



T.C.
KIRSEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI



**DOKSORUBİSİN VE OMEPRAZOL ETKEN
MADDELERİNİN MCF-7 KANSER HÜCRE
HATTI ÜZERİNE EŞ ETKİN VE HÜCRE
ZEHİRLENME ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ŞEYMA SAĞIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRSEHİR

2023



T.C.
KIRSEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI



**DOKSORUBİSİN VE OMEPRAZOL ETKEN
MADDELERİNİN MCF-7 KANSER HÜCRE
HATTI ÜZERİNE EŞ ETKİN VE HÜCRE
ZEHİRLENME ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ŞEYMA SAĞIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Lütfi TUTAR

KIRSEHİR

2023

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

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

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.
...../...../20....

Öğrenci
Şeyma SAĒIR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç	3
1.2. Kanser	3
1.2.1. Kanserın Diğer Hastalık Grupları İçerisindeki Yeri	3
1.2.2. Karsinogenezin Genetik ve Biyokimyasal Alt Yapısı	4
1.2.2.1. Proto-Onkogenler ve Onkogenlere Dönüşüm Mekanizmaları	6
1.2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyon Mekanizmaları	8
1.2.2.3. Tümör Baskılayıcı Genler ile Kalıtsal ve Ailesel Kanser Sendromlarının İlişkisi	10
1.2.3. Hücre Ölümü ve Karsinogenez İlişkisi	11
1.2.3.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması	11
1.2.3.2. Karsinogenezde Apoptozdan ve İmmün Yanıtta Kaçınılma Mekanizmaları.....	13
1.2.4. Karsinogenezde Hedefe Yönelik Terapötik Stratejiler	14
1.3. Meme Kanseri	15
1.3.1. Dünya'da ve Türkiye'de Meme Kanseri	15
1.3.1.1. Meme Kanseri	15
1.3.1.2. Meme Kanseri Mortalitesi	16
1.3.2. Sağlıklı Meme Dokusunun Yapısı ve Fizyolojik Düzenlenmesi	16
1.3.2.1. Memenin Histolojisi ve Anatomisi	16
1.3.2.2. Meme Dokusunun Hormonal ve Parakrin Düzenlenmesi	17
1.3.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	18
1.3.3.1. Demografik Risk Faktörleri	21
1.3.3.2. Genetik Risk Faktörleri.....	22
1.3.3.3. Hormonal ya da Reprodüktif Risk Faktörleri	23
1.3.4. Meme Kanseri Patofizyolojisi	24
1.3.4.1. Meme Kanserinin Hücrel Kökenleri	24
1.3.4.2. Meme Kanserinde İnvazyon ve Metastaz	26
1.3.4.3. Östrojenin Karsinogenezdeki Rolü	27
1.3.5. Meme Kanserinin Alt Tipleri	28
1.3.5.1. Luminal A Tip	29
1.3.5.2. Luminal B Tip.....	29
1.3.5.3. HER2 Overekspresyon Tip	29
1.3.5.4. Normal-Benzeri Tip.....	29
1.3.5.5. Bazal-Benzeri Tip	30
1.3.6. Meme Kanserinin Evreleri	30
1.3.7. Meme Kanseri Tanısı ve Önlenmesi	31
1.4. Meme Kanseri Tedavisinde Geleneksel ve Yenilikçi Yaklaşımlar.....	32
1.4.1. Meme Kanseri Tedavisinde Geleneksel Yaklaşımlar.....	33

1.4.1.1. Cerrahi Yöntemler.....	33
1.4.1.2. Radyoterapi	34
1.4.1.3. Kemoterapi ve Meme Kanseri Kullanılan Antineoplastik Ajanlar ..	34
1.4.1.4. Meme Kanseri Endokrin Terapiler	35
1.4.2. Meme Kanseri Tedavisinde Yenilikçi ve Gelişmekte Olan Statejiler	35
1.5. Antrasiklin Türevi Antibiyotiklerin Meme Kanseri Tedavisindeki Önemi.....	36
1.5.1. Doksorubisin'in Moleküler Yapısı ve Antineoplastik Etkisi.....	37
1.5.2. Doksorubisin Teşvikli Hücre Ölümünün Mekanizması	38
1.6. Proton Pompası İnhibitörlerinin Meme Kanseri Tedavisinde Kullanımı.....	39
1.6.1. Omeprazol'un Moleküler Yapısı ve Farmakolojik Aktivitesi	40
1.6.2. Proton Pompası İnhibitörlerinin Antikanser Etkisi.....	41
1.6.2.1. Proton Pompası İnhibitörlerinin Sinyal Yolakları ve Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi.....	41
1.7. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı ve Karakteristik Özellikleri	42
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	45
2.1. Etken Maddelerin Hücre Hatlarına Tekli Uygulanması ile İlgili Çalışmalar.....	45
2.2. Kemoterapötik Ajanların Proton Pompası İnhibitörleri ile Hücreler Üzerine Kombine Uygulanması ile İlgili Çalışmalar	46
3. MATERYAL VE METOT.....	49
3.1. Materyal.....	49
3.1.1. Kullanılan Hücre Serisi.....	49
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	49
3.1.3. Kullanılan Malzemeler.....	49
3.1.4. Kitler	50
3.2. Metot.....	50
3.2.1. DMEM Besiyeri Hazırlanması	50
3.2.2. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması.....	50
3.2.3. Sıvı Azottan Hücre Açılması	50
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)	51
3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	51
3.2.6. Hücre Sayımı	51
3.2.7. Hücrelerin Plakalara Ekimi.....	52
3.2.8. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT) Analizi	52
3.2.9. MCF-7 Hücrelerinden RNA İzolasyonu	53
3.2.10. RNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	53
3.2.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	53
3.2.12. Proton Pompası İnhibitörü ile Doksorubisin'in Sinyal Yolaklarında Meydana Getirdiği Gen Değişiminin Belirlenmesi	54
3.2.13. Hücre Ölümünün Akış Sitometri ile Belirlenmesi.....	54
3.2.14. İstatistiksel Analiz.....	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	57
4.1. MCF-7 Hücrelerindeki Hücre Canlılığı.....	57
4.1.1. Doksorubisin'in Tek başına MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Gösterilmesi.....	57
4.1.2. Omeprazolün Tek Başına MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Gösterilmesi	57
4.1.3. Doksorubisin ve Omeprazol Kombinasyonunun MCF-7 Hücrelerinde 48.saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	58
4.2. Doksorubisin ve Omeprazolün PCR Array Deneylelerinin Değerlendirilmesi	59
4.2.1. Sinyal Yolak Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	61

4.2.2. Anlamalı Değişim Gösteren mRNA'ların Yer Aldığı Yolakların Belirlenmesi	65
4.3. Dokсорubisin ve Omeprazol Uygulamasının MCF-7 Hücre Hattında Apoptoz Üzerine Etkisinin Anneksin V ile Değerlendirilmesi.....	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
6. KAYNAKÇA.....	75
EK-1	83
ÖZGEÇMİŞ	85



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması sürecinden; akademik rehberliği, cömert desteği, tüm tavsiye, katkı ve teşvikleri için ve tecrübelerini paylaşıp yol gösteren sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Lütfi TUTAR'a büyük bir içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesi konusunda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, değerli katkılarından dolayı İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yusuf TUTAR'a,

Laboratuvar çalışmalarında yalnız bırakmayan, yardım ve katkıları için Dr. Öğr. Üyesi Ezgi Nurdan YENİLMEZ TUNOĞLU'na,

En derin teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, bu zamana kadar tüm eğitim hayatım boyunca beraber yürüdüğümüz, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim çok kıymetli babama, anneme ve tüm aileme minnettarım.

Kasım, 2023

Şeyma SAĞIR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOKSORUBİSİN VE OMEPRAZOL ETKEN MADDELERİNİN MCF-7 KANSER HÜCRE HATTI ÜZERİNE EŞ ETKİN VE HÜCRE ZEHİRLENME ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şeyma SAĞIR

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Lütfi TUTAR
Yıl: 2023, Sayfa: 85
Jüri: Dr. Öğr. Üyesi Lütfi TUTAR
Prof. Dr. Yusuf TUTAR
Dr. Öğr. Üyesi Sevinç AKÇAY

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen malign hastalık türüdür. Kanser tedavisinde uygulanan yöntemler, yan etkiyi de beraberinde getirdiğinden yeni tedavi metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla iki veya daha fazla ilacın kombine olarak kullanılması kanser tedavisinde etkili bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, antikanser ajan doksorubisin ve proton pompası inhibitörü omeprazolün MCF-7 hücreleri üzerindeki ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının hücreler üzerindeki sitotoksik ve sinerjetik etkinliklerini araştırmaktır. Ek olarak bu çalışma, proton pompası inhibitörünün meme kanserinde kullanılan sitotoksik ajanın etkinliğini artırıp artırmayacağını araştırmak için tasarlanmıştır. Kombine kullanımda; terapötik etkiyi artırmak ve kemoterapötik ajana geliştirilen direnç ve yan etkileri azaltmak amaçlanmıştır. Bu sebeple etken maddelerin hücreler üzerine tekli ve kombine uygulanması sonucu MTT testi ile IC₅₀ dozları belirlenmiştir. Ardından sinerjetik etki hesaplanarak qPCR deneyleri için RNA izolasyonu ve cDNA sentezi deneyi gerçekleştirilmiştir. Etken maddelerin apoptoz üzerindeki etkileri akış sitometri ile tespit edilmiştir. Doksorubisin ve omeprazol tek başına ve birlikte kullanımının MCF-7 hücre hattı üzerindeki qPCR deneyi sonuçlarında anlamlı değişim gösteren mRNA'ların hangi yolakta rolü olduğu belirlenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptotik etkiye sebep olan proton pompası inhibitörünün sinyal yolaklarında gen ifade düzeyindeki etkileri gösterilmiştir. Sonuç olarak doksorubisinin antikanser etkinliğinin proton pompası inhibitörü ile arttığı gösterilmiştir. Kombine uygulamanın tekli uygulamaya göre hücreler üzerinde daha güçlü bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Etken maddelerin tek başına ve kombine kullanımının hem doz artımı hem de zamana bağlı olarak apoptozisi indüklediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Doksorubisin, İnhibitör, Omeprazol, Meme Kanseri, Sinerjetik Etki

ABSTRACT

MSc THESIS

THE INVESTIGATION OF THE SYNERGETIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF THE DOXORUBICIN AND OMEPRAZOLE ON THE MCF-7 CANCER CELL LINE

Şeyma SAĞIR

KIRŞEHİR AHİ EVRAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lütfi TUTAR
Year: 2023, Pages: 85
Juries: Assoc. Prof. Dr. Lütfi TUTAR
Prof. Dr. Yusuf TUTAR
Assoc. Prof. Dr. Sevinç AKÇAY

Breast cancer is the most common type of malignant disease among woman worldwide. Since the methods used in cancer treatment bring with them side effects, new treatment methods are needed. For this purpose, the combined use of two or more drugs appears to be an effective way to treat cancer. The aim of this study is to investigate the cytotoxic and synergetic effects of the anticancer agent doxorubicin and the proton pump inhibitor omeprazole on MCF-7 cells, individually and in combination. Additionally, this study was designed to investigate whether a proton pump inhibitor would increase the effectiveness of a cytotoxic agent used in breast cancer. In combined use; It is aimed to increase the therapeutic effect and reduce the resistance and side effects developed to the chemotherapeutic agent. For this reason, IC50 doses were determined by MTT test as a result of single and combined application of active ingredients on cells. Then, by calculating the synergetic effect, RNA isolation and cDNA synthesis experiments were performed for qPCR experiments. The effects of active substances on apoptosis were determined by flow cytometry. It was determined in which pathway the mRNAs that showed significant changes in the qPCR experiment results on the MCF-7 cell line were played by the use of doxorubicin and omeprazole alone or together. The effects of the proton pump inhibitor on the signaling pathways at the gene expression level have been demonstrated. As a result, it has been shown that the anticancer activity of doxorubicin increases with the proton pump inhibitor. It has been observed that combined application has a stronger cytotoxic effect on cells than single application. It has been observed that the use of active substances alone and in combination induces apoptosis depending on both dose increase and time.

Key Words: Apoptosis, Breast Cancer, Doxorubicin, Inhibitor, Omeprazole, Synergetic Effect

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1.2. Meme kanserinde önlenabilir, önlenemez ve yarı önlenabilir risk faktörleri....	20
Tablo 3.1. Labotuvarda kullanılan cihazların isimleri ve markaları.....	49
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemelerin adları ve markaları.....	49
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kitler.....	50
Tablo 3.4. QPCR bileşenleri ve miktarları.....	54
Tablo 3.5. QPCR koşulları.....	54
Tablo 4.1. Omeprazol ve Doksorubisinin MCF-7 hücre hattındaki % sinerjetik inhibisyonu.....	58
Tablo 4.2. PCR Array deneylerinde kullanılan genler.....	59
Tablo 4.3. Doksorubisin ve Omeprazolün kombine kullanılması ile anlamlı olarak artan ve azalan mRNA'ların yer aldığı yolaklar ve p değerleri.....	66
Tablo 4.4. 48 saatlik etken madde uygulama sonrası belirlenen apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.2.	Kanserin biyobelirteçleri.....	5
Şekil 1.3.	Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşüm mekanizmaları.....	8
Şekil 1.4.	Tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonunda çoklu vuruş modeli.....	10
Şekil 1.5.	Apoptozun moleküler mekanizması.....	12
Şekil 1.6.	Memenin anatomik ve histolojik yapısı.....	17
Şekil 1.7.	Meme kanserinin başlama ve ilerlemesinde kanser kök hücresi ve sitokastik teoriler.....	26
Şekil 1.8.	Östrojenin meme kanseri gelişiminde reseptöre bağımlı ve reseptör bağımsız rolleri.....	28
Şekil 1.9.	Meme kanserinde geleneksel ve yenilikçi tedavi yaklaşımları.....	33
Şekil 1.10.	Doksorubisinin moleküler yapısı.....	38
Şekil 1.11.	Doksorubisin teşvikli hücre ölümünü tetikleyici mekanizmalar.....	39
Şekil 1.12.	Omeprazolün moleküler yapısı.....	40
Şekil 1.13.	Proton pompası inhibitörlerinin antineoplastik etkinlikleri ile ilişkili olarak düzenledikleri hücrel sinyal yolları.....	42
Şekil 4.1.	Doksorubisinin 100-3.125 nM arasında uygulanan dozlarının 24 (a), 48 (b) ve 72 (c) saatlik inkübasyon süresinde MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi.....	57
Şekil 4.2.	Omeprazolün 100-3.125 µM arasında uygulanan dozlarının 24 (a), 48 (b) ve 72 (c) saatlik inkübasyon süresinde MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi.....	58
Şekil 4.3.	Doksorubisin varlığında MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri.....	62
Şekil 4.4.	Omeprazol varlığında MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri.....	62
Şekil 4.5.	Doksorubisin ve Omeprazol kombine uygulanması ile MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri.....	63
Şekil 4.6.	MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri.....	63
Şekil 4.7.	MCF-7 hücrelerine IC ₅₀ konsantrasyonlarında 48 saatlik süre ile uygulanan doksorubisin ve omeprazolün Anneksin V sonuçları.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
μl	: Mikrolitre
ml	: <i>Mililitre</i>
$^{\circ}C$: Santigrat Derece
<i>nM</i>	: Nanomolar
μM	: <i>Mikro Molar</i>
<i>mm</i>	: Milimetre
cm	: Santimetre

Kısaltmalar	Açıklama
AHR	: Seçici Aril Hidrokarbon Reseptörü
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BRCA1/2	: Meme Kanseri ile İlişkili Genler
CDI	: İlaç Etkileşim Katsayısı
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOX	: Doksorubisin
ER	: Östrojen Reseptörü
FASN	: Yağ Asidi Sentezinden Sorumlu Multi Enzim
FBS	: Fetal Sığır Serumunu
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
IC50	: Yarı-Maksimal Baskılayıcı Konsantrasyon
MCF-7	: Doğal Tip Meme Kanseri Hücre Hattı
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5)-Diphenyltetrazolium Bromide
OME	: Omeprazol
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PI	: Propidium İodide
PPIs	: Proton Pompası İnhibitörleri
PR	: Progesteron Reseptörü
P53	: Tümör Protein 53
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
QPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. GİRİŞ

Vücudumuzdaki hücreler kontrollü bir şekilde bölünür, çoğalır ve görevlerini yerine getirdikten sonra ise apoptoz denilen programlı ölüm şekli ile ölüme gider. Hücrelerin bölünme ve çoğalma mekanizmalarında meydana gelen hatalar, hücreleri kanserleşmeye götürür. Kanserleşen hücreler, apoptoz denilen güvenli bir şekilde ortadan kaldırılma sisteminden kaçarak uzun süre hayatta kalabilme kabiliyeti kazanırlar. Böylece kanser hücrelerinin birikmesi ile primer tümör odakları oluşur. İnvazyon yeteneği kazanan kanser hücreleri ait oldukları yerlerden komşu dokulara yayılarak kan dolaşımına geçer ve metastaz denilen sekonder tümör odakları oluştururlar. Lodish ve ark. (2011).

Dünya Sağlık Örgütü- Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)' nin 2020 yılı verilerine göre Dünya'da toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış ve 10,0 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Bu ölümlerin %90'ı metastaz kaynaklıdır. Metastatik hale gelen kanser hücreleri kemoterapötiklere dirençli hale geldiğinden tedaviyi zorlaştırmaktadır (Deo ve ark., 2022; Guo ve ark., 2020). Her yıl Dünya çapında ise yaklaşık 9.000.000 yeni kanser vakası olduğu tahmin edilmektedir. Kanser, gelişmiş ülkelerde ölüm sebebi olarak ikinci sırada yer almaktadır. Ayrıca kanser küresel olarak ölümlerin %10'unu oluşturmakla beraber, hastalık araştırmalarında en öncelikli hastalıklar arasındadır (Massardi, 2021).

Ayrıca kanser; hastalığın ve tedavisinin getirdiği fiziksel, psikolojik, ekonomik ve sosyal sorunlar ile hastaların yaşam kalitesini de önemli ölçüde düşürmekle birlikte ülkelerin sağlık sistemlerini de zorlaştırmaktadır. Tüm bu sebepler, kanseri bir toplum sağlığı sorunu haline getirmiştir (Donar, 2021). Dolayısıyla kanser, hastalık araştırmalarında öncelikli olarak yer almaktadır.

Meme kanseri, dünyada en sık gözlenen ikinci, kadınlar arasında ise en sık teşhis edilen kanser çeşididir (DeSantis ve ark., 2015). Ayrıca Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC)' nin çalışmalarına göre de kadınlar arasında mortalitesi en yüksek olan ikinci kanser türüdür (Orhan ve Hande, 2019). Meme kanserlerinin çoğunluğu, epitel hücrelerden köken alan karsinomlardan oluşurken filloid tümörler ve bağ dokusundan kaynaklanan sarkomlar da meme kanserlerinde nadiren görülmektedir (Feng ve ark., 2018).

Meme kanseri görülme sıklığının artan yaşam süresi sebebiyle gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere kıyasla çok daha yüksek olduğu görülmektedir.

Buna karşın meme kanserinden ölüm oranlarının gelişmiş ülkelerde daha düşük olması tarama ve tedavideki gelişmelerin önemine dikkat çekmektedir. (Orhan ve Hande, 2019).

Kadınlarda meme kanseri insidansı; yaşam süresinin artması, toplumdaki büyüme ve gelişme, batılı yaşam tarzlarının benimsenmesi ile yükseliş grafiği çizmektedir (D'Souza ve ark., 2021). Meme kanserini tedavi etmek için kullanılan stratejiler, hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir. Öyleki kemoterapi, radyoterapi ve özellikle koruyucu olmayan meme cerrahisini içeren geleneksel yaklaşımlar, meme kanseri tedavisi alan hastalarda ağrı, depresyon ve bilişsel işlev bozuklukları gibi semptomlar ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte meme kanseri hastalarında kemoterapi özelinde genç hastalarda kemoterapinin tetiklediği erken menopoza ve her yaş grubunda kemoterapinin tetiklediği periferik nöropati gözlemlenmektedir (Chan ve ark., 2017). Ayrıca günümüzde meme kanseri insidansında gözlenmeye başlayan artış hızının, ilerleyen yıllarda ortalama yaşam süresinin de artması ile beraber daha fazla yükselmesi beklenmektedir. Tüm bu nedenlerden ötürü yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve geleneksel terapötiklerin kombinasyonlarının ya da ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması ile meme kanserinde tedavi süreçlerinin iyileştirilerek yan etkilerin azaltılması ve terapötik etkinliğin artırılması önem kazanmaktadır.

Tümör oluşumunun moleküler temeli ve tiplendirilmesinde son yıllardaki önemli ilerlemelere rağmen, yüksek geliştirme maliyetleri ve düşük başarı oranları nedeniyle yeni terapötik adayları klinik öncesi çalışmalardan klinik deneylere getirmek dezavantaj oluşturmaktadır. İlaçların yeniden konumlandırılması stratejisi; mevcut olarak başka bir tür patoloji için kullanılan kimyasal bileşenler veya biyolojik maddelerden farklı hastalık koşullarında yararlanma sürecini gerektirir. Bu stratejinin avantajı, önceden kanıtlanmış farmakokinetik, toksikoloji ve güvenlik verileri nedeniyle, bu tür ilaçların klinik çalışmalara muhtemelen daha hızlı ve daha ucuza girmeleridir. Malign tümörler için ilaçlar, ilacın yeniden konumlandırılması ile bulunabilir. Dolayısıyla bu stratejiye olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Antineoplastik olarak kullanılmayan ilaçlar arasında omeprazol, esomeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol ve ilaprazol gibi gastrik proton pompası inhibitör (PPI)'leri genel kullanımları ile düşük maliyetleri açısından avantajlı gözükmektedir. Geleneksel sitotoksik ajanların aksine PPI'ların kullanımı tümör mikroçevresini de hedefleyerek antitümör etkinlik göstermektedir.

Bunların dışında omeprazolün aynı zamanda seçici aril hidrokarbon reseptörü (AHR) düzenleyicisi olması, meme kanseri tedavisinde doksorubisin gibi kemoterapötik ajanlar ile kombine kullanımının, tümörlerdeki kemoterapötik ilaç direncinin kırılması ve metastazın önlenmesi gibi avantajlar sağlayacağı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Lu ve ark., 2017).

1.1. Amaç

Mevcut tez çalışması, klinikte sıklıkla kullanılan, antikanser ajan doksorubisin antibiyotiği ve gastrik proton pompası inhibitörlerinden omeprazol ilacının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine tek başına, kombine şekilde, doza ve zamana bağlı olarak kullanımının hücreler üzerine sitotoksik ve sinerjetik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ek olarak bu çalışma, proton pompası inhibitörü özelliğinde omeprazolün meme kanserinde kullanılan kemoterapötik ajanın etkinliğini artırıp artırmayacağını araştırmak için tasarlanmıştır.

1.2. Kanser

Kanser; bir doku ya da organdaki belirli hücre gruplarının genetik ve epigenetik değişikliklere uğraması sonucu hücrelerin bölünme ve senesens kabiliyetlerinde anormallikler görülmesi, sıradışı çoğalması ve sonuç olarak sağlıklı dokulara giden besin ve oksijen alışverişinin bozulması, kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelerin invaziv yetenek kazanması, farklı doku ve organlara metastaz yapması ile tanımlanan heterojen bir hastalıklar grubudur (TÜRK ve ark., 2020).

1.2.1. Kanserinin Diğer Hastalık Grupları İçerisindeki Yeri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) resmi sayfası güncel verilerine göre; dünya genelinde ölümlerin ilk on sebebi sırasıyla iskemik kalp rahatsızlıkları, inme, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), alt solunum yolları enfeksiyonları, kötü yeni doğum koşulları, soluk borusu-bronş-akciğer kanserleri, demans, diyareye sebep olan hastalıklar, şeker hastalığı ve böbrek hastalıkları 2019 yılında dünyadaki yaklaşık 56 milyon ölümün %55'ini oluşturmaktadır. Eski yıllarda mortalite açısından oldukça önem arz eden bulaşıcı hastalıklar aşısı ve diğer pek çok hijyenik koşulun çağdaş dünya düzeninde temininin kolaylaşması ile önemini kaybetmiş ve sonuç olarak 2019 yılındaki ölümlerin %74'ü bulaşıcı olmayan hastalıklardan meydana gelmiştir. Öyleki kanser çok çeşitli alt türleri ile birlikte düşünüldüğünde kalp damar hastalıklarından sonra gelen ikinci ölümcül hastalık grubu olarak gözlenmektedir. Buna karşılık, az gelişmiş

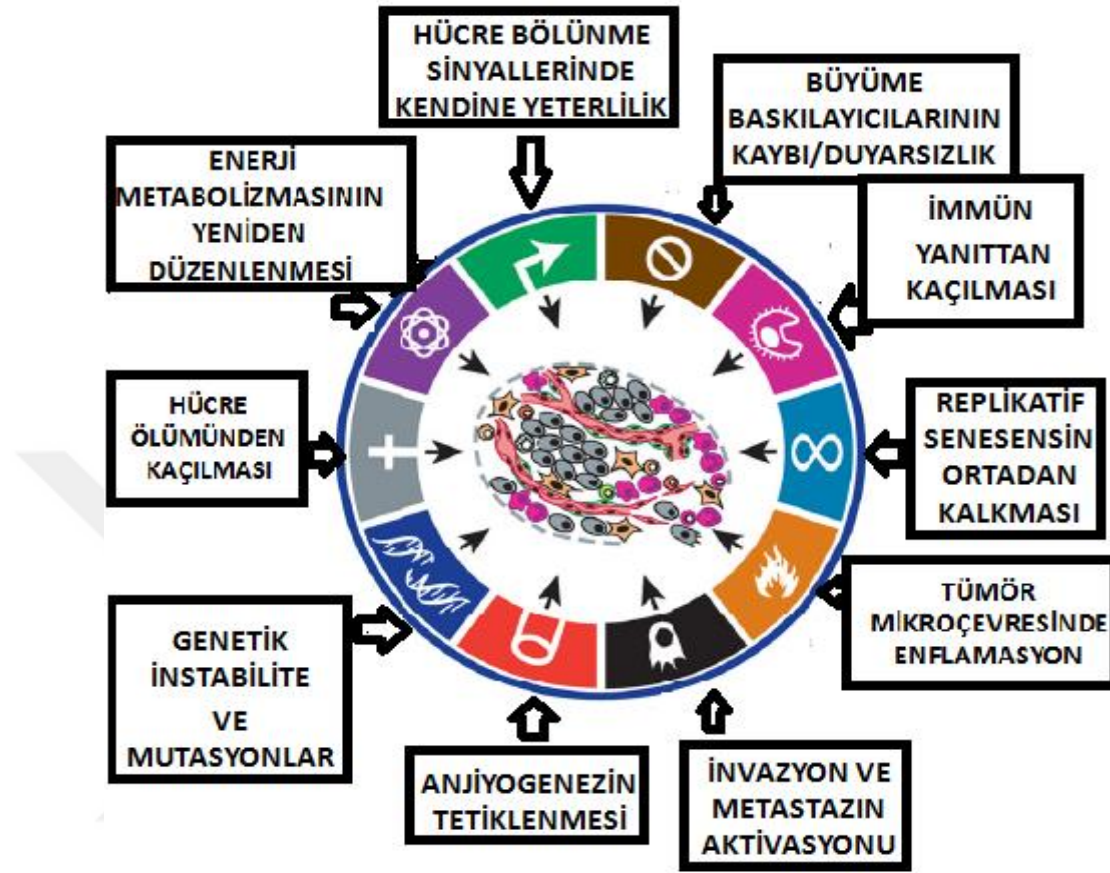
ülkelerde halen başta kötü doğum koşulları olmak üzere alt solunum yolları hastalıkları, diyareye sebep olan hastalıklar, sıtma, tüberküloz, AIDS gibi bulaşıcı hastalıklar ilk on ölüm sebebi arasında yer almaktadır. Ancak dünya genelindeki tabloya da yansıyan orta ve çok gelişmiş ülkelerde doğum oranlarının azalması, konfor ve sağlık koşullarının iyileşmesi ile azalan bedensel harekete ve ayrıca tüm bunların getirdiği nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak ilk on ölüm sebebi içerisinde çeşitli kanser türleri, kalp hastalıkları, hipertansiyon ve demans oldukça önem kazanmıştır ve ilerleyen yıllarda bu tarz hastalıkların görülme sıklığının artması beklenmektedir (WHO, 2020).

Türkiye’de toplam ölüm sebeplerinde ikinci sırada gelen kanser hastalığı için her yıl 200.000'den fazla yeni tanı alan birey saptanmaktadır. Ülkemizde en sık akciğer, meme, kolon, prostat ve mide kanserleri gözlenmektedir (Donar, 2021). İstatistiksel çalışmalara göre 2008 yılında dünyada 8.000.000 olarak kaydedilen kanser nedenli ölümlerin 2030 yılına kadar 11.000.000'a ulaşacağı tahmin edilmektedir (Sun ve ark., 2017). Tüm bu sebeplerden ötürü primer tümörleri ortadan kaldırmak ve metastazı önlemek amacı ile etkili kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesi son derece önemlidir.

1.2.2. Karsinogenezin Genetik ve Biyokimyasal Alt Yapısı

Kanserlerin tamamının sadece % 10-15'i kalıtsal olarak ebeveynlerden gelen genlerle aktarılmaktadır (ÇAKIR, 2012). Buna karşılık çoğu kanserleşme süreci, yaşam süresi boyunca maruz kalınan ve sonuçta genetik düzensizliği ve/veya epigenetik değişimleri teşvik eden fiziksel koşullar (iyonize radyasyon, ultraviyole ışınlar, elektromanyetik alanda sapmalar, ısı), kimyasal mutajenler ve biyolojik ajanlar (bazı virüsler ve bakteriler) ya da endojen metabolizma sonucu oluşabilecek spontan hasarlar ile DNA'nın yapısında ve/veya gen anlatımının düzenlenmesinde meydana gelen değişimler sonucunda oluşmaktadır (Darwiche, 2020). Özellikle son yıllarda gerçekleşen bilimsel çalışmaların da ışığında karsinogenezin biyobelirteçleri: mutasyonlar veya genetik düzensizlikler, hücrelerin programlı ölümden kaçınması, otokrin olarak sürekli bölünme sinyali varlığı, büyüme baskılayıcılarının kaybı, anormal telomeraz aktivitesi ile telomer uzunluğunun kısalması ile gerçekleşmesi gereken DNA replikasyonunun blokajı ve buna bağlı olarak hücre senesensin ortadan kalkması, hücre enerji sisteminin yeniden düzenlenmesi (örneğin aerobik glikolizin tercih edilmesi), anjiyogenezin aktiflenmesi, tümör mikroçevresinde enflamasyonun tetiklenmesi, malignan hücrelerin immün sistemden kaçması ve invazyon ile

metastazın tetiklenmesi olarak özetlenebilmektedir (Şekil 1.2) ; (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 1.2. Kanser biyobelirteçleri Hanahan ve Weinberg (2011)'den uyarlanmıştır.

DNA onarımı ile ilişkili (örneğin BRCA1/2, ATM, ATR), DNA replikasyonunun baskılanması ile ilişkili (örneğin Retinoblastoma proteini), hücre devrinin durdurulması (siklin ve sikline bağımlı kinaz inhibitörleri ve genomun gardiyanı olarak nitelendirilen p53) ve hücre ölümünü teşvik eden proapoptotik proteinler gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu sağlayan ya da sağlıklı hücrelerde hücre sağkalımında önemli olan protoonkogenlerin (örneğin: antiapoptotik proteinler, EGFR gibi büyüme faktörü reseptörleri; mitojenik sinyaller aktive edilen kinazlar, Ras gibi bazı GTPazlar ve GTPaz aktive edici faktörlerin, steroid hormon reseptörleri ve MYC gibi bazı transkripsiyon faktörleri) anormal aktivasyonu ile onkogenlere dönüşümlerini sağlayan mutasyonlar veya epigenetik değişiklikler karsinogenezin ilk adımını oluşturmaktadır (Darwiche, 2020).

Onkogenler veya tümör baskılayıcı genler sadece protein kodlayan genler değildir. Yukarıda değinilen çeşitli görevlere sahip proteinlerin transkripsiyonlarını

epigenetik olarak düzenleyen veya translasyonlarını engelleyen uzun kodlanmayan RNA'lar veya mikroRNA (miRNA)'lar da onkogen ya da tümör baskılayıcı gen işlevi görebilmektedir. Düzenleyici mekanizması sonucunda onkogen işlevi gören miRNA'lar da onkomir adını almaktadır (Anastasiadou ve ark., 2018). Malignant hücrelerde anormal hücre bölünmesi sonucunda hücrenin DNA hasarlarını onaracak veya mutasyonun zararlı etkilerinden kaçınmak için hücre ölümüne gidilmemesi neticesinde replikasyon hatalarının birikmesiyle karsinogenezi teşvik eden ilk mutasyon dışında pek çok mutasyon gözlenmektedir. Bu bağlamda mutasyona uğraması veya epigenetik regülasyonu ile kanser hücrelerinin anormal çoğalması ve klonal seçilimine pozitif anlamda etki gösteren genlere "driver (sürücü) genler"; buna karşılık mutasyonları veya epigenetik değişimleri ile karsinogenez sürecine pozitif veya negatif etki göstermeyen genlere ise "passenger (yolcu) genler" denilmektedir (Banyai ve ark., 2021).

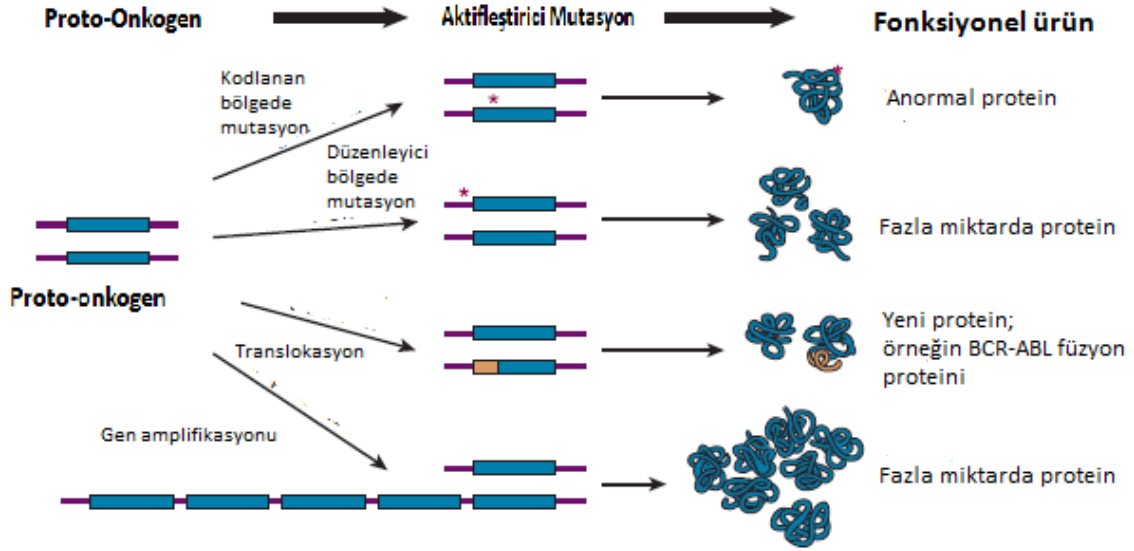
Üzerinde meydana gelen mutasyonlar karsinogenezi pozitif anlamda tetikleyen genlere "Mut-driver genler"; buna karşın mutasyon olmaksızın epigenetik olarak anlatımı artarak veya baskılanarak karsinogeneze pozitif anlamda katkı sağlayan genlere ise "Epi-driver genler" denilmektedir. Buna karşılık yapılan çalışmalarda karsinogenez esnasında meydana gelen genetik veya epigenetik değişimlerin çok az bir kısmının driver genler üzerinde olduğu gösterilmiştir (Vogelstein ve ark., 2013). Kanser genom atlasından çekilen, 33 kanser tipini ve bunların alt tiplerini temsil eden 10.000'den fazla tümör örneğinin tek nokta değişimi, kopya sayısı değişimi, mRNA anlatım seviyesi, gen füzyonları ve DNA metilasyonu verilerini içeren büyük çaplı bir biyoinformatik çalışmaya göre driver genler % 89 oranında bir temsille: DNA onarımı, hücre devrinin ilerlemesi ve kontrolü, hücre-hücre iletişimi, hücre farklılaşması veya çoğalması, hücrel stres cevabı tüm bunların temelinde ise hücre sağkalımı ve ölüm kararı ilişkili TP53, reseptör tirozin kinaz (RTK)/ Ras, fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K)/Akt, STAT, WNT, APC, MYC, transformasyon büyüme faktörü- β (TGF- β), HIPPO, NRF2, Hedgehog gibi önemli sinyal yolları üzerinde yer almaktadır (Sanchez-Vega ve ark., 2018).

1.2.2.1. Proto-Onkogenler ve Onkogenlere Dönüşüm Mekanizmaları

Proto-onkogenler; kodladıkları proteinlerin işlevlerine göre; büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal iletili-dönüştürücü kinazlar ve mediyatörler, nükleer transkripsiyon faktörleri, anti-apoptotik proteinler ve genomun gardiyanı tümör baskılayıcı protein p53'ün degradasyonunu sağlayan MDM2 proteindir. Bu zamana dek

yapılan çalışmalarda 50-60 civarında onkogen tanımlanmıştır. Büyüme faktörü olarak kodlanan proto-onkogenlere platelet türevli büyüme faktörünün (PDGF) β zinciri ile fibroblast türevli büyüme faktörleri-4/5 (FGF 4/5)'ni kodlayan genler; büyüme faktörü reseptörü olarak kodlanan proto-onkogenlere örnek olarak epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü işlevi yapan RTK aktiviteli ERBB2 (veya HER2/neu) ile interlökin için plazma membranı reseptörü işlevi yapan RTK; kinaz aktiviteli sinyal iletici proto-onkogenlere örnek olarak SRC ve ABL tirozin kinazları, sinyal iletici mediyatör olan proto-onkogenlere örnek olarak GTPaz olan Ras ve guanin nükleotid değişim faktörü olan SOS; nükleer transkripsiyon faktörü olarak kodlanan JUN, FOS, MYC, tiroid hormon reseptörü α ve antiapoptotik protein olan Bcl 2 örnek olarak verilebilir (Kontomanolis ve ark., 2020).

Proto-onkogenler şekil 1.3'te özetlenen farklı biçimlerde onkogenlere dönüşebilmektedir. Onkogenlerin protein ürünlerine onkoprotein denilmektedir. Protein kodlanan bölgelerde meydana gelen mutasyonlar amino asit değişiklikleri sonucunda daha fazla aktiviteye sahip onkoproteinlerin sentezine neden olabilir. Ayrıca promotör veya aktivatör/inhibitör DNA bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar da protein kodlayan genin anlatımının artarak karsinogenezin tetiklenebileceği durumlar ortaya koyabilmektedir. DNA üzerinde hareketli elementler olan transpozonlara bağlı olarak ya da fiziksel mutajenlere bağlı olarak tetiklenen parça değişimleri sonucunda protein kodlayan veya kodlamayan bölgeler arasında gerçekleşen translokasyonlar yeni ve aktivitesi artmış protein çeşitlerinin üretimini tetikleyebilmektedir. En sık bilinen örnek ise kronik miyeloid lösemi oluşumunu tetikleyen 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon sonucunda BCR-ABL füzyon onkoproteininin üretilmesidir. Ayrıca hücrelerimizde DNA replikasyonu sırasında gerçekleşen endojen hatalar ile bazı proto-onkogenlerin amplifikasyonu sonucunda çok sayıda protein üretime sebep olan onkogenik dönüşüm gerçekleşebilmektedir (şekil 1.3) ; (Nussbaum ve ark., 2015) Onkogenik aktivasyonlar genomdaki transpozon elemanlarının hareketi veya RNA retrovirüslerine bağlı olarak genoma giren hareketli elemanlar ile de tetiklenebilmektedir. RNA retrovirüsleri ayrıca genomda düzenleyici bölgelere de girerek gen anlatımlarının regülasyonu ile onkogen üretime katkıda bulunabilmektedir. DNA virüslerinin ise kendi genomlarının kodladıkları bazı onkoproteinler çeşitli kanserlerin gelişimine sebebiyet verebilmektedir (Kontomanolis ve ark., 2020).



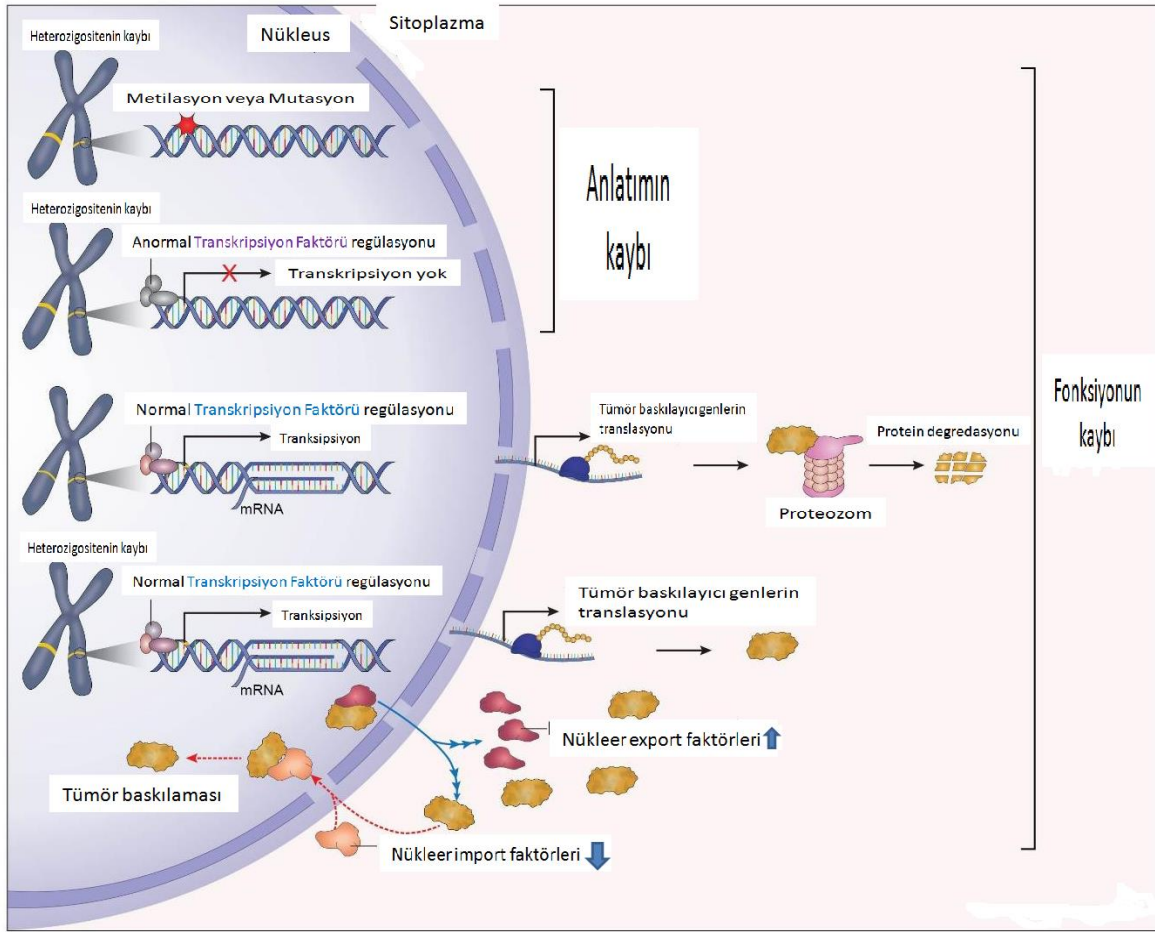
Şekil 1.3. Proto-onkogenlerin Onkogenlere dönüşüm mekanizmaları (Thompson & Thompson genetics in medicine 8.th edition (2015)'dan alınmıştır). (Nussbaum ve ark., 2015).

1.2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyon Mekanizmaları

Tümör baskılayıcı genlerin işlevleri temel olarak DNA onarımı, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre proliferasyon sinyallerinin kapatılması, hücre farklılaşması ve hücre ölümü ile ilişkilidir. Tümör baskılayıcı genlerin karsinogenezi tetikleyebilmesi için genellikle her iki allelinde nokta mutasyonları, delesyonlar veya anormal mitotik bölünmeler ile kaybı gerekmektedir. Bu duruma "çift vuruş" veya "Konudson hipotezi" denilmektedir. Ailevi kanser sendromlarında tümör baskılayıcı genin ilk kopyasının ebeveynlerden mutant olarak geldiği, diğer kopyanın ise hayat sürecinde mutasyonlar ile kaybının yaşandığı kabul edilmektedir. Bu duruma heterozigosenin kaybı denilmektedir. Bununla birlikte p53 proteini tetramer olarak işlev gördüğünden dolayı TP53 genindeki tek bir alelin kaybı sonucunda tetramer içerisinde tek bir alt ünite mutant olacağından karsinogenez tetiklenebilmektedir. Bu durumda karsinogenezin gelişmesinde her zaman "çift vuruş" hipotezinin geçerli olmadığı anlaşılmaktadır (Kontomanolis ve ark., 2020).

Yayınlanan pek çok çalışma, genetik ve epigenetik bir olayın tümör baskılayıcı gen anlatımının kaybına yol açtığı çift-vuruş modelinin, insan kanserlerinde tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu tam olarak açıklamadığını göstermektedir. Bu nedenle eldeki yeni verilerin de hesaba katılması ile Şekil 1.4'te gösterilen "çoklu vuruş modeli" önerilmektedir. Bu modelde düzenleyici bölgede, transkripsiyon faktörlerini

kodlayan bölgelerde veya tümör baskılayıcı proteini kodlayan bölgede gelişen mutasyonlar dışında bu bölgelerdeki epigenetik baskılanmalar, protein ürünlerinin proteozomal degradasyonu ve nukleusa göçen tümör baskılayıcı genlerin nukleusa göçünün bozulmasına yol açan etmenler de hesaba katılmaktadır (Wang ve ark., 2018). Ökaryotlarda transkripsiyonu düzenleyen proteinlerin; farklı bağlanma veya aktivasyon domainleri içermeleri, birden fazla alt birimden oluşmaları ve birden fazla faktörün birlikte çalışması sebepleri ile bu sistemdeki proteinleri etkileyecek mutasyonlar veya post-translasyonel modifikasyonların özellikle inaktivasyonu sporadik veya ailesel meme kanseri gelişiminde de etkili olan PTEN fosfataz'ın sentezine ket vurduğu bilinmektedir. Örneğin PTEN geninin promotörü p53 tümör baskılayıcı transkripsiyon faktörü ile regüle edildiğinden, kanser çeşitlerinde kaybı en fazla gözlenen gen olan p53'ün inhibisyonu PTEN sentezine de ket vurmaktadır (Liu ve ark., 2017). Karsinogenezde BRCA1, p53, APC ve Rb 'nın yanlış lokalizasyonunun söz konusu olması da patogenezi teşvik etmektedir. Örneğin BRCA1'in çoğu meme ve yumurtalık kanseri hücre hattında ve primer hücre soyunda yüksek düzeyde sitozolde lokalize olduğu gözlenmiştir. BRCA1 proteininin C-ucunu etkileyen germ hattı mutasyonlarının, somatik hücrelerdeki DNA hasarı durumunda BRCA1'in nukleusa göçünü engellediği belirlenmiştir. Normal şartlarda BRCA1 ile ilişkili RING alan proteini 1 (BARD1,) BRCA1 proteininin N-ucu nukleer ihraç sinyalini maskeleyecek şekilde onunla heterodimer oluşturarak onun nukleusta tutulmasını sağlamaktadır. p53 proteininin lokalizasyonu da sahip olduğu nukleer ihraç ve nukleer lokalizasyon sinyal motiflerine bağlanan diğer proteinler ve çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar ile düzenlenmektedir. Bu durumda nukleusa alım faktörlerinin miktarının azalmasının ve nukleer ihraç faktörlerinin artmasının karsinogenez ile uyumlu olduğu söylenebilir. p53 protein miktarının düzenlenmesi ise, içerisinde çeşitli endojen veya viral onkoproteinlerinde bulunduğu E3 ubikuitin ligaz ailesi tarafından proteozom sistemine yönlendirilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.4) ; (Wang ve ark., 2018).



Şekil 1.4. Tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonunda çoklu vuruş modeli (Wang ve ark., 2018)

1.2.2.3. Tümör Baskılayıcı Genler ile Kalıtsal ve Ailesel Kanser Sendromlarının İlişkisi

Tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonuna neden olan mutasyonlar kalıtsal veya ailesel kanser sendromlarına sebep olabilmektedir. Kalıtsal kanser sendromlarında belirli genlerin kayıplarının tek başına yüksek penetransı olmakla birlikte ailesel kanser sendromlarında daha fazla sayıda ancak penetransları düşük gen mutasyonlarının ve çevreye bağlı olarak epigenetik etkilerin karsinogenezisin gerçekleşmesine etkisi daha yüksektir. Ailesel kanser sendromları genellikle orta yaşlarda kendini gösterirken kalıtsal sendromlar genellikle daha genç yaşta kendisini göstermektedir. Ailesel kanser sendromları yaklaşık % 10-15 civarında insidansa sahip iken, kalıtsal sendromların insidansı % 5 civarındadır (Lalloo ve Evans, 2012). Hücre devri ve DNA onarımı işlevleri ile ilişkili olan meme kanseri ilişkili gen 1/2 (BRCA1/2)'leri ailesel meme ve yumurtalık kanseri; genomun gardiyanı olarak bilinen, hücre devri düzenlenmesi ve programlı hücre ölümü tiplerinden apoptozun aktivasyonunda rol alan

TP53 ve kontrol noktası kinaz 1/2 genleri (CHECK 1/2) oldukça nadir gözlenen "Li-Fraumeni sendromu" ile ; hücre devri düzenlenmesi ve replikasyon fazına geçişte önemli olan RB1 geni ailesel retinoblastoma ile; DNA yanlış eşleşme onarımından sorumlu MSH2 ve MLH1 genleri ise kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC); DNA'daki çift zincir kırıkları ile aktive olan ve hücre devrini durduran ATM serin/treonin kinaz ise Ataksi-Telanjiyektazi sendromları ile ilişkilidir (Rahner ve Steinke, 2008); Wang ve ark. (2018).

1.2.3. Hücre Ölümü ve Karsinogenez İlişkisi

Son yıllardaki çalışmalar sonucunda, öncesinde yalnızca programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz veya kontrolsüz hücre ölümü nekrozdan ibaret sanılan hücre ölümü çeşitlerine otofaji, nekroptozis, onkozis, piroptozis, ferroptozis, mitotik katastrofi ve nöronal toksisite gibi programlı ya da kontrolsüz hücre ölümü mekanizmaları eklenmiştir. Ayrıca apoptozun birkaç alt tipi olduğu ve apoptoz, nekroz ve otofaji arasında konuşma noktaları olduğu gösterilmiştir. Apoptoz, bir dizi enzimatik süreçle birlikte DNA'nın ip merdiven görünümü şeklinde kesilmesi ve apoptotik veziküllerin ekstrasellüler alana saçılması ile karakterize edilmektedir. Sonuç olarak çevredeki dokulara minimum zarar verilmesi ile hasarlı hücreler vücuttan temizlenmektedir. Bununla birlikte nekroz, genellikle, hücre içeriğinin çevre dokulara dağılması ve enflamasyonun tetiklenmesi ile sonuçlanmaktadır. Otofaji ise normal şartlar altında proteozom sistemi ile birlikte hücrenin temizlik ve geri dönüşüm mekanizmasını oluşturan, farklı alt tipleri olan ve ayrıca gerektiğinde hücre ölümünü devreye koyabilen bir sistemdir (D'arcy, 2019).

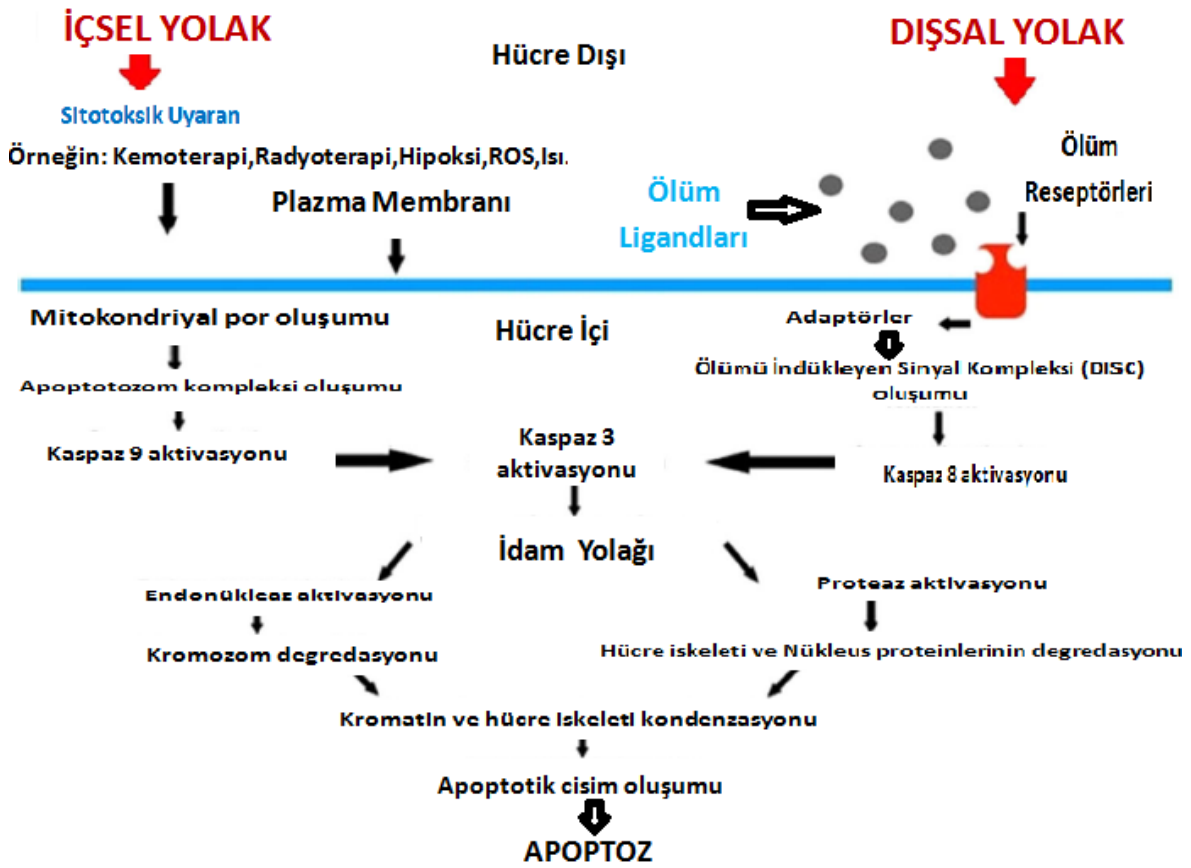
1.2.3.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptoz tetiklenmesi aşamasında içsel ve dışsal yolak olarak iki ana kısma ayrılmaktadır ancak bu iki mekanizma alt yollarda bağlanarak ortak bir sonucun gelişmesine neden olmaktadır. Apoptozun dışsal yolak aracılığı ile tetiklenmesi immün sistem hücreleri aracılığı ile parakrin veya jukstakrin olarak sunulan ölüm ligandlarının hedef hücrenin plazma membranı üzerindeki ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile ölüm sinyalleri bir dizi adaptör protein, kinaz ve proteazlar ve nükleazlar aracılığı ile hücre nükleusuna kadar iletimini sağlayan süreci başlatmaktadır.

Apoptoz tetiklenmesi aşamasında içsel ve dışsal yolak olarak iki ana kısma ayrılmaktadır ancak bu iki mekanizma alt yollarda bağlanarak ortak bir sonucun gelişmesine neden olmaktadır. Apoptozun dışsal yolak aracılığı ile tetiklenmesi immün

sistem hücreleri aracılığı ile parakrin veya jukstakrin olarak sunulan ölüm ligandlarının hedef hücrenin plazma membranı üzerindeki ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile ölüm sinyalleri bir dizi adaptör protein, kinaz ve proteazlar ve nükleazlar aracılığı ile hücre nükleusuna kadar iletimini sağlayan süreci başlatmaktadır.

Apoptozun içsel yolaktan tetiklenmesi ise çevresel ve metabolik stres koşulları tarafından mitokondri membranında por oluşturabilecek pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu ile başlayan ve mitokondri membranındaki reaktif bazı bileşenlerin sitoplazmaya salınarak proteazlardan bağımsız ya da proteazlarla dolayısıyla da dışsal yolakla bağlantılı olarak nükleusa iletilen bir sinyal kaskadını ihtiva etmektedir (Şekil 1.5). Carneiro ve El-Deiry (2020); (D'arcy, 2019).



Şekil 1.5. Apoptozun moleküler mekanizması D'arcy (2019)'dan uyarlanmıştır. Apoptoz başlıca içsel ve dışsal yollar aracılığı ile tetiklenebilmektedir.

Apoptozun dışsal yolaktan tetiklenmesini sağlayan ligandların başlıcaları çeşitli immün sistem hücrelerince sunulan tümör nekrozis faktör (TNF), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand ve apoptotik antijen 1 (FAS) reseptörü ligandı (FasL)'dır. Bu ligandların reseptörleri ölüm ilişkili domain aracılığı ile adaptör proteinler aracılığıyla sistein-aspartat spesifik proteaz 8 (kaspaz-8)'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Kaspazlar

birbirlerini keserek aktive eden proteazlardır ve sonuçta kaspaz 3 aracılığı ile endonükleazların aktivasyonu ile DNA kesilimi, proteazların aktivasyonu ile ise hücre iskeleti ve diğer protein birimlerin yıkılımı teşvik edilmektedir. Ayrıca DNA onarımını sağlayan Poli-ADP-Riboz polimeraz (PARP)'ın kesilimi de teşvik edilerek DNA onarımı engellenmektedir. İçsel yolda ise strese hassasiyet gösteren p53 gibi proteinler sayesinde B-hücre lenfoma 2 (Bcl 2) ailesinden olan antiapoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin birbirleriyle fiziksel olarak etkileşerek yarışan oranlarında apoptoz lehine bir sapma meydana getirilerek mitokondri membranından: kaspaz 9'un aktivasyonunu sağlayacak apoptozom kompleksinin bileşeni sitokrom C ve kaspazdan bağımsız olarak DNA'nın parçalanmasına vesile olan endonükleaz G'nin salınımı gerçekleşmektedir. Kaspaz 9'un içsel yoldan aktivasyonu ile Kaspaz 3' ün aktivasyonu sonucunda kromatin ve hücre iskeleti kondenzasyonu tetiklenmektedir (Şekil 1.5). Ayrıca apoptoz yollarının hücre sağkalımı ve çoğalması ya da ilaç direnci gibi diğer sinyal mekanizmalarıyla konuşması da hücre ölümü kararını etkileyebilmektedir (Carneiro ve El-Deiry, 2020); Pfeffer ve Singh (2018).

1.2.3.2. Karsinogeneizde Apoptozdan ve İmmün Yanıttan Kaçınılma Mekanizmaları

Onkogenler ve tümör baskılayıcılar; tümör metabolizmasını yeniden programlarken, tümör mikroçevresi veya terapinin dayattığı stresler (pH, hipoksi, besin yoksunluğu, radyasyon, ısı ve ilaç direnci) ayrıca metabolizmayı yeniden düzenleyebilmekte ve yeni metabolik bağımlılıklar yaratabilmektedir. Apoptozun kendisi enerjiye ihtiyaç duyan bir süreç olduğundan besin öncüllerine ulaşım ve onların metabolizması apoptozu düzenleyen etmenlerdendir. Glutamin ve glikoz gibi metabolitlerin spesifik Bcl 2 proteinlerinin anlatımlarını ve bağlanma özelliklerini düzenleyerek içsel yoldan apoptozu düzenledikleri tartışılmaktadır. Bu nedenle tümörlerin metabolizmaya bağımlılıklarını hedeflemek terapötik çalışmalar açısından umut vermektedir. Kanser hücrelerinde pro-apoptotik Bcl2 üyelerinin anlatımları azalırken ya da bu genlerin mutasyon veya epigenetik olarak kaybı avantaj sağladığından klonal olarak seçilirken anti-apoptotik proteinlerin anlatımları pozitif olarak düzenlenmektedir. Ayrıca çoğu karsinogeneiz sürecinde kaybedilen p53, normal hücresel koşullarda pro-apoptotik proteinlerin anlatımlarını tetiklemekle birlikte eksikliği durumunda kanser hücrelerinde apoptozu karşı direnç teşvik edilmektedir Chlebowski ve ark. (2005); (Sharma ve ark., 2019). Örneğin meme kanseri hücrelerinde apoptozu inhibe eden faktörler olan Bcl 2 ve survivin'in anlatımlarının arttığı, buna karşın

apoptozda çok önemli role sahip kaspaz anlatımlarının ise düştüğü gözlenmiştir (Wang ve ark., 2017).

Kanser hücrelerinin dışsal yoldan apoptoza karşı direnç geliştirilmesine yol açan tümör aracılı immün kaçışın başlıca mekanizmaları: tümör antijenlerinin eksikliği veya modifikasyonları, immün sistemdeki T hücrelerine antijen sunumunda kullanılan majör doku uyumluluk proteini 1 (MHC 1)'nin düşük anlatımı veya antiapoptotik fonksiyonlar ile ilişkilidir. Tümör ilişkili antijenlerin herhangi bir modifikasyonu veya mutasyonu, tümör hücrelerinin immünojenitesini değiştirerek farklı kanser alt tiplerinin farklı immün tepki vermesine sebep olabilmektedir. Meme kanseri hücrelerinde genel anlamda; hücrenin kendi ölümü için gerekli Fas anlatımının azalırken karşıdaki immün sistem hücrelerini öldürmek için sunulan Fas-L anlatımının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca normal şartlarda konakçı bağışıklık sistemi tarafından doğal katil ve sitotoksik T hücrelerine sunularak otoimmüniteden kaçınılmasına yol açan insan lökosit antijeni -G (HLA-G)'nin meme kanseri hücrelerinde anormal anlatımının immün yanıtta kaçınılarak hastalığın kötü seyretmesi ile ilişkisi gösterilmiştir. Bununla birlikte tümör mikroçevresinde bulunan tümör ilişkili lenfositler ve düzenleyici T hücreleri salgıladıkları sitokinler ile antijen sunumunu düzenlemektedirler. Tümör kaynaklı enflamasyonu baskılamak için düzenleyici T hücrelerinin immün baskılayıcı sitokinleri salgılaması da kanserde immün kaçışa sebep olan bir etmendir (Bates ve ark., 2018); Wang ve ark. (2017).

1.2.4. Karsinogenezde Hedefe Yönelik Terapötik Stratejiler

Meme kanseri de dahil olmak üzere çoğu karsinogenezde genel hedefe yönelik terapötik stratejiler malignant hücrelerde: enerji metabolizmasının bozulmasını; hücre sağkalımını tetikleyen büyüme faktörü sinyallerinin engellenmesini; hücre devrinin akışını sağlayan sistemlerin inhibisyonunu, replikatif senesensin sağlanmasını; DNA onarımının engellenmesini; anjiyogenez, invazyon ve metastazın inhibisyonunu; tümörün immün sistemden kaçışının engellenmesini ve bu kaçışı tetikleyecek mikroçevre enflamasyonun baskılanmasını ve apoptozun teşvikini hedeflemektedir. Bu bağlamda epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), sikline bağımlı kinaz (CDK)'ları, sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4(CTLA4)'ü, telomerazı, aerobik glikolizi, PARP'ı, vasküler-endothelyal büyüme faktörü VEGF sinyalini ve hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR)'nü hedefleyen monoklonal antikor (mAb)'lar veya küçük moleküllü inhibitörler ile antiapoptotik Bcl-2 proteinlerini saf dışı bırakacak olan

apoptozu teşvik eden Bcl-2 proteinlerini taklit eden ajanların geliştirilmesi son yıllarda önem kazanmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

1.3. Meme Kanseri

Meme kanseri çoğunlukla memenin lobülleri ve kanallarından kaynaklanmakta olan; moleküler düzeyde ise somatik gen mutasyonları, kopya sayısı değişiklikleri ve kromozom yapısal yeniden düzenlemeleri sonucunda yüksek genomik kararsızlık ile karakterize edilen heterojen bir hastalık grubudur (Testa ve ark., 2020). Dünyada her yıl 1.500.000'dan fazla kadın meme kanserine yakalanmaktadır. Buna karşın meme kanseri insidansı ve mortalite oranları dünya üzerinde ülkeden ülkeye değişkenlik göstermektedir (Sun ve ark., 2017).

1.3.1. Dünya'da ve Türkiye'de Meme Kanseri

1.3.1.1. Meme Kanseri

Epidemiyolojik olarak, Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da meme kanseri insidansı en yüksek; Güney Avrupa ve Güney Amerika orta derecede; Asya ve Afrika'da ise düşük insidans oranları görülmektedir. Çin, genel olarak düşük meme kanseri insidans alanına dahil olmasına rağmen, büyük ve orta büyüklükteki şehirlerde, kırsal ve iç bölgelere göre daha yüksek bir insidansa sahiptir. Bu da meme kanserine yatkınlıkta genetiğin yanı sıra çevresel faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir (Massardi, 2021). Asya'da her 35 kadından birinde gözlenen meme kanseri, çoğunlukla Güney Asya'nın gelişmekte olan ilçelerinin yoğun nüfuslu bölgelerinde gözlenmektedir (Akram ve ark., 2017). Örneğin Endonezya'da her yeni kanser tanısından % 41.6'sı meme kanseri vakasıdır (Massardi, 2021). Hawaii, Kaliforniya ve Kanada da en yüksek meme kanseri insidans oranları gözlenmektedir.

Meme kanseri insidansları düşük olan Japonya, Singapur ve Çin'de ise 1975'ten bu yana sosyoekonomik açıdan batılı tarzda bir yaşam biçimi seçildiğinden meme kanseri insidansı artmaktadır. Bununla birlikte meme kanserindeki en yüksek insidans artışları Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, İspanya ve İsveç'te gözlemlenmiştir (Aslan, 2007). Öyleki ABD'de 2017 yılında 250.000'den fazla yeni vaka tespit edilmiştir ve yapılan istatistiksel çalışmalara göre ABD'de tüm kadınların % 12'sinde yaşamlarının herhangi bir kısmında meme kanseri teşhis edilecektir (Waks ve Winer, 2019). Türkiye'nin doğusunda meme kanseri insidansı 50/100 000 iken, batısında bu oran 20/100 000 olarak bildirilmektedir (Kaplan ve ark., 2011).

Bununla birlikte 1994 yılında ülkemizde ortalama 24/100.000 meme kanseri insidansının yıllar içinde artarak 2015'te 43.8/100.000 'e ulaştığı hem de ortalama görülme yaşının giderek düştüğü gözlenmektedir (Özmen ve ark., 2019). Örneğin Kuzey Avrupa ülkelerinde meme kanseri vakalarının % 70'i 50 yaş üzerinde iken, ülkemizde menopoz öncesi dönem olan 50 yaş altında meme kanseri görülme sıklığı tüm vakaların % 50'sidir (Kozan, 2016). Ayrıca Batı ülkelerinde 40 yaşın altındaki meme kanseri vakası oranı tüm meme kanseri vakalarının % 5 ila % 7'si civarında iken Türkiye'de ise tüm meme kanseri vakalarının % 20'si 40 yaşın altındadır (ÇABUK ve ark., 2014).

1.3.1.2. Meme Kanseri Mortalitesi

Dünya'da kansere bağlı ölümlerin beşinci en yaygın nedeni meme kanseridir. Muhtemelen meme dokusu hayatı devam ettirebilmek için zorunlu bir organ olmadığından meme kanserinde sağ kalım oranları metastaz olmadığı sürece yüksektir (Feng ve ark., 2018). Gelişmiş ülkelerdeki iyileştirilmiş tedavi yöntemleri ve erken teşhis, hastaların sağ kalım oranlarını arttırmıştır. Öyleki 1990'lardan beri meme kanseri mortalite oranları % 25 azalmıştır (Yue ve ark., 2013). Buna karşın gelişmekte olan ülkelerde ve özellikle de az gelişmiş ülkelerde; hastalığın geç teşhis edilmesi, onkolojik altyapının yetersiz olması ve uygun maliyetli tedavi rejimlerine ulaşamaması nedeniyle sağkalım oranları daha düşüktür

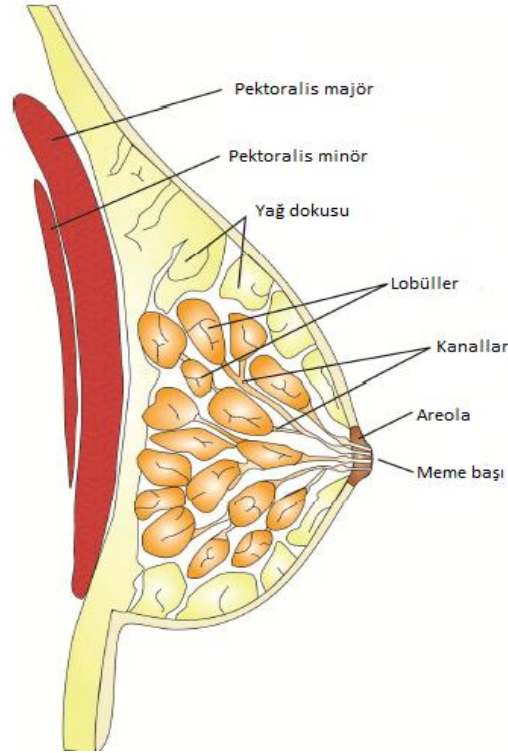
(Sharma, 2021). Çin ve Japonya gibi Asya ülkeleri, Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Avrupa ülkelerine kıyasla daha düşük meme kanseri mortalitesi göstermektedir (Iacoviello ve ark., 2020). Yapılan istatistiksel bir çalışmada Türkiye'de 1987-2008 yılları arasında 23.000 meme kanseri ölümü meydana geldiği, bununla birlikte bu aralıkta yıllık ölüm oranının 100.000 kadından 11.9 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Türkiye'de meme kanseri mortalitesinin 2003 yılından itibaren arttığı ancak bu artışın daha ziyade 65 yaş altında olduğu anlaşılmıştır (Dogan ve Toprak, 2014).

1.3.2. Sağlıklı Meme Dokusunun Yapısı ve Fizyolojik Düzenlenmesi

1.3.2.1. Memenin Histolojisi ve Anatomisi

Meme asimetrik bir bağ dokusu içerisinde yer alan tübülo-alveolar bir organdır. Ön göğüs duvarında bulunan meme; deri, deri altı dokusu ve meme dokusundan oluşmaktadır. Meme dokusunun yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Kadınlarda meme dokusu gelişimi embriyonik evreden hamileliğin başına değin devam eden, modifiye olmuş ve son derece özelleşmiş bir ter bezi çeşididir. Epitel doku toplam meme

hacminin % 10-15'ini kaplamakta, geri kalan kısmı ise stromal elemanlardan oluşmaktadır. Meme bezindeki iki temel hücre yapısından biri olan bazal hücreler düz kas aktininin anlatımını gerçekleştirir ve meme bezinin yapısındaki lümen hücre tabakasını çevrelemektedir. Diğer temel hücre yapısı luminal hücreler ise meme kanalları ile alveollerin lümenini kaplamaktadır ve luminal hücreler hormon reseptörlerinin anlatımı bakımında pozitif ya da negatif olabilmektedir. 15-20 lobdan oluşan meme dokusunda her bir lob 20 ila 40 lobüle ayrılmaktadır. Her bir lob büyük bir süt kanalına boşalmaktadır. Süt veren kanallar areolanın altında süt veren bir sinüse genişler ve daha sonra daralmış bir delikten meme ucuna açılır. Loblar boşluklar ise yağ dokusu ile doludur (Şekil 2.5). Memeden çekilen lenfatik sıvının % 75'inden fazlası aksiller lenf düğümlerinden geçmektedir. Aksiller bölgede 20 ile 30 civarında lenf düğümü bulunmaktadır (Ellis ve Mahadevan, 2013; Feng ve ark., 2018; Pandya ve Moore, 2011).



Şekil 1.6. Memenin anatomik ve histolojik yapısı (Feng ve ark., 2018)'den alınmıştır.

1.3.2.2. Meme Dokusunun Hormonal ve Parakrin Düzenlenmesi

Progesteron, androjenler ve östrojenler steroid yapıları hormonlar kategorisindedir. Bu steroid hormonlar kolesterol üzerinden sırasıyla progesteron, androjenler ve östrojenler olmak üzere ara moleküller aracılığı ile sentezlenmektedir.

Androjenlerin östrojenlere dönüşümünden aromataz enzimi sorumludur. Kadınlarda endojen östrojenler hamilelik dışında menopoza öncesi dönemde genellikle yumurtalıklarda üretilmektedir. Kan plazmasında bulunan üç östrojen formu östron (E1), β -östradiol (E2) ve östriol (E3)'dür. En çok salgılanan östrojen formu yumurtalıklar tarafından β -östradioldür. Östrojen potansiyeli diğer iki formdan oldukça fazla olan E2 bu nedenle ana östrojen hormonu olarak kabul edilmektedir. E2 sentezi menarş ile menopoza arasında oldukça yüksektir ancak menopoza sonrasında miktarında büyük düşüş yaşanmaktadır (Massardi, 2021).

Hamilelik esnasında meme büyümesini teşvik eden başlıca faktörler östrojen, progesteron, büyüme hormonu, prolaktin ve plasental hormonlardır. Doğumdan sonra östrojen ve progesteron seviyeleri düşmekte; bu aşamada prolaktin, büyüme hormonu ve insülin ile birlikte süt üretimi ve salgılanmasına yardım etmektedir. Oskitosin ise emzirme esnasında sinirsel uyarım yolu ile sütün salgılanmasını düzenlemektedir. Menopozun başlangıcında östrojen ve progesteron seviyesindeki üstsel azalış meme dokusunda glandular doku miktarında azalış ve yağ dokusu miktarında artışa sebep olmaktadır. Sonuçta meme tümörlerinin mamografi ile tespiti menopoza sonrasında kolaylaşmaktadır. Endokrin faktörlerin yanında meme dokusu içerisinde hücre bölünmesini ve farklılaşmasını düzenleyen, uyarıcı veya inhibe edici bir dizi parakrin faktör vardır. Bu parakrin düzenleyiciler; insülin benzeri büyüme faktörlerini, EGF ve TGF β 'yi içermektedir (Bistoni ve Farhadi, 2015; Ellis ve Mahadevan, 2013).

1.3.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserine neden olan pek çok risk faktörü bulunmaktadır. Bu risk faktörleri çeşitli kategoriler altında sınıflandırılabilir. Ancak geniş kapsamıyla önlenemez, önlenebilir ve yarı-önlenebilir risk faktörleri olarak üç ana gruba ayırmak mümkündür; bununla birlikte bazı risk faktörleri halen tartışılmaktadır (Tablo 1.2.).

Önlenebilir risk faktörlerinden olan ilk doğumunu 30 yaşından sonra yapmak ya da hiç doğum yapmamak, bebek emzirmemek, geç yaşta menopoza girmek, uzun süreli doğum kontrol hapı kullanımı, obezite, menopoza sonrası düzenli fiziksel egzersiz yapmamak ve şişmanlık, iyonize radyasyona maruz kalmak, koltuk altı ter önleyici losyon kullanmak, sigara içmek, alkol kullanmak, meyve/sebze/balık tüketiminin az olması, fazla kahve içmek ve yağlı diyetin meme kanseri riskini arttırdığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Önlenemez risk faktörleri ise genetik risk faktörleri, demografik risk faktörleri ve kişisel sağlık geçmişi ile alakalıdır. Yarı önlenebilir risk

faktörlerine ise menopozdan sonra kanda yüksek miktarda östrojen, androjen veya prolaktin bulunması gibi hormonal risk faktörleri; erkeklerde jinekomasti ve testiküler anormallikler, diyabet, karaciğer hastalıkları, çeşitli pestisit ve mutajenik ajanlara maruz kalmak, emzirme süresinin düşüklüğü, sosyo-ekonomik faktörler, mesleki risk faktörleri, günlük yaşamdaki stres ve bunlarla ilişkili olarak uykunun süresi ve kalitesindeki bozukluklar örnek verilebilir. Buna karşın, önlenebilir risk faktörlerinden; kürtaj, ovulasyonu arttırıcı ilaç kullanımı, fazla kahve tüketilmesi, fazla cep telefonu kullanımı, önlenemez risk faktörlerinden; kan grubu, ilk menarşın gözlendiği yaş ve yarı önlenebilir risk faktörlerinden uyku süresinin az olması gibi olası risk faktörlerinin meme kanseri üzerindeki etkinlikleri üzerindeki çalışmalarda henüz herkesin kabul ettiği çıkarımlara varılamamıştır.

(Brown ve ark., 2020; Dogan ve Toprak, 2014; Giordano, 2018; Kapoor ve ark., 2021; Momenimovahed ve Salehiniya, 2019; Parida ve Sharma, 2020).

Tüm bu kaynaklardan yararlanılarak meme kanseri risk faktörleri Tablo 1.2'de özetlenmiştir.

Tablo 1.2. Meme kanserinde önlenabilir, önlenemez ve yarı önlenabilir risk faktörleri

ÖNLENEBİLİR RİSKLER	ÖNLENEMEZ RİSKLER	YARI-ÖNLENEBİLİR RİSKLER	TARTIŞMALI RİSKLER
Doğum kontrol hapları	Cinsiyet (kadın olmak)	Menapozdan sonra kanda yüksek östrojen seviyesi(menopoz sonrası hormon takviyesi)	Kan grubu
Alkol tüketimi	BRCA 1/2 ve diğer bazı gen mutasyonları	Kanda yüksek miktarda androjen veya prolaktin seviyesi	Düşük yapmak veya kürtaj
Cep telefonu kullanım süreleri	Etnik köken (örneğin Afrikalı Amerikan olmak)	Kısa periyotta ya da hiç emzirme	İlk menarşın gözlendiği yaş
Evlilik, ilk hamilelik ve doğum yaşları	Aile hikayesinde meme kanseri bulunması	Erkeklerde jinekomasti ve testiküler anormallikler	Ovulasyonu uyarıcı ilaçlar
Ovulasyonu uyaran ilaç kullanımı	Kanser öyküsü olması	Meslek (gece çalışmak veya vardiyalı iş, mutaeşik kimyasallara ve radyasyona maruz kalmak)	Fazla kahve tüketimi
Fazla kahve tüketimi	İyi huylu meme tümörü	Uyku süresi ve kronik uykusuzluk	Cep telefonu kullanım süresi
Doğum ve kürtaj sayısı	Yaşlanmak	Çevre ya da yiyecekler aracılığı ile mutajenik kimyasallara (örneğin pestisitlere) maruz kalmak, hava kirliliği	Uyku süresi
Menapoza geç yaşta girmek	Yüksek kemik yoğunluğu	Sosyo-ekonomik faktörler (gelir, eğitim, vb.)	
Menapozdan sonra hareketsiz yaşam tarzı	Uzun boylu olmak	Günlük yaşamda stres düzeyi (örneğin: iş kaybı, yas, yakını kaybetme korkusu, boşanma, geçim sıkıntısı)	
İyonize radyasyona maruz kalma	Yüksek meme dokusu yoğunluğu	Diyabet	
Az ya da hiç meyve-sebze ve balık tüketimi	Kan grubu	Karaciğer hastalıkları	
Sigara içmek	İlk menarş gözlenme yaşının küçük olması		
Koltuk altı ter önleyici losyon kullanımı	Lobüler in situ karsinoma		
Obezite veya kötü diyet	Erkeklerde Klinefelter sendromu		
Menopozdan sonra fazla kilolu olmak			

1.3.3.1. Demografik Risk Faktörleri

Cinsiyet:

Meme kanseri genellikle kadınlarda, bunun yanında yaygın olmasa da erkeklerde de gözlenmektedir. Öyleki tanı konulan 100 meme kanseri vakasından 1'i erkek bireydir ve meme kanseri erkeklerde tüm kanserlerin % 1'inden azını temsil etmektedir. Bir erkek için yaşam boyu meme kanseri riski, bir kadın için olan 1:8'e kıyasla 1:1000 oranındadır. Buna karşın "Sürveyans, Epidemiyoloji ve Nihai Sonuçlar (SEER)"programından elde edilen veriler, yaşa göre düzeltilmiş meme kanseri insidansı 1975'te genel popülasyonda 100.000 erkek başına 0.85 vakadan 2011'de 100.000'de 1.43 vakaya yükselmiştir (Giordano, 2018).

Yaş:

Kadınlarda meme kanseri insidans oranı yaşla birlikte artmakta, ortalama menopoz yaşında (45-55) maksimum olmakta, sonrasında sabit kalmakta veya düşmektedir. Örneğin 2016'da meme kanserine bağlı ölümlerin % 99.3'ü 40 yaş üzerinde, % 71.2'si de 60 yaş üzeri kadınlarda gözlenmiştir (Sun ve ark., 2017). Ancak gençlerde riski daha düşük gözlenen meme kanseri söz konusu olduğunda genellikle daha agresiftir, lenf nodlarına metastaz oranları daha yüksektir ve sağ kalım oranları düşüktür (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019). Erkeklerde de meme kanseri yaşla ilişkili bir hastalıktır ve insidans oranları yaşla birlikte istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Ortalama tanı yaşı olan 67, erkekler için kadınlara göre yaklaşık 5 yaş daha büyüktür (Giordano, 2018).

Aile Hikayesi:

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık 1/4'ünde meme kanseri vakaları aile içerisinde sıkça gözlenmektedir. Örneğin anne veya kız kardeşinde meme kanseri görülen kadınlarda risk 1,75 kat; iki veya daha fazla birinci dereceden akrabasında meme kanseri görülen kadınlarda ise 2,5 kat ve üzerinde artmaktadır. Ayrıca babası veya erkek kardeşinde meme kanseri görülen kadınlarda da meme kanseri riski artmaktadır (Feng ve ark., 2018). Bunun yanında birinci derece akrabalarında yumurtalık ya da erken başlangıçlı prostat veya sarkoma görülen kadınların da meme kanseri riski artmaktadır (Laloo ve Evans, 2012). Ayrıca birinci dereceden akrabası olan erkeklerde meme kanseri riski iki katına çıkmaktadır (Giordano, 2018).

Etnik Köken:

Beyaz kadınların meme kanseri insidansı siyahi, Hispanik ve Asyalı kadınlardan biraz daha fazladır. Örneğin programından elde edilen verilere göre yaşa göre düzeltilmiş meme kanseri insidansı 100.000 kişide; beyaz kadınlar için 141, Afrika kökenli Amerikalılar için 122, Asyalı/Pasifik adalılar için 97, Hispanikler ve Amerikan Kızılderilileri/Alaska yerlileri için 58'dir. Buna karşın siyahi kadınlarda 45 yaşın altında nükleer östrojen reseptörü (ER) negatif teşhis edilen daha agresif, daha ileri evre meme kanseri gelişme olasılığı ve buna bağlı olarak meme kanseri mortalite oranları daha yüksektir (Chlebowski ve ark., 2005). Ayrıca siyahi erkekler meme kanseri açısından Hispanik olmayan beyaz erkeklere göre daha fazla risk altında görünmektedir (Giordano, 2018). Ayrıca kalıtsal ve ailesel meme kanserinde inaktivasyonu sıkça gözlenen BRCA geni mutasyonlarının Doğu Avrupa kökenli Yahudiler'de daha sık gözlemlendiği belirlenmiştir (Feng ve ark., 2018).

1.3.3.2. Genetik Risk Faktörleri

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda kalıtsal ve ailesel meme kanserinde BRCA1, BRCA2 ve TP53 % 40-85'lik yaşam boyu kanser risk oranlarıyla yüksek riskli genler; PALB1, BRIP, ATM ve CHEK2 dahil olmak üzere orta riskli genler (% 20-40 risk) ve büyük ölçüde genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yoluyla tanımlanan bir dizi düşük riskli genler tespit edilmiştir (Lalloo ve Evans, 2012).

BRCA1 ve BRCA2 :

Kalıtıl meme kanserlerinin yaklaşık % 20-25'i, tüm meme kanserlerinin ise % 5-10'u tümör baskılayıcı BRCA1/2 mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Kadınlarda ömür boyu kanser gelişimi riskinin BRCA1 gen mutasyonununa sahip bireylerde % 50-55, BRCA2 gen mutasyonuna sahip bireylerde ise % 45 olduğu gösterilmiştir (Feng ve ark., 2018). Ayrıca kadınlar ve erkeklerde meme kanseri için başlıca ortak genetik risk faktörü BRCA2 geni mutasyonları olarak bildirilmiştir. Ancak BRCA 2 mutasyonu kaynaklı erkeklerde ömür boyu meme kanseri riski yalnızca % 6.8'dir (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019). Otozomal-dominant olarak kalıtılan (BRCA1/2)'ye bağlı kalıtsal meme ve yumurtalık kanserlerinin insidansı 1:500 ila 1000 arasında değişirken, otozomal resesif olarak kalıtılan Ataksi-Telanjiektazi' nin insidansı 1:40.000 ila 1:100.000 arasında değişmektedir.

Bu bağlamda kalıtsal meme ve yumurtalık kanserinin HNPCC ile birlikte sık gözlenen kalıtsal kanser sendromları olduğu belirtilmiştir (Rahner ve Steinke, 2008).

Diğer Önemli Tümör Baskılayıcı Genler:

Tümör baskılayıcı proteinleri kodlayan genlerden en önemlilerinden olan TP53 meme kanserlerinin yaklaşık % 30'unda mutanttır. ATM mutasyonları özellikle 50 yaş altı kadınlarda meme kanseri riskini 5 ile 9 kat arttırmaktadır. E -kaderini kodlayan CDH1'in lobüler meme karsinomlarının % 85'inde inaktivasyonu söz konusudur. RB inaktivasyonu meme kanserlerinde % 25-35 oranında gözlenirken, PTEN inaktivasyonu da yaklaşık % 33 oranında belirlenmiştir (Sun ve ark., 2017). Bunun yanında PTEN genindeki % 80 oranında germ-hattı olarak bulunabilen ve otozomal dominant aktarılabilen bazı mutasyonlar Cowden hastalığı denilen; meme kanseri gelişim morbiditesi % 85 olan nadir ailesel kanser sendromuna sebep olmaktadır (Kimura ve ark., 2017). Ayrıca CHEK2 geni mutasyonlarının meme kanseri riskini yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir (Feng ve ark., 2018).

Önemli Onkogenler:

İnsan EGFR 2 (HER2) onkogeninin anlatımının meme kanserlerinin yaklaşık % 20'sinde artarak PI3K/Akt/mTOR1 sinyal yolağı üzerinden kanser kök hücrelerinin bölünmesini uyardığı belirlenmiştir. Ayrıca İnsan EGFR 1 (Her1) anlatımının da enflamatuvar meme kanseri olgularının % 30'undan fazlasında artarak PI3K, Ras-Raf-MAPK ve JNK yolakları üzerinden karsinogeneze yardım ettiği gözlenmiştir. Yüksek evreli, invaziv meme tümörlerinde MYC transkripsiyon faktörünün anlatımı artmıştır. Meme kanserinde mutasyonu % 5'ten daha az oranda gözlenen Ras GTPaz'ın anlatımı ise hem başlangıç evresindeki hem de ileri evre meme kanseri hücrelerinde artmıştır. Siklin D1 onkogeninin anlatımından artış ise meme kanserlerinin % 50 sinde gözlenmiştir (Feng ve ark., 2018; Sun ve ark., 2017).

1.3.3.3. Hormonal ya da Reprodüktif Risk Faktörleri

Meme kanserinde hormonal risk faktörleri doğum kontrol hapı kullanımı, menopoz sonrası hormon kullanımı ve ovülasyonu tetikleyici ilaçların kullanımınıdır. Öyleki eksojen östrojenler oral doğum kontrol hapları ya da menopoz süreci veya sonrasında hormon replasman terapisi ile vücuda alınmaktadır. Buna karşın östrojen hormonu ovülasyonu bastırıldığından meme kanseri risk faktörleri arasında halen tartışmalı olan ovülasyonu tetikleyici ilaçlar tarafından vücutta artırılması hedeflenmemektedir (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019). Özellikle 10 yıldan uzun doğum kontrol hapı alanlarda ve hormon replasman tedavisi görenlerde meme kanseri risklerinin arttığı, buna karşın hormon alımı kesildikten 2 yıl sonra meme kanseri

riskinin azaldığı belirlenmiştir (Sun ve ark., 2017).). Meme kanserinde kesinleşmiş ya da olası reproduktif risk faktörleri doğum sayısı ve emzirmenin az olması, ilk hamileliğin geç yaşta olması, menarş yaşının küçük olması, menopoza geç girmek, spontan düşükler ve kürtajdır (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019). Endojen veya eksojen östrojenlerin her ikisi de meme kanserinde bir risk faktörüdür. Bununla bağlantılı olarak reproduktif risk faktörlerinin meme kanseri gelişimini tetiklemesi ER varlığı veya yokluğu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir belirlenmiştir (Sun ve ark., 2017).

1.3.4. Meme Kanseri Patofizyolojisi

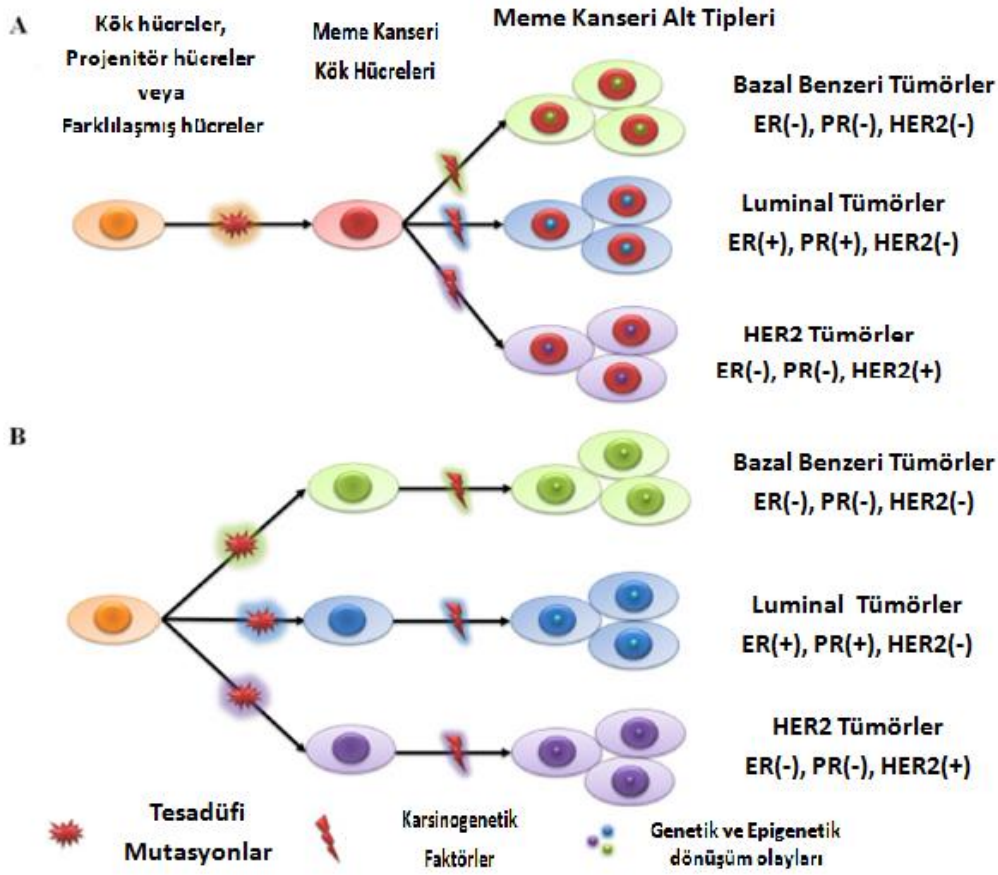
Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinde önemli olan, meme kanserlerinde anormal aktive olan sinyal yolları ve bileşenleri: ER, HER2, kanonikal Wnt/ β -katanin, siklin D1 ve CDK4/6, Notch sinyali, Sonik Hedgehog sinyali, meme tümörü kinaz (reseptör olmayan tirozin kinaz) ve PI3K/Akt/mTOR sinyalidir. Kanallar, lobüller veya aradaki doku gibi memenin farklı bölgelerinde ortaya çıkabileceğinden birçok meme kanseri türü vardır. Karsinomlar, lobülleri kaplayan hücrelerden ve süt yapımından sorumlu terminal kanallardan oluşan memenin epitelyal bileşeninden kaynaklanmaktadır ve meme kanseri tiplerinin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Buna karşın primer meme kanserlerinin % 1'inden azını oluşturan sarkomlar, memenin miyofibroblastları ve kan damarı hücrelerini içeren stromal bileşenlerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte meme kanserlerinde farklı bireyler arasındaki tümörlerde ve aynı bireydeki tek bir tümör içerisindeki hücrelerde tümör heterojenitesi söz konusudur. Aynı bireydeki tek bir tümördeki farklı heterojen tümör toplulukları etkili kişiselleştirilmiş tıp önünde büyük engel teşkil etmektedir (Akram ve ark., 2017; Feng ve ark., 2018).

1.3.4.1. Meme Kanserinin Hücresel Kökenleri

Meme kök hücreleri meme bezinin gelişiminde ve yenilenmesinde oldukça önemliken son yıllarda yapılan çalışmalarda tümörler içerisinde kanser kök hücreleri olarak tanımlanan yeni bir malignant hücre grubu keşfedilmiştir ve bu alt grubun az sayıdaki hücre popülasyonlarıyla immün sistemi baskılanmış farelerde yeni tümör oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. Kanser kök hücrelerinin sağlıklı dokudaki kök, projenitör veya farklılaşmış hücrelerden türeyebilen; kendini yenileme yeteneğine sahip, ayrıca kemoterapi ya da radyoterapi gibi geleneksel tedavilere dirençli hücre popülasyonları olduğu belirlenmiştir. Sonuçta kanser kök hücrelerinin karsinogenezin başlamasında, sonrasında immün sistemden kaçışta ve hastalığın yeniden

nüksetmesinde etkili hücre soyları olduğu düşünülmüştür. Bazal kök hücrelerden ziyade luminal projenitör hücrelerden kaynaklanması daha yüksek olduğu belirtilen kanser kök hücrelerinin kendini yenilemesinde ve invazyonunda Wnt, Hedgehog , PI3K/Akt ve HIF gibi sinyal yolları rol oynamaktadır (Feng ve ark., 2018; Sun ve ark., 2017).

Meme kanserinin nasıl başladığı ve karsinogenez sürecinin nasıl ilerlediğine dair iki hipotetik teori ortaya atılmıştır (Şekil 1.7). Buna göre ilk teori kanser kök hücresi teorisi (Şekil 1.7 A) ve diğer teori ise sitokastik teoridir (Şekil 1.7 B). Kanser kök hücre teorisine göre; tüm meme kanseri alt tipleri, aynı sağlıklı luminal veya duktal kök hücrelerden, duktal, alveolar ya da miyoepitelyal projenitör hücrelerden veya bunlardan farklılaşmış hücrelerden tesadüfi mutasyonlar aracılığı ile gelişen kanser kök hücrelerinden türemektedir. Bu hipoteze göre kanser kök hücreleri; genetik ve/veya epigenetik transformasyonlar aracılığı ile farklı meme kanseri alt tiplerini oluşturmaktadır (Şekil 1.7 A). Sitokastik teoriye göre ise her meme kanseri alt tipi; aynı kök, projenitör veya farklılaşmış hücrelerde biriken mutasyonlar ve epigenetik değişimler ile transforme olmaktadır. (Şekil 1.7 B). Buna karşın her iki hipotez de pek çok bilimsel çalışma ile desteklense de meme karsinogenezini tam olarak açıklamaya yetmemiştir (Feng ve ark., 2018; Sun ve ark., 2017).



Şekil 1.7. Meme kanserinin başlama ve ilerlemesinde kanser kök hücreleri ve sitokastik teoriler (Sun ve ark., 2017)'den alınmıştır.

1.3.4.2. Meme Kanserinde İnvazyon ve Metastaz

Tümör hücreleri ayrıca büyümelerini, sağkalımlarını ve bölünmelerini desteklemek için tümör mikroçevresini de dönüştürebilmektedir. Normal ve tümörle ilişkili mikroçevreler arasında aynı genlerde farklı DNA metilasyon durumları belirlenmiştir, bu da tümör mikroçevresindeki epigenetik modifikasyonların karsinogenezi teşvik ettiğini göstermektedir (Sun ve ark., 2017). Meme kanserinde tek bir tümör içerisindeki hücre popülasyonu heterojenliğine muhtemelen meme kanserlerinde epigenetik, genetik ve mikro-çevresel değişiklikler tarafından yönlendirilen fenotipik plastisite, kanser kök hücrelerinin klonal evrimi ve epitelyal-mezenkimal geçiş neden olmaktadır. Hastaların bir kısmında ilk tanıdan sonra yıl içerisinde, diğer bazılarında ise ilk tanıdan 10 yıldan fazla süre geçmesinin ardından uzak meme kanseri teşhisi konulan kadınların % 30'unda metastatik meme kanseri gözlenmesi beklenmektedir (Feng ve ark., 2018).

Tümör öncelikle kanal içinde yayılmakta, daha sonra ise kanal duvarını ve çevresini derinin önüne, pektoralis kasının arkasına ve göğüs duvarına doğru invaze etmektedir.

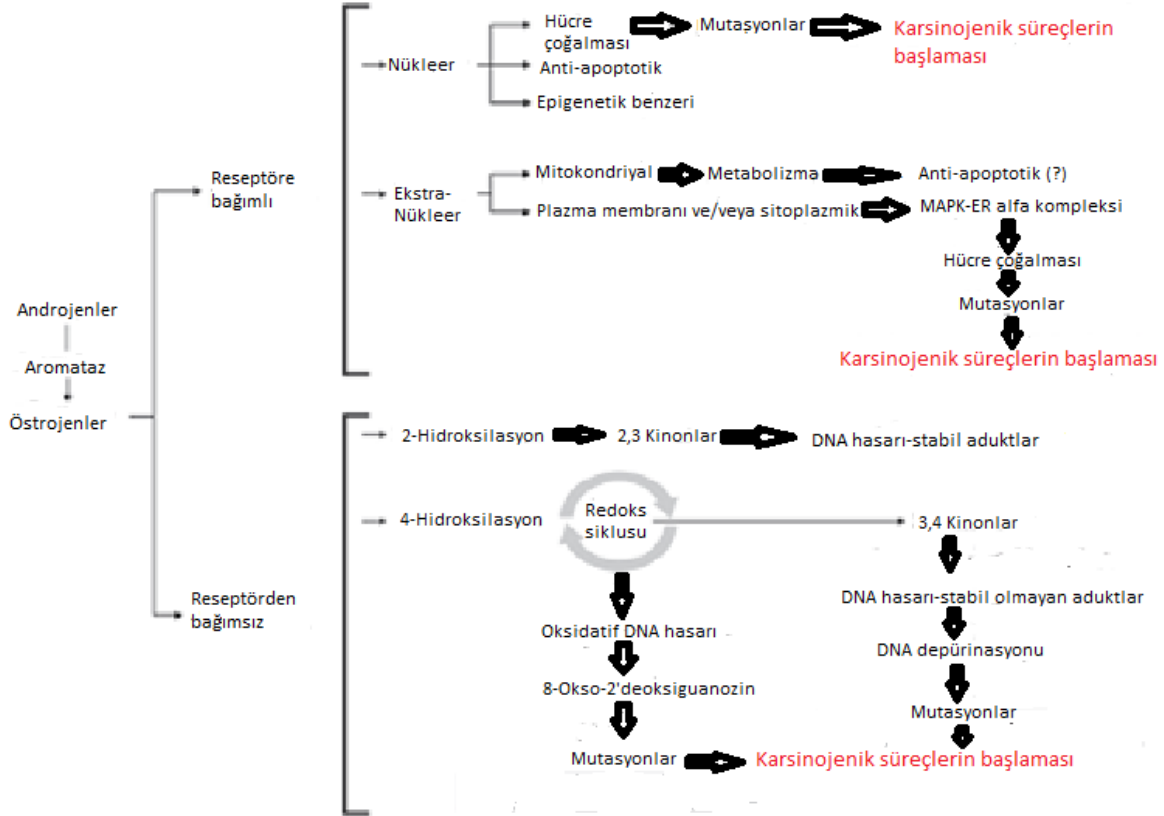
Meme kanseri metastazları aksiller lenf düğümlerine ve ayrıca lenfatik kanallardan kan damarlarına invazyona kadar gelişebilir ve akciğerlere, kemiklere, karaciğere, beyine, plevra zarına ve adrenallere yayılabilmektedir. Meme kanserlerinde oransal olarak en fazla kemiklere metastaz gözlenmiştir (Massardi, 2021).

1.3.4.3. Östrojenin Karsinogenezdeki Rolü

Meme kanseri risk faktörleri içerisinde en önemli grup hormonal risk faktörleri, meme kanseri gelişimine en fazla katkıda bulunan hormon da östrojendir. Öyleki tanı koyulan meme kanseri vakalarını yaklaşık % 95'i hormona bağımlıdır (ERGÜÇ ve ORHAN, 2019). Östrojenin meme kanseri gelişimine katkısı reseptör bağımlı veya reseptör bağımsız şekilde östrojenin metabolizması ile oluşan mutajenler aracılığı ile olabilmektedir. Östrojenin reseptöre bağımlı karsinojenik etkisi temelde hücre çoğalmasını ve buna bağlı olarak mutasyonları tetiklemesi aracılığı ile olmaktadır. Ayrıca anti-apoptotik proteinlerin anlatımlarının tetiklenmesi veya apoptozu teşvik eden proteinlerin anlatımlarının baskılandığı epigenetik benzeri modifikasyonlar ile de karsinogeneze takviyede bulunmaktadır. (Şekil 1.8). (Massardi, 2021).

Östrojen reseptörleri: nükleer östrojen reseptörleri ER α ve ER β ile meme kanseri hücrelerinin % 50'sinde ER anlatımı durumundan bağımsız olarak sentezlenebilen plazma membranı üzerindeki G-protein bağlantılı östrojen reseptörü (GPER1)'dür. Meme kanseri hücrelerinde ER α anlatımı yüksek iken ER β anlatımları düşük olarak gözlenmiştir. İnsan meme kanserlerinde klinik olarak anlamlı düzeyde ER α anlatımı % 80 oranında görülürken, progesteron reseptörü (PR) anlatımı % 55 civarındadır. Östrojen yokluğunda ısı şok proteinleri tarafından inaktif tutulan nükleer hormon reseptörleri östrojen varlığında homodimer ya da heterodimerler oluşturarak aktive olmakta ve DNA üzerindeki östrojen cevap elementi denilen bölgeye bağlanarak belirli genlerin anlatımlarını düzenlemektedirler. Bu nükleer hormon reseptörleri bazen nükleus dışında plazma membranı altında östrojenle bağlanarak MAPK, AKT, Ras, İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü ve EGFR gibi sinyal kompleksleri ile etkileşerek östrojen sinyali ile büyüme faktörü sinyallerini entegre etmektedirler. Bu birlikteliklerde ER α genellikle hücre sağkalımı, ER β ise apoptoz ile ilişkili genleri aktive etmektedir. ER α ve ER β ayrıca mitokondride de bulunarak doğrudan veya dolaylı olarak magentaz süperoksit dismutaz enziminin aktivasyonu yoluyla apoptozun inhibisyonunu tetiklemektedirler (Şekil 1.8). Östrojenin ayrıca GPER1 aracılığı ile EGFR, MAPK, PI3K ve NF- κ B sinyal yollarını aktive ederek özellikle ER negatif

olan tümörlerde IL-8 salgılanması aracılığı ile meme kanseri metastazını aktive ettiği gösterilmiştir. Bunun yanında östrojenler reseptörden bağımsız olarak oksidatif metabolizmaları ile oluşan: 2,3 veya 3,4 katekol oksitlendiğinde 2,3 ya da 3,4 kinonu oluşturarak; 4-hidroksi katekol ise redoks döngülü o-kinonu oluşturarak; DNA'da tek zincir kırılmaları, baz oksidasyonu, DNA apürinasyonu ve DNA aduktlarının oluşumu gibi oksidatif hasarlara neden olmaktadır. (Şekil 2.7). (Massardi, 2021; Yager ve Chen, 2007; Yue ve ark., 2010).



Şekil 1.8. Östrojenin meme kanseri gelişiminde reseptöre bağımlı ve reseptör bağımsız rolleri (Massardi, 2021)

1.3.5. Meme Kanserinin Alt Tipleri

Genellikle karsinom olan meme kanserleri patolojik özellikler ve invazivlik derecesine bağlı olarak invaziv olmayan (in situ), invaziv ve metastatik olmak üzere 3 temel alt gruba ayrılmaktadır. Meme kanserleri çoğunlukla invaziv duktal karsinom ve non-invaziv duktal karsinom in situ içeren adenokarsinomlardır. İnvaziv duktal karsinom, teşhis edilen tüm vakaların % 75-80'ini oluşturan en yaygın meme kanseri alt tipidir (Jagadish ve ark., 2016). İnvaziv lobüler karsinom ise % 10-15'lik oranıyla meme kanserinin ikinci en yaygın türüdür. İnvaziv duktal karsinom genellikle 50'li yaşlarda ortaya çıkarken invaziv lobüler form ise 60'lı yaşların başında gözlenmektedir. Bu iki

yaygın görülen formun dışında klinik ortamda nadir birkaç meme kanseri tipi gözlenmektedir. Nadir meme kanseri tipleri: tüm meme kanserleri içerisinde % 1- % 5 civarında görülen invaziv enflamatuvar meme kanseri ile daha az sıklıkta görülen; erkek, çocuk ve ergenlerde meme kanseri; memede Paget hastalığı, papiller karsinoma, filloid tümörler, ve memede anjiyosarkomadır. Meme kanserinin, tümörlerin gen anlatım profillerine göre moleküler/içsel sınıflandırılması ise tanımlanan 5 ana tipi içermektedir (Dai ve ark., 2015; Feng ve ark., 2018).

1.3.5.1. Luminal A Tip

Tüm meme kanserlerinin % 40'ını içeren, en sık gözlenen bu alt tipte tipte: ER anlatımı pozitif (ER+), PR anlatımı pozitif veya negatif (PR+ veya PR-), HER2 anlatımı negatif (HER2-) ve hücre çoğalması belirteci olarak kullanılan nükleer Ki67 seviyesi ise düşüktür. Düşük dereceli (evre 1/2) ve yavaş bölünen bu alt tipteki tümöre sahip hastaların mortalite oranı düşüktür (Dai ve ark., 2015; Feng ve ark., 2018).

1.3.5.2. Luminal B Tip

Evre 2/3 meme kanserini temsil eden ve hasta sağ kalım oranları Luminal A'dan düşük olan bu tip tüm meme kanserleri içerisinde yaklaşık % 10-20'lik bir yer kaplamaktadır. Bu tip ER+ olmakla birlikte PR ya da HER2 anlatımları vardır veya yoktur, bununla birlikte Ki67 seviyeleri yüksektir. HER2+ olan alt tipi daha kötü bir hastalık seyri göstermektedir (Dai ve ark., 2015; Feng ve ark., 2018).

1.3.5.3. HER2 Overeksprese Tip

HER2+, ER-, PR- meme kanseri, tüm meme kanserlerinin % 5-15'ini oluşturmaktadır. Bununla birlikte klinik olarak HER2 overeksprese alt tip ile HER2+ tümör aynı anlama gelmemektedir. Öyleki HER2+hücrelerin % 50'si HER2 overeksprese iken geri kalanı ise çoğunlukla luminal alt tiptir (Feng ve ark., 2018). HER2 gen amplifikasyonu/HER2 aşırı ekspresyonu ve yaygın p53 mutasyonları sonucunda agresif hücre çoğalması, anjiyogenez, metastaz ve apoptozdan kaçış nedeniyle meme kanseri evre2/3'ü temsil HER2 overeksprese tipte, luminal alt tiplere göre sağ kalım oranları daha düşüktür (Eyermaun ve ark., 2021).

1.3.5.4. Normal-Benzeri Tip

Nadiren görülen bu alt tip; ER, PR ve HER2 genotipleri açısından Luminal A tipine eşdeğerdir ancak gen anlatım profilleri açısından Luminal A tipinden farklılık göstermektedir. Ki67 seviyesi de Luminal A tipi gibi düşük olan ve evre 1/2/3 meme

kanserini temsil edebilen bu alt tipin hasta sağkalım oranları Luminal A tipinden düşüktür (Dai ve ark., 2015).

1.3.5.5. Bazal-Benzeri Tip

ER-, PR-, HER2-, bazal belirteç + immünohistokimyasal profili ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak da bilinen bu alt tip; evre 3 meme kanserini temsil etmekte ve tüm meme kanseri vakalarının % 15-20'sini oluşturmaktadır. BRCA1 gen mutasyonu olan kadınlarda ve siyahi kadınlar arasında daha yaygın olan, ayrıca 40 yaşın altındaki kadınlarda daha sık gelişebilen bu alt tip diğer meme kanseri tiplerinden daha agresif davranır ve tedavilere karşı daha dirençlidir. Üçlü negatif tipte en yaygın histoloji invaziv duktal karsinomdur, ancak nadir bir histolojik alt tip olan medüller karsinom da genellikle üçlü negatiftir. Yapılan son çalışmalar, epigenetik düzenlemelerin ve kodlamayan RNA'ların özellikle üçlü negatif meme kanserinin heterojenliğine ve metastatik yönlerine katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Akram ve ark., 2017; Dai ve ark., 2015; Feng ve ark., 2018).

1.3.6. Meme Kanserinin Evreleri

Meme kanseri evrelendirmesi tümörün boyutuna, türüne ve kanserli hücrelerinin meme dokusuna ne derece nüfus ettiğine göre yapılmaktadır. Bununla birlikte Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC) Tümör, Nod ve Metastaz (TNM) meme kanseri evreleme sistemine göre meme kanserinin klinik evrelendirilmesi şu şekildedir:

Evre 0:

Malignant hücreler sağlıklı meme dokusu hücreleri ile birlikte karsinogenezin kökenlendiği meme bölgesi (kapsül) içerisinde (in situ) bulunmaktadır. Malignant hücrelerin çevre dokulara invazyon yaptığına dair herhangi bir gösterge olmayan bu aşamaya invaziv olmayan aşama denilebilir. Bu evredeki bir tümöre örnek olarak DCIS verilebilir.

Evre 1:

İnvaziv meme karsinomu olarak da tanımlanan bu evrede mikroskobik invazyon mümkündür. Bu evre kendi içerisinde 1A ve 1B olarak iki kısma ayrılmaktadır.

1A kategorisinde 2 cm'den küçük veya eşit büyüklükte primer invaziv ancak lenf nodlarına sıçramamış tümörler tanımlanmaktadır. 1B kategorisi ise 2 cm'den küçük

veya eşit primer tümörleri olan ya da olmayan ancak boyutu 0,2 mm'den büyük 2 mm'den küçük lenf nodu mikrometastazları içeren yapılar tanımlanmaktadır.

Evre 2:

Kendi içerisinde 2A ve 2B olmak üzere iki kategoriye sahiptir. Evre 2A belirtilen üç şekilde olabilir: birinci durumda tümör aksiller lenf düğümlerinde veya sentinel lenf düğümlerinde bulunur, ancak memede bulunmaz; ikinci durumda 2 cm veya daha küçük olan tümör lenf bezlerine yayılmıştır üçüncü durumda ise 2 cm'den büyük ancak 5 cm'den küçük yada eşit boyutta tümör vardır ancak lenf nodu metastazı yoktur. Evre 2B'de ise: seviye 1/2 lenf nodu metastazına sahip 2 cm'den büyük ancak 5 cm'den küçük veya eşit boyutta tümör vardır ya da 5 cm'den büyük ancak lenf noduna metastaz olmamış tümörler söz konusudur.

Evre 3:

Kendi içerisinde üç kategoriye ayrılmaktadır. Evre 3A kendi içerisinde farklı tipleri olmakla birlikte daha çok memede tümör bulunmayan ancak aksiller ya da sentinel lenf nodunda bulunabilen duruma göre herhangi bir boyutta veya 5 cm'den büyük olabilen tümörleri temsil etmektedir. Evre 3B: herhangi bir boyutta göğüs duvarı veya deri invazyonu olan, meme derisinde kırmızılılaşma, ısınma ve şişme yada ülserle sebep olan, fazla sayıda aksiller ya da sentinel lenf noduna metastaz etmiş olan tümör içermektedir. 3C evresi ise 3B'den daha fazla sayıda aksiller ya da sentinel lenf düğümlerine ve hatta köprücük kemiği çevresindeki lenf düğümlerine metastaz edebilen değişken boyuttaki tümörleri temsil etmektedir.

Evre 4:

İleri evre metastatik kanser aşamasını temsil eden bu evrede tümör akciğerler, kemikler, karaciğer, beyin gibi pek çok organa yayılmıştır (Akram ve ark., 2017; Feng ve ark., 2018).

1.3.7. Meme Kanseri Tanısı ve Önlenmesi

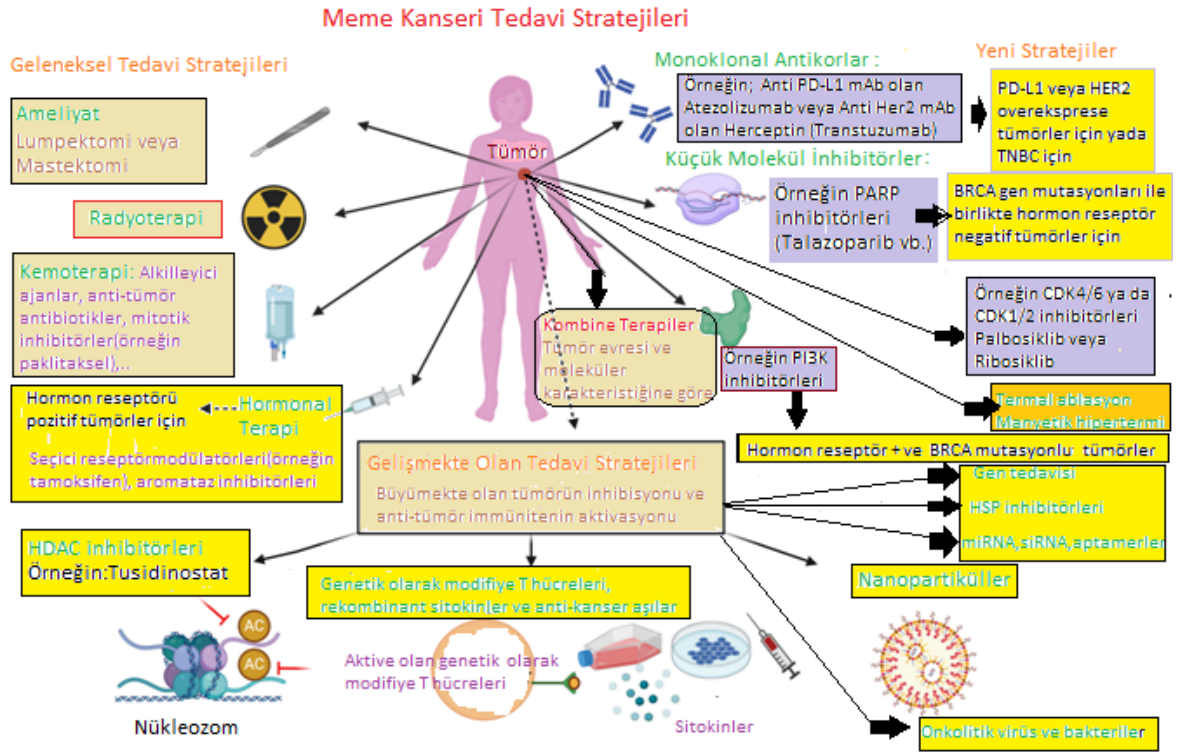
Meme kanseri tanısında elle muayenenin faydası tartışmalıdır, çünkü ölüm oranlarındaki azalış ile bu muayene şekli arasında bir ilişki bulunamamıştır. Hastalığın teşhisi ve çeşitlerinin tespitinde ultrason, nükleer tıpta tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPET) ve pozitron emisyon tomografisi (PET/CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve dijital mamografi gibi fiziksel yöntemlerin dışında; kandan sıvı biyopsisi veya meme ya da lenf nodu biyopsisini takip eden immünohistokimya gibi moleküler biyoloji yöntemleri ile Ca 15-3, Ca 27-29, ER, PR ve HER2 gibi tümör

belirteçleri incelenerek kanserin alt tipi ve evresi belirlenebilmektedir (Akram ve ark., 2017).

Meme kanserine karşı koruyucu önlemler: elle memenin muayenesi, 40 yaşından sonra düzenli olarak mamografi yaptırmak, aile hikayesinde meme ve yumurtalık kanseri varsa genetik test yaptırmak, mümkünse bebek emzirmek ve kürtaj yaptırmamak, iyonize radyasyondan, eksojen hormon takviyesinden ayrıca içki ve alkolden kaçınmak, fazla fiziksel aktivite yapmak, menopoza sonrası D vitamini takviyesi almak, sağlıklı bir diyet uygulamak, antioksidan kullanımı, normal kiloyu korumak ve kaliteli uyku için çabalamaktır. Ayrıca mastektomi ve/veya yumurtalıkların alınması (ooforektomi), her iki memede de kanser geliştirme riskini önemli ölçüde artıran zararlı mutasyonlara sahip kadınlar için koruyucu bir durumdur. İlerleyen dönemlerde kanser aşıları (örneğin HER2 aşısı) ve kişiselleştirilmiş tıbbın gelişmesi, meme kanserine karşı koruyucu önlemler alınmasına yardım edecektir (Sauter, 2018).

1.4. Meme Kanseri Tedavisinde Geleneksel ve Yenilikçi Yaklaşımlar

Antik Mısır'da ortaya çıkan meme kanserinin bilinen en eski tanımlarından bu yana, insanlar kendilerini meme kanserini ortadan kaldırma yollarını bulmaya adanmışlardır (Feng ve ark., 2018). Meme kanseri tedavi stratejileri tümörün moleküler karakteristiği ve evresine ya da hastanın tedavilere toleransına bağlı olarak; cerrahi, radyoterapi ile hormonal tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik stratejiler gibi sistemik tedavileri içermektedir. Geleneksel tedaviler başlıca kemoterapi, radyoterapi ve bazı cerrahi yöntemleri içermektedir. Bunun dışında hormon reseptörü pozitif tümörler için hormon tedavisi; bununla birlikte mAb'lar, küçük molekül inhibitörleri, termal ablasyon ve manyetik hipertermi ve kombine tedaviler gibi yenilikçi tedaviler; ayrıca epigenetik düzenleyiciler, RNA müdahalesi teknikleri, gen tedavisi ve genetik mühendisliği yöntemleri ile immün sistemin tümöre karşı yönlendirilmesi, onkolitik virüsler ya da bakterilerin kullanımı ve nanopartiküllerin kullanımı gibi gelişmekte olan yöntemlerde meme kanseri için kullanılan veya geliştirilen tedavi stratejileridir (Şekil 1.9).



Şekil 19. Meme kanserinde geleneksel ve yenilikçi tedavi yaklaşımları (<https://www.hbku.edu.qa/>: Katar Biyomedikal Araştırma Enstitüsü resmi sayfasından alınan figür üzerinden uyarlanmıştır.)

1.4.1. Meme Kanseri Tedavisinde Geleneksel Yaklaşımlar

1.4.1.1. Cerrahi Yöntemler

Cerrahi yöntemler eskiden kullanılan total mastektomi gibi memenin tamamının alınması ve sonradan geliştirilen memedeki kanserli bölgenin az sayıdaki sağlıklı hücre ile birlikte alınmasına ise lumpektomi denilmektedir. Her iki durumda da metastaz söz konusu ise meme dokusu ile birlikte çevresindeki lenf düğümleri de alınabilmektedir. Yeniden eksizyon tedavisi ise kanserli doku tamamıyla alınamamışsa cerrahi sınırların korunması mümkünse lumpektomi veya gerekirse total mastektomi yapılmaktadır. Bunun dışında oofektominin meme kanserinde alternatif bir adjuvan tedavi yöntemi olduğu özellikle BRCA 1/2 geni mutasyonu taşıyan bireylerde sağkalımı artırması ile gösterilmiştir. Oofektomi ayrıca radyasyon veya luteinize hormon salgılatıcı hormon analoglarının kullanımı ile de gerçekleştirilebilmektedir (Akram ve ark., 2017; Harbeck ve Gnant, 2017; Luveta ve ark., 2020).

1.4.1.2. Radyoterapi

Yüksek enerjili iyonize radyasyonun kanser hücrelerini öldürmek için tümörlü bölgeye yönlendirilmesi prensibine dayanan bu yöntem son yıllarda oldukça geliştirilerek hedef dışı veya bystander etkisi denilen sağlıklı dokularında hasar görmesinin önüne geçilmeye başlanmıştır. Öyleki brakiterapi veya hızlandırılmış kısmi meme ışınlanması denilen yöntem ile tüm meme ışınlamasının önüne geçilmekte ve ayrıca gereken radyoterapi seansı sayısı da azaltılabilmektedir. Son yıllarda total mastektomi gereksinimi azaltmak için özellikle meme kanserinin erken evrelerinde lumpektomi ve radyoterapinin birlikte kullanılması önemli bir strateji haline gelmiştir. Bu stratejide lumpektomi sonrasında geride kalan kanserli hücreler radyoterapi ile temizlenmektedir. Ancak tüm bu gelişmelere karşın radyoterapi halen ikincil kanser geliştirme riskini artırması nedeni ile tartışılmaktadır (Akram ve ark., 2017; Harbeck ve Gnant, 2017).

1.4.1.3. Kemoterapi ve Meme Kanserinde Kullanılan Antineoplastik Ajanlar

Çoğunlukla sitotoksik, bazen sitostatik ve nadiren de hücrel farklılaşmayı teşvik eden etkilere sahip bazı kimyasal ajanların; tümörün cerrahi operasyon öncesi küçültülmesi, cerrahi ameliyat ya da radyoterapi sonrasında destekleyici olarak veya cerrahi müdahale olmaksızın tek başına bu ajanların etkisi ile tümörün kontrolü amacı ile farklı stratejilerdeki kullanımlarına kemoterapi denilmektedir. Kemoterapide kullanılan kimyasal ajanlar; kemoterapötik, antineoplastik veya anti-tümör ajanlar olarak adlandırılmaktadır. Meme dokusuna mastektomi/lumpektomi ya da radyoterapi uygulanmadan önce tümörü küçültmek için kullanılan kemoterapötiklere neoadjuvan; cerrahi işlem sonrası kullanılan tedavide veya radyoterapiye eşlik eden (kemoradyoterapi) antineoplastiklere ise adjuvan denilmektedir. İndüksiyon kemoterapide ise temel tedavi kemoterapidir, yani tedaviye başlanırken cerrahi işlem ya da radyoterapi planlanmamaktadır (Goldner ve ark., 2021; Harbeck ve Gnant, 2017).

Kemoterapötik olarak kullanılan 100'den fazla ajan bulunmaktadır. Bu ajanlar genellikle bitki veya mantarlardan elde edilen organik bileşikler ile bazı inorganik konjugatlarıdır. Kemoterapötik ajanlar etki mekanizmalarına göre ve bileşenlerine göre; doksorubisin gibi antrasiklin yapıdaki antitümör antibiyotikler, antimetabolitler, siklofosamid gibi DNA alkilleyici ajanlar, yine DNA'da hasar oluşturan platin bazı ajanlar, bitki alkaloidlerinden paklitasel (taksol) ve vinblastin gibi anti-mitotik ajanlar ve DNA topoizomeraz inhibitörleri olarak sınıflandırılabilirler (Baudino, 2015).

Meme kanseri tedavisinde kullanılan başlıca antineoplastikler: dosetaksel, paklitaksel, sisplatin, karboplatin ve lipozomal doksorubisin (Doxil)'dir. Bununla birlikte metastatik meme kanseri ve ikincil kanser meme kanseri gelişimi durumunda kombine tedaviler daha çok tercih edilmektedir (Akram ve ark., 2017).

1.4.1.4. Meme Kanserinde Endokrin Terapiler

Hormon reseptörü pozitif olan tümörlerde kullanılabilen bu strateji için meme kanserinde başlıca örnekler seçici ER modülatörleri (SERM)'nin ve aromataz inhibitörlerinin kullanımınıdır. ER α ve PR pozitif meme kanserlerinde hormon tedavisi seçeneği oldukça önemlidir. SERM'ler özellikle meme kanseri dokusunda östrojen antagonisti etkiye sahiptir, bununla birlikte bazıları rahim gibi diğer bölgelerde östrojen gibi davranmaktadır. Ancak Faslodex gibi bazı ilaçlar tamamen anti östrojenik etkiye sahiptir ve meme dokularında anti neoplastik aktiviteler göstermekle birlikte rahim ve kemikler üzerinde osteoporoz gibi olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. SERM grubundaki tamoksifen ve raloksifen içerisinden tamoksifen 1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ER pozitif meme kanserinde adjuvan terapi için onaylanmıştır. Buna karşın östrojen sentez yolağının son reaksiyonunu katalize eden aromatazı hedefleyen inhibitörlerin kullanımının Tamoksifen kullanımına göre meme kanseri riskini daha etkin bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Öyleki letrozol, eksamastan ve anastrozol dahil üçüncü nesil aromataz inhibitörleri günümüzde kullanılmaktadır (Akram ve ark., 2017; Bhardwaj ve ark., 2019; Fleisher ve ark., 2017; Goldner ve ark., 2021).

1.4.2. Meme Kanseri Tedavisinde Yenilikçi ve Gelişmekte Olan Statejiler

Meme kanserinde hedefe yenilikçi ve gelişmekte olan teknolojilerde başlıca amaçlardan birisi; kanser hücrelerine yönelik olmayan geleneksel tedavilerde aynı zamanda sağlıklı hücrelerinde hedef alınması ile gelişen toksisiteyi önlemektir. Ayrıca malignan hücrede karsinogenezin tetiklenmesi ve ayrıca invazyon ile metastazın gelişimi aşamalarında tümörü destekleyici durumlara yol açan belirli hücrel bileşenlerin bu aktivitelerini; gen anlatımının DNA seviyesinde düzenlenmesi, transkripsiyon, translasyon, protein aktivitesi veya metabolit aktivitesi gibi belirli seviyelerde engellemek ya da aynı seviyelerde hücre devrinin kontrolü, hücre ölümü gibi anti-tümör aktivitelerden sorumlu bileşenleri aktive ederek hedefe yönelik, daha etkili ve kalıcı sonuçlar elde edilmek istenmektedir. Bu bağlamda genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik alanlardaki çalışmalar ile meme

kanseri alt tiplerindeki spesifik hedefler belirlenerek bu hedeflere yönelik stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejiler ve belli başlı amaçları şu şekildedir: gen terapisi ile onkogenlerin inhibisyonu veya tümör baskılayıcıların aktivasyonu; histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ile apoptotik ve tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu; RNA müdahalesi sağlanarak belirli tümörojenik proteinlerin sentezinin engellenmesi; onkolitik patojenleri yardımı ile malignant hücrelerin toksisite aracılı ölümü veya lizisi; genetik mühendisliği yöntemleri ile T hücrelerinin rekombinant sitokinler yardımı ile immün sistemden kaçan tümöre yönlendirilmesi veya tümör antijenlerinin belirlenmesi ile geliştirilen aşilar ile kansere karşı ön koruma ve tekrarlamaların önüne geçilmesi; monoklonal antikoların, küçük molekül inhibitörlerinin veya aptamer teknolojilerinin kullanımı ile doğrudan hedef bazı reseptörlerin, immün kontrol noktası bileşenlerinin, hücre devri düzenleyicilerinin enzimler ve ısı şok protein (HSP)'lerinin inhibisyonu; nanobiyoteknoloji ile geliştirilen ilaç ve taşıyıcı sistemler ile kanser hücrelerinin ya da spesifik bileşenlerin hedeflenmesi; termal ablasyon ve manyetik hipertermi ile ise geleneksel tedavilerinin etkinliklerinin artırılması düşünülmektedir. Bunun yanında kombine tedaviler denilen geleneksel tedaviler ile yenilikçi stratejileri bir araya getiren ana tedavi, neoadjuvan ve adjuvan terapileri bir araya getiren stratejiler günümüzde sıkça uygulanmaktadır (Damaskos ve ark., 2017; Fleisher ve ark., 2017; Foulon ve ark., 2020; Garcia-Aranda ve Redondo, 2019; Lin ve ark., 2010; Pucci ve ark., 2019).

FDA onaylı olarak meme kanserinde kullanılan mAb'lara örnek olarak herseptin; küçük molekül inhibitörlere SERM grubu tamoksifen ve HER1/2'nin tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden labatinib örnek verilebilir (Baudino, 2015). Bununla birlikte meme kanserinde tümörün moleküler tipi ve evresine göre farklı kemoterapötikler, radyoterapi, hormon tedavisi ve yenilikçi yaklaşımlar bir arada kullanılabilir. İlaçların ikili veya üçlü kemoterapötik kombinasyonların meme kanserinde 10'dan fazla olan örneklerinden birisi; DNA sentezini inhibe eden gemsitabin ve mitotik inhibitör paklitakselin kombinasyonudur. Meme kanserinde ilaç taşıyıcı nanoteknoloji sistemleri ise kuantum noktaları, karbon nanotüpler, nanopartiküller, polimerik miseller, lipozomlar ve dendrimerlerdir (Dhankhar ve ark., 2010; Fisusi ve Akala, 2019).

1.5. Antrasiklin Türevi Antibiyotiklerin Meme Kanseri Tedavisindeki Önemi

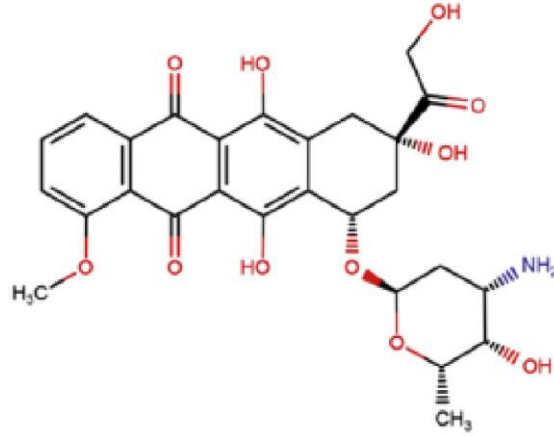
Antrasiklin türevi antibiyotiklerin; anti metabolit, DNA alkilleyici ya da antimitotik ajanlar olan siklofosamid, metotreksat, fluorourasil veya dokataksel kullanımlarına göre

mortalite oranlarını düşürmede önemli bir avantajla meme kanserinde adjuvan tedavisi için standart bir yaklaşım olduğu polikemoterapi çalışmaları ile belirlenmiştir (Aniogo ve ark., 2017).

1.5.1. Doksorubisin'in Moleküler Yapısı ve Antineoplastik Etkisi

1950'li yıllarda başlayan toprak bakterilerinden etkili bir antikanser ajan elde edilmesi amaçlanan çalışmalar ile *Streptomyces peucetius* bakterisindeki kırmızı pigmentlerden izole edilen bileşenlerin antikanser ajan olarak kullanımı düşünülmüştür ancak daunorubisinin adı verilen bu yeni bileşenin 1967'de ölümcül kardiyak toksisite üretebileceği anlaşılmıştır. Bunun üzerine gram pozitif bakteri grubu olan *Streptomyces spp.*'de genetik modifikasyonlar yapılarak daha sonra doksorubisin (Şekil 1.10) olarak adlandırılan Adriamisin adlı bir bileşik üretilmiştir. Bu yeni bileşen yüksek bir terapötik indekse sahip olmakla birlikte kalpte, kemik iliğinde ve böbreklerde akut veya kronik toksik etkileri belirlenmiştir. 2000'den fazla analogu üretilen doksorubisinin yan etkilerini azaltmak amacıyla geliştirilen çoğu formülasyon içerisinde doksorubisin hidroklorürün lipozomal enjeksiyonu, klinik onay alan ilk lipozomal kapsüllü antineoplastik ajandır (Rivankar, 2014).

Doksorubisin; daunorubisin, idarubisin, epirubisin ve mitoksantron gibi diğer antrasiklin türevi antibiyotikler ile benzer yapıdadır. Bu genel yapıda: şeker grubu bağlı olmayan üç üyeli bir antrasen halkasına sahip mitoksantron hariç, aglikon veya şeker parçasına bağlı dört üyeli bir antrasen halka kompleksi bulunmaktadır. Bununla birlikte doksorubisin, daunorubisinin hidroksillenmiş analogudur (Şekil 1.10). Amfoterik yapısı gereği hem plazma proteinlerine hem de plazma membranlarına bağlanabilen ve hücreye pasif difüzyon ile giren ilacın endozom, lizozom ve nukleus gibi asidik organellere afinitesi vardır. İlacın kolay nüfuz etme özelliği meme, lösemi ya da lenfoma gibi çok çeşitli kanserlerin tedavisinde çok yönlü kullanımına izin vermektedir (Alshammari ve ark., 2017; Aniogo ve ark., 2017).



Şekil 1.10. Doksorubisinin moleküler yapısı (Alshammari ve ark., 2017)' dan alınmıştır.

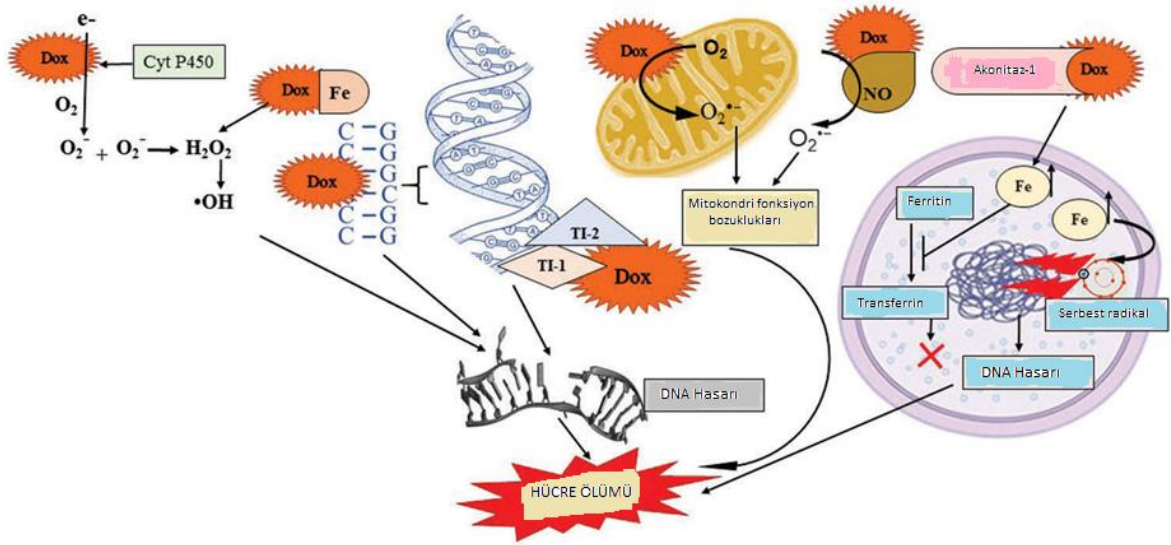
1.5.2. Doksorubisin Teşvikli Hücre Ölümünün Mekanizması

Yapılan çeşitli çalışmalarda en önemli etkisini hücre döngüsünün replikasyon fazı (S Fazı) üzerinde gerçekleştirdiği gösterilen doksorubisin (Dox)'in hücre ölümü üzerindeki tetikleyici etkisi farklı mekanizmalar ile belirlenmektedir. Bu mekanizmalar Dox'un: çift sarmal yapıdaki DNA'da baz çiftleri arasında girerek replikasyon ve gen anlatımını engellemesi, DNA replikasyonunda oluşan DNA üst dönümlerini çözen enzim olan DNA topoizomeraz 2 (TI-2) enzimini inhibe etmesi, kalsiyum homeostazını bozması ve reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek plazma membranı lipidlerinin peroksidasyonuna yol açmasıdır (Şekil 1.11). (Alshammari ve ark., 2017); Rivankar (2014).

Dox, guanin bazı ile hidrojen bağı yapması nedeniyle DNA üzerinde daha çok guanin-sitozin zengin bölgelere girmektedir. Ayrıca Dox oksijen molekülü (O₂) varlığında; sitokrom P450 (Cyt P450) redüktaz enzimi tarafından katalize edilen elektron indirgeme reaksiyonunu etkileyerek ve nitrik oksit sentaz (NO) enzimi ile etkileşime girerek mitokondri ya da sitoplazmada ROS çeşitlerinden süperoksit anyonu (O₂⁻) ve radikali üretimini tetiklemektedir. Bu iki oksijen türevi mitokondri işlev bozukluklarına neden olması dışında birbiri ile tepkimeye girerek hidrojen peroksit (H₂O₂) üretmektedir. Dox'un demir (Fe) varlığında H₂O₂'nin DNA için çok zararlı olan hidroksil radikali (·OH) üretimini teşvik ederek ve aynı zamanda mitokondride oluşturduğu hasarlar sonucunda sitozole salınan diğer ROS bileşenleri ile DNA'ya zarar vermesi söz konusudur. Fenton reaksiyonları ile ROS oluşumunu tetikleyen Fe'nin hücredeki ve ekstrasellüler alandaki taşıyıcı ve depo proteinleri olan ferritin ve transferrinin sentezi, bu proteinleri kodlayan mRNA'lar üzerinde bulunan demire

duyarlı bağlanma elementi ile hücre içi Fe konsantrasyonuna bağlı olarak akonitaz-1 enzimi tarafından düzenlenmektedir. Öyleki normal şartlarda sitrik asit döngüsü enzimi olan Akonitaz enziminin bu formu hücre içi Fe konsantrasyonu düşükken ferritin ve transferrin mRNA'larındaki demire duyarlı bağlanma elementine bağlanarak bu mRNA'ların translasyonlarını önlemekte ya da artırmaktadır.

Ancak Dox; akonitaz-1 enzimine bağlanarak bu proteinin, artan hücre içi konsantrasyonlarında Fe'ye bağlanmasını engelleyerek hücre içinde Fe depolayan ferritinin translasyonunu normal şartlarda artması gerekirken inhibe etmektedir. Ayrıca normal şartlarda artan Fe konsantrasyonunda anlatımı azalması beklenen transferrinin translasyonunun devam ederek hücre içi Fe seviyesinin artmasına devam etmesine yol açmaktadır. Sonuçta artan ROS üretimi de DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna katkıda bulunarak hücre ölümünü teşvik etmektedir (Şekil 1.11). (Aniogo ve ark., 2017; Khan ve ark., 2017).



Şekil 1.11. Dokсорubisin teşvikli hücre ölümünü tetikleyici mekanizmaları (Aniogo ve ark., 2017)' dan alınmıştır.

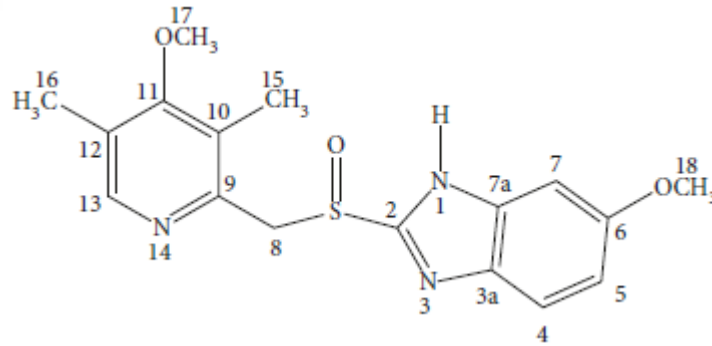
1.6. Proton Pompası İnhibitörlerinin Meme Kanseri Tedavisinde Kullanımı

1980'lerin sonunda piyasaya sürülen proton pompa inhibitörleri (PPIs), gastrik H^+/K^+ -ATPaz'ı inhibe ederek gastrik asit salgılanmasını engellemektedir. Düşük seviyedeki yan etkileri ve diğer ilaçlarla etkileşimlerinin düşük olması nedeniyle PPIs; gastroözofajeal reflü hastalığı, peptik ülser hastalığı ve steroid yapıda olmayan anti-inflamatuar ilaç kullanımına bağlı gelişen gastropati gibi çeşitli asit-peptik bozuklukların gelişmiş tedavisine olanak sağlamıştır. PPIs'nin zayıf bazik yapısı onların

proton pompalarının luminal yüzeyinde yüksek derişimlerde birikmesine yol açarak terapötik etkinliklerini artırmaktadır. PPI çeşitlerinden omeprazol, lansoprazol, rabeprazol ve yakın zamanda onaylanmış esomeprazol benzer etkinliğe sahiptir (Shin ve Sachs, 2008; Vanderhoff ve Tahboub, 2002). PPIs ayrıca vakuolar ATPaz (V-ATPaz) inhibitörleri olarak da etki etmektedir, bundan dolayı tümörlerin asidik mikro çevresini etkileyebilecekleri düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda PPI'ların meme, mide, kolorektal, özofagus ve pankreas kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde metastazı ve kemoterapötik ilaç direncini azalttığı gösterilmiştir (Ihraiz ve ark., 2020).

1.6.1. Omeprazol'un Moleküler Yapısı ve Farmakolojik Aktivitesi

5-Metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)-metil]sülfinil]-1H-benzimidazol (Omeprazol), PPI tipi ilaçların 1989 yılında piyasaya sürülen ilk tipidir. Şekil 1.12'de yapısı gösterilen ve tek kiral merkeze sahip olan omeprazolün S ya da R izomerlerinden her ikisi de aktif olmakla birlikte S izoformu daha yavaş metabolize olmaktadır. Benzimidazol halkaları (N-H, C=C-N ve S-C=N) ve S=O grubundan oluşan molekülün reaktif kısmı, benzimidazol halkasındaki bir asit grubudur (Vrbanec ve ark., 2017).



Şekil 1.12. Omeprazolün moleküler yapısı (Vrbanec ve ark., 2017) 'dan alınmıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda Omeprazol'un gastrointestinal sistemi koruma mekanizmasının ayrıca HSP70 ve TGF- β anlatımlarını arttırmasıyla ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında omeprazolün antiapoptotik etkinliğinin kaspaz-3 seviyesinin ve mitokondriyal kalsiyum seviyelerinin azalması ile; antiinflamatuvar etkinliğinin nötrofillerin infiltrasyonunu azaltması ve anti enflamatuvar interlökinleri arttırması ile; antioksidan etkinliğinin ise süperoksid dismutaz enziminin aktivasyonu ve lipid peroksidasyonunun azaltılması ile ilişkili olduğu farklı çalışmalarda belirlenmiştir (Paz ve ark., 2020).

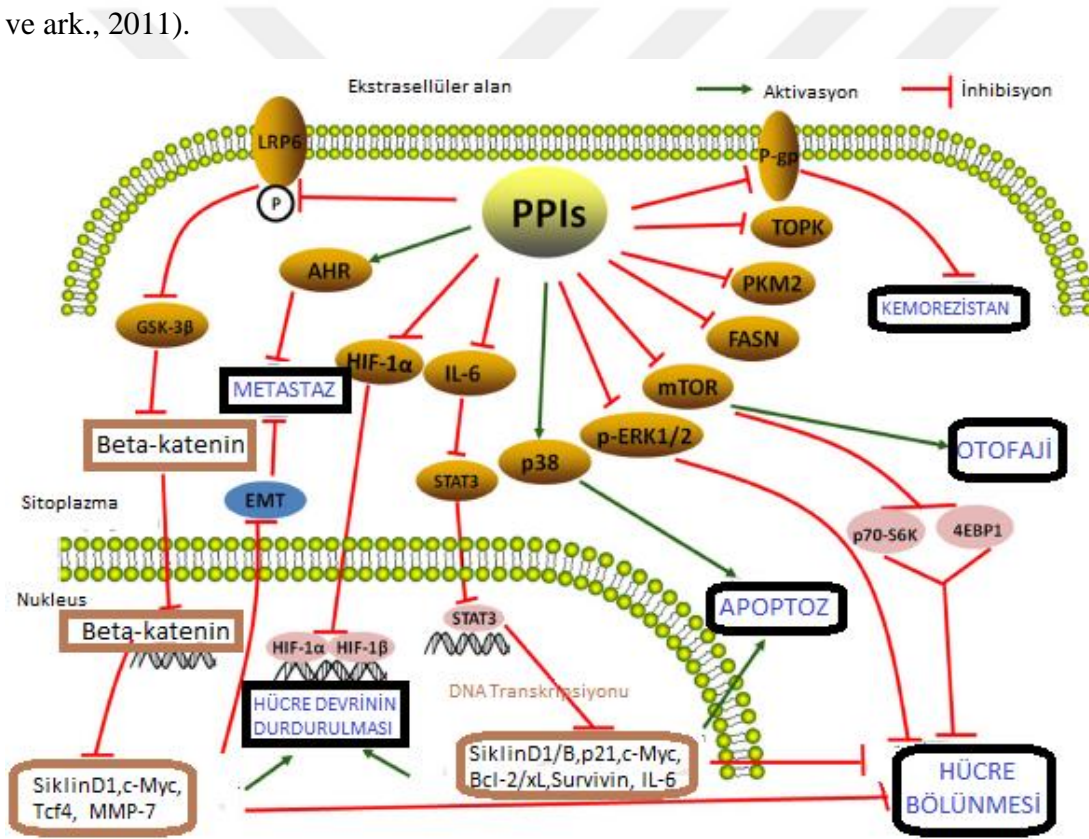
1.6.2. Proton Pompası İnhibitörlerinin Antikanser Etkisi

PPI'ların antikanser ajan olarak kullanılma ihtimalleri ilk olarak V-tipi ATPaz'ları adrenal kromafin granüllerinde inhibe ettiklerinin gösterilmesi ile ve insan bağırsak epitel bariyeri hücrelerinin ölümsüzleştirilmesi ile elde edilen *in vitro* koşullarda kemorezistansı sağlayan geçirgen glikoproteinleri (P-gp) inhibe ettiklerinin (Şekil 1.13) belirlenmesiyle düşünülmüştür. PPI'ların V-tipi ATPaz'ları inhibe etmesi sonucunda: malignant hücrelerde pH homeostazisinde bozulma ile mitokondriyal fonksiyon bozukluklarını ve ROS üretimini tetiklenmesi sonucunda; ayrıca da lizozomal pH'nın değişmesi ile otofajik süreçlerin engellenmesi yoluyla hücre ölümünü tetikleyebileceği öngörülmüştür (Lu ve ark., 2017). Ayrıca yapılan diğer pek çok çalışma sonucunda, V-tipi-ATPaz inhibisyonunun veya lizozomlar içinde birikimin, kanserli hücreleri sitostatik kemoterapilere karşı duyarlı hale getiren bir mekanizma olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 2015). Öyleki PPI inhibitörleri someprazol veya pantoprazolün kullanımının, kronik miyeloid lösemi hücre hattı K562'nin BCR-ABL füzyon proteini inhibitörü olan kemoterapötik imanitibe karşı duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (ErgÜL ve ErgÜL, 2018). Sonuç olarak PPI'ların kombine kemoterapilerde kullanılabileceği hipotezi desteklenmiştir.

1.6.2.1. Proton Pompası İnhibitörlerinin Sinyal Yolakları ve Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi

Yapılan pek çok çalışma sonucunda, PPI'ların V-tipi-ATaz ve P-gp dışında; LRP6/Wnt/ β -katenin, rapamisininin memeli hedefi (mTOR), hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF-1 α), P-gp ve MAPK alt ailesi (p38 ve ERK) dahil olmak üzere, tümör asiditesi etkisine direkt dahil olan yolaklar ya da pirüvat kinaz'ın M2 izoformu (PKM2), T hücre orjinli protein kinaz (TOPK), AHR ve yağ asidi sentaz (FASN) gibi asidite ile alakasız proteinlerle de etkileşime girebildiği gözlenmiştir (Şekil 1.13). Öyleki Wnt yolağının inhibe olması ile β -kateninin GSK3 β tarafından fosforilasyonu onun yıkımını tetikleyerek nukleusa göçmesini engellemektedir. Sonuçta hücre devrinin devam etmesini tetikleyen transkripsiyon faktörleri Tcf4 ve c-MYC ile siklinD1 ve invazyonda etkili matriks metalloproteinaz 7 (MMP-7) gibi proteinler sentezlenmemektedir. Bunun yanında IL-6 sinyalinin inhibisyonu ile STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu engellenerek sağkalımı ve hücre devri devamlılığını tetikleyen siklin B, p21, survivin ve IL-6 proteinlerinin sentezleri inhibe edilmektedir. Ayrıca bu etkilere HIF1 α sinyalinin inhibisyonu da eklenince hücre devrinin durdurulması, hücre bölünmesinin inhibisyonu ve AHR yolağının inhibisyonun da dahil olması ile epitelyal mezenkimal dönüşüm

(EMT) , dolayısıyla da metastaz inhibe olmaktadır. Ribozomal bir proteini fosforile eden kinaz p70-s6K ve ökaryotik translasyon başlatma proteinine bağlanan protein 4EBP1 üzerinden hücresel protein sentezinin ve otofajinin düzenlenmesinden sorumlu mTOR sinyal yolağının inhibe olması ile protein sentezi ile hücre bölünmesi inhibe olmakta ve ayrıca sürekliliği hücre ölümünü aktive eden otofaji tetiklenmektedir. Bunun yanında sırasıyla hücre devrinin düzenlenmesi, yağ asidi sentezi ve hücresel solunum yolaklarını düzenleyen TOPK, FASN ve PKM2'nin inhibisyonu da otofajinin tetiklenmesi ve hücre devrinin durmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca hücre sağkalımı ve bölünmesinden sorumlu ERK1/2 sinyalinin inhibisyonu ile hücresel stres cevabından sorumlu p38'in aktivasyonu hücre bölünmesinin inhibisyonu ve apoptozun teşvikine neden olmaktadır (Şekil 1.13). (Jin ve ark., 2014; Lu ve ark., 2017; Udelnow ve ark., 2011).



Şekil 1.13. Proton pompası inhibitörlerinin antineoplastik etkinlikleri ile ilişkili olarak düzenledikleri hücresel sinyal yolları (Lu ve ark., 2017)'dan alınmıştır.

1.7. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı ve Karakteristik Özellikleri

1973 yılında Dr. Soule ve Michigan Kanser Vakfı (MCF)'ndaki arkadaşları tarafından 69 yaşındaki metastatik meme kanseri hastası bir kadının akciğer zarları arasında biriken sıvıdan izole edilen bu hücre hattı; *in vitro* çalışmalarda ER+, PR+,

HER2-,BRCA1 geni doğal tip genotipi ve invaziv duktal adenokarsinom orijini ile Luminal A tipi meme kanserini temsil etmektedir. MCF-7 agresif olmayan, invazyon ve metastaz yeteneği düşük, E2 duyarlılığı yüksek, ER α anlatımı yüksek ancak ER β anlatımı düşük, östrojen yoksunluğunda ER anlatımını arttıran ve bölünme hızı azalan bir hücre hattıdır. MCF-7 ana soylarında PR anlatımı yüksek iken seçici ER modülatörü olan tamoksifene dirençli hücre soylarında PR anlatımı zayıftır veya yoktur. MCF-7 hücrelerinin E2'ye duyarlılığı otokrin insülin benzeri büyüme faktörü tip 1'in salgılanmasına bağımlıdır. Bununla birlikte anjiyogenezi teşvik eden vasküler-endotelial büyüme faktörü anlatımlarının MCF-7 hücre hattında, üçlü negatif (ER-,PR-,HER2-) ve BRCA1 geni doğal tip olan invazyon ve metastaz kabiliyeti yüksek MDA-MB-231 hücre soyuna göre düşük olduğu gösterilmiştir (Comsa ve ark., 2015; Dai ve ark.,2015).



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mevcut tez çalışması ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar geçmişten günümüze incelenmiş olup elde edilmiş bulgu ve sonuçların araştırılan konu etrafında yeniden değerlendirilmesi yapılmıştır.

2.1. Etken Maddelerin Hücre Hatlarına Tekli Uygulanması ile İlgili Çalışmalar

AbuHammad ve Zihlif (2013), MCF-7 meme kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmada Doksorubisine karşı gelişen ilaç direncinin; ilacın dışarıya pompalanmasını sağlayan proteinler ile hücre döngüsü, apoptoz ve DNA onarımında önemli rol oynayan genlerin anlatımlarındaki değişiklikler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Sharifi ve ark. (2015), MCF-7 hücre hattına uygulanan Doksorubisinin, antiapoptotik Bcl-xL seviyesini azaltırken; apoptoz teşvik eden Bax proteini seviyesini ve kaspaz-9 anlatımlarını arttırdığı gözlenmiştir.

Jin ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, pankreas kanseri hücrelerinin en yüksek düzeyde invaziv alt tipinde (QM-PDA), seçici aril hidrokarbon reseptörü (AHR) modülatörü olduğu belirlenen omeprazolün, genomik olmayan bir şekilde Aril Hidrokarbon reseptörü (AHR) yolağına etki ederek invazyonu engellediği gösterilmiştir.

Pilco-Ferreto ve Calaf (2016), meme kanseri hücre hatlarından Luminal A tipini temsil eden MCF-7 ve üçlü negatif tipi temsil eden MDA-MB-231 hücre hatları ile üçlü negatif ancak karsinojenik olmayan MCF-10F hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda, Dox'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinin anlatımını azaltıp, apoptozu teşvik eden Bcl-2 proteinlerinin ve ayrıca kaspaz proteazların anlatımlarını arttırdığı; ayrıca NF-κB ve süperoksit dismutaz 2 protein anlatımlarını düzenleyerek oksidatif stresi etkilediği gösterilmiştir.

Zhang ve ark. (2017), yapmış oldukları çalışmada, kanser tedavisinde adjuvan ilaç olarak omeprazolün KRT (kemoradyoterapi) etkinliğini artırmada ve rektum kanseri nüksünü azaltmada sinerjik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Hou ve ark. (2017), yemek borusu kanseri gelişim için önemli bir risk faktörü olan Barrett özofagusu hastalığı, Barrett özofagusu hücre hatlarında yapılan çalışmada omeprazol kullanımının spesifik bir miRNA'nın anlatımını düzenleyerek hücre bölünmesini inhibe ettiği ve hücre devrini G0/G1 konumunda durdurduğu gösterilmiştir.

Punia ve ark. (2017), çalışmış olduğu acetinin akciğer kanseri hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda doksorubisinin sitotoksitesini artırdığını ileri sürdü.

Khan ve ark. (2017), MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile yaptıkları çalışmada, bir antimetabolit olan azasitidin kullanımının hücreleri Doksorubisine karşı dirençli hale getirdiği gözlenmiştir.

Sakagami ve ark. (2017), oral keratinosit toksisitesinin çoğu antikanser ajanının yeni bir yan etkisi olduğunu ileri sürmüştür. Toplam 11 antikanser ilacı benzer keratinosit toksisitesi gösterdi. Sasa senanensis Rehder'in yapraklarının alkali özünü, hücre büyümesini teşvik ederek doksorubisinin neden olduğu keratinosit sitotoksitesini kısmen hafiflettiği gözlenmiştir.

2.2. Kemoterapötik Ajanların Proton Pompası İnhibitörleri ile Hücreler Üzerine Kombine Uygulanması ile İlgili Çalışmalar

Udelnow ve ark. (2011), yüksek oranda kemorezistan tümör olan pankreatik kanser hücre hatları MiaPaCa-2, ASPC-1, Colo357, PancTu-1, Panc1 ve Panc89' na yapılan çalışmalarda PPI'lar omeprazol ve pantoprazol ile kemoterapötik ajanlar gemsitabin ve 5-florourasil'in farklı kombinasyonları uygulanmıştır. Sonuç olarak, omeprazolün kemoterapötik ajanlar ile kombine kullanımının pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını engelleyip, otofaji yolağını tetiklediği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Jin ve ark. (2014), üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulanan omeprazol dahil seçici Aril Hidrokarbon Reseptörü (AHR) inhibitörleri kullanılan çalışmada; omeprazolün CXCR4 ve MM9 ifadelerinin transkripsiyon seviyesinde inhibisyonu yoluyla meme kanseri hücre istilasını azalttığı, hayvan modelinde akciğere metastazı önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir.

Lee ve ark. (2015), epitel kökenli ovaryum kanseri için yapılan bir çalışmada, kemorezistan *in vitro* ovaryum kanseri hücre hatlarında ve kemorezistan hayvan modellerinde paklitaksel ile birlikte omeprazol kullanılmasının ilaç direncini kırarak *in vitro* modellerde apoptozu teşvik ettiği, *in vivo* modellerde ise tümör ağırlığında önemli ölçüde azaltmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Pilco-Ferreto ve Calaf (2016), yaptıkları çalışmada, meme kanseri hücre hatlarından Luminal A tipini temsil eden MCF-7 ve üçlü negatif tipi temsil eden MDA-MB-231 hücre hatları ile üçlü negatif ancak karsinojenik olmayan MCF-10F hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda, Dox'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinin anlatımını azaltıp, apoptozu teşvik eden Bcl-2 proteinlerinin

ve ayrıca kaspaz proteazların anlatımlarını arttırdığı; ayrıca NF-κB ve süperoksit dismutaz 2 protein anlatımlarını düzenleyerek oksidatif stresi etkilediği gösterilmiştir.

Liu ve ark. (2017), meme kanseri hastalarında up regüle edilen ve meme kanseri büyümesini, invazyonunu ve migrasyonunu destekleyen bir adipokin olan resistin'in Dox ile uygulanmasının yeni bir strateji olabileceğini düşünmüş ve meme kanseri hastalarında doksorubisin bazlı kemoterapiye direncin üstesinden gelmek amaçlanmıştır. Bunun neticesinde resistin antagonizmasının AMPK/mTOR/ULK1 ve JNK sinyal yolları, resistin tedavisi ile aktive edilmiştir. Ayrıca resistinin, otofaji indüksiyonu yoluyla Dox kaynaklı apoptoza direnç sağladığını da göstermişlerdir.

Paškevičiūtė ve Petrikaitė (2019), yaptıkları çalışmada üçlü negatif mürin meme kanseri hücre hattı 4T1 kullanılarak iki ve üç boyutlu kanser modellerinde omeprazol veya lansoprazol kullanımının, zayıf bazik antikanser ilaç doksorubisinin ya da lipozomal formunun hücre içerisine taşınmasını belirli koşullar altında arttırdığı gözlenmiştir. Hem Omeprazol hem de Lansoprazolün asidik koşullarda Dox'un kendisinin de lipozomal formunun da iletimini artırdığı görülmüştür.

Mohammadian ve ark. (2020), HSP90 inhibitörlerinin Doksorubisin ile kombine kullanımlarının MCF-7 hücre hattında; anjiyogenezi tetikleyen VEGF anlatımını azalttığı ve apoptotik etkinliği arttırdığı belirlenmiştir.

Ihraiz ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada; MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarına omeprazolün de içerisinde bulunduğu üç PPI ajanının her birini doksorubisin ile tek başına ve kombine olarak kullanmışlardır. Sonuç olarak, tüm hücre hatlarında doksorubisin ile kombinasyonun hücre çoğalmasını ve göçünü engellediği, apoptozisi önemli ölçüde indüklediğine ilave olarak sinerjetik bir terapötik etkinliğe neden olduğu belirlenmiştir.

(Wang ve ark., 2021), MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 insan meme kanseri hücre hatlarına omeprazolün de içerisinde bulunduğu farklı PPI ajanları Dox ve radyoterapi ile kombine olarak uygulanmıştır. Sonuçta, DNA hasar onarımını arttırarak ilaç ve radyoterapiye direnç sağlanmasına neden olan FASN'yi etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını baskıladığı gösterilmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yusuf TUTAR tarafından sağlanmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Hücre Serisi

Çalışmalarımızda American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilen insan meme kanser hücresi MCF-7 kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1. Laboratuvarda Kullanılan Cihazların İsimleri ve Markaları

Cihaz İsmi	Cihaz Markası
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
RNA İzolasyon Kabini	Euroclone
Mikrosantrifüj	Weightlab
Nanodrop	Thermo
RT PCR	Roche
Biyogüvenlik Kabini	Euroclone Safemate Eco
Hücre Görüntüleme Mikroskobu	ZOE, BIORAD
CO2 İnkübatör	RHCBI
Su Banyosu	Thermomac
+4 Buzdolabı	Uğur
-20 Buzdolabı	Uğur
-86 Buzdolabı	Binder
Otomatik Pipet Seti	Eppendorf
Flow Cytometry	Beckman Coulter

3.1.3. Kullanılan Malzemeler

Tablo 3.2. Kullanılan Malzemeler ve Markaları

Malzemeler	Markaları
DMEM	Biochrome
DMEM-F12	Lonza
RPMI	Lonza
MEGM	Lonza
Bullet Kit	Lonza
Fetal Bovine Serum	Biochrome
Trypsin/EDTA %0.25	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Gibco
Vi-Cell Reagents	Beckman Coulter
Dimetil Sülfoksit	Sigma
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
PBS Dulbecco's	Gibco
96 Well Plates	Greiner
Cell Culture Flasks 75 cm ²	Greiner

3.1.4. Kitler

Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

innuPREP RNA Mini Kiti 2.0
SensiFAST cDNA Sentez Kit
ApopNexin Annexin V FITC Apoptosis Kit

3.2. Metot

3.2.1. DMEM Besiyeri Hazırlanması

50 ml FBS (Fetal Bovine Serum), 5 ml Penisilin/Streptomisin, 445 ml DMEM eklenerek hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

MCF-7 doğal tip meme kanseri hücreleri (ATCC No; HTB 22), DMEM besiyerinde (% 10 sığır fetüs serumu (FBS) ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik) , % 5 CO₂ bulunan ve 37°C şartlarını oluşturan hücre inkübatöründe (Hera Cell 150i, Thermo), %95 nem ortamında büyütülmüştür. Hazırlanmış olan besiyeri 0.22 µm' lik filtrelerden geçirilip +40°C sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Sıvı Azottan Hücre Açılması

Kullanılan hücrelerin genomlarına, metabolik aktivite veya temel fizyolojik özelliklerinin zarar görmeden uzunca bir süre saklanabilmesi için sıvı azot ile -196°C'de uygun tekniklerle dondurulmaları gerçekleştirilmiştir. Düşük pasaj sayılarına sahip sıvı azotta dondurulmuş olan hücrelerin açılması, hem yapılan deneyler için hücrelerin kısa sürede kullanılabilmelerini sağlarken hem de çalışmalar sırasında oluşabilecek olan kontaminasyon, stres faktörleri yolu ile hücre kaybının sonrasında kullanılması sağlanmıştır. Hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra hızlıca eritilerek uygun besiyeri içerisine aktarılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu, 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası çöktürülen pellet kısmı hücreleri içerirken, üst fazda sıvı azotta dondurulmak amacıyla besiyerine eklenen dimetilsülfoksit bulunur. Dimetilsülfoksit, hücrelerde toksik etki oluşturarak stres faktörü olabileceğinden üst fazın atılması gerçekleştirilir. Kalan pellet üzerine 1 ml uygun besiyeri eklenerek 25 pelletin homojen olarak dağıtılması sağlanmış olup homojenize edilen hücre süspansiyonu T25-T75'lik flaska ekilmiştir. Ekimi yapılan hücreleri mikroskopta

görüntülerine bakılarak yoğunlukları ve morfolojileri gözlemlenir. T25-T75'lik flasklar %5 CO₂, 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre alınmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)

Üremekte olan hücre pasajları, %80-90 yoğunluğa (confluent) ulaşınca yeniden pasajlandı. Bu amaçla üremekte olan hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında Flaskların içerisindeki besiyeri pipetle alınarak steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm² için 2 ml) ile yıkandı. Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştıkları alandan kaldırılması için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 10 dk bekletildi. Tüm yüzeye yapışık olan hücrelerin kaldırılmasının ardından süspansiyon halindeki hücre+tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml hacimli bir tüp içerisine alındı. Solüsyonun üzerine tripsin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı medyum eklendi. Tüpe alınan süspansiyon 1300 rpm de 10 dk santrifüj edildi, ardından tripsin EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler taze hücre medyumunu ile süspanse edilerek 3 adet 25 cm² 'lik flaska bölünerek yeniden pasajlandı. Yeniden pasajlanan hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücreler santrifüj edildi ve tripsin, besiyerinden uzaklaştırıldı. Ardından hücre pelleti 1 ml besiyeri ile sulandırılarak sayıldı. Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeri ile inhibe edildi. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilip bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 2-3 ml daha medyum ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1300 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 900 µl hücre medyumunu ile sulandırılarak sayıldı. Dondurma tüpleri içerisine 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ve 900 µl hücre medyumunu ile süspanse edilen hücre solüsyonu eklendi. Tüpler dondurma kabına yerleştirilerek -80°C'de derin dondurucuda gerektiğinde kullanılmak üzere saklandı.

3.2.6. Hücre Sayımı

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Bu karışım Neubauer lamı üzerine konularak 5 bölmedeki hücreler sayıldı, daha sonra bulunan bu sayı -sulandırma miktarı x 50 000- sayısı ile çarpıldı. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulundu. Böylece ekim yapılacak sayı belirlenip

hücrelerin petriye ekimleri yapıldı. 100 mm'lik kültür petrisine 5×10^6 hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 5000 hücre transfer edildi.

3.2.7. Hücrelerin Plakalara Ekimi

Önceden sayılmış ve besiyeri ile dilüsyonu yapılmış olan hücreler 96 kuyucuklu plakalar içerisine her kuyucukta 5×10^3 hücre 100 μ l içerisinde olacak şekilde ekilecektir. Ekilen bu hücreler plaka yüzeyine 24 saat içerisinde tutunacaklar ve ertesi gün belirlenen konsantrasyonda dozlama yapılarak inkübasyona bırakılacaktır. Klinik etken maddeler hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde in vitro olarak antikanser aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca sağlıklı hücrelerde toksik etkisini görebilmek için sağlıklı epitel hücrelerinde de toksisite deneyleri yapılmıştır.

3.2.8. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT) Analizi

MTT analizi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapötik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir. Doksorubisin ve omeprölün MCF-7 hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik etkisi MTT kiti ile üretici firmanın kullanım talimatına göre uygulandı. Yöntem MTT ajanı ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorpsiyon değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır. MTT analizi için; 96'lık plak kuyucuklarında bulunan 100 μ l medyum ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış tiazolil mavi tetrazolium bromid solüsyonundan 10 μ l ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plak inkübatöre alınarak 3 saat bekletildi. Üç saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100 μ l ilave edildi ve 20 dk daha inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre ile 570 nm absorpsiyon değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. 28 Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

3.2.9. MCF-7 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için analytik jena firmasına ait “innuPREP RNA Mini Kiti 2.0” kullanılmıştır. 400 µl Lysis Solution RL eklenen hücre pelleti oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Hücre pelletini pipetledikten sonra oda sıcaklığında 3 dakika daha inkübe edildi. İzolasyondan sonra protokolda vurgulandığı gibi hücre kümeleri görülmedi. Parçalanmış numuneyi aktardığımız spin filtresi D yi alıca tüpe yerleştirdikten sonra 2 dakika 11.000 x g'de (~11.000 rpm) santrifüjlendi. Filtre D uzaklaştırıldı. Elimizde RNA yı içeren süzüntü kaldı. Yeni alıcı tüpüne döndürme filtresi R yerleştirildi. Elde ettiğimiz RNA içeren süzüntüye eşit hacimde yaklaşık 400 µl %70 etanol eklendi ve birkaç kez pipetlendi. Pipetajdan sonra numune döndürme filtresi R ye aktararak 11.000 x g'de (~11.000 rpm) de 2 dakika santrifüjlendi. Alıcı Tüpü süzüntüyle birlikte atıldı ve Döndürme Filtresi R'yi yeni bir Alıcı Tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µl Yıkama Solüsyonu HS ekleyip 11.000 x g'de (~11.000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Tekrardan alıcı tüpü ve süzüntü atıldı. Spin filtresi R yi yeni alıcı bir tüpe yerleştirildi. Üzerine 700 µl Washing Solution LS eklenip, 11.000 x g'de (~11.000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Spin filtresi R yeni alıcı tüpüne yerleştirildi. Etanolü uzaklaştırmak için 3 dakika boyunca 11.000 x g'de (~11.000 rpm) santrifüjlendi. Alıcı tüpü atıldıktan sonra spin filtresi R yeni bir elüsyon tüpüne yerleştirildi. Üzerine 30–80 µl RNaz'sız Su eklenip 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1 dakika 11.000 x g'de santrifüj (~11.000 dev/dak) edildi.

3.2.10. RNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıklarının belirlenmesi için spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de ışığı soğurma (O.D) ölçümü yapılmıştır. 260 nm'deki RNA maksimum absorbans değeri ile 280 nm'deki RNA maksimum absorbans değerleri oranlanıp hesaplanarak RNA saflık derecesi bulunmuştur. Ölçümler Nanodrop cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA Sentezi için Meridian firmasına ait , SensiFAST cDNA Sentez Kiti ” kullanılmıştır. İlk olarak kullanılmadan önce vorteks ve santrifüj yapılan solüsyonlardan buz üzerinde ana karışım hazırlandı. Karışım nazikçe karıştırıldı. Cihaz da kit protokolüne göre termal döngü ayarlandı. 4 µL'ye kadar (1/5 hacim) cDNA sentez reaksiyon ürünü 20 µL hacimli qPCR da kullanıldı. İsteğe göre reaksiyon ürünü 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA da seyreltilebilir. Alternatif olarak, reaksiyon

ürünü veya seyreltilmiş cDNA 4 °C'de 1 hafta veya uzun süreli depolama için -20 °C de saklanabilir.

3.2.12. Proton Pompası İnhibitörü ile Doksorubisinin Sinyal Yolaklarında Meydana Getirdiği Gen Değişiminin Belirlenmesi

Tablo 4.2’de verilen genlere ait ifade düzeyleri gerçek zamanlı PCR(qPCR) ile belirlenmiştir. Amplifikasyonlar 20 µL toplam reaksiyon hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü ileri-geri yönlü primerler, SYBRGreen Master Mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Gen ifadelerini normalize etmek için GAPDH ve ACTINB genlerine özgü primerlerin de ifade düzeyleri belirlenmiştir. QPCR yönteminin gerçekleştirilmesi için kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 3.4 ve Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.4. QPCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	İlk hacim
SYBR green master mix	10 µl
Primerler	1 µl
cDNA örneği	1 µl
Steril su	8 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.5. QPCR Koşulları

Zaman	Sıcaklık	Döngü
5 dk	95 °C	1
15 sn	95 °C	40
30 sn	60 °C	Floresan Okuma

3.2.13. Hücre Ölümünün Akış Sitometri ile Belirlenmesi

Hücre hatlarına uygulanan ajanların hücreler üzerinde apoptotik etkisinin gösterilebilmesi için “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” (Sigma-Aldrich) ve PI boyama tekniği kullanılacaktır. Membran fosfolipidlerinden biri olan fosfatidilserin, hücrenin plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde olduğu halde, apoptotik sürecin başlaması ile hücrenin plazma membranının dış

yüzeyine çıkmaya başlar. Komşu hücreler, üzerinde fosfotidilserin olan hücreleri fagosite eder. Apoptozun bu fizyopatolojik özelliklerinden yararlanılarak apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir.

Anneksin V, hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkan fosfotidilserine bağlanabilen bir protein olduğundan hücre yüzeylerine Anneksin V bağlanma oranı, o hücre topluluğundaki apoptoza uğramış hücrelerin oranını verecektir. Hücreler santrifüj edilerek üzerine binding buffer eklenecek ve homojenize edilecektir. Homojenize edilen hücrelerde 100 µl alınacak ve üzerine 5 µl Annexin V eklenecektir. 15 dakika, karanlıkta, +25 °C' de bekletilen hücreler flow sitometri ile analiz edilecektir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği gibi flow sitometride ikinci boya olarak 5 µl propidyum iyodür eklenecektir. Hücre döngüsü, kanser hücrelerindeki anormal DNA hücre dizilerini tanımlamak, ilişkili DNA indeksini tahmin etmek ve bu hücre dizilerindeki hücre fazı dağılımını belirlemek için kullanılacaktır. Hücreler, 5 dakika boyunca 500 g'de santrifüjlenecektir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılacaktır. Pellete 1 ml tampon solüsyon eklenecek ve 5 dakika 500 g'de santrifüjlenecektir. Hücre konsantrasyonu daha sonra 1×10^6 hücre/ml'ye ayarlanacaktır. Daha sonra A solüsyonu (spermin tetrahidroklorür deterjan tamponunda tripsin) eklenecek ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilecektir. Daha sonra 200 µl B solüsyonu (spermin tamponunda RNase A ve tripsin inhibitör) eklenecektir. İnkübasyon bittikten sonra üzerlerine C solüsyonu (spermin buffer içinde Propidiumiodide (PI)) eklenerek 10 dakika karanlıkta bekletilir. Daha sonra filtrelenecek ve hücreler flow sitometrisi ile analiz edilecektir.

3.2.14. İstatistiksel Analiz

Kantitatif veri analizi için normal dağılıma uygun olup olmadığı kolmogrov simirnov testi ile incelenmiştir. Sonuçlar; ortalama, \pm ortalamaların standart hatası olarak gösterilir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA), ardından çoklu karşılaştırma Student-Newman-Keuls testi ve ikili karşılaştırmalar için Student t testi kullanılmıştır. Bu testler GraphPad Prism 5.0 Yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0.05'ten küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Gen ekspresyon analizleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplaması kullanılmış olup istatistikleri Reactome veri tabanı ile tamamlanmıştır.



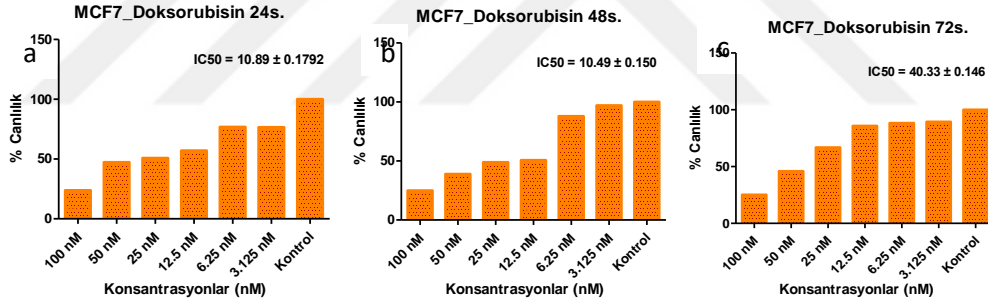
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MCF-7 Hücrelerindeki Hücre Canlılığı

Doksorubisin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde; 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 nM dozlarda incelendi. Omeprazol apoptotik etkileri ise 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M dozlarda incelendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her bir etken madde için optik yoğunluk (OD) grafikleri GraphPad Prism 5.0 istatistik programında değerlendirilerek çizilmiştir. Her bir inkübasyon süresinde hücre canlılığını %50 oranında azaltan doz (IC_{50}) hesaplanmıştır.

4.1.1. Doksorubisin Tek başına MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Gösterilmesi

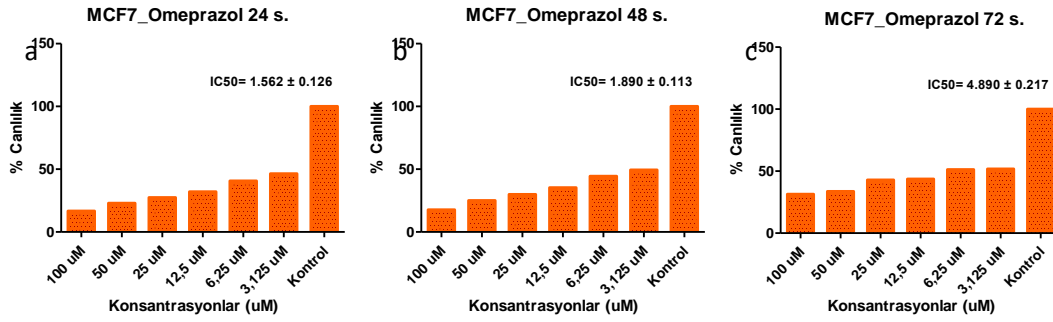
Doksorubisin, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkili olduğu belirlenen konsantrasyonlar sırasıyla 10.89, 10.49 ve 40.33 nM'dir.



Şekil 4.1. Doksorubisin 100-3.125 nM arasında uygulanan dozlarının 24 (a), 48 (b) ve 72 (c) saatlik inkübasyon sürelerinde MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi ($p < 0.01$)

4.1.2. Omeprazolün Tek Başına MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Gösterilmesi

Omeprazolün, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkili olduğu belirlenen konsantrasyonlar sırasıyla 1.562, 1.89 ve 4.89 μ M'dir.



Şekil 4.2. Omeprazolün 100-3.125 µM arasında uygulanan dozlarının 24 (a), 48 (b) ve 72 (c) saatlik inkübasyon sürelerinde MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi (p=0.01)

4.1.3. Doksorubisin ve Omeprazol Kombinasyonunun MCF-7 Hücrelerinde 48.saat Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinde doksorubisin ile omeprazolün farklı konsantrasyonlarının tekli uygulamaları ve kombin uygulamalarının % inhibisyon sonuçları Tablo 4.1.' de verilmiştir.

MTT sonuçlarına göre, MCF-7 hücrelerine 12.5 nM konsantrasyondaki doksorubisin + omeprazol kombinasyonu (12.5nM + 3µM) gruplarında, kontrole göre % hücre inhibisyon oranı %54.95; ilaç etkileşim katsayısı (CDI) ise 1.469613 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak *p < 0.005 olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.1: Omeprazol ve doksorubisin MCF-7 hücre hattındaki % sinerjetik inhibisyonu (ortalama ± standart sapma), n=5, p<0.005, kontrol:%0.1 DMSO, CDI < 1 sinerjizm, CDI < 0.7 güçlü sinerjizm, CDI = 1 additiflik ve CDI > 1 antagonizm

Hücre Hattı	Konsantrasyon Omeprazol/Doksorubisin (uM/nM)	% İnhibisyon	CDI
MCF-7	3/50	60.26 ± 0.4280	1.611627
	3/25	58 ± 0.4261	1.551184
	3/12.5	54.95 ± 0.4045	1.469613
	3/6.25	57.2 ± 0.4164	1.529789
	3/3.125	61.82 ± 0.4357	1.653349
	3/0	0	-

4.2. Dokсорubisin ve Omeprazolün PCR Array Deneylerinin Değerlendirilmesi

Bu alışma için 6 kuyucuklu plakalara 2 ml'de 3×10^5 hücre ekimi yapıldı. 24 saat hücrelerin tutunmasının ardından dokсорubisin ile omeprazol ayrı ayrı ve bir arada uygulandı. Gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması için etken madde uygulaması yapılmayan, yalnızca MCF-7 hücrelerinin bulunduğu bir kuyucuk da deneylere dahil edildi. 48 saatin sonunda RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. PCR array deneylerinde kullanılan genler Tablo 4.2. 'da verilmiştir.

Tablo 4.2. PCR Array deneylerinde kullanılan genler

ANGPT1	Angiopoietin 1
ANGPT2	Angiopoietin 2
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FLT1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
PGF	Placental Growth Factor
SERPINF1	Serpin Family F Member 1
TEK	TEK Receptor Tyrosine Kinase
VEGFC	Vascular Endothelial Growth Factor C
APAF1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
BCL2L11	BCL2 Like 11
CASP2	Caspase 2
CASP7	Caspase 7
CASP9	Caspase 9
FASLG	Fas Ligand
NOL3	Nucleolar Protein 3
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
AURKA	Aurora Kinase A
CCND2	Cyclin D2
CDC20	Cell Division Cycle 20
E2F4	E2F Transcription Factor 4
MCM2	Minichromosome Maintenance Complex Component 2
MKI67	Marker Of Proliferation Ki-67
SKP2	S-Phase Kinase Associated Protein 2
STMN1	Stathmin 1

Tablo 4.2. PCR Array deneylerinde kullanılan genler

WEE1	WEE1 G2 Checkpoint Kinase
BMI1	BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger
ETS2	ETS Proto-Oncogene 2, Transcription Factor
IGFBP3	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3
IGFBP5	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5
IGFBP7	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 7
MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MAP2K3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3
MAPK14	Mitogen-Activated Protein Kinase 14
SERPINB2	Serpin Family B Member 2
SOD1	Superoxide Dismutase 1
TBX2	T-Box Transcription Factor 2
DDB2	Damage Specific DNA Binding Protein 2
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3
ERCC3	ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit
ERCC5	ERCC Excision Repair 5, Endonuclease
GADD45G	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Gamma
LIG4	DNA Ligase 4
PPP1R15A	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A
CDH2	Cadherin 2
FOXC2	Forkhead Box C2
GSC	Gooseoid Homeobox
KRT14	Keratin 14
OCLN	Occludin
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNAI2	Snail Family Transcriptional Repressor 2
SNAI3	Snail Family Transcriptional Repressor 3
SOX10	SRY-Box Transcription Factor 10
ADM	Adrenomedullin
CA9	Carbonic Anhydrase 9
HMOX1	Heme Oxygenase 1
LDHA	Lactate Dehydrogenase A
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1
ACLY	ATP Citrate Lyase

Tablo 4.2. PCR Array deneylerinde kullanılan genler

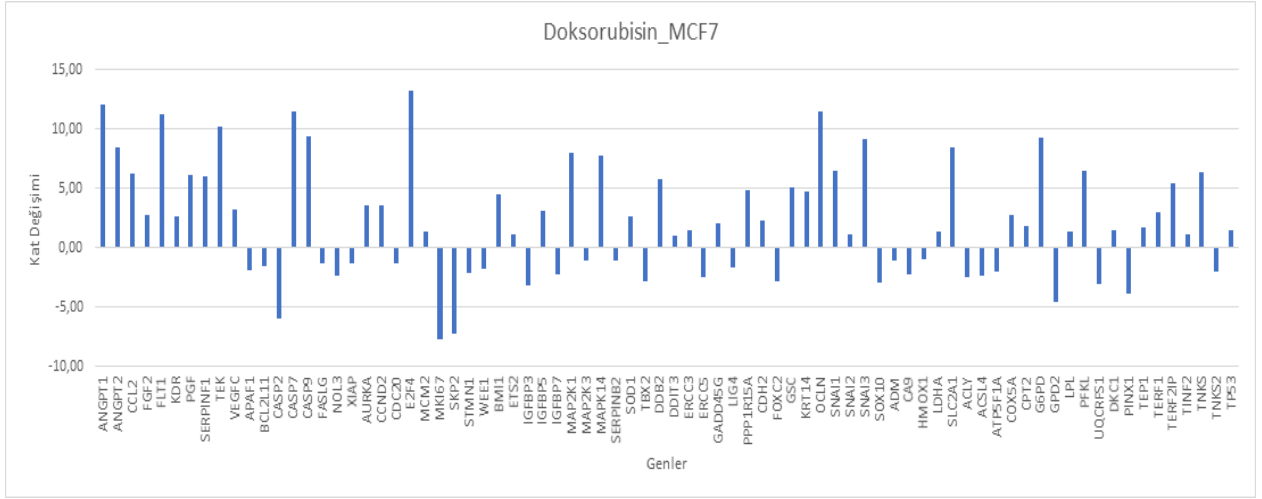
ACSL4	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4
ATP5F1A	ATP Synthase F1 Subunit Alpha
COX5A	Cytochrome C Oxidase Subunit 5A
CPT2	Carnitine Palmitoyltransferase 2
G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
GPD2	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 2
LPL	Lipoprotein Lipase
PFKL	Phosphofruktokinase, Liver Type
UQCRCF1	Ubiquinol-Cytochrome C Reductase, Rieske Iron-Sulfur Polypeptide 1
DKC1	Dyskerin Pseudouridine Synthase 1
PINX1	PIN2 (TERF1) Interacting Telomerase Inhibitor 1
TEP1	Telomerase Associated Protein 1
TERF1	Telomeric Repeat Binding Factor 1
TERF2IP	TERF2 Interacting Protein
TINF2	TERF1 Interacting Nuclear Factor 2
TNKS	Tankyrase
TNKS2	Tankyrase 2
TP53	Tumor Protein P53

4.2.1. Sinyal Yolak Analizlerinin Değerlendirilmesi

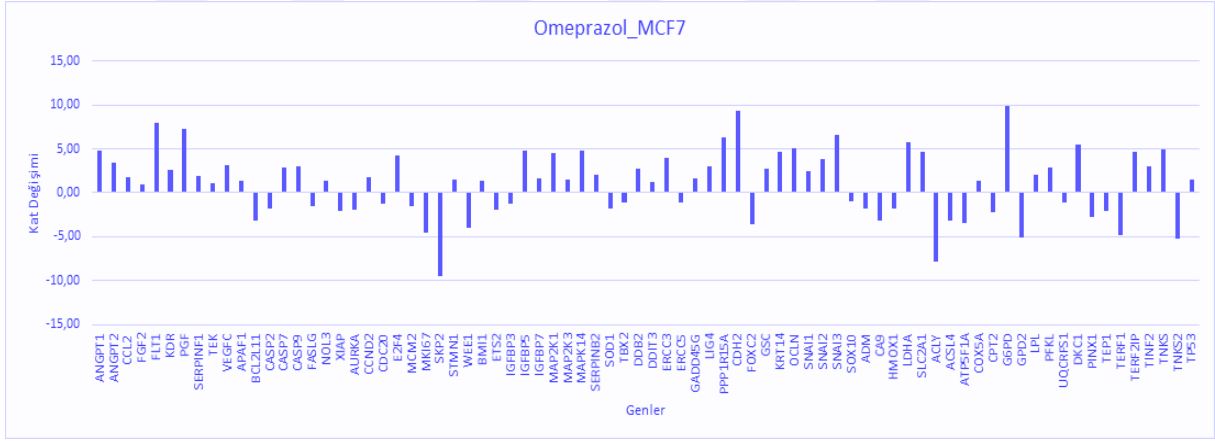
MCF-7 hücrelerinde antikanser ajan Doksorubisin ve proton pompası inhibitörü Omeprazolün ayrı ayrı ve beraber etkilerinin 48 saat sürede hücrelerde oluşturduğu apoptotik etki gen düzeyinde gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinin kültüre alınması, IC₅₀ dozları uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) hücrelerden RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

Kontrol grubuna göre gen anlatımlarındaki kat değişimi (fold change) hesaplamaları log₂'ye uygun yapıldı. 2 ve üzeri ekspresyon farklılığı görülen yukarı; -2 ve altı ekspresyon farklılığı görülen aşağı regüle olan genler gösterildi. Doksorubisin uygulaması (Şekil 4.3), Omeprazol uygulaması (Şekil 4.4), Doksorubisin ve Omeprazol birlikte uygulaması (Şekil 4.5) ($p < 0.05$) hücrelerdeki gen anlatım değişimleri gösterilmiştir.

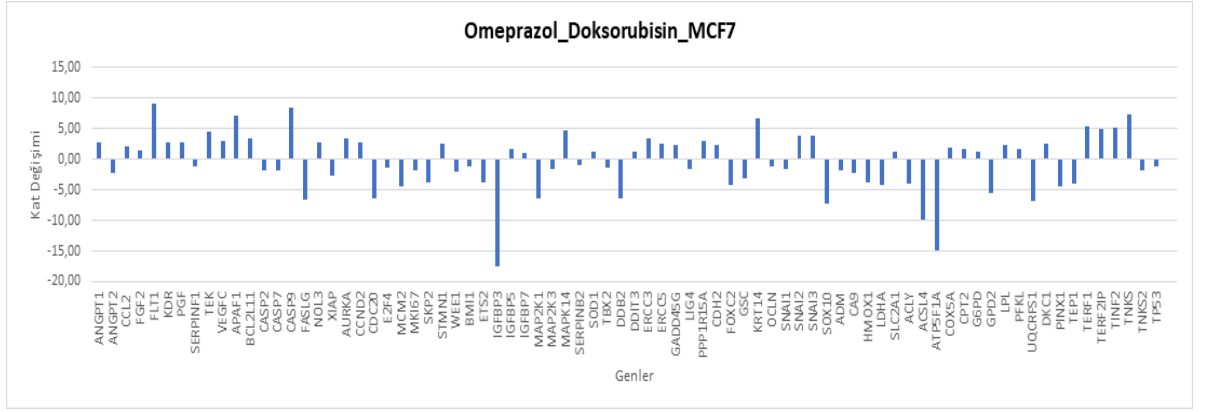
Etken madde uygulaması yapılmış MCF-7 hücre hatlarına ait PCR array sonuçları sırasıyla Şekil 4.3.'te verilmiştir.



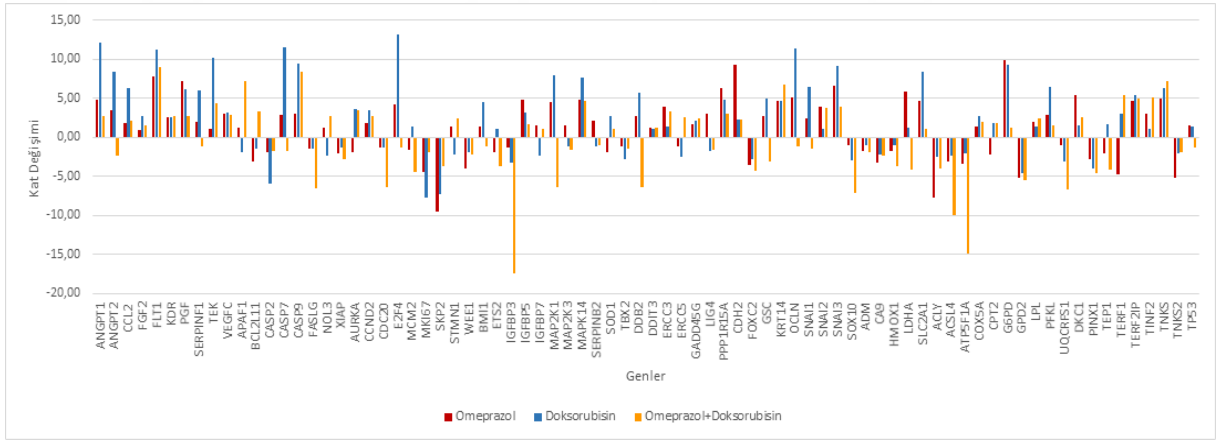
Şekil 4.3. Doksorubisin varlığında MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri



Şekil 4.4. Omeprazol varlığında MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri



Şekil 4.5. Dokсорubisin ve Omeprazol kombine uygulanması ile MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri



Şekil 4.6. Dokсорubisin ve Omeprazol tek başına ve kombine şekilde uygulanması ile MCF-7 hücre hattına sinyal yollarında değişim gösteren gen ifadeleri

Log₂'ye göre aşağı ve yukarı anlamlı olduğu belirlenen gen ifadenme değişimlerini gösteren harita ise Şekil 4.6'da verilmiştir.

Dokсорubisin uygulaması sonrası gen anlatım düzeyleri değerlendirildiğinde; ANGPT1 gen ifadesinin 12,08 kat, ANGPT2 gen ifadesinin 8,43 kat, CCL2 gen ifadesinin 6,25 kat, FGF2 gen ifadesinin 2,76 kat, FLT1 gen ifadesinin 11,27 kat, KDR gen ifadesinin 2,59 kat, PGF gen ifadesinin 6,13 kat, SERPINF1 gen ifadesinin 6,04 kat, TEK gen ifadesinin 10,16 kat, VEGFC gen ifadesinin 3,22 kat, CASP7 gen ifadesinin 11,51 kat, CASP9 gen ifadesinin 9,42 kat, AURKA gen ifadesinin 3,59 kat, CCND2 gen ifadesinin 3,52 kat, E2F4 gen ifadesinin 13,22 kat, BMI1 gen ifadesinin 4,48 kat, IGFBP5 gen ifadesinin 3,15 kat, MAP2K1 gen ifadesinin 7,97 kat, MAPK14 gen ifadesinin 7,70 kat, SOD1 gen ifadesinin 2,67 kat, DDB2 gen ifadesinin 5,72 kat, GADD45G gen ifadesinin 2,06 kat, PPP1R15A gen ifadesinin 4,84 kat, CDH2 gen

ifadesinin 2,27 kat, GSC gen ifadesinin 5,05 kat, KRT14 gen ifadesinin 4,74 kat, OCLN gen ifadesinin 11,43 kat, SNAI1 gen ifadesinin 6,48 kat, SNAI3 gen ifadesinin 9,16 kat, SLC2A1 gen ifadesinin 8,49 kat, COX5A gen ifadesinin 2,70 kat, G6PD gen ifadesinin 9,29 kat, PFKL gen ifadesinin 6,43 kat, TERF1 gen ifadesinin 3,00 kat, TERF2IP gen ifadesinin 5,41 kat, TNKS gen ifadesinin 6,30 kat arttığı; CASP2 gen ifadesinin 6,00 kat, NOL3 gen ifadesinin 2,34 kat, MKI67 gen ifadesinin 7,70 kat, SKP2 gen ekspresyonunun 7,29 kat, STMN1 gen ifadesinin 2,17 kat, IGFBP3 gen ifadesinin 3,19 kat, IGFBP7 gen ifadesinin 2,29 kat, TBX2 gen ifadesinin 2,80 kat, ERCC5 gen ifadesinin 2,49 kat, FOXC2 gen ifadesinin 2,82 kat, SOX10 gen ifadesinin 3,00 kat, CA9 gen ifadesinin 2,26 kat, ACLY gen ifadesinin 2,54 kat, ACSL4 gen ifadesinin 2,42 kat, ATP5F1A gen ifadesinin 2,01 kat, GPD2 gen ifadesinin 4,64 kat, UQCRFS1 gen ifadesinin 3,02 kat, PINX1 gen ifadesinin 3,93 kat azaldığı belirlenmiştir.

Omeprazol uygulaması sonrası gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde; ANGPT1 gen ekspresyonunun 4,82 kat, ANGPT2 gen ifadesinin 3,46 kat, FLT1 gen ekspresyonunun 7,89 kat, KDR gen eksp. 2,62 kat, PGF gen eksp. 7,21 kat, VEGFC gen ifadesinin 3,10 kat, CASP7 gen ifadesinin 2,89 kat, CASP9 gen ifadesinin 3,07 kat, E2F4 gen ifadesinin 4,20 kat, IGFBP5 gen ifadesinin 4,76 kat, MAP2K1 gen ifadesinin 4,47 kat, MAPK14 gen ekspresyonunun 4,79 kat, SERPINB2 gen ifadesinin 2,10 kat, DDB2 gen ifadesinin 2,69 kat, ERCC3 gen ifadesinin 4,00 kat, LIG4 gen ifadesinin 3,01 kat, PPP1R15A gen ifadesinin 6,32 kat, CDH2 gen ifadesinin 9,32 kat, GSC gen ifadesinin 2,79 kat, KRT14 gen ifadesinin 4,69 kat, OCLN gen ifadesinin 5,13 kat, SNAI1 gen ifadesinin 2,39 kat, SNAI2 gen ifadesinin 3,86 kat, SNAI3 gen ifadesinin 6,59 kat, LDHA gen ifadesinin 5,82 kat, SLC2A1 gen ifadesinin 4,63 kat, G6PD gen ifadesinin 9,92 kat, PFKL gen ifadesinin 2,93 kat, DKC1 gen ifadesinin 5,46 kat, TERF2IP gen ifadesinin 4,63 kat, TINF2 gen ifadesinin 3,01 kat, TNKS gen ifadesinin 4,92 kat arttığı; BCL2L11 gen ifadesinin 3,12 kat, XIAP gen ifadesinin 2,01 kat, MKI67 gen ifadesinin 4,50 kat, SKP2 gen ifadesinin kat, WEE1 gen ifadesinin 3,94 kat, FOXC2 gen ifadesinin 3,61 kat, CA9 gen ifadesinin 3,23 kat, ACLY gen ifadesinin 7,78 kat, ACSL4 gen ifadesinin 3,12 kat, ATP5F1A gen ifadesinin 3,41 kat, CPT2 en ifadesinin 2,25 kat, GPD2 gen ifadesinin 5,13 kat, PINX1 gen ifadesinin 2,77 kat, TEP1 gen ifadesinin 2,11 kat, TERF1 gen ifadesinin 4,79 kat, TNKS2 gen ifadesinin 5,24 kat azaldığı belirlenmiştir.

Doksorubisin ile Omeprazol aynı anda uygulanması sonrası gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; ANGPT1 gen ekspresyonunun 2,71 kat, CCL2 gen ifadesinin 2,08 kat, FLT1 gen ifadesinin 9,06 kat, KDR gen ifadesinin casp9 2,77 kat, PGF gen ekspresyonunun 2,77 kat, TEK gen ifadesinin 4,41 kat, VEGFC gen ifadesinin 2,91 kat, APAF1 gen ifadesinin 7,21 kat, BCL2L11 gen ifadesinin 3,34 kat, CASP9 gen ifadesinin 8,46 kat, NOL3 gen ifadesinin 2,71 kat, AURKA gen ifadesinin 3,51 kat, CCND2 gen ifadesinin 2,68 kat, STMN1 gen ifadesinin 2,48 kat, MAPK14 gen ifadesinin 4,63 kat, ERCC3 gen ifadesinin 3,36 kat, ERCC5 gen ifadesinin 2,55 kat, GADD45G gen ifadesinin 2,43 kat, PPP1R15A gen ifadesinin 3,01 kat, CDH2 gen ifadesinin 2,23 kat, KRT14 gen ifadesinin 6,73 kat, SNAI2 gen ifadesinin 3,84 kat, SNAI3 gen ifadesinin 3,86 kat, LPL gen ifadesinin 2,36 kat, DKC1 gen ifadesinin 2,51 kat, TERF1 gen ifadesinin 5,35 kat, TERF2IP gen ifadesinin 5,03 kat, TINF2 gen ifadesinin 5,06 kat, TNKS gen ifadesinin 7,26 kat arttığı; ANGPT2 gen ifadesinin 2,28 kat, FASLG gen ifadesinin 6,59 kat, XIAP gen ifadesinin 2,75 kat, CDC20 gen ifadesinin 6,36 kat, MCM2 gen ifadesinin 4,41 kat, SKP2 gen ifadesinin 3,73 kat, WEE1 gen ifadesinin 2,13 kat, ETS2 gen ifadesinin 3,71 kat, IGFBP3 gen ifadesinin 17,51 kat, MAP2K1 gen ifadesinin 6,45 kat, DDB2 gen ifadesinin 6,32 kat, FOXC2 gen ifadesinin 4,32 kat, GSC gen ifadesinin 3,07 kat, SOX10 gen ifadesinin 7,16 kat, CA9 gen ifadesinin 2,28 kat, HMOX1 gen ifadesinin 3,76 kat, LDHA gen ifadesinin 4,11 kat, ACLY gen ifadesinin 4,03 kat, ACSL4 gen ifadesinin 9,92 kat, ATP5F1A gen ifadesinin 14,93 kat, GPD2 gen ifadesinin 5,54 kat, UQCRFS1 gen ifadesinin 6,73 kat, PINX1 gen ifadesinin 4,53 kat, TEP1 gen ifadesinin 4,08 kat azaldığı belirlenmiştir.

4.2.2. Anlamlı Değişim Gösteren mRNA'ların Yer Aldığı Yolakların Belirlenmesi

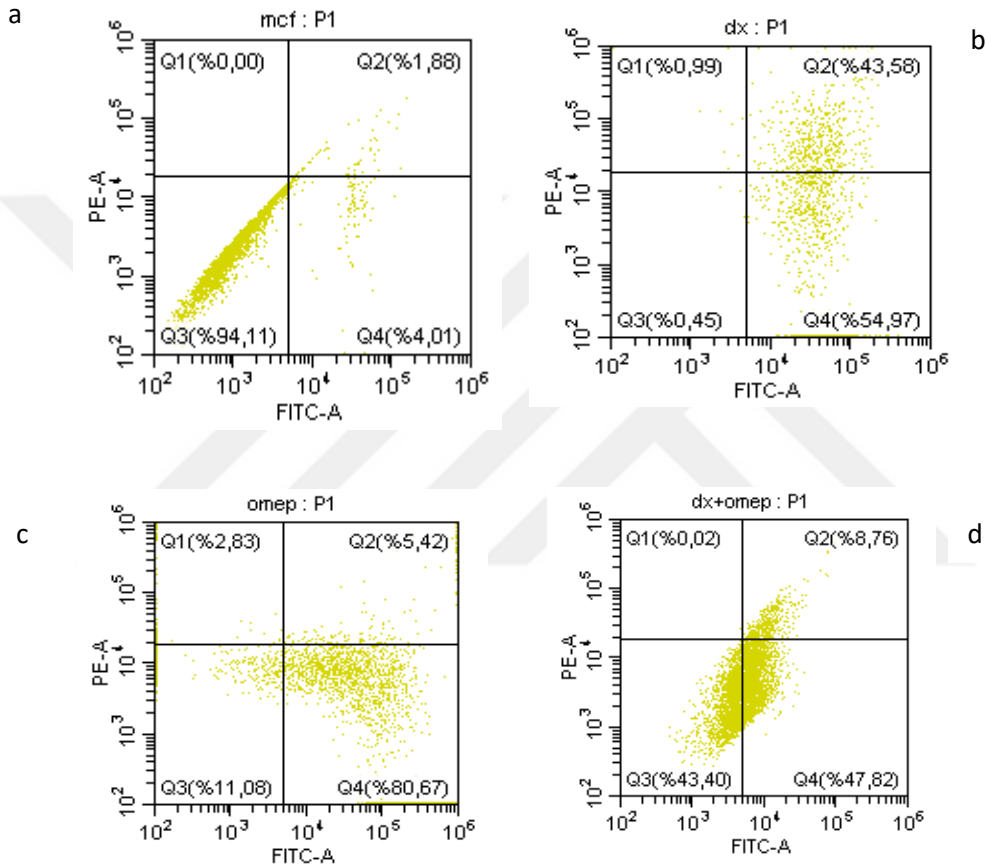
QPCR sonuçlarında anlamlı değişim gösteren mRNA'ların hangi yolakta rolü olduğunu belirlemek için Reactome programından yararlanılmıştır. QPCR konfirmasyonu yapılan 78 genden tanımlanmış yolaklarda ve metabolik olaylarda rol oynayanlar belirlenmiştir. Tablo 4.3.te Reactome programına göre anlamlı artan ve anlamlı azalan mRNA'ların yer aldığı yolaklar gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Dokсорubisin ve omeprazolün kombine uygulanmasıyla anlamlı artan ve azalan mRNA'ların yer aldığı yolaklar ve p değerleri

Pathway Name	Entities				Reactions	
	found	ratio	p-value	FDR	found	ratio
Interlukin-4 and Interleukin-13 signaling	6/211	0.015	1.86e-06	5.52e-04	3/47	0.003
Regulation of TP53 Expression	2/4	2.80e-04	2.54e-05	0.003	5/5	3.68e-04
Defective Intrinsic Pathway for Apoptosis	3/33	0.002	3.09e-05	0.003	2/24	0.002
Oncogene Induced Senescence	3/42	0.003	6.30e-05	0.005	9/19	0.001
Cytokine Signaling in Immune system	9/1,092	0.077	8.42e-05	0.005	12/708	0.052
RUNX1 regulates expression of components of tight junctions	2/8	5,61e-04	1.01e-04	0.005	2/6	4.42e-04
Signaling by Interleukins	7/643	0.045	1.16e-04	0.005	4/493	0.036
Transcriptional Regulation by TP53	6/487	0.034	2.02e-04	0.006	166/259	0.019
Unwinding of DNA	2/12	8.41e-04	2.27e-04	0.006	2/4	2.95e-04
Generic Transcription Pathway	10/1,555	0.109	2.39e-04	0.006	176/830	0.061
RNA Polymerase II Transcription	10/1,694	0.119	4.82e-04	0.012	176/891	0.066
TP53 Regulates Transcription of DNA Repair Genes	3/89	0.006	5.66e-04	0.012	12/17	0.001
Diseases of programmed cell death	3/90	0.006	5.85e-04	0.012	2/28	0.002
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G2 Cell Cycle Arrest	2/21	0.001	6.87e-04	0.013	6/11	8.10e-04
FOXO-mediated transcription of cell death genes	2/23	0.002	8.23e-04	0.015	2/15	0.001
Gene Expression (Transcription)	10/1,855	0.13	9.97e-04	0.017	176/1,006	0.074
Neurodegenerative Diseases	2/30	0.002	0.001	0.021	1/22	0.002
Deregulated CDK5 triggers multiple neurodegenerative pathways in Alzheimer's disease models	2/30	0.002	0.001	0.021	1/22	0.002
Cell Cycle Checkpoints	4/280	0.02	0.002	0.022	23/56	0.004
Loss of function of TP53 in cancer due to loss of tetramerization ability	1/1	7.01e-05	0.002	0.023	1/1	7.37e-05
Loss of function of TP53 in cancer	1/1	7.01e-05	0.002	0.023	1/1	7.37e-05
Activation of the pre-replicative complex	2/36	0.003	0.002	0.023	8/9	6.63e-04
DNA strand elongation	2/38	0.003	0.002	0.023	2/15	0.001
Activation of ATR in response to replication stress	2/39	0.003	0.002	0.023	2/9	6.63e-04

4.3. Dokсорubisin ve Omeprazol Uygulamasının MCF-7 Hücre Hattında Apoptoz Üzerine Etkisinin Anneksin V ile Değerlendirilmesi

MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine IC₅₀ dozlarında dokсорubisin ve omeprazol uygulamasının apoptoz üzerine etkisini belirlemek amacıyla Anneksin V yöntemi yapıldı. Sırasıyla 48 saatlik dozlar olan; 10.49 nM, 1.89 µM uygulanması sonucu hücrelerin toplanıp Anneksin V kiti kullanılarak yapılan deneyde doz uygulamasının hücre ölümü üzerine istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bulundu (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerine IC₅₀ konsantrasyonlarında 48 saatlik süre ile uygulanan dokсорubisin ve omeprazolün Anneksin V sonuçları. a: 48 saat madde uygulaması yapılmayan NT (kontrol) hücreler. b: 48 saat süre ile 10.49 nM dokсорubisin uygulaması. c: 48 saat süre ile 1.89 µM omeprazol uygulaması. d: 48 saat süre ile dokсорubisin ile omeprazol kombinasyonunun uygulaması sonucunda hücre ölümü oranının istatistiksel olarak karşılaştırılması (p=0.01)

Madde uygulaması sonrasında Anneksin V ile belirlenen toplam apoptoz miktarları Tablo 4.4. te verilmiştir.

Tablo 4.4. 48 saatlik uygulama sonrasında belirlenen toplam apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q2+Q4
MCF7/Kontrol	0.00	1.88	94.11	4.01	5.89
MCF7/Doksorubisin	0.99	43.58	0.45	54.97	98.55
MCF7/Omeprazol	2.83	5.42	11.08	80.67	86.09
MCF7/Dx+Omep	0.02	8.76	43.40	47.82	56.58

Q1: Nekrotik hücreler, **Q2:** Geç apoptotik hücreler, **Q3:** Canlı hücreler, **Q4:** Erken apoptotik hücreler, **Q2+Q4:** Erken ve geç apoptotik hücreler



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık görülen malign hastalık türüdür. Gelişmekte olan ülkelerde son birkaç yılda bu tip kanser insidansında artış görülmüştür. Günümüzde meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Filipova ve ark., 2014).

Öyleki meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda tüm yeni kanser tanılarının % 25'ini oluşturmaktadır (Atoum ve ark., 2020). Yaşam tarzının ve çevresel faktörlerin meme bezi kanserinin (yüksek yağlı diyet, alkol tüketimi, fiziksel egzersiz eksikliği) gelişimi üzerindeki etkisini gösteren çok sayıda kanıt vardır. Bunlar da hayat standardını önemli ölçüde etkilemektedir (Kolak ve ark., 2017).

Meme kanserine neden olan pek çok risk faktörü bulunmaktadır. Bu risk faktörleri; kadın olmak, ileri yaş, memede selim hastalık öyküsü , aile hikayesi/genetik faktörler , erken yaşta menarş olmak ve geç yaşta menopoza girmektir (Kapoor ve ark., 2021).

Dünyada her yıl 1.500.000'dan fazla kadın meme kanserine yakalanmaktadır. Buna karşın meme kanseri insidansı ve mortalite oranları dünya üzerinde ülkeden ülkeye değişkenlik göstermektedir (Sun ve ark., 2017).

Son yıllarda meme kanseri çağında çeşitli tedaviler ortaya çıkmıştır. Meme kanseri kök hücreleri (BCSC'ler), farklı tümörlerin saldırganlığında ana oyuncudur ve ayrıca bu hücreler kanser tedavisinde ana zorluktur. Ayrıca, etkili bir tedaviye ulaşmanın en büyük engeli, terapilere dirençtir. Meme kanseri (BC) hastaları için çeşitli tedavi yolları vardır. Geleneksel kemoterapi, antikor-ilaç konjugasyon sistemleri (ADC'ler), metronomik terapiler, nanopartiküller, meme kanseri kök hücreleri, immünoterapi gibi yeni yaklaşım tedavileri mevcuttur (Barzaman ve ark., 2020).

Son on yıl boyunca bu hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere pek çok ilaç geliştirilmiştir (Andre ve ark., 2004). Meme kanseri tedavisinde kullanılan başlıca antineoplastikler: dosetaksel, paklitaksel, sisplatin, karboplatin ve lipozomal doksorubisin (Doxil)'dir. Bununla birlikte metastatik meme kanseri ve ikincil kanser meme kanseri gelişimi durumunda kombine tedaviler daha çok tercih edilmektedir (Akram ve ark., 2017).

DOX için, topoizomeraz II enziminin inhibisyonunu ve DNA ve kanser hücresi ölümüne yol açan proteinler de dahil olmak üzere ana makromoleküllere zarar veren

serbest radikal mekanizmalarını içeren iyi kurulmuş etki mekanizmaları vardır (Kumar ve ark., 2021).

Doksorubisin (DOX), bir dizi kanserde geniş uygulanabilirliği ve lipozomal formda kullanım kolaylığı nedeniyle seçilmiştir. Orta dozlarda kansere karşı immün aktivasyon için faydalı olan tümörlerde immünojenik hücre ölümüne neden olma ek yararına sahiptir (Wu ve ark., 2020).

Çalışmamızda, MCF-7 meme kanseri hücrelerine farklı dozlarda doksorubisin ve bununla birlikte aynı hücrelere omeprazol verilerek, doksorubisinin ve omeprazolün apoptoz üzerine etkilerinin zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler ve dozlar arasındaki farklılıkları araştırıldı. Aynı zamanda doksorubisin ve omeprazolün birlikte MCF-7 hücre hattı üzerindeki sinerjetik etkisine bakıldı.

Hücrelere verilecek doksorubisin ve bununla birlikte verilecek olan omeprazol dozları MTT analizi ile belirlendi. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi, ilk olarak Mosmann tarafından uygulanmıştır.

Alley ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir (Mosmann, 1983).

MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir (Abe ve Matsuki, 2000).

MTT analizlerinde sitotoksik doz, kontrol grubuna göre % 50 absorbans azalmasına yol açan doksorubisin dozu tespit edildi. Doksorubisinin, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MCF7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkili olduğu belirlenen konsantrasyonlar sırasıyla 10.89, 10.49 ve 40.33 nM'dir.

Aynı çalışmamızda omeprazolün tek başına MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin MTT testi analizi sonuçlarında ise Omeprazolün, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkili olduğu belirlenen konsantrasyonlar sırasıyla 1.562, 1.89 ve 4.89 μ M'dir.

Klinik veya klinik olmayan çalışmalarda ünlü PPI türü omeprazol ile ilgili toksikogenetik etkileri gözlenmiştir. Omeprazolün: oksidatif etkileri mitokondriyal hasar, H₂O₂ ve serbest radikal üretimi; genotoksik etkileri, DNA hasarı ve eklentileri oluşturması; sitotoksik etkileri apoptotik p21 seviyesini ve hücrel asidifikasyonu arttırması, ROS üretimi, kaspaza bağımlı (apoptoz) ya da kaspazdan bağımsız ve otofajik hücre ölümünü tetikleme olarak belirlenmiştir. Tüm bunların yanında yapılan

pek çok çalışmalar ile omeprazolün antineoplastik etkinliği gösterilmiştir (Paz ve ark., 2020).

Bu sayede MTT analizi ile hücre sayısı da değerlendirildi. Çalışmada, hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı, 24, 48 ve 72 saat süreyle doksorubisin ile inkübe ettiğimiz MCF-7 hücrelerine uyguladığımız MTT analizi sonuçlarından tespit edildi.

MTT sonuçlarına göre MCF-7 meme kanseri hücrelerini 100-3.125 nM doksorubisin ile 24, 48 ve 72 saat süre ile inkübe edildi. Sonuçları kontrol grubuna göre karşılaştırıldı.

Bu tez çalışmasında; doksorubisin ve omeprazol kombinasyonunun MCF hücrelerinde sitotoksik etkileri araştırılmış ve antiproliferatif etkilerine göre hesaplanan CDI oranlarına göre sinerjistik/antagonistik etkileri değerlendirilmiştir.

MTT sonuçlarına göre, MCF-7 hücrelerine 12.5 nM konsantrasyondaki doksorubisin + omeprazol kombinasyon (12.5nM + 3µM) gruplarında, kontrole göre % hücre inhibisyon oranı %54.95; ilaç etkileşim katsayısı (CDI) ise 1.469613 olarak belirlenmiştir. Meme kanseri hücre hattı üzerinde (3.125 ,6.25, 12.5, 25, 50 µM) artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızdaki MTT sonuçlarına göre doksorubisinin 3.125 ,6.25, 12.5, 25, 50 µM konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde, antiproliferatif etkilerinin olduğu belirlenmiş olup, bu etkiyi artan konsantrasyona bağlı olarak en çok 50 µM konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan literatür taramalarında doksorubisinin omeprazol ile kombine uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ile ilgili önceden yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. Doksorubisinin omeprazol ile kombine uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Çalışmamızdaki sonuçlara göre doksorobisinin omeprazol ile kombin uygulamalarının hücre canlılıklarına bağlı CDI hesaplama sonuçlarına göre MCF-7 hücreleri üzerinde 12.5 nM konsantrasyonda sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir.

AHR sinyali ve ER sinyali arasında karmaşık bir konuşma vardır. Öyleki aktive edilmiş AHR sinyali, bir dizi farklı mekanizma yoluyla ER aktivitesini inhibe ederken, ERα'nın AHR sinyalleşmesinde pozitif bir rolü olduğu gösterilmiştir. AHR sinyalinin ERα sinyalini engellemesi: ERα gen anlatımını inhibe etme, ERα 'nın proteozomda yıkımını teşvik etme, ERα'nın düzenleyici mekanizmasını direkt DNA'ya bağlanarak

engelleme gibi farklı mekanizmalar ile olmaktadır (Matthews ve Gustafsson, 2006). Öyleki AHR agonistleri veya antagonistleri tümör tipine özgün antikanser ajanlardır. Üçlü negatif MDA-MB-231 hücrelerinde AHR'nin protoonkogen veya tümör baskılayıcı olduğunu gösteren zıt çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte hem ER+ hem de ER- meme kanseri hücrelerinde karşılaştırılabilir çalışmaları zıt sonuçlar vermektedir (Jin ve ark., 2014). Bununla birlikte omeprazol de dahil seçici AHR inhibitörlerinin MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığı çalışmada; omeprazolün CXCR4 ve MMP-9 anlatımlarının transkripsiyon seviyesinde inhibisyonu yoluyla meme kanseri hücrelerinin invazyonunu ve metastazını engellediği gösterilmiştir (Jin ve ark., 2015; Jin ve ark., 2014).

MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının kullanıldığı bir çalışmada omeprazolün de içinde olduğu üç PPI ajanının her birinin doksorubisin ile kombine kullanımının, tüm hücre hatlarında doksorubisin ile sinerjetik bir terapötik etkinliğe neden olduğu belirlenmiştir (Ihraiz ve ark., 2020).

İçerisinde yine omeprazolün de bulunduğu farklı PPI ajanlarının, MCF-7, T47D, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde, doksorubisin veya radyoterapi ile kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada, normal şartlarda DNA hasarı onarımını arttırarak ilaç ve radyoterapiye direnç sağlanmasına neden olan FASN'in anlatımının düşürülerek geleneksel terapilere duyarlılığın DNA onarımının inhibisyonu yoluyla arttırıldığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2021).

Çalışmamızda; MCF 7 meme kanseri hücre hattı üzerine IC50 dozlarında doksorubisin ve omeprazol uygulamasının apoptoz üzerine etkisini belirlemek amacıyla Anneksin V yöntemi yapıldı. Sırasıyla 48 saatlik dozlar olan; 10.49 nM, 1.89 µM uygulanması sonucu hücrelerin toplanıp Anneksin V kiti kullanılarak yapılan deneyde doz uygulamasının hücre ölümü üzerine istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu bulundu. Akım sitometri sonuçları değerlendirildiğinde, çalışmamızda kullandığımız proton pompa inhibitörü omeprazolün MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterildi. Doksorubisin ve omeprazol birlikte uygulanan hücrelerde ise apoptoz oranının yalnız doksorubisin ve yalnız omeprazol uygulanan durumlara göre daha yüksek olduğu gösterildi.

Canlı hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde; MCF-7 hücrelerine verilen 10.49 nM doksorubisinin ve 1.89 nM omeprazol kontrol grubuna göre canlı hücre sayısı ile 48. saatteki canlı hücre sayısı arasında oldukça fazla fark olduğu saptandı.

Geç apoptotik hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde; 48. saat sonunda hem kontrol grubunda hem de 10.49 µM doksorubisin ve 1.89 nM omeprazole verilen hücre gruplarında zamana bağlı olarak geç apoptozun arttığı gözlemlendi

Nekrotik hücre gruplarında ise, 1.89 nM omeprazol verilen MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak bir yüzde artışı gözlemlenirken, kontrol ve 10.49 µM doksorubisin verilen MCF-7 hücrelerinde ise zamana bağlı olarak düzenli bir yüzde artışı gözlemlenmemiştir. Özellikle hem 10.49 µM doksorubisin ve 1.89 nM omeprazol verilen MCF-7 hücrelerinde erken ve geç apoptozun zamana bağlı olarak artması, doksorubisin ve omeprazolün MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini açıklayabilir.

Doksorubisinin ve omeprazolün birlikte kullanıldığı hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde, 48 saat sonrasında hücre sayısında azalış, zamana bağlı olarak geç ve erken apoptozun artması MCF-7 hücrelerinde gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre soyuna farklı dozlarda doksorubisin ve bununla birlikte aynı hücrelere omeprazol verilerek, doksorubisinin ve omeprazolün apoptoz üzerine etkilerinin zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler ve dozlar arasındaki farklılıklar Anneksin V antikoru kullanarak Flow-Sitometrik olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda doksorubisin ve omeprazolün birlikte MCF-7 hücre hattı üzerindeki sinerjetik etkisine bakıldı.

Çalışmamızda doksorubisin ve omeprazolün ayrı ayrı ve aynı zamanda birlikte kombine kullanıldığı MCF-7 hücre hattı üzerindeki qPCR sonuçlarında anlamlı değişim gösteren mRNA'ların hangi yolakta rolü olduğu belirlenmiştir. qPCR konfirmasyonu yapılan 78 genden tanımlanmış yollarda ve metabolik olaylarda rol oynayanlar belirlenmiştir

Sonuç olarak doksorubisinin ve omeprazolün hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanımını doz artımı ve de zamana bağlı olarak da apoptozu indüklediği görülmektedir. Çalışmamızda omeprazol uyguladığımız MCF-7 hücrelerinde canlılık önemli ölçüde azalırken; apoptoz oranı ise artmıştır.

Son yıllarda yapılmış in vitro çalışmalara benzer sonuçlar aldığımız bu çalışmamız, doksorubisinin ve omeprazolün hem zaman, hem de doz artımı ile apoptotik etkilerinin ortaya konulmasında literatüre destek sağlamaktadır. Belirlenen bu özellikleriyle meme kanseri hastalarında diğer tedavilere ek olarak destek tedavi niteliğinde kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.

Bu alışma, doksorubisinin antikanser etkinliğini dūřuk dozlarda azaltılmış yan etkilerle artırmak için doksorubisin ile kombinasyon halinde omeprazol kullanımını teşvik etmeye yardımcı olabilir.



6. KAYNAKÇA

- Abe, K., & Matsuki, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res*, 38(4), 325-329. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(00\)00188-7](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(00)00188-7)
- AbuHammad, S., & Zihlif, M. (2013). Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, 101(4), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.11.009>
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50, 1-23. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- Alshammari, F. M., Reda, S. M., & Ghannam, M. M. (2017). Potential effects of gamma irradiation on the stability and therapeutic activity of anticancer drug, doxorubicin. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 10(2), 103-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jrras.2017.01.001>
- Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2018). Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18(1), 5-18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>
- Andre, F., Slimane, K., Bachelot, T., Dunant, A., Namer, M., Barrelier, A., Kabbaj, O., Spano, J. P., Marsiglia, H., & Rouzier, R. (2004). Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. *Journal of Clinical Oncology*, 22(16), 3302-3308. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.095>
- Aniogo, E. C., George, B. P. A., & Abrahamse, H. (2017). Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 17(8), 693-702. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1347505>
- Aslan, F. E., Gürkan, A. (2007). KADINLARDA MEME KANSERİ RİSK DÜZEYİ. *THE JOURNAL OF BREAST HEALTH*, 3, 63-68.
- Atoum, M. F., Alzoughool, F., & Al-Hourani, H. (2020). Linkage Between Obesity Leptin and Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*, 14, 1178223419898458. <https://doi.org/10.1177/1178223419898458>
- Banyai, L., Trexler, M., Kerekes, K., Csuka, O., & Patthy, L. (2021). Use of signals of positive and negative selection to distinguish cancer genes and passenger genes. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.59629>
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International immunopharmacology*, 84, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- Bates, J. P., Derakhshandeh, R., Jones, L., & Webb, T. J. (2018). Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 556. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3>
- Baudino, T. A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*, 12(1), 3-20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>
- Bhardwaj, P., Au, C. C., Benito-Martin, A., Ladumor, H., Oshchepkova, S., Moges, R., & Brown, K. A. (2019). Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 189, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.002>
- Bistoni, G., & Farhadi, J. (2015). Anatomy and physiology of the breast. *Plastic and reconstructive surgery: Approaches and techniques*, 477-485.

- Brown, L. C., Murphy, A. R., Lalonde, C. S., Subhedar, P. D., Miller, A. H., & Stevens, J. S. (2020). Posttraumatic stress disorder and breast cancer: Risk factors and the role of inflammation and endocrine function. *Cancer*, *126*(14), 3181-3191. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9069707/pdf/nihms-1798581.pdf>
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, *17*(7), 395-417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Chan, C. W. H., Law, B. M. H., So, W. K. W., Chow, K. M., & Waye, M. M. Y. (2017). Novel Strategies on Personalized Medicine for Breast Cancer Treatment: An Update. *Int J Mol Sci*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112423>
- Chlebowski, R. T., Chen, Z., Anderson, G. L., Rohan, T., Aragaki, A., Lane, D., Dolan, N. C., Paskett, E. D., McTiernan, A., Hubbell, F. A., Adams-Campbell, L. L., & Prentice, R. (2005). Ethnicity and Breast Cancer: Factors Influencing Differences in Incidence and Outcome. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *97*(6), 439-448. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji064>
- Comsa, S., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer research*, *35*(6), 3147-3154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026074>
- ÇABUK, D., DEMİR, M. V., YAYLACI, S., TEMİZ, T., & TAMER, A. (2014). Meme Kanseri Hastalarımızın Retrospektif Analizi [Makaleler]. *4*. <https://doi.org/https://dergipark.org.tr/tr/pub/smj/issue/11328/135395>
- ÇAKIR, B. Y. D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası [Review]. [https://dergipark.org.tr/en/pub/duvetfd\(1\), 7-18](https://dergipark.org.tr/en/pub/duvetfd(1), 7-18). <https://doi.org/https://dergipark.org.tr/en/pub/duvetfd/issue/31344/342253>
- D'Souza, M. S., O'Mahony, J., & Karkada, S. N. (2021). Effectiveness and meaningfulness of breast cancer survivorship and peer support for improving the quality of life of immigrant women: a mixed methods systematic review protocol. *Clinical Epidemiology and Global Health*, *10*, 100678. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.100678>
- D'arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, *43*(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, *5*(10), 2929. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656721/pdf/ajcr0005-2929.pdf>
- Damaskos, C., Garpis, N., Valsami, S., Kontos, M., Spartalis, E., Kalampokas, T., Kalampokas, E., Athanasiou, A., Moris, D., Daskalopoulou, A., Davakis, S., Tsourouflis, G., Kontzoglou, K., Perrea, D., Nikiteas, N., & Dimitroulis, D. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. *Anticancer Res*, *37*(1), 35-46. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11286>
- Darwiche, N. (2020). Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: An intimate affair. *American journal of cancer research*, *10*(7), 1954-1978. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407342/pdf/ajcr0010-1954.pdf>
- Deo, S. V. S., Sharma, J., & Kumar, S. (2022). GLOBOCAN 2020 Report on Global Cancer Burden: Challenges and Opportunities for Surgical Oncologists. *Ann Surg Oncol*, *29*(11), 6497-6500. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-12151-6>
- DeSantis, C. E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B. O., & Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality

- Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(10), 1495-1506.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0535>
- Dhankhar, R., Vyas, S. P., Jain, A. K., Arora, S., Rath, G., & Goyal, A. K. (2010). Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 38(5), 230-249.
<https://doi.org/10.3109/10731199.2010.494578>
- Dogan, N., & Toprak, D. (2014). Female breast cancer mortality rates in Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(18), 7569-7573.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.18.7569>
- Donar, G. B. (2021). *Türkiye’de Kanser İnsidansı ve Farkındalık Etkinlikleri ile Google Çevrimiçi Arama Hacmi Arasındaki İlişki: Retrospektif Bir Araştırma*.
<http://journal.acibadem.edu.tr/tr/download/article-file/1482569>
- Ellis, H., & Mahadevan, V. (2013). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 31(1), 11-14.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2012.10.018>
- ERGÜÇ, E. İ.-., & ORHAN, H. G.-. (2019). Östrojenle indüklenen meme kanseri, tedavi yaklaşımları ve melatoninin tedavideki rolü [Review Articles]. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 39(2), 113-128.
<https://doi.org/https://dergipark.org.tr/en/pub/hujpharm/issue/54286/683639>
- Ergül, M., & Ergül, M. (2018). Protein pump inhibitors esomeprazole and pantoprazole increase the chemosensitivity of Cml cells against imatinib. *Cumhuriyet Tıp Dergisi (ELEKTRONİK)*, 40(4), 351-355.
<https://doi.org/10.7197/223.vi.499367>
- Eyermann, C. E., Haley, J. D., & Alexandrova, E. M. (2021). The HSP-RTK-Akt axis mediates acquired resistance to Ganetespib in HER2-positive breast cancer. *Cell Death Dis*, 12(1), 126. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03414-3>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., & Luo, W. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
- Filipova, A., Seifrtova, M., Mokry, J., Dvorak, J., Rezacova, M., Filip, S., & Diaz-Garcia, D. (2014). Breast cancer and cancer stem cells: a mini-review. *Tumori Journal*, 100(4), 363-369.
https://journals.sagepub.com/doi/10.1700/1636.17886?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub Opubmed
- Fisusi, F. A., & Akala, E. O. (2019). Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(1), 1-15.
<https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>
- Fleisher, B., Brown, A. N., & Ait-Oudhia, S. (2017). Application of pharmacometrics and quantitative systems pharmacology to cancer therapy: The example of luminal a breast cancer. *Pharmacological Research*, 124, 20-33.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.015>
- Foulon, A., Theret, P., Rodat-Despoix, L., & Kischel, P. (2020). Beyond chemotherapies: recent strategies in breast cancer treatment. *Cancers*, 12(9), 2634. <https://doi.org/10.3390/cancers12092634>
- Garcia-Aranda, M., & Redondo, M. (2019). Immunotherapy: A Challenge of Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/cancers11121822>
- Giordano, S. H. (2018). Breast Cancer in Men. *N Engl J Med*, 378(24), 2311-2320.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1707939>

- Goldner, M., Pandolfi, N., Maciel, D., Lima, J., Sanches, S., & Pondé, N. (2021). Combined endocrine and targeted therapy in luminal breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(11), 1237-1251. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1960160>
- Guo, B., Huang, Z., Shi, Q., Middha, E., Xu, S., Li, L., Wu, M., Jiang, J., Hu, Q., & Fu, Z. (2020). Organic small molecule based photothermal agents with molecular rotors for malignant breast cancer therapy. *Advanced Functional Materials*, 30(5), 1907093. <https://doi.org/10.1002/adfm.201907093>.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134-1150. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- Hou, Y., Hu, Q., Huang, J., & Xiong, H. (2017). Omeprazole Inhibits Cell Proliferation and Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest through Up-regulating miR-203a-3p Expression in Barrett's Esophagus Cells. *Front Pharmacol*, 8, 968. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00968>
- Iacoviello, L., Bonaccio, M., de Gaetano, G., & Donati, M. B. (2020). Epidemiology of breast cancer, a paradigm of the “common soil” hypothesis. *Seminars in cancer biology*,
- IARC. (2020). *The top 10 causes of death*. <https://www.iarc.who.int/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>, Erişim Tarihi:7 Kasım 2023
- Ihraiz, W. G., Ahram, M., & Bardaweel, S. K. (2020). Proton pump inhibitors enhance chemosensitivity, promote apoptosis, and suppress migration of breast cancer cells. *Acta Pharm*, 70(2), 179-190. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0020>
- Jagadish, N., Agarwal, S., Gupta, N., Fatima, R., Devi, S., Kumar, V., Suri, V., Kumar, R., Suri, V., Sadasukhi, T. C., Gupta, A., Ansari, A. S., Lohiya, N. K., & Suri, A. (2016). Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) overexpression in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 35(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0425-9>
- Jin, U. H., Kim, S. B., & Safe, S. (2015). Omeprazole Inhibits Pancreatic Cancer Cell Invasion through a Nongenomic Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway. *Chem Res Toxicol*, 28(5), 907-918. <https://doi.org/10.1021/tx5005198>
- Jin, U. H., Lee, S. O., Pfent, C., & Safe, S. (2014). The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer*, 14, 498. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-498>
- Kaplan, M. A., BaŞAran, G., DemİRağ, G. G., GÜLer, N., EngİN, H., UzunoğLu, S., ÇUbukÇU, E., ÇİÇİN, İ., Uygun, K., SaİP, P., KesKİN, S., SalepÇİ, T., AydoğAn, F., DemİRkan, B., ÖZdemİR, F., & ÖZkan, M. (2011). Türkiye’de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. *Meme Sağlığı Dergisi*, 7(2), 109-117. <http://search/yayin/detay/128156>
- Kapoor, P. M., Mavaddat, N., Choudhury, P. P., Wilcox, A. N., Lindström, S., Behrens, S., Michailidou, K., Dennis, J., Bolla, M. K., & Wang, Q. (2021). Combined associations of a polygenic risk score and classical risk factors with breast cancer risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 113(3), 329-337. <https://doi.org/doi:10.1093/jnci/djaa056>
- Khan, G. N., Kim, E. J., Shin, T. S., & Lee, S. H. (2017). Azacytidine-induced chemosensitivity to doxorubicin in human breast cancer MCF7 Cells. *Anticancer research*, 37(5), 2355-2364. <https://doi.org/10.21873/anticanres.11573>

- Kimura, F., Ueda, A., Sato, E., Akimoto, J., Kaise, H., Yamada, K., Hosonaga, M., Kawai, Y., Teraoka, S., Okazaki, M., & Ishikawa, T. (2017). Hereditary breast cancer associated with Cowden syndrome-related PTEN mutation with Lhermitte-Duclos disease. *Surg Case Rep*, 3(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s40792-017-0355-6>
- Kolak, A., Kaminska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukielka-Budny, B., & Burdan, F. (2017). Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med*, 24(4), 549-553. <https://doi.org/10.26444/aaem/75943>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*, 40(11), 6009-6015. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14622>
- Kozan, R. T., V.Y. (2016). Türkiye’de Meme Kanseri Farkındalığı ve Tarama Programı. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4, 185-188.
- Kumar, A., Patel, S., Bhatkar, D., Sarode, S. C., & Sharma, N. K. (2021). A novel method to detect intracellular metabolite alterations in MCF-7 cells by doxorubicin induced cell death. *Metabolomics*, 17(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01755-2>
- Laloo, F., & Evans, D. G. (2012). Familial breast cancer. *Clin Genet*, 82(2), 105-114. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01859.x>
- Lee, Y. Y., Jeon, H. K., Hong, J. E., Cho, Y. J., Ryu, J. Y., Choi, J. J., Lee, S. H., Yoon, G., Kim, W. Y., Do, I. G., Kim, M. K., Kim, T. J., Choi, C. H., Lee, J. W., Bae, D. S., & Kim, B. G. (2015). Proton pump inhibitors enhance the effects of cytotoxic agents in chemoresistant epithelial ovarian carcinoma. *Oncotarget*, 6(33), 35040-35050. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5319>
- Lei, J., Wang, H., Zhu, D., Wan, Y., & Yin, L. (2020). Combined effects of avasimibe immunotherapy, doxorubicin chemotherapy, and metal–organic frameworks nanoparticles on breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4814-4823. <https://doi.org/DOI: 10.1002/jcp.29358>
- Lin, S. X., Chen, J., Mazumdar, M., Poirier, D., Wang, C., Azzi, A., & Zhou, M. (2010). Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol*, 6(9), 485-493. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.92>
- Liu, Z., Shi, A., Song, D., Han, B., Zhang, Z., Ma, L., Liu, D., & Fan, Z. (2017). Resistin confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells through autophagy induction. *American journal of cancer research*, 7 3, 574-583.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2011). Moleküler hücre biyolojisi. *Çeviri editörleri: Geçkil, H., Özmen, M., Yeşilada, Ö., Palme yayıncılık*, 6, 248-249.
- Lu, Z. N., Tian, B., & Guo, X. L. (2017). Repositioning of proton pump inhibitors in cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 80(5), 925-937. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3426-2>
- Luveta, J., Parks, R. M., Heery, D. M., Cheung, K. L., & Johnston, S. J. (2020). Invasive Lobular Breast Cancer as a Distinct Disease: Implications for Therapeutic Strategy. *Oncol Ther*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s40487-019-00105-0>
- Massardi, N. A. (2021). The Role of Estrogen in The Development of Breast Cancer. *Biomedical Journal of Indonesia*, 230-241. <https://doi.org/https://doi.org/10.32539/BJI.v7i2.280>

- Matthews, J., & Gustafsson, J.-Å. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear receptor signaling*, 4(1), 1-4. <https://doi.org/10.1621/nrs.04016>
- Mohammadian, M., Feizollahzadeh, S., Mahmoudi, R., Toofani Milani, A., Rezapour-Firouzi, S., & Karimi Douna, B. (2020). Hsp90 Inhibitor; NVP-AUY922 in Combination with Doxorubicin Induces Apoptosis and Downregulates VEGF in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev*, 21(6), 1773-1778. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.6.1773>
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 151-164.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nussbaum, R., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2015). *Thompson & Thompson genetics in medicine e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Orhan, E. İ., & Hande, G. (2019). Östrojenle indüklenen meme kanseri, tedavi yaklaşımları ve melatoninin tedavideki rolü [Review Articles]. 39, 113-128. <https://doi.org/https://dergipark.org.tr/en/pub/hujpharm/issue/54286/683639>
- Özmen, V., Özmen, T., & Doğru, V. (2019). Breast cancer in Turkey; an analysis of 20.000 patients with breast cancer. *European journal of breast health*, 15(3), 141. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6619786/pdf/ejbh-15-3-141.pdf>
- Pandya, S., & Moore, R. G. (2011). Breast development and anatomy. *Clinical obstetrics and gynecology*, 54(1), 91-95.
- Parida, S., & Sharma, D. (2020). Microbial Alterations and Risk Factors of Breast Cancer: Connections and Mechanistic Insights. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051091>
- Paškevičiūtė, M., & Petrikaitė, V. (2019). Proton pump inhibitors modulate doxorubicin and its liposomal form delivery into 2D and 3D cancer cell cultures. *Cancer Management and Research*, 11, 9761-9769.
- Paz, M., de Alencar, M., de Lima, R. M. P., Sobral, A. L. P., do Nascimento, G. T. M., Dos Reis, C. A., Coelho, M., do Nascimento, M., Gomes Junior, A. L., Machado, K. D. C., de Menezes, A. P. M., de Lima, R. M. T., de Oliveira Filho, J. W. G., Dias, A. C. S., Dos Reis, A. C., da Mata, A., Machado, S. A., Sousa, C. D. C., da Silva, F. C. C., . . . Melo Cavalcante, A. A. C. (2020). Pharmacological Effects and Toxicogenetic Impacts of Omeprazole: Genomic Instability and Cancer. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 3457890. <https://doi.org/10.1155/2020/3457890>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int J Oncol*, 49(2), 753-762. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558>
- Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>

- Punia, R., Raina, K., Agarwal, R., & Singh, R. P. (2017). Acacetin enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin in non-small-cell lung carcinoma cells. *PLoS One*, *12*(8), e0182870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182870>
- Rahner, N., & Steinke, V. (2008). Hereditary cancer syndromes. *Dtsch Arztebl Int*, *105*(41), 706-714. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0706>
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*, *10*(4), 853-858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Sakagami, H., Okudaira, N., Masuda, Y., Amano, O., Yokose, S., Kanda, Y., Suguro, M., Natori, T., Oizumi, H., & Oizumi, T. (2017). Induction of Apoptosis in Human Oral Keratinocyte by Doxorubicin. *Anticancer Res*, *37*(3), 1023-1029. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11412>
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadoy, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., Saghaforinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M. H., Liang, W. W., Foltz, S. M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., . . . Schultz, N. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, *173*(2), 321-337 e310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>
- Sauter, E. R. (2018). Breast cancer prevention: current approaches and future directions. *European journal of breast health*, *14*(2), 64-71. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2018.3978>
- Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., & Samadi, N. (2015). Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *5*(3), 351-359. <https://doi.org/doi:10.15171/apb.2015.049>
- Sharma, A., Boise, L. H., & Shanmugam, M. (2019). Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. *Cancers*, *11*(8), 1144. <https://doi.org/10.3390/cancers11081144>
- Sharma, R. (2021). Global, regional, national burden of breast cancer in 185 countries: evidence from GLOBOCAN 2018. *Breast Cancer Res Treat*, *187*(2), 557-567. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-06083-6>
- Shin, J. M., & Sachs, G. (2008). Pharmacology of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep*, *10*(6), 528-534. <https://doi.org/10.1007/s11894-008-0098-4>
- 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. *Int J Biol Sci*, *13*(11), 1387-1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2020). Breast cancer: a molecularly heterogenous disease needing subtype-specific treatments. *Medical Sciences*, *8*(1), 18. <https://doi.org/10.3390/medsci8010018>
- TÜRK, M., KOÇDOĞAN, A. K., OĞUZTÜZÜN, S., & ŞİMŞEK, G. G. (2020). MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soyunda Doksorubisin Öncesi ve Sonrası GST İzozimlerinin, İlaç Dirençlilik Proteinlerinin ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması [Makaleler]. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/igusabder>, *10*, 1-18. <https://doi.org/https://dergipark.org.tr/tr/pub/igusabder/issue/53551/631695>
- Udelnow, A., Kreyes, A., Ellinger, S., Landfester, K., Walther, P., Klapperstueck, T., Wohlrab, J., Henne-Bruns, D., Knippschild, U., & Wurl, P. (2011). Omeprazole inhibits proliferation and modulates autophagy in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, *6*(5), e20143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020143>
- Vanderhoff, B. T., & Tahboub, R. M. (2002). Proton pump inhibitors: an update. *Am Fam Physician*, *66*(2), 273-280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12152963>

- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *science*, 339(6127), 1546-1558. <https://doi.org/10.7554/eLife.59629>
- Vrbanec, T., Šket, P., Merzel, F., Smrkolj, M., & Grdadolnik, J. (2017). Spectroscopic Characterization of Omeprazole and Its Salts. *Spectroscopy*, 2017, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/6505706>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, C. J., Li, D., Danielson, J. A., Zhang, E. H., Dong, Z., Miller, K. D., Li, L., Zhang, J. T., & Liu, J. Y. (2021). Proton pump inhibitors suppress DNA damage repair and sensitize treatment resistance in breast cancer by targeting fatty acid synthase. *Cancer Lett*, 509, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.03.026>
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*, 51(6), 2647-2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- Wang, M., Zhang, C., Song, Y., Wang, Z., Wang, Y., Luo, F., Xu, Y., Zhao, Y., Wu, Z., & Xu, Y. (2017). Mechanism of immune evasion in breast cancer. *Onco Targets Ther*, 10, 1561-1573. <https://doi.org/10.2147/OTT.S126424>
- Wu, D., Pusuluri, A., Vogus, D., Krishnan, V., Shields IV, C. W., Kim, J., Razmi, A., & Mitragotri, S. (2020). Design principles of drug combinations for chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 323, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.018>
- Yager, J. D., & Chen, J. Q. (2007). Mitochondrial estrogen receptors – new insights into specific functions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(3), 89-91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.02.006>
- Yue, W., Wang, J. P., Li, Y., Fan, P., Liu, G., Zhang, N., Conaway, M., Wang, H., Korach, K. S., & Bocchinfuso, W. (2010). Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *International journal of cancer*, 127(8), 1748-1757. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775086/pdf/nihms762539.pdf>
- Yue, W., Yager, J. D., Wang, J. P., Jupe, E. R., & Santen, R. J. (2013). Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*, 78(2), 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.001>
- Zhang, J. L., Liu, M., Yang, Q., Lin, S. Y., Shan, H. B., Wang, H. Y., & Xu, G. L. (2017). Effects of omeprazole in improving concurrent chemoradiotherapy efficacy in rectal cancer. *World J Gastroenterol*, 23(14), 2575-2584. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i14.2575>

EK-1

Kongre Katılım Belgesi





ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı:	Şeyma SAĞIR
Uyruğu:	T.C.
Orcid Numarası:	0009-0002-5983-8070

EĞİTİM BİLGİLERİ	
Lisans	
Üniversite:	Necmettin Erbakan Üniversitesi
Fakülte:	Fen Fakültesi
Bölümü:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı:	2017
Yüksek Lisans	
Üniversite:	Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü:	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı:	2023

Tezden Üretilen Makaleler ve Bildiriler	
Uluslararası Konferans ve Sempozyumlarda Sunulan Bildiriler	
<p>SAĞIR, Ş., TUTAR, Y., TUTAR, L. ve YENİLMEZ, E. N., “Doksorubisinin MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Araştırılması”, 3rd International Graduate Studies Congress, 14-17 June, Balıkesir, (2023) (Sözlü Sunum)</p>	
Ulusal Konferans ve Sempozyumlarda Sunulan Bildiriler	
<p>SAĞIR, Ş., YALÇIN AZARKAN S. et al., “ In silico analysis and 3D modelling of changes in protein structure of cytochrome-c oxidase-I gene mutations in cervical cancer”, III. Yaşam Bilimleri Kongresi, 23-24 Şubat, Kayseri (2018) (Poster Sunumu) (Yayın No:7189965)</p>	
<p>SAĞIR. Ş., TUTAR, Y., TUTAR, L. ve YENİLMEZ, E. N., “Omeprazolün MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Araştırılması”, 25.Ulusal Biyoloji Kongresi, 13-15 Temmuz, İzmir (2023) (Poster Sunumu)</p>	