

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

**BİR FLAVONOİD OLARAK RUTİNİN
TLR4/TRIF/IRF3 SİNYAL YOLU
AKTİVASYONUNDAKİ ROLÜNÜN HORMON
DUYARLI MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur KAZAN

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Asuman DEVECİ ÖZKAN

MART 2023

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

**BİR FLAVONOİD OLARAK RUTİNİN
TLR4/TRIF/IRF3 SİNYAL YOLU
AKTİVASYONUNDAKİ ROLÜNÜN HORMON
DUYARLI MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur Kazan

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

**“Bu tez /.... /2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”**

JÜRİ	KANAATİ	İMZA

BEYAN

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

.../.../2023

İmza

NUR KAZAN

TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bana her alanda ciddi katkıları olan başta danışmanım olmak üzere tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı hocalarıma çok derin teşekkürlerimi sunarım.

ESOGÜ'nin bana kazandırdığı, on üç seneden bu yana baki dostum Biyolog Selin KESEN'e bu süreçte bana olan destek ve motivasyonu için teşekkür ederim.

Ayrıca benden desteğini esirgemeyen, yüklemrimi her koşulda olumlu çekim ekleriyle çekimleyen Edebiyat Öğretmeni Semra TAYYAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitimim boyunca beni yalnız bırakmayacak olan canım aileme ve biricik kardeşim Veteriner Hekim Candan KAZAN'a varlıklarından dolayı müteşekkirim.

Sevgilerinden asla şüphe duymadığım, benim için dünyadaki çoğu şeyden daha değerli siyah kedim Jiji'me, tez deneylerim sırasında kansere yenik düşerek melek olan fakat ruhu daima benimle olan güzel kızım Lola'ma, oyuncu yeğenim Tofu'ma ve akademik kariyeri için her türlü zorluğu göze alan kendime teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER.....	v
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. MEME KANSERİ	4
2.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri	4
2.1.2. Tedavi Yöntemleri	6
2.1.3. Meme Kanseri İndamasyonun Rolü	7
2.2. FLAVONOİDLER VE RUTİN	8
2.2.1. Flavonoidler ve Anti-Karsinogenik Etkileri	8
2.2.2. Flavonoidlerin Sınıflandırılması	9
2.2.3. Rutin (RUT).....	13
2.2.4. Rutinin (RUT) Etki Mekanizmaları	14
2.3. TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER (TLRs)	15
2.3.1. TLR'lerin Yapısal Özellikleri ve TLR Sinyal Yolakları	15
2.3.2. Toll Benzeri Reseptör 4 (TLR-4).....	18
2.3.3. TLR4 Sinyal Yolağı'nın Meme Kanseri İndamındaki Rolü	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	21
3.2. RUTİN HİDRAT'IN (RUT) HAZIRLAMASI.....	22
3.3. WST-1 HÜCRE CANLILIK TESTİ	22
3.4. AKRIDİN ORANJ (AO) VE DAPI BOYAMA	23
3.5. HÜCRELERDEN TOTAL RNA İZOLASYONU.....	23
3.6. CDNA SENTEZİ VE KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) ANALİZİ	25
3.7. İMMÜNFLORESAN GÖRÜNTÜLEME (IF)	27
3.8. ÇIZIK (SCRATCH) ANALİZİ.....	28
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN SİTOTOKSİK ETKİSİ	29
4.2. RUT'UN HÜCRE MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ	31
4.3. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN APOPTOTİK HÜCRE MORFOLOJİSİ VE ÇEKİRDEK MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ	33
4.4. RUT'UN MCF-7 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TLR4 İFADE DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ.....	36

4.5. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN TLR4 VE IRF3 PROTEİNLERİNİN HÜCRESEL LOKALİZASYONU ÜZERİNE ETKİSİ	37
4.6. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN MİGRASYON ÜZERİNE ETKİSİ	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKÇA	50
ÖZGEÇMİŞ.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.



KISALTMA VE SİMGELER

AP-1	:Aktivatör protein 1
Bax	:Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BCL2A1	:Bcl-2 ile ilişkili protein A1
CCNA2	:Hücresel iletişim ağı faktörü 2
CCNE2	:Siklin E2
CDC25A	:Hücre bölünme döngüsü 25A
CDKN1B	:Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1B
cIAP	:Apoptoz proteini inhibitörü 1
CpG	:Sitozin ve guanin adacı
DAMP	:Hasar-ilişkili moleküler yapıları
DAPI	:4',6-diamidino-2-fenilindol
dNTP	:Nükleotit trifosfat
EDTA	:Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
EMT	:Epitelyal Mezankimal Geçiş Mekanizması
ER	:Östrojen reseptörü
ERK	:Ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinazlar
GSK3β	:Glikojen sentaz kinaz-3 beta
HMGB1	:Yüksek mobilite grubu kutu 1 proteini,
HSP	:Isı şok proteini
IGF-1	:İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1β	:İnterlökin-1 Beta

IL-2p70	:İnsan interlökin 2 reseptörü beta
IL-6	:İnterlökin-6
IRAK	:İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinazlar
IRF	:İnterferon düzenleyici faktör 3
IRF3	:İnterferon düzenleyici faktör 3
IRF3	:İnterferon düzenleyici faktör 3,
JAK	:Janus kinaz 2
JNK	:c-Jun N-terminal kinazlar
LHRH	:Lütein hormonu salgılatan hormon
MAPK	:Mitojenle etkinleşen protein kinaz
MD2	:Miyeloid farklılaşma faktörü 2
MyD88	:Miyeloid farklılaşma birincil yanıt geni 88
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	:Nükleer faktör kappa Beta
P38	:Mitojenle aktive olan protein kinaz 11
PARP	:Poli (ADP-riboz) polimeraz
PLK1	:Polo benzeri kinaz 1
PR	:Progestron reseptörü
PTEN	:Fosfataz ve tensin homologu
STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
TGF-β1	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
TIRAP	:TIR alanı içeren adaptör protein
TNF-α	:Tümör nekroz faktörü alfa
TRAF-6	:TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6
TRAM	:TRIF ile ilişkili adaptör molekülü
TRIF	:TIR alanı içeren adaptör indükleyici interferon-β

WST-1 :Suda çözünür tetrazolyum-1
XIAP :Apoptoz protein 3



ŞEKİLLER

Şekil 1. Flavonoidlerin Temel İskelet Yapısı Ve Sınıfları.....	10
Şekil 2. Rutinin Kimyasal Yapısı Ve Başlıca Diyet Kaynakları.	14
Şekil 3. Tlr Ligandları Ve Ligand Aracılı Oluşan Bağışıklık Tepkileri.	16
Şekil 4. Tlr Sinyal Yollarının Şematik Görünümü.	17
Şekil 5. Tlr4 Bağımlı Sinyal Yolaklarının Şematik Görünümü.....	19
Şekil 6. Rut'un Mcf-7 Ve Huvec Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi.....	30
Şekil 7. Rut'un Mcf-7 Hücrelerindeki Genel Morfolojik Etkileri	32
Şekil 8. Mcf-7 Hücrelerinde Ao Boyama İle Rut'un Apoptotik Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi.....	34
Şekil 9. Mcf-7 Hücrelerinde Dapı Boyama İle Rut'un Çekirdek Morfolojisi Üzerine Etkisi.	35
Şekil 10. Rut'un Rt-Pcr İle Mcf-7 Hücrelerinde <i>Tlr4</i> Mrna İfade Seviyelerindeki Değişimler Üzerine Etkisi	37
Şekil 11. Mcf-7 Hücrelerinde If Analizi İle Rut'un Tlr4 Proteininin Hücresel Lokalizasyonu Üzerine Olan Etkisi.	38
Şekil 12. Mcf-7 Hücrelerinde If Analizi İle Rut'un Irf3 Proteininin Hücresel Lokalizasyonu Üzerine Olan Etkisi.	39
Şekil 13. Rut'un Mcf-7 Hücrelerindeki Çizik (Strach) Analizi Sonuçları.....	41

TABLÖLAR

Tablo 1. q-PCR Deneylerinde Kullanılan Gene Özgöl Primer Çiftleri.....	26
Tablo 2. Rut'un Doza Ve Zamana Bağlı Olarak Gösterdiği Canlılık Analizi Sonuçları	31
Tablo 3. Rut'un Mcf-7 Hücrelerinde Tlr4 İfadesi Kat Değişimleri Üzerine Etkisi ..	36



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Meme kanseri, dünya çapında ikinci en yaygın malign neoplazm türü olmakla birlikte hastalığın tedavisi çeşitli klinik özellikler ve kemoterapötiklerin toksik yan etkileri nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle yeni terapötik bileşiklerin meme kanserindeki etkilerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4), Toll-benzeri reseptör ailesinin en önemli üyelerinden biridir ve meme kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonu progresyona eşlik etmektedir. Rutin (RUT) bir polifenolik flavonoid olup, gösterdikleri anti-neoplastik etkinlikler nedeniyle kanser immunoterapisinde dikkat çekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada RUT'un TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolu aktivasyonundaki rolünün hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ YÖNTEM: RUT konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesi WST-1 analizi ile, TLR4 ekspresyon seviyesi RT-PCR analizi ile, TLR4 ve IRF3 hücresel lokalizasyonu IF boyama ile ve anti-migratif etkisi Strach (Çizik) analizi ile tespit edilmiştir.

BULGULAR: RUT' un MCF-7 hücrelerinin canlılığını ve migrasyonunu azalttığı, tipik apoptotik morfolojiyi arttırdığı, TLR4 ekspresyonunu baskıladığı, TLR4'ün endozomal lokalizasyonunu ve IRF3'ün nükleer translokasyonunu azalttığı belirlenmiştir.

SONUÇ: Çalışmada RUT'un anti-inflamatuar etkinlik ile hormon duyarlı meme kanserinde TLR4'e karşı antagonist aktivite göstererek TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yoluna aracılık edebileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca, RUT ve TLR aktivasyonun dahil olabileceği hücre kaskadının ortaya konulması için daha fazla *in vitro* araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, flavonoid, meme kanseri, rutin, TLR4

SUMMARY

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Although breast cancer is the second most common malignant neoplasm worldwide, the treatment of the disease is limited due to various clinical features and toxic side effects of chemotherapeutics. Therefore, it is important to evaluate the effects of new therapeutic compounds in breast cancer. Toll-like receptor 4 (TLR4) is one of the most important members of the Toll-like receptor family, and its overexpression in breast cancer cells is associated with progression. Rutin (RUT) is a polyphenolic flavonoid that draws attention in cancer immunotherapy due to its anti-neoplastic activities. Therefore, in this study, it was aimed to investigate the role of RUT in TLR4/TRIF/IRF3 signaling pathway activation in hormone-sensitive breast cancer cells.

METHODS: The cytotoxicity of RUT concentrations in MCF-7 cells was determined by WST1 analysis, TLR4 expression level was determined by RT-PCR analysis, cellular localization of TLR4 and IRF3 was determined by IF staining and its anti-migratory effect was determined by Strach assay.

RESULTS: It was determined that RUT decreased the viability and migration of MCF7 cells, increased typical apoptotic morphology, suppressed TLR4 expression, decreased endosomal localization of TLR4 and nuclear translocation of IRF3.

CONCLUSION: In the study, it was revealed that RUT may mediate TLR4/TRIF/IRF3 signaling pathway by showing anti-inflammatory activity and antagonist activity against TLR4 in hormone sensitive breast cancer. Moreover, more in vitro research is needed to elucidate the cell cascade in which RUT and TLR activation may be involved.

Key Words: Apoptosis, breast cancer, flavonoid, rutin, TLR4

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, dünya çapında ikinci en yaygın malign neoplazm türüdür. GLOBOCAN verilerine göre 2021 yılında dünya genelinde 2 milyondan fazla yeni vaka tespit edilmekte ve görülme sıklığının daha da artması beklenmektedir (Pilevarzadeh et al 2019, Barone et al 2020). Meme kanseri, genetik ve epigenetik olarak farklı hastalıkların oldukça heterojen bir grubu olup; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil çeşitli tedavi yolları mevcuttur (Barone et al 2020). Meme kanseri hastalarının tedavisi, çeşitli klinik özellikler ve kemoterapötiklerin toksik yanları nedeniyle sınırlı kalmaktadır (Guan et al 2019). Bu nedenle, başarılı klinik uygulamalar sağlamak için mevcut kemoterapi ve/veya yeni terapötik ilaçların ve/veya bileşiklerin meme kanserindeki etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), farklı hücre içi sinyal yolları aracılığıyla kanser ve/veya diğer hastalıklarla bağlantılı patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP'ler) tanıyarak immün yanıtta çok önemli bir rol oynamaktadır (Poltorak et al 1998, Aliprantis et al 1999, Hemmi et al 2000, Wagner 2006). TLR'ler, tümör ilerlemesinde ve tedavisinde TLR'lerin veya TLR ile ilişkili sinyalleşme basamaklarının aktivasyonuna göre farklı etkiler göstermektedir (Zhao et al 2014). Tümör ilerlemesinde, TLR'ler akciğer, prostat ve meme dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde aşırı eksprese edilmekte ayrıca, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını desteklemektedir (Fukata et al 2007, He et al 2007, Ilvesaro et al 2007, Curtin et al 2009). Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4), TLR ailesinin lipopolisakkarit (LPS) tarafından uyarılan en önemli üyelerinden biridir (Poltorak et al 1998). Meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen TLR4, apoptoz ve metastaza karşı direnç geliştirilmesine aracılık ederek tümörü teşvik edici bir rol sergilemektedir (Jiang et al 2015). Örneğin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TLR4 ve MyD88 ekspresyon seviyeleri LPS uyarımı ile artırılırken TLR4 sinyalinin baskılanması meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasını engellemektedir (Yang et al 2010, Yang et al 2014). LPS tarafından TLR4 sinyalinin aktivasyonu, MyD88'e bağımlı veya TRIF kaskadını

içeren MyD88'den bağımsız yol olmak üzere iki farklı yolu desteklemektedir. MyD88'e bağlı yol; TIRAP, IRAK2/IRAK4, TRAF6 ve NF-κB aktivasyonuna neden olarak IL-1β, TNF-α ile IL-6 dahil farklı proinflatuar sitokinlerin salınımını indüklemektedir. Ancak, MyD88'den bağımsız TRIF yolunun aktivasyonu MyD88'e bağımlı yolun aksine TLR4/TRIF/endozomal kompleksin içselleştirilmesine dayanmaktadır. Bu yola TRAM ile IRF3 fosforilasyonunun ve interferon β (IFN-β) transkripsiyonunun başlatılması aracılık etmektedir (Kuzmich et al 2017).

Diyet polifenollerini bitkilerde yaygın olarak bulunur ve biyoaktif potansiyelleri nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir (Han et al 2007). Meyve ve sebze tüketiminin artmasının, kısmen polifenollerin etkilerine bağlı olarak kanser insidansını azaltabileceği iyi bilinmektedir (Batra and Sharma 2013, Niedzwiecki et al 2016). Flavonoidler, temel benzo-γ-piron isketine sahip düşük moleküler ağırlıklı doğal polifenolik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır. Bitki sekonder metabolitleri olup, çeşitli sebzelerde, meyvelerde, tahıllarda, sert kabuklu yemişlerde ve belirli içeceklerde (çay, kahve) yaygın olarak bulunmasıyla diyet polifenollerinin ana kategorisi olarak kabul edilmektedir (Sharma et al 2011). Çeşitli flavonoidler arasında, quercetin ve ramnoz-glukoz disakkaritin glikosile edilmiş bir formu olan Rutin (RUT) meyve ve sebzelerde yaygın olarak dağılmıştır (Gentile et al 2015). Aynı zamanda rutosid, quercetin-3-O-rutinosid, vitamin P ve soforin olarak da bilinmektedir. Molekül ağırlığı 610.53 kD ve kimyasal formülü $C_{27}H_{30}O_{16}$ olan sarı-yeşil renkli iğne şeklinde bir kristaldir. Adı RUT açısından zengin olan *Ruta graveolens* L. bitkisinden gelmektedir (Patel and Patel 2019). RUT'un hücre döngüsü aracılığı, hücre kinazlar, inflammatuar sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve reaktif oksijen türleri gibi karsinogeneze yer alan birçok moleküler hedefi modüle ettiği bilinmektedir (Park et al, 2016, Nafees et al 2018, Farha et al 2022). Farklı doğal ürünlerin farklı TLR sinyalleri üzerindeki baskılayıcı etkisini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Murakami et al 2000; Safarinejad 2010). Ancak meme kanserinde TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonu üzerine RUT'un potansiyel etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada RUT'un TLR4'e bağlı TRIF sinyalleme üzerindeki etkilerinin hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır. Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i ER ve/veya PR için pozitifdir. Bu nedenle çalışmamızda RUT'un

potansiyel immünoterapötik etkisinin ilk defa MCF-7 hücrelerinde araştırılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri en sık görülen malignitelerden biridir ve günümüzde meme kanseri başta cinsiyet kadın olmak üzere, kişi beden ve metal sağlığı için önemli bir tehdit unsuru oluşturmaktadır (Seksenyan et al 2015). Meme kanseri oldukça heterojen karakter sergileyen bir hastalık olup klinik tedavi ve prognoz hastalar arasında büyük farklılıklar göstermektedir (Turashvili and Brogi 2017). Erken teşhis ve tedavideki ilerlemeler meme kanserinde ölümü %38 oranında azaltmıştır, nitekim neoadjuvan ve ana tedavi sonrası pre-neoplastik veya metastatik olmayan kanserden invazif karaktere bağlı nüksler mortaliteyi arttırmaktadır (Shaukat et al 2013). Meme kanseri tedavisinde bu hastalığa bağlı nüksü ve ölümü azaltan yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç söz konusudur. Son yıllarda elde edilen veriler, meme kanseri hastalarında hem standart tedaviye yanıtı hem de uzun süreli sağ kalımı belirlemede bağışıklık sisteminin önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir (Savas et al 2016).

2.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri

Meme kanseri çeşitli tedavi yöntemlerine ve klinik sonuçlara yanıt modellerinde farklılıklar gösteren birçok alt tipten oluşan bir spektruma sahiptir. Meme kanseri alt tiplerinin sergiledikleri farklı biyolojik özellikler nedeniyle heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tümör boyutu, lenf nodu tutulumu, histolojik derece, hastanın yaşı, ER, PR ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2 veya c-erbB2) durumu gibi biyolojik özelliklere ilişkin geleneksel sınıflandırma sistemleri, hastaya özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesini oldukça kısıtlamaktadır (Schmidt et al 2016). Ayrıca tümörlerin histolojik görünümü, altta yatan karmaşık genetik

değişiklikler kanser gelişimi ve ilerlemesinde yer alan biyolojik olayları belirlemek için yeterli olmamaktadır. Benzer klinik ve patolojik prezantasyonlara sahip tümörlerin farklı davranışları bulunmaktadır (Yersal 2014). Bu nedenle, son çalışmalar hasta risk sınıflandırmasını iyileştirmek, belirli bir tedavi modalitesinden en yüksek fayda şansını sağlamak ve toksisiteyi azaltmak için daha ayrıntılı biyolojik özellikleri tanımlamaya odaklanmaktadır (Moccia and Haase 2021). Bu konuda global gen ekspresyon profillemesi (GEP) çalışmaları, meme kanserinin gen ekspresyon paternlerine dayalı olarak sağkalım ile ilişkisini farklı biyolojik sınıflarda tasnif için kanıt sağlamaktadır (Rakha and Ellis 2011, Eroles et al 2012).

Analizler, klinik olarak ER-pozitif ve ER-negatif olmak üzere iki ana grubu tanımlamaktadır. ER-pozitif gruptaki tümörler, meme lümen hücreleri tarafından ifade edilen birçok genin (ER-yanıt veren genler, lümen sitokeratinleri ve diğer lümenle ilişkili belirteçler) nispeten yüksek ekspresyonu ile karakterize edilmekte ve bu nedenle lümenal grup olarak adlandırılmaktadırlar (Naderi et al 2007). Luminal-A en yaygın alt tip olup tüm meme kanserlerinin %50-60'ını temsil etmektedir. Bu tümörler sıklıkla düşük histolojik dereceye, düşük nükleer pleomorfizme, düşük mitotik aktiviteye sahiptir ve iyi prognoza ait histolojik tipleri (tübüler, invaziv kribriform, müsinöz ve lobüler) içermektedir. Luminal-A daha yüksek ER seviyeleri ve daha düşük proliferasyonla ilgili gen seviyeleri ile karakterize edilmektedir (Carey et al 2010). Luminal-B tümörleri meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Luminal-B daha agresif bir fenotipe, daha yüksek histolojik dereceye, proliferatif indekse ve daha kötü bir prognoza sahiptir (Creighton 2012). Bu tip Luminal-A ile karşılaştırıldığında daha yüksek nükse ve nüks sonrası daha düşük sağkalım oranlarına sahiptir (Ellis et al 2008).

ER-negatif grup ise bazal-benzeri, ErbB2-pozitif (HER2-pozitif) ve normal-benzeri alt sınıflarına ayrılmaktadır. Bazal benzeri tümörler, ER eksprese etmeyen ve bazal keratinlerle boyanma gösteren meme bazal epitel hücrelerinin birçok özelliğini eksprese eden tümörlerdir. Diğer bir tümör kümesi olan ErbB2-pozitif, düşük seviyelerde ER ekspresyonu ve ER ekspresyonu ile bağlantılı diğer genleri de ifade eden yüksek seviyelerde HER2 onkogen ekspresyonu ile karakterize edilmektedir (Naderi et al 2007). Normal-benzeri tümörler ise luminal ve bazal benzeri arasında bir

ara prognoz sunan adipoz dokusunun gen özelliklerini ifade etmektedir ve genellikle neoadjuvan kemoterapiye yanıt vermemektedir. ER, PR ve HER2 ekspresyonundan yoksun olduklarından, bu tümörler üçlü negatif olarakta isimlendirilmekte ve tüm meme kansinonlarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır (Weigelt et al 2010).

2.1.2. Tedavi Yöntemleri

İnsan meme tümörlerinin yaklaşık %70'i hormon reseptörlerini (HR/HR+) ifade etmektedir (EBCTCG 2011). Östrojen tarafından uyarıldıktan sonra ER, spesifik epigenetik olaylar yoluyla oldukça organize bir şekilde genomdaki belirli bölgelere alınmaktadır (Lupien et al 2008). ER sinyali; östrojenlerin ER'ye bağlanmasının tamoksifen ile antagonize edilmesi, aromataz inhibitörleri (Als) veya LHRH agonistleri ile östrojen biyosentezinin bloke edilmesi ve ER'nin fulvestrant (Faslodex) ile aşağı regüle edilmesi ile etkin bir şekilde hedeflenebilmektedir (Johnston and Cheung, 2010). Adjuvan anti-östrojen tedavisine rağmen hastaların önemli bir azınlığında nüks görülmekte ve bununla birlikte metastatik karakter gösteren çoğu hastada anti-östrojen tedavilerine direnç gelişmektedir (Ozyurt and Ozpolat 2022). HR+ tümörleri tek bir hastalık antitesini temsil etmemekte olup önemli moleküler ve klinik heterojenlik sergilemektedir (Perou et al 2000). Diğer meme kanseri alt tiplerinden farklı olarak, HR+ meme kanseri genellikle geç nükslerle ilişkilidir (Saphner et al 1996, Esserman et al 2011). Adjuvan anti-östrojen tedavisini takiben yıllık uzak nüks riski, kapsamına bağlı olarak %1 ila %4 arasında olmaktadır (Goss et al 2008). Adjuvan kemoterapinin kullanımı ve anti-östrojen rejimler ile kombin tedavi bazı hastalara fayda sağlamakla birlikte (Paik et al 2006), geç nüksü engelleme konusunda yeterli olmamaktadır (Lin and Winer 2008). Halihazırda prediktif belirteçler ve alternatif tedavi stratejilerinin açıkça gerekli olduğu tedavi direnci ve geç relapsın altında yatan mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir (Lim et al 2012; Rani et al 2019).

Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i ER ve/veya PR için pozitifdir. ER-pozitif tümörler, lümen epitel hücrelerinin tipik proteinlerini kodlayan ER, PR, ER'ye yanıt veren genler ve diğer genleri ifade etmektedir (Sotiriou et al 2003, Habashy et al 2012). MCF-7, 40

yılı aşkın bir süredir yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre dizisi olup (Baguley and Leung 2011) ER pozitif / PR pozitifdir (Shirazi et al 2011) ve lümen A moleküler alt tipine (Constable et al 2017) aittir. Muhtemelen yakın gelecekte, düzenlemenin tümöral anahtar mekanizmaları ayrı ayrı tanımlanarak tedaviler minimum toksisite ile daha spesifik ve etkili olacaktır. Çeşitli biyolojik yolları hedefleyen çok sayıda ajan, meme kanserinde kişiselleştirilmiş bir tıbbi terapötik yaklaşıma ulaşmak için şu anda klinik geliştirme aşamasındadır. Bu nedenle çalışmamız bir flavonol glikoziti olan RUT potansiyel immünoterapötik etkisini ilk defa MCF-7 hücre hattında in vitro olarak araştırılmasını hedeflemiştir.

2.1.3. Meme Kanserinde İnflamasyonun Rolü

İnflamasyon ve kanser arasındaki bağlantı ilk olarak 1863'te öne sürülmüştür (Keibel et al 2009). Ancak yine de inflamasyonun kanseri şiddetlendirdiği veya uzlaştırdığı bugüne kadar tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Bir cerrah olan William Coley, 1891'de erizipel ile enfekte olmuş hastalarda kanserin gerilediğini gözlemlemiştir ve "Coley toksini" olarak bilinen bakteriyel toksini kanser tedavisinde kullanmıştır [60]. Öte yandan kronik inflamasyonun, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında kolon kanseri gibi kanser gelişme riskini arttırdığı bilinmektedir (Itzkowitz and Yio 2004). İnflamatuvar mediatörler, stromal hücreleri doğrudan etkileyerek epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) teşvik edilmesi ve kanser hücrelerinin metastazı gibi kanserin çeşitli ayırt edici özelliklerine katkıda bulunmaktadır (Suarez-Carmona et al 2017). Tüm meme kanseri kohortunda, yüksek inflamatuvar yolak skoru olan tümörler, daha kötü prognoza özgü sağkalım, daha yüksek Nottingham histolojik derecesi ve tanı anında daha genç yaş gibi agresif klinik özellikler ile ilişkilendirilmiştir (Bunt et al 2007). Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ile bazal ve normal benzeri alt tiplerde inflamatuvar skorun diğer alt tiplere göre anlamlı derecede yüksek olması, yüksek düzeyde inflamasyonun zararlı etkisinin agresif bir alt tip içermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Qiu et al 2018).

2.2. FLAVONOİDLER VE RUTİN

2.2.1. Flavonoidler ve Anti-Karsinogenik Etkileri

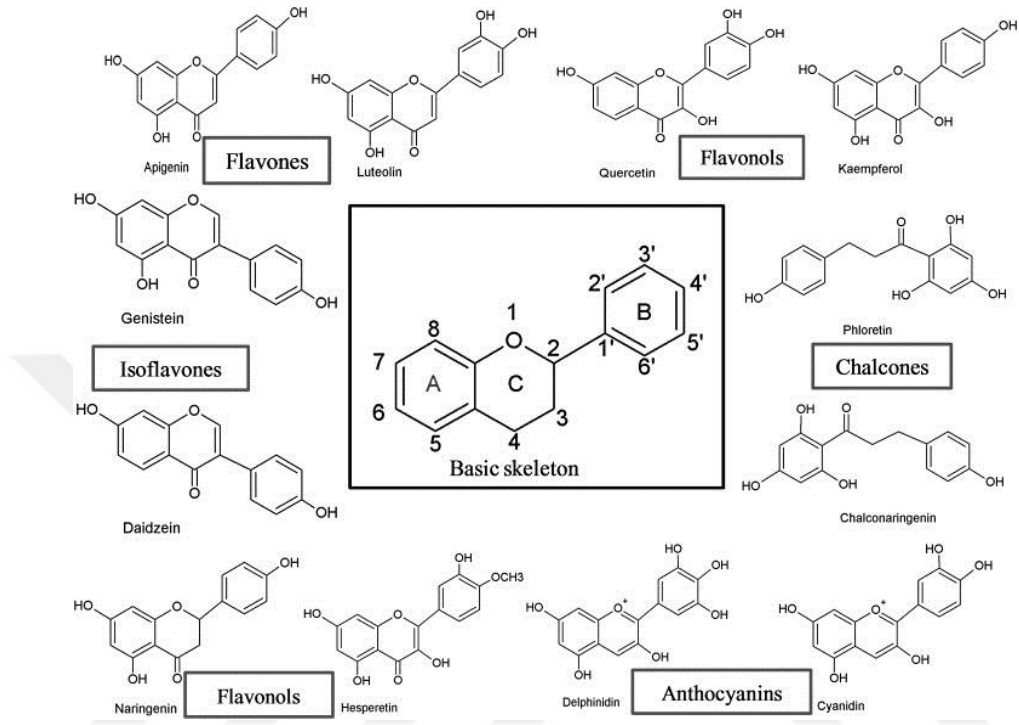
Flavonoidler, temel benzo- γ -piron isketine sahip düşük moleküler ağırlıklı doğal polifenolik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır (Panche et al 2016). Flavonoidler bitki sekonder metabolitleri olup çeşitli sebzelerde, meyvelerde, tahıllarda, sert kabuklu yemişlerde ve özellikle belirli içeceklerde (çay, kahve) yaygın olarak bulunmaktadır. Çeşitli farmasötik, nutrasötik, kozmetik ve tıbbi uygulamalar gibi geniş bir yelpazede kullanılan flavonoidler özellikle sağlık sektörünün önemli bir bileşenidir (Panche et al 2016). Ayrıca flavonoidler, anti-viral, hepatoprotektif, anti-bakteriyel, analjezik, antialerjik, anti-östrojenik/östrojenik ve apoptotik dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik potansiyele sahiptir (Kumar and Pandey 2013). Flavonoidlerin bu çeşitli farmakolojik aktiviteleri; doğrudan ve dolaylı antioksidan görevi, faz I ve II detoksifikasyon enzim aktivitelerinin modülasyonu, protein kinazların inhibisyonu, gen transkripsiyonunun modülasyonu, hücre döngüsünün kontrolü ve epigenetik etkinlikleri dahil çeşitli moleküler mekanizmalara ilişkilendirilmiştir (Jucá et al 2020; Khan et al 2021). Flavonoidlerin karsinogenezi destekleyen epigenetik mekanizmaları tekrar düzenleyebileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur Jiang et al 2021, Khan et al 2021). Genel olarak, bu fotokimyasal ajanlar, tümör baskılayıcı genlerin aktif hale getirilmesi ve onkogen ekspresyonunun bloke edilmesiyle sonuçlanan anahtar sinyal transdüserlerini hedefleyerek tümörün ilerlemesini baskılamaktadır (Kasi et al 2016). Flavonoidler özellikle DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar (HDAC) ve histon asetiltransferazlar (HAT) gibi enzim aktivitelerini doğrudan düzenleyerek anti-tümör etkinlik göstermektedir Jiang et al 2021, Khan et al 2021). Ayrıca çeşitli hastalıklar sırasında flavonoidlerin, değişen mikro RNA (miRNA) ve uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) profilini de düzenleyerek invazyon sürecini yönlendirdiğine dair kanıtlar mevcuttur (Izzo et al 2020).

Kanser tedavisinde kemoterapötik ajanların hayat kurtarıcı rolüne rağmen normal hücreler üzerindeki potansiyel aşırı toksik etkileri en büyük dezavantajların başında gelmektedir. Bu nedenle kümülatif tedavide istenmeyen yan etkileri olmayan daha iyi

ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Anti-karsinojenik flavonoidlerin çoğu normal hücrelere karşı nispeten daha az toksisiteye sahip olduğundan umut vadetmektedir (Galati and O'Brien 2004). Nitekim bazı flavonoidlerin normal hücrelerde serbest radikaller, mutajen kaynağı pro-oksidanlar ve yüksek dozlarda endokrin sistemde anahtar rol oynayan enzimlerin inhibitörleri olarak hareket edebildikleri de rapor edilmiştir (Skibola and Smith 2000). Buna rağmen çok sayıda çalışma epigenetik modifikasyon potansiyeline sahip flavonoidler, kombinasyon tedavi dahil olmak üzere kemoterapötik yaklaşımlar için oldukça etkili seçimler olabileceği düşünülmektedir (Izzo et al 2020). Bu nedenle flavonoidlerin, güvenilirliklerinin ve yan etkilerinin değerlendirilmesi için daha ileri toksisite çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır.

2.2.2 Flavonoidlerin Sınıflandırılması

Flavonoidler, B halkasının bağlı olduğu C halkasının karbonuna, C halkasının doymamışlık ve oksidasyon derecesine bağlı olarak alt gruplara ayrılmaktadır (Kumar and Pandey 2013) (Şekil 1). İzoflavonlar B halkasının C halkasına 3. konumundan bağlandığı flavonoidlerdir. B halkasına 4. konumundan bağlı olanlar ise neoflavonoidler olarak isimlendirilmektedir. Neoflavonoidler B halkasının 2. konumunda bulunduklarında C halkasının yapısal özelliklerine göre temel olarak 6 alt grup oluşturmaktadır. Bu alt gruplar şunlardır: flavonlar, flavonoller, flavanonlar, kateşinler, antosiyaninler ve kalkonlar (Kumar and Pandey 2013).



Şekil 1. Flavonoidlerin temel iskelet yapısı ve sınıfları (Panche et al 2016).

Flavonlar, çeşitli farmakolojik özelliklere sahip 2-fenilkromen-4-on omurgası içeren; kereviz, maydanoz ve yenilebilir tahıllar başta olmak üzere hemen hemen tüm bitkilerde yaygın olarak bulunan bir flavonoid grubudur. Apigenin, luteolin, tangeretin, krisin, triclin, baicalein, roifolin ve 6-hidroksiflavon bazı yaygın flavon türlerindendir (Barreca et al 2020).

Flavonoller, keton grubu içeren flavonoidlerdir. Pro-antosiyeninlerin monomerleri olan flavonoller, çeşitli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır. En çok çalışılan flavonollerin başında kaempferol, kuersetin, mirisetin ve fisetin gelmektedir. Soğan, lahana, marul, domates, elma, üzüm ve çilek flavonol açısından zengin besin kaynaklarıdır. Meyve ve sebzelerin yanı sıra çay ve kırmızı şarap da

önemli flavonol kaynaklarını oluşturmaktadır (Häkkinen et al 1999). Mevcut literatür flavonollerin anti-oksidan potansiyeline ve vasküler hastalık riskini azalttığına yönelik önemli bulguları ortaya koymaktadır (Kozłowska and Szostak-Węgierek 2022). Flavonlarla karşılaştırıldığında, flavonoller, C halkasının 3. pozisyonunda da glikozide olabilen bir hidroksil grubuna sahiptir. Flavonoller çeşitli metilasyon, hidroksilasyon ve glikozilasyon potansiyelleri sebebiyle en yaygın ve en büyük flavonoid alt grubudur (Russo and Ungaro 2019). Özellikle quercetin birçok bitkisel gıdada bulunan ve kemopreventif yönü çokça çalışılmış bir flavonoldür (Iwashina 2015, Vafadar et al 2020). Kuersetin'nin meme (Dixon and Pasinetti 2010), akciğer (Kumar and Pandey 2013), nazofaringeal (Panche et al 2015), böbrek (Manach et al 2004), kolorektal (Iwashina 2015), prostat (Matthies et al 2008), pankreas (Aoki et al 2000) ve yumurtalık (Dixon 2002) kanserleri gibi çok çeşitli kanser türlerinde kötü prognozu önlediği bildirilmiştir.

Flavanonlar, genellikle portakal, limon ve üzüm gibi tüm turuncgillerde bulunan bir diğer önemli flavonoid sınıfıdır. Hesperitin, naringenin ve eriodictyol bu flavonoid sınıfının yaygın örneklerindendir. Flavanonlar narenciye meyvelerinin suyunun ve kabuğunun acı tadından sorumludur. Narenciyede bulunan flavanonlar; anti-oksidan, anti-inflamatuar etkinlikleri; ayrıca kandaki kolesterol ve gliserol miktarını düşürücü ajan olma potansiyelleri nedeniyle çeşitli farmakolojik özellik göstermektedir (Iwashina 2015). Flavanonlar, serbest radikal bağlayıcı özelliklerinden dolayı bir dizi hastalığın tedavisi ile yakından ilişkilidir (de Souza Farias et al 2021).

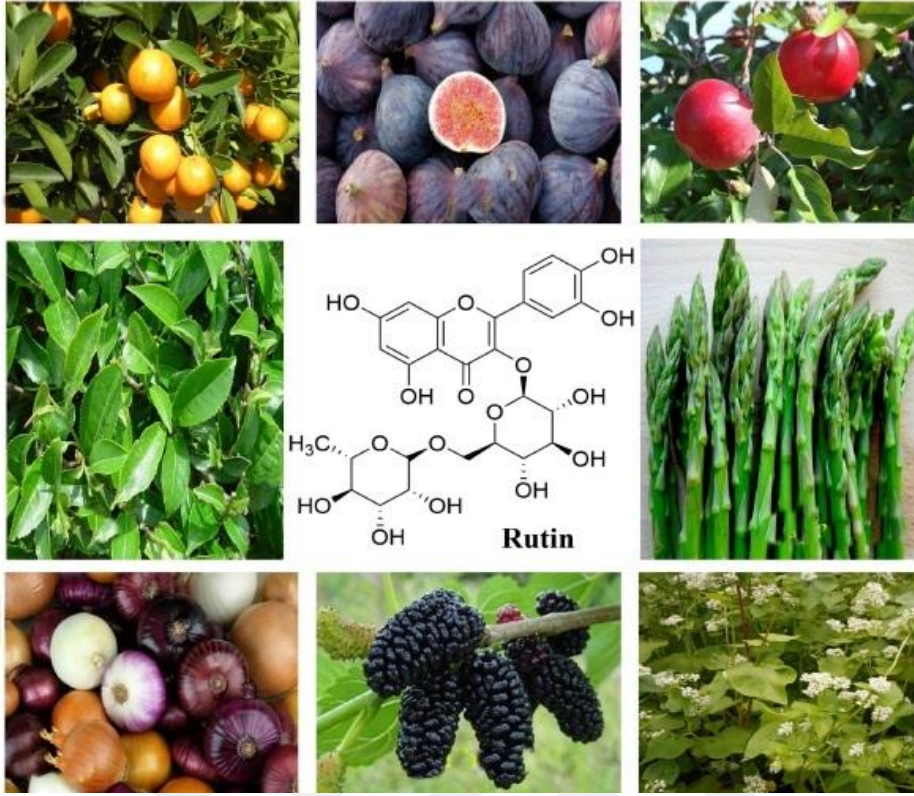
Dihidroflavonoller veya kateşinler olarak da adlandırılan flavanonoller, flavanonların 3-hidroksi türevleridir. Kateşinler yeşil çay, muz, elma, yaban mersini, şeftali ve armutta bol miktarda bulunmaktadır. Yeşil çay kateşinlerinin en bilineni olan epigallocateşin-3-gallat (EGCG) farklı kanser modellerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir. Özellikle, hem içsel (mitokondriyal) hem de dışsal (ölüm reseptörü) apoptotik yollar ile anti-proliferatif etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Liu et al 2017). Nükleer yoğunlaşma, kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP inaktivasyonu, yeşil çay (Green Tea/GT) kateşinlerinin ana apoptotik özellikleri arasında yer almaktadır (Gossiau et al 2011).

Antosiyaninler kırmızı, mor ve mavi renkli meyve ve sebzelerde bol bulunan flavonoid türevleridir (Miyake et al 2012, Burton et al 2015). Bitkilerde, çiçeklerde ve meyvelerde renklerden sorumlu pigmentler olan antosiyaninler, pH'a ve ayrıca A ve B halkalarındaki hidroksil gruplarındaki metilasyon veya asilasyona bağlı olarak farklı renkleri yansıtır (Iwashina 2015). Kızılcık, siyah kuş üzümü, kırmızı üzüm, merlot üzümü, ahududu, çilek, yaban mersini, böğürtlen gibi çeşitli meyvelerin ve yam patates, kırmızı lahana gibi bitkilerin dış hücre katmanında bol miktarda bulunmaktadır (Giusti and Wrolstad 2003). Siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin ve peonidin en bilinen antosiyaninlerdendir. Çok sayıda araştırma, antosiyaninlerin insan sağlığı üzerinde potansiyel anti-kanser aktiviteye sahip olduğunu; kanser önleme ve yönetimi için nutrasötik olarak şiddetle tavsiye edildiğini göstermektedir (Chen et al 2022). Antosiyaninlerin P glikoproteinini inhibe ederek ve tübülün polimerizasyonunu azaltarak prostat kanserinde kemo-duyarlılığı arttırdığı rapor edilmiştir (Eskra et al 2019). Antosiyaninlerin in vitro çalışmalardan ortaya çıkan potansiyel kemopreventif aktiviteleri; faz II detoksifiye edici enzimlerin stimülasyonunu, anti-proliferasyonu, anti-inflamasyonu, anti-anjiyogenezi, anti-invazyonu, anti-metastazi, apoptozu, otofajiyi ve farklılaşmanın indüklenmesini içermektedir (Wang and Stoner 2008).

Flavonoidlerin alt sınıfı olan kalkonlar; temel flavonoid iskelet yapısında C halkasının olmaması ile karakterize edilmektedir. Bu nedenle, açık zincirli flavonoidler olarak da adlandırılmaktadır. Kalkonların başlıca örnekleri arasında floridzin, arbutin, floretin ve kalkonaringenin gelmektedir. Domates, armut, çilek, yaban mersini ve bazı buğday türleri önemli kalkon kaynaklarıdır (Gaonkar and Vignesh 2017). Kalkonlar ve türevleri, sayısız besinsel ve biyolojik faydaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Katsori and Hadjipavlou-Litina 2011). Bir kalkon olan naringenin hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası mekanizmalar yoluyla inflamatuvar sitokin üretimini baskılayarak tümör mikroçevresini düzenlediği ortaya konulmuştur (Barfod et al 2002). Ayrıca naringenin, sitokin üretimini transkripsiyonel düzeyde düzenleyerek yeni anti-inflamatuvar ajanın geliştirilmesi için model teşkil etmektedir (Zeng et al 2018).

2.2.3. Rutin (RUT)

Flavonoidler, diyet polifenollerinin ana kategorisi olarak kabul edilmektedir (Sharma et al 2011). Bitkilerde bulunan çeşitli flavonoidler arasında, quercetin ve ramnoz-glukoz disakkaritinin glikozile edilmiş formu olan rutin (RUT) (Şekil 2) yaygın olarak dağılmıştır (Gentile et al 2015). Aynı zamanda rutoside, quercetin-3-O-rutinosid, vitamin P ve sophorin olarak da bilinen RUT, molekül ağırlığı 610.53 kD ve kimyasal formülü $C_{27}H_{30}O_{16}$ olan sarı-yeşil renkli iğne şeklinde bir kristaldir. Adı RUT açısından zengin olan *Ruta graveolens L.* bitkisinden gelmektedir (Patel and Patel 2019). RUT'un emilimi ve metabolizması üzerine yapılan araştırmalar, zayıf emilime ve düşük biyoyararlanıma sahip olduğunu göstermektedir (Mel et al 2020). Bununla birlikte RUT, anti-kanser, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, anti-oksidan, kardiyovasküler koruyucu ve anti-diyabetik aktiviteler gibi birçok sağlık yararına sahip aday bileşik olarak tanımlanmıştır (Ganeshpurkar and Saluja 2017). Özellikle RUT'un hem kemoterapötik hem de kemopreventif potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Sharma et al 2013, Dixit 2014, Perk et al 2014). Çok sayıda çalışmada, RUT'un meme (Ghasemzadeh et al 2014), pankreas (Saleh et al 2019), kolon (Nasri Nasrabadi et al 2019), ve prostat (Satari et al 2019) gibi kanser hücrelerinde in vitro proliferasyonu engellediği ortaya koymuştur (Farha et al 2022). RUT'un anti-kanser etkileri arasında hücre proliferasyonunun önlenmesi (Abdul Hamid Hasani et al 2017), apoptozun tetiklenmesi (Nafees et al 2018), otofajinin indüklenmesi (Park et al 2016), anjiyogenezin baskılanması (Chuang et al 2010) ve metastazın engellenmesi (Ghasemzadeh et al 2014) gelmektedir. Ayrıca RUT'un hücre döngüsü aracılarını, hücresel kinazları, inflamatuvar sitokinleri, transkripsiyon faktörlerini ve reaktif oksijen türlerini modüle ederek karsinogenezde yer alan birçok moleküler mekanizmayı hedeflediği bilinmektedir (Park et al 2016, Nafees et al 2018, Farha et al 2022).



Şekil 2. Rutinin kimyasal yapısı ve başlıca diyet kaynakları (Farha et al 2022).

2.2.4. Rutinin (RUT) Etki Mekanizmaları

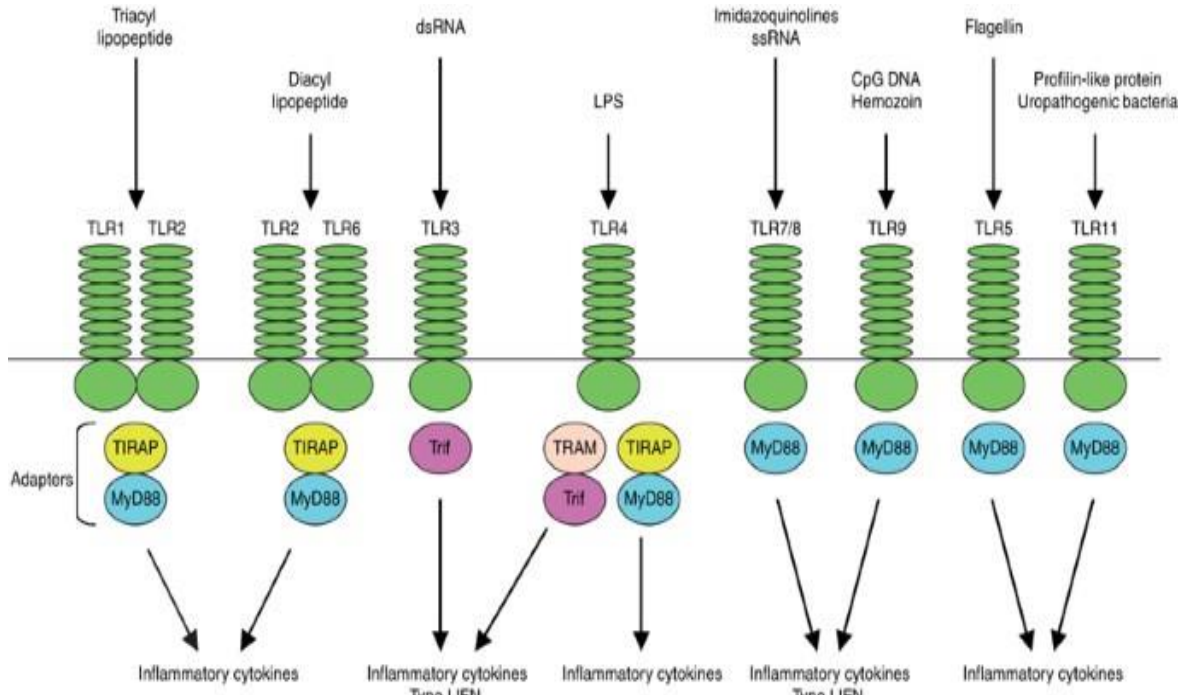
RUT, gallik asit, klorojenik asit, kumarik asit, kuersetin ve ferulik asit gibi diğer antioksidanlara benzer bir şekilde kaspazdan bağımsız bir yol aracılığıyla hücre apoptozunu indüklemektedir (Farias Wohlenberg et al 2015). Araştırmalar RUT'un insan MG-63 hücrelerinde osteoblastı uyardığını, insan lösemisi (HL-60) ve karaciğer hücrelerinde tümör boyutunda kayda değer bir azalma sağladığını, hepatoselüler karsinomda anti-neoplastik etkinlik gösterdiğini bildirmiştir (Lin et al 2012, Park et al 2014, Chandra and Viswanathswamy 2018). RUT hücre canlılığını azaltarak insan karaciğer hücrelerinde apoptozu indüklemektedir (Cristina Marcarini et al 2011). Ayrıca RUT'un üçlü meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231), hormon duyarlı meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de ve HTC hepatik hücrelerinde EGF, Wnt, JAK-STAT, AP-1, NF-κB ve Akt sinyalizasyonlarını düzenlediği gösterilmiştir (Perk et al 2014, Iriti et al 2017). RUT, hücre canlılığını azaltarak insan akciğeri (A549) ve

kolon (HT-29 ve Caco-2) kanser hücre hatlarının tedavisi için aday bir terapötik ajan olma potansiyeli göstermiştir (ben Sghaier et al 2016). Bu nedenle yapılan çalışmalar RUT'un kanser tedavisinde tek başına veya adjuvan tedavide anti-kanser etkinliğe sahip olabileceğini öngörmektedir.

2.3. TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER (TLRs)

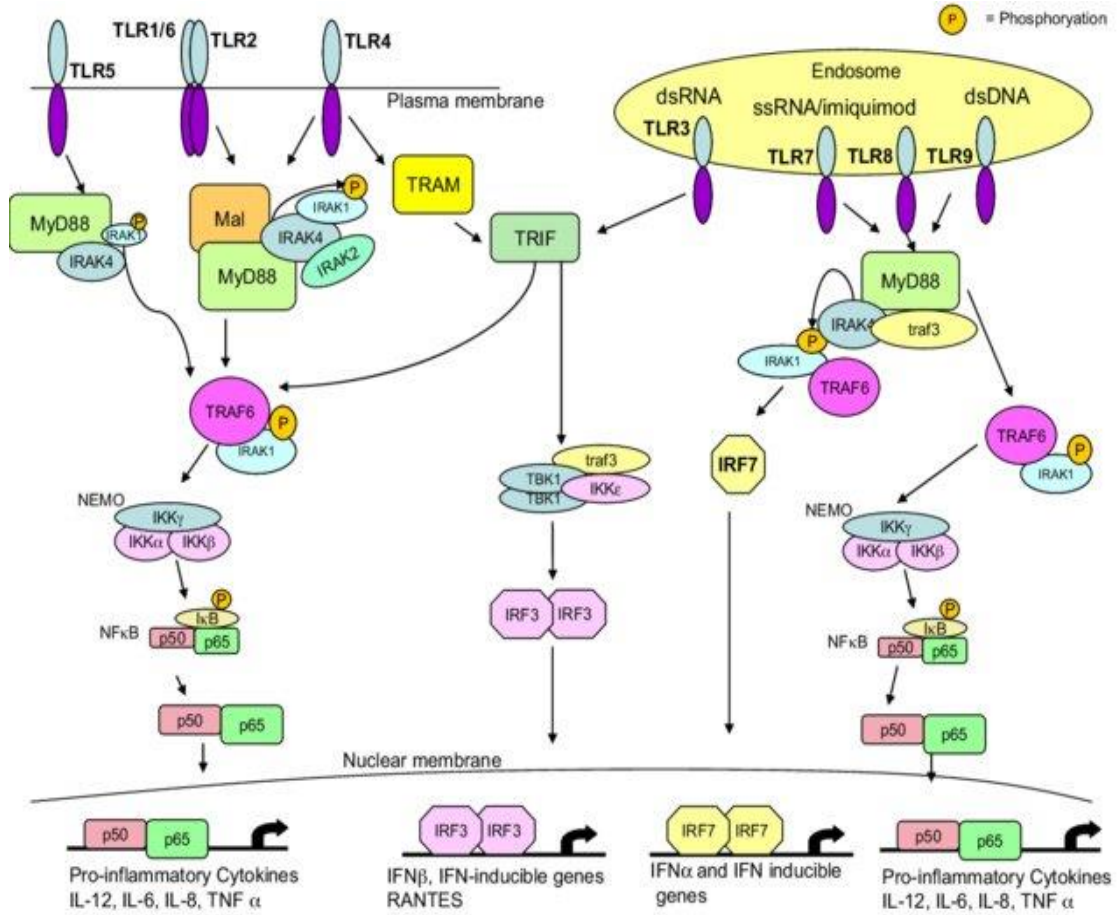
2.3.1. TLR'lerin Yapısal Özellikleri ve TLR Sinyal Yolakları

Toll benzeri reseptörler (TLR) istilacı patojenleri tanıyarak doğuştan gelen bağışıklığın aktivasyonunu sağlamakta ve adaptif bağışıklığı güçlendirmektedir (Akira et al 2001, Nishimura and Naito 2005). Toll-benzeri reseptörler doğal bağışıklıkta anahtar rol oynayan ve doğal immun sistemde patern tanıyan reseptörler (PRR) olarak görev yapan bir transmembran reseptör ailesidir. Bu reseptörler yüksek olarak korunmuş yapılar olan bakteri, virüs, mantar ve diğer parazitler gibi patojen ile ilişkili moleküler yapıları (PAMP) tanımakta ve bir dizi hücre içi sinyal kaskadı oluşturarak immün sistemi aktive etmektedir (Takeda et al 2003). Ayrıca kanser başta olmak üzere farklı bozukluklarda endojenik olarak oluşan DAMP'ları da tanımaktadır (Takeda et al 2003). İnsanlarda ekspresyon paternleri ve agonist özgünlükleri bakımından farklılık gösteren 10 TLR ailesi üyesi vardır (Hornung et al 2002). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR6 hücre yüzeyinde ifade edilmektedir ancak TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 endozomal reseptörler olarak bulunmaktadır (Takeda et al 2003). TLR'ler ligandlarını tanımak için özgünlük göstermektedir. TLR2 bakteriyal lipopolisakkaritleri, TLR3 çift zincirli bir RNA olan Poly (I:C)'yi, TLR4 LPS'yi, TLR5 flajellini, TLR7 tek zincirli RNA'yı (ssRNA), TLR9 ise DNA'daki metillenmemiş CpG'leri (CpG-ODN) tanımaktadır (Poltorak et al 1998, Heil 2004) (Şekil 3).



Şekil 3. TLR ligandları ve ligand aracılı oluşan bağışıklık tepkileri (Kawai and Akira 2006).

TLR'lerin aktivasyonu ile mevcut sinyalin bir ya da daha fazla adaptör protein (MyD88, TICAM1, TIRAP ve TICAM2) tarafından aktarımı gerçekleşmektedir. Tüm TLR'ler sinyal aktarımını (TLR3 hariç) IL-1 reseptör ailesi üyeleri ve MyD88 üzerinden yapmaktadır. TLR3 ile ilişkili sinyal kaskadı ise TRIF molekülü ile aktarılmaktadır. TLR4 ise hem MyD88 hem de TRIF yolağını kullanarak sinyal iletimini gerçekleştirmektedir (Takeda et al 2003) (Şekil 4). TLR'lerin uyarılması inflamatuvar sitokinlerin yapımıyla sonuçlanan NF- κ B, JNK, ERK, IRF3, IRF5, IRF7, MAPK ve p38 sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (Sato and Iwasaki 2004). TLR'ler immunoregülatör rollerinin yanı sıra anti-apoptotik proteinler olan BCL2A1, cIAP1, cIAP2, XIAP ve Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonunu arttırarak hücre ölüm mekanizmalarını da düzenlemektedir (Salaun et al 2007).



Şekil 4. TLR sinyal yollarının şematik görünümü (O'Neill et al 2009).

Toll-benzeri reseptörler ağırlıklı olarak dentritik hücrelerde, makrofajlarda ve doğal öldürücü hücreler (NK) gibi doğal bağışıklık hücrelerinde ifade edilmektedirler. TLR'lerin bu hücrelerde aktive olması doğal bağışıklığın aktivasyonuna sebep olmaktadır. Antijen sunan hücrelerde (APC) TLR'lerin aktivasyonu kazanılmış bağışıklığı da tetiklemektedir. Bu süreç pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve adhezyon moleküllerinin yapımıyla sonuçlanmakta ve kazanılmış bağışıklığın aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır (Iwasaki and Medzhitov 2004). Artan kanıtlar TLR'lerin tümör hücrelerinde de ifade edildiğini göstermektedir (Yu et al 2014). Tümör hücrelerinde TLR'lerin artan ifadesi sonucu tipik doğal bağışıklık hücrelerinin aktive olması, kanser prognozunun şekillenmesinde oldukça karmaşık bir süreci içermektedir. Nitekim TLR'lerin uyarılması ile artan sitokinlerin, akut inflamasyondan kronik inflamasyona geçişte aşırı ifade edilerek tümör mikroçevresini

modüle ettiği ve neoplaziyi desteklediği bildirilmiştir (Medzhitov 2001). Bu nedenle TLR sinyal yolları üzerinde etkili anti-inflamatuar potansiyel taşıyan yeni moleküllerin keşfi bu alanda önem arz etmektedir.

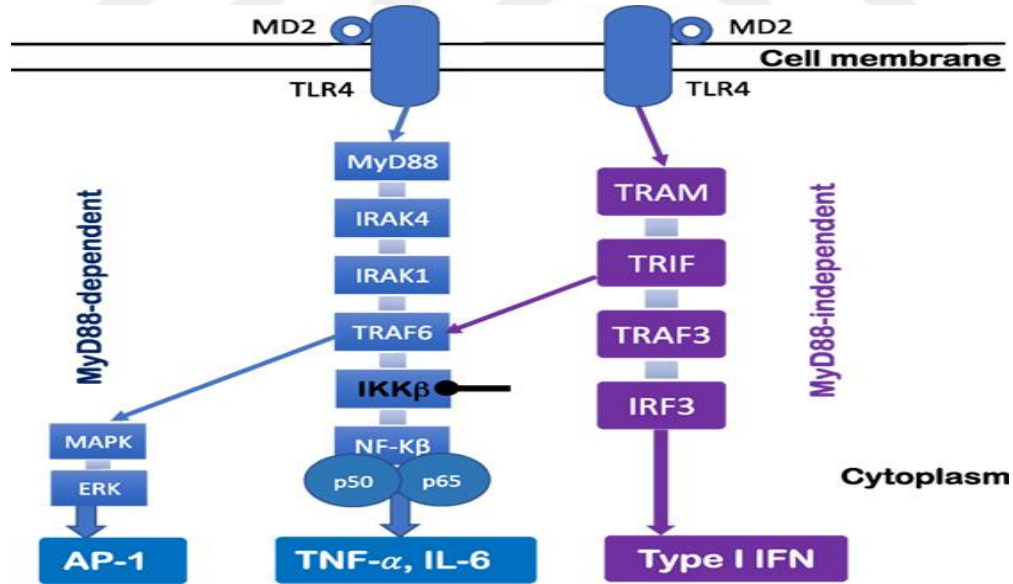
2.3.2 Toll Benzeri Reseptör 4 (TLR-4)

TLR4'ün deri, sindirim, üreme ve solunum organlarındaki periferik monositler, makrofajlar ve normal epitel hücreleri tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir (Akira et al 2001, Medzhitov 2001, Nishimura and Naito 2005, Ou et al 2018). TLR4 ligandı olan LPS, gram-negatif bakterilerin dış zarlarının önemli bir bileşenidir (Alexander and Rietschel 2001). LPS, doğal immun sistemin bir bileşeni olan CD14 geni tarafından kodlanan protein varlığında LPS bağlayıcı protein (LBP) tarafından TLR4/MD2 kompleksine bağlanmakta ve TLR4 hücre sinyal yolunu tetiklemektedir. TLR4/MD2 kompleksinin aktivasyonu, aşağı yönde sinyal iletimini sağlayan konformasyonel değişikliklerle sonuçlanmaktadır (Malm et al 2005). TLR4 endojen ligandları olan HSP'ler, fibrinojen ve HMGB1'in doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini başlatmakla kalmayıp, aynı zamanda adaptif bağışıklığa ilişkin moleküler modeller olarak da işlev gördüğü bilinmektedir (Smiley et al 2001, Dybdahl et al 2002, Apetoh et al 2007). Fibrinojen esas olarak hepatositler tarafından sentezlenmekte; trombin, fibrinojenin fibrin ve fibrinojen dönüşümünü teşvik etmekte ve TLR4 ligandı görevini üstlenmektedir. Bunlar inflammatuar sitokinler üretmek için makrofajları aktive etmektedir (Millien et al 2013). Diğer bir endojen TLR4 agonisti olan HSP'ler, hücre yüzeyinde TLR4'e doğrudan bağlanarak MAPK ve NF- κ B aktivasyonu ile dendritik hücrelerde pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-12p70) üretimini sağlayan protein katlanmalarında rol oynamaktadır (Fang et al 2011). HMGB1 ise DNA bağlayıcı bir protein olup, TLR4/MD2 kompleksi yoluyla yaralanma sonrası inflamasyonun indüklenmesini sağlamaktadır (Kim et al 2013).

TLR4 kompleksinin ligasyonu, iki farklı hücre sinyal yolunu tetiklemektedir; MyD88 bağlı yol ve MyD88'den bağımsız yol (Şekil 5). MyD88'e bağlı yol, TIRAP, IRAK2 ve IRAK4, TRAF6 ve NF- κ B salınımı tarafından düzenlenmektedir. IL-1 β , TNF- α ve IL-6 dâhil olmak üzere farklı proinflammatuar sitokinlerin salınımı ile sinyal

sonlanmaktadır. MyD88'in aktivasyonu ile IRAK2, IRAK4 ve TRAF6, κB kompleksinin inhibitörünün ($IKK\beta$) aktivasyonunu indüklemek için kompleks oluşturmaktadır. Bu NF- κB 'nin aktivasyonu ve nükleer translokasyonu gerçekleştirerek proinflamatuvar sitokin üretimini sağlamaktadır (Kawai and Akira 2006).

MyD88 bağımsız TRIF yolunun aktivasyonu MyD88'e bağlı yolun aksine TLR4/TRIF endozomal kompleksinin içselleştirilmesine dayanmaktadır. TRAM aracılı TRIF'ın aktive olması üzerine TRAF3, IRF3'ü fosforile ederek INF- β üretimini gerçekleştirmektedir (Kawai and Akira 2006). IRF3 fosforilasyonu ile IFN- β transkripsiyonunun başlatılması ile sinyal sonlanmaktadır (Lu et al 2008, Kuzmich et al 2017). Bu nedenle, TLR4 aktivasyonundan sonra bu hücre sinyal yollarının aktivasyonu, inflamasyon bölgesinde anti-mikrobiyal tepkileri başlatan bir dizi inflamatuvar yanıt ve gen transkripsiyonu ile sonuçlanmaktadır (Kawai and Akira 2006) (Şekil 5).



Şekil 5. TLR4 bağımlı sinyal yollarının şematik görünümü (Ou et al 2018).

2.3.3. TLR4 Sinyal Yolağı'nın Meme Kanserindeki Rolü

Meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen TLR4, tümör gelişiminde aktive edici bir rol üstlenmekte olup apoptoz ve metastaza karşı direnci teşvik etmektedir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TLR4 ve MyD88 ekspresyon seviyeleri LPS uyarımı ile artırılırken, TLR4 sinyalinin baskılanması meme kanserinde iyi prognozu öngörmektedir (Yang et al 2010, Yang et al 2014). Fakat literatürde buna ilişkin sonuçlar oldukça çelişkilidir. TLR4'ün meme kanseri patogenezindeki rolüne ilişkin araştırmalarda kanser gelişimini ve metastazını inhibe ettiğini bildiren çalışmalar olsa da; TLR4'ün meme kanserinde iyi prognozu öngördüğüne dair raporlarda mevcuttur (Paarnio et al 2017).

Farklı doğal ürünlerin (nobiletin, shinbaro3, curcumin, tanshinones, phloretin, ksantohumol, celastrol, sarımsak bileşikleri vb.) farklı TLR sinyalleri üzerindeki baskılayıcı etkisini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Ishiwa et al 2000, Murakami et al 2000, Safarinejad 2010). Ek olarak, umut vadeden birkaç doğal bileşik (shinbaro3, kurkumin, tanshinones) TLR4/MyD88/NF-KB yolu üzerinde engelleyici etkin sergileyerek anti-inflamatuar aktivite göstermiştir. Ancak bildiğimiz kadarıyla meme kanserinde TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonu üzerine RUT'un potansiyel etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada RUT'un TLR4'e bağlı TRIF sinyalleme üzerindeki etkilerinin hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla RUT'un MCF-7 hücreleri üzerindeki toksik etkileri WST-1 analizi, TLR4'ün ekspresyon seviyesi RT-PCR analizi, hücrelerin migrasyon düzeyi Scratch analizi, morfolojik değişiklikler ise Akridin Oranj boyama ile belirlenmiştir. Ayrıca, RUT ile tedavi sonrası TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonunun incelenmesi amacıyla TLR4 ve IRF3'ün hücresel lokalizasyonu immünofloresan analiz ile gösterilmiştir. Böylelikle bir flavonoid olan RUT'un TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonundaki rolü hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde ilk defa belirlenerek literatüre katkı sağlanması gerçekleştirilmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada MCF-7 insan östrojen duyarlı meme adenokarsinom (HTB-22™) hücre hattı ile birlikte kontrol hücre hattı olarak HUVEC insan umbilikal damar endotel (CRL-10317™) hücreleri Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak temin edildi. Tüm kültür işlemleri laminar hava akımlı kabinde (Thermo Fisher, ABD) steril olarak gerçekleştirildi. MCF-7 ve HUVEC hücre hatları için Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyerine %10 nihai konsantrasyonda Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco, Invitrogen, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich St ABD) ilave edilerek uygun hacimde 75 cm² flitreli flasklara dağıtıldı. Flasklar besiyeri pH'nı dengelenmesi için 37°C'de 15 dakika bekletildi. -80°C'deki stok hücreler 37°C su banyosunda yaklaşık 2 dakika hızlıca çözündürüldü ve 9 mL tam kültür ortamı içeren falkonlara alınarak 125xg'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek hücre stok solüsyonu uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 1 mL tam besiyerinde pipetaj yapılarak 75 cm² flitreli flasklara aktarıldı. Daha sonra 37°C'de %95 nem/hava ve %5 CO₂ içeren etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası %80 konfluent olan hücreler pasajlanmak üzere besiyerleri uzaklaştırıldı ve flask fosfat tamponlu tuz çözeltisi (1X PBS) (Gibco, ABD) ile nazıkçe yıkandı. Besiyeri kalıntıları uzaklandıktan sonra 3 mL %0,25 (w/v) Trypsin/ 1mM EDTA (Gibco, ABD) solüsyonu ile 37°C'de 3 dakika inkübe edildi. Hücre tabakasının invert mikroskopta ayrıldığıının gözlenmesinin ardından flaska 6 mL besiyeri ilave edilerek tripsin aktivitesi durduruldu ve hücreler falkonlara toplanarak 1500xrpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti 1mL besiyerinde çözündürüldü. Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µl ependorf tüpe alınarak üzerine eşit miktarda tripan mavisi boyası eklendi. Bu solüsyondan Thoma lamına

(Marienfeld, Almanya) 10 µL aktarılmış ve binoküler ışık mikroskopunda (Olympus, Çin) 10x objektifinde lamın ortasında bulunan 16 bölmedeki boyanmayan canlı hücreler sayıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı tespit edildi.

3.2. RUTİN HİDRAT'IN (RUT) HAZIRLAMASI

Çalışmamızda kullanılan Rutin Hidrat flavanoidi Caymanchem (ABD) markasından ticari olarak temin edildi. RUT 12 mg tartılarak Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD) ile 1mL'ye tamamlanarak 20 mM stok solüsyonu elde edildi (Iriti et al 2017). Elde edilen stok solüsyon uygun besiyeri ile 1:1 oranda seyreltilerek 10 uM konsantrasyonda ara stok oluşturuldu. Hücrelere farklı konsantrasyondaki (0-1000 µM) RUT, ara stoktan çekilerek ortam hacmine tamamlanacak şekilde hesaplanarak uygulandı.

3.3. WST-1 HÜCRE CANLILIK TESTİ

RUT'un MCF-7 ve HUVEC hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etkinin belirlenmesi için WST-1 hücre canlılık analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla MCF-7 ve HUVEC hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına her kuyucuğuna 2×10^4 hücre/100µL olacak şekilde ekildi. Belirlenen konsantrasyonlarda (31.25, 62.5, 125, 500 ve 1000 µM) RUT uygulanan hücreler 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyuya 100 µL nihai hacim olacak şekilde taze medium ve 10 µL WST-1 (Biovision, ABD) boyası eklendi. 1,5 saat 37°C'de (%5 CO₂) inkübe edilen hücreler inkübasyon sonrası horizontal shakerde 1 dakika nazikçe döndürüldü ve ardından 450 nm dalga boyunda çoklu plate okuyucusunda (Allsheng, Çin) optik dansite değerleri kaydedildi (Mohamed et al 2017). RUT uygulanmayan kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul

edilerek deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Gerçekleştirilecek diğer analizler için WST-1 analizinden elde edilen en etkin doz ve saat seçildi.

3.4. AKRIDİN ORANJ (AO) VE DAPI BOYAMA

RUT tedavisi sonrası MCF-7 hücrelerindeki morfolojik değişimlerin gözlemlenmesi amacıyla AO boyama yapıldı. Bu amaçla 6 kuyulu plakalara eşit sayıda (1×10^6 hücre/kuyu) MCF-7 hücreleri ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası MCF-7 hücreleri WST-1 analizi ile belirlenen en etkin doz ve saatte RUT ile muamele edildi. Uygulama sonrası kuyular PBS ile yıkanarak kültür ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler %4 Paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika fikse edildi ve fiksasyon sonrası kuyular üç kez 1X PBS tampon ile yıkanarak paraformaldehitin uzaklaştırılması sağlandı. Ardından 100 mg/mL Akridin Oranj (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu ile boyama prosedürü gereği 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta boyamaya alındı. Tüm protokol oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Boyanan kuyular üç kez PBS tamponundan geçirildi. Ardından çekirdek morfolojisini görüntülemek amacıyla DAPI (Invitrogen, ABD) stok solüsyonu, 1X PBS tampon ile 300nM derişimde dengelenerek her bir kuyuya 300 uL eklendi ve 1 dakikda karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında birkaç kez 1X PBS tampon ile yıkanan kuyular Olympus CX23 Upright Mikroskop Sistemi (Olympus, Çin) hücre görüntüleme sistemi ile uygun dalga boylarında görüntülendi.

3.5. HÜCRELERDEN TOTAL RNA İZOLASYONU

TLR4 reseptörünün mRNA gen ifade düzeyini belirlemek amacıyla MCF-7 hücreleri T25 flasklara 20 mL besiyerine 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat 37°C'de (%5 CO₂) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MCF-7 hücrelerine WST-1 analizi ile belirlenen en etkin doz ve saatte RUT uygulandı. Uygulama sonrasında hücreler

E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega, ABD) kullanılarak kit protokolüne uygun bir şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyon protokolünde izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- Hücrelerin olduğu T₂₅ flasklarda büyüme ortamı uzaklaştırıldı ve 2 mL %0,25 Trypsin/ 1mM EDTA (Gibco, ABD) 37C'de 3 dakika inkübe edildi.
- Tripsinizasyon sonrası tripsin etkinliğini durdurmak için medium eklenerek 15'lik steril falkonlara alındı ve 1500x rpm'da 21°C'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 350 µl TRK çözeltisi ve 7 µl 2-merkaptoetanol eklenerek yaklaşık 2 dakika vorteks yapıldı.
- 350 µl hücre lizatına 350 µl %70 etanol eklenerek vortekslendi.
- Toplama tüpüne geçen sıvıya 350 µl %80 etanol eklendi ve karıştırıldı.
- 700 µl örnek RNA bağlama kolonuna transfer edildi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken akış sıvısı uzaklaştırıldı.
- Kolona 500 µl Wash Buffer I eklendi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen akış sıvısı uzaklaştırıldı.
- 500 µl Wash Buffer II i eklendi ve 10000×g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen akış sıvısı uzaklaştırıldı. Bu adım birkez daha tekrarlandı.
- Filtreyi arta kalan çözeltilerden temizlemek için kolon maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen akış sıvısı uzaklaştırıldı.
- Filtre yeni ve steril mikrosantrifüj tüpüne geçirildi. Membranın üzerine doğrudan 40-60 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika sonra maksimum hızda santrifüj edildi.

- Mikrosantrifüj tüpünde toplanan RNA örneklerinin Qubit® HS RNA (Invitrogen, ABD) kiti kullanılarak Qubit® 2.0 (Invitrogen, ABD) cihazında ng/uL konsantrasyonda ölçümleri gerçekleştirildi. Örnekler RT-PCR analizi öncesi -80 °C’de saklandı.

3.6. CDNA SENTEZİ VE KANTITATIF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) ANALİZİ

RUT tedavisi sonrasında MCF-7 hücrelerinde TLR4’ün mRNA ekspresyon seviyesini analiz etmek amacıyla RT-PCR analizi gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örnekleri konsantrasyon ve saflık tayininin ardından High Capacity cDNA çevrim kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak cDNA’ya çevrildi. Buz blok üzerinde her bir PCR tüpünde 2 uL RT Tamponu (10X), 0.8 uL 100mM dNTP karışımı (25X), 2 uL RT Random Primer (10X), 1 uL MultiScribe™ Reverse Transkriptaz ve 4.2 uL nükleaz içermeyen H₂O bulunacak şekilde 2x RT Master Mix hazırlandı. Karışım her bir PCR tüpüne 10 uL olacak şekilde dağıtıldı ve nihai hacmi 10 uL olacak şekilde RNA örnekleri de reaksiyon tüplerine eklendi. 2x Master Mix ve RNA örnekleri buz blok üzerinde hafifçe pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra 25°C’de 10 dakika, 37°C’de 120 dakika, 85°C’de 5 dakika 4°C’de 15 dakika Bio-Rad Thermal Cycle (ABD) cihazında aplikasyonu gerçekleştirildi. Döngü sonrası elde edilen cDNA’lar gen ifadesi analizi için -20°C’de muhafaza edildi.

TLR4 mRNA seviyesi, özgün primerler ve çalışılacak olan proba (SYBR) uygun ABSolute QPCR Mix, SYBR Green, no ROX (ThermoFisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak tespit edildi. İlgili mRNA düzeyleri, 3 tekrarlı olmak üzere her bir reaksiyon için 96’lık PCR plakaları kullanılarak belirlendi. Her bir kuyu için 12,5 µL SYBR Green çözeltisi (2X), 1,75 µM ileri primer, 1,75 µM geri primer ve 2 µL kalıp cDNA (nihai derişim 250 ng) buz blok üzerinde nükleaz içermeyen su ile 25 µL’ye tamamlandı. Sentezlenen cDNA’lar için ilgili qPCR reaksiyonunda kullanılan gene özgül primer çiftleri Tablo 1’de gösterilmiştir. qPCR reaksiyonları CFX Connect

sisteminde (Bio-Rad, ABD), 95 °C’de 15 saniye 1 döngü antikor inaktif enzimin aktivasyonunun ardından, 95°C’de 15 saniye, 60°C’de 30 saniye ve 72 °C’de 30 saniye 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyonun özgüllüğünü doğrulamak amacıyla erime eğrisi analizi 95°C’de 30 saniye 1 döngü, 60°C’de 30 saniye 1 döngü, 60°C’de 10 saniye 80 döngü ve her döngü başına 0,5°C sıcaklık artışı olacak şekilde programlandı. Referans gen olarak β -gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı ve deney grupları arasındaki karşılaştırmalar kontrol grubuna göre yapıldı. PCR reaksiyonlarında kontaminasyon kaynaklı olası hataların belirlenmesi amacı ile kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol grupları da kuyucuklara eklendi. CFX Manager™ Software yazılımı kullanılarak, kontrol gruplarına ve referans gene göre deney gruplarının ilgi genlerdeki değişiminin göreceli normalizasyonu için $\Delta\Delta CT$ değerleri elde edildi. Elde edilen bu değerlerin deney gruplarında ilgili genin nispi ifadesinin görselleştirilmesi amacıyla GraphPad Prism 9.0.0 kullanılarak grafikleri çizildi.

Tablo 1. qPCR deneylerinde kullanılan gene özgül primer çiftleri (F: İleri Primer, R:Geri Primer).

TLR4	F	5’-TAGCAGTCATCCAACAGAATCAT-3’
	R	5’-AATCTTCTGAGTTGATTATGGGTAA-3’
GAPDH	F	5’-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3’
	R	5’-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3’

3.7. IMMÜNFLORESAN GÖRÜNTÜLEME (IF)

RUT tedavisi sonrasında MCF-7 hücrelerinde TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunda görev alan TLR4 ve IRF-3 proteinlerinin hücresel lokalizasyonunu belirlemek amacıyla IF görüntüleme yapıldı. Bu amaçla 6 kuyulu plakalara yerleştirilen lameller üzerine eşit sayıda (1×10^6 hücre/kuyu) MCF-7 hücreleri ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası MCF-7 hücrelerine WST-1 analizi ile belirlenen en etkin doz ve saate sadece RUT uygulandı. Uygulama sonrası kuyular 1X PBS ile yıkanarak besiyerinden arındırıldı ve 15 dakika %4 paraformaldehit ile fikse edildi. Fiksasyon süresi sonunda kuyular üçer kez 5 dakika 1X PBS tamponu ile yıkandı. Permeabilizasyon için kuyular %0.1 Triton X-100 içeren 1X PBS ile 30 dakika 37°C'de ve 10 dakika oda sıcaklığında olmak üzere 40 dakika inkübe edildi. Herhangi bir buharlaşmanın olmaması için 6 kuyulu plakanın kapatılması için parafilm kullanıldı ve sonraki aşamalar içinde bu adım tekrarlandı. İnkübasyon süresi sonunda kuyular 1X PBS tamponu ile üçer kez 5 dakika yıkanarak permeabilizasyon tamponunda arındırıldı. Ardından %10 Normal Goat Serum (IRF3 için %0.1 Triton X-100 eklenerek) içeren 1X PBS ile hazırlanan bloklama solüsyonu eklenen kuyular oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda kuyular üçer kez 5 dakika nazikçe yıkandı. Bloklama solüsyonu ile üreticinin talimatlarına göre seyreltilen anti-TLR4 (Mause) (Bio-Rad, ABD) ve anti-IRF3 (Mause) (Bio-Rad ABD) primer antikorlar ile hücreler 4°C'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında üçer kez 5 dakika 1X PBS tampon ile yıkandı. Bloklama solüsyonu ile üreticinin talimatlarına uygun olarak seyreltilen Mause Alexa Fluor 488 konjuge sekonder antikor (Bio-Rad, ABD) ile hücreler oda sıcaklığında 1 saat karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda kuyular üçer kez 5 dakika 1X PBS tampon ile yıkandıktan sonra hücre nükleusları stok solüsyonu 1X PBS tampon ile 300nM derişimde dengelenen DAPI (Invitrogen, ABD) ile boyandı. Her bir kuyuya 300 uL DAPI eklendi ve 1 dakikda karanlıkta boyandı. Boyamanın ardından birkaç kez 1X PBS tampon ile yıkanan kuyulardan alınan lameller bir lam üzerine kapatılarak kenarlarından oje ile sabitlendi. Slaytlar Olympus CX23 Upright Mikroskop Sistemi (Olympus, Japonya) hücre görüntüleme sistemi ile uygun dalga boylarında görüntülendi.

3.8. ÇIZIK (SCRATCH) ANALIZI

RUT tedavisi sonrasında MCF-7 hücrelerinin migrasyon yeteneğindeki değişimlerin gözlemlenmesi amacıyla Scratch analizi yapıldı. Bu amaçla 6 kuyulu plakalara eşit sayıda (1×10^6 hücre/kuyu) MCF-7 hücreleri ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası muamele öncesinde kuyularda 1000 μ L'lik mikropipet ucu kullanılarak horizontal ve vertikal kesişim olacak şekilde çizik oluşturuldu. Ardından MCF-7 hücrelerine WST-1 analizi ile belirlenen en etkin doz ve saatte sadece RUT uygulandı. Muamele sonrası kuyular 1X PBS ile yıkanarak besiyerinden arındırıldı ve hücreler %4 Paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyon sonrası kuyular üçer kez 5 dakika 1X PBS tampon ile yıkanarak paraformaldehit uzaklaştırıldı. Ardından Olympus IX81 Mikroskop (Olympus, Japonya) ile görüntülendi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm deneyler 3 kez tekrarlandı ve sonuçlar GraphPad Prism 8.0.0 (La Jolla, CA) ile değerlendirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar, Tek Yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc Tukey Testi ile yapıldı. Gen ifadesi sonuçları CFX Manager™ Yazılımı, görüntüler ImageJ program kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak belirlendi.

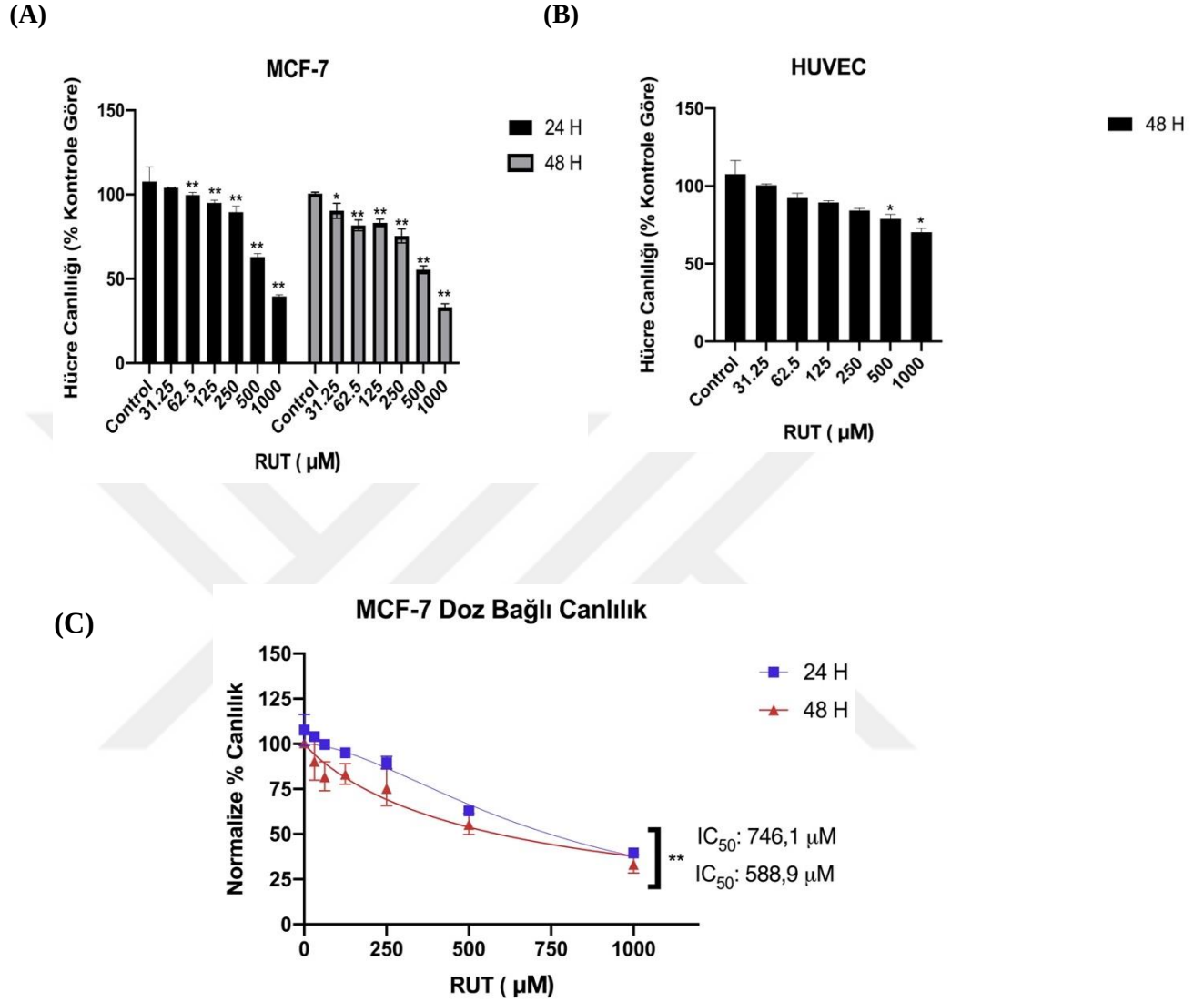
4. BULGULAR

4.1. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN SİTOTOKSİK ETKİSİ

Bu çalışmada, RUT flavonoidinin hormon duyarlı meme kanseri hücresi MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile belirlendi. Hücreler 24 saat ve 48 saat boyunca 62.5, 125, 250, 500, 1000 ve 1500 μ M RUT ile tedavi edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak kanserli olmayan HUVEC hücreleri kullanıldı. RUT'un WST-1 canlılık analizi sonucunda elde edilen verileri Tablo 2 ve Şekil 6'de gösterildi.

MCF-7 hücre hattında 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 μ M RUT tedavisi sonrasında canlılık oranları sırasıyla 24 saat için; %105.99, %98.38, %93.88, %86.18, %60.96, %38.59 ve 48 saat için ise %91.94, %84.92, %83.38, %79.75, %57.63, %33.51 olarak belirlendi (Şekil 6A). HUVEC hücre hattında ise 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 μ M RUT'un uygulaması sonrasında canlılık oranları 48 saat için sırasıyla %105.99, %99.86, %88.10, %85.67, %81.28 ve %69.03 olarak belirlendi (Şekil 6B).

Çalışmamızda RUT'un MCF-7 hücrelerinde canlılık oranlarını istatistiksel olarak zamana ve doza bağlı bir şekilde azalttığını ve kanser olmayan HUVEC hücrelerinde toksik etki göstermediği belirlendi ($p < 0.01$). Verilerimiz RUT'un potansiyel anti-inflamatuar potansiyelini vurguladı. RUT'un IC₅₀ değerleri 24 saat ve 48 saatte sırasıyla 746,1 μ M ve 588,9 μ M bulundu. IC₅₀ değerleri etkin RUT dozunun zamana bağlı bir şekilde değiştiğini gösterdi (Şekil 6C). Bu sonuçlara neticesinde, diğer analizler için 500 ve 1000 μ M RUT konsantrasyonu ve 48 saatlik tedavi süresi seçildi.



Şekil 6. RUT'un MCF-7 ve HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkisi. Farklı konsantrasyonlarda RUT (62,5-1000 µM) muamelesinin (A) MCF-7 ve (B) HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisi (C) RUT'un MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ değerleri (**p<0,01; *p<0,05).

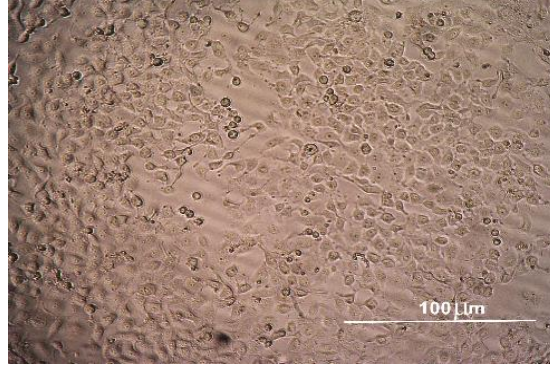
Tablo 2. RUT'un doza ve zamana bağılı olarak gösterdiği canlılık analizi sonuçları.

Uygulama grubu	MCF-7		HUVEC
	24 saat	48 saat	48 saat
Kontrol	%100	%100	%100
500 μ M RUT	%60.96	%57.63	%81.28
1000 μ M RUT	%38.59	%33.51	%69.03

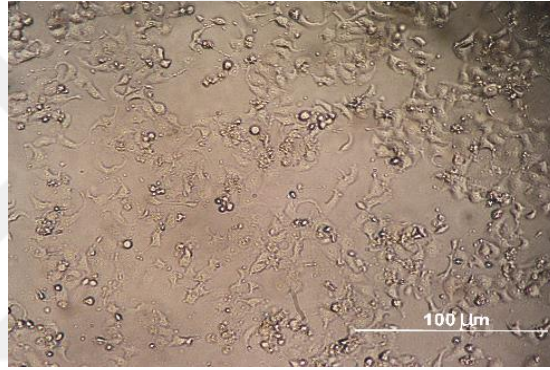
4.2. RUT'UN HÜCRE MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

Canlılık analizi ile elde edilen veriler göz önüne alınarak RUT tedavisi sonrası hücre morfolojisi üzerine etkisi inverted mikroskop ile görüntülendi (Şekil 7). RUT'un (500 ve 1000 μ M) 48 saat uygulama sonrasında MCF-7 hücrelerinde canlılık oranlarını doza bağımlı olarak azaltmasına korale olarak hücrelerin epitel benzeri morfolojisinin bozulduğu belirlendi.

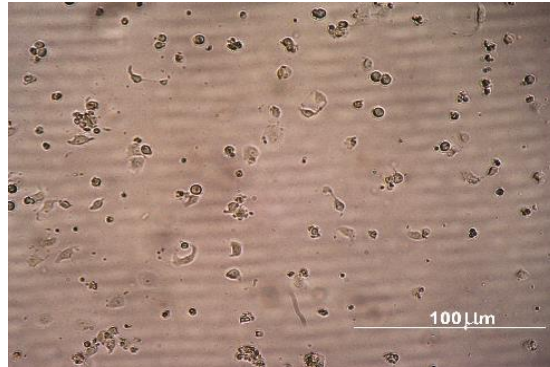
Kontrol



500 μM RUT



1000 μM RUT

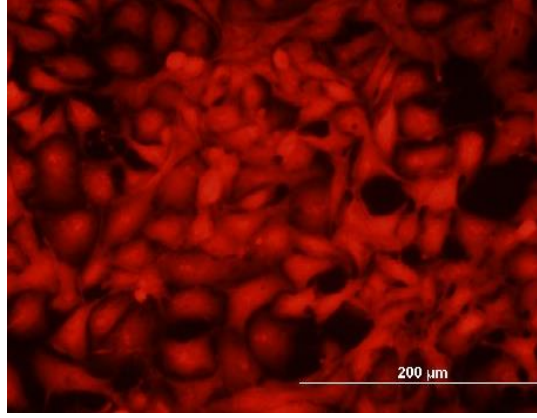


Şekil 7. RUT'un MCF-7 hücrelerindeki genel morfolojik etkileri.

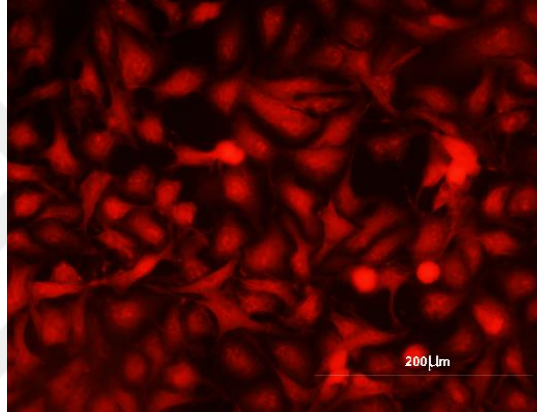
4.3. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN APOPTOTİK HÜCRE MORFOLOJİSİ VE ÇEKİRDEK MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

RUT tedavisi sonrası MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik hücre ve çekirdek morfolojisi üzerindeki etkisi sırasıyla AO ve DAPI boyama ile değerlendirildi. MCF-7 hücre hattına RUT uygulaması sonrasında daha yuvarlak hücreler, membran kabarması, hücresel büzülme, nükleer yoğunlaşma ve parçalanma gibi belirgin apoptotik morfolojik değişimler gözlemlendi (Şekil 8 ve Şekil 9). Özellikle RUT konsantrasyonuna bağlı olarak MCF-7 hücrelerinde apoptotik morfolojik değişimlerin arttığı belirlendi. Bu nedenle bulgularımız, RUT'un hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini gösterdi.

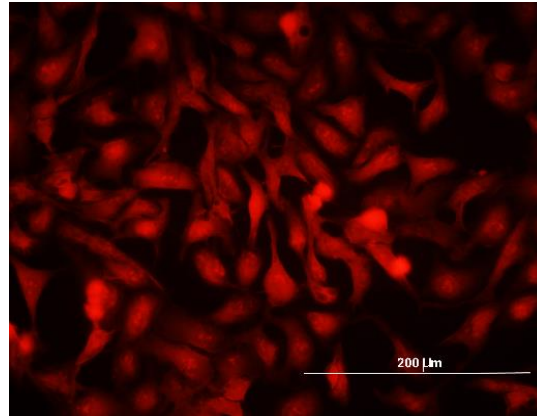
Kontrol



500 µM RUT

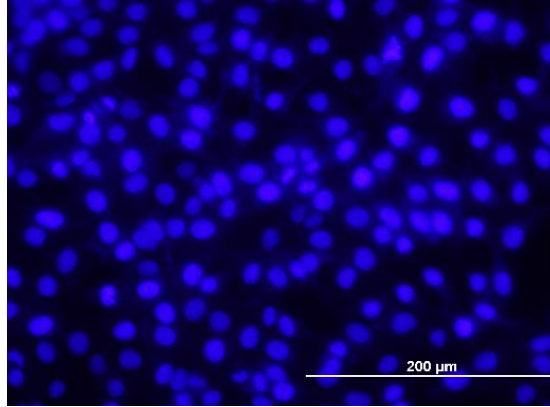


1000 µM RUT

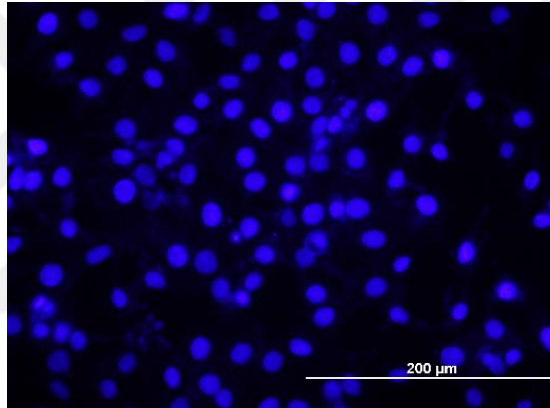


Şekil 8. MCF-7 hücrelerinde AO boyama ile RUT'un apoptotik hücre morfolojisi üzerine etkisi.

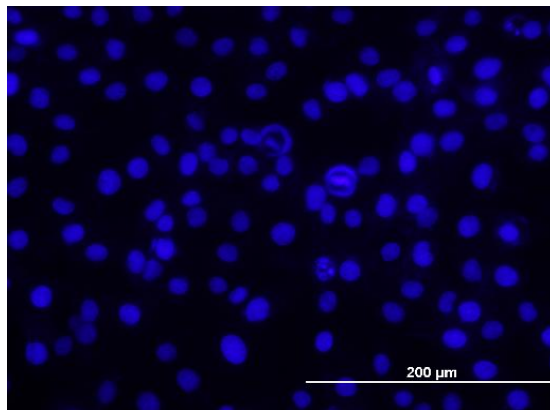
Kontrol



500 µM RUT



1000 µM RUT



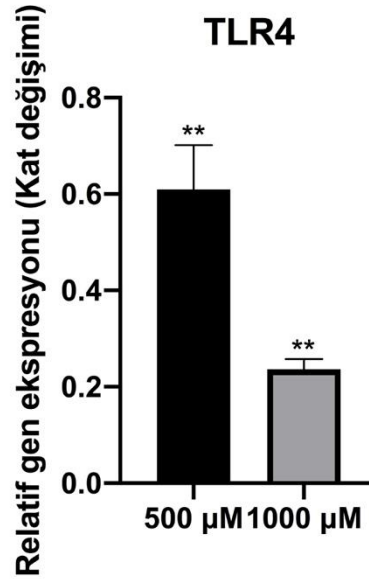
Şekil 9. MCF-7 hücrelerinde DAPI boyama ile RUT'un çekirdek morfolojisi üzerine etkisi.

4.4. RUT'UN MCF-7 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TLR4 İFADE DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

RUT tedavisinin MCF-7 hücrelerinde *TLR4* mRNA ifade seviyesi üzerindeki etkilerini araştırmak için RT-PCR analizi yapıldı. Analiz sonrası 500 ve 1000 µM RUT muamelesinin *TLR4* ifadesini MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 0.53- ve 0.22-kat azaldığını tespit etti ($p<0.01$, Tablo 3). Bu nedenle elde ettiğimiz sonuçlar RUT'un hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde TLR4 aktivasyonunu baskıladığını gösterdi (Şekil 10).

Tablo 3. RUT'un MCF-7 hücrelerinde TLR4 ifadesi kat değişimleri üzerine etkisi (** $p<0.01$).

Uygulama grubu	TLR4		
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat değişimi	p
500 µM RUT	0.057	0.53	0.241
1000 µM RUT	0.023	0.22	0.062**

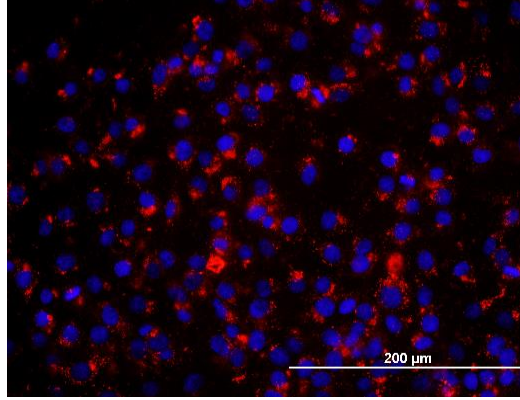


Şekil 10. RUT'un RT-PCR ile MCF-7 hücrelerinde *TLR4* mRNA ifade seviyelerindeki değişimler üzerine etkisi (** $p < 0.01$).

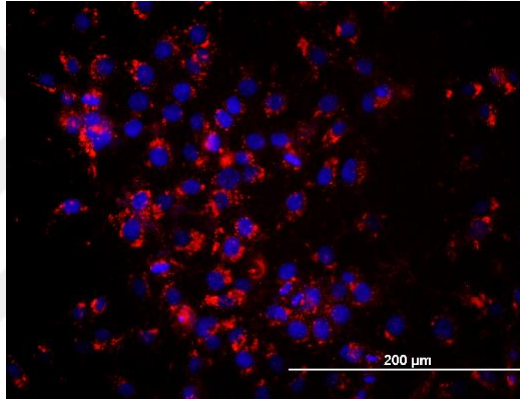
4.5. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN TLR4 VE IRF3 PROTEİNLERİNİN HÜCRESEL LOKALİZASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

MCF-7 hücrelerinde RUT'un TLR4/IRF3 sinyal yolağında görevli olan TLR4 ve IRF3 proteinlerinin hücresel lokalizasyonu üzerindeki etkisi immünofloresan boyama (IF) ile değerlendirildi (Şekil 11 ve Şekil 12). RUT uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik TLR4 varlığı gözlemlenmedi ve sitoplazmik inaktif IRF3 proteinleri tespit edildi. Bununla birlikte, RUT tedavisi sonrası TLR4'ün sitoplazmik ve IRF3'ün nükleer lokalizasyonunun doza bağlı bir şekilde arttığı belirlendi. Bu sonuçlar gen ifade analizi sonuçları ile tutarlı olarak RUT'un TLR4 ve IRF3 aktivasyonunu azalttığını ortaya koydu. Bulgularımız, RUT'un TLR4'ün endozomal lokalizasyonunu azalttığını ve IRF3'ün nükleer translokasyonunu inhibe ettiğini ve dolayısıyla RUT'un TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolu ekspresyonunu baskılayabileceğini gösterdi.

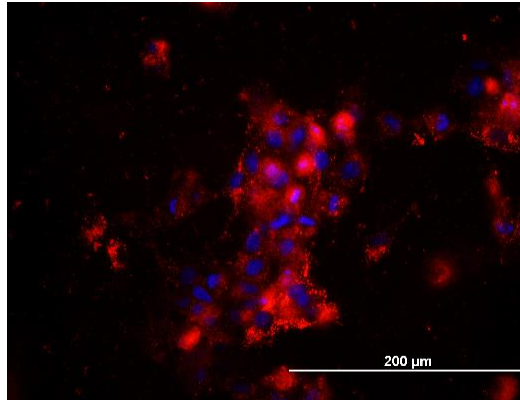
Kontrol



500 µM RUT

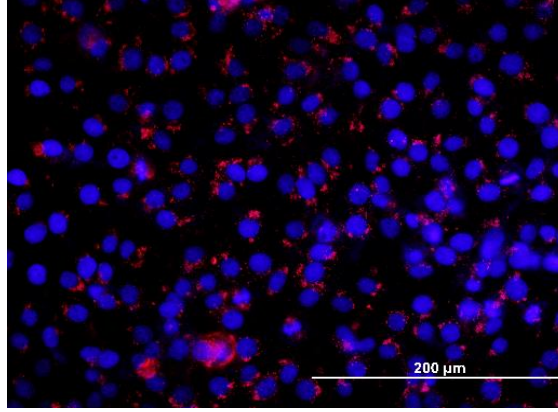


1000 µM RUT

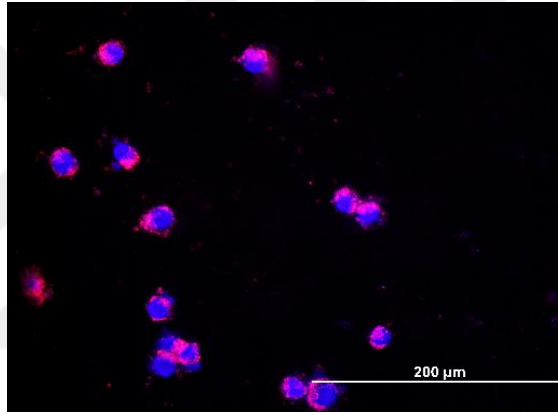


Şekil 11. MCF-7 hücrelerinde IF analizi ile RUT'un TLR4 proteininin hücresel lokalizasyonu üzerine olan etkisi.

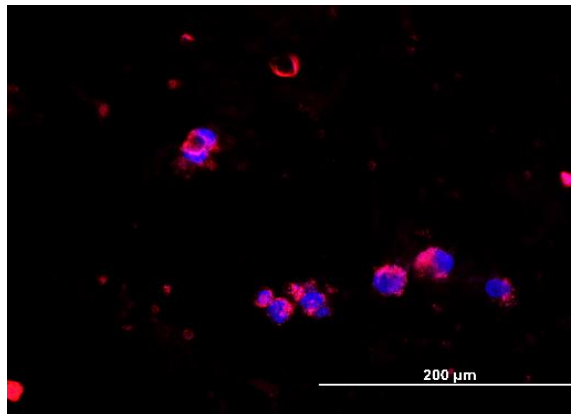
Kontrol



500 μ M RUT



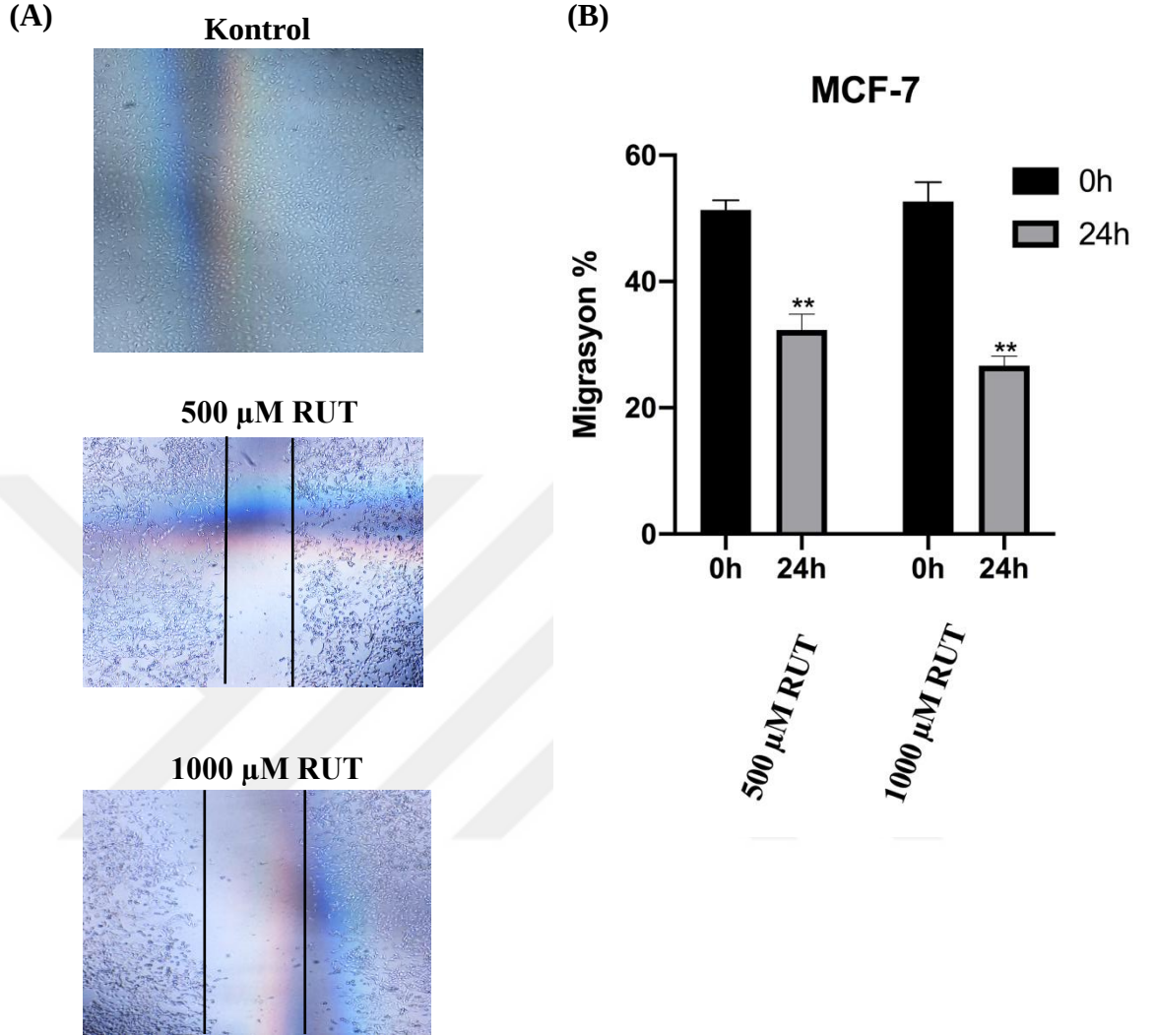
1000 μ M RUT



Şekil 12. MCF-7 hücrelerinde IF analizi ile RUT'un IRF3 proteininin hücresel lokalizasyonu üzerine olan etkisi.

4.6. MCF-7 HÜCRELERİNDE RUT'UN MİGRASYON ÜZERİNE ETKİSİ

RUT'un hormon duyarlı meme kanserindeki migrasyon üzerine etkisi çizik (scratch) analizi ile MCF-7 hücrelerinde gösterildi (Şekil 13A). Analizin başlangıcında (0 saat) kontrol ve RUT uygulanmış (500 ve 1000 μ M) gruplar aynı düzeyde klerens bölgesine sahipti. Hücre göçünün daha iyi gözlemlenebilmesi için 500 ve 1000 μ M dozların daha az toksik olan saati (24 saat) seçildi. Kontrol hücreleri 24 saat sonunda klerans bölgesini kapatarak boş alana tamamen göç ettiği gözlemlendi. Bununla birlikte RUT, artan doza bağlı olarak hücre göçünü kuvvetli bir şekilde inhibe etti. RUT, MCF-7 hücrenin geçiş mesafesini 24 saat sonra işlenmemiş hücrelere kıyasla %79 oranında (1000 μ M RUT) önemli ölçüde azalttı (Şekil 13B). Bu sonuçlar RUT'un TLR4 sinyal yolunun baskılanmasına bağlı olarak hücre migrasyonunu azalttığını ortaya koydu.



Şekil 13. RUT'un MCF-7 hücrelerindeki Çizik (Strach) analizi sonuçları (A) 24 saat RUT tedavisi sonrası MCF-7 hücrelerinde gözlemlenen klerens bölgeleri (B) RUT'un MCF-7 hücrelerindeki anti-migrasyon etkisi (**p<0,01).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, dünya çapında ikinci en yaygın malign neoplazm türüdür ve 2021 yılında dünya genelinde 2 milyondan fazla yeni vaka tespit edilmiştir (Barone et al 2020). Meme kanseri oldukça heterojen bir karakter sergileyip; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil meme kanseri hastalarının tedavisinde sınırlı kalmaktadır (Pilevarzadeh et al 2019). Bu nedenle, başarılı klinik uygulamalar sağlamak için mevcut kemoterapi ve/veya yeni terapötik ilaçların ve/veya bileşiklerin meme kanserindeki etkilerini değerlendirmek önemlidir. TLR4 esas olarak doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde ifade edilmektedir ve TLR4 dimerizasyonu hem MyD88'e bağımlı hem de bağımsız TRIF sinyal yollarının aktivasyonu için oldukça önemlidir. Bu nedenle TLR4 doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli bir role sahiptir (Takeda et al 2003). Diğer taraftan TLR4 sinyal yollarının inhibisyonunun meme kanseri proliferasyonunu baskıladığına dair çalışmalar rapor edilmiştir (Yang et al 2010b). RUT *in vitro* kanser tedavisi için hem tek başına hem de ilaçlarla kombinasyon halinde umut verici bir aday olarak karşımıza çıkmaktadır (Batra and Sharma 2013). RUT'un anti-tümör özelliğinin yanı sıra, Wnt ve MAPK gibi sinyal yolları üzerindeki etkisi de bilinmektedir (Iriti et al 2017). Bununla birlikte, RUT'un kanser hücreleri üzerindeki uygun etki mekanizmasını anlamak için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Ancak meme kanserinde TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonu üzerine RUT'un potansiyel etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada bir flavonoid olarak RUT 'un ilk defa hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Flavonoidlerin kanser tedavisindeki potansiyel rolü hali hazırda etki mekanizması yeterince aydınlatılmamış RUT için umut vadedicidir. Literatürde çeşitli flavonoidlerin farklı kanser hücrelerinde anti-kanser etkinliğini kanıtlayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Pandey ve ark. (2012) flavon sınıfına ait Apigenin'in ilk kez Sınıf I HDAC'leri (özellikle HDAC1 ve HDAC3'ü) inhibe ettiğini, insan prostat kanseri hücrelerinde proliferasyonu durdurduğunu ve apoptozu indüklemek için

kromatin yapıda fragmentasyonlar meydana getirdiğini bildirmiştir. Üçlü negatif meme kanserinde apigenin, hücre siklusunu G2/M fazında tutarak ve histon H3 asetilasyon aracılı p21 ekspresyonunu indükleyerek hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Tseng et al 2017). Bir flavon olarak Luteolin'in kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Krifa et al 2014). Ayrıca Luteolin ve Gefitinib kombinasyonunun, insan prostat kanseri hücrelerinde (PC-3), EGF reseptörü ile stimüle olan tirozin kinazları hedefleyerek hücre döngüsünün kontrolünde yer alan genleri (CCNA2, CCNE2, CDC25A, CDKN1B ve PLK1) düzenlediği gösterilmiştir (Markaverich et al 2010). Bir flavonoid olarak Tangeretin'in p21 gen ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücrelerinin ilerlemesinin önlenmesinde ve invazyonun baskılanmasında (Wei et al 2019); Baicalein'in insan prostat, meme, mesane ve miyelom kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaltılmasında, hücre döngüsünün durdurulmasında ve apoptozun indüklenmesinde başarılı olduğu bildirilmiştir (Gao et al 2016). Narinciye kabuklarında yaygın bulunan O-metillenmiş bir flavonoid olan Nobiletin'nin metastatik prostat kanseri hücrelerinde erken apoptozu indükleyerek ve G0/G1 fazında sitostatik tutulum ile anti-neoplastik etkinlik sergilediği bildirilmiştir (Guney Eskiler et al 2019). Ayrıca Nobiletin'in, kanser ve immun sistemde yaygın bir patern tanıma reseptör ailesi olan TLR'lerden TLR4 ve TLR9 aracılı sinyal yolları üzerine baskılayıcı bir etkinlik gösterdiği de literatür verilerinde mevcuttur (Deveci Ozkan et al 2020). Birçok bitkisel gıdada yaygın olarak bulunan Quercetin'nin, çoklu ilaç direci proteinleri (MRP) ve kemodireçle ilişkili p-glikoprotein üzerindeki inhibitör etkileri bilinmektedir (van Zanden et al 2007). Quercetin özellikle prostat kanserinde apoptozun indüklenmesi, proliferasyonun inhibisyonu ve IGF-1 yolunun dahil olduğu çoklu mekanizmalar aracılığıyla kemo-preventif aktivite sergilemektedir (Sharmila et al 2014). Genistein ve Daidzein gibi izoflavonlar, bazı hayvan modellerinde östrojenik aktivitelerinden dolayı yaygın fito-östrojenler olarak kabul edilmekte ve östrojen reseptörlerinin spesifik modülatörleri olarak görülmektedir (Adlercreutz 2002, Pons et al 2016)(Adlercreutz 2002; Pons et al., 2016). Bundan dolayı özellikle meme kanseri başta olmak üzere Genistein, fito-östrojenlerin potansiyel terapötik ajanı olarak dikkat çekmektedir (Szkudelska and Nogowski 2007). Özellikle Genistein kullanımına yönelik epidemiyolojik çalışmalar, Genistein tüketimine bağlı olarak meme kanseri insidansı ile ters korelasyonunu ortaya koymuştur (Nadal-Serrano et al 2013). Kateşin

grubundan olan EGCG'nin anti-kanser mekanizmasına pro-apoptotik BAX aktivasyonunun, mitokondriyal membran depolarizasyonunun ve sitozole sitokrom c salınımının eşlik ettiği bilinmektedir (Lambert and Elias 2010). Kanser hücrelerinde proliferasyonun düzenlenmesindeki ana stratejilerin başında gelen apoptozun uyarılması ve hücre döngüsünün durulması flavonoidlerin başlıca kemoterapötik hedeflerindendir. Yeşil çay kateşinleri hem G1/S hem de G2/M geçişini düzenleyerek karsinogenezi engellemektedir (Ahmad and Mukhtar 1999, Liu et al 2017). EGCG, hücre döngüsü ilerlemesindeki ilk basamak olan siklin bağımlı kinazları (CDK) doğrudan inhibe etmektedir. Ayrıca G1/S geçişinde siklin D1 ekspresyonunu ve retinoblastomun (pRb) fosforilasyonunu azaltarak CDK inhibitörleri olan p21 ve p27 ekspresyonunu indüklemektedir (Liu et al 2017). Kateşinler pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin yanı sıra nitrit oksit sentazların (NOS) aktivasyonunu sağlayarak anti-neoplastik bir etkinlik göstermektedir (Okabe et al 1999, Pervin et al 2019). Ayrıca EGCG'nin, NF- κ B inhibisyonu ile anti-inflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-karsinojenetik mekanizmalarda etkili genlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığına dair çok sayıda kanıt mevcuttur (Lambert and Elias 2010, Khan and Mukhtar 2013, Gupta et al 2014, Fujiki et al 2018). Ek olarak, EGCG'nin tümör nekroz faktörü α (TNF- α) aktivasyonunun inhibisyonu ile sistemik inflamasyonu baskılayarak tümör mikroçevresini modüle ettiği de bilinmektedir (Okabe et al 1999). Mevcut kanıtlar, başta flavonoidler olmak üzere fito-kimyasalların kanser tedavisinde etkin kemoterapötik rolüne dikkat çekmektedir.

Diğer yandan meme kanserinde TLR4'ün rolü ile ilgili literatür verileri değerlendirildiğinde; TLR4'ün meme kanserinde ilaç direncinin indüklenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Xu et al 2014, Khademalhosseini and Arababadi 2019). Obezite ile ilişkili lipoliz sonucu salınan doymuş yağ asitlerinin meme kanserinde TLR4'e bağlı kronik inflamasyon aracılı metastazı desteklediğini rapor eden kanıtlar mevcuttur (Howe et al 2013). TLR4 ligandlarının ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) TLR4 ile etkileşiminin TGF- β 1 aktivasyonu ile invaziv olmayan meme kanseri hücrelerinin aktivasyonuna yol açtığını bildirilmiştir (Zhou et al 2013). Benzer bir çalışma TLR4'ün Akt/GSK3 β / β -katenin bağımlı sinyal yoluyla meme kanserinde karsinogenezi desteklediğini göstermektedir (Li et al 2017). Ayrıca Liao ve ark. (2012) meme kanserlerinde TLR4 aktivasyonunun, vitronektin için bir reseptör türü olan

$\alpha\text{v}\beta 3$ integrin molekülünün aşırı eksprese edilmesini destekleyerek anjiyogenez ve invazyonda rol oynadığını rapor etmiştir. TLR4 aktivasyonuna bağlı inflamasyonun tümör gelişimi üzerindeki etkilerine dair literatürde çelişkiler de bulunmaktadır. Meme kansinomlarının LPS ile tedavisinde TLR4 ve MYD88'e bağlı olarak kemokin ligandı 2 ve 5'in (CCL2 ve CCL5) ekspresyonunun arttığı ve sonuç olarak hem insan hem de farelerde meme kanserinin büyümesinin ve metastazının engellendiği rapor edilmiştir (Egunsola et al 2012). TLR4, meme kanserine karşı bağışıklık tepkilerini indükleyebilen veya uyatabilen önemli bir moleküldür (Khademalhosseini and Arababadi 2019). TLR4'ün pro-inflamatuvar molekül (proinflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri ve CD16) ekspresyonlarını indüklenmesindeki rollerine dayanarak, meme kanserinde makrofajları, NK hücrelerini ve sitotoksik T lenfositlerini destekleyerek tümörigenezi baskıladığı düşünülmektedir (Song et al 2003, Hsu et al 2011, Rittirsch et al 2009). Nitekim onkolitik adenovirüsler ile geliştirilen bir aşının, meme kanseri immünoterapisinde, TLR4'ün anti-tümör bağışıklığın indüklediği ve hayvan modelinde tümör gerilemesine katkı sağladığı ortaya konulmuştur (Lapteva et al 2009). Tümör hücrelerinde ROS üretimi, büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörleri tarafından NADPH oksidaz veya mitokondriye bağımlı bir şekilde hücre adezyonunu, EMT'yi ve invazyonu desteklemek için indüklenmektedir (Wu 2007). Bu nedenle hali hazırda kanser hücrelerinde kritik düzeydeki ROS'un, TLR4 aktivasyonunun NOS'u indüklemesine bağlı olarak toksik seviyede arttırılması tümörigenezin baskılanmasına neden olmaktadır (Lamrani et al 2016). Bu nedenle TLR4'ün başta meme olmak üzere farklı kanserlerdeki rolünün ve bu rolle ilişkin moleküler mekanizmaların iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır (Petriceviz et al 2012).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler 48 saat boyunca RUT'un MCF-7 hücrelerinde canlılık oranlarını doza bağımlı olarak anlamlı bir şekilde ($p < 0,01$) azalttığını ve HUVEC hücrelerinde toksik etkiye neden olmadığını ortaya koymuştur. Böylece RUT'un, hormon duyarlı meme kanseri hücre dizilerinde seçici sitotoksite göstererek potansiyel anti-inflamatuvar aktivite sergileyebileceği gösterilmiştir.

RUT'un meme, glioma, pankreas, kolon, karaciğer, akciğer, deri, prostat, servikal ve yumurtalık kanseri hücreleri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre türlerinin *in vitro*

çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Romero et al 2002, Ghasemzadeh et al 2014, Li et al 2014, ben Sghaier et al 2016, Wu et al 2017, Saleh et al 2019, Yan et al 2019). Anti-kanser etkileri üretmek için gereken RUT konsantrasyonu kanser türüne bağlı olarak değişmektedir. RUT, *in vitro* olarak yalnızca 4 ila 850 mM aralığında nispeten yüksek konsantrasyonlarda önemli anti-kanser etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Thani and Vallisuta 2010, Ghasemzadeh et al 2014). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler de literatür verisi ile tutarlı olarak 500 ve 1000 μ M RUT konsantrasyonunun önemli ölçüde sitotoksik etkinlik gösterdiğini belirlemiştir.

Literatürde RUT'un farklı kanser hücrelerinde apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir. LAN-5 nöroblastom hücrelerinde RUT'un Bcl2/Bax oranındaki azalma ile apoptozun içsel yolunu tetiklediği ortaya konulmuştur (Chen et al 2013). Benzer şekilde, HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde RUT, kaspaz-3 aktivasyonunu indüklemiştir (Jayameena et al 2018). Ek olarak RUT'un, kaspaz-3/8/9 ve Bax'ın yukarı regülasyonu ile Bcl-2'nin aşağı regülasyonu yoluyla HT-29 kolon kanseri hücrelerinde hem dışsal hem de içsel apoptoz yollarını aktive ettiği rapor edilmiştir (Nafees et al 2018). MCF-7 meme kanseri hücrelerinde RUT'un, bir tümör baskılayıcı olan PTEN ifadesini artırarak apoptoz aracılı hücre ölümüne yol açtığına dair kanıtlar mevcuttur (Hasani et al 2017). RUT ayrıca p53 aktivasyonuna bağlı kanser hücresi apoptozunu indükleyebilmektedir (Hasani et al 2017, Nafees et al 2018, Yan et al 2019). Çalışmamızda AO ve DAPI boyama ile elde ettiğimiz veriler, bu veriler ile korole olarak RUT'un MCF-7 hücrelerinde tipik apoptotik morfolojiyi arttırdığını göstermiştir.

RUT, başta meme kanseri olmak üzere birçok kanser türünde; hücre yapışmasını ve göçünü durdurmak, proliferasyonu engellemek, ROS üretimini azaltmak, tümör büyümesini ve metastazını sınırlamak, apoptoz ve otofajiyi indüklemek için çok işlevli bir ajan olma potansiyeline sahiptir (ben Sghaier et al 2016, Park et al 2016, Li et al 2021). Bununla birlikte, sadece sınırlı sayıda çalışma, RUT'un kanser hücreleri üzerindeki anti-inflamatuar etkilerini göstermiştir. Ancak TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunun aktivasyonuna dair RUT'un potansiyel immünoterapötik etkilerini araştıran bir çalışma mevcut değildir. Bu amaçla RUT'un TLR4 sinyalizasyonu ve özellikle TLR4/TRIF/IRF3 eksenindeki potansiyel özgün etkisi bu çalışmada

değerlendirilmiştir. Çalışmamız ilk kez RUT'un MCF-7 hücrelerinde TLR4'ün endozomal lokalizasyonunu azalttığını ve IRF3'ün nükleer translokasyonunu baskıladığını; karsinogenezi engellemede TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yolunu düzenleyerek anti-inflamatuar etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlarımız kanser hücrelerinde fitokimyasalların TLR4'ün TRIF'a bağlı sinyal yolunu baskıladığını gösteren kanıtlarla uyumludur (Youn et al 2006, Lee et al 2009, Liu et al 2016).

TLR4 esas olarak doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde ifade edilir. TLR4 dimerizasyonu, hem MyD88'e bağımlı hem de bağımsız TRIF sinyal yollarının aktivasyonu için çok önemlidir. Bu nedenle TLR4 doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynamaktadır (Shi et al 2006). TLR4'ün MyD88 bağımsız sinyal yolağına TRIF, IRF3 aktivasyonu ve tip I IFN'lerin (IFN- α/β) ifadesi aracılık etmektedir (Kuzmich et al 2017). Önceki çalışmalar, TLR4 ve MyD88'in meme kanserinde aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (Wang et al 2013, Yang et al 2014, Chen et al 2015, Wu et al 2018). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler RUT ile tedavi sonrası MCF-7 hücrelerinde *TLR4* ifadesini kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldığını ortaya koymuştur ($p<0,01$). Bu nedenle çalışmamız RUT muamelesinin hormon duyarlı meme kanseri hücrelerinde ilk kez artan TLR4 aktivasyonunu baskıladığını göstermiştir.

Göç eden karsinomlar azalmış apio-bazal polarite ve aktince zengin hücresel çıkıntılar ile mezenkimal özellikler gösterir. EMT tipi mekanizmaların bu epitellerin göç hareketine dahil olduğu bilinmektedir (Revenu and Gilmour 2009). EMT hücrelerin epitel özelliklerini kaybetmesine ve hareketli mezenkimal özellikler kazanmasını sağlayan fenotipik değişikliklere neden olmaktadır (Mendez et al 2010). Çok sayıda kanıt, EMT'nin meme kanseri dahil malignitelerde neoplastik invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Singh and Settleman 2010, Craene and Berx 2013, Felipe Lima et al 2016, Cao et al 2020). Bu nedenle kanser tedavisinde yan etkilere neden olmadan tümör yayılımını ve metastazını inhibe eden biyomoleküllere gereksinim vardır. TLR4'ün kanser hücrelerinde migrasyona ve EMT sürecine dahil olduğu bilinmektedir (Zandi et al 2019). Hepatoselüler karsinomada yapılan bir çalışma LPS'nin TLR4 yoluyla in vitro olarak EMT'yi desteklediğini göstermiştir (Li

et al 2014). TLR4 ve sinyal moleküllerinin aşırı ekspresyonu meme kanserinde invazyon ve metastazı desteklemektedir (Yang et al 2014, Chen et al 2015, Volk-Draper et al 2017, Wang et al 2017). TLR4 ekspresyonu meme kanseri metastazı ile pozitif bir korelasyon göstermektedir (González-Reyes et al 2010). Meme kanserinde TLR4 ve MYD88 ekspresyonuna bağlı olarak nüks/metastaz ve ölüm oranında artış söz konusudur (Ma et al 2014). Ek olarak, araştırmalar bir TLR4 ligandı olan Paklitaksel kullanımının TLR4 aktivasyonunu desteklediğini ve sonuç olarak meme kanseri metastazını arttırdığını göstermiştir (Rajput et al 2013, Volk-Draper et al 2014). TLR4 agonisti olan Resistin'in, TLR4 ile etkileşimi sonrası meme kanserinde STAT3 ve NF- κ B ekspresyonunu artırarak EMT'yi tetiklediği bildirilmiştir (Wang et al 2018). Birçok çalışma RUT'un potansiyel metastatik inhibitör rolüne dikkat çekmektedir. C57BL/6 ve İsviçre fareleri üzerinde yapılan bir çalışma RUT'un akciğer metastazını ve tümör nodül oluşumunu inhibe ettiğini rapor etmiştir (Menon et al 1995, Martínez Conesa et al 2005). RUT'un MDA-MB-231, A549 ve HT-29 hücrelerinde hücre istilasını ve göçünü engelleyerek metastazını önlediği bildirilmiştir (Ghasemzadeh et al 2014, ben Sghaier et al 2016). Ayrıca moleküler yerleştirme (molecular docking) çalışmaları RUT'un etkili bir matris metalloproteinaz inhibitörü olduğunu göstermiştir (Selvaraj et al 2019). Elde ettiğimiz veriler RUT'un MCF-7 hücrelerinde ilk kez azalan TLR4 ifadesine bağlı olarak migrasyon oranını azalttığını ortaya koymuştur. Çalışmamız TLR4 sinyalini baskılayarak meme kanseri hücrelerinde seçici sitotoksiste gösteren RUT'un, EMT sürecine dahil olan mekanizmaların araştırılmasının önünü açmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamız RUT'un anti-inflamatuar etkisi ile hormon duyarlı meme kanserinde TLR4 antagonist aktivite gösterdiği ve TLR4/TRIF/IRF3 sinyal yoluna aracılık edebileceğini elde edilen veriler doğrultusunda ortaya koymuştur. Diğer yandan RUT, geniş bir potansiyel terapötik kullanım yelpazesine sahiptir ve en çok çalışılan diyet flavonoidlerinden biridir. Son zamanlarda kanser tedavisinde, doğal ürünleri etkili kemopreventif ve kemoterapötik ajanlara dönüştürmek için dünya genelinde devam eden kapsamlı federal ve ticari çabalar vardır. RUT, kansere karşı hem kemoterapötik hem de kemopreventif etkiler göstermektedir. RUT'un anti-kanser etkileri güçlü anti-inflamatuar ve anti-oksidan aktivitesi ile ilişkilendirilirken; kanser

ilerlemesinde yer alan çoklu moleküler hücre sinyal yollarını da etkilediği bilinmektedir. Ancak biyoaktif potansiyeline rağmen, zayıf biyoyararlanım, düşük çözünürlük ve azaltılmış sitotoksosite gibi çeşitli faktörler doğrudan kullanımını sınırlandırmıştır. RUT'un kemoterapötik ilaçlar/fitokimyasallar/ışınlama ile kombinasyonları, sentetik analogları ve nanoformülasyonları gibi çoklu yaklaşımlar ile bir anti-kanser ajan olarak biyo-yararlanımının ve etkinliğinin artırılması olasıdır. Genel olarak RUT, umut verici anti-neoplastik potansiyeli olan bir flavonoiddir ve kanserin yönetimi için etkili bir kemoterapötik ilaç potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, meme kanserinde RUT'un anti-inflamatuar etkisi ile TLR4/TRIF/IRF3 ve TLR4/MyD88/NF- κ B sinyal yolları arasındaki ilişkiyi ayrıntılı olarak araştırmak için daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak, RUT ve TLR aktivasyonu yoluyla diğer sinyal yolları arasındaki bağlantıların ortaya konması için *in vitro* olarak daha fazla araştırma gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Abdul Hamid Hasani N, Mohd Amin I, Kamaludin R, Nik Mohd Rosdyd NMM, Johari Ibahim M, Sheikh Abdul Kadir SH. (2017). P53 And Cyclin B1 Mediate Apoptotic Effects Of Apigenin And Rutin In Er α +-Breast Cancer Mcf-7 Cells. J Teknol. <https://doi.org/10.11113/jt.v80.10704>
- Adlercreutz H. (2002) Phyto-oestrogens and cancer. Lancet Oncol, 3:364–373.
- Ahmad N, Mukhtar H. (1999). Green Tea Polyphenols and Cancer: Biologic Mechanisms and Practical Implications. Nutr Rev, 57:78–83.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol, 2:675–680.
- Alexander C, Rietschel ET. (2001). Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res, 7:167–202.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. (1999). Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. Science, (1979) 285:736–739.
- Anand Gupta D, John Bhaskar D, Gupta K, Karim B, Jain A, Ranjan Dalai D. (2014). Green tea: A review on its natural anti-oxidant therapy and cariostatic benefits. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research, 2:8–012.
- Aoki T, Akashi T, Ayabe S. (2000). Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis. J Plant Res, 113:475–488.

- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, 13:1050–1059.
- Barfod L, Kemp K, Hansen M, Kharazmi A. (2002). Chalcones from Chinese liquorice inhibit proliferation of T cells and production of cytokines. *Int Immunopharmacol*, 2:545–555.
- Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, Andò S, Catalano S. (2020). The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives. *Semin Cancer Biol*, 60:274–284.
- Barreca D, Mandalari G, Calderaro A, Smeriglio A, Trombetta D, Felice MR, Gattuso G. (2020). Citrus Flavones: An Update on Sources, Biological Functions, and Health Promoting Properties. *Plants*, 9:288.
- Batra P, Sharma AK. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3:439–459.
- ben Sghaier M, Pagano A, Mousslim M, Ammari Y, Kovacic H, Luis J. (2016). Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84:1972–1978.
- Bruce CB, Euphemia L. (2011). Heterogeneity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways*. <https://doi.org/10.5772/21984>
- Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. (2007). Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Res*, 67:10019–10026.

- Burton LJ, Smith BA, Smith BN, Loyd Q, Nagappan P, McKeithen D, Wilder CL, Platt MO, Hudson T, Otero-Marah VA. (2015). Muscadine grape skin extract can antagonize Snail-cathepsin L-mediated invasion, migration and osteoclastogenesis in prostate and breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 36:1019–1027.
- Cao R, Yuan L, Ma B, Wang G, Qiu W, Tian Y. (2020). An EMT- related gene signature for the prognosis of human bladder cancer. *J Cell Mol Med*, 24:605–617.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol*, 7:683–692.
- Chandra YP, Viswanathswamy AHM. (2018). Chemo preventive effect of rutin against N-nitrosodiethylamine-induced and phenobarbital-promoted hepatocellular carcinoma in wistar rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52:78–86.
- Chen H, Miao Q, Geng M, Liu J, Hu Y, Tian L, Pan J, Yang Y. (2013). Anti-Tumor Effect of Rutin on Human Neuroblastoma Cell Lines through Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Promoting Apoptosis. *The Scientific World Journal*, 2013:1–8.
- Chen J, Xu B, Sun J, Jiang X, Bai W. (2022). Anthocyanin supplement as a dietary strategy in cancer prevention and management: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62:7242–7254.
- Chen X, Zhao F, Zhang H, Zhu Y, Wu K, Tan G. (2015). Significance of TLR4/MyD88 expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8:7034–9.

- Chuang CH, Huang CS, Hu ML. (2010). Vitamin E and rutin synergistically inhibit expression of vascular endothelial growth factor through down-regulation of binding activity of activator protein-1 in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Chem Biol Interact*, 183:434–441.
- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH. (2017). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*, 11th edition, Volumes 1 and 2. *Can Vet J*, 58(10):1116.
- Craene B de, Berx G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13:97–110.
- Creighton C. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics*, 289.
- Cristina Marcarini J, Ferreira Tsuboy MS, Cabral Luiz R, Regina Ribeiro L, Beatriz Hoffmann-Campo C, Sérgio Mantovani M. (2011). Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63:459–465.
- Curtin JF, Liu N, Candolfi M. (2009). HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. *PLoS Med*, 6:e1000010.
- de Souza Farias SA, da Costa KS, Martins JBL. (2021). Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-ol. *ACS Omega*, 6:8908–8918.
- Deveci Ozkan A, Kaleli S, Onen HI, Sarihan M, Guney Eskiler G, Kalayci Yigin A, Akdogan M. (2020). Anti-inflammatory effects of nobiletin on TLR4/TRIF/IRF3 and TLR9/IRF7 signaling pathways in prostate cancer cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 42:93–100.

- Dixit S. (2014). Anticancer Effect of Rutin Isolated from the Methanolic Extract of *Triticum aestivum* Straw in Mice. *Medical Sciences*, 2:153–160.
- Dixon R. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60:205–211.
- Dixon RA, Pasinetti GM. (2010). Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. *Plant Physiol*, 154:453–457.
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OFM, Espevik T, Sundan A. (2002). Inflammatory Response After Open Heart Surgery. *Circulation*, 105:685–690.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, 378:771–784.
- Egunsola AT, Zawislak CL, Akuffo AA, Chalmers SA, Ewer JC, Vail CM, Lombardo JC, Perez DN, Kurt RA. (2012). Growth, metastasis, and expression of CCL2 and CCL5 by murine mammary carcinomas are dependent upon Myd88. *Cell Immunol*, 272:220–229.
- Ellis MJ, Tao Y, Luo J. (2008). Outcome Prediction for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Based on Postneoadjuvant Endocrine Therapy Tumor Characteristics. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 100:1380–1388.
- Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38:698–707.
- Eskra JN, Schlicht MJ, Bosland MC. (2019). Effects of Black Raspberries and Their Ellagic Acid and Anthocyanin Constituents on Taxane Chemotherapy of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *Sci Rep*, 9:4367.

- Esserman LJ, Moore DH, Tsing PJ. (2011) .Biologic markers determine both the risk and the timing of recurrence in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 129:607–616.
- Fang H, Wu Y, Huang X, Wang W, Ang B, Cao X, Wan T. (2011). Toll-like Receptor 4 (TLR4) Is Essential for Hsp70-like Protein 1 (HSP70L1) to Activate Dendritic Cells and Induce Th1 Response. *Journal of Biological Chemistry*, 286:30393–30400.
- Farha AK, Gan RY, Li HB, Wu DT, Atanasov AG, Gul K, Zhang JR, Yang QQ, Corke H. (2022). The anticancer potential of the dietary polyphenol rutin: Current status, challenges, and perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62:832–859.
- Farias Wohlenberg M, Gonçalves LK, Schaffer TK. (2015). Effect of grape juice on some biochemical and oxidative stress parameters in serum and liver enzymes of pregnant and lactating rats. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 3:37–46.
- Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett J. (2016). EMT in Breast Carcinoma—A Review. *J Clin Med*, 5:65.
- Fujiki H, Watanabe T, Sueoka E, Rawangkan A, Suganuma M (2018) Cancer Prevention with Green Tea and Its Principal Constituent, EGCG: from Early Investigations to Current Focus on Human Cancer Stem Cells. *Mol Cells*, 41:73–82.
- Fukata M, Chen A, Vamadevan AS. (2007). Toll-Like Receptor-4 Promotes the Development of Colitis-Associated Colorectal Tumors. *Gastroenterology*, 133:1869-1869.e14.
- Galati G, O'Brien PJ. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med*, 37:287–303.

- Ganeshpurkar A, Saluja AK. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi Pharmaceutical Journal, 25:149–164.
- Gao Y, Snyder SA, Smith JN, Chen YC. (2016). Anticancer properties of baicalein: a review. Medicinal Chemistry Research, 25:1515–1523.
- Gaonkar SL, Vignesh UN. (2017). Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. Research on Chemical Intermediates, 43:6043–6077.
- Gentile MT, Ciniglia C, Reccia MG, Volpicelli F, Gatti M, Thellung S, Florio T, Melone MAB, Colucci-D'Amato L. (2015). Ruta graveolens L. Induces Death of Glioblastoma Cells and Neural Progenitors, but Not of Neurons, via ERK 1/2 and AKT Activation. PLoS One, 10:e0118864.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A, Devarajan T. (2014). Evaluation of Bioactive Compounds, Pharmaceutical Quality, and Anticancer Activity of Curry Leaf (*Murraya koenigii* L.). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014:1–8.
- Giusti MM, Wrolstad RE. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochem Eng J, 14:217–225.
- González-Reyes S, Marín L, González L, González LO, del Casar JM, Lamelas ML, González-Quintana JM, Vizoso FJ. (2010). Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. BMC Cancer, 10:665.
- Goss PE, Ingle JN, Pater JL. (2008). Late Extended Adjuvant Treatment With Letrozole Improves Outcome in Women With Early-Stage Breast Cancer Who Complete 5 Years of Tamoxifen. Journal of Clinical Oncology, 26:1948–1955.

- Gossiau A, En Jao DL, Huang MT, Ho CT, Evans D, Rawson NE, Chen KY. (2011). Effects of the black tea polyphenol theaflavin-2 on apoptotic and inflammatory pathways *in vitro* and *in vivo*. *Mol Nutr Food Res*, 55:198–208.
- Guan X, Liu Z, Zhao Z, Zhang X, Tao S, Yuan B, Zhang J, Wang D, Liu Q, Ding Y. (2019). Emerging roles of low-density lipoprotein in the development and treatment of breast cancer. *Lipids Health Dis*, 18:137.
- Guney Eskiler G, Deveci Ozkan A, Bilir C, Kaleli S. (2019). Synergistic Effects of Nobiletin and Sorafenib Combination on Metastatic Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer*, 71:1299–1312.
- Habashy HO, Powe DG, Abdel-Fatah TM, Gee JMW, Nicholson RI, Green AR, Rakha EA, Ellis IO. (2012). A review of the biological and clinical characteristics of luminal-like oestrogen receptor-positive breast cancer. *Histopathology*, 60:854–863.
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. (1999). Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *J Agric Food Chem*, 47:2274–2279.
- Han X, Shen T, Lou H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci*, 8:950–988.
- Hasani NAH, Amin IM, Kamaludin R, Rosdyd NMMNM, Ibahim MJ, Kadir SHSA. (2018). P53 and Cyclin B1 Mediate Apoptotic Effects of Apigenin AND Rutin in ER+-Breast Cancer MCF-7 Cells. *J Teknol.* <https://doi.org/10.11113/jt.v80.10704>
- He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. (2007). TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol*, 44:2850–2859.

- Heil M. (2004). Direct Defense or Ecological Costs: Responses of Herbivorous Beetles to Volatiles Released by Wild Lima Bean (*Phaseolus lunatus*). *J Chem Ecol*, 30:1289–1295.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408:740–745.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. (2002). Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1–10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168:4531–4537.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Hudis CA, Dannenberg AJ. (2013). Molecular Pathways: Adipose Inflammation as a Mediator of Obesity-Associated Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19:6074–6083.
- Hsu RYC, Chan CHF, Spicer JD, Rousseau MC, Giannias B, Rousseau S, Ferri LE (2011). LPS-Induced TLR4 Signaling in Human Colorectal Cancer Cells Increases β 1 Integrin-Mediated Cell Adhesion and Liver Metastasis. *Cancer Res*, 71:1989–1998.
- Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, Selander KS. (2007). Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate*, 67:774–781.
- Iriti M, Kubina R, Cochis A, Sorrentino R, Varoni EM, Kabała-Dzik A, Azzimonti B, Dziedzic A, Rimondini L, Wojtyczka RD. (2017). Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 31:1529–1538.

- Ishiwa J, Sato T, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. (2000). A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. *J Rheumatol*, 27:20–5.
- Itzkowitz SH, Yio X. (2004). Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287:G7–G17.
- Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 5:987–995.
- Iwashina T. (2015). Flavonoid Properties in Plant Families Synthesizing Betalain Pigments (Review). *Nat Prod Commun*, 10:1103–14.
- Izzo S, Naponelli V, Bettuzzi S. (2020). Flavonoids as Epigenetic Modulators for Prostate Cancer Prevention. *Nutrients*, 12:1010.
- Jayameena P, Sivakumari K, Ashok K, Rajesh S. (2018). Rutin: A potential anticancer drug against human colon cancer (HCT116) cells. *Int J Biol Pharm Allied Sci*. <https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2018/7.9.4532>
- Jiang Q, Yi M, Guo Q, Wang C, Wang H, Meng S, Liu C, Fu Y, Ji H, Chen T. (2015). Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol*, 29:370–376.
- Jiang W, Xia T, Liu C, Li J, Zhang W, Sun C. (2021). Remodeling the Epigenetic Landscape of Cancer—Application Potential of Flavonoids in the Prevention and Treatment of Cancer. *Front Oncol*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.705903>

- Johnston S, Cheung K. (2010). Fulvestrant - A Novel Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Curr Med Chem*, 17:902–914.
- Jucá MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat Prod Res*, 34:692–705.
- Kasi PD, Tamilselvam R, Skalicka-Woźniak K, Nabavi SF, Daglia M, Bishayee A, Pazoki-toroudi H, Nabavi SM. (2016). Molecular targets of curcumin for cancer therapy: an updated review. *Tumor Biology*, 37:13017–13028.
- Katsori AM, Hadjipavlou-Litina D. (2011). Recent progress in therapeutic applications of chalcones. *Expert Opin Ther Pat*, 21:1575–1596.
- Kawai T, Akira S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13:816–825.
- Keibel A, Singh V, Sharma M. (2009). Inflammation, Microenvironment, and the Immune System in Cancer Progression. *Curr Pharm Des*, 15:1949–1955
- Khademalhosseini M, Arababadi MK. (2019) Toll-like receptor 4 and breast cancer: an updated systematic review. *Breast Cancer*, 26:265–271.
- Khan H, Belwal T, Efferth T. (2021). Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 61:1616–1639.
- Khan N, Mukhtar H. (2013). Tea and Health: Studies in Humans. *Curr Pharm Des*, 19:6141–6147.
- Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, Loughran P, Scott MJ, Billiar TR. (2013). Signaling of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) through Toll-like Receptor 4 in Macrophages Requires CD14. *Molecular Medicine*, 19:88–98.

- Kozłowska A, Szostak-Węgierek D. (2022). Targeting Cardiovascular Diseases by Flavonols: An Update. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu14071439>
- Krifa M, Leloup L, Ghedira K, Mousli M, Chekir-Ghedira L. (2014). Luteolin Induces Apoptosis in BE Colorectal Cancer Cells by Downregulating Calpain, UHRF1, and DNMT1 Expressions. *Nutr Cancer*, 66:1220–1227.
- Kumar S, Pandey AK. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013:1–16.
- Kuzmich N, Sivak K, Chubarev V, Porozov Y, Savateeva-Lyubimova T, Peri F. (2017). TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)*, 5:34.
- Lambert JD, Elias RJ. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*, 501:65–72.
- Lamrani M, Sassi N, Paul C. (2016). TLR4/IFN γ pathways induce tumor regression via NOS II-dependent NO and ROS production in murine breast cancer models. *Oncoimmunology*, 5:e1123369.
- Lapteva N, Aldrich M, Rollins L, Ren W, Goltsova T, Chen S-Y, Huang XF. (2009). Attraction and Activation of Dendritic Cells at the Site of Tumor Elicits Potent Antitumor Immunity. *Molecular Therapy*, 17:1626–1636.
- Lee JK, Kim SY, Kim YS, Lee WH, Hwang DH, Lee JY. (2009). Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by luteolin. *Biochem Pharmacol*, 77:1391–1400.
- Li H, Li Y, Liu D, Liu J. (2014). LPS promotes epithelial–mesenchymal transition and activation of TLR4/JNK signaling. *Tumor Biology*, 35:10429–10435.

- Li J, Yin J, Shen W, Gao R, Liu Y, Chen Y, Li X, Liu C, Xiang R, Luo N. (2017). TLR4 Promotes Breast Cancer Metastasis via Akt/GSK3 β / β -Catenin Pathway upon LPS Stimulation. *Anat Rec*, 300:1219–1229.
- Li Q, Xu D, Gu Z, Li T, Huang P, Ren L. (2021). Rutin restrains the growth and metastasis of mouse breast cancer cells by regulating the microRNA-129-1-3p-mediated calcium signaling pathway. *J Biochem Mol Toxicol*. <https://doi.org/10.1002/jbt.22794>
- Liao SJ, Zhou YH, Yuan Y. (2012). Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes $\alpha\beta$ 3-mediated adhesion and invasive migration. *Breast Cancer Res Treat*, 133:853–863.
- Lim E, Metzger-Filho O, Winer EP. (2012). The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park)*, 26:688–94, 696.
- Lin JP, Yang JS, Lin JJ. (2012). Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ Toxicol*, 27:480–484.
- Lin NU, Winer EP. (2008). Advances in Adjuvant Endocrine Therapy for Postmenopausal Women. *Journal of Clinical Oncology*, 26:798–805.
- Liu S, Ou S, Huang H. (2017). Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. *Journal of Zhejiang University-Science, B* 18:89–98.
- Liu X, Wang N, Fan S, Zheng X, Yang Y, Zhu Y, Lu Y, Chen Q, Zhou H, Zheng J. (2016). The citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway. *Sci Rep*, 6:39735.

- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42:145–151.
- Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, Carroll JS, Liu XS, Brown M. (2008). FoxA1 Translates Epigenetic Signatures into Enhancer-Driven Lineage-Specific Transcription. *Cell*, 132:958–970.
- Ma FJ, Liu ZB, Hu X, Ling H, Li S, Wu J, Shao ZM. (2014). Prognostic Value of Myeloid Differentiation Primary Response 88 and Toll-Like Receptor 4 in Breast Cancer Patients. *PLoS One*, 9:e111639.
- Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sørensen OE, Frohm B, Dentener MA, Egesten A. (2005). Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. *J Reprod Immunol*, 66:33–43.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79:727–747.
- Markaverich BM, Vijjeswarapu M, Shoulars K, Rodriguez M. (2010). Luteolin and gefitinib regulation of EGF signaling pathway and cell cycle pathway genes in PC-3 human prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 122:219–231.
- Martínez Conesa C, Vicente Ortega V, Yáñez Gascón MJ, Alcaraz Baños M, Canteras Jordana M, Benavente-García O, Castillo J. (2005). Treatment of Metastatic Melanoma B16F10 by the Flavonoids Tangeretin, Rutin, and Diosmin. *J Agric Food Chem*, 53:6791–6797.
- Matthies A, Clavel T, Gütschow M, Engst W, Haller D, Blaut M, Braune A. (2008). Conversion of Daidzein and Genistein by an Anaerobic Bacterium Newly Isolated from the Mouse Intestine. *Appl Environ Microbiol*, 74:4847–4852.

- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1:135–145.
- Mel MMRD, Gunathilake KDPP, Fernando CAN. (2020). Formulation of microencapsulated rutin and evaluation of bioactivity and stability upon in vitro digestive and dialysis conditions. *Int J Biol Macromol*, 159:316–323.
- Mendez MG, Kojima SI, Goldman RD. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*, 24:1838–51.
- Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. (1995). Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett*, 95:221–225.
- Millien VO, Lu W, Shaw J. (2013). Cleavage of Fibrinogen by Proteinases Elicits Allergic Responses Through Toll-Like Receptor 4. *Science*, (1979) 341:792–796.
- Miyake S, Takahashi N, Sasaki M, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. (2012). Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Laboratory Investigation*, 92:102–109.
- Moccia C, Haase K. (2021). Engineering Breast Cancer On-chip—Moving Toward Subtype Specific Models. *Front Bioeng Biotechnol*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.694218>.
- Mohamed AS, Hanafi NI, Sheikh Abdul Kadir SH, Md Noor J, Abdul Hamid Hasani N, Ab Rahim S, Siran R. (2017). Ursodeoxycholic acid protects cardiomyocytes against cobalt chloride induced hypoxia by regulating transcriptional mediator of cells stress hypoxia inducible factor 1 α and p53 protein. *Cell Biochem Funct*, 35:453–463.

- Murakami A, Nakamura Y, Torikai K. (2000). Inhibitory Effect of Citrus Nobiletin on Phorbol Ester-induced Skin Inflammation, Oxidative Stress, and Tumor Promotion in Mice 1.
- Nadal-Serrano M, Pons DG, Sastre-Serra J, Blanquer-Rosselló M del M, Roca P, Oliver J. (2013). Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER α /ER β ratio: Effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes. *Int J Biochem Cell Biol*, 45:2045–2051.
- Naderi A, Teschendorff AE, Barbosa-Morais NL. (2007). A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene*, 26:1507–1516.
- Nafees S, Mehdi SH, Zafaryab M, Zeya B, Sarwar T, Rizvi MA. (2018). Synergistic Interaction of Rutin and Silibinin on Human Colon Cancer Cell Line. *Arch Med Res*, 49:226–234.
- Nasri Nasrabadi P, Zareian S, Nayeri Z, Salmanipour R, Parsafar S, Gharib E, Asadzadeh Aghdaei H, Zali MR. (2019). A detailed image of rutin underlying intracellular signaling pathways in human SW480 colorectal cancer cells based on miRNAs- lncRNAs- mRNAs- TFs interactions. *J Cell Physiol*, 234:15570–15580.
- Niedzwiecki A, Roomi M, Kalinovsky T, Rath M. (2016). Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients*, 8:552.
- Nishimura M, Naito S. (2005). Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-Like Receptors and Related Genes. *Biol Pharm Bull*, 28:886–892.

- O'Neill LAJ, Bryant CE, Doyle SL. (2009). Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer. *Pharmacol Rev*, 61:177–197.
- Okabe S, Ochiai Y, Aida M, Park K, Kim SJ, Nomura T, Suganuma M, Fujiki H. (1999). Mechanistic Aspects of Green Tea as a Cancer Preventive: Effect of Components on Human Stomach Cancer Cell Lines. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90:733–739.
- Ou T, Lilly M, Jiang W. (2018). The Pathologic Role of Toll-Like Receptor 4 in Prostate Cancer. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01188>
- Ozyurt R, Ozpolat B. (2022). Molecular Mechanisms of Anti-Estrogen Therapy Resistance and Novel Targeted Therapies. *Cancers (Basel)*, 14:5206.
- Paarnio K, Väyrynen S, Klintrup K, Ohtonen P, Mäkinen MJ, Mäkelä J, Karttunen TJ. (2017). Divergent expression of bacterial wall sensing Toll-like receptors 2 and 4 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 23:4831.
- Paik S, Tang G, Shak S. (2006). Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24:3726–3734.
- Panche A, Chandra S, Ad D, Harke S. (2015). Alzheimer's And Current Therapeutics: A Review. 8.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. (2016). Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 5:e47.

- Pandey M, Kaur P, Shukla S, Abbas A, Fu P, Gupta S. (2012). Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: In vitro and in vivo study. *Mol Carcinog*, 51:952–962.
- Parish CR. (2003). Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. *Immunol Cell Biol*, 81:106–113.
- Park MH, Kim S, Song Y, Kim S, Kim HJ, Na HS, Chung J. (2016). Rutin induces autophagy in cancer cells. *International Journal of Oral Biology*, 41:45–51.
- Park SE, Sapkota K, Choi JH, Kim MK, Kim YH, Kim KM, Kim KJ, Oh HN, Kim SJ, Kim S. (2014). Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille Protects Human Dopaminergic Cells Against Rotenone Induced Cell Injury Through Inhibiting JNK and p38 MAPK Signaling. *Neurochem Res*, 39:707–718.
- Patel K, Patel DK. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. Elsevier, pp 457–479.
- Perk AA, Shatynska-Mytsyk I, Gerçek YC, Boztaş K, Yazgan M, Fayyaz S, Farooqi AA. (2014). Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. *Cancer Cell Int*, 14:124.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747–752.
- Pervin M, Unno K, Takagaki A, Isemura M, Nakamura Y. (2019). Function of Green Tea Catechins in the Brain: Epigallocatechin Gallate and its Metabolites. *Int J Mol Sci*, 20:3630.

- Petricevic B, Vrbanec D, Jakic-Razumovic J, Brcic I, Rabic D, Badovinac T, Ozimec E, Bali V (2012) Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. *Medical Oncology*, 29:486–494.
- Pilevarzadeh M, Amirshahi M, Afsargharehbagh R, Rafiemanesh H, Hashemi S-M, Balouchi A. (2019). Global prevalence of depression among breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 176:519–533.
- Poltorak A, He X, Smirnova I. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* (1979), 282:2085–2088.
- Pons DG, Nadal-Serrano M, Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P. (2016). The Phytoestrogen Genistein Affects Breast Cancer Cells Treatment Depending on the ER α /ER β Ratio. *J Cell Biochem*, 117:218–229.
- Qiu X, Song Y, Cui Y, Liu Y. (2018). Increased neutrophil-lymphocyte ratio independently predicts poor survival in non-metastatic triple-negative breast cancer patients. *IUBMB Life*, 70:529–535.
- Rajput S, Volk-Draper LD, Ran S. (2013). TLR4 Is a Novel Determinant of the Response to Paclitaxel in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*, 12:1676–1687.
- Rakha EA, Ellis IO. (2011). Modern Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*, 18:255–267.
- Rani A, Stebbing J, Giamas G, Murphy J. (2019). Endocrine Resistance in Hormone Receptor Positive Breast Cancer–From Mechanism to Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00245>
- Revenu C, Gilmour D. (2009). EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. *Curr Opin Genet Dev*, 19:338–342.

- Rittirsch D, Flierl MA, Day DE. (2009). Cross-Talk between TLR4 and FcγReceptorIII (CD16) Pathways. *PLoS Pathog*, 5:e1000464.
- Romero I, Páez A, Ferruelo A, Luján M, Berenguer A. (2002). Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. *BJU Int*, 89:950–954.
- Russo GL, Ungaro P. (2019). Epigenetic Mechanisms of Quercetin and Other Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention. In: *Epigenetics of Cancer Prevention*. Elsevier, pp 187–202.
- Safarinejad MR. (2010). Safety and efficacy of sorafenib in patients with castrate resistant prostate cancer: A Phase II study. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28:21–27.
- Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. (2007). Toll-like Receptor 3 Expressed by Melanoma Cells as a Target for Therapy? *Clinical Cancer Research*, 13:4565–4574.
- Saleh A, ElFayoumi HM, Youns M, Barakat W. (2019). Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 392:165–175.
- Saphner T, Tormey DC, Gray R. (1996). Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 14:2738–2746.
- Satari A, Amini SA, Raeisi E, Lemoigne Y, Heidarian E. (2019). Synergetic Impact of Combined 5-Fluorouracil and Rutin on Apoptosis in PC3 Cancer Cells through the Modulation of P53 Gene Expression. *Adv Pharm Bull*, 9:462–469.

- Sato A, Iwasaki A. (2004). Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:16274–16279.
- Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, Loi S. (2016). Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*, 13:228–241.
- Schmidt KT, Chau CH, Price DK, Figg WD. (2016). Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient-Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 56:1484–1499.
- Seksenyan A, Kadavallore A, Walts AE, de la Torre B, Berel D, Strom SP, Aliahmad P, Funari VA, Kaye J. (2015). TOX3 is expressed in mammary ER+ epithelial cells and regulates ER target genes in luminal breast cancer. *BMC Cancer*, 15:22.
- Selvaraj G, Kaliamurthi S, Thiruganasambandam R. (2019). Molecular docking studies of Rutin on matrix metalloproteinase View project Computational Drug Design View project Short Communication.
- Sharma N, Dobhal M, Joshi Y, Chahar M. (2011). Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev*, 5:1.
- Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. (2013). Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*, 22:1063–1079.
- Sharmila G, Bhat FA, Arunkumar R, Elumalai P, Raja Singh P, Senthilkumar K, Arunakaran J. (2014). Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. *Clinical Nutrition*, 33:718–726.

- Shaukat U, Ismail M, Mehmood N. (2013). Epidemiology, Major Risk Factors and Genetic Predisposition for Breast Cancer in the Pakistani Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14:5625–5629.
- Shi H, Kokoeva M, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116:3015–3025.
- Shirazi FH, Zarghi A, Ashtarinezhad A, Kobarfard F, Nakhjavani M, Anjidan N, Zebardast T. (2011). Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. <https://doi.org/10.5772/23005>
- Singh A, Settleman J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29:4741–4751.
- Skibola CF, Smith MT. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med*, 29:375–383.
- Smiley ST, King JA, Hancock WW. (2001). Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4. *The Journal of Immunology*, 167:2887–2894.
- Song Y, Shi Y, Ao LH, Harken AH, Meng XZ. (2003). TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: role of TNF-alpha and IL-1beta. *World J Gastroenterol*, 9:1799–803.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:10393–10398.

- Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. (2017). EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*, 11:805–823.
- Szkudelska K, Nogowski L. (2007). Genistein—A dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105:37–45.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003). Toll-Like Receptors. *Annu Rev Immunol*, 21:335–376.
- Thani W, Vallisuta O. (2010). Article in *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*.
- Tseng TH, Chien MH, Lin WL, Wen YC, Chow JM, Chen CK, Kuo TC, Lee WJ. (2017). Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation and tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest and histone H3 acetylation-mediated p21^{WAF1/CIP1} expression. *Environ Toxicol*, 32:434–444.
- Turashvili G, Brogi E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne)*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00227>
- Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A. (2020). Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell Biosci*, 10:32.
- van Zanden JJ, van der Woude H, Vaessen J, Usta M, Wortelboer HM, Cnubben NHP, Rietjens IMCM. (2007). The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochem Pharmacol*, 74:345–351.
- Volk-Draper L, Hall K, Griggs C, Rajput S, Kohio P, DeNardo D, Ran S. (2014). Paclitaxel Therapy Promotes Breast Cancer Metastasis in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res*, 74:5421–5434.

- Volk-Draper LD, Hall KL, Wilber AC, Ran S. (2017). Lymphatic endothelial progenitors originate from plastic myeloid cells activated by toll-like receptor-4. *PLoS One*, 12:e0179257.
- Wagner H. (2006). Endogenous TLR Ligands and Autoimmunity. pp 159–173.
- Wang CH, Wang PJ, Hsieh YC. (2018). Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties. *Oncogene*, 37:589–600.
- Wang J, Dong B, Tan Y, Yu S, Bao YX. (2013). A study on the immunomodulation of polysaccharopeptide through the TLR4-TIRAP/MAL-MyD88 signaling pathway in PBMCs from breast cancer patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 35:497–504.
- Wang LS, Stoner GD. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*, 269:281–290.
- Wei GJ, Chao YH, Tung YC, Wu TY, Su ZY. (2019). A Tangeretin Derivative Inhibits the Growth of Human Prostate Cancer LNCaP Cells by Epigenetically Restoring p21 Gene Expression and Inhibiting Cancer Stem-like Cell Proliferation. *AAPS J*, 21:86.
- Weigelt B, Mackay A, A'hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*, 11:339–349.
- Wu F, Chen J, Fan LM, Liu K, Zhang N, Li SW, Zhu H, Gao HC. (2017). Analysis of the effect of rutin on GSK-3 β and TNF- α expression in lung cancer. *Exp Ther Med*, 14:127–130.

- Wu K, Zhang H, Fu Y, Zhu Y, Kong L, Chen L, Zhao F, Yu L, Chen X. (2018). TLR4/MyD88 signaling determines the metastatic potential of breast cancer cells. *Mol Med Rep*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9326>
- Wu WS. (2007). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25:695–705.
- Xu F, Wang F, Yang T, Sheng Y, Zhong T, Chen Y. (2014). Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells. *Cancer Cell Int*, 14:538.
- Yan X, Hao Y, Chen S. (2019). Rutin induces apoptosis via P53 up-regulation in human glioma CHME cells. *Transl Cancer Res*, 8:2005–2013.
- Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H, Yan J, Su H, Zhu X. (2014). Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis. *PLoS One*, 9:e109980.
- Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X, Shen H, Zhu X. (2010). Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29:92.
- Yersal O. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5:412.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. (2006). Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (–)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol*, 72:850–859.

- Yu L-X, Yan L, Yang W. (2014). Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. *Nat Commun*, 5:5256.
- Zandi Z, Kashani B, Poursani EM. (2019). TLR4 blockade using TAK-242 suppresses ovarian and breast cancer cells invasion through the inhibition of extracellular matrix degradation and epithelial-mesenchymal transition. *Eur J Pharmacol*, 853:256–263.
- Zeng X, Su W, Liu H, Zheng Y, Chen T, Zhang W, Yan Z, Bai Y, Yao H. (2018). Simultaneous determination of rosuvastatin, naringin and naringenin in rat plasma by RRLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic drug interaction study. *J Chromatogr Sci*, 56:611–618.
- Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. (2014). Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00352>
- Zhou YH, Liao SJ, Li D. (2013). TLR4 Ligand/H₂O₂ Enhances TGF- β 1 Signaling to Induce Metastatic Potential of Non-Invasive Breast Cancer Cells by Activating Non-Smad Pathways. *PLoS One*, 8:e65906.

