

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ESTROJEN POZİTİF KANSER HÜCRELERİNDE
PI3K/AKT/mTOR BAĞIMLI PROLİFERASYONDA
SPARSTOLONİN'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yağmur DİLBER

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ESTROJEN POZİTİF KANSER HÜCRELERİNDE
PI3K/AKT/mTOR BAĞIMLI PROLİFERASYONDA
SPARSTOLONİN'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yağmur DİLBER

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-6535 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güzin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi

Üye : Doç. Dr. Hamit Yaşar ELLİDAĞ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü

Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Doktora Öğrencisi
Yağmur DİLBER

İmza

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mutay ASLAN

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince maddi ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, tez çalışmam boyunca bilgisini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Mutay ASLAN'a** en derin saygı ve sevgilerimi sunarım.

Biyokimya Anabilim Dalı'na adım attığım ilk günden itibaren samimiyeti ve desteğiyle yolumu aydınlatan, yalnızca akademik anlamda değil, hayatın her alanında rehberliğini hissettiğim kıymetli hocam **Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA'ya** ve anabilim dalındaki tüm hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda geçirdiğim ilk günden itibaren desteklerini esirgemeyen, bu süreci benim için daha anlamlı ve keyifli hale getiren sevgili doktora yol arkadaşlarım **Tuğçe ÇEKER** ve **Çağatay YILMAZ'a**, her zaman yanımda olup stresli süreçlerde destekleyen **Aleyna ÖZTÜZÜN ÜN'e** ve tezimin deneylerinde emeği geçen tüm laboratuvar arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Yarım kalmış bir hayali gerçeğe dönüştürmem için bana fırsat veren, bana olan inancıyla her zaman en büyük destekçim olan **eşim Doç. Dr. Erhan DİLBER'e** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında koşulsuz desteklerini hissettiğim, maddi ve manevi varlıklarını hiçbir zaman eksik etmeyen **canım annem, babam ve kız kardeşlerime** minnettarım.

Ve son teşekkürüm, bazen oyun saatlerine eşlik edemediğim, hafta sonu gece demeden laboratuvara gittiğimde sabırla beni bekleyen, hayatımdaki en özel ve en fedakâr kişi olan **sevgili oğlum Yusuf Kayra DİLBER'e...**kocaman bir teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Doktora eğitim süreci boyunca YÖK 100/2000 bursiyeri olarak desteklendiğim için Yüksek Öğretim Kurumuna ve Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, insan meme kanseri (MCF-7) ve insan over epitel kanseri (OVCAR-3) hücre hatlarında östradiol hemihidrat (ES) varlığında ve yokluğunda Sparstolonin B'nin (SsnB) hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerindeki etkisini belirlemektir. Fosfoinositol-3 kinaz (PI3K), fosforile protein kinaz B (p-AKT), fosforile mTOR (rapamisin'in mekanistik hedefi) sinyal proteinleri ve sfingomyelin (SM) /Seramid (CER) metabolitleri çalışma kapsamında ölçüldü.

Gereç ve Yöntemler: SsnB tedavisinin anti-proliferatif etkileri çeşitli zaman ve konsantrasyonlarda değerlendirildi. Hücre proliferasyonu, Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA) ölçülerek belirlendi. PCNA protein miktarı ELISA ile hücresel dağılımı immünfloresan mikroskobu ile değerlendirildi. Hücrelerin canlılığını test etmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) analizi kullanılırken, CER, sfingozin-1-fosfat (S1P) ve SM miktarlarını analiz etmek için LC-MS/MS kullanıldı. Apoptozu değerlendirmek için TUNEL yöntemi kullanılırken, PI3K, p-AKT ve p-mTOR proteinlerinin seviyelerini ölçmek için immünfloresan boyama ve enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) kullanıldı.

Bulgular: SsnB uygulaması hem estradiol varlığında hem de yokluğunda, MCF-7 ve OVCAR-3 kanser hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı, ancak sağlıklı insan fibroblastlarında toksisiteye neden olmadı. S1P, PI3K, p-AKT ve p-mTOR seviyeleri SsnB ile tedavi edilen kanser hücrelerinde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir düşüş gösterdi. Ayrıca, SsnB ile kültüre edilen kanser hücrelerinde C16-C24 CER'lerin intraselüler seviyelerinde belirgin bir artış ve apoptoza yönelim oranında anlamlı bir yükselme tespit edildi.

Sonuç: SsnB, hücre proliferasyonunu azaltırken, CER birikimini ve apoptozu teşvik ederken S1P, PI3K, p-AKT ve p-mTOR seviyelerini önemli derecede düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sparstolonin B; CER, apoptoz, PI3K, AKT, mTOR

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to determine the effect of Sparstolonin B (SsnB) on cell proliferation and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) and human ovarian epithelial cancer (OVCAR-3) cell lines in the presence and absence of estradiol hemihydrate (ES). Phosphoinositol-3 kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B alpha (p-AKT), phosphorylated mTOR (mechanistic target of rapamycin) signaling proteins, and sphingomyelin/ceramide metabolites were also measured within the scope of the study.

Methods: The anti-proliferative effects of SsnB therapy were evaluated over a range of times and concentrations. Cell proliferation was determined by measuring the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). PCNA was quantified by ELISA and cell distribution was assessed by immunofluorescence microscopy. MTT analysis was used to test the vitality of the cells, while LC-MS/MS was used to analyze the amounts of ceramides (CERs), sphingosine-1-phosphate (S1P), and sphingomyelins (SMs). TUNEL labeling was used to assess apoptosis, while immunofluorescence staining and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to measure the levels of PI3K, p-AKT, and p-mTOR proteins.

Results: SsnB administration significantly decreased cell viability in MCF-7 and OVCAR-3 cells both in the presence and absence of ES, while it did not cause toxicity in healthy human fibroblasts. In comparison to controls, cancer cells treated with SsnB showed a significant drop in the levels of S1P, PI3K, p-AKT, and p-mTOR. In cancer cells cultured with SsnB, a significant increase in intracellular concentrations of C16-C24 CERs and apoptosis was observed.

Conclusions: SsnB downregulated the levels of S1P, PI3K, p-AKT, and p-mTOR while reducing cell proliferation and promoting ceramide buildup and apoptosis.

Key Words: Sparstolonin B; ceramide; apoptosis; PI3K; AKT; mTOR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser Etiyolojisi	5
2.2. Meme Dokusu Yapısı	5
2.2.1. Meme Dokusu Anatomisi	5
2.2.2. Meme Dokusu Histolojisi	6
2.3. Östrojen Pozitif Kanser Türleri	7
2.3.1. Meme Kanseri	8
2.3.2. Meme Kanseri Tipleri	9
2.3.2.1. Luminal A Meme Kanseri	10
2.3.2.2. Luminal B Meme Kanseri	10
2.3.2.3. HER-2 Tip Meme Kanseri	10
2.3.2.4. Üçlü Negatif / Bazal Tip Meme Kanseri	11
2.4. Over Dokusu Yapısı	11
	iii

2.4.1. Over Dokusu Anatomisi	1
2.4.2. Over Dokusu Histolojisi	2
2.5. Over Kanseri ve Tipleri	15
2.6. MCF-7 ve OVCAR-3 hücre hatları	15
2.7. Polifenollerin Kanser Araştırmalarında Rolü	17
2.8. Sparstolonin B(SsnB)	17
2.8.1. Sparstolonin B'nin Yapısı ve Fonksiyonları	17
2.8.2. Sparstolonin B'nin Kanser ile İlişkisi	18
2.9. Sinyal yolları	19
2.9.1. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı	19
2.9.2. Apoptoz	21
2.9.2.1. Apoptozda intrinsik yol	22
2.9.2.2. Apoptozda ekstrinsik yol	22
2.10. Sfingolipitler ve Kanser İlişkisi	23
2.10.1. Seramid	23
2.10.2. Sfingomyelin	25
2.10.3. Sfingozin	25
2.10.4. Sfingozin 1-fosfat	25
2.10.5. Seramid 1-fosfat	26

3.GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	27
3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması	27
3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Başlangıcı	27
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	28
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	28
3.2. Hücre Tedavi Protokolleri ve Canlılık Analizleri	29
3.2.1. Hücrelerde Östrojen (ES) Proliferasyonu Oluşturulması	29
3.2.2. Hücrelerde Sparstolonin B (SsnB) Tedavi Uygulaması	29
3.2.3. Hücre Canlılığı Deneyi	29
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	31
3.4. İmmünfloresan Boyama	31
3.5. ELİSA Yöntemi ile Protein Ölçümü	32
3.6. Protein Ölçümleri	33
3.7. TUNEL Apoptotik Hücre Tayini	33
3.8. Sfingolipidler ve Seramid Kütle Spektrometri	
Analizleri İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması	34

3.9. Sfingomiyelin ve Seramid Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.10. İstatistiksel Analiz	37
4.BULGULAR	38
4.1. Hücrelerde Estrojen Proliferasyon Etkinliğinin MTT ile Değerlendirilmesi	36
4.2. Hücrelerde SsnB Anti-Proliferatif Etkinliğinin MTT ile Değerlendirilmesi	38
4.3.Hücre Nükleer Proliferasyon (PCNA) Düzeyinin Belirlenmesi	41
4.4.Apoptotik Hücre Sayısının Belirlenmesi	41
4.5. MCF-7 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	43
4.6. OVCAR-3 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	45
4.7. Sfingomiyelin ve Seramid Seviyelerinin Belirlenmesi	47
5.TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Meme dokusunun anatomisi	6
Şekil 2.2. Meme dokusunun histolojisi	7
Şekil 2.3 Over dokusunun anatomisi	12
Şekil 2.4. Meme dokusunun histolojisi	13
Şekil 2.5. Sparstolonin B'nin kimyasal yapısı	17
Şekil 2.6. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına genel bakış	19
Şekil 2.7. CER 'in Kimyasal Yapısı	23
Şekil 4.1. MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücrelerinde Estradiol Hemihidrat Tedavisinin MTT analizi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi	37
Şekil 4.2. MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücrelerinde Sparstolonin B Tedavisinin MTT analizi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi	39
Şekil 4.3. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde PCNA ve TUNEL Immü floresan ve protein seviyeleri	42
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR proteinlerinin Immü floresan ve aktivite düzeyleri	44
Şekil 4.5. OVCAR-3 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR proteinlerinin Immü floresan ve aktivite düzeyleri	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması	9
Tablo 2. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde sfingolipid düzeyleri	48



SİMGELER ve KISALTMALAR

Bax	Apoptoz düzenleyici gen
BAD	Pro-apoptotik protein
Bcl-2	Apoptoz düzenleyici protein
BRCA	Meme kanser geni
C16 SM	N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin,
C18 SM	N-stearoil-D-eritro sfingosilfosforilkolin,
C24 SM	N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin
C16 CER	N-palmitoil-D-eritro-sfingozin
C18 CER	N-stearoil-D-eritro-sfingozin
C20 CER	Araşidoil-D-eritro-sfingozin,
C22 CER	N-behenoil-D-eritro-sfingozin
C24 CER	Lignoseroil-D-eritro-sfingozin
CCK-8	Hücre sayım kiti
CER	Seramid
C1P	Seramid 1-fosfat
CTCF	Düzeltilmiş toplam hücre floresansı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit

E1	Estron
E2	17 β Estradiol
E3	Estriol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EK	Endometriyal Kanser
ES	Estradiol Hemihidrat
ER	Estrojen Reseptörü
E1F4E	Eukaryatik translasyon ilişkili faktör 4
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floresan izotiyosiyanat konjugatı
FOXO	Forkhead bax proteini
GSK3	Glikojen sentaz kinaz 3
GTP	Guanozin trifosfat
HDI	İnsan gelişme endeksi
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IGF-1	İnsülin büyüme faktörü 1
IKK	I κ B kinazlar
LH	Luteinizan hormon
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz

MCF-7	İnsan meme kanser hücresi
MMP-2	Matriks metalloproteinaz 2
MOMP	Membran permeabilizasyonu
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazolyum bromür
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NF-κB	Nükleer faktör Kappa B p65
NGS	Normal keçi serumu
OVCAR-3	İnsan ovaryan kanser hücresi
PANC-1	İnsan pankreatik kanser hücresi
PBS	Fosfat tamponu
PCNA	Proliferatif hücre nükleer antijeni
PK1	Fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PIP2	Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat
p-AKT	Fosforile protein kinaz B
p-mTOR	Fosforile rapamisin mekanistik hedefi
ROS	Reaktif oksijen metabolitleri
RHEB	Ras homolog zenginleştirilmiş beyin proteini
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute

RTK	Reseptör tirozin kinaz
S1P	Sfingozin 1-fosfat
SM	Sfingomiyelin
SsnB	Sparstolonin B
TdT	Terminal deoksinükleotid transferaz
TGF	Tümör baskılayıcı faktör
TLR	Toll benzeri reseptörü
TLR2	Toll benzeri reseptör 2
TLR3	Toll benzeri reseptör 3
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF	Tümör nekroz faktör
TSC	Tümör skleroz kompleksi
Tyr	Tirozin
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz etiketleme

1.GİRİŞ

Sağlıklı organ ve dokudaki yeni oluşan hücrelerin bölünme hızı ile yaşlanmış hücrelerin bölünme hızı ve ölümü arasında bir homeostaz vardır. Bu homeostatik dengenin bozulması hücrelerin programsız ve kontrolsüz çoğalmasına yani kansere neden olur. Dünya da kardiyovasküler rahatsızlıklardan sonra kanser, ölüm insidansı en yüksek ikinci hastalık çeşididir.

Meme kanseri, özellikle kadınlarda sık görülen bir hastalık olup ölüm oranı üst sıralarda yer alan bir kanserdir. 2022 yılı raporlarına göre, meme kanseri yaklaşık 2.3 milyona ulaşan vaka sayısı ile dünya çapında kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser olmaya devam etmektedir. Yaklaşık küresel olarak 670.000'den fazla ölümden sorumludur. Meme kanserinin 185 ülkenin 157'sinde kadınlarda en çok tanımlanan kanser olması, küresel yaygınlığını ortaya koymaktadır. İnsidans oranları genellikle yüksek İnsani Gelişim Endeksi (HDI) skorlarına sahip ülkelerde daha yüksektir; bu ülkelerde her 12 kadından neredeyse 1'ine yaşamları süresince meme kanseri tanısı konması muhtemeldir (Bray ve ark., 2024). Dünya Sağlık Örgütü (WHO- *World Health Organization*)'nın son bildirisinde meme tümörleri sınıflamasında, meme kanseri 20 major grup ve 18 minör alt grup varyantı tanımlanmıştır (Ferlay ve ark., 2015). Meme kanserinin tedavisinde, daha çok cerrahi tedavi programları uygulanmakta olup yakın zamanda kemoroterapi, radyoterapi ve terapötik ajanlarla tedavi desteklenmeye başlanmıştır (Dowlathahi ve ark., 1997).

Endometrial kanser (EK) jinekolojik hastalıklarda bilinen malignitedir ve insidansı gün geçtikçe yükselmektedir (Njoku ve ark., 2020). 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 324.603 yeni over kanseri vakası bildirilmiştir. Bu kanser türünün ortalama standardize edilmiş insidans oranı (ASR) 100.000 kadın başına 6,7'dir (Bray ve ark., 2024). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda meme kanserinden sonra EK en çok rastlanan ikinci kanser türüdür. Yüksek ölüm oranı göz önüne alındığında, kadınlar için daha ciddi bir kanserdir ve özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde tarama ve tedavi seçeneklerine erişimin sınırlı olması nedeniyle vaka sayısının artması beklenmektedir Kadınların yaklaşık %3'ünde menopoz öncesi ya da menopoz sonrası dönemde bu kanser türü gelişir ve insidansı da giderek yükselmektedir. (Zhang M. ve ark., 2021). Tümör yapısı histolojik özelliklerine göre sınıflandırıldığında; seviye ve hormon reseptör ekspresyonuna göre 2 kategoriye ayrılır. Tip 1 EK (endometrioid,

östrojen-bağımlı tip) en yaygın tiptir ve tüm EK vakalarının %80'nini oluşturmaktadır. Bunlar düşük gradelidir, çoğunlukla perimenopozal kadınlarda oluşur ve genellikle öncesinde veya beraberinde endometrial hiperplazi eşlik etmektedir. Tip 2 EK (nonendometrioid, östrojen-bağımsız tip) genellikle daha yaşlı kadınlarda görülür, agresif tümörlerdir ve östrojen stimülasyonu ile bağlantılıları yoktur. Tip 2 EK'ler atrofik endometriumdaki prekanseröz lezyonlardan veya endometrial poliplerden kaynaklanabilmektedirler. Ayrıca tip 1 EK ve tip 2 EK vakaları farklı gen ekspresyon profillerine sahiptir. Tip 1 EK vakalarında mikrosatellit instabilite ve fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) mutasyonları yaygındır. Oysa tip 2 vakalarında sıklıkla p53 mutasyonları ve çeşitli kromozomlarda heterozigosite kaybı görülmektedir (Yeramian ve ark., 2013). Meme ve Endometrial kanser tedavisinde hastalığın evresine göre uygun tedavi yöntemi olan cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi uygulamaları ve hormon replasman tedavileri uygulanmaktadır. Güncel tedavi olarak kemoterapi için kullanılan ilaçlar, tam anlamıyla başarılı sonuçlar vermemektedir. (An ve ark., 2021). Bu sebeple kanser tedavisinde farklı, daha az zararlı, kullanımı kolay ve maliyeti düşük başka ajanlara acil ihtiyaç vardır.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, kurkumin, resveratrol, kuersetin ve epigallocateşin gallat (EGCG) gibi polifenollerin, meme (Jakobusic Brala ve ark., 2023; Mecca ve ark., 2024) ve yumurtalık kanserlerinin (Sharifi-Rad ve ark., 2023; Peng Z. ve ark., 2024) tedavisinde kemoterapi ile kombine uygulamaların araştırıldığını vurgulamaktadır. Bu doğal bileşikler paklitaksel, sisplatin ve 5-florourasil gibi kemoterapötik ajanların etkinliğini artırarak sinerjik faydalar sunar (Jakobusic Brala ve ark., 2023; Peng Z. ve ark., 2024). Polifenoller ilaç direncini azaltabilir, apoptozu teşvik edebilir ve kanser hücresi proliferasyonunu inhibe edebilir. Ayrıca, kemoterapinin toksik yan etkilerini hafifletmeye yardımcı olarak hastaların yaşam kalitesini iyileştirirler (Jakobusic Brala ve ark., 2023; Peng Z. ve ark., 2024). Araştırmalar, bu biyoaktif bileşiklerin standart kemoterapi ile birleştirilmesinin, özellikle üçlü negatif meme kanseri ve tekrarlayan yumurtalık kanseri gibi tedavisi zor kanserler için umut verici sonuçlar sunduğunu desteklemektedir.

Kimyasal yapısı bilinen (Şekil 2.5) SsnB polifenolik bileşikler sınıfında olan izokumarinler ve ksantonlar ile benzer yapısal özellikleri paylaşmaktadır (Yepuri ve ark., 2019) . Bu kimyasal bileşim, kanser tedavisi ve diğer inflamatuvar durumlar için

araştırılan anti-inflamatuar ve anti-anjiyojenik özelliklere katkıda bulunur (Tuorkey, 2015). SsnB, toll benzeri reseptör (TLR) sinyalini inhibe etmektedir, inflammatuar sitokin ekspresyonunu azaltabilmektedir ve hücre döngüsü ilerlemesini bozarak etki eder ve bu da onu terapötik uygulamalar için umut verici bir aday haline getirir (Liang ve ark., 2011). SsnB'nin prostat kanseri hücrelerinde reaktif oksijen metabolitleri (ROS) oluşumunu inhibe ederek PI3K/AKT yolunu bloke ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2021). SsnB'nin nöroblastoma dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri üzerindeki etkileri incelenmiş olsa da (Kumar ve ark., 2014). Meme veya yumurtalık kanseri üzerine spesifik araştırmalar sınırlıdır. İnflamatuar yolları hedef alan ve hücre sağkalımını düzenleyen etki mekanizması göz önüne alındığında, SsnB'nin meme ve yumurtalık kanseri tedavileriyle ilgili olma potansiyeli vardır, ancak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

PI3K/AKT/mTOR sinyal ileti yolu, hücre metabolizmasının düzenlenmesinde ve aktifleşmesinde rol oynayan membran proteinlerinden oluşmaktadır. Tümör ve kanser hücrelerinde bu reseptör tirozin kinazlarını (RTK) kodlayan genler mutasyonlara veya amplifikasyonlara uğrayabilir ya da bu genlerin ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenebilir (Bennasroune ve ark., 2004; Easty ve ark., 2011; Takeuchi ve Ito, 2011). Bu çalışmada kullanılan insan meme (MCF-7) ve yumurtalık (OVCAR-3) kanseri hücre hatları, östrojen reseptörü pozitif hücrelerdir (Karpeta ve Gregoraszczyk, 2017). Östrojene bağlı hücre proliferasyonu, PI3K/AKT/mTOR yolu aracılığıyla gerçekleşmektedir (Zhang H. P. ve ark., 2024). Östrojenin reseptörüne bağlanması PI3K'nın aktivasyonuna yol açar ve bu da AKT'in fosforilasyonunu tetikler. Aktive olmuş AKT, hücre proliferasyonunu ve sağkalımını destekleyen mTOR'un aktivasyonuna neden olur (Zhang H. P. ve ark., 2024). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu hem meme hem de yumurtalık kanseri hücrelerinde proliferasyonu artırarak tümör büyümesini teşvik etmektedir (Aziz ve ark., 2018; Raphael ve ark., 2018).

Hormon bağımlı kanserlerde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, PI3K mutasyonları veya PTEN kaybı gibi yolak bileşenlerindeki mutasyonlar ya da amplifikasyonlar nedeniyle sıklıkla aşırı aktif hale gelmekte ve bunun sonucunda kontrolsüz hücre büyümesi ile apoptoza direnç gelişmektedir (Tufail ve ark., 2024). Ayrıca, hormon reseptör durumu, özellikle östrojen reseptörü (ER) pozitifliği, PIK3CA mutasyonlarının bu alt tipte daha yaygın olması nedeniyle, ER+ meme kanserinde PI3K inhibitörlerinin potansiyel

etkinliği ile ilişkilidir (Shariati ve ark., 2021). Daha spesifik olarak, PTEN fonksiyon kaybı yaşıyan meme kanseri hastalarının PI3K inhibitörlerinden terapötik olarak daha fazla fayda sağlama olasılığı bulunmaktadır (Dillon ve Miller, 2014).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu aynı zamanda östrojen ve androjen reseptörleri ile etkileşimde bulunarak bunların transkripsiyonel aktivitesini artırmakta ve böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmektedir(Peng Y. ve ark., 2022). Sağkalım ve proliferasyonda merkezi bir rol üstlenmesi nedeniyle, PI3K/AKT/mTOR yolu kanser tedavileri açısından önemli bir hedef haline gelmiştir. Bu bağlamda, PI3K, AKT ve mTOR inhibitörleri (örn. everolimus), hormon bağımlı kanserlerde etkinliği araştırılan ve klinik kullanımda yer alan ajanlardır (Janku, 2017). Ayrıca, PI3K/AKT/mTOR inhibitörlerinin hormon tedavileri (aromataz inhibitörleri veya anti-androjenler gibi) ile kombinasyonu, direnç mekanizmalarının üstesinden gelme ve tedavi yanıtlarını iyileştirme potansiyeli taşımaktadır (Wylaź ve ark., 2023).

SsnB'nin, ilk defa bu tez çalışmasında ROS oluşumunu inhibe ederek PI3K/AKT yolunu bloke ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2021). Benzer şekilde, CER'in PI3K/AKT yolunu inhibe ettiği bilinmektedir (Schubert ve ark., 2000). Bu bilgiler doğrultusunda, SsnB'nin meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinde östrojene bağılı hücre proliferasyonunu baskılayabileceği ve bu etkinin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşebileceği öngörülmektedir. Ayrıca, SsnB'nin östrojen reseptörü pozitif meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinde CER seviyeleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Etiyolojisi

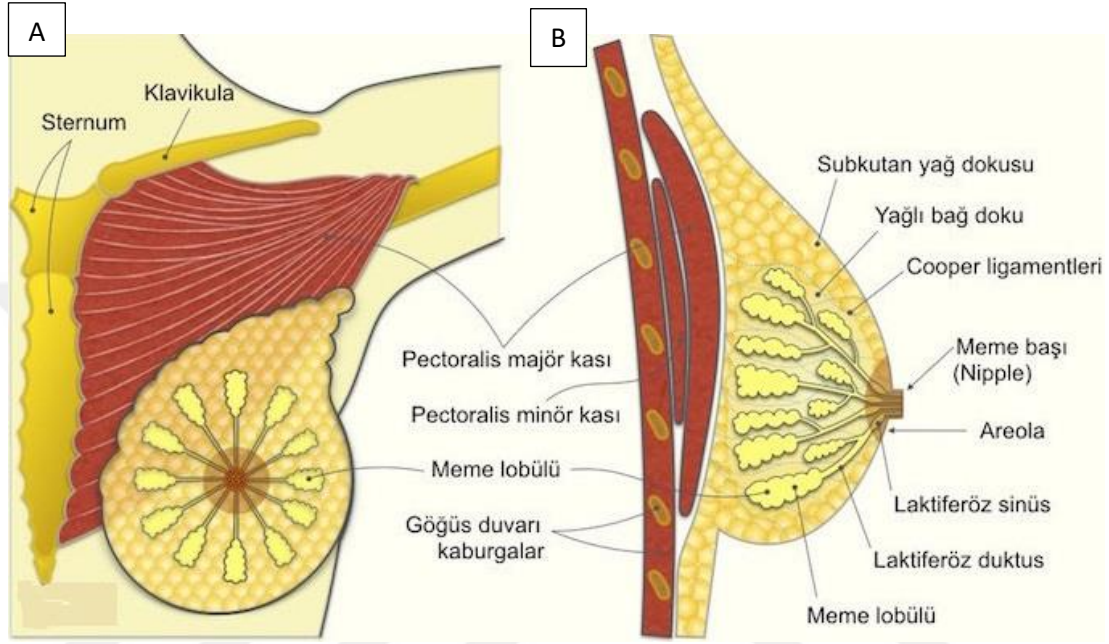
Kanser, sağlıklı hücrelerin zaman içinde çeşitli faktörlerden etkileyerek kontrolsüz biçimde çoğalması olarak tanımlanmıştır. Kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm oranı yüksek hastalıklardan biridir. Değişen ve endüstriyelleşen çevresel koşullara göre yapılan son analizler yakın gelecekte her geçen gün kanser görülme oranının daha da artacağını bildirmiştir. Gün geçtikçe yaklaşık 20-25 milyon yeni kanser vakasının tanımlanması ve bu sayının bir çoğunluğunun düşük gelirli ülkelerde olacağı düşünülmektedir. Düşük gelirli insanların yaşadığı yerlerdeki hizmetlerin sınırlı olması ve yeterince faydalanamaması, dengesiz beslenme ve sağlıksız yaşam koşulları olduğu düşünülmektedir (Ferlay ve ark., 2015). Ayrıca sigara ve alkol gibi zararlı madde kullanımı, yetersiz ve dengesiz beslenme şeklinin artması, mesleki şartlara bağlı olarak karsinogen ajanlara maruziyetin artması, üreme sağlığının bozulması ve enfeksiyonlar kanserin sebepleri arasında sayılabilir (Ferlay ve ark., 2015).

2.2. Meme Dokusu Yapısı

2.2.1. Meme Dokusu Anatomisi

Meme yapısı salgı bezi organizasyonunda olup (glandula mammae) fibröz fasya dokusu ile etrafı çevrelenmiş, toraksın ön tarafında iki interkostal alanın ikinci ve altıncı hizasında, mediyalinde sternum, lateralinde ön aksiler çizgi arasında yerleşimli apokrin salgı yapan bir bezdir. Meme dokusunun ön yüzeyinde etrafını kuşatan deri, bulunduğu yer olarak pektoralis major kası ve fasyası ile birlikte bütünleşik bir organizasyona sahiptir (Sayek, 2004). Meme, stroma ile parankim dokudan oluşur. Stroma; destek doku, parankim ise meme dokusunun işlevsel bölümüdür. Stroma; fibröz bağ doku ile loblar arasında yerleşim gösteren yağlı bir dokudan ibarettir. Parankim kısmı; 15-20 adet lob ve glandula mammariae' den oluşur (**Şekil 2.1**). Loblar da lobullere dallanmıştır. Bir lobtan süt salgısı kanallar aracılığı ile taşınır ve ductus lactiferus ile drene olur. Ductus lactiferus kanalı papillaya kadar ilerler ve porus lactiferusa içeriği boşaltır. Areola mammae tabanında, ductus lactiferus' ta oluşan genişlemeye sinüs lactiferi denir (Yıldırım, 2000). Memenin uç kısmı olan papilla mammaria (meme başı) pigment hücrelerinden zengin olup areola mammae ile

çevrilidir (Moore ve Agur, 2006). Meme başının lokalizasyonu, genellikle 4. kostaya hizalanır. Areola 15–60 mm. çapında, pigmentli bir yapı ve sinir uçları, yağ ve ter bezleri yer alırken kıl folikülü yer almaz. Areola derisi genel olarak düzensiz bir görünümde ve içinde gll. Areolares (montgomery bezleri) olarak adlandırılan yağ bezleri vardır (Şekil 2.1). Gestasyon süresince bu bez yapıları çeşitli hormon uyarısı ile gelişir yağlı bir süt salgısı ile emme esnasında olabilecek maserasyonu önlerler.

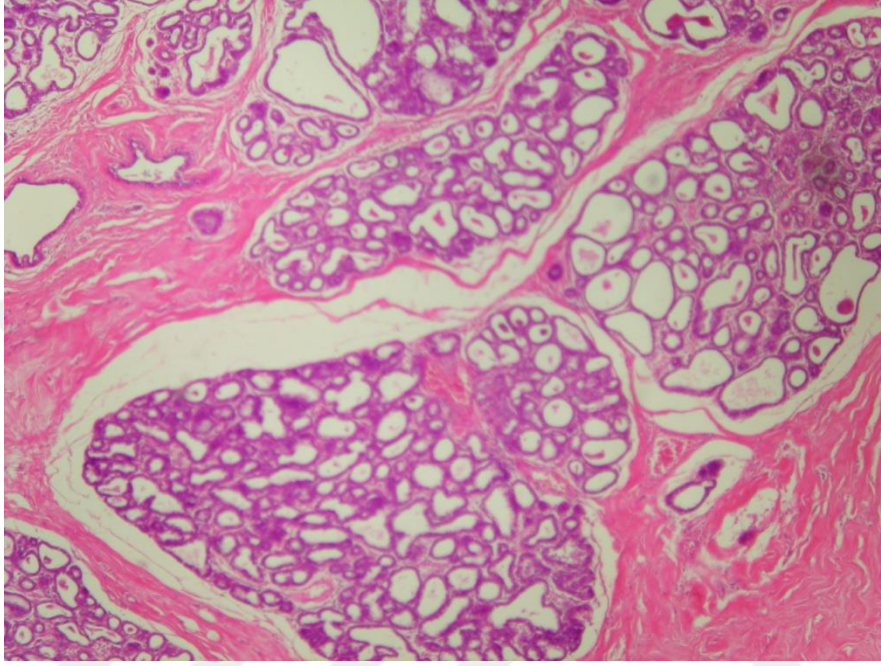


Şekil 2.1: Memenin Şematik Anatomisi A) Vertikal görünüm B) Lateral görünüm (Şekil Türkcerrah web sayfasından alınmıştır).

2.2.2. Meme Dokusu Histolojisi

Meme bezi histolojisi 15-20 tane birleşik tübüloelveoler bezden oluşmuştur (Şekil 2.2). Meme bezleri küçük kanallar (alveoller) aracılığı ile tek bir ortak kanala (lobülüs) açılır. Epiteli dokusu iki sıra halinde döşeli hücrelerden oluşur. Dışta yüzeyi yassı epitel hücreleri olup, kasılma özelliği olan, devamlılık göstermeyen bazal membran üstüne oturmuş konumdadır. Lümeneye dönük epitel yapısında prizmatik veya kübik epitel hücreleri vardır. Bu hücreler sekresyondan sorumlu olup süt salgısını yapar. Meme yapısında terminal duktal lobüler kısım fonksiyonel birimdir. Lobüllerde salgılanan süt terminal, segmental ve laktiferöz duktuslardan geçerek laktiferöz sinüsler aralığı ile meme başına açılır (Kierszenbaum ve Tres, 2006). Gebelik dönemi öncesinde meme bezi organizasyonu kanallar sistemi yapısındadır. Gebelik sırasında kanallar dallanarak bir lopçuğu oluşturan alveollerden veya asinüslerden oluşmuş keseleri oluşturarak sonlanır. Gebeliğin başlaması ile çoğunlukla yağ dokusundan

oluşan stroma içinde östrojen, progesteron ve prolaktin, HPL salgısıyla alveollerde üretilir. Apokrin tip salgı yapan meme bezlerinden doğum ile artan oksitosin hormonunun etkisiyle miyoepitelyal hücrelerin kasılarak süt meme ucundan salınım yapar. Meme yapısının olgunlaşması östrojen etkisiyle puberte döneminde gerçekleşir (Kierszenbaum ve Tres, 2006).



Şekil 2.2. Meme Dokusu Histoloji (Kierszenbaum ve Tres, 2006)

2.3. Östrojen Pozitif Kanser Türleri

Meme kanseri vakalarının büyük bir çoğunluğu hormona bağımlıdır ve yüksek doz oranlarında östrojene uzun süre maruziyet ile meme kanseri insidansı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Dorgan ve ark., 1996; Yue ve ark., 2013). Ayrıca hormonlardan bağımsız olarak ortaya çıkan ve gelişen meme kanseri tipleri de mevcuttur.

Kadınlarda birçok dokuda sentez edilebilen ve dişilik özelliklerin oluşumunda önemli rol alan östrojen ve progesteron hormonlarının en önemli sentez yerleri over ve plasentadır (Onat ve ark., 2007). Sağlıklı doku gelişimi bu hormonların kontrolünde olması sebebiyle tümörleşme ve kanserleşme sürecinde de hormon etkisi doğal bir sonuçtur. Fakat burada hormonlar direkt olarak değil, indirekt olarak polipeptid büyüme faktörlerinin insülin büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF)

ve tümör baskılayıcı faktör (TGF) oluşumu üzerinden etkilidirler. Bu nedenle de östrojen pozitif kanser türlerinin tedavisinde anti-östrojen etki oluşturan ürünlerin kullanımı büyük önem taşımaktadır (Kalaycıoğlu ve ark., 2013).

2.3.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, tanımlanan kanser türleri arasında en yaygın ikinci kanser türü olup; kadınlarda ise en sık görülen kanser türüdür (Bray ve ark., 2024). Meme kanseri karmaşık yapılı bir tür olup nokta mutasyonu, kromozom üzerindeki değişimler ve genetik defektler kanserleşme sürecinde rol alır. Meme kanserlerinin %10'unu germ hücre genlerinde meydana gelen mutasyon sonucunda ortaya çıkan protein sentez bozuklukları oluşturur (Bray ve ark., 2024). Kanser gibi hastalıklarda ırksal geçiş %20 gibi bir orana sahip olmasına rağmen hala bu süreçte aktifleşen genlerin tam olarak tanımlaması yapılamamıştır. BRCA geninin hücre siklusunun kontrolü, DNA defektlerinin tamiri ve transkripsiyon süreçlerinde proteinlerin kodlanması gibi görevleri tanımlanmıştır (Turnbull ve Rahman, 2008). *BRCA-1* ve *BRCA-2* genleri mutasyona maruziyeti ile meme kanseri meydana gelir. Meydana gelen mutasyonlar genellikle *BRCA-2* geninde daha fazla görülür. Her iki gende meydana gelen mutasyon sonucunda over, meme ve prostat kanseri görülmektedir. *BRCA-1* geni östrojen reseptörü ilişkili sinyal mekanizmasında önemli rol almaktadır (Tryggvadottir ve ark., 2003). Buna bağlı olarak progesteron reseptörü (PR), östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) defekt ya da eksikliğinde *BRCA-1* geni ile ilgili tümörojenik yapılar meydana gelir.

Doku organizasyonundaki kan damarları, immün sistem hücreleri, fibroblastlar ve sinyalleşme molekülleri tümör yapısının çevresinde bulunan hücresel ortamı oluşturmaktadır (Vannucci, 2015). Meydana gelen tümör yapılarının etrafında kan damarları ve ekstrasellüler matriks bulunur. Bu yapılar tümörün beslenmesi ve yayılmasında rol oynar. Gen yapısındaki kromatin değiştirici faktörler, histon değişimleri, DNA metil transferazların etkinliğindeki değişimler tümör yapılarını etkileyerek meme kanseri hücrelerin çoğalmasına neden olur (Vannucci, 2015).

2.3.2. Meme Kanseri Tipleri

ER ve PR bağılı reseptörlerin pozitif veya negatif olması, HER-2 gen ekspresyonu meme kanserinin sınıflandırılmasında kullanılır. Meme kanseri moleküler olarak Luminal A, Luminal B, HER-2 ve 3'lü Negatif/bazal benzeri olarak 4 grup olarak kategorize edilmektedir (Holliday ve Speirs, 2011).

Tablo 2.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması (Holliday ve Speirs, 2011)

SINIFLANDIRMA	İMMÜNPROFİL	DİĞER ÖZELLİKLER	HÜCRE HATLARI
Luminal A	ER (+/), PR (+/), HER-2 (-)	Ki67 ekspresyon düşük, endokrin yanıt kemoterapi uyumlu.	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER (+/), PR (+/), HER-2 (+)	Ki67 ekspresyon yüksek, genellikle endokrin yanıt kemoterapi için değişken, HER-2 (+) trastuzumab duyarlıdır.	BT474, ZR-75
HER-2	ER (-), PR (-), HER-2 (+)	Ki67 ekspresyon yüksek, trastuzumab duyarlı, kemoterapiye duyarlıdır.	MDA-MB-453, SKBR-3
3'lü Negatif/Bazal	ER (-), PR (+/-), HER-2 (-)	Ki67 ekspresyon yüksek, endokrin yanıt vermeyip genellikle kemoterapiye yanıt verir.	MDA-MB-468, SUM190

2.3.2.1. Luminal A Meme Kanseri

ER pozitif, HER-2 negatif olan ve düşük oranda Ki67 belirteci barındıran tümörler luminal A meme kanseri olarak adlandırılır. Bu kanser tipi %50-70 oranında en sık görülen meme kanseri türüdür (Voduc ve ark., 2010). Luminal A tümöründe hücre çoğalma hızı diğer kanser alt tiplerine göre en düşüktür. Bu tip meme kanserlerinin çoğunlukla tedavisi hormon desteği ile yapılmaktadır. ER'nin pozitif olması tedavi yöntemini şekillendirmede iyi bir alternatiftir. Luminal A tümörleri diğer alt tiplerine göre en düşük tekrarlama oranına sahiptir (Metzger-Filho ve ark., 2013).

2.3.2.2. Luminal B Meme Kanseri

Luminal B tümörlerini; ER pozitif olması, Ki67 belirtecinin yüksek oranda eksprese edilmesi ve HER-2 pozitif / negatif özellikte olması tanımlar (Voduc ve ark., 2010). Luminal B tümörlerin görülme oranı, Luminal A grubuna göre daha düşüktür ve genç yaşlarda erken teşhis edilir. Luminal B tipi meme kanseri görülme oranı % 10-20 arasında değişmektedir. Luminal B tümörleri daha malign olup yaşam oranı daha azdır (Metzger-Filho ve ark., 2013).

2.3.2.3. HER-2 Tip Meme Kanseri

HER-2'nin moleküler yapısı, reseptörünün yapısal özellikleriyle birebir örtüşmemekte olup, meme kanseri tedavilerinde doğrudan kullanılmamaktadır. Meme kanserlerinin bir kısmı HER-2 pozitif olup, bu tümörler "HER-2 tipi tümör" olarak adlandırılmaktadır. Ancak, HER-2 pozitif tümörler tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5-15'ini oluşturmaktadır. Luminal A ve B alt tipleriyle karşılaştırıldığında, HER-2 pozitif tümörlerin daha erken evrelerde tespit edilebildiği bildirilmiştir (Metzger-Filho ve ark., 2013).

2.3.2.4. Üçlü Negatif/Bazal Tip Meme Kanseri

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), ER, PR ve HER-2 ekspresyonunun bulunmadığı bir alt tiptir. Diğer meme kanseri alt tipleriyle kıyaslandığında, genellikle daha genç yaşlarda teşhis edilmekte ve daha agresif bir seyir izlemektedir. Üçlü negatif bazal benzeri meme kanseri, HER-2 reseptörünün genetik materyalindeki amplifikasyonun bulunmaması ve buna bağlı olarak gen ekspresyonundaki farklılıklarla karakterizedir (Fan ve ark., 2006).

Metastatik potansiyelinin yüksek olması, TNBC için hedefe yönelik tedavi geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si üçlü negatif alt tipe ait olup, bu durum TNBC'yi önemli bir klinik zorluk haline getirmektedir (Fan ve ark., 2006).

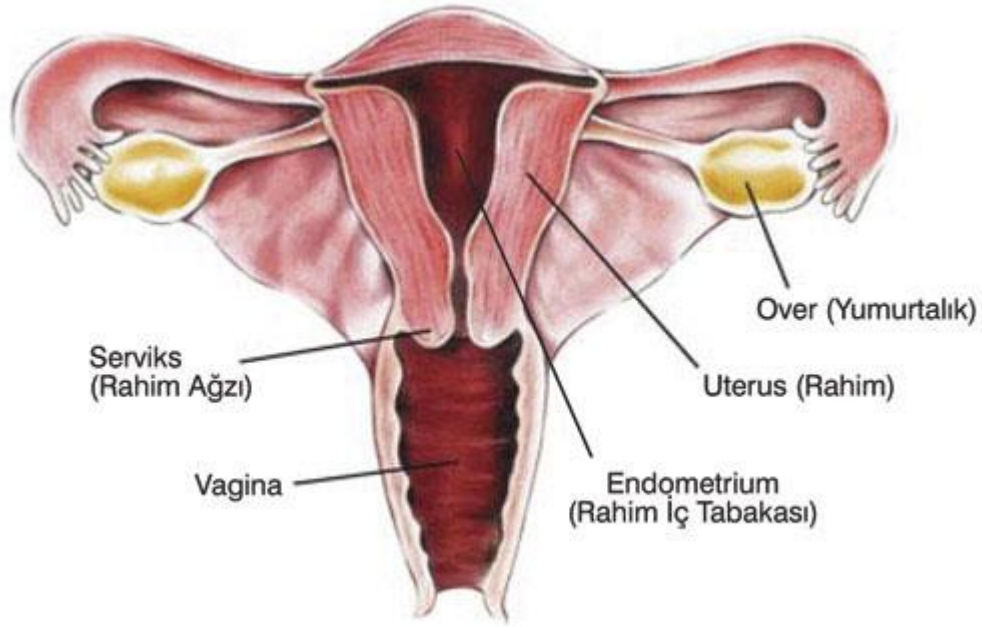
2.4. Over Dokusu Yapısı

2.4.1. Over Dokusu Anatomisi

Overler, anatomik olarak uterusun her iki yanında, pelvik boşluğun lateralinde yer alan oval şekilli, intraperitoneal organlardır (Şekil 2.3). Pelvisin yan duvarlarına, Ligamentum (lig.) latum'un mezovarium bölgesinden asılı konumda bağlanmışlardır. Embriyolojik gelişim sürecinde, başlangıçta abdominal boşlukta, böbrek hizasında bulunan overler, zamanla inferiora doğru göç ederek minör pelvise, fossa ovarica bölgesine yerleşirler(Williams ve ark., 1995).

Erişkin bir bireyde overlerin yaklaşık boyutları; uzunluk açısından 3-3,5 cm, genişlik açısından 1,5-1,7 cm ve kalınlık açısından 1 cm'dir. Fossa ovarica'nın ön yüzeyinde medial umbilikal ligament, arka yüzeyinde ise ureter ve internal iliak arter yer almaktadır (Williams ve ark., 1995).

Puberte öncesinde overlerin yüzeyi, tek katlı küboidal epitel hücreleri ile kaplıdır. Ancak, puberte sonrası dönemde, ovaryan folliküllerin rüptüre olması ve ovulasyon süreci nedeniyle overlerin yüzey epiteli giderek daha girintili ve çıkıntılı bir yapı kazanır. Bu nedenle, ovulasyonu inhibe eden oral kontraseptif kullanımı, overlerin yüzeyinde skar doku oluşumunu azaltmaktadır (Moore ve Dalley, 2018).

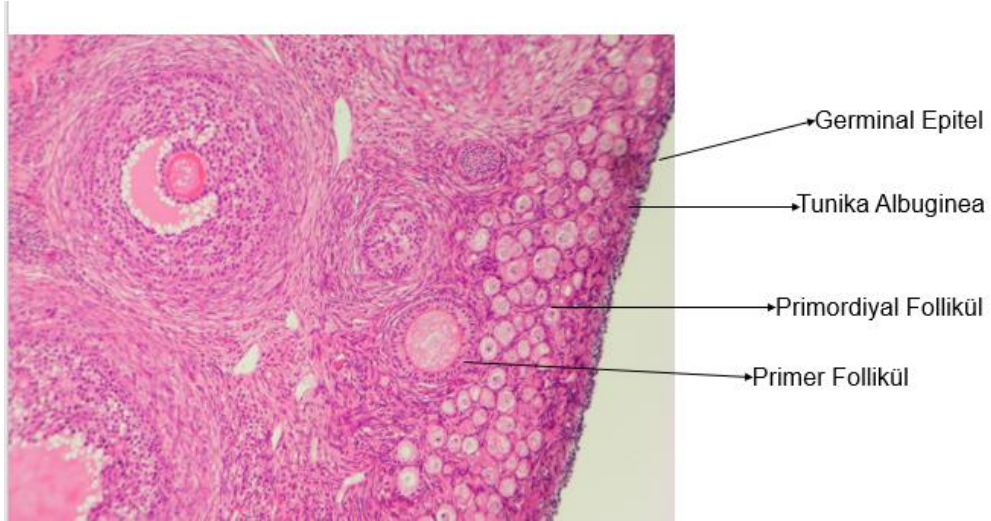


Şekil 2.3. Over Dokusunun Anatomisi (Williams ve ark., 1995)

2.4.2. Over Dokusu Histolojisi

Ovaryum histolojik organizasyonu korteks ile medulladan oluşur (Şekil 2.4). Korteks dış bölgede foliküllerin yer aldığı bölümdür. Medulla; iç kısımda yer alıp çok miktarda kan damarı, lenf damarları ve sinir liflerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Medulla kısmı foliküler yapı bulundurmaz. Puberte öncesindeki dönemde foliküler gelişimde sadece primordiyal foliküller yapılar görülür, puberte sonrası dönemde primer, sekonder ve tersiyer yapıda foliküller izlenir. Seksüel olgunluk başlayınca burada foliküllerin dışında korpus luteum, korpus albicans ve atretik foliküller de bulunur (Eşrefoğlu, 2021).

Ovaryum yüzeyini kaplayan germinal epitel olarak adlandırdığımız tek katlı kübik ve yer yer tek katlı yassı epitel ile kaplıdır. Yüzeydeki germinal epitel embriyonik gelişim sürecinde germ hücrelerinin kökenini oluşturduğu varsayımına dayanmaktadır. Bununla birlikte, primordiyal germ hücrelerinin embriyolojik kökeni ekstragonadal, yani vitellus kesesi duvarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda deney hayvanları ve insanların germinal epitelinden oosit üretmenin mümkün olması, bu tartışmayı yeniden gündeme getirdi (Eşrefoğlu, 2021).



Şekil 2.4.Over Dokusunun Histoloji (Eşrefoğlu, 2021).

Ovaryum germinal epitel altına yerleşmiş olan tunika albuginea sıkı bağ dokusu yapısındadır. Bu bölgede bağ doku stroması içinde foliküller yerleşim gösterir. Daha iç bölgede gevşek bağ dokudan zengin vasküler yapıyı oluşturan damar yatağı bulunur (Eşrefoğlu, 2021).

Folikülogenez primordiyal folikülden başlayıp tersiyer folikül oluşumuna kadar olan gelişim dönemidir. Histolojik olarak değerlendirdiğimizde, olgun folikül, gelişmekte olan folikül ve primordiyal folikül olarak bilinen üç tür folikül vardır. Primer ve sekonder foliküller gelişmekte olan iki tür foliküldür. Bu süreçte, folikül çapı ve hücresel özellikler değişir (Eşrefoğlu, 2021).

Primer oosit mayoz bölünmenin profaz evresinde oluşur. Tersiyer folikülde ovulasyona altı ile on iki saat kala ilk mayozu tamamlayarak ikinci mayoza girer ve sekonder oosit olarak adlandırılır. Sekonder oosit ovulasyonun metafaz evresinde bölünür ve ovulasyonla uzaklaşır. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse mayoz tamamlanmaz (Eşrefoğlu, 2021).

Hücreler arası bağlantı, folikül hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan granüloza tabakasından sorumludur. Bu aşamada folikül birincil veya preantral olarak bilinir. Oosit mikrovillusları ve folikül hücrelerinin uzantıları zona pellusida içinde uzanır ve birbirleriyle gap junctionlar aracılığıyla etkileşim kurarlar. Folikül sıvısı, folikül hücrelerinin büyümesi sırasında oluşmaya başlar. Bu sıvının bulunduğu boşluklar birleşir ve daha büyük bir boşluk oluşur. Bu nedenle bu foliküllerin adları "ikincil" veya "antral"dır. Antrum oluşturulan granüloza hücreleri, bir noktada folikül duvarında

yoğunlaşır. Bu hücreler küçük bir tepecik oluşturarak antrumun iç kısmına uzanan yapı kumulus ooforus olarak bilinir. Oosit de bu yapıda bulunur. Korona radiata, oosit etrafında yoğunlaşan bir grup granüloza hücresi tarafından üretilir (Eşrefoglu, 2021). Oosit ve granüloza hücrelerinde bu değişiklikler meydana gelirken, folikülün etrafındaki stromada fibroblastlar teka tabakasını oluşturur. Bu tabakanın hem iç hem de dış özellikleri farklılıklar gösterir. Folikül uyarıcı hormon, granüloza hücrelerinde aromataz enzimi salgılayarak androstenediondan östrojen üretir. Bu östrojen de folikülü çevreleyen stromaya dönüşür ve ardından kan dolaşımına girer ve tüm vücuda yayılır (Karakoç ve ark., 2019).

Her menstruasyonda, bir folikül büyür ve olgun hale gelir. Olgunlaşan bu folikül büyümenin son aşamasına ulaşabilir ve bu da ovulasyonu gerçekleştirebilir. Graaf folikül, ovulasyon öncesi oldukça büyük bir foliküldür ve yaklaşık iki buçuk santimetre çapındadır. Bu folikül ovaryum yüzeyinden çıkar. Folikül büyümesiyle orantılı olarak büyümediğinden, granüloza hücre tabakası daha ince hale gelir. Büyüyen folikülün dolaşımdaki yüksek östrejene yanıt olarak, ön hipofiz luteinizan hormon (LH) düzeyinde bir artışa neden olur. Bu, ovulasyon döneminin yaklaştığını gösterir (Karakoç ve ark., 2019).

2.5. Over Kanseri ve Tipleri

Over kanseri, jinekolojik maligniteler arasında en yüksek mortalite oranına sahip kanser türlerinden biri olarak dikkat çekmektedir (Javadi ve ark., 2016). Dünya genelinde her yıl yaklaşık 220.000 kadına epitelyal over kanseri (EOK) tanısı konmaktadır (Jayson ve ark., 2014). Epidemiyolojik olarak değerlendirildiğinde, aile öyküsü, nulliparite, erken menarş, geç menopoz ve ileri yaş gibi faktörler over kanseri için önemli risk unsurları arasında yer almaktadır (Chobanian ve Dietrich, 2008). Over kanserlerinin yaklaşık %90'ı sporadik olarak gelişirken, %10'u kalıtsal ailesel sendromlarla ilişkilidir (Chobanian ve Dietrich, 2008; Javadi ve ark., 2016).

BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı gen mutasyonları taşıyan bireyler ile hereditör non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC; Lynch sendromu) tanısı almış hastalar, over kanseri açısından yüksek risk grubunda yer almaktadır (Javadi ve ark., 2016). Kadınlarda 1/500 oranında görülen kalıtsal meme ve over kanseri sendromu, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına sahip bireylerde otozomal dominant geçiş göstermektedir (Roett ve Evans, 2009; Javadi ve ark., 2016). BRCA1 mutasyonu taşıyan bireylerde

over kanseri gelişme riski yaklaşık %30 iken, BRCA2 mutasyonu taşıyanlarda bu risk %27 olarak belirlenmiştir (Jayson ve ark., 2014; Javadi ve ark., 2016).

Over kanseri açısından infertilite, nulliparite, geç menopo ve erken menarş belirgin risk faktörleri arasında yer alırken (Holschneider ve Berek, 2000; Javadi ve ark., 2016). geç menarş, erken menopo ve hormonal kontraseptif kullanımı gibi ovulasyon sıklığını azaltan faktörlerin koruyucu etkileri olduğu bildirilmektedir (Javadi ve ark., 2016).

2.6. MCF-7 VE OVCAR-3 Hücre Hatları

MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında beyaz ırktan bir kadının duktal karsinom dokusundan izole edilerek tanımlanmış olup, Michigan Kanseri Vakfı-7'nin kısaltması olarak adlandırılmıştır (Soule ve ark., 1973). MCF-7 hücreleri, ER pozitif olup E2'ye duyarlı hücrelerdir. Bu hücrelerde östrojen reseptörü alfa (ER α) ekspresyonu yüksek seviyelerde olup, östrojen reseptörü beta (ER β) ekspresyonu daha düşük düzeylerde gözlemlenmektedir (Caroline, 1998). Ayrıca, MCF-7 hücreleri çok sayıda E2 reseptörü içermekte olup, proliferasyonları hücre zarına bağlı büyüme faktörü reseptörleri aracılığıyla düzenlenmektedir. MCF-7 hücre hattında mikroRNA (miRNA) düzenlenmesi, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) sinyal iletim mekanizmasıyla ilişkili olup, IGF-1'in aktivasyonunda otokrin bir uyarının rol oynadığı gösterilmiştir (Caroline, 1998).

MCF-7 hücre hattı, Lüminal A tipi meme kanserine ait bir hücre hattıdır. Bu hücreler, düşük metastatik aktiviteye sahip olup invaziv olmayan bir yapıya sahiptir (Levenson ve Jordan, 1997). Ayrıca, MCF-7 hücrelerinin çeşitli alt grupları bulunmakta ve farklı kültür koşullarına bağlı olarak genomik dengesizlikler göstermektedir. Bu hücre hatları arasında RNA ekspresyon seviyeleri ve genomik farklılıklar görülebilmektedir (Levenson ve Jordan, 1997). MCF-7 hücreleri, kolayca kültüre edilebilmeleri ve ER pozitif aktivitesini korumaları nedeniyle, özellikle anti-hormon tedavisine direnç çalışmalarında tercih edilen bir modeldir. Günümüzde meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan önemli bir hücre hattıdır (Levenson ve Jordan, 1997).

OvcAR-3 ovarian kanser tipi, 1982 yılında overlerinde ileri derece adenokarsinom olan hastanın malign epitel dokusundan izole edilmiştir (atcc.org). Yumurtalıklar tarafından üretilen hormonlar sadece yumurtalıklarda değil aynı zamanda periyodik

değişiklikler sırasında endometriyumda da önemli bir rol oynarlar (Xu ve ark., 2022). Bu nedenle, yumurtalıkların düzgün çalışması, gebeliğin sürdürülmesi için gereklidir. Östrojenler arasında, en baskın östrojen E2'dir. Bunun yanında E1 ve estriol (E3)'de ayırt edilebilir (Boon ve ark., 2010). Östrojenlerin in vitro yumurtalık kanseri hücrelerinin büyümesini uyarabildiği gözlemlenmiştir (Cunat ve ark., 2004). Örneğin, Matsumura ve ark. E2'nin AKT/ERK kaskadları aracılığıyla Caov-3 ve OVCAR3 hücrelerinin çoğalmasını uyardığını göstermiştir (Matsumura ve ark., 2017).

2.7. Polifenollerin kanser araştırmalarında rolü

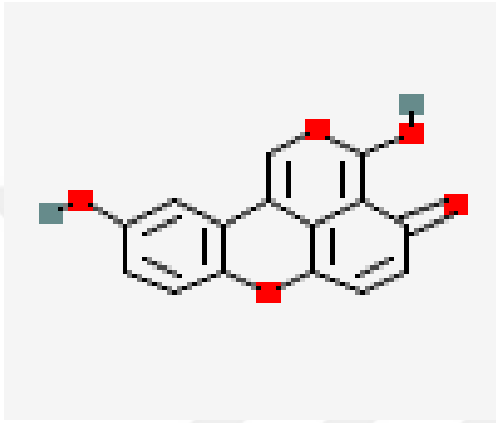
Polifenoller, doğal ve sentetik formlarda bulunabilen organik kimyasal bileşiklerdir (Lu ve ark., 2016). Doğal yapıdaki polifenoller baharatlar, çaylar, yağlar, renkli meyveler, üzüm çekirdeği ve meyve kabuğu gibi günlük tüketilen gıdalarda bulunmakla birlikte serbest radikalleri yakalama özellikleri sayesinde potansiyel antioksidan ve antikanser etkinlik göstermektedirler (Sharma R. A. ve ark., 2005).

Son araştırmalar, kurkumin, resveratrol, kuersetin ve epigallocateşin gallat (EGCG) gibi polifenollerin, meme (Jakobusic Brala ve ark., 2023) ve yumurtalık kanserlerinin (Sharifi-Rad ve ark., 2023) (Peng Z. ve ark., 2024) tedavisinde kemoterapiyle birlikte kullanımının giderek daha fazla incelendiğini vurgulamaktadır. Bu doğal bileşikler, paklitaksel, sisplatin ve 5-florourasil gibi kemoterapötik ajanların etkinliğini artırarak sinerjik faydalar sunmaktadır (Jakobusic Brala ve ark., 2023; Peng Z. ve ark., 2024). Polifenoller, ilaç direncini azaltabilir, apoptozu teşvik edebilir ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilir. Ayrıca, kemoterapinin toksik yan etkilerini hafifleterek hasta sonuçlarını ve yaşam kalitesini iyileştirmeye yardımcı olmaktadır (Jakobusic Brala ve ark., 2023; Peng Z. ve ark., 2024). Araştırmalar, bu biyoaktif bileşiklerin standart kemoterapi ile kombinasyonunun, özellikle üçlü negatif meme kanseri ve tekrarlayan yumurtalık kanseri gibi tedavisi zor kanserler için umut verici sonuçlar sunduğunu desteklemektedir.

2.8.Sparstolonin B (SsnB)

2.8.1. SsnB Yapısı ve Fonksiyonları

SsnB, Sparganium stoloniferum bitkisinin kök ve yumrularından elde edilir. Yapısal formülü C₁₅H₈O₄ olarak tanımlanmıştır. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve X-ışını kristalografisi ile izokumarin ve ksanton olmak üzere iki temel bileşenden oluşan bir polifenol olarak belirlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Sparstolonini B'nin Kimyasal yapısı (PubChem)

SsnB'nin batı çin tıbbında menstrüasyon düzenleyici, anti-oksidant, anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-mikrobiyal ve immünomodulator etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Tuorkey, 2015). SsnB, Toll benzeri reseptörler iletilisini inhibe ederek, inflamatuvar sitokin ekspresyonunu azaltır ve hücre döngüsünün ilerlemesini bozarak etki eder. Bu etki mekanizması ile terapötik uygulamalarda SsnB umut verici bir aday haline gelmiştir (Liang ve ark., 2011).

2.8.2. SsnB'nin Kanser ile İlişkisi

SsnB'nin çok çeşitli nöroblastoma hücre hatlarında hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu, hücre büyümesini engellediği ve kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2014). SsnB'nin prostat kanser hücre bölünme evreleri ve tümör büyümesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Özellikle, SsnB'nin bir dizi sitolojik deney temelinde in vitro G2/M fazının durmasını aktive ederek prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu inhibe edebileceği ve apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir. İn vivo olarak, SsnB'nin çıplak fare ksenograft modellerinde tümör büyümesini inhibe edebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, SsnB'nin

ROS birikimini ve oksidatif stresi azaltarak PI3K/AKT yolunu baskılayabileceği doğrulanmıştır (Liu ve ark., 2021).

Bir diğer çalışmada pankreas adenokarsinomu üzerinde SsnB'nin antikanser aktivitesi araştırılmıştır. SsnB'nin insan pankreatik kanser hücresi (PANC-1) ve insan pankreatik adenokarsinom hücresi (SW1990) hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmış ve CCK-8 (hücre sayım kiti), koloni oluşumu ve Transwell analizleriyle gösterildiği gibi pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu etkili bir şekilde bastırdığı bildirilmiştir. Akım sitometrisi sonuçları ile hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. SsnB ayrıca Bax ve Nükleer faktör kappa B (NF- κ B p65) fosforilasyon seviyelerini artırdığı, ancak Matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) ve Apoptoz düzenleyici protein (Bcl-2) seviyelerini ve I κ B α ekspresyonunu azalttığı; ancak toplam NF- κ B p65 seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2021). SsnB, NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe edebildiği, apoptozunu indükleyebildiği ve pankreas kanseri tedavisi için potansiyel yeni bir ilaç olabileceği bildirilmiştir (Lyu ve ark., 2022).

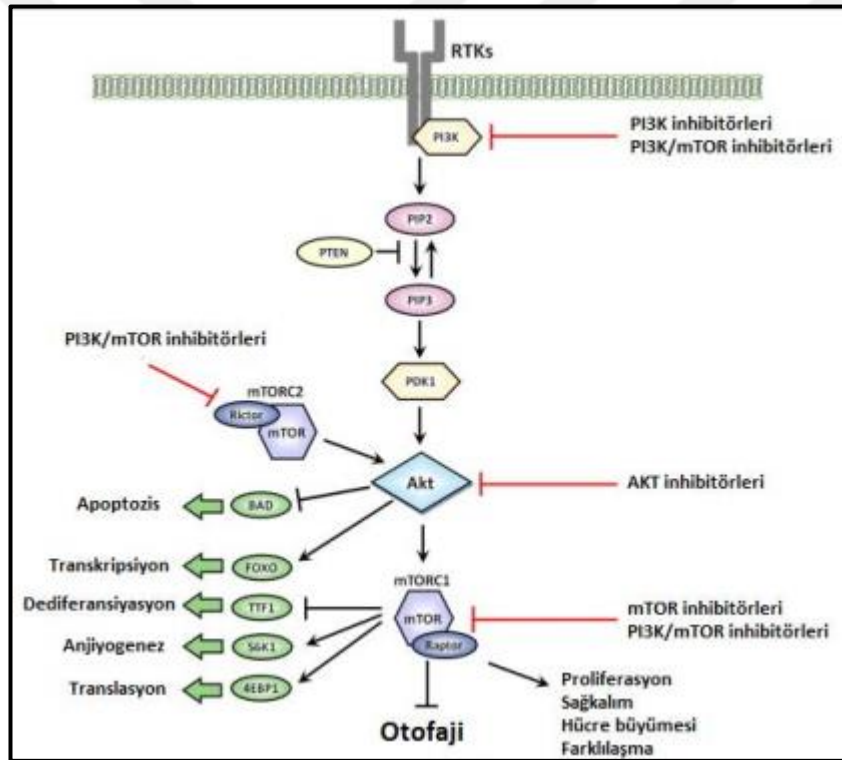
Literatür araştırmasında SsnB'nin meme ve over kanseri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmemiş olduğu gözlenmiş olup bizi bu yönde araştırma yapmaya yönlendirmiştir.

2.9. Sinyal Yolakları

2.9.1. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, canlı organizmanın büyüme evresinde insülin sinyalini düzenleyen, glukoz homeostazisini sağlayan, protein sentezi, hücre döngüsünün kontrol edilmesi, hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, anjiyogenez dâhil olmak üzere birçok fizyolojik süreci kontrol eden önemli bir hücre içi sinyal iletim yoludur (Şekil 2.6) (Zhou ve ark., 2011; Lien ve ark., 2016). Sinyal yolağı üyelerinden PI3K, AKT ve mTOR gibi aşağı yönlü molekülleri aktifleştirmek amacıyla RTK'lar gelen sinyalleri alırlar. IGF gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle aktifleşen RTK monomerleri dimerleşerek her bir monomer otofosforilasyon yoluyla PI3K/AKT/mTOR yolağının aşağı yönlü uyarılmasına neden olur (Sun E. J. ve ark., 2021). Hücre membran yerleşimli RTK ve G-protein reseptörlerine insulin ve

sitokinler bağlanarak, sitoplazmada inaktif olan PI3K'yı aktive ederek sinyal iletimini başlatır (Sun K. ve ark., 2020). Başlayan sinyal iletimi ile fosfotirozin PI3K'nın alt ünitesi olan p85'te konformasyonel değişikliğe yol açarak PI3K'yı serbestleştirir ve hücre membranına doğru yerleştirir. Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) aracı molekül PI3K'lar aracılığı ile uyarılır ve fosforilasyon yoluyla fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat (PIP3) oluşumu katalize edilir. PIP3 aracılığıyla bir serin/treonin kinaz olan AKT hücre zarına taşınır. AKT aktivasyonu sonucunda, hücresel fonksiyonların ilerlemesi için glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), forkhead box 0 (FOXO) transkripsiyon faktörleri ve pro-apoptotik belirteç (BAD) gibi sinyal proteinleri fosforile olur. AKT, tümör skleroz kompleksi (TSC) aracılığı ile hücre büyümesi ve metabolizmasının ana düzenleyicisi olan mTOR'u fosforiller (Porta ve ark., 2014).



Şekil 2.6. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına genel bakış.(Porta ve ark., 2014)'dan modifiye edilmiştir.

PI3K'lar kendi içinde çeşitli işlev, yapı ve substrat özelliklerine sahip olan unitleri IA, IB, II ve III olmak üzere dört sınıfa ayrılır (Bhatt ve Damania, 2012). Ökaryotik hücre zarlarının iç tarafında bulunan lipid kinaz ailesi olan PI3K'lar, fosfoinositidin inositol halkasının 3'-OH grubunu fosforilasyon yeteneği ile ayırt eder (Tewari ve ark., 2022).

Membranın hücre içi sinyal komplekslerini oluşturmaya yardımcı olan fosfoinositidler, hücre içi trafikte aktif rol alırlar. PIP2'nin PIP3'e fosforilasyonu, sınıf IA ve IB PI3K tarafından katalize edilir. Ayrıca PIP3 hücre şeklini kontrol etmede görevli ikincil haberci olarak çalışır. Bu, hücrenin hayatta kalmasını, büyümesini, çoğalmasını ve hareket etmesini kontrol eder (Engelman ve ark., 2006; Bhatt ve Damania, 2012).

PI3K'ların sınıf I alt grubu, bir katalitik ve bir düzenleyici alt birim içeren heterodimerik proteinlere sahiptir. Düzenleyici alt birimler p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ ve p50 α iken katalitik alt birimler p110 α , p110 β , p110 δ ve p110 γ 'dir. Birçok memeli dokusunda p110 α , p110 β ve p110 δ katalitik alt birimleri yaygın olarak eksprese edilirken, p110 γ sadece lenfositlerle eksprese edilir (Mishra ve ark., 2021).

Serin/treonin kinaz sınıfında tanımlanan AKT, PI3K'nın temel aşağı yönlü sinyal ileti efektörlerinden biridir. PI3K aktive olduktan sonra AKT, hücre içi membranına doğru transloke olur. Ardından Fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz (PDK1), AKT'yi iki önemli bölgesinden (T308 ve S473) fosforile etmeye başlar (Martini ve ark., 2014). PI3K hücre dışı uyaranlarla aktive edildiğinde, AKT hemen hemen tüm hücre ve dokularda aktive edilir. Aktive olan AKT, mTOR'u Ser 2448 bölgesi üzerinden fosforilleyerek doğrudan mTORC1'i aktive edebilirken, TSC2'yi fosforile ederek dolaylı olarak da aktive edebilir. AKT ayrıca çok sayıda önemli substratın fosforilasyonunu sağlar ve bu da çeşitli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (Li H. ve ark., 2014) (Manning ve Toker, 2017).

AKT, mTORC1 adlı önemli bir protein kompleksini modüle eder. Besin ve büyüme faktörü sinyallerinin birleşimi mTORC1'i aktive eder. AKT TSC2'yi fosforilleyerek inaktive eder. Bu, Ras homolog zenginleştirilmiş beyin proteini (RHEB) ile guanosin trifosfat (GTP) ile etkileşerek aktive olur ve mTORC1'i uyarır. mTORC1, S6K ve Eukaryotic translation initiation factor 4E (E1F4E) ile aracılığıyla hücre büyümesini ve protein sentezini de uyarır. mTORC1 tarafından aktive edilen S6K proteinini PI3K/AKT sinyal yolu üzerinde negatif bir etki gösterir (Zoncu ve ark., 2011; Laplante ve Sabatini, 2012).

2.9.2. Apoptoz

Apoptoz, canlı organizmanın embriyogenezi ile başlar, yetişkin doku homeostazının evrelerinde ve tümör baskılayıcı mekanizmalarda önemli rol oynar. Apoptozun kontrol mekanizması sıkı bir şekilde düzenlenmiş programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018). Hücrenin apoptozu yönetim şekli fizyolojik ya da patojenlere bağlı farklı uyaranlar ve koşullar aracılığı ile gerçekleşir. İntrinsik ya da ekstrinsik bir yol ile bu süreç başlatılır (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

2.9.2.1 Apoptozda İntrinsik Yol

Hücre apoptozunda intrinsik yol, mitokondri aracılı yol olarak da tanımlanmakta olup, hücre büyüme faktörlerinin azalması, besin yetersizliği, DNA hasarı ve endoplazmik retikulum stresi gibi koşullar sonucunda tetiklenir. Bu süreç, mitokondrinin dış membran permeabilizasyonu (MOMP)'nin değişmesiyle hücre ölümüne yol açar. Omurgalılarda intrinsik apoptoz yolu, Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmekte ve kontrol edilmektedir (Kaczanowski, 2016; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

2.9.2.2. Apoptozda Ekstrinsik Yol

Hücrede apoptozun ekstrinsik yolları, transmembran yapılı reseptörler aracılığıyla başlatılmaktadır. Bu süreç, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesine ait reseptörlerin aktivasyonu ile gerçekleşir. TNF reseptör ailesinin üyeleri, hücre içinde yaklaşık 80 amino asitten oluşan ve "ölüm alanı" (death domain) olarak adlandırılan bir bölgeye sahiptir. Bu yapı, hücre yüzeyinde algılanan ölüm sinyalinin hücre içine iletilmesinde kritik bir rol oynar.

Şimdiye kadar en iyi tanımlanmış ölüm ligandları ve bunlara karşılık gelen reseptörler arasında FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 bulunmaktadır (Elmore, 2007). Bu ligand-reseptör etkileşimleri, hücre içinde kaspaz enzimlerinin aktivasyonuna yol açarak programlı hücre ölümünü tetiklemektedir. Bu yolak, immün yanıtın düzenlenmesi, gelişim sürecinde gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılması ve kanser gibi hastalıkların kontrol altına alınması açısından büyük önem taşımaktadır.

2.10. Sfingolipidler ve Kanser İlişkisi

Sfingolipid, temel yapısı alifatik amino alkol olan hücresel membranların primer yapısal bileşenidir. Sfingolipidler, hücre membranının çift tabakalı olan lipid yapısının bir parçasıdır ve membrandaki lipidlerin görevlerinden olan membranın akışkanlığını düzenleme görevleri vardır (Ogretmen, 2018).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle seramid (CER), sfingozin, sfingozin 1 fosfat (S1P) ve seramid 1-fosfat (C1P) gibi birçok sfingolipidin biyoaktif moleküller olduğunu ve çeşitli hücresel işlevlerde önemli roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu moleküllerin başlıca görevleri; hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminde taşıyıcı olarak görev almak, inflamasyon, anjiyogenez, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patolojik süreçlerde rol oynamaktadır. (Holland ve Summers, 2008).

Bu lipid grubu, kanserin patogeneğinde ve tedavisinde önemli rol oynayan, apoptozu tetikleyen ve kanser hücrelerinin proliferasyon süreçlerinde etkili olan biyoefektör moleküller olarak tanımlanmaktadır. Sfingolipidlerin metabolitleri arasında yer alan sfingozin, S1P ve CER, hücre büyümesi ile hücre ölümü arasında dengeyi düzenler. Seramidler hücresel stres, apoptotik sinyallerin indüklenmesi ve DNA hasarı gibi durumlar sonucunda hücrede birikir. CER, seramidazlar (CER'azlar) aracılığı ile üretilir. ve hücre proliferasyonunu baskılayarak apoptozu teşvik eder. Sfingozin kinaz, enzimi ise S1P üretiminden sorumludur. S1P, hücrelerin hayatta kalması, büyümesi ve apoptozun engellenmesi gibi süreçlerde etkilidir (Hannun, 1996).

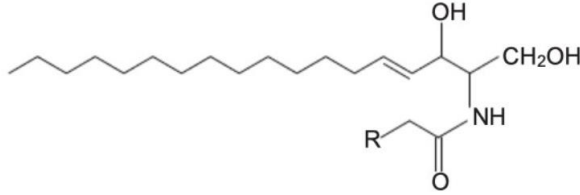
2.10.1. Seramid (CER)

Seramidler, hücre sinyalleşmesi, apoptoz ve hücre zarının yapısal bütünlüğünün korunması gibi çeşitli hücresel işlemlerde hayati rol oynar (Şekil 2.7). CER'lerin temel yapısı üç ana bileşenden oluşur:

1) Sfingoid Temel yapısı: CER molekülünün çekirdeği uzun zincirli bir amino alkol olan sfingoid bazdır. Sfingozin, uzun bir hidrokarbon zinciri ve dört trans çift bağa sahip en yaygın sfingoid bazdır. CER'lerin omurgası, dihidrosfingozin ve fitosfingozin gibi diğer sfingoid bazlardan oluşabilir.

2) Yağ Asidi Zinciri: CER'ler, sfingoid bazın amino grup kısmından bir amid bağı aracılığı ile bağlanan bir yağ asidi zincirine sahiptir. CER türlerine göre yağ asidi zincirinin uzunluğu ve doygunluğu değişebilir.

3) **Polar Baş Grubu:** Genellikle yağ asidi zincirinin karşısındaki sfingoid bazının uç kısmında konumlanarak, farklı CER türlerine özgüllük kazandırır. Polar baş grubu, SM'lerdeki fosfokolin veya glikosfingolipidlerdeki şeker kalıntıları gibi çeşitli fonksiyonel grupların eklenmesiyle modifiye edilebilir (Pyne ve Pyne, 2010; Hla ve Dannenberg, 2012).



Şekil 2.7: Seramid 'in kimyasal yapısı (Murakami ve ark., 2011)

CER, asıl kısmı yağ asidinden ziyade sfingoid baz kısmında denatürasyona ve hidroksilasyona maruz kalarak yapısal görevi değişen yapılardır (Hannun ve Obeid, 2011). CER'ler doğada bulunan en hidrofobik yapıda lipidlerdir bu sebeb sitozolde ve çözelti içinde hiçbir CER'e rastlanılmaz.(Hannun ve ark., 2001).

Son çalışmalar, farklı uzunluktaki yağ asidi zincirine sahip CER'lerin kanser patogeneğinde farklı işlevleri olabileceği gösterilmiştir. Mesela C16-CER (CerS6 tarafından sentezlenir) kanser hücresi proliferasyonunda rol oynadığı, C18-CERin (CerS1 tarafından sentezlenir) ise hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir. Agresif tümörlerde total CER (özellikle C16-, C24:1- ve C24:0-CERler) seviyelerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Alizadeh ve ark., 2023).

2.10.2. Sfingomyelin (SM)

Sfingomiyelinler (SM) seramid (CER) molekülüne bir fosfatidilkolin grubunun eklenmesiyle oluşan sfingolipid türüdür. CER'ler ve SM'ler arasında çeşitli yağ asidi eklenmesi ile yeni yapıların oluşumu devam etmektedir. Vücutta SM düzeylerinin değişmesi çeşitli fizyolojik ve patolojik etkilere neden olmaktadır. SM'ler hücre proliferasyonu ve hücre sinyalizasyonu gibi önemli görevlerde yer almaktadırlar.

Hücre yüzeyindeki biyokimyasal değişiklikler, özellikle fosfolipit tabakasındaki SM içeriğindeki aşırı artış, kanser başlangıcında, büyümesinde ve immün sistemi baskılamada önemlidir. Sfingomiyelin (SM) sentezi ve hidrolizinin, karsinogenezisin başlamasında ve metastaz evresinde artış göstermesi bu süreçlerde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. SM düzeyinin aşırı artışı hücre-hücre temasına bağlı çoğalma inhibisyonunu baskıladığı, hücre içi sinyal iletimini bozduğu ve bağışıklık hücrelerinin duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir (Tallima ve ark., 2021).

2.10.3. Sfingozin

Sfingozinler, sfingozin kinazlar (SphK) için bir substrat olup sfingozin-1-fosfat (S1P) molekülünün öncüsüdür. S1P, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak sinyal iletiminde bir ligand görevi görür. Ancak etkileri yalnızca hücre yüzeyiyle sınırlı kalmayıp, hücre içinde de çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyebilirler. Hücre büyümesini ve sağkalımını destekleyen etkileri sayesinde, genellikle seramidin etkilerine zıt yönde işlev görür. Ayrıca, hücre içi sinyal iletimi, anjiyogenez ve bağışıklık sistemi savunmasında fonksiyonel bir rol oynar. (Gomez-Muñoz ve ark., 2013).

2.10.4. Sfingozin 1-fosfat (S1P)

Sfingozin 1-fosfat, sfingolipidlerin fosforile metaboliti olup önemli biyoaktif molekülüdür. S1P, SphK1 ve SphK2 katalizi ile meydana gelir. Bu iki enzim de sfingozini fosfatlayarak S1P üretimi sağlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu iki enzimin hücre sağkalımı ve sfingolipit metabolizması üzerindeki etkilerinin daha farklı şekilde olduğunu göstermiştir (Pyne ve Pyne, 2010). S1P ilk olarak pro-mitojenik ve anti-apoptotik olarak tanımlanmıştır ve daha yakın zamanda inflamatuvar süreçlerle ilişkilendirilmiştir. İnflamasyonda önemli rol oynayan spesifik G-protein bağlantılı reseptör ailesinin S1P'ye yüksek afinitesi olduğu keşfedildi. S1P hücre göçü, farklılaşma veya tümör oluşumunda rol oynar ayrıca anjiyogenezin temel düzenleyicisidir (Gomez-Muñoz ve ark., 2013).

2.10.5. Seramid 1-fosfat (C1P)

Memeli hücrelerinde, CER'ler üzerinden seramid-1-fosfatın (C1P) CER kinaz (CerK) aracılığıyla üretildiği iyi bilinmektedir. Bu enzim ilk olarak Bajjalieh ve çalışma arkadaşları tarafından beyin dokusunda tespit edilmiş (Bajjalieh ve ark., 1989), ardından Kolesnick ve Hemmer tarafından insan lösemi HL-60 hücrelerinde gözlemlenmiştir (Bajjalieh ve ark., 1989). Bununla birlikte, memeli dokularında C1P biyosentezi için şu ana kadar tanımlanmış tek enzim CerK olmasına rağmen, alternatif biyosentetik yolların da var olabileceği düşünülmektedir.

Klasik olarak, C1P, fibroblastlar, makrofajlar ve myeloblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde hücre proliferasyonunu teşvik eden ve apoptozu inhibe eden mitojenik ve pro-sağkalım ajanı olarak tanımlanmıştır. Bu bağlamda, yakın zamanda CerK'nin insan nöroblastoma hücrelerinin çoğalması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Spesifik gen susturma siRNA veya farmakolojik inhibitörler ile CerK'nin aşağı düzenlenmesi, nöroblastoma hücre proliferasyonunu belirgin şekilde azaltmıştır. Ayrıca, CerK'nin A549 akciğer adenokarsinom hücrelerinde mitogenezi uyardığı ve apoptozu inhibe ettiği belirlenmiş, böylece C1P'nin hücre büyümesi ve ölümünü kontrol etmedeki kritik rolü doğrulanmıştır (Gomez-Muñoz ve ark., 2013).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda MCF-7 ve BJ hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virginia, USA) firması tarafından sağlanmıştır. OVCAR-3 hücre hattı I-Cell (Fengxian ' Dist, Shanghai, China) firmasından temin edilmiştir. MCF-7 ve BJ hücrelerini çoğaltmak için ATCC tarafından formülize edilen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Ham's Nutrient Mixture (F-12), 1:1 (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) ve OVCAR-3 hücreleri için RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. 500 ml'lik sıvı ham besiyeri içerisine son konsantrasyonları %10 (v/v) olacak şekilde fetal bovin serum (FBS; Gibco, Life Technologies Corporation, Paisley, UK), %1 olacak şekilde penisilin-streptomisin (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) ve 100 µl Amfoterisin-B (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) eklenerek karışım hazır hale getirildi. Hazırlanan bu karışım 0.22 µm bottle-top ile filtre edilerek, steril hale getirildi ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Başlangıcı

Hücreleri çoğaltmak için 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren steril inkübatörler tercih edildi. Hücrelerin çoğalmaları %70-90 dolgunluğa ulaşma süresi 2-4 gün aralığında gerçekleşti. Hücre çözündürme işlemine başlamadan su banyosu 37°C önce ısıtıldı. Sıvı azot içerisinde dondurmada kullanılan viyaller içinde 37°C su banyosunda hafif şekilde sallanarak çözülmesi sağlandı. Hücre viyali %70 alkol ile dış yüzeyi silinerek hava akışlı laminar flow kabine alındı. Bu aşamadan sonra yapılan bütün işlemler aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. Falkon tüplere önceden ısıtılmış besiyeri 9 ml eklendi üzerine 1 ml hücre kültür ortamı aktarıldı. Hücreler 1000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında besiyeri ile resüspansiyon yapılarak 25 cm² flasklara aktarıldı. Hücre varlığı ışık mikroskopunda kontrol edilip hücreler inkübatöre kaldırıldı.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajlama işlemi öncesi gerekli miktarda kullanılacak besiyeri, tripsin-EDTA ve steril fosfat tampon salin (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 37°C su banyosuna koyularak aktive olacak uygun sıcaklığa getirildi. Pasajlanacak hücrelerin

morfolojisine ve yoğunluğuna mikroskop altında bakıldı. Ardından hücrenin büyütüldüğü flask %70 alkol ile silinerek laminar flow kabin içine alındı. Bu aşamadan sonraki bütün adımlar sıkı aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücreleri %70-90 yoğunluğa ulaştıkları zaman %0,05 tripsin-EDTA çözeltisi (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) ile hücre ayrıştırılması yapıldı. Tripsin-EDTA'nın etkisini en iyi şekilde gösterebilmesi için 5-10 ml steril PBS flaskın köşesinden yavaşça eklendi ve PBS flask içinde birkaç dakika kadar bekletilerek atıkların temizlenmesi sağlandı. Flask yüzeyine tutunmuş hücreleri kaldırmak için 25 cm² flask yaklaşık 3 ml olacak şekilde, 75 cm² için yaklaşık 9 ml olacak şekilde tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenen flask yaklaşık 5-7 dakika kadar inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrıldığına emin olduktan sonra tripsin-EDTA miktarının iki katı olacak şekilde besiyeri flaska ilave edilerek tripsin-EDTA'nın inaktivasyonu gerçekleştirildi. Steril pipet yardımı ile birkaç kez pipetleme yapılarak flaskın tamamı hücreden arındırıldı. Hücrelerin bir araya gelerek oluşturduğu kümelenmelerin ayrılması sağlandı ve flask içeriğinin tamamı alınarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti 10 ml önceden ısıtılan besiyeri ile re-süspanse edildi. Pasajlama işlemi tamamlandığında flasklar 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren steril CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarımızda kullanmak amacıyla hücrelerin bir kısmı kademeli şekilde dondurularak sıvı azot tankına konuldu. Dondurma işlemi için %80-90 yoğunluğa ulaşmış MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücreleri protokole uygun adımlar ile donduruldu. İlk olarak PBS ile flask yüzeyi atıkların uzaklaştırılması işlemine maruz bırakıldı. Ardından tripsin-EDTA ile hücreler yüzeyden kaldırıldı. Besiyeri ile tripsinin inaktivasyonu sağlandı ve hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak 1000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO; Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA) içeren besiyeri ile re-süspanse edildi. Re-süspanse edilen hücreler, her kriyo viyal de 1 ml olacak şekilde viyallere aktarıldı ve kademeli dondurma işleminin gerçekleştirilebilmesi için kriyo viyaller izopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) içeren dondurma kabına (freezing-container) konuldu.

Ardından -80°C’de bir gece boyunca bekletildi. Son olarak da kriyo viyaldeki hücreler sıvı azot tankına transfer edildi.

3.2. Hücre Tedavi Protokolleri ve Canlılık Analizi

3.2.1.Estrojen (ES) Uygulaması

Hücre proliferasyonu estrojen hemihidrat (ES) kullanılarak uyarıldı (ESTROFEM, MW: 562,8 g/mol, Novo Nordisk İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye). 2 mg tabletin 1 ml DMSO’da çözülmesiyle 3,6 mM’lik bir östrojen hemihidrat ana stok konsantrasyonu hazırlandı. Bu stok, 1 mM’lik bir ara stok çözelti oluşturmak için hücre kültürü ortamıyla daha fazla seyreltilti. MTT deneyinde test edilen son östrojen konsantrasyonları 1, 10 ve 100 nM (Koyunoğlu ve ark., 2013) olarak belirlendi. MTT deney sonuçları, MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücreleri için östrojen proliferasyonu takibi için 16, 24 ve 48. saatlerdeki optimum doz ve süreyi tanımlamaya yardımcı oldu.

3.2.2. Sparstolonin B(SsnB) Uygulaması

Literatürde MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücrelerinde SsnB toksisitesi üzerine etkinliğini inceleyen bir çalışma yoktur. SsnB ($\geq 99,0$ saflıkta ve 268,32 g/mol moleküler ağırlıkta) Sigma-Aldrich’ten (St. Louis, MO, ABD) satın alındı. 10 mM stok solüsyonu hazırlamak için 5 mg SsnB, 1864 μ L DMSO’da çözüldü. Bu stok daha sonra hücre kültürü ortamıyla seyreltilerek 1 mM ara stok solüsyon oluşturuldu. MTT deneyinde kullanılan SsnB’nin son konsantrasyonları 3,125 ile 50 μ M arasında değişti. MTT deneyinden elde edilen sonuçlar, MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücrelerine 16, 24 ve 48. saatlerde uygulandı.

3.2.3. Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığının analizi için yaygın olarak kullanılan MTT (Gold Biotechnology Inc., St. Louis, MO, USA) analizi yapıldı. MTT, çözünmeyen yapıdaki bir formazana indirgendiği zaman mor renk oluşturan sarı renkli kromojendir. Bu indirgenme fazı hücrelerde bulunan mitokondriyal NADH veya NADPH’a bağlı oksidoredüktaz enzimleri aracılığı ile gerçekleştirilir. Oksidoredüktaz enzimlerinin seviyesi, hücresel metabolik aktiviteyi gösterir. Hücrelerde formazanın çözünmesi ile absorbans ölçümü gerçekleştirilir. Absorbans değerleri hücresel metabolik aktivitenin belirlenmesi için kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlenir. Çalışmamızda 5 mg MTT tozu 1 ml PBS içinde çözüldü. Ardından hücre kültüründe kullanılmak amacıyla 0.22 μ m çapındaki

filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanmış olan bu çözelti -20°C buzdolabında 6 ay süre ile muhafaza edilebildi. MTT analizine başlamadan önce çalışmamızda kullanılan tüm hücreler bulunduğu flask içerisinde %70-90 yoğunluğa ulaştığı zaman hücre medyumunu ortamdan uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldı. Hücreleri flasktan uzaklaştırma işlemi için tripsinizasyona maruz bırakarak hücre içeriği 15 mL'lik santrifüj tüpe aktarıldı. 1000 x g'de 5 dakika santrifügasyon sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin sayımı yapıldı. MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücreleri, 100 µL ortam başına 5×10^3 hücre yoğunluğunda steril 96 kuyulu plakalara ekildi. Hücreler, dozlanmaya başlamadan önce hücre kültürü ortamıyla bir gece boyunca kültüre edildi.

İnkübasyon süresi sonunda her kuyucuğa 200 µl belirlenen konsantrasyonlarda 1 µL/mL DMSO, 1–10–100 nM ES veya 3,125–50 µM SsnB doz uygulamaları yapıldı ve 16-24-48 saat inkübasyon süreleri bittikten sonra karanlık ortamda MTT protokolü gerçekleştirildi. Grup başına 12 tekrar olacak şekilde çalışıldı. İnkübasyon medyumunu yavaşça aspire edildi ve her kuyucuğa daha öncesinde medyum ile hazırlanmış olan %10 (v/v) MTT çözeltisinden 100 µl eklendi. MTT çözeltisi eklenen 96 kuyucuklu plaka dışından ışık geçirmeyecek şekilde kaplanarak 2 saat boyunca 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletildi. İnkübasyon bitiminde kuyucukların dibinde mor renkli formazan kristallerinin oluştuğu görüldü. Yavaş ve hassas şekilde kuyucuklardaki sıvı aspire edildi ve ardından her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Formazan kristallerinin en iyi şekilde çözünmesi için 96 kuyucuklu plaka 5 dakika boyunca yatay çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu aşamadan sonra mikropilaka okuyucuda (MicroQuant Plate Reader, Bio-Tek Instruments Inc. Vermont, USA) 570 ve 690 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. 690 nm'deki absorbans değerleri 570 nm'deki absorbans değerlerinden çıkarıldı. Tüm gruptaki formazan kristalinin oluşma miktarları, kontrol grubuna kıyasla % canlılık olarak belirlendi. Kontrol grubundan gelen absorbans %100 hücre canlılığı olarak kabul edildi ve hücre canlılığı (%) şu formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = (\text{Abs örnek}/\text{Abs Kontrol}) * 100$$

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda MTT analiz sonuçlarına dayanarak beş farklı deney grubu oluşturuldu. (1) Kontrol (sadece ortam); (2) DMSO (24 saat boyunca 1 µL/mL DMSO ile inkübe edilen hücreler); (3) ES (48 saat boyunca 10 nM ES ile muamele edilen hücreler); (4) SsnB (24 saat boyunca 25 µM SsnB ile inkübe edilen hücreler); ve (5) ES + SsnB (10 nM ES muamelesi ile 24 saat inkübasyon sonrası 25 µM SsnB başladı ve 24 saat boyunca devam etti).

3.4. İmmü floresan Boyama

Bu çalışmada sinyal ileti yolundaki proteinlerden PI3K, p-AKT ve p-mTOR immün reaktivitesi ve PCNA protein düzeyi immü floresan mikroskopi yöntemi ile belirlendi. Bu deney için MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücreleri flasklar da çoğaltılarak hücreler %70-90 yoğunluğa ulaşınca tripsinizasyon işlemine maruz bırakılarak hücreler kaldırıldı ve hücre sayımı yapılarak her kuyucuğa yaklaşık 10.000 hücre olacak şekilde 8 kuyucuklu chamber-slide'a (Merck Millipore, Cork, Ireland) ekim yapıldı. Ekim gerçekleşikten sonra chamber slide hücrelerin adezyonu ve hücre morfoloji alması için gece boyunca 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletildi. %70-80 yoğunluğa ulaşmış olan hücreler deney gruplarına göre gerekli doz uygulamaları yapıldı. Sonrasında chamber slide içerisinde bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak, kuyucuklar 0,01 M soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler taze hazırlanan %4 konsantrasyondaki paraformaldehit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile 8-10 dakika fiksasyon işlemine maruz bırakıldı. Fiksasyon aşaması yapıldıktan sonra üç kez soğuk PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından hücreler PBS içerikli %0,2 konsantrasyonlu Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile 10 dakika permeabilize edildi. Permeabilizasyon aşama sonrası 5 kez soğuk PBS ile yıkama yapıldı. PBS içerisinde hazırlanmış %5 normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ile 30 dakika inkübe edilerek bloklama yapıldı. Daha sonra herhangi bir yıkama yapılmadan kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde rabbit poliklonal kökenli anti-PI3K (1:200, BT-AP07136, BT Bioassay Technology Laboratorie), rabbit poliklonal anti-p-AKT (1:200, #649001, BioLegend Enabling Legendary Discovery), rabbit poliklonal anti-p-mTOR (1:200, AFFBIO/AF3308 Affinity Biosciences), ve anti-PCNA (1.200, #bs-0754R, Bioss Woburn, MA, USA) primer antikorları eklenerek 4°C'de ve karanlık ortamda bir gece boyunca inkübe edildi. Deneylerin 2. Günü slidelar oda sıcaklığında 5 kez PBS ile yıkandı. Ardından

karanlık ortamda her kuyucuğa 200 µl Alexa Fluor-488 konjuge goat anti-rabbit (1:300, # A11008 life Technologies, USA) sekonder antikoru eklendi ve 45 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra hücre çekirdeğini görünür hale getirmek için DAPI boyaması (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) yapıldı. Slidelar kapatılarak floresan mikroskobunda görüntülendi.

Chamber slidelerin görüntülenmesi floresan mikroskopta (Olympus IX81, inverted fluoresans mikroskop Tokyo, Japan) uygun olan filtreler kullanılarak yapıldı. Yapılan görüntülemelere göre floresans yoğunluğu NIH ImageJ 1.53e yazılımı aracılığı ile analiz edildi. Her grup için hücrelerin floresans ışıma yapan bölgeleri baz alındı ve integrated yoğunluk program ile belirlendi. Hücrelerin doğrulanmış total floresans (CTCF) miktarlarını hesaplayabilmek için “CTCF= Integrated Yoğunluk – (Seçilen hücrenin alanı x Background okumaları ortalaması)” formülü kullanıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi istatistiksel olarak gerçekleştirildi.

3.5. ELİSA Yöntemi ile Protein Ölçümü

PCNA seviyelerini ölçmek için, non-kompetitif olmayan sandviç ELISA kiti (Kat. #ELK5141, ELK Biotechnology, Denver, CO, ABD) kullanıldı. MCF-7 ve OVCAR-3 hücreleri için tedavi uygulamalarını takiben, 10^7 hücre/mL PBS'de süspanse edildi ve ultrasonikasyon işlemine tabi tutuldu. Hücre lizatları 2–8°C'de 10 dakika boyunca 1500 g'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı örneklerinde PCNA seviyeleri, kitin talimatlarına uygun olarak değerlendirildi. Standart bir eğri kullanılarak, örneklerdeki PCNA yoğunluğu 450 nm'de belirlendi ve ng/mg protein olarak ifade edildi.

PI3K, fosfo-AKT (ser473) ve fosfo-mTOR düzeyleri sandviç ELISA kitleri (sırasıyla kat. #E0896Hu, kat. #E4531Hu, kat. #E4485Hu. BT Lab, Bioassay Teknoloji Laboratuvarı; Şanghay, Çin) ile değerlendirildi. MCF-7 ve OVCAR-3 hücreleri çalışma gruplarına göre muamele edildi ve toplanan hücreler (10^7 hücre/mL) PBS'de süspanse edildi, ardından 2–8°C'de 10 dakika boyunca 1500 g'de ultrasonikasyon ve santrifüjlemeye tabi tutuldu. Kuyucuklar PI3K, fosfo-AKT ve fosfo-mTOR antikoruyla önceden kaplanmıştı. PI3K kaplanmış kuyucuklara örnek eklenir ve ilgili antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş İnsan PI3K, p-AKT ve p-mTOR antikoru eklenir ve örnekteki ilgili proteine bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP ilave edilir. Biyotin aracılığı ile PI3K, p-AKT, p-mTOR antikoruna bağlanır.

İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, bir yıkama adımı sırasında yıkanır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve PI3K, p-AKT, p-mTOR miktarına bağlı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisi eklenerek sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçülür. Örneklerdeki PI3K, fosfo-AKT (ser473) ve fosfo-mTOR miktarı standart bir eğri kullanılarak 450 nm'de belirlendi ve ng/mg protein olarak bildirildi.

3.6. Protein Ölçümleri

Protein ölçümleri MCF-7 ve OVCAR-3 hücre lizatları kullanılarak protein konsantrasyonları 595 nm'de modifiye Bradford yöntemiyle ölçüldü. Yöntemde standart olarak bovin serum albümin (BSA) ile Coomassie Plus reaktifi içeren ticari kit kullanıldı (Thermo Fisher Scientific Cat. #23238, Thermo Fisher, Waltham, MA USA). Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonu BSA standart grafiği yardımıyla hesaplandı.

3.7. TUNEL Apoptotik Hücre Tayini

Apoptotik hücreler One-Step TUNEL Test Kiti (Elabscience, Cat#E-CK-A320, Houston, Teksas, ABD) kullanılarak belirlendi. Terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) tarafından yapılan katalitik bir işlem, hasarlı DNA'nın açığa çıkan 3'-OH uçlarına floresan etiketli dUTP ekleyebilir. Her reaktif ve örnek, test kitinde bulunan talimatlara göre hazırlandı. Kuyu başına yaklaşık 100.000 hücre (MCF-7 veya OVCAR-3), 8 kuyulu hazne slaytlarına (Merck Millipore, Cork, İrlanda) yerleştirildi. Hücreler %70-80 proliferasyona ulaştıktan sonra, kültür ortamı kullanılan doz ortamı ile değiştirildi ve inkübasyon süreci sonunda apoptotik hücre tayini için deney başlatıldı. İnkübasyon süresinin ardından, ortam uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve paraformaldehit fiksasyon aşaması için oda sıcaklığında 20 dakika boyunca bekletildi. Pozitif kontrol grubunda DNA'yı koparmak ve 3'-OH uçlarını açığa çıkarmak için DNase I kullanıldı. 100 µL DNase I solüsyonu (200 U/mL) uygulandıktan sonra hücreler 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Slaytları yıkamak için PBS kullanıldı (üç kez, her biri beş dakika). Negatif kontrol olarak kullanılan hücreler oda sıcaklığında DNase I tamponunda beş dakika inkübe edildi ve ardından PBS'de her biri beş dakika olmak üzere üç kez yıkandı. Penetrasyon adımının tamamlanmasının ardından 100 µL TdT Dengeleme Tamponu eklendi ve slaytlar 37°C'de 25 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda her bir slayda 50 µL

Etiketleme Çalışma Solüsyonu eklendi ve ardından 37°C'de 60 dakika nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Slaytlar, her biri beş dakika olmak üzere üç kez PBS ile yıkandı. Chamber Slide'ın üst fazını lam kısmından ayırdıktan ve bir peçeteyle sildikten sonra, DAPI slaytların üzerine damlatıldı. Lekesiz bir lamel yardımı ile hava kabarcığı olmadan kapatıldı. Chamber slidelerin görüntülenmesi floresan mikroskopta (Olympus IX81, inverted fluorasans mikroskop Tokyo, Japan) uygun olan filtreler kullanılarak yapıldı. Yapılan görüntülemelere göre floresans yoğunluğu NIH ImageJ 1.53e yazılımı aracılığı ile analiz edildi. Her grup için hücrelerin floresans ışımı yapan bölgeleri baz alındı ve integrated yoğunluk program ile belirlendi. Hücrelerin doğrulanmış total floresans (CTCF) miktarlarını hesaplayabilmek için “CTCF= Integrated Yoğunluk – (Seçilen hücrenin alanı x Background okumaları ortalaması)” formülü kullanıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi istatistiksel olarak gerçekleştirildi.

3.8. Sfingolipidler ve CER Kütle Spektrometrik Analizleri İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması

Uygun yöntemlerle toplanan ve ($4-5 \times 10^6$ hücre içerecek şekilde) pellet haline getirilen 500 µl MCF-7 ve OVCAR-3 hücre lizatları, önceki çalışmada belirtildiği şekilde (Afşar ve ark., 2020) 2 µl 5000 ng/ml IS stok çözeltisi ile muamele edildi. Ardından, lizatlara 375 µl kloroform: metanol (1:2, v/v) karışımı eklendi. Örnekler 30 saniye boyunca sonikasyona tabi tutuldu ve 100 µl distile su ilavesi sonrasında 5 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldı. Elde edilen karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, numuneler 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantlara 125 µl kloroform ve 125 µl distile su eklenerek vortekslendi ve yeniden 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından, oluşan yaklaşık 500 µl üst-organik faz yeni bir cam tüpe aktarıldı ve sabit azot akışı altında uçurma işlemi gerçekleştirildi (VLM, Bielefeld, Almanya). Uçurma sonrası kuruyan kalıntılar 100 µl metanol: formik asit (99,9:0,1) çözeltisinde çözüldü ve tamamı insert viallere aktararak LC-MS/MS analizine hazır hale getirildi.

3.9. Sfingomiyelin ve Seramid Seviyelerinin Belirlenmesi

SM ve CER miktar analizleri, daha önceki çalışmalarda belirtildiği şekilde (Özer ve ark., 2018), ultra hızlı sıvı kromatografi (UFLC) sistemine bağlı LC-MS/MS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya; LCMS-8040, Shimadzu Corporation, Japonya).

Analizlerde kullanılan N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C16 SM), N-stearoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C18 SM), N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C24 SM), N-palmitoil-D-eritro-sfingozin (C16 CER), N-stearoil-D-eritro-sfingozin (C18 CER), N-araşidoil-D-eritro-sfingozin (C20 CER), N-behenoil-D-eritro-sfingozin (C22 CER) ve N-lignoseroil-D-eritro-sfingozin (C24 CER) standartları Avanti Polar Lipids'ten (Alabaster, AL, ABD) temin edilmiştir. İç standart olarak kullanılan C16 CER d18:1/16:0 (Palmitoil-U-¹³C₁₆) ise Cambridge Isotope Laboratories'ten (Andover, MA, ABD) sağlanmıştır.

Her bir Sfingolipid standart çözeltisi metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içinde çözülmüş ve 40°C'de sonikasyon uygulanarak analiz için hazırlanmıştır. Ölçümler, ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) sistemine bağlı MS/MS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve önceki çalışmalarda optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik ayırmalar, 60°C'de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonu (XTerra C18, 2.1 mm × 50 mm, Waters, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sfingolipidler için akış hızı 0.450 ml/dk olacak şekilde belirlenmiş ve enjeksiyon hacmi 10 µl olarak ayarlanmıştır.

Mobil fazlar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- Mobil Faz A: Su/asetonitril/2-propanol (8:1:1, v/v/v) karışımı, 10 mM amonyum format ilavesiyle
- Mobil Faz B: Asetonitril/2-propanol (9:1, v/v) karışımı, 10 mM amonyum format ilavesiyle

Gradient programı şu şekilde ayarlanmıştır:

- 0-2 dakika → Solvent B: %65
- 2.01-13 dakika → Solvent B: %90

- 13.01-20 dakika → Solvent B: %100
- 20.1-23 dakika → Solvent B: %65

CER ve SM ölçümleri için 39-625 ng/ml aralığında lineer kalibrasyon optimize edilmiş ve toplam analiz süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Ölçümler, pozitif elektrosprey-iyonizasyon (ESI) modunda gerçekleştirilmiş ve her bileşiğin MRM geçişleri ile yanıtları otomatik olarak optimize edilmiştir. Tüm analiz edilen sfingolipidlerin pozitif ESI-MS mod ana ve ürün m/z değerleri aşağıdaki gibidir;

C16 SM, precursor m/z: 703.30, product m/z: 184.20
C18 SM, precursor m/z: 731.40, product m/z: 184.20
C24 SM, precursor m/z: 815.50, product m/z: 184.20
C16 CER, precursor m/z: 538.50, product m/z: 264.40
C16 CER *IS, precursor m/z: 554.30, product m/z: 264.30
C18 CER, precursor m/z: 566.30, product m/z: 264.40
C20 CER, precursor m/z: 594.60, product m/z: 264.50
C22 CER, precursor m/z: 622.60, product m/z: 264.40
C24 CER, precursor m/z: 650.40, product m/z: 264.30

3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler 8.4.3 GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapıldı. (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Elde edilen istatistiksel analiz sonuçları şekil açıklamalarında ayrıntılı olarak yazılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Analizi

4.1.1. Estrojen Proliferasyon Analizi

MCF-7, OVCAR-3 ve sağlıklı insan fibroblast BJ hücrelerinde 16, 24 ve 48 saatlik ES (1–100 nM) tedavisini takiben hücre canlılığı analizi **Şekil 4.1**'da gösterilmiştir. PI3K/AKT/mTOR yolu sağlıklı hücrelerde genel olarak daha az aktif olduğundan (Glaviano ve ark., 2023), BJ sağlıklı fibroblast hücreleri kontrol grubu olması amaçlı kullanılmıştır.

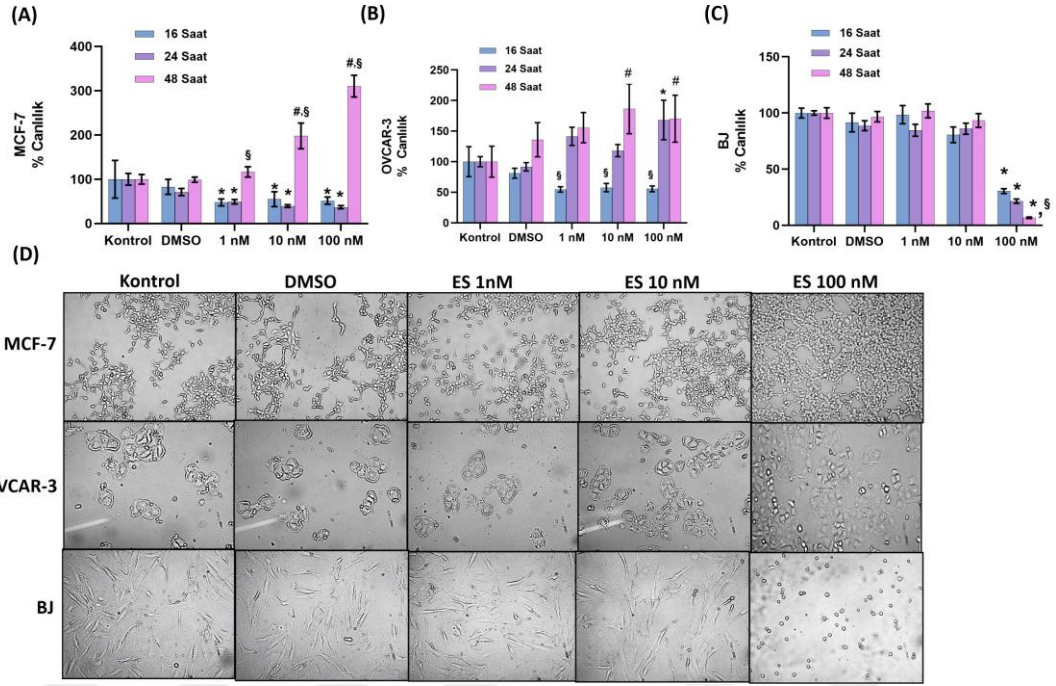
MCF-7 hücrelerindeki hücre canlılığı analizleri, uygulanan tüm ES dozlarının, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 16. ve 24. saatlerde hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. Ancak, 48 saatlik inkübasyon süresinde 10 nM ve 100 nM ES uygulamaları, diğer tüm gruplara kıyasla hücre proliferasyonunu belirgin şekilde artırmıştır. Ayrıca, 48 saat boyunca uygulanan tüm ES dozlarının, 16 ve 24 saatlik uygulamalara kıyasla hücre canlılığını anlamlı derecede yükselttiği tespit edilmiştir (**Şekil 4.1A**).

OVCAR-3 hücrelerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı analizleri, 16 saat boyunca uygulanan tüm ES dozlarının, 24 ve 48 saatlik uygulamalarla karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. Bununla birlikte, 48 saatlik inkübasyon süresinde 10 nM ve 100 nM ES uygulamalarının, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, OVCAR-3 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanan 100 nM ES tedavisinin, hücre proliferasyonunu kontrol ve DMSO gruplarına göre anlamlı düzeyde artırdığı gözlemlenmiştir (**Şekil 4.1B**).

BJ hücrelerinde ise tüm saat aralıklarında 100 nM ES uygulamasının, hücre proliferasyonunu tüm gruplara kıyasla belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Ek olarak BJ hücrelerinde 100 nM ES tedavisinin, 16 saatlik tedavi grubuna kıyasla 48 saatlik uygulama grubunda hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (**Şekil 4.1C**).

Şekil 4.1D, MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücrelerine 48 saatte uygulanan ES'nin ışık mikroskobu görüntülerini (10x büyütme) göstermektedir. Kontrol ve DMSO (1 µL/mL) gruplarında herhangi bir değişiklik gözlenmezken, 10 ve 100 nM ES ile tedavi

edilen MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir çoğalma gözlenmiştir. 48 saat boyunca 100 nM ES uygulamasının BJ hücrelerinde; morfolojide bozulmaya, büzülmeye, kümelenmeye ve toksisiteye neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1D).



Şekil 4. 1: A) MCF-7 hücrelerinde 16-48 saat aralığında MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. ES (1,10 ve 100 nM) ile DMSO (1µ/ml) uygulanan hücreler. Veriler 7-8 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve deney grupları arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, kontrol grubu ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$, tüm gruplar ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. §, $p<0.05$, aynı doz aralığında 16 ve 24 saat ile karşılaştırıldığında. **B)** OVCAR-3 hücrelerinde 16-48 saat aralığında MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. ES (1,10 ve 100 nM) ile DMSO (1µ/ml) uygulanan hücreler. Veriler 6-8 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve deney grupları arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, Kontrol ve DMSO grubu ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$, kontrol grubu ile aynı zaman dilimi karşılaştırıldığında. §, $p<0.05$, aynı doz aralığında 24 ve 48 saat ile karşılaştırıldığında. **C)** BJ hücrelerinde 16-48 saat aralığında MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. ES (1,10 ve 100 nM) ile DMSO (1µ/ml) uygulanan hücreler. Veriler 6 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve deney grupları arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, diğer gruplar ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. §, $p<0.05$, 16 saatin aynı doz aralığında karşılaştırıldığında. **D)** MCF-7, OVCAR-3 ve BJ hücrelerinde ES uygulamasının 48 saat sonra ışık mikroskop görüntüsü (100X büyüme). Kontrol ve DMSO (1µl/ml) gruplarında bir değişim gözlenmezken, 10 ve 100 nM ES uygulaması sonucunda MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir proliferasyon gözlemlendi. BJ hücrelerinde 48 saat 100 nM ES uygulamasının hücre morfolojide bozulma, küçülme, kümelenme ve toksisite oluşturduğu gözlemlendi.

4.1.2. Sparstolonin B'nin (SsnB) Anti-Proliferatif Etkisi

MCF-7, OVCAR-3 ve sağlıklı insan fibroblast BJ hücrelerinde, 16, 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (3.125–50 μ M) uygulanan SsnB'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.2'de değerlendirilmiştir.

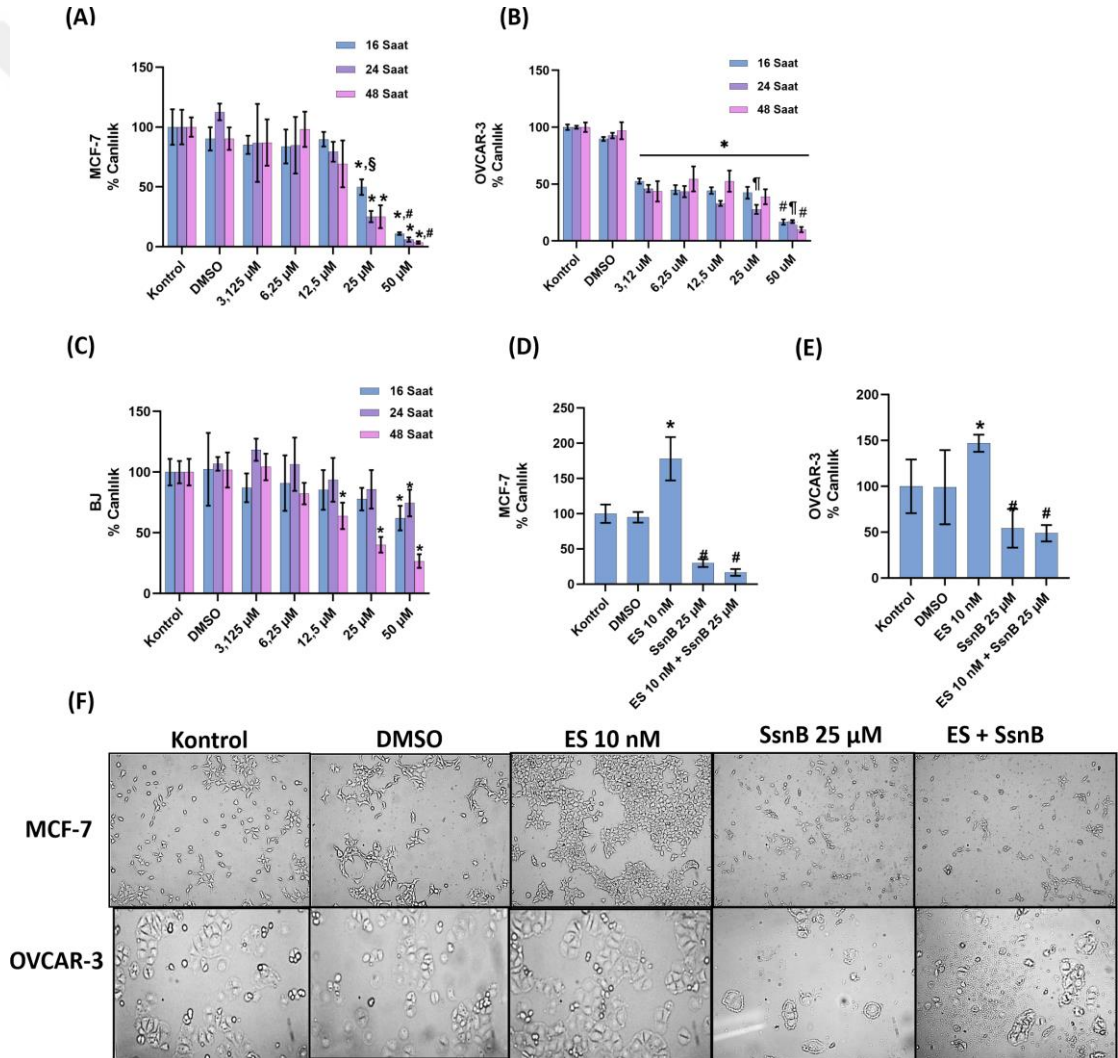
MCF-7 hücrelerine 3.125–12.5 μ M konsantrasyonlarındaki SsnB uygulamaları, tüm zaman dilimlerinde hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik oluşturmazken, 25 ve 50 μ M'lik uygulamalar, diğer tüm doz grupları ve zaman aralıklarına kıyasla hücre canlılığında belirgin bir azalmaya neden oldu. Ayrıca, 24 ve 48 saat boyunca 25 μ M SsnB uygulanması, 16 saatlik uygulamaya göre hücre canlılığını azalttı. Benzer şekilde, 16 ve 48 saat boyunca 50 μ M SsnB uygulaması, aynı zaman dilimlerindeki 25 μ M doz uygulamasına göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı gösterildi (**Şekil 4.2A**).

OVCAR-3 hücrelerine uygulanan tüm SsnB dozları, kontrol ve DMSO gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte, 16 ve 48 saat süresince uygulanan 50 μ M SsnB, aynı zaman dilimlerinde 3.125–25 μ M dozlarına kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, 24 saat boyunca uygulanan 25 ve 50 μ M SsnB, aynı zaman diliminde 3.125–6.25 μ M uygulamalarına kıyasla hücre canlılığında önemli bir düşüşe sebep olmuştur (**Şekil 4.2B**).

BJ hücrelerinde ise 48 saatlik 12.5 ve 25 μ M SsnB doz uygulamaları ile tüm zaman dilimlerinde uygulanan 50 μ M SsnB dozu, diğer tüm gruplara kıyasla hücre canlılığında anlamlı olarak azaltmıştır (**Şekil 4.2C**).

MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde, 48 saatlik 10 nM ES uygulaması diğer tüm gruplara kıyasla hücre çoğalmasını önemli ölçüde artırdı. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde sadece 25 μ M SsnB uygulaması kontrol, DMSO ve ES 10 nM gruplarına göre hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı. Benzer şekilde, 24 saatlik 10 nM ES uygulamasının ardından başlatılan 24 saatlik 25 μ M SsnB tedavisi, hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı (**Şekil 4.2D, E**).

Şekil 4.2F, MCF-7 ve OVCAR-3 hücre gruplarında ES ve SsnB uygulamalarının morfolojik değişikliklerini göstermektedir. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde 24 saatlik DMSO (1 μ L/mL) tedavisinden sonra hücrelerde hiçbir değişiklik gözlenmezken 10 nM ES uygulaması kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde SsnB uygulaması hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttı ve hücre morfolojisinde kontrol ve ES gruplarına kıyasla önemli değişikliklere neden oldu. ES+SsnB grubunda inkübasyon, ES tedavisinden 24 saat sonra başladı ve 24 saat boyunca devam etti. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde sadece SsnB tedavisi ve ES + SsnB uygulamasının hücre morfolojisinde bozulma, yapışma kaybı, hücresel büzülme, kümelenme ve toksisiteye neden olduğu gözlemlendi



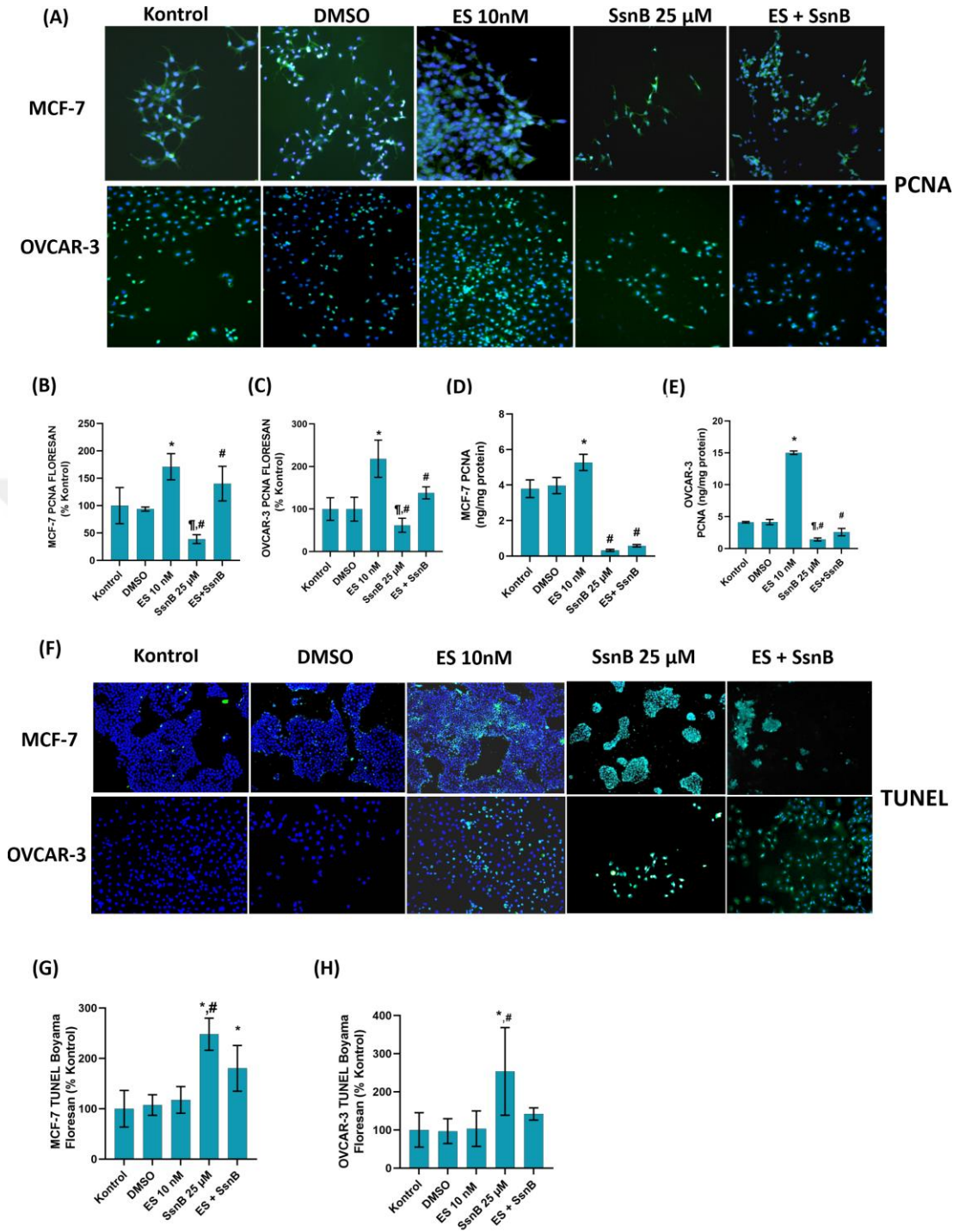
Şekil 4.2: **A)** MCF-7 hücrelerinde 16-48 saat aralığında MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. SsnB (3.125-50 μ M) ile DMSO (1 μ /ml) uygulanan hücreler. Veriler 6-8 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, kontrol, DMSO, 3.125 ve 12.5 μ M grubu ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$, 25 μ M ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. §, $p<0.05$, 24 ve 48 saat ile aynı doz aralığı karşılaştırıldığında. **B)** OVCAR-3 hücrelerinde 16-48 saat aralığında MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. SsnB (3.125-50 μ M) ile DMSO (1 μ /ml) uygulanan hücreler. Veriler 7 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.001$, kontrol ve DMSO tüm doz grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p<0.001$, 3.125 ve 25 μ M ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. ¶, $p<0.05$, 3.125 ile 6.25 μ M aynı zaman diliminde karşılaştırıldığında **C)** BJ hücrelerinde 16-48 saat aralığında MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. SsnB (3.125-50 μ M) ile DMSO (1 μ /ml) uygulanan hücreler. Veriler 6-8 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, tüm doz grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında **D)** MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik ES uygulama sonrasında 24 saatlik SsnB uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. DMSO (1 μ /ml), ES (10 nM) ve SsnB (25 μ M) uygulanan hücreler. Veriler 8 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. SsnB ile inkübasyon ES tedavisinden 24 saat sonra başladı ve 24 saat boyunca devam etti. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Holm-Sidak çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.0001$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.0001$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grubu ile karşılaştırıldığında. **E)** OVCAR-3 hücrelerinde 24 saatlik ES uygulama sonrasında 24 saatlik SsnB uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi DMSO (1 μ /ml), ES (10 nM) ve SsnB (25 μ M) uygulanan hücreler. Veriler 8 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. SsnB ile inkübasyon ES tedavisinden 24 saat sonra başladı ve 24 saat boyunca devam etti. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Holm-Sidak çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grubu ile karşılaştırıldığında. **F)** MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinin 48 saatlik ES (10 nM), 24 saatlik SsnB (25 μ M) ve ES+SsnB uygulama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü (10x büyütme). ES+SsnB; ES ile inkübasyon tedavisinden 24 saat sonra başladı ve 24 saat boyunca devam etti. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde 10 nM ES uygulamasının bir sonucu olarak kontrole kıyasla önemli proliferasyon gözlemlendi. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde SsnB uygulaması hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttı. Kontrol ve ES gruplarına kıyasla hücre morfolojisinde önemli değişikliklere neden oldu. ES + SsnB uygulamasının MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde morfolojide bozulmaya, küçülmeye, kümelenmeye ve toksisiteye neden olduğu gözlemlendi.

4.2. Çoğalan Hücre Nükleer Antijen (PCNA) Düzeyleri

Şekil 4.3A, MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde PCNA immün floresan boyamasını göstermektedir. MCF-7 (**Şekil 4.3B**) ve OVCAR-3 (**Şekil 4.3C**) hücrelerinde PCNA proteini 10 nM ES ile tedavi edilen grupta, Kontrol, DMSO ve SsnB gruplarına kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Sadece SsnB (25 µM) tedavisi veya 24 saatlik ES (10 nM) inkübasyonunun ardından uygulanan ES+SsnB (25 µM) tedavisi gruplarında, 10 nM ES gruplarına kıyasla PCNA immün reaktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. Ek olarak PCNA immün reaktivitesi, SsnB tedavi grubunda ES + SsnB 'ye kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. MCF-7 (**Şekil 4.3D**) ve OVCAR-3 (**Şekil 4.3E**) hücrelerindeki PCNA protein seviyelerinin ELISA analizi, immün floresan boyama sonuçlarını doğrulamıştır. 10 nM ES ile 48 saat boyunca inkübe edilen kanser hücrelerinde diğer tüm deney gruplarına kıyasla PCNA protein miktarı, önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. 24 saat boyunca 25 µM SsnB ile tedavi, diğer tüm gruplara kıyasla hücre çoğalmasını önemli ölçüde azaltmıştır. Ek olarak, OVCAR-3 hücrelerindeki PCNA ELISA ölçümleri de SsnB tedavi grubunda ES + SsnB 'ye kıyasla önemli ölçüde azaldığını doğruladı (**Şekil 4.3E**).

4.3. Apoptotik Hücreler (TUNEL)

MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde TUNEL immünfloresan boyaması **Şekil 4.3.F** göstermektedir. Kontrol, DMSO ve ES grupları arasında apoptotik hücre sayısında önemli bir fark yoktu. SsnB grubunda, apoptotik hücre sayısında diğer tüm gruplara kıyasla önemli bir artış gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinde ES + SsnB tedavisinin kombinasyonu, kontrol, DMSO ve ES 10 nM gruplarına kıyasla apoptoz derecesini artırdı; ancak OVCAR-3 hücrelerinde apoptotik hücre sayısı üzerinde bir etkisi olmadı (**Şekil 4.3 G, H**).



Şekil 4. 3. A) MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde DMSO (1 µL/mL), ES (10 nM) veya SsnB (25 µM) ile tedavi edilen PCNA temsili immünfloresan boyama. SsnB ile inkübasyon ES tedavisinden 24 saat sonra başladı ve ES + SsnB grubunda 24 saat boyunca devam etti **B)** MCF-7 hücrelerinde PCNA floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 10 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir *, $p < 0.0001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.005$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile

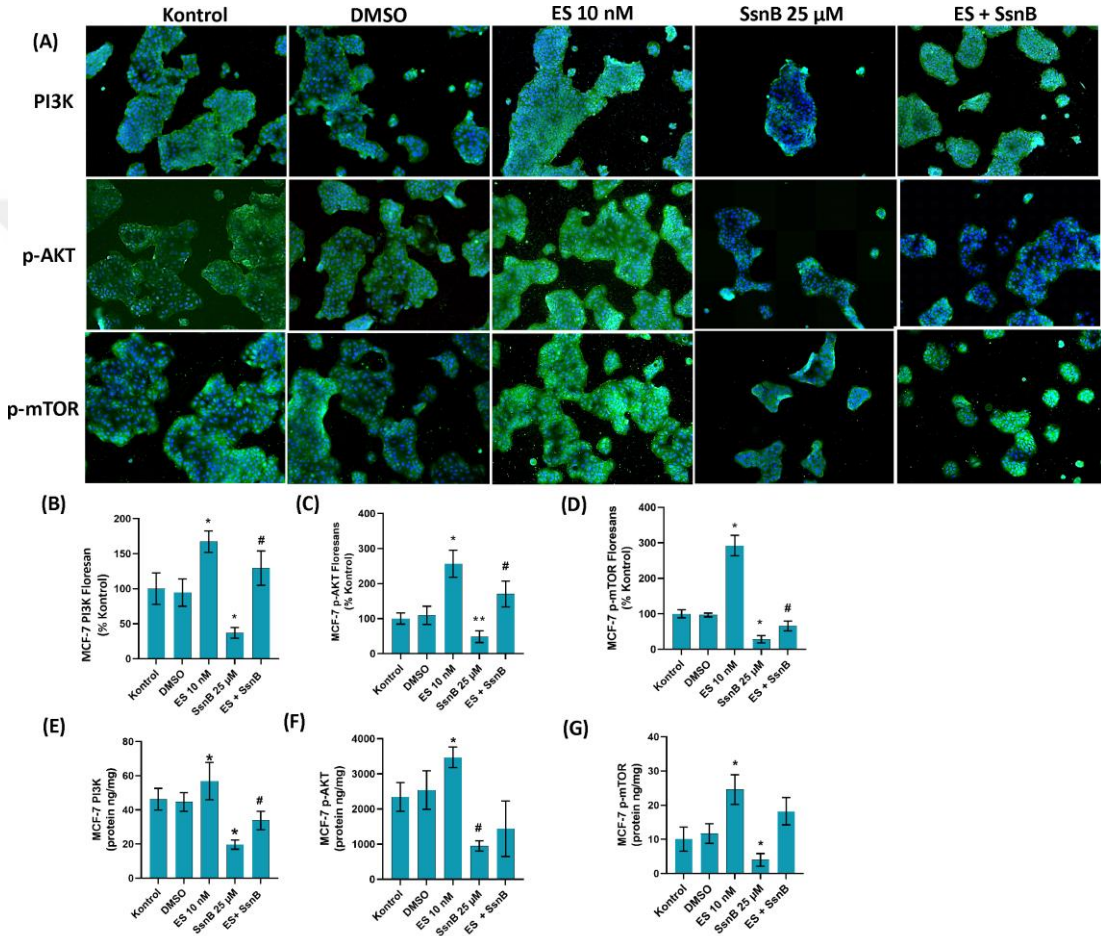
karşılaştırıldığında. ¶, $p < 0.001$, ES+ SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. C) OVCAR-3 hücrelerinde PCNA floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 10 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.0001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile karşılaştırıldığında. ¶, $p < 0.001$, ES+ SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. D) MCF-7 hücrelerinde PCNA protein düzeyleri. Veriler 10 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.0001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.0001$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile karşılaştırıldığında. E) OVCAR-3 hücrelerinde PCNA protein düzeyleri. Veriler 10 farklı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.0001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.0001$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile karşılaştırıldığında. ¶, $p < 0.05$, ES+ SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. F) MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde TUNEL boyama yönteminin temsili immüno floresan boyaması. Çift işaretleyici görüntüler elde etmek için $40\times$ objektif lens kullanıldı. G) MCF-7 hücrelerinde TUNEL boyama kantifikasyonu ImageJ programı ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ SD ($n = 10$). İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.001$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.001$, ES + SsnB grubu ile karşılaştırıldığında. H) OVCAR-3 hücrelerinde TUNEL boyama kantifikasyonu ImageJ programı ile değerlendirildi. Değerler ortalama $\pm$ SD ($n = 10$). İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p < 0.0001$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.05$, ES + SsnB grubu ile karşılaştırıldığında.

4.4 MCF-7 hücrelerinde PI3K, p-AKT ve p-mTOR Düzeyleri

Şekil 4.4A'da MCF-7 hücrelerinde PI3K, p-AKT ve p-mTOR immüno floresan boyamaları gösterilmiştir. MCF-7 (sırasıyla **Şekil 4.4B ve 4.4E**) hücrelerinde PI3K immünreaktivitesi ve protein seviyeleri, 10 nM ES uygulanan grupta diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış gösterdi. MCF-7 (sırasıyla **Şekil 4.4B ve 4.4E**) hücrelerinde sadece SsnB (25 μ M) uygulanan grupta, diğer tüm gruplara kıyasla PI3K immünreaktivitesi ve protein seviyeleri azaldı. ES + SsnB grubunda 10 nM ES uygulamasından sonra PI3K seviyelerindeki artış, SsnB tedavisinden sonra azaldı ve bu azalma, ES 10 nM grubuna göre anlamlıydı.

MCF-7 (sırasıyla **Şekil 4.4C ve 4.4F**) hücrelerinde p-AKT immünreaktivitesi ve protein seviyeleri, 10 nM ES uygulanan grupta diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı artış gösterdi. MCF-7 (sırasıyla **Şekil 4.4C ve 4.4F**) hücrelerinde p-AKT immünreaktivitesi ve protein seviyeleri sadece SsnB (25 μ M) tedavi grubunda, diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak azaldı. ES+SsnB grubunda, 10 nM ES uygulamasından sonra p-AKT düzeylerindeki artış, SsnB tedavisinden sonra zayıfladı ve ES 10 nM grubuna göre anlamlılık vardı.

MCF-7 (sırasıyla Şekil 4.4D ve 4.4G) hücrelerinde p-mTOR immünreaktivitesi ve protein seviyeleri, 10 nM ES uygulanan grupta diğer tüm gruplara kıyasla önemli bir artış gösterdi. MCF-7 (sırasıyla Şekil 4.4D ve 4.4G) hücrelerinde sadece SsnB (25 µM) tedavisi, diğer tüm gruplara kıyasla p-mTOR immünreaktivitesini ve protein seviyelerini düşürdü. ES+SsnB grubunda 10 nM ES uygulamasından sonra p-mTOR düzeylerindeki artış, SsnB tedavisinden sonra zayıfladı ve ES 10 nM grubuna göre anlamlıydı.



Şekil 4.4 (A) MCF-7 hücrelerinde DMSO (1 µL/mL), ES (10 nM) ve SsnB (25 µM) ile tedavi edilen PI3K, p-AKT ve fosfo p-mTOR'un immünfloresan boyamaları gösterilmiştir. (B) MCF-7 hücrelerinde PI3K floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 9-10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0.0001, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, p<0.05 tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. (C) MCF-7 hücrelerinde p-AKT floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 9-10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0.0001, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **, p<0.05 tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, p<0.05. tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. (D) MCF-7 hücrelerinde p-mTOR

floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.0001$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.001$. Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. (E) MCF-7 hücrelerindeki PI3K protein seviyeleri. Veriler 7 ayrı ölçümün temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. (F) MCF-7 hücrelerindeki p-AKT protein seviyeleri. Veriler 7 ayrı ölçümün temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.001$, kontrol, DMSO ve ES 10 nM grupları ile karşılaştırıldığında. (G) MCF-7 hücrelerindeki p-mTOR protein seviyeleri. Veriler 7 ayrı ölçümün temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında.

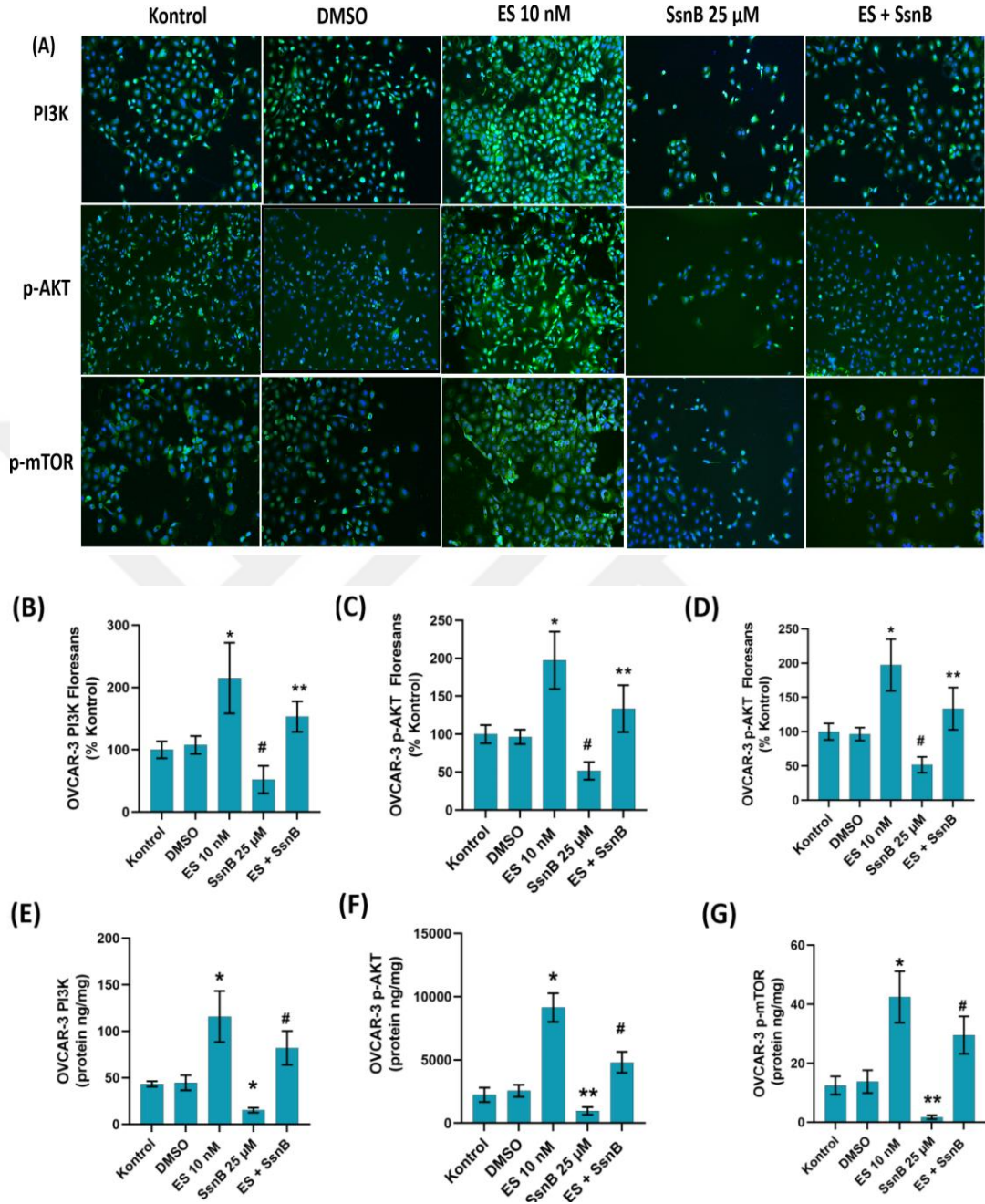
4.5 OVCAR-3 hücrelerinde PI3K, p-AKT ve p-mTOR Düzeyleri

Şekil 4.5A'da OVCAR-3 hücrelerinde PI3K, p-AKT ve p-mTOR immünfloresan boyamaları gösterilmiştir. OVCAR-3 (**sırasıyla Şekil 4.5B ve 4.5E**) hücrelerinde PI3K immünreaktivitesi ve protein seviyeleri, 10 nM ES uygulanan grupta diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış gösterdi. OVCAR-3 (**sırasıyla Şekil 4.5B ve 4.5E**) hücrelerinde sadece SsnB (25 μ M) uygulanan grupta, diğer tüm gruplara kıyasla PI3K immünreaktivitesi ve protein seviyeleri azaldı. ES + SsnB grubunda 10 nM ES uygulamasından sonra PI3K seviyelerindeki artış, SsnB tedavisinden sonra azaldı ve bu azalma, ES 10 nM grubuna göre anlamlıydı.

OVCAR-3 (**sırasıyla Şekil 4.5C ve 4.5F**) hücrelerinde p-AKT immünreaktivitesi ve protein seviyeleri, 10 nM ES uygulanan grupta diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış gösterdi. OVCAR-3 (**sırasıyla Şekil 4.5C ve 4.5F**) hücrelerinde sadece SsnB (25 μ M) tedavisi, diğer tüm gruplara göre p-AKT immünreaktivitesini ve protein seviyelerini düşürdü. ES+SsnB grubunda 10 nM ES uygulamasından sonra p-AKT düzeylerindeki artış, SsnB tedavisinden sonra zayıfladı ve bu düşüş ES 10 nM grubuna kıyasla anlamlıydı.

OVCAR-3 (**sırasıyla Şekil 4.5D ve 4.5G**) hücrelerinde p-mTOR immünreaktivitesi ve protein seviyeleri 10 nM ES uygulanan grupta diğer tüm gruplara kıyasla önemli bir artış gösterdi. OVCAR-3 (**sırasıyla Şekil 4.5D ve 4.5G**) hücrelerinde sadece SsnB (25 μ M) tedavisi, diğer tüm gruplara kıyasla p-mTOR immünreaktivitesi ve protein seviyelerini düşürdü. ES+SsnB grubunda 10 nM ES uygulamasından sonra p-mTOR

düzeylerindeki artış, SsnB tedavisinden sonra zayıfladı ve bu durum ES 10 nM grubuna kıyasla anlamlıydı.



Şekil 4.5: (A) OVCAR-3 hücrelerinde DMSO (1 µL/mL), ES (10 nM) ve SsnB (25 µM) ile tedavi edilen PI3K, p-AKT ve p-mTOR'un immünfloresan boyamaları gösterilmiştir. (B) OVCAR-3 hücrelerinde PI3K floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0.001, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **, p<0.05 kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, p<0.05 tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. (C) OVCAR-3 hücrelerinde p-Akt

floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.0001$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **, $p<0.05$ kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.001$ tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **(D)** OVCAR-3 hücrelerinde p-mTOR floresan boyama ImageJ yazılımı (sürüm 1.53k) ile kantitasyonu yapıldı. Veriler 10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.0001$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **, $p<0.05$ kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$ tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **(E)** OVCAR-3 hücrelerindeki PI3K protein seviyeleri. Veriler 7 ayrı ölçümün temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.05$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. **(F)** OVCAR-3 hücrelerindeki p-AKT protein seviyeleri. Veriler 7 ayrı ölçümün temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.0001$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **, $p<0.05$ kontrol ve DMSO tüm gruplar ile karşılaştırıldığında #, $p<0.001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. **(G)** OVCAR-3 hücrelerindeki p-mTOR protein seviyeleri. Veriler 7 ayrı ölçümün temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0.001$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **, $p<0.05$ tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, $p<0.001$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında.

4.5. Sfingolipid Düzeyleri

MCF-7 ve OVCAR-3 kanser hücrelerinde ölçülen sfingolipid düzeyleri **Tablo 2'**de gösterilmiştir. MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde 48 saat boyunca 10 nM ES ile tedavi edilen grup diğer tüm gruplara kıyasla S1P düzeylerinde önemli bir artış tespit edildi. Hem MCF-7 hücrelerinde hem de OVCAR-3 hücrelerinde S1P düzeyleri 24 saat boyunca 25 μ M SsnB ile inkübasyon yapılan grupta, diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak azaldı. 10 nM ES uygulamasını takiben S1P düzeylerindeki artış, ES+ SsnB grubunda SsnB tedavisini takiben zayıfladı ve bu azalma hem MCF-7 hem de OVCAR-3 hücrelerinde ES 10 nM'ye göre anlamlıydı.

MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde 24 saat boyunca 25 μ M SsnB ile inkübe edilen grupta, diğer tüm gruplara kıyasla C18–C24 CER düzeyleri önemli ölçüde arttı. SsnB tedavisinin ardından ES + SsnB grubunda C18–24 düzeyleri de arttı ve bu artış hem MCF-7 hem de OVCAR-3 hücrelerinde kontrol, DMSO ve ES 10 nM gruplarına göre anlamlıydı.

Tablo 2: MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinde sfingolipid düzeyleri. Veriler 6 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. SM, sfingomyelin; S1P, sfingozin-1-fosfat; C1P, seramid-1- fosfat; Sparstolonin B (SsnB); Dimetil sülfoksit (DMSO); Estradiol Hemihidrat (ES). İstatistiksel analiz Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapılmış olup, gruplar arası farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, $p<0,01$, Kontrol, DMSO, ES 10 nM gruplarına göre karşılaştırıldığında. **, $p<0,01$, Kontrol, DMSO, ES 10 nM ve ES+SsnB gruplarına göre karşılaştırıldığında. $\neq$, $p<0,001$, Kontrol, DMSO, SsnB ve ES+SsnB gruplarına göre karşılaştırıldığında. $\neq$, $p<0,001$, Kontrol, DMSO, ES 10 nM ve SsnB 25 μ M gruplarına göre karşılaştırıldığında. \$, $p<0,001$, Kontrol, DMSO, ES ES 10 nM ve ES+SsnB gruplarına göre karşılaştırıldığında.

	KONTROL (n=6)	DMSO (n=6)	ES (n=6)	SsnB(n=6)	ES + SsnB (n=6)
Sphingolipids (ng/mg protein)					
16:0 SM (d18:1/16:0)					
MCF-7	124,99 $\pm$ 5,22	156,82 $\pm$ 27,99	165,75 $\pm$ 25,34	153,98 $\pm$ 13,82	143,83 $\pm$ 30,33
OVCAR-3	157,40 $\pm$ 8,14	170,01 $\pm$ 13,15	143,50 $\pm$ 9,06	133,11 $\pm$ 28,17	158,64 $\pm$ 26,93
18:0 SM (d18:1/18:0)					
MCF-7	67,44 $\pm$ 13,12	60,60 $\pm$ 7,90	65,42 $\pm$ 24,01	61,71 $\pm$ 13,20	66,73 $\pm$ 7,84
OVCAR-3	65,09 $\pm$ 14,51	59,68 $\pm$ 2,59	66,93 $\pm$ 17,35	57,40 $\pm$ 6,20	69,15 $\pm$ 22,34
24:0 SM (d18:1/24:0)					
MCF-7	45,42 $\pm$ 5,91	38,30 $\pm$ 3,54	41,46 $\pm$ 5,51	39,846 $\pm$ 6,82	36,15 $\pm$ 4,46
OVCAR-3	44,08 $\pm$ 4,77	41,5 $\pm$ 2,005	41,16 $\pm$ 3,11	47,386 $\pm$ 6,37	44,83 $\pm$ 8,98
C16 Ceramide (d18:1/16:0)					
MCF7	71,37 $\pm$ 9,38	73,71 $\pm$ 3,38	71,71 $\pm$ 2,11	7,02 $\pm$ 3,88	67,21 $\pm$ 7,79
OVCAR-3	66,41 $\pm$ 7,28	69,63 $\pm$ 7,90	69,85 $\pm$ 6,76	69,87 $\pm$ 2,26	63,51 $\pm$ 14,33
C18 Ceramide (d18:1/18:0)					
MCF-7	11,02 $\pm$ 0,77	10,26 $\pm$ 0,54	12,33 $\pm$ 0,12	27,36 $\pm$ 1,13**	22,73 $\pm$ 2,01*
OVCAR-3	4,59 $\pm$ 1,08	6,11 $\pm$ 2,16	4,8 $\pm$ 0,327	11,77 $\pm$ 0,67*	11,90 $\pm$ 2,51*
C20 Ceramide (d18:1/20:0)					
MCF-7	12,51 $\pm$ 1,72	14,77 $\pm$ 1,42	15,61 $\pm$ 1,76	31,68 $\pm$ 0,57*	30,54 $\pm$ 0,79*
OVCAR-3	4,08 $\pm$ 0,36	4,61 $\pm$ 0,69	5,16 $\pm$ 0,73	33,91 $\pm$ 2,53**	27,73 $\pm$ 1,52*
C22 Ceramide (d18:1/22:0)					
MCF-7	29,83 $\pm$ 2,032	27,14 $\pm$ 3,11	24,69 $\pm$ 1,70	65,98 $\pm$ 3,64*	54,21 $\pm$ 2,76*
OVCAR-3	17,24 $\pm$ 0,98	17,44 $\pm$ 1,38	17,85 $\pm$ 3,77	50,99 $\pm$ 0,55*	48,51 $\pm$ 1,76*
C24 Ceramide (d18:1/24:0)					
MCF-7	39,33 $\pm$ 1,09	36,41 $\pm$ 2,06	39,76 $\pm$ 2,75	98,55 $\pm$ 7,38*	88,77 $\pm$ 2,56*
OVCAR-3	39,56 $\pm$ 3,38	37,57 $\pm$ 4,61	32,80 $\pm$ 5,11	97,56 $\pm$ 3,30*	92,05 $\pm$ 4,72*
S1P					
MCF-7	6,55 $\pm$ 0,47	5,87 $\pm$ 0,21	16,81 $\pm$ 0,29 $\neq$	1,59 $\pm$ 0,10 $^{\$}$	8,91 $\pm$ 0,14 **
OVCAR-3	14,86 $\pm$ 0,22	14,89 $\pm$ 0,20	30,23 $\pm$ 0,44 $\neq$	6,48 $\pm$ 0,22 $^{\$}$	11,43 $\pm$ 0,78 **

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamız, MCF-7 ve OVCAR-3 kanser hücrelerinin 48 saat boyunca 10 nM ES ile tedavisinin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde artırdığını gösterdi. Birkaç çalışma, özellikle 10 nM konsantrasyonunda estradiolün MCF-7 hücreleri üzerinde proliferatif etkisini bildirmiştir (Ma ve ark., 2016; Tian ve ark., 2018). Estradiol, östrojen reseptörlerine (MCF-7 hücrelerinde başlıca ER α) bağlanarak hücre çoğalmasında rol oynayan genlerin transkripsiyonunun artmasına neden olmaktadır (Yu X. ve ark., 2012).

Estradiolün 10 nM konsantrasyonu, hücre siklus devamlılığını destekleyen genlerin up-regüle edilmesini ve tümör baskılayıcı yolları etkileyen miR-21 gibi inhibitör miRNA'ların down regüle edilmesiyle ilişkilendirilmiştir (Wickramasinghe ve ark., 2009). Bir çalışmada, 10 nM estradiol tedavisinin hücre büyümesini artırdığı ve reseptöre özgü etkiler gösterdiği görülmüş, bu etkileri ER α ve Er β reseptörünün hücre proliferasyon ve gen düzenlemesindeki önemi vurgulanmıştır. (Paterni ve ark., 2014). Estradiolün hücre çoğalmasındaki rolü AP-1 transkripsiyon faktörleri gibi ko-faktörlerle etkileşimi, karmaşık düzenleyici mekanizmalarla bağlantısını vurgulamıştır (Klinge, 2000). Bu bulgular doğrultusunda, estradiolün ilgili konsantrasyonlarında MCF-7 gibi hormona duyarlı meme kanseri hücrelerinin büyümesini desteklediği ayrıca meme kanseri araştırmalarında hedef odaklı terapötik stratejilerin geliştirilmesinde önemli rol oynadığı görülmektedir.

Başka çalışmalar da estradiolün OVCAR-3 gibi over kanseri hücre hatlarında hücre çoğalması üzerindeki etkisini desteklemektedir. Araştırmalar, çeşitli nanomolar aralıktaki estradiolün kanser hücresi davranışını, büyümesini ve reseptör düzeyindeki ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir (Shi ve Bartlett, 2008). OVCAR-3 hücreleriyle yapılan deneylerde, araştırmacılar östrojen reseptör aracılı mekanizmaları araştırmak için estradiol kullanmışlardır. Bu çalışmalar sinyal yolları ve östrojen duyarlılığı ile ilişkili (1 nM, 10 nM ve 100 nM) birden fazla konsantrasyondaki doza bağlı tepkileri karşılaştırmıştır (Schüler-Toprak ve ark., 2017).

MCF-7 ve OVCAR-3 hücrelerinin 24 saat boyunca 25 μ M SsnB ile inkübasyonu hem ES varlığında hem de yokluğunda hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttı.

Çalışmalar, SsnB'nin kanser ve endotel hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir (Bateman ve ark., 2013). SsnB'nin hücre döngüsüne müdahale ederek özellikle hücreleri G1 veya G2/M kontrol noktalarında durdurarak kanserle ilişkili süreçler olan hücre göçü, invazyon ve anjiyogenezi engellediği bildirilmiştir (Bateman ve ark., 2013).

SsnB'nin 10 μ M ile 100 μ M arasında değişen konsantrasyonları, nöroblastoma (Kumar ve ark., 2014) ve prostat kanseri modelleri (Liu ve ark., 2021) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde güçlü antiproliferatif etkiler göstermiştir. Bu çalışma SsnB'nin MCF-7 ve OVCAR-3 kanser hücrelerinde östrojene bağlı proliferasyonunu inhibe ettiğini ilk kez göstermektedir. Ayrıca SsnB vasküler endotel hücre fonksiyonunu bozarak tümörlerde anjiyogeneze bağlı büyüme ve metastazı üzerinde kritik rol oynamaktadır (Bateman ve ark., 2013).

MCF-7 ve OVCAR-3 hücreleri SsnB'nin 24 saat boyunca sitotoksik konsantrasyonu (25 μ M) ile tedavi sonrası, hücre içi C18–C24 CER seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış gösterdi. Bu çalışma, SsnB'nin meme ve over kanseri hücrelerindeki endojen sfingolipid miktarlarını nasıl etkilediğini değerlendiren ilk çalışmadır. Şimdiye kadarki araştırmalarda SsnB tedavisi ile artan CER seviyeleri arasındaki ilişki değerlendirilmemiştir. SsnB ile ilgili çoğu çalışmada, Toll like reseptör (TLR) yollarını modüle ederek (Liang ve ark., 2011), NF- κ B ve STAT1 sinyallemesini baskılayarak (Kim ve ark., 2022) anti-inflamatuar, anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. İncelenen çalışmalarda SsnB'nin özellikle lipid metabolizması ve CER seviyeleri üzerindeki etkisi iyi bir şekilde belgelenmemiştir. SsnB, güçlü anti-inflamatuar özelliklere sahip seçici bir TLR antagonistidir (Liang ve ark., 2011).

Fare makrofajlarında, SsnB TLR4, TLR1/TLR2 veya TLR2/TLR6 ligandları aracılığı ile inflammatuar sitokin ekspresyonunu önemli ölçüde bastırmıştır (Liang ve ark., 2011). TLR-4, meme kanseri hücrelerinin ve over kanseri hücrelerinin hücre çoğalması ve apoptoz direncinin indüklenmesi yoluyla hayatta kalmasını ve invazyonunu desteklemektedir (Yang ve ark., 2014; Lupi ve ark., 2020). TLR sinyal yolu ile kanser hücrelerinde CER sentezi arasındaki ilişki karmaşıktır. Bazı araştırmalar, kanser tedavisinde rol oynayan CER üretimi de dahil TLR sinyal yolu ile sfingolipid metabolizması arasında potansiyel bir çapraz konuşma olduğunu göstermektedir

(Schilling ve ark., 2013). Ancak, TLR antagonistlerinin CER sentezini artırdığına dair doğrudan örnekler gösterilmemiştir. TLR'ler kanser hücrelerindeki inflamatuvar yanıtları kontrol etmektedir. Kanser hücre hatlarında kanserin ilerlemesiyle tümör oluşumu ve TLR ekspresyonu artışı ilişkilendirilmiştir (Sato ve ark., 2009). TLR sinyal yolu ile kanser arasındaki ilişki hala tartışılmaktadır. TLR'lerin kanser ilerlemesini yavaşlatma yeteneğinin güçlü olduğu bildirilmiştir (Onier ve ark., 1999; Garay ve ark., 2007), ancak aynı zamanda bu süreci hızlandırdıkları da gösterilmiştir (Zhang Y. B. ve ark., 2009). SsnB, tümör hücrelerinde TLR'lerin artan ekspresyonu nedeniyle terapötik hedef olarak dikkat çekmektedir. TLR2/TLR4 agonisti (Bacillus Calmette ve Guérin), kanser tedavisinde en etkili TLR ligandıdır; otuz yıldan uzun süredir mesane kanserini tedavi etmek için kullanılmaktadır (Yoo ve ark., 2012).

Tümör ilerlemesi sırasında TLR-4 tarafından proinflamatuvar kemokinler ve immün süpresif sitokinler düzensiz ve engellenmemiş biçimde üretilmektedir. TLR-4 antagonistleri kullanımı kanseri tedavi etmenin harika bir yolu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak TLR-4 antagonistleri, konakçının bağışıklığını tehlikeye atma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, kanser tedavisinde TLR-4 agonistleri mi yoksa antagonistleri mi hedefleneceği sorusu bilimde hala çözümsüz kalmaktadır. TLR-4 agonistlerinin ve antagonistlerinin farklı malignitelerdeki rollerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırma yapılmalıdır (Mai ve ark., 2013).

Çalışma sonuçlarımız, TLR sinyalleşmesinin manipüle edilmesinin, CERler 'in kanser hücresi ölümünü başlatma ve ilaç direnci mekanizmalarının üstesinden gelme etkisinden yararlanma potansiyeli ile terapötik açıdan umut vaat ettiğini göstermektedir. SsnB'nin TLR yolunun modülasyonunu, CER sentezini etkileyerek CER kaynaklı apoptozun artmasına yol açtığı varsayılmaktadır. Bu mekanizma, TLR inhibisyonunu kullanarak CER birikimi yoluyla pro-apoptotik bir ortam yaratır ve bunun sonucunda kanser hücrelerinde hücre canlılığı sinyali zayıflayarak hücreyi apoptoza indüklemektedir. Bu ikili modülasyon aracılığı SsnB kanser hücrelerinde TLR sinyal yollarının aktivasyonu ve bozulmuş hücre sağkalım mekanizmalarını hedefleyen bir terapötik ajan potansiyelindedir.

Kanser hücrelerine 24 saat boyunca 25 μ M SsnB tedavi uygulandığında S1P seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını bulduk. Bildiğimiz kadarıyla, çalışmamız SsnB ile tedavi edilen kanser hücrelerinde S1P seviyelerinin azaldığını belgeleyen ilk

çalışmadır. CER ve S1P, kanser patofizyolojisi için önemli olan birden fazla biyolojik yolun işleyişinde kritik rol oynayan işlevsel sfingolipid metabolitlerine örnektir. Biyolojik olarak aktif sfingolipid üretimine ilişkin mevcut anlayış, bunların kanser ilerlemesi ve gelişimindeki kritik rollerini kabul etmektedir. CER, Sfingolipid metabolizmasının temel bir parçasıdır ve birçok kötü huylu hücrede tümör baskılayıcı olarak fonksiyon göstererek anti-proliferatif ve apoptotik yanıtları indüklemektedir (Li F. ve Zhang, 2015). S1P,CER'lerin tam aksine kanserleşmeyi destekleyen lipide dönüştüren süreçleri tetiklemektedir (Ogretmen, 2018).

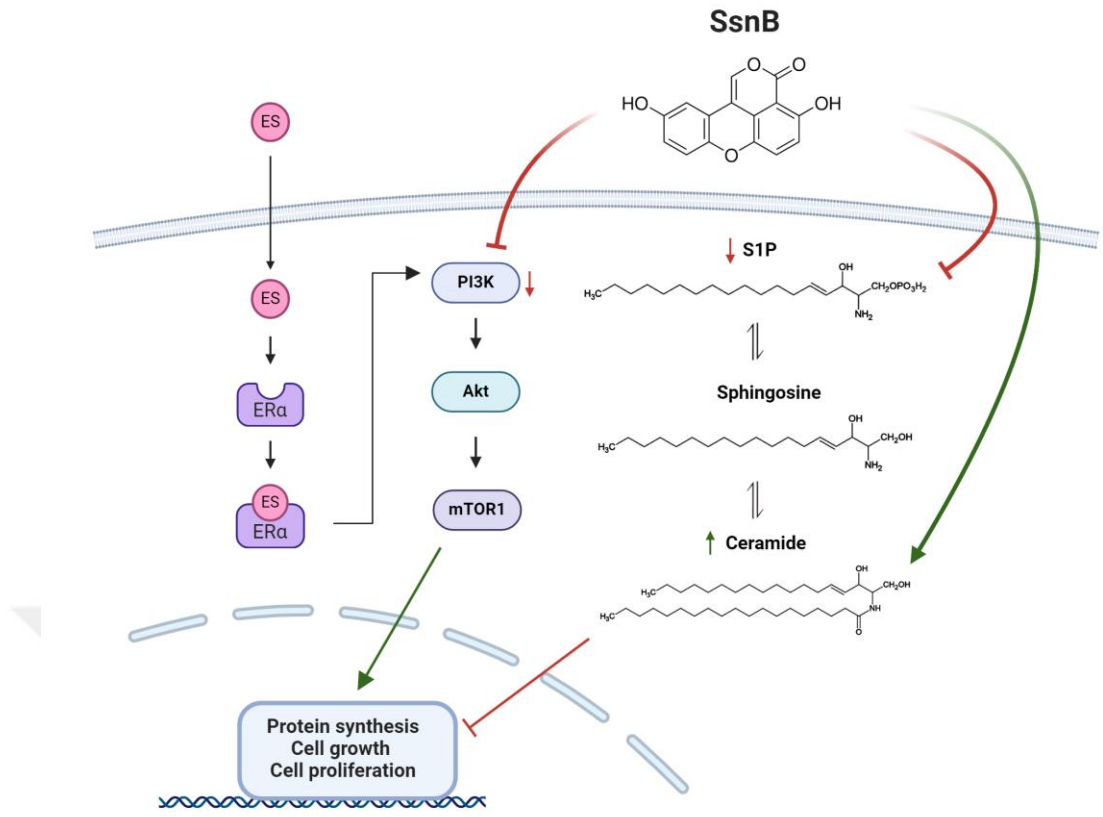
SsnB ile tedavi edilen kanser hücrelerinde, kontrol gruplarına kıyasla PI3K, p-AKT ve p-mTOR proteinlerinin önemli ölçüde baskılandığını gördük. Sonuçlarımız, SsnB'nin prostat kanseri hücrelerinde PI3K/AKT yolunu bloke ettiğini gösteren önceki çalışmaları desteklemektedir (Liu ve ark., 2021).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, hücre büyümesini, sağ kalımını, metabolizmasını ve çoğalmasını düzenleyen kritik bir hücre içi sinyal yoludur (Yu J. S. ve Cui, 2016). Genellikle meme (Sharma V. R. ve ark., 2017) ve over kanserleri (Mabuchi ve ark., 2015) türlerinde bu sinyal yolağı aşırı aktif hale gelmektedir. Bu sinyal yolağının tümör ilerlemesi, metastazı ve tedavi sürecinde oluşan dirence karşı önemli katkıları bulunmaktadır. İnsülin, büyüme faktörleri (örn. EGF, VEGF) ve hormonlar gibi hücre dışı sinyaller, HER2 veya insülin reseptörü gibi hücre membranındaki RTK'lara bağlanmaktadır. Bu, plazma membranında PIP2'yi PIP3'e dönüştüren bir lipit kinaz olan PI3K'yı aktive etmektedir (Yu L. ve ark., 2022). PIP3, AKT'yi aktive olduğu membrana çekerek fosforile etmektedir. Fosforile edilmiş AKT, anti-apoptotik proteinleri uyarır ve pro-apoptotik faktörleri inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasını desteklemektedir. AKT, hücre büyümesinin önemli düzenleyicisi olan mTOR'u dolaylı olarak aktive etmektedir (Yu L. ve ark., 2022). Meme kanserinde, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, PIK3CA genindeki mutasyonlar ve HER2 gibi RTK'ların amplifikasyonu nedeniyle sıklıkla aktive olmaktadır (Sharma V. R. ve ark., 2017). Bu değişiklikler tümör büyümesini ve metastazı tetiklemektedir. PIK3CA mutasyonlu meme kanserlerinin %40'a kadarı östrojen reseptörü (ER) pozitif ve hormonal tedavilere karşı dirence neden olmaktadır. Sonuç olarak, PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri meme kanseri hastalarının, özellikle endokrin direnci olanların tedavi süreçlerini iyileştirmek için test edilmektedir (Yu L. ve ark., 2022). Over

kanserlerinde, bu yol benzer şekilde hastalığın ilerlemesinde, kemoterapi direncinde ve epitelden mezenkimale geçişte (EMT), kanser hücrelerinin daha invaziv hale geçmesinde rol oynamaktadır.

Genellikle tekrarlayan ve standart tedavilere direnç geliştiren over kanser hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR'u hedefleyen tedaviler, kök hücre benzeri etkileri gösterdiği düşünülmektedir (Mabuchi ve ark., 2015). mTOR /PI3K ikili inhibitörü olan BEZ235 gibi ilaçlar, EMT'ye ters yönde etkileriyle kanser kök hücreleriyle ilişkili belirteçleri azaltarak kemoterapi yanıtlarını artırmak için araştırılmaktadır. (Afify ve ark., 2021). Daha önce de belirtildiği gibi, CER üretiminin uyarılması ve apoptozis indüksiyonu, SsnB'nin antikanser etkilerini gösterdiği temel mekanizmalardır. CER, apoptozun teşvik edilmesi ve hücresel çoğalmanın engellenmesindeki rolüyle bilinmektedir. Burada sunulan araştırma hipotezi, SsnB'nin CER sentezini uyararak veya bozunmasını engelleyerek hücresel CER seviyelerini artırabileceğini öne sürmektedir. Yüksek CER seviyeleri apoptozu tetikleyebilir ve kanser hücresi büyümesine karşı hücresel stres yanıtlarını başlatabilir. CERin, PI3K/AKT/mTOR (Matos ve ark., 2021) dahil olmak üzere hayatta kalma yollarını down regüle ederek PP2A (Chalfant ve ark., 2004) proteinini aktive ettiği bilinmektedir. Hipotez, SsnB'nin bu yolu doğrudan inhibe edebileceğini, bunun da kanser hücrelerindeki hayatta kalma sinyallerini azaltarak onları hücre ölümüne daha duyarlı hale getireceğini öne sürmektedir.

Bu nedenle hipotez, SsnB'nin CER seviyelerini artırdığını, PI3K/AKT/mTOR yolunu doğrudan veya dolaylı olarak inhibe ettiğini, apoptozun artmasına ve kanser hücresi canlılığının azalmasına yol açan sinerjik bir etkisi olduğunu önermektedir. Bu ikili mekanizma hem bir lipit sinyal molekülü olan CER'i, hem de önemli bir hayatta kalma yolu olan PI3K/AKT/mTOR'u hedef alarak SsnB'nin potansiyel anti-kanser etkilerini güçlendirmiştir.



Şekil 5.1. Grafiksel Özet

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, SsnB özellikle östrojen bağımlı kanserlerde kanser hücresi canlılığını azaltarak önemli bir antikanser potansiyeli göstermektedir. Bu etki, çoklu moleküler mekanizmalar aracılığıyla elde edilir: SsnB, PCNA, S1P, p-AKT ve p-mTOR dahil olmak üzere kilit proliferatif proteinleri down regüle eder. (Şekil-5.1) Bu proteinler, kanserde sıklıkla up regüle olan ve hücre büyümesi, hayatta kalması ve metabolizmasının desteklenmesinde rol oynayan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun merkezindedir. Ayrıca SsnB, pro-apoptotik özellikleriyle bilinen biyoaktif bir lipid olan CER seviyelerini yükselterek kanser hücrelerinde hücre ölümünü artırır ve hücrel yönetimi proliferasyon yerine apoptoza doğru kaydırır.

SsnB hakkında gelecekte yapılacak araştırmalar, bu metabolitlerin kanserde hücre kaderinin kilit düzenleyicileri olduğu göz önüne alındığında, CER ve S1P arasındaki dengenin modüle edilmesindeki rolüne odaklanmalıdır. SsnB'nin diğer hücre sinyal yolları, özellikle de östrojene bağımlı kanserlerdeki hormon reseptörleriyle ilişkili olanlar üzerindeki etkilerinin araştırılması, terapötik potansiyelinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayabilir. Ayrıca, SsnB analoglarının veya türevlerinin geliştirilmesi, biyoyararlanımı ve özgüllüğü artırarak PI3K/AKT/mTOR odaklı kanserleri hedefleyen kombinasyon tedaviler için umut verici bir aday haline getirebilir.

KAYNAKLAR

- Afify SM, Oo AKK, Hassan G, Seno A, Seno M. How can we turn the pi3k/akt/mtor pathway down? Insights into inhibition and treatment of cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2021; 21: 605-619.
- Alizadeh J, da Silva Rosa SC, Weng X, Jacobs J, Lorzadeh S, Ravandi A , ve ark. Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy. *Eur J Cell Biol.* 2023; 102: 151337.
- An J, Li L, Zhang X. Curcucione c induces apoptosis in endometrial cancer cells via mitochondria-dependent apoptotic and erk pathway. *Biotechnol Lett.* 2021; 43: 329-338.
- Aziz AUR, Farid S, Qin K, Wang H, Liu B. Pim kinases and their relevance to the pi3k/akt/mtor pathway in the regulation of ovarian cancer. *Biomolecules.* 2018; 8.
- Bajjalieh SM, Martin T, Floor E. Synaptic vesicle ceramide kinase: A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *Journal of Biological Chemistry.* 1989; 264: 14354-14360.
- Bateman HR, Liang Q, Fan D, Rodriguez V, Lessner SM. Sparstolonin b inhibits pro-angiogenic functions and blocks cell cycle progression in endothelial cells. *PLoS One.* 2013; 8: e70500.
- Bennasroune A, Gardin A, Aunis D, Cr  mel G, Hubert P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 50: 23-38.
- Bhatt AP, Damania B. Aktivation of pi3k/akt/mtor signaling pathway by kshv. *Front Immunol.* 2012; 3: 401.
- Boon WC, Chow JD, Simpson ER. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Prog Brain Res.* 2010; 181: 209-232.
- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74: 229-263.
- Caroline M. (1998). In search of the perfect serm: Beyond tamoxifen and raloxifene. In: Oxford University Press.
- Chalfant CE, Szulc Z, Roddy P, Bielawska A, Hannun YA. The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *J Lipid Res.* 2004; 45: 496-506.
- Chobanian N, Dietrich CS, 3rd. Ovarian cancer. *Surg Clin North Am.* 2008; 88: 285-299, vi.
- Cunat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004; 94: 25-32.
- Dillon LM, Miller TW. Therapeutic targeting of cancers with loss of pten function. *Curr Drug Targets.* 2014; 15: 65-79.
- Dorgan JF, Longcope C, Stephenson HE, Jr., Falk RT, Miller R, Franz C , ve ark. Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5: 533-539.
- Dowlathshahi K, Fan M, Snider HC, Habib FA. Lymph node micrometastases from breast carcinoma: Reviewing the dilemma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society.* 1997; 80: 1188-1197.
- Easty DJ, Gray SG, O'Byrne KJ, O'Donnell D, Bennett DC. Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24: 446-461.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495-516.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006; 7: 606-619.
- E  refo  lu M.   zel histoloji. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2021.

- Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB , ve ark. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006; 355: 560-569.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M , ve ark. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359-386.
- Garay RP, Viens P, Bauer J, Normier G, Bardou M, Jeannin JF, Chiavaroli C. Cancer relapse under chemotherapy: Why tlr2/4 receptor agonists can help. *Eur J Pharmacol*. 2007; 563: 1-17.
- Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH , ve ark. Pi3k/akt/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer*. 2023; 22: 138.
- Gomez-Muñoz A, Gangoiti P, Arana L, Ouro A, Rivera IG, Ordoñez M, Trueba M. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1831: 1060-1066.
- Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*. 1996; 274: 1855-1859.
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: From modular to integrative signaling. *Biochemistry*. 2001; 40: 4893-4903.
- Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem*. 2011; 286: 27855-27862.
- Hla T, Dannenberg AJ. Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metab*. 2012; 16: 420-434.
- Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev*. 2008; 29: 381-402.
- Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011; 13: 215.
- Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2000; 19: 3-10.
- Jakobusic Brala C, Karkovic Markovic A, Kugic A, Toric J, Barbaric M. Combination chemotherapy with selected polyphenols in preclinical and clinical studies-an update overview. *Molecules*. 2023; 28.
- Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (pi3k) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treat Rev*. 2017; 59: 93-101.
- Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, Iyer RB, Bhosale P. Ovarian cancer, the revised figo staging system, and the role of imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 2016; 206: 1351-1360.
- Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*. 2014; 384: 1376-1388.
- Kaczanowski S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol*. 2016; 13: 031001.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlioğlu M, Başpınar N, Tiftik AM. *Biyokimya*. 5. basım ed. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık; 2013.
- Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Üremeye yardımcı tekniklerde laboratuvar teorik konular ve pratik uygulamaları. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri; 2019.
- Karpeta A, Gregoraszcuk E. Differences in the mechanisms of action of bde-47 and its metabolites on ovcAR-3 and mcf-7 cell apoptosis. *J Appl Toxicol*. 2017; 37: 426-435.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
- Kim N, Kim C, Ryu SH, Kim GO, Bae JS. Anti-inflammatory effect of sparsolonin b through inhibiting expression of nf-kb and stat-1. *Int J Mol Sci*. 2022; 23.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000; 65: 227-251.

- Koyunoğlu F, Tekin S, Konar V, Sandal S. İnsan meme kanseri hücre serileri mcf-7 üzerine apelin-13'ün etkilerinin araştırılması: In vitro bir çalışma. *Annals of Health Sciences Research*. 2013; 2: 23-28.
- Kumar A, Fan D, Dipette DJ, Singh US. Sparstolonin b, a novel plant derived compound, arrests cell cycle and induces apoptosis in n-myc amplified and n-myc nonamplified neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2014; 9: e96343.
- Laplane M, Sabatini DM. Mtor signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149: 274-293.
- Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer research*. 1997; 57: 3071-3078.
- Li F, Zhang N. Ceramide: Therapeutic potential in combination therapy for cancer treatment. *Curr Drug Metab*. 2015; 17: 37-51.
- Li H, Zeng J, Shen K. PI3K/akt/mtor signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; 290: 1067-1078.
- Liang Q, Wu Q, Jiang J, Duan J, Wang C, Smith MD, ve ark. Characterization of sparstolonin b, a chinese herb-derived compound, as a selective toll-like receptor antagonist with potent anti-inflammatory properties. *J Biol Chem*. 2011; 286: 26470-26479.
- Lien EC, Lyssiotis CA, Cantley LC. Metabolic reprogramming by the pi3k-akt-mtor pathway in cancer. *Metabolism in Cancer*. 2016: 39-72.
- Liu S, Hu J, Shi C, Sun L, Yan W, Song Y. Sparstolonin b exerts beneficial effects on prostate cancer by acting on the reactive oxygen species-mediated pi3k/akt pathway. *J Cell Mol Med*. 2021; 25: 5511-5524.
- Lu W, Kelly AL, Miao S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 47: 1-9.
- Lupi LA, Cuciolo MS, Silveira HS, Gaiotto LB, Cesário RC, Seiva FRF, de Almeida Chuffa LG. The role of toll-like receptor 4 signaling pathway in ovarian, cervical, and endometrial cancers. *Life Sci*. 2020; 247: 117435.
- Lyu Y, Duan B, Liu Z, Yang F, Chen C, Jiang X, Liu X. Sparstolonin b inhibits pancreatic adenocarcinoma through the nf-kb signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2022; 417: 113214.
- Ma L, Liu Y, Geng C, Qi X, Jiang J. [corrigendum] estrogen receptor β inhibits estradiol-induced proliferation and migration of mcf-7 cells through regulation of mitofusin 2. *Int J Oncol*. 2016; 49: 2187.
- Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The pi3k/akt/mtor pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015; 137: 173-179.
- Mai CW, Kang YB, Pichika MR. Should a toll-like receptor 4 (tlr-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? Tlr-4: Its expression and effects in the ten most common cancers. *Onco Targets Ther*. 2013; 6: 1573-1587.
- Manning BD, Toker A. Akt/pkb signaling: Navigating the network. *Cell*. 2017; 169: 381-405.
- Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/akt signaling pathway and cancer: An updated review. *Ann Med*. 2014; 46: 372-383.
- Matos B, Howl J, Jerónimo C, Fardilha M. Modulation of serine/threonine-protein phosphatase 1 (pp1) complexes: A promising approach in cancer treatment. *Drug discovery today*. 2021; 26: 2680-2698.
- Matsumura S, Ohta T, Yamanouchi K, Liu Z, Sudo T, Kojimahara T, ve ark. Activation of estrogen receptor α by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2017; 18: 730-739.
- Mecca M, Sichert M, Giuseffi M, Giglio E, Sabato C, Sanseverino F, Marino G. Synergic role of dietary bioactive compounds in breast cancer chemoprevention and combination therapies. *Nutrients*. 2024; 16.
- Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G, Price KN, Crivellari D, Snyder RD, ve ark. Patterns of recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-

- negative disease: Results from international breast cancer study group trials viii and ix. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 3083-3090.
- Mishra R, Patel H, Alanazi S, Kilroy MK, Garrett JT. Pi3k inhibitors in cancer: Clinical implications and adverse effects. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- Moore KL, Agur AMR. *Temel klinik anatomi.* Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.
- Murakami I, Wakasa Y, Yamashita S, Kurihara T, Zama K, Kobayashi N , ve ark. Phytoceramide and sphingoid bases derived from brewer's yeast *saccharomyces pastorianus* activate peroxisome proliferator-activated receptors. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 150.
- Njoku K, Abiola J, Russell J, Crosbie EJ. Endometrial cancer prevention in high-risk women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020; 65: 66-78.
- Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18: 33-50.
- Onat T, Emerk K, Sözmén EY. *İnsan biyokimyası.* In. 2. basım ed., Ankara: Palme Yayıncılık; 2007.
- Onier N, Hilpert S, Arnould L, Saint-Giorgio V, Davies JG, Jeannin JF, Jeannin JF. Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid a om 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17: 299-306.
- Özer H, Aslan İ, Oruç MT, Çöpelci Y, Afşar E, Kaya S, Aslan M. Early postoperative changes of sphingomyelins and ceramides after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids in Health and Disease.* 2018; 17: 1-11.
- Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha ($er\alpha$) and beta ($er\beta$): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014; 90: 13-29.
- Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *Febs j.* 2018; 285: 416-431.
- Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W, Zeng C. Pi3k/akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: Are we making headway? *Front Oncol.* 2022; 12: 819128.
- Peng Z, Li H, Gao Y, Sun L, Jiang J, Xia B , ve ark. Sintilimab combined with bevacizumab in relapsed or persistent ovarian clear cell carcinoma (inova): A multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2024; 25: 1288-1297.
- Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting pi3k/akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol.* 2014; 4: 64.
- Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10: 489-503.
- Raphael J, Desautels D, Pritchard KI, Petkova E, Shah PS. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors in advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2018; 91: 38-46.
- Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: An overview. *Am Fam Physician.* 2009; 80: 609-616.
- Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DS. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2009; 2 Suppl 1: 205-214.
- Sayek İ. *Temel cerrahi.* Ankara: Güneş Kitabevi; 2004.
- Schilling JD, Machkovech HM, He L, Sidhu R, Fujiwara H, Weber K , ve ark. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. *J Biol Chem.* 2013; 288: 2923-2932.
- Schubert KM, Scheid MP, Duronio V. Ceramide inhibits protein kinase b/akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13330-13335.
- Schüler-Toprak S, Moehle C, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Effect of estrogen receptor β agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 2017; 17: 319.
- Shariati M, Evans KW, Zheng X, Bristow CA, Ng PK, Rizvi YQ , ve ark. Combined inhibition of ddr1 and cdk4/6 induces synergistic effects in er-positive, her2-negative breast cancer with pik3ca/akt1 mutations. *Oncogene.* 2021; 40: 4425-4439.

- Sharifi-Rad J, Seidel V, Izabela M, Monserrat-Mequida M, Sureda A, Ormazabal V, et al. Phenolic compounds as nrf2 inhibitors: Potential applications in cancer therapy. *Cell Commun Signal*. 2023; 21: 89.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 1955-1968.
- Sharma VR, Gupta GK, Sharma AK, Batra N, Sharma DK, Joshi A, Sharma AK. Pi3k/akt/mTOR intracellular pathway and breast cancer: Factors, mechanism and regulation. *Curr Pharm Des*. 2017; 23: 1633-1638.
- Shi WF, Bartlett JS. Estrogen plays a critical role in aav2-mediated gene transfer in ovarian cancer. *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29: 1440-1450.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973; 51: 1409-1416.
- Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, McFarlane C, Hebbard L. Targeting the pi3k/akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomedicines*. 2021; 9.
- Sun K, Luo J, Guo J, Yao X, Jing X, Guo F. The pi3k/akt/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: A narrative review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020; 28: 400-409.
- Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34: 1774-1780.
- Tallima H, Azzazy HME, El Ridi R. Cell surface sphingomyelin: Key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. *Lipids Health Dis*. 2021; 20: 150.
- Tewari D, Patni P, Bishayee A, Sah AN, Bishayee A. Natural products targeting the pi3k-akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. *Semin Cancer Biol*. 2022; 80: 1-17.
- Tian JM, Ran B, Zhang CL, Yan DM, Li XH. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin g1 expression. *Braz J Med Biol Res*. 2018; 51: 1-7.
- Tryggvadottir L, Olafsdottir EJ, Gudlaugsdottir S, Thorlacius S, Jonasson JG, Tulinius H, Eyfjord JE. Brca2 mutation carriers, reproductive factors and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2003; 5: R121-128.
- Tufail M, Hu JJ, Liang J, He CY, Wan WD, Huang YQ, et al. Predictive, preventive, and personalized medicine in breast cancer: Targeting the pi3k pathway. *J Transl Med*. 2024; 22: 15.
- Tuorkey MJ. Cancer therapy with phytochemicals: Present and future perspectives. *Biomed Environ Sci*. 2015; 28: 808-819.
- Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: Past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008; 9: 321-345.
- Vannucci L. Stroma as an active player in the development of the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2015; 8: 159-166.
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 1684-1691.
- Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, CM. Estradiol downregulates mir-21 expression and increases mir-21 target gene expression in mcf-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: 2584-2595.
- Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MW. Gray's anatomy: The anatomical basis of medicine and surgery. 38th Edition ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.
- Wylaż M, Kaczmarek A, Pajor D, Hryniewicki M, Gil D, Dulińska-Litewka J. Exploring the role of pi3k/akt/mTOR inhibitors in hormone-related cancers: A focus on breast and prostate cancer. *Biomed Pharmacother*. 2023; 168: 115676.
- Xu XL, Huang ZY, Yu K, Li J, Fu XW, Deng SL. Estrogen biosynthesis and signal transduction in ovarian disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 827032.

- Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H , ve ark. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PLoS One*. 2014; 9: e109980.
- Yepuri N, Dhawan R, Cooney M, Pruekprasert N, Meng Q, Cooney RN. Sparstolonin b: A unique anti-inflammatory agent. *Shock*. 2019; 52: 568-576.
- Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catasus L, Abal M, Colas E , ve ark. Endometrial carcinoma: Molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene*. 2013; 32: 403-413.
- Yıldırım M. Topografik anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000.
- Yoo KH, Lim TJ, Chang SG. Monthly intravesical bacillus calmette-guérin maintenance therapy for non-muscle-invasive bladder cancer: 10-year experience in a single institute. *Exp Ther Med*. 2012; 3: 221-225.
- Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: The role of pi3k/akt/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*. 2016; 143: 3050-3060.
- Yu L, Wei J, Liu P. Attacking the pi3k/akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2022; 85: 69-94.
- Yu X, Zhang X, Dhakal IB, Beggs M, Kadlubar S, Luo D. Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012; 12: 29.
- Yue W, Yager JD, Wang JP, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*. 2013; 78: 161-170.
- Zhang HP, Jiang RY, Zhu JY, Sun KN, Huang Y, Zhou HH , ve ark. Pi3k/akt/mTOR signaling pathway: An important driver and therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2024; 31: 539-551.
- Zhang M, Lu Q, Hou H, Sun D, Chen M, Ning F , ve ark. Garcinol inhibits the proliferation of endometrial cancer cells by inducing cell cycle arrest. *Oncol Rep*. 2021; 45: 630-640.
- Zhang YB, He FL, Fang M, Hua TF, Hu BD, Zhang ZH , ve ark. Increased expression of toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2009; 36: 1475-1481.
- Zhou Q, Lui VW, Yeo W. Targeting the pi3k/akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol*. 2011; 7: 1149-1167.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. Mtor: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12: 21-35.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yağmur	Uyruğu	
Soyadı	DİLBER	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2007
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2014

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Özel İzmir Şifa Üniversitesi	2013-2014
Öğretim Görevlisi	Özel İzmir Şifa Üniversitesi	2014-2016

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	65

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sıçan testis porsiyonu iskemi/reperfüzyon hasarında PI3K-Akt-mTOR yolakları üzerinden CAPE ve EGCG'nin koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2 yıl-2012
Deneysel testis torsiyonunda detorsiyon sonrası tunika albuginea insizyonunun testis dokusu üzerine etkisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2 yıl-2013
Meme kanseri hücre hattında kızılçam (pinus brutia) kabuk ekstratının antikanserojen etkisinin incelenmesi	TÜBİTAK-2209	2013
Sıçan Hipertansif Hipertrofik Kardiyomiyopati Modelinde Aurantiamit Asetatın Koruyucu Etkisinin Araştırılması	TÜBİTAK-1002	2025

Burslar-Ödüller:

YÖK 100/2000 Bursiyeri

1)“Proje 3.lük Ödülü”, Meme Kanseri Hücre Hattında Kızılçam (pinus brutia) Kabuk Ekstratının Antikanserojen Etkisinin İncelenmesi”, Celal Bayar Üniversitesi Projen Var mı yarışması, Manisa, 28-29 Mart 2013

2)“Young Scientist Travel Award” at the 16th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry hosted by the Society for Histochemistry, Prague, August, 28-31 2022

Yayınlar ve Bildiriler:

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1) Gungorduk, K., Ertas, I. E., Sahbaz, A., Ozvural, S., **Sarica, Y.**, Ozdemir, A., ... & Yildirim, Y. (2014). Immunolocalization of ERK1/2 and p-AKT in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and early and advanced stage endometrioid endometrial adenocancer and their prognostic significance in malignant group. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 179, 147-152. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.05.040. Epub 2014 Jun5(**SCIE**)
- 2) Aral, C.A., Dilber, E., Aral, K., **Sarica, Y.**, & Sivriköz, O.N. (2015). Management of cyclosporine and nifedipine-induced gingival hyperplasia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(12), ZD12. doi: 10.7860/JCDR/2015/14737.6974 (**ESCI**)
- 3) **Dilber, Y.**, Inan, S., Ercan, G., & Sencan, A. (2016). The role of CAPE in PI3K/AKT/mTOR activation and oxidative stress on testis torsion. *Acta histochemica*, 118(1), 31-37. doi: 10.1016/j.acthis.2015.11.004. Epub 2015 Nov 30 (**SCI-E**)
- 4) **Yagmur Dilber**, Hanife Tugçe Çeker, Aleyna Öztüzün, Bürke Çırçırılı, Esma Kırmılioğlu, Zerrin Barut, Mutay Aslan. Sparstolonin B Reduces Estrogen-Dependent Proliferation in Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and PI3K/AKT/mTOR Inhibition. *Pharmaceuticals* 2024, 17, 1564. <https://doi.org/10.3390/ph17121564> (**SCI-E**)

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1)Emirdar, V., Ekizceli, G., **Dilber, Y.**, Inan, S., & Sancı, M. (2021). Immunolocalization of FOXP3, JAK1 and STAT5 in preeclamptic, intrauterine growth restricted and gestational diabetic human placentas. *Aegean Journal of Obstetrics and Gynecology*, 3(3), 73-77. doi: <https://doi.org/10.46328/aejog.v3i3.101> (**Diğer hakemli Endeks**)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1) Inan, S., **Sarica, Y.**, Ercan, G., Sencan, A. Protective effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester through PI3K/AKT/mTOR pathway on ischemia-reperfusion damage in rat testicular tissue. 20th Electron Microscopy Congress (EMC), Regensburg/Germany, August 25-30, 2013
- 2) Uluer, E.T., Kivanc, M., **Sarica, Y.**, Evirgen, S., Inan, S. Evalution of rapamycin Effects on MDA-MB 231 breast cancer cell using immunohistochemistry and TUNEL methods. 20 th Electron Microscopy Congress (EMC), Regensburg/Germany, August 25-30, 2013
- 3) **Sarica, Y.**, Inan, S., Ercan, G., Sencan, A. The effects of epigallocatechin-3-gallate through pi3k/akt/mTOR pathway on ischemia-reperfusion damage in rat testicular tissue. 14th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox States & Antioxidants, Paris/France, 12-13 June 2014
- 4) **Sarica, Y.**, Inan, S. Is CAPE required for spermatogonial stem cell on testicular ischemia damage? 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, Antalya/Türkiye, 15-18 October 2015
- 5) Inan, S., **Sarica, Y.**, Ercan, G., Sencan, A. The effects of EGCG and CAPE through PI3K/Akt/mTOR pathway on ischemia-reperfusion damage in rat testicular tissue. 41st FEBS Congress, Kusadasi/Aydın/Türkiye, 3-8 September 2016
- 6) **Dilber, Y.**, Inan, S., Ercan, G., Sencan, A., The effect of EGCG anti-apoptotic pathway on ischemia-reperfusion damage in rat testicular tissue. 16th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Prague/ Czech Republic, 28–31 August 2022

- 7) **Dilber, Y.**, Ceker, H.T., Oztuzun, A., Aslan, M. Inhibition of estrogen-dependent proliferation in breast cancer cells by sparstolin B. 33rd International Biochemical Congress, İzmir/Türkiye, 26-30 October 2022(**Sözlü Sunu**)
- 8) **Dilber, Y.**, Ceker, H.T., Oztuzun, A., Aslan, M. Inhibition of estrogen-dependent proliferation in breast and ovarian cancer cells by sparstolonin B. 35th International Biochemical Congress, Antalya/Türkiye, 28-31 October 2024 (**Sözlü Sunu**)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1) Evirgen, G., **Sarica, Y.**, Inan, S., Ozbilgin, K., Sancı, M., Emirdar, V. Gebelik ile ilgili IUGG, preeklampsi ve gestasyonel diabetes mellitus'ta göbek kordonu ve plasentada FOXP3, JAK ve STAT immunoreaktivitelerinin değerlendirilmesi. 11. Uluslararası Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Denizli/Türkiye, 16-19 Mayıs 2012
- 2) Sancı, M., Emirdar, V., Inan, S., Karaca, F., Evirgen, G., **Sarica, Y.**, Seyhan, S. mTOR ve ERK yollarının uterus düz kas tümörleri ile ilişkisi, 13.Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi, Antalya/Türkiye, 7-11 Kasım 2012
- 3) **Sarica, Y.**, Inan, S., Sencan, A., Ercan., G. Sıçan testis torsiyonu, iskemi/reperfüzyon hasarında, Caffeic Asid Phenethyl Ester (CAPE)'nin koruyucu etkilerinin PI3K-Akt-mTOR yolları üzerinden değerlendirilmesi. 1. Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, İzmir/Türkiye, 6-7 Nisan 2013 (**Sözlü sunu**)
- 4) Uluer, E., **Sarica, Y.**, Kivanc, M., Evirgen, G., Inan, S. MCF-7 meme kanseri hücre hattında rapamycin sitotoksitesinin indirek immünohistokimyasal ve tunel yöntemleri ile değerlendirilmesi. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Mersin/Türkiye, 28-31 Mayıs 2013
- 5) Yesil, H., Inan, S., Sancı, M., Solmaz, U., Ayaz, D., **Sarica, Y.**, Gokcu, M. Endometriyum kanserlerinde hyaluronan reseptörü CD44S ve HAS2'nin rolü. Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, Kocaeli/Türkiye, 20-23 Mart 2014.
- 6) **Sarica, Y.**, Inan, S., Sencan, A., Ercan, G. Testis I/R Hasarında CAPE'nin anti-apoptotik etkisinin değerlendirilmesi. 2. Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, Aydın/Türkiye, 17-20 Nisan 2014 (**Sözlü sunu**)
- 7) **Sarica Y.**, Uluer, E.T., Seyhan, S., Sancı, M., Inan, S. Endometriyal hiperplazi ve kanserlerinde apoptotik yolların rolü. 12. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara/Türkiye, 27-30 Mayıs 2014

- 8) Ozgul, M., Uluer E.T., **Sarica, Y.**, Onal, T., Firat, F., Inan, S. Akciğer kanser hücre hattında antioksidan kullanımının apoptotik yollar ve TGF- β dağılımı üzerine etkisi. 12. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara/Türkiye, 27-30 Mayıs 2014
- 9) Inan, S., Uluer, E.T., **Sarica, Y.**, Celik, M., Korkmaz, M., Olmez, E., Ozbilgin, K. Akciğer Kanser hücre hattında EGCG ve CAPE'nin VEGF ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerine etkileri. 12. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara/Türkiye, 27-30 Mayıs 2014
- 10) Uluer, E.T., **Sarica, Y.**, Seyhan, S., Sancı, M., Inan, S. Normal ve Patolojik Endometriyum'da E-Kaderin, β -Katenin ve MMP9 dağılımlarının incelenmesi. 12. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara/Türkiye, 27-30 Mayıs 2014
- 11) Ekizceli, G., **Sarica, Y.**, Sancı, M., Emirdar, V., Taner, C.E., Ozeren, M., Inan, S. Gebelikle ilişkili diabetes mellitus, Pre-eklampsı ve IUGG olgularında elde edilen plasenta örneklerinde PI3K/AKT/mTOR yolağının değerlendirilmesi. 12. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara/Türkiye, 27-30 Mayıs 2014
- 12) Gultekin, A., Sencan, S., Inan, S., **Sarica, Y.**, Gunsar, C., Karadag, C., Erdem, R. Deneyisel testis torsiyonunda detorsiyon sonrası tunika albuginea insizyonunun testis dokusu üzerine etkisi. 32. Ulusal Çocuk Cerrahi Kongresi, Trabzon/Türkiye, 17-20 Eylül 2014. **(Sözlü Sunu)**
- 13) **Sarica, Y.**, Celik, M., Inan, S. Testis Torsiyonunda Kan-Testis Bariyerinde CAPE'nin Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi. 22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2-4 Eylül 2015, Sabancı Üniversitesi/İstanbul/Türkiye **(Sözlü Sunu)**