

T.C.



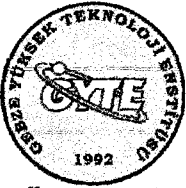
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KERSETİN'İN MEME KANSERİ
HÜCRELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Erol DÜLGER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr Asuman DEMİROĞLU

GEBZE
2005



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU



Erol DÜLGER'in tez çalışması, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25.07.2005 Tarih ve 2005/1/26 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU (G.Y.T.E.)

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Can M. ERİŞTİ (G.Y.T.E.)

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Eser KILIÇ (Erciyes Ü.)

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.11.2005 Tarih ve 2005/1/39 sayılı kararı.





ÖZET

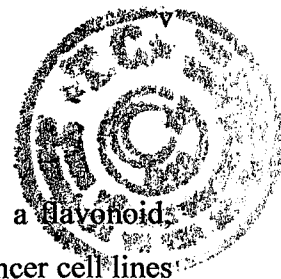
Bu çalışmada, bir flavonoid olan Kersetin ile bir Aromataz inhibitörü olan Arimideks'in, meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve T47-D hücreleri üzerindeki doz ve zamana bağlı etkileri araştırıldı. Kersetin'in 5-200 μ M konsantrasyonlarının, Arimideks'in 5-100 μ g/ml konsantrasyonlarının ve Kersetin'in 5-50 μ M dozlarına/ Arimideks'in 50 ve 100 μ g/ml dozu ilave edilerek oluşturulan kombinasyonunun 24, 48, 72 ve 96 saatlerde MCF-7 ve T47-D hücre hatlarına uygulanarak hücre proliferasyonuna ve apoptosise etkileri, MTS kiti ve DNA Laddening yöntemleri kullanılarak incelendi.

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, 100-200 μ M Kersetin konsantrasyonunda, MCF-7 hücrelerinde 72. saatten sonra, T47-D hücrelerinde ise 48. saatten sonra hücre proliferasyonunu yavaşlatıcı ve/veya durdurucu olduğu gözlenmiştir. Bu durum T47-D hücrelerinin, MCF-7 hücrelerine göre Kersetin'e daha duyarlı olduğunu işaret edebilir.

Arimideks 5-50 μ g/ml konsantrasyonları, MCF-7 hücrelerinde 0-96. saatleri arasında hücre proliferasyonunu arttırırken, 100 μ g/ml uygulamada ise 72. saatten sonra yavaşlatıcı veya durdurucu etki gözlemledik. Bu durum T47-D hücrelerinde ise 10, 50 ve 100 μ g/ml konsantrasyonlarda 48. saatten sonra gözlenmiştir.

Kesretin/Arimideks kombinasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin, MCF-7 hücrelerinde arttırıcı olduğu, T47-D hücrelerinde 72-96 saatler arasında azaltıcı/durdurucu olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlar T47-D hücrelerinin bu kombinasyonlara daha duyarlı olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca her iki hücre çeşidinde de Kersetin'in hücre proliferasyonunu arttırırken 0-24. saatleri arasında apoptosise neden olduğunu ve bu etkinin kombinasyon uygulamalarında arttığını gözlemledik.

SUMMARY



In this study, the dose and time-dependent effects of Quercetin, a flavonoid, and Arimideks, an aromatase inhibitor, were examined on mammary cancer cell lines MCF-7 and T47-D. The effects of 5-200 μ M concentrations of Quercetin, 5-100 μ g/ml concentrations of Arimidex and different combinations of both (50 and 100 μ g/ml doses of Arimidex was added to 5 and 50 μ M concentrations of Quercetin) on cell proliferation and apoptosis in MCF-7 and T47-D cell lines were evaluated by using MTS kit and DNA Laddening methods.

5-50 μ M concentrations of Quercetin increased cell proliferation in MCF-7 and T47-D cells in dose and time-dependent manner. In addition, 100-200 μ M concentrations of Quercetin decreased the cell proliferation of MCF-7 and T47-D cells after 72. and 48. hours, respectively. This result shows the higher sensitivity of the T47-D cells to Quercetin.

Although the cell proliferation of MCF-7 cells was increased at 5-50 μ g/ml concentrations of Arimidex during 0-96. hours, 100 μ g/ml concentrations of Arimidex decreased or stopped the cell proliferation after 72. hour. A decline in the cell proliferation of T47-D cells was seen at 10-50 and 100 μ g/ml concentrations of Arimidex after 48. hours.

The effect of Quercetin-Arimidex combinations on cell proliferation was inhibitory on T47-D cells between 72-96. hours and stimulatory on MCF-7 cells. These results indicate that T47-D cells were more susceptible to the combinations of both agents. While Quercetin increased the cell proliferation, it caused apoptosis during 0-24. hours in both cell lines and we observed that the apoptotic effect of Quercetin was increased in combinations with arimidex.



K.T.Ü. F.E.F. Bölümü öğrencilerinden

olan ve 1998 yılında aramıza anı ayrılan

Bünyamin ÖZLÜ

arkadaşımıza ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasını yapma imkanımı sağladığı için, tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımım sırasında da desteğiyle bana yol göstermekteki azmi ve sabrı için tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU'na tekrar teşekkürler eder, saygılarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarında dikkatimden kaçan konularda, beni uyarak yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Nil Saydan'a, tezimin son şeklini almasında bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Can Murat Erişti'ye ve Yrd. Doç. Dr. Eser KILIÇ'a ayrıca çalışmamızda kullandığımız hücreleri sağladığı için Londra Üniversitesi, ICSM, Jinekoloji Bölümünden Dr. Roger WHITE'a da ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen arkadaşlarımdan; Alper ALDENİZ'e; Abdullah SARRAÇ'a; Aydın DEMİRDAĞ'a; Necmeddin GÜNAY'a; Sami AKSOY'a; Yusuf BİLGİN'e; Zekiye KARAKAYA'ya ve laboratuvar arkadaşlarıma tek tek teşekkür ederim.

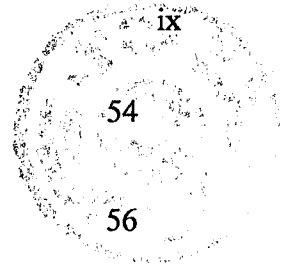
Tüm hayatım boyunca her türlü maddi ve manevi destekleri ile karşılık beklemeden benim bugünlere gelmemi sağlayan ve fedakarlıklarını bu zamana kadar da hiç esirgemeyen beni seven, sevgili Aileme en derin saygı ve teşekkürlerimi sunmayı kendime bir borç bilirim...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Kanser	2
1.1.1. Kanser Oluşumu	3
1.1.1.1. Radyasyon	4
1.1.1.2. Kimyasallar	5
1.1.1.3. Virüsler	7
1.1.1.4. Kanser Genleri	7
1.2. Meme Kanseri Nedir?	8
1.2.1. Epidemiyoloji	9
1.2.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri	9
1.2.3. Meme Kanseri Patolojisi	11
1.2.4. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler	11
1.3. Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi	11
1.3.1. Meme Kanserin’de Protoonkogenler ve Onkogenler	11
1.3.2. Meme Kanseri’nde Tümör Baskılayıcı Genler	12
1.3.3. Meme Kanseri ve Apoptosis	14
1.4. Meme Kanserinin Tedavisi	15
1.4.1. Operasyon	15
1.4.2. Kemoterapi	15
1.4.3. Radyoterapi	17
1.4.4. Fotodinamik Tedavi	18
1.5. Kersetin	19

1.5.2. Kersetin'in Moleküler Yapısı ve Diğer Flavonoidler ile İlişkisi	19
1.6. Arimideks	21
1.6.1. Aromataz	21
1.6.2. Aromataz İnhibitörleri	24
1.6.3. Aromataz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması	24
1.6.4. Arimideks'in Moleküler Yapısı ve Diğer Aromataz İnhibitörleri ile ilişkisi	25
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	29
3. MATERYAL ve METOD	37
3.1. Hücre Kültürü	37
3.1.1. Hücre Kültürü Büyüme Ortamı	37
3.1.2. Hücre Saklama	38
3.2. Hücre Sayımı	38
3.2.1. Tripan Mavisi Boyama	38
3.2.2. MTS	38
3.3. DNA Laddering	39
3.4. Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi	39
3.4.1. MCF-7 Hücreleri	40
3.4.2. T47-D Hücreleri	41
3.5. Hazırlanan Solüsyonlar	42
3.5.1. Hücre Kültürü için Hazırlanan Solüsyonlar	42
3.5.2. Kersetin ve Arimideks'in hazırlanması	43
3.5.3. DNA Laddering İçin Hazırlanan Solüsyonlar	44
3.6. Kullanılan Kimyasallar	46
3.7. Kullanılan Cihazlar	46
4. BULGULAR	47
4.1. Hücre Büyüme Eğrisi'nin Belirlenmesi	47
4.1.1. Tripan Mavisi Boyama ile Büyüme Eğrisi	47
4.1.2. MTS Kiti ile Büyüme Eğrisi	48
4.2. Kersetin'in Etkisi'nin Belirlenmesi	51
4.2.1. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisi	51
4.2.2. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kersetin'in Apoptotik etkisi	53



4.2.3. Kersetin'in Etkisinin Morfolojik İncelenmesi	
4.2.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Kersetin'in Etkilerinin Görüntülenmesi	54
4.2.3.2. T47-D Hücrelerinde Kersetin'in Etkilerinin Görüntülenmesi	56
4.3. Arimideks'in Etkisi'nin Belirlenmesi	61
4.3.1. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Arimideks'in Hücre proliferasyonuna Etkileri	66
4.4. Kersetin ve Arimideks Kombinasyonunun Etkisi'nin Belirlenmesi	68
4.4.1. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kombinasyonunun Proliferatif Etkisi	68
4.4.2. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kombinasyonunun Apoptosise Etkisi	71
4.4.3. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kombinasyonunun Etkisinin Morfolojik İncelenmesi	72
4.4.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Kombinasyonun Etkilerinin Görüntülenmesi	73
4.4.3.2. T47-D Hücrelerinde Kombinasyonun Etkilerinin Görüntülenmesi	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	99



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Akt: Protein kinase B

ATAC: Arimideks, Tamoxifen Alone in Combination

ATCC: American Type Culture Collection

Bax: Bcl-2 associated x protein

Bcl 2: B-cell lymphoma 2

BP: Binding protein

BRCA: Breast cancer susceptibility gene

CO₂: Karbon dioksit

COMT: Catechol-o-methyl-transferase

COX-2: Cyclooxygenase-2

dH₂O: Distile su

DISC: Death-inducing signaling complex

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit.

DNA: Deoksiribonükleik asit

EBV: Epstein-barr virüs

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ER-: Östrojen reseptör negatif

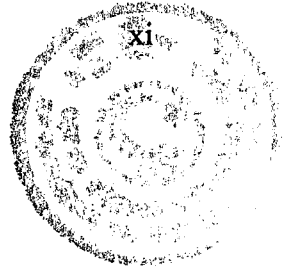
ER: Östrojen reseptörü

ER+ : Östrojen reseptör pozitif

ErbB2, ErbB3: Avian erythroblastosis-ES-4

FADD: Fas-associated death domain

FBS: Fetal Bovine (sığır) serum



FDT/PDT: Fotodinamik tedavi

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HeLa: Uterine cervical carcinoma

HER-2/neu: Human epidermal growth factor receptor-2

HL-60: Promyelocytic leukemia cell line

HP: Hücre proliferasyonu

HPB-ALL: Akut lenfoblastik lenfoma

Hsp: Heat shock proteins

IGFBP: İnsulin benzeri büyüme faktör bağlanma proteinleri

IR: İyonize radyasyon

kDa: Kilo dalton

Kersetin: 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone

Lag: Durağan (faz)

LH: Lüteinleştirici hormon

Log: Logaritmik (faz)

LOH: Loss of genetic heterozygosity

MCF-7: Human mammary cancer cells

MMTV: Mouse mammary tumor virus

MRM: Modifiye Radikal Mastektomi

myc: Avian myeloblastosis

NaAc: Sodyum Asetat

NaHCO₃: Sodyum bi karbonat

PARP: Poly (ADP-riboz) polimeraz

PBS: Phosphate Buffer Saline

PGE₂: Prostaglandin E2

PKC: Protein kinaz C

PR: Progesteron reseptörü

Radda: Emilen radyasyonun ölçü birimi

Rb: Retinoblastoma; çocuklarda görülen göz kanseridir.

SDS: Sodyum didosil sülfat

SFM: Serum Free Medium

SV40: Simian virüs 40.

T47-D: Human breast cancer cell lines

TPK: Tirozin protein kinaz

UV: Ultra viole

WNT7B: Wingless-related Mouse mammary tumor virus



ŞEKİLLER DİZİNİ



Sekil

Sayfa

1.1. Kersetin'in kimyasal yapısı	20
1.2. Östrodiol'ü genotoksik metabolitlere götüren biyokimyasal patikalar	23
1.3. Aromataz inhibitörünün ve tamoksifen'in karşılaştırılmalı etki mekanizması	24
1.4. Arimideks'in kimyasal yapısı	25
1.5. Aromataz inhibitörlerinin adjuvant uygulamalardaki şematik gösterimi	26
2.1. A) K562 lösemi hücrelerinde Kersetinin etkisi sonucunda meydana gelen kromozomal DNA fragmentasyonu B) İnsan lösemi hücrelerindeki Kersetin'in meydana getirdiği DNA fragmentinin yüzdesi	30
3.1. MCF-7 Hücrelerinin genel görünüşü	40
3.2. MCF-7 Hücrelerinin ATCC'den alınan genel görünüşü	41
3.3. T47-D Hücrelerinin genel görünüşü	41
3.4. T47-D Hücrelerinin ATCC'den alınan genel görünüşü	42
4.1. Tripan mavisi boyama ile (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücresi büyüme eğrileri.	48
4.2. MTS kiti ile (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücresi büyüme eğrileri	50
4.3. (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücrelerinde Kersetin'in Kontrol, 5, 10 ve 50 μ M'luk dozlarının etkisi	52
4.4. (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücrelerinde Kersetin'in Kontrol, 50, 100, 150 ve 2000 μ M'luk dozlarda uygulanması	53
4.5. DNA Laddering yöntemi ile Kersetin'in 5, 50 ve μ M'luk dozlarının hücreler üzerine etkileri	54
4.6. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 0. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	56
4.7. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	57
4.8. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 48. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi	58

4.9. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 72. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	60
4.10.MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 96. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi	61
4.11.T47-D hücrelerinde Kersetin'in 0. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	62
4.12.T47-D hücrelerinde Kersetin'in 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	63
4.13.T47-D hücrelerinde Kersetin'in 48. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	64
4.14.T47-D hücrelerinde Kersetin'in 72. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	65
4.15.T47-D hücrelerinde Kersetin'in 96. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi	67
4.16. (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücrelerinde Arimideks'in Kontrol, 5, 10, 50 ve 100µg/ml'lik dozlarda uygulanması.	69
4.16.(A) MCF-7 ve (B) T47-D Kersetin Kontrol, 5, 10 ve 50 µM'lık dozlarına Arimideks'in 50µg/ml dozunun eklenmesi ile oluşturulan kombinasyonun uygulanması.	70
4.17.(A) MCF-7 ve (B) T47-D Kersetin Kontrol, 5, 10 ve 50 µM'lık dozlarına Arimideks'in 100 µg/ml dozunun eklenmesi ile oluşturulan kombinasyonun uygulanması.	71
4.18.DNA Laddering yöntemi ile Kersetin/Arimideks kombinasyonun hücreler üzerine etkileri	73
4.20. MCF-7 hücrelerinde Kersetin ve Arimideks kombinasyonu'nun 0 ve 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi	74
4.21. T47-D hücrelerinde Kersetin ve Arimideks kombinasyonu'nun 0 ve 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

1.1. Türkiye’de kadınlarda görülen kanser türleri	9
1.2. Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılması	24
1.3. Adjuvant tedavide aromataz inhibitörleri	26
1.4. Metastatik durumda aromataz inhibitörlerinin megestrol asetat’la karşılaştırılması	27
1.5. Metastatik durumda aromataz inhibitörlerinin tamoksifen’le karşılaştırılması	27

1. GİRİŞ

Kanser; genetik ve çevresel faktörler arasındaki ilişkinin bir sonucudur. Bu kapsamda beslenme alışkanlığı kanser oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Russo *et al.*, 1999). Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsünün araştırmalarına göre doğru beslenmenin kanser riskini %20 azalttığı belirtilmiştir (World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 1997). Son yıllarda araştırmacılar diyetle bulunan, besleyici olmayan ve kanser gibi yıkıcı hastalıkların oluşumunu engelleyebilen bileşikler üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmıştır (Russo *et al.*, 1999). Stavic 1994'e göre bu molekülleri kimyasal engelleyiciler olarak adlandırarak bir sınıfta toplamaktadır. Bu sınıfta bazı vitaminler (C ve E vitamini) ve yiyeceklerdeki gıda polifenoller yer almaktadır. Flavonoid sınıfı, sebze, meyve ile çay ve şarap gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik antioksidanlardır (Middleton and Kandaswami, 1993). Yapılan birçok epidemiyolojik ve moleküler çalışma diyetle birlikte alınan flavonoidlerin bazı kanser tiplerinin oluşumunu azaltabileceğini göstermektedir (Kuo, 1997; Garcia-Closas *et al.*, 1999).

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) besinlerle vücuda alınan en önemli flavanoidlerden biridir. Elma, soğan siyah ve yeşil çay ve şarap gibi içeceklerde bolca bulunmaktadır (Middleton and Kandaswami, 1993; Lombard *et al.*, 2005). Bu molekülün insan kanserlerinden elde edilen çeşitli hatlarının büyümesini engellediği rapor edilmiştir (Avila *et al.*, 1994; Ferrandina *et al.*, 1998).

Kersetin'in kolon (bağırsak) kanser hücreleri üzerinde büyümeyi önleyici ve apoptosis mekanizmaları üzerine araştırmalarında Kersetin'in insan kolon kanseri hücrelerinde apoptosise yol açtığını ve hücre büyümesini yavaşlattığını belirtmişlerdir (Kim *et al.*, 2005). Bununla birlikte, yapılan diğer çalışmalarda Kersetin'in farklı hücre tiplerinde hem yararlı, hem zararlı etkilerini gözlemlemişlerdir. Örneğin, Kersetin'in hidrojen peroksit ile uyarılan oksidatif strese maruz kalan hücreler üzerinde koruyucu bir potansiyel etkiye sahip olduğunu Oyama *et al.*, 1999 ve Rzymowska *et al.*, 1999 fakat Rong *et al.*, 2000'de Kersetin uygulamalarının farklı sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle Kersetin'in hücreler üzerindeki etkisi hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Kadınlarda, yumurtalıklardan salgılanan steroid yapıdaki östrojen hormonu; genotoksik metabolitlere dönüştürülebilmekte ve böylece meme kanserine sebep

olabilmektedir öyle ki kadınlarda östradiol (östrojen vücutta; östron, östriol ve östradiol formlarında bulunmaktadır) aromatoz enzimi üzerinden meme dokusunda sentezlenmektedir (Crews *et al.*, 1996). Aromataz enziminin aşırı ekspresyonu nedeniyle östrojen, meme dokusunun kanserleşmesine neden olabilmekte ve bununla ilgili olarak da aromatazı aşırı eksprese eden transgenik fare ve kemirgen modellerinde kanser ile aromataz arasında ilişki bulunmuştur (Santen *et al.*, 1999). Bu verilere dayanarak aromataz inhibitörlerinin meme kanserini önlemedeki potansiyel etkileri günümüzde ilgi uyandırmaktadır (Santen *et al.*, 1999).

Aromataz inhibitörleri ile birlikte yapılan farmakolojik yaklaşımlar östrojen sentezini önlemede etkin olmaktadır. 1973 yılında birkaç aromataz inhibitörü bulunmuştur. Aromatoz inhibitörlerinin kapsadığı bileşenler *in vivo* da östrojen sentezini yavaşlatmış ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda tümör oluşumunu zayıflatmıştır (Freedman *et al.*, 2005).

Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılmasında, steroid yapıda olup olmamaları dikkate alınmıştır. Bu inhibitörlerde bulunduğu zamanlara göre birinci kuşak, ikinci kuşak ve üçüncü kuşak şeklinde gruplandırılmaktadır. Arimideks bu aromataz inhibitörlerinin steroid yapıda olmayan üçüncü kuşak kısmına girmektedir (Freedman *et al.*, 2005).

Bu çalışmamızda, hücre kültürü ve moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak meme kanseri hücrelerinde, Kersetin, Arimideks ve Kersetin/Arimideks kombinasyonu'nun çeşitli dozları; doza ve zamana bağlı olarak, hücre proliferasyonu (HP) ve apoptosis üzerine etkileri araştırılmıştır.

1.1. Kanser

Kanser, Eski Mısır'dan beri bilinmesine rağmen yaklaşık 200 yıl önce tanımlanabilmiştir (Singer and Grunberger, 1983).

Kanser, çevredeki dokuları işgal etmeye yönelmiş, kontrolsüz hücre büyümesi ve vücudun diğer organlarına yayılma (metastaz) ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Bazen kullanılan çeşitli tanımlar çelişki yaratmaktadır. Kanser, tümör ve neoplasma terimleri birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Neoplasm, büyümenin doğasını tanımlamaksızın her hangi bir yeni büyümeye verilen isimdir. Tümör kelimesi ise hem zararlı hem de zararsız büyümelerin her ikisi içinde kullanılmaktadır (Artner, 2001)

1.1.1. Kanser Oluşumu

Kanserin oluşum süreci Karsinogenez olarak isimlendirilir. Karsinogenez, hücrelerde önemli düzenleyici yollardaki hataların birikmesinden kaynaklanan, çok basamaklı bir mekanizmadır. Tek hücrede başlar (klonal), çoğalır ve komşularına göre ona yaşamsal avantajlar sağlayan ilave değişiklikler geçirir. Bu değişmiş hücreler, kanser oluşturmak için pek çok hücre üretecek kadar çoğalmak durumundadır. Yaşam süresince meydana gelebilecek hataların birikmesiyle oluştuğu düşünülürse, kansere yakalanma riskinin yaşla orantılı olduğu düşünülebilir. Bununla beraber, erken yaşta görülen kanserlerde vardır. Örneğin retinoblastoma (göz kanseri) ve leukaemia (kan kanseri) kanserleri gibi (King, 2000).

Yaş faktörünün yanısına kanserin oluşumunda yaşam tarzıda önem taşımaktadır. Kanserin etiyojisine baktığımızda, Meme ve prostat kanseri batı ülkelerinde daha yaygın iken Çin gibi ülkelerde ise rahim ağzı ve mide kanseri daha çok görülmektedir. Kanser oluşumunda çevresel faktörlerin daha fazla önemi olmasıyla birlikte bazı kanser tipleri hatta alt tipleri genetik olarak tanımlanır. Örneğin, kolon kanserlerinin çoğu kalıtsal özellikte değildir bununla beraber üç farklı tipi genetik özelliklerin kalıtılması ile oluşmaktadır (King, 1997).

Karsinogenez süresince hücrelerde hataların birikimi devam eder, ilerledikçe kanser hücreleri davranışlarını değiştirmeyi sürdürürler. Örneğin meme kanseri hücreleri başlangıçta normalde hormonlara duyarlı iken daha sonra duyarsız hale gelir. Hücrelerdeki genetik tutarsızlık artmaya devam eder, hücre aşırı büyümeye doğru bir eğilim göstererek diğer hücrelerin farklılaştığı yapıdan uzaklaşır (King, 2000).

Bazı dokular, örneğin epitel dokular kanser oluşumuna daha fazla eğilimlidirler (Masood and Kameh, 2003). Cinsiyete bağlı olarak da farklı kanser türleri görülür, kadınlarda ovaryum ve rahim ağzı kanserleri görülür iken erkeklerde prostat kanseri görülmektedir. Tüm kanserlerin sadece %5'ni oluşturan ağız ve deri kanserlerinin her ikisi de hızlı bir şekilde çoğalan hücreleri içermektedir. Oysa kadınlarda en yaygın kanser olan meme kanseri yavaş bir şekilde çoğalmaktadır (Parkin, 1998). Pek çok normal hücre, zamanla aşırı çoğalma gösterir fakat tekrar normal görünüm ve davranışını geri kazanabilir. Hücreler farklılaştığında çok daha yavaş bölünürler. Böylece farklılaşmayı bloke etmek (bazı kan kanserlerinde görüldüğü gibi) veya

farklılaşmamaya yol açmak (birçok ilerlemiş kanserde olduğu gibi) bölünmeyi artırmaktadır. Normal hücrelerde hücre dışı matris ile temas, normal bölünmeyi durdururken, kanser hücrelerinde bu durum söz konusu değildir. Aslında bu temas bozukluğu nedeniyle bazı kanserler yabancı olarak tanımlanır böylelikle konakçının bağışıklık sisteminin müdahalesine maruz kalırlar (Masood and Kameh, 2003).

Kanser hücrelerinin özgül özelliği, anti-sosyal olmaları ve kanserleşmemiş komşuları ile uyumlu olmayan bir otonomi düzeyine sahip olmalarıdır. Normal hücreler değişik seviyelerde iç ve dış kaynaklı sinyallere tabii olmaktadır; Karsinogenez sırasında ise bu özellik ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle, bu düzenleyici sinyalleri tanımlamak; hücre dışı çevrenin hücrenin işleyişini nasıl etkileyebildiğini, bir kanser hücresinin çevresini nasıl manipule edilebildiğini, bir hücre yığınındaki tüm davranışlara karar veren sinyalin ne olduğunu anlayabilmemiz bakımından önemlidir.

Hücre (doku) yaşamının genlerle kontrolüne, kanser genleri veya onkogenlerin de katılımı, hücre içi sinyal yollarında rol alan anahtar düzenleyici genlerin aktivitelerinde nitel veya nicel değişikliklere neden olarak, hücrenin işlevi değişmektedir. Çoğu kanser vakasında, gen işlevinde artıştan ziyade, normal baskılayıcı genlerdeki işlev kaybı görülebilmektedir, özellikle hücre çoğalması ve ölümü ile ilgili kontrol genlerinde olabilmektedir. Kanserler arasındaki farklılığın nedeni, kontrolsüz büyümeye farklı kanserlerin, farklı sinyal yollarını değiştirmesi yargısında yatmaktadır.

Kanser oluşumu sürecinde bireyin maruz kaldığı iç ve dış etmenlerin etkisi söz konusudur. Bu etmenlerden, dış kaynaklı olanlarına; radyasyon, kimyasallar, virüsler ve beslenme alışkanlığı, iç kaynaklı olanlarına; taşıdığı genler, onkogenler ve kalıtım örnek verilebilir.

1.1.1.1. Radyasyon

U.V, X ve Gama ışınları mutajenik ve karsinojeniktir. U.V radyasyonu piramidin dimerlerinin oluşmasına neden olur. U.V ışını ile karşıt bazların eliminasyonu ile pürinsiz ve pirimidinsiz konumlar oluşabilir tek ve çift iplikçik kırılmaları veya iplikçiklerde çapraz bağlantılar oluşabilmektedir. Işınlama enerjisinin neden olduğu karsinogenezde temel mekanizmanın DNA hasarı olduğu varsayılmaktadır. DNA'daki doğrudan etkilerden ayrı olarak X ve gama ışınları

dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olur, meydana gelen OH⁻, süper oksit ve diğer radikaller DNA ve başka makro moleküler ile etkileşerek moleküler hasara yol açarlar (Barcellos-Hoff, 2005).

Yüksek dozda radyasyon ışınına maruz kalmak karsinogenezi başlatabilmektedir. Radyasyonun ışıma süresince, bu ışımaya maruz kalan hücrelere bireysel olarak hasar verdiği düşünülmektedir (Barcellos-Hoff, 2005). Fakat son zamanlarda, radyasyona uğramış hücrelerin var olmasının, radyasyona uğramamış diğer hücreleri de etkilediği gösterilmiş ve bu olgu Bystander etkisi olarak adlandırılmıştır (Huang *et al.*, 2003). Radyasyon ışımasının kanser üzerindeki potansiyel etkisine dair çalışmalar, sıklıkla başlangıçta DNA'ya vermiş olduğu hasarlar üzerine odaklanmıştır. Bu arızalar doğru bir şekilde tamir edilemediği takdirde mutasyon veya kromozom hasarına yol açmaktadır. DNA hasarları normalde hücre ölümüne neden olur. Bununla birlikte hatalı olarak tamir edilen hasar neoplastik hücreyi oluşturan bir mutasyona yol açabilir. Genellikle radyasyon ışımasının mutajenik olmayan etkileri, çok hücreli sistemde neoplastik işlemi açıkça teşvik edecek şekilde bozan sürekli etkilere de neden olabilmektedir. İyonize radyasyonun (IR) dokunun mikro çevresindeki değişiklikleri uyarabilmesi, neoplastik sürecin sıklığını ve özelliklerini etkileyen karsinojenik potansiyelinin önemli bir bileşeni olduğu düşünülmektedir (Barcellos-Hoff, 2001). Radyasyona uğramış bir dokuda, kaybolan işlevi tamir etmeye yönelik bir Doku Hasar Yanıt Programı mevcuttur ve bu programda her bir hücrenin hasara yanıtı hücre dışı sinyal ileti ile koordine edilmektedir (Barcellos-Hoff, 1998). Doku patolojisi ve organın görevini yerine getirememesi, hücreler arasında ve hatta farklı hücre tipleri arasındaki bilgi alışverişinin bozulmasından kaynaklanıyor olabilmektedir (Trosko, 1998; Barcellos-Hoff, 2005).

1.1.1.2. Kimyasallar

Nükleik asitlerin modifikasyonunu etkileyerek kansere yol açabilen birçok faktör vardır. Mutajenler ve karsinojenler doğrudan etkili olanlar ve dolaylı yoldan etkili olanlar olarak ikiye ayrılabilirler. Doğrudan etkili olanlar makro moleküller ile herhangi enzimatik aktivasyona ihtiyaç duymaksızın reaksiyona girerler. Diğerleri metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Örneğin dialkilnitroz aminler reaktif olabilmek için bir enzimatik basamağa maruz kalmak zorundadırlar (Singer and Grunberger, 1983).

6

Beslenme kanser oluşumunda etkili olabilmektedir. Yüksek tuz (sodyum nitrat) alımı mide kanseri riskini artırır. Meme kanseri ile alınana yağ arasında doğru orantı, konserve soya fasulyesinin içerdiği tuz oranıyla mide kanseri arasında da bir bağlantı olduğu belirtilmiştir. Yüksek yağ alımı ile şişmanlayan kadınlarda bu durumun östrojen üzerinde etkili olması sonucunda hiperproliferasyona sebebiyet verdiği için meme ve rahim kanserine yakalanma riskini artırmaktadır (World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 1997)

Besinlerle birlikte alınan bazı kimyasal bileşiklerinde kanser gelişimi üzerinde etkileri vardır. Örneğin basit non-alkilleyici ajanlar nükleik asitlerde, amino gruplarını doğrudan değiştirirler, bu işlemi oksitaditif mekanizmalar yolu ile veya doğrudan elektrofilik atakla gerçekleştirirler. Deaminasyon yoluyla baz çiftleşmesini değiştirirler veya tautomerik dengede bir kaymaya yol açarlar ayrıca bisülfid, hidroksilamin, metoksiamin ve hidrazin sitozinin 5-6 çift bağına (veya metoksianim hariç) urasilin 5-6 çift bağına dahil olabilirler. Nitroz asit mükemmel bir mutajendir ve oksidatif deaminasyon ajanıdır. Sitozinin urasil, adenin'in hipoksantine veya guanin'in ksantine deaminasyonu baz eşleşmesini değiştirmektedir (Singer and Grunberger, 1983).

Alkol bileşiminde kanseri hızlandıran maddeler bulunur. Ağız, gırtlak, yemek borusu, karaciğer, kolon gibi bölgelerde kötü etkileri vardır. Günde 10 gr alkol tüketimi ile 160 gr'dan fazla alım arasında risk oranı 20 kattır (American Institute for Cancer, 1997).

U.S.A.'da ölümlerin %17'si, sadece kanserden kaynaklanan ölümlerin %30'u sigara içmekten kaynaklanmaktadır ve diğer ülkelerde de benzerdir. Pasif içicilerde de tütün ile ilişkili ürünleri hava yoluyla alarak etkilenmekte ayrıca ağız, gırtlak, yemek borusu, mesane ve böbrek kanserlerini de arttırmaktadır. Etkilenen bölgenin çoğu karsinogen dumanlar temasa geçen bölgelerdir ama karsinogenler akciğerler yoluyla kana geçerek oradan da böbrek ve mesane'ye ulaşarak dışarı atılır. Bu bölgelerin her ikisi de bu durumdan etkilenir ama ilginçtir ki kanser baskılayıcı gen p53'teki inaktive edici mutasyonlar mesane ve akciğer kanserlerin de farklıdır. Bu durum mesaneye ulaşan dumandaki karsinogenlerin akciğerleri epiteli üzerinde etkili olan karsinogenler den farklı olduğu önerisine yol açmaktadır (Doll and Crofton, 1996)



Bunlara ek olarak tıbbi tedavi uygulamalarının, kanser oluşumu üzerinde etkileri göz ardı edilmemelidir. Bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlar kullanmakta olan organ nakli yaptırmış hastalarda da bu ilaçlar kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Örneğin böbrek nakli yaptırmışlar da ileride lenfoma gelişimi görülme riski normalin 40 kat üzerindedir (King, 2000).

1.1.1.3. Virüsler

Virüsler karsinogenez oluşumunda diğer bir etmendir. Hücre düzenlenmesini etkileyen genleri taşırlar, hücre fonksiyonunu değiştirebilir veya hücreyi modifiye edebilirler (Beverly and Wilson, 2003).

DNA virüsleri konakçı proteinlerini inaktive ederek v-onc proteinleriyle de konakçı proteinlerini bağlayarak etkilerini gösterirler. DNA virüslerin'den Simian virüs 40 (SV40) ve Adenovirüsler insan kanserleri ile ilişkili değildir. Bazı tip adenovirüslerin muhtelif hayvan hücrelerinin transformasyonlarına neden oldukları bilinmektedir. Epstein-Barr virüsü (EBV) insanlarda Burkitt Lenfoması ve nozofarigeal karsinoma ile ilişkilidir. Herpes Simpleks virüsü (tip II) ile serviks kanseri arasında ilişki kurulmuştur. Hepatitis B virüsü ile de insanlardaki bazı karaciğer kanserleri arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir (Butel, 2000). Papilloma virüsler bir DNA virüs ailesidir, insanlarda dahil olmak üzere yüksek omurgalıların çoğunda mukozal ve deri epitelinde aşırı şekilde çoğalabilen yaralara (siğil gibi) sebep olur. Bu yaralardan çoğu gelende iyi huylu zamanla gerileyen bir yapıdadırlar. Fakat bazıları kötü huylu olmaya ve karsinomaya meyillidir. Örneğin rahim ağzı kanseri (Villa, 1997).

RNA virüsleri hücreyi enfekte ettiğinde virüsün RNA'sı revers transkripsiyon ile DNA'ya dönüştürülür. Aktif hale gelen viral DNA bir onkogen olarak veya konakçı gen aktivitesini etkileyerek mutasyonlara neden olmakta ve böylece karsinogeneze gidilen yolda konakçı hücrelerinin ilerlemesini başlatmaktadır (Butel, 2000).

1.1.1.4. Kanser Genleri

Kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Tchia *et al.*, 1991). Onkogenler ilk olarak Rous sarkoma virüsünde tanımlanmış, insan genomunda da homolog gözlenmiştir. Viral olan onkogenler v-onc, normal onkogenler ise c-onc olarak belirtilir. Proto-onkogenlerin kodlanmış protein ürünleri

hücre sinyalizasyonu ile hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar (Bacus *et al.*, 1990). Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregulasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Aktive olan proto-onkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir. Örnek olarak c-myc geni, int-2 ve c-erb B2 genlerine verebiliriz (Hesketh, 1997). Bu genlerin kanser ile ilişkilerini tezin 1.3.1. meme kanseri'nde protoonkogenler ve onkogenler adlı kısımda anlatılmaktadır.

Protoonkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık ras onkogen ailesinde görülür. Bir başka mekanizma da, genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatuar bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile hücre içindeki DNA miktarı artar örneğin, Myc ailesi (Roth *et al.*, 1994).

Kanser oluşumunda etkili olabilen diğer genler tümör baskılayıcı genlerdir. Örneğin p53 ve Rb genleri olup, bu genler tezin 1.3.2. meme kanseri'nde tümör baskılayıcı genler adlı kısımda anlatılıyor.

1.2. Meme Kanseri Nedir?

Meme kanseri ile ilgili verilere M.Ö 3000'de antik Mısır'da rastlanılmıştır (Bartelink *et al.*, 1985). Meme hastalıkları ile ilgili ilk bilgiler Mısırlı hekim İmhotep'in yazılarında rastlanır (Bartelink *et al.*, 1985). Hippocrates meme tümörlerini benign ve malign olarak sınıflamıştır (Urban and Baker, 1952). ABD'de her yıl 658,800 kadında yeni kanser vakası görülmekte ve kadın kanserleri arasında meme kanseri görülme oranı %30'dur (American Cancer Society, 2003).

Ülkemizde ise sağlık bakanlığının 1999 yılı verilerine göre, kadın kanserleri arasında meme kanseri görülme sıklığı, %24.1'dir (Kılıç ve ark, 2003) (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1. Türkiye’de kadınlarda görülen kanser türleri (Kılıç ve ark, 2003).

		KADINLARDA EN ÇOK GÖRÜLEN ON KANSER TÜRÜ, 1999 <i>The Most Frequent Ten Cancers In Females, 1999</i>		İNSİDANS (Yüzbinde) <i>Incidence (Per hundred thousand)</i>
ORGANLAR	Organs	VAK'A Case	%	
TOPLAM	TOTAL	6.577	100	30.38
Meme	Breast	2.390	24.1	7.32
Mide	Stomach	693	6.99	2.12
Yumurtalık	Ovary	556	5.61	1.70
Deri	Skin	684	6.9	2.10
Kolon	Colon	419	4.22	1.28
Akciğer	Lung	404	4.07	1.24
Serviks	Cervix	310	3.13	0.95
Beyin	Brain	349	3.52	1.07
Kemik iliği	Bone Marrow	391	3.94	1.20
Rektum	Rectum	381	3.84	1.17
Diğerleri	Others	3.342	33.69	10.24

1.2.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kötü huylu (malign) tümör olup (Brinton and Devesa, 1996) Avrupa’da yılda 180.000 ve A.B.D’de 211,300 yeni vaka saptanmaktadır (Parki *et al.*, 1988; Boring *et al.*, 1993; American Cancer Society, 2003). A.B.D’de kadın kanser hastalarından yaklaşık %15’si meme kanserinden ölmektedir (American Cancer Society, 2003).

1.2.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Meme kanseri etiyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır. Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70-80’i bu risk faktörlerine sahip değildir (Tannock and Hill, 1992). Meme kanserinde, bazı risk faktörlerinin çok önemli olduğu bilinmekte olup bu Risk faktörleri şöyle sıralanabilir.

(i) **Reproduktif Faktör:** Menstruasyon hayatı uzun süren kadınlarda meme kanseri daha sık görülmektedir. Doğurmuş olmak veya ilk doğumun erken yaşlarda olması ve emzirme süresinin uzunluğu kadınlarda meme kanseri riskini azaltmaktadır (Aslan, 1997).

(ii) **Yaş Faktörü:** Orta ve ileri yaşlarda meme kanseri risk artmakta olup menopoz süresin duraklama göstermekte olup sonrasında tekrar artış gözlenir (Schwarzel *et al.*, 1973).

(iii) **Kalıtım Faktörü:** Ailesinde meme kanseri vakası bulunan kadınlarda diğerlerine göre meme kanseri yakalanma riski 3 kat daha fazladır. Ailenin birincil yakın akrabalarında görülen vakalar durunum da bu risk 9-10 kat olabilir (Sattin *et al.*, 1985).

(iv) **Diğer meme hastalıklarının Rolü:** Özellikle fibrokistik hastalıkta belirgindir. Atipik lobuler ve duktal hiperplaziler ile bariz atipisi olan apokrin metaplazilerde bu risk 5 kat, makrokistiklerde 20 yıl içinde 4 kat fazladır (Sattin *et al.*, 1985).

(v) **Coğrafi Faktör:** Ükelere ve iklime göre meme karsinomu dağılımı farklılık gösterir. A.B.D. ve Avrupa ülkelerinde fazla, Japonya'da azdır. Soğuk iklimlerde riskin daha fazla olduğu belirtilmiştir (Ottoman *et al.*, 1986). Başka ülkelere göç eden ailelerde yapılan çalışmalar göç eden kadınlarda meme kanseri sıklığının, birkaç nesil sonra göç ettikleri ülkenin görülme sıklığına ulaştığını göstermiştir (Buell, 1974; Locke and King, 1980).

(vi) **Endokrin Faktörü:** Meme kanseri erkeklerden ziyade kadınlarda çok fazla görülmesinde genetik faktöre bağlı olduğu, normal meme gelişimi ve fonksiyonu için çok sayıda hormonun etkili olması sebebiyle başta östrojen olmak üzere hormonlar sorumlu olduğu belirtilmiştir (Miller, 1990).

(vii) **Diğer Faktörler:** Radyoterapi uygulananlarda, immuno-spesifik ilaç kullananlarda, timus atrofisi olan yaşlılarda meme karsinomu diğer popülasyonlara göre daha sık görülmektedir. Rezerpin, Fenotiazin, Metil-Dopa gibi bazı antidepresanlar ve bazı antihistaminiklerin meme karsinomuna sebep olduğu ileri sürülmüştür (Sattin *et al.*, 1985). Rahim kanseri ve endometrium kanseriyle birlikte sık görülmektedir. Virüsler ve yaralanmalar da kansere etkeni olabilmektedir.

Ayrıca, kansinojen madde ihtiva eden besin alımı, aşırı yağlı gıdalar ve şişmanlık meme karsinomuna neden olduğu sanılan diğer faktörlerdir (Aslan, 1997).

1.2.3. Meme Kanseri Patolojisi

Meme kanseri vakalarında sol memede, sağ memeye oranla daha fazla rastlanılmaktadır (Robins and Kumar, 1990). Hastaların %4-10'nun da iki taraflı birincil tümörlerde vardır. Ya da birincil tümörlerin ardından ikincil tümör gelişir (Robins and Kumar, 1990). Meme tümörleri makroskopik özelliklerine göre; skirö, kolloid, ve medüller olarak, histolojik özelliklerine göre; adenokarsinom, papiller ve sarkoma olarak isimlendirilirler. Histogenetik olarak; duktal, lobüler ve asiner ve aktivitesine göre de; invaziv ve noninvaziv olarak tanımlanır.

1.2.4. Meme Kanseriinde Prognostik Faktörler

Prognoz; genel olarak tedavi sonrası tekrarlanmasına kadar geçen süre ve toplam sağ kalım süresi ile değerlendirilir. Kötü seyirli olabilecek kanserli olguların tedavi seçiminde prognostik faktörler yol göstericidir.

Yapılan çalışmalarda kanıtlanmış ya da potansiyel olan prognostik faktörleri sıralarsak; aksiler lenf bezleri tutulumu, tümör büyüklüğü, histolojik tipi, nükleer grade, vasküler invazyon, tümör nekrozu, östrojen ve progesteron reseptör durumu, DNA ploidi, % S faz fraksiyonu ayrıca c-erb B2 (HER-2/neu) (HER-2/neu: Human epidermal growth factor receptor-2) gen amplifikasyonu ya da onkoprotein overekspresyonu, epidermal growth faktör, p53 gen mutasyonu, heat shock protein (hsp), plasminogen aktivatörleri, laminin reseptörleri, tümör angiogenesis, c-myc, c-HA-ras, int-2/hst, katepsin D vb. (Hansel, 1997).

1.3. Meme Kanseriinin Moleküler Biyolojisi

Meme kanserine moleküler düzeyde bakıldığında karşımıza; protoonkogenler, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve genotipteki değişimler çıkmaktadır.

1.3.1. Meme Kanseriinde Protoonkogenler ve Onkogenler

Protoonkogenlerin ürünleri hücre sinyal iletide önemli noktaları teşkil etmekte olup bu genlerin ürünleri olan proteinlerin normal işlevlerini yerine getirememesi veya normal konsantrasyonundaki değişim ile üzerlerine düşen görevleri yerine getirememelerine neden olmaktadır (Hesketh, 1997).

Solid tümörler, lösemi ve lenfomalar dahil birçok insan kanserinde etkili olduğu düşünülen c-myc onkogeni, bir transkripsiyonel faktörü proteini kodlar. Meme kanserinde c-myc geninde amplifikasyon ve yeniden düzenlemeler saptanmıştır (Bonilla *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1989). Myc geni amplifikasyonu ile lenf tutulumu, evre, hormon reseptörü durumu ve nüks arasında anlamlı ilişki sadece menopoz sonrası hastalarda görülmüştür (Cline *et al.*, 1987). c-myc geni daha çok yeniden düzenlenme yoluyla aktive olur (Adnane *et al.*, 1989).

İnt-2 geni fare meme tümörlerinde MMTV'ün integrasyon bölgesi olarak tanımlanmıştır. Bu genin insandaki karşıtının 11q13 (11. kromozonun kısa kolundaki 13. lokasyon bölgesi) üzerinde yer aldığı saptanmış ve gen izole edildikten sonra meme kanserlerinin %15-20'sinde ifade edildiği gözlemlenmiştir (Lidereau *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1988).

c-erbB2 veya HER-2/neu onkogeni, etil nitro üre uygulanan farelerde nokta mutasyonu ile nöroglıblastoma oluşturarak tanımlanmış ve neu olarak isimlendirilmiştir (Schechter *et al.*, 1984). c-erbB2 onkogeni, 17. kromozomun q21 kolunda bulunmaktadır (Hansel, 1997). Bu onkogen ürünü, tirozin kinaz ailesinden 185 kDa bir glikoproteindir. c-erbB2 onkogeninin ekstrasellüler bölgesi, yapısal olarak EGF reseptörüne benzemekte olup ligandı bağlayan parçasının olmaması ile ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda c-erbB2 onkogen amplifikasyonu veya over-ekspresyonu meme kanserli olguların %10-40'da tespit edilmiştir (Hansel, 1997).

1.3.2. Meme Kanseri'nde Tümör Baskılayıcı Genler

Meme kanseri vakalarında bir tümör supressör ve transkripsiyon faktör olan p53 geninde mutasyonlara rastlanmıştır (Deng *et al.*, 1994). p53 genin ürünü olan p53 proteini 393 amino grup asit uzunluğunda 50-55kDA moleküler ağırlığında nüklear transaktivatör proteindir. Cell cycle G1'den S fazına geçişteki ve G2'den M fazına geçişteki kontrol noktalarıda görev alır (Ronit and Ygal, 1999). p53 hücre büyümesinin ve ölümünün düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenmiştir. p53 ekspresyonu memenin iyi huylu lezyonlarında gözlenmez (Koutselini *et al.*, 1991). p53'teki mutasyonlarda viral veya hücresel proteinler ile etkileşim yoluyla gerçekleşen inaktivasyonlar kanser hücrelerinde en sık gözlenen en sık değişimlerdir. Bu değişimler genellikle p53 proteininin yarılanma süresinin uzamasına neden olmaktadır. Meme kanserinde en sık görülen p53 mutasyonları (LOH: loss of

genetic heterozygosity) bir allelinde anlamsız mutasyon diğ erinde ise delesyon olmasıdır. Bu durum sonucunda ise normal p53 gen ürününün kaybı ile sonuçlanır. p53 günümüzde sporadik meme kanserlerinde en sık rastlanan mutasyona uğ ramış gendir. Meme kanserlerinde %22-58 oranında p53 proteininin aş ırı ekspresyonu gö rülür (Thor *et al.*, 1992). p53'teki mutasyonlara kolon, akciğ er, özafagus, karaciğ er, beyin ve hemopoetik kanserlerde de araştırılmış tır (Hansel, 1997).

Birçok tümör türünde olduğu gibi meme kanserinde de retinoblastoma (Rb) geninde bozukluklar saptanmış tır (Xu *et al.*, 1991). Bu bozukluklar meme kanserinin ileri aş amalarında gözlenmekte olup, bu mutasyonların kalıtsal meme kanserli hastalardaki incelemeler sonucunda kalıtsal meme kanseri ile bir ilişkisi olmadığı saptanmış tır (Borg *et al.*, 1992).

Ayrıca yapılan soy ağ acı çalışmaları ile meme kanserinde iş levsel olduğu bulunan genler saptanmış tır. 17. kromozom üzerinde kalıtsal meme ve ovaryum kanseri ile ilişkili bir genin yer aldığı bağlantı analiziyle saptanmış BRCA1 (breast kanser susceptibility gene) olarak isimlendirilmiştir (Casey, 1997). BRCA1 17q'da yer almakta olup, meydana gelebilecek mutasyonlardan dolayı BRCA1 geninin ailevi meme kanseri ve ovaryum kanserinde etiyolojik rol oynadığı kabul edilmektedir (Adnane *et al.*, 1989). BRCA1 otozomal dominant bir gen olup, DNA'ya bağ lanabilen bir tümör supressör proteini kodlamaktadır. BRCA1 genine özğ ü antisense oligonükleotidlerin meme epitel hücrelerini çoğ alma yönünde uyardığı gösterilmiştir (Zhang *et al.*, "2" 1998). Bu bulgular BRCA1'in tümör baskılayıcı etkinliğini ve normal meme ile ovaryum epitelinde mevcut olan proteinin tümörlerde değ iş ikliğ e uğ radığını ya da ortadan kalktığı görüş ünü desteklemektedir. Kalıtsal meme kanseri ailelerinin %45'inde, kalıtsal meme/ovaryum kanseri ailelerinin ise %87'sinde hastalığın oluş umundan BRCA1 genindeki mutasyonlar sorumludur (Merajver *et al.*, 1995). Erken yaş ta ortaya çıkan en az iki meme ya da ovaryum kanseri olgusunun yer aldığı ailelerin %92'sinde BRCA1 geni mutasyonları gözlenir (Simard *et al.*, 1994). Normal bireylerde meme kanserine yakalanma olasılığı %2 iken, BRCA1 geninde mutasyon bulunan bir kadınlarda 50 yaş ından önce bu olasılık %59 ve 65 yaş ına kadar %85 olarak belirtilmiştir (Ford *et al.*, 1994).

Sonraki araştırmalar da 13. kromozom üzerinde ikinci bir predispozisyon geni olan BRCA2 bulunmuş tur. İlk yapılan değ erlendirmelere göre ailevi kanserler de hastalığın erken ortaya çıkış ında rol oynayan bir gendir. BRCA2'nin, BRCA1'den

farkı bu genin ovaryum kanseri ile bir ilişkisi olmayıp, erkeklerde görülen meme kanseri ile bir ilişkisi olduğudur (Futreal *et al.*, 1994). Bu iki gen birlikte değerlendirildiğinde kalıtsal nitelik taşıyan meme kanserlerinin %90'ından sorumludur (Topuz, 1997).

1.3.3. Meme Kanseri ve Apoptosis

Apoptosis; embriyonik gelişimin organogenesis aşamasında, erişkin yaşamında ise bazı fizyolojik işlemler ve patofizyolojik durumlarda meydana gelen programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. (Wyllie, 1992; Buja *et al.*, 1993). Apoptosis olayında özgül endonükleazlar, nükleozomlar arasındaki kromatini keserek yaklaşık 200 baz çiftinde oluşan kromatin parçacıkları meydana gelir (Wyllie, 1992; Buja *et al.*, 1993). Apoptotik işlem, uyarıcılar ve baskılayıcılar tarafından kontrol edilmektedir. Bu uyartılar arasındaki denge, hücre döngüsünün mitoz yönünde yada apoptosise gireceğine karar verir. (Wyllie, 1992; Buja *et al.*, 1993). Son hipotezlere göre klonal büyüme apoptosisin baskılanması, düzenleyici onkogenlerdeki mutasyonlar sonucunda oluşan pre-malignant bir olay olarak meydana gelmektedir (Lipponen, 1999). Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Hockenbery, 1992; van Slooten *et al.*, 1998), c-myc (Koskinen and Alitalo, 1993) ve p53'ün (Wyllie, 1992; van Slooten *et al.*, 1998) apoptosisin düzenlenmesinde yer almaktadır.

Meme kanseri vakalarında, apoptosis ile tümör büyüklüğü arasındaki ilişki incelenmiştir (Lipponen *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1998; Berardo *et al.*, 1998). Bu çalışmalardan sadece birinde tümör büyüklüğünün artışına bağlı olarak ile apoptotik hücre miktarında artış gözlenmiştir (Zhang *et al.*, 1998).

Apoptosis ile cinsiyet steroid reseptörü bulundurmama arasında önemli bir ilişki tespit edilmiştir (Lipponen and Aaltomaa, 1994; Berardo *et al.*, 1998). ER (östrojen reseptörü) ekspresse eden tümörlerde genellikle apoptosis miktarı ER- (östrojen reseptörü negatif) tümörlere göre daha düşüktür öyle ki, ER- tümörlerde apoptosis değeri %50 daha yüksek bulunmuştur (Lipponen and Aaltomaa, 1994, Berardo *et al.*, 1998).

p53 proteinini aşırı ekspresse eden meme tümörleri hızlı bir şekilde çoğalmaktadır (Pietiläinen *et al.*, 1995), ve p53'ün aşırı ekspresyonu yüksek apoptosis değeri ile orantılı bulunmuştur (Lipponen *et al.*, 1994; Pietiläinen *et al.*, 1995; Mustonen *et al.*, 1997; Berardo *et al.*, 1998; Zhang, *et al.*, 1998).

Epey farklılaşmış cinsiyet steroid reseptör pozitif meme kanserlerinde Bcl-2 ekspresse edilmektedir (Lipponen *et al.*, 1995). Teoride Bcl-2 apoptosisi engellemektedir (Hockenbery, 1992). Meme kanseri çalışmalarında elde edilen sonuçlar bunu desteklemektedir (Lipponen *et al.*, 1995, Mustonen *et al.*, 1997, Ellis *et al.*, 1998, van Slooten *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1998). Apoptosis Bcl-2 pozitif meme kanserinde Bcl-2 negatif tümörlere nazaran % 30 daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Lipponen *et al.*, 1994).

1.4. Meme Kanserinin Tedavisi

Meme kanserinin tedavisinde çeşitli yöntemler uygulanmaktadır, bununla birlikte bu tedavi yollarının eş zamanlı veya öncelikli olması hastalığın hangi aşamada olduğu ilgili olup operasyon, radyoterapi, kemoterapi, fotodinamik olarak sıralanır.

1.4.1. Operasyon

1950'li yıllara kadar meme kanserinde en etkili tedavi yönteminin 1894'de Halsted tarafında tarih edilen radikal mastektomi olduğu belirtilmiştir (Çelik, 1990). 1960-1970'li, yıllarda modifiye radikal mastektomiye olan eğilim giderek artmıştır. Günümüzde meme kanseri operasyonlarında kullanılan yaklaşım 1948'de Patey ve Dyson tarafından önceki yaklaşımları modifiye ederek geliştirdikleri Modifiye Radikal Mastektomi (MRM) yapılmaktadır (Çelik, 1990). Burada tüm meme dokusu yanında meme kanseri ile ilgili olabilecek olan meme iç dokuları ve koltuk altı lenf dokuları çıkarılmaktadır.

Hastalığın yararlı biçimde operasyonla tedavisinin yapılabilmesi için klinik olarak çok ilerlememiş olması gerekmektedir. Meme kanserinin güncel operasyonla tedavisi hastalıklı organın kısmen veya tamamen çıkartılmasına yanında koltuk altı disseksiyonu esasına dayanır. Hastalığın bölgesel tedavisi ile tümörün hangi evrede olduğu saptanmakta elde edilen bilgiler doğrultusunda yardımcı radyoterapi ve kemoterapi ile hastanın yaşam kalitesi ve süresi arttırılmaktadır (Topuz, 1997).

1.4.2. Kemoterapi

Meme kanseri adjuvant (normal tedaviyi destekleyici tedavi) tedavinin uygulandığı ilk tümördür ve adjuvant ovaryum ablasyonunu (ooferektomi veya irridiasyon ile) değerlendirildiği randomize çalışmalar 1948'lerde başlamıştır

(Akyan, 1991). Bu uygulamalarla tekrarlama oranlarında bir azalma görülmekle birlikte anlamlı uzun süreli bir sağkalım elde edilememiştir (Sherman and Hossfeld, 1990). Bunun üzerine, adjuvant kemoterapi uygulamaları başlamış ve bunun adjuvant kastrasyona üstün olduğu görülmüştür (Sherman and Hossfeld, 1990). Primer tümörün lokal tedavi yöntemleriyle (operasyon ve/veya radyoterapi) organizmadan uzaklaştırılmasını takiben lokal nüks ya da metastaz riskini azaltmak amacıyla yapılan kemoterapiye adjuvant kemoterapi denir (Akyan, 1991). Adjuvant kemoterapi başlangıçta mevcut olduğu kabul edilen mikro-metastazların ortadan kaldırılmasına yönelik bir tedavidir (Sherman and Hossfeld, 1990; Akyan, 1991).

Meme kanserinin tedavisinde son zamanlarda kemoterapinin katkılarının belirgin olarak ortaya çıkması sonucu, primer tedavi olarak öncelik taşıyan operasyonun bazı özel durumlarda geriye atılması, artık kaçınılmaz olmuştur. Koruyucu meme operasyonunun başarısı (radyoterapi ve/veya kemoterapi sonrası yapılan operasyon tedavisi), lokal ileri meme kanserinde kemoterapinin verdiği yüksek yanıt oranı, enflamatuvar meme kanserinde kemoterapinin dışında hastanın başka bir tedavi şansının olmaması, bu tedavi tarzını vazgeçilmez olmasını sağlamıştır. Sonra uygulanacak operasyon girişimini kolaylaştırmak, lokal kontrolü arttırmak, mikrometastazları yok etmek, uzun vadeli sonuçları düzeltmek, tedavi sonrası metastazlarda hücre büyümesini engellemek ve etkilerinin diğer yöntemlere oranla hemen anlaşılabilir olması nedeniyle kemoterapi öncelikle uygulanır. Bu nedenle lokal tedaviden önce yapılması gerekmektedir. Böylelikle etkili bir primer kemoterapi ile tümörün küçülmesi sağlanarak koruyucu operasyonun, ileri evre meme kanserlerinde bile uygulanabilmesi sağlanır (Topuz, 1997).

Adjuvant kemoterapide kullanılacak ilaçların ilke olarak her şeyden önce aynı tümörde, ileri dönem olgularda etkili olduğu bilinen ilaçlardan ya da onların kombinasyonundan oluşması gerekir. İleri evre meme kanserinde en çok etkili olan sitotoksik (hücre büyümesini durdurucu) ilaçlar; cyclophosphamide ve diğer alkilleyici ajanlar, methotrexate, 5-fluouracil, vincristine, prednisone ve adriamycin'dir (Akyan, 1991).

Adjuvant kemoterapinin yukarıda sayılan faydalarının yanında çeşitli olumsuz yönleri de mevcuttur. Örneğin; tedavinin masrafını ve erken toksisitesini arttırabilir, etkisiz olduğu takdirde, etkili lokal tedavi şansı olan hastalarda gecikmeye neden olarak, kür şansını ortadan kaldırabilir ve agresif seyirli tümörlerde metastaz

gelişmesine neden olabilir. Operasyon sonrasında uygulanınca etkili olabilen tedavi, operasyon sonucunda daha duyarlı hale gelebilecek tümör hücrelerine karşı etkisiz kalabilmektedir. En önemli dezavantajı ise meme kanserinin seyrini değiştirdiği için sonraki prognostik faktörlerin kestirilememesinden dolayı operasyon sonrası tedavinin belirlenmesini zorlaştırmasıdır (Topuz, 1997). Meme kanserinde primer kemoterapi, operasyonla tedavisi mümkün olan tümörlerde sağ kalımı ve hastalıksız süreyi uzatmak veya meme koruyucu operasyonu uygulayabilmek, lokal ileri meme kanserini operasyona uygun hale getirmek, enflamatuvar meme kanserinde ise başka seçenek olmadığı için uygulanmaktadır (Topuz, 1997).

1.4.3. Radyoterapi

X ışınlarının bulunmasından sonra, operasyona ilave olarak, meme kanseri tedavisinde radyoterapi kullanılmaya başlanmıştır. Başlangıçta, İnoprabl masif meme kanserlerinde kullanılmıştır. Ancak ortovoltaj şartlarında ve yeterli doz verilemediğinden, tümör lokal kontrolü sağlamada yetersiz kalmıştır. 1937 yılında Keynes, lokal eksizyondan sonra radyum implantasyonu ile elde ettiği sonuçlar ameliyatla elde edilen sonuçlara yakın bulmuştur. Daha sonraki yıllarda Baslesse Operabl ve İnoprabl 400'den fazla meme kanserli hastaya sadece radyoterapi uyguladı. Bu çalışmada 10 yıllık sağ kalım %34 olarak bulunmuştur (Calle *et al.*, 1978).

Radyoterapi alanındaki yeni gelişmeler (süper voltaj tedavi, fraksiyon tedavi, ışın kalitesinde yükselme) yan etkilerin en aza indirilmesini sağlamıştır. Bu yöntemde periferik lenfatik gangliyonlar ve meme dokusu ışınlanır. Radyoterapi ile meme duktal kanserlerinde mikroskobik hastalığın kontrolü; 4 hafta 3000–3500 radda (emilen radyasyonun ölçü birimi) %60–70, 4 hafta 4000 %80–90, 5 hafta 5000 radda %90'ın üzerinde sağlanabilir. Klinik olarak pozitif olan mikroskobik lezyonlarda ise 6 hafta ancak 6000–6500 rad verilmek suretiyle %90'ın üzerinde kontrol sağlanır. Prolaktik ışınlama ile yinelemeleri önleme olasılığı %90 iken, tümör büyüdüktan sonra yapılan ışınlamalarda kontrol sağlama olasılığı % 42–77 arasında değişmektedir (Kuno and Fukami, 1979).

Radyoterapinin de meme kanseri tedavisindeki etkinliği kanıtlandıktan sonra; operasyon ve radyoterapi birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Radyoterapide, operasyon tedavisindeki gibi meme kanseri tanısının erken konulması tümörün

büyüklüğü ile ters orantılı olmaktadır. Radyoterapi tek başına tedavi olabileceği gibi şu an kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinin kombine kullanılması ile hastaların sağ kalımını ve yaşam kalitesinin arttırmaktadır (Kizir, 1987).

1.4.4. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi (FDT) fotosensitirez veya ışığa hassaslaştırıcı ajan denilen bir ilaç ve özel bir tipte ışığın kullanıldığı bir uygulamadır. Işığa hassaslaştırıcı ajan özel bir dalga boyundaki ışığa maruz bırakıldığında çevresindeki hücreleri öldüren bir oksijen formu üretmektedir (Wilson *et al.*, 2002; Dolmans *et al.*, 2003; Vrouenraets *et al.*, 2003).

Her bir ışığa hassaslaştırıcı ajan spesifik bir dalga boyundaki ışıkla aktive edilmektedir (Dougherty *et al.*, 1998; Vrouenraets *et al.*, 2003). Bu dalga boyu ışığın vücut da ne kadar ilerleyeceğini belirler (Dickson *et al.*, 2003; Vrouenraets *et al.*, 2003), bu nedenle doktorlar vücudun farklı bölgelerini fotodinamik tedavi ile tedavi etmek için özgül ışığa hassaslaştırıcılar ve ışık dalga boyları kullanırlar.

Kanser tedavisinde fotodinamik tedavinin ilk basamağında ışığa hassaslaştırıcı bir ajan kan dolaşımına enjekte edilir. Ajan vücudun tüm hücreleri tarafından emilir ama kanser hücrelerinde normal hücrelere göre çok daha uzun kalır enjeksiyonda yaklaşık 24-72 saat sonra (Dolmans *et al.*, 2003) ajanın normal hücreleri terk ettiği ama kanser hücrelerinin de mevcudiyetini devam ettirdiği bir durumda tümör ışığa maruz bırakılır, tümördeki foto hassaslaştırıcı ışığı absorbe eder ve çevredeki kanser hücrelerini yıkacak aktif bir oksijen formu üretir (Wilson *et al.*, 2002; Dolmans *et al.*, 2003; Vrouenraets *et al.*, 2003).

Kanser hücrelerini doğrudan öldürmesine ilaveten fotodinamik terapi tümörleri iki yolla yıkıyor görünmektedir (Wilson *et al.*, 2002; Dolmans *et al.*, 2003; Vrouenraets *et al.*, 2003; Dougherty *et al.*, 1998). Fotosensitizer, tümördeki kan damarlarına zarar verebilir böylece kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu besin engeller ilaveten FDT bağışıklık sistemini tümör hücrelerine saldırmak üzere aktive edebilir. FDT için kullanılan ışık bir lazerden veya başka ışık kaynaklarından gelebilir. Genellikle FDT bir ayakta tedavi prosedürü olarak kullanılır (Capella and Capella, 2003). FDT tekrarlanabilir ve ameliyat, radyoterapi veya kemoterapi gibi diğer metotlarla kullanılabilir.



1.5. Kersetin

1.5.1. Flavonoidler

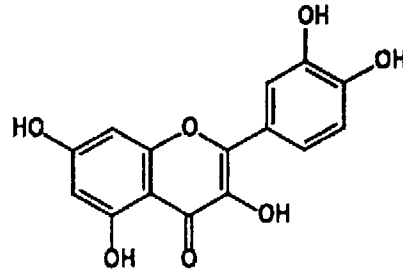
Son yıllardaki kanser çalışmaları diyetle bulunan fakat besleyici olmayan ve kanser gibi yıkıcı hastalıkların oluşumunu engelleyebilen bileşikler üzerine odaklanmıştır (Stavric, 1994; Russo *et al.*, 1999) bu molekülleri kimyasal engelleyiciler olarak adlandırarak bir sınıfta toplamaktadır. Bu sınıfta bazı vitaminler ve yiyeceklerdeki gıda polifenollerini yer almaktadır. Flavonoidler sebzelerde, meyvelerde, çay ve şarap gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik antioksidanlardır (Middleton and Kandaswami, 1993).

Flavonoidlerin estrogenik etkiye sahip olduğu, koyunların, bazı tip çiçekleri yedikten sonra kısırlaştıklarının gözlenmesi sonucunda keşfedilmiştir (Shutt, 1976). Bitkilerin ürettiği östrojenlerin, östrojen reseptörlerine bağlanmak için radyoaktif etiketli östrodiol ile yarıştığı deneysel olarak gösterilmesi, bitki kökenli fitoöstrojenler ve hayvansal östrojenin ortak bir davranış mekanizmasına sahip olduğunu göstermiştir (Sheehan, 1995). Bunun nedeni 17 β östrodiolün steroid çekirdeğinde ve izoflovenlerin polifenolik halka yapısı arasındaki yapısal benzerliği olmalıdır (So *et al.*, 1997). Yapılan birçok epidemiyolojik ve moleküler çalışma diyetle birlikte alınan flavonoidlerin bazı kanser tiplerinin oluşumunu azaltabileceğini göstermektedir (Kuo, 1997; Garcia-Closas *et al.*, 1999).

1.5.2. Kersetin'in Moleküler Yapısı ve Diğer Flavonoidler ile İlişkisi

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) diyetle alınan en önemli flavonoidlerden biridir (Şekil 1.1.). Özellikle meyve (elma) ve bitkilerde (çay, soğan) bolca bulunmaktadır (Middleton and Kandaswami, 1993).

Avrupa ülkelerinde kişi başına günlük olarak 16mg tüketilmektedir. Şarap ve çay gibi bazı gıdalar 150 μ M kadar Kersetin içerebilmektedir (Goldberg *et al.*, 1996). Bir kilo soğanda yaklaşık 200-600 mg Kersetin bulunduğu belirtilmiştir (Price and Rhodes, 1997). Yiyeceklerle alınan glikozitler kalın bağırsakta, bağırsak bakterilerinin glikosidaz enzimlerince katalizlenen reaksiyonlarla aglikonlara (örneğin Kersetin) çevrilir (Tamura *et al.*, 1999).



Şekil 1.1. Kersetin'in kimyasal yapısı (Robert *et al.*, 2004).

Kersetin hücrenin tipine ve tümörün kökenine bağlı olarak hücre döngüsünü; G1/S geçiş aşamasında (Parki *et al.*, 1988; Boring *et al.*, 1993) veya G2/M geçiş noktalarında bloke etmektedir (Avila *et al.*, 1994; Ferrandina *et al.*, 1998; Plaumann *et al.*, 1996). Kersetin mutasyona uğramış H-ras ve p53 (Avila *et al.*, 1994), c-myc ve K-ras (Csokay *et al.*, 1997) ekspresyonlarını aşağı akışlı düzenleyerek veya p21^{WAF1/CIP1} yukarı yönde düzenleyerek hücresel neoplastik fenotipi düzenliyor görünmektedir (Iwao and Tsukamoto, 1999).

Kersetin'in ER+ (östrojen reseptör pozitif), MCF-7 (human mammary cancer cells) insan meme kanseri üzerinde çoğalmayı önleyici bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Hofmann *et al.*, 1988; Ferriola *et al.*, 1989; Kantengwa and Polla, 1991; Cunningham *et al.*, 1992; Barret *et al.*, 1993; Avila *et al.*, 1994; So *et al.*, 1997; Ferrandina *et al.*, 1998). Fakat Kersetinin büyümeyi engelleyici bu etkisinin mekanizması östrojen reseptörüne bağlanmak üzere östrojen ile yarışmak yoluyla değil büyümeyi inhibe edici başka mekanizmaların aranması gerektiği ortaya konmuştur (So *et al.*, 1997).

Russo *et al.*, 1999, Kersetin'in apoptosisi, kanserli hücrelerde tetiklediğini gösteren çalışmalarında, mekanizmasına dair bir hipotez kurmaktadır. Kersetin proteinler üzerindeki anahtar rol oynayan rezidüleri (örneğin sülfütril grupları) modifiye etmektedir, böylece onların işlevlerini değiştirmektedir (Borg *et al.*, 1992). CD95 ile başlatılan apoptotik sinyal iletimi iki ana patika üzerinden kaspaz 3'e iletilir: DISC (Death-inducing signaling complex)/caspase-8 ve mitokondri/sitokrom C/A^{paf-1}/caspase-9 patikaları hücre ölümüne giden sinyal iletiminde mitokondriler önemli bir rol oynamaktadır. Apoptosisin daha erken basamaklarında mitokondriyal yapıda ve işlevde değişimler meydana gelir. Bazı sistemlerde CD95'in aktive olması mitokondriyal zarıda değişimle birlikte sitokrom C'in salınarak A^{paf-1}'e bağlanmasına yol açarak apoptosisi tetiklemektedir (Green and Reed, 1998; Adachi *et al.*, 1997). Kersetin anti-CD95' cevap olarak sitokrom C'yi uyarak apoptotik A^{paf-1}/caspase-9

patikasını aktive etmektedir (Santos, *et al.*, 1998). Fakat Kersetin tarafından salınan sitokrom C miktarı kaspazı aktive edecek kadar yeterli değildir. Kersetin muhtemelen CD95'e paralel olan veya ondan bağımsız alternatif pro-apoptotik (öncü apoptotik) patikaları aktive ederek kanser hücrelerinde apoptosisi yükseltmektedir (Russo *et al.*, 1999). Çok sayıda çalışma Kersetin'in PKC (protein kinaz C) ve TPK'yı (sitoplazmik tirozin protein kinaz) inhibe etme kapasitesinde olduğunu göstermektedir (Hofmann *et al.*, 1988; Ferriola *et al.*, 1989; Kantengwa and Polla, 1991; Cunningham *et al.*, 1992; Barret *et al.*, 1993; So *et al.*, 1997).

Buna göre malignant (kötü huylu) hücrelerin etkili olamamasının nedeni hücre döngüsünde Kersetin'e bağımlı duraklamanın apoptosisi tetikliyor olmasıdır (Russo *et al.*, 1999). Bununla beraber Kersetin'in çoğalmayı önleyici ve pro-apoptotik etkileri üzerine çok sayıda veri olmasına rağmen aksiyonun mekanizması hala bilinmemektedir. Ayrıca Kersetin genellikle hücre döngüsünün bloke edilmesini takiben pro-apoptotik aktiviteyi başlattığıda belgelenmiştir (Ferrandina *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1994; Iwao and Tsukamoto, 1999; Larocca *et al.*, 1997).

Normal hücrelerde Kersetin apoptosisi oksidatif baskı ile tetiklenen tirozin kinaz/c-jun/AP-1 patikasının baskılanması üzerinden inhibe etmektedir (Yokoo and Kitamura, 1997). Kersetin ve gıdalardaki diğer flavonoidlerin tümörlü olmayan hücrelerde p53 yollu apoptosisi uyarabildikleri için potansiyel genotoksik tehlike olduğunu söyleyen görüşlerde vardır. Kersetin aktivitesi protein kinaz ailesinden serin/threonin protein kinazları inhibe etmek yeteneği ile ilişkili olabilir (Hagiwara *et al.*, 1988; Ferriola *et al.*, 1989; Agullo *et al.*, 1997). Bu verilerin yanında Kersetin'in yararlı etkileride belirtilmiştir (Deschner, 1992; Stavric, 1994; Barotto *et al.*, 1998).

Kersetinin osteoblastlar üzerinde etkisini araştırılmış ve sıçan kafatasında bulunan osteoblast benzeri hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve mineral kazanımını azalttığını belirtmişlerdir (Notoya *et al.*, 2004).

1.6. Arimideks

1.6.1. Aromataz

Kadınlarda menapoz başlangıcı ve menapoz sonrası dönemde meme kanseri riski artmaktadır. Bu dönemlerde meme dokusu östrojene daha uzun süre maruz kalmaktadır. Meme kanserlerinde beş yıl ya da daha uzun süreler sonunda kadınlarda

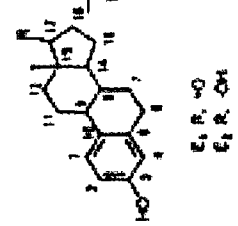
estradiolün plazma seviyesinde %20 lik bir artışın olduğu gösterilmiştir (Wysowski *et al.*, 1987; Toniolo *et al.*, 1995; Berrino *et al.*, 1996; Dorgan *et al.*, 1997). Ayrıca obezite de meme kanserinde çok büyük bir risk oluşturmaktadır (Magnusson *et al.*, 1998). Obezite seviyesi vücutta toplam aromataz aktivitesi ile doğru orantı gösterdiğinden (Longcope *et al.*, 1986) buradaki ilişki östrojen üretimindeki artışla da açıklanabilir. Aromataz, östrojen biyosentezinde androjenlerin östrojenlere çeviriminde kontrol basamağını katalizleyen bir enzimdir (Santen *et al.*, 1999).

Kadınlarda menapoz öncesinde östrojen sentezi yumurtalıklarda gerçekleşir. Menapoz sonrasında ise östrojenler deri, yağ ve kas dokularında bulunan aromataz enziminin etkileştiği androjenik substratlardan sentezlenir. Aromataz enzimi periferel dokularda, ayrıca meme dokusunda ve meme tümör dokusunda bulunmaktadır (Santen *et al.*, 1999).

Östradiol üretiminde aromataz enziminin konsantrasyonu ile onun substratları olan testosteron ve androstenodione birincil belirleyicilerdir. Östradiolün üretim seviyesinin birincil düzenleyicisi olan aromataz vücutta bol miktarda bulunduğundan östrojen birçok dokuda sentezlenebilmektedir. Aromatazın ovaryumda en fazla olduğu dönem pro-menapozdur ve bu sırada ovaryum estradiolün en önemli kaynağıdır. Ovaryumda aromatazın substratı olan andostenoidene de fazla miktardadır ve hipofizden salgılanan LH (luteinleştirici hormon) seviyesi ile düzenlenmektedir. Ayrıca periferel yağ dokusu da fazla miktarda aromataz içmesiyle birlikte meme dokusunun kendisi de aromataz içerir ve *in situ* östrojen sentezleyebilmektedir (Santen *et al.*, 1999).

Endojen veya ekzojen östrojen ile uyarılan hücre çoğalmasındaki artış, hücre bölünme ve mutasyon miktarını da artırmaktadır (Preston-Martin *et al.*, 1993). Çoğalma hızı arttığında DNA'nın tamiri için gerekli zaman azalmaktadır. Buna ilaveten hücre bölünmesi sırasında mevcut olan tek iplikli DNA, çift ipliğe göre hasarlara daha hassastır ve gen duplikasyonları meydana gelebilmektedir. Estradiol 4-OH estradiole dönüştürülür ve sonrasında östrojen kininlere dönüştürülür. Kininler gunanine bağlanır ve bir glikosidaz enzimiyle DNA'dan uzaklaştırılarak N-7-guanin-kinin veya N-3-adenin kinin konjuganlarına dönüştürülür (Şekil 1.2.). Depürine haldeki DNA'nın kalan parçası replikasyon sırasında G'den T'ye ve A'dan T'ye şeklinde nokta mutasyonlarına yol açar. İlaveten kininler tekrar 4-OH estradiole kinin redüktaz yoluyla geri dönüştürülebilirler. 4-OH estradiol ve 3,4 estradiol kinin

(Santen *et al.*, 1999).



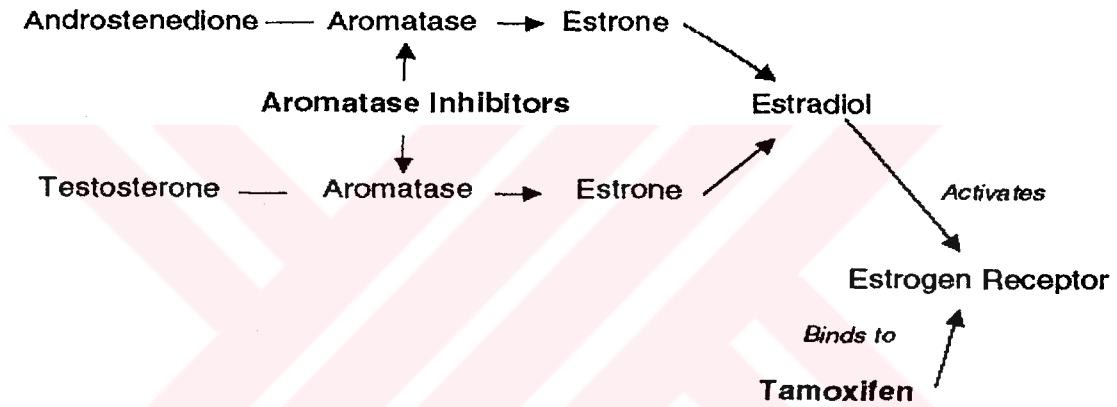
Şekil 1.2. Östrodiol’ü genetoksik metabolitlere götüren biyokimyasal patikalar. Östrodiol ve östron özgül P450 enzimleri üzerinden 2- veya 4-OH östrodiol’den birine dönüştürülebilir. 2-OH bileşikler kararlı DİNA takılarına varacak şekilde, bileşikler 3,4 kinin’lere metabolize edilebilir ve bu kinin’ler daha sonra Guanin veya Adenin bazlarına kovalent bir şekilde bağlanarak depürinasyona sebep olan takılar

olustururlar. Catechol-o-methyl-transferase (COMT) patikası ve Glutathione patikası, 4-methoxy estradiol veya glutathione konjugatları gibi metillenmiş türev meydana getirerek catecholestrogen'leri detoksifiye eder (Santen *et al.*, 1999).

1.6.2. Aromataz İnhibitörleri

Kemirgen hayvanlarda dışarıdan verilen östrojen hormonun meme kanserine sebep olduğu gösterilmiştir (Furth, 1982). Aromataz inhibitörlerinin yaşlı sıçanlarda iyi veya kötü huylu meme yaralarının kendiliğinden gelişimini önlediği belirlenmiştir (Gunson *et al.*, 1995).

Aromataz inhibitörleri aromatazı inaktive ya da inhibe ederek plazmadaki (doku sıvısındaki) östrojen seviyesini baskılar ve bu şekilde tamoksifenden farklı bir aktivite gösterir (Şekil 1.3.) (Freedman *et al.*, 2005).



Şekil 1.3. Aromataz inhibitörünün ve tamoksifen'in karşılaştırmalı etki mekanizması (Freedman *et al.*, 2005).

1.6.3. Aromataz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması

Aromataz inhibitörleri tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki sınıfta toplanabilir. Tip 1 inhibitörleri androstenedione'nin steroidel analoglarıdır ve androstenedione'nin etki bölgesine geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır. Tip 2 inhibitörleri steroidel olmayan ve enzimin aktif kısmındaki bir Hem grubuna geri dönüşlü olarak bağlanır.

Aromataz inhibitörleri, daha detaylı bir şekilde kliniksel geliştirilme süreçlerindeki kronolojiksel sıralarına göre birinci, ikinci ve üçüncü kuşak Aromataz inhibitörleri olarak sınıflandırılır (Tablo 1.2.).

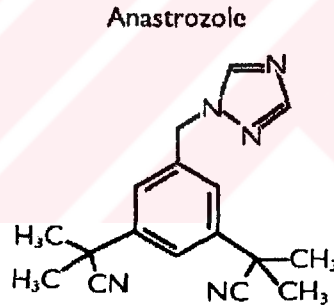
Tablo 1.2. Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılması (Freedman *et al.*, 2005).

	First generation	Second generation	Third generation
Nonsteroidal	Aminoglutethamide	Rogletimide Fadrozole	Anastrozole Letrozole Vorozole
Steroidal		Formestane	Exemestane



1.6.4. Arimideks'in Moleküler Yapısı ve Diğer Aromataz İnhibitörleri ile ilişkisi

Birinci kuşak aromataz inhibitörleri aminoglutethimide'dir ve 1970'li yılların sonuna doğru meme kanseri tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Wells *et al.*, 1978). İkinci kuşak aromataz inhibitörleri formestane (4-hydroxyandrostenedione) tip 1 inhibitörü ve tip 2 inhibitörü olan fadrazoleyi içerir. Bu maddelerin her birisinin kliniksel etkisi olduğu gösterilmiştir fakat belirli eşik değerlerde kullanılmadıklarında ciddi yan etkileri ortaya çıkmıştır (Wells *et al.*, 1978; Stein *et al.*, 1990; Steele *et al.*, 1987). Üçüncü kuşak aromataz inhibitörleri ise 1990'lı yılların başlarında keşfedilmiştir. Tip 1 exemestane (Aromasin ®) ve aynı zamanda Tip 2 inhibitörlerinden anastrozole (Arimidex ®) (Şekil 1.4.) ve letrozole (Femara ®)'yi içerir. Bu üç ajan metastatik, yardımcı ve yeni yardımcı tedavilerin uygulanmasında bir hayli ümit verici sonuçlar ortaya koymaktadır (Freedman *et al.*, 2005).



Şekil 1.4. Arimideks'in kimyasal yapısı (Choueiri *et al.*, 2004).

Üçüncü kuşak aromataz inhibitörlerinin, adjuvant uygulaması ile ilgili yapılmış bir çok çalışmada, tedavi ile ilgili faydalı etkilerinin olduğu bulunmuştur (Goss and Strasser, 2001; Smith and Dowsett, 2003; Clemons *et al.*, 2004). Süre açısından bakıldığında adjuvant tamoksifenin beş yıldan sonra aromataz inhibitörleri için bir işlevi olduğu görülmüştür (Goss *et al.*, 2003). 2-3 yıllık tamoksifen tedavisini takiben bir aromataz inhibitörü uygulamasına geçişin faydalı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Boccardo *et al.*, 2001; Coombes *et al.*, 2004; Boccardo *et al.*, 2003). İlk sıra (line) tedavisinde adjuvant tamoksifene sadece bir aromataz inhibitörü üstünlük sergilemiştir (Tablo 1.3.) (Şekil 1.5.) (Baum *et al.*, 2002). Bu sonuçlar doktorlar ve adjuvant uygulamadaki aromataz inhibitörlerinin kullanan hastalar arasında tartışmaya yol açmıştır. Adjuvant uygulamaya ilave olarak menapoz sonrası

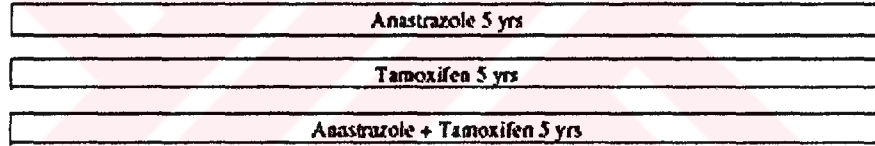
kadınlar için aromataz inhibitörlerin kullanımı çalışmaları, menapoz öncesi kadınlarda meme kanserine karşı olumlu hormon tedavisi için adjuvant uygulamadaki yumurtalıkların durdurulmasını baskılayan bir aromataz inhibitörün ilavesinin güvenliği ve sınırını belirleme üzerinde sürmektedir (Freedman *et al.*, 2005).

Tablo 1.3. Adjuvant tedavide aromataz inhibitörleri (Freedman *et al.*, 2005).

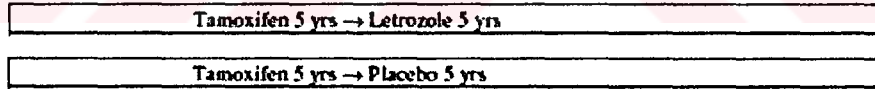
Study	Drugs	Median Followup	N	Contralateral breast cancer	Recurrence (total)	Disease free survival
ATAC trial ²⁹	Anastrozole	47 months	3125	25*	413	89.4% (3 years)*
	Tamoxifen		3116	40	472	87.4% (3 years)
	Combination		3125	35	488	NR
MA-17 ²⁵	Letrozole	2.4 years	2575	75	61	93% (4 years)*
	Placebo		2582	132	106	87% (4 years)
Boccardo <i>et al.</i> ²⁶	Aminoglutethamide	61 months	190	5	42	ns
	Tamoxifen		190	2	42	ns
Boccardo <i>et al.</i> ²⁸	Anastrozole	24 months	208	10*	2	n/a
	Tamoxifen		218	26	5	n/a
IES ²⁷	Exemestane	30.6 months	2362	183*	9*	91.5% (3 years)*
	Tamoxifen		2380	266	20	86.8% (3 years)

* Statistically significant.

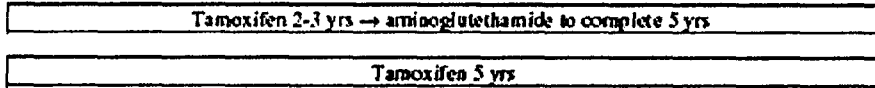
ATAC²⁹



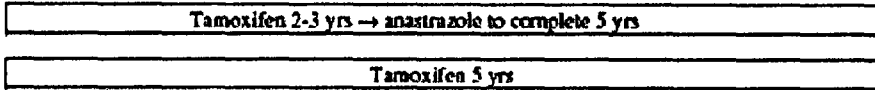
MA-17²⁵



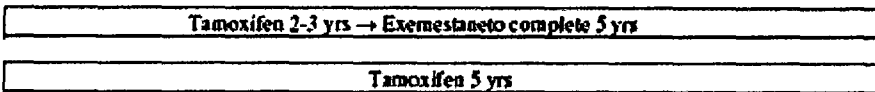
Boccardo²⁶



Boccardo²⁸



IES²⁷



Şekil 1.5. Aromataz inhibitörlerinin adjuvant uygulamalardaki şematik gösterimi (Freedman *et al.*, 2005).

Metastatik uygulamada aromataz inhibitörlerinin tamoksifenden üstünlüğü birçok çalışma ile gösterilmiştir. Değişik bir çok deneme üçüncü kuşak aromataz

inhibitörleri standart ikinci çizgi metastatik tedavi olan megestrol asetat ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak üç aromataz inhibitörün tümünde belirgin cevaplar görülmüştür ve exemestane ile anastrozole maddelerinin hastayı hayatta tutma yönünden yarar gösterdiği ortaya çıkmıştır (Tablo 1.4.) (Freedman *et al.*, 2005).

Tablo 1.4. Metastatik durumda aromataz inhibitörlerinin megestrol asetat'la karşılaştırılması (Freedman *et al.*, 2005).

Reference	Drugs studied	Subjects	Response (%)	Clinical benefit (%)	Time to progression (months)	Overall survival (months)
Buzdar <i>et al.</i> ¹³	A	263	10	35	4.8	n/a
	M	253	8	34	4.8	n/a
Dombernowsky <i>et al.</i> ¹⁵	L	174	24*	35	5.6	25
	M	189	16	32	5.5	22
Buzdar <i>et al.</i> ¹⁶	L	199	16	27	3	29
	M	201	15	24	3	26
Kaufmann <i>et al.</i> ¹⁴	E	366	15	37	4.7*	
	M	403	12	35	3.8	28
Goss <i>et al.</i> ¹⁷	V	225	10	24	2.6	26
	M	227	7	27	3.3	29

E: exemestane; A: anastrozole; L: letrozole; M: megestrol acetate; V: vorozole.

Adapted from Smith I, Dowsett M.¹¹

* Significant difference from megestrol acetate.

Karışık tedavilerinde aromataz inhibitörü olan anastrozole, letrozole ve tamoksifen içeren exemestane ile metastatik tedavide karşılaştırması yapılmıştır (Tablo 1.5.). Bu tedavilerin tümü aromataz inhibitörleri ile ilgili düşünüldüğünde istatistiksel olarak belirgin kliniksel yarar göstermiştir (Freedman *et al.*, 2005).

Tablo 1.5. Metastatik durumda aromataz inhibitörlerinin tamoksifen'le karşılaştırılması (Freedman *et al.*, 2005).

Reference	Drugs	Subjects	Response	Clinical benefit	Time to progression (months)
Mouridsen <i>et al.</i> ¹⁸	L	453	30*	49*	9.4*
	T	454	20	38	6.0
Nabholtz <i>et al.</i> ¹⁹	A	171	21	59*	11.1*
	T	182	17	46	5.6
Bonnetterre <i>et al.</i> ²⁰	A	340	33	56	8.2
	T	328	33	56	8.3
Paridaens <i>et al.</i> ²²	E	190	44*	71	10.9 ^a *
	T	192	29	66	6.7 ^a

A: anastrozole; L: letrozole; E: exemestane; T: tamoxifen.

Adapted from Smith I, Dowsett M.¹¹

* Progression free survival.

^a Significantly different from tamoxifen.

Hormonal tedaviye karşı direnç hormon reseptörü pozitif olan meme kanserinin kontrol altına alınmasında gerçekleşen bir ana girişim olarak sürmektedir. Direncin farklı sebepleri vardır: (a) ER ekspresyonunda meydana gelen kayıp ya da azalma, (b) hormonal ajanlara karşı daha az duyarlı olmayı sağlayan ER mutasyonları, (c) Dirençli hücrelerdeki kofaktör seviyelerindeki değişme,

(d) HER-2'nin aşırı derecede ekspresyonu (Freedman *et al.*, 2005). *In vitro* çalışmaları ER ve HER-2 pathway (metabolik yolunda)'leri arasındaki etkileşim ve karşılıklı iletişim olduğu yönündedir. Önceki çalışmaları HER-2'nin ekspresyonunu (Read *et al.*, 1990) aşağı akışlı regüle eden (downregule) östrojen olduğunu göstermiştir. Östrojen HER-2 ekspresyonunu aşağı akımlı regüle eder (Read *et al.*, 1990), tamoksifen ise HER-2'nin transkripsiyonunu yukarı akımlı regüle eder (Antoniotti *et al.*, 1992). ER+ ve tamoksifene duyarlı olan MCF-7 meme kanser hücrelerin HER-2 kodlayıcı bölgesi ile transfeksiyonu bu hücrelerin tamoksifene duyarsızlaşmasına sebep olduğu gösterilmiştir.

Tüm bunlarla birlikte kliniksel veriler HER-2'nin aşırı derecede ekspresyonunun tepki (reaksiyon, cevap) oranında azalmaya neden olabileceği ve hormon tedavisi ile muamele görmüş hastalarda hayatta kalmayı azaltabileceğini göstermiştir (Giai *et al.*, 1994; Stal *et al.*, 2000; Lipton *et al.*, 2002). Bu çalışmalar her ne kadar geçmişle ilgili olsa da HER-2'nin hormonal tedaviye karşı direnç gösterdiği açıktır ve bu durumu destekleyen verinin daha ayrıntılı bir şekilde mercek altına alınmasına ihtiyaç vardır.

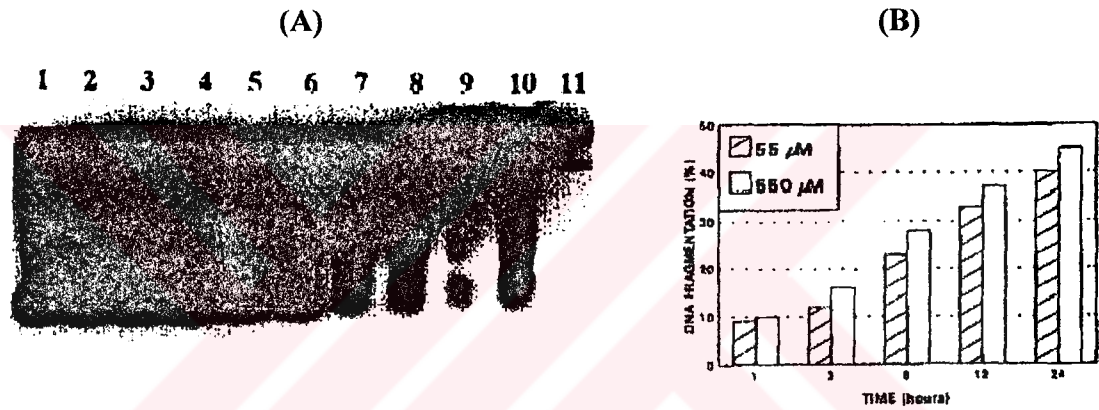
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Kersetin'in H_2O_2 ile uyarılan oksidatif baskıya maruz bırakılan hücreler üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Nakayama *et al.*, 1993; Yakoo and Kitamura 1997). Bununla birlikte hidroksil radikalleri üzerinde, onları yok edici bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir (Hanasaki *et al.*, 1994; Oyama *et al.*, 1999), H_2O_2 ile uyarılarak oksidatif strese maruz kalmış sıçan timosit hücreleri üzerinde, bir antioksidan ajan olan Kersetin'in koruyucu etkilerini araştırmışlardır. $10 \mu M$ 'lık Kersetin'in, hücre popülasyonunda $300 \mu M$ H_2O_2 ile uyarılan değişiklikleri büyük oranda baskılamaktadır. Ayrıca hücre popülasyonunda $3mM$ H_2O_2 ile uyarılan değişiklikleri de hafifletmekte etkili olduğunu da göstermektedirler. Elde ettikleri bu sonuçlara göre, Kersetin'in hidrojen peroksit ile uyarılan oksidatif stresten muzdarip hücreler üzerinde koruyucu bir potansiyel etkiye sahip olduğu yargısına varmışlardır (Nakayama *et al.*, 1993; Yakoo and Kitamura 1997).

Kersetin'in bağırsak kanseri (Hosokawa *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992), HeLa (Hosokawa *et al.*, 1990), kan kanseri (Elia and Santoro, 1994) ve deri kanserinde (Sliutz *et al.*, 1996) hsp'lerin (heat shock proteins) ekspresyonunu önlediğini göstermiştir. Bu hücreler Kersetin ile muamele edildikten sonra ısı güdümlü hsp27 ve hsp70 ekspresyonunu önlediği gösterilmiştir (Hansen *et al.*, 1997). Fakat HeLa, MDA-MB-231 hücre hatlarında Kersetin'in ısı uygulaması sonrasında ısı şok transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma kabiliyetini de önlerken (Nagai *et al.*, 1995; Hosokawa *et al.*, 1992), MDA-MB-231 hücrelerinde DNA'ya bağlanma kabiliyetini önlememektedir (Elia *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1994). Bu sonuçlara göre Kersetin'in hücreye özgü davranış biçimleri sergileyebilecekleri önerilmektedir (Hansen *et al.*, 1997).

Kersetin'in HL-60 hücrelerinin büyümesinde güçlü bir inhibe edici etkiye sahip olduğunu belirttiler (Kang and Liang, 1997). Kersetin'in HL-60 hücrelerinden membrana ait TPK ve sitozole ait PKC aktivitelerini dikkate değer bir seviyede inhibe ettiğini fakat sitozole ait TPK ve membrana ait PKC üzerinde etki göstermediğini buldular (Kang and Liang, 1997). Ayrıca sonuçlarına göre Kersetin HL-60 hücrelerinde fosfoinosititlerin üretimini büyük ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir (Kang and Liang, 1997).

Kersetin ile muamele edilmiş olan K562 lökemia hücre hatlarının DNA fragmentleri incelenmiş ve farklılıklar görülmüştür (Csokay *et al.*, 1997). Kersetinin sitotoksik etkisi 1-24-48-72 ve 96 saatlik sürelerle sitotoksik test ile ölçülmüş ve hücrelerin apoptosize meyilli oldukları görülmüştür. Kersetin ile muamele edilmiş hücrelerin programlı hücre ölümü ile bağlantılı olan hücresel değişimleri indüklediği bulunmuştur (Csokay *et al.*, 1997). 1 saat ve daha uzun süreli Kersetin muamelesinden sonra (55 μ M ve 550 μ M arasında) DNA'nın yaklaşık 180 baz çiftinden oluşan fragmentler gösterdiği bulunmuştur [Şekil 2.1. (A)]. 550 μ M konsantrasyona kadar Kersetinin 24 saatlik proliferasyon süresince kromozomal DNA fragmentasyonunun %45 seviyesinde olduğu ve 5.5 μ M seviyesinde ise DNA ladder formasyonu olmadığı gözlenmiştir [Şekil 2.1. (B)] (Csokay *et al.*, 1997).



Şekil 2.1. A) K562 lösemi hücrelerinde Kersetinin etkisi sonucunda meydana gelen kromozomal DNA fragmentasyonu. 15 dakika ve 24 saatlik süre diliminde 55 μ M Kersetin konsantrasyonuna maruz bırakılmış hücreler. Line 1: Kontrol hücreleri; Line 2-10: 15 dakika, 30 dakika, 1,3,6,12,18,24 saat; Line 11: markır DNA. **B)** İnsan lösemi hücrelerindeki Kersetin'in meydana getirdiği DNA fragmentinin yüzdesi. Taralı sütunlar 55 μ M, beyaz sütunlar 550 μ M'lık konsantrasyonun etkisini göstermektedir (Csokay *et al.*, 1997).

Normal de hücrelerde; CD95 ve onun ligandı olan CD95-L fizyolojik apoptosisin bazı tiplerinde anahtar yol oynamaktadır. CD95 yollu apoptosisi şu yollarla tetiklenebilir; ya killer (katil) hücreler gibi bazı hücre tipleri üzerinde ekspresse olan reseptörün doğal ligandı CD95-L ile tetiklenir ya da anti CD95 gibi agonistik (doğal olmayan) antitadilerle tetiklenebilmektedir (Nagata, 1997; Krammer *et al.*, 1998). CD95 yolu apoptosisin en iyi anlaşılan sinyal ileti yolunda FADD (Fas-associated death domain) ve kaspaz 8 yer almaktadır. Bunların aktivasyonu bir proteaz kaskatını tetiklemek suretiyle hücre tipinin orjinine bağlı olarak kaspaz 3,6 ve 7 gibi aşağı akışlı efektör kaspazlarının aktivasyonuna yol açmaktadır. CD95 patikasının aktivasyonu mitokondriye bağlı apoptotik olayı da

uyarmaktadır (Li *et al.*, 1998; Varadhachary *et al.*, 1998; Nunez *et al.*, 1998). Bununla beraber farklı hücre tipleri spesifik tipine bağlı olarak iki CD95 sinyal patikasından birini kullanmaktadır. CD95 uyarımlı Kersetin'in etkisini çalışmak için HPB-ALL (akut lenfoblastik lenfoma) hücresi kullanılmıştır. Bu hücreler *in vitro* uyarılan apoptosisi gösterdikleri şaşırtıcı dirençleri ile tanınmaktadırlar ve sinyal iletiminin CD95 patikası değişmiş bir tümör tipinden üretilmiştir (Russo *et al.*, 1999).

CD95 yollu apoptosise direnç gösteren malignant hücrelerini Kersetin'in duyarlı hale getirebildiğini gösterdiler (Russo *et al.*, 1999), bulgularında Kersetin ve anti-CD95 i birlikte kullandıklarında hücrelerin canlılığında %50 azalma olduğunu bildirilmektedir. Kersetin'in kendi başına apoptosisi uyarmadığını ortaya koydular. Fakat anti-CD95 monoklonal antibadi (CD95 reseptörünü ekspresse eden hücrelerde apoptosisi uyarmada aktif) ile birlikte apoptosisi güçlü bir şekilde artırdığını gösterdiler (Russo *et al.*, 1999).

Normalde hücrelerde; Bcl-2 mitokondriyal membranın bütünlüğünü koruyarak sitokrom C'in salınmasını inhibe etmekte ve böylece kaspaz 3 aktivasyonu önlenmektedir. Kaspaz 3 apoptosisteki önemli cellatlarından biridir. PARP gibi birçok anahtar proteinin proteolitik parçalanmasının sorumlusudur. PARP DNA tamir mekanizmalarından strese karşı yanıtta ki DNA tamirinde yer almaktadır ve *in vivo* kaspaz 3'ün parçalaması için ana hedeflerden biridir; PARP'ın parçalanması hücrel bütünlüğün bozulmasına yardım eder ve apoptosise giden hücreleri için bir belirteçtir (Kim *et al.*, 2005).

Kersetin'in kolon kanser hücreleri üzerinde büyümeyi önleyici ve apoptosis mekanizmaları hakkında çalışmalar yapmışlardır (Kim *et al.*, 2005). Kersetin'in ErbB2, ErbB3, Akt (Protein kinase B)'nin ekspresyonunu ve Akt'ini fosforilasyonunu negatif yönde etkileyip etkilemediğini araştırmışlar. Kersetin'in Bcl-2, Bax (Bcl-2 associated x protein), poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve kaspaz 3'ün ekspresyonu üzerinde etkili olup olmadığını incelemişler. Bcl-2 seviyesinde hücreler 72 saat süreyle Kersetin maruz bırakıldığında doza bağlı bir şekilde azalma olduğunu belirlemişler (Kim *et al.*, 2005). Oysa Bax seviyesi değişmemiştir. Kersetin'in konsantrasyonu arttıkça parçalanmış kaspaz 3'ün 17 ve 19 kDa'luk parçalarında bir artış gözlenirken 32 kDa'luk parçalanmamış kaspaz 3'de bir azalma görülmüştür. Kersetin PARP'ın proteolitik parçalanmasını uyarmaktadır.

Gıdalarda glikozid olarak bulunan polifenollerin anti-kolon kanseri aktivitesi gösterebilmeleri için mutlaka hidroliz olmaları gerekmektedir (Kim *et al.*, 2005). Kersetin'in insan kolon kanseri hücrelerinde artan apoptosisinde en azından kısmen hücre büyümesini azalttığı görüşü doğrulanmıştır (Kim *et al.*, 2005). Bu araştırmacılara göre Kersetin'in apoptosisi artıran etkisi Bcl-2 seviyesini düşürmesinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmüşlerdir. Çalışmalarından elde ettikleri veriler göre Kersetin, Akt patikasının inhibe edilmesi yoluyla kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ediyor olabilir. Ayrıca ErbB2, ErbB3 protein ekspresyonunu Kersetin'in azalttığı gösterilmiştir. erbB genlerinin ve özellikle erb B2'nin bazı insan kanseri tiplerinde aşırı miktarda ekspresse edildiği gösterilmiştir (Kim *et al.*, 2005).

Meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlardan birisi olan tamoksifen dünyada en iyi bilinen ve hasta tedavi reçetelerinde en çok yazılan ilaçlardan birisidir ve aromataz inhibitörleri grubunda yer almaktadır. Meme kanserini tedavi etmek için yapılan operasyon sonra uygulanan yardımcı tedavide aromataz inhibitörü olan anastrozole (Arimideks) menapoz sonrası kadınlarda tamoksifene göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. Ameliyat sonrası yapılan Arimideks'inde dahil olduğu neoadjuvant tedaviler kanserin yeniden oluşumunu önlemekte etkili olmaktadır (Nicholls, 2002).

ATAC (Arimideks, Tamoxifen Alone in Combination) uygulamasının sonuçları adjuvant tedavi uygulamasında, ilk başlarda tek başına kullanılan tamoksifenin yerini almıştır (Baum *et al.*, 2001).

Meme kanserinin tedavisinde bu en son tedavi şeklinde aromataz inhibitörleri ile birlikte olan yaklaşım, tamoksifenin tekeli ortadan kaldıran en son kullanım şeklidir. Gelişmiş metastatik meme kanserleri için birinci ve ikinci hat tedaviler olarak aromataz inhibitörlerinin etkinliği artık bir gerçektir (Bonnetterre, J. *et al.*, 2000; Nabholz, *et al.*, 2000; Mouridsen, *et al.*, 2001) ve ATAC ve diğer denemelerin sonuçları adjuvant uygulamaları genişletmektedir (Baum *et al.*, 2001; Ellis, *et al.*, 2001).

Tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinin her ikisi de kanser hücrelerinin büyümesi ve bölünmesini uyaran dişi estrogen hormonunu önlemek suretiyle çalışır. Bu yüzden östrojen reseptörleri taşıyan östrojen-pozitif tümörlerde sadece aromataz

inhibitörleri ve tamoksifen etkilidir. Bu iki madde östrojeni tamamen birbirinden farklı yollarla engellemektedir. Bir antiestrogen olarak bilinen tamoksifen estrogen reseptörlerini geri dönüşümsüz bir şekilde kilitleyerek çalışır öyle ki estrogen artık bağlanamaz ve hücrelere bölünme sinyali ulaşamaz. Aromataz inhibitörleri ise aromataza bağlanır ve onu inaktive eder. Aromataz, androjenleri estrogenlere çeviren bir enzimdir. Bu yolla vücuttaki estrogen konsantrasyonu azaltılır. Bu alternatif uygulama özellikle menapoz sonrası aşamayı yaşayan kadınlarda başarılı olmaktadır çünkü menapoz sonrasında ovaryumların işlevi kesildiğinde aromataz vücuttaki estrogenin çoğunun sentezlenmesinden sorumludur; ama aromataz inhibitörleri, ovaryumları aktif olan menapoz öncesi kadınlar için uygun değildir. Bu kadınlar için hala tamoksifen gibi ilaçların antiestrogenik etkisinin yerini alacak bir yöntem mevcut değildir. Yine de meme kanserlerinin yaklaşık %80 i menapoz sonrasında geliştiğinden ve bu kadınların %70 inin estrogen pozitif tümörlere sahip olacağı dikkate alındığında, aromataz inhibitörleri meme kanserleri için umut vaat etmektedir (Nicholls, 2002).

Son yıllarda aromataz inhibitörlerinin hormon reseptörü pozitif olan meme kanserli hastalarda uzun yıllar kullanılmasının gerekli olmasına karşın faydalı olduğu bilinmektedir (Smith and Dowsett, 2003). Bu yüzden de aromataz inhibitörlerine dirençli olan adjuvant ya da ana tedavide kullanılabilecek ilaçların da içinde olduğu markır mekanizmalarının bilinmesi önemlidir. Meme kanseri olan hastalarda steroid reseptörü pozitif olanların oranı net olarak tedaviye cevabın fazla olduğunu göstermemektedir ve bunun sebebinin de novo ya da özel bir direnci olduğu gösterilmiştir. Bu iki durum başlangıç cevabın neredeyse tümünün er ya da geç bozulacağı ve direnç gerektirdiği şeklinde tanımlanır. Böyle bir direncin de novo direncini belirleyen benzer moleküler karakteristiklerinden olabileceği ya da olamayacağı düşünülmektedir. Bu iki tip direnç tipinin verilerinin farklı olduğu düşünülmektedir (Dowsett *et al.*, 2005).

Son yıllarda östrojen reseptörlerinin bulunma miktarı tamoksifenin faydalı olabilmesi açısından bir ön koşul olduğu açıktır (Collaborative Group, 1998). Cevabın olmadığı durumda genellikle aromataz inhibitörlerinden kaynaklandığı tahmin edilir. Bununla birlikte steroid reseptörü negatif olan hastalarda belirgin bir fayda görülmemektedir. ATAC denemesi uygulandığında estrogen ve progesteron reseptörü tanınmayan bir bölüm hasta kaydedilmiştir fakat bunların durumu

immünohistokimyasal yollarla arşivlerdeki kayıtlarla belirlenmiştir. Denemelerin yapıldığı hastaların %1’lik kısmında tamoksifen ve arimideks’li tedavinin meme kanseri tehlikesini önlemede etkin olmadığı görülmüştür (Dowsett and ATAC Trialists Group, 2003). Kliniksel çalışmalarda kayıtlı bulunan hastalardan bir kısmına bakıldığında hormon reseptörü negatif olan hastalara da ulaşılabilir. Tamoksifenin bulunduğu letrozol’lü bir neoadjuvant tedavinin karşılaştırılması yapıldığında başlangıçta Estrojen reseptörü pozitif olarak kaydedilmiş 12 hastanın daha sonradan yapılan testler sonucunda ER ve PR (progesteron reseptörü) bakımından negatif olduğu görülmüştür. Bu hastaların sadece bir tanesi letrozoleye karşı belirgin bir kliniksel cevap göstermiştir. Dört hastanın ER negatif ve PR pozitif olduğu ve bu hastalardan ikisinin letrozoleye cevap verdiği ve bu hastalardan küçük bir grub aromataz inhibitöründen fayda görmüştür.

Metastatik hastalıktaki üçüncü kuşak aromataz inhibitörlerinin rastgele düzenlendiği birincil (first line) çalışmalar esnasında cevap oranları %21 den %33 oranına değişiklik göstermiş, kliniksel faydalarda ise hastalığın en azından 6 aylık bir süre diliminde kliniksel fayda oranı %55-59 seviyelerinde olmuştur. Arimideks ve letrozole’nin neoadjuvant çalışmaları esnasında cevap oranlarının 3-4 aylık sürelerde sırasıyla %37 ve %55 olduğu görülmüştür (Eiermann *et al.*, 2001; Smith and Dowsett, “2” 2003). Bu kliniksel bulgulara dayanarak ER pozitif olan tümörlerin etkili olanlarında aromataz inhibisyonuna karşı dirençli olduğu görülmüştür. Neoadjuvant tedavi esnasında elde edilen dokulardaki biyolojik çalışmalar bu konuya farklı bir görüş açısı getirmiştir. Anastrozole (Arimideks), tamoksifen ya da anastrozole artı tamoksifenli etkin neoadjuvant tedavilerinde hücre proliferasyonu ölçümleri; tedaviden önce, tedaviye başladıktan 2 ve 12 hafta sonra yapılmıştır. Böylece neredeyse tamamı ER pozitif olan meme kanseri hastalarında hücre proliferasyon östrojene bağımlı olmaktadır ve tedavide aromataz inhibitörlerinden belirgin fayda görülmektedir. Meme kanserinde kliniksel bir cevabın oluşması hem büyüme başlangıcı oranı, hem hücre proliferasyonundaki değişiklikler ve hem de aromataz inhibisyonuna bağlı olan hücre ölümüne bağlı olduğu düşünülmektedir. Her şeye karşın yine de aromataz inhibitörlerine karşı olan direncin sürekli olarak değişme eğiliminde olduğu gözükmemektedir (Dowsett *et al.*, 2005).

Tamoksifen gelişmiş meme kanserinin tedavisinde ve kanserin ameliyat sonrasında tekrarlaması ihtimalini azaltan hormonal tedavisinin yapıldığı adjuvant

uygulamaların her ikisinde de önemli bir role oynamaktadır. Estrojen reseptörünü bloke etme hareketi hücrenin büyümesini etkileyen bazı genlerin ekspresyonunu tetikleyebilir olabilmektedir. Bu durum Tamoksifenin niçin bazı meme kanserlerinde başarısızlık gösterdiğini açıklamaktadır. Ayrıca kanın pıhtılaşması, vaginal kanamalar, kilo alma, felç ve diğer dokularda oluşabilecek yeni tümörlerin oluşması gibi bazı kötü yan etkileri de olabilir (Nicholls, 2002).

Son yıllarda kanser tedavilerinde aromataz inhibitörleri ile bir Prostaglandin olan COX-2'in inhibitörlerinin kombine kullanımı denenmiştir (Bundred and Barnes, 2005). Aşırı COX-2 üretiminin transjenik farelerde meme dokusunda apoptosis olayının, normal dokulara göre azalmasına yol açtığı belirlenmiştir (Liu *et al.*, 2001). İnsanlarda DCIS (Half *et al.*, 2002) ve yayılcı meme kanserinin her ikisinde de COX-2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Boland *et al.*, 2004). Bu artışın, hücre çoğalması, apoptosis de azalma ve yeni kan damarları oluşumundaki artış ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Kirkpatrick *et al.*, 2001; Boland *et al.*, 2004). PGE₂'nin (prostaglandin E2) varlığı aromataz aktivitesinin seviyesinde dikkate değer bir artışa yol açmaktadır (Zhao *et al.*, 1996). PGE₂ ve sitokinler tümör hücrelerindeki aromataz aktivitesini düzenlemektedir (Michael *et al.*, 1997; Brueggemeier *et al.*, 2001). COX-2 inhibitörleri tarafından PGE₂'nin aktivasyonunun inhibe edilmesi aromataz aktivitesini inhibe edebilmektedir ve aromataz inhibitörleriyle kombine edildiğinde, ortak hedefleri olan aromatazı inhibe etmek suretiyle tümör tekrar riskini azaltmaktadır (Bundred and Barnes, 2005).

Arimideks gibi aromataz inhibitörleri ise yan etkiye sahip gibi gözükmemektedir çünkü bunlar menapoz sonrası kadınlarda östrojen seviyesini düşürerek çalıştıkları için osteoporoz ve kemik kırılmaları riskini artırmaktadır. Uzun süreli kullanımının kemik metabolizması üzerine olumsuz etkileri görülebilir (Nicholls, 2002). Yılda 1000 kadın için kemik kırılması oranı anastrozole kullanımında 21.55 iken tamoksifen kullanımında 13,44 olduğu bulunmuştur (Lester and Coleman, 2005). Sağlıklı kadınlarda ise bu oranın 19.10 olduğu belirlenmiştir (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002), buna göre anastrozole'nin kemik mineral yoğunluğunu azalttığı ve tamoksifenin kemiği koruyucu özelliğine sahip olmadığı belirlenmiştir (Lester and Coleman, 2005).

Aromataz inhibitörlerinden Fadrazolenin kemirgenlerde spontan meme kanserlerini önlediği gösterilmiştir (Gunson *et al.*, 1995). Anti-östrojenlerden

tamoksifen ve raloksifene yeni meme kanserlerinin başlangıcını sırasıyla %45 ve %20 oranıyla 30 ay dört yıllık bir periyotta verildiğinde azaltmaktadır (Cummins *et al.*, 1998; Wickerham *et al.*, 1998). Fakat östrodiol seviyesindeki aşırı düşme hızlı kemik kaybına ve/veya kardiyovasküler hastalığa neden olabilmektedir (Santen *et al.*, 1999).





3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Hücre Kültürü

Meme kanseri hücrelerinde Kersetin ve Arimideks'in etkilerini araştırmak için MCF-7 ve T47-D (human breast cancer cell lines) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler Londra Üniversitesi, ICSM, Jinekoloji Bölümünden Dr. Roger WHITE tarafından hediye edilmiştir.

MCF-7 hücreleri, göğüs zarı dışına taşmış adenokarsinoma epitel hücreleridir. Bu hücrelerde IGFBP (insulin benzeri büyüme faktör bağlanma proteinleri), BP-2 (binding protein-2), BP-4, BP-5 üretilmektedir. Bu hücrelerde östrojen reseptörü pozitifdir. MCF-7 farklılaşmış memeli epitelyumun bazı özelliklerine sahiptir. Mesela östrojen reseptörü üzerinden estradiol işleme özelliğine sahip olup ayrıca kubbe oluşturabilme kabiliyetindedir (ATCC; American Type Culture Collection) . Tx-4 onkogeni içerir. MCF-7 hücrelerinin büyümesi TNF α tarafında inhibe edilmektedir. IGFBP'lerin sekresyonu anti-östrojenler ile ayarlanabilmektedir. Hücreler WNT7B [wingless-related MMTV (Mouse mammary tumor virus) integration site 7B] onkogenini eksprese ederler (ATCC).

T47 hücreleri, duktal karsinomaya sahip hastaların göğüs zarından sızmış metastatik bölgedeki meme tüp dokusundan alınmıştır. Bu hücrelerin reseptörleri Caltitonin, androjen, progesteron, glucocortizoit, prolaktin ve östrojen reseptörleri pozitifdir. Ayrıca tümörjenik özelliği olup yumuşak agar da koloniler oluşturur. T47 hattı memesinde duktal karsinoma gözlenen 54 yaşındaki dişi bir hastadan meme zarından sızmış I. Keydar tarafından izole edilmiştir. Farklılaşmış epitel alt strain (T47-D) sitoplazmik birleşmeler ve 17 beta estradiol, diğer stroidler ve kalcitonin reseptörleri içerdiği bulunmuştur. Hücreler WNT7B onkogenini eksprese ederler (ATCC).

3.1.1. Hücre Kültürü Büyüme Ortamı

MCF-7 ve T47-D hücreleri; DMEM² (Dulbecco's Modified Eagle Medium) F12(1:1), 1X NaHCO₃³, %10'luk FBS [Fetal Bovine (sığır) Serum] ve 100 ünite/ml'lik Pen/Strep solüsyonundan 5 ml içeren besiyerinde¹ 37°C'de, %5'lik CO₂ ortamında büyütülmüştür.

MCF-7 ve T47-D hücreleri, 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda büyütüldü. Büyüyen hücreler (flask zemininin %90-95'ini kaplamış), 3-4 günlük periyotta, yeni flasklara aktarıldı (pasaj). Hücrelerin pasajlanma aşamasında, 1X Tripsin-EDTA⁵ ile flask zemininde kaldırılarak, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra yeni besi yeri ile toplam hücre miktarının 1/3'ü oranında yeni flaska aktarıldı. Kullanılmayacak olan hücreler, sonra kullanılmak üzere saklandı.

3.1.2. Hücre Saklama

Santrifüj edilen hücreler, MCF-7 ($1-2 \times 10^6$), T47-D ($2-2.5 \times 10^6$ hücre) fazla medium (besi yeri) uzaklaştırıldıktan sonra; 37°C'deki 1 ml stok serum⁴ ile yavaş bir şekilde karıştırıldı. Kriyo tüp hemen buz içerisine alınarak, -80°C'de 24 saat saklandıktan sonra sıvı azot tankına aktararak saklandı.

3.2. Hücre Sayımı

3.2.1. Tripan Mavisi Boyama

Hücre sayısı hesaplanırken ilk olarak hücrelerin birbirinden tamamen ayrılmasını sağlayacak şekilde pipetlenir. Toplam hacimden 20µl alarak, tripan mavisi boyasından 20 µl (1:1 oranında) üzerine eklenerek karıştırılır ve hazırladığımız thoma lamının üzerindeki lamelin kenarlarından taşmayacak şekilde lam ve lamel arasına bırakılır.

Hücre sayımı ise thoma lamında sayılarak ortalaması alınır. Bu sayı, toplam hacim X dilüsyon miktarı X 10^4 ile hesaplanarak tespit edildi. Elde edilen veriler Microsoft Excel programı kullanılarak grafiğe dönüştürüldü.

3.2.2. MTS

Deneylerimizde canlı hücre sayısını belirleyebilmek için mitokondriyal solunumda, NADPH'ın biyokimyasal sentezi sırasında meydana gelmekte olan formazanın, meydana getirdiği renk oluşumunu ölçen MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) boya-indirgeme tekniği kullanıldı (Cory *et al.*, 1991). 96'lık plate'deki her kuyucuğa 20µl MTS ekleyip, 2 saat 37 °C'de inkübasyona bıraktıktan sonra Elisa (EL_x800) Reader'da (Eliza okuyucu) 490 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen veriler Microsoft Excel programı kullanılarak grafikleri çizildi.

3.3. DNA Laddering

Bu çalışmadaki DNA Laddering uygulamalarında; Kersetin⁷ uygulamalarının 24 saat öncesinden, MCF-7 ve T47-D hücreleri ayrı ayrı 20 cm²'lik petrilere 1×10^6 hücre ekilerek yapıldı.

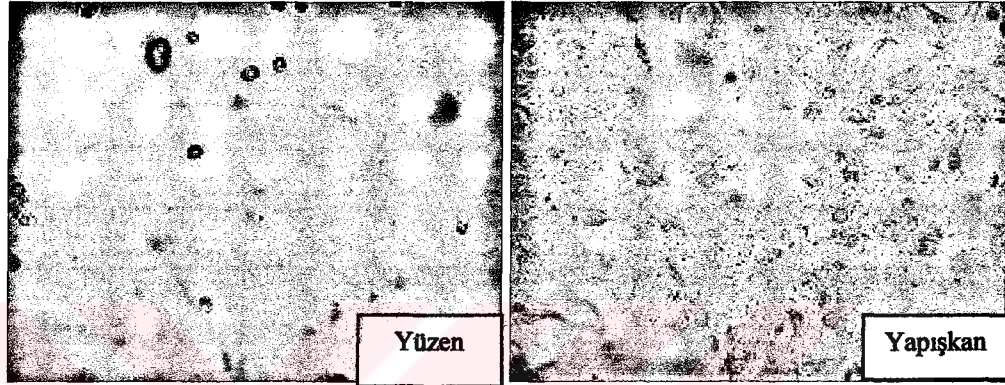
Petrilerdeki hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, çökelen hücrelerin medium'u uzaklaştırıldıktan sonra 1ml soğuk PBS¹⁰ (Phosphate Buffer Saline) eklenerek hücreler ependorf tüpüne aktarıldı. 1000 rpm'de +4°C'deki santrifüjde 5 dakika santrifüj edilerek, üst kısmı uzaklaştırıldı. Tekrar soğuk PBS ilave edilerek santrifüj edildi, üst kısım uzaklaştırılarak ependorf içerisinde 4.4µg/ml RNAase¹¹ ilave edilir. DNA Lizis tamponundan¹² 500µl koyarak, hücreler tamponla karıştırılır ve 37°C'de 1 saat bekletildi. 37°C'de 1 saat bekletilen ependorfların içerisine 4.4 µl proteinaz K koyup 50°C'de 3 saat bekletildi. DNA Lizis tamponuna 700 µl Fenol Kloroform eklenir, ependorfları 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek, 300 µl süpernatant pipet ile yeni bir ependorfuna alındı, bu işlemin tekrarı gerekirse, süpernatant üzerine 500µl Fenol Kloroform eklenerek karıştırıldı ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantın üzerine toplam hacmin iki katı soğuk absolute etil alkol eklenir ve toplam hacim 1/10'u kadar NaAc¹³ (Sodyum Asetat) ilave edilir, -20°C'de bir gece bekletildi. -20°C'den alınan ependorflar 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı pellet halindeki DNA'ya zarar verilmeden uzaklaştırılıp üzerine oda sıcaklığındaki etil alkol eklenerek 13000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılır. Kurutma işleminden sonra DNA pelletine 50 µl 1X TE¹⁴ (Tris-EDTA) ilave edilir. 1X TE'de çözülen DNA 260 nm absorbansta okundu. Elde edilen değer $X 50$ [DNA sabitesi; ($1A_{260}$: 50µg/ml)] $X 50$ (dilüsyon katsayısı:1/50) / 1000 formülü kullanılarak µg/µl cinsinden hesaplandı. 5 µg DNA, 10µl DNA yükleme tamponu¹⁵ ile karıştırılarak ve 1X TBE¹⁶ ile %1.8'lik olarak hazırlanmış, içerisine 0.005 µg/ml Et-Br ilave edilmiş agar'dan¹⁷ yapılmış jel kuyularına yüklenerek, 7V/cm akım ile 1-2 saat DNA yürütüldü (Catter and Martin 1997'den modifiye edilerek kullanıldı).

3.4. Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi

Hücrelerin morfolojik incelenmesinde, hücreler 100x büyütmede Sony Cybershot dijital fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

3.4.1. MCF-7 Hücreleri

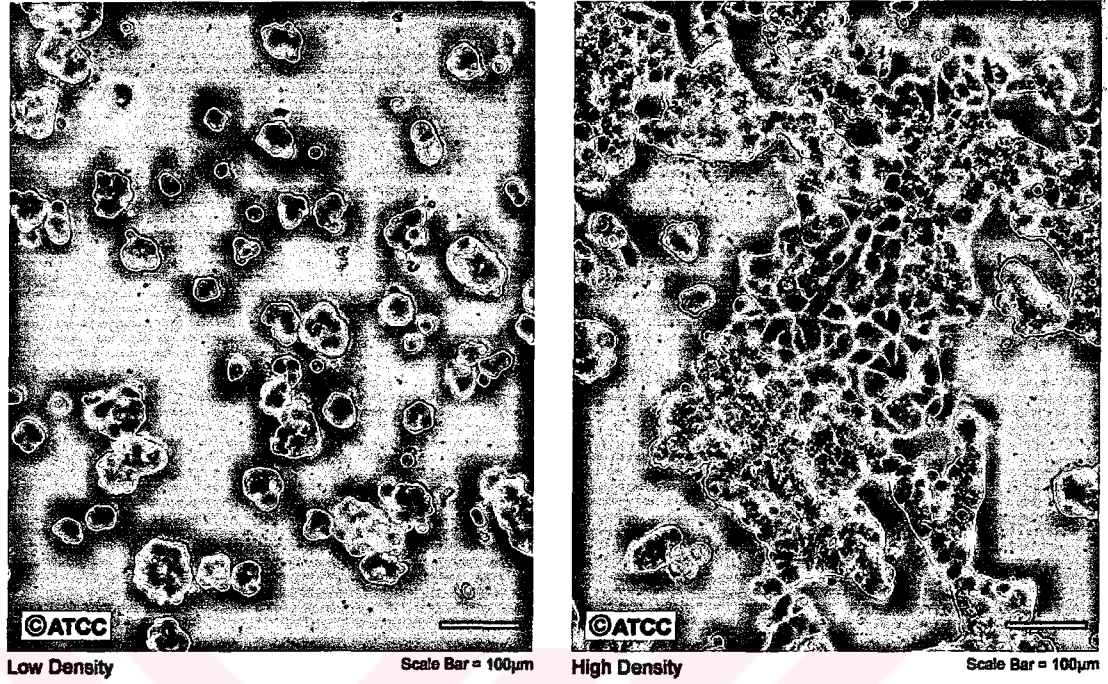
MCF-7 hücreleri morfolojik görünümüne bakıldığında tutunarak (adheşive) yaşamlarını sürdürür. Hücreler, birbirine sitoplazmik uzantıları ile tutunur. Bu halde hücrelerin sitoplazmalarının, hücre zarına yakın kısımları daha parlak bir görünümde olup, hücre zarları da belirgindir. Nukleusları, net olarak gözlemlenip yeşil renk röfle vermektedir. Yapışkan özellikte olduklarından dolayı kendilerine has bir görünümüne olup, yüzer durumdakine oranla daha büyük görülmektedirler (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. MCF-7 Hücrelerinin genel görünüşü.

Yüzer halde iken MCF-7 hücreleri Şekil 3.1. ve Şekil 3.2’de görüldüğü gibi küresel bir hal almakta olup nukleusları belirgin olarak görülememektedir fakat hücre zarının görünümü daha da belirginleşmiştir. Yapışık halde iken birbirlerine, sitoplazmik uzantılarla bağlı olan hücreler, yüzer halde de genellikle ayrılmamış olup grup yapan hücreler, kümeler halinde yüzerler.

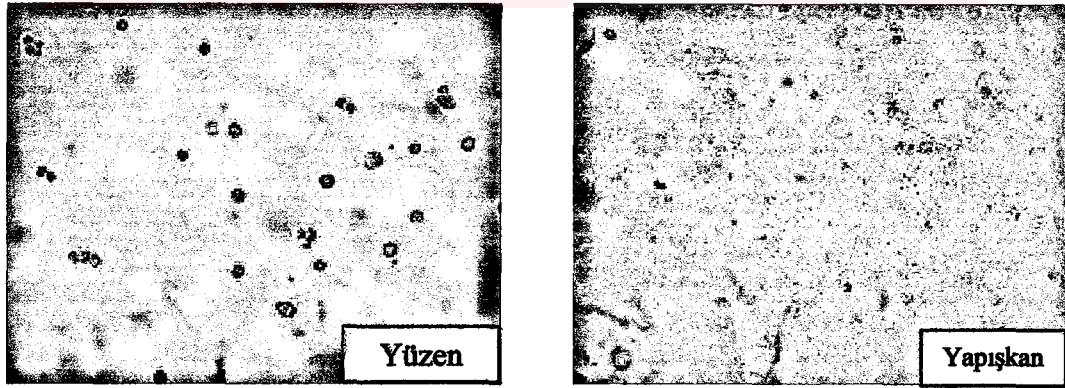
ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Şekil 3.2. MCF-7 Hücrelerinin ATCC'den alınan genel görünüşü.

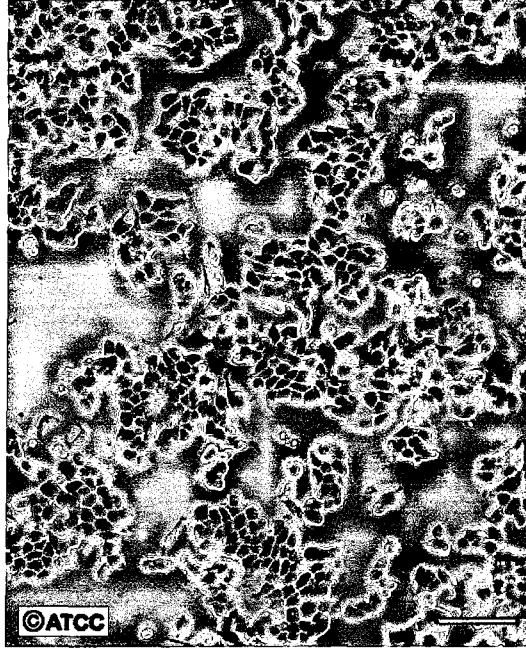
3.4.2. T47-D Hücreleri

MCF-7 hücrelerine oranla daha küçük ve mikroskopik görüntüleri daha az belirgin olan T47-D hücreleri de yapışkan özellikli olup, flask zeminine tutunurlar (Şekil 3.3.).



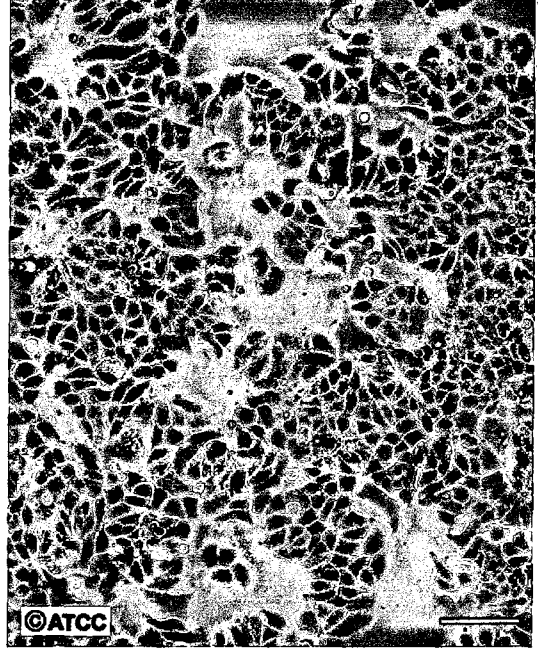
Şekil 3.3. T47-D Hücrelerinin genel görünüşü.

ATCC Number: **HTB-133**
Designation: **T-47D**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Şekil 3.4. T47-D Hücrelerinin ATCC'den alınan genel görünüşü.

Yüzer halde T47-D hücreleri Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'te görüldüğü gibi hücre zarı daha da belirginleşip, nükleus zor seçilebilmektedir. Bu hücreler ise, yüzer durumda 3-5 hücreden oluşan, MCF-7 göre daha küçük gruplar halinde yüzerler.

3.5. Hazırlanan Solüsyonlar

3.5.1. Hücre Kültürü için Hazırlanan Solüsyonlar

[1]

BESİYERİ (500ml)

500 ml besi yeri [DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) F12(1:1)] hazırlanırken; 50 ml stok 10X DMEM F12(1:1), 50 ml stok 10X NaHCO₃, 50 ml %10'luk FBS (Fetal Bovine (sığır) serum) ve 100 ünite/ml'lik Pen/Strep solüsyonundan 5 ml alınarak 345 ml steril dH₂O'da iyice karıştırılarak, +4°C'de saklandı.

[2]

DMEM (10X)

12 gr DMEM toz, steril dH₂O ile 100 ml tamamlandı. Hazırlanan DMEM 0.22µm'lik filtre kullanılarak steril edildi ve +4°C'de saklandı.

[3]

NaHCO₃ (10X)

265mM NaHCO₃, steril dH₂O ile hazırlandı. Hazırlanan NaHCO₃ 0.22µm'lik filtre kullanılarak steril edildi ve +4°C'de saklandı.

[4]

STOK SERUM (1X)

FBS içerisinde, 1:10 oranında steril 10M DMSO çözüldü ve +4°C'de saklandı.

[5]

TRİPSİN-EDTA (1X)

10X Trypsin-EDTA, 1:10 oranında steril 1X Puck's Saline A⁶ ile sulandırılarak, 0.1M NaHCO₃ ile pH=7.4'e ayarlanarak, küçük hacimlerde -20°C'de saklandı.

[6]

PUCK'S SALINE A (1X)

137mM sodyum klorür, 5.36mM potasyum klorür, 5.55mM D-glikoz ve %0.5'lik fenol kırmızı steril dH₂O hazırlandı. 0.1M NaHCO₃ ile pH=7.2'ye ayarlanıp, 0.22µm'lik filtre kullanılarak steril edildi ve +4°C'de saklandı.

3.5.2. Kerşetin ve Arimideks'in hazırlanması

[7]

KERSETİN (100mM)

100mM'lık stok Kerşetin DMSO içinde çözülerek hazırlandı. Deneylerde kullanılan stoklarda DMSO konsantrasyonu SFM (Serum Free Medium)⁹ 1/100'e düşürülerek kullanıldı.

[8]

ARİMİDEKS (1mg/ml)

1 mg'lık Arimideks tableti steril 1ml 1X PBS içerisinde çözülerek hazırlandı.

[9]

SERUM FREE MEDIUM (500 ml)

50 ml stok 10X DMEM F12(1:1), 50 ml stok 10X NaHCO₃, ve 5 ml 100 ünite/ml Pen/Strep 395 ml steril dH₂O'da iyice karıştırılarak, +4°C'de saklandı.

3.5.3. DNA Laddering İçin Hazırlanan Solüsyonlar

[10]

PBS (1X)

137mM NaCl, 1.47mM KH₂PO₄ ve 8.26mM NaH₂PO₄ steril dH₂O ile hazırlandı. 0.1M NaHCO₃ ile pH=7.3'e ayarlanıp, 0.22µm'lik filtre kullanılarak steril edildi. Küçük hacimlerde -20°C'de saklandı.

[11]

RNAase SULANDIRMA CÖZELTİSİ (1X)

10 mM Tris-HCl pH=7.5¹⁸ ve 15mM NaCl steril dH₂O ile hazırlandı. Hazırlanan solüsyon ile RNAase'ı 1 ml'de 540 ünite olacak şekilde sulandırıldı. Işık almayan ortamda -20°C'de saklandı.

[12]

DNA LİSİZ TAMPONU (1X)

10 mM Tris-HCl pH=8, 0.1mM EDTA pH=8 ve 173,38mM SDS¹⁹ steril dH₂O ile hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

[13]

SODYUM ASETAT (1X)

3M NaAc steril dH₂O ile hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

[14]

TE (1X)

10mM Tris-HCl pH=8²⁰ ve 1mM EDTA pH=8²¹ steril dH₂O ile hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

[15]

DNA YÜKLEME TAMPONU (6X)

1:1 oranında, 1X TBE ile 1M Gliserol karıştırılarak, hazırlanan karışıma 0.3 mM Brom fenol mavisi eklendi. Işık almayan ortamda, oda sıcaklığında saklandı.

[16]

TBE (5X)

445mM Tris-Borate, 445mM Borik asit ve 0.5M EDTA pH=8²² steril dH₂O ile hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

[17]

AGAR (%1.8)

1X TBE'de %1.8'lik Agar hazırlanarak, mikrodalga fırın kullanılarak eritildi. Agar'a dökülmeden önce 12.7µM Et-Br eklendi.

[18]

1M TRIS (pH=7.5)

1M Tris-HCl steril dH₂O ile hazırlandı. 0.1M NaHCO₃ ile pH=7.5'e ayarlanıp, oda sıcaklığında saklandı.

[19]

SDS (%10)

346.7mM SDS steril dH₂O ile hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

[20]

1M TRIS (pH=8)

1 M Tris-HCl steril dH₂O ile hazırlandı. 0.1M NaHCO₃ ile pH=8'e ayarlanıp, oda sıcaklığında saklandı.

[21]

1M EDTA (pH=8)

1M EDTA steril dH₂O ile hazırlandı. 0.1M NaHCO₃ ile pH=8'e ayarlanıp, oda sıcaklığında saklandı.

[22]

0.5M EDTA (pH=8)

0.5M EDTA steril dH₂O ile hazırlandı. 0.1M NaHCO₃ ile pH=8'e ayarlanıp, oda sıcaklığında saklandı.

3.6. Kullanılan Kimyasallar

Agarose (Sigma), Arimidex (Astra Zeneca), Bromophenol blue (Sigma), Cell titer 96 A Queous One Solution Assay (MTS Kit) (Promega), D-glikoz (Sigma), Dimethyl sulphoxide (Sigma), Dulbecco's MEM/Nutrient mix (Gibco), Et-Br (Sigma), Foetal Bovine Serum (Gibco), Gliserol (Sigma), HCl (Merck), PBS Dulbecco's (Gibco), Penisilin/Streptomisin (Sigma), Phenol red (Merck), Potasyum klorür (Sigma), Proteinase K (Sigma), Ribonuclease A (Sigma), SDS (Sigma), Sodyum bikarbonat (Gibco), Sodyum klorür (Sigma), Trizma base (Sigma), Trizma hydrochloride (Sigma), Sodyum asetat (Sigma), Trypan blue solution (% 0.4) (Sigma), ve Trypsin-EDTA (10x) (Sigma) kullanıldı.

3.7. Kullanılan Cihazlar

Agaroz jel yürütme ünitesi, +4°C santrifüj (Biofuge 15 R Heraey), CO₂ inkübatörü (Thermo Forma), Elisa Reader (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK INS.), Işık mikroskobu (Nikon Inverted Microscope), Otoklav, Santrifüj (Beckman coulter microfuge 18), Sıcak su banyosu, Sony Cybershot dijital fotoğraf makinesi, Spektrometre (Bio-Rad Smart Spec 3000), Steril kabin ve Thoma lamı kullanıldı.



4. BULGULAR

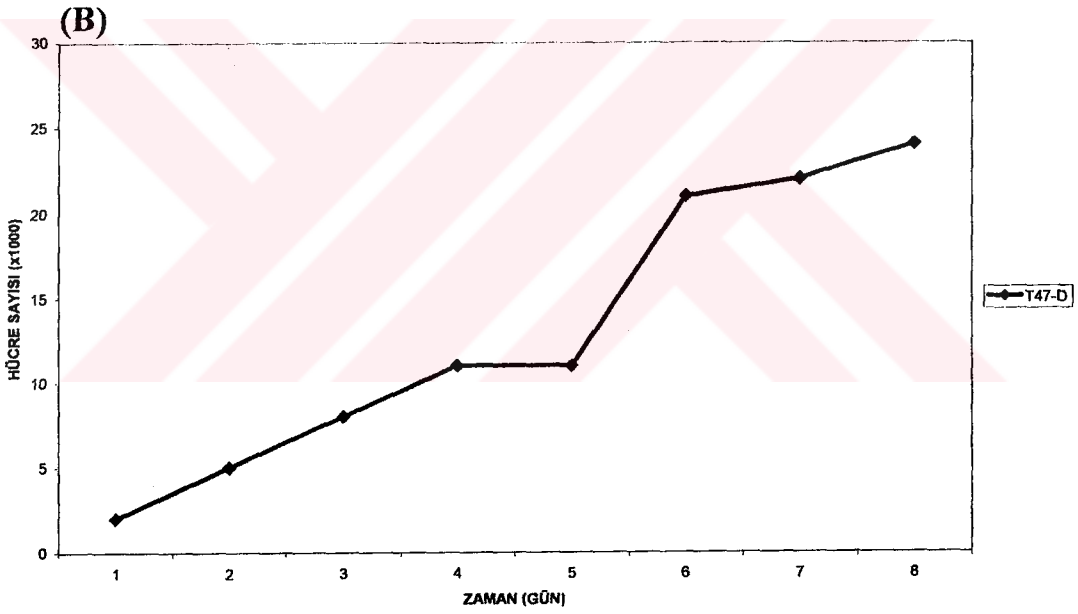
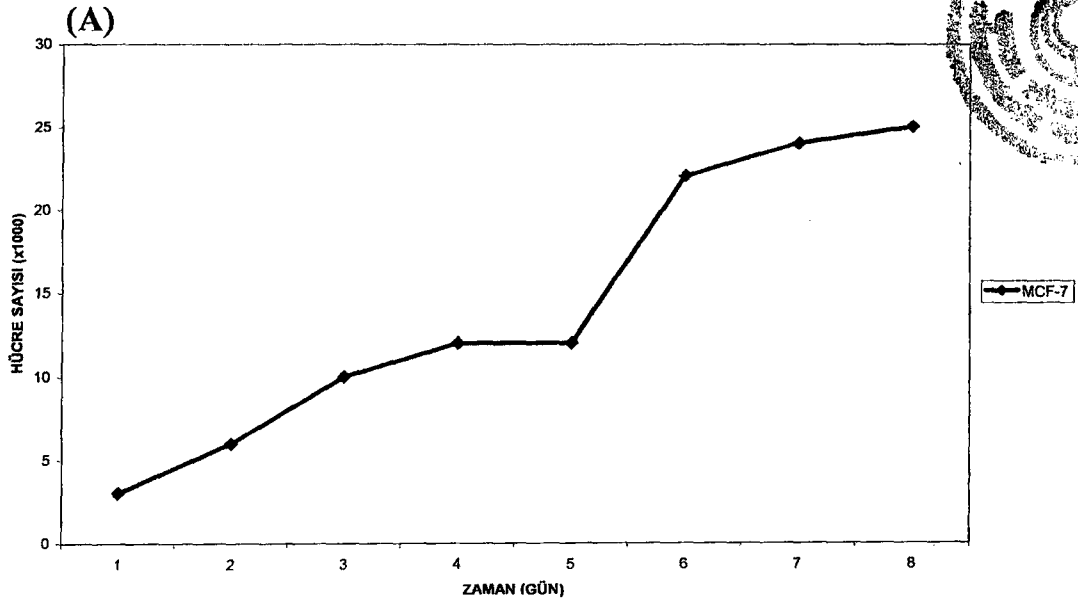
Yaptığımız çalışmada, MCF-7 ve T47-D hücrelerinin büyüme eğrileri belirlendi. Kersetin ve bir Aromataz inhibitörü olan Arimideks'in doza ve zamana bağlı etkilerinin, hücre proliferasyonu ve apoptosis üzerine etkileri belirlendi. Yaptığımız çalışmadaki deneylerde, 96'lık hücre kültürü plate ve 5.5 cm çapında petri kullanıldı. Plate kuyularına; $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde 100µl hücre solüsyonu ve petri kaplarına ise 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde hücre solüsyonundan ekildi.

4.1. Hücre Büyüme Eğrisi'nin Belirlenmesi

4.1.1. Tripan Mavisi Boyama ile Büyüme Eğrisi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinin büyüme eğrileri, Tripan mavisi boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Büyüme grafikleri, 8 gün boyunca, 24 saatlik periyotlarda, 3.2.1.'de Tripan Mavisi Boyama adlı kısımda belirtildiği şekilde hücre sayımları yapıldı.

MCF-7 ve T47-D hücreleri, 8 gün boyunca 24 saatlik periyotlarda sayımı yapılarak büyüme eğrisi grafiği çizildi (Şekil 4.1.). Deneyin 4. günü sonunda hücrelerin besiyeri yenilendi. Sayım işlemine, hücrelerin kuyu yüzeyine yapışabilmeleri için 24 saatlik bekleme sürecinden sonra başlanması nedeniyle, Şekil 4.1. (A ve B)'de görüldüğü gibi her iki hücrede de Lag (durağan) fazı görülemedi. Log (logaritmik) faza geçmişlerdir. 4-5 günler arasında Lag faza giren hücreler, yeni besiyeri ilavesi ile tekrar Log faza girerek, proliferasyona devam etmişlerdir.

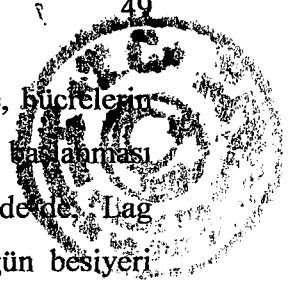


Şekil 4.1. Tripan mavisi boyama ile (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücresi büyüme eğrileri.

4.1.2. MTS Kiti ile Büyüme Eğrisi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinin büyüme eğrileri, MTS boya-indirgeme tekniği kullanılarak da değerlendirildi. Büyüme grafikleri, hücrelerin 8 günlük büyüme periyotlarını izlemek $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde her bir kuyuya eklendi.

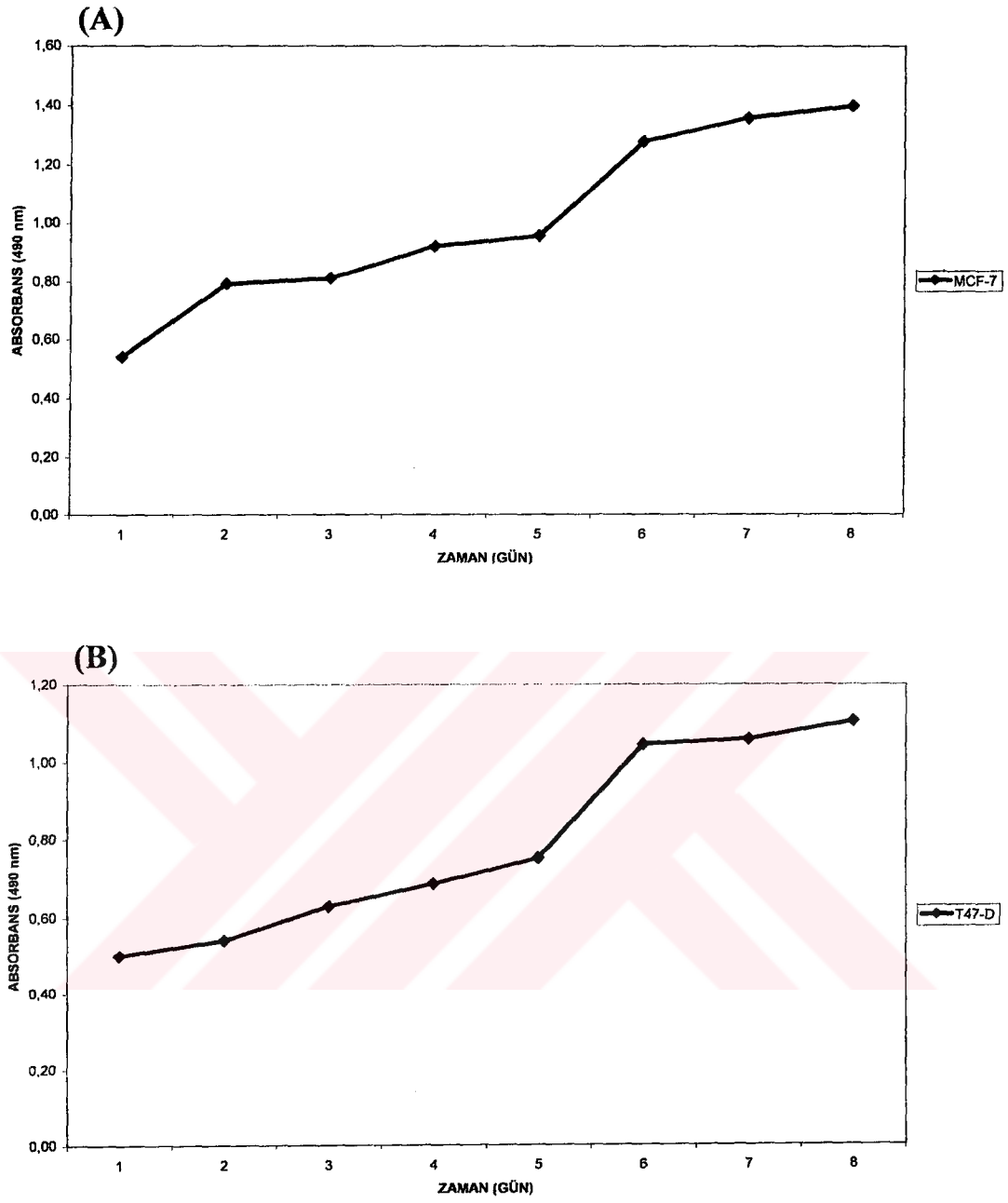
MCF-7 ve T47-D hücreleri, 8 gün boyunca 24 saatlik periyotlarda MTS kiti ile Elisa okuyucuda da ölçümleri yapılarak büyüme eğrisi grafiği çizildi (Şekil 4.2.).



Deneyin 4. gün sonunda hücrelerin besiyeri yenilendi. Okuma işlemine, hücrelerin kuyu yüzeyine yapışabilmeleri için 24 saatlik bekleme sürecinden sonra başlaması nedeniyle, Şekil 4.2. (A) ve (B)'de görüldüğü gibi her iki hücre çeşidinde de, Lag fazı görülemedi. 4-5. günler arasında Lag faza giren hücreler, aynı gün besiyeri değiştirildiği için 5. günün sonunda Log faza girerek, proliferasyona devam etmişlerdir.

Hücrelerin büyüme süreçlerinin belirlenmeye çalışıldığı, tripan mavisi boyama ve MTS kiti yöntemi ile elde edilen sonuçlarda benzerlik gözlemlendi. Bu elde edilen sonuçlar; 24 saatlik bekleme sürecinde dikkate alınması doğrultusunda, hücrelerin iki katına çıkma (doubling) süreleri 48-60 saat arası olduğu ve bu sürenin MCF-7 için 48 saate daha yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1. A ve Şekil 4.2. A).





Şekil 4.2. MTS kiti ile (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücresi büyüme eğrileri.

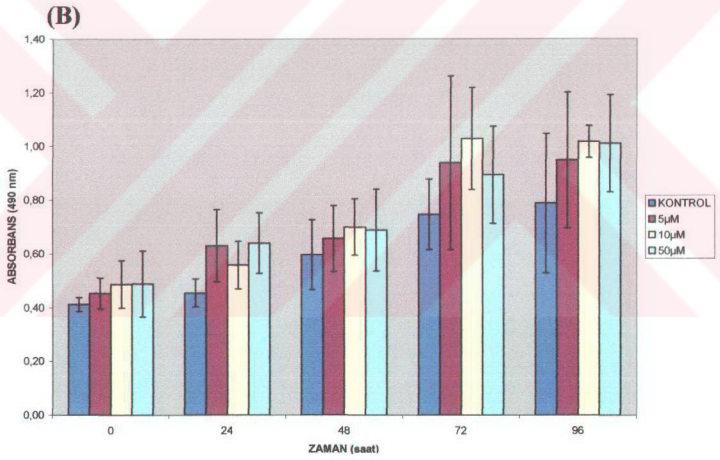
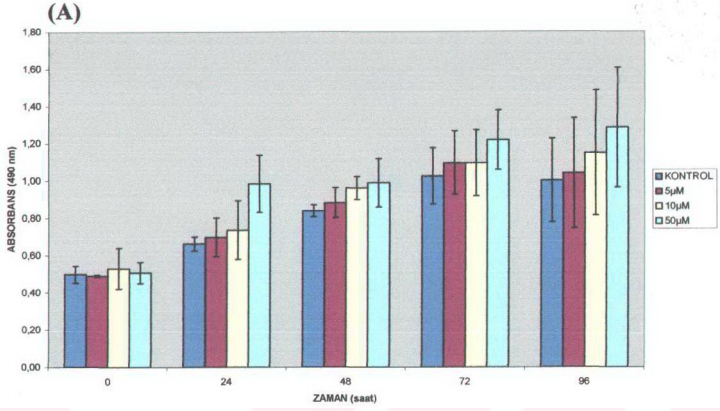
4.2. Kersetin'in Etkisi'nin Belirlenmesi

Yaptığımız çalışmalarda, MCF-7 ve T47-D hücrelerinde Kersetin'in etkisi doz ve zamana bağlı olarak izlendi.

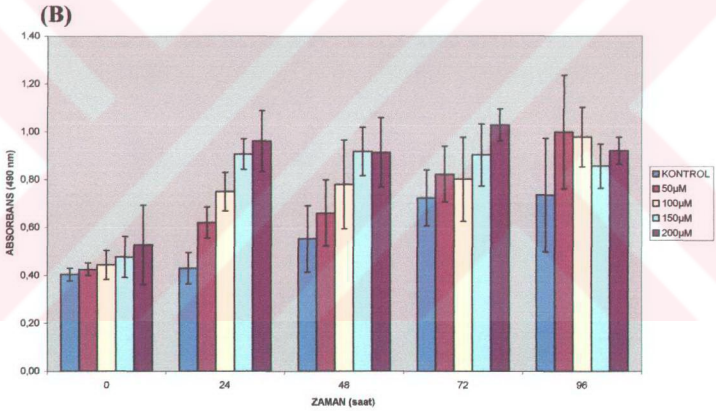
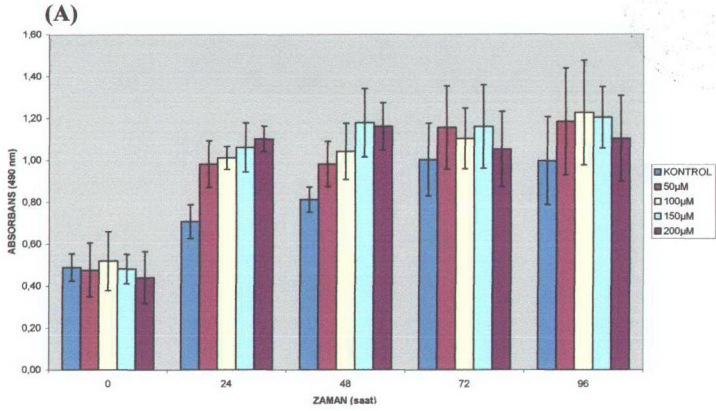
4.2.1. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Kersetin'in doz ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra Kersetin'in farklı dozları uygulanarak 4 gün süresince hücre proliferasyonları izlendi. Ölçümler MTS kiti kullanılarak elisa reader da 490 nm dalga boyunda okundu.

Kersetin'in hücreler üzerindeki etkisinin görüldüğü Şekil 4.3. (A) ve (B)'de her iki hücre tipinde de, 5-50 μ M konsantrasyonlarda artan doza ve zamana bağlı olarak Kersetin'in hücre sayısında artışa neden olarak, hücre proliferasyonu indüklediği gözlemlendi.



Şekil 4.3. (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücrelerinde Kersetin'in Kontrol, 5, 10 ve 50 μM 'luk dozlarının etkisi: Kersetin'in HP'nu artırıcı etkisine MCF-7 hücrelerinin daha fazla duyarlı olduğu görüldü.



Şekil 4.4. (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücrelerinde Kersetin'in Kontrol, 50, 100, 150 ve 2000 μM 'luk dozlarında uygulanması.

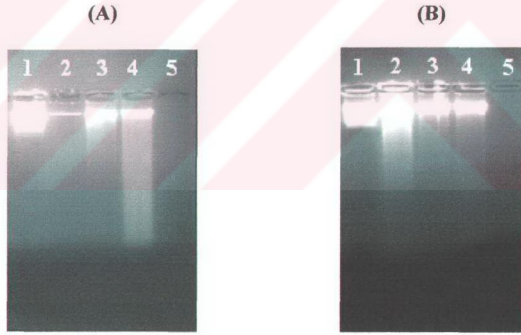
Kersetin'in hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için yaptığımız MTS kiti sonuçları ile mikroskopik fotoğraflama sonuçları benzerlik göstermektedir (Şekil 4.6. ve 4.7.).

4.2.2. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kersetin'in Apoptotik etkisi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Kersetin'in doz ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekimi yapılan hücrelere,

Kersetin'in farklı dozları 24 saat süresince uygulandı. Bu süre sonunda Kersetin'in hücreler üzerine etkisi, DNA Laddering yöntemi kullanılarak, elde edilen jel U.V. görüntüleme cihazı (Photocap, Vilber Laurmat) ile görüntülenerek, değerlendirildi (Bölüm 3.3.).

DNA Laddering yöntemi kullanılarak apoptosisin belirteci olan fragmentasyon gözlemlenmeye çalışıldı. MCF-7 hücrelerine, Kersetin'in 50 ve 100 μM 'lık dozlarının 24 saat uygulanması sonucu, Şekil 4.5. (A)'da görüldüğü gibi hücrelerin DNA'sında fragmentlenme gözlemlendi. Paralel yapılan, (B) T47-D hücrelerinde de fragmentlenme gözlemlendi. T47-D hücrelerinde, MCF-7'ye göre daha düşük konsantrasyonda (5 μM), fragmentlenme gözlenmesi, T47-D hücrelerinin Kersetin'in 24 saatlik bu etkisine MCF-7 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu tespit edildi. Kersetin'in bu konsantrasyonlardaki etkisinin; MTS kiti deneylerinde bu 24 saatlik periyotta, hücre proliferasyonun artırıcı yönde olduğu gözlenmişti, DNA Laddering'de ise fragmentlenme gözlenmesi, her iki hücre çeşidinde proliferasyonu artmakta aynı zamanda apoptosizin belirteçlerinden biri olan DNA fragmentlenmesi gözlemlendi.



Şekil 4.5. DNA Laddering yöntemi ile Kersetin'in 5, 50 ve μM 'lık dozlarının hücreler üzerine etkileri. (A) MCF-7 ve (B) T47-D Hücrelerinde Kersetin 5, 50 ve 100 μM 'lık Dozları: 1: kontrol; 2: 5 μM ; 3: 50 μM ; 4: 100 μM ; 5: DNA yükleme tamponu (negatif kontrol); her kuyuya 5 μg DNA yüklenmiştir.

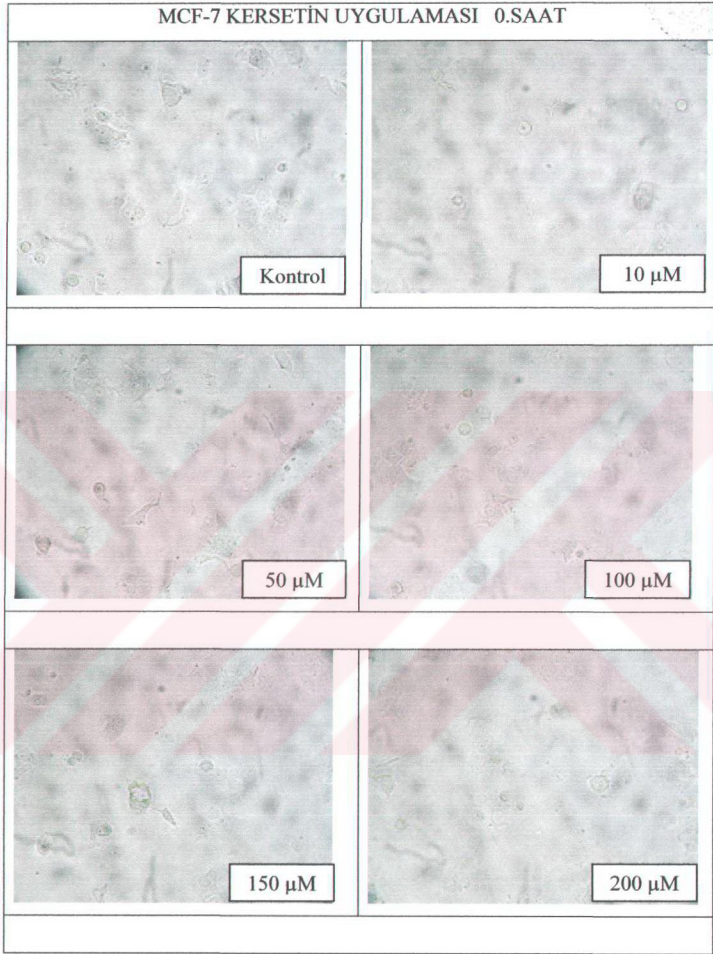
4.2.3. Kersetin'in Etkisinin Morfolojik İncelenmesi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Kersetin'in doz ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra Kersetin'in farklı dozları uygulanarak 4 gün süresince hücre proliferasyonları

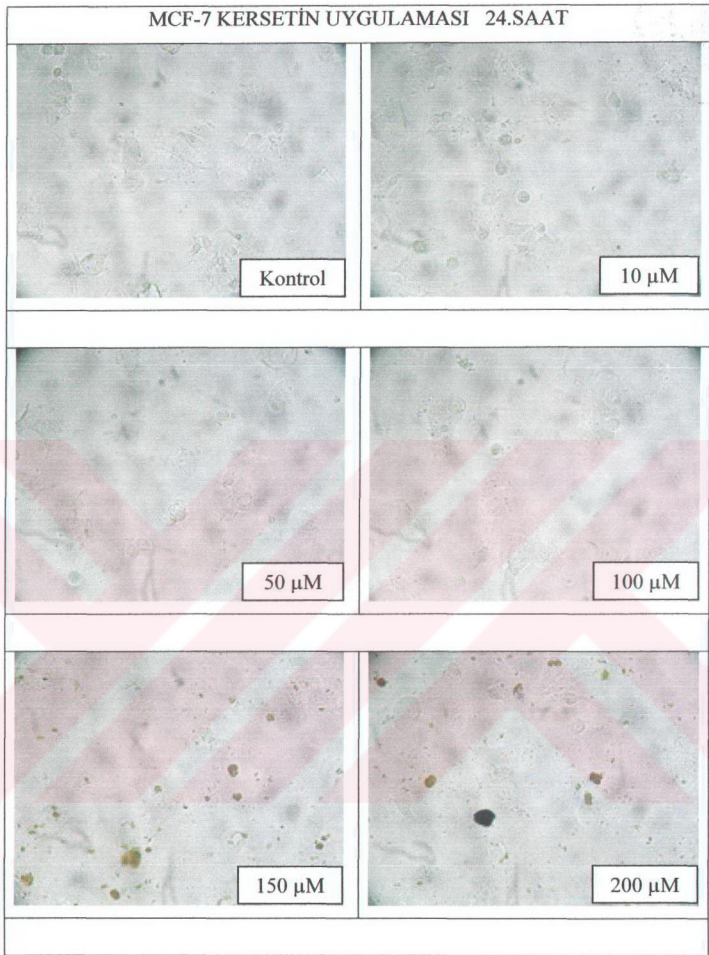
morfolojik olarak izlendi ve ışık mikroskobu ile 100x büyütmede, Sony Cybershot fotoğraf makinesi ile görüntülendi. Değerlendirme, görüntülenen alandaki hücre yoğunluğu, kontrol ile karşılaştırılarak yapıldı.

Proliferasyon deneylerine benzer sonuçlar aldığımız morfolojik bulgular da 100-200 μM 'lık konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinde 72-96. saatler arasında duraklama ve azalmanın olduğunu (Şekil 4.9-10.) fakat 24-48. saatlerde Kersetin'in proliferasyonu arttırdığını gözlemledik (Şekil 4.7-8.). T47-D hücrelerinde ise 100-200 μM arasında 48. saatten sonra duraklama (Şekil 4.13-14-15.) ve daha önceki zamanlarda bu ve alt Kersetin konsantrasyonlarının proliferasyonu indüklediğini gözlemledik (Şekil 4.11-12.).

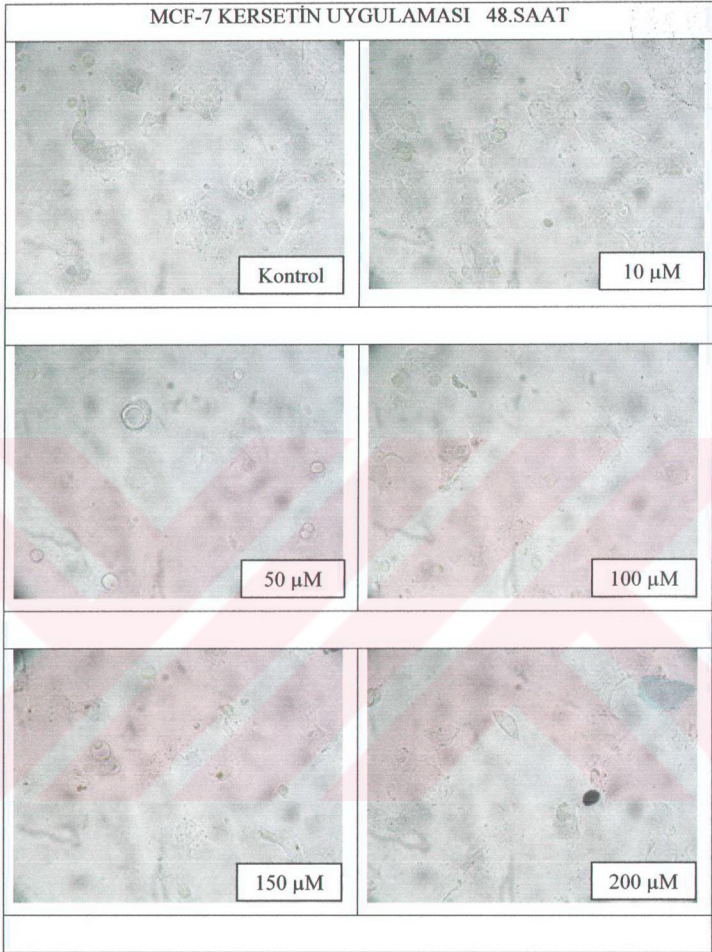
4.2.3.1. MCF-7 H  relerinde Kersetin'in Etkilerinin Görüntülenmesi



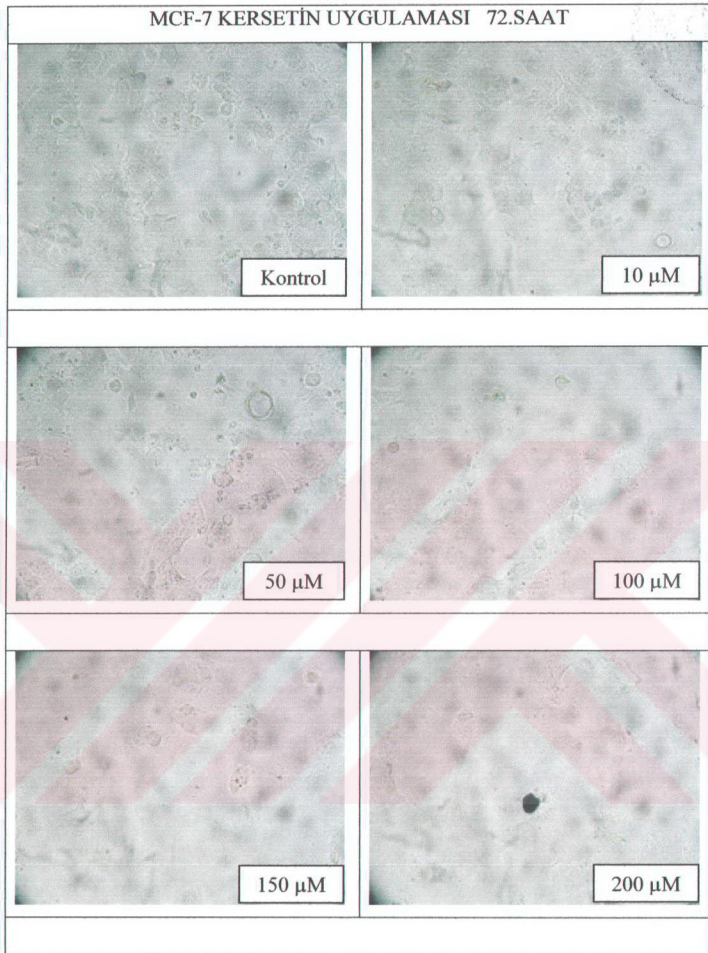
  kil 4.6. MCF-7 h  relerinde Kersetin'in 0. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.



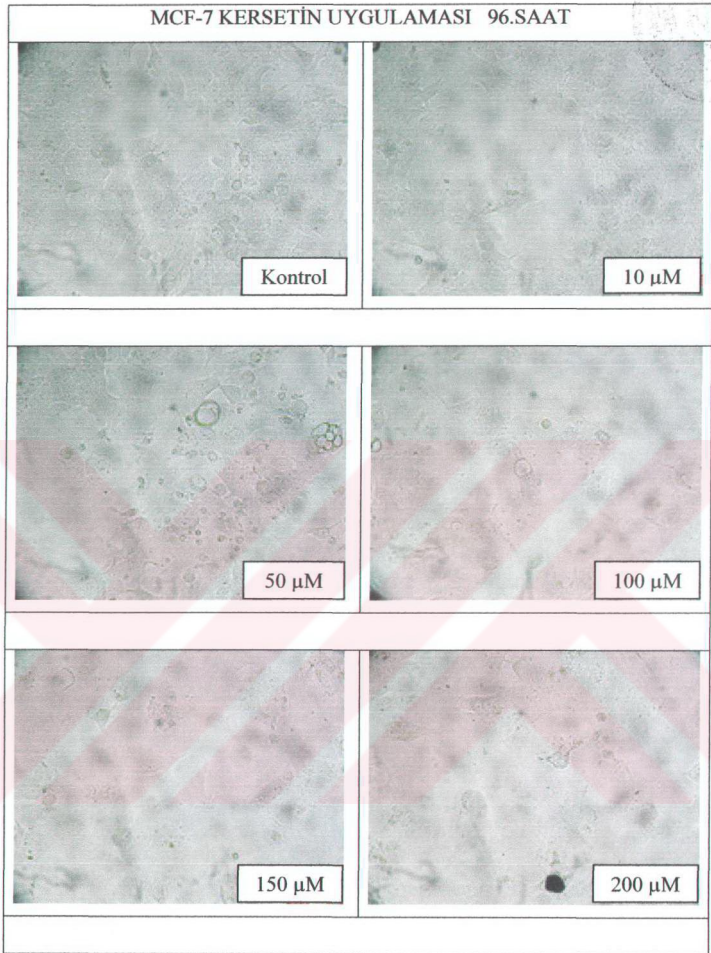
Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.



Şekil 4.8. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 48. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.

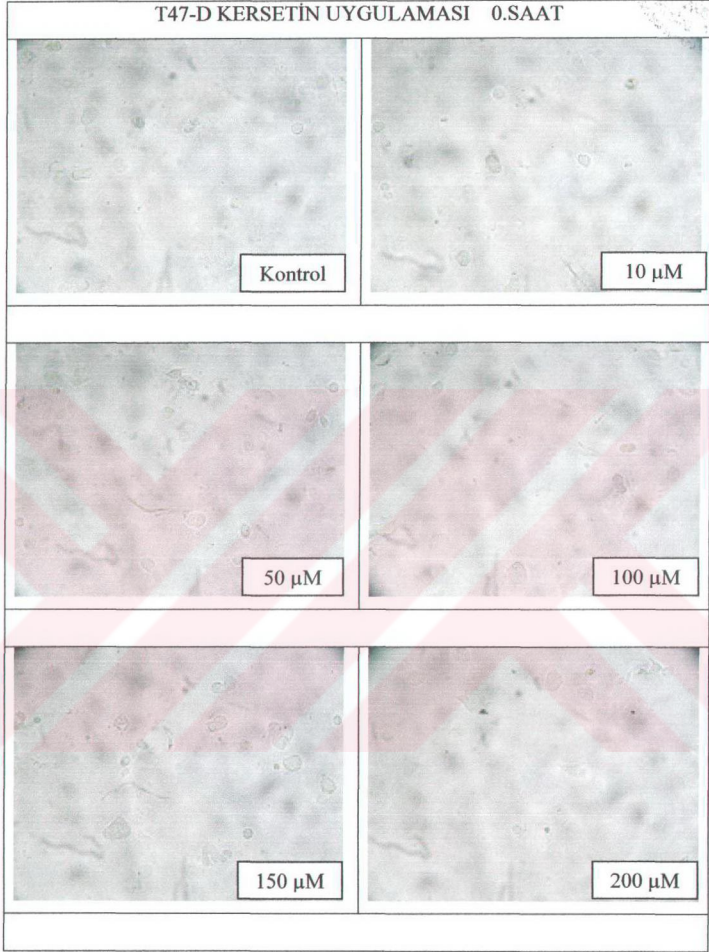


Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 72. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.

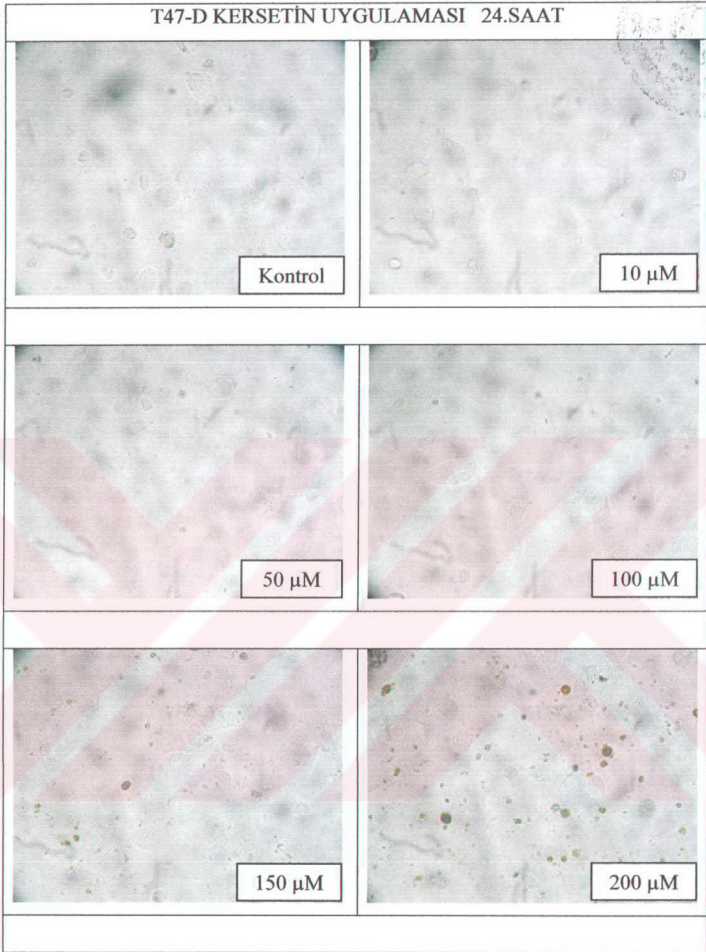


Şekil 4.10. MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 96. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.

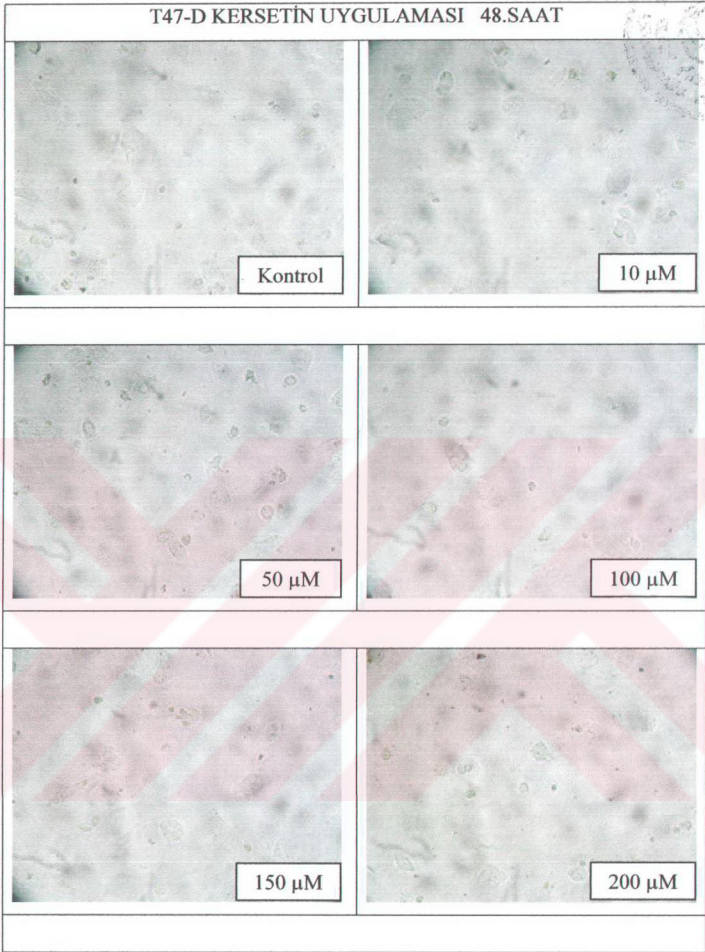
4.2.3.2. T47-D Hücrelerinde Kersetin'in Etkilerinin Görüntülenmesi



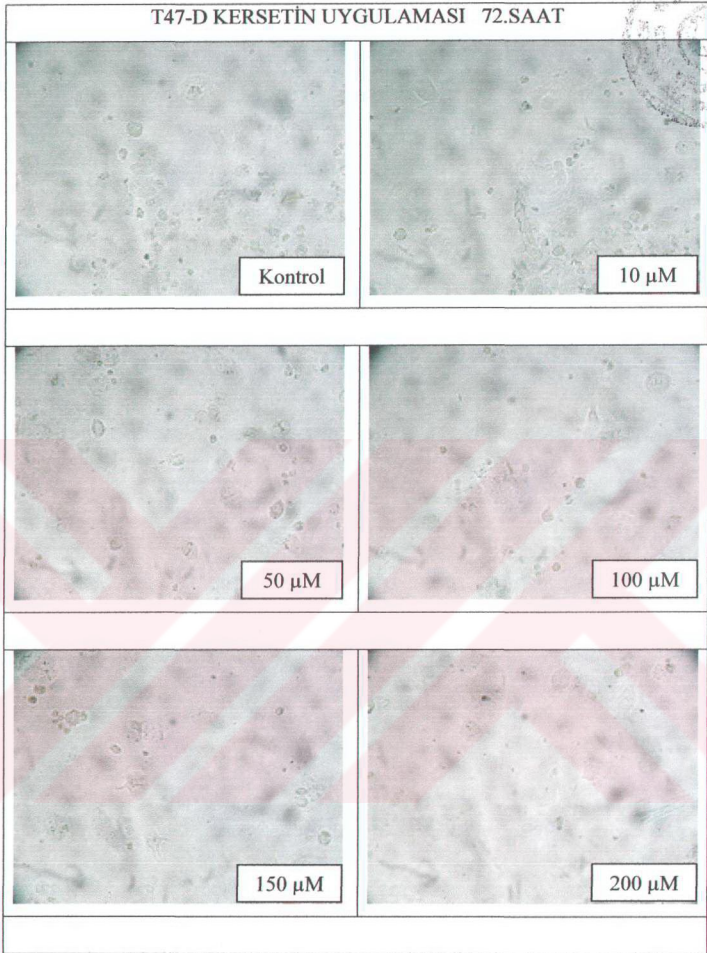
Şekil 4.11. T47-D hücrelerinde Kersetin'in 0. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.



Şekil 4.12. T47-D hücrelerinde Kersetin'in 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.

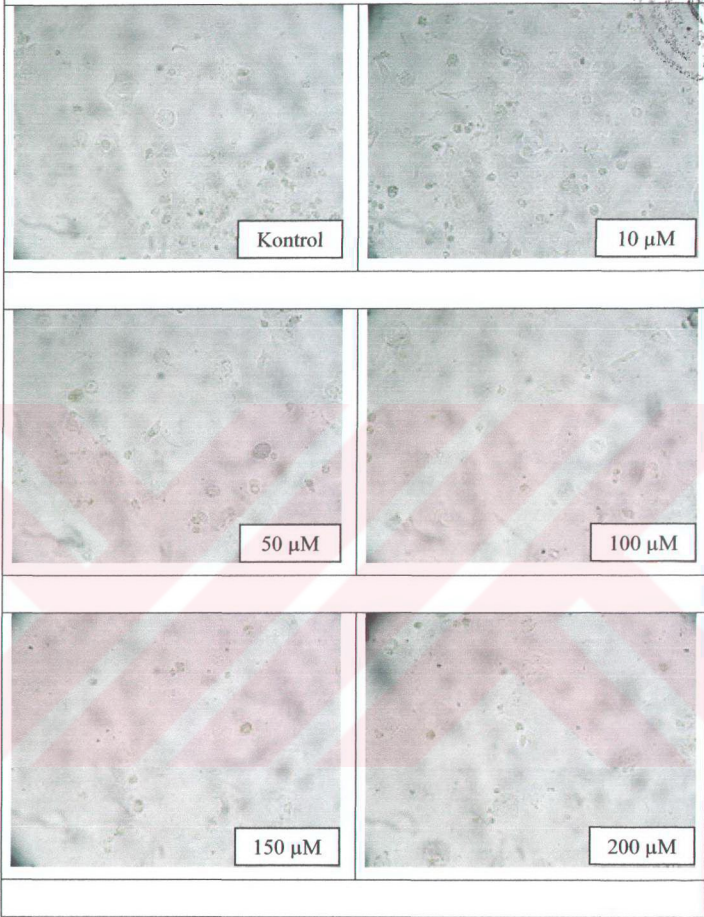


Şekil 4.13. T47-D hücrelerinde Kersetin'in 48. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.



Şekil 4.14. T47-D hücrelerinde Kersetin'in 72. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.

T47-D KERSETİN UYGULAMASI 96.SAAT



Şekil 4.15. T47-D hücrelerinde Kersetin'in 96. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi.



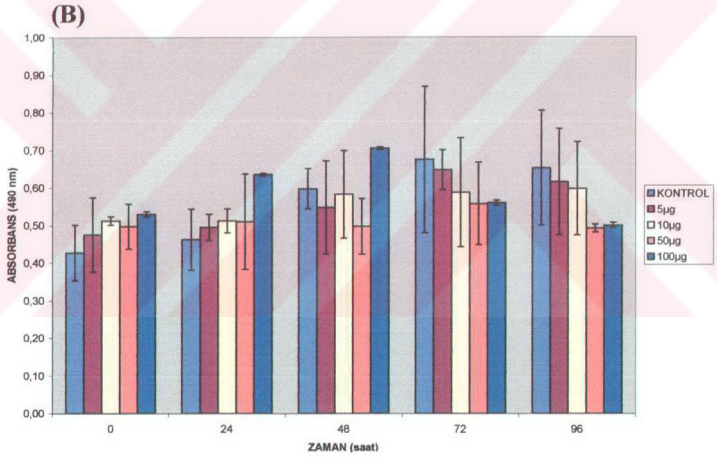
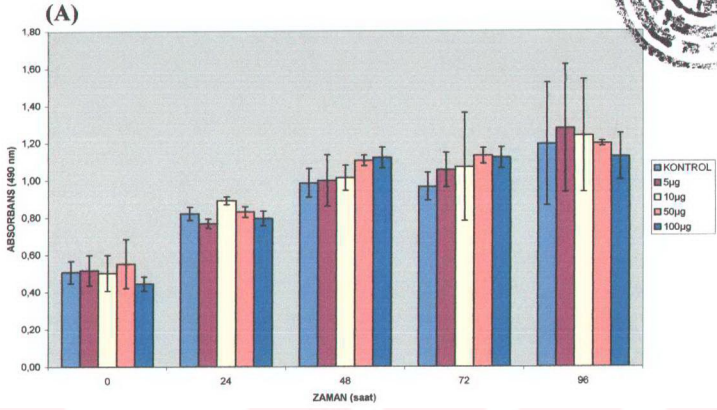
4.3. Arimideks'in Etkisi'nin Belirlenmesi

Yaptığımız çalışmalarda, MCF-7 ve T47-D hücrelerinde Arimideks'in çeşitli dozda konsantrasyonları, zamana bağlı olarak izlendi.

4.3.1. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Arimideks'in Hücre proliferasyonuna Etkileri

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Arimideks'in doz ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra Arimideks'in farklı dozları uygulanarak 4 gün süresince hücre proliferasyonları izlendi. Ölçümler MTS kiti kullanılarak elisa reader da 490 nm dalga boyunda okundu.

MCF-7 hücrelerine, Arimideks (5-50 $\mu\text{g/ml}$) uygulamasının 0-96 saat arasında proliferasyonu arttırdığı, 100 $\mu\text{g/ml}$ uygulanan hücrelerde ise 72-96. saatler arasında yavaşlatıcı/durdurucu etki gösterdiği gözlemlendi [Şekil 4.16. (A)]. T47-D hücrelerinin ise Arimideks'e daha duyarlı olduğunu, 10, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ uygulamalarının 48. saatten sonra hücre proliferasyonunu yavaşlatıcı/durdurucu etki gösterdiği gözlemlendi [Şekil 4.16. (B)]. Bu sonuçlar doğrultusunda 50 $\mu\text{g/ml}$ Arimideks'i, 5-50 μM Kersetin konsantrasyonlarını kombine ederek iki hücre tipinde oluşacak proliferatif değişiklikleri zamana bağımlı olarak izledik (Bölüm 4.4.1.).



Şekil 4.16. (A) MCF-7 ve (B) T47-D hücrelerinde Arimideks'in Kontrol, 5, 10, 50 ve 100µg/ml'lik dozlarda uygulanması.

4.4. Kersetin ve Arimideks Kombinasyonunun Etkisi'nin Belirlenmesi

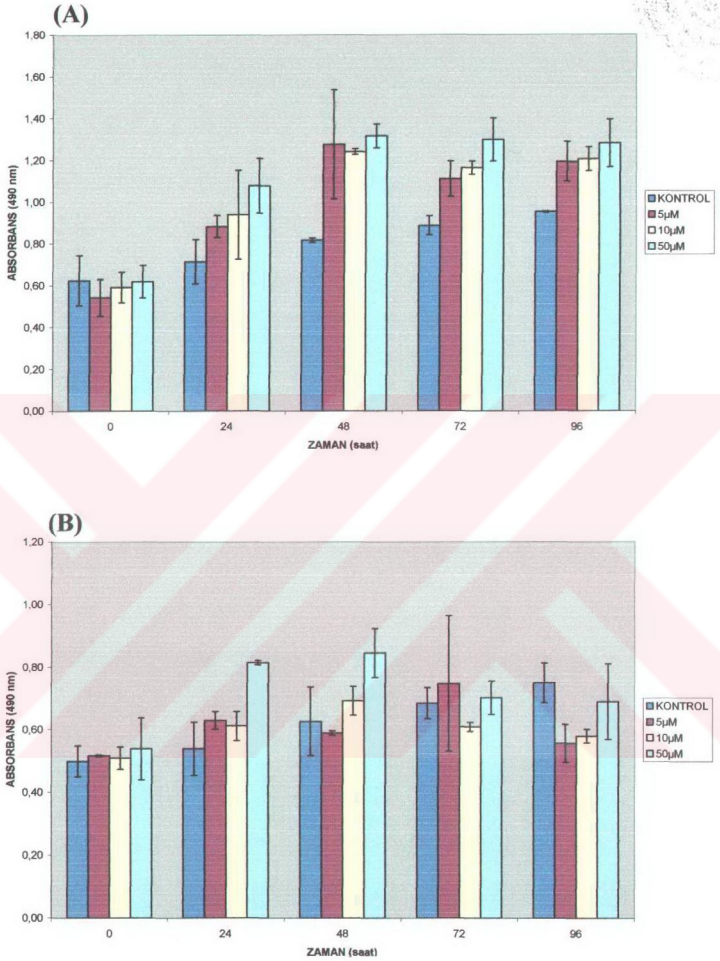
Yaptığımız kombinasyon çalışmalarda, MCF-7 ve T47-D hücrelerinde Kersetin'in çeşitli dozdaki konsantrasyonlarına, Arimideks'in 50 µg/ml'lık dozu uygulanarak, zamana bağlı olarak izlendi.

4.4.1. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kombinasyonunun Proliferatif Etkisi

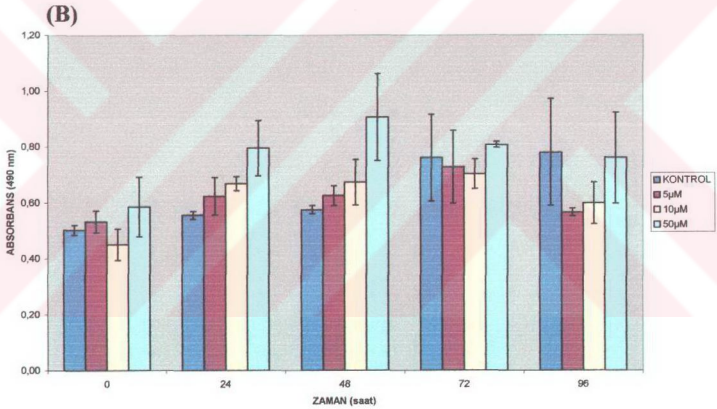
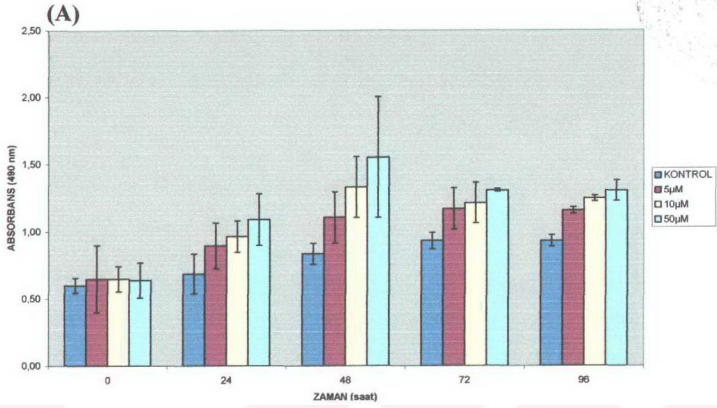
MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Kersetin'in çeşitli dozlarına, Arimideks 50 ve 100 µg/ml'lık dozları eklenerek yapılan kombinasyonların doza ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. Ölçümler MTS kiti kullanılarak, elisa reader da 490 nm dalga boyunda okundu.

Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi 50 µg/ml Arimideks, 5-50 µM Kersetin konsantrasyonlarıyla kombine edilerek MCF-7 (A) ve T47-D (B) hücrelerinde uygulanmıştır. Deneylerimiz sonucu MCF-7 hücreleri üzerine iki ilaç kombinasyonun proliferasyonu artırıcı etkisi olduğunu gözlemledik. Bununla beraber (B) T47-D hücrelerinde 72-96 saatler arası yavaşlatıcı/durdurucu etkisinin olduğunu tespit ettik. T47-D hücrelerinin kombinasyon uygulamasına daha duyarlı olduğu gözlemlendi.

Şekil 4.18.'de Kersetin'in 5-50 µM'lık ile Arimideks 100 µg/ml konsantrasyonları ile kombine edilerek MCF-7 (A) ve T47-D (B) hücrelerinde uygulanmıştır. (A)'da görüldüğü gibi MCF-7 hücrelerinde, kombinasyonun proliferasyonu artırıcı olduğu gözlemlendi. T47-D (B) hücrelerinde ise, 72-96. saatler arasında da, Arimideks'in 50 µg/ml konsantrasyonu kombine edilerek yapılan uygulama ile benzer etki gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 4.17. (A) MCF-7 ve (B) T47-D Kersetin Kontrol, 5, 10 ve 50 μM 'lık dozlarına Arimideks'in 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunun eklenmesi ile oluşturulan kombinasyonun uygulanması.



Şekil 4.18. (A) MCF-7 ve (B) T47-D Kersetin Kontrol, 5, 10 ve 50 μM 'lık dozlarına Arimideks'in 100 $\mu\text{g/ml}$ dozunun eklenmesi ile oluşturulan kombinasyonun uygulanması.

4.4.2. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kombinasyonunun Apoptosis Etkisi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Kersetin ve Arimideks kombinasyonunun doz ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra Kersetin'in farklı dozlarına, Arimideks'in 50 $\mu\text{g/ml}$ 'lık dozu uygulanarak 24 saat süresince beklendi. Bu süre sonunda Kersetin ve Arimideks kombinasyonunun hücreler üzerine etkisi, DNA Laddering yöntemi ile elde edilen jelin (Bölüm 3.3.) U.V. görüntüleme cihazı (Photocap, Vilber Laurmat) ile görüntülenmesi ile değerlendirildi.

Şekil 4.19.'da MCF-7 hücrelerine Kersetin 50 μM dozuna, Arimideks'in 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunun ilavesi ile oluşan kombinasyon dozunun 3. kuyuda görüldüğü gibi DNA fragmentlenmesine neden olduğu gözlenmiş fakat tek başına Arimideks'in bu dozunun uygulamasını yapmadığımızdan; kombinasyon uygulaması ile gözlenen bu DNA fragmentlenmesine, Arimideks'inde etkisi olduğunu, bu dozda Kersetin'in tek başına fragmentasyona neden olmasından dolayı belirlenemedi [Şekil 4.5. (A).].



Şekil 4.19. DNA Laddering yöntemi ile Kersetin/Arimideks kombinasyonun hücreler üzerine etkileri. MCF-7 Hücrelerinde Kersetin 5 ve 50 μM 'lık dozlarına, Arimideks'in 50 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozu eklenmiştir. 1: Kontrol (madde yok); 2: 5 μM +50 $\mu\text{g/ml}$; 3: 50 μM +50 $\mu\text{g/ml}$; 4: DNA yükleme tamponu (negatif kontrol). Her kuyuya 5 μg DNA yüklenmiştir.

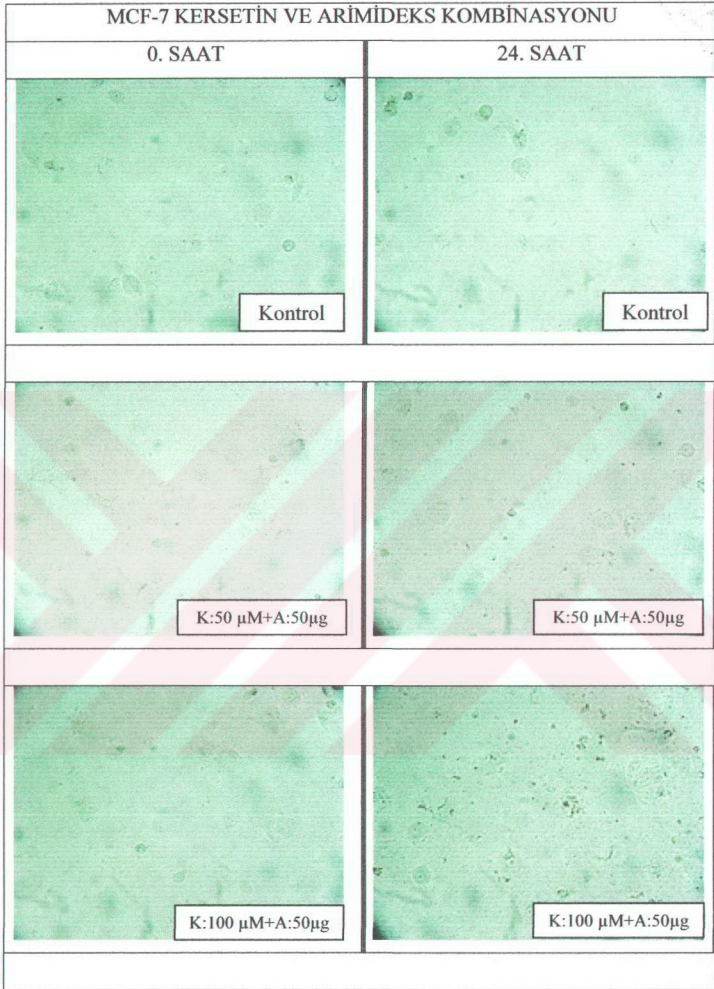
4.4.3. MCF-7 ve T47-D Hücrelerinde Kombinasyonunun Etkisinin Morfolojik İncelenmesi

MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, Kersetin ve Arimideks kombinasyonunun doz ve zamana bağlı etkilerini gözlemlemek için $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra Kersetin'in 50 μ M ve 100 μ M'lık dozlarına, Arimideks'in 50 μ g/ml'lık dozu uygulanarak 4 gün süresince hücre proliferasyonları izlendi. Hücreler, ışık mikroskobu kullanılarak Sony Cybershot fotoğraf makinesi ile görüntülendi. Değerlendirme, görüntülenen alandaki hücre yoğunluğu, kontrol ile karşılaştırılarak yapıldı.

Arimideks'in fotoğraf netliğini bozmasından dolayı, başlanılan bu çalışma sadece 24 saat olarak görüntülenebildi.

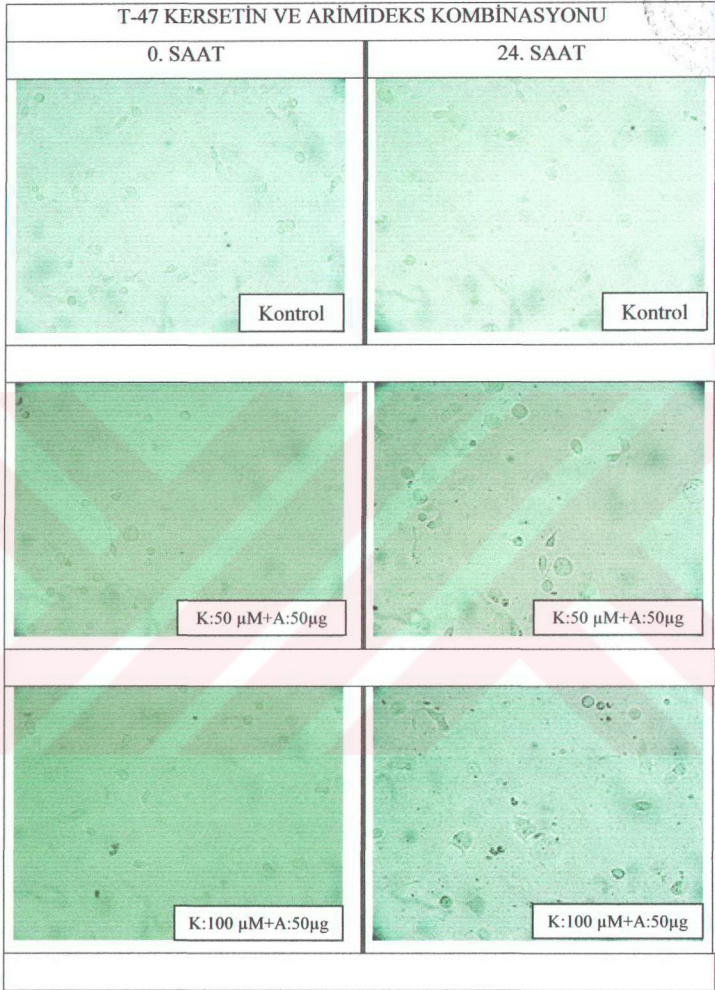
Şekil 4.20. ve 4.21.'de görüldüğü gibi 24 saatte kombinasyonların, hem MCF-7 hem de T47-D hücrelerinde proliferatif etkisi görüldü.

4.4.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Kombinasyonun Etkilerinin Görüntülenmesi



Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerinde Kersetin ve Arimideks kombinasyonu'nun 0 ve 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi (K:Kersetin; A:Arimideks).

4.4.3.2. T47-D Hücrelerinde Kombinasyonun Etkilerinin Görüntülenmesi



Şekil 4.21. T47-D hücrelerinde Kersetin ve Arimideks kombinasyonu'nun 0 ve 24. saatteki etkisinin morfolojik olarak görüntülenmesi (K:Kersetin; A:Arimideks).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

MCF-7 ve T47-D hücreleri insanlardan izole edilmiş meme kanseri hücreleri olup, bu hücreler östrojen reseptörü pozitifdir. T47-D hücrelerinden farklı olarak, MCF-7 farklılaşmış memeli epiteliumun bazı özelliklerine sahiptir. Mesela östrojen reseptörü üzerinden östradiol işleme özelliğine sahiptir (ATCC). Bu çalışmada MCF-7 ve T47-D hücreleri arasındaki bu farklılıktan yararlanılarak, Kersetin ve Arimideks'in hücre proliferasyonu ve apoptosise olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kersetin'in, H_2O_2 ile oksidatif baskıya maruz bırakılan hücreler üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Nakayama *et al.*, 1993; Yakoo and Kitamura, 1997). Ayrıca bağırsak kanseri (Hosokawa *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992), HeLa (Hosokawa *et al.*, 1990), kan kanseri (Elia and Santoro, 1994) ve deri kanserinde (Sliutz *et al.*, 1996) hsp'lerin ekspresyonunu önlediği gösterilmiştir (Hansen *et al.*, 1997). ER+ MCF-7 insan meme kanseri üzerinde çoğalmayı önleyici bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Hofmann *et al.*, 1988; Ferriola *et al.*, 1989; Kantengwa and Polla, 1991; Cunningham *et al.*, 1992; Barret *et al.*, 1993; Avila *et al.*, 1994; So *et al.*, 1997; Ferrandina *et al.*, 1998). Sonuç olarak, Kersetin'in hücreye özgü davranış biçimleri sergileyebileceği önerilmiştir (Hansen *et al.*, 1997).

Meme kanserlerinde beş yıl ya da daha uzun süreler sonunda kadınlarda östradiolün plazmadaki seviyesinde %20'lik bir artış olduğu gösterilmiştir (Wysowski *et al.*, 1987; Toniolo *et al.*, 1995; Berrino *et al.*, 1996; Dorgan *et al.*, 1997). Aromataz, östrojen biyosentezinde androjenlerin östrojenlere çeviriminde kontrol basamağını katalizleyen bir enzimdir. Kadınlarda menopoza öncesinde östrojen sentezi yumurtalıklarda gerçekleşir ve menopoza sonrasında ise östrojenler, deri, yağ ve kas dokularında bulunan Aromataz enziminin etkileştiği androjenik substratlardan sentezlenmektedir. Aromataz enzimi periferik dokularda, ayrıca meme dokusunda ve meme tümör dokusunda bulunmaktadır (Santen *et al.*, 1999). Kemirgen hayvanlarda dışarıdan verilen östrojen hormonunun meme kanserine sebep olduğu gösterilmiştir (Furth, 1982). Bir Aromataz inhibitörü olan Arimideks, Aromataz enziminin aktif bölgesindeki bir hem grubuna geri dönüşümlü bağlanarak (Freedman *et al.*, 2005) ve onu inaktive etmek suretiyle, Aromataz enziminin konsantrasyonunu düşürmekte ve östradiolün etkilerini azaltabilmektedir (Santen *et*

al., 1999; Nicholls, 2002; Freedman *et al.*, 2005). Aromataz inhibitörlerinin yaşlı sıçanlarda iyi veya kötü huylu meme yaralarının kendiliğinden gelişimini önlediği belirlenmiştir (Gunson *et al.*, 1995). Bu nedenlerle, bu çalışmada Kersetin ve Arimideks'in, MCF-7 ve T47-D hücrelerinin hücre proliferasyonuna ve apoptosise etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada; MCF-7 ve T47-D hücreleri üzerine Kersetin, Arimideks ve Kersetin/Arimideks kombinasyon konsantrasyonlarının, doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonu ve apoptosise etkileri değerlendirilmiştir.

MTS hücre canlılığı/hücre proliferasyon sonuçlarına bakıldığında, MCF-7 ve T47-D hücrelerinde Kersetin'in HP'nu doza ve zamana bağlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte 100-200 μ M Kersetin konsantrasyonunda MCF-7 hücrelerinde 72 saatten, T47-D hücrelerinde ise 48 saatten sonra HP'da duraklama olduğu gözlenmiştir. Bu durum T47-D hücrelerinin Kersetin'e daha duyarlı olduğunu işaret etmektedir.

1994 yılında Hanasaki *et al.*, ve 1999 yılında da Oyama *et al.*, tarafından, bir antioksidan ajan olan Kersetin'in etkilerini araştırmışlar. Kersetin'in antioksidan özelliğini belirliyelemek için, 300 μ M H₂O₂ ile oksidatif strese maruz kalmış sıçan timosit hücre popülasyonu üzerinde, 10 μ M Kersetin konsantrasyonunu uygulamışlardır. Çalışmalarında, Kersetin oksidatif stresin meydana getirdiği değişiklikleri, büyük oranda ortadan kaldırabildiğini gözlemlemişler. Kersetin'in MCF-7 ve T47-D hücrelerinde gösterdiği, hücre proliferasyonu arttırıcı etkisi, antioksidan bir ajan (Hanasaki *et al.*, 1994; Oyama *et al.*, 1999) olmasından kaynaklanıyor olabilir.

1997 Kang ve Liang tarafından, HL-60 hücreleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, Kersetin'in 80 μ M konsantrasyonunu 96 saat uygulamışlar ve hücre büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlemişlerdir. Kersetin'in gözlemledikleri bu etkiyi, TPK ve PKC aktivitelerini inhibe ederek gerçekleştiriyor olabileceği sonucuna varmışlardır (Kang and Liang, 1997). Kersetin'in MCF-7 ve T47-D hücrelerinde gözlemlediğimiz, hücre proliferasyonunu yavaşlatıcı/durdurucu etkisini, TPK ve PKC aktivitelerini inhibe ederek (Hofmann *et al.*, 1988; Ferriola *et al.*, 1989; Kantengwa and Polla, 1991; Cunningham *et al.*, 1992; Barret *et al.*, 1993; So *et al.*, 1997; Kang and Liang, 1997; Russo *et al.*, 1999) veya hücre döngüsünü, G1/S geçiş

aşamasında (Parki *et al.*, 1988; Boring *et al.*, 1993) veya G2/M geçiş noktasında bloke ederek (Avila *et al.*, 1994; Ferrandina *et al.*, 1998; Plaumann *et al.*, 1996) gerçekleştiriyor olabilir.

MCF-7 hücrelerinde Arimideks'in 5-50 µg/ml konsantrasyonlarının 0-96 saatleri arasında HP'nu arttırdığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte 100 µg/ml konsantrasyonun 72. saatte HP'nu yavaşlatıcı, 96. saatte durdurucu etkisi gözlemlenmiştir. T47-D hücrelerinin Arimideks'in 10, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarına daha duyarlı olduğu ve 48. saatten sonra HP'nu yavaşlatıcı/durdurucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu farklılık, Arimideks'in ortamdaki östradiol (östrojenin bir formu) seviyesini, zamana bağlı olarak azaltmasında kaynaklanıyor olabilir (Santen *et al.*, 1999; Nicholls, 2002; Freedman *et al.*, 2005) ve MCF-7 hücresinde görülen östradiol'ü kullanabilme (ATCC) kabiliyetinin bulunmasından dolayı Arimideks'in etkilerinden daha az etkileniyor olabilir.

Kersetin 5 ve 50 µM-Arimideks 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının kombine edilmiş dozlarının MCF-7 ve T47-D hücrelerinde, HP'nu arttırıcı olduğu fakat T47-D hücrelerinde 72 ve 96 saatte yavaşlatıcı/durdurucu etkisi olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar diğer deney sonuçları ile benzerlik göstermekte olup Arimideks Kersetin'in HP'nu üzerine etkisini arttırmış olduğu gözlemlenmiştir.

Morfolojik incelemelerde, proliferasyon deneylerinde olduğu gibi benzer sonuçlar görülmüş olup MCF-7 ve T47-D hücrelerinde genel olarak Kersetin'in HP'nu arttırıcı olduğu bununla beraber MCF-7 hücrelerinde 72-96 saatten sonra, T47-D hücrelerinde ise 48. saatten sonra HP'nu yavaşlatıcı/durdurucu etki gösterdiği gözlemlendi.

DNA Laddering, DNA fragmentasyonu/Apoptosis sonuçlarına bakıldığında MCF-7 hücrelerinde Kersetin'in 50 ve 100 µM konsantrasyonlarının fragmentasyona neden olduğu gözlemlendi. T47-D hücrelerinin ise 5, 50 ve 100 µM Kersetin dozlarına 24 saatlik zaman diliminde daha duyarlı olduğu gözlemlendi. MTS kiti deneylerinde 0-24 saatleri arasında HP'nu arttırıcı etki gözlenirken bu sonuçlara göre aynı zamanda apoptosise neden olduğu da gözlemlendi. Bu sonuçlar MTS ve morfolojik inceleme sonuçları ile benzer olup T47-D hücrelerinin Kersetin'e daha duyarlı olduğunu bir kez daha gözlemlendi.

1997 yılında Csokay *et al.*, tarafından Kersetin'in, apoptotik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, apoptotik etkinin belirteci olan DNA fragmentlenmesini gözlemleyebilmek için, Kersetin'in 550 μ M konsantrasyona kadar olan dozlarını, 1-24 saatler arasında, K562 lökemiya hücre hatlarında uygulamışlardır. Kersetin'inin 5.5 μ M seviyesinde i kromozomal DNA ladder formasyonu olmadığını, doza bağımsız fakat proliferasyon süresine bağlı olarak DNA fragmentasyonunu %45 seviyesine getirdiğini gözlemişlerdir. DNA'nın yaklaşık 180 baz çiftinden oluşan fragmentler gösterdiği gözlemleyerek, hücrelerin apoptosise meyilli olduklarını ortaya koymuşlar ve hücrelerin apoptosise gidişine, Kersetin'in hücrel değişimleri indüklemesinin sebep olduğu sonucuna varmışlardır. 2005 yılında Kim *et al.*, tarafından Kersetin'in büyümeyi önleyici ve apoptosis mekanizmaları hakkında araştırmalarında apoptotik etkinin belirteci olan DNA fragmentlenmesini gözlemleyebilmek için kolon kanser hücrelerine Kersetin'in 25-100 μ M konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Kersetin'in 72. saatte DNA'da fragmentasyona neden olduğunu belirtmişler ve Kersetin, Akt patikasının inhibe edilmesi yoluyla kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ediyor olabileceği sonucuna varmışlar. Kersetin'in 5 ve 50 μ M'lık konsantrasyonlarını 24 saat uyguladığımız, MCF-7 ve T47-D hücrelerinde gözlemlediğimiz, DNA fragmentlenmesine, Akt'in fosforilasyonuna etki ederek onun aktivasyonunu engellemiş (Kim *et al.*, 2005) olmasından kaynaklanıyor olabilir.

DNA Laddering DNA fragmentasyonu/Apoptosis sonuçlarına bakıldığında Kersetin 5 ve 50 μ M-Arimideks 50 ve 100 μ g/ml konsantrasyonlarının kombine edilmiş dozlarının 24 saat uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinde, Kersetin 50 μ M + Arimideks 50 μ g/ml uygulamasında DNA fragmentasyonu gözlemlenmiş olup Arimideks'in, Kersetin'in apoptotik etkisini arttırdığı gözlemlenmiş fakat Arimideks'in tek başına MCF-7 ve T47-D hücreleri üzerindeki etkilerini araştırılmamış olmamızdan ve deneylerin tekrarlarının da yapılması gerektiğinden dolayı kesin olarak gözlenen bu fragmentlenme artışında Arimideks'in de katkısı olup olmadığı belirlenemedi.

1999 yılında Russo *et al.*, tarafından, Kersetin konsantrasyonları, anti-CD95 i dozlarını kombine ederek CD95 yollu apoptosise direnç gösteren malignant hücrelere uyguladıkları çalışmalarında, bu kombinasyonun apoptosisi güçlü bir şekilde artırdığını göstermişlerdir. Buna göre malignant hücrelerin etkili olamamasının

nedeni hücre döngüsünde Kersetin'e bağımlı duraklamanın apoptosisi tetikliyor olmasıdır (Russo *et al.*, 1999). Bununla beraber Kersetin'in çoğalmayı önleyici ve pro-apoptotik etkileri üzerine çok sayıda veri olmasına rağmen aksiyonun mekanizması hala bilinmemektedir. Ayrıca Kersetin genellikle hücre döngüsünün bloke edilmesini takiben pro-apoptotik aktiviteyi başlattığı da belgelenmiştir (Ferrandina *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1994; Iwao and Tsukamoto, 1999; Larocca *et al.*, 1997). DNA Laddering yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmalar ile benzerlik göstermekte olup Arimideks, Kersetin'in gözlenmiş olan bu özelliğinde dolayı apoptotik etkisini arttırmış olabilir.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda; ileriki çalışmalarda, Kersetin'in ve Arimideks'in MCF-7 ve T47-D hücrelerinde HP'nu yavaşlatıcı/durdurucu etkisini ve apoptosise sebep olan en düşük konsantrasyonları belirlenebilir. Paralel olarak yapılabilecek; diğer meme kanseri hücre hatları üzerinde de etkilerinin de Kersetin'in ve Arimideks'in etkileri ve etkin olabilecek en düşük dozlar belirlenebilir. Ayrıca bu dozların belirlenmesi doğrultusunda oluşturulacak kombinasyon konsantrasyonları; 24, 48, 72 ve 96 saatlik uygulanarak, MTS kiti ve DNA Laddering yöntemleri etkilerine bakılabilir. Kersetin'in apoptotik etki mekanizması belirlemeye yönelik; apoptosis sırasında ekspresyonlarında artış gözlemlendiği bilinen, antibadiler (anti- Akt, anti-Bcl 2, anti-bax v.b.) immunoblotting analiz yönteminde kullanarak, bu etkisinin protein ekspresyonları ile ilişkili olup olmadığı ve/veya Kersetin ve Arimideks'in bu hücreler üzerindeki etki mekanizmalarını aydınlatılabilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ve sonrasında yapılması planlanan çalışmaların tamamlanarak, edebilecek sonuçların tıbbi alana uygulanabilir olması; olası Kersetin/Arimideks'in kombinasyonlarının, önümüzdeki yıllarda, şu an günümüzde meme kanserinin tedavisinde kullanılmakta olan adjuvant tedavilere dahil olabilecek, alternatif bir seçenek olması sağlanabilir. Uygulanan tedavi yaklaşımlarında, meme kanseri hücrelerinin ilaçlara direnç göstermesi ve/veya uzun zamanlı kullanımlarında çeşitli yan etkiler (Kemik metabolizması, Menstürasyon döngüsüne etkisi, v.b.) görülmesi nedeniyle adjuvant tedavi yaklaşımlarında kullanılan ilaçların, daha kısa zamanlı ve kombinasyonlarından oluşan yeni uygulamalarda süreklilikten ziyade devirli olarak kullanılmasının hastalarda, sağ kalım süresinin ve yaşam kalitesinin artırılmasında daha etkin olduğu bir gerçektir.

KAYNAKLAR

Adachi, S., Cross, A.R., Babior, B.M. and Gottlieb, R.A. (1997). Bcl-2 and the Outer Mitochondrial Membrane in the Inactivation of Cytochrome c during Fas-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:21878-21882.

Adnane, J., Gaudray, P., Simon, M.P., Simony -Lafontaine J., Jeanteur, P. and Theillet, C. (1989). Proto-oncogene amplification of human breast tumor phenotype. *Oncogene*. 4:1389-1395.

Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Viala, C., Remesey, C., Chap, H. and Payraastre, B. (1997). Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharm.* 53:1649-1657.

Akyan, N.F. (1991). Meme kanserinde adjıvant kemoterapinin bazı humoral inmün sistem parametreleri üzerinde etkisi. *Tıbbi Onkoloji Uzmanlık Tezi*. İstanbul.

American Cancer Society. (2003). Cancer facts and figures 2003. *American Cancer Society*. 404:320-3333.

American Type Culture Collection. 07/09/2005 www.lgcpromochem.com/atcc/.

Antoniotti, S., Maggiora, P., Dati, C. and De Bortoli, M. (1992). Tamoxifen upregulates c-erbB-2 transcription in estrogen-responsive breast cancer cells in vitro. *Eur J Cancer*. 28:318-21.

Artner, J. (2001). Cancer and Neoplasia. *Cancer and Neoplasia*. July 28.

Aslan, A.M. (1997). Lokal ileri meme kanserlerinde uygulanan neoadjuvant kemoterapinin *in vitro* ve *in vivo* sonuçlarının karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi*. İstanbul.

Avila, M.A., Velasco, J.A., Cansado, J. and Notario, V. (1994). Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res.* 54:2424-2428.

Bacus, S.S., Bacus, J.W., Slamon, D.J. and Pres, M.F. (1990). Her-2/Neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 114:164-169.

Barcellos-Hoff, M.H. (2005). Integrative radiation carcinogenesis: interactions between cell and tissue responses to DNA damage. *Seminars in Cancer Biology*. 15:138-148.

Barcellos-Hoff, M.H. (1998). How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. *Radiat Res*. 150:S109-20.

Barcellos-Hoff, M.H. (2001). It takes a tissue to make a tumor: epigenetics, cancer and the microenvironment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 6:213-21.

Barret, J.M., Ernould, A.P., Ferry, G., Genton, A. and Boutin, J.A. (1993). Integrated system for the screening of the specificity of protein kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 46:439-448.

Barotto, N.N., Lopez, C.B., Eynard, A.R., Fernandez, Z.M.E. and Valentich, M.A. (1998). Quercetin enhances pretumorous lesions in the NMU model of rat pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett*. 129:1-6.

Bartelink, H., Van, D.F. and Van D.J. (1985). Psychological effects of breast conserving therapy in comparison with radical mastectomy. *Int. J. Radiol. Onc. Bio. Phys*. 11:381-5.

Baum, M., on behalf of ATAC Trialists' Group. (2001). The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) adjuvant breast cancer trial in postmenopausal (PM) women. *24th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium*. December;(Abstr. 8):10-13.

Baum, M., Budzar, A.U., Cuzick, J., Forbes, J., Houghton, J.H., Klijn, J.G., Sahmoud, T. and ATAC Trialists' Group. (2002). Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomized data. *Lancet*. 359:2131-2139.

Berardo, M.D., Elledge, R.M., de Moor, C., Clark, G.M., Osborne, C.K. and Allred, D.C. (1998). Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer*. 82:1296-1302.

Berrino, F., Muti, P., Micheli, A., Bolelli, G., Krogh, V., Sciajno, R., Pisani, P., Panico, S. and Secreto, G. (1996). Serum sex hormone levels after menopause and subsequent breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 88:291-296.

Beverly, E.G. and Wilson, C.-W. (2003). Section A - The Molecular Basis of Cell and Tissue Organisation. In "The Cancer Handbook". (Chiel Malcolm R. Allson: NGP), pp 49-74, *Nature Publishing Grup*; London; UK.

Boccardo, F., Rubagotti, A., Amoroso, D., Mesiti, M., Romeo, D., Caroti, C., Farris, A., Cruciani, G., Villa, E., Schieppati, G., Mustacchi, G. and on behalf of the Italian Tamoxifen Arimidex (ITA) trial. (2003). Anastrozole appears to be superior to tamoxifen in women already receiving adjuvant tamoxifen treatment. *Breast Cancer Res Treat.* 82;(suppl1):[Abstract 3].

Boccardo, F., Rubagotti, A., Amoroso, D., Mesiti, M., Romeo, D., Caroti, C., Farris, A., Cruciani, G., Villa, E., Schieppati, G., Mustacchi, G. and Italian Breast Cancer Cooperative Group. (2001). Sequential tamoxifen and aminoglutethamide versus tamoxifen alone in the adjuvant treatment of postmenopausal breast cancer patients: results of an Italian Cooperative Study. *J Clin Oncol.* Nov 15;(19);22:4209-15.

Boland, G.P, Butt, I.S., Prasad, R., Knox, W.F. and Bundred, N.J. (2004). COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer.* 90:423-429.

Bonilla, M., Ramirez, M., Lopez-Cueto, J. and Gariglio, P. (1988). In vivo amplification and rearrangement of c-myc oncogene in breast tumors. *J Nalt. Cancer Inst.* 80:665-671.

Bonneterre, J., Thurlimann, B., Robertson, J.F., Krzakowski, M., Mauriac, L., Koralewski, P., Vergote, I., Webster, A., Steinberg, M. and von Euler, M. (2000). Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol.* (18);22:3748-57.

Borg, A., Zhang, Q.X., Alm, P., Olsson, H. and Sellberg, G. (1992). The retinoblastoma gene in breast cancer: Allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer Res.* 52:2991-2994.

Boring, C.C., Squires, T.S. and Tong, T. (1993). Cancer statistics C.A. *Cancer J Clin.* 43:7-26.

Brinton, A.L. and Devesa, S.S. (1996). Etiology and pathogenesis of breast cancer, Epidemiologic factors. In "Diseases of the breast." (J.R. Harris, M.E. Lippmann, M. Morrow, S. Hellman.), pp 159-168, *Lippincott-Raven publishers*; Philadelphia; USA.

Brueggemeier, R.W., Richards, J.A., Joomprabutra, S., Bhat, A.S. and Whetstone, J.L. (2001). Molecular pharmacology of aromatase and its regulation by endogenous and exogenous agents. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 79:75-84.

Buell, P. (1974). Changing incidence of breast cancer in Japanese American Women. *JNCI.* 51:479-487.

Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L. and Eigenbrodt, E.H. (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types of cell death. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 117:1208-1214.

Bundred, N.J. and Barnes, N.L.P. (2005). Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer. *British Journal of Cancer.* 93;(Suppl 1):10-15.

Butel, S.J. (2000). Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and Etiology of human disease. *Carcinogenesis.* (21);3:405-426.

Calle, R. Pilleron, J.R, Sehlienger, P. and Vilcoq, J.R. (1978). Conservative management of operable breast cancer. *Cancer.* 42:2045-2053.

Capella, M.A.M. and Capella, L.S. (2003). A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *Journal of Biomedical Science.* 10:361-366.

Casey, G. (1997). The Brca1 and BRCA2 breast cancer genes. *Current Opinion in Oncology.* 9:88-93.

Choueiri, T.K., Alemany, C.A., Abou-Jawde, R.M. and Budd, G.T. (2004). Role of Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Clin Ther.* (26);8:1199-214.

Clemons, M., Coleman, R.E. and Verma, S. (2004). Aromatase inhibitors in the adjuvant setting: bringing the gold to a Standard. *Cancer Treat Rev.* (30);4:325-32.

Cline, M.J., Battijona, H. and Yokota, J. (1987). Protooncogene abnormalities in human breast cancer. Correlation with anatomic features and clinical course of disease. *J. Clin. Oncol.* 5:999-1003.

Collaborative Group; Early Breast Cancer Trialists'. (1998). Tamoxifen for early breast cancer an overview of the randomised trials. *Lancet.* 351:1451-67.

Coombes, R.C., Hall, E., Gibson, L.J., Paridaens, R., Jassem, J., Delozier, T., Jones, S.E., Alvarez, I., Bertelli, G., Ortmann, O., Coates, A.S., Bajetta, E., Dodwell, D., Coleman, R.E., Fallowfield, L.J., Mickiewicz, E., Andersen, J., Lonning, P.E., Cocconi, G., Stewart, A., Stuart, N., Snowden, C.F., Carpentieri, M., Massimini, G., Bliss, J.M. and Intergroup Exemestane Study. (2004). A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med.* (350);11:1081-92.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A. and Cory, J.D. (1991). Use of aqueous soluble tetrazolium formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3:207-212.

Crews, D., Cantu, A.R., Rhen, T. and Vohra, R. (1996). The Relative Effectiveness of Estrone, Estradiol-17b, and Estriol in Sex Reversal in the Red-Eared Slider (*Trachemys scripta*), a Turtle with Temperature-Dependent Sex Determination. *General and Comparative Endocrinology.* 102:317-326.

Csokay, B., Prajda, N., Weber, G. and Olah, E. (1997). Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sciences.* (60);24:2157-2163.

Cunningham, B.D., Threadgill, M.D., Groundwater, P.W., Dale, I.L. and Hickman, J.A. (1992). Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Anticancer Drug Des.* 7:365-384.

Çelik, V. (1990). Meme kanserinin konservatif cerrahi yöntemlerle tedavisi. *uzmanlık tezi.* İstanbul.

Deng, G., Chen, L.C., Schott, D.R., Thor, A., Bhargava, V.L., Jung, B.M., Chew, K. and Smith, H.S. (1994). Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 54:499-505.

Deschner, E.E. (1992). In "Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II". (Huang M.T. Ho C.T. Lee C.Y. Eds.), pp 507:265-268, *American Chemical Society*; Washington, DC; USA.

Dickson, E.F.G., Goyan, R.L. and Pottier, R.H. (2003). New directions in photodynamic therapy. *Cellular and Molecular Biology*. (48);8:939-954.

Doll, R. and Crofton, J.(eds). (1996). Tobacco and health. *British Medical Bulletin* 52.

Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D. and Jain, R.K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. (3);5:380-387.

Dorgan, J.F., Longcope, C., Stephenson, H.E. Jr, Falk, R.T., Miller, R., Franz, C., Kahle, L., Campbell, W.S., Tangrea, J.A. and Schatzkin, A. (1997). Serum sex hormone levels are related to breast cancer risk in postmenopausal women. *Environmental Health Perspectives* 105. (Suppl 3):583-585.

Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J. and Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. (90);12:889-905.

Dowsett, M. and ATAC Trialists' Group. (2003). Analysis of time to recurrence in the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial according to estrogen receptor and progesterone receptor status, *Breast Cancer Res. Treat.* 82:(Suppl. 1): (abstract 4) -S7.

Dowsett, M., Martin, L.-A., Smith, I. and Johnston, S. (2005). Mechanisms of resistance to aromatase inhibitors *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. (article in pres).

Eiermann, W., Paepke, S., Appfelstaedt, J., Llombart-Cussac, A., Eremin, J., Vinholes, J., Mauriac, L., Ellis, M., Lassus, M., Chaudri- Ross, H.A., Dugan, M. and Borgs, M. (2001). Letrozole Neo-Adjuvant Breast Cancer Study Group, Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: a randomized double-blind multicenter study. *Ann. Oncol.* 12:1527-1532.

Elia, G. and Santoro, M. G. (1994). Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.* 300:201-209.

Elia, G., Amici, C., Rossi, A. and Santoro, M.G. (1996). Modulation of prostaglandin A1-induced thermotolerance by quercetin in human leukemic cells: role of heat shock protein 70. *Cancer Res.* 56:210-217.

Ellis, M.J., Coop, A., Singh, B., Mauriac, L., Llombert-Cussac, A., Janicke, F., Miller, W.R., Evans, D.B., Dugan, M., Brady, C., Quebe-Fehling, E. and Borgs, M. (2001). Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* (19);18:3795-7.

Ellis, P.A., Smith, I.E., Detre, S., Burton, S.A., Salter, J., A'Hern, R., Walsh, G., Johnston, S.R.D. and Dowsett, M. (1998). Reduced apoptosis and proliferation and increased bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment.* 48:107-116.

So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F. and Carroll, K.K. (1997). Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of. *Cancer Letters.* 112:127-133.

Ferrandina, G., Almadori, G., Maggiano, N., Lanza, P., Ferlini, C., Cattani, P., Piantelli, M., Scambia, G. and Ranelletti, F.O. (1998). Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors. *Int. J. Cancer.* 77:747-754.

Ferriola, P.C., Cody, V. and Middleton, E.Jr. (1989). Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 38:1617-1624.

Ford, D., Easton, D.F., Bishop, D.T., Narod, S.A. and Goldgar, D.E. (1994). Risk of cancer BRCA1 mutations carriers. *Lancet.* 343:692-695.

Freedman, O.C., Verma, S. and Clemons, M.J. (2005). Using aromatase inhibitors in the neoadjuvant setting: evolution or revolution? *Cancer Treatment Reviews.* 31:1-17.

Furth, J. (1982). Hormones as etiological agents in neoplasia. In "Cancer: A Comprehensive Treatise, Etiology" "Chemical and Physical Carcinogenesis". (Becker, F.F.), pp 89-134, *Plenum Press* edn 2; New York; USA.

Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y. and et al. (1994). Mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. 266:120-122.

Garcia, I., Dietrich, P.Y., Aapro, M., Vauthier, G., Vadas, L. and Engel, E. (1989). Genetic alterations of c-myc, c-erb B2 and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res*. 49:6675-6679.

Garcia-Closas, R., Gonzalez, C.A., Agudo, A. and Riboli, E. (1999). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Contr*. 10:71-75.

Giai, M., Roagna, R., Ponzzone, R., De Bortoli, M., Dati, C. and Sismondi, P. (1994). Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res*. 14:1441-50.

Goldberg, D.M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E.P., Soleas, G. and Ng, E. (1996). Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal. Chem*. 68:1688-1694.

Goss, P.E. and Strasser, K. (2001). Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *JCO*. (19);3:881-94.

Goss, P.E., Ingle, J.N., Martino, S., Robert, N.J., Muss, H.B., Piccart, M.J., Castiglione, M., Tu, D., Shepherd, L.E., Pritchard, K.I., Livingston, R.B., Davidson, N.E., Norton, L., Perez, E.A., Abrams, J.S., Therasse, P., Palmer, M.J. and Pater, J.L. (2003). A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early stage breast cancer. *N Engl J Med*. 349:1793-802.

Green, D.R. and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281:1309-1312.

Gunson, D.E., Steele, R.E. and Chau, R.Y. (1995). Prevention of spontaneous tumours in female rats by fadrozole hydrochloride, an aromatase inhibitor. *British Journal of Cancer*. 72:72-75.

Hagiwara, M., Inoue, S., Tanaka, T., Nunoki, K., Ito, M. and Hidaka, H. (1988). Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem. Pharmacol*. 37:2987-2992.

Half, E., Tang, X.M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathen, K. and Sinicrope, F.A. (2002). Cyclooxygenase expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 62:1676-1681.

Hanasaki, Y., Ogawa, S. and Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* (16);6:845-850.

Hansel, H. (1997). Meme kanserinde oksidatif aktivite, onkogenler ve tümör markerlarının tümör evrelerine göre karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi.* Istanbul

Hesketh, R. (1997). Contains molecular details of major oncogenes and repressor genes plus a short introduction to their biological functions. In "The oncogene and tumour suppressor gene facts book", *Academic Press* 2nd ed., London; U.K.

Hockenbery, D.M. (1992). The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Seminars in Immunology.* 4:413-420.

Hofmann, J., Doppler, W., Jakob, A., Maly, K., Posch, L., Ijberall, F. and Grunicke, H.H. (1988). Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloroplatinum (II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase. *C. Int J Cancer.* 42:382-388.

Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Aoike, A., Kawai, K. and Nagata, K. (1992). Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol. Cell. Biol.* 12:3490-3498.

Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Nakai, A., Hosokawa, Y., Marui, N., Yoshida, M., Sakai, T., Nishino, H., Aoike, A., Kawai, K. and Nagata, K. (1990). Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Funct.* 15:393-401.

Huang, L., Snyder, A.R. and Morgan, W.F. (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene.* 22:5848-54.

Iwao, K. and Tsukamoto, I. (1999). Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1427:112-120.

Kang, T.-B. and Liang, M.-C. (1997). Studies on the Inhibitory Effects of Quercetin on the Growth of HL460 Leukemia Cells. *Biochemical Pharmacology*. 54:1013-1018.

Kantengwa, S. and Polla, B.S. (1991). Flavonoids, but not protein kinase C inhibitors, prevent stress protein synthesis during erythrophagocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 180:308-314.

Kılıç, D., Kaya, I. ve Kamaş, A. (2003). Sağlık istatistikleri 2002. *Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Araştırma, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı Sağlık İstatistikleri 2002*; Ankara; Türkiye.

Kim, W.K., Bang, M.H., Kim, E.S., Kang, N.E., Jung, K.C., Cho, H.J. and Park, J.H.Y. (2005). Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16:155-162.

King, R.J.B. (1997). *Cancer Biology*. Pearson Education Ltd. England; UK.

King, R.J.B. (2000). *Cancer Biology*. Pearson Education Ltd. England; UK.

Kirkpatrick, K., Ogunkolade, W. and Elkak, A.E. (2001). The association between cyclo-oxygenase-2 expression and cell proliferation and angiogenesis in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 3;(Suppl 1):A37.

Kızır, A. (1987). Meme kanseri tedavisinde posperatif radyoterapi ve adjuvant kemoterapinin lokal ve uzak metastazlara etkisi. *Uzmanlık tezi*. İstanbul.

Koskinen, P.J. and Alitalo, K. (1993). Role of myc amplification and over-expression in cell growth, differentiation and death. *Seminars in Cancer Biology*. 4:3-12.

Koutselini, H., Malliri, A., Field, J.K. and Spandidos, D.A. (1991). p53 expression in cytologic specimens from benign and malignant breast cancer lesions. *Anticancer Res*. 11:1415-1419.

Krammer, P.H., Gale, P.R., Moller, P. and Debatin, K.M. (1998). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in normal and malignant liver, colon, and hematopoietic cells. In "Advances in Cancer Research" (Vande Woude G.F. and Klein G. Eds.), pp 65:251-272, *Academic Press Inc*; San Diego; USA.

Kuno, K. and Fukami, A. (1979). Cancer of Breast Cancer Institute Hospital, Tokyo, Can Monogr. *Cancer Res.* 22:159-165.

Kuo, S.M. (1997). Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit. Rev. Oncog.* 8:47-69.

Larocca, L.M., Ranelletti, F.O., Maggiano, N., Rutella, S., La Barbera, E.O., Rumi, C., Serra, F., Voso, M.T., Piantelli, M., Teofili, L. and Leone, G. (1997). Differential sensitivity of leukemic and normal hematopoietic progenitors to the killing effect of hyperthermia and quercetin used in combination: role of heat-shock protein-70. *Int. J. Cancer.* 73:75-83.

Lee, Y.J., Curetty, L., Hou, Z.Z., Kim, S.H., Kim, J.H. and Corry, P.M. (1992). Effect of pH on quercetin-induced suppression of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1121-1128.

Lee, Y.J., Erdos, G., Hou, Z.Z., Kim, S.H., Kim, J.H., Cho, J.M. and Corry, P.M. (1994). Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 137:141-154.

Lester, J. and Coleman, R. (2005). Bone loss and the aromatase inhibitors. *British Journal of Cancer.* (Suppl I):16-22.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94:491-501.

Lidereau, R., Callahan, R., Dickson, C., Peters, G., Escot, C. and Ali, I.U. (1988). Amplification of the Int-2 gene in primary human breast cancer tumors. *Oncogene Res.* 2:285-291.

Lipponen, P., Aaltomaa, S., Komsa, V-M. and Syrjänen, K. (1994). Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *European Journal of Cancer.* 30:2068-2073.

Lipponen, P. (1999). Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocrine-Related Cancer.* 6:13-16.

Lipponen, P. and Aaltomaa, S. (1994). Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *Journal of Pathology*. 173:333-340.

Lipponen, P., Pietiläinen, T., Komsa, V-M., Aaltomaa, S., Eskelinen, M. and Syrjänen, K. (1995). Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *Journal of Pathology*. 177:49-55.

Lipton, A., Ali, S.M., Leitzel, K., Demers, L., Chinchilli, V., Engle, L., Harvey, H.A., Brady, C., Nalin, C.M., Dugan, M., Carney, W. and Allard, J. (2002). Elevated HER-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 20:1467-72.

Liu, C.H., Chang, S.H., Narko, K., Trifan, O.C., Wu, M.T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T.F. and Hla, T. (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*. 276:18563-18569.

Locke, F.B. and King, H. (1980). Cancer mortality risk among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 64:1149-1156.

Lombard, K., Peffley, E., Geoffriau, E., Thompson, L. and Herrin, A. (2005). Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18:571-581.

Longcope, C., Baker, R. and Johnston C.C. Jr. (1986). Androgen and estrogen metabolism: relationship to obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*. 35:235-237.

Magnusson, C., Baron, J., Persson, I., Wolk, A., Bergstrom, R., Trichopoulos, D. and Adami, H.O. (1998). Body size in different periods of life and breast cancer risk in post-menopausal women. *International Journal of Cancer*. 76:29-34.

Masood, S. and Kameh, D. (2003). Section D - Systemic Oncology. in "The Cancer Handbook". (Chiel Malcolm R. Allson: NGP), pp 611-616, *Nature Publishing Grup*; Florida; USA.

Merajver, S.D., Pham, T.M., Caduff, R.F., Chen, M., Poy, E.L., Cooney, K.A., Weber, B.L., Collins, F.S., Johnston, C. and Frank, T.S. (1995). Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors. *Nat. Genet*. 9:439-443.

Michael, M.D., Michael, L.F. and Simpson, E.R. (1997). A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol Cell Endocrinol.* 134:147-156.

Middleton, E.J. and Kandaswami, C. (1993). Advance Research Since 1986. In "The Flavonoids", (Hairbone, J.H. and Liss, A.R., Eds.) pp. 619–652, New York; USA.

Miller, W.R. (1990). Oestrogens and Breast cancer. *Biological considerations. Br. Med. Bull.* 47:470-478.

Mouridsen, H., Gershanovich, M., Sun, Y., Perez-Carrion, R., Boni, C., Monnier, A., Apffelstaedt, J., Smith, R., Sleenboom, H.P., Janicke, F., Pluzanska, A., Dank, M., Becquart, D., Bapsy, P.P., Salminen, E., Snyder, R., Lassus, M., Verbeek, J.A., Staffler, B., Chaudri-Ross, H.A. and Dugan, M. (2001). Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* 19:2596-2606.

Mustonen, M., Taunio, H., Pääkkö, P. and Soini, Y. (1997). The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology.* 31:347-353.

Nabholtz, J.M., Buzdar, A., Pollak, M., Harwin, W., Burton, G., Mangalik, A., Steinberg, M., Webster, A. and von Euler, M. (2000). Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *J. Clin. Oncol.* 18:3758-3767.

Nagai, N., Nakai, A. and Nagata, K. (1995). Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:1099-1105.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-365.

Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1993). Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 45:265-267.

Nicholls, H. (2002). Aromatase inhibitors continue their ATAC on tamoxifen. *Trends Mol Med.* (8);(4 Suppl):12-13.

Notoya, M., Tsukamoto, Y., Nishimura, H., Woo, J-T., Nagai K., Lee, I-S. and Hagiwara, H. (2004). Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. *European Journal of Pharmacology.* 485:89-96.

Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17:3237-3245.

Ottoman, R., Pike, M.C., King, M.C., Casagrande, J.T. and Henderson, B.E. (1986). Familial breast cancer in a population based series. *Am. J. Epidemiol.* 123:15-21.

Oyama, Y., Noguchi, S., Nakata, M., Okada, Y., Yamazaki, Y., Funai, M., Chikahisa, L. and Kanemaru, K. (1999). Exposure of rat thymocytes to hydrogen peroxide increases annexin V binding to membranes: inhibitory actions of deferoxamine and Quercetin. *European Journal of Pharmacology.* 384:47-52.

Parki, D.M., Laara, E. and Muir, C.S. (1988). Estimates of the world wide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer.* 41:184-96.

Parkin, D.M. (1998). The global burden of cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 8:219-35.

Pietiläinen, T., Lipponen, P., Aaltomaa, S., Eskelinen, M., Komsa, V.-M. and Syrjänen, K. (1995). Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer. *Journal of Pathology.* 177:225-232.

Plaumann, B., Fritsche, M., Rimpler, H., Brandner, G. and Hess, R.D. (1996). Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* 13:1605-1614.

Preston-Martin, S., Pike, MC., Ross, R.K. and Henderson, B.E. (1993). Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model of carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives.* (101);(Suppl 5):137-138.

Price, K.R. and Rhodes, M.J.C. (1997). Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *J. Sci. Food Agric.* 74:331-339.

Read, L.D., Keith, D.Jr. and Slamon, D.J. (1990). Katzenellenbogen BS Hormonal modulation of HER2/neu proto-oncogene messenger ribonucleic acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J. Clin. Oncol.* 18:3748-3757.

Robert, J.W., Jeremy, P., Spencer, E. and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants Or Signalling Molecules?. *Free Radical Biology & Medicine.* 36:838-849.

Robins, S.L. and Kumar, V. (1990). Basic Pathology, Philadelphia, Saunders W.B. Çeviri: In "Kadın genital sistemi ve meme". (Erhan, Y.) pp 820-872, *Güneş Kitapevi; Patoloji. Ed. O. Uluoğlu 4. baskı; Ankara; Türkiye.*

Rong, Y., Yang, E.B., Zhang, K. and Mack, P. (2000). Quercetin induced apoptosi in the monoblastoid cell line U937 *in vitro* and the regulation of heat shock protein expression: *Anticancer Res.* 20:4339-4345.

Ronit, V.S. and Ygal, H. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 18:6145-6157.

Roth, J.A. (1994). Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer.* (10);(Suppl 1):3-15.

Russo, M., Palumbo, R., Tedesco, I., Mazzarella, G., Russo, P., Iacomino, G. and Russo, G.L. (1999). Quercetin and anti-CD95(Fas/Apo1) enhance apoptosis in HPB-ALL cell line. *FEBS Letters.* 462:322-328.

Rzymowska, J., Gawron, A., Pawlikowska, P.B., Jakubowicz, G.J. and Wojcierowski, J. (1999). The efect of Quercetin on induction of apoptosis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 37:125-126.

Santen, R.J., Yue, W., Naftolin, F., Mor, G. and Berstein, L. (1999). The potential of aromatase inhibitors in breast cancer prevention. *Endocrine-Related Cancer.* 6:235-243.

Santos, A.C., Uyemura, S.A., Lopes, J.L., Bazon, J.N., Mingatto, F.E. and Curti, C. (1998). Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 24:1455-1461.

Sattin, R.W., Rubin, G.L., Webster, L.A., Huezo, C.M., Wingo, P.A., Ory, H.W. and Layde, P.M. (1985). Familial history and the risk of breast cancer. *JAMA*. 253:1908-1913.

Schwarzel, W.C., Kruggel, W.G. and Brodie H.J. (1973). Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. VIII. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta. *Endocrinology*. 92:866-80.

Sheehan, D.M. (1995). The case for expanded phytoestrogen research. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208:3-5.

Sherman, C.D. and Hossfeld, D.K. (1990). Breast cancer. In "Manual of Clin. Onc. Fifth ed." (Hossfeld, D.K., Sherman, C.D., Love, R.R. and Bosch, F.X.), pp 253-271, *Springer-Verlag*; Berlin; Germany.

Shutt, D.A. (1976). The effect of plant oestrogens on animal reproduction. *Endeavour*. 35:110-113.

Simard, J., Tonin, P., Durocher, F., Morgan, K., Rommens, J., Gingras, S., Samson, C., Leblanc, J.F., Belanger, C., Dion, F., Liu, Q., Skolnick, M., Goldgar, D., Shattuck-Eidens, D., Labrie, F. and Narod, S.A. (1994). Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and Ovarian cancer families. *Nat. Genet.* 8:392-397.

Singer, B. and Grunberger, D. (1983). Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens. *Plenum Press NY*, London; UK.

Sliutz, G., Karlseder, J., Tempfer, C., Orel, L., Holzer, G. and Simon, M. M. (1996). Drug resistance against gemcitabine and topotecan mediated by constitutive hsp70 overexpression in vitro: implication of quercetin as sensitiser in chemotherapy. *Br. J. Cancer*. 74:172-177.

Smith, I.E. and Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:2431-2442.

Smith, I.E. and Dowsett, M. "2". (2003). The Impact Trial. A multicentre double blind placebo controlled trial comparing neoadjuvant anastrozole with tamoxifen or the combination, Breast Cancer Res. Treat. 82 (Suppl. 1) S6 (abstract 1). increased proliferative activity. *British Journal of Cancer*. 77:789-796.

Stal, O., Borg, A., Ferno, M., Kallstrom, A.C., Malmstrom, P., Nordenskjold, B. and South Sweden Breast Cancer Group. (2000). Southeast Sweden Breast Cancer

Group. ErbB2 status and the benefit from two or five years of adjuvant tamoxifen in postmenopausal early stage breast cancer. *Ann Oncol.* 11:1545-50.

Stavric, B. (1994). Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem.* 27:319-332.

Steele, R.E., Mellor, L.B., Swyer, W.K., Wasvary, J.M. and Browne, L.J. (1987). In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective oestrogen inhibition with the non-steroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. *Steroid.* 50:147-61.

Stein, R.C., Dowsett, M. and Headley, A. (1990). Treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women with 4-hydroxyandrostenedione. *Cancer Chemother Pharmacol.* 26:75-8.

Tamura, G., Gold, C., Fezz-Luzi, A. and Ames, B.N. (1999). Fecalase: a model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:4961-4965.

Tannock, I.F. and Hill R.P. (eds). (1992). The Basic science of oncology 2nd ed. (Mc Graw-Hill), New York; UK.

Tchia, M.M., Holmes, M.D. and McLennan, G. (1991). The molecular biology of lung cancer. *Med J Australia.* 154:501-503.

Thor, A.D., Moore, D.H.II., Edgerton, S.M., Kawasaki, E.S., Reihsaus, E., Lynch, H.T., Marcus, J.N., Schwartz, L., Chen, L.C., Mayall, B.H. and et al. (1992). Accumulation of p53 tumor supressor gene protein: an indipendent marker of prognosis in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84:845-855.

Toniolo, P.G., Levitz, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Banerjee, S., Koenig, K.L., Shore, R.E., Strax, P. and Pasternack, B.S. (1995). A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute.* 87:190-197.

Topuz, E. (1997). Meme kanseri biyoloji, tanı, evreleme ve tedavi. *İstanbul üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları 3.* İstanbul; Türkiye.

Trosko, J.E. (1998). Hierarchcal and cybernetic nature of biologic systems and their relevance to homeostatic adaptation to low-level exposures to oxidative stress-inducing agents. *Environ Health Perspect.* 106:331-9.

Urban, J.A. and Baker, H.W. (1952). Radical mastectomy in continuity with en bloc resection of the internal mammary lymph node chain: a new procedure for primary operable cancer of the breast. *Cancer*. 5:992-1008.

van Slooten, H.-J., van der Vijver, M.J., van der, Velde, C.J.H. and van Dierendonck, J.H. (1998). Loss of bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with Varadhachary A.S. and Salgame P: *Oncogene*. 17:3271-3276.

Villa, L.L. (1997). Human papillomaviruses and cervical cancer. *Advances in Cancer Research*. 71:321-41.

Vrouenraets, M.B., Visser, G.W.M., Snow, G.B. and van Dongen, G.A.M.S. (2003). Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Research*. 23:505-522.

Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. and Uchida, A. (1994). Induction of apoptosis by quercetin: Involment of heat shock protein. *Cancer Res*. 54:4952-4957.

Wells, S.A. Jr., Santen, R.J., Lipton, A., Haagensen, D.E. Jr., Ruby, E.J., Harvey, H. and Dilley, W.G. (1978). Medical adrenalectomy with aminoglutethemide: clinical studies in postmenopausal patients with metastatic breast carcinoma. *Ann Surg*. 187:475-84.

Wickerham, D.L., Constantino, J.C. and Fisher, B. (1998). The initial results from NSABP P-1: a clinical trial to determine the worth of tamoxifen for preventing breast cancer in women at increased risk. Abstract no. 3a. *34th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*; Los Angeles; USA.

Wilson, B.C. (2002). Photodynamic therapy for cancer: Principles. *Canadian Journal Of Gastroenterology*. (16);6:393-396.

World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. (1997). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *American Institute for Cancer Research Washington, DC*. ISBN 1 899533 05 2.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002). Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal

result from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*. (288);3:321-333.

Wyllie, A.H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metastasis Reviews*. 11:95-103.

Wysowski, D.K., Comstock, G.W., Helsing, K.J. and Lau, H.L. (1987). Sex hormone levels in serum in relation to the development of breast cancer. *American Journal of Epidemiology*. 125:791-799.

Xu, H.J., Hu, S.X., Cagle, P.T., Moore, G.E. and Benedict, W.F. (1991). Lack of the RB protein expression in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*. 51:2735-2739.

Yokoo, T. and Kitamura, M. (1997). Unexpected production of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid. Quercetin. *Am. J. Physiol*. 273:206-212.

Zhang G.-J., Kimijima, I., Abe, R., Watanabe, T., Kano, M., Hara, K. and Tsuchiya, A. (1998). Apoptotic index correlates to Bcl-2 and p53 protein expression, histological grade and prognosis in invasive breast cancers. *Anticancer Res*. (18);3B:1989-1998.

Zhang, H., Tomblin, G. and Weber, B.L. "2". (1998). BRCA1, BRCA2 and DNA damage response: collision or collusion? *CELL*. 92:433-36.

Zhao, Y., Agarwal, V.R., Mendelson, C.R. and Simpson, E.R. (1996). Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE₂ via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology*. 137:5739-5742.

Zhou, D.J., Casey, G. and Cline, M.J. (1988). Amplification of human int-2 in breast and squamous carcinoma. *Oncogene*. 2:279-282.

ÖZGEÇMİŞ



17 Nisan 1978 tarihinde, Bafra'da doğdu. 2000 yılında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2001 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2003 yılında yüksek lisans tez çalışmasına başladı. Halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.

