



**AVENANTHRAMİDE C’NİN MEME KANSERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep İrem GÜNHAN

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

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

Yüksek Lisans Tezi – 2022

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

**AVENANTHRAMİDE C ‘NİN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep İrem GÜNHAN

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

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

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-
2021-2682 Y. Lisans Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2022**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri Etiyolojisi	3
2.1.1. Meme Kanseri ve Hormonal Bağlantıları	4
2.1.2. Meme Kanseri ve Reaktif Oksijen Türü İlişkisi.....	8
2.1.3. Meme Kanseri Antioksidan Etkisi	10
2.1.4. Fitokimyasallar	14
2.2. Avenantramidler	15
2.2.1. Avenantramidlerin Antiproliferatif Aktiviteleri	18
2.2.2. Avenantramidlerin Anti-inflamatuar Aktiviteleri.....	19
2.2.3. Avenantramidlerin Antikarsinojen Etkileri.....	20
2.3. Avenantramid C	21
2.4. Çalışmanın Amacı	21
3. MATERYAL ve METOT	22
3.1. Kullanılan Materyaller	22
3.1.1. Cihazlar	22
3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	24
3.2.2. Hücrelerin Çözülme Aşaması.....	24
3.2.3. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları	25
3.2.4. Hücrelerin Dondurulma İşlemi.....	25
3.2.5. Hücre Sayımının Yapılması	25
3.2.6. Hücre Proliferasyonu Testi- MTS	26
3.2.7. Tripan Mavisi ile Boyama Testi.....	26
3.2.8. Koloni Oluşturma Testi.....	27

3.2.9. Hücre Döngüsü Analizi için Propidyum İyodür ile Boyama	27
3.2.10. Hücre Ölümünün Belirlenmesi için Yapılan Apoptoz Testleri	28
3.2.11. İnvazyon Analizleri.....	29
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	30
4. BULGULAR	31
4.1. Avn C ile Muamele Edilen Hücreler ve Kontrol Grubunun Hücre Proliferasyonuna İlişkin Bulgular	31
4.2. Avn C ile Muamele Sonrası Hücre Döngüsü Analizlerine İlişkin Bulgular.....	33
4.3. Avn C'nin Uygulanmasıyla Hücre Ölümüne İlişkin Bulgular.....	38
4.4. Avn C ile Muamele Edilen Hücrelerin Klonojenik Testlerine İlişkin Bulgular	40
4.5. Avn C Uygulanması Sonrası Hücrelerin Tripan Mavisi ile Boyanmasına İlişkin Bulgular	42
4.6. İnvazyon Analiziyle Avn C Uygulanmasının Hücreler Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	45
5.TARTIŞMA	48
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53
EKLER	58
EK 1. ÖZGEÇMİŞ	58
EK 2 . ETİK KURUL GEREKLİ OLMADIĞINA DAİR BELGE	59

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca her aşamada çalışmalarına yön veren ve her türlü olanağı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye,

Yüksek lisans eğitimime başladığımda tecrübeleriyle bana yol gösteren, destekleyen ve her zaman cesaretlendiren hocam Sayın Prof. Dr. Başak KAYHAN'a,

Çalışmalarım boyunca ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan, ilgi ve desteğini gördüğüm Dr. Mehmet CÜREOĞLU' na, beni destekleyen, maddi-manevi her şekilde hep yanımda olan aileme, dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2021-2682 no'lu Y.Lisans Projesi ile desteklenmiştir.

Zeynep İrem GÜNHAN

Malatya, 2022

ÖZET

Avenanthramide C ‘nin Meme Kanseri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Amaç: Meme tümörünün oluşumu yüksek seviyede oksidatif stres ve serbest radikal üretimine maruz kalınması sonucu meydana gelmektedir. Artan oksidatif stres ve serbest radikallere karşı etki gösterebilen antioksidan maddeler kanser tedavisinde terapötik etkinlik sağlayabilmektedir. Bu çalışmada antioksidan kökene sahip bir madde olan Avn C’nin *in vitro* olarak meme kanserinde etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda Avn C’nin antioksidan kaynaklı tedavi stratejileri için bir kaynak oluşturabilmesi hedeflenmektedir.

Materyal ve Metot: Bu çalışma, meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde gerçekleştirildi. Avn C’nin antiproliferatif etkilerinin görülebilmesi için hücre canlılığı hakkında bilgi veren MTS yöntemi, hücre ölümleriyle ilgili incelemeler için apoptoz analizi ve Tripkan mavisi ile boyama yöntemleri, hücre döngüsü ile ilgili analizler her iki hücre hattında kontrol grubu hücreleri ve Avn C ile tedavi edilen hücreler için ayrı olarak incelendi. Hücrelere Avn C ile muamele edilmesi sonrası hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerini belirleyebilen klonojenik testler yapıldı. Ayrıca Avn C’nin invazyon üzerinde etkilerinin gözlemlenebilmesi için invazyon analizleri yapıldı.

Bulgular: Avn C’nin meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde uygulanmasıyla her iki hücre hattında da etkinlik gösterdiği belirlendi. Antiproliferatif etkisiyle her iki hücre hattında hücre canlılığını azalttığı, sitotoksik etkisiyle hücre ölümlerine neden olduğu görüldü. Ayrıca MDA-MB-231 hücre hattında hücre döngüsü üzerinde sınırlayıcı etkileri olduğu ve yine aynı hücre hattı için invazyon analiziyle hücrelerin invazyonunu inhibe edici aktivite gösterdiği sonuçlarına ulaşıldı.

Sonuç: Bu tez çalışmasıyla Avn C bileşiğinin meme kanseri hücrelerinde göstermiş olduğu antiproliferatif etkileri, hücre ölümünü tetikleyici aktiviteleri, hücre döngüsünü sınırlayıcı ve invazyonu engelleyici karakteristikleri nedeniyle meme kanseri üzerinde terapötik etkinliği olabileceği önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Avn C, antioksidan, ROS, meme kanseri

ABSTRACT

Researching the Effect of Avenanthramide C on Breast Cancer

Aim: The formation of breast tumor occurs as a result of exposure to high levels of oxidative stress and free radical production. Antioxidant substances that can act against increased oxidative stress and free radicals can provide therapeutic efficacy in cancer treatment. In this study, it is aimed to evaluate the effects of Avn C that a substance with antioxidant origin, in breast cancer *in vitro*. For this purpose, it is aimed that Avn C could be a source for antioxidant-based treatment strategies.

Material and Method: This study was performed on MDA-MB-231 and MCF-7 cells from breast cancer cell lines. MTS method, which provides information about cell viability to see the antiproliferative effects of Avn C, apoptosis analysis and Trypan blue staining methods for cell death studies, cell cycle analyzes for control cells and Avn C treated cells in both cell lines analyzed separately. After treating the cells with Avn C, clonogenic tests were performed to determine the colony forming abilities of the cells. In addition, invasion analyzes were performed to observe the effects of Avn C on invasion.

Results: It was determined that Avn C showed activity in both cell lines when it was applied to MDA-MB-231 and MCF-7 cells from breast cancer cell lines. It was observed that it decreased cell viability in both cell lines with its antiproliferative effect and caused cell death with its cytotoxic effect. In addition, it was concluded that MDA-MB-231 cell line has limiting effects on cell cycle and also showed inhibitory activity against invasion of cells by invasion analysis for the same cell line.

Conclusion: With this thesis, it can be suggested that Avn C compound may have therapeutic effects on breast cancer due to its antiproliferative effects, cell death triggering activities, cell cycle limiting and invasion inhibitory characteristics in breast cancer cells.

Key Words: Avn C, antioxidant, ROS, breast cancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	:American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kùltür Koleksiyonu)
Avn A	:Avenantramid A
Avn B	:Avenantramid B
Avn C	:Avenantramid C
COX-2	:Siklooksijenaz-2
DHA_vD	:DihidroAvenantramid D
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetilsùlfoksit
EDTA	:Etilendiamin tetraasetikasit
EMT	:Epitelyal Mezenkimal Transmisyon
FBS	:Fetal Bovin Serum
FITC	:Floresan isotiosiyanat
LOX	:Lipoksijenaz
PBS	:Phosphate Buffer Saline
PI	:Propidyum İyodür
ROS	:Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Meme kanserli hastalarda yaklaşık 50 yaşlarında bükülme noktasını (Clemmesen's hook) gösteren yaşa özgü insidans oranları (SEER Veritabanı) (10) SEER=Surveillance, Epidemiology and End Results program of the National Cancer Institute	6
Şekil 2.2. BRCA proteinlerinin özellikleri(17).....	8
Şekil 2.3. Doğal, sentetik ve rekombinant avenantramid türlerinin kimyasal yapıları ve isimleri, antranilik asit ve sinamik asitten türetilen yapısal olarak birleşimleri (7)	16
Şekil 2.4. İki fragmentin kombinasyonundan oluşan avenantramidlerin genel yapısı ...	17
Şekil 2.5. Üç esas Avn türlerinin kimyasal yapıları (30)	17
Şekil 2.6. Mayadan türetilen YAvn I ve YAvn II kimyasal yapıları (5).....	18
Şekil 4.1.MTS analizi sonrası plaka görüntüleri.....	31
Şekil 4.2. MTS analizi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan doz-yanıt ilişkisi grafikleri.	32
Şekil 4.3. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde Avn C'nin belirli dozlarla uygulanması sonucu elde edilen verilerin grafik özetleri.....	32
Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücre hattı tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin hücre döngüsü grafiği (A) MDA-MB-231 hücre hattında Avn C'nin yarı maksimal konsantrasyonu ile muamele sonrası elde edilen hücre döngüsü grafiği (B) MDA-MB-231 hücre hattında Avn C uygulanması sonucu hücre döngüsü analizinde elde edilen hücre yüzdelерinin grafik sunumu(C)	34
Şekil 4.5. MCF-7 hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin hücre döngüsü grafiği MCF-7 hücre hattında Avn C IC50 konsantrasyonu ile tedavi sonrası elde edilen hücre döngüsü grafiği MCF-7 hücre hattında Avn C uygulanması sonucunda hücre döngüsü analizinde ulaşılan yüzdeleringrafik gösterimleri.....	36

- Şekil 4.6.** MDA-MB-231 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu kontrol grubunda bulunan hücrelerin grafiği (A) ve Avn C'nin IC50 konsantrasyonu ile tedavi sonrası meydana gelen hücre ölümlerini ifade eden grafik (B) ve MDA-MB-231 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu kuadrantlardaki hücre yüzdelerinin grafik sunumu (C).....38
- Şekil 4.7.** MCF-7 hücrelerinde kontrol grubu olarak tedavinin uygulanmadığı hücrelerde Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu elde edilen grafik (A) ve MCF-7 hücre hattında Avn C'nin IC50 konsantrasyonunda uygulanması sonucu Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesinde ulaşılan grafik (B) ve MCF-7 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu kuadrantlardaki hücre yüzdelerinin grafik sunumu(C)39
- Şekil 4.8.** MDA-MB-231 hücrelerinin tedavi uygulanmayan kontrol grubu ve Avn C ile muamele edilen hücrelerde koloni oluşumları ve MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavi uygulanmayan plaklarda oluşan koloni sayıları ve Avn C ile tedavi sonrası oluşan koloni sayılarının karşılaştırılması.....41
- Şekil 4.9.** MCF-7 hücrelerinin tedavi uygulanmayan kontrol grubu ve Avn C ile muamele edilen hücrelerde koloni oluşumları ve MCF-7 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavi uygulanmayan plaklarda oluşan koloni sayıları ve Avn C ile tedavi sonrası oluşan koloni sayılarının karşılaştırılması.....41
- Şekil 4.10.** MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin tripan mavisile boyanması sonucu hücre sayımlarından elde edilen verilerin grafik sunumu.....43
- Şekil 4.11.** MCF-7 hücre hattında kontrol grubu hücreleri ve Avn C tedavisi uygulanan hücrelerin tripan mavisile boyanması sonucu hücre sayımlarından elde edilen yüzdelerin grafik sunumu.....44

Şekil 4.12. MDA-MB-231 hücre hattında invazyon analizi sonrası kontrol grubu, IC25 ve IC50 konsantrasyonu ile tedavi sonucu elde edilen görüntüleri, MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu hücreleri ve Avn C'nin IC25 ve IC50 konsantrasyonlarıyla tedavi edilen hücrelerin invazyon analizi sonucunda elde edilen verilerin grafik gösterimleri.....45

Şekil 4.13. MCF-7 kontrol grubu hücreleri ve Avn C IC25 ve IC50 konsantrasyonlarıyla tedavi sonucu invazyon analiziyle elde edilen görüntüler.....47



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2. 1. Meme kanseri üç alt türünün patolojik tanımları ve prevalans değerleri.....	5
Tablo 2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	10
Tablo 2.3 Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri.....	10
Tablo 2.4. Bazı Endojen ve Ekzojen Antioksidanların Başlıca Fonksiyonları	12
Tablo 4.1. MTS analizi sonucunda ulaşılan IC50 konsantrasyonları	33



1.GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen malignitelerden biridir ve kansere bağlı ölümlerin çoğunun ana nedenidir(1). Kanser araştırma alanlarındaki önemli gelişmelere rağmen büyük bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir ve biyomedikal araştırma önceliği göstermektedir. Bu kanser türü, son derece heterojen görünmekte ve potansiyel olarak agresif ve kompleks biyolojik özelliklere sahiptir(2).

Meme tümörleri arasında gözlemlenen açık bir biçimde farklı moleküler fenotiplerin sayısı meme tümörlerinin çeşitliliğine dair bir delil sunmaktadır. Meme epitel biyolojisinin farklı moleküler özellikleriyle bağlantılı olabilecek dört grup tanımlanmıştır. Bu dört grup ER+/luminal benzeri, bazal benzeri, normal epitel benzeri, Erb-B2+(3). Daha sonraki çalışmalarda luminal benzeri grup için bir alt sınıflandırma daha belirlenmiştir. Luminal A ve Luminal B olmak üzere iki alt kategoriye ayrılmıştır(4).

Doğal ürünler antikanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi için önemli bir başlangıç noktası sunmaktadır. Antioksidanlar olarak iyi bilinen polifenoller, çok sayıdaki yolak ve mekanizmaların düzenlenmesiyle antikanser etki gösterir(5).

Avenantramidler, çoğunlukla yulafta bulunan polifenollerin bir grubudur. Yulaf, avenantramidler benzersiz bir kaynağıdır ve kendine özgü bileşiği olarak düşünülür(5).

Avenantramidler reaktif türlerin bloke edilmesi aracılığıyla kanseri önlemektedir. Apoptoz ve hücre yaşlanmanın aktivasyonu, hücre proliferasyonunun engellenmesi ve epitel mezenkimal dönüşüm inhibisyonu dahil eden çoklu metabolik yolların modülasyonu ile tedavi edici aktivite sergilemektedirler(5).

Avenantramidler, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antioksidan, vasodilatör aktiviteleriyle, geniş kapsamlı bioaktivitelere sahiptirler(6).

Hem yulaf tanelerinde hem de yapraklarında bulunan yaklaşık olarak 40 farklı avenantramid türü bulunmaktadır. En bol bulunanları Avn A, Avn B ve Avn C'dir(7).

Bir dizi çalışma, bu doğal ürünlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, ayrıca anti-inflamatuvar, anti-irritan, antiaterojenik ve antiproliferatif aktivitelere sahip olduğunu, bunların hücresel oksidatif fonksiyon

bozukluklarını önleyebileceğini veya sınırlayabildiğini nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi oksidatif strese bağlı hastalıkların gelişimi ve kansere karşı koruma sağladığını göstermiştir(7).

Avenantramidler yulaftan ekstrakte edilmiş çözünebilen fenolik bileşiklerden olan fenilpropanoid ve 5-hidroksi antranilik asidin konjugatlarıdır. Avenantramidlerin üç esas isoformundan olan Avn A, Avn B ve Avn C yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Başlıca bu üç isoform, antioksidan, antiproliferatif, antihistamin ve antiinflamatuvar fonksiyonları göstermiştir(8).

Literatürdeki mevcut bilgiler avenantramidlerin kanserin bazı özellikleri üzerindeki etkilerinden dolayı kemoterapötik potansiyele sahip olduğuna işaret etmektedir. Avenantramidler sahip oldukları antiinflamatuvar özellikleriyle pro-inflamatuvar sitokinleri modüle ederek tümör mikroçevresini değiştirebilir ve tümör boyutunu azaltabilir. Ayrıca avenantramidler, hücre döngüsünün ilerleyişini etkileyebilir ve siklinlerin azaltılmasıyla hücreleri durdurduğu görülmüştür(9). Siklin seviyelerini etkileme yeteneğiyle beraber canlılıkta azalmanın belgelenmesi Avn C'nin antiproliferatif olduğunun açığa çıkmasına neden olmuştur(9).

Avn C ile ilgili olarak literatürde verilen antiinflamatuvar, antioksidan ve antiproliferatif özelliklerinden yola çıkarak, Avn C'nin meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü baskılayacağı, apoptozu uyaracağı çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır ve hipotezin doğruluğunun test edilmesi amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir. Meme kanseri etiyojisinin çevreleyen birçok belirsizliğe rağmen, yoğun epidemiyolojik, klinik ve genetik çalışmalar, meme kanseri ile bağlantılı risk faktörleri olarak birtakım biyolojik ve sosyal nitelik tanımlamıştır. Bu özelliklerin başlıcaları, *BRCA1* ve *BRCA2* duyarlılık genlerinin kanıtı, ailede meme kanseri öyküsü, yaş, iyonize radyasyon, alkol tüketimi ve çeşitli hormon ve metabolik faktörlerdir. Hormonal etkiler arasında, yüksek östrojen seviyelerine ve aktif metabolitleriyle bağlantılı bir etiyojistik işlev atfedilmiştir(10).

Yoğun epidemiyolojik araştırmalarla belgelenen ve genel karsinogenez ilkeleri bağlamında görülen meme kanseri risk faktörleri, 3 ana bileşenden oluşan bir etiyojistik modele entegre edilebilir: meme kanseri oluşma olasılığı meme dokusuna özgü erken yaşamda belirlenen kök hücre sayısına bağlıdır. Tüm büyüme arttırıcı mamotropik hormonlar, başlatılan klonların genişleme oranını etkiler ve hamilelik, halihazırda başlatılan hücrelerin replikasyonunu uyarırken, meme dokusuna özgü kök hücrelerin farklılaşması yoluyla uzun vadeli koruma sağlar. Bu bakış açısı, meme kanserinin epidemiyolojisi ve doğal öyküsü hakkında bilinenlerin çoğunu barındırır ve bu kanserin kökeninde erken yaşamın rolünü vurgular(11).

Yüksek düzeyde fiziksel aktivite ve yüksek düzeyde sebze, meyve ve zeytinyağı tüketiminin, muhtemelen endojen östrojen seviyelerini azaltarak meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, kanıtların yetersiz olduğu görüşü de kabul görmektedir. Çalışmaların çoğu, alkollü içecek tüketiminin, östrojen seviyelerini artırarak meme kanseri riskini artırabileceği yönündedir(12).

Kadınlarda meme kanseri insidansı yaşa, meme bezi kitlesine ve endojen ve eksojen hormonlara maruziyete göre değişir. Yaş öngörülen en önemli faktördür. Meme bezinin büyümesini etkileyen hormonal etkiler meme kanseri riskini artırır; örneğin erken menarş ve geç menopoz. Hormonal kontraseptiflere maruz kalma, 51 epidemiyolojik çalışmadan elde edilen verilerle birleştirilmiş ve yeniden analizinde değerlendirilmiştir. Oral kontraseptif kullanıcıları arasında meme kanseri göreceli riskinde küçük bir geçici artış vardır, ancak kullanım tipik olarak meme kanserinin nispeten nadir olduğu genç yaşlarda gerçekleştiğinden, böyle bir artışın genel insidans oranları üzerinde çok az etkisi olacaktır. Buna karşılık,

menopoz hormonu tedavisine maruz kalma, meme kanseri için temel risk daha yüksek olduğunda ortaya çıkar ve epidemiyolojik çalışmalar ve randomize kontrollü araştırmalar, kombine östrojen ve progestojene maruz kalma ile meme kanseri riskinde sürekli bir artış göstermektedir(13).

Meme kanserinin tek bir homojen hastalığı temsil etmediği giderek daha fazla kabul görmekte ve hormon-reseptör durumu önemli klinik ve etiyolojik farklılıkları tanımlamaktadır. Hormon-reseptör konumuna göre meme kanseri risk modellerini karşılaştırmak için farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri olan Rosner ve Colditz modeli hormon-reseptör pozitif ve hormon-reseptör negatif meme kanseri risklerini ayrı olarak tahmin ederken, başka bir yaklaşım olan aynı zamanda meme kanserinin klinik değerlendirmesi için en yaygın kullanılan model olan Gail modeli ise invaziv meme kanseri gelişiminin 5 yıllık mutlak risklerini tahmin etmektedir(14).

2.1.1. Meme Kanseri ve Hormonal Bağlantıları

Meme kanseri tümörlerinin dörtte üçünden daha fazlası hormonal yanıt oluşturur. Bu hormon bağımlılığı hastalığın ilerleyişini ve insidansını belirlemek için çevresel ve genetik faktörlerle etkileşim göstermektedir(10).

Meme kanseri, östrojen veya progesteron reseptör ifadesine ve *ERBB2* gen amplifikasyonuna göre kategorize edilen 3 esas tümör alt türünden oluşmaktadır. Alt türlerin herbirinin farklı risk profilleri vardır ve herbirine özgü farklı tedavi stratejileri bulunmaktadır(11).

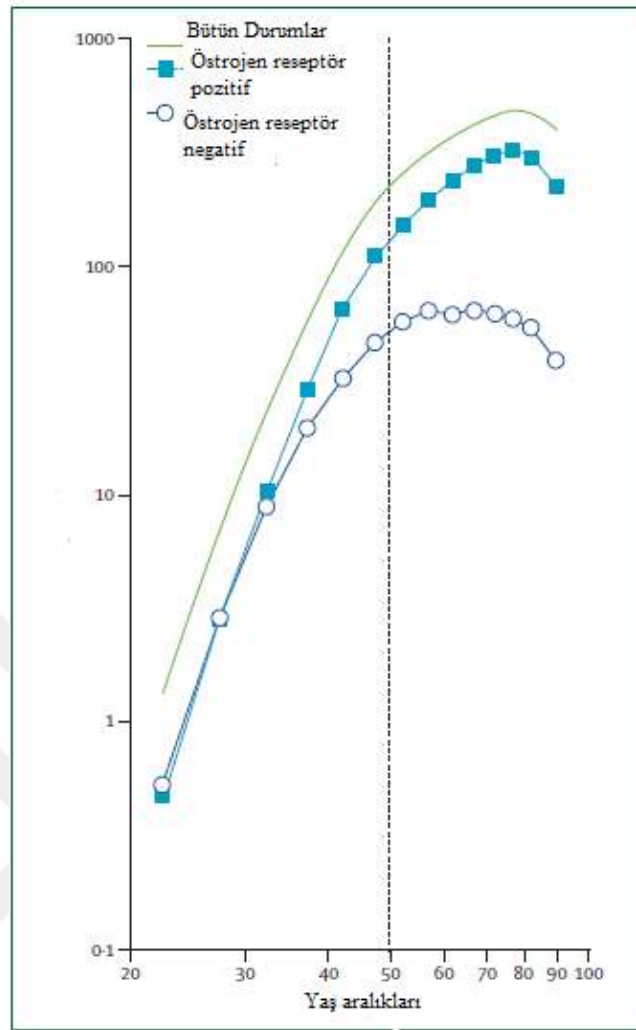
Meme kanseri, human epidermal growth factor 2 ve östrojen veya progesteron reseptörlerinin moleküler markerlarının varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak 3 esas alt türe kategorize edilmiştir. Bu sınıflandırma hormon reseptör pozitif/ERBB2 negatif (HR+/ERBB2-), ERBB2 pozitif (ERBB2+) ve triple-negatif şeklindedir(11).

Tablo 2.1.'de bu türlerin patolojik tanımları ve prevalans değerleri ile ilgili başlıca özellikleri ifade edilmiştir.

Tablo 2. 1. Meme kanseri üç alt türünün patolojik tanımları ve prevalans değerleri (11)

	Hormon Reseptörü (HR)+/ <i>ERBB2</i> -	<i>ERBB2</i> +(HR+ yada HR-)	Üçlü Negatif
Patolojik Tanım	Tümör hücrelerinin >%1 'i östrojen reseptör veya progesteron reseptör proteinini için pozitif	Tümör hücreleri <i>ERBB2</i> proteinini ya da <i>ERBB2</i> genini hücrelerde son derece çoğaltır	Tümör, östrojen reseptör, progesteron reseptör pozitiflik veya <i>ERBB2</i> geninden hiçbir patolojik kriterle uyuşmaz
Moleküler Patogenez	Östrojen reseptörü onkojenik metabolik yolağını aktive eder	Onkogen <i>ERBB2</i> aşırı aktif duruma geçer	Bilinmeyen (büyük ihtimalle çeşitli)
Meme Kanseri Vakalarının Yüzdesi	70	15-20	15

Yaş ve kadın cinsiyeti, 35 ve 39 yaşları arasında hızla artan ve 80'li yaşlardan sonra bir plato noktasına gelen insidans oranıyla meme kanseri için büyük risk faktörleridir. Bununla birlikte, ortalama menopoz yaşı olarak bilinen 50 yaş civarında artış hızı düşmektedir ve yaş spesifik insidans eğrisinde Clemmesen's hook olarak bilinen bir bükülme noktası oluşturmaktadır(10). Clemmesen's hook bükülme noktası Şekil 2.1.'de verilen grafikte görülmektedir.



Şekil 2. 1. Meme kanserli hastalarda yaklaşık 50 yaşlarında bükülme noktasını (Clemmesen's hook) gösteren yaşa özgü insidans oranları (SEER Veritabanı) (10) SEER=Surveillance, Epidemiology and End Results program of the National Cancer Institute

Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi bu geçiş noktası, östrojen reseptörü pozitif ve negatif tümörlerinde iki ayrı hız eğrisi için bir kesişme göstergesi sunmaktadır. Östrojen reseptörü negatif tümörlerin insidansı 50 yaşına kadar hızla artar ve sonrasında düzleşmekte veya azalmaktadır. Buna karşılık, östrojen reseptörü pozitif tümörlerin insidansı 50 yaşına kadar benzerdir, ancak sonrasında daha yavaş bir hızda tırmanmaya devam etmektedir(10).

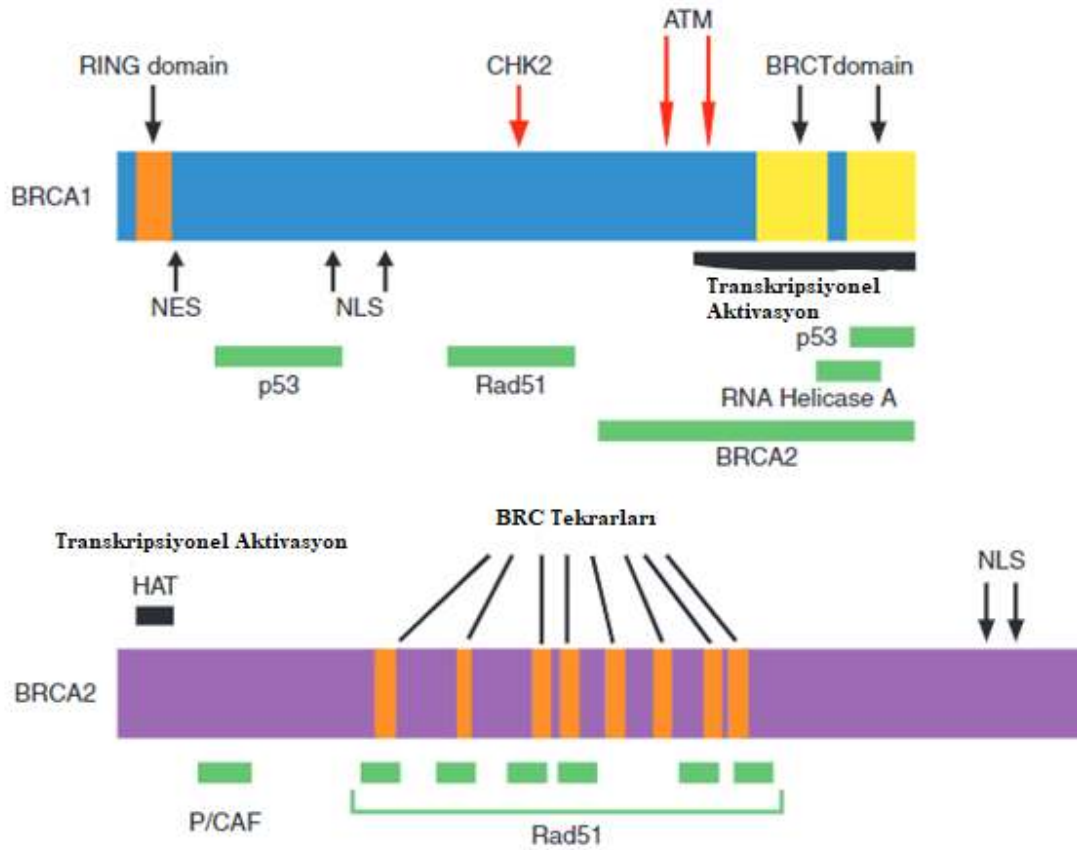
Meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde kanser kök hücre teorisi ve stokastik teori olmak üzere iki hipotetik teori bulunmaktadır. Kanser kök hücre teorisi, bütün tümör alt türlerinin aynı kök hücrelerden ya da progenitor hücrelerden türetildiğini ileri sürmektedir. Kök hücrelerde ya da progenitor hücrelerde edinilen genetik ve epigenetik mutasyonlar farklı tümör fenotiplerine neden olacaktır. Stokastik teori ise her tümör alt türünün tek bir hücre

tipinden (kök hücre, progenitor hücre ya da farklılaşmış hücre) başlatıldığını savunmaktadır. Rastlantısal mutasyonlar herhangi bir meme hücresinde birikebilir ve yeterince mutasyon biriktiğinde tümör hücrelerine dönüşmelerine neden olabilir(12).

Moleküler düzeyde meme kanseri heterojen bir hastalıktır ve moleküler özellikleri *ERBB2* geni tarafından kodlanan HER2 human epidermal growth factor reseptörünün aktivasyonu, hormon reseptörlerinin(östrojen ve progesteron reseptörleri) aktivasyonu veya *BRCA* mutasyonlarını kapsamaktadır(13).

Meme kanseri oluşumuna neden olan bir diğer faktör ailesel yatkınlıktır. Bu noktada en önemli genler, bir hücredeki tümör supresör genlerin işlevini yerine getiren *BRCA1* ve *BRCA2* genleridir(14) Bu genlerdeki mutasyonlardan meydana gelebilecek mutlak meme kanseri riski yüksektir(15). Neredeyse bütün meme kanserleri, sporadik ya da ailesel yatkınlığa bağlı olup olmaksızın *BRCA1* geni mutasyonu ile ilişkilidir(16).

BRCA1 (BReast-CAnceR susceptibility gene 1) ve *BRCA2* genleri mutant fenotipleri meme kanserine yatkınlık oluşturan tümör supresör genlerdir. Kapsamlı araştırmalar, BRCA proteinlerinin çok sayıda önemli hücresel süreçte yer aldığını göstermiştir. Özellikle, her iki gen de DNA hasarına yanıt olarak DNA onarımına ve transkripsiyonel düzenlemeye katkıda bulunmaktadır. Son çalışmalar, kromozomal stabilitenin korunması için BRCA proteinlerinin gerekli olduğunu ve böylece genomu hasardan koruduğunu göstermektedir. Yeni elde edilen veriler ayrıca BRCA proteinlerinin DNA onarımı, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili bazı genleri transkripsiyonel olarak düzenlediğini göstermektedir(17).



Şekil 2.2. BRCA proteinlerinin özellikleri(17).

Şekil 2.2.'de verilen resimde BRCA proteinlerinin yapıları ve konformasyonlarında yer alan esas elemanlar görülmektedir. *BRCA1*, N-terminal RING alanını, nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) ve iki C-terminal BRCT alanını içerir. Etkileşen proteinler, bağlanma bölgelerinin altında yeşil çubuklar ile gösterilmiştir. CHK2 veya ATM tarafından fosforile edilmiş alanlar kırmızı oklarla belirtilmiştir. *BRCA2*, BRC motifinin sekiz tekrarını içermektedir. Rad51, yeşil çubuklarla gösterilen sekiz BRC tekrarından altısına doğrudan bağlanmaktadır(17).

2.1.2. Meme Kanseri ve Reaktif Oksijen Türü İlişkisi

Moleküllerin oksidasyonu ve indirgenmesi kapsayan kimyasal reaksiyonlar her hücrede meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu serbest radikallerin oluşumu gözlenebilmektedir. Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, bağımsız olarak var olabilme yeteneğine sahip bir kimyasal türdür. Böylelikle bu serbest radikaller, çeşitli organik substratlarla tepkime verecek mevcut elektronlara sahip olduklarından son derece kararsız moleküller olarak bilinmektedir(18).

Aerobik organizmalar tarafından moleküler oksijenin kullanılması, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen oksijen içeren birtakım reaktif türlerin oluşumuyla sonuçlanır(18). ROS, ökaryotik hücrelerde hem enzimatik hem de enzimatik olmayan sistemler tarafından üretilmektedir aynı zamanda hücrel fizyoloji ve patofizyolojide önemli rol oynamaktadır(19).

Oksijen içeren reaktif türler olarak tanımlanabilen bu terim, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), singlet oksijen (1O_2), peroksil radikali ($LOO^{\bullet}$), alkoksil radikali ($LO^{\bullet}$), lipid hidroperoksit ($LOOH$), peroksinitrit ($ONOO^-$), hipokloröz asit ($HOCl$) ve ozon (O_3) gruplarını dahil eden kolektif bir terimdir(18).

Fizyolojik konsantrasyonları hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için çok kritik olmakla beraber, aşırı ROS üretimi hücreler için hasar verici olabilmektedir ve nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların gelişimi için kilit unsurlar olarak düşünülmektedir. Kanser hücreleri genellikle, daha yüksek ROS seviyelerine maruz kaldığında, devam eden çoğalma, ölümden kaçınma, anjiyogenez, yayılabilirlik ve metastaz için uyaran yoluyla malignant fenotipi uyatabilmektedir(19).

Canlı organizmaların gelişmesi, canlılığı veya yaşlanması için gerekli mekanizmaların altında ROS'lerinin intrinsik biyokimyasal özellikleri bulunmaktadır(20).

Belirli bir bölgede ROS varlığı, çeşitli kaynaklardan üretimi ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması arasındaki dengeden ileri gelmektedir. Bu sistemin dengesizlik durumu pro-oksidant bir çevreye neden olabilir. Bu durum oksidatif stres olarak karakterize edilmiştir. ROS aşırı üretimi veya yetersiz antioksidan aktivitesinin olduğu koşullarda bu tür dengesizlik durumları meydana gelmektedir(19). Oksidatif stres oluştuğunda, çeşitli hücre organellerinde DNA ve protein alterasyonları gibi kimyasal değişikliklere neden olabilen, yüksek oranda reaktif oksijen türlerin aşırı üretimiyle sonuçlanabilmektedir(26).

Meme hücrelerinin genomundaki değişiklikler, büyük olasılıkla hasar görmüş hücrelerin reseptör aracılığıyla proliferasyonu ile östrojen kaynaklı oksidatif stres tarafından oluşturulan ROS'un kombinasyon halinde oluşturduğu ROS oksidatif saldırısı ile gerçekleşmektedir(19).

Tablo 2.2.'de serbest radikaller olarak gruplandırılan reaktif oksijen türleri ve eşlenmemiş elektronlarını belirten simgeleri birlikte gösterilmektedir. Hidroksil, süperoksit, nitrikoksit ve tabloda bulunan diğer serbest radikaller eşleşmemiş tek elektrona sahiptir.

Tablo 2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) (26)

Serbest Radikaller	
Hidroksil	$\text{OH}\cdot$
Superoksit	$\text{O}_2\cdot^-$
Nitrik Oksit	$\text{NO}\cdot$
Thiyl	$\text{RS}\cdot$
Peroksil	$\text{RO}_2\cdot$

Tablo 2.3.'de radikal olmayan kategoride bulunan reaktif oksijen türleri ve sembolleri verilmiştir.

Tablo 2.3. Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri (26)

Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri	
Peroksinitrit	ONOO^-
Hipokloröz asit	HOCl
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Singlet oksijen	$^1\Delta_g(^1\text{O}_2)$
Ozon	O_3
Lipid peroksit	LOOH

2.1.3. Meme Kanseriinde Antioksidan Etkisi

Hücreler, kendilerini oksidatif strese karşı savunmak için antioksidanlar olarak adlandırılan enzimatik ve enzimatik olmayan bileşikleri kullanmaktadır(26). Antioksidan terimi, ROS eliminasyonunda görev alan bir enzim veya kofaktörü nitelendirmek için kullanılan bir ifadedir(21). Antioksidan bileşikleri, ROS'ü azaltma yeteneğine sahiptir.

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere köken alma şekillerine göre sınıflandırılmaktadırlar(22).

Antioksidanlar, ROS yıkımı yada dengeli seviyede tutulması için gerekli olan fazla bir elektron sağlamaktadırlar. Dolayısıyla ROS'un kararlı bir halde, dengede kalmayı sürdürebilmesi ve kanser hücreleri için antioksidan üretilmesini kaçınılmaz hale getirmektedir (23).

Modern tıp, kanser problemlerini azaltmak için öncelikle kanser önleyici özelliklere sahip bileşikler üzerinde yoğunlaşmıştır. Son dönemlerde modern tıp, kanserin doğal besin bileşenleri ile önlenmesi ve tedavi edilmesini vurgulamaktadır. Doğal polifenolik bileşikler olarak flavonoidlerin anti-kanser, anti-inflamatuvar aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli özellikleri kanıtlanmıştır(24).

Flavonoidlerin, proliferasyon, apoptoz ve anjiyogenez metabolik yollarının modülasyonu yoluyla tümör hücrelerinin üstesinden geldiği yakın zamanda bulunmuştur(24).

Fitokimyasallar, antioksidan aktiviteleri ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleme yetenekleri sebebiyle alternatif terapötik ajanların geliştirilmesine yol gösterebilmektedir(25). Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile bir substratın oksidasyonunu geciktirebilir veya engelleyebilmektedir(26). Endojen olarak tanımlanan antioksidan molekülleri içten sentezlenebilirken, ekzojen olarak ifade edilen antioksidan molekülleri tüketim yoluyla alınabilmektedir. Antioksidanlar, etki mekanizmalarına bağlı olarak iki gruba ayrılabilir. Bu iki grup, zincir kırıcı antioksidanlar ve önleyici antioksidanlar olarak ifade edilmektedir(26).

Önleyici antioksidanlar zincir başlama hızını azaltırken zincir kırıcı antioksidanlar zincirin yayılmasına müdahale ederek aktivite göstermektedir. Önleyici antioksidan sistemler, serbest radikallerin ve aktif oksijen türlerinin kontrolsüz oluşumunu veya biyolojik yapılarla reaksiyonlarını engelleyebilmektedir(26).

Zincir kırıcı antioksidanlar ROS uzaklaştırabilme yetkisine sahiptir ve kendi içerisinde alt kategorilere ayrılmaktadır. Alt kategorilerden birincisi küçük molekül antioksidanlar olarak nitelendirilen grup, C vitamini veya glutatyon gibi suda çözünebilir bileşikler hem de E vitamini, karotenler, lipoik asit ve koenzim Q10 gibi yağda çözünen bileşikler içerisinde barındırmaktadır. İkinci grup ise hücreler tarafından sentezlenen süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerini dahil etmektedir. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit(O_2^-) iyonunu, katalaz enzimi hidrojen peroksiti(H_2O_2) ve glutatyon peroksidaz enzimi ise hücresel peroksitleri detoksifiye ederek fonksiyon göstermektedir. Bu enzimler

sayesinde hücre, oksidatif strese karşı koyabilmekte ve yıkım için hasarlı molekülleri hedefleyebilmektedir(26).

Tablo 2. 4. Bazı Endojen ve Ekzojen Antioksidanların Başlıca Fonksiyonları (26)

Zincir Kırıcı Antioksidanlar	Önleyici Antioksidanlar
Albumin, bilirubin, ürik asit	Metallotionin, transferrin
Vitamin C, Vitamin E, karotenler,lipoik asit	Koeruloplasmin, myoglobin, ferritin
Koenzim Q ₁₀ , glutatyon, flavonoidler	Selenyum, flavonoidler
	EDTA (etilendiamin tetraasetat)
	DTPA (dietilenetriamin pentasetat)
Enzimatik antioksidanlar: superoksit dismutaz,	
Katalaz, glutatyon peroksidaz	

Tablo 2.4.'de reaktif oksijen türlerini uzaklaştırabilme yetkisine sahip zincir kırıcı antioksidanlar ve zincirin başlama hızını azaltarak etki gösteren önleyici antioksidan örnekleri verilmiştir.

Diyet ve kanserden korunma arasındaki ilişki bitki kaynaklı fitokimyasallar ve bunların antikanser aktiviteleri arasındaki dinamik ilişkiyi gösteren pek çok çalışma tarafından desteklenmektedir(36). Flavonoidler, insan sağlığını geliştirici yararları bulunan bitkilerden türetilen doğal ürünlerdir(27). Flavonoidler, yapı ve özellikler bakımından geniş çapta farklılıklar gösteren çok sayıda polifenol grubudur(28). Fenolik bileşikler, bitki metabolizmasının başlıca ikincil ürünü olmakla beraber, bir veya daha fazla hidroksil grubu (fenolik birim) taşımakta ve en az bir aromatik halkadan oluşmaktadır. Kimyasal yapıları basit bir fenolik molekülden (fenolik asitler) karmaşık yüksek moleküler ağırlıklı bir polimere (polifenoller) kadar değişebilir(7). Polifenol bileşikleri doğal eksojen antioksidanlardır. Yiyeceklerle alındığında değişime uğramadan emilim gösterir veya hidroksilasyon, metilasyon, sülfatlama yoluyla metabolize edilirler(28).

Deneyisel araştırmalara göre, flavonoid bakımından zengin beslenme ile düşük BRCA riski arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Bu sebepten, doğadan elde edilen bileşikler, kanser araştırma alanında odak noktası konumundadır(24).

Flavonoidler, anti kanser fonksiyonlarıyla doğrudan veya dolaylı olarak metabolik yolları modüle edebilmektedir. Biyoflavonoidlerin anti östrojenik özelliklerinin keşfi ile biyoflavonoid etkinliğinin östrojen agonisti veya antagonisti olabilme potansiyeli araştırma konusunda dikkat çekmektedir(24).

Lif bakımından zengin ve işlenmemiş gıdaların kanser dahil olmak üzere birçok hastalık riskini azalttığı çalışmalarla açıklığa kavuşturulmuştur. Doğal rnlerin çoklu hücresel hedeflerle sinerjik olarak etkileşime girme yeteneği, kanser patogenezinin karmaşıklığına karşı etki mekanizması sağlayabilir. Ayrıca, doğal bileşikler, geleneksel kemoterapötik ilaçlara nazaran genellikle daha iyi bir güvenlik profili ile nitelendirilmiştir(5).

Mevcut araştırma verileri, tam tahılların daha önce bilinenden daha fazla antioksidan fitokimyasal içerdiğini ileri sürmektedir. Tam taneli tahıllar, benzoik ve sinnamik asitler, antosiyanidinler, kininler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar ve aminofenolik bileşiklerin türevlerini içeren fenolik bileşiklerin bol miktarda bulunduğu kaynaklardır. Mineraller, eser elementler, vitaminler, karotenoidler, polifenoller, alkilresorsinoller, betain, kolin, kükürt içeren amino asitler, lignanlar ve avenantramidler tam taneli tahıllarda bulunan ve beslenme yollarıyla alınabilen antioksidanlardır. Çoğunlukla kepek ve tohum kısımlarında yer almaktadırlar ve farklı antioksidan mekanizmalarına sahiptirler(29).

Bu mekanizmalar, çoklu doymamış lipidlerin oksidasyonunun (E vitamini) nlenmesini, plazma homosistein konsantrasyonunun azaltılmasını (B9 vitamini, betain, kolin), süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve tioredoksin (Zn, Fe, Se, Cu, Mn) gibi antioksidant enzimlerin kofaktörü olarak rol almasını veya eşleşmemiş elektronların (E vitamini, polifenoller, alkilresorsinoller) stabilizasyonu ve delokalizasyonunu kapsamaktadır. Tam taneli tahıl antioksidanları, suda ve yağda çözünebilme özelliğine sahiptir(29).

Yulaf, antioksidan aktivitesi gösteren pek çok molekülü içerisinde bulundurmaktadır. Bu moleküllerin bir türü olan avenantramidler, polifenollerle yapısal benzerlik göstermekte, ancak kafeik asit veya vanilin gibi diğer yulaf fenolik bileşiklerinden 10-30 kat daha fazla antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir(5). Tahıl antioksidatif fitokimyasallarının sağlığa olan yararlarını mümkün olan en büyük dereceye yükseltmek ve daha ileri boyuta taşımak için daha fazla çalışma gereklidir(29).

2.1.4. Fitokimyasallar

Fitokimyasallar, meyvelerde, tahıllarda ve sebzelerde bol miktarda bulunan besleyici olmayan biyoaktif ikincil bileşiklerdir. Fitokimyasalların tüketimi, kardiyovasküler hastalık, nörodejeneratif hastalık ve kanser gibi kronik hastalıklara karşı koruma sağlayabilmektedir (29, 50).

Fitokimyasallar çeşitli bitkilerden elde edilmekte ve hem geleneksel hem de modern ilaçlar olarak hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır(29, 51).

Fitokimyasalların metabolizması çoğunlukla fitokimyasalların formuna ve fitokimyasalların metabolizmasındaki kişiye özgü varyasyonlara bağlıdır. Fitokimyasalların metabolizmasını ve farmakokinetiğini anlamak, çeşitli hastalıkların tedavisi için bitki bazlı ilaçların uygulanmasına yardımcı olabilir(29, 52).

Proinflamatuvar gen ekspresyonlarının doğal modülatörleri olarak, meyve, sebze ve baklagillerden elde edilen fitokimyasallar, çeşitli nutrasötiklerin ve farmasötiklerin yeni biyoaktif anti-inflamatuvar formülasyonlarına dahil edilebilir(29, 53).

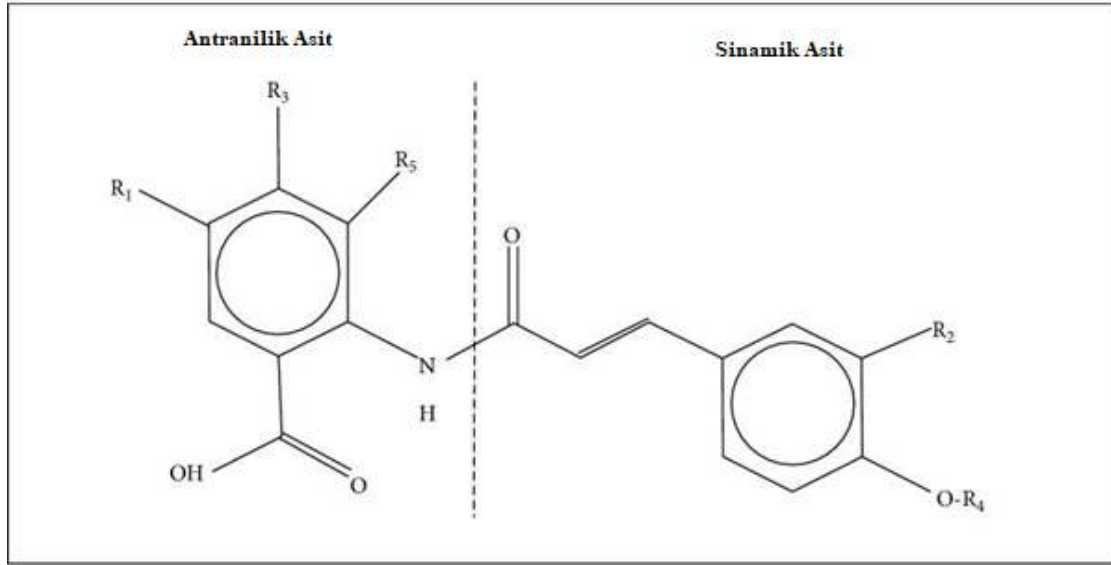
Son olarak, bu fitokimyasallar, insan sağlığı durumunun iyileştirilmesi için doğal tedavi stratejisi olarak tartışılmaktadır. Meyve ve sebzelerdeki fenolikler ve triterpenoidler, diğer bileşiklerden daha yüksek anti-inflamatuvar aktivite göstermektedir. Gıda baklagillerinde, lektinler ve peptitler çoğu durumda anti-inflamatuvar aktiviteye sahiptirler. Bununla birlikte, meyveler, sebzeler ve baklagillerden elde edilen fitokimyasalların anti-inflamatuvar aktivitesi hakkında çalışmalar bulunmaktadır (29, 54).

2.2. Avenantramidler

Yulaf, (*Avena sativa*) antik çağlardan beri besin değerlerinin yüksek olmasıyla ve sağlığa olan faydaları ile bilinen bir tahıldır. Yulaf, Poaceae (veya Gramineae) familyasında bulunan tam taneli tahıl ürünüdür. *Avena sativa* ve *Avena nuda* olarak adlandırılan yulafın iki ana türü doğal olarak yetişmektedir. Tokoferoller, tokotrienoller ve flavanoidler gibi yüksek antioksidan aktiviteye sahip farklı moleküler bileşenleri içerisinde bulundurmaktadır. Ayrıca, avenantramidler, antranilik asit ve hidroksisinamik asit bileşenleri içeren fenolik amidler için özgün bir kaynaktır. Antioksidan, anti-inflamatuar ve antiproliferatif etkileri nedeniyle dikkat çekici niteliklere sahiptir(7).

Yulafın lif içeriği, besin değerleri ve sağlığa faydaları oldukça yüksektir. Tam tahıllı yulaflar, oleik ve linoleik asitler dahil olmak üzere yüksek derecede doymamış lipidler (toplam yağ asitlerinin yaklaşık %40'ı ve %36'sı) uygun bir esansiyel amino asit bileşimine sahip proteinler ve yüksek β -glukan içeriğine sahip diyet lifleri içeren makrobesin bileşiminden oluşmaktadır(7).

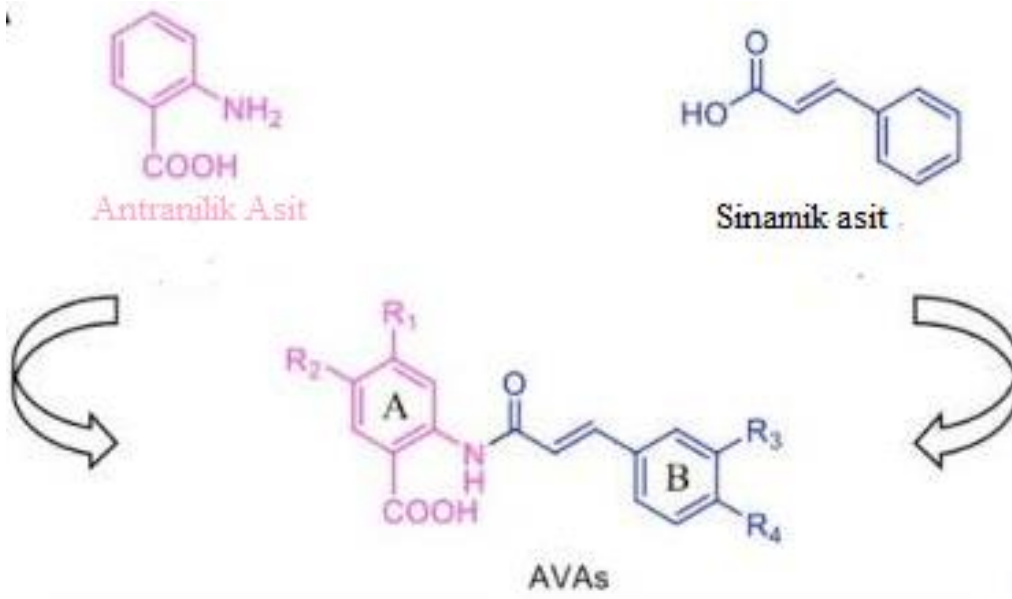
Yulaf, antiinflamatuar ve hücre çoğalmasını önleyici özelliklere sahip aynı zamanda güçlü antioksidan olması yönüyle bilinen, bir grup polifenolik bileşik olan avenantramidleri içerisinde barındırmaktadır(30). Avenantramidler, bir N-sinnamoilantranilik asit grubudur, ayrıca N-sinnamoilantranilat alkaloidleri veya antranilik asit amidleri olarak da bilinmektedirler(7, 30). Avn'ler, bir hidroksisinamik aside bir amid bağı ile bağlanmış bir antranilik asitten oluşan düşük moleküler ağırlıklı fenolik amid bileşikleridir(7). Avenantramidler ilk olarak patojenik mantar *Puccinia coronata* tarafından enfekte edilmiş yulaf yapraklarındaki fitoaleksinler olarak tanımlanmıştır ancak daha sonra yulaf tanelerinde anlamlı düzeyde bulundukları keşfedilince çok farklı yönlerinin olduğu açığa çıkmıştır(30).



İsim	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Yapı
Avn-A	OH	H	H	H		N-(4'-hidroksisinamoil)-5-hidroksiantranilik asit
Avn-B	OH	OCH ₃	H	H		N-(4'-hidroksi-3'-metoksisinamoil)-5-hidroksiantranilik asit
Avn-C	OH	OH	H	H		N-(3'-4'-dihidroksisinamoil)-5-hidroksiantranilik asit
Avn-D	H	H	H	H		N-(4'-hidroksisinamoil)-hidroksiantranilik asit
Avn-E	H	OCH ₃	H	H		N-(4'-hidroksi-3'-methoksisinamoil)-hidroksiantranilik asit
Tranilast	H	OCH ₃	H	CH ₃		N-(3',4'-dimetoksisinamoil)-antranilik asit
Yavn I	H	H	H	H	OH	N-(4'-hidroksisinamoil)-3-hidroksiantranilik asit
Yavn II	H	OH	H	H	OH	N-(3'-4'-dihidroksisinamoil)-3-hidroksiantranilik asit

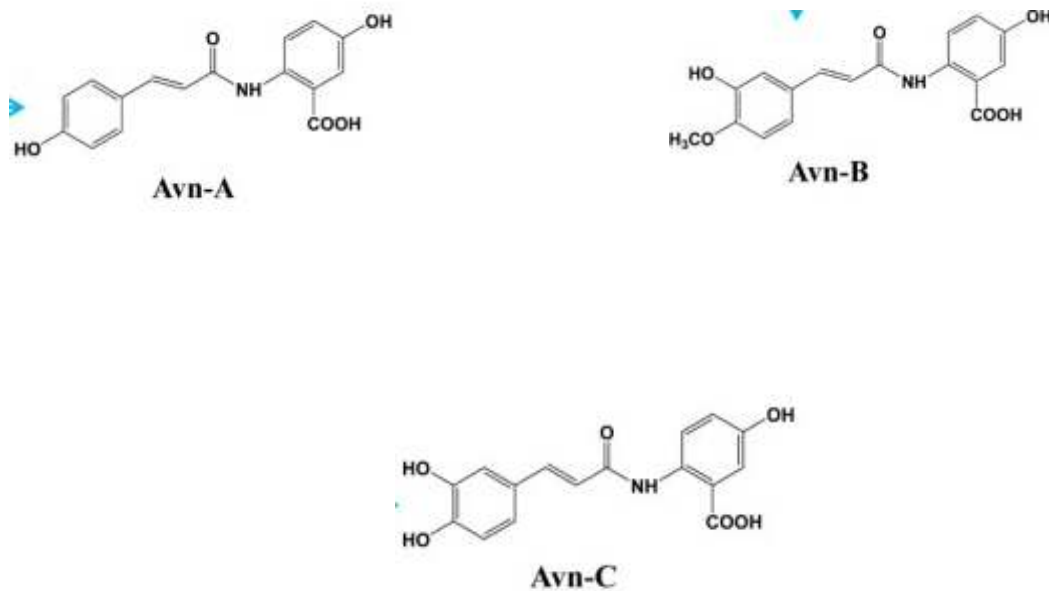
Şekil 2. 3. Doğal, sentetik ve rekombinant avenantramid türlerinin kimyasal yapıları ve isimleri, antranilik asit ve sinamik asitten türetilen yapısal olarak birleşimleri (7)

Şekil 2.3.'de kimyasal yapılarından görüldüğü gibi avenantramidler, molekülün sol tarafının antranilik asitten ve sağ tarafının ise sinamik asitten türetildiği yapısal olarak iki fragmentin birleşiminden meydana gelen ve yerdeğiştirebilen N-sinnamoil antranilik asitlerdir(5). Bu özel yapı ve yer değiştirme modelleri baz alınarak yer değiştiren her molekülle harf ve sayıları ilişkilendiren sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir. Bu adlandırmaya göre üç esas sinamik asit türevleri kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit olarak belirlenmiştir. Bu noktadan temel alınan harflendirmeye göre kafeik asit için c harf, ferulik asit için f harf ve p-kumarik asit için p harf kullanılmasıyla köken alınan bileşiği işaret etmektedir(5). Şekil 2.4.'de avenantramid bileşiğinin genel yapısı verilmiştir.



Şekil 2. 4. İki fragmentin kombinasyonundan oluşan avenantramidlerin genel yapısı (5)

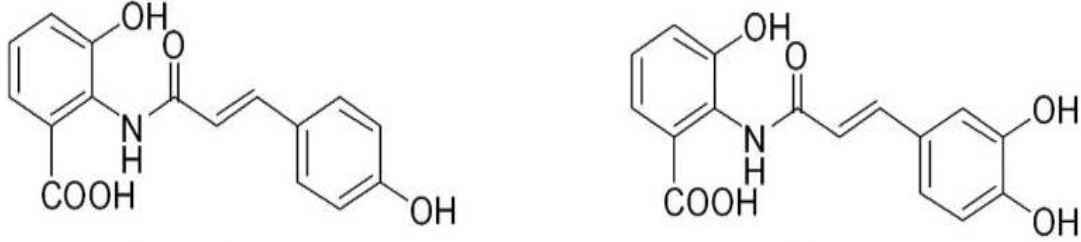
En bol miktarda bulunan Avn türleri sırasıyla 5-hidroksiantranilik asidin p-kumarik, ferulik ve kafeik hidroksisinamik asitlerle amidleri olan Avn-A (N-(4'-hidroksisinnamoil)-5-hidroksiantranilik asit), Avn-B (N-(4'-hidroksi-3'-metoksisinnamoil)-5-hidroksiantranilik asit) ve Avn-C (N-(3'-4'-dihidroksisinnamoil)-5-hidroksiantranilik asit) olarak belirtilmiştir(7). En yaygın olan bu üç Avn formunun kimyasal yapıları Şekil 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2. 5. Üç esas Avn türlerinin kimyasal yapıları (30)

Avn'lerin potansiyel terapötik uygulamaları göz önüne alındığında, endüstriyel boyutta üretilmelerine imkan sağlamak için alternatif olarak yapay sentez stratejileri geliştirilmiştir.

Avn'ler, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Escherichia coli* dahil olmak üzere genetik olarak tasarlanmış mikroorganizmalar yoluyla üretilmektedir. Rekombinant Avn, YAvn I N-(4'-hidroksisinnamoil)-3-hidroksiantranilik asit ve YAvn II N-(3'-4'-dihidroksisinnamoil)-3-hidroksiantranilik asit bu yöntemle üretilen mayadan türetilmiş Avn türlerindendir(5). Şekil 2.6.'da rekombinant Avn türlerinin yapıları yer almaktadır.



Şekil 2. 6. Mayadan türetilen YAvn I ve YAvn II kimyasal yapıları (5)

Avn'lerin farklı formları yulaftan ekstrakte edilebilir, kimyasal sentez yoluyla üretilbilir ya da maya hücrelerinde rekombinant DNA teknikleri ile üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Sentetik olarak üretilen TranilastTM(N-[3',4'dimetoksisinnamoil]-antranilik asit Avn türü ise farmasötik ilaç olarak organik sentez metodolojileri kullanılarak yapay olarak üretilen avenantramid analogu olma özelliği taşımaktadır(7).

2.2.1. Avenantramidlerin Antiproliferatif Aktiviteleri

Literatürde belirtilen kesin kanıtlar, Avn 'nin insan kolon ve meme kanseri hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri (VSMC) gibi farklı hücre hatlarının proliferasyonunu önemli ölçüde engelleyebildiğini işaret etmektedir(7). Avn' nin farklı kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisinin test edilmesiyle, Avn ile zenginleştirilmiş yulaf ekstraktının, Avn C ve Avn C'nin metil-ester türevinin, CaCo-2, HT29, LS174T ve HCT116 hücreleri dahil olmak üzere kolon kanseri hücre hatları üzerinde etkili olduğu görülmüştür(31).

Ayrıca, Avn analogu olan Tranilast'ın, proliferasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve kanser hücrelerinin invazyonu üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Son elde edilen kanıtlara göre rekombinant YAvn I ve YAvn II'nin, intrasellular ROS

seviyelerini ve siklin D1 ekspresyonunu azaltma kapasitelerinin artması nedeniyle, daha güçlü antiproliferatif özelliklere sahip olduğu açıklığa kavuşturulmuştur(7).

2.2.2. Avenantramidlerin Anti-inflamatuar Aktiviteleri

Avenantramidlerin anti-inflamatuar özellikleri birçok çalışmada gözlemlenmiştir(32). Anti-inflamatuar etkilerini, çeşitli potansiyel mekanizmalar üzerinden uygulamaktadırlar(33). Avn C ve metillenmiş türevi, endotel hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunun baskılanması yoluyla proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Yakın tarihli bir protein-ligand yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyon çalışması, Avn C'nin iskelet kas hücrelerinde IKK β aktivitesini azaltarak NF- κ B aracılı inflammatuar yanıtı güçlü bir şekilde inhibe ettiğini ileri sürmektedir(8).

Yapılan bir çalışmada, çeşitli mast hücreleri (RBL-2H3, mBMMC ve RPMC) kullanarak mast hücre degranülasyonunu araştırmak ve Avn C anti-alerjik ve anti-inflamatuar etkilerini analiz etmek için β -heksosaminidaz ve histamin testi yapılmıştır. Bu çalışmada, antijen ile uyarılan β -heksosaminidaz ve histamin salınımının Avn C tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Bu nedenle, Avn C'nin mast hücre degranülasyonunu baskılayarak anti-alerjik ve anti-inflamatuar etkiler gösterebileceği öne sürülmüştür. Avn C'nin, NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu ve proinflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ettiği bu çalışmada elde edilen bir diğer bulguyu işaret etmektedir(8).

Avn takviyesi alan kadınlarda, NF κ B aktivasyonu, plazma IL-6 konsantrasyonu, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesi ve glutatyon seviyelerinde önemli bir artış gösterdiği çalışmalarla görülmüştür(32).

Anti-inflamatuar etkileri için, çoklu doymamış yağ asitlerinin inflammatuar süreçlerde yer alan güçlü sinyal moleküllerine oksijenlenmesini katalize eden lipoksijenazların (LOX) inhibisyonu bir diğer etki mekanizmaları olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmadaki bir başka hipotez, Avn'lerin memelilerde LOX ve/veya siklooksijenaz (COX-2) enzimlerini inhibe edebileceği ve böylece lökotrienler ve prostaglandinler gibi pro-inflamatuar bileşiklerin üretimini azaltabileceğidir(33).

Yapılan başka bir çalışma, Avn C'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde sirtuin1 aktivasyonu yoluyla hipoksi kaynaklı siklooksijenaz-2 ekspresyonunu baskıladığına dair deliller sunmaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Avn C'nin A549 hücrelerinde SIRT1 yoluyla hipoksi ile indüklenen COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiğini görülmektedir. Avn C'nin, COX-2 protein seviyelerinde ve promotör aktivitesinde hipoksi

kaynaklı artışı bastırıldığı ve SIRT1 aktivasyonu yoluyla COX-2 ekspresyonunun hipoksik indüksiyonunu inhibe ettiği dolayısıyla Avn C'nin hipoksi altında akciğer iltihabını önlemede faydalı olabileceğini ileri sürmektedir(34).

2.2.3. Avenantramidlerin Antikarsinojen Etkileri

Avn'lerin antikarsinojenik etkileri çeşitli kanser hücre hatlarında antikanser aktivitelerini değerlendiren birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Kanser gelişiminin tüm aşamalarında yer alan apoptoz, hücre proliferasyonu, metastas gibi çeşitli olayları modüle edebilme özelliği bulunmaktadır(5). Birçok çalışma, yulaftaki biyolojik olarak aktif bileşiklerin pozitif korelasyonuna ve kanserde bir azalmaya neden olduğuna dair işaret etmektedir(35).

Avn 'lerin antitümör aktivitesi ve kanseri önlemesi, cilt kanseri hücrelerine, epitelyal akciğer kanserine ve kolon karsinomuna karşı gözlemlenmiştir. Yulaftaki aktif bileşenlerin akciğer kanseri hücrelerinde normal hücrelere göre sitotoksik olduğu ve oksidatif stresi indüklediği bulunmuştur. Yulafta bulunan benzersiz bir fitokimyasal olan avenantramidlerin zayıflatıcı etkileri, sonuçların yulaf ve yulaf kepeği tüketiminin kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltabileceğini öne sürdüğü bir in vitro çalışmada gözlemlenmiştir. 2014 yılında yapılan sistematik bir inceleme, yulaf veya yulaf kepeğinin kolorektal adenom ve kanser üzerinde bazı önleyici etkileri olabileceği sonucunu öne sürmüştür(32). 2017' yaplan bir çalışmayla antikanser etkiler gösteren *Moringa oleifera* tohumları ve Avn 2f'in kombinasyon halinde hepatokarsinom gelişimine karşı etkili bir kemopreventif kokteyl olabileceği sonucuna varılmıştır(36).

Hücrel yaşlanmanın uyarılması, Avn'lerin tümör supresif aktivitesi için başka bir potansiyel mekanizma olarak kabul edilmiştir. Çalışmayla Avn A'nın, hücrel büyüme boyut ve artan β -galaktosidaz aktivitesi dahil olmak üzere spesifik morfolojik ve biyokimyasal özelliklerle gösterildiği gibi kolon kanseri hücrelerinde (HCT116 ve HCT8) hücrel yaşlanmayı tetiklediği kaydedilmiştir(5).

Başka bir çalışmada ise filizlenmiş yulafın ve fenolik-Avn özütünün azoksimetan /dekstran sülfat sodyum ile indüklenen kolorektal kanser fare modelinde kemopreventif etkisini değerlendirdirilmiştir. Çoklu bileşiklerin sinerjik etkilerinden dolayı yüksek kemopreventif etki gösterdiği sonucu elde edilmiştir(37).

2.3. Avenantramid C

Üç esas isoformdan biri olan Avn C ‘nin yulaf tohumundaki miktarı, Avn A ve Avn B ye göre iki kat daha yüksektir(38). Çoğunlukla yulafta bulunan bir polifenol olan Avn C’nin çeşitli biyolojik özellikler sergilediği bilinmektedir(8). Bu özellikler, antioksidan, anti-proliferatif, antihistamin ve anti-inflamatuar fonksiyonları içermektedir. Yapılan çalışmalar, büyük ölçüde Avn C’nin bir anti-kanser ilacı olarak kullanma potansiyelini göstermek için yüksek antioksidan etkilerine odaklanmıştır(39).

Hastings ve Kenealey’ in 2017 yılında yaptıkları çalışmaya göre, normal hücreler için belirlenen toksisite olmaksızın Avn C’nin doz sınırlayıcı yan etkileri olmayan yeni bir kemoterapötik olarak kullanmaya olanak tanıyabileceği öne sürülmüştür(9). Ayrıca Avn C ‘nin anti-inflamatuar sitokin seviyelerini azaltarak anti-inflamatuar aktivitelere aracılık etmesi, bir diğer dikkat çekici özelliğidir(34). Bir başka çalışmada, Avn C, intrasellular serbest radikal seviyelerini ve antioksidan gen transkriptlerini azaltarak H₂O₂ kaynaklı oksidatif stresi azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Ek olarak, Avn C’nin, H₂O₂ veya tümör nekroz faktörü-a’ya (TNF-a) yanıt olarak proinflamatuar sitokinleri kodlayan gen transkriptlerinin seviyelerinin azalmasına neden olduğu aynı çalışmayla gözlemlenen bir diğer olgudur(40).

Mast hücre aracılı alerjik inflamasyona karşı Avn C’nin etkinliğini değerlendirmek için yapılan çalışmada, Avn C ‘nin mast hücre aracılı alerjik inflamasyon için olası bir terapötik aday olabileceği öne sürülmüştür(8).

Avn C, hücresel sağlığın genel olarak iyileştirilmesine katkıda bulunan çok yönlü sitoprotektif yetenekler göstermektedir. Bu bileşiğin araştırılması, Avn C’nin potansiyel bir nutrasötik olarak kullanımını daha çok destekleyici veriler sunacaktır(40).

2.4. Çalışmanın Amacı

Literatürde verilen bu bilgilerden köken alarak yapılan bu çalışmanın amacı, meme kanserinde Avn C bileşiğinin etkisinin ne olduğunu gösterebilmektir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Cihazlar

Cihaz	Marka
İnkübatör	Euro Clone Safegrow
Laminar hava akımlı kültür kabini	Euro Clone Safemate 1.2
Mikroskop	Olympus
Santrifüj cihazı	Hermle
Soğutmalı santrifüj	Hermle
Hassas terazi	A&D
Vorteks	Heidolph
Manyetik karıştırıcı	Daihan
Azot tankı	International Cryogenics
Su banyosu	Benchmark
Buz makinesi	Nüve
Spektrofotometre	Emax Plus
Flow sitometri cihazı	Beckman Coulter Cytotflex

Çalışmaların yapılabilmesi için kullanılan cihazlar yukarıda liste halinde gösterilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Kimyasal Madde, Malzeme ve Kitler	Marka
Avenanthramide C	Sigma Aldrich, A.B.D.
Dimetil Sülfoksit	Merck, A.B.D.
Etanol	Merck, A.B.D.
FBS	Capricorn, Almanya
L-glutamin	Capricorn, Almanya
Penisilin-Streptomisin	Capricorn, Almanya
DMEM F12 1:1 mix	Sigma, A.B.D.
PBS	Capricorn, Almanya
Metanol	Merck, A.B.D.
Propidyum iyodür	Chem Cruz, A.B.D.
Mikropipetler	Ependorf, Almanya
CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, A.B.D
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biolegend, A.B.D
Corning Matrigel Invasion Chamber 6 Well-Plate 8.0 Micron	Corning, A.B.D.

Yazılım	Program Adı
Grafik çizim yazılımları	Graph Pad Prism 9
Grafik çizim yazılımları	CytExpert
Referans düzenleme yazılımları	Endnote X8

Kullanılan kimyasal madde, malzeme, kitler ve sonuçların analiz edilmesinde yararlanılan yazılımlar yukarıda gösterilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada, MCF-7 (ATCC® HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) meme kanser hücre hatları kullanıldı. MCF-7 hücre hattı ER, PR ve Her2 hormon reseptörlerinin ekspresyonu durumunda pozitif (ER+, PR+ ve Her2+) olarak belirtilirken MDA-MB-231 hücre hattında bu durum tam tersini işaret etmektedir. ER, PR ve Her2 hormon reseptörlerinin ifadeleri olmaksızın (ER-, PR- ve Her2-) MDA-MB-231, söz konusu hormon reseptörleri için triple negatif olarak belirtilen bir hücre hattı olma özelliği taşımaktadır.

Her iki hücre hattı için, hücre pasajı ve hücre kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmalarında % 10 FBS, 100 µg/ml penisilin-streptomisin ve 2 Mm L-glutamin içeren DMEM:F12 besiyeri kullanıldı.

3.2.2. Hücrelerin Çözülme Aşaması

DMEM:F12 besiyeri +4 C°'den alınarak uygun sıcaklığa gelmesi için su banyosunda 37 C° ye ısıtıldı. -196 C°'de kriyojenik bir ortam sağlayan azot tankında muhafaza edilen hücreler alınarak bir süre çözümleri için beklendi. Ardından, kryovial içinde bulunan hücre süspansiyonu 15 ml 'lik falkon tüplere alınarak üzerine DMEM:F12 besiyeri 4 ml olarak eklendi ve 1500 rpm 5 dakika olarak ayarlanarak santrifüj edildi.

Santrifüj işleminin hemen ardından supernatant kısım uzaklaştırıldı ve pelette bulunan hücre üzerine besiyeri ilave edilerek pipetaj yapıldı. Total hacim 6 ml olmak üzere besiyeriyle tamamlanarak 25 cm²'lik flasklara alındı.

3.2.3. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları

T-25 cm² hücre kültürü flaskaları kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 3 veya 4 günde bir olarak yapıldı. Konfluent durumda olduğu görülen hücrelerin pasajlanması yapılırken ilk olarak hücre kültürü yüzeyinde bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre tabakası üzerine 2 ml tripsin-EDTA(%0.05) eklenerek 37 C°'de bir süre bekletilip flask yüzeyine tutunmuş durumdaki hücrelerin tamamen kalkmaları beklendi. Faz kontrast ışık mikroskobu altında kontrolün ardından kalktıklarından emin olunan hücrelerin üzerine 3 ml besiyeri eklenmesiyle pipetaj yapıldı. Bu hücre ve besiyeri karışımı 15 ml 'lik falkon tüplere alınarak 1500 rpm 5 dakika olmak şartıyla santrifüj edildi. Daha sonra supernatant atılıp pelet üzerine yeni besiyeri ilave edildi. Karışımın homojenliği sağlandıktan sonra tekrar yeni bir T-25 cm²'lik flaska alınarak kültürün devamlılığı sağlandı. Kültürler %5 CO₂ ve %98 nem içeren 37 C°'lik etüvde inkübe edildi.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulma İşlemi

Tek tabaka halinde tutunmanın olduğu bir hücreye uygulanan pasaj işlemleri yapıldı. Dondurulacak hücrenin içinde bulunacağı, %90 FBS ve %10 DMSO olacak şekilde karışım hazırlandı. Tripsinle kaldırılıp santrifüj edilme aşaması sonrası elde edilen pelet üzerine bu karışım eklenerek pipetaj yapıldı. Kryovial tüpler, 1 ml içerik bulunduracak şekilde hücre ve karışımdan alınarak içerisine koyuldu. -80 C°'de bir gün bekletildikten sonra uzun süreli koruma sağlaması amacıyla azot tankına alındı.

3.2.5. Hücre Sayımının Yapılması

Yapılan deneyin şartlarına bağlı olarak, çalışma için gerekli olan 25 cm² 'lik hücre kültür flaskalarına, 6 kuyucuklu ve ya 96 kuyucuklu platelere uygun olarak hücrelerin ekimleri yapıldı. Deneyin ilerlemesi ve sonuçların netliği açısından en önemli unsur olması dolayısıyla her kuyucukta eşit sayıda hücre olmasına dikkat edildi. Buradan hareketle, yapılan deneyin ilk aşamasında belirli sayıda hücre ile başlanması için hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımı için Neubauer lamı kullanıldı. Neubauer lamı üzerinde 16'şar kareden oluşan, hacmi 0.1 µl olan toplam dört alan bulunmaktadır. Toplam dört alandaki kare çizgisi içindeki hücreler sayıldı ve ortalamaları alınarak, alan başına düşen ortalama hücre sayısı hesaplandı. Hücrelerin çok yoğun olduğu gözlemlendiğinde süspansiyon seyreltilerek kullanıldı ve yapılan hesaplama dilüsyon faktörü de dahil edildi. 1 ml'deki hücre sayısı; Ortalama canlı hücre sayısı x dilüsyon faktörü x 10^4 formülü ile hesaplama yapılarak istenen hücre sayısı belirlendi.

3.2.6. Hücre Proliferasyonu Testi- MTS

Hücrelerin proliferasyonu üzerinde, çalışılan maddenin nasıl bir etki gösterdiğinin gözlemlenmesi için 96 kuyucuklu well platelere her bir kuyucuk 1.5×10^3 hücre içerecek şekilde ekimi yapıldı. Ekimi yapılan hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi ve 24 saat sonunda Avn C ile tedavi uygulandı.

Çalışmada esas olarak 72 saatlik bir zaman aralığı periyod seçilerek tedavi edilen hücreler 72 saati tamamlayana dek inkübatörde bekletildi. 72 saatlik zaman diliminin dolmasıyla sonuçların alınması için CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega kiti protokolü uygulandı. Protokole uygun olarak, her bir kuyucuğa 20 µl MTS solüsyonu eklendi. Renk değişiminin olup olmadığı kontrol edilerek, 2 saat inkübatörde bekletildi ve spektrofotometre cihazında 490 nm seçilerek uygun ayarda ölçüm yapıp sonuçlar alındı.

3.2.7. Tripan Mavisi ile Boyama Testi

Canlı hücre ve ölü hücrelerin ayırt edilmesinde, canlılığın belirlenmesi için bir diğer gösterge olan tripan mavisi ile boyama testi yapıldı. Başlangıçta, T-25 cm² flasklara her iki hücre hattı için 1.5×10^5 sayıda hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra, hücre kültür flasklarındaki hücrelere Avn C ile belirlenen dozda tedavi uygulandı. 72 saat boyunca inkübatörde bekletildi.

72 saat sonunda, hücre yüzeyinde bulunan besiyerleri, isimlendirilmiş falkon tüplere ayrı olarak alındı. Tripsin eklenen hücreler, tutundukları yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre kültür flasklarından alınarak falkon tüplere aktarımı yapıldı. Santrifüjde ayarlanan 1.500 rpm

5 dakikaya göre santrifüj edildi. Ardından falkon tüplerden süpernatant kısım atılıp pelet üzerine 1 ml PBS eklenerek pipetaj yapıldı.

Hücrelerin bulunduğu süspansiyon içerisinde 50 µl alınıp, 50 µl trypan mavisi ile karışım haline getirilerek ependorf tüp içinde karışması sağlandı. Neubauer lamı kullanılarak 10 µl bu hücre ve tripan mavisi karışımından alındı ve sayım aşamasına geçildi. Hücre sayımı ile elde edilen veriler sonucunda ortalama olarak canlı hücre ve ölü hücre sayısının yüzdesinin hesaplanması için

$$\left(\frac{\text{Ortalama canlı hücre sayısı}}{\text{Canlı ve ölü hücrelerin toplam sayısı}} \right) \times 100$$

formülü uygulandı. Böylelikle, tedavi uygulanan hücrelerde meydana gelen ölüm ve canlılığı sürdüren hücrelerin oranları belirlenmiş canlılık yüzdesine ulaşılmıştır.

3.2.8. Koloni Oluşturma Testi

6 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğu 5×10^3 sayıda hücre bulunduracak şekilde her iki hücre hattı için hücre ekimi yapıldı ve total hacim 2 ml olmak şartıyla uygun besiyeriyle tamamlandı. Hücre ekimi yapıldıktan bir gün sonra hücrelerin tutunmaları kontrol edildi ve Avn C ile tedavi yapıldı. Avn C ile muamele edildikten 24 saat sonra hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri alınıp yeni besiyeriyle değişimi gerçekleştirildi.

Hücre kültür flaskları bir hafta boyunca inkübatörde bekletilmeye bırakıldı. Canlılık durumları aralıklarla kontrol edildi. Bir hafta sonunda, Avn C ile tedavi yeniden yapıldı ve protokol tekrar edilerek 24 saat sonra besiyeri yeni besiyeri ile değiştirildi.

Hücre kültür flaskları tekrar bir hafta süreyle inkübatörde bekletildi. 14 günün tamamlanmasından sonra hücrelerin yüzeyinde bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. 1 ml PBS ile yıkama yapıldı. 1 ml metanol eklenerek 10 dakika süreyle hücrelerin fiksasyonu sağlandı. Son olarak kristal viole boyası eklenip birkaç dakika beklemeye alındı. Koloni oluşumu gözlenen hücrelerde boyanma meydana geldiği görüldü.

3.2.9. Hücre Döngüsü Analizi için Propidyum İyodür ile Boyama

T-25 cm² kültür flasklarına MDA-MB-231 ve MCF 7 hücreleri için 1.5×10^5 sayıda hücre ekimi yapıldı. Ekimin yapılmasının ardından 24 saatlik süreyle Avn C tedavisi belirlenen IC50 dozu üzerinden yapıldı.

72 saat periyodun tamamlanmasından hemen sonra hücreler üzerinde bulunan besiyeri falkon tüplere alındı. Flasklara tripsin eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması beklendi. Kaldırılan hücreler, falkon tüplere eklendi ve santrifüj yapılması için 1500 rpm 5 dakika seçiminde santrifüj edildi. Santrifüj edilen falkonlardan süpernatant kısım atıldı. Geriye kalan pelet üzerine 1 ml PBS eklendi ve yeniden askıya alındı.

PBS ile yıkanan hücreler tekrar santrifüj edildi. Bu işlemlerin yapılmasından sonra PBS hücre yüzeyinden uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet +4 C°'de bulunan %70 saflıkta soğuk etanol ile süspanse hale getirildi. Bu işlem, falkon tüpler vorteks üzerindeyken etanolün damla olarak yavaş bir şekilde eklenmesiyle gerçekleştirildi.

Falkon tüpler 30 dakika süreyle buz içerisinde bekletildi. 30 dakikanın bitiminden hemen sonra, 1500 rpm 5 dakika santrifüj yapılarak etanol uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1 ml PBS eklendi ve 30 dakika olarak tekrar buz içinde beklemeye bırakıldı. Hücrelerin PBS ile yıkanma işlemi 2 kez yapılarak 30 dakika bekleme süreci tekrar edildi.

Santrifüj yapılmasından sonra pelet üzerine 50 µl Rnase A (stok: 100 µg/ml) eklenip pipetaj yapıldı. Rnase A üzerine 250 µl PI (stok: 50 µg/ml) solüsyonu eklenip tekrar pipetaj yapıldı. Çözelti 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra flow sitometri cihazında uygun ayarda sonuç verileri elde edildi.

3.2.10. Hücre Ölümünün Belirlenmesi için Yapılan Apoptoz Testleri

İlk etapta, T-25 cm²'lik hücre kültür flasklarına, her iki hücre hattı için 1.5x10⁵ sayıda hücre ekimi yapıldı. Hücre ekiminin yapılmasıyla 24 saatin tamamlanmasından sonra Avn C ile tedavi uygulandı. Diğer deneylerle aynı ekseni olarak 72 saatlik periyod takip edildi ve bu süre sonunda sonuçların gözlemlenmesi için uygulanan apoptoz tespit kitindeki protokollerin her bir aşaması izlendi.

T-25 cm² 'lik flasklardan kaldırılan hücreler, isimlendirilmiş ayrı falkon tüpler içerisinde santrifüj edildi. Santrifüj yapılmasının ardından, Biolegend FITC Annexin V P1 ile apoptoz belirleme kit protokolüne göre hücrelerin yıkama adımlarına geçildi. PBS ile 2 kez hücrelerin yıkanması sağlandı ve santrifüj işleminden sonra pelet halinde bulunan hücrelerin süspanse hale getirilmesi için 100 µl Annexin V Binding Buffer kullanıldı ve çözelti, flow sitometri için kullanılabilen uygun tüplere alındı.

Bu çözelti üzerine 5 µl FITC Annexin V solüsyonu eklendi. Propidyum iyodür solüsyonundan 10 µl eklenmesiyle son karışım kısa bir süre vorteks yapıldı ve karanlıkta 25 C° oda sıcaklığı koşullarında 15 dakika süreyle bekletildi. Bekleme süresinin hemen ardından, 400 µl Annexin V Binding Buffer her tüpe eklendi ve uygun ayarlar flow sitometri cihazında analiz edildi.

3.2.11. İnvazyon Analizleri

Kullanılan invazyon kitindeki protokolle uyumlu olarak çalışmalar gerçekleştirildi. Prosedürün ilk aşaması olan matrijel rehidratasyonunun uygun koşullar sağlanarak yapılmasıyla tüm adımlar izlendi. Matrijelin rehidratasyonu için invazyon analizine uygun olan plakalar -20 °C' den alınıp oda sıcaklığına gelmesi için bir süre bekletildi. Daha sonra rehidratasyon yapılması için insertlerin ve kuyuların üzerine protokolde yazan hacim miktarlarına uygun olarak 2 ml besiyeri eklemesi yapıldı.

Besiyeri eklemenin ardından 37° C'de 2 saat beklemeye bırakıldı. 2 saat sonra besiyerleri üzerlerinden tekrar alındı. Kuyucukların üstüne 2 ml %5 FBS içeren besiyeri kemoatraktant olarak koyuldu. Insertlerin üzerine 2 ml besiyeri ve 1.5×10^5 sayıda hücre içeren karışım koyuldu. Hücrelerin tutunmaları kontrol edilip 3,5 saat beklemenin ardından IC25 ve IC50 dozları üzerinden Avn C ile muamele edildi.

72 saat beklemenin ardından insertler üzerinde bulunan hücrelerin hem üst hem de alt tabanı PBS ile yıkandı. Metanol kullanılarak birkaç dakika fiksasyonu sağlandı ve tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Bütün bu işlemlerin yapılmasından sonra kristal viole boyası kullanılarak boyama aşamasına geçildi. 15 dakika boyunca boya içerisinde bekletildi ve boyanın fazla miktarından arındırmak için süre sonunda PBS ile yıkama tekrar edildi. Elde edilen sonuçların resimleri çekildi.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tez kapsamında yapılan *in vitro* çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesi, student t testi ile belirlenmiştir. $p < 0.05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.



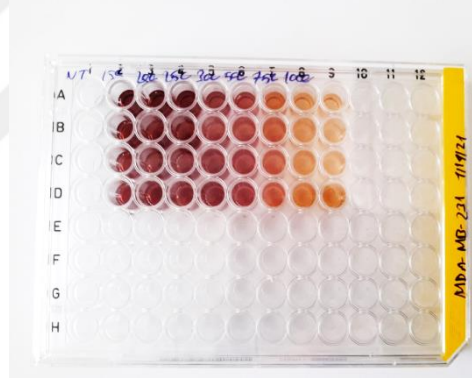
4. BULGULAR

4.1. Avn C ile Muamele Edilen Hücreler ve Kontrol Grubunun Hücre Proliferasyonuna İlişkin Bulgular

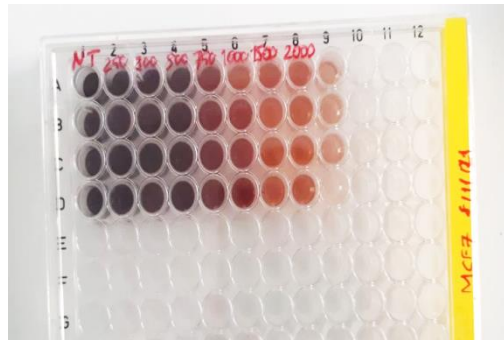
Hücrelerin proliferasyonu üzerinde Avn C'nin etkisinin gözlemlenmesi ve *in vitro* sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla meme kanseri hücre hatlarından MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde MTS analizi yapılmıştır. Avn C'nin belirli dozlarla uygulanmasının ardından 72 saat sonra analiz gerçekleştirilerek IC50 konsantrasyonları belirlenmiştir.

MTS sonucunda MDA-MB-231 hücre hattı için elde edilen plaka görüntüleri ve MCF-7 hücre hattı için elde edilen plaka görüntüleri Şekil 4.1.'de gösterilmektedir.

A)

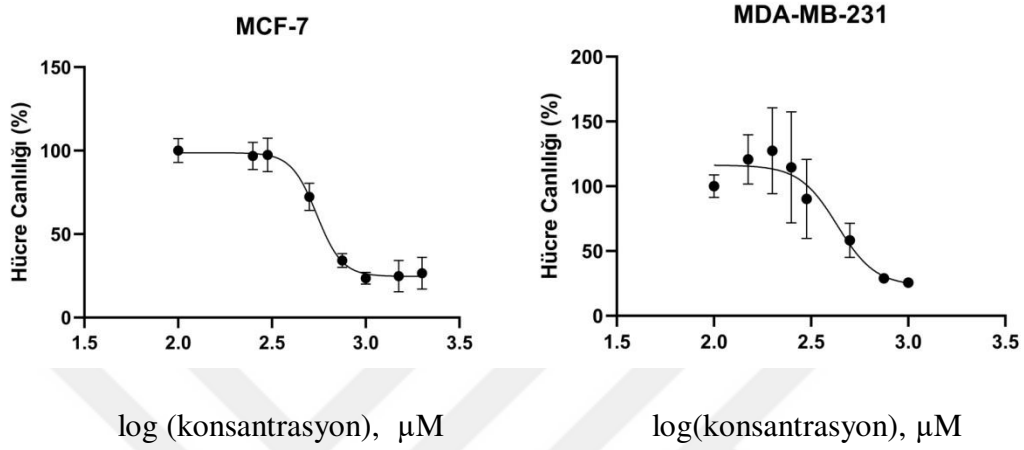


B)

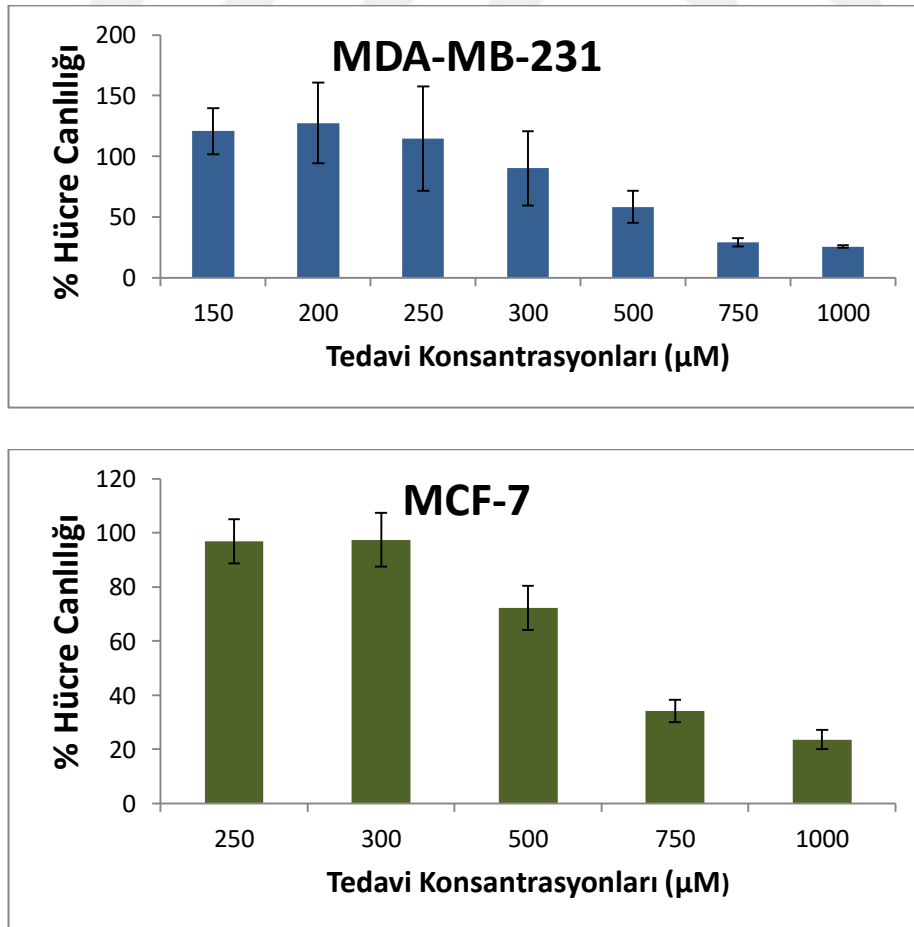


Şekil 4. 1. MTS analizi sonrası MDA-MB-231 hücre hattı plaka görüntüleri (A) MTS analizi sonrası MCF-7 hücre hattı plaka görüntüleri (B)

Plakalar spektrofotometre cihazında analiz için uygun ayarlar okutulurken absorbansları belirlenip sonrasında yapılan hesaplar sonucunda IC50 konsantrasyonları belirlenmiştir. Belirlenen IC50 değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir ve bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen grafikler Şekil 4.2.'de ve Avn C'nin belirli dozlarla uygulanması sonucu MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları için elde edilen verilerin grafik özetleri Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4. 2. MTS analizi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan doz-yanıt ilişkisi grafikleri



Şekil 4. 3. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde Avn C'nin belirli dozlarla uygulanması sonucu elde edilen verilerin grafik özetler

Tablo 4.1.'de MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında Avn C'nin uygulanmasıyla belirlenen IC50 değerleri yer almaktadır.

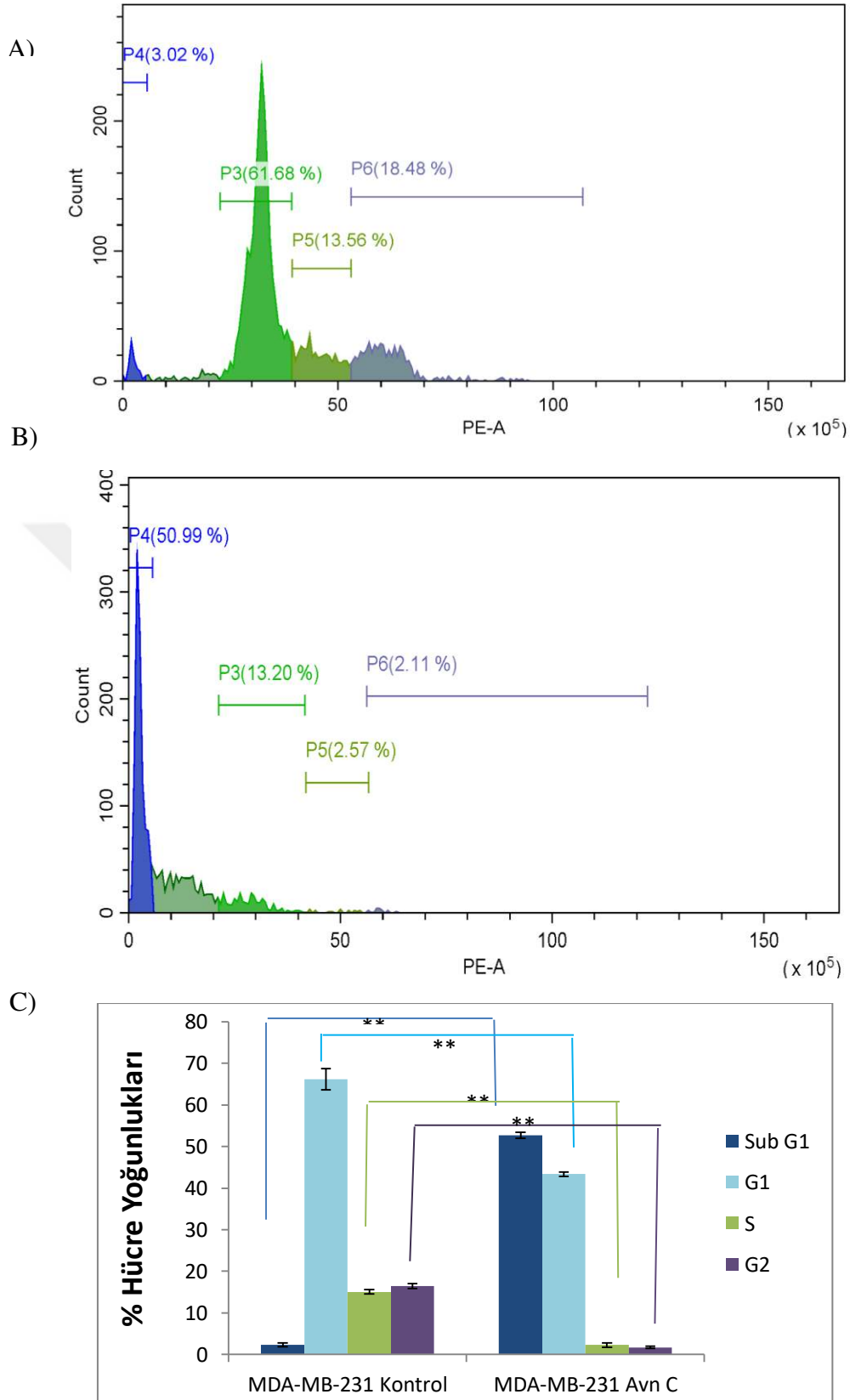
Tablo 4.1. MTS analizi sonucunda ulaşılan IC50 konsantrasyonları

Hücre hattı	IC50 Konsantrasyonu (μM)
MDA-MB-231	582 μM
MCF-7	722 μM

4.2. Avn C ile Muamele Sonrası Hücre Döngüsü Analizlerine İlişkin Bulgular

Avn C 'nin IC50 dozu üzerinden hücrelere uygulanmasından 72 saat sonra yöntem 3.2.9'da belirtildiği şekilde protokole uygun olarak propidyum iyodür boyaması tekniğiyle hücre döngüsüne dair veriler elde edildi.

MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavi uygulanmayan hücreler ve Avn C'nin uygulandığı hücrelerin flow sitometride uygun ayarda ölçümüyle hücre döngüsü analizi sonuç verilerine ulaşılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı için kontrol grubundaki hücrelerin hücre döngüsü grafikleri Şekil 4.4.(A)'da, MDA-MB-231 hücre hattında Avn C'nin yarı maksimal konsantrasyonu ile muamele sonrası elde edilen hücre döngüsü grafiği (B) ve MDA-MB-231 hücre hattında Avn C uygulanması sonucu hücre döngüsü analizinde elde edilen hücre yüzdelerinin grafik sunumu (C)'de verilmiştir.



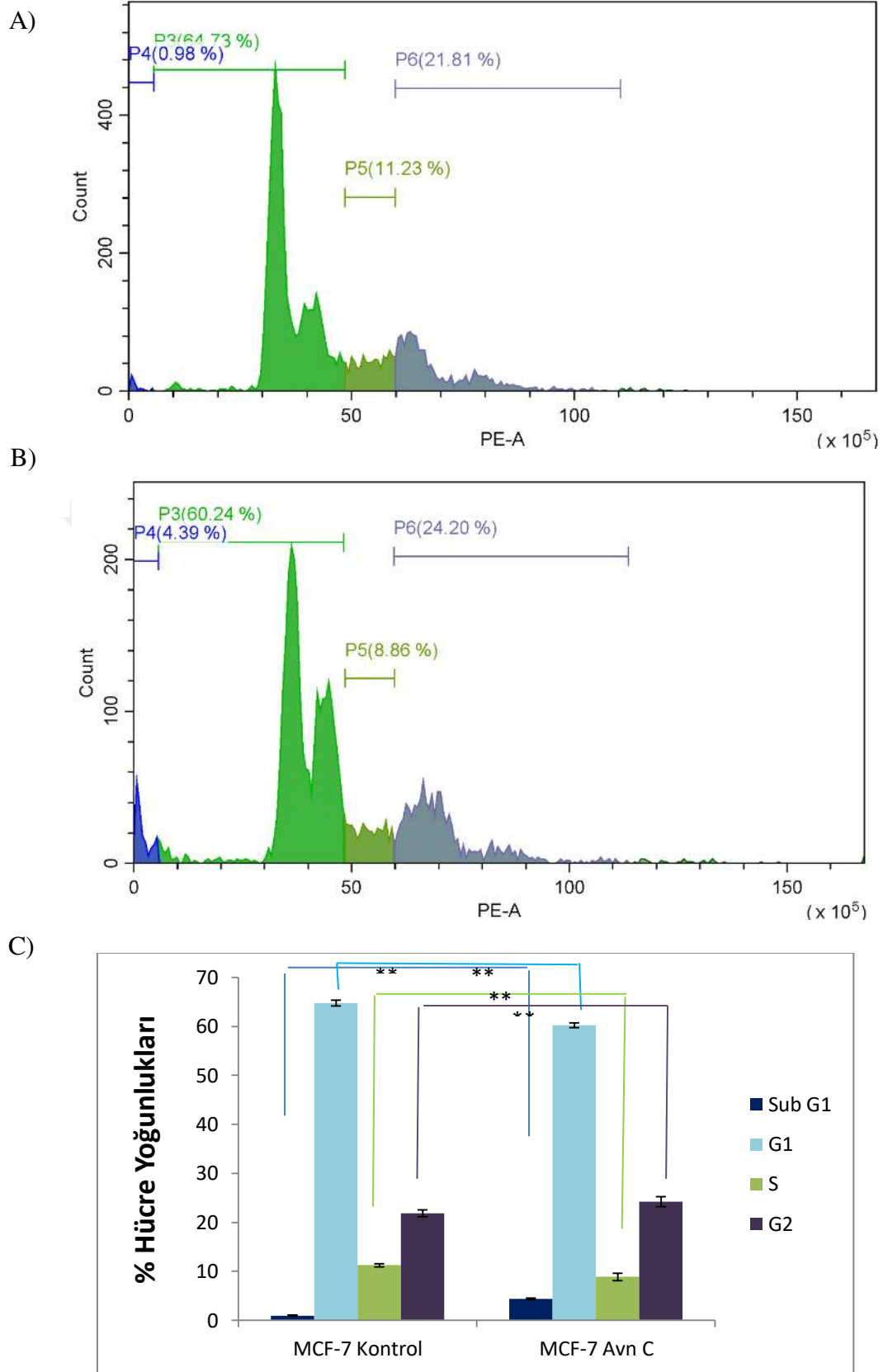
Şekil 4. 4. MDA-MB-231 hücre hattı tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin hücre döngüsü grafiği (A), MDA-MB-231 hücre hattında Avn C'nin yarı maksimal konsantrasyonu ile muamele sonrası elde edilen hücre döngüsü grafiği (B), MDA-MB-231 hücre hattında Avn

C uygulanması sonucu hücre döngüsü analizinde elde edilen hücre yüzdelerinin grafik sunumu (C). * işareti unpaired t testi ile belirlenen istatistiksel anlamlılığın anlamlılık seviyesinin $p<0.05$ olduğunu ve ** işareti ise anlamlılık seviyesinin $p<0.01$ olduğunu ifade etmektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinin Avn C 582 μM ile muamele edilmesinden 72 saat sonra hücre döngüsü analizine ilişkin bulgular ve kontrol grubundaki tedavi uygulanmayan hücrelerin hücre döngüsü grafikleri kıyaslandığında, Avn C tedavisi sonucunda, hücre döngüsünün sub G1 aşamasında %50.99 oranıyla hücrelerin yoğun bir şekilde yığın oluşturdıkları görülmektedir. Bu oran, kontrol hücrelerinin sub G1 aşamasında %3.02 olarak kaydedilmiştir. Avn C tedavisi sonucu, G1 evresindeki hücrelerin oranı %13.20 iken tedavi uygulanmayan hücrelerde bu oran %61.68 olarak belirlenmiştir. Hücre döngüsünün S aşamasında ise Avn C ile muamele edilen hücreler %2.57 oranıyla görülürken, kontrol grubundaki hücreler %13.56 oranıyla görülmektedir. Avn C uygulanan hücrelerin G2 evresinde oranı %2.11 olarak belirlenmiş olup, kontrol grubunda bulunan hücrelerde %18.48'dir.

Avn C uygulanan hücrelerin sub G1 popülasyonunda meydana gelen artış, Avn C'nin DNA fragmentasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir. Literatürde varolan bilgiler elde edilen sonuçları desteklemektedir (9). Elde edilen sonuçlardan, Avn C'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde apoptotik bir mekanizmayla etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

MCF-7 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavi uygulanmayan hücreler ve Avn C'nin IC50 konsantrasyonu üzerinden (722 μM) uygulandığı hücrelerin flow sitometride uygun ayarlarla ölçümüyle hücre döngüsü analizi sonuç verilerine ulaşılmıştır. MCF-7 hücre hattı için kontrol grubundaki hücrelerin hücre döngüsü grafikleri Şekil 4.5.(A)'da MCF-7 hücrelerinde IC50 konsantrasyonu olan 722 μM Avn C ile tedavi uygulanması sonrası 72 saatlik periyodun ardından yapılan hücre döngüsü analizine ilişkin veriler (B)'de elde edilen yüzdelerin grafik sunumu (C)'de yer almaktadır.



Şekil 4. 5. MCF-7 hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin hücre döngüsü grafiği (A), MCF-7 hücre hattında Avn C IC50 konsantrasyonuyla tedavi sonrası elde edilen hücre döngüsü grafiği (B), MCF-7 hücre hattında Avn C uygulanması sonucunda

hücre döngüsü analizinde ulaşılan hücre yüzdelerinin grafik gösterimi (C). * işareti unpaired t testi ile belirlenen istatistiksel anlamlılığın anlamlılık seviyesinin $p<0.05$ olduğunu ve ** işareti ise anlamlılık seviyesinin $p<0.01$ olduğunu belirtmektedir.

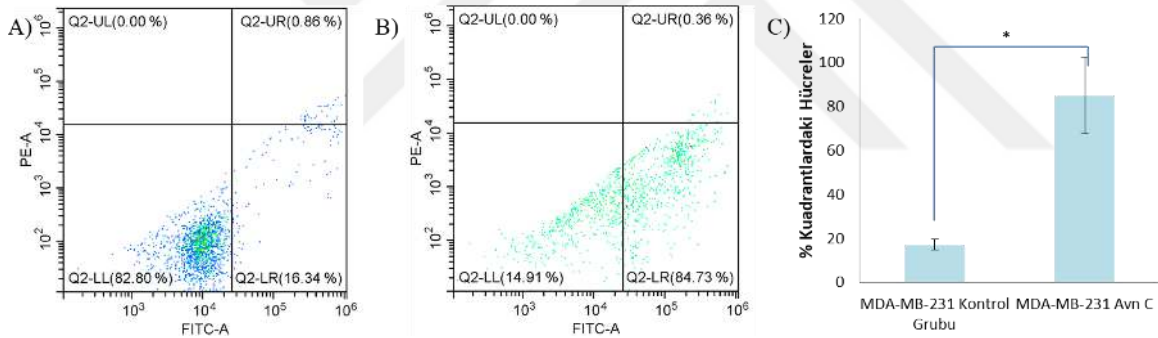
MCF-7 hücre dizisinde kontrol grubundaki tedavi uygulanmayan hücreler ve Avn C'nin 722 μ M olarak uygulanan hücrelerin hücre döngüleri açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlara göre; kontrol grubu hücreleri sub G1 aşamasında 0.98' lik bir yüzdeye sahipken, Avn C'nin uygulandığı hücrelerde %4.39 olarak görülmektedir. Kontrol grubu G1 evresinde hücreler %64.73 oranda bulunurken, Avn C ile tedavi uygulanımı sonrası hücreler aynı evrede %60.24 oranında bir popülasyonda bulunmaktadır. S evresinde kontrol grubundaki hücreler %11.23 oranında bir dilimde yer alırken, Avn C'nin uygulandığı hücreler % 8.86 oranında olduğu görülmektedir. Kontrol grubu hücreleri, G2 aşamasında %21.81 oranında bir popülasyonun içerisinde ve aynı evre için Avn C ile muamele sonucunda hücrelerin %24.20 oranında olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır.

MCF-7 hücre hattında Avn C ile tedavi uygulanması sonrası hücrelerin canlılık seviyelerinde azalmanın olmasıyla beraber hücrelerin normal bir şekilde çoğalmaya devam edebildikleri görülmektedir.

4.3. Avn C'nin Uygulanmasıyla Hücre Ölümüne İlişkin Bulgular

Hücre ölümünün gözlemlenebilmesi bağlamında, apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğine dair bir kanıt sunan ve hücre ölümü sebebiyle hücrelerin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserin moleküllerine bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesine imkan sağlayan FITC ile konjuge olabilen Anneksin V ve P1 boyama yöntemleri kullanılmıştır. Biolegend FITC Annexin V P1 ile apoptoz belirleme kit protokolüne göre bütün aşamalar izlenerek prosedüre uygun olarak deneyler yürütülmüştür.

Şekil 4.6.'da elde edilen bulgulara ilişkin MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu olarak Avn C'nin uygulanmadığı hücrelerin 72 saat sonunda flow sitometrideki grafikleri (A) MDA-MB-231 hücre hattı için belirlenen IC50 konsantrasyonu (582 μ M) üzerinden hücrelere Avn C ile muamele edilmesinden 72 saat sonrası flow sitometride ulaşılan grafikler (B) yer almaktadır. Kuadrantlarda bulunan hücre yüzdelерinin grafik olarak sunumu Şekil 4.6. (C)'de verilmiştir.



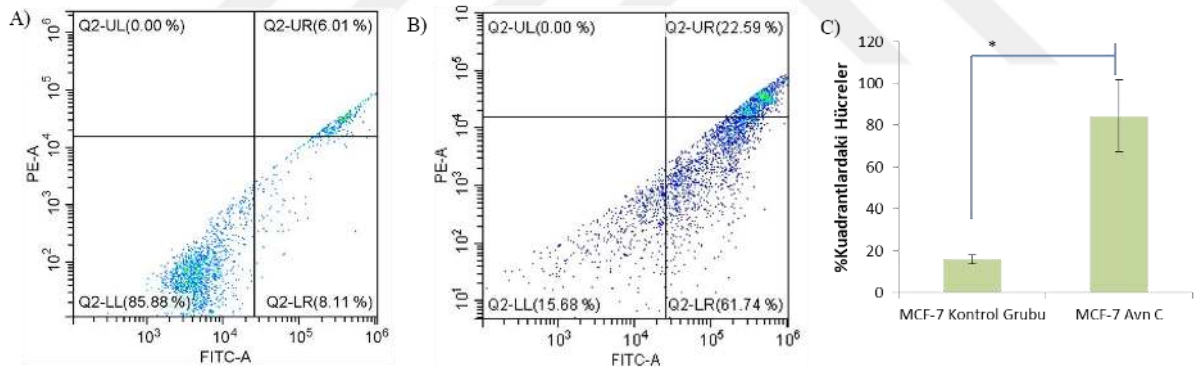
Şekil 4. 6. MDA-MB-231 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu kontrol grubunda bulunan hücrelerin grafiği (A) ve Avn C'nin IC50 konsantrasyonu ile tedavi sonrası meydana gelen hücre ölümlerini ifade eden grafik (B) ve MDA-MB-231 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu kuadrantlardaki hücre yüzdelерinin grafik sunumu (C). * işareti unpaired t testi ile belirlenen istatistiksel anlamlılığın anlamlılık seviyesinin $p < 0.05$ olduğunu belirtmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattının kontrol grubunda bulunan ve tedavinin uygulanmadığı hücrelerdeki her bir kuadrantta bulunan hücrelerin yüzdesi ve Avn C ile muamele edilen

hücrelerin flowsitometride ulaşılan grafiğinde yine kontrol grubundaki kuadrantın karşılığı olan bölüm yüzdeleri kıyaslandığında kontrol grubu hücrelerinde hücre ölümü yüzdesi %17.2 olarak görülürken, Avn C'nin 582 μ M konsantrasyonunda muamelesi sonrası hücrelerde %85.09 oranında hücre ölümü yüzdesi kaydedilmiştir. Yaşanan erken ve geç apoptoz yüzdelerinin Avn C etkisi ile yüksek bir değerde olması Avn C'nin apoptozu uyarıcı bir aktivite gösterdiğini yönünde açıklanabilir.

Bu sonuçlar, Avn C'nin MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik bir mekanizma üzerinden hücre ölümünü uyardığı sonucunu doğrulamaktadır.

MCF-7 hücre hattında kontrol grubu hücreleri için Anneksin V ve PI boyaması sonucu flow sitometride alınan grafikler Şekil 4.7.(A)'da gösterilmektedir. MCF-7 hücrelerinde Avn C'nin IC50(722 μ M) konsantrasyonu üzerinden uygulanmasından 72 saat sonrası flow sitometride kaydedilen sonuçlar ise Şekil 4.7.(B)'de verilmiştir. MCF-7 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesinde elde edilen sonuçlar doğrultusunda kuadrantlarda bulunan hücre yüzdelerinin grafik olarak sunumları Şekil 4.7.(C)'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 7. MCF-7 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavinin uygulanmadığı hücrelerde Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu elde edilen grafik (A) ve MCF-7 hücre hattında Avn C'nin IC50 konsantrasyonunda uygulanması sonucu Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesinde ulaşılan grafik (B). MCF-7 hücre hattında Anneksin V ve P1 boyama yönteminin yapılmasıyla apoptozun belirlenmesi sonucu kuadrantlardaki hücre yüzdelerinin grafik sunumu (C). * işareti unpaired t testi ile belirlenen istatistiksel anlamlılığın anlamlılık seviyesinin $p < 0.05$ olduğunu ifade etmektedir. İstatistiksel olarak karşılaştırmalar kontrol grubunda apoptotik hücrelerin bulunduğu kuadrant ile Avn C ile muamele edilen hücrelerde aynı kuadrant bölümü kıyaslanarak yapılmıştır.

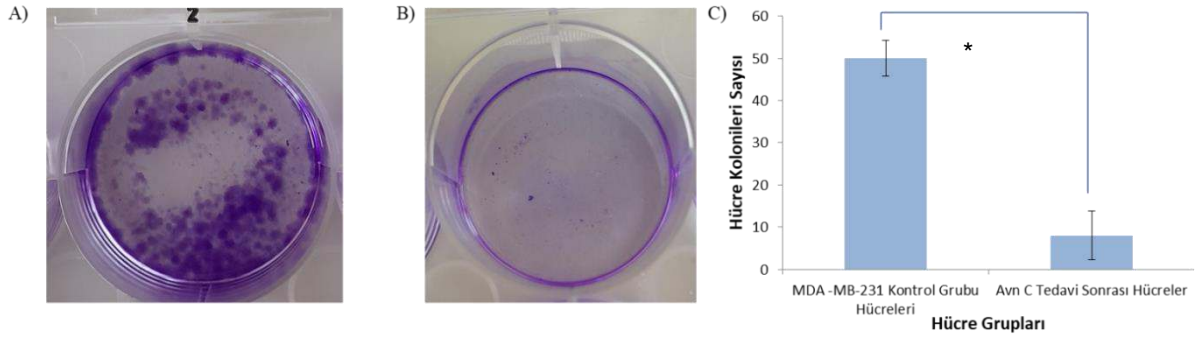
MCF-7 hücre hattında kontrol grubu hücrelerinin, Avn C uygulanan hücrelerle karşılaştırma yapabilmek için bir temel oluşturması ve Avn C etkilerinin tedavinin uygulanmadığı hücrelere göre daha iyi görülebilmesi için apoptozun belirlenmesi amacıyla yapılan Anneksin V ve PI boyama yöntemi sonucu ulaşılan verilere göre kontrol grubu hücrelerinde totalde hücre ölümü yüzdesi, %14.12 olarak kaydedilmiştir.

Avn C'nin 722 μ M konsantrasyonunda uygulanmasını izleyen 72 saatlik periyod sonrası flow sitometride alınan sonuçlara göre Avn C'nin uygulandığı hücrelerde bu yüzde değerlerinin değişim gösterdiği belirlenmiştir. Apoptozun belirleyici olduğu kuadrantlardan erken ve geç apoptoz yüzdeleri incelendiğinde ise totalde 84.33 oranında bir yüzdeyle Avn C'nin MCF-7 hücreleri için oldukça yüksek seviyede apoptotik ölüme neden olduğu gözlemlenmiştir.

4.4. Avn C ile Muamele Edilen Hücrelerin Klonojenik Testlerine İlişkin Bulgular

Avn C ile muamele sonrası hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerinin görülebilmesi için kristal viole boyaması kullanıldı. Yöntem 3.2.8' de belirtildiği gibi hücre ekiminin ardından Avn C ile muamele edildi ve 24 saat sonra besiyeri değişimi yapıldı. Bir hafta süresince uygun şartlarda inkübatörde bekletildi. Bir haftanın tamamlanmasıyla yeniden tedavi uygulandı ve tekrar yedi gün süreyle inkübatörde hücrelerin canlılığı sürdürüldü. 14 gün sonunda kristal viole boyası kullanılarak koloni oluşumlarına ilişkin görüntüler alındı.

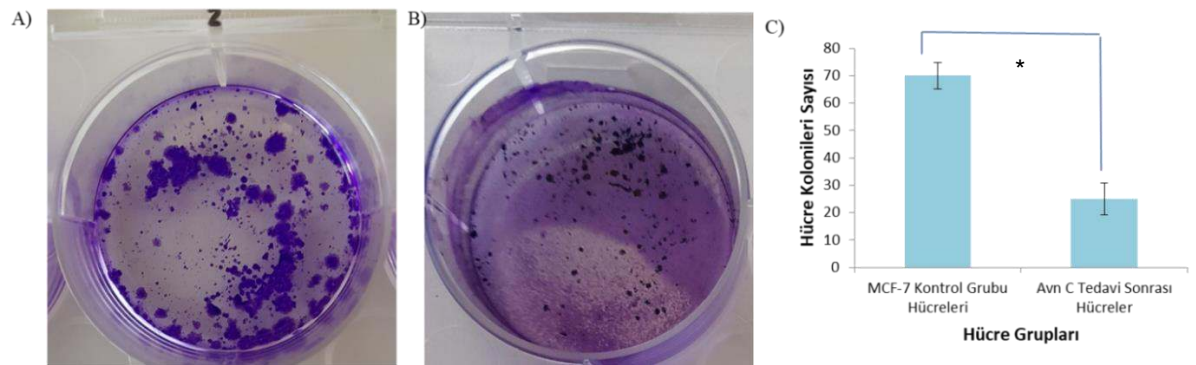
MDA-MB-231 hücre hattı için görüntüleri alınan plaklar Şekil 4.8.'de verildiği gibidir. MDA-MB-231 hücre hattında tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin koloni oluşumlarına ilişkin görüntüleri (A), Avn C IC50 dozuyla (582 μ M) tedavi sonrası hücrelerde koloni oluşumlarına ilişkin görüntüler (B)'de verilmiştir. Şekil 4.8. (C)'de MDA-MB-231 hücre hattı için kontrol grubu ve Avn C tedavisi sonrası görüntülenen plaklarda bulunan hücre kolonileri sayımları sonrası oluşturulan grafik görülmektedir.



Şekil 4. 8. MDA-MB-231 hücrelerinin tedavi uygulanmayan kontrol grubu (A) ve Avn C ile muamele edilen hücrelerde (B) koloni oluşumları ve MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavi uygulanmayan plaklarda oluşan koloni sayıları ve Avn C ile tedavi sonrası oluşan koloni sayılarının karşılaştırılması (C)

MDA-MB-231 hücrelerinin kontrol grubu ve bu hücre hattı için Avn C'nin uygulandığı hücrelerin görüntüleri karşılaştırıldığında hücrelerin koloni oluşturabilme kabiliyetlerinin uygulanan Avn C etkisiyle kaybolduğu sonucuna ulaşılmıştır.

MCF-7 hücre hattı için elde edilen plak görüntüleri ise Şekil 4.9.'da yer almaktadır. MCF-7 kontrol grubu hücrelerinde görülen koloni oluşumları Şekil 4.9.(A)'da ve MCF-7 hücrelerinin Avn C ile tedavi sonrası koloni oluşumlarının görüntüleri Şekil 4.9.(B)'de verilmiştir. Şekil 4.9.(C)'de MCF-7 hücre hattı için kontrol grubu ve Avn C tedavisi sonrası görüntülenen plaklarda bulunan hücre kolonileri sayımları sonrası oluşturulan grafik görülmektedir.



Şekil 4. 9. MCF-7 hücrelerinin tedavi uygulanmayan kontrol grubu (A) ve Avn C ile muamele edilen hücrelerde (B) koloni oluşumları ve MCF-7 hücre hattında kontrol grubu olarak tedavi uygulanmayan plaklarda oluşan koloni sayıları ve Avn C ile tedavi sonrası oluşan koloni sayılarının karşılaştırılması (C)

MCF-7 hücre dizisi için alınan sonuç görüntülerine bakıldığında, tedavinin yapılmadığı kontrol grubu hücreleri ve Avn C IC50(722 μ M) konsantrasyonu ile tedavinin uygulandığı hücreler, koloni oluşumları açısından kıyaslandığında Avn C etkisiyle hücrelerin koloni oluşumlarında azalma meydana geldiği fark edilmektedir.

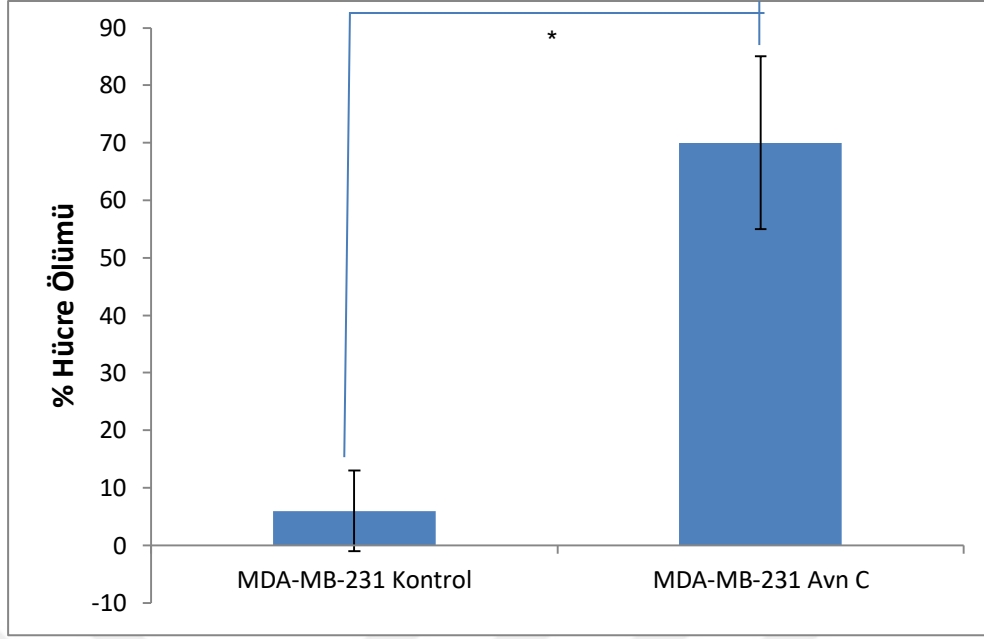
4.5. Avn C Uygulanması Sonrası Hücrelerin Tripan Mavisi ile Boyanmasına İlişkin Bulgular

Canlı hücrelerin hücre zarlarının bütünlüğü sebebiyle, hücre kültürü ortamına eklenen boyaları dışarda bırakması, diğer taraftan ölü hücrelerin zar yapısının bozulmasından dolayı zarlarından geçerek hücreyi boyayabilme esasına dayanan tripan mavisile boyama tekniğiyle süspansiyonda bulunan canlı ve ölü hücre yüzdeleri belirlenmiştir.

Tripn mavisile boyanmanın yapılabilmesi için Yöntem 3.2.7.'de belirtildiği gibi adımlar izlenmiştir. Canlı ve ölü hücrelerin yüzdelerinin belirlenebilmesi için Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımları sonucu elde edilen verilerin grafik olarak dökümleri sunulmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattı için kontrol grubundaki hücrelerin tripan mavisile boyanmasını takiben hücre sayımları sonucu kontrol grubu hücre ölümleri yüzdesi % 6 olarak belirlenmiştir. Avn C ile muamele sonucu hücre ölümü yüzdesi ise % 70 olarak belirlenmiştir.

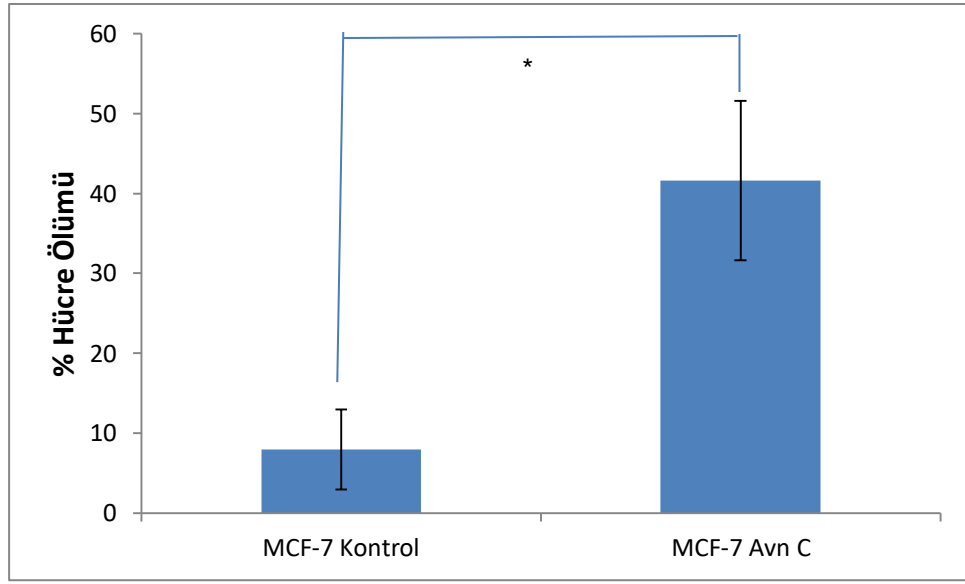
MDA-MB-231 hücre hattı için kontrol grubu ve Avn C tedavisi uygulanan hücrelerin tripan mavisile boyanmasına dair sonuçların grafik sunumları Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4. 10. MDA-MB-231 hücre hattında hücrelerin tripan mavisiyle boyanması sonucu hücre sayımlarından elde edilen verilerin grafik sunumu. * işareti kontrol grubuyla Avn C uygulanan hücrelerin istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlılığı ifade etmektedir.

MCF-7 hücre hattı için kontrol grubundaki hücrelerin ölüm yüzdesi % 8 olarak kaydedilmiştir. Avn C ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin boyanmalarının ardından sayımları yapıldığında hücre ölümü yüzdelerinin % 41.6 olduğu görülmüştür.

MCF-7 hücre hattı için kontrol grubu olarak tedavinin yapılmadığı hücreler ve Avn C tedavisi uygulanan hücrelerin tripan mavisiyle boyanmasıyla elde edilen yüzdelerin grafik gösterimleri Şekil 4.11.'de verilmiştir.

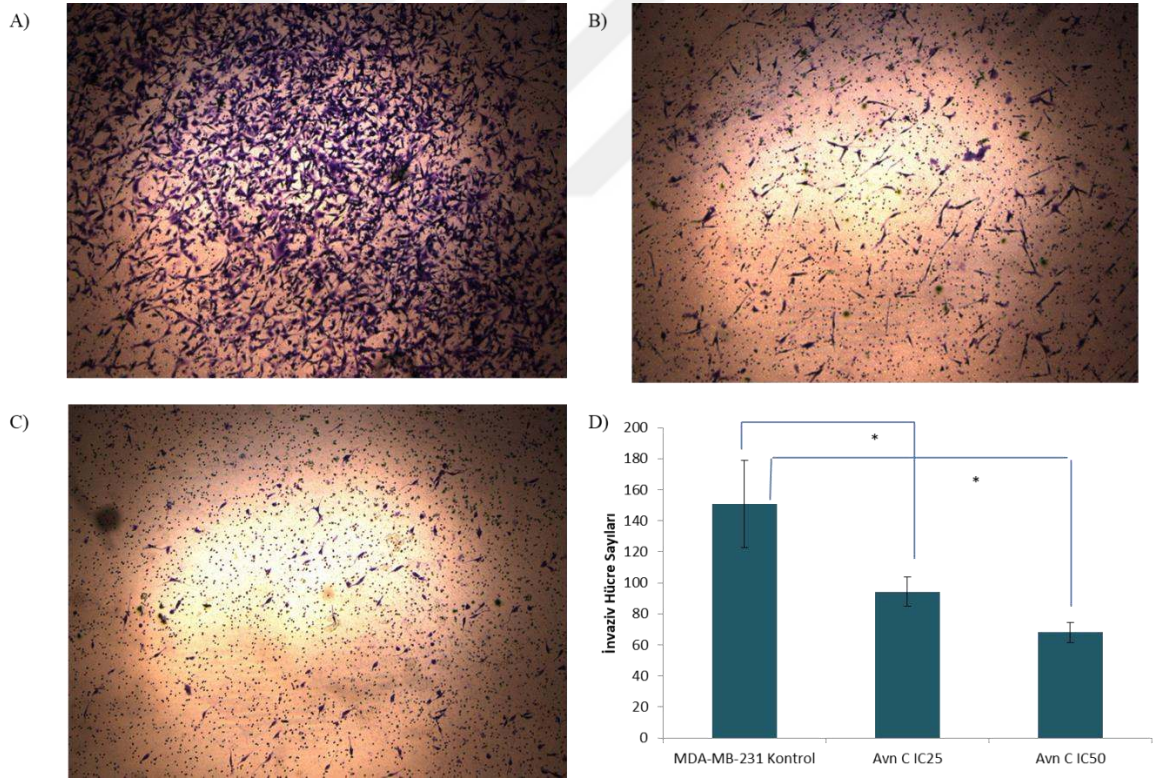


Şekil 4. 11. MCF-7 hücre hattında kontrol grubu hücreleri ve Avn C tedavisi uygulanan hücrelerin tripan mavisiyle boyanması sonucu hücre sayımlarından elde edilen yüzdelerin grafik sunumu

4.6. İnvazyon Analiziyle Avn C Uygulanmasının Hücreler Üzerinde Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Matrijel kaplı Boyden chamber kullanılarak *in vitro* invazyon analizi gerçekleştirildi. Hücrelerin basement membran matriks içerisinde kemoatraktant içeren besiyerine doğru geçmesi ve geçişi sağlayan hücrelerin sayısının ölçülmesi esasına dayanan *in vitro* invazyon analizi Yöntem 3.2.11.'de belirtilen şekilde Corning Matrigel Invasion Chamber 6 well plate, 8.0 Micron kit protokolüne uygun olarak yapıldı. 72 saatlik periyodu takiben invaze durumdaki hücrelerin görüntülenmesi ve nicel verilere ulaşılabilmesi için kristal viole boyası kullanılarak plakaların fotoğrafları alındı.

MDA-MB-231 hücre hattı için invazyon analizi sonrası tedavi uygulanmayan kontrol grubu hücreleri ve Avn C IC25 ve IC50 konsantrasyonları ile tedavinin uygulandığı hücrelerin kristal viole boyaması sonucunda görüntüleri Şekil 4.12.'de yer almaktadır.



Şekil 4. 12. MDA-MB-231 hücre hattında invazyon analizi sonrası kontrol grubu(A), IC25 konsantrasyonu (B) ve IC50 konsantrasyonu(C) ile tedavi sonucu elde edilen görüntüleri,

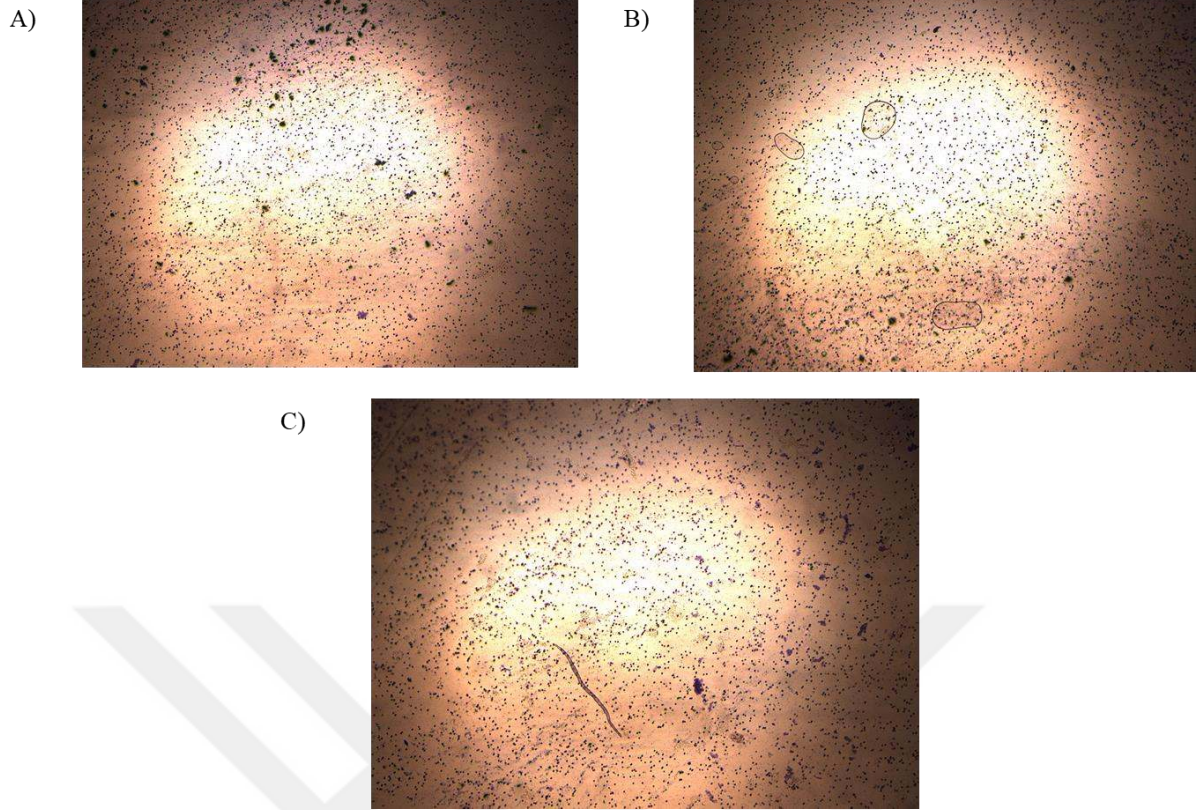
MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu hücreleri ve Avn C'nin IC25 ve IC50 konsantrasyonlarıyla tedavi edilen hücrelerin invazyon analizi sonucunda elde edilen verilerin grafik gösterimleri (D). Kontrol grubu ve tedavi grupları arasında karşılaştırmalar unpaired t testi ile yapılmıştır. Yıldız imi, tedavisiz olan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir. ($p<0.05$)

MDA-MB-231 hücre hattında Avn C tedavisi sonrası *in vitro* invazyon analizinde ulaşılan bulgulara göre Avn C IC25 ve IC50 konsantrasyonunda tedavi uygulanan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla Avn C'nin hücrelerin matrijelle kaplı membrandan geçişlerini engellediği ve hücrelerin invazyona uğramasını inhibe edici etki gösterdiği görülmektedir. IC25 ve IC50 konsantrasyonları kendi aralarında kıyaslandığında IC50 konsantrasyonu uygulanan hücrelerde invazyonu engellenen hücrelerin daha yoğun olduğu kaydedilmiştir.

Bu veriler, varılan sonuçlarla bağlantılı olarak, Avn C'nin son derece yüksek invaziv fenotipe sahip bir hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu ve metastatik potansiyelleri üzerinde inhibisyonu tetikleyen bir etki gösterdiği şeklinde açıklanabilir.

Görüntü halindeki bulguların kantifiye edilmesinin daha kesin ve nicel veriler oluşturacağından hücre sayımları yapılmasıyla net sonuçların grafik halinde gösterimleri şekil 4.12.(D)'de sunulmuştur.

MCF-7 hücre hattı için kontrol grubu hücreleri ve Avn C IC25 ve Avn C IC50 konsantrasyonunda tedavi yapılan hücrelere invazyon analizi uygulanması sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.13.'de verildiği gibidir.



Şekil 4. 13. MCF-7 hücre dizisinde kontrol grubu hücreleri(A) ve Avn C IC25 konsantrasyonu ile muamele sonucu (B) ve Avn C IC50 konsantrasyonlarıyla tedavi sonucu (C) invazyon analiziyle elde edilen görüntüler

MCF-7 hücre hattı için *in vitro* invazyon analizi sonucunda kaydedilen görüntülere göre kontrol grubu dahil Avn C IC25 ve IC50 konsantrasyonlarında muamele edilen hücrelerin yoğun bir kısmı invaze durumda olup bu hücre hattı için Avn C'nin etkisi tam olarak belirlenememiştir.

5.TARTIŞMA

Meme kanseri hücreleri, daha yüksek seviyelerde oksidatif strese ve artan serbest radikal üretimine maruz kalabilmekte ve bu durumdan köken alarak, DNA hasarı, protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin mutasyonu ve ardından genetik mutasyonlar ile sonuçlanan malign süreçleri uyaramaktadır(41).

Bitkilerden elde edilen polifenoller, kemopreventif olmalarının yanı sıra, aynı zamanda potansiyel antikanser maddeleri olarak vurgulanmaktadır. Bunlardan bir grup olan flavonoidlerin antioksidan ve antikanser aktiviteye sahip olduğu bilinen özellikleri arasındadır. Flavonoidlerin antioksidan işlevi görmeleriyle, hücre proliferasyonunu inhibe edici etkileri, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri bulunmaktadır. Ayrıca, bu bileşikler kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili hücresel moleküler mekanizmalara katılırlar. Bu bilgiyle aynı doğrultuda olarak, sadece kanseri önleme için değil, aynı zamanda antikanser ajanları olarak da kullanılabilirler. Kanser hücresi proliferasyonunu ve farklılaşmasını inhibe edebildikleri, apoptozu uyatabildikleri, anjiyogenez ve inflamasyona müdahale edebildikleri tespit edilen nitelikleri olarak sıralanabilir(42). Antioksidanların bu olaylara karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır(41).

Avn'lerin antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-kanser, antiproliferatif aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik özelliklere sahip bir polifenol grubu olduğu çalışmalarla kanıtlanmış bir olgudur(43). Tip I ve II programlanmış hücre ölümünün kritik oluşumu olarak hücre apoptozu ve otofajisi, tümörijenite ve tümör gelişimi ile yakından ilişkilidir ve anti-tümör tedavisinde potansiyel bir strateji olarak kabul edilebilir(44).

Bu bulgularla aynı eksenli olarak, yapılan bir çalışmada Avn'nin makrofajlar tarafından inflamatuvar maddelerin salınımını veya monositlerin vasküler endotelial hücrelere tutunmasını ve anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktiviteler yoluyla anti-kanser etkileri sergilediği elde edilmiştir(43).

Bu çalışmada, meme kanserine karşı etkin, antioksidan kaynaklı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için meme kanseri iki hücre hattı üzerinde Avn C 'nin terapötik bir madde olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Şimdiye kadar meme kanseri üzerinde Avn C'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde etkinliği ile ilgili olarak yapılan çalışmalar olmakla beraber MDA-MB-231 ve MCF-7 her iki hücre hattı üzerinde çalışıldığına dair literatürde

herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde Avn C'nin *in vitro* olarak tedavi etkinliğinin araştırılması ve hücre döngüsünü baskılaması, apoptozu uyarması hedeflenmiştir.

Li ve ark. (45) kolorektal kanser üzerinde yaptıkları çalışmada Avn ekstraktlarının kolorektal kanser hücrelerine karşı etkili olduğunu ve ağır yan etkiler olmadan tümör boyutunu önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. Yine Li ve ark. (46) kolorektal kanser üzerinde yaptıkları diğer çalışmada, Avn isoformlarından biri olan Avn A'nın kolon kanseri gelişimini baskılamak için miR-129-3p/ Pirh2/p53 sinyal yolağı üzerinden hücre senesansı uyardığı bulgusuna ulaşmışlardır. MiR-129-3p bir tümör supresör görevi görür ve apoptotik hücre ölümünün aktivasyonu, otofaji ve hücre döngüsünün durdurulmasıyla yakından ilişkilidir. Avn A ile indüklenen miR-129-3p, doğrudan Pirh2'yi hedef alarak hücre yaşlanmayı tetikleyen p53/p21 eksenini etkinleştirmektedir.

Kim ve ark. (47) tarafından meme kanseri invazyonu üzerine yapılan bir çalışmada, doğal olarak oluşan avenantramidlerin sentetik bir analogu olan Dihidroavenantramid D (DHA_vD) nin MMP-9 ekspresyonunun baskılanmasıyla meme kanseri hücre invazyonunu inhibe edebildiğini görmüşlerdir. MMP-9, bazal membranın ana bileşeni olan tip IV kollajeni parçalayan kilit bir enzimdir. Yükselen MMP-9 seviyeleri fonksiyonel olarak yüksek metastaz ile bağlantılıdır. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada, DHA_vD'nin MMP-9 ekspresyonunu ve hücre invazyonunu modüle edebildiği saptanmıştır.

Scarpa ve ark.(48) CaCo-2 ve Hep3B kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmaya göre doğal ve sentetik avenantramidlerin, kaspaz 2, 8, 3 'ü aktive edebildiklerini ve CaCo-2 ve Hep3B kanser hücrelerinde, pro-survival genler olan Htert, MDR1 ve COX-2 genlerini down regüle ettiklerini tespit etmişlerdir.

Scarpa ve ark.(49) bir başka çalışmalarında Vitexin-2-O-xyloside ve avenantramidlerin CaCo-2 ve HepG2 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitesinin apoptoz indüksiyonu ve pro-survival mekanizmaların azaltılması yoluyla gerçekleştiğini fark etmişlerdir. Konvansiyonel antikanser ilaçları tarafından indüklenen apoptozu karşı yüksek direnç gösteren iki malignant hücre hattı olan CaCo-2 kolon kanseri hücreleri ve HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde etkinlik göstermeleri dikkat çekici bir özellik oluşturmaktadır.

Çalışmamızda, Avn C'nin meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde etkilerinin araştırılmasında, ilk aşamada hücre canlılığının %50 inhibisyonu için gerekli IC₅₀ konsantrasyonu belirlenmesi ve Avn C'nin antiproliferatif etkilerinin görülmesi için MTS analizi yapılmıştır. Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu, her iki hücre için belirlenerek diğer deney aşamalarında uygulanacak doz olarak seçilmiştir. Avn C'nin antiproliferatif etkinliği her iki hücre hattında görülmekle beraber, MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine kıyasla daha etkin olduğu farkedilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri daha düşük bir IC₅₀ konsantrasyonuna(582 µM) sahipken MCF-7 hücrelerinde bu canlılık yüzdesine ulaşmak için gerekli konsantrasyon miktarının(722 µM) daha yüksek olduğu görülmüştür.

Klonojenik testler sonucunda, Avn C tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin azaldığı görülürken, MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyetlerinin tamamen ortadan kaybolduğu bulgusuna ulaşılmıştır.

Yapılan hücre döngüsü analizleri, Avn C ile muamele edilen hücrelerde hücre döngüsü sırasında meydana gelen değişikliklerin incelenmesine imkan tanımakta ve her iki hücre hattı üzerinde şu gözlemin yapılmasına yol açmaktadır; MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubuna kıyasla Avn C ile muamele edilen hücrelerde, Avn C etkisi ile fragmente olması sonucu hücre döngüsü sırasında sub G1 evresinde ölü hücreler olarak yığılma görülürken(%50.99), MCF-7 hücre hattı için Avn C ile tedavi edilen hücrelerde kontrol grubu hücrelerine kıyasla döngü esnasında belirgin bir değişiklik söz konusu değildir.

Hücre ölümü ile ilgili olarak yapılan apoptoz testlerinde elde edilen bulgular ise MDA-MB-231 hücrelerinin Avn C ile muamele sonucu daha yüksek bir oranda(%85.09) apoptoza uğradığı, MCF-7 hücrelerinde ise bu oranın(%84.33) yüksek olduğu yönündedir. Hastings ve Kenealey'in (9) Avn C ile MDA-MB-231 hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada Avn C ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozun aktive edilmesi yoluyla etki gösterdiği sonuçları, çalışmamızla aynı paralelde görülmekte ve ulaşılan bulguları doğrulamaktadır. Ek olarak, hücre ölümlerinin görülmesiyle ilgili yapılan diğer testler, bu bulguları destekleyici veriler sunmaktadır.

Matris ve gözenekli bir membrandan kemoatraktan maddeye doğru geçebilme potansiyellerinin görülebilmesine olanak sağlayan *in vitro* invazyon analizleri sonucu ulaşılan verilere göre, Avn C uygulanan MCF-7 hücrelerinde bütün hücreler invaze bir durumda olup membrandan geçişi sağlarken, MDA-MB-231 hücrelerinde bu durum zıtlık göstermektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinde Avn C ile muamele sonucu membrandan hücre geçişi düşük bir oranda meydana gelip ve Avn C etkisiyle invazyonun engellendiği görülmektedir.

Çalışmamızda, Avn C'nin meme kanseri üzerine etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi kapsamında yapılan hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, hücre ölümü ve invazyon analizleri sonucunda, meme kanseri üzerinde antiproliferatif etkisinin olduğu, hücrelerde apoptozun aktive edilmesi yoluyla hücre ölümüne neden olduğu bulguları elde edilmiştir. Her iki hücre hattı ayrı olarak ele alındığında, Avn C ile muamele sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde, yarı maksimal konsantrasyonunun MCF-7 hücrelerine göre daha düşük olması, hücre döngüsü üzerinde belirgin bir değişikliğe sebep olması, invazyonu inhibe edici özelliklerinin olması nedeniyle Avn C'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde etkisinin MCF-7 hücrelerine kıyasla daha etkin olduğu kanısına varılmasını sağlamıştır.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Avn C'nin *in vitro* olarak meme kanserinde etkisinin incelenmesi ve terapötik etkinliğinin araştırılması hedeflendi. Bu bağlamda, incelenen MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde hücre proliferasyon testleriyle antiproliferatif özellikleri olduğu belirlendi. Belirlenen tedavi dozlarıyla muamele sonucunda her iki hücre için de hücre ölümünü aktive etmesiyle sitotoksik etkilerinin olduğu göz önüne alındı. MDA-MB-231 hücreleri için hücre döngüsünde sınırlayıcı etkilerinin olduğu gösterildi. MDA-MB-231 hücreleri için invazyonu inhibe edici özelliklere sahip olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak çalışmamız, kanser tedavisinde Avn C'nin yeni bir kemoterapötik olarak kullanılabileğini göstermiştir. Triple negatif hücrelerinde görülen daha etkin sonuçlar ile antioksidan kaynaklı kanser tedavisi için oldukça umut vericidir.

KAYNAKLAR

1. Liang Y, Zhang H, Song X, Yang Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 2020, 60: 14-27.
2. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg* 2017, 69(3): 313-17.
3. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406(6797): 747-52.
4. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron J, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003, 100(14): 8418-23.
5. Turrini E, Maffei F, Milelli A, Calcabrini C, Fimognari C. Overview of the anticancer profile of avenanthramides from oat. *Int J Mol Sci* 2019, 20(18): 4536.
6. Tripathi V, Singh A, Ashraf M. Avenanthramides of oats: Medicinal importance and future perspectives. *Pharmacogn Rev* 2018, 12(23).
7. Perrelli A, Goitre L, Salzano AM, Moglia A, Scaloni A, Retta SF. Biological activities, health benefits, and therapeutic properties of avenanthramides: from skin protection to prevention and treatment of cerebrovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 2018(8): 1-17.
8. Dhakal H, Yang E-J, Lee S, Kim M-J, Baek M-C, Lee B, Park P-H, Kwon TK, Khang D, Song K-S. Avenanthramide C from germinated oats exhibits anti-allergic inflammatory effects in mast cells. *Sci Rep* 2019, 9(1): 1-11.
9. Hastings J, Kenealey J. Avenanthramide-C reduces the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells through an apoptotic mechanism. *Cancer Cell Int* 2017, 17(1): 1-12.
10. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. *Lancet* 2009, 373(9673): 1463-79.
11. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *Jama* 2019, 321(3): 288-300.
12. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, Shi W, Jiang J, Yao P-P, Zhu H-P. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017, 13(11): 1387.

13. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019, 5(1): 1-31.
14. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 2015, 14(3): 196.
15. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* 2010, 4(3): 174-91.
16. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009, 360(8): 790-800.
17. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 2004, 95(11): 866-71.
18. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in biology and medicine. *Apex NC* 2016, 1(1): 9.
19. Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol* 2016, 37(4): 4281-91.
20. Yang B, Chen Y, Shi J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chem Rev* 2019, 119(8): 4881-985.
21. Harris IS, DeNicola GM. The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer. *Trends Cell Biol* 2020, 30(6): 440-51.
22. Isnaini I, Permatasari N, Mintaroem K, Prihardina B, Widodo MA. Oxidants-antioxidants profile in the breast cancer cell line MCF-7. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018, 19(11): 3175.
23. Athreya K, Xavier MF. Antioxidants in the treatment of cancer. *Nutr Cancer* 2017, 69(8): 1099-104.
24. Ezzati M, Yousefi B, Velaei K, Safa A. A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. *Life Sci* 2020, 248: 117463.
25. Forcados GE, James DB, Sallau AB, Muhammad A, Mabeta P. Oxidative stress and carcinogenesis: potential of phytochemicals in breast cancer therapy. *Nutr Cancer* 2017, 69(3): 365-74.
26. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007, 28(4): R41.
27. Xu P, Marsafari M, Zha J, Koffas M. Microbial coculture for flavonoid synthesis. *Trends Biotechnol* 2020, 38(7): 686-88.

28. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Świerczek-Zięba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 2014, 19(1): 78-101.
29. Masisi K, Beta T, Moghadasian MH. Antioxidant properties of diverse cereal grains: a review on in vitro and in vivo studies. *Food Chem* 2016, 196: 90-97.
30. Li Z, Chen Y, Meesapyodsuk D, Qiu X. The biosynthetic pathway of major avenanthramides in oat. *Metabolites* 2019, 9(8): 163.
31. Guo W, Nie L, Wu D, Wise ML, Collins FW, Meydani SN, Meydani M. Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines in vitro. *Nutr Cancer* 2010, 62(8): 1007-16.
32. Paudel D, Dhungana B, Caffè M, Krishnan P. A Review of Health-Beneficial Properties of Oats. *Foods* 2021, 10(11): 2591.
33. Landberg R, Sunnerheim K, Dimberg LH. Avenanthramides as lipoxygenase inhibitors. *Heliyon* 2020, 6(6): e04304.
34. Lim W, Kang C. Avenanthramide C suppresses hypoxia-induced cyclooxygenase-2 expression through sirtuin1 activation in non-small-cell lung cancer cells. *Anim Cells Syst (Seoul)* 2020, 24(2): 79-83.
35. Martinez-Villaluenga C, Penas E. Health benefits of oat: Current evidence and molecular mechanisms. *Curr Opin Food Sci* 2017, 14: 26-31.
36. Antonini E, Iori R, Ninfali P, Scarpa ES. A combination of Moringin and Avenanthramide 2f inhibits the proliferation of Hep3B liver cancer cells inducing intrinsic and extrinsic apoptosis. *Nutr Cancer* 2018, 70(7): 1159-65.
37. Damazo-Lima M, Rosas-Pérez G, Reynoso-Camacho R, Pérez-Ramírez IF, Rocha-Guzmán NE, de Los Ríos EA, Ramos-Gomez M. Chemopreventive effect of the germinated oat and its phenolic-AVA extract in azoxymethane/dextran sulfate sodium (AOM/DSS) model of colon carcinogenesis in mice. *Foods* 2020, 9(2): 169.
38. Matsukawa T, Isobe T, Ishihara A, Iwamura H. Occurrence of avenanthramides and hydroxycinnamoyl-CoA: hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyltransferase activity in oat seeds. *Z Naturforsch C J Biosci* 2000, 55(1-2): 30-36.
39. Tran T-T, Song W-H, Lee G, Kim HS, Park D, Huh YH, Ryu J-H. Avenanthramide C as a novel candidate to alleviate osteoarthritic pathogenesis. *BMB Rep* 2021, 54(10): 528.
40. Wang C, Eski CH. Cytoprotective effects of Avenanthramide C against oxidative and inflammatory stress in normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep* 2019, 9(1): 1-12.

41. Sasanfar B, Toorang F, Maleki F, Esmailzadeh A, Zendehtdel K. Association between dietary total antioxidant capacity and breast cancer: A case–control study in a Middle Eastern country. *Public Health Nutr* 2021, 24(5): 965-72.
42. Grigalius I, Petrikaite V. Relationship between antioxidant and anticancer activity of trihydroxyflavones. *Molecules* 2017, 22(12): 2169.
43. Kim I-S, Hwang C-W, Yang W-S, Kim C-H. Multiple Antioxidative and Bioactive Molecules of Oats (*Avena sativa* L.) in Human Health. *Antioxidants* 2021, 10(9): 1454.
44. Yan W, Ma X, Zhao X, Zhang S. Baicalein induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway in vivo and vitro. *Drug Des Devel Ther* 2018, 12: 3961.
45. Fu R, Yang P, Li Z, Liu W, Amin S, Li Z. Avenanthramide A triggers potent ROS-mediated anti-tumor effects in colorectal cancer by directly targeting DDX3. *Cell Death Dis* 2019, 10(8): 1-14.
46. Fu R, Yang P, Sajid A, Li Z. Avenanthramide A induces cellular senescence via miR-129-3p/Pirh2/p53 signaling pathway to suppress colon cancer growth. *J Agric Food Chem* 2019, 67(17): 4808-816.
47. Lee Y-R, Noh E-M, Oh HJ, Hur H, Kim J-M, Han J-H, Hwang J-K, Park B-H, Park J-W, Youn HJ. Dihydroavenanthramide D inhibits human breast cancer cell invasion through suppression of MMP-9 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 405(4): 552-57.
48. Scarpa ES, Mari M, Antonini E, Palma F, Ninfali P. Natural and synthetic avenanthramides activate caspases 2, 8, 3 and downregulate hTERT, MDR1 and COX-2 genes in CaCo-2 and Hep3B cancer cells. *Food Funct* 2018, 9(5): 2913-21.
49. Scarpa ES, Antonini E, Palma F, Mari M, Ninfali P. Antiproliferative activity of vitexin-2-O-xyloside and avenanthramides on CaCo-2 and HepG2 cancer cells occurs through apoptosis induction and reduction of pro-survival mechanisms. *Eur J Nutr* 2018, 57(4): 1381-95.
50. Muti P, Rogan E, Cavalieri E. Androgens and estrogens in the etiology and prevention of breast cancer. *Nutr Cancer* 2006, 56: 247-52.
51. Chen WY, Colditz GA. Risk factors and hormone-receptor status: epidemiology, risk-prediction models and treatment implications for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007, 4(7):415-23.

52. Al Ishaq RK, Overy AJ, Büsselberg D. Phytochemicals and gastrointestinal cancer: cellular mechanisms and effects to change cancer progression. *Biomolecules* 2020, 10(1):105.
53. Rathaur P, Johar KS. Metabolism and pharmacokinetics of phytochemicals in the human body. *Curr Drug Metab* 2019, 20(14):1085-102.
54. Zhu F, Du B, Xu B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018, 58(8):1260-70.



EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ



EK 2 . ETİK KURUL GEREKLİ OLMADIĞINA DAİR BELGE

Evrak Tarih ve Sayısı: 30/03/2022-163315



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı

Sayı :E-62594724-100--163315
Konu : Zeynep İrem Günhan'ın tez çalışması hk

30/03/2022

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Danışmanı olduğum yüksek lisans öğrencimiz Zeynep İrem Günhan'ın 'Avenantiramid C'nin Meme Kanseri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması' başlıklı tez çalışmasında herhangi bir insan veya hayvan materyali kullanılmayacağından etik kurul onayına ihtiyaç bulunmamaktadır. Gereğini arz ederim.

Prof.Dr. İbrahim TEKEDERELİ
Öğretim Üyesi

