

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

**MEME EPİTELİ VE MEME KANSERİ  
HÜCRE HATLARINDA SİNARİN BİLEŞİĞİNİN  
APOPTOZ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Berna ÖZDEM**

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

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

**MALATYA  
2021**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
TABLOLAR DİZİNİ .....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.2. Doğal Ürünler ve Kanser Tedavisi .....	5
2.3. Kanserde Doğal Ürünlerin Hedefleri .....	6
2.4 Flavanoidler .....	6
2.4.1. Enginar.....	7
2.4.2. Sinarin.....	8
2.5. Apoptozis ve Oksidatif Stres .....	10
2.5.1. Apoptoz ve Kanser Tedavisi.....	13
2.5.2. Oksidatif stres .....	13
2.5.3. Antioksidanlar.....	14
2.6. Meme Kanseri ve Etiyolojisi .....	16
2.6.1. Meme Kanseri Sınıflaması.....	17
2.7.Hipotez.....	19
3. MATERYAL VE METOT .....	20
3.1. Materyaller.....	20
3.1.1. Cihazlar.....	20

3.1.2. Sarflar.....	21
3.1.3. Kimyasallar ve Reaktifler .....	21
3.1.4. Kitler .....	24
3.1.5. Antikorlar.....	24
3.1.6. Çalışmada kullanılan hücre hatları .....	24
3.2. Metotlar.....	27
3.2.1. Hücre Kültürü .....	27
3.2.2. Hücrelerin Çözülmesi .....	27
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması .....	27
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması .....	28
3.2.5. Hücrelerin Sayılması.....	28
3.2.6. Hücre Lizatı Elde Edilmesi.....	29
3.2.7. Protein Miktarının Ölçülmesi .....	29
3.2.8. Western Blot Analizi .....	30
3.2.9. Annexin V Boyaması ile Apoptozun Belirlenmesi.....	30
3.2.10. Hücre Proliferasyon Testi (MTT).....	31
3.2.11. Koloni Oluşturma Testi (Colony Formation Assay).....	31
3.2.12. Yazılım ve Veritabanları.....	32
3.2.13. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Canlılık ve Doluluk Oranları .....	33
4.2. Hücrelerin İlaç Uygulaması Sonrasındaki Mikroskop Görüntüleri.....	34
4.3. Proliferasyon ve Hayatta Kalım.....	37
4.4. Anneksin PI Boyanması ile Apoptoz Tespiti.....	39
4.5. Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi .....	43

4.6. Sinarin'in Hücre Ölümündeki Rolünün Western blot ile Belirlenmesi.....	46
5. TARTIŞMA .....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR .....	56
EKLER.....	61
EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	61
EK.2 Etik Kurul Gerek Olmadığına Dair .....	61





## ÖZET

### **Meme Epiteli ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sinarin Bileşiminin Apoptoz Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması**

**Amaç:** Enginarada yüksek oranda yer alan bir polifenol olan sinarin'in oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı, sinarin'in proliferasyon ve hücre ölümü üzerindeki etkilerinin in vitro ortamda meme kanseri hücrelerinde araştırılması ve bu bağlamda sinarin'in apoptoz sürecindeki rolünün aydınlatılmasıdır.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışmada, MCF-10A normal meme hücresi ve MDA-MB-231, MCF7 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Uygulanan sinarin tedavisiyle hücrelerde bu tedavinin hücre proliferasyonu MTT ile, koloni oluşturma yetenekleri ise koloni oluşturma testi ile test edilmiştir. Hücre ölümündeki rolünün aydınlatılması için western blotting yöntemi ve annexin PI boyama testi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Sinarin uygulanan hücrelerde hücre proliferasyonunun ve hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre hatlarında sırasıyla 160 µM ve 180 µM konsantrasyonlarda, yüzde 70'in üzerinde bir oranda azaldığı belirlenmiştir. MCF10A hücresinde %10, MDA-MB-231 hücresinde %63 ve MCF-7 hücre hattında ise %69 oranında-apoptoz meydana geldiği saptanmıştır. Ve bütün bu sonuçlar student T testi kullanılarak analiz edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

**Sonuç:** Sinarin'in in vitro'da meme kanseri hücreleri ve meme epitel hücresinde etkileri analiz edilmiş ve sinarin'in apoptozu uyarıcı, hücre proliferasyonunu azaltıcı etki yaptığı belirlenmiştir. Kansere tedavisinde kullanılan ilaçlardan beklenen etkilerin ortaya çıktığı bu çalışma sonucunda sinarin bileşiminin kanser tedavisi için yeni bir ümit olacağı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sinarin, Epitel, Meme Kanseri

## ABSTRACT

### **Investigation the Apoptotic Effects of Sinarin Compound On Breast Epithelium and Cancer Cells**

**Aim:** it is suggested that sinarin, a polyphenol that is highly involved in artichoke, has a protective effect against oxidative stress. In addition, the purpose of this study is to investigate the effects of sinarin on proliferation, cell death in breast cancer cells. And in this context, to clarify the role of sinarin in the cancer death process.

**Material and Method:** In this study, MCF10 normal breast cell and MDA-MB-231, MCF7 breast cancer cells were used. With the sinarin treatment applied, cell proliferation of this treatment in cells was tested with MTT, and colony forming abilities were tested with colony forming test, western blotting and annexin PI test were used to clarify its role in cell death.

**Results:** It was determined that cell proliferation and colony formation ability of cells in cells treated with sinarin decreased over 70 percent at concentrations of 160  $\mu\text{M}$  and 180  $\mu\text{M}$ , respectively, in MCF-7 and MDA-MB 231 cell lines. Apoptosis occurred in 10% in MCF10A cell, 63% in MDA-MB-231 cell and 69% in MCF-7 cell line. And all these results were analyzed using the student's T test and found statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In this study, the effects of sinarin on breast cancer cells and breast epithelial cells were analyzed. It was determined that sinarin compound had an effect on increasing apoptosis and decreasing cell proliferation. As a result of this study in which the effects expected from the drugs used in cancer treatment appeared, it was determined that sinarin substance would be a new hope for cancer treatment.

**Keywords:** Sinarin, Epithelium, Breast Cancer

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ATCC</b>	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medyum
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>kDa</b>	:Kilo dalton
<b>MEBM</b>	: Memeli Epitel Hücre Büyüme Ortamı (Mammary Epithelial Cell Growth Medium)
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>ml</b>	:Mililitre
<b>mM</b>	:Milimolar
<b>NAF</b>	: Sodyum Florür
<b>NA<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	: Sodyum Ortovanadat
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
<b>PI</b>	: Propidyum İyodit
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>WB</b>	: Western Blot
<b>DCQA</b>	: Dikaffeoylquinik asit
<b>TNBC</b>	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
<b>BRCA1</b>	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni 1
<b>BRCA2</b>	: Meme Kanseri Yatkınlık Geni 2
<b>ER</b>	: Östrojen Reseptörü
<b>PR</b>	: Progesteron Reseptörü
<b>CGA</b>	: Klorojenik Asit (Chlorogenic acid)



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil no	Sayfa no
Şekil 2.1. Karsinogenezin Aşamaları.....	4
Şekil 2.2. Enginar Bitkisi.....	7
Şekil 2.3. Sinarin'in Kimyasal Yapısı.....	8
Şekil 2.4. Sinarin'in Yapısı .....	9
Şekil 2.5. Apoptoz Yolakları .....	12
Şekil 2.6. Oksidatif Stresin Neden Olduğu Çeşitli Hastalıklar.....	14
Şekil 2.7. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	15
Şekil 2.8. Antioksidanlar Serbest Radikallerin Etkilerini İnaktive Ederler.....	15
Şekil 2.9. Meme Kanserinde Risk Faktörleri .....	17
Şekil 3.1. Neubauer Lam.....	28
Şekil 4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskopundaki Görüntüleri.....	33
Şekil 4.2. MDA-MB 231 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Vehicle ve Sinarin ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (72 saat)...34	34
Şekil 4.3. MCF7 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Vehicle ve Sinarin ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (72 saat).....	35
Şekil 4.4. MCF10A Hücresinde Tedavisiz Grup ile Vehicle ve Sinarin ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (72 saat).....	36
Şekil 4.5. MCF 7 Hücresinde Farklı Sinarin Konsantrasyonları Sonrası Hücre Canlılığı Yüzdesi (72 saat).....	37
Şekil4.6. MDA-MB 231 Hücresinde Farklı Sinarin Konsantrasyonları Sonrası Hücre Canlılığı Yüzdesi (72 saat).....	38
Şekil 4.7. MCF10-A Hücresinde Farklı Sinarin Konsantrasyonları Sonrası Hücre Canlılığı Yüzdesi (72 saat).....	38
Şekil 4.8. MDA-MB 231 Hücre Hatlarında Tedavisiz, Vehicle ve 160 µM Sinarin Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri.....	39
Şekil 4.9. Sinarin Uygulaması Sonrası MDA-MB 231 Hücrelerinde Hücre Ölüm Yüzdesi .....	40
Şekil 4.10. MCF-7 Hücre Hatlarında Sırasıyla Tedavisiz, Vehicle ve 160 µM Sinarin Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri.....	41

<b>Şekil 4.11.</b> 160 µM Sinarin Uygulaması Sonrası MCF-7 Hücrelerinde Hücre Ölüm Yüzdesi.....	42
<b>Şekil 4.12.</b> MCF10A Hücre Hattında Tedavisiz, Vehicle ve Sinarin Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri.....	43
<b>Şekil 4.13.</b> 550 µM Sinarin Uygulaması Sonrası MCF10A Hücrelerinde Hücre Ölüm Yüzdesi .....	44
<b>Şekil 4.14.</b> MDA-MB 231 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği.....	44
<b>Şekil 4.15.</b> MCF7 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği.....	45
<b>Şekil 4.16.</b> MCF 10A Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği.....	45
<b>Şekil 4.17.</b> MCF- 7 Hücrelerinde Bcl-2 Gen İfadesinin Baskılanması.....	46
<b>Şekil 4.18.</b> Sinarin ile Muamele Edilen MCF7 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması .....	47
<b>Şekil 4.19.</b> Sinarin ile Muamele Edilen MCF7 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile PARP 1 İfadeleri.....	47
<b>Şekil 4.20.</b> MDA MB 231 Hücre Hattı Western Blot Sonuçları.....	48
<b>Şekil 4.21.</b> Sinarin İle Muamele Edilen MDA-MB 231 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması .....	48
<b>Şekil 4.22.</b> Sinarin İle Muamele Edilen MDA-MB 231 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile PARP 1 İfadeleri.....	49
<b>Şekil 4.23.</b> Sinarin İle Muamele Edilen MCF10A Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bcl-2 İfadeleri.....	50
<b>Şekil 4.24.</b> Sinarin ile Muamele Edilen MCF10A Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması.....	50

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Hücrelerin Özellikleri.....	25
<b>Tablo 3.2.</b> Besiyeri İçerikleri.....	26
<b>Tablo 3.3.</b> Anneksin V boyaması için karışım oranları.....	31



# 1.GİRİŞ

Kanser şimdiye kadar tanımlanmış olan en eski hastalıklardan biridir ve eski Mısır döneminden şimdiye kadar bu hastalığı tedavi etmek için girişimlerde bulunulmuştur (1). Kanser biyolojisindeki diğer gelişmeler, sistemik tedaviler, hormonal tedaviler ve hedefli ilaçların geliştirilmesine izin vermiştir. Meme kanserinin moleküler intrinsik alt tiplerinin tanımlanması, meme kanserinin farklı klinik sonuçlar ve terapötik fırsatlarla ilişkili bir grup heterojen hastalık olarak anlaşılmasını netleştirmiştir (1).

Meme Kanseri, dünyada en çok kadınlarda görülen kanser türüdür. Meme kanseri kadınlar arasında tüm kanser vakalarının %23'ünü ve kanser sebebiyle ölümlerin %14'ünü oluşturmaktadır (2).

Meme kanseri, ileriki yaşlarda daha sık görülmekle birlikte 25-30 yaşlarında da nadir olarak görülmektedir. Meme kanseri, multifaktöriyel yani genler ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşim içerisinde bulunduğu bir hastalıktır (2). Bu kanser türünde en büyük risk ailesel yatkınlığa neden olan genler olan BRCA1 ve BRCA2 olarak bilinse de multifaktöriyel bir hastalık olduğundan dolayı tek faktör olarak görülmez, çevre etkisinde önemli bir etken olarak görülür (2).

Günümüzde ilaçların anlamlı sayıda bir kısmı doğal ürünlerden geliştirilip sentezlenen bileşiklerden elde edilmektedir (3). Ayrıca pek çok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede de aynı şekilde doğal bitkilerden elde edilen bileşiklerden çeşitli ilaç hammaddeleri sağlanmaktadır (4).

Meme kanserinin tedavisi için yapılan araştırmalarda birçok yeni ilacın etkinliği üzerinde durulmakta, meme kanseri tedavisinde etkinliği öne çıkmaktadır. Meme kanseri tedavisinde etkin ilaç olma potansiyeli olan yeni bileşiklerin araştırılması ve geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Apoptotik hücre ölümü, hücre ölümünün erişkin dokularının korunmasında ve embriyonun gelişiminde anahtar rol alan normal fizyolojik bir çeşididir. Apoptoz, hücre ölümünün düzenlenmiş bir dizi olay aracılığıyla gerçekleştiği fizyolojik bir süreçtir (5). Bitkilerde yer alan bileşiklerin kullanılarak kötü huylu olan malign tümörlerde apoptozun uyarılması vasıtasıyla kanser tedavisinde kullanılması yönünde pek çok çalışma bulunup bunlar hastalığın tedavisi için umut vaat etmektedir.

Pek çok fizyolojik ve patolojik durumda, organizma yüksek oranlarda oksidanlarla ve serbest radikallerle karşı karşıya kalabilir.

Oksidatif stres pek çok hastalığın gelişimine moleküler olarak temel oluşturur. Oksidatif stresin neden olduğu hastalıklar arasında; diyabet hipertansiyon, kanser, otoimmün bozukluklar parkinson ve hipoksi yer almaktadır (6). Yapılan literatür taramaları neticesinde enginarada yüksek oranda yer alan bir polifenol olan sinarin'in oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (7).

Sinarin'in insanlarda yapılan çalışmalarda antioksidan savunma sistemi üzerinde potansiyel olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (8). Sinarin, enginarın (*Cynara scolymus*) içeriğinde yer alan bir polifenoldür (9).

Ayrıca yapılan bir çalışmada sinarin bileşiğinin Hela hücre hattında 400 uM doza kadar bir etkisine rastlanmadığı belirtilmişken, lökemik hücre hatlarında %20 oranında sitotoksik etkisi olduğu kanıtlanmıştır (10, 11).

Yapılan bazı çalışmalarda sinarin içeren enginarların hepatoprotektif, kolesterol düşürücü, safra salgılayan ve idrara çıkaran, anti bakteriyel, antioksidatif etkileri olduğu görülmüştür (12-14).

Bütün bu insan sağlığını olumlu yönde etkileyen faydalı etkileri bu bitkinin baş ve yaprak kısımlarında çok fazla oranda bulunan temel kafeoilkinik asit türevlerinden sinarin'e atfedilmektedir (15).

Bu çalışmada, sinarin'in farklı konsantrasyonlarının normal meme epitel hücresi MCF10A ve meme kanseri hücre hatları olan MDA- MB 231, MCF7 üzerindeki potansiyel etkileri ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz büyüme ve anormal hücrelerin yayılım göstermesiyle ile karakterize bir grup hastalıktır. Eğer yayılması kontrol altına alınamazsa, ölümle sonuçlanması olasıdır (16).

Kanser kelimesinin Yunan hekim Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından verildiği tahmin edilmektedir. Hipokrat ilk kez “karkinos” ve “karkinoma” terimlerini malign iyileşmeyen tümörleri tanımlamak için kullanmıştır (17).

Kansere neden olan faktörlere kanserojenler denir. Bu faktörlerden bazılarında örnek olarak sigara, radyasyon ultraviyole ışınlar, x-ray, aflotoksin ve bazı virüsler verilebilir. Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen etkilerini DNA hasarı yaparak ya da mutasyonları uyararak gösterirler. Her karsinojen mutasyon yapmaz direkt olarak proliferasyonda uyarabilir. Bunlara ‘tümör kamçılayıcılar’ denir. Örnek olarak, protein kinaz C’yi aktif hale getirerek hücre çoğalmasını uyararak ‘forbol’ esterleri verilebilir (18). Kansere; cerrahi, radyasyon, kemoterapi, hormon tedavisi, biyolojik terapi ve hedefe yönelik terapi ile tedavi edilir (16).

Peki kanser önlenir mi? Buna cevap olarak; büyük oranda önlenir denilebilir. Sigara ve ağır alkol kullanımından kaynaklanan tüm kanserler tamamen önlenir (17).

Dünya Kanseri Araştırma Fonu, ABD’de gerçekleşmesi beklenen yeni kanser vakalarının yaklaşık dörtte üçünün aşırı kilo veya obezite, fiziksel hareketsizlik ve yetersiz beslenme ile ilgili olacağını ve bu nedenle de önlenebileceğini tahmin ediyor. Ayrıca, insan papilloma virüsü (HPV), hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve helicobakter pilori (H. pylori) gibi etkenlerin neden olduğu kanser türlerinin birçoğu; davranış değişiklikleri, aşılar veya antibiyotiklerle önlenir.

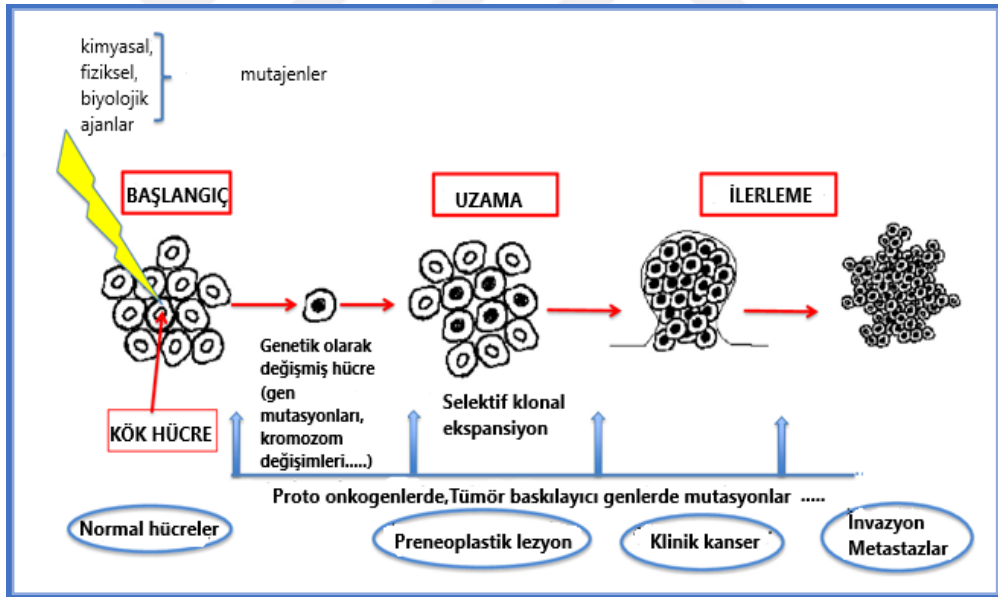
Her yıl teşhis edilen 2 milyondan fazla cilt kanserinin çoğu, cildi aşırı güneşe maruz kalmaktan koruyarak ve iç mekânda bronzlaşmayı önleyerek önlenir.

Risk faktörlerinden kaçınarak kanseri önlemeye ek olarak, prekanseröz büyümelerin saptanmasına ve cerrahi olarak çıkarılmasına izin veren düzenli tarama testleri ile serviks, kolon ve rektum kanserleri önlenir (18).

Genellikle daha az kapsamlı tedavi ve daha iyi sonuçlarla sonuçlanan kanser türlerinin erken tespiti, bu kanser türlerinin taranmasıyla da elde edilebilir. Taramanın meme, kolon, rektum ve serviks kanserleri için mortaliteyi azalttığı bilinmektedir. Memedeki veya derideki değişiklikler hakkında artan farkındalık, bu tümörlerin daha erken aşamalarda tespit edilmesini neden sağlayabilir (19). Bu önlenebilir kanserlerin yansira çeşitli genetik yatkınlık ve çevresel etmenlerle gelişen diğer kanser türleri karsinogenez aşamalarını geçirerek tümörler oluşturmaktadır.

Karsinogenez normal hücrelerin kanser hücrelere dönüşmesi süreci olarak tanımlanır. Karsinogenez esnasında hücreler, bir seri genetik mutasyon kazanırlar. Hücreler bu mutasyonla birlikte, bölünme ve hayatta kalma kabiliyetlerini artırır ve bu mutasyon kazanan hücreler malign tümörler oluşturmak üzere çoğalmaya devam ederler.

Daha az sayıda mutasyona sahip hücreler ise benign tümör oluşturmaktadır. Bir hücrenin tümör oluşturabilme kapasitesi zamanla kazandığı mutasyon sayısı ile doğru orantılı göstermektedir (19). [19]



Şekil 2.1. Karsinogenez Aşamaları (20)

Karsinogenez, genel olarak üç aşamaya ayrılır (Şekil 2.1.). Başlatıcı olan etken direkt DNA'yla etkileşime girer ve irreversibl mutasyona neden olur. Ayrıca genotoksiktir. Proliferasyonu uyaran bölge ise, DNA dizisini etkilemeyen fakat

fenotipinde farklılıklara neden olabilen, genellikle tersine çevrilebilir olan epigenetik değişikliklere yol açar (21).

## **2.2. Doğal Ürünler ve Kanseri Tedavisi**

Günümüzde artan kanser ölüm oranları ve tedavilerin yüksek maliyetleri, yeni tedavi yaklaşımlarına ve doğal kaynaklardan yeni kemopreventif ajanların keşfine olan ilgiyi artırmaktadır. Doğal bitkiler kanserin tedavisi için önemli kaynaklardır (22).

Bununla birlikte kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan anti kanser bir ilaç olan taxol tıbbi bitkilerden elde edilmektedir (23).

Örneğin, artık ilaçların yarısından çoğunun doğal kaynaklı olduğunu ve bunların yüzde elliden fazlasının kanser tedavisinde kullanıldığı görülebilir. Sentezlenen bileşiklere göre doğal bileşiklerin, daha fazla etkili ve çok az bir toksik etkiye sahip olmaları da doğal olarak ondan elde edilen ilaçların önemini göstermektedir (24, 25).

Bitkilerin içeriklerinde; fenoller, flavanoidler ve terpenoidler gibi pek çok doğal bileşik olduğunu görebiliriz. Bu doğal bitkisel ürünlerin anti bakteriyel, anti fungal, özellikleri, biyolojik aktivitelerdeki oynadıkları roller ayrıntılı olarak çalışılmıştır (25).

Doğal bileşiklerin tedavilerde kullanılması için detaylı in vitro ve in vivo araştırmaların yapılması gereklidir. Pek çok doğal bileşik, hücre sinyal yollarında moleküler mekanizmaları tetikleyerek etki göstermektedir.

Modern tıpta kanserin tedavisi amacıyla kullanılmakta olan birçok ilaç çok pahalı ve toksiktir. Bu sebepten ötürü, kanserin tedavisinde ve önlenmesinde yeni doğal kaynaklı ilaçların bulunmasına duyulan ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Bu doğal bileşiklerin güvenilirliklerinin sağlanması için daha fazla moleküler ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.



### 2.3. Kanserde Doğal Ürünlerin Hedefleri

Kansere karşı önleyici olduğu bilinen en yaygın aktif bileşenlere örnek olarak kurkumin, genistein, resveratrol, silmarin, lutein, izoflavonlar, saponinler, selenyum, vitaminler örnek olarak verilebilir (26). Doğal bileşiklerin kanser oluşturma sürecinde in vitro ve in vivo deneylerde açıklanmış temel moleküler hedeflerinden bazıları ise;

Nükleer Faktör kappa B: serbest radikaller, sitokinler, karsinojenler UV ve X ışınlarıyla aktive olmaktadır. Aktive olduktan sonra apoptozu baskıladığı ve proliferasyonu tetiklediği bilinen 200 'den fazla genin ifadesini indükler (26, 27). Kurkumin, emodin, likopen, anetol gibi bileşikler NF kappa B üzerinde güçlü engelleyici (inhibe edici) etkilere sahiptir ve doğal kemopreventif ajanlardır (27).

Aktivatör Protein -1: Büyümenin düzenlenmesi, inflamasyon ve immün cevap ile ilişkilidir. Siklin D -1 aktivasyonu hücre proliferasyonunu tetikleyerek ve P53, p21/cip1/waf1 ve p16 gibi tümör baskılayıcı genleri baskılar ve apoptozdan sorumlu genlerin düzenlenmesinde aktif rol oynar. Kurkumin, kapsaisin, kuercetin, anetol gibi çeşitli fitokimyasalların AP-1 aktivasyon sürecini baskıladığı çeşitli in vivo ve in vitro deneylerle kanıtlanmıştır (26-28).

Hücre döngüsü: Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK, cyclin dependent kinase) hücre döngüsünün önemli kontrol noktalarında görev yapan moleküllerdir [29]. Kurkumin, resveratrol, genistein, apigenin ve silibinin kanser hücrelerinde hücre döngüsünün durdurduğu gösterilmiştir. Siklin D1'in baş boyun, meme ve prostat kanserlerinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (26).

Kurkumin 'in siklin D-1 ifadesini baskılayarak hücre döngüsünü inhibe ettiği gösterilmiştir (29). Apoptoz ve hücre yenilenmesi arasında dengeyi sağlayan önemli bir mekanizmadır. Bcl-2, Bcl-XL, survivin gibi NF-KB sinyal yolağının hedef genlerinin ifadesi, apoptoz yolunu bloke ederek etki gösterir.

### 2.4 Flavanooidler

Flavonooidler, meyve ve sebzelerde bulunan çeşitli bitki besinleri (bitki kimyasalları) grubudur. Flavonooidler, 6000'den fazla türü ile en büyük bitki besin grubudur.

Polifenolik flavanooidler güçlü antioksidanlardır (30). Flavonooidler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavan-3-oller, antosiyanidinler ve izoflavonlar dahil olmak üzere alt sınıflara ayrılır.

Flavanoid ve polifenol bileşikleri kanser hücrelerinde antiproliferatif ve apoptozu uyarması şeklinde etkiler göstermektedir (31).

Flavonoid türevleri ile yapılacak ileri çalışmalar kanserin tedavisi ve önlenmesi için önem arz etmektedir.

#### 2.4.1. Enginar

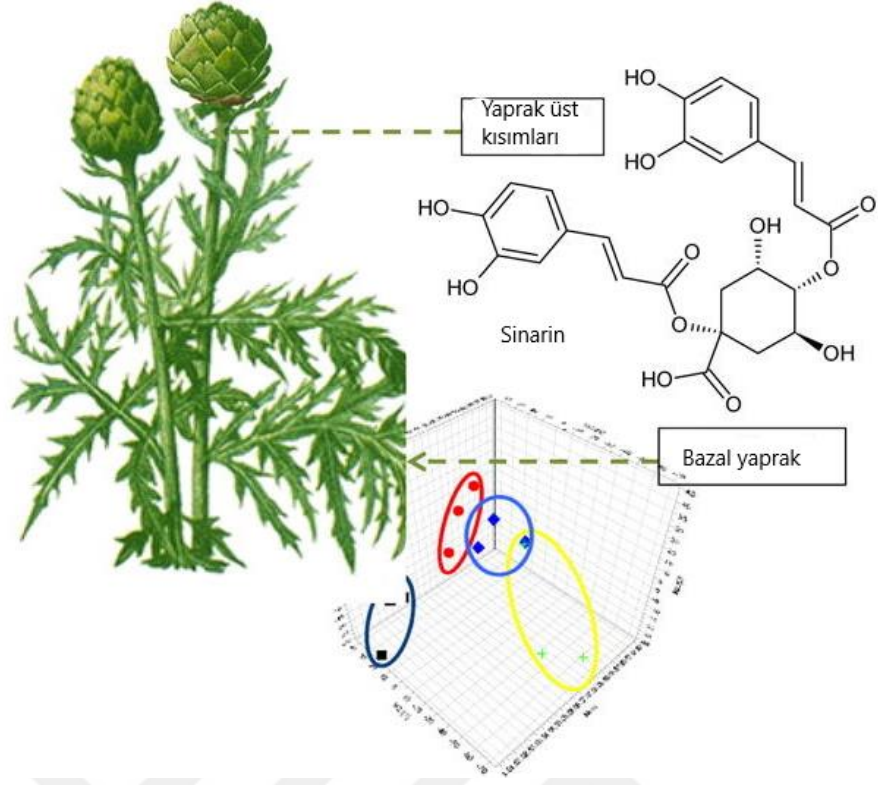
Genellikle enginar olarak bilinen *Cynara scolymus L.*, devedikeni benzeri çok yıllık bir bitkidir ve Asteraceae ailesinin bir üyesidir(32).Posası, vitaminleri, fenolik bileşikleri, sinarin ve mineralden zengin bir bitkidir(33).



Şekil 2.2. Enginar Bitkisi

Enginarlardan gelen hem yapraklar hem de üst kısım, farklı sınıflara ait fenolik bileşikler bakımından zengindir; benzoik ve sinnamik türevler, flavonoidler ve tanenler gibi. Bu fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteler gösterdiği ve farklı serbest radikal tiplerini inhibe ettiği durumlar vardır. Bu nedenle, serbest radikal kökenli farklı hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki rolleri nedeniyle koruyucu olarak kullanılabilirler (34).

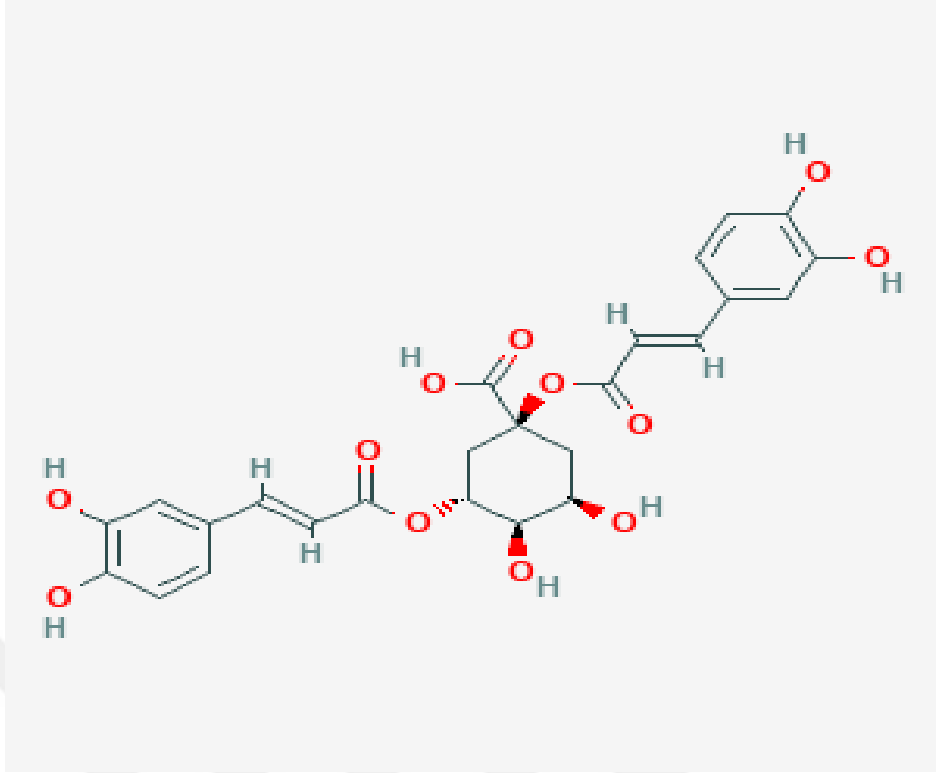
Enginar bitkisi eskiden beri alternatif tıpta kullanılmaktadır. Çalışmalarda dispeptik, antioksidatif, koloretik, kolesterol düşürücü ve antikarsinojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (35).



Şekil 2.3. Sinarin'in Kimyasal Yapısı (33)

#### 2.4.2. Sinarin

Enginarın baş ve yaprak kısımlarında bolca bulunan Sinarin, bir dikafeoilkinik asit türevidir. Enginarların en önemli biyolojik aktif maddesi olarak kabul edilmektedir.



**Şekil 2.4.** Sinarin'in Yapısı (36)

Sinarin, bir hidroksisünamik asit türevidir ve bazı bitki ve yiyeceklerden oluşan biyolojik olarak aktif fonksiyonel gruplara sahiptir. Sinarin'in antioksidan aktivitesi açıklanmıştır. Sinarin'in belirgin antioksidan, anti-kolinerjik, radikal temizleme ve metal bağlama aktivitelerine sahip olduğu açıkça gösterilmiştir (37).

Yapılan bir çalışmada Sinarin'in lösemi hücreleri üzerinde doğrudan sitotoksik etkisinin %20 oranında olduğu kanıtlanmıştır (11).

Yapılan bir çalışmada, *Echinacea purpurea*'nın kanserli olmayan hücreleri apoptozdan koruduğu bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ekinezya ekstraktları, doksorubisin ile muamele edilmiş olan hücrelere verilmiştir. Doksorubisin, hücrelerde apoptozise neden olan bir anti kanser ilacıdır, ancak kardiyotoksikite, kanda kalabilecek kümülatif dozu sınırlandırır.

Çalışmada doksorubisin ile muamele edilmiş olan hücrelerde *Chinacea Angustifolia* köklerinden elde edilen fraksiyonlar ve bileşiklerin hücreleri koruduğu tespit edilmiştir.

Servikal ve meme kanseri hücreleri, *Echinacea* örnekleri ve doksorubisin ile tedavi edilmiş ve 0.05 ve 0.5  $\mu\text{M}$  doksorubisin ile muamele edilmiş hücrelerde, sinarin'in HeLa hücre büyümesini sırasıyla %48 ve %29 arttırdığı gösterilmiştir ( $p < 0.01$ ).

0.05  $\mu\text{M}$  doksorubisin konsantrasyonunda, kikirik asitin hücre büyümesini %23 arttırdığı gösterilmiştir ( $p < 0.01$ ). MCF-7 hücreleri, *Echinacea* ve doksorubisin ile muamele edildiğinde, etil asetat fraksiyonunun hücre büyümesini %20-25 arttırmış olduğu ve kicorik asitin ise hücre büyümesini %10-15 arasında arttırdığı gösterilmiştir.

Sinarin'in, hela hücreleri üzerinde proliferatif aktivite göstermiş olduğu, ancak doksorubisin ile muamele edilmiş MCF-7 hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlar fenolik bileşiklerin proliferatif aktiviteden sorumlu olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar, kikirik asit ve sinarin'in, 0.5  $\mu\text{M}$  doksorubisin ile işlenmiş hücelere etki ettiğini göstermektedir[38]. Bir başka çalışmada ise; 400  $\mu\text{M}$ ' kadar sinarin ile muamele edilen HeLa hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmemiştir (15).

## 2.5. Apoptozis ve Oksidatif Stres

Apoptoz, hücrelerin belirli görevlerini yerine getirdikten sonra güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlayan, genetik regülasyona sahip programlanmış bir hücre ölüm şeklidir.

Organizmanın gelişiminde rol oynayan hayati bir işlemdir. Apoptoz terimi yunanca asıllı "ayrılma" anlamına gelen "apo" ve "düşme" anlamına gelen "ptoz" kelimelerinin birleşiminden oluşur. Bu terim ilk olarak Hipokrat tarafından "parçaların kemik üstünden düşmesi" anlamıyla kullanılmıştır(39). Daha sonraları, apoptozis terimi 1972 yılında nekrozdan farklı bir şekilde gerçekleşen hücre ölümünü ifade etmek için ilk olarak J.F.K.Kerr tarafından kullanılmıştır (40).Programlı hücre ölümü olan apoptozis normal embriyonik gelişim,doku homeostazisinde önemli rolleri bulunan bir süreçtir (39).

Apoptoz başlangıçta hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma gibi morfolojik özellikleri ile tanımlanmıştır. Apoptozun gene yönelik bir program olduğunun farkına varılması, gelişimsel biyoloji ve doku homeostazı hakkındaki anlayış üzerinde derin etkiler oluşturmuştur, çünkü hücre sayılarının, hücre yaşamını etkileyen faktörlerin yanı sıra proliferasyon ve farklılaşmayı kontrol eden faktörler tarafından düzenlenebileceğini göstermektedir (41).

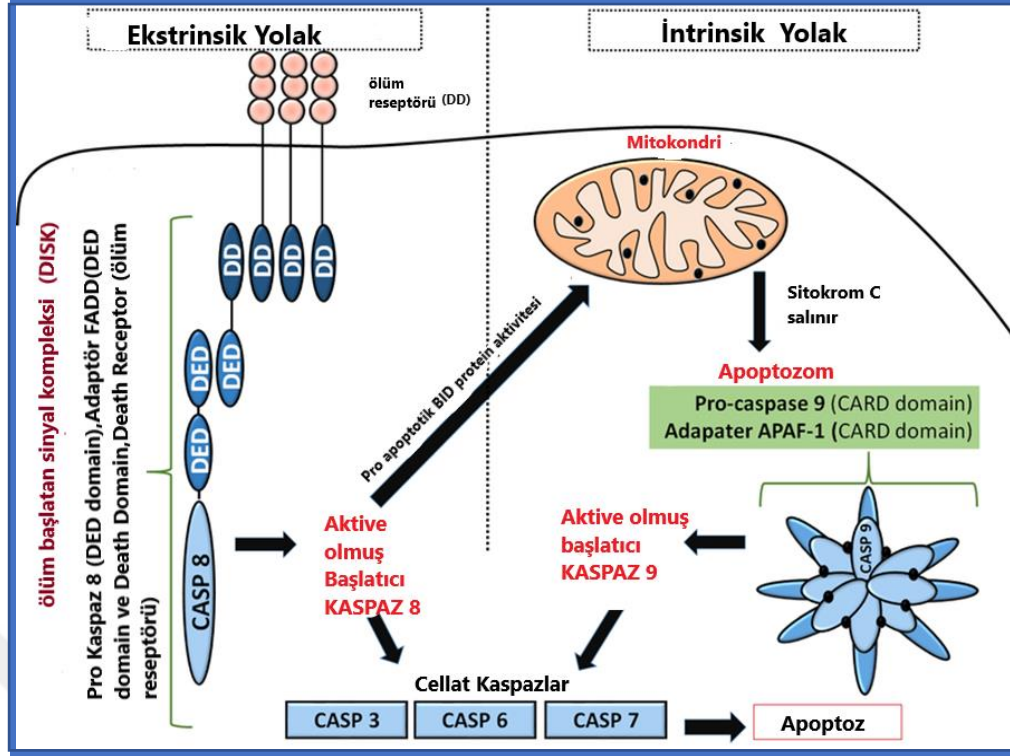
Apoptozdaki önemli oyuncu moleküllere bakıldığında, apoptotik süreci tetiklemek ve etkilemekle ilgili dört ana fonksiyonel molekül grubunun olduğunu görürüz. Bunlar, başlatıcı kaspazların aktivasyonunu kontrol eden adaptör proteinler, tümör nekroz faktörü (TNF), reseptörü (TNF-R) süper ailesinin üyeleri, ve bcl-2 protein ailesinin üyeleridir (42).

Apoptozun gerçekleşebilmesi için ilk olarak kaspaz adı verilen bir grup sistein proteazı gereklidir. Kaspaz aracılı apoptoz için ölüm sinyallerinin gönderilmesi için içsel ve dışsal yollar olmak üzere belirgin olarak iki farklı yol vardır. dışsal yolak hücre yüzeyiyle, içsel yolak mitokondriyal olaylarla ilişkilendirilmiştir (42).

İçsel yol esas olarak iç uyaranlara yanıt olarak apoptozu tetikler: biyokimyasal stres DNA hasarı (bu hücre döngüsünü durduran ve DNA onarımını başlatan p53 genini aktive eder. Bu onarım denemesi başarısız olursa apoptoz indüklenebilir).

İçsel yol, Bcl-2 ve Bax olmak üzere iki grup molekül tarafından modüle edilir. Bax'ın aktivasyonu, Bax-Bax dimerlerinin oluşumuna yol açar, bu da çeşitli apoptotik uyaranların etkisini artırır ve bir hücrenin apoptoza duyarlılığını artırır. Bcl-2 ailesi hem pro- hem de anti-apoptotik üyelerden oluşur ve bir hücrenin apoptoza ne kadar duyarlı olabileceğini belirleyen bunlar arasındaki dengedir (43).

Bu molekül grupları arasındaki denge, bir hücrenin iç uyaranlara yanıt olarak hayatta kalacağını veya apoptoza girip girmeyeceğini belirleyen bir 'moleküler anahtar' oluşturur.



Şekil 2.5. Apoptoz Yolakları (44)

Dışsal yol, dış uyaranlara yanıt olarak apoptozu, yani hücre yüzeyinde 'ölüm' reseptörlerinde ligand bağlanması ile tetikler.

Bu reseptörler tipik olarak TNFR1 veya FAS gibi Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bu reseptörlere bağlanma, aşağı akış kaspaz aktivasyonunu başlatmak için hücre yüzeyinde gruplanan reseptör moleküllerine yol açar (45).

Şekil 2.5'te görüldüğü üzere her iki yoldan da apoptozun başlatılması, kaspazların kaskad bir aktivasyonu ile sonuçlanır. Bunlar normal olarak hücre içinde aktif olmayan öncüler olarak bulunan özel proteazlardır.

Apoptozun başlatılması ilk olarak, rolü diğer pro-kaspazları aktif "yürütücü" kaspazlara ayırmak olan kaspaz 8 gibi başlatıcı kaspazları aktive eder. Bu uygulayıcı kaspazlar daha sonra hücre iskeleti ve çekirdek gibi çeşitli hücre yapısının bozulmasına neden olur.

Örneğin, kaspaz 3 DNAaz'ı aktive eder. DNA'nın parçalanmasına yol açar. Bu süreçler, hücre içinde nükleer büzülme (piknoz) ve parçalanma (karyorrheksis) gibi çeşitli morfolojik değişikliklere yol açar. Bununla birlikte, hücrenin kendisi küçülür, ancak daha

da önemlisi, sağlam bir plazma membranını korur. Ölü hücreler hemen komşu hücreler tarafından fagositozlanır veya apoptotik cisimler olarak bilinen daha sonra fagositoz olan daha küçük, membrana bağlı veziküllere ayrılır.

### **2.5.1. Apoptoz ve Kanser Tedavisi**

Çok hücreli canlılarda homeostazi hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki denge ile sağlanır. Bu dengeyi düzenleyen pek çok mekanizma apoptoz ile ilişkili olduğundan dolayı çok önemlidir. Günümüzde çoğu anti-kanser ilacı kanser hücrelerini hedef alarak öldürmek üzere tasarlanmışlardır. Anti-kanser ajanların çoğunun apoptozu indüklediği aşıkardır (46).

Son deneysel kanıtlar, apoptozun, radyoterapi ve kemoterapi dahil olmak üzere çeşitli kanser tedavisi formlarına tümör büyümesinin ve tümör yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Apoptoz, sitotoksik tedavilerden sonra saatler içinde hızla gelişir ve doza bağımlıdır. Tümörler sitotoksik ajanlara apoptotik yanıtlarında farklılık gösterir, karsinomlar sarkomlardan daha duyarlıdır. Apoptozu düzenlemek, tümör tedavisini iyileştirmek için etkili bir yol olabilir; terapötik kazanç, tümörlerin apoptotik yanıtının artırılmasıyla veya normal dokuların apoptotik yanıtının inhibe edilmesiyle elde edilecektir (47).

Bu bilgiler ışığında, apoptotik sinyal yollarının aktif hale getirilmesiyle hedef hücrede etkisini gösterebilen yeni kanser tedavileri güçlü bir hedef olarak görünmektedir.

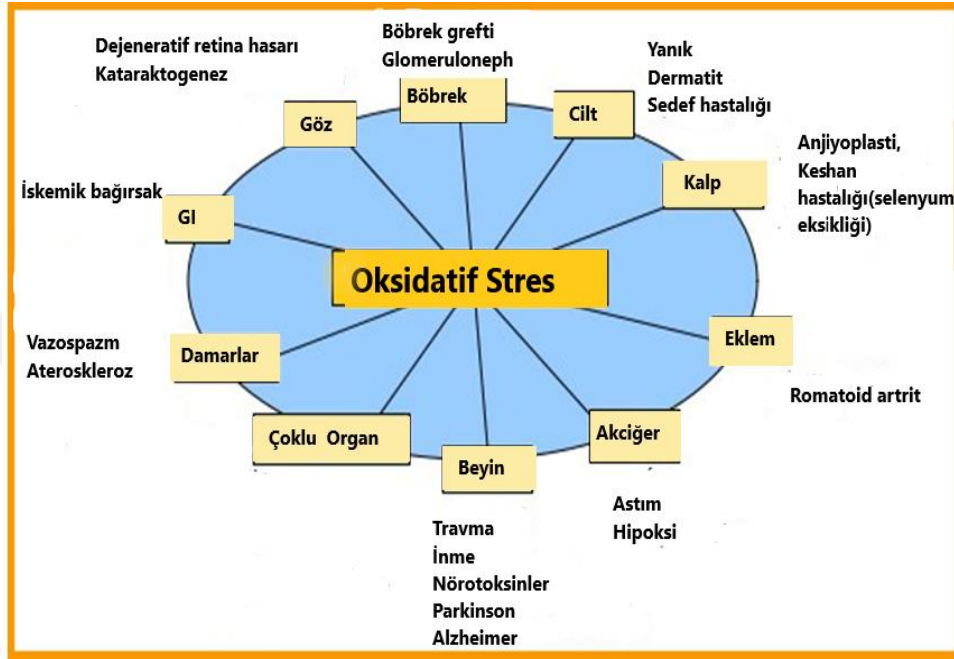
### **2.5.2. Oksidatif stres**

Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki bir dengesizlik durumudur. Oksidatif denge sabit olduğu sürece canlı organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir (48).

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortalanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok elektron transferi sonucu meydana gelirler (49). Vücutta serbest radikal tepkimeleri bağışıklık sistemindeki nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için bir ihtiyaçtır, ancak serbest radikallerin gereğinden fazla üretilmesi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (50).



Oksidatif stres pek çok hastalığın oluşmasına moleküler anlamda temel oluşturmaktadır.Şekil2.6.'da da gösterildiği üzere oksidatif stresin sebep olduğu hastalıklar arasında; başta kanser olmak üzere ; diyabet, miyokardiyal enfarktüs, hipertansiyon, yaşlanma, alzheimer, parkinson, huntington sendromu, otoimmün bozukluklar yer almaktadır (51).



Şekil 2.6. Oksidatif Stresin Neden Olduğu Çeşitli Hastalıklar (52)

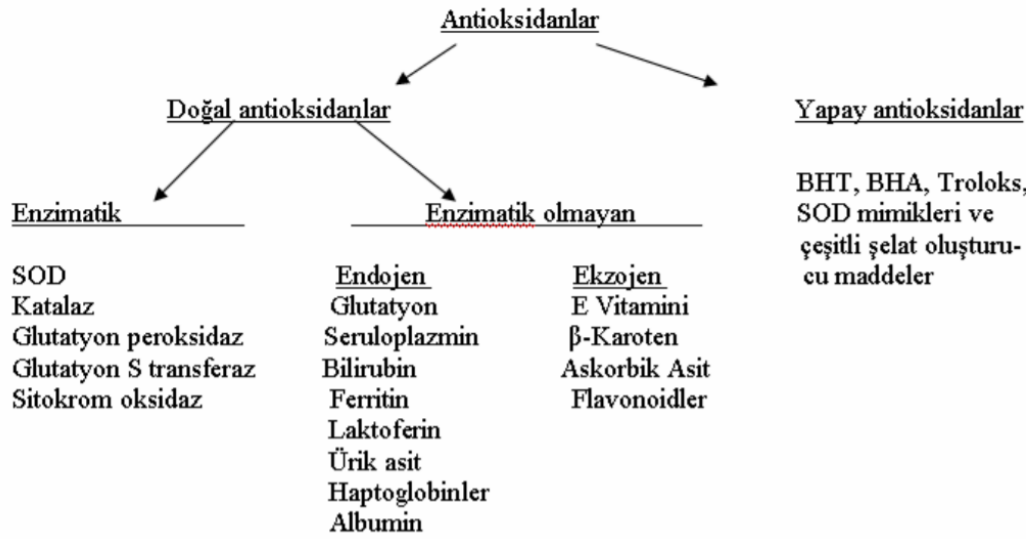
İnsan vücudu oksidanların etkisini dengelemeye yarayan çeşitli antioksidanlarla donatılmıştır. Tüm pratik amaçlar için bunlar; enzimatikler, enzimatik olmayanlar ve yapay antioksidanlar olarak üç kategoriye ayrılabilir.

Oksidatif strese karşı tedavi için hali hazırda kullanılan pek çok antioksidan bulunmaktadır. Bu antioksidanlar sayesinde serbest radikal hasarlarıyla savaşılmaktadır (53).

### 2.5.3. Antioksidanlar

Oksijen radikallerinin hücre ve dokularda sebep olacakları zararlı etkilere karşı, organizmada kendilerini radikallere karşı korurlar. ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma sistemleri vardır ve bunlar antioksidan sistemlerdir.

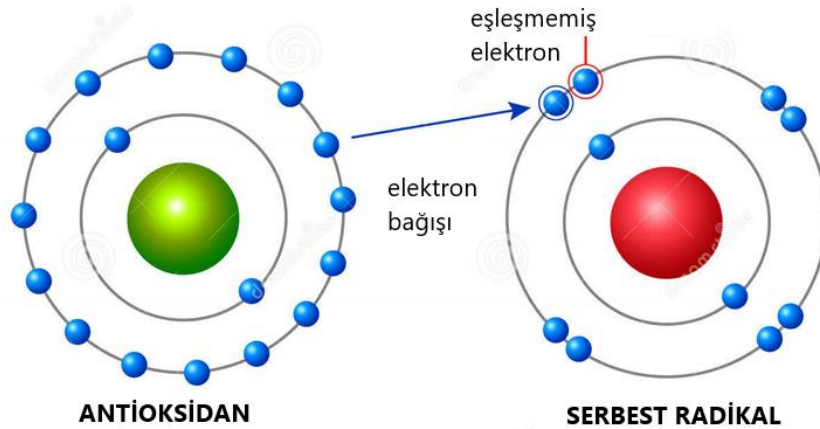
Enzimatik olanlar, enzimatik olmayanlar ve yapay antioksidanlar olarak üç kategoriye ayrılabilirler (Şekil 2.7.) (54).



Şekil 2.7. Antioksidanların Sınıflandırılması (54)

Antioksidan molekülleri diğer moleküllerin neden olduğu hasarı hücre içinde ve dışında etkisiz hale getirir, serbest radikallerin yapısını bozar ve inaktive ederler.

### Antioksidanlar Serbest Radikalleri Nasıl Azaltır?



Kimyasal olarak reaktif eşleşmemiş + elektron bağışı: kararlı elektron çifti oluşur, serbest radikal nötröle edilir.

Şekil 2.8. Antioksidanlar Serbest Radikallerin Etkilerini İnaktive Ederler. (55)

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında vitaminler (C ve E vitaminleri), P-karoten, ürik asit ve GSH gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler bulunur. Bunlardan C vitamini; Suda çözünür özelliğe sahiptir ve öncelikle oksijensiz radikalleri atarak hücre içi ve hücre dışı sulu faz antioksidan kapasite sağlar. E vitamini serbest radikallerini E vitaminine dönüştürür.

Bir diğer enzimatik olmayan antioksidan olan E vitamini ise; lipitte çözünür ve hücre zarının hidrofobik iç bölgesinde yoğunlaşır ve oksidan kaynaklı membran hasarına karşı temel savunma mekanizmasıdır. E vitamini, lipit peroksidasyonu esnasında üretilmiş olan peroksil radikaline elektron gönderir. A-tokoferol, E vitamininin en aktif formudur ve hücredeki membrana bağlı ana antioksidandır. E vitamini kanser hücrelerinin apoptozunu tetikler ve serbest radikal oluşumlarını inhibe eder (53).

## **2.6. Meme Kanseri ve Etiyolojisi**

Meme kanseri, çeşitli uzmanlık alanlarındaki hekimler için büyük ilgi ve önem taşıyan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Meme kanseri, dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür. Kadınlarda ise birinci sırada görülen kanser türüdür. 2012 yılında 1,67 milyon kadına meme kanseri tanısı koyulmuştur ve bu sayı bütün kadın kanserlerinin %25'ini oluşturmaktadır (56).

Meme kanseri gelişme olasılığını artırabilecek cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıksız yaşam tarzı gibi birçok risk faktörü vardır. Meme kanseri kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülür. Ayrıca meme kanseri ile ilgili olarak birçok gen tanımlanmıştır. Hem onkogenlerin hem de anti-onkogenlerin mutasyonları ve anormal amplifikasyonu, tümör başlatma ve ilerleme süreçlerinde anahtar rol oynar (57).



**Şekil 2.9.** Meme Kanserinde Risk Faktörleri (57)

Meme kanserinin erken teşhisi, bu hastalığı önlemek için en iyi yaklaşımlardan biridir. Tarama, kemoprevensiyon ve biyolojik korunmayı içeren mevcut önleme yöntemleri geçmişte olduğundan daha doğrudan ve etkilidir. Meme kanserinin mortalitesi azalmıştır. Bununla birlikte, meme kanseri hala 20-59 yaş arası kadınlar için kanser ölümünün önde gelen nedenidir.

Meme kanseri önlenebilir. Risk faktörlerini azaltmak ve kemoprevent almak meme kanserini önlemek için gereken iki temel önlemdir. Dizileme teknolojisindeki ilerlemelerle, bireysel genom dizilenmesi, meme kanseri riskini öngörmek için güçlü bir yöntem olabilir.

Gelecekte daha az yan etki ve daha iyi bir risk-fayda oranı olan daha iyi ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir (57).

### **2.6.1. Meme Kanseri Sınıflaması**

Meme kanserleri dört şemaya göre sınıflandırılabilir. Bu şemaların her biri kanserleri farklı kriterlere göre sınıflandırır ve farklı bir amaca hizmet eder. Bunlardan bazıları şunlardır:

- a. **Patolojiye dayalı sınıflandırma:** kanser hücresel yapısına ve mikro anatomisine göre sınıflandırılır. Bu, meme kanserinin sınıflandırılması veya yazılması için en yaygın olanıdır.
- b. **Derecesine göre sınıflandırılması:** patolog kanseri dereceye göre sınıflandırır. Örneğin "iyi ayırt edilmiş" tümör düşük dereceli ve normal dokuya benziyor. "Kötü farklılaşmış" tümör dağınık hücrelerden oluşur ve bu nedenle normal dokuya benzemez ve yüksek dereceli olarak adlandırılmıştır. Bazıları "orta derecede farklılaşmış" veya orta sınıftır.
- c. **Evreye göre sınıflandırılması:** kanserin evresini ve TNM evrelemesi için en sık kullanılan sınıflandırmadır. Kanserın tümör boyutunu, lenf node tutulumunu ve metastazını dikkate alır.
- d. **Protein ve Gen durumuna göre sınıflandırılması:** bugünlerde tüm meme kanserleri östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2/neu proteinlerinin ekspresyözü veya tespit edilebilir etkisi için test edilir. Bu testler immünohistokimya ilkelerinden yararlanır ve bu proteinlerin durumu bilindikten sonra prognoz tahmin edilebilir ve tedavi için belirli yeni tedaviler seçilebilir[58, 59]. Meme kanserinin sınıflandırılması, tümörün morfolojisi, tümörün derecesi göz önüne alınarak ve tümörün östrojen reseptörlerini içermesine bağlı olarak sınıflandırabilmektedir. Meme kanseri genellikle histolojik görünümüne göre sınıflandırılır. Histolojik tiplerden bazıları şunlardır: (60)

**Düktal Karsinom in situ (DCIS):** yayılmamış çok erken bir kanser türüne işaret eder. DCIS, düktal sistemin içinde bulunan ve yakındaki dokuya saldırmamış bir tür erken meme kanseridir. Yaygın invaziv olmayan kanser türlerinden biridir.

**Sızan veya invaziv düktal karsinom (IDC):** bu meme kanserinin en yaygın türüdür. Süt kanallarında başlar ve çevre dokulara yayılır. Aynı zamanda lenf kanalları ve kan akışı yoluyla vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir.

**Lobular Karsinom in situ (LCIS):** invaziv olmayan tümörün daha nadir görülen bir şeklidir. Genellikle invaziv kansere dönüşmez. LCIS daha çok meme kanserinin gelişebileceğinin bir "belirteci" veya sinyalidir. LCIS son zamanlarda lobuler neoplazi olarak yeniden adlandırılmıştır.

**Lobular Karsinom 'a (ILC) Sızma:** invaziv düktal karsinomdan sonra en sık görülen ikinci meme kanseri türüdür. Kanser loblarda veya loblarda başlar ve vücudun diğer bölgelerine yayılır. Memenin üst-dış kısmında bir kalınlaşmanın ilk görünümü vardır.

Bunlar genellikle östrojen ve progesteron reseptörleri için pozitifdir ve bu nedenle hormon tedavisi ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir.

**Tübüler karsinom:** kanser hücreleri küçük tübüller gibi görünür. Bu tip meme kanseri tipik olarak 50 yaş ve üzeri kadınlarda görülür. Bu tümör tedaviye iyi yanıt verir.

**Musinöz karsinom veya kolloid:** lenf düğümlerine nadiren yayılan nadir invaziv meme kanseri türüdür. Kanser hücreleri mukus üretir ve bu hücreler mikroskop altında normal hücrelerden farklıdır. Mukoza ve kanser hücreleri birleşerek jöle benzeri tümörler oluşturur. (59)

Ayrıca meme kanserinin ilerlemesinde ve oluşmasında görev hücrelerin reseptörleri (Progesteron reseptörü veya HER2;human epidermal reseptör-2), ve molekül alt türlerine göre değişik sınıflandırmalar (luminal A, luminal B, basal-like,Her2 pozitif gibi) da olabilmektedir (61).

Meme kanser türlerinin fazlalığı, tedavi seçeneklerinin artması ile doğru orantılı olarak azalma imkanına sahip olabilecektir. Her bir farklı tür meme kanseri farklı ilaçlara farklı yanıtlar verebilir. Bu sebeple farklı ilaçların araştırılıp tasarlanması önem arz etmektedir. Bu kapsamda, doğal bileşiklerden yararlanmak gerekebilir.

## **2.7.Hipotez**

Bir polifenol olan ve enginar bitkisinde de yüksek oranda bulunan sinarin'in oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğu bilinmektedir. Sinarin'in proliferasyon, hücre canlılığı üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu hipotez edilmiştir. Antiproliferatif özelliğinin tespiti ve apoptoz sürecindeki etkileşiminin in vitro ortamda meme kanseri hücrelerinde araştırılması ve açıklanması hedeflenmektedir. Ayrıca bu çalışmanın hayvan testlerini içerecek şekilde birinci basamak çalışma olması planlanmaktadır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Cihazlar

Azot Tankı	Taylor-Wharton
Buz Cihazı	Scotsman AF 80
Hassas Terazı	Ohaus
Isı Bloęu	Benchmark
İnkübatör	Euro Elone
Kemolüminesans	ChemiDoc-It <sup>2</sup>
Laminar Kabin	Cell line
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Mikroskop	Olympos
PH Metre	Mettler Toledo
Santrifüj	Nüve
Santrifüj	Hermle
Shaker (Çalkalayıcı)	Benchmark Scientific
Spektrofotometre	Biotek
Su Arıtma Cihazı	Direct-Q 3UV
Su Banyosu	Benchmark
Western Blot Tankı	Bio-Rad
Vorteks	Heidolph

### 3.1.2. Sarflar

5 ml'lik Pipetler
10 ml'lik Pipetler
15 ml'lik Santrifüj Tüpü
50 ml'lik Santrifüj Tüpü
1.5 ml Mikro Santrifüj Tüpü
6 Kuyucuklu Plate
96 Kuyucuklu Plate
Neubauer Lamı
Hücre Dondurma Tüpü
PVDF Transfer Membranı, 0.45 mikron 30 x 30 cm
Western Blot Filtre Kâğıdı 20 cm x 20 cm
Nitrosellüloz Transfer Membranı, 0.45 mikron, 30 cmx30cm
Mini Trans-Blot Filtre Kâğıdı
75 cm <sup>2</sup> 'lik ve 25 cm <sup>2</sup> 'lik Hücre Kültür Kapları

### 3.1.3. Kimyasallar ve Reaktifler

Akrilamid	Acros Organics
Amonyum Persülfat %98	Acros Organics
Bovin Serum Albümin	Sigma
Dimetil Sülfoksit	Fisher Scientific
DMEM F12 1:1 mix	Lonza
Etanol	Sigma-Aldrich



Fetal Bovin Serum	Sigma
Glisin	Carlo Erba
L-glutamin	Lonza
Luminol	Sigma
MEBM	Lonza
2-Merkaptoetanol, %99ekstra saf	Acros Organics
Metanol	Sigma-Aldrich
N, N-Metilenbisakrilamid	Sigma,
Penisilin-Streptomisin	PAN Biotech
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)	Zymed
Prism Ultra Protein Ladder	Abcam,
2-Propanol, minimum %99	Sigma
Propidyum iyodit	Sigma
Protogel (%30 Acr., %0.8 Bis)	National Diagnostics
Resolving Buffer	National Diagnostics
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich
Sodyum klorit	Carlo Erba, Cat No: 368257

Sodyum dodesil sülfat	Fisher Scientific, Cat No: BP166-500
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Cat No: 6203
Sodyum florit, %99	Acros Organics, Cat No: 201295000
Sodyum ortovanadat, %99	Acros Organics, Cat No: 205330500
Stacking Buffer	National Diagnostics, Cat No: EC-893
Stripping Buffer	Thermo
Tetrametiletilendiamin %99	Acros Organics, Cat No: 138455000
Tripsin-EDTA	PAN Biotech
Tris Base	Sigma
Tween 20	Sigma-Aldrich, Cat No: P1379
Sinarin 5mg	Sigma Aldrich

### 3.1.4. Kitler

CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I
Protein assay kit

### 3.1.5. Antikorlar

$\beta$ -aktin	NeoMarkers, Cat No: RB-9421-P
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-2313
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-2004
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-2005
Bcl-2 antibody	Cell Signaling
Rabbit anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz, Cat No: sc-358920
Parp-1 antibody	Cell Signalling #9542

### 3.1.6. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Meme kanseri üzerine yapılmış olan çalışmalarda kullanılan pek çok hücre hattı vardır. Bu hücre hatlarının özellikleri birbirlerinden farklılık göstermektedir (tablo 3.1.). Örneğin; MCF-7 hücre hattı ER+PR+ hücre hatları olarak bilinirken, MDA-MB-231, hücre hatları ER- PR - hücre hattı olarak bilinmektedir (60).

**Tablo3.1.** Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Hücrelerin Özellikleri

<p><b><u>Hücre: MCF10A</u></b> Doku: Meme Hücre Tipi: Epitel Hastalık: Normal (Fibrokistik) Organizma: Homo sapiens Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)</p>
<p><b><u>Hücre: MDA-MB-231</u></b> Doku: Meme Hücre Tipi: Epitel Hastalık: Adenokarsinom Organizma: Homo sapiens Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan) (ER-, PR-, Her2-)</p>
<p><b><u>Hücre: MCF7</u></b> Doku: Meme Hücre Tipi: Epitel Hastalık: Adenokarsinom Organizma: Homo sapiens Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan) (ER+, PR+, Her2+)</p>

**Tablo 3.2.** Besiyeri İçerikleri

<p><b><u>DMEM: F12 Besiyeri</u></b></p> <p>% 10 FBS</p> <p>100 µg/ml penisilin streptomisin</p> <p>2 mM L-glutamin</p>
<p><b><u>MEBM Besiyeri</u></b></p> <p>%5 At serumu</p> <p>0.5 ml Hidrokortizon</p> <p>%5'lik 200µl Koler toksini</p> <p>0.5 ml İnsülin</p> <p>0.5 ml EGF</p> <p>0.5 ml GA-1000</p> <p>2 ml BPE</p>

Hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabinde yapılmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren, nemlendirilmiş inkübatörde DMEM ve MEBM besiyerleri ile kültüre edilmiştir.

## **3.2. Metotlar**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

%10 Fetal Sığır Serumı (FBS), 5 ml Penisilin/streptomisin ve 2ml L-Glutamin içeren DMEM F-12-1:1 büyüme medyumı ile 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilen MDA-MB 231 ve MCF7 hücreleri 2 gün sonra yüzde 75 oranında çoğalınca 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska ekimi yapılmıştır. Hücrelerin haftada 2 kez %0.05 konsantrasyonda tripsin ile kültür kabından kaldırılarak pasajlanması yapılmıştır. Hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabin içinde gerçekleştirilmiş ve hücreler %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C de kültüre edilmiştir.

MCF10A hücreleri ise, MEBM kiti (2ml BPE, 0.5ml EGF, 0.5ml İnsülin, 0.5ml hidrokortizon, 0.5ml GA-1000), %5'lik 200µl kolera toksini, 5ml Pen/Strep ve %10 at serumu içeren MEBM büyüme medyumı ile 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilip yüzde 75 oranında çoğalınca 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska alınıp ekimi yapılmıştır.

### **3.2.2. Hücrelerin Çözülmesi**

DMEM F-12-1:1 ve MEBM besi yerleri 37°C ye su banyosuna koyulmuştur. Her bir hücre hattı için 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar hazırlanmıştır.

Dondurma tüpünde bulunan hücreler azot tankından çıkarılarak çözülmüştür. Çözünen hücreler pipet ile birkaç kez süspanse edilerek 15ml'lik tüplere alınmıştır. Hücreler üzerine 5ml besiyeri eklenmiştir ve 1300 rpm'de 5 dk. santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır ve altta kalan peletin üzerine 4 ml besi yeri eklenmiştir ve 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmıştır ve hacim 6 ml'ye tamamlanmıştır.

### **3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması**

Hücrelerin kültür ortamları atılmıştır. Flasklara 3-4 ml tripsin ilave edilmiştir. Tripsin eklenen kültür kapları 5-6 dakika %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C deki inkübatörde bekletilmiştir. Faz kontrast mikroskop ile üzerinde çalıştığımız hücrelerin morfolojilerine bakılmıştır. Daha sonra tripsinin etkisini inhibe etmek için 5-6'şar ml besi yeri eklenmiştir. Hücreler steril 15 ml'lik falkon tüplere alınmış ve 1300 rpm de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernetant atılmış ve elde edilen pellet miktarına göre hücreler DMEM F-12-1:1 ve MEBM besi yerleri ile süspanse edilmiştir ve 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmıştır. Hücrelerin durumu faz kontrast ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C deki inkübatöre kaldırılmıştır.

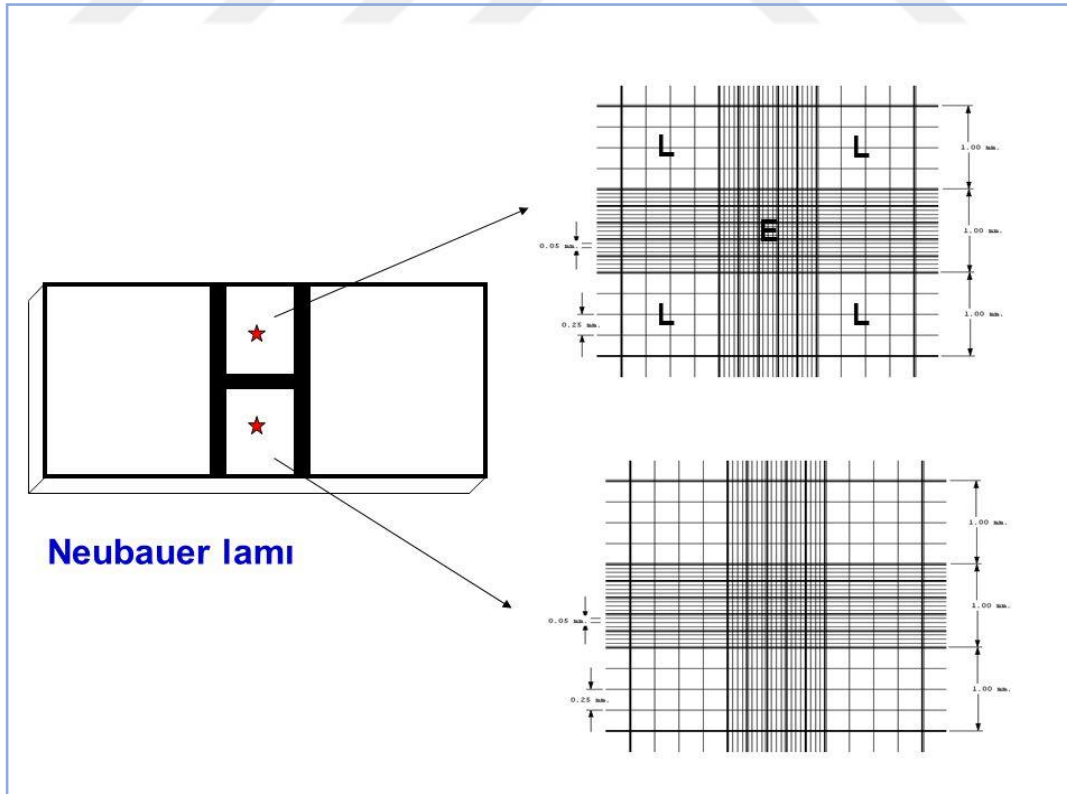
### 3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

T25 kültür kabının yüzeyini %80 kaplayan hücreler laminar akımlı kabin altında PBS ile yıkanmış ve daha sonra tripsin ile kaldırılıp 15 ml'lik falkon içerisine alınmıştır ve 1500 rpm'de, 5 dk. santrifüj edilmiştir.

Üst kısım atıldıktan sonra pelet üzerine 1:10 oranında DMSO: besiyeri hazırlanmış her bir dondurma tüpüne 2 ml eklenmiştir. Dondurma tüpleri içerisine alınan hücreler -80°C' de bir gece muhafaza edildikten sonra azot tankında -196 °C' de saklanmıştır.

### 3.2.5. Hücrelerin Sayılması

Yapılan testler için belirli sayıda hücrelerin bulunmasını sağlamak için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için neubauer lamı kullanılmıştır. Hemositometre veya neubauer bölmesi neubauer bölmesinin sayım ızgarası 3 mm x 3 mm boyutundadır. Izgaranın 1 mm genişliğinde 9 kare alt bölümü vardır (Bkz. Şekil 3.1.). Bu işaretli dört bölmenin ortalaması alınarak hesaplama yapılmış ve hücreler ekilmiştir.



Şekil 3.1. Neubauer Lam

### 3.2.6. Hücre Lizatı Elde Edilmesi

Kültürü yapılan hücreler, pasajlanma basamağında anlatıldığı gibi kaldırılmıştır. Hücreler 15 ml'lik tüplere alınmış ve ardından 1700 rpm de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet üzerine 1 ml PBS ilave edilerek hücreler ependolf tüplere alınmıştır.

Ependolf tüpler 5000 rpm de 3 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet üzerine hücre sayısına bağlı olarak (2 milyon hücre için 160µl lizis tampon) lizis solüsyonu (2mL Lizis solüsyonuna 2µL NaF ve 2 µL Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> gelecek şekilde) ilave edilmiştir. Karışım 15 saniye vorteks yapıldıktan sonra ve buz üzerinde 10 dakika bekletilip, bu yapılan işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Ardından süspansiyon 13000 rpm' de 10 dakika +4 °C de santrifüjlenip, süpernatant yeni bir ependolf'e alınmıştır.

### 3.2.7. Protein Miktarının Ölçülmesi

Elde edilen hücrelerdeki total proteininin belirlenmesi için Protein Assay kit (Biorad) alınarak Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford yöntemi için 3 solüsyonun karışımı kullanılmıştır.

Protein Assay Reagent A

Protein Assay Reagent B

Protein Assay Reagent S

BSA (Bovine Serum Albumin) Standardı oluşturulmuştur. Bunun için 1 ml distile suda 10 mg BSA, çözülerek stok solüsyon oluşturulmuştur. Bu stoktan seri dilüsyon ile 0.25, 0.5, 1 ve 2µg/ul'lik 5 adet standart hazırlanmıştır.

Standartlardan 5'er ul ilk 5 kuyucuğa eklenmiştir. Daha sonra reagent S ve Reagent A 'dan sırasıyla 20 ve 1000 ul oranında örnek sayısına göre karışım oluşturulup her bir kuyucuğa standart dışındaki 25 'er ul eklenmiştir. Sonrasında reagent B solüsyonundan 200 ul tüm kuyucuklara eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 96 kuyulu plate'e yüklenip 750nm'de plate okuyucuda ölçüm yapılmıştır.



### 3.2.8. Western Blot Analizi

#### %6'lık Stacking Jel için ;

- 2.6ml dH<sub>2</sub>O
- 1ml %30 ACA/bisACA
- 1.25ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8
- 50µl %10 SDS
- 50 µl %10 APS
- 5 µl TEMED kullanıldı.

#### %12'lik Resolving jel için;

- 2.6ml dH<sub>2</sub>O
- 3.2ml %30 ACA/bisACA
- 2ml 1.5M Tris-HCl pH 8.8
- 80µl %10 SDS
- 80µl %10 APS

Her hücre hattı lysis edildikten sonra 40µg total protein içeren örnekler %8-12'lik jellere sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile 90V'da yürütülerek PVDF membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi sonrasında membran, Tween 20 içeren TBS(Tris-Buffer-Salin) (TBS/T) ile hazırlanan %5'lik süt tozu solüsyonunda 1 saat blotlanmış ve 3 kez TBS/T ile 10'ar dakika aralarla yıkanmış ve %2.5'lük süt tozunda 1:1000 oranında seyreltilen bcl-2 ve Parp 1 antikoruna bir gece +4°C de inkübe edilmiştir. Ardından 3 kez TBS/Tween 20 ile 10'ar dakika yıkanmış ve TBS/Tween20 de hazırlanan %2.5'lük süt tozu solüsyonunda sekonder antikoruna oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir.

Membran yapılan yıkamaların sonrasında 1:1 oranında karıştırılan luminol ve peroksit ile muamele edilerek şeffaf bir petri kabı içerisinde UVP ChemiDoc-It<sup>2</sup> kemoluminesans ile görüntülenmiştir. Yükleme kontrolü olarak β-aktin antikoruna kullanıldı ve sekonder antikor muamelesinden sonra TBS-Tween ile yıkamalar yapılarak görüntülenmiştir. Bant yoğunlukları ImageJ kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.2.9. Annexin V Boyaması ile Apoptozun Belirlenmesi

Hücreler Tripsin ile kaldırılmış ve 1500 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra Hücreler 500 ul soğuk PBS ile resüspanse edilmiştir ve 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Her bir hücre için 400 ul 1X binding hazırlanmış ve buza koyulmuştur.

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

**Tablo 3.3.** Annexin V Boyaması İçin Karışım Oranları

<b>10X Binding</b>	<b>10 µl</b>
<b>PI</b>	<b>10 µl</b>
<b>Annexin</b>	<b>10 µl</b>
<b>Distile Su</b>	<b>79 µl</b>
<b>Toplam hacim</b>	<b>100 µl</b>

Bu karışım buzda ve karanlıkta 10 dk kadar bekletilmiştir. Annexin buzdan alınmış ve her bir tüpe 100 ul eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve 400 µl Binding 1X eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk-1 saat arası bekletilip ve akış sitometrisinde ölçüm yapılmıştır.

### **3.2.10. Hücre Proliferasyon Testi (MTT)**

Hücre canlılık testlerinden birisi olan MTT yönteminde mitokondriyal aktivitesi devam eden hücrelerin 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid ile tepkimeye girerek formazan bileşikleri oluşturmaları üzerine dayanır (62).

96 çukurlu plakaların çukurlarına 2000 hücre fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ile ekilerek hücreler kültüre edilmiştir. Hücre kültür kabının yüzeyini %70 kaplayan hücrelerin besiyeri değiştirilmiş ve sinarin ile çeşitli dozlarda muamele edilmiştir.

72 saat sonra hücrelerin üzerine 100 ul fenol kırmızısı içermeyen tam besiyeri ilave edilmiştir. Her bir örneğin üzerine 50 µl 5mg/ml konsantrasyondaki MTT çözeltisi eklenmiştir. Hücreler 3 saat inkübatörde inküve edilmiş ve inkübasyon sonrası çukurlardaki karışım uzaklaştırılmıştır. Her çukura 160 µl DMSO ilave edilmiştir ve formazon kristallerinin çözünmesi için her bir çukur pipetlenmiştir. 570 nm'de absorbanları okutulmuştur.

### **3.2.11. Koloni Oluşturma Testi (Colony Formation Assay)**

MDA-MB-231, MCF10A ve MCF7 hücreleri 6 kuyucuklu platelere her kuyucukta 5000 hücre toplam volüm 2 ml olmak üzere ekilmiştir. Ekim işleminden 1 gün sonra

tutunan hücreler üzerine sinarin tedavisi uygulanmıştır. Tedaviden 24 saat sonra hücreler üzerindeki besiyeri atılmıştır. Hücreler 7 gün boyunca bekletilmiştir.

Bu süre sonunda ikinci kez sinarin tedavisi uygulanmıştır. Yine aynı işlem yapılarak 24 saat sonra besiyeri atılıp taze besiyeri eklenip hücreler tekrar 7 gün inkübe edilmiştir. En son olarak hücre yüzeyinden besiyeri atılarak 5 dakika metanol ile muamele edilmiş ve kristal viyole ile hücreler boyanmıştır. Hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.2.12. Yazılım ve Veritabanları

Image J	Western Blot sonuçlarını analiz etmek için kullanılmıştır.
Microsoft Office 365 Excel	Sonuçların grafik haline getirilmesi için kullanılmıştır.

Western Blot sonuçlarının elde edilmesinde ilgilenilen antikorların ifade seviyelerini sayılara dökmek için image J analiz programı kullanılmıştır. Daha sonrasında bu sayısal veriler excel'de hesap yapılarak ve grafikler çizilerek analiz edilmiştir.

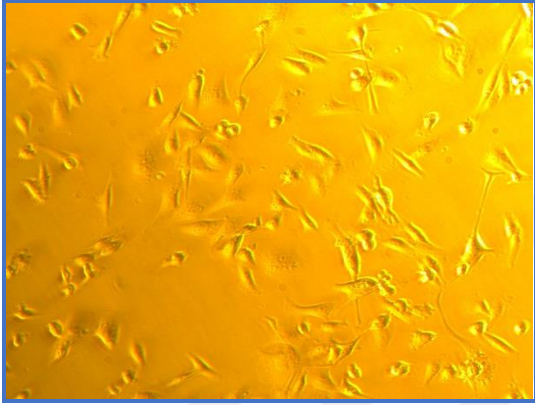
### 3.2.13. İstatistiksel Analiz

Dansitometrik analizler Image J programı ile yapılmıştır, akış sitometri ve dansitometrik analizlerde gruplar arasındaki farklar student t testi ile değerlendirilmiştir.

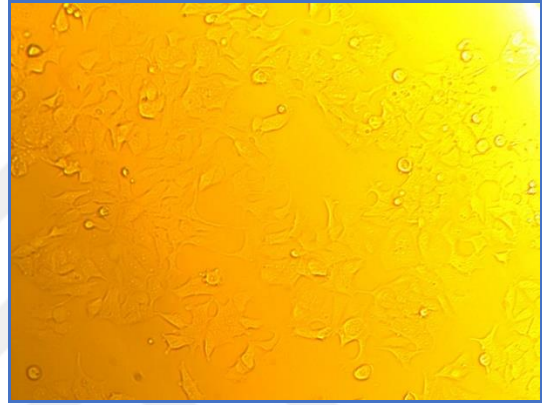
## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Canlılık ve Doluluk Oranları

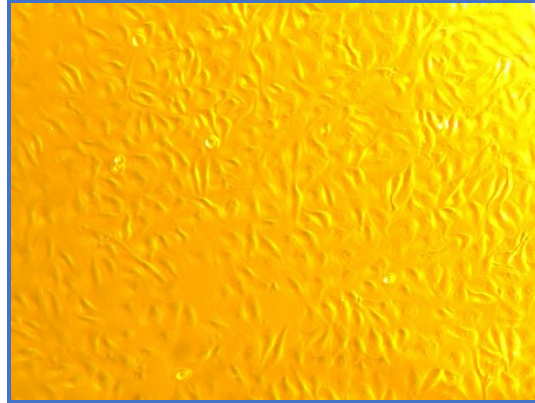
Bu deneylerde meme epitel hücre hattı (MCF10A) ve iki meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231 ve MCF7) kullanılmıştır. MCF10A, MDA-MB-231, ve MCF7 hücre hatları %80 doluluğa ulaşınca pasajlanmıştır. Şekil 4.1.'de çalışmada kullanılan hücrelerin morfolojik yapıları görülmektedir. Hücrelerin %80 doluluk oranında morfolojilerinin sağlıklı olduğu tespit edilmiştir.



MDA-MB 231 HÜCRE HATTI



MCF 7 HÜCRE HATTI



MCF-10A EPİTEL HÜCRE HATTI

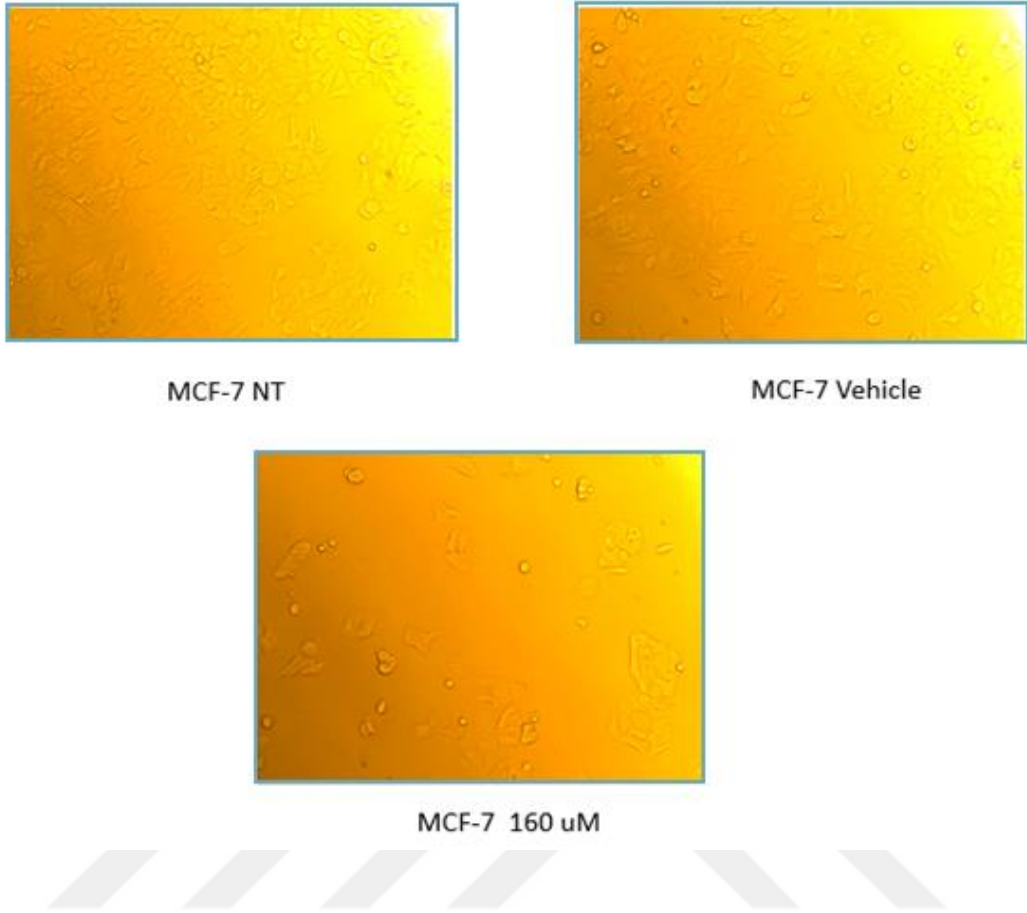
**Şekil 4.1.** Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskopundaki Görüntüleri

## 4.2. Hücrelerin İlaç Uygulaması Sonrasındaki Mikroskop Görüntüleri



**Şekil 4.2.** MDA-MB 231 Hücresinde Tedavisiz Grup ile Vehicle ve Sinarin ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (72 saat)

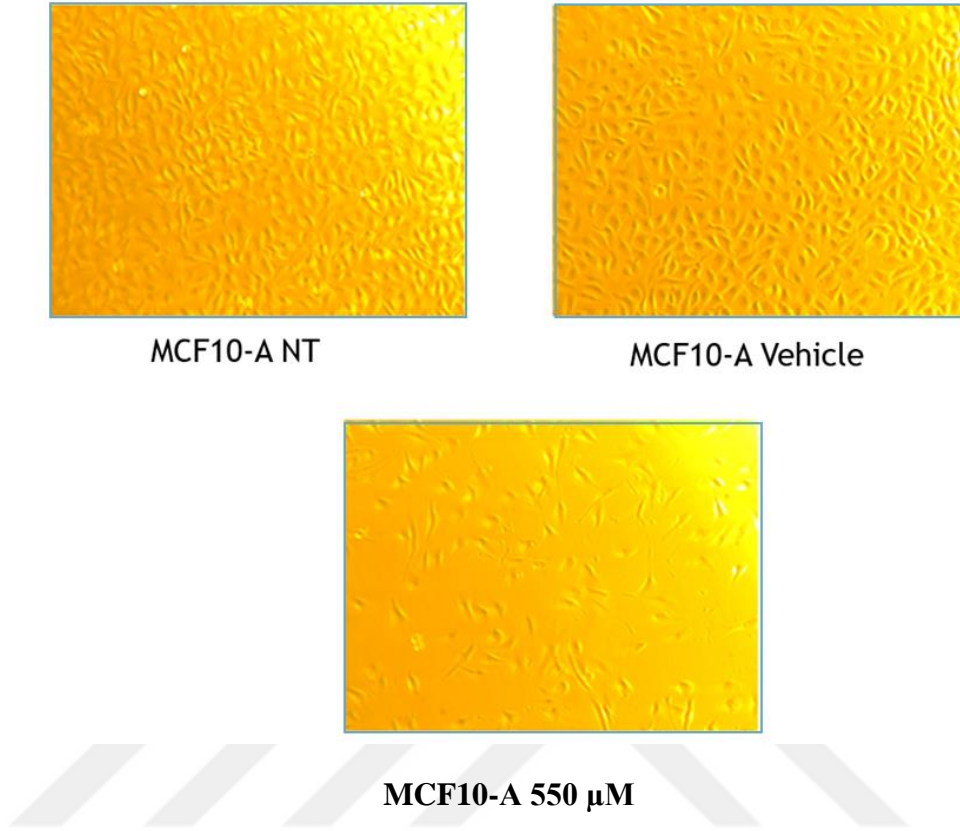
Şekil 4.2.'deki MDA-MB 231 hücreleri 180 uM sinarin ile 72 saat süreyle tedavi edilmiş ve kontrol grupları olan NT ve vehicle uygulaması ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre NT ve Vehicle gruplarında anlamlı bir azalma görülmezken tedavi grubunda yüzde 50'nin üzerinde bir azalma saptanmıştır.



**Şekil 4.3.** MCF7 Hücrelerinde Tedavisiz Grup ile Vehicle ve Sinarin ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (72 saat)

MCF7 hücreleri 160 uM sinarin ile 72 saat tedavi edilmiş ve kontrol grupları olan NT ve vehicle uygulaması ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre NT ve Vehicle gruplarında anlamlı bir azalma görülmezken tedavi grubunda yüzde 65'in üzerinde bir azalma saptanmıştır.

## MCF-10A HÜCRE HATTI



**Şekil 4.4.** MCF10A Hücresinde Tedavisiz Grup ile Vehicle ve Sinarin ile Muamele Edilen Hücrelerin Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması (72 saat)

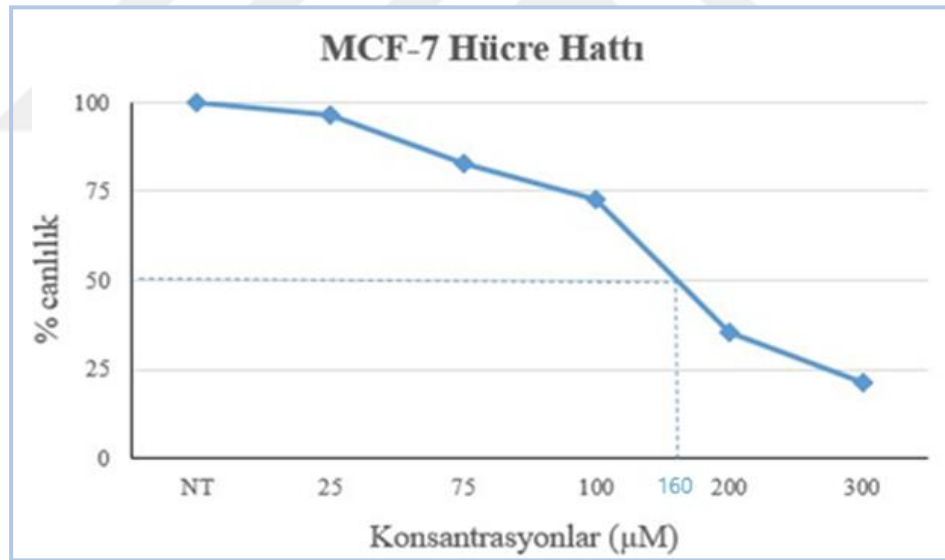
MCF10A hücreleri 500  $\mu\text{M}$  sinarin ile 72 saat tedavi edilmiş ve kontrol grupları olan NT ve vehicle uygulaması ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre NT ve vehicle gruplarında anlamlı bir azalma görülmezken, tedavi grubunda ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan yüzde 25-30 gibi bir azalma saptanmıştır [Şekil 4.4.].

### 4.3. Proliferasyon ve Hayatta Kalım

Proliferasyonda azalma ve apoptozda artışı sağlayan dozları elde etmek için, enginar bitkisinde bulunan sinarin bileşiminin in vitro çoğalmaya etkileri MTT hücre canlılık testi ile gösterilmiştir. Hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla hücreler sinarin ile muamele edildikten 72 saat sonra MTT testi ile analiz edilmiştir. Bu test ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

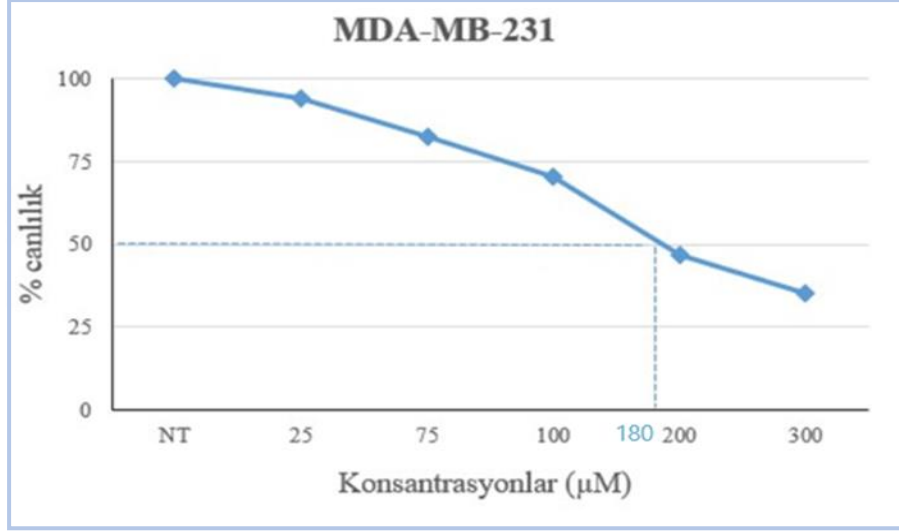
Deneylerde kullanılan MCF7, MCF10-A VE MDA-MB 231 hücrelerinin sinarin ile muamele edilince elde edilen doz-hücre ölümü sonuçlarına göre IC50 oranları hesaplanarak ileri aşamalı deneyler yapılmıştır.

Şekil 4.5. 'te MCF7 hücrelerinin spektrofotometre sonrası sonuçları grafik haline getirilip analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir. IC 50 değeri 160  $\mu$ M, MDA-MB 231 hücre hattı için 180  $\mu$ M ve MCF 10A için ise 550  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. MCF 7 Hücrelerinde Farklı Sinarin Konsantrasyonları Sonrası Hücre Canlılığı Yüzdesi (72 saat)

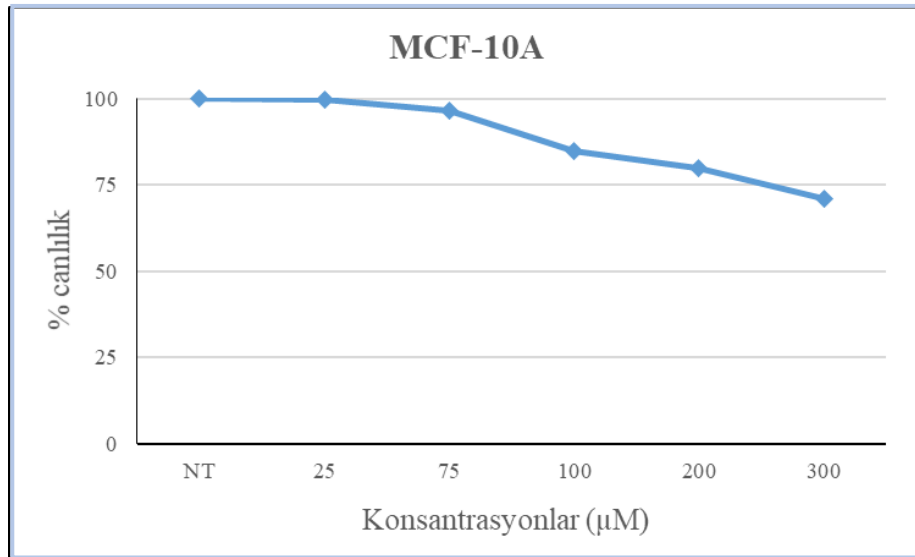




**Şekil 4.6.** MDA-MB 231 Hücresinde Farklı Sinarin Konsantrasyonları Sonrası Hücre Canlılığı Yüzdesi (72 saat)

Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da görüldüğü üzere hem MCF7 hem de MDA-MB-231 hücresinde sinarin muamelesi ile hücre canlılığının tedavisiz gruba göre azalmış olduğu ve bu azalmaların ise 100 µM sonrası giderek arttığı belirlenmiştir.

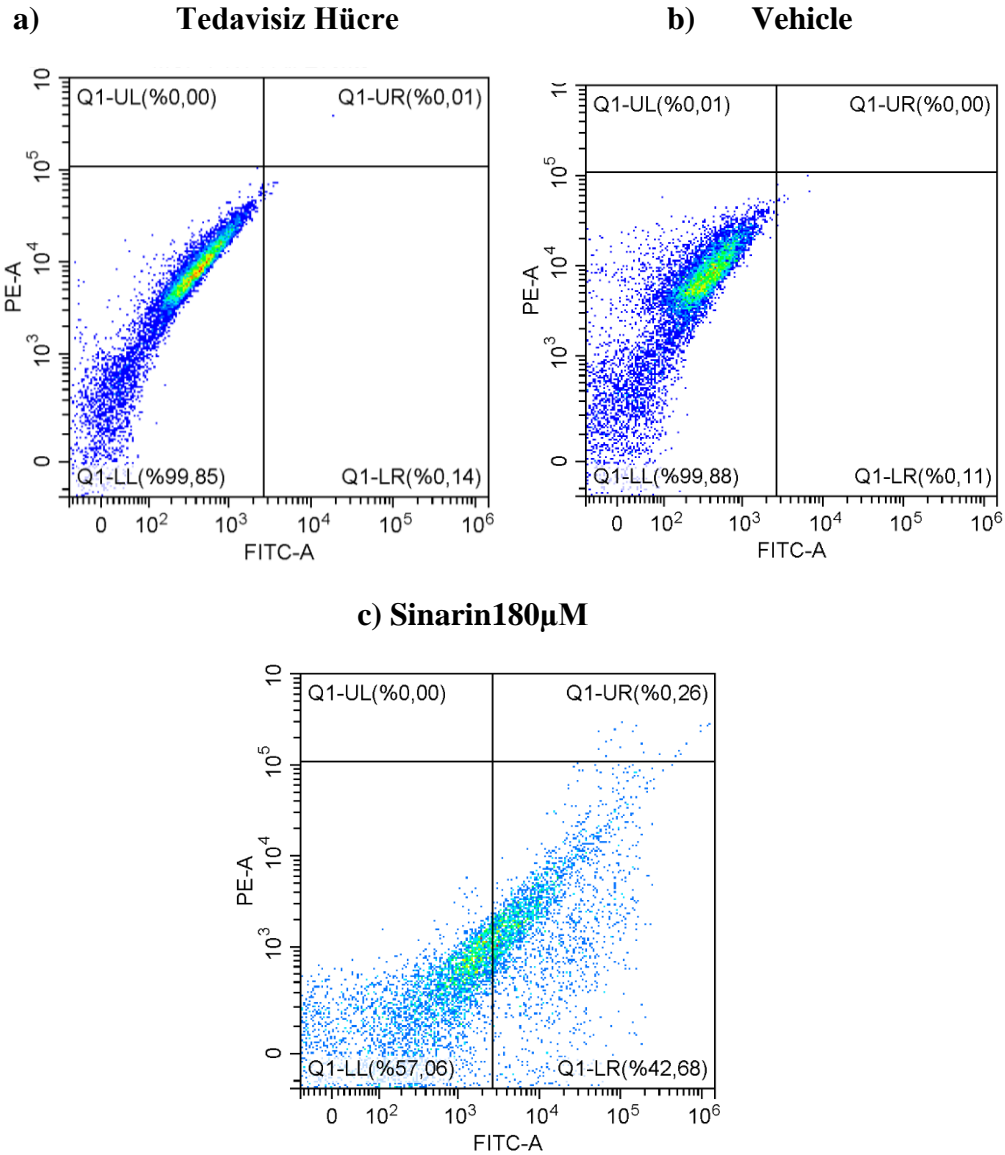
Şekil 4.7.'de MCF10A hücresinde hücre canlılığının tedavisiz gruba göre 300 µM sinarin konsantrasyonundan sonra belirgin olarak azaldığı belirlenmiştir.



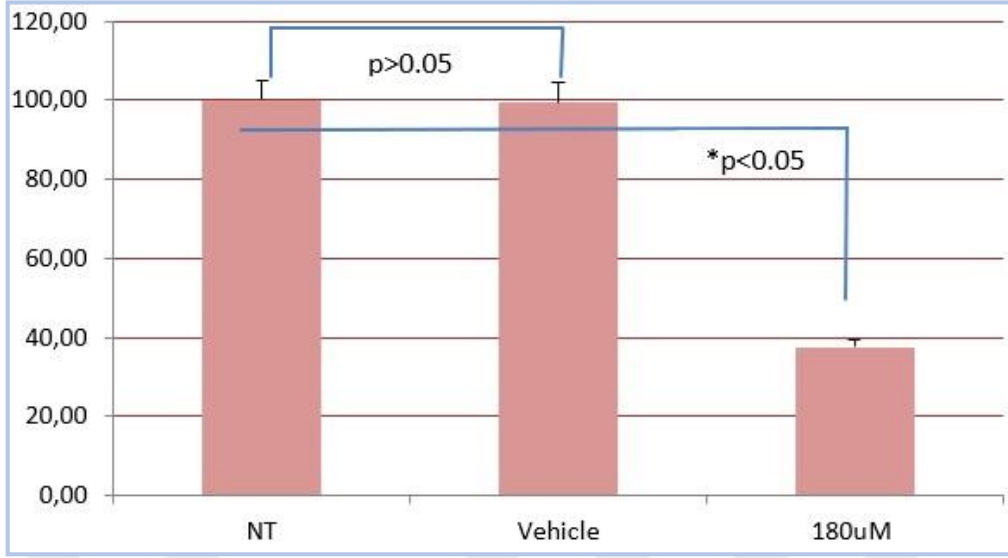
**Şekil 4.7.** MCF10-A Hücresinde Farklı Sinarin Konsantrasyonları Sonrası Hücre Canlılığı Yüzdesi (72 saat)

#### 4.4. Anneksin PI Boyanması ile Apoptoz Tespiti

Çalışmada apoptoz değerlendirilmesi için annexin boyama ile akış Sitometri uygulaması yapılmıştır. Sinarin'e maruz kalan MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF10-A hücre hatları 72 saat tedaviden sonra hasat edilmiş ve annexin V boyama için işlemler yapılmıştır. Şekil 4.8.'de MDA-MB-231 hücrelerinin akış sitometrisi ile elde edilen analiz sonuçları gösterilmiştir ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir.



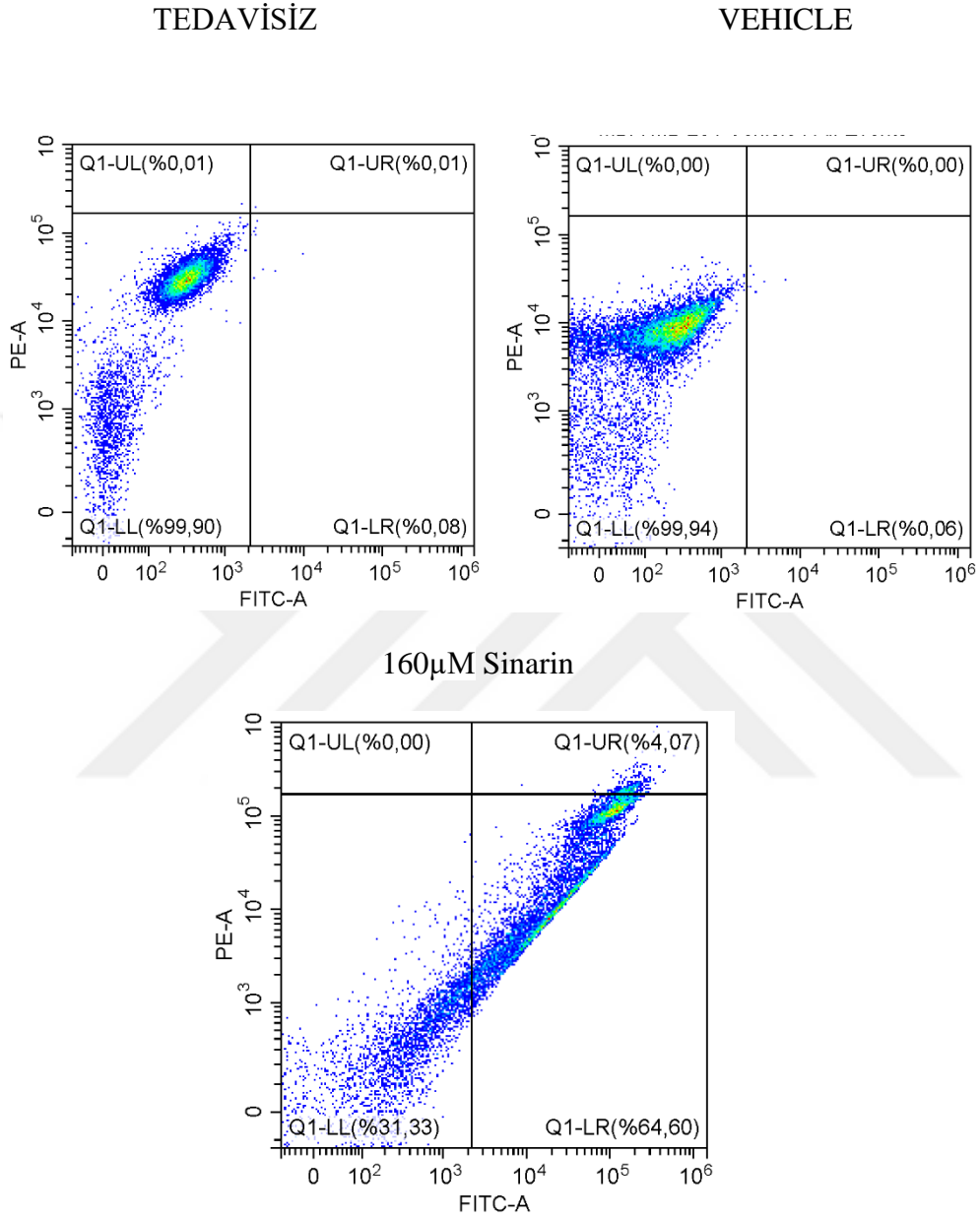
Şekil 4.8. MDA-MB 231 Hücre Hatlarında Tedavisiz, Vehicle ve 160 µM Sinarin Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri



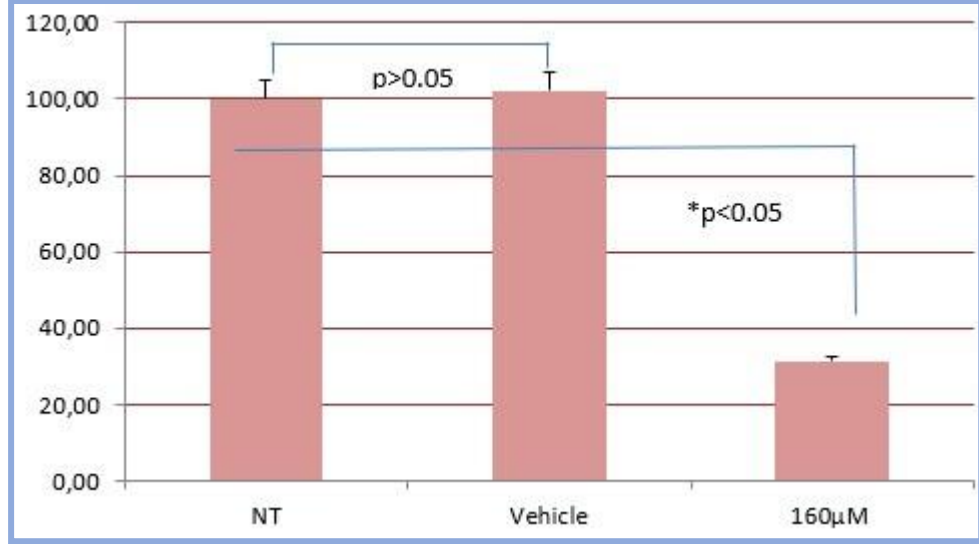
**Şekil 4.9.** Sinarin Uygulaması Sonrası MDA-MB 231 Hücrelerinde Hücre Canlılık Yüzdesi ( $p<0.05$ )

Şekil 4.9.'da gösterildiği üzere, MDA-MB-231 hücrelerinin sinarin muamelesi ile hücre canlılığının tedavisiz gruba göre azalmış olduğu ve bu azalmanın yaklaşık olarak %55-60 oranında apoptoz tipi hücre ölümü olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Şekil 4.10.' da MCF7 hücresinin akış sitometrisi ile elde edilen analiz sonuçları gösterilmiştir ve elde edilen sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir.



**Şekil 4.10.** MCF-7 Hücre Hatlarında Sırasıyla Tedavisiz, Vehicle ve 160 µM Sinarin Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri



**Şekil 1.11.** 160 µM Sinarin Uygulaması Sonrası MCF-7 Hücrelerinde Hücre Canlılık Yüzdesi ( $p<0.05$ ).

Yapılan değerlendirme sonucunda MCF- 7 hücre hattı için MDA-MB 231 hücre hattındaki durum söz konusu olup, apoptoza uğrama oranının anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.11.).

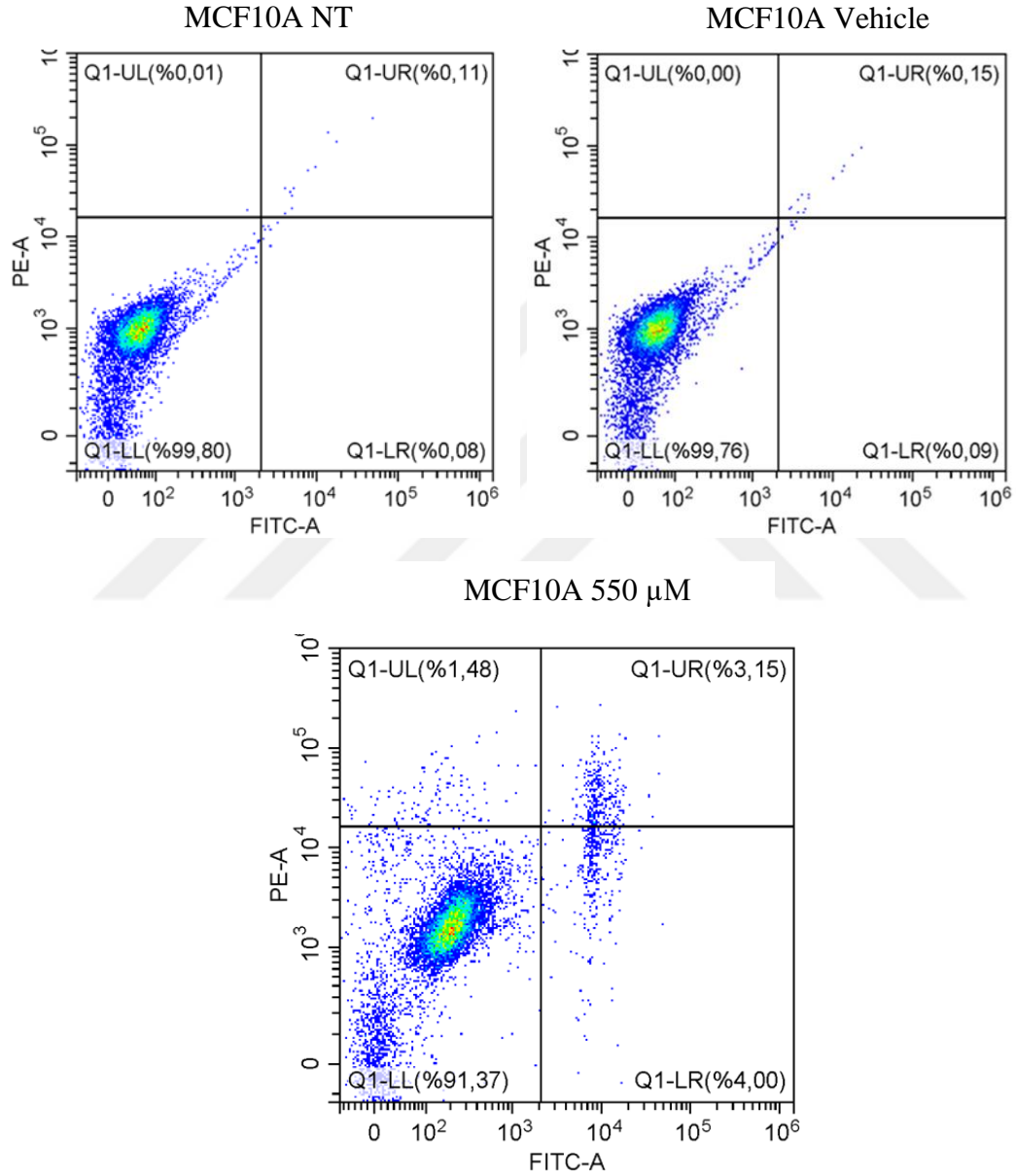
MCF-7 hücrelerinin MDA-MB-231 hücrelerinde sinarin ile tedaviden sonra hesaplanan apoptoz oranına göre daha yüksek hücre ölümü oranına sahip olduğu tespit edilmiştir.

550 µM sinarin muamelesinin ardından 72 saat inkübasyon uygulanmış ve yine anneksin V boyaması için gerekli işlemler uygulanmıştır. Şekil 4.12.'de elde edilen apoptoz yüzdeleri gösterilmektedir.

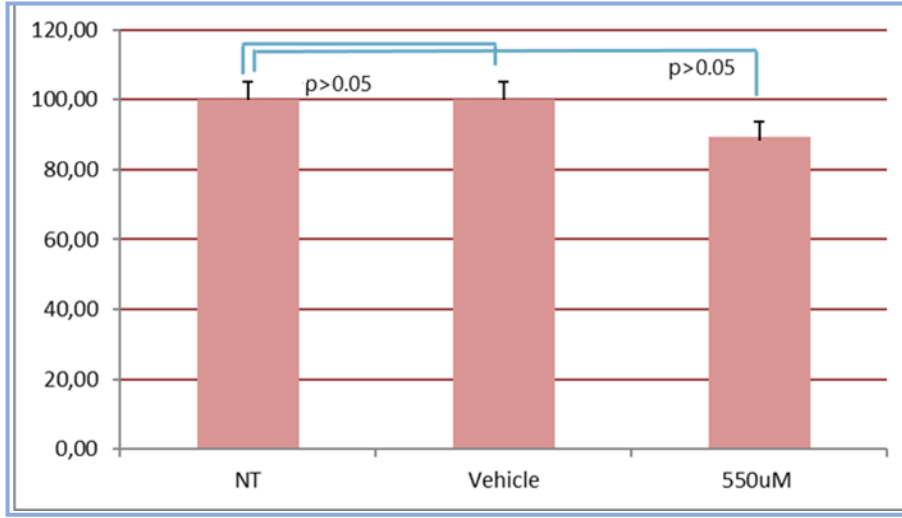
MCF10A hücresi için yapılan analizde şekil 4.12. ve 4.13.'te görüldüğü gibi sinarin ile muamele edilen hücrelerde apoptoz oranının %10-15 civarında olduğu saptanmış ve bu oranın istatistiksel olarak anlamsız olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.5. Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

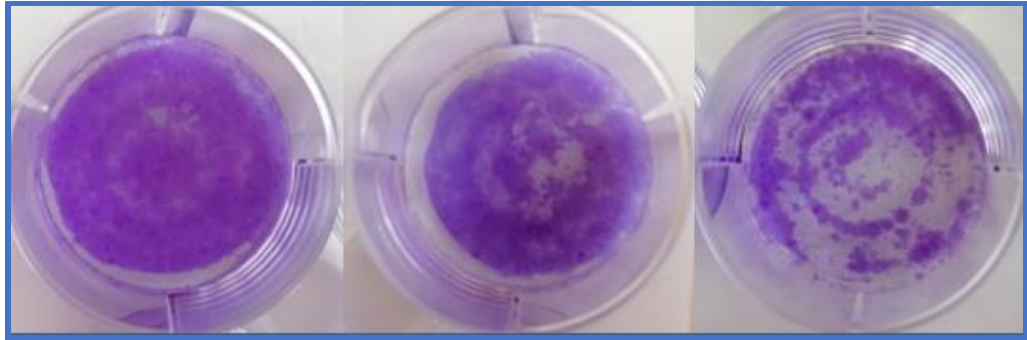
Hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerini ölçmek için kristal viyole kullanılmıştır. Sinarin ile muamele edilen hücrelerin 72 saat sonra besiyeri değiştirilip 7 gün inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra tekrar sinarin tedavisi uygulanıp aynı işlem uygulanmıştır. Toplam 2 hafta sonunda kristal viyole ile hücreler boyanmıştır. Her plak analiz için elde edilen hücre hatlarının görüntüleri Şekil 4.14. ve 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.12. MCF10A Hücre Hattında Tedavisiz, Vehicle ve Sinarin Uygulaması Sonucu Oluşan Apoptoz Yüzdeleri



**Şekil 4.13.** 550  $\mu$ M Sinarin Uygulaması Sonrası MCF10A Hücrelerinde Hücre Canlılık Yüzdesi ( $p>0.05$ )



MDA-MB 231 NT

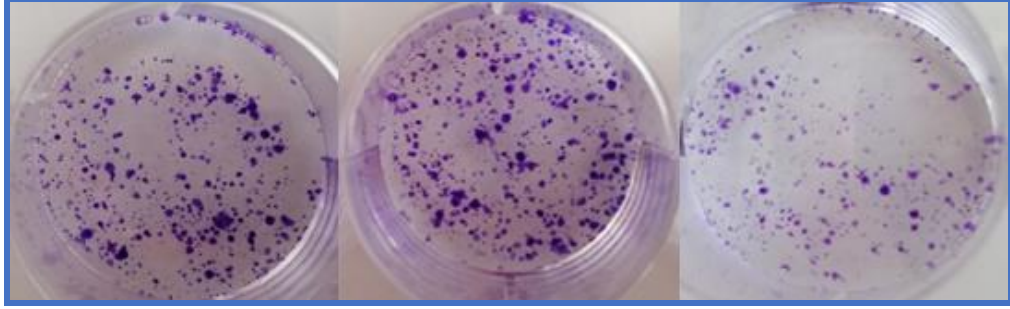
MDA-MB 231 Vehicle

MDA-MB 231 180  $\mu$ M

**Şekil 4.14.** MDA-MB 231 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği

MDA-MB 231 hücre hattında yapılan koloni oluşturma deneyinde tedavisiz grup ve vehicle grubu arasında fark görülmemektedir(Şekil 4.14.). Tedavisiz grup ve sinarin ile tedavi edilen grup karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücresinde de hücrelerin koloni oluşturma becerilerinin azaldığı belirlenmiştir.

Şekil 4.15'te MCF7 hücresi boyamasına bakıldığında tedavisiz grup ve 160 µM sinarin grubu arasında yüzde 50 oranda bir fark görülmektedir. Tedavisiz grup ve 160 µM sinarin ile muamele edilen grup karşılaştırıldığında hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin tedavisiz gruba göre azaldığı saptanmıştır.



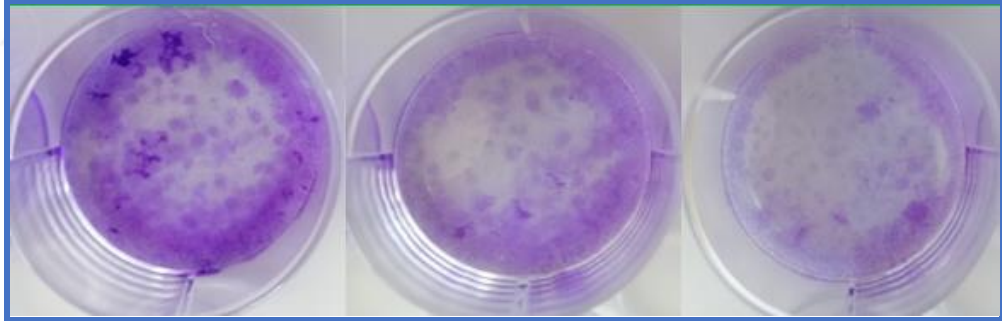
MCF7 NT

MCF 7 Vehicle

MCF7 160 µM

**Şekil 4.15.** MCF7 Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği

Sinarin, hücrenin MCF-7 hücresinde 160 µM'de koloni oluşturma kabiliyetini inhibe ettiğini göstermektedir (Şekil 4.15.).



MCF10-A NT

MCF10-A Vehicle

MCF10-A 550 µM

**Şekil 4.16.** MCF 10A Hücresinin Koloni Oluşturma Yeteneği

MCF10A hücresi için yapılan koloni oluşturma testinde MCF10A hücresinin sinarin ile muamelesi sonucunda hücrelerin koloni oluşumlarının az oranda etkilendiği, ancak bunun diğer hücrelere kıyasla daha az olduğu Şekil 4.16.'da olduğu gibi belirlenmiştir.

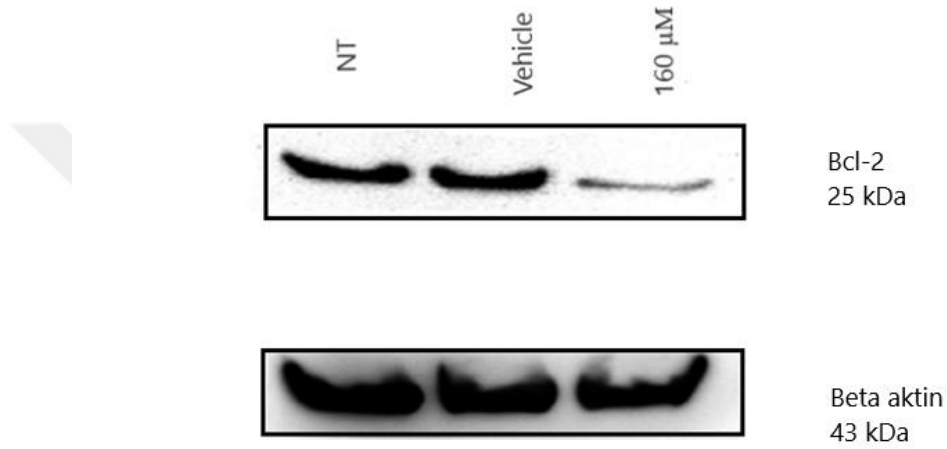
Sonuç olarak her üç hücre grubunda da vehicle ile muamele koloni oluşumunu önemli oranda etkilememiştir. Sinarin ile muamele ise koloni oluşumunu



azaltmıştır. Ancak MCF7 ve MDA-MB 231 hücre hatlarında bu oran MCF10A'ya oranla daha fazla gözlenmiştir.

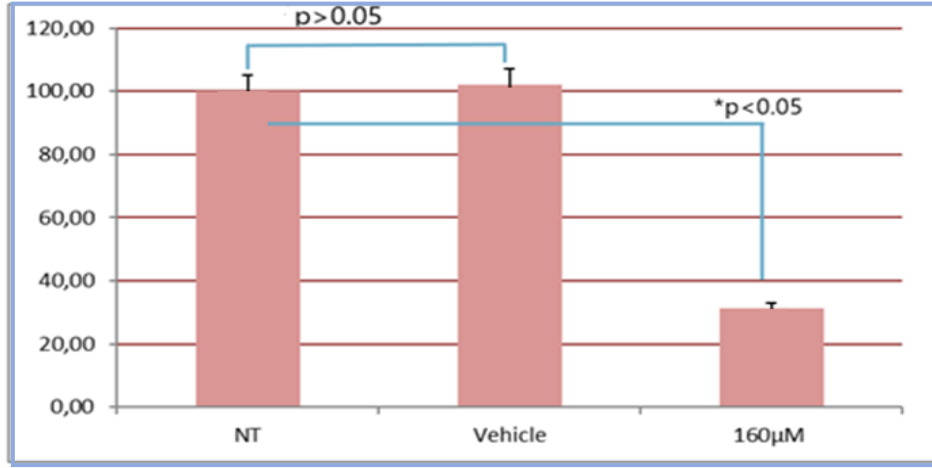
#### 4.6. Sinarin'in Hücre Ölümündeki Rolünün Western blot ile Belirlenmesi

MCF7 hücresinde bcl-2 ifadesinin sinarin muamelesi ile azaldığı ( $p < 0.05$ ), vehicle ve tedavisiz grup arasında belirgin bir fark olmadığı şekil 4.17.'de görülmektedir.

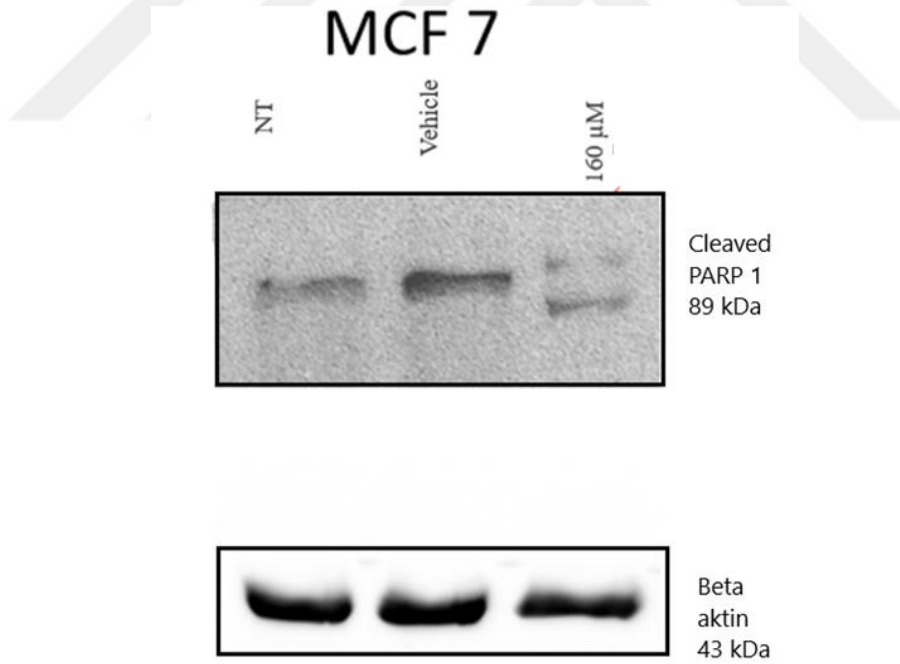


**Şekil 4.17.** MCF- 7 Hücresinde Bcl-2 Gen İfadesinin Baskılanması

WB analizi ile elde edilen veriler şekil 4.18' de grafik haline getirilmiştir. Grafikte tedavisiz grup ile vehicle grubu arasında belirgin bir fark olmadığı, 160 µM sinarin muamelesi ile baskılanmanın %70 civarında olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ )



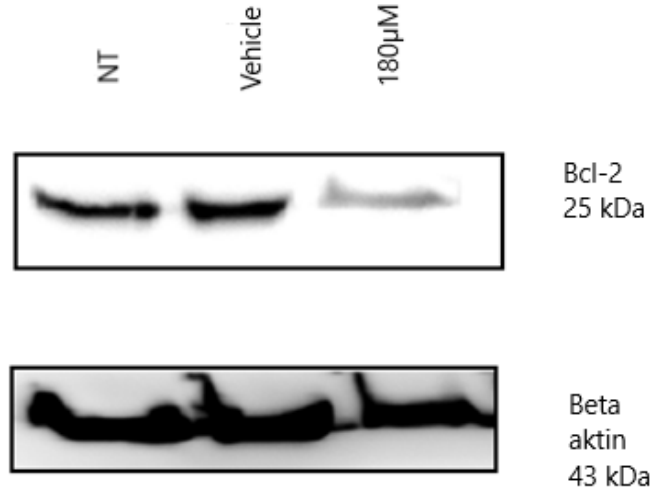
**Şekil 4.18.** Sinarin ile Muamele Edilen MCF7 Hücresinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması ( $p < 0,05$ )



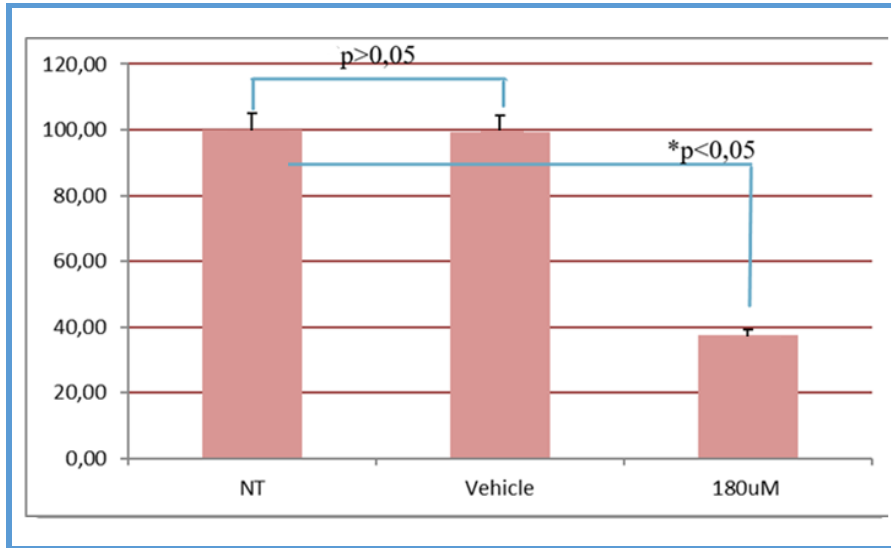
**Şekil 4.19.** Sinarin ile Muamele Edilen MCF7 Hücresinde Western Blot Analizi ile PARP 1 İfadeleri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PARP aktivasyonu, Sinarin tedavisinden sonra her iki hücre hattında önemli ölçüde artmıştır. Ek olarak, Sinarin ile indüklenen apoptoza ayrıca Bcl-2'de belirgin bir azalma gözlenmiştir.

## MDA-MB 231



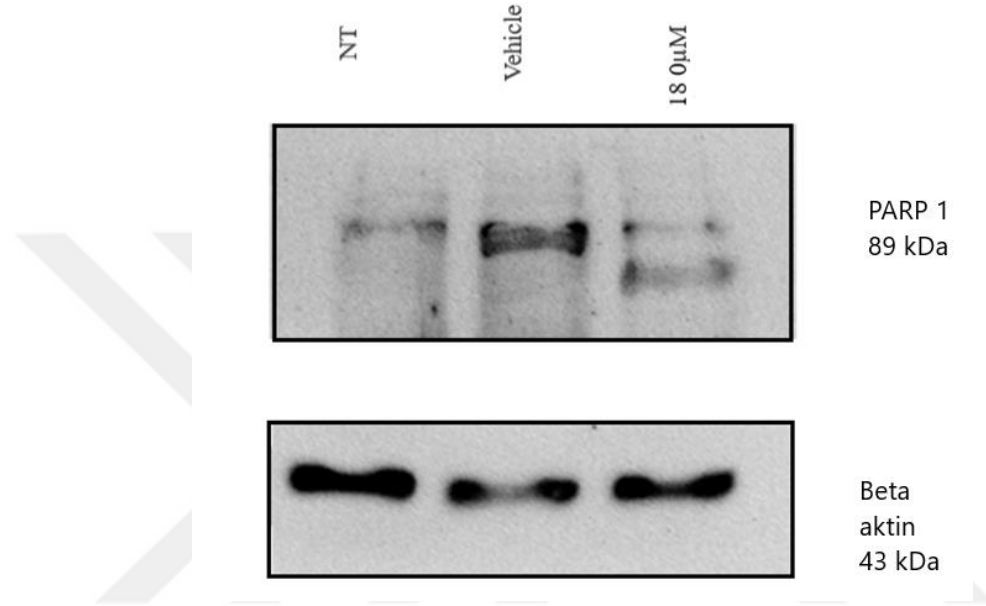
Şekil 4.20. MDA MB 231 Hücre Hattı Western Blot Sonuçları



Şekil 4.21. Sinarin ile Muamele Edilen MDA-MB 231 Hücresinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması ( $p < 0,05$ )

Mda-Mb-231 hücrelerinde yapılan 180µM Sinarin muamelesi ile hücre canlılığının tedavisiz gruba göre azalmış olduğu ve bu azalmanın yaklaşık olarak %63 civarında olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

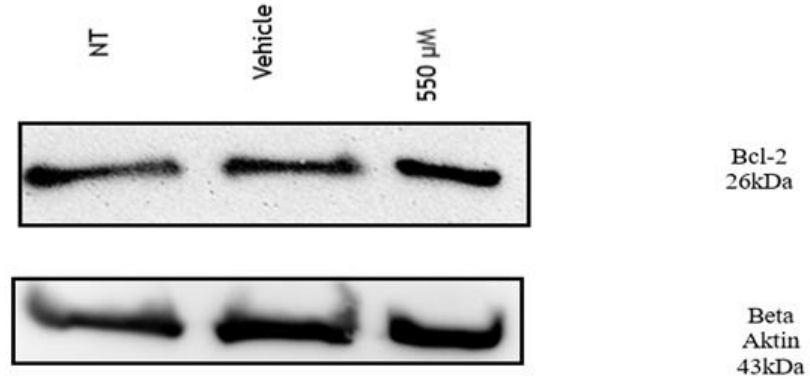
MDA MB 231 hücrelerinde şekil 4.22.'de görüldüğü gibi sinarin muamelesiyle PARP 1'in aktifleşmiş (cleaved) olduğu saptanmıştır.



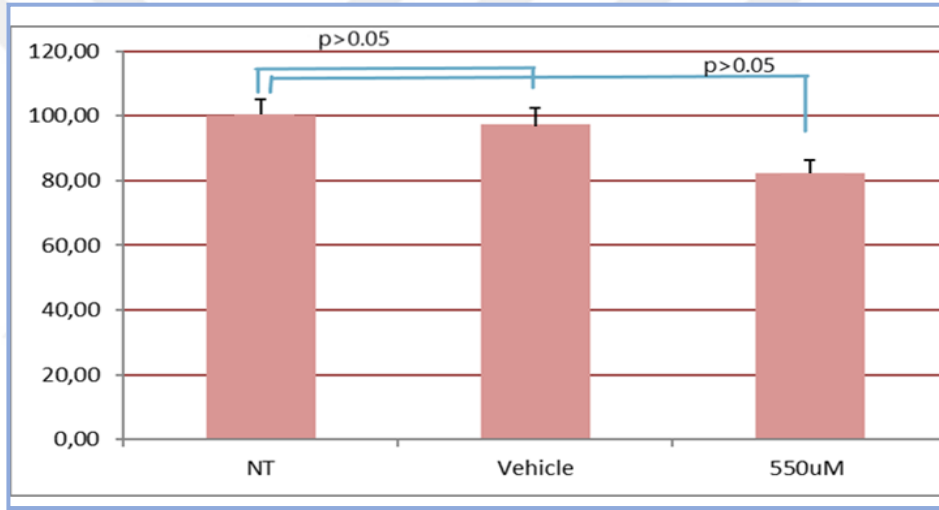
**Şekil 4.22.** Sinarin ile Muamele Edilen MDA-MB 231 Hücrelerinde Western Blot Analizi ile PARP 1 İfadeleri

Bu sonuçlar, sinarin'in esas olarak meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyerek bir tümör baskılayıcı etki gösterdiğini doğrulamıştır.

MCF10 A hücrelerinde bcl-2 ifadesinin sinarin ile anlamlı olmayan bir oranda azaldığı ( $p>0.05$ ), vehicle ve tedavisiz grup arasında belirgin bir fark olmadığı şekil 4.24.'de görülmektedir.



**Şekil 4.23.** Sinarin ile Muamele Edilen MCF10A Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bcl-2 İfadeleri



**Şekil 4.24.** Sinarin ile Muamele Edilen MCF10A Hücrelerinde Western Blot Analizi ile Bant Yoğunluklarının Karşılaştırılması (p>0,05)

MCF 10-A hücrelerinde yapılan 550 µM sinarin muamelesi ile hücre canlılığının tedavisiz gruba göre çok az oranda olduğu ve bu azalmanın yaklaşık olarak %18-20 civarında olduğu ve anlamsız olduğu belirlenmiştir (p>0,05). Tedavisiz ve vehicle grup karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamsız olduğu saptanmıştır (p>0,05)

## 5. TARTIŞMA

Dünyada çoğunlukla kadınları etkileyen hastalıkların başında meme kanseri gelmektedir. Yapılan pek çok çalışma bunun her geçen yıl arttığını göstermekte ve daha hızlı çareler bulmaya itmektedir. Meme kanseriyle ilgili yapılan çalışmalardan pek çoğu doğal ürünlerden elde edilebilen, aynı zamanda da diğer sağlıklı hücelere zarar vermeyecek bileşiklerden yapılmaktadır. Yine en çok çalışılan alanlardan biri de polifenoller ve onların etkileşimleridir.

Bu çalışmada, bir polifenol türü olan sinarin bileşiğinin, insan meme kanseri hücre hatları olan MCF7, MDA-MB 231 ve insan meme epitel hücre hattı olan MCF10A üzerinde proliferasyon ve apoptoz üzerine olan etkileri deneysel olarak test edilmiştir. Farklı sinarin konsantrasyonlarının meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu, hayatta kalması ve apoptozu üzerinde olumlu etkileri vardır. Bu sebeple ‘sinarin bileşiği potansiyel anti kanserdir’ hipotezi test edilmiştir.

MTT tahlilleri, yaşama kabiliyeti üzerindeki önleyici etkinin zamana ve doza bağlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. MTT testi ile oluşturulan doz-yanıt eğrileri, MCF7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinin canlılığını, 100 µM’ın üzerindeki sinarin konsantrasyonlarında MCF10A normal hücrelerinden daha belirgin şekilde azalttığını ortaya koymuştur.

Yapılan bu çalışma ile sinarin’in etkilerinin doza ve hücre tipine bağlı olarak değişmekte olduğu gösterilmiştir. Sinarin, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde MCF-7’den daha belirgin bir sitotoksik etki göstermiştir. Tedavi edici dozlar olan bu teste göre belirlenen IC50 değeri hesaplandıktan sonra, MCF7, MDA-MB231 ve MCF10A hücre hatlarına sırasıyla 160 µM, 180 µM ve 550 µM konsantrasyonlarda sinarin tedavisi yapılmış ve bu hücre hatlarında apoptoz belirteci olan genlerin ifadeleri, sinarin’in apoptozu indükleyip indüklediğini belirlemek için western blot yöntemiyle incelenmiştir. Hücre ölümü tipini saptamak için, hücre apoptozu için işaretler olarak PARP-1 antikoru ve bcl-2 kullanılmıştır. Sonuçlar sinarin'in bölünmüş (cleaved) Parp 1'in ifadesini arttırdığını ve bcl-2 protein ifadesinin azaldığını göstermiştir.

Hücreler tedavi ve tedavisiz ve ayrıca vehicle olarak gruplara ayrılarak koloni oluşturma kabiliyeti testi uygulanmış, MTT deneylerinde gösterildiği gibi sinarin tedavisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin anlamlı oranda

azaldığı gözlenmiştir. MCF10-A hücrelerinin ise kanser hücrelerine oranla daha düşük oranda azaldığı gözlenmiştir.

Yapılan deneyler neticesinde; sinarin muamelesi ile MDA-MB 231 ve MCF-7 hücre hatlarının canlılığının tedavisiz gruba göre azalmış olduğu ayrıca sinarin'in apoptozu uyardığı, western blot ve aneksin V boyama yöntemleriyle ulaşılan sonuçlar ile gösterilmiş, bu azalmanın tedavisiz ve vehicle grup karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamsız olduğu saptanmıştır.

Polifenollerin, antioksidan sistemini aktifleştirerek kanser hücrelerinin ilerlemesini önlemede potansiyel etkileri bulunmaktadır. Polifenollerin toksinleri arındırıcı (detoksifiye edici) enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadelerini, hormonların metabolizmasını, antibakteriyal, antiviral etkileri düzenleyerek de etkili oldukları bilinmektedir (3,4).

Literatürde, bir polifenol türü olan sinarin'in kanserle olan ilişkisi hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar indirekt çalışmalar olup doğrudan sinarin bileşiğinin değil daha çok bitki ekstraktlarının kullanıldığı çalışmalar ya da diğer benzer polifenol türevleri ile ilgili yapılan çalışmalardır. Ayrıca, sinarin ve türevleri ile ilgili yapılan çalışmalarda daha çok antioksidan etkisi üzerine yoğunlaşmış olup çalışmalarda tek başına sinarin değil farklı türevleri bir arada kullanılmış ve proliferasyon, güçlü radikal atma aktivitesi in vitro olarak yapılan deneylerle gösterilmiştir (63).

Örneğin bir çalışmada, kahve polifenolleri ile yapılan deneylerde, CGA'lar gibi kahve polifenollerinin, insan hücrelerinde antioksidan, anti-enflamatuar, antiproliferatif etkileri teşvik etmede anahtar oyuncular olduğu sonucuna varılmıştır (64). Bizim çalışmamızda da bir polifenol ve di-kafeoilkinik asit türevi olan sinarin'in MCF 7 ve MDA-MB 231 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri MTT testleri sonucunda gösterilmiştir.

Sinarin'in genotoksik ajanlara karşı potansiyel bir kemoterapi önleyici olarak hareket edip etmediğinin araştırıldığı bir çalışmada ise, sinarin'in antioksidan kapasitesi nedeniyle güçlü bir kemo-önleyici aktivite gösterdiği belirtilmiştir (65).

Bütün bu etkilerinden yola çıkarak sinarin'in potansiyel bir anti-kanser olabileceği ve bu bileşiğin daha fazla araştırılması gerektiği sonucuna varılabilir.

Bütün bu antioksidan özelliklerinin yanında etkilediği yolların araştırıldığı bir çalışmada ise, PI3K / Akt / mTOR yolağının agonistleri olan, sinarin bileşiği ve

MHY1485'in, PI3K / Akt / mTOR'u aktive ettiği ve hücrenin, harin bileşiğinden kaynaklanan stresi korumasına ve dengelemesine yardımcı olduğu gözlenmiştir (66).

Bizim çalışmamız sonucunda ise bcl-2'nin sinarin tarafından tedavi edilen kanser hücre hatlarında ifadesinin azalmasından dolayı mitokondriyal aracılı hücre ölüm yolağının aktive edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, bcl-2 apoptotik geninin NF-κB sinyal yolağının hedef genlerinden biri olduğu düşünüldüğünde, sinarin'in bu yolağında inhibe ettiği sonucuna varılabilir.

Bazı polifenol bileşiklerin metaztaz ve proliferasyon ile ilgili özel proteinleri hedef olarak çalıştığı ve bunlardan biri olan 14-3-3 τ proteininin, meme kanserinin tümör oluşumu ve metastazında kritik bir rol oynadığı ve yeni ilaç hedef proteini olarak kullanılabilirdiği bilinmektedir (67).Yapılan güncel bir çalışmada, DCQA'lerin meme kanseri hücreleri MCF-7, MDA-MB-231 hücre hatlarında, 14-3-3 τ 'ye bağlanabilen DCQA'ler için tarama yapılmıştır. Bu tarama neticesinde, 1,3 DCQA'in meme kanseri hücre proliferasyonu ve metastaza karşı hedef protein olan 14-3-3 τ proteinine bağlandığı ve hücre canlılığını ve hareketliliğini engellediği gösterilmiştir. Moleküler yerleştirme simülasyonu, aşırı ifade ve nakavt deneyleri yoluyla, 14-3-3τ'nin sinarin'in hedef proteinlerinden biri olduğu doğrulanmıştır (68).

Bizim çalışmamızda burada elde edilen sonuçlara benzer olarak proliferasyonda azalma gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada bileşiğin yaklaşık 90 mikro molar etkinliği gözlenirken, çalışmamızda farklı olarak 100 mikro moldan sonra gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda sonuçlar sinarin'in bölünmüş (cleaved) Parp-1'in ifadesini göstererek apoptozu uyardığını düşündürmektedir.

G.Soykut ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, yine polifenol olan kuersetin ve kafeoilkinik asitler gibi antioksidan özellikler gösteren güçlü fitokimyasallar içeren *C. Olitorius* bitkisinin kolon kanseri hücrelerine uygulanmasıyla genellikle kanser ve hücre çoğalmasının azaltılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (69). *Corchorus olitorius* L. yapraklarının iki farklı özütünün, 50 ug / ml konsantrasyonda apoptozu indüklediği ve sonuç olarak, ekstraktların kolon kanser hücre hatlarının ikisinde de apoptozu indüklerken, metastatik kolon adenokarsinom hücre hatlarında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, ekstrelerin içerisinde bulunan kafeoilkinik asit türevlerinin potansiyel anti-kanser etkilere sahip olabileceğini ve kolon kanseri tedavisinin öncüsü olarak kullanılma olasılığının olabileceğini göstermekte ve yine bir kafeoilkinik asit türevi olan sinarin'in de aynı etkileri gösterebileceğini düşündürmektedir. Daha önce DCQA'lerin proliferasyonu ve apoptozu etkileyen



biyolojik aktivitelere sahip olabileceği ve bunu PI3K/Akt sinyal yolunu aktifleştirerek yapabileceği gösterilmiştir (70). Bununla birlikte, bu etkilerin genel toksisiteden kaynaklanıp kaynaklanmadığı veya kanser hücresi seçiciliği sergileyip sergilemedikleri hiçbir zaman değerlendirilmemiştir. Bizim çalışmamızda, kanser hücresine özgü etkilerin tanımlanıp tanımlanamayacağını görmek için de normal insan epitel hücresi olan MCF10A, meme kanseri hücreleri olarak ise MCF7, MDA-MB 231 hücreleri kullanılarak karşılaştırmalı bir yaklaşım ile deneyler yapılmıştır. Çalışmada meme epitel hücre hattı MCF10A ile MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları sinarin muamelesi sonrasında apoptoz ve proliferasyon açısından kıyaslandığında MCF7 hücre hattında daha yüksek oranda hücre canlılığında azalma ve apoptozda artış,MDA-MB-231 hücre hattında ise daha az olduğu tespit edilmiştir (şekil 18-21).

Ayrıca, MCF10A meme epitel hücre hattında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir oranda hücre canlılığında azalma ve apoptoz görülmüştür (şekil 4.12. ve Şekil 4.13.).

Sonuçta literatürden farklı olarak bu bileşiğin normal meme epitelinde ve meme kanseri hücre hatlarında proliferasyon ve apoptoz üzerine etkileri ilk kez karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.Bu sonuca göre sinarin, tümör hücrelerinde apoptozu indüklerken normal hücreler için toksik değildir.

Hücre hatları arasındaki bu farklı sonuçlara yorum getirilirse; bu farklılık kullanılan hücre hatlarının kendilerine has özelliklerinden kaynaklanıyor olması muhtemeldir. Kullanılan hücrelerin özellikleri ile bu durum açığa kavuşur. MCF7 hücre hattı, ER ve PR açısından pozitif iken , MDA-MB-231 hücre hattı bu yönlerden triple-negatif hücre hattı olarak bilinir (71).

Özetle, bu tez sinarin ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun azaldığını ve bu bileşiğin kanser hücreleri için sitotoksik etkiye sahipken normal hücreler için güvenli olduğunu göstermiştir.Çalışma, sinarin bileşeninin, normal ve tümör hücrelerinde paralel olarak tümör seçici sitotoksiste için çalışılmış olması bakımından benzersizdir.

Ulaşılan bu sonuçlar göz önüne alındığında sinarin için gelecek çalışmaların önemi daha fazla anlaşılmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen sonuçların özeti;

1. Sinarin bileşiğinin yapılan MTT testi sonuçlarına göre belirlenen konsantrasyonları 72.saatte, MCF7 ve MDA-MB 231 hücre hatları için MCF10A hücre hattına göre daha çok toksik etki göstermiştir. Bu konsantrasyonlarda MCF10A hücrelerine kıyasla daha fazla MCF7 ve MDA-MB 231 hücresi ölmüştür.

2.MDA-MB 231 ve MCF7 hücrelerinde sinarin bileşiğinin muamelesi ile, Bcl-2 genlerinin ifade seviyelerinin sırasıyla %63 ve %69 oranlarında azaldığı saptanmıştır. PARP 1 antikoru ile muamele sonucu ise, PARP 1 aktifleşerek (cleaved) devreye girdiğini ve kanser hücrelerinin tedaviye yanıt verdiğini göstermiştir.

3. MCF10A hücrelerinin sinarin bileşiği ile muamelesi sonucunda ise, Bcl-2 genlerinin ifade seviyelerinin anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır.

4.Yapılan annexin PI akış sitometri analizleri ise western blot sonuçlarını destekler nitelikte sonuçlar ortaya çıktığını göstermektedir.

5.Ayrıca yapılan koloni testi sonucunda da yine hem MDA-MB 231 hem de MCF 7 hücre hatlarında koloni oluşturmada çok belirgin bir azalma gözlenirken, MCF10A epitel hücre hattında ise onlara kıyasla daha az bir koloni oluşturmada azalma gözlenmiştir.

Özetle, bu araştırma, sinarin'in meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna ve apoptozuna karşı etkili bir bileşik olarak etkili olup olmadığını taramış ve kanser hücreleri için sitotoksik etki gösterirken aynı konsantrasyonlarda normal hücreler için güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Meme kanseri hücrelerinde bcl-2 / PARP 1 gibi apoptoz belirteçlerinin ve annexin testi sonuçlarında önemli derecede anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle sinarin, TNBC'yi tedavi etmek için yeni ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi ve meme kanseri hücre proliferasyonuna ve metastaza karşı koruyucu bir öncü bileşik olarak kullanılabilir sonucuna ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment-from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedicalscience* 2017, 11: 746.
2. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61: 69-90.
3. Jesse W, Verdaras JC, Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier. *Science* 2009,32: 161-5.
4. Balakumbahan R, Rajamani K, Kumanan K. Acorus calamus: an overview. *J Med Plant Res* 2010, 25: 2740–5.
5. Bohm I, Schild H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* 2003, 5: 2-14.
6. Ratham DV, Bhandwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006, 13: 189-207.
7. Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V and Cardinoli A. Globe Artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J Food Sci Nutr Res* 2009, 1: 131-44.
8. Golvano F, Fauci LL, Vitaglione P, Faglione V, Vanella L, Felgines C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cynaridin and related glycosides. *Ann Ist Super Sanita* 2007, 43: 382-93.
9. Gouveia S, Castilho P. Helichrysum monizii lowe: phenolic composition and antioxidant potential. *Phytochem Anal* 2012, 23: 72-83.
10. Slanina J, Táborská E, Bochořáková H, Slaninová I, Humpa O, Robinson WE, Schram KH. New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1, 3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Lett* 2001, 42: 3383-5.
11. Atasever B, Akgün DK, Kuruca S, Turan N, Seyhanli V, Meriçli A. Effects of flavonoids obtained from Cynara syriaca on leukemic cells. *Turk J Pharm Sci* 2003, 32: 143-50.
12. Ernst E, Pittler MH. Safety issues in phytotherapy. *Int J Herb Med* 2000, 21: 70-1.

13. Ebadi M. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, 2<sup>nd</sup> ed. Florida, CRC press, 2006: 325-9.
14. Barnes J, Anderson LA. *Herbal Medicines*, 4<sup>th</sup> ed. London, The Pharmaceutical Press, 2007: 47-9
15. Negro D, Montesano V, Grieco S, Crupi P, Sarli G, De Lisi A, Sonnante G. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *J Food Sci* 2012, 77: 244-52.
16. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*, 4<sup>th</sup> edition, 2010: 7-18.
17. Diamandopoulos GT. Cancer: an historical perspective. *Anticancer Res* 1996, 16: 1595-602.
18. Castagna M, Takai YI, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982, 257: 7847-51.
19. Baran Y, *Kanser Moleküler Biyolojisi*. 1.baskı, İstanbul, Kısayol Yayıncılık, 2018: 1.
20. Burgio E, Migliore L. Towards a systemic paradigm in carcinogenesis: linking epigenetics and genetics. *Mol Biol Rep* 2015,42: 777-90.
21. Weinberg RA, *The Biology of Cancer*, 2<sup>nd</sup> ed. Pennsylvania, Garland Science, 2013: 125-137.
22. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 2003,99: 1-13.
23. Aggarwal BB, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, Sethi G, Bhatt ID, Pandey MK, Shishodia S, Nair MG. From traditional ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2006, 10: 87-118.
24. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol* 2007, 9: 767-76.
25. Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2001, 1: 364-9.
26. Aggarwal BB, Shishodia S, Aggarwal, Bharat B, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, Sethi G, Bhatt ID, Pandey MK, Nair MG. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2006, 71: 1397-1421.

27. Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B: the enemy within. *Cancer Cell* 2004, 6: 203-8.
28. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003, 3: 859-68
29. Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 2002, 21: 8852-61.
30. Fuhrman B, Buch S, Vaya J, Belinky PA, Coleman R, Hayek T, Aviram M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 1997, 66: 267-75.
31. Choi SJ, Park SY, Han TH. Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways and its protective effect against oxidative injury. *Eur J Pharmacol* 2008, 580: 12-8.
32. Colfer WJ (inventors). Artichoke plant patent, PS-MSC0003, 2004.
33. El Senousy AS, Farag MA, Al-Mahdy DA, Wessjohann LA. Developmental changes in leaf phenolics composition from three artichoke (*Cynara scolymus*) as determined via UHPLC-MS and chemometrics. *Phytochemistry* 2014, 108: 67-76.
34. Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V, Cardinoli A. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *Int J Food Sci* 2009, 1:131-44.
35. Kraft K. Artichoke leaf extract recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine* 1997, 4: 369-78
36. National Center for Biotechnology Information. Compound Summary for 1,3-Dicaffeoylquinic acid.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6474640> Son Erişim Tarihi 10 Temmuz 2020.
37. Topal M, Gocer H, Topal F, Kalin P, Köse LP, Gülçin İ, Çakmak KC, Küçük M, Durmaz L, Gören AC. Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016, 31: 266-75.

38. Huntimer ED, Halaweish FT, Chase CC. Proliferative activity of echinacea angustifolia root extracts on cancer cells: interference with doxorubicin cytotoxicity. *Chem Biodivers* 2006, 3: 695-703.
39. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26: 239-57.
40. Mak T. The E. Donnall Thomas lecture apoptosis: "Tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant* 2003, 9: 483-8.
41. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000, 21: 485-95.
42. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000, 157: 1415-30.
43. Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ* 2009, 16: 1053-61.
44. Pucci, B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2000, 15: 291-9.
45. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *J Clin Invest* 2008, 118: 325-31.
46. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999, 187: 127-37.
47. Milas L, Stephens L, Meyn R. Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo* 1994, 8: 665-73.
48. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000, 49: 3-8.
49. Akkus I. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 3. baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1995: 110-7.
50. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Clin Lab Med* 1992, 119: 598-620.
51. Spector A. Oxidative stress and disease. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000, 16: 193-201.
52. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 17: 114-29.
53. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012 5: 9-19.
54. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *MAE Vet. Fak. Derg.* 2016, 1: 65-76.

55. Harvard Medical School Understanding Antioxidants.  
<https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/understanding-antioxidants> Son Erişim Tarihi 14 Nisan 2020
56. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *Int J Cancer* 2015, 136: 359-86.
57. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017, 13: 1387.
58. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 2010, 28: 1684-91.
59. Tsang J, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2020, 27: 27-35.
60. Li Y, Li S, Meng X, Gan RY, Zhang JJ, Li HB. Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients* 2017, 9: 728.
61. Wesolowski R, Ramaswamy B. Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management. *J Liver Res Disord Ther* 2011, 15: 105-15.
62. Van M, Kaspers J, Gertjan JL, Cloos J. Cancer Cell Culture, 3<sup>rd</sup> ed. California, Humana Press, 2011: 237-245.
63. Paulová, H, Paulová, H, Slanina J, Bochořáková H, Táborská E, Strong Antiradical activity of Dicafeoylquinic acids. *BMC Mol Cell Biol* 2000, 7: 2-5.
64. Moreno CM, Arroyave JC, Cortes M, Fabian M, Röthlisberger S. Chemopreventive effect of coffee against colorectal cancer and hepatocellular carcinoma. *International Int J Food Prop* 2019, 22: 536-55.
65. Erikel E, Yuzbasioglu D, Unal F. In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *J Ethnopharmacol* 2019, 237: 171-81.
66. Cui G, Shu B, Veeran S, Yuan H, Yi X, Zhong G. Natural  $\beta$ -carboline alkaloids regulate the PI3K/Akt/mTOR pathway and induce autophagy in insect Sf9 cells. *Pestic Biochem Physiol* 2019, 154: 67-77.
67. Choi SJ, Park SY, Han TH. 14-3-3 $\tau$  associates with and activates the MEF2D transcription factor during muscle cell differentiation. *Nucleic Acids Res* 2001, 29: 2836-42.

68. Zhou Y, Fu X, Guan Y, Gong M, He K, Huang B. 1, 3-Dicaffeoylquinic acid targeting 14-3-3 tau suppresses human breast cancer cell proliferation and metastasis through IL6/JAK2/PI3K pathway. *Biochem Pharmacol* 2020, 172: 13-52.
69. Soykut G, Becer E, Calis I, Yucecan S, Vatansever S. Apoptotic effects of *Corchorus olitorius* L. leaf extracts in colon adenocarcinoma cell lines. *Prog Food Nutr Sci* 2018, 20: 689-98.
70. Bi YM, Wu YT, Chen L, Tan ZB, Fan HJ, Xie LP, Zhang WT, Chen HM, Li J, Liu B. 3, 5-Dicaffeoylquinic acid protects H9C2 cells against oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Food Nutr Res* 2018, 62: 128-37.
71. Neve RM, Chi K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006, 10: 515-27.