



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HORMON POZİTİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
YÜKSEK YOĞUNLUKLU LİPOPROTEİN-2 ALT FRAKSİYONU VE
ASTAKSANTİNİN İN VİTRO ETKİLERİ**

DUYGU TARHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. DERYA ÖZSAVCI
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HORMON POZİTİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
YÜKSEK YOĞUNLUKLU LİPOPROTEİN-2 ALT FRAKSİYONU VE
ASTAKSANTİNİN İN VİTRO ETKİLERİ**

DUYGU TARHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. DERYA ÖZSAVCI
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Duygu TARHAN

İmza



TEŞEKKÜR

Tanıştığım ilk günden beri benden desteğini esirgemeyen, yüksek lisans eğitim sürecimde tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana her konuda yol gösteren, kılavuz olan, samimiyeti, mütevazılığı, naifliği ile kendisine hayran bırakan, tez danışmanım, değerli hocam Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Derya ÖZSAVCI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitim sürecinde değerli bilgileri ile gelişimime destek olan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKINAR' a teşekkürlerimi sunuyorum.

Deney aşamasında bana desteğini esirgemeyen, her zaman pozitif kişiliği ile anımsayacağım Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Merve GÜRBOĞA' ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisansa başlamama vesile olan, desteğini üzerimden hiç çekmeyen, zarif, güzel kalpli, çalışkan, yol arkadaşım, canım dostum, kardeşim Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Müjgan ÇUBUK' a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bitmeyen okuma aşkımı sonsuz destekleyen, şefkati, sakinliği, hep yapıcı tutumu, sevgisi ile arkamda duran canım eşim Caner TARHAN' a, bana bu hayatta en çok sevdiğim annelik duygusunu yaşatan, sabırla, güzelliğiyle, başarılarıyla ve zarifliği ile gurur kaynağım olan, kalbim, canım kızım Naz TARHAN' a sonsuz minnetimi sunarım.

Beni hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan okutan, büyüten ve her koşulda destek olan canım annem Gülay ALPSOY' a ve canım babam İbrahim ALPSOY' a teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak bu hayatta koşulsuz sevildiğimi hissettiren, hep yanımda olan sevgili ablam Esin ALPSOY GÖZLEK' e ve kardeşim Y. Mehmet Alpsöy'a, asaleti, vicdanlı duruşu ile herkese örnek olan, kızıma kardeş olan yeğenim Can GÖZLEK' e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1.Tarihçe	7
4.2.Meme Kanseri Alt Tipleri	10
4.3.Meme Kanseri Evreleri	14
4.4.Meme Kanseri Risk Faktörleri	18
4.4.1. Cinsiyet	18
4.4.2. Yaşlanma	18
4.4.3. Aile öyküsü.....	18
4.4.4. Üreme faktörleri.....	18
4.4.5. Östrojen	18
4.4.6. Yaşam tarzı	19
4.5. Lipoprotein Metabolizması ve Sınıflandırılması.....	19
4.5.1. Şilomikronlar	21
4.5.2. Şilomikron kalıntıları	22
4.5.3. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL).....	22
4.5.4. Ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)....	23
4.5.5. Düşük yoğunluklu lipoprotein parçacıkları	23
4.5.6. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL).....	23
4.6. Meme Kanseri ile Kolesterol Arasındaki İlişki	24
4.7.Meme Kanseri ile HDL Arasındaki İlişki	24
4.8.SR-B1 Reseptörü	31
4.8.1. Özet noktalar.....	40
4.9.Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz	40
4.9.1. Meme dokusunda apoptozun saptanması ve miktarının belirlenmesi.....	42
4.9.2. Neden meme kanserinde apoptoza bakılır?	42
4.10.Astaksantin.....	43
5. GEREÇ ve YÖNTEM	46
5.1.Gereçler	46
5.1.1. Hücre kültürü	46

5.1.2. Laboratuvar gereçleri	46
5.1.3. Kimyasallar	46
5.2.Yöntem.....	47
5.2.1. Hücre kültürü	47
5.2.2. Astaksantin ve HDL-2'nin hazırlanması	47
5.2.3. Astaksantin ve HDL-2'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki	48
antiproliferatif etkinliğinin belirlenmesi	
5.2.4. MCF7 hücrelerinde apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının incelenmesi	49
6. BULGULAR	51
6.1.Astaksantin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi	51
6.2.HDL-2'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi	52
6.3.Astaksantin ve HDL-2 Kombinasyonunun MCF-7 Hücreleri Üzerindeki	53
Proliferasyona Etkisinin Belirlenmesi	
6.4.RayBio® C-Serisi, İnsan Apoptoz Antikor Array C1 Kiti ile	54
MCF 7 Hücrelerinde Hücre Apoptoz Mekanizmalarının İncelenmesi	
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	59
8. KAYNAKLAR	63
9. ÖZGEÇMİŞ	67
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	68
10.1.Bildiri (Poster veya Sözel)	68

KISALTMALAR LİSTESİ

ABCA-1: ATP bağlayıcı kaset proteini

AKT: Protein kinaz B

AST: Astaksantin

BL1: Bazal benzeri 1

BL2: Bazal benzeri 2

CCND1: Siklin D1 geni

ER: Östrojen

(ER⁺): Östrojen reseptörü pozitif

(ER⁻): Östrojen reseptörü negatif

HER2+: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HDL-C: Yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol

HNGCoA: 3-Hidroksi-3- koenzimA redüktaz enzimi

HSL: Hormona duyarlı lipaz

IDL: Ara yoğunluklu lipoprotein

IM: İmmünomodülatör

LAR: Luminal androjen reseptörü

LCAT: Lesitin kolesterol asiltransferaz

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LIMP-2: Lizozomal İntegral Membran Proteini-2

LPL: Protein lipaz

M: Mezenkimal

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

MSL: Mezenkimal kök benzeri

MYC: Normal koşullarda hücre büyümesini kontrol eden genlerden biri

PI3: Fosfatidilinositid-3- kinaz

PR: Progesteron

(PR⁺): Progesteron reseptörü pozitif

(PR-): Progesteron reseptörü negatif

PLTP: Fosfolipid transfer proteini

SR-B1: Çöpçü reseptör sınıfı B, tip I.

TNF: Tümör nekroz faktör

TNBC: Üçlü negatif meme kanseri



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1.	Meme kanserinin moleküler alt tipleri	11
Şekil 2.	Meme kanseri başlangıç ve ilerleme teorisi	13
Şekil 3.	Lipoprotein molekülü	20
Şekil 4.	SR-B1'in ters kolesterol taşınmasındaki rolü.....	34
Şekil 5.	Kolesterolce zengin HDL'nin SR-B1 tarafından yakalanması.....	36
Şekil 6.	HDL'nin yükünü sitoplazmaya bırakması.....	37
Şekil 7.	HDL'nin kan dolaşımına geçmesi	37
Şekil 8.	HDL-2'nin diyaliz edilmesi.....	47
Şekil 9.	Plakalara eklenen membranların yıkanması.....	50
Şekil 10.	Astaksantin MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi	51
Şekil 11.	HDL-2 uygulanan MCF-7 hücrelerinde, MTT metodu ile hücre	52
	proliferasyonunun belirlenmesi	
Şekil 12.	Uygulanan kombinasyonların (Astksantin+HDL-2), MCF-7	53
	hücrelerindeki proliferasyona etkisi	
Şekil 13.	Tek başına HDL-2 (10 µg/ml) uygulanan MCF-7	55
	hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü	
Şekil 14.	Tek başına HDL-2 (10 µg/ml) ve tek başına HDL-2 (50 µg/ml).....	55
	uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü	
Şekil 15.	(HDL-210 µg/ml ve AST 100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7.....	55
	hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü	
Şekil 16.	Tek başına HDL-2 (50 µg/ml) uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik...	57
	proteinlerin membran görüntüsü	
Şekil 17.	(HDL-2 50 µg/ml ve AST 100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7.....	57
	hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü	

TABLO LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Tablo 1. Meme kanseri evre 0.....	14
Tablo 2. Meme kanseri evre 1.....	15
Tablo 3. Meme kanseri evre 2.....	15
Tablo 4. Meme kanseri evre 3.....	16
Tablo 5. Meme kanseri evre 4.....	17
Tablo 6. Lipoproteinler.....	20
Tablo 7. Astaksantin MCF-7 hücre hattında proliferasyon ve inhibisyon..... Değerleri	52
Tablo 8. MCF-7 hücre hattında HDL-2'nin proliferasyon ve inhibisyon..... Değerleri	53
Tablo 9. MCF-7 hücre hattında astaksantin ve HDL-2 kombinasyonunun proliferasyon ve inhibisyon değerleri	54
Tablo 10. HDL-2(10 µg/ml) ve HDL-2 (10 µg/ml) +AST (100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptozda yer alan proteinlerin değişimi	56
Tablo 11. HDL-2(10 µg/ml) ve HDL-2 (10 µg/ml) +AST (100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptozda yer alan proteinlerin değişimi	58

1. ÖZET

Tezin başlığı : Hormon Pozitif Meme Kanseri Hücre Hatlarında Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein-2 Alt Fraksiyonu ve Astaksantin'in İn Vitro Etkileri.

Öğrencinin Adı : Duygu Tarhan

Danışmanı : Prof. Dr. Derya Özsavcı

Programın Adı : Eczacılık Fakültesi/ Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programı

Amaç: Bu çalışmanın amacı, hormon pozitif meme kanser hatlarında astaksantin ve HDL-2 alt fraksiyonunun, hücre sinyal yollarında ve apoptozda, reseptör aracılı etkilerini araştırmak ve kombinasyonlarının sinerjik etkilerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu tez çalışmasında, MCF-7 hücreleri üzerinde, astaksantin, HDL-2 alt fraksiyonu ve kombinasyonunun anti-kanserojen, apoptotik ve SR-B1 reseptörü üzerindeki etkileri araştırıldı. MCF-7 hücrelerine, astaksantin, 10-50-100-250-500 μ M ve HDL-2, 10-25-50 μ g/ml konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra (24 saat), MTT yöntemi ile hücre proliferasyonu incelendi. MTT sonuçlarından elde edilen bulgular doğrultusunda astaksantin, HDL-2 ile kombine edilerek tekrar uygulandı ve MTT ile değerlendirildi. Kombinasyonun, apoptotik hücre ölüm mekanizmalarına olan etkisi, RayBio® C-Serisi, İnsan Apoptoz Antikor Array C1 ile incelendi.

Bulgular: Astaksantin'in değişen dozlarda MCF-7 hücre hattında, hücre proliferasyonunu azalttığı, apoptozu arttırdığı görülmüştür. Bu etki HDL-2'de oldukça az gözlenmiştir. Astaksantin ve HDL-2 kombinasyonu ile, antiproliferatif ve apoptotik etki daha fazla görülmüştür.

Sonuç: Astaksantin HDL-2' ye oranla tek başına hormona duyarlı epitelyal meme kanseri hücre hattında antiproliferatif etki gösterdiği, ancak kombinasyonlarının apoptoz üzerinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız meme kanseri tedavisine umut vadeden bir bakış açısı sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: Yüksek dansiteli lipoprotein, hormona duyarlı meme kanseri, apoptoz, astaksantin ve kanser

2. SUMMARY

Title of Thesis : In Vitro Effects of High Density Lipoprotein-2 Sub-fraction and Astaxantine in Hormone Positive Breast Cancer Cell Lines.

Student Name, Surname : Duygu Tarhan

Supervisor Name : Prof. Dr. Derya Özsavcı

Program Name : Pharmacy / Biochemistry Master's Program

Objective: The aim of this study is to investigate the receptor -mediated effects in hormone positive breast cancer lines, astaxanthin and HDL-2 sub -fraction, in cell signal pathways and apoptosis, and to determine the synergistic effects of combinations.

Material and Methods: In this thesis study, the anti-carcinogenic, apoptotic and SR-B1 receptor effects of astaxanthin and HDL-2 subfraction on MCF-7 cells were investigated. After applying astaxanthin at 10-50-100-250-500 μ M and HDL-2 at 10-25-50 μ g/ml concentrations to MCF-7 cells (24 hours), cell proliferation was examined by the MTT method. In line with the findings obtained from the MTT results, it was re-applied in combination with astaxanthin and HDL-2 and evaluated with MTT. The effect of the combination on apoptotic cell death mechanisms was examined with RayBio® C-Series, Human Apoptosis Antibody Array C1.

Results: It has been observed that astaxanthin alone, at varying doses, reduce cell proliferation and increase apoptosis in the MCF-7 cell line. This effect was very little with HDL-2. Antiproliferative and apoptotic effects were observed more with the combination of astaxanthin and HDL-2.

Conclusion: It has been observed that only astaxanthin has a strong antiproliferative effect on the hormone-sensitive epithelial breast cancer cell line compared to HDL-2, but their combination is more effective on apoptosis. Our results provide a promising perspective on breast cancer treatment.

Keywords: High-density lipoprotein, hormone-sensitive breast cancer, apoptosis, astaxanthin and cancer

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri dünya genelinde ciddi ve önemli bir ölüm nedenidir (Samadi ve ark., 2018). Meme kanseri kadınlarda sık görülmektedir. Örneğin 2012 yılında yapılan küresel kanser istatistikleri; yaklaşık 1,7 milyon kadına meme kanseri teşhisi konduğunu ve 521.900 kadının meme kanserinden öldüğünü göstermiştir. Ayrıca yapılan pek çok çalışma meme kanserinin oldukça heterojen bir hastalık olduğunu göstermiştir (Yin ve ark., 2020). Uygulanan tedaviler ve hastaların bu tedavilere verdiği yanıtlar arasında büyük farklılıklar görülmektedir (Yin ve ark., 2020).

Östrojen reseptörü pozitif (ER⁺), meme kanserinin en sık görülen alt tipidir. ER(+) meme kanseri tedavisi, östrojen üretimi inhibe edilerek ve/veya direkt olarak östrojen reseptörüne müdahale edilerek gerçekleştirilmektedir. Yapılan araştırmalarda teşhis konulan meme kanserlerinin büyük çoğunluğu (ER⁺) olarak bulunmuştur. Örneğin; ABD'de her yıl 250.000'den fazla meme kanseri teşhis edilmektedir ve bunların yaklaşık %80'i (ER⁺)'tir (Hanker ve ark., 2020).

Meme kanseri, hücre büyümesi, yapışması ve göçünden sorumlu sinyal yollarını etkileyerek kolesterol membran içeriğinden etkilenir. Ayrıca meme kanseri ile HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) arasındaki ilişki de araştırılan konular arasındadır. Serum HDL-kolesterol düzeyi ile meme kanseri riski arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiş bulgular olsa da bunun tersiyle ilgili bazı bulgular da vardır ve bu nedenle ikisi arasındaki durum belirsizliğini korumaktadır.

Birçok çalışma, meme kanseri gelişimini etkileyen çevresel faktörler arasından, iki önemli risk faktörü olarak diyet ve obeziteyi göstermektedir (Samadi ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda kolesterol metabolizması ve meme kanserinin değerlendirilmesi yapılmış olup östrojen ve HDL konsantrasyonları arasında bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Serum östrojen konsantrasyonları ile ilişkili olarak artan bir tümör gelişimi ve ilerlemesi riski olduğu bilinmektedir (Samadi ve ark., 2018).

HDL dolaşımdaki kolesterolün taşınmasında önemli bir rol oynar. SR-B1 reseptörüne bağlanarak protein kinaz (MAPK) ve AKT sinyal yollarını destekler. Bir diğer önemli nokta ise; agresif tümörlerde SR-B1 reseptörünün ekspresyonunun artmış olmasıdır. Bunun sonucunda da HDL ve SR-B1 reseptörünün işlevine ve tümörlerin büyümesine yönelik çalışmalar yapılmış ve HDL'nin migrasyonu teşvik etme, çeşitli sinyal yollarını indüklemeye yeteneğinin olduğu tespit edilmiştir.

Meme kanserindeki bu yeni bulgular, HDL'nin çeşitli sinyal yollarını düzenleyebileceğini ve dolayısıyla tümör ilerlemesini değiştirebileceğini düşündürmektedir.

Birlikte ele alındığında, bulgular SR-B1 ve HDL'yi meme kanseri tedavisi için potansiyel terapötik hedefler olarak tanımlayabilir (Danilo ve ark., 2013).

Astaksantin (AST), kanser insidansını potansiyel olarak azaltmak veya kanser hücrelerinin yayılmasını önlemek için antioksidan, antienflamatuvar ve oksidatif stres azaltıcı özellikler gibi işlevlere sahip deniz kökenli bir ketokarotenoiddir. AST bir ksantofil karotenoididir (3,3'-dihidroksi-beta, beta-karoten-4,4'-dion) ve algler, karides, somon gibi çeşitli deniz canlılarında bulunan kırmızı renkli bir pigmenttir. AST, diğer karotenoidlerden farklı olarak daha fazla antioksidan ve antienflamatuvar etkiye sahiptir ve oksidatif stres ve enflamasyona bağlı oluşan hastalıkları önlemek ve tedavisine destek olmak için birçok defa ve kapsamlı olarak çalışılmıştır. AST'nin anti-kanserojen etkisi ve bununla ilgili mekanizmaları anlamak için birkaç çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar sonucunda AST'nin oksijen aracılı sitotoksiteyi önlediği, tümör bağışıklığını modüle ettiği ve fosfatidilinositid-3-kinazları (PI3), protein kinaz B/AKT ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyalini inhibe ederek intrinsik apoptozu tetiklediği görülmüştür. Bu nedenle, bu sonuçlar AST'nin kanser hücrelerinde güçlü apoptoz yapıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AST'nin hücrelerde apoptozu nasıl neden olduğuna dair daha ayrıntılı araştırmalara gerek olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasının amacı, hormon pozitif meme kanser hatlarında, astaksantin ve HDL-2 alt fraksiyonunun, hücre sinyal yollarına, reseptör aracılı apoptotik mekanizmaya etkilerini araştırmak ve meme kanser tedavisine yeni bir bakış açısı kazandırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

Meme kanseri dünya genelinde ciddi ve önemli bir ölüm nedenidir (Samadi ve ark., 2018). Meme kanseri kadınlarda sık görülmektedir. Örneğin 2012 yılında yapılan küresel kanser istatistikleri; yaklaşık 1,7 milyon kadına meme kanseri teşhisi konduğunu ve 521.900 kadının meme kanserinden öldüğünü göstermiştir. Ayrıca yapılan pek çok çalışma meme kanserinin oldukça heterojen bir hastalık olduğunu göstermiştir (Yin ve ark., 2020).

Uygulanan tedaviler ve hastaların bu tedavilere verdiği yanıtlar arasında büyük farklılıklar görülmektedir (Yin ve ark., 2020).

Meme kanserini ayrıca histolojik özelliklere dayalı olarak hormon reseptörü pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'yi (HER2+) aşırı eksprese eden ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak sınıflandırılan bir hastalık olarak da tanımlayabiliriz (Nagini, 2017).

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ise; östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'nin (HER2) negatif ekspresyonu olan bir meme kanseri türüdür (Yin ve ark., 2020).

Yapılan pek çok araştırma; TNBC'nin büyük oranda, mevcut meme kanseri hastalarının yaklaşık %15-20'lik kısmını kapsayan, premenopozal dönemdeki 40 yaş altı kadınlarda ortaya çıktığını göstermektedir. Ve bu araştırmalar ayrıca göstermiştir ki; öteki meme kanseri alt tiplerine göre, TNBC hastalarının yaşama süresi daha azdır. Hatta verilere göre, teşhis konduktan sonraki 5 sene içerisinde meydana gelen ölüm oranı %40 civarındadır.

TNBC fazlaca invaziv özelliktedir yani geliştiği ilk dokuda veya hücrelerde büyümekte ve çevredeki diğer sağlıklı dokulara yayılmaktadır. TNBC tanısı almış kişilerin yaklaşık %46'sında metastaz beklenen bir durumdur. Hatta kanser hücrelerinin orijininde kan damarları veya lenf damarları yoluyla vücudun uzak bir bölgesine metastazı da sık görülür. Metastaz sonrası ortalama yaşam süresi istatistiksel olarak yaklaşık 13,3 aydır ve operasyon sonrası yeniden nüks etme oranı ise %25'e kadar çıkmaktadır. Metastaz genellikle beyinde ve iç organlarda görülmektedir. Uzak organlara metastaz genellikle teşhis konduktan sonraki 3. yılda görülmektedir. TNBC tanısı almamış diğer kanser hastalarında ortalama nüks etme süresi 35-67 ay iken, TNBC tanısı almış hastalarda bu süre daha kısa olup 19-40 aydır. TNBC tanısı almış ve daha sonra nüks yaşamış hastaların nüks gerçekleştikten sonraki yaşam süresi 3 ay gibi çok kısa bir süredir ve bu istatistiksel olarak TNBC tanılı nüks yaşamış hastaların %75'i gibi yüksek bir oranı kapsamaktadır (Yin ve ark., 2020).

2011 yılında Lehmann ve arkadaşları 587 TNBC hastasından kanser hücresi numunelerini almış ve bunların gen ekspresyon profilini çıkarmışlardır. Bu çalışmanın sonucu olarak da TNBC'yi altı alt tipe ayırmışlardır. Bunlar;

- 1- Bazal benzeri 1 (BL1),
- 2- Bazal benzeri 2 (BL2),
- 3- Mezenkimal (M),
- 4- Mezenkimal kök benzeri (MSL),
- 5- İmmünomodülatör (IM)
- 6- Luminal androjen reseptörü (LAR) olarak bilinmektedir (Yin ve ark., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada meme kanseri sonrası hastanın takibinin daha net yapılabilmesi ve kişiselleştirilebilmesine yönelik fikirler elde edebilmek için kanser alt tiplerinin farklı metastaz modelleri değerlendirilmiştir ve beş intrinsik alt tip olarak sınıflandırılmıştır. Bunlar;

- 1-Luminal A (ER+, Her2-, G1/2)
- 2-Luminal B/Her2 negatif (ER+, Her2-, G3)
- 3-Üçlü
 - 3.1-Üçlü pozitif (ER+, PR+, Her2+)
 - 3.2-Her2 ile zenginleştirilmiş (ER-, Her2+)
 - 3.3-Üçlü negatif (ER-, PR-, Her2-).

Bu sınıflandırma için yapılan çalışmada, primer meme kanserli 2284 kadın hastanın tümör örneği kullanılmıştır (Kast ve ark., 2015).

Ayrıca bu çalışmada meme kanserinin ilk teşhis edildiğindeki mevcut evresi, uzak dokulara metastaz yaptığının ilk tespit edildiği zamanki evresi ve yeri analiz edilmiştir. Bu deneklerde 3 yıl içerisinde uzak metastazsız, nüksüz olarak yukarıda saydığımız alt tiplerin ölüm oranları birbirinden farklı bulunmuştur. Bu oranlar; Her2 ile zenginleştirilmiş alt tipte %66,8, üçlü negatif tipte %45,5 iken, üçlü pozitif tipte %81,7 bulunmuştur.

Yine aynı çalışma göstermiştir ki; hormon reseptör pozitif olan alt tipte hastalık yüksek oranda ilk bölge olarak kemiğe metastaz yaparken, hormon reseptör negatif alt tipteki hastalık iç organlara metastaz yapmaktadır. Bu bilgilere ilave olarak; luminal A alt tipi, kemik metastazı vakalarının %45'ini oluştururken, Her2- pozitif ve üçlü negatif alt tiplerde visseral metastaz özellikle beyin metastazı kemik metastazından daha sık görülmüştür (Kast ve ark., 2015).

Östrojen reseptörü pozitif (ER⁺), meme kanserinin en sık görülen alt tipidir. ER(+) meme kanseri tedavisi, östrojen üretimi inhibe edilerek ve/veya direkt olarak östrojen reseptörüne müdahale edilerek gerçekleştirilmektedir.

Yapılan araştırmalarda teşhis konulan meme kanserlerinin büyük çoğunluğu (ER⁺)'tir. Örneğin; ABD'de her yıl 250.000'den fazla meme kanseri teşhis edilmektedir ve bunların yaklaşık %80'i (ER⁺)'tir (Hanker ve ark., 2020).

Bu tümörlerin büyük çoğunluğu başlangıçta ER'nin östrojen tarafından aktive edilmesine bağlı oluşmaktadır. Şöyle ki; ER α ve ER β nükleer reseptörlerinin östrojen kaynaklı aktivasyonu, hayatta kalma yanlısı genlerin transkripsiyonu (genomik düzenleme) ve hücrel sinyalleşmenin aktivasyonu (genomik olmayan düzenleme) yoluyla hem normal hem de kanserli meme dokusunun çoğalmasını ve hayatta kalmasını desteklemektedir. Östrojene bağlandıktan sonra ER, dimerize olmakta ve çekirdeğe doğru yer değiştirmektedir, burada ER dimerleri, transkripsiyonel olarak aktif bir ER kompleksi oluşturmak için koaktivatörlere (CoA) bağlanmaktadır. Östradiol hormonu da dahil olmak üzere östrojenler, dişi meme ve üreme fizyolojisinin büyüme ve gelişmesinde zorunlu bir rol oynamaktadır. Östrojene bağlı ER, kısmen MYC (normal koşullarda hücre büyümesini kontrol eden genlerden biri) ve CCND1 (siklin D1 geni) ekspresyonunu uyararak hücre döngüsü ilerlemesini indüklemektedir. Östrojen ile uyarılan ER ayrıca, TGF α , IGF-1, AREG (amphiregulin) ve EGF dahil olmak üzere meme gelişimi için önemli olan çeşitli büyüme faktörlerinin transkripsiyonunu yukarı doğru düzenleyerek mitojenik sinyali arttırmaktadır. Normal meme bezi gelişimini yöneten östrojen-ER kaynaklı mekanizmalar ayrıca meme hiperplazisini ve tümör oluşmasını düzenlemektedir (Hanker ve ark., 2020).

4.1 Tarihçe

Meme kanseri, tanımlanan en eski kanser türlerinden birini oluşturmaktadır. Antik Mısır'dan günümüze meme kanseri, devam eden bir araştırma alanı olmuştur. Meme kanserinin en eski tanımını yapan Edvin Smith Cerrahi Papirüsü Mısır'da yaklaşık MÖ 1600 yılına ait olarak bulunmuştur. Bu papirüs sekiz meme tümörü büyümesi veya ülseri vakasını anlatmaktadır (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Hipokrat (MÖ 460-377), iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki farkı anlayan ilk kişi olarak bilinmektedir. Kansere karsinom adını vermesiyle bilinir. Tümörü yengece benzettiği için bu adı vermiştir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Roma dönemine gelindiğinde Aulus Cornelius Celsus (MÖ 25 – MS 50), meme kanseri olgularına koltuk altı lenf nodu büyümesinin de eşlik ettiğini tespit etmiştir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Celsus, erken evrede tespit edilen tümörlerin cerrahi olarak çıkarılmasının uygun olabileceğini ileri sürmüştür. Hastalıkların nüks etmesini, koltuk altı bölgesinde şişliklerin bulunmasını ve bunların vücuda yayılmasını açıklamıştır ve bugün bunların hepsi metastatik meme kanserini tanımlamakta kullanılan özellikler olarak kabul edilmektedir. Yine bu dönemde Bergamalı Galen (MS 2. yüzyıl), tümörlerin karaciğerde safra atılımından kaynaklandığını öne süren bir teoriyi benimsemiştir. Safra dalak aracılığı ile temizlenmezse damarlar tıkanır ve tümörler oluşur diye düşünmüştür (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Bizans ve İslam Tıbbı döneminde İbn Sina (981–1037), cerrahi tedavi olarak mastektomiye önermediğini bildirmiştir. Bunun yanında Abulcasis (936–1013), yalnızca erken evrede tespit edilen tümörlerin cerrahi yöntemle çıkarılabileceğini çevre dokuların ise dağlanması önermiştir. Rhazes (865–925), eğer tümör tamamen çıkarılamazsa kanserli bölgede büyüme olabileceğine dair fikir beyan etmiştir. Böyle durumlarda sadece dağlamanın uygun olabileceğini tavsiye etmiştir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Orta çağlara gelindiğinde William of Saliceto (1210–1277), yalnızca tam çıkarılma mümkün olduğu durumlarda meme kanserinin koterize edilmesi yerine cerrahiye desteklemiştir. Theodoric of Bologna (1205–1298) ve Henri de Mondeville (1260–1320) gibi diğerleri, Galen'in kanser teorisini benimsemiş ve cerrahiye koterizasyonla birleştirmişlerdir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Rönesans'ta Andreas Vesalius (1514-1564), meme kanserlerini eksize ederken koter yerine tel veya iplik ile bağlama yöntemi kullanmıştır. Ambroise Paré (1510–1590), ilerlemiş meme kanserinde cilt infiltrasyonunu ve bitişik lenf düğümlerini tarif ederken, küçük meme tümörlerini eksize etmiş ancak sıcak koter yerine sülfürik asit koymuştur. Michael Servetus (1511-1553), pektoralis majorun çıkarılmasıyla birlikte lenf nodu eksizyonunu önermiş ve böylece ilk kez modern çağdaki mastektomi kavramını ortaya koymuştur. Nicolaes Tulp (1593-1674), meme kanserinin yavaş invaze olan bir zehir olduğuna inanarak bulaşıcı olduğu sonucuna varmış ve erken ameliyat ihtiyacını desteklemiştir. Richard Wiseman (1622-1676) gerçekleştirdiği 12 mastektominin sonucunda; iki hastanın ameliyatta öldüğünü, sekiz hastanın uzun zaman geçmeden ilerleyen kanserden öldüğünü ve iki hastanın iyileştiğini beyan etmiştir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

18. Yüzyılda birçok farklı görüş varlığı gözlemlenmiştir. Gerard Tabor, operasyonun basitleştirilmesini savunurken, Lorenz Heister (1683-1758), mastektomiye savunmuş ve lüzumu halinde kaburgaların da alınarak yapılabileceğini bildirmiştir. Jean Louis Petit (1674-1750), ameliyatlarında hem memeyi hem göğüs kasını hem de lenf düğümlerini çıkarmıştır. Bernhard Perilhe (1735–1804) ise, pektoralis majör kasını yani büyük göğüs kasını da çıkarmıştır (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

19. Yüzyılda, 1846'da Horace Wells'in (1815-1848) nitroz oksidi keşfetmesi ve 1867'de Joseph Lister'in (1827-1912) karbolik asit spreyi ile antisepsiyi tanıtmalarıyla cerrahide yeni bir çağ başlamıştır. Alfred Velpeau (1795-1867), göğüs kafesinin etrafındaki derinin önemli bir bölümünü tutan bir karsinom olan meme kanserini ilk tanımlayan kişidir. Joseph Pancoast (1805 1882), ilk kez memenin ve ilişkili infiltre aksiller lenf nodlarının tümünün alınması ihtiyacını vurgulamıştır. Sir James Paget (1814-1899), meme kanserinden önce memenin

ucunda meydana gelen yapısal bozuklukları tanımlamıştır (Paget hastalığı) (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Pancoast'ın düşüncesini biraz daha geliştiren Charles Hewitt Moore (1821-1870), cerrahi sırasında tümörün kesilip ortaya çıkarılmaması gerektiğini ve nüksetmesinin birincil bölgeden yayılarak olduğunu bildirmiştir. Samuel Weissel Gross (1837-1889), 3 yıllık göreceli yüksek bir sağkalımı, yalnızca tüm memenin değil, sırttaki latissimus dorsi kasına doğru uzanan pektoralis majör üzerindeki ince doku tabakasının ve koltuk altı bölgesinin de alınmasından kaynaklandığını açıklamıştır. William Stewart Halsted (1852–1922) ve Willy Meyer, 1894'te yukarıda belirtilen cerrahi tekniği birbirinden bağımsız olarak ancak neredeyse eş zamanlı yayınlarak, “radikal mastektomi” olarak bilinen tekniği tasarlamışlardır ve bu cerrahi yöntem, 70 yılı aşkın süredir meme kanseri cerrahisinde benimsenmiştir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Meme kanserinin hormona bağımlı olabileceğinin düşünülmesi ve bunun keşfedilmesine devamında kemoterapinin kullanılmasına kadar kanser tedavisi yönetiminin seyri değişmemiştir. William Conrad Röntgen (1845–1923), 1895'te radyoterapi ve mamografi için temel oluşturan X ışınlarını tanıtmıştır. Emile Grubbe, bir meme kanseri hastasına terapötik amaçla radyasyon uygulayan ilk kişidir (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

20. yüzyılda adrenalektomi ve hipofizektomiye kapsayan sekonder endokrin cerrahisi oferektomiden sonra gelişme göstermiştir. Ancak Sir Hugh Lett'dir (1876-1964), ikincisinin meme kanseri hastalarına sağkalım ile ilgili bir avantaj sağlamadığını kanıtlamıştır. Zamanla endokrin cerrahisinin yerini hormon tedavisi ve östrojen üretimi indükleyicileri veya luteinizan hormon salan hormon agonistleri, östrojen reseptör modülatörleri ve aromataz inhibitörleri ile etkilerini azaltmaya yönelik farmakolojik yöntemler almıştır. George Edward Pfahler (1874–1957), operasyon sonrası radyasyonu devam tedavisi olarak sunarak evre II meme kanseri için 5 yıllık sağkalım süresini uzatmıştır. 20. yüzyılın ortalarına gelindiğinde, bilim insanlarının çoğu, genişletilmiş radikal mastektomilerle radikal cerrahinin sonuçlarını iyileştirmeye çalışmışlardır. 1971 yılına kadar radikal mastektomi kontrendikasyonları tanımlanamamıştır (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

Yine 20. yüzyılda meme kanserine yatkın bireylerin BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki predispozan mutasyonları keşfedilmiş ve bu keşif, genetik aktarımı doğrulamış ve büyük risk altındaki bireylerin belirlenmesi için önemli bir yol gösterici olmuştur (Ekmektzoglou ve ark., 2009).

4.2 Meme Kanseri Alt Tipleri

Meme kanseri, değişik biyolojik davranışa, klinik risk faktörüne, doğal öyküye, bireyselleştirilmiş tedavi yanıtına ve prognoza sahip beş alt tip içeren heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri, dört belirteç (östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2 ve Ki-67), luminal A (ER- ve/veya PR) kullanılarak 5 alt tipte sınıflandırılmaktadır:

- 1- Pozitif/HER2-negatif /düşük Ki-67
- 2- Lümen B (ER- ve/veya PR-pozitif/HER2-negatif/yüksek Ki-67)
- 3- HER2-pozitif lümen B (ER- ve/veya PR-pozitif/ HER2 aşırı ekspresyonu/herhangi bir Ki-67)
- 4- Luminal olmayan HER2-pozitif (ER ve PR yok/HER2 aşırı ekspresyonu)
- 5- Üçlü negatif (ER ve PR yok/HER2-negatif).

Beş moleküler alt tipi içeren meme kanseri, farklı biyolojik davranışa, doğal geçmişe, bireyselleştirilmiş tedaviye yanıtı ve prognoza sahiptir (Li ve ark., 2015).

Başka bir kaynağa göre meme kanseri; invazif meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) ekspresyonu olmak üzere dört ana moleküler alt tipe ayrılabilir.

1. Luminal A Meme Kanseri (ER+ ve/veya PR+ ve HER2-); meme kanserinin yaklaşık %60'ını oluşturur ve iyi bir seyir göstermektedir.
2. Luminal B Meme Kanseri (ER+ ve/veya PR+ ve HER2+); meme kanserinin yaklaşık %30'unu oluşturur ve bir proliferasyon belirteci olan yüksek ki67 (>%14) ve kötü hastalık seyri ile ilişkilidir.
3. HER2 Meme Kanseri (ER-, PR- ve HER2+); meme kanserinin yaklaşık %10'unu oluşturur ve ayrıca kötü bir hastalık seyri göstermektedir.
4. Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) (ER-, PR- ve HER2-); meme kanserinin yaklaşık %15-20'sini oluşturur ve diğer meme kanseri moleküler alt tiplerine kıyasla daha fazla saldırganlık ve daha kötü hastalık seyri gösterir ve yüksek oranda genç kadınlarda görülmektedir (Burguin ve ark., 2021).

Moleküler alttip	Luminal A	Luminal B	HER2	TNBC
ER/PR	+ -			
HER2	- + -			
Sıklık	% 50-60	% 30	% 10	% 10-20
Seviye	Düşük Yüksek			
Prognoz	İyi Zayıf			
5 Yıllık hayatta kalma oranı	% 94.3	% 90.5	% 84.0	% 76.9
Tedavi	Endokrin tedavisi Anti-HER2 tedavisi Kemoterapi			

Şekil 1. Meme kanserinin moleküler alt tipleri

Hergueta-Redonndo ve Ark., Engstrom ve Ark., Hennings ve Ark., Fragomeni ve Ark. 'nın yaptığı çalışmada 5 yıllık sağkalım oranı SEER'in en son sağkalım istatistiklerinden elde edilmiştir (Burguin ve ark., 2021'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %70' i östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) veya her ikisini de kapsar ve bu tür tümörler hormon reseptörü pozitif (HR+) olarak adlandırılmaktadır. ER ve PR' nin tespiti için ve insan epidermal büyüme reseptörü 2 (HER2) protein aşırı ekspresyonu ve/veya HER2 gen amplifikasyonu için testler yapılmakta ve bu testlerin sonuçlarına göre uygun tedavi kararları alınmaktadır (Brufsky & Dickler, 2018).

İşlevsel olarak farklı iki östrojen reseptörü (ER) vardır. Bunlar;

1-ER-alfa (ER α , ESR1 geni)

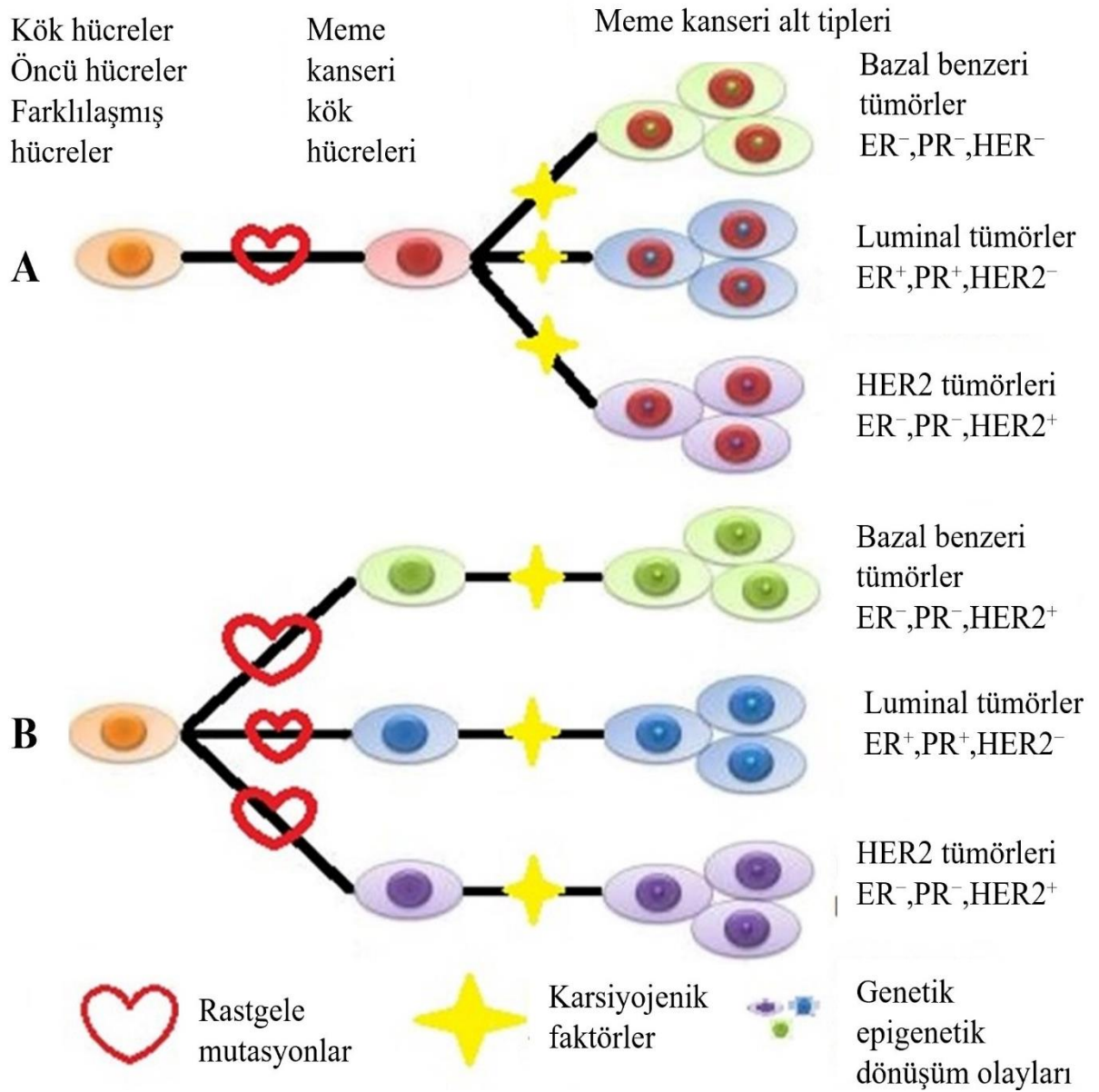
2-ER-beta (ESR2 geni).

ER α , memede ve östrojen kaynaklı meme kanserinde baskın bir endokrin düzenleyici proteindir. Östrojen, ER' ye yüksek afinite göstererek ve spesifik olarak bağlanmaktadır. Nükleer yol yani klasik yol ve alternatif yol yani nükleer olmayan yol olmak üzere iki ana yol türü aracılığıyla görev yapmaktadır. Bu nükleer ve nükleer olmayan yollar içindeki genlerin başarılı bir şekilde hedeflenmesi klinik olarak çok önemlidir. Klasik yol boyunca östrojen-ER kompleksi, ligand bağlanması üzerine dimerize olmakta ve spesifik DNA dizileri ile etkileşime girmektedir. Spesifik DNA dizileri çekirdek düzenleyici proteinler ve östrojene duyarlı

elementler olarak adlandırılmaktadır. Bu etkileşimler, hücre döngüsü, DNA replikasyonu, hücresel farklılaşma, apoptoz ve anjiyogenezin düzenlenmesine katılan çok çeşitli genlerin transkripsiyonunu desteklemektedir.

ER'nin östrojenle alternatif yollardan bağlanması, sitoplazmada, çekirdek düzenleyici büyüme faktörü ve G-protein eşleşme sinyalleşmesini tetiklemektedir. Nükleer olmayan yollardaki ortak düzenleyiciler, reseptörleri (örneğin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü, fibroblast büyüme faktörü reseptörü [FGFR], HER2) ve kinazları (örn, mitojenle aktive olan protein kinazlar, reseptör tirozin kinaz, PI3K, AKT, mTOR, Src ve CDK) içermektedir. ER aynı zamanda liganddan bağımsız mekanizmalar yoluyla da aktive edilebildiğinden, büyüme faktörleri ve protein kinazlar arasındaki sinyallerin çakışması ER' yi aktive edebilen çok sayıda fırsat oluşturmaktadır (Brufsky & Dickler, 2018).





Şekil 2. Meme kanseri başlangıç ve ilerleme teorisi

Şekil 2'de farklı meme kanseri başlangıç ve ilerleme teorisi gösterilmiştir (A-B). A teorisine göre, tüm tümör alt tipleri aynı kök hücrelerden veya öncü (progenitor) hücrelerden türetilir.

B teorisine göre; tek bir kök hücrede (progenitör hücre, farklılaşmış hücre) başlatılır. Rastgele mutasyonlar, herhangi bir meme hücresinde kademeli olarak birikebilir ve yeterli sayıda mutasyon biriktiğinde tümör hücrelerine dönüşmesine yol açar (Sun ve ark., 2017'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

4.3. Meme Kanseri Evreleri

Amerikan Kanseri Ortak Komitesi (AJCC) anatomik bulgulara dayanan bir evreleme sistemi yayınlamıştır. Buna göre; T (tümör boyutu), N (nodül durumu) ve M (metastaz) dikkate alınarak evreleme yapılmıştır. Bu kısaca TNM sınıflandırılması olarak bilinmektedir.

Toplamda beş evre ve bu evrelerin alt sınıfları kanser ve onun yayılımı hakkında bilgi vermektedir.

T1: Tümör> 1-5 mm = T1a / Tümör> 5-10 mm=T1b / Tümör>10-20 mm= T1c

T2: Tümör> 20-50 mm

T3: Tümör> 50 mm

T4: Doğrudan yayılan herhangi bir boyutta tümör

Evre 0:

Henüz yağ ya da lenf dokusuna yayılım göstermemiş, süt kanallarında oluşmuş hücrelerdir. En erken evredir. Bu evrede tümör henüz oluşmadığı için tanı ancak görüntüleme yolu ile olabilmektedir.

Bu evrede;

Tablo 1. Meme kanseri evre 0

Evre	T	N	M
Evre 0	TİS	N0	M0

TİS: Karsinoma İn Situ yani non-invaziv yayılım göstermemiş

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

M0: Metastaz mevcut değil

Evre 1:

Bu evre 1A ve 1B olarak sınıflandırılmıştır. Yine oluşan hücreler çevre dokulara ve lenf bezlerine yayılmamıştır. Boyutları küçüktür.

Tablo 2. Meme kanseri evre 1

Evre	T	N	M
EVRE 1A	T1	N0	M0
EVRE 1B	T0	N1mi	M0
EVRE 1B	T1	N1mi	M0

Evre 2:

Bu evre 2A, 2B olarak sınıflandırılmıştır. Bu şamada tümör lenf bezlerine ve çevre dokulara yayılım yapabilmektedir. Genelde tümör boyutları küçüktür.

Tablo 3. Meme kanseri evre 2

Evre	T	N	M
EVRE 2A	T0	N1	M0
EVRE 2A	T1	N1	M0
EVRE 2A	T2	N0	M0
EVRE 2B	T2	N1	M0
EVRE 2B	T3	N0	M0

T1: Tümör boyunu <20 mm

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Hareketli, aynı tarafta I ve II aksiller (koltuk altı) lenf noduna metastazlar

M0: Metastaz mevcut değil

Evre 3:

Bu aşamada uzak dokulara metastaz yoktur ancak lenf bezlerine ve koltukaltı dokuya yayılım vardır. Tümör boyutu biraz da büyümüştür.3A, 3B ve 3C olarak sınıflandırılmaktadır.

Tablo 4. Meme kanseri evre 3

Evre	T	N	M
EVRE 3A	T0	N2	M0
EVRE 3A	T1	N2	M0
EVRE 3A	T2	N2	M0
EVRE 3A	T3	N1	M0
EVRE 3A	T3	N2	M0
EVRE 3B	T4	N0	M0
EVRE 3B	T4	N1	M0
EVRE 3B	T4	N2	M0
EVRE 3C	Herhangi bir boyutta T(HerT)	N3	M0

Evre 4:

Meme kanseri bu evrede karaciğer, akciğer, kemik, beyin gibi vücut organlarına ve lenf bezlerine yayılım yapmıştır.

Tablo 5. Meme kanseri evre 4

Evre	T	N	M
EVRE 4A	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
EVRE 4B	HerT	N3	M0
	T4b	Her N	M0
EVRE 4C	Her T	Her N	M1

TİS: Karsinoma İn Situ yani non-invaziv yayılım göstermemiş

T1: Tümör boyunu <20 mm

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1mi: 0.2 mm <Mikrometastazlar >2 mm

N1: Hareketli, aynı tarafta I ve II aksiller (koltuk altı) lenf noduna metastazlar

N2: Aynı tarafta, I ve II aksiller lenf noduna metastazlar klinik olarak saptanır veya saptanmaz

N3: Aynı tarafta, I ve II aksiller lenf tutulumu var/yok III aksiller lenf nodu metastazı

M0: Metastaz mevcut değil- M1: Metastaz mevcuttur.

Her N: Herhangi bir lenf nodu-Her T: Herhangi bir boyutta T

T4a: Tümör çevre dokuları metastaz yapmış

T4b: Tümör karotis arterine, prevertebral fasyaya metastaz yapmış (Giuliano ve ark., 2018), (Haksever, 2013).

4.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri

4.4.1. Cinsiyet

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında en çok görülen kanser tipiyken erkeklerde ise nadir görülmektedir. 2015 yılında yapılan bir analize göre yaklaşık 570.000 kişinin ölümüne neden olmuştur ve tüm dünyada her yıl 1,5 milyondan fazla kadına (bu değer tüm kanserli kadınların yaklaşık %25'ini kapsar) meme kanseri teşhisi konulmaktadır. Meme kanseri kolay metastaz yapan bir kanser türüdür. Genellik kanser, kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi organlara yayılabilmektedir. Erken teşhis çok önemlidir. Kuzey Amerika'da yapılan bir çalışmada kanser hastalarının 5 yıllık sağ kalma oranı hastalığın erken evrede tespiti ile %80 oranının üzerinde bulunmuştur (Sun ve ark., 2017).

4.4.2. Yaşlanma

Cinsiyetin yanı sıra yaşlanma, meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Çünkü meme kanseri insidansı yaş almayla yakından ilişkilidir. Yapılan araştırmalarda, meme kanserine bağlı ölümlerin çoğu 40 ve 60 yaş üstü kadınlarda gerçekleştiği görülmüştür. Bu nedenle 40 yaş üzeri kadınların yılda bir defa meme mamografisi yaptırmasının önemi vurgulanmıştır (Sun ve ark., 2017).

4.4.3. Aile öyküsü

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık dörtte biri aile öyküsü ile ilişkilidir. Annesi veya kız kardeşi meme kanseri olan kadınlar bu hastalığa eğilimlidir. Meme kanserine kalıtsal yatkınlık kısmen BRCA1 VE BRCA2 gibi meme kanseri ile ilgili genlerin mutasyonlarına bağlanmıştır (Sun ve ark., 2017).

4.4.4. Üreme faktörleri

Erken adet görme, geç menopoz, geç ilk gebelik yaşı ve düşük doğum gibi üreme faktörlerinin meme kanseri riskini artırabildiği düşünülmüştür. Menopozdaki her 1 yıllık gecikmenin meme kanseri riskini %3 oranında arttırdığı saptanmıştır. Buna karşılık adet görme yaşındaki her 1 yıllık gecikme %5, her ek doğum %10 oranında meme kanseri riskini azalttığı tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2017).

4.4.5. Östrojen

Hem endojen hem de eksojen östrojenler meme kanseri riski ile ilişkilidir. Endojen östrojen premenopozal kadınlarda yumurtalık tarafından üretilmektedir ve meme kanseri riskini azaltabilmektedir. Eksojen östrojenin ana kaynakları oral kontraseptifler ve hormon replasman tedavisidir. Oral kontraseptifler 1960'lardan bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır ve yan etkileri azaltmak için formülasyonları güncellenmiştir. Bir dizi çalışma, hormon replasman tedavisi kullanımının meme kanseri riskini artırabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, meme kanseri riskinin, hormon replasman tedaviyi bıraktıktan iki yıl sonra önemli ölçüde

azaldığı gösterilmiştir. Meme kanseri geçmişi olan ve hormon replasman tedavisi alan hastalarda tekrarlama olasılığı da fazla olarak bulunmuştur (Sun ve ark., 2017).

4.4.6. Yaşam tarzı

Aşırı alkol tüketiminin ve çok fazla diyet yağı alımının meme kanseri riskini artırabileceği düşünülmüştür. Alkol tüketimi, kandaki östrojenle ilişkili hormonların seviyesini yükseltebilmekte ve östrojen reseptör yollarını tetikleyebilmektedir. Bir meta-analiz, günde 35-44 gram alkol alımının meme kanseri riskini %32 arttırabildiğini göstermiştir. Sigara içme ve meme kanseri riski arasındaki ilişki tartışmalı olup henüz netlik kazanmamış olsa da, emzirme döneminde olmayan kadınların meme sıvısında sigara dumanından kaynaklanan mutajenler tespit edilmiştir. Hem sigara hem de içki içen kadınlarda meme kanseri riski de yüksek bulunmuştur (Sun ve ark., 2017).

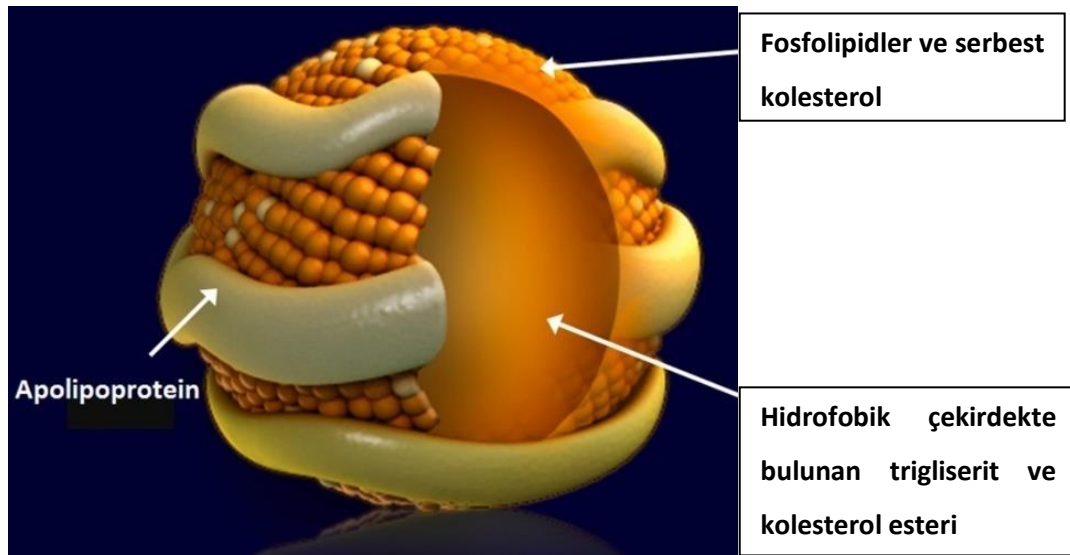
4.5. Lipoprotein Metabolizması ve Sınıflandırılması

Diyet ile alınan lipidler bağırsaktaki şilomikronlara gitmektedirler. Şilomikrondaki trigliseritler kas ve yağ dokusunda metabolize edilmektedirler ve karaciğer tarafından atılmaktadırlar. Bunlara şilomikron kalıntıları denilmektedir. Bu durum eksojen lipoprotein yolu olarak adlandırılmaktadır.

Endojen lipoprotein yolu ise karaciğerde çok düşük yoğunluklu lipoprotein partiküllerinin oluşumuyla başlamaktadır. Bunlar VLDL olarak bilinmektedirler. VLDL trigliseritleri, kas ve yağ dokusunda metabolize olarak orta yoğunluklu lipoproteinleri oluşturmaktadırlar. Bu IDL olarak adlandırılmaktadır. O da metabolize alarak düşük yoğunluklu lipoproteine (LDL) dönüşmektedir veya karaciğer tarafından alınabilmektedir.

Lipitler suda çözünmezler, hidrofobiktirler ve bu nedenle kanda lipoproteinler vasıtası ile taşınmaktadırlar. Lipoproteinler diyetle alınan lipidlerin ince bağırsaktan karaciğer, kas ve yağ dokusuna taşınmasında, karaciğerde sentezlenen lipidlerin periferik dokulara taşınmasında ve periferik dokulardaki lipidlerin karaciğer ve bağırsağa taşınmasında (ters kolesterol taşınması) önemli rol oynamaktadırlar. Ters kolesterol taşınması, karaciğer ve bağırsakta yüksek yoğunluklu lipoprotein oluşması ile başlamaktadır. Bu HDL olarak adlandırılmaktadır. Bu HDL periferik hücrelerden kolesterol almakta ve olgun HDL oluşmaktadır. Bu lipoprotein kolesterol ve fosfolipid bakımından oldukça zengindir (Feingold, 2022).

Lipoproteinler kolesterol esterleri, trigliseritler olmak üzere polar olmayan lipidleri içeren hidrofobik bir çekirdeği çevreleyen fosfolipidler, serbest kolesterol ve apolipoproteinlerden oluşan hidrofilik bir zarla kaplı bulunmaktadırlar (Feingold, 2022).



Şekil 3. Lipoprotein molekülü (Feingold 2022'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Tablo 6. Lipoproteinler (Feingold 2022'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

Lipoprotein	Yoğunluk(g/mL)	Boyut(nm)	Başlıca Lipidler	Başlıca Apolipoproteinler
Şilomikronlar	<0.930	75–1200	Trigliseritler	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
Şilomikron Kalıntıları	0.930–1.006	30–80	Trigliseritler Kolesterol	Apo B-48, Apo E
VLDL	0.930–1.006	30–80	Trigliseritler	Apo B-100, Apo E, Apo C
IDL VLDL Kalıntıları	1.006–1.019	25–35	Trigliseritler Kolesterol	Apo B-100, Apo E, Apo C
LDL	1.019–1.063	18–25	Kolesterol	Apo B-100
HDL	1.063–1.210	5–12	Kolesterol Fosfolipidler	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E
Lp (a)	1.055–1.085	~30	Kolesterol	Apo B-100, Apo (a)

Kolesterol, hücre zarı bütünlüğünün sağlanması ve akışkanlığının korunması için büyük öneme sahiptir ve yapının yaklaşık olarak %25'ini oluşturmaktadır. Kolesterol, üzerindeki hidroksil grubu vasıtası ile zara gömülmektedir. Bu işlevini membran fosfolipidlerinin ve sfingolipidlerin polar başları arasındaki etkileşim sayesinde yapmaktadır. Aynı zamanda polar olmayan yağ asidi zinciri, steroid ve hidrokarbon zincirinin etkileşimi yoluyla zara gömülmektedir. Kolesterolün bu özelliği, düşük sıcaklıklarda daha fazla zar akışkanlığına ve yüksek

sıcaklıklarda akışkanlığın dengelenmesine izin verirken, bu sayede zar bütünlüğünü korumaktadır.

Tüm çekirdekli hücrelerde kolesterol, endoplazmik retikulum (ER) içinde, mevalonat yolu boyunca iki asetat molekülünden ve hız sınırlayıcı olarak-3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzimA (HMGCoA) redüktaz enziminin aktivitesi ile sentezlenmektedir. Günlük toplam kolesterol üretiminin yaklaşık %20'si karaciğerde gerçekleşirken, sentezlendiği diğer bölgeler bağırsaklar, adrenal bezler ve üreme organlarıdır. Kolesterolün sentezi, vücuttaki kolesterolün az bir kısmını oluşturmakta, geri kalanı, öncelikle duodenum ve proksimal jejunum olmak üzere ince bağırsakta emilim yoluyla diyet kaynaklarından elde edilmektedir.

Bu senteze ek olarak, hücreler için ana kolesterol kaynağı, lipoprotein partikülleri içinde serbest kolesterol veya kolesteril esterler olarak taşınan kolesterolün alımıdır. Fizikokimyasal özellikleriyle birbirinden farklı beş ana lipoprotein sınıfı bulunmaktadır. Artan yoğunluklarına göre sıralanması; lipoproteinler, şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), orta yoğunluklu lipoprotein (IDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) şeklinde olmaktadır. Karaciğer, VLDL ve LDL lipoproteinlerinin üretildiği ana bölgedir. İster sentezden ister diyet kaynaklarından türetilmiş olsun, karaciğerde ihtiyaç fazlası olan fazla kolesterol, karaciğerden VLDL partikülleri olarak salgılanır ve daha sonra dolaşımda LDL' ye dönüştürüldükten sonra periferik dokulara taşınmaktadır. Salgılanmak üzere lipoprotein partikülleri halinde paketlenmesinin yanı sıra, hepatik kolesterol ayrıca serbest kolesterol ile birlikte atılmak üzere bağırsağa safra olarak salgılanan safra asitlerine metabolize edilebilmektedir. Ayrıca, adrenal bezlerin ve gonadların steroidojenik hücrelerindeki lipoprotein türevi kolesteril esterleri, dokuya özgü steroid hormon üretimi için veya lipid damlacıkları formunda depolama için kullanılmaktadırlar (Shen ve ark., 2018).

4.5.1. Şilomikronlar

Trigliserit (TG) kaynakları, eksojen ve endojen olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Endojen kaynaklar karaciğer tarafından sentez edilenler, eksojen kaynaklar diyet ile alınanlardır. Günlük diyetimizin bir kısmı lipittir. Bu lipidlerin en fazla oranını TG, az oranını da fosfolipid, kolesterol ve kolesteril esterlerini kapsamaktadır. TG ince bağırsakta hidrolize edilmekte ve bu hidroliz pankreatik lipaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Pankreatik lipazın bu etkisini gösterebilmesi için ortam pH'ı 7 ila 9 arasında olmaktadır. Pankreatik lipaz enzimi pankreas tarafından salgılanmaktadır. TG hidroliz edildiği zaman ortaya gliserol ve yağ asidi çıkmaktadır. Daha ayrıntılı söylemek gerekirse; trigliserit molekülü üç molekül yağ asidi ve bir molekül gliserolden oluşmaktadır. Lipitler ince bağırsakta sindirilmekte ve bu sindirim işlemi sonucunda ortaya TG, 2-monogliserid, yağ asidi, gliserol, fosfolipid, serbest kolesterol ve safra tuzları çıkmaktadır. Bunların çok büyük bir kısmı ince bağırsağın son bölümünden emilerek

mukoza hücresine geçmektedirler. Bu emilim işlemi pasif difüzyon ya da pinositoz yolu ile olmaktadır. Bu yapılar mukoza hücresi içerisinde tekrar aktif hale gelmekte ve TG’i oluşturmaktadırlar. Bu aktifleşme işlemi koenzim-A ile olmaktadır. Bunlar eksojen TG’lerdir ve sonra protein bir tabaka ile kaplanmakta ve hidrofilik bir özellik kazanmakta ve taşınabilmektedirler. Bu oluşan yeni yapı şilomikron olarak adlandırılmaktadır. Şilomikron içeriği şu şekildedir; çok fazla miktarda TG ki bu oran yaklaşık %85’tir ve geri kalan kısım protein, serbest kolesterol, kolesterol esteri ve fosfolipidtir. Şilomikronlar sistemik dolaşıma lenf dolaşımı yolu ile dahil olmaktadır. Şilomikronlar lipoprotein lipaz (LPL) enzimi ile TG içeriğinin büyük kısmını kaybetmektedirler ve küçük şilomikron kalıntılarına dönüşmektedirler. Bu şilomikron kalıntıları Apo-E reseptörleri tarafından tanınmaktadır.

Apo-E reseptörleri vasıtası ile endositoz yaparak karaciğer hücresi içine girmekte ve burada yıkılmaktadırlar (Çetinkalp ve ark., 2017).

4.5.2. Şilomikron kalıntıları

Şilomikronlar, ince bağırsak tarafından salgılanan, trigliserit bakımından zengin büyük parçacıklardır. Diyet ile alınan trigliseritlerin ve kolesterolün periferik dokulara ve karaciğere taşınmasında önemli rol oynamaktadırlar. Şilomikron kalıntıları ise trigliseritlerin şilomikronlardan lipoprotein lipaz (LPL) tarafından uzaklaştırılması ile oluşan daha küçük parçacıklardır. Bu parçacıklar kolesterol açısından zengindir. Ayrıca bu parçacıklar pro-aterojenik özelliktedirler. Her şilomikron partikülü, Apo B-48 molekülü içerir. Şilomikron parçacıkları da; AI, A-II, A-IV, A-V, B-48, C-II, C-III ve E içermektedir (Feingold, 2022).

4.5.3. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)

Karaciğer tarafından üretilmektedir, apolipoprotein B-100, C-I, C-II, C-III ve E içermektedir. Çekirdek yapısal proteini Apo B-100’dür. Karaciğerde trigliserit üretimi arttığında salgılanan VLDL partikülleri büyük olmaktadır (Feingold, 2022).

Karaciğer dolaşımdaki yağ asitlerinden veya glikozdan trigliserit sentezleyebilmektedir. Trigliseritlerin sentezi için mevcut olan yağ asitlerinin seviyeleri, karaciğerdeki trigliserit sayısının ana belirleyicisidir. Diyabet, obezite ve metabolik sendrom, hepatik trigliserit düzeylerindeki artışın ve VLDL sekresyonunun artmasının yaygın nedenleridir. Sistemik dolaşımda diyet ile dışarıdan alınan TG’leri şilomikronlar taşıırken, vücutta üretilen TG’leri düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) taşımaktadır. Şilomikronlar karaciğere taşıırken; VLDL kaslara ve yağ dokusuna taşımaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi trigliseritler lipoprotein lipaz enzimi varlığında ve kofaktör olarak Apo C-II varlığında üç yağ asidi ve bir gliserole parçalanmaktadır. Açığa çıkan yağ asitleri depolanacak ise adipoz dokuya, enerji olarak yakılacak ise kas dokusuna taşınmaktadır. Oluşan kalıntılar ise karaciğere taşınmaktadır.

Karaciğerde hepatik lipaz enzimi vardır ve bu enzim VLDL kalıntılarını LDL' ye dönüştürmektedir (Feingold, 2022), (Çetinkalp ve ark., 2017).

4.5.4. Ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)

Orta yoğunluklu lipoprotein partikülleri, trigliseritlerin lipoprotein lipaz tarafından VLDL' den uzaklaştırılmasıyla oluşturulmaktadır. Oluşan yapı kolesterol açısından zenginleştirilmiş ve pro-aterojenik olan IDL partikülleridir. Bu IDL parçacıkları apolipoprotein B-100 ve E içermektedir (Feingold, 2022).

Lipoprotein lipaz trigliserit metabolizmasının en önemli oyuncusudur. Vücutta bulunduğu yerler; iskelet sistemi, yağ dokusu, meme dokusu, kalp dokusudur ayrıca bu enzim heparin ve insülin varlığında daha iyi aktivite göstermektedir (Çetinkalp ve ark., 2017).

4.5.5. Düşük yoğunluklu lipoprotein parçacıkları

Düşük yoğunluklu lipoprotein parçacıkları, VLDL ve IDL parçacıklarının metabolizmasından türetilmektedir ve kolesterol açısından zengindir. Her bir LDL parçacığı bir Apo B-100 içermektedir. Dolaşımdaki kolesterol ve Apo B-100'ün çoğunluğu LDL partikülleri üzerinde taşınmaktadır (Feingold, 2022).

4.5.6. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)

Trigliseritten zengin lipoproteinlerin metabolizması sırasında, kolesterol ve fosfolipidler şilomikronlardan ve VLDL' den yeni oluşan HDL'ye aktarılmaktadır. Trigliseritten zengin lipoproteinlerin metabolizması aynı zamanda bu trigliseritten zengin lipoproteinlerden apolipoproteinlerin HDL'ye transferiyle sonuçlanmaktadır. Fosfolipidlerin lipoproteinler arasındaki hareketi, fosfolipid transfer proteini (PLTP) tarafından kolaylaştırılmaktadır. Kolesterolün büyük kısmı, kolesterol esterler biçiminde HDL'nin çekirdeğinde bulunmaktadır. LCAT (lesitin kolesterol asiltransferaz), HDL parçacıklarının yüzeyinden çekirdeğe göç eden kolesterol esterlerin senteziyle sonuçlanan, yağ asidinin fosfolipidlerden serbest kolesterole transferini katalize eden HDL ile ilişkili bir enzimdir. Apo AI bir LCAT aktivatörüdür. LCAT eksikliği düşük HDL kolesterole neden olmaktadır. HDL'ye aktarılan trigliseritler hepatik lipaz tarafından metabolize edilerek küçük HDL partikülleri elde edilmektedir (Feingold, 2022).

HDL proteini büyük oranda Apo-AI proteini içermektedir. Apo-AI, karaciğer ve bağırsaklardan sentez edilmekte ve bu protein LCAT'ın etkinliğinde öneme sahip olmaktadır. HDL karaciğerden ve bağırsaktan sentezlenirken henüz olgunlaşmamıştır. Sistemik dolaşım içerisinde serbest kolesterolü bünyesine dahil ederek olgunlaşmaya başlamaktadır. HDL'nin içerisine aldığı serbest kolesterol LCAT enzimi vasıtasıyla esterleşmektedir. Oluşan bu kolesterol esterleri çekirdeğe geçmekte ve HDL-3 oluşmaktadır. HDL-3 içeriği arttıkça daha büyük bir hacme sahip olmakta ve HDL-2'ye dönüşmektedir. HDL-2 karaciğere ulaştığında burada hepatik lipaz devreye girmekte, onu metabolize etmekte ve HDL-2'nin TG ve fosfolipid

içeriğini hidrolize etmektedir. Bunun sonucunda tekrar HDL-3 oluşmaktadır. VLDL içindeki trigliserit ve HDL-2 içindeki kolesterol esterleri, kolesterol ester transferaz (CETP) varlığında yer değiştirmektedir. HDL-2 'nin TG içeriği artmakta ve tekrar karaciğerde hidroliz işlemine tabi olmaktadır. Sonrasında yine HDL-3 oluşmaktadır. Bu döngü sayesinde HDL-2 periferik hücrelerden aldığı fazla kolesterolü karaciğere taşımaktadır. Bu ters kolesterol taşınmasıdır. Bu içeriğin karaciğere alınmasına aracılık eden ise SR-B1 reseptörüdür (Ramasamy, 2014), (Baytak & Top, 2012), (Feingold, 2022), (Aslan, 2012).

Serbest kolesterol, HDL dahil olmak üzere lipoprotein parçacıklarının yüzeyinde konumlanırken kolesterolün büyük bir kısmı kolesterol esteri biçiminde HDL'nin çekirdeğinde bulunmaktadır. Serbest kolesterol hücrelerden HDL'ye aktarılmakta ve büyük olgun HDL parçacıkları oluşturmak için bu serbest kolesterol esterleşmektedir. Bu aşamada LCAT yağ asidinin fosfolipidlerden serbest kolesterole transferini kataliz etmekte ve kolesterol esterlerinin sentezini sağlamaktadır. Bu kolesterol esterleri HDL'nin çekirdeğine göç etmektedirler. LCAT ise Apo AI varlığında aktive olmaktadır (Feingold, 2022).

4.6. Meme Kanseri ile Kolesterol Arasındaki İlişki

Meme kanseri ile kolesterol arasındaki olumlu ya da olumsuz ilişkinin tespit edilmesi için pek çok bilimsel çalışma yapılmıştır. Kolesterol seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin meme kanseri riskini azaltabileceği düşünülmüş ve mendel randomizasyonu kullanılarak önemli bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın ana amacı; HDL, LDL ve TG gibi plazma lipoproteinlerinin özellikleri ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir. Bu çalışma esnasında kolesterol düşürücü olarak kullanılan ilaçların östrojene duyarlı meme kanseri hücreleri ile etkileşime girdiği ve olumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür. İlaçların etkisi ile meydana gelen kolesterol seviyesindeki değişiklikler ile meme kanseri arasındaki etkileşimin tutarlı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Özellikle HDL düzeyleri ile östrojen reseptörü pozitif meme kanseri arasında olumlu ilişki olduğu bulunmuştur. LDL'nin ise tüm meme kanserleri ile ilişkisi bulunmuştur (Johnson ve ark., 2020).

4.7. Meme Kanseri ile HDL Arasındaki İlişki

Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için HDL'yi yükseltmek gerektiği düşünülmüş ve bunun için uygun tedaviler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte, son araştırmalarda yüksek HDL düzeyleri olan bireylerde tüm nedenlere bağlı ölümlerde bir artış gözlemlenmiştir. Sonuçlar, HDL seviyelerini yükselterek kardiyovasküler riski azaltmayı amaçlayan tedavilerin, meme kanseri görülme riskini arttırmaya neden olabileceğini düşündürmüştür. Ancak varılan bu sonuçta hangi tip meme kanseri olduğu netlik kazanmamıştır ve bunun yanında alınan bu sonuçlar belli popülasyonlar üzerinde olduğu için tüm popülasyonlara genellemek mümkün olmamıştır (Johnson ve ark., 2020).

Elde edilen bu sonuçlar, artmış HDL ile artmış meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi desteklemektedir ve bu durum daha fazla araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Statinlerin genel olarak reçete edilme nedeni LDL seviyelerini düşürmektir ancak statinler aynı zamanda HDL seviyelerini yükseltmektedirler. Bu doğrultuda yapılacak daha fazla çalışmanın yüksek HDL düzeyleri ile artan meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi kanıtlayabileceği ve HDL'nin "iyi kolesterol" veya iyi huylu etkiye sahip olduğu konusundaki kanıyı güçlendirebileceği düşünülmüştür (Johnson ve ark., 2020).

Yukarıdaki verilerin aksini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Buna göre kolesterol metabolizması ve meme kanserinin değerlendirilmesi yapıldığında, östrojen ve HDL konsantrasyonları arasında bir ilişki olduğunu fark edilmiştir. Premenopozal kadınlarda düşük plazma HDL seviyesi ile meme kanseri insidansında artış arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Samadi ve ark., 2018).

Serum östrojen konsantrasyonu ile ilişkili olarak bir tümörün gelişimi ve progresyonu açısından riskin arttığı görülmüştür. Lipoproteinler kolesterol taşıyıcıları olarak kabul edildiğinden, lipoproteinlerin kanser hücreleri için kolesterol sağlayarak meme hücresi proliferasyonuna bir miktar katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Samadi ve ark., 2018), (Danilo ve ark., 2013).

Kolesterolün tümör ilerlemesindeki rolü son on yılda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Kolesterolün, hücresel çoğalma, göç, hayatta kalma ile ilgili temel sinyal yollarını düzenlediği ve böylece kanserin ilerlemesini desteklediği gösterilmiştir (Samadi ve ark., 2018).

Kolesterol seviyelerinin yükselmesi, tümörün büyümesi ve migrasyonunu uyarabilmektedir. Kanser hücresi gelişimi ve metastazı; hücre büyümesi, adhezyonu ve göçünü (migrasyonu) modüle eden sinyal yolları aracılığıyla kolesterol membran içeriğinden etkilenmektedir. Steroid hormonlar (östrojen), kolesterolden üretilmektedirler ve hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol edebilmektedirler. Bundan dolayı meme kanseri patogenezinde kilit rol oynamaktadırlar.

Kanser varlığında kolesterol serum konsantrasyonlarında değişiklik olduğu düşünülen birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunlar gelişmiş kolesterol katabolizmasının bir sonucu olarak metastaz gelişmiş hücrelerde LDL reseptörlerinin up-regülasyonu, kanser hücrelerinde esterlenmiş kolesterolün fazlaca depolanması ve yeni sentezlenen membranlar için kolesterol kullanımının artması gibi mekanizmalardır (Samadi ve ark., 2018).

Artmış plazma kolesterolü kanser hücresi büyümesini arttırabilmekte ve dolayısıyla meme kanseri malignitesinde anahtar role sahip olabilmektedir. Örnek vermek gerekirse yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, kolesterol sentezinin öncülü olan mevalonatın meme kanseri hücrelerinin yayılımını indükleyebileceğini ve östrojen reseptörü pozitif göğüs kanserlerinde

bir kolesterol metaboliti olan 27-hidroksil kolesterolün yüksek konsantrasyonunun gözlenebileceğini ortaya koymaktadır. HDL'nin ana proteini olan apolipoprotein A1, tümör agresifliği ve malignite derecesi ile ilişkili görülmektedir (Samadi ve ark., 2018).

Sadece plazma HDL konsantrasyonlarının ölçümü, HDL'nin ters kolesterol taşınması veya anti-oksidatif veya anti-inflamatuar özellikler gibi fonksiyonel özelliklerini yansıtmak için iyi bir parametre olarak sayılmamaktadır. İn vitro analizler, insan meme kanseri hücre hatlarının HDL varlığında artan proliferasyon ve migrasyon sergilediğini göstermiştir (Samadi ve ark., 2018), (Mooberry ve ark., 2016).

Meme kanseri gibi durumlarda oksidatif stres koşulları altında, HDL oksidatif modifikasyonlara yatkındır ve bu değişiklikler HDL'lerin işlevselliğini etkileyebilmektedir (Samadi ve ark., 2018).

Kanser hücrelerindeki plazma membranı, yüksek konsantrasyonda ve kolesterol açısından zengin olan, sinyal iletimini etkileyen lipid raftları içermektedir. Bununla birlikte, kolesterol bu lipid yığınlarından (raft) uzaklaştırıldığında apoptoz artmakta ve kanser hücresinin ölümüne yol açabilmektedir. Lipid raftlarında yüksek oranda kolesterol bulunması ve mikrokalsifikasyonun artması ile tümörün agresiflik derecesi arasında pozitif bir ilişki olduğu öne sürülmüştür (Samadi ve ark., 2018).

Hızlı bölünen kanser hücreleri, membran oluşumu için ek kolesterole ihtiyaç duymakta ve HDL çekirdek komponentinin reseptör aracılı alımı, bu ihtiyacı destekleyebilmektedir. Birkaç çalışma, hücre proliferasyonu ve HDL uptake'i ile meme kanseri hücre dizilerinde HDL reseptörlerinin ekspresyonunun fazla olması arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Samadi ve ark., 2018).

Bilindiği gibi HDL'nin sentez yeri karaciğer ve ince bağırsaktır. HDL'lerin içeriği; büyük oranda protein, daha az oranda da serbest kolesterol, kolesteril esteri, fosfolipid (fosfotidilkolin), trigliseritten oluşmaktadır. Protein yapıyı Apo A-I, Apo A-II, Apo C-I, Apo C-II, Apo CIII, Apo D, Apo E oluşturmaktadır. Vücuttaki HDL seviyesi diyet, egzersiz, hormonlar, genetik, ilaçlar ve bazı hastalıklardan etkilenebilmektedir (Altıntaş, 2013).

HDL sentezlendiği anda Apo A-I, Apo A-II, lesitin ve serbest kolesterol ihtiva etmekte ve sistemik dolaşımda diğer lipoproteinlerden kolesteril esterlerini almaktadır.

Yine HDL sentezlendiği anda yüzeyinde LCAT bulunmakta ve bu LCAT serbest kolesterol ve lesitinden, kolesteril esteri ve lizolesitin meydana getirmektedir. HDL'nin zamanla bünyesinde kolesteril esterlerinin miktarı artmakta ve HDL olgunlaşmaya başlamaktadır. HDL'nin olgunlaşmış ilk hali HDL-3 olarak adlandırılmaktadır. Zamanla kolesteril esteri daha da artmakta ve ortama Apo E de katılmakta ve oluşan yapı HDL-2 adını almaktadır. Süreç devam etmekte ve sonra HDL1 oluşmaktadır. Süreç tamamlanıp HDL'nin kolesterol içeriği yeterli

düzeye ulaşınca karaciğere gitmekte ve burada SR-B1 reseptörü vasıtası ile kolesterolü bırakmaktadır. HDL partikülleri ayrıca paraoksonaz (PON), trombosit aktive edici faktör-asetil-hidrolaz (PAFAH), lesitin kolesterol asiltransferaz (LCAT) ve kolesterol ester transfer proteini (CETP) gibi enzimler de taşımaktadır (Altıntaş, 2013).

HDL'nin ayrıca HDL-2 ve HDL-3 gibi alt fraksiyonları bulunmaktadır. HDL-3 partikülleri daha küçük bir çapa (7,5 nm) sahip olup, kolesterol bakımından fakir, protein bakımından zenginleştirilmiştirler. HDL-2 partikülleri ise daha büyük (10 nm) ve lipid bakımından zengindirler. HDL-2 ve HDL-3 ayrıca lipid bileşiminde farklılıklar göstermektedir. HDL-2, Apo A-II içermeyen ve Apo A-I içeren partiküller açısından daha zenginken, HDL-3 hem Apo A-I hem de Apo A-II içeren partiküller açısından daha zengindir (Hirano, 2016), (Buring ve ark., 1992).

Sfingolipidler genel olarak HDL-3 alt sınıfında daha az bulunmaktadır ve yüzey lipid akışkanlığını etkilemektedirler. Buna karşın biyoaktif lipid sfingosin-1-fosfat (S1P) ağırlıklı olarak HDL-3 ile ilişkilidir. S1P hücrenin farklılaşması ve büyümesi, üremesi, apoptozu ve inflamasyon gibi fonksiyonları için çok önemli bir moleküldür. Yoğunlukla HDL'de bulunmakta ve kardiyovasküler fonksiyonlarda etkili olmaktadır. Bu etkisini çevresel sinyal yollarına aracılık ederek yapmaktadır (Lee ve ark., 2010).

Büyük kolesterolden zengin HDL-2, plazma TG ve insülin direnci ile ters ilişkiliyken, küçük kolesterolden fakir HDL-3 değildir (Hirano, 2016).

Akut iskemik inmeli hastalarda ve obez olmayan tip 2 diyabetiklerde, aşırı kilolu ve obez kişilerde, metabolik sendromlu hastalarda daha az oranda HDL-2 alt fraksiyonu ve daha fazla küçük partiküller olan HDL-3 fraksiyonu gözlenmiştir. Özellikle, daha küçük ve daha yoğun HDL partikülleri, daha büyük HDL partiküllerine kıyasla farklı anti-inflamatuar özellikler göstermektedir. Yapılan bir çalışmada large HDL kolesterolün, kardiyovasküler risk düşüşü ile ilişkili olduğu, bu durumun da HDL alt fraksiyonunun potansiyel faydasını vurguladığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2016).

Meme kanseri, hücre büyümesi, yapışması ve göçünden sorumlu sinyal yollarını etkileyerek kolesterol membran içeriğinden etkilenmektedir. Steroid hormonları kolesterolden üretilir ve bu hormonlar hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek meme kanserinin patogenezinde önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca meme kanseri ile HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) arasındaki ilişki de araştırılan konular arasındadır. Serum HDL-kolesterol düzeyi ile meme kanseri riski arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiş bulgular olsa da bunun tersiyle ilgili bazı bulgular da vardır ve bu nedenle ikisi arasındaki durum belirsizliğini korumaktadır. HDL'nin temelde ters kolesterol taşınmasında rolü olduğu bilinmektedir. HDL'nin meme kanseri üzerinde bir etkisi olabileceği de öne sürülmüştür. HDL, antioksidan etki ile, LDL

(düşük yoğunluklu lipoprotein)'i oksidatif modifikasyondan korumak, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını önlemek, damar dayanıklılığı için önemli olan nitrik oksit oluşumunu aktive etmek ve ayrıca inhibe etmek gibi pek çok işleve sahiptir. Oksidatif stres, glikasyon ve inflamasyon sonucu işlevsiz HDL oluşabilir ve lipoprotein anormallikleri ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi açıklığa kavuşturabilir (Samadi ve ark., 2018).

Birçok çalışma, meme kanseri gelişimini etkileyen çevresel faktörler arasından, iki önemli risk faktörü olarak diyet ve obeziteyi göstermektedir (Samadi ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda kolesterol metabolizması ve meme kanserinin değerlendirilmesi yapılmış olup östrojen ve HDL konsantrasyonları arasında bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Serum östrojen konsantrasyonları ile ilişkili olarak artan bir tümör gelişimi ve ilerlemesi riski olduğu bilinmektedir (Samadi ve ark., 2018).

Yine aynı çalışma göstermiştir ki; SCARB1 geni, çöpçü reseptör sınıf B1'i kodlamakta ve HDL ile hücreler arasındaki kolesterol akışının dengesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra ters kolesterol taşınması ve fazla kolesterolü safraya atmak, vücuttan uzaklaştırmak için de hepatik SR-B1 kullanılmaktadır. HDL dolaşımdaki kolesterolün taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. SR-B1 reseptörüne bağlanarak protein kinaz (MAPK) ve AKT sinyal yollarını desteklemektedir. Bir diğer önemli nokta ise; agresif tümörlerde SR-B1 reseptörünün ekspresyonunun artmış olmasıdır. Bunun sonucunda da HDL ve SR-B1 reseptörünün işlevine ve tümörlerin büyümesine yönelik çalışmalar yapılmış ve HDL'nin migrasyonu teşvik etme, çeşitli sinyal yollarını indüklemeye yeteneğinin olduğu tespit edilmiştir.

Meme kanseri kadınlarda çok önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Hormonlar, radyasyona maruz kalma, kimyasallar ve obezite gibi çeşitli risk faktörlerinden etkilenmektedir (Samadi ve ark., 2018).

HDL, LDL, total kolesterol ve trigliseritler olmak üzere lipit seviyeleri ile meme kanseri insidansı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek üzere yapılan inceleme ve meta-analizlerden elde edilen sonuçlara göre, serum HDL ve meme kanseri arasında anlamlı ölçüde ters ilişki olduğu bulunmuştur. Bu durum özellikle LDL/HDL oranı yüksek olan ve yüksek oranda östradiol sentezi bulunan kadınlarda oluşmuştur (Samadi ve ark., 2018).

Kanser hücresinin yayılımı ile HDL kolesterolü arasındaki ilgileşim nedeniyle, çoğunlukla yüksek HDL düzeylerinin meme kanseri ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca, kanser oluşumunun HDL kolesterolün özellikle apoptoz veya protein kinaz yolunu aktive etmesinden etkilendiği düşünülmektedir. İn vitro çalışmalar, HDL'nin bağımsız olarak meme kanseri hücre dizilerinin gelişimine neden olabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar, meme kanseri riski ile lipit profili arasındaki ilişkiyi ve meme kanseri olan kadınlarda düşük serum HDL oranının

etkilerini araştırmış ve dolaşımdaki HDL ile meme kanseri riski arasında ters bir ilişkiyi destekleyen güçlü kanıtlara ulaşmıştır (Samadi ve ark., 2018).

Östrojen reseptörü negatif (ER-) ve progesteron reseptörü negatif (PR-) olan meme kanseri hastalarında plazma HDL düzeyi ve trigliserit düzeyi arasında bir bağlantı vardır ve bu durum aynı zamanda HDL-reseptör arasındaki etkileşimi desteklemektedir. Ayrıca 7575 kadın hastada yürütülen bir çalışma sonucunda düşük plazma HDL seviyesi ile artan meme kanseri insidansı arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuş ve eksojen HDL eklenerek meme kanserinin ilerlediği ve tümör hücrelerinin agresifleştiği tespit edilmiştir. Bu durumda yüksek bir serum kolesterolü kanser hücresi büyümesini artırabilir ve dolayısıyla yükselmiş serum kolesterolü meme kanseri malignitesinde potansiyel bir artışa sebep olabilir düşüncesi oluşmuştur (Samadi ve ark., 2018).

Yapılan başka bir çalışma kolesterolün öncül maddesi mevalonatın meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını indükleyebileceği ve meme kanseri (ER⁺) olanlarda kolesterolün bir metaboliti olan 27-hidroksil kolesterolün yüksek konsantrasyonlarının gözlemlenebileceğini ortaya koymuştur (Samadi ve ark., 2018).

Birkaç epidemiyolojik çalışmaya göre, HDL seviyeleri ile meme kanseri riski arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir ve son veriler bu iddiayı doğrulamıştır (Danilo ve ark., 2013).

In vivo çalışmalar, diyetin veya genetik faktörlerin neden olduğu hiperkolesteroleminin, meme kanseri modellerinde tümör yükünü artırdığı ve metastaza yol açtığını ileri sürmüştür (Danilo ve ark., 2013).

İn vitro çalışmalar ise, insan meme kanseri hücre hatlarının HDL varlığında çoğaldığını ve yayıldığını göstermiştir (Danilo ve ark., 2013).

Östrojen biyoaktif bir steroid hormondur ve kolesterolden sentez edilmektedir. Ayrıca kolesterol plazma zarında bulunan ve sinyal moleküllerini düzenleyen lipid sallarının oluşumu için de gereklidir. Hücrelerin plazma zarları, lipid sallarını olarak bilinen glikolipoprotein lipid mikro alanlarında düzenlenen glikosfingolipidler, kolesterol ve protein reseptörlerinin tümünü içermektedir. Bu lipid sallarının sinyal moleküllerini düzenleyici işlevleri nedeni ile insan kanserlerinin gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. Buradan kolesterolün tümör büyümesinde önemli bir rolü olduğu çıkarımı yapılabilmektedir (Danilo ve ark., 2013).

Hücre zarının bütünlüğünün korumasında kolesterol çok önemli bir öneme sahiptir ve bu durum kolesterol metabolizmasının kanser gelişiminde rol oynayabileceği düşündürmektedir. Hücrelerde kolesterol üretimi, kolesterolün diyetle alınması ve dolaşımdaki kolesterol taşınması, kanser gelişimini etkileyebilecek faktörler olabilmektedir. Yüksek kolesterol seviyeleri, tümör büyümesini ve göçünü uyarabilmektedir (Samadi ve ark., 2018).

Yapılan bir in vitro analiz, lipoproteinlerin meme kanseri gelişimini uyarmada ve bunun yanı sıra tümörün agresif özelliklerini arttırmada bir rolü olduğunu göstermiştir. Hücre kültürü çalışmalarında meme kanseri hücrelerinin büyümesinin HDL eklenmesinin bir sonucu olacağı daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Birkaç çalışma, meme kanseri hücrelerinden aşırı kolesterolü uzaklaştırmak ve gerekli hücre içi kolesterolü artırmak için HDL'yi kullanan SR-B1 reseptörünün aktivitesini göstermiştir (Samadi ve ark., 2018).

HDL'nin aterosklerozda, özellikle ters kolesterol taşınmasında iyi bilinen bir rolü bulunmaktadır, bu sayede HDL, fazla kolesterol moleküllerini periferik dokulardan uzaklaştırmakta ve bunları atılım veya geri dönüşüm için karaciğere geri götürmektedir. Ek olarak HDL, makrofajlarda apoptozun inhibisyonu, endotelial hücrelerde migrasyonun indüklenmesi ve çoklu hücre tiplerinde hücre sinyal olaylarının başlatılmasında rol almaktadır (Danilo ve ark., 2013).

HDL, plazma kolesterolünün önemli bir taşıyıcısıdır ve MAPK ve AKT sinyal yollarını başlatarak endotel hücrelerinde göçe neden olabilmektedir. Bu sinyal yollarının aktivasyonu, HDL reseptörüne (çöpçü reseptör sınıf B tip 1(SR-B1)) HDL bağlanmasına ve ardından hücreye lipid transferine bağlıdır. SR-B1, HDL reseptörü olarak bilinmekte ve seçici HDL-kolesterol ester alımı olarak bilinen bir işlemde kolesterol esterinin HDL moleküllerinden hücrelere seçici transferine aracılık etmektedir. Kanser doku örneklerinde SR-B1 protein düzeylerinin normal çevre dokuya kıyasla arttığı bulunmuştur. Bu konuda çok güzel ve değerli bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada fare ksenograft modeli kullanılmış; HDL ve SR-B1 reseptörünün meme kanseri hücre hatlarında hücresel sinyal yollarının düzenlenmesindeki ve fare modelinde tümörlerin gelişimindeki rolüne bakılmıştır. Sonuç olarak; HDL'nin göçü indükleyebildiği, bazı insan göğüs kanseri hücre dizisinde MDA-MB-231 ve MCF7 sinyal iletim yollarını etkinleştirebildiği bulunmuştur. Bunun yanı sıra SR-B1 reseptörünün yıkılmasının meme kanseri hücre hattında HDL kaynaklı sinyal iletim yollarının MDA-MB-231 ve MCF7 aktivasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Buradan SR-B1'nin Akt aktivasyon yolu ile sinyal yollarını düzenlediği ve tümör gelişimini sınırlayabildiği sonucu çıkarılabilmektedir (Danilo ve ark., 2013).

Bu çalışmada, iki meme kanseri hücre hattında sinyal iletiminin bir aracısı olarak HDL'nin rolü belirlenmiştir. Diğer hücre tiplerinde elde edilen sonuçlarla tutarlı olarak hem MCF7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde HDL-3 ile inkübasyonun hem Erk1/2 hem de Akt sinyal yollarının hızlı aktivasyonunu indüklediği bulunmuştur. Meme kanserindeki bu yeni bulgular, HDL'nin çeşitli sinyal yollarını düzenleyebileceğini ve dolayısıyla tümör ilerlemesini değiştirebileceğini düşündürmektedir.

Aynı çalışmada, HDL'nin iki meme kanseri hücre dizisi olan MCF7 ve MDA-MB-231'in göçünü indükleyebildiği bulunmuş, bu da HDL'nin metastazın erken evrelerinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Danilo ve ark., 2013).

Çalışma sonucunu özetlemek gerekirse; HDL ve SR-B1'nin pro-onkogenik aktiviteye sahip olduğu ve göçü indükleyebileceği ve iki meme kanseri hücre hattında hücresel proliferasyon ve tümör oluşumundan sorumlu sinyal iletim yollarını aktive edebileceği gösterilmiştir. Ek olarak, SR-B1'nin yıkılması veya farmakolojik inhibisyonu, HDL'nin aracılık ettiği sinyalleri zayıflatılabilir ve çoğalmayı, yayılmayı ve tümör büyümesini inhibe edebilir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular SR-B1 ve HDL'yi meme kanseri tedavisi için potansiyel terapötik hedefler olarak tanımlayabilir (Danilo ve ark., 2013).

4.8. SR-B1 Reseptörü

Çöpçü reseptörü, sınıf B tip 1 (SR-B1) dahil olmak üzere birkaç farklı lipoprotein reseptörü vardır. SR-B1'nin en önemli işlevi HDL'den türetilen kolesterol esterlerin seçici alımına aracılık etmektir. Ayrıca bu reseptör makrofajlar da dahil olmak üzere periferik dokulardan karaciğere geri kolesterol akışını da kolaylaştırmaktadır. Bir diğer önemli işlevi ise; yağda çözünen vitaminlerin hücrelere girişini desteklemektir. SR-B1 ayrıca kanser prognozu ve teşhisi için potansiyel bir belirteç olarak tanımlanmıştır (Shen ve ark., 2018).

SR-B1'in kanser gelişimine ve maligniteye katkısı olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Hatta çalışmalar SR-B1'in meme kanserinde yeni bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmüştür çünkü agresif tümörlerde SR-B1 ekspresyonunun normal sağlıklı hücrelere göre oldukça fazla olduğu görülmüştür. Bu artış HDL'nin hücre göçünü teşvik ettiği ve bazı sinyal yollarını indüklediğini göstermiştir. SR-B1 ekspresyonu azaltılmaya çalışıldığında ise tümörün ilerlemesi azalmıştır (Samadi ve ark., 2018).

Dolaşımdaki LDL'nin ihtiva ettiği kolesterol, LDL reseptörü (LDL-R) yoluyla hücrelere iletilmektedir. LDL tarafından taşınan kolesterol esterleri; lizozomlar içinde lizozomal asit lipaz tarafından hidrolize edilmekte veya yeniden esterleştirildiği sitoplazmik lipid damlacıkları içinde depolanmakta ya da endoplazmik retikulumdan plazma zarlarına veya mitokondriye taşınmaktadır. HDL partiküllerinin bağlanması, LDL reseptörününkinden oldukça farklılık göstermektedir. Kolesterol esteri açısından zengin lipoprotein partikülü LDL-R'ye bağlanmakta, HDL partikülleri hücre yüzeyi üzerinde SR-B1'e bağlanmakta ve kolesterol esterleri hücrenin içine iletilmektedir. Bu şekilde teslim edilen kolesterol esteri, kullanılmadan önce HSL tarafından serbest kolesterole hidrolize edilmektedir. Bu mekanizma steroidojenik hücrelerde kullanılmaktadır. Steroidojenik hücreler steroidogenez için öncü olarak kolesterole dayanmaktadırlar. Kolesterol esteri açısından zengin lipid damlacıkları, steroidojenik hücrelerde bariz bir şekilde bulunmakta ve kolesterol esterleri HSL'nin etkisi ile serbest

kolesterole hidrolizini takiben steroidogenez için kolesterol sağlayabilmektedirler. Şaşırtıcı bir şekilde, HSL'nin aktivitesi, siklik AMP (cAMP)/PKA sinyal yolu aracılığıyla tropik hormonlar tarafından düzenlenmektedir (Shen ve ark., 2018).

Adrenal bezler ve gonadlardaki hücreler dışında, periferik hücrelerin çoğu kolesterolü metabolize edememektedirler. Bundan dolayı, homeostazı sürdürmek ve aşırı kolesterol ile başa çıkabilmek için birkaç farklı mekanizma bulunmaktadır. Temel mekanizma, kolesterolün hücrelerden HDL'ye geçişidir. HDL tarafından alınan kolesterol daha sonra HDL ile ilişkili enzim LCAT tarafından esterleştirilmekte ve kolesteril ester transfer proteininin etkisiyle VLDL veya LDL gibi diğer lipoproteinlere aktarılabilmektedir. Kolesterolün periferik hücrelerden karaciğere taşınması, ters kolesterol taşınması (RCT) olarak adlandırılmaktadır (Shen ve ark., 2018).

SR-B1 sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmaktadır. SR-B1 bağırsak, makrofajlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, keratinositler, adipositler ve plasenta dahil birçok memeli dokusunda ve hücre tipinde eksprese edilebilmektedir. Birçok çalışma, SR-B1'in kolesterol akışı ve steroid hormon üretimi için önemli, düzenleyici rolünü ortaya koymaktadır (Shen ve ark., 2018).

Yetişkinlerde, SR-B1 mRNA/protein ekspresyonu belli bölgelerde en yüksek seviyede görülmektedir. Bu bölgeler; adrenal bez, plasenta, karaciğer ve yumurtalık olarak sayılabilmektedir. Farelerde ve insanlarda trofik hormonların (ACTH, FSH, LH/hCG) etkisi ile steroidojenik dokularda, SR-B1 ekspresyonu görülebilmektedir (Shen ve ark., 2018).

SR-B1'in ekspresyonu bazı faktörlerden etkilenebilmektedir. Adrenal bezlerde ACTH stimülasyonu, yumurtalık granülozası, testis Leydig Hücreleri'nde gonadotropin tedavisi sonrası oluşan durumlar bu faktörlere örnek olarak sayılabilmektedir. Bunun yanı sıra kolesterol rezervleri tükendiğinde veya steroid üretimi arttığında steroidojenik dokularda ekspresyon önemli ölçüde değişebilmektedir (Shen ve ark., 2018).

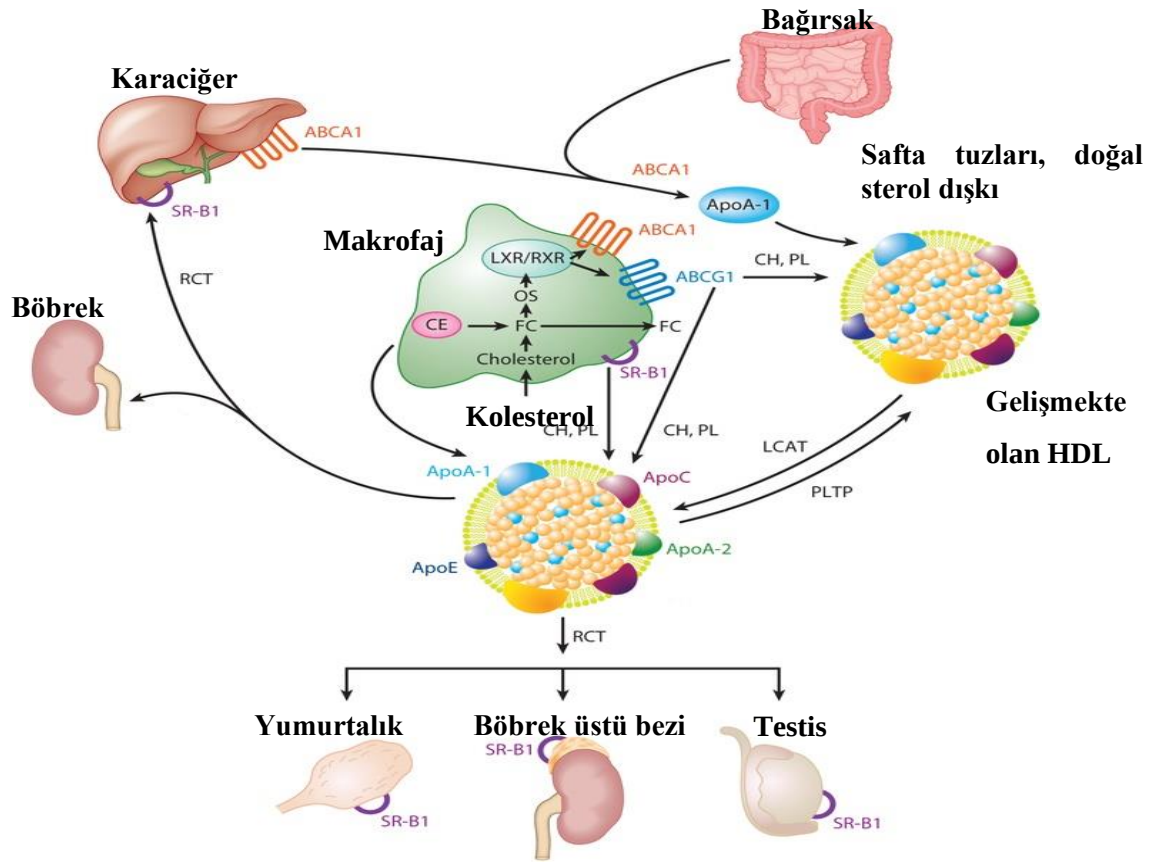
Kolesteril esterleri, lipid bakımından zengin lipoproteinlerden SR-B1 aracılığı ile alınmaktadır ancak bu süreç hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Elde edilen bilgiler sürecin iki adımda gerçekleştiği yönündedir. Birinci adımda lipid açısından zengin lipoprotein SR-B1'in hücre dışı alanına bağlanmaktadır ve ikinci adımda, lipid plazma zarına seçici olarak transfer olmaktadır (Shen ve ark., 2018).

Daha büyük HDL parçacıkları, gelişmiş bağlanmaya ve artan seçici kolesteril esteri iletimine sahip olmakta, bu da HDL'nin yüzeyindeki tanıma bölgelerinde meydana gelen değişikliklerin HDL'nin SR-B1 ile etkileşime girme potansiyelini etkilediğini göstermektedir (Shen ve ark., 2018).

SR-B1'in aracılık ettiği seçici alımda ilk önce, lipoproteinler ki bunlar kolesterol esterleri açısından zengin olanlardır; amfipatik α -heliks alanı yoluyla SR-B1 reseptörünün hücre dışı alanına bağlanmaktadır. Bağlanmadan sonra kolesterol esterleri, HDL parçacıkları içindeki bir konsantrasyon gradyanını hücre plazma zarına doğru hareket ettirmektedirler. Serbest kolesterol ve trigliserit molekülleri gibi HDL yapısındaki diğer lipitler de seçici olarak hücrelere aktarılmaktadır. Kolesterol esterlerinin ne kadar alınacağı, başlangıçta HDL partiküllerinde var olan kolesterol esterleri miktarına bağlı bulunmaktadır. Kolesterol esterler ve trigliseritler için taşıma daha kolay ve verimlidir çünkü bu moleküller apolardır. Ancak daha polar fosfolipidler için taşıma hızı daha yavaş olmaktadır. HDL'den kolesterol ester alımı için gerekli olan aktivasyon enerjisi düşüktür. Bu değer yaklaşık 9 kcal/mol olarak bilinmektedir ve bu durum bu alımdaki hız sınırlayıcı adımın susuz bir yol içerebileceğini düşündürmektedir. Reseptörün hücre dışı alanı tarafından oluşturulan, suyun dışlandığı ve kolesterol ester moleküllerinin yayıldığı bir hidrofobik kanalın, bu aktiviteleri barındırmak için uygun olabileceği düşünülmüştür. Bu kanalın varlığı yapılan bir çalışma ile de doğrulanmıştır. Bu çalışmada; SR-B1'in homoloji modellemesine ek olarak, Lizozomal İntegral Membran Proteini-2 (LIMP-2)'nin hücre dışı bölgesinin yüksek çözünürlüklü kristal yapısı yayınlanmıştır. HDL yapısı, yüzeyinde yer alan bir apo A-1 molekülünde bulunan asidik amfipatik α -sarmallarının bağlanmasını kolaylaştırmak için bir bazik kalıntı kümesi oluşturan protein kıvrımları ile küresel bir yapı oluşturan antiparalel bir β -fiçisi çekirdeği ve birçok kısa sarmal segment ortaya çıkarmıştır. Ek olarak, molekülün tüm uzunluğunu kateden β -fiçisinin merkezinde bir tünel vardır. Bu boşluğun boyutu, kolesterol ester ve serbest kolesterol moleküllerinin geçişine izin vermek için yeterlidir (Shen ve ark., 2018).

Yapılan pek çok çalışma HDL'nin plazma düzeylerinin kardiyovasküler hastalık riski ile ters orantılı olduğunu göstermiştir. HDL'nin varsayımsal koruyucu etkisi, kolesterol atılımı ve safra asidi sentezi veya steroidojenik organlarda steroid hormonu sentezi için HDL yoluyla kolesterolün periferik dokulardan karaciğere ters kolesterol taşınmasındaki rolüne bağlanmaktadır. Ters kolesterol taşınmasındaki öncelikle yapılan, aterosklerotik lezyonlarda bulunan makrofaj köpük hücrelerindeki depolardan fazla kolesterolün uzaklaştırılmasıdır. Kolesterol akışına yardımcı olan birkaç yol bulunmaktadır. Bunlar; ATP bağlayıcı kaset A1'in (ABCA1) aracılık ettiği yol, apo A-1'e tek yönlü akış yolu, ABCG1'in aracılık ettiği olgun HDL partiküllerine tek yönlü akış yolu; SR-B1 tarafından kolaylaştırılan pasif difüzyon yoluyla olgun HDL partiküllerine akış şeklindedir. Ters kolesterol taşınmasının bir sonraki adımı, makrofaj köpük hücre depolarından gelen kolesterolün safra asidi üretimi için karaciğere SR-B1 aracılığıyla taşınması ve ardından steroid üretimi ve depolanması için özellikle adrenal

bez ve yumurtalık olmak üzere steroidojenik dokulara taşınması olarak açıklanmaktadır (Shen ve ark., 2018).



Şekil 4. SR-B1'in ters kolesterol taşınmasındaki rolü (Shen ve ark., 2018'den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

SR-B1'in ters kolesterol taşınmasındaki rolü, serbest kolesterolün hücrelerden lipitsiz apolipoproteinlere, özellikle ABCA1'in aracılık ettiği apo A-1'e tek yönlü akışıyla başlamaktadır. Serbest kolesterol ve fosfolipidlerin olgun HDL parçacıklarına daha fazla tek yönlü akışına ABCG1 aracılık etmektedir. SR-B1, serbest kolesterolün pasif difüzyon yoluyla olgun HDL parçacıklarına akışını kolaylaştırmaktadır. Serbest kolesterolden oluşturulan oksisteroller, Retinoid X Reseptörler ile heterodimerleri oluşturan Karaciğer X Reseptörlere bağlanarak ABCA1 ve ABCG1'in ekspresyonunu düzenlemektedirler. HDL'ye aktarılan serbest kolesterol, LCAT'ın eylemleriyle esterleştirilirken, HDL'nin fosfolipid yüzeyi, fosfolipid transfer proteininin eylemleriyle yeniden modellenmektedir. Olgun HDL daha sonra kolesterol esterlerini SR-B1 aracılığı ile karaciğere ve steroidojenik organlara (yumurtalık, adrenal ve testis) iletmektedir (Shen ve ark., 2018).

Kolesterolün seçici alımının aksine, SR-B1 ve lipoprotein partiküllerinin bağlanması, muhtemelen SR-B1'in dış bölgesi içindeki hidrofobik tünel aracılığıyla olmakta, hücrelerden serbest kolesterolü çıkaran kolesterol akışı için bir bağlanma yeri görevi görebilmektedir. Bununla birlikte, SR-B1 aracılı serbest kolesterol akışının HDL konsantrasyonları üzerindeki

etkisi incelendiğinde, serbest kolesterol akışı ve HDL bağlanması tam anlamıyla olmadığını göstermiştir ki; serbest kolesterol, düşük ve yüksek hücre dışı HDL konsantrasyonlarında farklı şekilde dışarı akmaktadır (Shen ve ark., 2018).

HDL konsantrasyonları çok önemlidir. HDL ile hücre zarı arasındaki kolesterol esteri ve serbest kolesterol konsantrasyonu birbirine zıt olduğu için, hücre plazma zarındaki yüksek kolesterol miktarının fosfolipid miktarına oranı fazladır ve serbest kolesterol bu sayede HDL'ye yönelmektedir. HDL'nin fosfolipid içeriği arttığında, hücrelerden serbest kolesterol akışı buna oranla artmakta ve daha büyük HDL partikülleri SR-B1'e daha sıkı bağlanmakta (daha yüksek bir afiniteye sahip olmaları sebebi ile) ve daha fazla serbest kolesterol akışına neden olmaktadır. Ayrıca yüksek HDL seviyelerinde, SR-B1, plazma zarı hücresinde serbest kolesterolün yeniden düzenlenmesini indüklemekte ve kolesterol oksidaz tarafından oksidasyona daha duyarlı olan aktifleştirilmiş serbest kolesterol alanları oluşturmaktadır. Bu koşullar altında, aktive edilmiş serbest kolesterol, hücre dışı alıcılara sulu difüzyon yoluyla daha kolay taşınabilmektedir (Shen ve ark., 2018).

Son gelişmelere göre Src, SR-B1'e direkt bağlanmaktadır. Src, proto-onkogenik tirozin kinaz grubudur ve hücreler arası sinyal iletiminde etkilidir. Src'nin fosforilasyonu gerçekleştiğinde SR-B1'deki PDZK1 bölgesi ile etkileşmektedir. Bu etkileşim endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) sinyalini uyarmakta ve bu sayede endotel hücreler apoptozdan korunmuş olmaktadır. Akabinde endotel hücre göçü ve hücre büyümesi artmakta ve bunun sonucu olarak daha az köpük hücre oluşmaktadır. Sitoplazmik kolesterol esterlerinin temizlenmesi için bilinen temel yol, hidroliz için kolesterol esterlerinin lizozomlara göçüdür. Tüm bu sürecin sonunda makrofaj otofajisi ile aterosklerozda azalma görülebilmektedir. Son araştırmalar göstermiştir ki; eğer makrofajlarda SR-B1 eksikliği mevcut ise otofaji yetersiz olabilmektedir. Tüm bunların yanı sıra sitoplazmik kolesterol esterlerinin temizlenebilmesi için SR-B1, Rab7 ile birlikte lizozomlara aktarılabilir. Rab7 otofagozom ve lizozom fizyonu için önemli bir proteindir (Shen ve ark., 2018).

SCARB1 geni, çöpçü reseptör sınıf B tip 1'i kodlamaktadır ve HDL ile hücreler arasındaki kolesterol transferine aracılık etmektedir. Bunun yanında, ters kolesterol taşınmasında etkilidir çünkü fazla kolesterol safra aracılığıyla vücuttan atılmaktadır. Bunun için hepatik SR-B1 kullanılmaktadır. SR-B1, CD36 Antijen-benzeri2 (LIMPII) ve CD36'yı da içeren Scavenger Reseptör proteinlerinin B sınıfı ailesinin bir üyesidir. SR-B1, bağırsak, makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, keratinositler, adipositler ve plasenta dahil olmak üzere birçok memeli hücresinde eksprese edilmektedir (Samadi ve ark., 2018).

SR-B1 sistemik dolaşımdaki lipoproteinlerden kolesterol esterlerinin alınmasını kolaylaştıran HDL'nin reseptörüdür. Bu reseptör çoğu tümör hücresi tarafından aşırı eksprese edilirken aynı

zamanda bulunmuştur ki; kolesterol metabolizmasında, sinyal iletiminde, kanser hücrelerinin çoğalmasında rol oynamaktadır ve karsinogenezde ve metastazda önemli etki göstermektedir. Son yapılan çalışmalarda bulgulara göre; SR-B1'in ekspresyon seviyesi meme kanserinin daha agresif bir hal almasında etkili olmaktadır. HDL bilindiği gibi ateroskleroza karşı koruyucu etkilidir. Bu yararlı etkisini ters kolesterol taşıması ile yapar. Ters kolesterol taşıması, perifer hücrelerdeki fazla kolesterolün uzaklaştırılmasıdır. Burada HDL bu fazla kolesterolü atılmak üzere karaciğere taşır. Birçok kanser hastasında azalmış HDL düzeyi tespit edilmiştir ve bu hastalarda SR-B1'in aşırı ekspresyonu görülmüştür (Mooberry ve ark., 2016).



Şekil 5. Kolesterolce zengin HDL'nin SR-B1 tarafından yakalanması (Mooberry ve ark., 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır)



Şekil 6. HDL'nin yükünü sitoplazmaya bırakması (Mooberry ve ark., 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır)



Şekil 7. HDL'nin kan dolaşımına geçmesi (Mooberry ve ark., 2016'dan yararlanılarak hazırlanmıştır)

HDL'nin vücuttaki görevi dokulardaki fazla kolesterolü ters transport ile karaciğere taşıyıp bu yolla temizlemektir. Önce kolesterol açısından zengin HDL hücre yüzeyindeki SR-B1 reseptörü tarafından Şekil 5'deki gibi yakalanır. Daha sonra HDL kolesterol ester yükünü SR-B1 aracılığı ile Şekil 6'de gösterildiği gibi direkt olarak sitoplazmaya iletir. Son aşamada içi boşalmış HDL Şekil 7'teki gibi kana salınır (Mooberry ve ark., 2016).

Dolaşımdaki HDL'nin öncülleri Apo (Apolipoprotein) A1 ve fosfolipidten oluşan, kolesterolden fakir, diskoidal yapılardır ve karaciğerde sentezlenip dolaşıma salınırlar. Ardından ABCA-1(ATP bağlayıcı kaset proteini), yeni oluşan bu diskoidal yapının periferik dokulardan kolesterol ile yüklenmesini kolaylaştırır. HDL'de kademeli olarak kolesterol birikir. Sonra bu biriken kolesterol LCAT (Lesitin Kolesterol Asiltransferaz) tarafından esterlenir. Böylece olgun, küresel HDL partikülleri oluşur. HDL'nin esas apolipoproteini Apo-A1'dir ancak, HDL birkaç lipoprotein reseptörü ile etkileşimini kolaylaştırmak için, diğer lipoproteinlerden Apo A-II, Apo A-IV, Apo C-III veya Apo-E'yi alır. HDL'den gelen kolesterolün büyük bir kısmı, SR-B1 reseptörü tarafından kolaylaştırılan ve sadece kolesterol esterlerinin uzaklaştırılmasını kapsayan bir işleme tabi tutulur. Bu işleme seçici lipit alımı adı verilmektedir. HDL kolesterolü boşalttıktan sonra retro endositoz yolu ile salınır.

HDL'nin protein bileşeni ise plazma zarına bağlı kalır. SR-B1 reseptörünün eksprese olması daha çok testis, yumurtalıklar, karaciğer, adrenal bezler gibi kolesterol ve steroid hormon sentezinin olduğu dokularda belirgindir (Mooberry ve ark., 2016).

SR-B1'in yapısı; N-terminal hücre içi bölge, N-terminal trans membran alan, C-terminal hücre içi alan ve hücre dışı sistein açısından zengin bir bölgeden oluşmaktadır. SR-B1 reseptörü HDL'den kolesterol esterlerinin hücre içine girmesini kolaylaştırmak için bir hidrofobik kanal oluşturmaktadır diye görüşler bulunmaktadır. Hatta bu yönde yapılan çalışmalarda N-terminal ve C-terminal alanlarının seçici kolesterol alımı için kullanılmadığı sadece hücre dışı bölgenin bu görevi üstlendiği bulunmuştur (Mooberry ve ark., 2016).

SR-B1 aşırı kolesterolün atılmasını destekleyen, ters kolesterol taşınmasında önemli rol oynayan bir reseptördür. Ayrıca ateroskleroz açısından bakıldığında SR-B1 hücre içi sinyalleşme, lipid birikimi, köpük hücre oluşumu ve hücre apoptozun düzenlenmesinde rol almaktadır. SR-B1'in kardiyovasküler hastalıklarda ters kolesterol taşınmasına katkıları çok defa ayrıntılı olarak araştırılmıştır ancak son zamanlarda yapılan incelemeler kolesterol ve metabolitlerinin kanser ilerlemesindeki kritik rolü üzerinedir (Gutierrez-Pajares ve ark., 2016). SR-B1 karaciğer hücrelerinde, periferik dokularda HDL-CE (kolesterol ester) alımına aracılık ederken; SR-B1'in HDL'ye bağlanması, hücre içi depolardan kolesterol akışı yolu ile net bir kolesterol çıkışını uyarabilmektedir. Kanser durumlarında, çoğalan ve yayılan kanser hücrelerinde hücre içi kolesterolün yüksek seviyelerinin korunması için dışarı akış ve içeri akış

hassas bir şekilde düzenlenmelidir. Kolesterol akışının yönü, kolesterol alıcılarının ve hücresel plazma zarının özelliklerine bağlı olabilir. SR-B1'in aracılık ettiği akış, serumda bulunan HDL fosfolipid içeriği ile büyük oranda ilişkilidir. Bu bağlamda Fournier ve arkadaşları, 1996-1997 yıllarında bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada HDL, fosfatidilkolin veya sfingomyelin ile zenginleştirilmiş ve bu şekilde yeniden yapılandırılmış ve CHO hücrelerinde SR-B1'in aracılık ettiği akış incelenmiştir (Gutierrez-Pajares ve ark., 2016).

Yancey ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada sfingomyelin ile zenginleştirilmiş HDL'nin, SR-B1 aracılı kolesterol akışını azaltarak net akışı arttırdığı, buna karşın HDL'nin fosfatidilkolin zenginleştirmesinin SR-B1 aracılı akışı arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, aynı mekanizmaların kanser hücrelerinde kolesterol homeostazını düzenleyip düzenleyemediği şu anda bilinmemektedir (Gutierrez-Pajares ve ark., 2016).

Bir çalışmada, meme kanseri hücre hattı HDL-100'ün, SR-B1 yoluyla seçici olarak kolesterol esterleri aldığı gösterilmiş ve hücreler, HDL-3 konsantrasyonuna yanıt olarak kolesterol esterini doza bağlı bir şekilde absorbe etmiştir. Kolesterol esterleri daha sonra hormona duyarlı lipaz (HSL) tarafından hidrolize edilmiştir (Mooberry ve ark., 2016).

Kanser hücrelerinde SR-B1 tarafından aktive edilen veya inhibe edilen sinyal yollarıyla ilgili henüz fazla veri mevcut değildir. HDL/SR-B1 etkileşiminin iki meme kanseri hücre hattında hem PI3K hem de Erk1/2 yollarını aktive edebileceği bilinmektedir. Bu bulgular, endotelial hücrelerle elde edilen sonuçlarla paraleldir. Bunun yanında, SR-B1 ve PDZK1 etkileşime girer ve bu etkileşim eNOS aktivasyonuna ve endotel hücre göçüne aracılık etmek için elzemdir. Ancak, PDZK1'in HDL'ye bağlanması, SR-B1 plazma zarı lokalizasyonu veya kolesterol ester alımı için gerekli değildir. PDZK1'in, PI3K'nın HDL/SR-B1 aracılı aktivasyonu ve c-Src yolları ve endotelial hücrelerde yayılımının aktivasyonu için önemli olduğu öne sürülmüştür ve bu sinyalleşme kaskadının aktivasyonunda SR-B1 sitoplazmik C-terminalinin rol oynadığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada proteinin karboksil-terminal kuyruğundan yoksun olan bir mutant rekombinant SR-B1 formunun meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve bu etkinin muhtemelen Akt aktivasyonunun azalmasından kaynaklandığı gösterilmiştir. Total olarak değerlendirildiğinde, bu bulgular meme kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunda SR-B1'nin C-terminal alanı ile ilgili olduğunu göstermiştir (Gutierrez-Pajares ve ark., 2016).

SR-B1'in inhibe olduğu ya da hiç bulunmadığı tümörlerde (MDA-MB-231 hücreleri) artan Erk1/2 ve Akt aktivasyonu ve hücre apoptozda artış ile birlikte tümör büyümesinin azaldığı gösterilmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerindeki çalışmalar, SR-B1 reseptörünün devre dışı bırakılmasının (SR-B1 shRNA'nın lentiviral transdüksiyonu veya HDL varlığında SR-B1'in farmakolojik inhibisyonu yoluyla) Akt ekspresyonunun aktivasyonunu azalttığını göstermiştir. Akt sinyal

yolu, meme kanserlerinin %40'ında aktive edilir. Yapılan çalışmalar HDL'nin (100µg/ml) meme kanseri hücrelerinde Erk1/2 ve Akt yollarının aktivasyonunu tetikleyebileceğini göstermiştir (Mooberry ve ark., 2016).

4.8.1. Özet noktalar

- 1- SR-B1, HDL'nin hücrelere seçici olarak iletilmesine aracılık eden multiligand membran reseptörüdür.
- 2- SR-B1, plazma zarı içinde hidrofobik bir tünel oluşturabilir ve bu, lipit moleküllerinin seçici hücrel akışını kolaylaştırmaktadır.
- 3- SR-B1, periferik dokulardan HDL'ye kolesterol akışını sağlayarak ters kolesterol akışının ilk adımına ve HDL'nin kolesterolü karaciğer hücrelerine seçici olarak verilmesini kolaylaştırarak ters kolesterol akışının son adımına aracılık etmektedir.
- 4- SR-B1 ayrıca vitaminlerin alımını kolaylaştırabilmektedir.
- 5- SR-B1, kanser teşhis etmek için iyi bir biyobelirteç olarak kabul edilebilmektedir.
- 6- SR-B1'e bağlı seçici HDL kolesterol ester alım yolu, terapötik ve tanısal ajanların verilmesi için uygundur (Shen ve ark., 2018).

4.9. Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz

Apoptoz, normal hücrelerin bazı indükleyici ajanlar tarafından dışarıdan birkaç sinyal yolunu aktive ederek hücrenin ölümüne neden olan doğal bir süreçtir. Hayvan hücrelerinde apoptoz kendi kendini yok etme şeklinde olurken, kanser hücrelerinde nekroz süreci, yakındaki canlı hücrelerin parçalanmasını etkilemektedir. Canlı hücreler, farklı hücre yüzey reseptörleri yoluyla apoptoz ve nekroz hedeflerini ayırt edebilmektedirler. Nekrozdan farklı olarak, yüksek oranda metastatik meme kanseri bulunan hastalarda apoptotik hücre ölümü daha az zarar vericidir. Meme ve kolon kanseri hücrelerinde apoptotik kaskadların aktivasyonu kanser için kullanılacak ilaç keşfinde birincil ilgi alanı olmuştur. Apoptoz indüksiyonu dört kategoride sınıflandırılabilir:

- 1-Dahili mitokondriyal kaspaz aktivasyon yolu (IMCAP)
- 2-Harici ölüm reseptörü aktive edici yol (EBRAP)
- 3-NF-kappa B aktivasyon yolu (NF-kB Parthway)
- 4-Kaskadlar protein kinaz aktivasyon yolları (CPKAP) (Basu ve ark., 2012).

Normal meme gelişiminde, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge çok önemlidir. Bu nedenle tümör büyümesinin sadece kontrolsüz çoğalmanın değil, aynı zamanda azalmış apoptozun bir sonucu olduğuna dair düşünceler vardır. Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge, uygulanacak tedaviler açısından da çok önem arz etmektedir. Çünkü kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavilere yanıt olarak tümörün genel büyümesini ve gerilemesini belirlemede bu dengeye bakılmaktadır. Bunların hepsinin hareket amacı kısmen apoptozu

indüklemektir. Bu nedenle, apoptozu ve bunun kontrolünü ve regülasyonunu inceleyerek bireysel tümörlerin biyolojisini moleküler ve biyokimyasal düzeyde açıklamak ve bunları klinik avantaj sağlamak için kullanmak mümkündür. Araştırmalar sonucu varılan bazı noktalar şu şekilde sıralanabilmektedir:

- 1- Artan çoğalma ile artan apoptoz, malign tümörlerle ilişkilidir.
- 2- Artmış apoptozu olan meme tümörlerinin östrojen negatif olasılığı fazladır.
- 3- Bir meme kanserinde yüksek apoptoz seviyeleri varsa hayatta kalma olasılığı düşük kabul edilmektedir.
- 4- Kemoterapi başladıktan sonraki 24 saatte apoptoz daha net ölçülebilmektedir

(Parton ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalar sonucunda apoptotik yolun ikiye ayrıldığı bulunmuştur. Bunlar; dışsal yol veya diğer adı ile ölüm reseptörü yolu ve içsel yol veya diğer adı ile mitokondriyal yoldur. Sonraki çalışmalarda ek bir yol daha bulunmuştur ve bu yol granzim B yolu olarak adlandırılmıştır. Bu üç yol aynı yürütme yolunda birleşmektedir. Bu yol, kaspaz-3'ün bölünmesiyle başlatılmaktadır ve DNA fragmantasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alımla sonuçlanmaktadır. Kaspazlar apoptozda çok önemli role sahiptirler. Birçok hücrede aktif olmayan proenzim şeklinde eksprese edilmektedirler ve aktif hale geldiklerinde prokaspazları aktive edebilmektedirler. Böylece proteaz kaskadının başlatılmasına izin verilmiş olmaktadır. Bu şekilde bir kaspazın diğer kaspazların aktive etmesi ile işleyen süreçte apoptotik sinyal yolu güçlenmekte ve hücre ölümü hız kazanmaktadır. Günümüze kadar yaklaşık on kaspaz tanımlanmıştır. Bunlar kendi arasında başlatıcılar (Kaspaz-2, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Kaspaz-10) ve yürütücüler (Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7) ve inflamatuvar (Kaspaz-1, Kaspaz-4, Kaspaz-5) olmak üzere gruplara ayrılmaktadırlar.

Dışsal yol, apoptozu başlatan sinyal yollarını ve membran reseptör aracılı etkileşimleri kapsamaktadır. Bunlar tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü ve ölüm reseptörlerini (FasL/FasR, TNF-a/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5) içermektedir. TNF reseptörleri sistein açısından zengin ve ölüm alanı adı verilen yaklaşık seksen aminoasit içeren sitoplazmik bir alana sahiptirler. Bu alan ölüm sinyallerinin hücre içerisine iletilmesinde kritik öneme sahiptir. Apoptozun dışsal fazı sitoplazmik adaptör proteinlerin toplanması ve birtakım olaylar zincirinden sonra Kaspaz-8'in aktivasyonu ile devam etmektedir. Kaspaz-8 aktive olduğunda ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşmaktadır ve apoptoz gerçekleşmektedir. İçsel yol, reseptör aracılı değildir ve mitokondri tarafından başlatılmaktadır (Elmore, 2007).

4.9.1. Meme dokusunda apoptozun saptanması ve miktarının belirlenmesi

Apoptozun in situ saptanması ve miktarının belirlenmesi için elektron mikroskobu veya ışık mikroskobu kullanılmaktadır. Burada yapılan değerlendirmeler; kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma, hücre büzülmesi ve plazma zarının taşması olarak sayılabilmektedir. Bununla birlikte, bu tür bir değerlendirme oldukça zordur ve zaman gerektirmektedir. Bu nedenle değerlendirmeleri kolaylaştırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

En çok tercih edilen teknikler, apoptozun ileri aşamalarında meydana gelen çok sayıda DNA fragmanının ucuna etiketli nükleotidlerin eklenmesidir. Buna örnek olarak TUNEL tahlili verilebilir. TUNEL tahlili terminal deoksiribonükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketlemesi olarak bilinmektedir. Hücre morfolojisi aynı anda incelenebilmekte ve apoptotik hücreler daha kolay tanımlanabilmektedir. Serbest DNA uçlarının etiketlenmesi esnasında nekrozlu alanlar da lekelenebilmektedir fakat uygulama, bunları apoptotik hücrelerden zorlanmadan ayırabilmektedir. Apoptoz, apoptoz esnasında görülen zar değişikliklerinin tespit edilmesi veya enzimlerin (doku transglutaminazları) salınmasının saptanmasıyla da değerlendirilebilir, ancak DNA uçlarının etiketlenmesi tekniği klinik dokuya uygulanabilirken, bu teknik klinik materyale uygulanamamaktadır. Uygulanacak klinik doku formalin ile sabitlenmiş ve parafine gömülmüş dokudur. Ancak bu yöntemler sadece süreçte anlık bir görüntü sağlar çünkü apoptotik hücreler makrofajlar tarafından süratle uzaklaştırılmaktadırlar (Parton ve ark., 2001).

4.9.2. Neden meme kanserinde apoptoza bakılır?

Normal meme gelişiminde apoptoz çok önemlidir. Eğer düzensizlik olursa kontrol noktası yollarının büyük kısmı etkilenmekte ve kanser hücrelerinin oluşmasına yol açmaktadır. Apoptoz oranları, kanserin derecesi ile bağlantılıdır. Eğer apoptoz ve proliferasyon oranı fazla ise bu daha saldırgan tümörlerde daha yaygın görülmektedir.

Eğer apoptozda düzensizlik mevcut ise uygulanan tedaviler de başarısız olabilmektedir. Bu tedaviler arasında kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi sayılabilir. Apoptozu kontrol eden genler ve proteinler vardır ve bunlar kanser hücrelerini apoptozunu arttırmak için manipülasyonun hedefi haline gelebilmektedirler.

Ameliyattan önce kemoterapi veya endokrin tedavisi uygulanması, tedavi öncesinde ve tedavi esnasında tümörlere erişim sağlamak ve tedavi sırasında apoptozdaki değişikliklerin incelenmesini mümkün kılmaktadır.

Genellikle apoptoz ve hücre proliferasyonu birlikte analiz edilmektedir. Apoptoz ve proliferasyon arasındaki denge kavramı, bir tümörde genel hücre ölümü ve proliferasyon indeksleri olarak mitotik ile apoptotik oranların araştırılmasıyla sonuçlanmaktadır

(Parton ve ark., 2001).

Meme kanserine yönelik güncel araştırmaların ana hedefi, bireysel tümörlere göre tasarlanmış tedavi protokollerini geliştirmek ve böylece sağkalımı mümkün oldukça arttırmaktır. Bu nedenle sonuç olarak şu yorumu yapabiliriz; bireysel bir tümörün biyolojisinin profilini çıkaracak ve klinik olarak en etkili tedaviyi sağlamaya olanak sağlayacak apoptoz ile ilgili yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra ek bir bilgi olarak astaksantin apoptoz ile ilişkilidir ancak bunu nasıl yaptığının mekanizması henüz bilinmemektedir (Parton ve ark., 2001), (Kim ve ark., 2020).

4.10. Astaksantin

Astaksantin (AST) bir ksantofil karotenoididir (3,3'-dihidroksi-beta, beta-karoten-4,4'-dion) ve mikroalg, karides, somon gibi çeşitli deniz canlılarında bulunan kırmızı bir pigmenttir. AST'nin antioksidan ve anti-inflamatuar etki kapasitesi diğer karotenoidlere kıyasla daha fazladır. Bu nedenle oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkili hastalıkları önleyebilmek ve tedavi edebilmek için bu madde üzerinde fazlaca çalışılmıştır. Son zamanlarda yapılan bir çalışma sonucunda, AST'nin anti-tümör aktivitesi incelenmiş ve AST'nin oksijen aracılı sitotoksiteyi önlediği, tümör bağışıklığını modüle ettiği ve fosfatidilinositid 3-kinazları (PI3), Protein kinaz B (AKT) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyalini inhibe ederek intrinsik apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Bu nedenle, bu bulgular AST'nin kanser hücrelerinde güçlü bir apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AST'nin hücrelerde apoptoza nasıl neden olduğuna dair daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir (Kim ve ark., 2020).

Bir çalışmada, AST'nin bir antioksidan ve apoptotik olarak rolünü anlamak için AST tedavisinden sonra SKBR3 meme kanseri hücrelerinde mutp53, PARP-1, Bcl2, SOD, MAPK dahil olmak üzere apoptoz ile ilgili bazı molekülleri analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda bulunan veriler ile AST'nin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücrelerin hücresel morfolojisini değiştirdiği gözlenmiştir (Kim ve ark., 2020).

Yapılan başka bir çalışma ise, AST'nin diğer anti-kanser tedavilerinin etkinliklerini geliştirmek için potansiyel olarak olası bir alternatif tedavi olabileceğini düşündürmektedir (Kim ve ark., 2020).

AST, anti-inflamatuar ve oksidatif stres azaltıcı özelliklere sahip olduğundan, teorik olarak, AST takviyesi kanseri olumlu yönde etkileyebilmektedir. Araştırmalar, AST'nin hücre zarı yapısını korurken diğer karotenoidlerin zarlarda düzensizliğe neden olduğunu göstermektedir. AST'nin doza bağlı bir şekilde hem oksidatif stresi hem de iltihabı azalttığı kanıtlanmıştır (McCall ve ark., 2018).

Bir araştırmada, AST'nin ER+ meme kanseri hücreleri ve TNBC hücreleri üzerindeki çoğalma, göç ve gen ifadesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Normal meme epitel hücrelerine oranla kanser hücrelerinde AST tarafından indüklenen önemli farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca elde

edilen verilere göre, AST'nin meme kanseri hücrel göçünü önemli ölçüde engellediği, meme kanseri hücre sayılarını önemli ölçüde azalttığı ve normal meme epitelyal hücrelerine kıyasla meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. MDA-MB-231 TNBC hattı oldukça metastatiktir ancak göç kapasitesi AST tedavisi ile azaltılmıştır (McCall ve ark., 2018). AST tedavilerini takiben normal meme epitel hücre dizisi MCF10A'nın migrasyon, hücre sayıları veya apoptotik gen ekspresyonundaki değişiklik üzerinde önemli etkiler gözlemlenmiştir. AST'nin normal meme hücreleri üzerindeki etkisinin olmaması, normal hücrelerin AST kanser tedavilerine yanıt olarak göç etme ve çoğalma kapasitesine sahip olacağı için önemlidir, bu da normal hücrelerin normal şekilde çalışmaya devam edebileceği ve ölmekte olan tümör tarafından oluşan boşluklara göç edebileceği anlamına gelmektedir. Sonuç olarak AST meme kanseri hücrelerinin çoğalması ve göçünü azaltmada etkili bir yöntem olarak bulunmuştur (McCall ve ark., 2018).

Astaksantin (AST), kanser insidansını potansiyel olarak azaltmak veya kanser hücrelerinin yayılmasını önlemek için antioksidan, antienflamatuvar ve oksidatif stres azaltıcı özellikler gibi işlevlere sahip deniz kökenli bir ketokarotenoiddir. Yapılan bir çalışmada, 250 µM astaksantin, metastazı inhibe eden tüm proteinlerin etkinliğini arttırdığı; ayrıca, bu metastaz inhibe edicilerin, tek bir yerde bulunan kanser hastalarının kanser dokularına göre invaziv duktal karsinom hastalarının (kanseri hücrelerinin kanal dışına geçmiş halidir) karsinom dokularında daha yüksek ekspresyon gösterdiği bulunmuştur (Badak ve ark., 2021).

AST bir ksantofil karotenoididir (3,3'-dihidroksi-beta, beta-karoten-4,4'-dion) ve algler, karides, somon gibi çeşitli deniz canlılarında bulunan kırmızı renkli bir pigmenttir. AST, diğer karotenoidlerden farklı olarak daha fazla antioksidan ve antienflamatuvar etkiye sahiptir ve oksidatif stres ve enflamasyona bağlı oluşan hastalıkları önlemek ve tedavisine destek olmak için birçok defa ve kapsamlı olarak çalışılmıştır. AST'nin anti-kanserojen etkisi ve bununla ilgili mekanizmaları anlamak için birkaç çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar sonucunda AST'nin oksijen aracılı sitotoksitesiteyi önlediği, tümör bağışıklığını modüle ettiği ve fosfatidilinositid 3-kinazları (PI3), protein kinaz B (AST) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyalini inhibe ederek intrinsik apoptozu tetiklediği görülmüştür. Bu nedenle, bu sonuçlar AST'nin kanser hücrelerinde güçlü apoptoz yapıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AST'nin hücrelerde apoptoz nasıl neden olduğuna dair daha ayrıntılı araştırmalara gerek olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2020).

Bir çalışmada, AST'nin antioksidan ve apoptotik olarak rolünü anlamak için AST tedavisinden sonra SKBR3 meme kanseri hücrelerinde mutp53, PARP-1, Bcl2, SOD, MAPK dahil olmak üzere apoptoz ile ilgili bazı molekülleri analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda bulunan veriler

ile AST'nin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücrelerin hücresel morfolojisini değiştirdiği gözlenmiştir (Kim ve ark., 2020).



5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Gereçler

5.1.1. Hücre kültürü

- CO2 inkübatörü: SANYO MCO-19A1C(UV)
- Laminar akımlı kabin: ESCO Class II Biosafety Cabi net LP-4S1I 2009- 43648
- Santrifüj: Hettich UNIVERSAL 320
- Işık mikroskobu: OLYMPUS CKX41
- Microplate reader: Epoch BioTek Instruments 254732
- Otoklav: BioTek NB1045
- Mikropipet: RAININ Pipet-Lite XLS 10 µl, 100 µl, BIOHIT PROLINE 20-200 µl
- Otomatik pipet: CappAid
- Flask: TPP, 90026, filter screw caps, 25 cm²
- Falkon tüp: CAPP, Bluecapp 50 ml steril, 5100050
- Eppendorf: UltraCruz, 2 ml mikrosantrifüj steril tüp, sc-200273
- Steril serolojik pipet: CAPP, 5ml, SP-5-C
- Steril plakalar: TPP, 96 kuyucuklu mikrolaka- 92096, 24 kuyucuklu mikrolaka - 92424, 6 kuyucuklu mikrolaka – 92006

5.1.2. Laboratuvar gereçleri

- Hassas terazi: Weightlab instruments WSA-224
- Distile su cihazı: GFL 2002-1008974151
- Buz makinesi: SPT IM-662C: 66 Ibs Automatic Stainless Steel Ice Maker
- Ultrasonik banyo: Wise Clean WUC-A03H
- Etüv: Heraeus Thermo Scientific 40918100
- Manyetik karıştırıcı: ISOLAB Fuse T315 A1 250VAC
- UV spektrofotometre: SHIMADZU UV- 1700
- Mikropipet: İsolab 1ml, Eppendorf research 10ml
- Bio-Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System
- Coomassie (Bradford) protein test kiti thermo scientific

5.1.3. Kimyasallar

- Medyumlar: Gibco Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (DMEM F12)
- Phosphate-buffered saline (PBS), Gibco, 20012027
- Fetal Bovine Serum (FBS), PAN Biotech, P30-193306
- Penicillin/Streptomycin Solution (10x), Capricorn, PS-B

- Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, 41640
- Ethanol Absolute, Sigma-Aldrich, 32221-2,5 L

5.2. Yöntem

5.2.1. Hücre kültürü:

Bu tez çalışmasında, MCF-7 (hormona duyarlı epitelyal meme kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde astaksantin HDL-2 alt fraksiyonu ile birlikte anti-kanserojen, apoptotik ve SR-B1 reseptörü üzerindeki etkileri araştırıldı.

MCF-7 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin- streptomisin karışımı içeren DMEM F12 besi yeri kullanılarak çoğaltıldı. %5 CO₂ ve 37°C'lik atmosfer koşullarının sağlandığı inkübatör ortamında hücreler kültüre edildi. Hücrelerin %80-90 konfluent hale gelmesinin ardından tripsin-EDTA uygulaması ile tutundukları flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanıp, 25 cm² 'lik flasklara pasaj işlemi yapıldı.

5.2.2. Astaksantin ve HDL-2' nin hazırlanması

6 mg astaksantin tartıldı ve 2,5 ml DMSO'da çözüldü. 50 µl stok çözeltisi alınıp 950 µl DMEM F12 ile seyreltilti.

Apoptoz ve MTT deneyleri için her seferinde yeni olarak hazırlandı.

Ticari olarak satın alınan HDL-2(1mg/ml) deneylerde kullanılmadan önce yarı geçirgen membran kullanılarak filtrelendi. Membran içerisine aktarılan HDL-2 24 saat + 4 °C'de hafif karıştırılarak bekletildi. Böylece içeriğindeki sodyum azidin uzaklaştırılması sağlandı. Hücrelere eklenmeden önce sterilizasyonun sağlanması amacı ile 0.45 mikron single use filter unit kullanılarak süzüldü. Ardından 0,25 mg/ml derişimde olacak şekilde DMEM F12 ile seyreltilti.



Şekil 8. HDL-2'nin diyaliz edilmesi

5.2.3. Astaksantin ve HDL-2'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin belirlenmesi

MCF 7 hücrelerinde astaksantin ve HDL-2 uygulamasından sonraki hücre canlılığı, ticari olarak satın alınan MTT ile belirlendi.

MTT yöntemi: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid), hücre proliferasyonunu, hücre canlılığını ve sitotoksitesiyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır (Beekman ve ark., 1997). Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz (SDH) enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler bu ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Formazan tuzları, DMSO, izopropanol gibi organik solventlerde kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi spektrofotometrik olarak ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitotoksitesi belirlenir.

MTT çözeltisinin hazırlanışı: Çalışmada kullanılacak yöntem için ticari olarak satın alınan “Vybrant Mtt Cell Proliferation Assay Kit” (Thermo Fischer, USA) kullanıldı. Paket içerisinde bulunan 5 mg MTT boyası, 1 ml steril fosfat tamponu (PBS) içinde çözüldükten sonra iyice vorteksenerek ve çözünmeyen kısımlar santrifüjlenerek üstteki sıvı steril bir eppendorfa alındı. Işığa karşı hassas olan MTT çözeltisi kullanılıncaya kadar +4°C’de karanlıkta saklandı.

96 Kuyucuklu mikropalakalarda hücre kültürlerinin hazırlanması: MCF7 hücre hattı öncelikle toma lamı ile sayımı yapılarak kuyucuk başına 10 000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları ışık mikroskobu ile incelendi. Kuyucuklara ekilen hücreler, her bir kuyucukta 200 µl besiyeri olacak şekilde inkübatöre kaldırılarak 24 saat inkübe edildi. Sonra kuyucuklara ekilen hücrelere çeşitli derişimlerde hazırlanmış olan astaksantin ve HDL-2 eklendi.

Çalışmada kullanılan örnekler ve içerikleri aşağıdaki şekildedir.

- AST (10-50-100-250-500 µM derişimlerde uygulandı)
- HDL-2(10-25-50-100 mcg/ml)
- AST+ HDL-2

MTT deneyinin yapılışı: Hücrelerin kuyucuklara ekilmesinin ardından 48. saate gelindiğinde, kuyucuklara eklenen 200 µl besiyeri mikropipet ile çekilip atıldı. Kuyucuklar 200 µl PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 100 µl taze besiyeri ve 10 µl MTT solüsyonu eklendikten sonra 4 saat boyunca inkübatöre kaldırıldı. 4 saatlik sürenin sonunda kuyucuklara 100µl sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenerek MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için 12 saat boyunca inkübe edildi. Sürenin sonunda, mikropate okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda okuması yapıldı. Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbens değerlerinin ortalaması alınarak bu değer %100 kabul edildi. Sentez bileşikleri içeren kuyucuklardan elde edilen absorbens değerleri kontrol absorbens değerine oranlandı ve hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Bu deneyler, her bir hücre tipi için örnekler en az 3 tekrarlı olarak 3 farklı zamanda yapıldı.

5.2.4. MCF7 hücrelerinde apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının incelenmesi:

RayBio® C-Serisi, İnsan Apoptoz Antikor Array C1, hücre ölümü (apoptoz) üzerine odaklanan bir deney kitidir. Bu kit ile apoptozla ilişkili birçok proteinin aynı anda ölçülmesi sağlanır. Bu proteinler, hücre ölümü sürecindeki farklı aşamalarda veya farklı yollarda rol oynamaktadır. Kit ile insan hücre ve doku lizatlarında 43 farklı proteinin yarı nicel tespiti sağlanabilmektedir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, MTT sonuçlarından elde edilen bulgular doğrultusunda astaksantin ve HDL-2 kombine edilerek hücreler ile 24 saat inkübe edildi ve ardından kit prosedürüne uygun bir şekilde deney gerçekleştirildi.

Hücrelerin hazırlanması: MCF 7 hücreleri 5×10^5 hücre olacak şekilde toma lamı ile sayılıp, 6 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saat boyunca inkübe edilerek hücreler çoğaltıldı. Sürenin sonunda her bir kuyucuğa HDL-2 10 µg/ml, HDL-2 50 µg/ml, astaksantin 100 µM + HDL-2 10 µg/ml ve astaksantin 100 µM + HDL-2 50 µg/ml derişimlerde örnekler eklendi. Örnekler ile hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra örnekler kuyucuklardan uzaklaştırıldı, iki kez PBS ile yıkanan kuyucuklara kit içeriğinde bulunan hücre lizis tamponundan 500 µL eklendi. 10 dakika buzda bekletilen plakada hücreler kazıyarak patlatıldı, ardından hücre lizatları temiz eppendorflara aktararak +4 °C 10.000 rpm/ 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant temiz eppendorflara aktarıldı. Total protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi (Bradford, 1976). Deney boyunca süpernatant soğukta muhafaza edildi.

Deneyin yapılışı: Kit içeriğindeki plakaya membranlar yerleştirildi. Membranlar her bir örnek için etiketlendi. Membranların üzerine bloklama tamponu eklendi. Otuz dakika yatay karıştırıcıda bırakıldılar. Sürenin sonunda örnek ile muamele edilmiş hücre süpernatantlarından, 1 ml ilgili membranın üzerine eklendi. Plaka gece boyunca + 4 °C hafifçe karıştırılarak bırakıldı.

Ertesi gün, plaka yıkama tamponu-1 ile 5'er dakika olacak şekilde 3 tur; yıkama tamponu-2 ile 5'er dakika olacak şekilde 2 tur yıkandı. Yıkamaların ardından kit prosedürüne göre hazırlanan antikor kokteyli her bir membranın üzerine 1 ml eklendi. Plaka oda sıcaklığında 2 saat hafifçe karıştırıldı. Sürenin sonunda daha önce bahsedilen şekilde yıkamalar gerçekleştirildi ve her bir membranın üzerine hazırlanan HRP (horseradish peroxidase) karışımından 2 ml eklendi, ışıktan korunarak oda sıcaklığında 2 saat daha karıştırıldı. 3. kez yıkamalar aynı şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 9. Plakalara eklenen membranların yıkanması

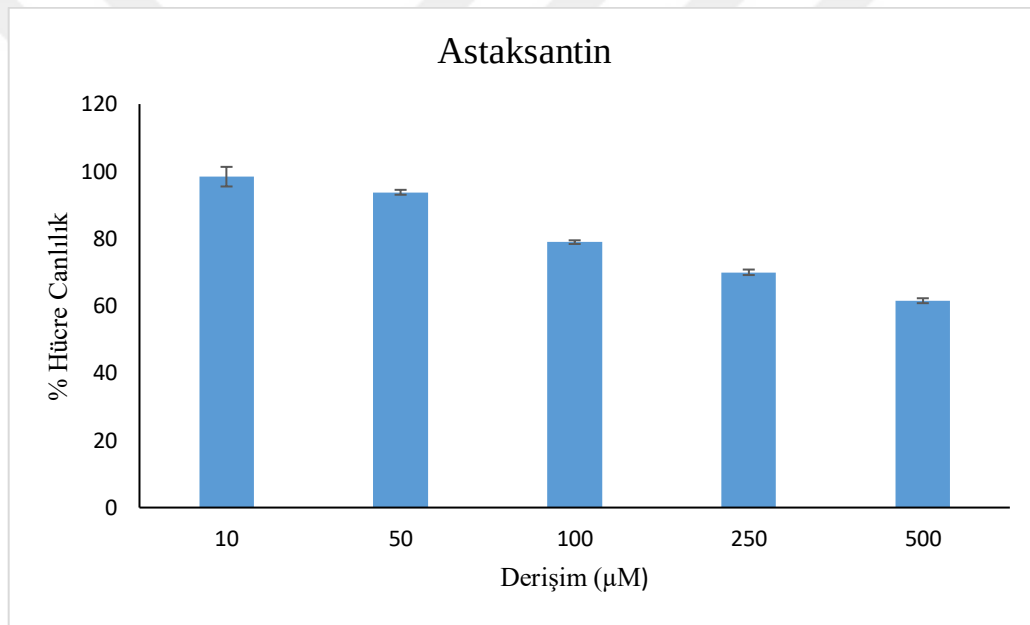
Yıkamanın ardından membranlar plakadan dikkatlice çıkartıldı ve plastik levhanın üzerine yerleştirildi. Membranlarda kalan fazla sıvı filtre kâğıdı ile dikkatlice emdirildi. Her bir membranın üzerine tespit tamponundan 500 µL eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra başka bir plastik levha membranların üzerine kapatılarak sandviç şeklinde hazırlandı. 10 dakika içerisinde kemilüminesans tespit sistemi ile membranların görüntülenmesi gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

Tez çalışmamızda, önce farklı dozlarda astaksantin ve HDL-2 alt fraksiyonunun, MCF-7 (hormon pozitif meme kanseri hücre hattı) hücrelerinin proliferasyonundaki etkisi, MTT yöntemiyle araştırıldı. Elde edilen bulgularla, astaksantin ve HDL-2'nin uygun dozları belirlendi. Belirlenen dozlarda, her iki molekül kombinasyonlarının MCF-7 hücrelerindeki apoptotik etkileri ise, farklı yolak proteinlerindeki değişimleri ölçen, Apoptoz Antikor Array C1 kiti kullanılarak değerlendirildi.

6.1. Astaksantin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Çalışmamızda, 10-50-100-250-500 μ M konsantrasyonlarda astaksantin, MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkisini incelemek üzere MTT deneyi gerçekleştirildi.



Şekil 10. Astaksantin MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi

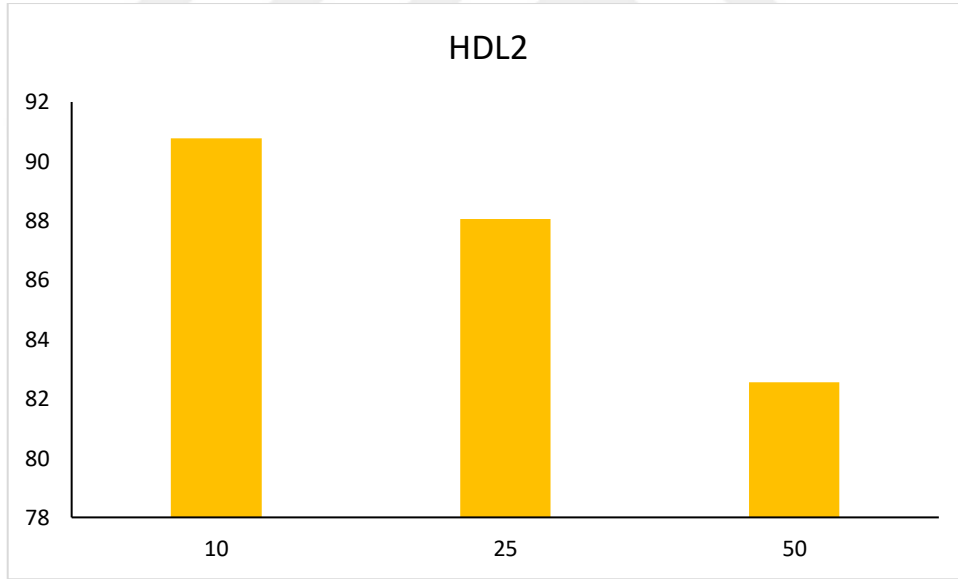
Şekil 10'de gösterildiği gibi, artan konsantrasyonlarda astaksantin MCF-7 hücre hattında, doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiğini gözlemledik. En düşük doz olan 10 μ M konsantrasyonda, bu değer % 1.59 olarak gözlenirken, 100 μ M konsantrasyonda inhibisyon oranı % 21.06; 250 μ M 'da % 30,02 ve son olarak en yüksek konsantrasyon olan 500 μ M'da %38,47 idi. Elde edilen bulgularımız, iyi bir antioksidan olan astaksantin artan dozlarının, hormon pozitif meme kanser hücrelerinde, in vitro olarak, sitotoksik etki gösterdiğini ve meme kanser hücrelerini ölüme sürüklediğini göstermektedir.

Tablo 7 Astaksantin MCF-7 hücre hattında proliferasyon ve inhibisyon değerleri

Astaksantin (Konsantrasyon)	%proliferasyon	%inhibisyon	stDev.
10 μ M	98.4095	1.5905	2.9181
50 μ M	93.7663	6.2337	0.7299
100 μ M	78.9340	21.0660	0.5474
250 μ M	69.9701	30.0299	0.8206
500 μ M	61.5221	38.4779	0.7294

6.2. HDL-2'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Yaptığımız çalışmada, 10-25-50 μ g/ml konsantrasyonlarda HDL-2'nin MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkileri, MTT metodu ile değerlendirildi. HDL-2'nin doza bağlı olarak artan inhibisyona sahip olduğunu gözlemledik. HDL-2 uygulanan MCF-7 hücrelerinde, ilk 2 konsantrasyonda ortalama %85 oranında hücre canlılığı olduğu görülmektedir.



Şekil 11. HDL-2 uygulanan MCF-7 hücrelerinde, MTT metodu ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi

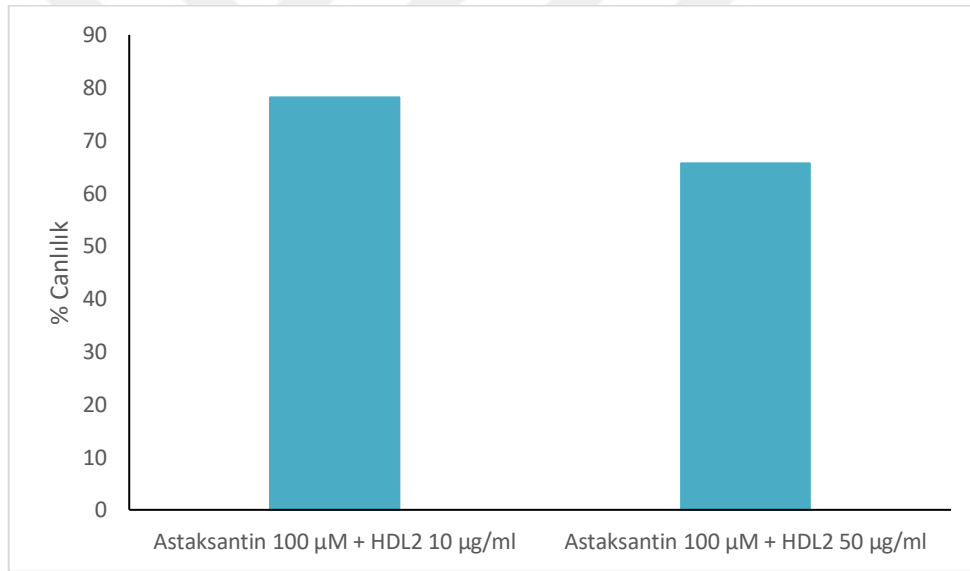
MCF-7 hücrelerine protokole uygun bir şekilde, **Şekil 11**'de belirtilen konsantrasyonlarda HDL-2 eklendi. 10 μ g/ml konsantrasyonda %9,2 inhibisyon, %90,77 hücre canlılığı görüldü. HDL-2 dozu arttırıldığında, 25 μ g/ml HDL-2 ve 50 μ g/ml dozda inhibisyon oranındaki artış, astaksantin dozları arasındaki artışa göre oldukça düşüktü. HDL-2'nin en düşük dozu ile %90,77 canlılık, en yüksek dozu ile %82 oranında canlılık gözlemlendi.

Tablo 8 MCF-7 hücre hattında HDL-2'nin proliferasyon ve inhibisyon değerleri

HDL-2	%proliferasyon	%inhibisyon	stDev.
10 µg/ml	90.7747	9.2253	4.7670
25 µg/ml	88.0591	11.9409	5.4267
50 µg/ml	82.5547	17.4453	2.0072

6.3. Astaksantin ve HDL-2 Kombinasyonunun MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Proliferasyona Etkisinin Belirlenmesi

Yaptığımız çalışmada MCF-7 hücrelerinde, astaksantin (100 µM) ve HDL-2'nin (10-50 µg/ml) belirlenen dozlarında, birlikte uygulanması ile nasıl bir sinerjistik etki gösterdikleri de incelenmiştir.



Şekil 12. Uygulanan kombinasyonların (Astksantin+HDL-2), MCF-7 hücrelerindeki proliferasyona etkisi

MCF-7 hücrelerine, protokole uygun bir şekilde **Şekil 12**'de belirtilen konsantrasyonlarda astaksantin ve HDL-2 kombinasyonu eklendi. MCF-7 hücrelerine, HDL-2 10 µg/ml + astaksantin 100 µM konsantrasyonda kombine olacak şekilde eklendiğinde, hücrelerde % 78,02 oranında canlılık ve %21,79 oranında inhibisyon gözlemlendi. HDL-2 oranı arttırıldığında (HDL-2 50 µg/ml + astaksantin 100 µM) ve bir önceki kombinasyonla aynı oranda yani 100 µM astaksantin ile hücreler muamele edildiğinde, canlılık oranı% 65,66'ya gerilerken, ölüm oranı %34,33'e yükselmiştir. 100 µM konsantrasyonda AST, 50 µg/ml konsantrasyonda HDL-2 ile birlikte uygulandığında, MCF-7 hücrelerinde %34,33 inhibisyon sağlamaktadır.

Tablo 9 MCF-7 hücre hattında astaksantin ve HDL-2 kombinasyonunun proliferasyon ve inhibisyon değerleri

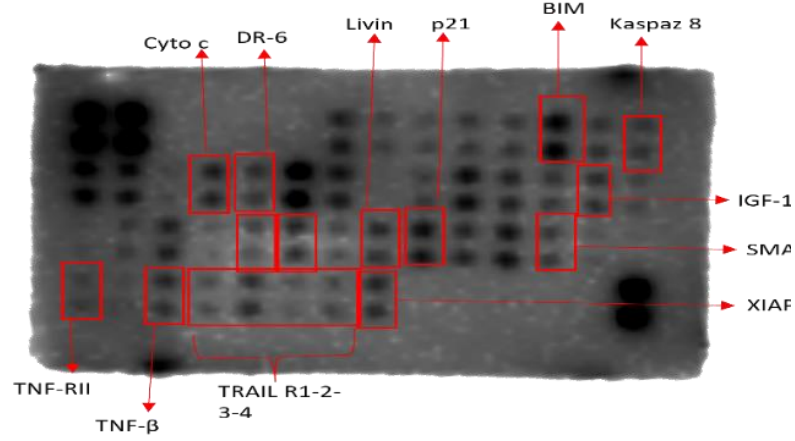
	%proliferasyon	%inhibisyon	stDev.
Astaksantin 100 µM + HDL-2 10 µg/ml	78.2016	21.7984	2.3121
Astaksantin 100 µM + HDL-2 50 µg/ml	65.6676	34.3324	0.5780

6.4. RayBio® C-Serisi, İnsan Apoptoz Antikor Array C1 kiti ile, MCF 7 Hücrelerinde Hücre Apoptoz Mekanizmalarının İncelenmesi

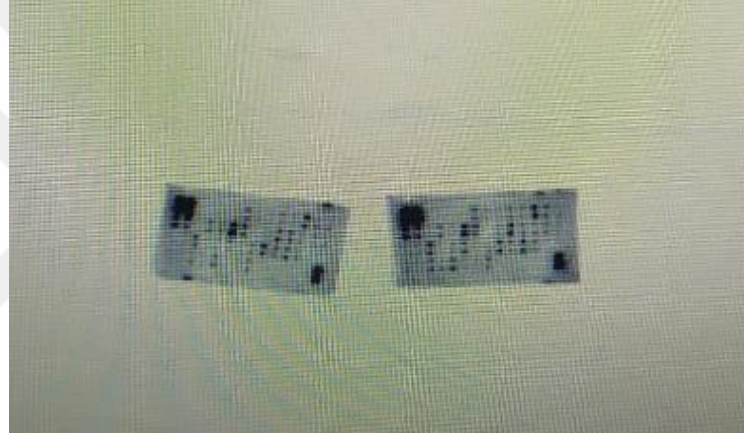
RayBio® C-Series Human Apoptosis Antibody Array C1 kiti ile, hücre ölümü (apoptoz) ile ilişkili birçok proteinin aynı anda ölçülmesi sağlanır. Bu proteinler, hücre ölümü sürecindeki farklı aşamalarda veya farklı yollarda rol oynamaktadır. Böylece bu kit ile insan hücre ve doku lisatlarında 43 farklı proteinin ekspresyonu, yarı kantitatif olarak belirlenmektedir. Literatürde yer alan bilgilere göre bu proteinler, bazı yollar üzerinden etki etmektedirler. Örneğin IGF-1 proteini TOR kinaz yolu üzerinden etki gösterir ve bizim sonucumuzda da IGF-1 proteininin eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Yine literatüre göre Kaspaz 8, pro apoptotik Kaspaz aktivasyon kademesi başlatmaktadır. Ayrıca BAD aşırı ekspresyonunun insan hücrelerinde otofajiyi tetiklemek için yeterli olduğu gösterilmiştir (Elmore, 2007).

Çalışmamızda, MTT sonuçlarından elde edilen bulgular doğrultusunda, astaksantin ve HDL-2 kombine edilerek, hücreler ile 24 saat inkübe edildi ve ardından kit prosedürüne uygun bir şekilde membran görüntüleri analiz edildi.

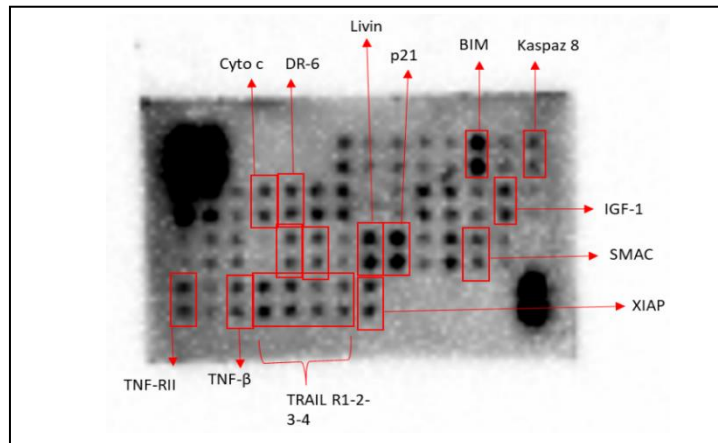
Çalışmamızdaki dozlarda, HDL-2 ve AST beraber uygulandığında, tek başına uygulanan hücrelere göre TNF- β , kaspaz-8, BIM, CYTO-C gibi programlı hücre ölümünde görev alan önemli proteinlerin ekspresyonu arttı. Özellikle DR-6 (ölüm reseptörü) ve kaspaz-8'deki artış hücrelerin ekstrinsik yolak üzerinden apoptoza girdiğini göstermektedir. TRAIL, ölüm reseptörlerinin birleşmesi yoluyla, apoptozu başlatabilen ligandların TNF (tümör nekroz faktör) ailesinin bir üyesidir ve literatüre göre kanser hücrelerinin apoptozunu başlatmaktadır. Çalışmamızda HDL-2 ve AST'nin beraber uygulandığı MCF-7 hücrelerinde TRAIL R1-R2-R3-R4 seviyelerinde artış olduğu belirlendi.



Şekil 13. Tek başına HDL-2 (10 µg/ml) uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü



Şekil 14. Tek başına HDL-2 (10 µg/ml) ve tek başına HDL-2 (50 µg/ml) uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü



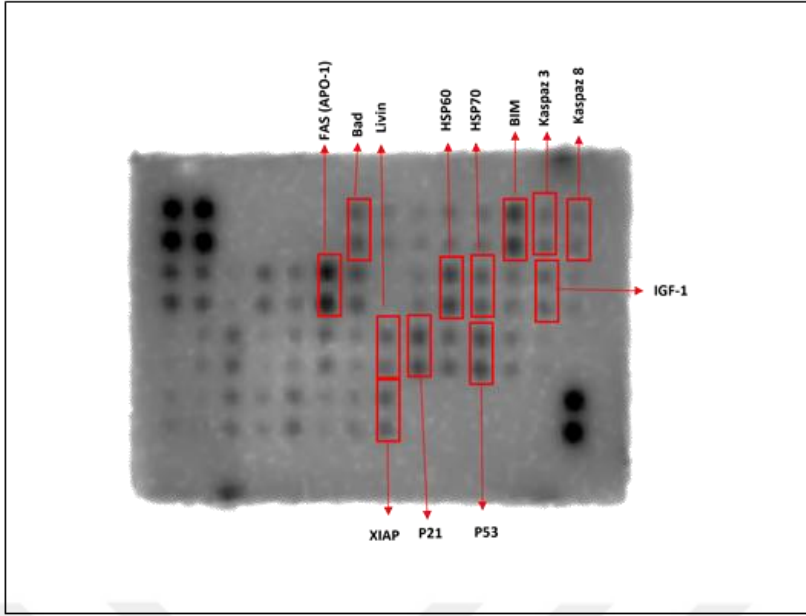
Şekil 15. (HDL-2 10 µg/ml ve AST 100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü.

Tablo 10. HDL-2(10 µg/ml) ve HDL-2 (10 µg/ml) +AST (100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptozda yer alan proteinlerin değişimi

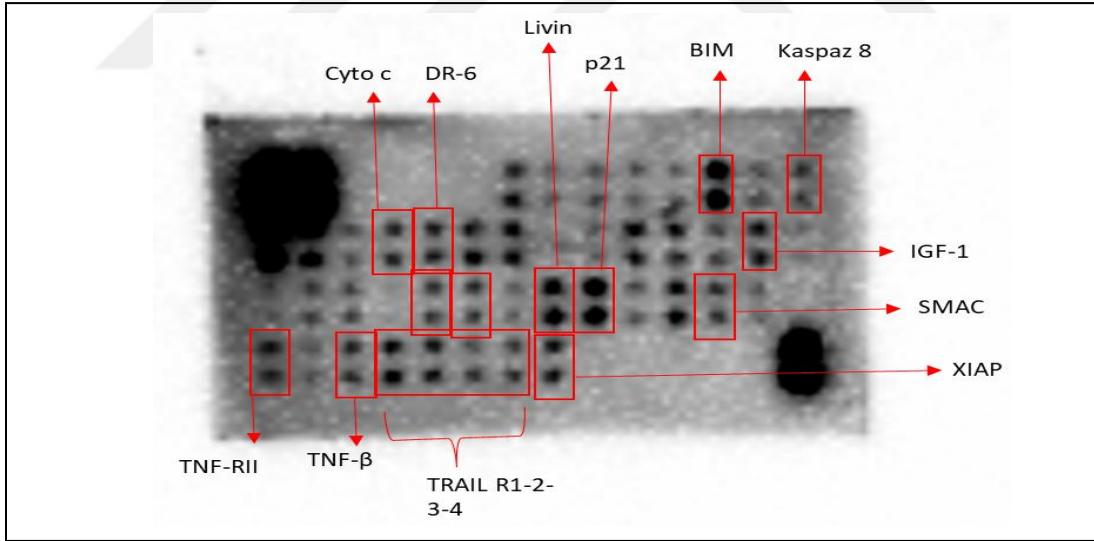
Protein	% Yoğunluk	
	HDL 10 µg/ml	HDL 10 µg/ml +AST 100 µM
IGF-2	19,4780	8,8734
IGF-1	13,9122	19,5070
HSP60	31,9153	12,5888
HSP70	13,1544	21,9037
DR6	12,8274	50,8043
CYTO-C	12,9706	19,9697
CD40	18,6480	38,9806
p53	28,9295	12,3284
p21	18,6119	26,1856
Livin	16,2576	19,5199
XIAP	13,1544	20,1848
TNF- R2	13,0283	18,2090
Caspase 8	12,9832	20,8246
BIM	20,0817	31,2834
BAD	13,8380	25,5726
Fas (APO-1)	14,7124	26,9919

MCF-7 hücrelerine protokole uygun bir şekilde, **Tablo 10**'da belirtilen konsantrasyonlarda astaksantin ve HDL-2 kombinasyonu eklendi ve apoptoz mekanizmasında yer alan proteinlerin hacimleri değerlendirildi. Hacim yüzdeleri her bir proteine özel metodoloji ile ölçülerek, aralarındaki fark önce kalitatif ve sonra da yarı kantitatif yöntemle belirlendi.

Literatürde var olan bilgilere göre IGF-1, HSP70, DR6, CYTO-C, CD40, p21, Livin, XIAP, TNF- R2, Kaspaz 8, BIM, BAD, Fas (APO-1) gibi proteinler apoptozu indükleyen proteinlerdir. Bu proteinlerdeki nicel ve nitel artış özellikle bazı yollar üzerinden apoptozun tetiklendiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da HDL 10 µg/ml +AST 100 µM kombinasyonunun MCF-7 hücrelerine eklenmesi ile, bu proteinlerin hacimleri artmış ve hücrenin apoptozu hızlanmıştır.



Şekil 16. Tek başına HDL-2 (50 µg/ml) uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü



Şekil 17. (HDL-2 50 µg/ml ve AST 100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptotik proteinlerin membran görüntüsü.

Tablo 11. HDL-2(10 µg/ml) ve HDL-2 (10 µg/ml) +AST (100 µM) kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde, apoptozda yer alan proteinlerin değişimi

Protein	% Yoğunluk	
	HDL 50 µg/ml	HDL 50 µg/ml +AST 100 µM
BIM	23,7377	26,6222
Kaspaz-3	16,7509	19,1051
Kaspaz-8	20,01128	18,2577
IGF-1	19,1223	17,0100
HSP70	16,6003	18,2437
HSP60	15,5531	23,3686
P53	17,9626	21,6524
P21	18,3614	22,3039
Livin	14,8975	15,7739
XIAP	12,4893	16,6984
Fas (APO-1)	12,4550	36,0432
Bad	8,8554	20,2631

MCF-7 hücrelerine protokole uygun bir şekilde **Tablo 11**'de belirtilen konsantrasyonlarda astaksantin ve HDL-2 kombinasyonu eklendi ve apoptoz mekanizmasında yer alan proteinlerin hacimleri değerlendirildi.

Literatürde var olan bilgilere göre BIM, Kaspaz-3, HSP70, HSP60, p53, p21, Livin, XIAP, BAD, Fas (APO-1) gibi proteinler apoptozu indükleyen proteinlerdir ve bizim çalışmamızda da HDL-2 50µg/ml +AST 100 µM kombinasyonunun MCF-7 hücrelerine eklenmesi ile, bu proteinlerin hacimleri artmış ve hücrenin apoptozu hızlanmıştır.

Elde ettiğimiz tüm sonuçlardan yola çıkarak, tek başına HDL-2 ve tek başına astaksantin eklenmiş MCF-7 hücre apoptoz sonuçları ile karşılaştırıldığında, HDL-2 ve astaksantin kombinasyonunun eklenmesi ile elde edilen sonuçlar, anlamlı farklılık göstermektedir. Hatta kombine kullanım esnasında, ekspresyon görülmeyen bazı proteinlerde de (HSP60, p53, Kaspaz-3) ekspresyon artışı görülmüştür.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri kadınlarda cilt kanserinden sonra en sık karşılaşılan kanser tipidir ve kansere bağlı meydana gelen ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bu kanser sadece kadınlara özgü olmayıp erkeklerde de teşhis edilebilmektedir. Literatürlerde sunulmuş olan bilgiler ışığında yaklaşık olarak her sekiz kadından birine (%13) yaşamı boyunca invaziv meme kanseri tanısı konulmaktadır (Karimian ve ark., 2022).

Yine literatürde yer alan bilgilere göre, 2012 yılında yapılan küresel kanser istatistikleri; yaklaşık 1,7 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulduğunu ve 521.900 kadının meme kanserinden öldüğünü göstermiştir. Ayrıca yapılan pek çok çalışma meme kanserinin oldukça heterojen bir hastalık olduğunu göstermiştir (Yin ve ark. 2020).

Östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanserinin en sık görülen alt tipidir. Örneğin; ABD'de her yıl 250.000'den fazla meme kanseri teşhis edilmektedir ve bunların yaklaşık %80'i östrojen reseptörü pozitifdir (ER+). ER (+) meme kanseri tedavisi, östrojen üretimi inhibe edilerek ve/veya direkt olarak östrojen reseptörüne (ER) müdahale edilerek gerçekleştirilmektedir (Hanker ve ark. 2020).

Teşhis konulduktan sonra kanserin tedavisi için çoğunlukla kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Kemoterapi ilaçlarının çoğu kanser hücrelerini seçici olarak öldüremez ve kanser hücrelerinin yanı sıra çevredeki sağlıklı hücrelere de etki eder. Bunun sonucunda sağlıklı hücreler de zarar görmüş olur. Kemoterapinin uygulanan doza bağlı olarak yan etkileri görülmektedir. Bu etkiler bazı durumlarda tümörün geri dönmesine ve ilaca karşı direnç gelişmesine yol açabilmektedir. Ayrıca meme tümörlerinin heterojen yapıda olması ve mevcut iç basınçları kanser ilaçlarına verilen yanıtı azaltmaktadır. Ayrıca ilaçlara bağlı oluşan toksisite ve doza bağlı oluşan yan etkiler nedeni ile reçete edilen ilaç dozu sınırlı kalmakta ve bu da terapötik yaklaşımların yetersizliğini düşündürmektedir. Tüm bu nedenler, araştırmacıları alternatif tedavi protokollerini geliştirmeye yönlendirmiştir. Burada önemli olan nokta antitümör ajanların sahip olduğu apoptozun indüksiyonudur. Bunu sağlayabilecek ve yan etki insidansı düşük ajanlarla sonuç alabilmek için bazı çalışmalar yapılmıştır (Karimian ve ark., 2022).

Literatürde yer alan bilgiler ışığında, oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarının, birçok kanser türü de dahil olmak üzere 100'den fazla hastalığın patogenezinde yer aldığı görülmektedir. Bu nedenle antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan biri olan AST, genellikle bitkilerde likopenden sentezlenir. Ayrıca kabuklularda, serbest balıklarda ve diğer deniz organizmalarda kırmızımsı-turuncu renklenmeye neden olan ana pigmentlerden biridir.

Ayrıca AST'nin önemli bir özelliği, beta-karoten ve alfa-tokoferolden daha iyi performans gösteren antioksidan özellikleridir (Karimian ve ark., 2022).

Yapılan bir çalışmada, MCF-7 hücrelerinde karotenoid kombinasyonunun doza ve zamana bağlı sitotoksitesi gösterilmiştir. Kullanılan karotenoidlerden birisi, karidesten elde edilen AST'dir ve AST'nin MCF-7 hücrelerinde glutatyon seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Glutatyon endojen bir antioksidan görevi gördüğünden, azalmış seviyelerinin meme kanseri hücrelerinde apoptoza aracılık ettiği düşünülmüştür. Ve çalışma sonucunda karotenoid karışımlarının eşit konsantrasyonlarda, kanser hücrelerindeki antioksidan mekanizmalar üzerindeki pro-oksidan aktiviteyi sinerjistik olarak arttırdığı varsayılmıştır (Sowmya ve ark., 2017).

Yapılan başka bir çalışmada ise, AST'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisine bakılmış ve bu etkilerin zamana ve doza bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; dozun 1 μ M'den 100 μ M'ye çıkarılmasıyla hayatta kalma oranı %80'den %10'a düşmüştür AST, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak kaspazların indüklenmesine ve dolayısı ile apoptoza yol açtığı bulunmuştur (Karimian ve ark., 2022).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da tüm bu çalışmalara paralellik göstermektedir. Bulgularımıza göre; 10, 50, 100, 250, 500 μ M derişimlerdeki AST'nin MCF-7 hücre hattında doza bağlı olarak artan hücre inhibisyona sahip olduğu gözlemlenmiştir. AST'nin en düşük dozu (10 μ M) ile %98,40 canlılık, en yüksek dozu (500 μ M) ile %61,52 oranında canlılık gözlemlenmiştir. Eklenen AST miktarı arttıkça hücrenin canlılık %'sinin azaldığı, inhibisyon %'sinin arttığı görülmüştür.

Meme kanseri hastalarının, kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere diğer kronik hastalıklara yakalanma riskinin yüksek olduğu bilinmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar, artan diyet yağı veya hiperkolesterolemi ile meme kanseri oluşumu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmaya 56'sı meme kanseri, 32'si pankreas ve 44'ü aynı yaştaki kontrol olmak üzere 132 hasta dahil edilmiş; meme kanserli hastalarda kontrollerle karşılaştırıldığında trigliseritlerde bir artış ve HDL-kolesterolde, özellikle HDL-2 alt fraksiyonunda bir azalma gözlemlenmiştir (Michalaki ve ark., 2005).

Bu bilgiler ışığında planladığımız çalışmamızda; HDL-2'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi belirlenmeye çalışılmış ve sonucunda 10-25-50 μ g/ml konsantrasyonlarda HDL-2'nin MCF-7 hücre hattında doza bağlı olarak hafif artan inhibisyona sahip olduğu gözlemlenmiştir. HDL-2 uygulanan MCF-7 hücrelerinde, ilk üç derişimde (10-25-50 μ g/ml) ortalama %85 oranında hücre canlılığı görülmektedir. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre AST ve HDL-2'nin kombine kullanımın daha etkili olabileceği kanısı oluşmuştur. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada AST (100 μ M) ve HDL-2'nin (10-50 μ g/ml) birlikte uygulanması ile nasıl

bir sinerjistik etki gösterdikleri incelenmiştir. 100 µM derişimde AST, 50 µg/ml derişimde HDL-2 ile birlikte uygulanınca MCF-7 hücrelerinde %34 inhibisyon sağlanmıştır.

Apoptoz, hücrenin normal döngüsü, olması gerektiği gibi çalışan bağışıklık sistemi, hormon kaynaklı atrofi, embriyogenez ve kimyasal nedenlere bağlı hücre ölümü olmak üzere birçok sürecin bütünü olarak tanımlanabilmektedir ve bu süreç enerjiye bağlı olarak gerçekleşmektedir. Kaspazlar apoptozda çok önemli role sahiptirler. Birçok hücrede aktif olmayan proenzim şeklinde eksprese edilmektedirler ve aktif hale geldiklerinde prokaspazları aktive edebilmektedirler. Bu şekilde bir kaspazın diğer kaspazları aktive etmesi ile işleyen süreçte apoptotik sinyal yolu güçlenmekte ve hücre ölümü hız kazanmaktadır. Günümüze kadar yaklaşık on kaspaz tanımlanmıştır. Bunlar kendi arasında başlatıcılar (Kaspaz-2, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Kaspaz-10) ve yürütücüler (Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7) ve inflamatuvar (Kaspaz-1, Kaspaz-4, Kaspaz-5) olmak üzere gruplara ayrılmaktadırlar (Elmore, 2007).

Meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada; AST'nin, G0/G1'de hücre döngüsü ilerlemesini bloke ettiği, doza bağlı olarak proliferasyonu baskıladığı; Bax/Bcl2, bölünmüş kaspaz-3 ve bölünmüş kaspaz-9'un aktivasyonunun yanı sıra ERK1/2, JNK ve p38'in fosforilasyonu ile hücrelerin içsel apoptozunu indüklediği ayrıca mutp53, PARP-1, Bcl2, SOD, MAPK'ler ve Pontin dahil olmak üzere apoptozla ilgili moleküllerin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2020).

Çalışmalar, AST'nin hem antiapoptotik Bcl-2, p-Bad ve survivinin ekspresyonunu azaltarak hem de proapoptotik Bax ve Bad'ın ekspresyonunu artırarak kaspaz aracılı mitokondriyal apoptozu indüklediğini göstermiştir. Ovaryum kanser hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, AST ve insan serum albümininin (HSA) kombine kullanımının, Bcl2/Bax2 oranı ve kaspaz-3 seviyesinde artışa neden olarak mitokondriyal apoptotik yolları harekete geçirdiği ayrıca p53 ve MAPK 51 ilişkili sinyal yollarını aktive ettiği bulunmuştur (Gürbüz, 2019).

Tüm bu araştırmalardan yola çıkarak tezimizde, MCF-7 hücre hattında, hücre ölümü sürecindeki farklı aşamalarda veya farklı yollarda rol oynayan proteinler üzerinde çalışılmıştır. Çalışmamız sonuçlarına göre farklı dozlarda, HDL-2 ve AST beraber uygulandığında tek başına HDL-2 uygulanan hücrelere göre, TNF- β, kaspaz-8, BIM, CYTO-C gibi programlı hücre ölümünde görev alan önemli proteinlerin ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Özellikle DR-6 (ölüm reseptörü) ve kaspaz-8'deki artış hücrelerin dışsal yolk üzerinden apoptozu girdiğini göstermektedir. Ayrıca HDL-2 ve AST'nin beraber uygulandığı MCF-7 hücrelerinde TRAIL R1-R2-R3-R4 seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak tek başına değişen dozlarda HDL-2 uygulandığında meydana gelen protein ekspresyonuna kıyasla AST ve HDL-2 kombinasyonu ile bazı apoptozu indükleyen proteinlerde daha fazla ekspresyon gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu kombinasyonun antikanser

mekanizmalarını bu apoptotik yollar üzerinden gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Literatür araştırmalarımıza göre, HDL-2 ve astaksantin kombinasyonunun meme kanser sinyal yollarındaki sinerjik etkileri, ileri apoptotik mekanizmadaki etkileri çalışılmamıştır. Sonuçlarımız, bu yöndeki açığı aydınlatmada literatüre katkıda bulunarak, meme kanser tedavisi için umut vadetmektedir.



8. KAYNAKLAR

- Altıntaş, A. (2013, Ocak 08). Kolesterol Metabolizması- Kontrol ve Düzenlenme [PowerPoint Slayları]. Ankara Üniversitesi. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1027/mod_resource/content/1/9.%20Lipid%20Metabol%20%28Kolesterol%20Metabolizmas%C4%B1%29.pdf.
- Aslan, V. (2012). Dislipidemi’de endokrin hastalık sıklığının araştırılması (Yayın No. 50691) [Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi] <http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/50691.pdf>
- Badak, B., Aykanat, N. E. B., Kacar, S., Sahinturk, V., Arik, D., & Canaz, F. (2021). Effects of astaxanthin on metastasis suppressors in ductal carcinoma. A preliminary study. *Annali italiani di chirurgia*, 92, 565–574. PMID: 34096509.
- Basu, S., Ma, R., Moskal, J. R., Basu, M., & Banerjee, S. (2012). Apoptosis of breast cancer cells: modulation of genes for glycoconjugate biosynthesis and targeted drug delivery. *Advances in experimental medicine and biology*, 749, 233–255. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3381-1_16
- Baytak, M., Top, C., (2012). Lipoprotein Metabolism. *Türkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics*, 5(1):1-6. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-lipoprotein-metabolizmasi-62172.html> (Web Sayfası)
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Beekman, A. C., Barentsen, A. R., Woerdenbag, H. J., Van Uden, W., Pras, N., Konings, A. W., el-Feraly, F. S., Galal, A. M., & Wikström, H. V. (1997). Stereochemistry-dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives. *Journal of natural products*, 60(4), 325–330. <https://doi.org/10.1021/np9605495>
- Brufsky, A. M., & Dickler, M. N. (2018). Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. *The oncologist*, 23(5), 528–539. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0423>
- Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of personalized medicine*, 11(8), 808. <https://doi.org/10.3390/jpm11080808>
- Buring, J. E., O'Connor, G. T., Goldhaber, S. Z., Rosner, B., Herbert, P. N., Blum, C. B., Breslow, J. L., & Hennekens, C. H. (1992). Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. *Circulation*, 85(1), 22–29. <https://doi.org/10.1161/01.cir.85.1.22>
- Çetinkalp, Ş., Koylan, N., Özer, N., Onat, A., Özgen, A. G., Koldaş, Z. L., Sain Güven, G., Özdoğan, Ö., Karşıdağ, K., Yiğit, Z., Kayıkçıoğlu, M., Tokgözoğlu, L., Can, L. H., Tartan, Z., Kültürsay, H., Karpuz, B., Kırılmaz, B., Ersanlı, M., Ural, D., Erbakan, A. N., ... Yıldırım Şimşir, I. (2017). 33 Soruda Trigliseritler ve Kardiyovasküler Etkileri: Uzman Yanıtları [33 Questions about Triglycerides and Cardiovascular Effects: Expert Answers]. *Türk Kardiyoloji Dernegi arsivi : Türk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir*, 45(Suppl 1), 1–63. <https://doi.org/10.5543/tkda.2017.77459>

- Danilo, C., Gutierrez-Pajares, J. L., Mainieri, M. A., Mercier, I., Lisanti, M. P., & Frank, P. G. (2013). Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development. *Breast cancer research : BCR*, 15(5), R87. <https://doi.org/10.1186/bcr3483>
- Ekmektzoglou, K. A., Xanthos, T., German, V., & Zografos, G. C. (2009). Breast cancer: from the earliest times through to the end of the 20th century. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 145(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.03.017>
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Feingold K. R. (2022). Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 51(3), 437–458. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2022.02.008>
- Giuliano, A. E., Edge, S. B., & Hortobagyi, G. N. (2018). Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of surgical oncology*, 25(7), 1783–1785. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6486-6>
- Gutierrez-Pajares, J. L., Ben Hassen, C., Chevalier, S., & Frank, P. G. (2016). SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 7, 338. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00338>
- Gürbüz, M.A. (2019). Sıçanlarda siklofosfamid ile indüklenmiş ovaryum hasarında astaksantinin etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi (Yayın No 10248809) [Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi]. YÖK https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54324/yokAcikBilim_10248809.pdf?sequence=-1
- Haksever, M. (2013). Staging, prognostic factors in oral cavity cancers and evaluation of staging system. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/161278>
- Hanker, A. B., Sudhan, D. R., & Arteaga, C. L. (2020). Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer cell*, 37(4), 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>
- Hirano T. (2016). Rinsho byori. *The Japanese journal of clinical pathology*, 64(6), 636–642.
- Johnson, K. E., Siewert, K. M., Klarin, D., Damrauer, S. M., VA Million Veteran Program, Chang, K. M., Tsao, P. S., Assimes, T. L., Maxwell, K. N., & Voight, B. F. (2020). The relationship between circulating lipids and breast cancer risk: A Mendelian randomization study. *PLoS medicine*, 17(9), e1003302. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003302>
- Karimian, A., Mir Mohammadrezaei, F., Hajizadeh Moghadam, A., Bahadori, M. H., Ghorbani-Anarkooli, M., Asadi, A., & Abdolmaleki, A. (2022). Effect of astaxanthin and melatonin on cell viability and DNA damage in human breast cancer cell lines. *Acta histochemica*, 124(1), 151832. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151832>
- Kast, K., Link, T., Friedrich, K., Petzold, A., Niedostatek, A., Schoffer, O., Werner, C., Klug, S. J., Werner, A., Gatzweiler, A., Richter, B., Baretton, G., & Wimberger, P. (2015). Impact of breast cancer subtypes and patterns of metastasis on outcome. *Breast cancer research and treatment*, 150(3), 621–629. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3341-3>

- Kim, M. S., Ahn, Y. T., Lee, C. W., Kim, H., & An, W. G. (2020). Astaxanthin Modulates Apoptotic Molecules to Induce Death of SKBR3 Breast Cancer Cells. *Marine drugs*, 18(5), 266. <https://doi.org/10.3390/md18050266>
- Lee, M. H., Hammad, S. M., Semler, A. J., Luttrell, L. M., Lopes-Virella, M. F., & Klein, R. L. (2010). HDL3, but not HDL2, stimulates plasminogen activator inhibitor-1 release from adipocytes: the role of sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research*, 51(9), 2619–2628. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003988>
- Li, J. J., Zhang, Y., Li, S., Cui, C. J., Zhu, C. G., Guo, Y. L., Wu, N. Q., Xu, R. X., Liu, G., Dong, Q., & Sun, J. (2016). Large HDL Subfraction But Not HDL-C Is Closely Linked With Risk Factors, Coronary Severity and Outcomes in a Cohort of Nontreated Patients With Stable Coronary Artery Disease: A Prospective Observational Study. *Medicine*, 95(4), e2600. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002600>
- Li, J., Chen, Z., Su, K., & Zeng, J. (2015). Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(7), 8500–8505. PMID: 26339424
- McCall, B., McPartland, C. K., Moore, R., Frank-Kamenetskii, A., & Booth, B. W. (2018). Effects of Astaxanthin on the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells In Vitro. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 7(10), 135. <https://doi.org/10.3390/antiox7100135>
- Michalaki, V., Koutroulis, G., Syrigos, K., Piperi, C., & Kalofoutis, A. (2005). Evaluation of serum lipids and high-density lipoprotein subfractions (HDL2, HDL3) in postmenopausal patients with breast cancer. *Molecular and cellular biochemistry*, 268(1-2), 19–24. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-2993-4>
- Mooberry, L. K., Sabnis, N. A., Panchoo, M., Nagarajan, B., & Lacko, A. G. (2016). Targeting the SR-B1 Receptor as a Gateway for Cancer Therapy and Imaging. *Frontiers in pharmacology*, 7, 466. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00466>
- Nagini S. (2017). Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 17(2), 152–163. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>
- Parton, M., Dowsett, M., & Smith, I. (2001). Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ (Clinical research ed.)*, 322(7301), 1528–1532. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7301.1528>
- Ramasamy I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 52(12), 1695–1727. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0358>
- Samadi, S., Ghayour-Mobarhan, M., Mohammadpour, A., Farjami, Z., Tabadkani, M., Hosseinnia, M., Miri, M., Heydari-Majd, M., Mehramiz, M., Rezayi, M., Ferns, G. A., & Avan, A. (2019). High-density lipoprotein functionality and breast cancer: A potential therapeutic target. *Journal of cellular biochemistry*, 120(4), 5756–5765. <https://doi.org/10.1002/jcb.27862>
- Shen, W. J., Azhar, S., & Kraemer, F. B. (2018). SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annual review of physiology*, 80, 95–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121550>

- Sowmya, P. R., Arathi, B. P., Vijay, K., Baskaran, V., & Lakshminarayana, R. (2017). Astaxanthin from shrimp efficiently modulates oxidative stress and allied cell death progression in MCF-7 cells treated synergistically with β -carotene and lutein from greens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 106(Pt A), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.024>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Upton G. V. (1990). Lipids, cardiovascular disease, and oral contraceptives: a practical perspective. *Fertility and sterility*, 53(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)53208-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)53208-7)
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

9. ÖZGEÇMİŞ



10. BİLİMSEL FAALİYETLER

10.1 Bildiri (Poster veya Sözel)

Tarhan, D., Gürboğa, M., Özakpınar, Ö. B., Özsavcı, D. (2023, Aralık 23-24). Hormon pozitif meme kanseri hücre hatlarında Hdl-2 ve astaksantin in vitro etkileri [Poster sunumu]. 14th UTSAK 2023, Ankara, Türkiye.

https://www.utsakcongress.com/kitaplar/utsak_14_ozet_kitap_.pdf

<https://www.artsteps.com/view/658410372dbb5d8c35210602?currentUser>

