

**FARKLI İNSAN MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE
ELLAJİK ASİTİN SİTOTOKSİK ETKİSİ**

Nilüfer ERENOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz, 2012

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 1105F090 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nilüfer Erenoğlu'nun “Farklı İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Ellajik Asitin Sitotoksik Etkisi” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 18.06.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı – Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. H. MEHTAP KUTLU	
Üye :	Yard. Doç. Dr. GÜLŞEN AKALIN	
Üye :	Yard. Doç. Dr. HÜSEYİN BERBER	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI İNSAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ELLAJİK ASİTİN SİTOTOKSİK ETKİSİ

Nilüfer ERENOĞLU

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. H. Mehtap KUTLU

İkinci Danışman: Doç. Dr. G. Güven BUDAK

2012, 87 Sayfa

Bu çalışmada Ellajik asitin insan meme kanseri hücre serileri olan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, ellajik asitin 10 farklı dozu (5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM, 100µM, 150µM, 200µM, 250µM) 72 ve 96 saat süreyle hücrelere uygulanmıştır. Kullanılan MTT sitotoksikite testi sonuçlarına göre, uygulanan doza ve zamana bağlı olarak kontrole göre canlı hücre sayısında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma, ölü hücre sayısında ise anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Floresan Mikroskobunda morfolojik kriterleri incelenen hücrelere MTT sitotoksikite testi sonucu bulunan EC 50 değeri uygulandı. 72 ve 96 saat süreyle ellajik asit uygulanması sonucu hücreler de hacim kaybı, nükleer kondensasyon, apoptotik cisim oluşumları belirlendi.

Ellajik asitin SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı etkisi araştırılıp, karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, ellajik asitin hücreler üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Ellajik asit, MTT, TEM, Floresan Mikroskop

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CYTOTOXICITY EFFECTS OF ELLAGIC ACID ON DIFFERENT HUMAN BREAST CANCER CELLS

Nilüfer ERENOĞLU

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. G. Gürer BUDAK

2012, 87 Pages

In this study, the SKBR-3 and MDA-MB-231 which are human breast cancer cell lines were investigated on the cytotoxic effect of ellagic acid. For this purpose, 10 different dose ellagic acid (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M) is applied to cells for 72 and 96 hours. According to the results of the MTT cytotoxicity tests, the number of living cells is decreased, the number of dead cells is increased by depend on time and dose.

After microscopy analysis via transmission electron microscope (TEM) and fluorescence microscope performed, half maximal effective concentration (EC₅₀) was determined for the cells being tested with MTT cytotoxicity assay. Upon ellagic acid addition to cells at 72h and 96h after, the experiment resulted with loss in cell volume, nucleus condensation and apoptotic body formation.

Effect of ellagic acid on SKBR-3 and MDA-MB-231 cells was investigated compared with respect to dosage concentration of ellagic acid and time. As a result, ellagic acid had cytotoxic effects on cells by time and dose dependend manner.

Keywords: Cancer, Ellagic acid, MTT, TEM, Fluorescence Microscopy

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesinde ve çalışmalarım süresince destek ve ilgisini esirgemeyen bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Mehtap KUTLU'ya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yapıcı bilgi ve önerileriyle beni destekleyen eş danışmanım Sayın hocam Doç. Dr. Gürer Güven BUDAK 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Beni her zaman güleryüzle karşılayan, laboratuarda yardımlarını, emeğini esirgemeyen arkadaşım Biyolog Arzu İŞCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi katkılarını hiç bir zaman esirgemeyen, beni anlayışla karşılayan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Nilüfer ERENOĞLU

Temmuz, 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x

1.GİRİŞ.....	1
--------------	---

1.1.KANSERİN BİYOKİMYASI.....	3
1.1.1. Kanser Oluşumunun Moleküler Mekanizması.....	5
1.2. HÜCRE YAŞAM DÖNGÜSÜ ve KANSER.....	9
1.2.1. Hücre Yaşam Döngüsü.....	9
1.2.2. Hücre Döngüsünün Regülasyonu.....	10
1.2.3. Hücre Döngüsü ve Kanser İlişkisi.....	12
1.3. APOPTOZ ve KANSER.....	12
1.3.1. Apoptozun Mekanizması.....	13
1.3.2. Apoptozun Genetik Düzenlemesi.....	15
1.3.3. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler ve Nekroz İle Arasındaki Farklar.....	18
1.3.4. Apoptozun Aşamaları.....	19
1.3.5. Apoptozu Belirleme Yöntemleri.....	20
1.3.6. Apoptoz ve Kanser Arasındaki İlişki.....	20
1.4. MEME KANSERİ.....	21
1.4.1. Meme Kanseri Belirtileri.....	23
1.4.2. Meme Kanserine Yakalanmada Etkili Olan Risk Faktörleri.....	25
1.4.3. Meme Kanserinin Biyolojik Davranışı.....	27
1.4.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	28

1.4.5. Meme Kanserinin Genetiği	29
1.5. FENOLİK BİLEŞİKLER	30
1.5.1. Ellajik Asit	31
1.5.2. Ellajik Asitin Kimyasal Yapısı	32
1.5.3. Ellajik Asitin Biyolojik Aktivitesi	33
1.5.4. Ellajik Asitin Etki Mekanizması	34
1.5.5. Ellajik Asitin Kanser Tedavisindeki Yeri	34
1.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ	35
1.6.1. Hücre Kültürü Tarihçesi	37
1.6.2. Hücrelerin İnkübasyonu ve Bakımı	38
1.7. MEME KANSERİNİ ÇALIŞMADA MODEL SİSTEMLER	39
1.7.1. MDA-MB-231 Hücre Hattının Özellikleri	41
1.7.2. SKBR-3 Hücre Hattının Özellikleri	42
2. MATERYAL ve METOD	43
2.1. MATERYAL	43
2.1.1. Hücre Serileri	43
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
2.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	43
2.1.4. Kullanılan Cihazlar	43
2.2. METOD	44
2.2.1. Hücre Kültürü	44
2.2.1.1. Sterilizasyon	44
2.2.1.2. Kullanılan besiyeri ve hazırlanışı	44
2.2.1.3. Hücre serilerinin kültüre edilmesi	44
2.2.1.4. Hücre serilerinin pasajlanması	45
2.2.1.5. Hücre serilerinin stoklanması	45
2.2.1.6. Tripan mavisi ile hücrelerin sayımı	45
2.2.1.7. Hücre serilerinin ikilenme zamanının hesaplanması	46
2.2.2. Ellajik Asit Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Hücre Serileri ile Etkileşimi	47

2.2.3. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) Sitotoksosite Testi.....	47
2.2.4. Floresan Mikroskop ile Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi.....	48
2.2.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi.....	49
2.2.6. EC 50 Değerinin Hesaplanması.....	51
3. BULGULAR	52
3.1. MTT Sitotoksosite Bulguları.....	52
3.1.1. Ellajik Asitin SKBR-3 Hücrelerinde Doz ve Zamana Bağlı Sitotoksik Etkisini Değerlendirme Bulguları.....	52
3.1.2. Ellajik Asitin MDA-MB-231 Hücrelerinde Doz ve Zamana Bağlı Sitotoksik Etkisini Değerlendirme Bulguları.....	54
3.2. Floresan Mikroskop ile Morfolojik İnceleme Bulguları.....	56
3.2.1. Ellajik asitin EC 50 değerinin SKBR-3 hücrelerindeki yapısal değişikliklerin floresan mikroskobu inceleme bulguları.....	56
3.2.2. Ellajik asitin EC 50 değerinin MDA-MB-231 hücrelerindeki yapısal değişikliklerin floresan mikroskobu inceleme bulguları.....	62
3.3. Geçirimli Elektron Mikroskop ile İnce Yapısal Değişiklik İnceleme Bulguları.....	68
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Kanser hücrelerini normal hücreden farklılaştıran özellikler.....	5
1.2. Karsinogenezis’de apoptoz ile ilgili olabilecek genler/proteinler.....	8
1.3. Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları.....	11
1.4. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü mekanizmalarının karakteristik özellikleri.....	15
1.5. p53 proteininin apoptoz üzerine etkisi.....	16
1.6. Bcl-2 onkoproteininin apoptoz üzerine etkisi.....	17
1.7. Meme kanseri gelişim basamakları.....	23
1.8. Ellajik Asit Kimyasal Yapısı.....	33
3.1. Ellajik asitin uygulandığı SKBR-3 hücrelerinin 72 ve 96 saatlik hücre canlılığı grafiği.....	53
3.2. Ellajik asitin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinin 72 ve 96 saatlik hücre canlılığı grafiği.....	55
3.3. Akridin oranj ile boyanan SKBR-3 hücrelerinin 72. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	56
3.4. Akridin oranj ile boyanan SKBR-3 hücrelerinin 96. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	57
3.5. Ellajik asitin EC 50 değerinin 72. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerinde yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi.....	58
3.6. Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerinde yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi.....	59
3.7. Akridin oranj ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	62
3.8. Akridin oranj ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinin	

96. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	63
3.9. Ellajik asitin EC 50 değerinin 72. saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskobunda değerlendirilmesi.....	65
3.10. Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskobunda değerlendirilmesi.....	66
3.11. Ellajik asitin EC 50 değerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin taramalı elektron mikroskobunda değerlendirilmesi.....	68
3.12. Ellajik asitin EC 50 değerinin SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin taramalı elektron mikroskobunda değerlendirilmesi.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar.....	19
1.2. Meme Kanserinde Başlangıç Semptomları.....	24
1.3. Meme Kanseri Gelişimindeki Risk Faktörleri.....	25
1.4. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması.....	29
1.5. Meme kanserinin hücre düzeyinde modellenmesi olan hücre hatlarının özellikleri.....	36
1.6. Yaygın Olarak Kullanılan Hücre Serileri.....	39
1.7. Memeli hücresi için hücre kültürü besiyerinin bileşenleri.....	40
3.1. Ellajik asidin uygulandığı SKBR-3 hücrelerinin 72 ve 96 saat canlılık yüzde değerleri.....	53
3.2. Ellajik asidin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinin 72 ve 96 saat canlılık yüzde değerleri.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
AO:	Akridin oranj
Apaf-1:	Apoptotic protease activating factor
ATP:	Adenozin trifosfat
ASP:	Aspartik asit
CDK:	Siklin bağımlı kinazlar
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
FBS:	Fetal Bovine Serum
FS:	Fosfotidil serin
GC:	Glukortikoid
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
MTT:	3-(4,5-dimitiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrozolyum bromit
PAH:	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PBS:	Phosphate buffered salina
RES:	Retiküloendotelyal sistem
RNA:	Ribo nükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SERM:	Sentetik seçici östrojen reseptör modülatörü
SOD:	Süperoksit dismutaz
TEM:	Geçirimli Elektron Mikroskop
µM :	Mikromol

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Kanser, dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kanser, hücrenin genetik materyali tarafından kontrol edilen hücre döngüsünün normal sürecinde ortaya çıkan bir hastalıktır. Kansere yanlış beslenme, genetik yatkınlık ya da yaşanılan çevre neden olabilir (Reddy ve ark., 2003). Kanser türleri açısından bakıldığında meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Aslan ve ark., 2007). Yaklaşık olarak her 8,2 kadından birinde bütün yaşamı boyunca meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından birinin meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, Türkiye'de 1999 yılında kadınlarda en sık rastlanılan kanser türünün, %24,1 oranında meme kanseri olduğu bildirilmektedir (Aslan ve ark., 2007).

Çağımızda halk sağlığı ve tıbbi amaçlar için en önemli konulardan biri kanserden korunmadır. Yaklaşık yirmi yıldan beri doğal ürünlerde bulunan koruyucu maddelerin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan bütün suni maddeler toksik olarak bilinmektedir ve sağlam hücrelere ciddi zarar vermektedirler. Bu nedenle kanserden korunmak için yada kemoterapi amacıyla doğal ürünlerin kullanımı kansere yakalanma sıklığını azaltabilir. Tıbbi bitkilerde bulunan, günlük alımla vücudumuza giren antioksidanlar, kimyasal olarak üretilmiş antikanser ajanlara bir alternatif olabilirler (Reed, 1999).

Flavonoidler, polifenolik bileşikler olup bitki orjinli yapılardır. Flavonoidlerin, hücre sistemi içerisinde çeşitli biyolojik etkileri vardır. Flavonoidlerin antiviral, antimikrobiyal, antiülserojenik, antineoplastik, antioksidan, anti-inflamatuar ve antitrombosit aktivitelerinin var olduğu tespit edilmiştir. Flavonoidler reaktif oksijen türleri (ROT) zararını engelleyebilirler. Serbest radikallere karşı direkt olarak savunucu olarak kullanılabilirler (Hanasaki ve ark., 1994).

Ellajik asit, bitkilerde fenol yapısında doğal olarak bulunur ve anti-mutajenik, anti-kanserojenik aktivitesi olan bir maddedir (Smerak ve ark., 2002).

Ellajik asitin, DNA' da oksidatif zararların büyük bir kısmını engelleyerek kanser gelişmesini büyük ölçüde durdurduğu yönündeki bilgiler artmaktadır (Muhktar ve ark., 1986). Ellajitaninlerin bazı kimyasal işlemler geçirmesi sonucu ellajik asit oluşmaktadır. Ellajik asitin bir hücre tarafından algılanması ve kullanılabilmesi için uygun bir formda bulunması gerekmektedir. Bu yarayışlı form şeker molekülleri ile birleşmesi sonucunda sağlanmaktadır. Kanser hücrelerinin enerji ihtiyaçları çok fazladır ve bu enerjiyi glukoz moleküllerinden sağlamaktadırlar.

Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir.

Son yıllarda malignansinin sadece kontrolsüz hücre çoğalması nedeniyle değil aynı zamanda fizyolojik hücre ölümü apoptozun azalması nedeniyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Reed, 1999). Apoptozun başlatılması ilaç keşif sürecinde yeni bir hedeftir. Bitkilerde bulunan bazı ürünler, malignant hücrelerde apoptoz tetikleyicisi olarak bilinmektedir (Senderowicz, 2004). Ellajik asit vücutta kansere neden olan kimyasalları inaktif hale getirerek antikanserojen ve serbest radikalleri temizleyerek antioksidan etki gösterir. Çalışmalar etkinin hücre tipine, konsantrasyona ve inkübasyon süresine göre değiştiğini göstermektedir. Buna karşın ellajik asitin meme kanser hücrelerine etkisini gösteren çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır ve bu etkinin tipi tam olarak belirlenmiş değildir. Bütün bu bilgiler ışığında çalışmamızda;

1. SKBR-3 meme kanseri hücre serisinde ellajik asitin sitotoksik etkisinin belirlenmesi
2. MDA-MB-231 meme kanseri hücre serisinde ellajik asitin sitotoksik etkisinin belirlenmesi
3. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin Floresan Mikroskopta incelenmesi
4. Hücrelerdeki ince yapısal değişikliklerin Geçirimli Elektron Mikroskobunda incelenmesi amaçlanmaktadır.

1.1. KANSERİN BİYOKİMYASI

Kanser hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengenin kontrolsüz bir şekilde gerçekleşmesi ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser, vücudun herhangi bir organında başlayabilmekte ve yaşamının herhangi bir döneminde herkesi etkileyebilmektedir (Baloğlu, 2001). Kanser, köken aldığı dokuya ve bireye göre farklı karakteristik özellik gösterir. Kanserler yaklaşık % 85 oranında epitel hücrelerde meydana gelir ve karsinoma olarak adlandırılır. Mesoderm hücrelerinden köken alan kansere sarkoma, salgı bezi hücrelerinden köken alan kansere de adenokarsinoma adı verilir. Kanser, iyi huylu (benin) veya kötü huylu (malin) tümör olarak köken aldığı hücre, doku ve organ özelliklerine göre adlandırılır. İyi huylu tümörler (benin) ölümcül değildirler bunun nedeni metastaz yapmamalarıdır. Kötü huylu tümörler (malign) ise invazyon ve metastaz yaptıklarından dolayı organizmanın ölümüne sebep olurlar (Lauren, 2005).

Kanserin oluşum nedenleri tam olarak açıklanamamıştır ve oluşumu tek bir nedenle birlikte düşünülemez. Karsinojenler, kimyasal, fiziksel veya viral kaynaklı olabilirler. Kimyasal karsinogenez, boya, kimyasal, deri ve petrol ürünlerinin üretimi sırasında DNA'nın hasarlanması sonucu oluşmaktadır. Fiziksel karsinogenez ise, radyasyon ve UV ışık sonucu DNA'da meydana gelen hasar ile oluşmaktadır. Radyasyon, DNA'nın kimyasal bağlarında kırıklara yol açarak mutasyona neden olduğunda direkt etki, hücredeki diğer moleküllere zarar vererek serbest radikal oluşturduğunda indirekt etki göstermektedir (Baloğlu, 2001). DNA metilasyonu, DNA'nın genetik istikrarsızlığı gibi epigenetik faktörler ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar da kanser gelişiminde rol oynamaktadır (Sinici, 2004).

Farklı moleküler mekanizmalardaki düzensizlikler her hücre tipinde kansere yol açar. Hanahan ve Weinberg 2000 yılında kanser hücresinin karakteristik özelliklerini şu şekilde tanımlamışlardır:

1) Dışardan gelen çoğalma sinyaline bağımlı olmadan bölünme özelliği kazanmaları

- Kanser hücreleri çoğalma sinyallerine ihtiyaç duymaksızın bölünme potansiyeli kazanırlar.

- Hücrede oluşan mutasyonlar hücrenin çoğalmayı aktive edici yollarında görev alan moleküllerin fonksiyonunu etkileyerek kontrolsüz çoğalmaya sebep olur.

2) Çoğalma sinyallerinin inhibisyonunu sağlayan yollarındaki moleküllerde oluşan mutasyonlar ise;

-Çoğalma sinyallerinin kesintisiz devam etmesine dolayısıyla sürekli bölünmeye neden olur.

3) Apoptozisten kaçabilmeleri

- Kanser hücreleri apoptotik sinyallere duyarsızlaşırlar.

- Apoptozis mekanizmasını düzenleyen yollarındaki moleküllerde oluşan mutasyonlar kanser hücrelerini apoptotik sinyallere karşı duyarsız hale getirir.

4) Limitsiz bölünme potansiyeli kazanmaları

- Kanser hücrelerinde, bölünmeye paralel olarak telomerlerin kısalması söz konusu olmadığından bölünme özellikleri devam eder.

- Telomerlerin uzunluğunun düzenlenmesini kontrol eden mekanizmaları bozan değişimler, kanser hücrelerine sınırsız bölünme potansiyeli kazandırır.

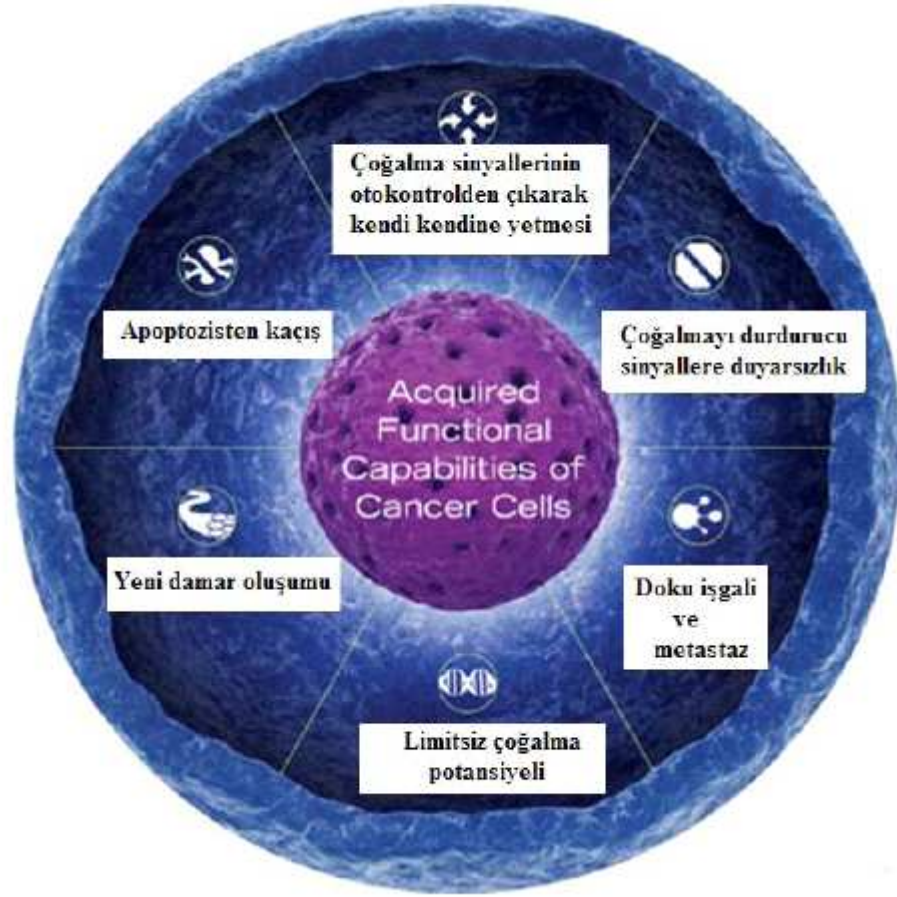
5) Yeni kan damarlarının oluşumu (Anjiyogenez)

- Kanser hücreleri, artan besin ve oksijen ihtiyaçlarını yeni kan damarları oluşturarak sağlarlar

6) İnvazyon ve metastaz yapmaları

- Kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine göçü, vücudun genel homeostazısını bozarak ölüme yol açar.

2005 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre Dünya'daki ölüm oranlarının %13'ü kanserden olmaktadır. WHO verilerine göre 2010 yılında Dünya'da erkeklerde en sık rastlanılan kanser türleri sırayla; akciğer, mide, prostat, kolon/rektum ve karaciğer iken, kadınlarda bu sıra meme, serviks, kolon/rektum, akciğer ve mide olarak sıralanmaktadır (Aksoy, 1984). Ülkemizdeki kanser türleri T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre bu sıralamaya oldukça benzerlik göstermektedir. Erkeklerde en sık görülenler sırayla bronş/akciğer, mide, lenfoma, prostat ve larinks, kadınlarda ise; meme, uterus, bronş/akciğer, mide, lenfoma olarak yer almaktadır (Anonim, 2002).



Şekil 1.1. Kanser hücrelerini normal hücreden farklılaştıran özellikler

1.1.1. Kanser Oluşumunun Moleküler Mekanizması

Kanser, hücrelerde çeşitli hataların birikimiyle ortaya çıkan ve normal hücrelerin metastatik tümör hücrelerine dönüşmesiyle sonuçlanan çok basamaklı bir süreçtir. Bir tümör hücresinin en önemli özelliği; gen ekspresyonundaki değişikliktir. Bu değişiklik tümör hücrelerine normal komşu hücrelerden daha fazla üreme avantajı sağlamaktadır. Bu durum neticesinde hücre kontrolsüz üreme özelliği kazanmaktadır (Aslan, 2010). Proto-onkogenler ve anti-onkogenler (tümör süpresör genler) normal üreme kontrolünü düzenlendiği ortaya konulan farklı tipteki genlerdir. Meme kanseri gelişiminde ve özellikle progresyonunda etkili olduğu düşünülen proto-onkogenler içinde ras, c-erbB-2 ve c-myc onkogenleri vardır. Tümör suppressör genler içinde de en etkili olduğu kabul edilen p53'tür (Berger ve ark., 1988).

a.Proto-onkogenler: Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdir. Proto-onkogenlerde oluşabilecek herhangi bir mutasyon sonucu bu genler onkogenlere dönüşmektedir. Normal hücrelerin gelişimi çoğalmayı artıran onkogenler tarafından düzenlenirken, büyümeyi kısıtlayıcı tümör baskılayıcı genler tarafından da dengelenmektedir. Kanseri, onkogen ekspresyonunun aktivasyonu ve değişimi ile tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya kaybı ile oluşmaktadır (Burtis ve Ashwood, 2005). Günümüzde proto-onkogenlerin; üreme faktörleri, hücre yüzey reseptörleri ve onların ligandını, hücre yüzey reseptörlerinden nükleusa üremeyi stimüle eden sinyalleri taşıyan sinyal moleküllerini (intraseptüler sinyal yolağı bileşenleri), gen ekspresyon oranını kontrol eden nükleer transkripsiyon faktörlerini, hücre siklusunun ilerlemesi, DNA bağlayan proteinler, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptotik hücre oluşumunun moleküler kontrolüne katılan molekülleri ve hücre siklusu yolağındaki bileşenler gibi normal hücre üremesinin regülasyonu için gerekli proteinleri kodladıkları bilinmektedir (Lalloo, 2002; Burtis, 2005). Onkogenler hücresel veya retroviral orijinli genlerdir. Hücresel onkogenler; kanser hücrelerinden DNA elde edildikten sonra, bu DNA'ların normal hücrelere sokulmasıyla hücrelerin kanserleşmesi (DNA transfeksiyonu) yoluyla keşfedilmişlerdir. Retroviral onkogenler (v-onc) hayvan tümörlerinden elde edilmiş hızla transforne edici retrovirüslerde ilk olarak keşfedilmiştir. Hücresel onkogenler hem intronlara hem de ekzonlara sahipken, viral onkogenler sadece ekzonlara sahiptir. (Kopnin,2000; Weinberg, 2007)

- **c-erbB-2:**

Onkogen familyasından olan c-erbB-2, normal hücrelerde tek kopya halinde olup 17. kromozomda lokalizedir. Epidermal GroWth Factor (EGF) ailesinden bir glikoproteini (p185) kodlamaktadır. P185' in intraseptüler komponenti tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir. Ekstrasellüler komponenti ise yapı olarak groWth faktör reseptörlerine benzemektedir. C-erbB-2 aşırı ekspresyonu invaziv duktal karsinomlu hastalarda %25 - 45 olarak izlenmektedir . Genellikle lenf nodu pozitif meme kanserli hastalarda sağ kalım süresinin ve rölaps zamanını belirlemede prognastik faktör olduğu düşünülmektedir. İmmünohistokimyasal olarak c-erbB-2

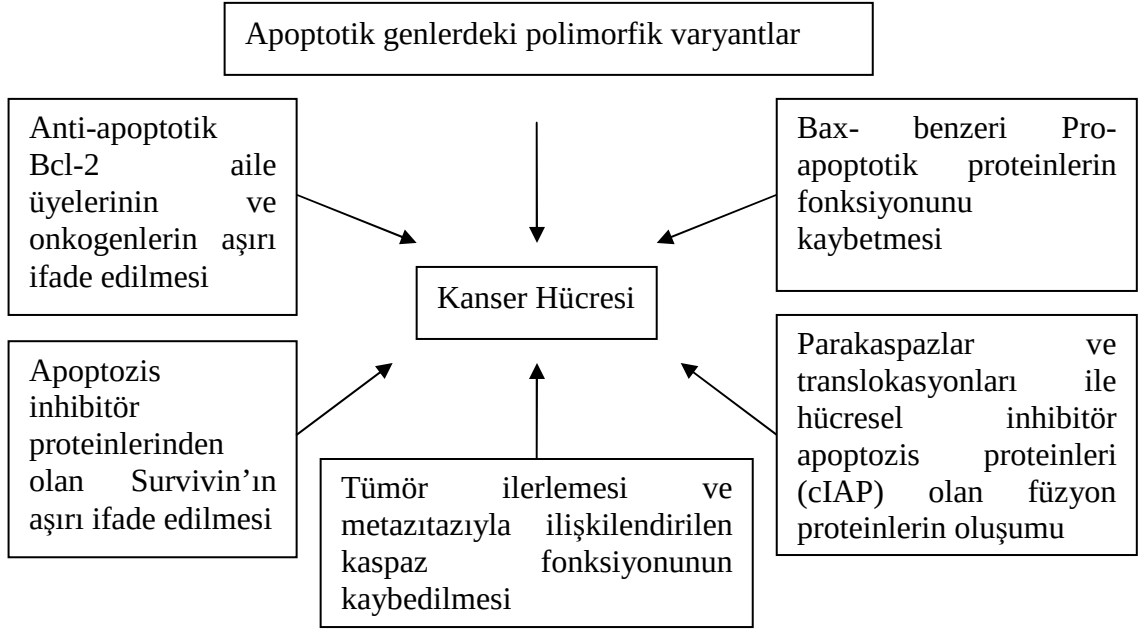
malign hücrelerde sitoplazmik membranda pozitif boyanma şeklinde saptanmaktadır (Karabulut ve ark., 2003).

- **Ras Geni**

Ras genlerindeki (onkogen) mutasyonlar, insan kanserlerindeki onkogenlerin en yaygın anomalilerindendir ve nokta mutasyonu ile aktivasyonun en iyi örneğini oluştururlar (Wang ve ark., 1999). Ras geni p21 olarak adlandırılan molekül ağırlığı 21kDa olan proteinleri kodlayan ve hücrenin çoğalması ve farklılaşmasında temel rol oynayan bir proteindir. p21 proteini tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşime girer ve sinyal iletim yolunu aktive eder. Bu nedenle, bütün ras gen ürünleri GTPaz aktivitesine sahiptir ve hücrenin büyümesini ve farklılaşmasını düzenler (Teich, 1996). Ras gen ailesindeki mutasyonlar çeşitli insan kanserlerinde bulunur. Bu mutasyonların çoğu (12,13 veya 61 kodonda) nokta mutasyonlarıdır. Mutasyona uğramış ras p21 aktive olan proteine (GAP) GTPaz bağlanma yeteneğini engelleyen bir yapıda olur. Böylece guanozin trifosfat (GTP) bağlı aktif durumda p21 tutulur (Buyru ve ark., 2003).

b. Anti-onkogenler (Tümör süpresör genler): Anti-onkogenler hücre proliferasyonunu inhibe eden veya geciktiren genlerdir, inaktive olduklarında kansere neden olmaktadır. Bu genler hücre genlerdir; büyüme faktörünü baskılayarak tümör bölünmesini engellerler. Aynı zamanda bu genlerin büyümeyi düzenleyici veya hücre adezyon ve proteaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi tümör hücrelerinin yayılmasını sağlayan, metastazı etkileyebilecek işlevleri vardır (Aslan, 2010)

Tümör süpresörlere örnek olarak Retinoblastoma (Rb) geni, Antijen Sunucu Hücre (ASH) geni (kolon kanseri), WT1 (böbrekte Wilm's tümör), BRCA1 ve BRCA2 (meme kanseri), INK4A, p53 (bir çok dokuda bulunabilmektedir) ve p16 genleri örnek olarak verilebilir (Lalloo, 2002).



Şekil 1.2. Karsinogenezis’de apoptozis ile ilgili olabilecek genler/proteinler (Ekmekçi ve ark.,2008)

• BRCA1-BRCA2

Meme kanser sendromundan sorumlu tümör süpresör genleri BRCA1 ve BRCA2’dir. Bu genler, DNA hasarına karşı oluşan hücresel yanıtta rol oynayan proteinleri kodlarlar. Hücre siklusunda negatif regülatör olarak fonksiyon görürler ve neoplastik progresyonun aktif inhibitörüdürler. BRCA1 geni 17q21 kromozomu üzerinde lokalizedir. 24 eksonu vardır (22 kodlama eksonu, alternatif 5’UTR eksonları, 1a ve 1b). BRCA1’in ekson 11’i (3.4 kb), 1863 amino asitlik proteinin % 61’ini kodlar. BRCA2, kromozom 13q12.3’te lokalizedir. 27 eksondan oluşmuştur, en büyüğü (4.9 kb) ekson 11’dir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar meme kanseri riskini büyük ölçüde artırmaktadır. Gerçekte normal genetik yapının bir parçası olarak herkes bu genleri taşır, meme kanseri açısından risk altındaki kişiler ise bu genlerde mutasyona sahiptirler. Bu genlerindeki mutasyonlar, heterozigot taşıyıcılar için meme kanseri açısından kuvvetli predispozan faktördürler (Meindl, 2002).

- **p53 Geni:**

p53 proteini transkripsiyon faktörü işlevine sahip 393 amino asitten oluşan bir proteindir. p53 geninin kodlanması, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmış 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından gerçekleştirilmektedir. p53 proteini DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücreyel olayda rol almaktadır (Haris, 1996).

Herhangi bir DNA hasarı oluşması durumunda, p53 geninin ürünü olan protein, hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasında sentezlenir ve hücrenin S evresine girmeden G1 evresinde bekletilmesini sağlar (Spandidos, 2007; Sandal, 2002; Weinberg, 2007). p53 geninin aktive olması, BAX, Bcl-2 ve diğer apoptozu kontrol eden genlerin ekspresyonunu ortadan kaldırır ve hücre döngüsünü durduran p21^{WAF1} ve GADD45 genlerinin ekspresyonunu sağlar (Kopnin, 2000)

1.2. HÜCRE YAŞAM DÖNGÜSÜ ve KANSER

1.2.1. Hücre Yaşam Döngüsü

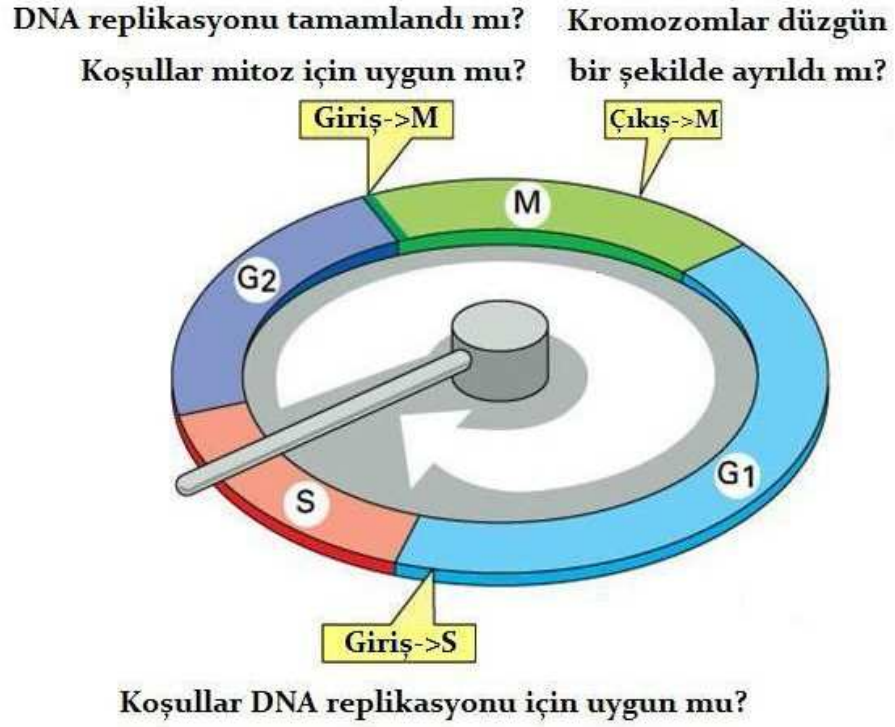
Hücre siklusu sürecinde çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede bir dizi geçici biyokimyasal aktivite ve morfolojik değişiklikler görülmektedir. Bir sıklusa giren hücre, döngüyü morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla tamamlar. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitozis ile gerçekleşir. Hücreler mitozise girmeden önce hacimce büyüdükleri bir hazırlık evresi geçirirler. Bu hazırlık evresinde bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. Siklin'ler) ve makromoleküller (Örn. Deoksiribonükleik asit'ler) sentezlenir. Bu hazırlık evresine de interfaz adı verilmektedir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden (fazlardan) oluşur. Mitozis ve interfaz beraberce hücre siklusu olarak bilinen bir süreci oluştururlar (Ulukaya, 2003).

İnterfaz sürecinin ilk fazı **G1**, mitozun (M) bitişi ile DNA sentezinin (S) başlangıcı arasında kalan sürece verilen isimdir. Bu faz DNA sentezine yani replikasyona hazırlık fazıdır. Hücre bu fazda replikasyon için gerekli olan çeşitli

proteinlerin sentezini gerçekleştirir. **S fazı** DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. Kromozom sentezi bu fazda tamamlanmasına rağmen kardeş kromatidler birbirinden ayrılmaz, bu sayede hücre diploid özelliği korunmuş olur. Sentez tamamlandıktan sonra hücre **G2** fazına geçer, bu faz mitoz hazırlık fazıdır. Mitoz sürecinde gerekli olan mikrotübüller G2 fazında sentezlenir. **Mitoz (M) fazında** ise nükleusun (karyokinez) ve sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesi gerçekleşir. Bu fazda kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılması ve mikrotübüller aracılığı ile hücrenin zıt kutuplarına taşınması gerçekleşir. Mitoz fazı sonucunda iki yeni hücre meydana gelmektedir (Alberts ve ark., 2002).

1.2.2. Hücre Döngüsünün Regülasyonu

Hücrenin yaşam döngüsü siklinler ve siklin bağımlı kinazlar adı verilen çeşitli proteinler aracılığı ile kontrol edilir. Siklinlerin baskılanması hücre yaşam döngüsünün duraksamasına neden olur (Nigg, 1995). Kontrol noktaları hücre yaşam döngüsünde hücrenin bir fazdan diğerine geçişi için çeşitli faktörlerin uygunluğunun kontrol edildiği süreçlerdir (Şekil 1.3). Bu kontrol noktalarında hücrenin içerisinde bulunduğu fazın tamamlanıp tamamlanmadığı ve bir sonraki faza geçiş için koşulların uygun olup olmadığı kontrol edilir (Stephen, 1996). Bu kontrol noktalarından, G1-S kontrol noktasında hücrenin replikasyon için hazır olup olmadığı, G2-M kontrol noktasında hücrenin mitoz için uygun olup olmadığı, M-G1 kontrol noktasında ise kromozomların yerleşimi kontrol edilir (Alberts ve ark., 2007).



Şekil 1.3. Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları

Siklinlerin düzenleyici CDK alt birimleri vardır. Siklin bağımlı kinazlar kendi başlarına bulunduklarında inaktiftirler ama sikline bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK komplekslerini oluştururlar. CDI'ler siklin bağımlı kinaz inhibitörleridir. CDI proteinleri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinlere, ya CDK'lara ya da her ikisine bağlanarak CDK aktivitelerini inhibe ederler (Schwartz ve Shah, 2005).

Farklı siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünde spesifik noktalarda bulunurlar ve faz geçişlerinde önemli görevleri vardır. Siklin D hücre döngüsünde ilk sentezlenen siklindir ve CDK4/6 ile birlikte G1 fazı boyunca sürer. G1'den S fazına geçişte siklin E geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde siklin D önemli rol alır. Siklin A-CDK 2 S fazı sürecinde önemlidir. Siklin A, B-CDK 1 G2 fazında bulunur, mitotik siklinlerdir ve G2-M fazı geçişinde etkilidir (Pecorino, 2008; Puri ve ark., 1999).

1.2.3. Hücre Döngüsü ve Kanser İlişkisi

Hücre yaşam döngüsü ve kanser gelişimi yakından ilişkili konulardır. Kanser oluşum mekanizmasında proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen ardışık mutasyonlar sonucu, hücre döngüsünün kontrolden çıkması gözlenmektedir. (Bos, 1989). DNA hasarını algılayarak p21 proteinini aktiveştiren ve bu sayede hücre döngüsünün ilerlemesine engel olan p53 proteini katı tümörlerin %50'sinden fazlasında mutanttır. Hücre yaşam döngüsünü duraksatma aktivitesi gösteren tümör baskılayıcı proteinler p53, p21 ya da p16 iken, siklinler ve CDKlar hücreyi bölünmeye yönlendirirler. Çeşitli kanser türlerinde bu tümör baskılayıcı proteinlerin eksikliği, siklin ve CDK' ların ise aşırı ekspresyonu söz konusudur (Zhang, 2007). Kanserin en önemli karakteristik özelliğinin kontrolsüz hücre bölünmesi olduğu düşünüldüğünde protein ekspresyon profilindeki bu değişimin önemi anlaşılmaktadır. Benzer şekilde bir proto-onkogen olan RAS proteini aktiveştiğinde siklin D-CDK4 kompleksini aktiveştirerek hücre döngüsünün ilerlemesine neden olur. Tüm insan tümörlerinin %20-30' unda RAS aktiveşmesi görülmektedir (Bos, 1989).

Normal koşullarda, kontrol noktaları inaktiftir, fakat spesifik sinyallerce aktif olduklarında, hücre döngüsünü durdururlar. Kanser hücreleri, hasarlı DNA'nın çoğalmasını engelleyen kontrol noktalarını ya reddederler yada kaybetmişlerdir. G2 kontrol noktalarında oluşan hasarlar ise kromozomal kırılmalarla ilişkilidir ve genetik kararsızlığa yol açarlar. (Pecorino, 2008; Puri ve ark., 1999) Radyasyon vb. etkenlere maruz kalan hücrelerde de hücre siklusunda hatalar olabilmektedir. Örneğin, gamma radyasyonuna maruz kalan hücreler G fazında kalmaz ve S fazında hasarlı DNA'yı kopyalayarak gen mutasyonuna veya hatalı koromozom dizilimine neden olurlar (Cabadak , 2008; Park ve Lee , 2003).

1.3. APOPTOZ ve KANSER

Organizmada bulunan hücrelerin fonksiyonlarının yanında, sayıları da o organizmanın yaşamı için önemlidir. Örnek olarak insan vücudu yaklaşık 1×10^{14} hücreden oluşur ve hergün milyarlarca hücre organizma homeostazısının korunabilmesi için ölmektedir (Fischer ve Schulze-Osthoff, 2005). Hücre ölümü,

gelişmenin düzenlenmesinde ve daha sonraki aşamada doku homeostazısının korunmasında hücre çoğalması kadar önemlidir (Saunders ve Birchall, 1998).

Apoptoz, morfolojik süreçlerin önderliğinde hücrelerin kendilerini kontrollü olarak yok etmelerini tarif eden bir terim olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve Yunanca, ağaçların yapraklarını veya çiçeklerini dökmesi ile anlam bakımından analogi gösteren “düşmek, dökmek” anlamındadır (Gewies, 2003). Apoptoz biyokimyasal ve morfolojik olarak özel süreçleri bulunan aktif bir hücre imha şekli olarak tanımlanmaktadır. Apoptozun çok hücreli organizmaların gelişiminde, fizyolojik ve patolojik koşullarda dokulardaki hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde, ihtiyaç duyulmayan yada hasar görmüş hücrelerin yok edilmesinde fonksiyonel olduğu bildirilmiştir (Saunders ve Birchall, 1998; Gewies, 2003; Fischer ve Schulze-Osthoff, 2005).

Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimler ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. Hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda görülen apoptotik hücre ölümü sürecine giren bir hücrede sırası ile, yüzey adezyon kaybı nedeniyle hücre şeklinin yuvarlaklaşması ve komşu hücrelerle temas kaybı, hücre hacminde azalma ve sitoplazma yoğunluğunda artış, kromatinin nukleus membranına yönelmesi ve kondensasyonu, plazma membranında kabarcık şeklinde girinti çıkıntıların oluşumu, hücrenin “apoptotik cisimcikler” adı verilen membranla çevrili hücresel yapılardan oluşan parçalara ayrılması meydana gelmektedir. Apoptozda, apoptotik cisimciklerin oluşumuna kadar tüm hücresel yapılar hücre membranı yapısı bozulmadan tamamen hücre içerisinde yıkıma uğramaktadırlar. Apoptoz ile ölen hücrelerin artıkları fagositler ve çevre hücreler tarafından fagositoz ile yok edilmektedirler. Böylece dokuda inflamatuvar yanıt oluşması engellenmektedir (Willingham, 1999; Gewies, 2003).

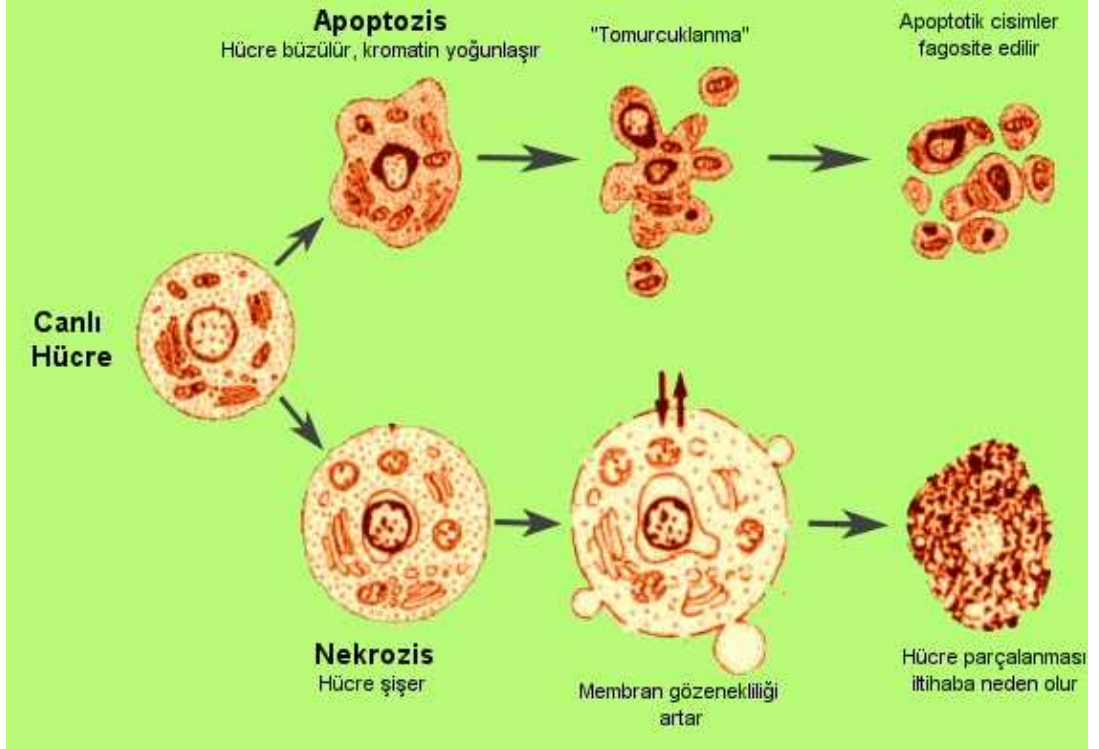
1.3.1. Apoptozun Mekanizması

Pozitif ve negatif sinyaller arasındaki dengenin bozulması hücrelerin apoptoza gitmesine sebep olur. Pozitif sinyaller hücrelerin yaşamı için gerekli olan büyüme faktörleri, sitokinler gibi moleküllerdir. TNF ve Fas-Ligand gibi negatif sinyaller ise kimyasal ve fiziksel etkiler altında kaldıklarında hücrelerin

salgıladığı ölümü aktive edici molekülerdir (Özçimen, 2005). Hücrelerin ölümü seçmesinde iki farklı tetikleyici mekanizma rol oynar:

Apoptozda hücre içi sinyallerle tetiklenme: Sağlıklı hücrelerin mitokondri dış zarlarında Bcl-2 eksprese edilir ve Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) molekülüne bağlanır. Hücre içinde bir hasar oluştuğu zaman Bcl-2, Apaf-1 molekülünü serbest bırakır. Bcl-2 ile ilişkili bir protein olan Bax, mitokondri membranlarından girer ve sitokrom c'nin salınımı sağlanır. Sitokrom c nin salınımı ve Apaf-1'in Kaspaz-9 molekülü ile bağlanması ile sitoplazmada bir "Apoptozom Kompleksi" oluşur ve bunun için ATP enerjisi harcanır. Kaspaz-9, bir düzine kaspaz ailesinden biridir. Kaspazların hepsi bir çeşit proteazdır ve adlarını da, proteinleri kesmeleri (cleavage-C) ve yapılarında aspartik asit (asp) taşımalarından dolayı almışlardır. Kaspaz-9 proteinleri keser ve diğer kaspazları aktive eder. Kaspazların ard arda aktive olmalarıyla diğer proteolitik aktiviteye sahip yolaklar da aktive olacağı için, sitoplazmik proteinler ve kromozomal DNA yıkılır. Daha sonra bu hücre artıkları ve apoptotik hücreler fagositozla ortamdan uzaklaştırılır (Green ve Kromer, 2004; Ricci ve ark., 2003).

Apoptozda hücre dışı sinyallerle tetiklenme (Ölüm Reseptör Yolu): Fas ve TNF reseptörleri hücre yüzeylerindeki zar içi proteinlerdir. Fas-Ligand ve TNF gibi ölüm aktivatörlerinin bağlanması ile sinyal sitoplazmaya iletilir ve kaspaz 8 aktive olur. Aynı kaspaz-9 gibi kaspaz-8 de diğer yolakları aktive ederek hücrelerin fagositozunu sağlar (Wolf ve Green, 2002). Ölüm reseptör yolunda rol alan diğer bir faktör de mitokondri iç membran boşluklarında yer alan bir protein olan apoptoz indükleyici faktör (AIF) dür. AIF, hücre ölüm sinyallerini aldığı zaman mitokondriden salınır, çekirdeğe göç eder ve DNA'ya bağlanarak DNA'nın yıkımı ve dolayısıyla hücrenin parçalanıp ölmesine neden olur (Green ve Kromer, 2004; Ricci ve ark., 2003).



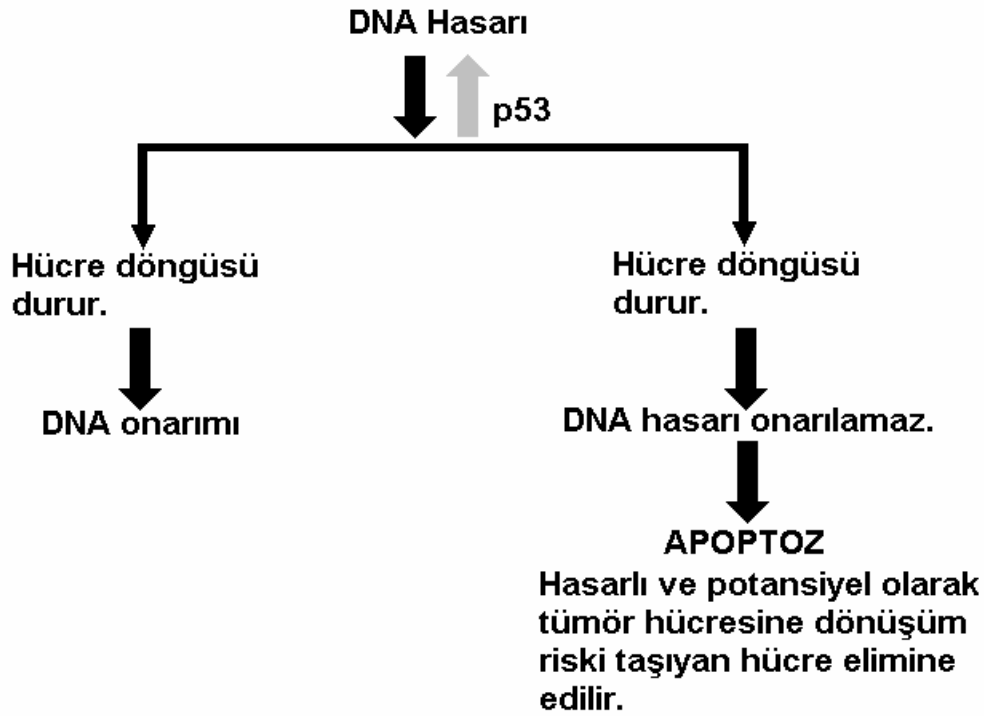
Şekil 1.4. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü mekanizmalarının karakteristik özellikleri

1.3.2. Apoptozun Genetik Düzenlenmesi

Son yıllarda sürdürülen çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör süpressör genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir. Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p53, ve bcl-2 olarak bilinmektedir.

- **c-myc:** Bir transkripsiyon faktörü olan c-myc proteini ortamda bazı moleküllerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise girmesine neden olur. C-myc protoonkogeni bir hücrenin hücrenin büyümesini programlar. Eğer ikinci bir onkogenle engellenirse hücre intihar yolunu seçer. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikiside yeterli ise çoğalma olur. Ancak c-myc var ve büyüme faktörleri yoksa hücrede apoptozis görülür (Cummings ve ark., 1997; King, 1995; Schwartzman, 1993).
- **p53:** Apoptozisi düzenleyen bir diğer tümör baskılayıcı p53 genidir. Hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi, etkisiyle) DNA hasarı olduğunda, eğer bu hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandıran bir proteindir. Fakat DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar

büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler. P53'ün apoptozu indüklemesi, Bax'ın ekspresyonunu arttırması böylece bcl-2/ Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Uyarılan p53, bcl-2 ailesinden bax'ın uyarılmasına yol açarak apoptoz mekanizmasını başlatabildiği gibi, Fas, DR4ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerini uyararakta apoptozu uyarabilmektedir. Normal işlev gören wild-tip p53 geni hücrede apoptozu kolaylaştırır (Thiede ve ark., 2000; Akşit ve Bildik, 2008; Pınarbaşı, 2007).



Şekil 1.5. p53 proteininin apoptoz üzerine etkisi (Altunkaynak, 2008).

- **Bcl-2:** Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-XL) geniş bir ailedir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu ("survival") bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı belirtilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır (Ulukaya, 2003). Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu

engelleme fonksiyonunu ya kaspasların öncü formlarını durdurarak ya da kaspas akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (Tsujimoto, 1998). Bax veya Bak gibi proapoptotik üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-C'yi serbestleştirirler dolayısıyla kaspaz aktivasyonuna yol açarlar (Tsujimoto, 1998; Taneja ve ark., 2001). Bir hücrenin apoptoza eğilimli olması heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması sonucu Bcl-2 homodimerleri şekillenir ve apoptoz inhibe edilir (Şekil 1.6). Oysa aşırı Bax apoptozu aktive eder. Hücre içi apoptoz sinyalinin verilmesinde bcl-2 ile bax proteinlerinin etkileşiminin önemli olduğu görülmüştür. (Altunkaynak, 2008)



Şekil 1.6. Bcl-2 onkoproteininin apoptoz üzerine etkisi (PARP: poli ADP riboz polimeraz)

- **Kaspazlar:** Apoptotik ölüm mekanizmasının merkez konumunda bulunan kaspazlar sisteinproteazlardır ve hedef substratlarının aspartik asit (ASP) bölgelerindeki karboksil gruplarındaki peptit bağlarını kesen nukleofilik bir bölgeye sahiptirler. Kaspazlar hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve seri olarak birbirlerini aktifleştirirler (Gewies, 2003; Serbes, 2009). Hücre fonksiyonları için gerekli olan, özellikle hücre iskeleti yapısal proteinleri ve DNA tamirinde rol alan proteinlerin parçalanmasından sorumludurlar (Kandaş, 2004; Ekshyyan ve Aw, 2004). Kaspazlar sadece apoptozun son aşamasını yürütmekle kalmazlar bunun yanında bazı durumlarda hücre ölümünün uyarılmasında da görev alırlar (Kasof ve ark., 1999). Kaspazların 14 üyesi vardır ve bunların 7 tanesi apoptozda rol almaktadır. Bunlar; kaspaz 2, 8, 9, 10, 3, 6 ve 7'dir. Apoptozda hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan kaspazlar 3, 6 ve 7'dir. Diğer kaspazlar ise başlatıcı rol oynayıp, apoptotik sinyali almada ve etkili kaspazları aktive etmede rol oynarlar (Earnshaw ve ark., 1999)

1.3.3. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler ve Nekroz ile Arasındaki Farklar

- **Yüzey Organellerinin Kaybı**

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillusler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır.

- **Hücre Büzülmesi**

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez.

- **Kromatin Yoğunlaşması**

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır.

Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçiği genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır .

- **Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması**

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (Yılmaz, 2005)

Çizelge 1.1. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar (Cameron ve Feuer, 2000; Potten ve Wilson, 2004; Lacasse ve ark., 2005)

APOPTOZ	NEKROZ
Hem fizyolojik hem patolojik bir ölüm şeklidir. Hücreler tek tek veya birkaçı birlikte ölür.	Fizyolojik bir ölüm şeklidir. Hücreler gruplar halinde ölür.
Hücre büzülür, apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücre veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz.	Hücreler içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişer ve hücre içeriği dış ortama aktığından inflamasyon oluşur.
Apoptotik hücrede kromatin nükleus membranının çevresinde yoğunlaşır.	Nekrotik hücrede kromatin yoğunluğu normal hücredeki görüntüye benzer.
Apoptotik hücrede hücre membran bütünlüğünü korur.	Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder.

1.3.4. Apoptozun Aşamaları

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c+Apaf-1 +kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyel-in değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu

- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internukleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (Ulukaya, 2003).

1.3.5. Apoptozu Belirleme Yöntemleri

Apoptozisin belirlenmesinde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Kullanılan bu yöntemler;

- ❖ Morfolojik görüntüleme yöntemleri (Elektron Mikroskopu, Floresan Mikroskop ve Konfokal Mikroskopu)
- ❖ Histokimyasal yöntemler (Annexin V Yöntemi, Tunel Yöntemi, M30 Yöntemi, Kaspaz -3 Yöntemi, MTT Testi)
- ❖ Biyokimyasal yöntemler (Agaroz Jel Elektroforezi, Western Blotting, 'Flow' Sitometri,)
- ❖ Moleküler biyoloji yöntemleri (DNA Ladder , Semi Kantitatif m-RNA analizleri, RNAaz Üretim metodu, Fas Analizi, Fas Ligand Analizi, Bcl-2 Üretimi) (Altunkaynak ve Özbek, 2008)

1.3.6. Apoptoz ve Kanser Arasındaki İlişki

Apoptoz ve kanser arasında ters orantılı bir ilişki vardır yani apoptoz kanser hücrelerinin zararına ve organizmanın yararına çalışır. Bir hücrenin DNA'sında oluşan hasar, tamir mekanizmaları ile düzeltilemezse, hasarlı hücre güvenli bir şekilde genetik kontrol mekanizmalarının öncülüğünde yok edilir (Lozano ve Elledge, 2000). Fakat, genetik kontrol mekanizmalarını oluşturan proteinlerde (özellikle p53, Rb gibi hücrelerin tamir ve ölüm programlarını yöneten) bir hasar oluştuğunda, hücre apoptozu gidemez ve hasarlı bir şekilde bölünür. Aşırı bölünen bu hücreler neoplazik oluşumun başlangıcını tetikler ve kanser başlar. Kanseri hücreleri, apoptozu karşıtı olan bcl-2, c-myc gibi sağkalım genlerini aşırı derecede ekspres ederek ölüme neden olan genleri baskırlar (Curtin ve Cotter, 2003). Survivin ve bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonları

tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Survivin'in aşırı ekspresyon düzeyleri nöroblastom ve kolon kanserlerinde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir. Bazı B hücre lösemileri ve lenfomaları, prostat tümörleri ve nöroblastomlarda Bcl-2 proteinini aşırı düzeyde eksprese ederler. Alınması gereken ölüm sinyalleri de böylece önlenir. Çoğunlukla Bcl-2 geni immunoglobulinin ağır zincir bölgesinin enhancer kısmına birleşir ve t(14;18) translokasyonunu meydana getirir (Özçimen, 2005).

Melanoma hücreleri de Apaf-1 geninin ekspresyonunu inhibe ederek apoptozdan kaçarlara (Schroter ve ark., 2000). Akciğer ve kolon kanser hücreleri ortama çok fazla Fasliganda bağlanan çözünür "decoy" moleküller salgılar, böylece Fas-ligandın Fas proteinine bağlanması engellenmiş olur. Böylece, sitotoksik T-hücreleri kanser hücrelerini öldüremezler (Özçimen, 2005). AML hücrelerinde bcl-2 proteini c-myc ile birlikte aşırı artar ve apoptoz oluşumunu önleyerek aşırı hücre çoğalmasını tetikler. Aşırı bcl-2 artışı kemoterapiye de direnç göstermekte, lösemik hücrelerin ölümünü engellemektedir (Lotem ve Sachs, 2002).

Steroid, glukortikoid (GC) reseptörleri aracılığıyla çekirdek içine girer, ölüm ve farklılaşma mekanizmalarını düzenleyen genlerin aktivasyonunda rol almaktadır. Özellikle bu mekanizmaların düzenlenmesinde calcineurinin anahtar bir rol oynadığı bildirilmiştir (Yüksel ve ark., 2002).

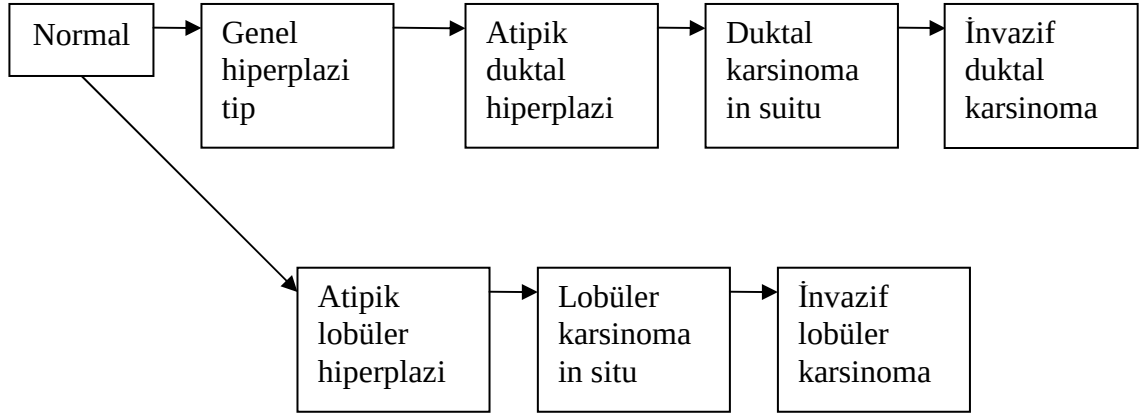
1.4. MEME KANSERİ

Memede salgı yapan hücreler tarafından oluşturulan lobüllerin birleşmesiyle loblar oluşur. Lobüller birbirlerine süt kanalları ile bağlanır ve bu süt kanalları da meme başına doğru birleşirler. Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya sürdürmeleriyle gelişmektedir (Tavassoli ve Devilee, 2003).. Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir. Meme kanserlerinin %95'i adenokanser iken %5' lik kısmını skuamoz hücreli kanser, filloides tümörleri, sarkom ve lenfomalar oluşturur.

Bugünkü bilgilere göre meme kanseri (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epiteli, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri gelişir. Bu dönüşüm on yıllarca sürer. Başlangıçta süt aktaran kanal sistemi (duktus) içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçerler. Bu aşamada tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karşılaşarak metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar. Bir gram meme kanseri dokusunun ortalama sekiz yılda geliştiği tahmin edilmektedir. Ancak bu tüm tümörler için geçerli olmayabilir (Aydıntuğ, 2004).

Meme kanseri heterojen bir hastalık olup, meme epitelinden kaynaklanan kötü huylu tümörlerdir. Kadınlarda görülen kanserler arasında yaygınlığı en yüksek (%32) tümör olup, bronş kanserlerinden sonra ölüme en fazla sebep olan kanserdir (Jemal ve ark., 2004). Tümör süpresör ve DNA tamir genlerindeki mutasyonlar meme kanserinin genetik temelini oluşturmaktadır. Bu tür gen mutasyonları, mendelin kalıtım modelini izler ve genellikle en çok hedeflenen organlar olarak, meme ve yumurtalık için kanser riski oluştururlar. Gen mutasyonlarının bir kısmında ailesel aktarımlar gözlenmiştir. Ancak hangi genlerdeki mutasyonların birinci derecede sorumlu olduğu henüz belirlenememiştir (Tavassoli ve Devilee, 2003).

Meme kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi yaşanan coğrafi bölgeye, etnik kökene ve sosyoekonomik duruma göre farklılık göstermektedir. Meme kanserine ABD’ de yüzbinde 80-90 oranında rastlanırken Japonya’ da bu sayı yüzbinde 12-18 civarındadır (Parkin ve ark., 2005). Türkiye’ de meme kanseri insidansı ve risk faktörlerini belirlemeye yönelik çalışmaların sayısı çok azdır. T.C. Sağlık Bakanlığı’ nın 1999 yıl verilerine göre, meme kanseri ülkemizde % 24.1 oranı ile kadınlarda görülen kanserler arasında ilk sırada yer alırken, %13.7’lik oranla kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre de, kadınlarda kanserden ölüm sebepleri arasında meme kanseri (%16.7) ilk sırada yer almaktadır (Hamzaoğlu ve Özcan, 2006).



Şekil 1.7. Meme kanseri gelişim basamakları (Simpson ve ark., 2005)

1.4.1. Meme Kanseri Belirtileri

Meme kanserinin belirtileri hastalığın vücuttaki yayılım derecesine ve kişiden kişiye göre farklılık göstermektedir. Kadınların çoğunda meme kanseri ilk başlarda ağrısız olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle yapılan meme muayenesi sırasında herhangi bir değişiklik fark edildiğinde gecikmeden bir hekime başvurulması gerekmektedir. Meme kanserinin belirtileri konusunda unutulmaması gereken nokta, memede meydana gelen değişikliklerin birçok nedeni olduğudur. Bu değişikliklerin büyük çoğunluğu zararsız olmakla birlikte küçük bir ihtimalle meme kanserinin ilk işaretleri olabileceği de unutulmamalıdır. Bu nedenle kadınların kendileri için neyin normal olduğunu bilmeleri memelerinin doğal yapısını incelemeleri, değişikliklerin neler olduğunu tespit etmeleri ve gecikmeden rapor etmeleri tavsiye edilmektedir. Ayrıca yaşları ile orantılı meme tarama programlarına katılmalarının önemine dikkat çekilmektedir (Somunoğlu, 2009).

Yukarıdaki bilgiler ışığında literatürde meme kanserinin belirtileri ile ilgili olarak yer alan ifadeler incelendiğinde;

- Memede bir kitlenin varlığının,
- Memenin portakal kabuğu şeklinde bir görüntü almasının,
- Doğumsal nedenlere bağlı olmaksızın meme başının içe çekilmesinin,
- Meme başından kanlı ya da kansız akıntı gelmesinin,
- Meme derisinde ülser, kızarıklık ve ödem meydana gelmesinin,

- Lenf bezlerinde şişlik olmasının ve
- Kolda şişlik ve ödem oluşmasının vb.nin önemli olduğu görülmektedir (Kutluk ve Kars, 1992; Matsui, 2002).

Memede ele gelen kitlelerin çoğu kanser olmamakla beraber, kadınlar tarafından memede farklı bir kitle veya sertlik fark edildiğinde yeterli önlemlerin alınması gerekmektedir. Ancak birtakım semptomlar görülmesine rağmen birçok kadının hekime gitmeyi geciktirdiği ifade edilmektedir . Meme kanseri öncelikle bölgesel lenf bezlerine yayılmakta ve sıklıkla da koltukaltı lenf bezlerini tutmaktadır. Bölgesel lenf bezlerini aşan kanser hücreleri kan dolaşımına katılarak sırasıyla akciğer, plevra (akciğer zarı), kemik (kaburga, bel omurları, kafatası, kol kemikleri), karaciğer, periton (karın zarı), böbrek üstü bezleri, beyin ve yumurtalıklara yayılma gösterebilmektedir. Meme kanserinin ileri evrelerinde kanserin meme dışındaki başka organlara yayılmasına da metastaz denilmektedir (Somunoğlu, 2009). Bu da meme kanseri hastalarında sıklıkla görülen durumlardan biri olarak ifade edilir. Gelişmiş ülkeler açısından bakıldığında, meme kanseri tarama programlarının gelişme göstermesi, tedavi yöntemlerinin ilerleme kaydetmesi metastazın hala bir sorun olduğu gerçeğini değiştirememiştir (Bartelink ve ark., 2003).

Çizelge 1.2. Meme Kanseri Başılangıç Semptomları

Semptomlar	Görülme Oranları (%)
Ağrısız meme kitlesi	70
Ağrılı meme kitlesi	10
Meme başı akıntısı	10
Lokal ödem	4
Meme başı çekintisi	3
Meme başı değişikliği	2
Diğer semptomlar	5

1.4.2. Meme Kanserine Yakalanmada Etkili Olan Risk Faktörleri

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemektedir. Tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmekte ve bu özelliklere de kısaca “risk faktörü” adı verilmektedir. Bu risk faktörleri (Tablo 1.3), kanserden koruyucu programın geliştirilmesinde önemlidir (Somunuğlu, 2007).

Çizelge 1.3. Meme Kanseri Gelişimindeki Risk Faktörleri (Erkut, 2006)

Faktör		Risk	Açıklama
Cinsiyet	Kadın olmak	Arttırır	Tüm meme kanserlerinin %99'u kadınlarda %1'i erkeklerde görülür
Yaş	50 yaş ve üzeri	Arttırır	Yaş ilerledikçe risk artar Yeni vakaların %77'si, meme kanserinden ölümlerin %84'ü 50 yaş ve üzeri oluşur.
Maling /Bening Meme Kanseri	Öyküsü olması	Arttırır	Bir memede kanser varlığı ortalama popülasyona göre diğer memede kanser riskini 2-6 kez arttırır
Aile öyküsü	Anne ve / veya Kız kardeşte meme kanseri, BRCA-1, BRCA-2, P53 genlerinde mutasyon,	Arttırır	Anne veya kız kardeştten herhangi birinde meme kanseri riski %2-3 arttırırken, her ikisinde kanser olması riski %8 arttırır. Meme kanserlerinin sadece %10-15'i hereditör kökenli iken, bunların %50-60'ı BRCA-1 genindeki mutasyondan %10-30 'u

			ise BRCA-2 genlerinin DNA tamirinde ve kopyalanmasında önemli rolleri vardır.
İrk			Beyaz kadınlarda meme kanseri gelişme riski daha yüksek olmasına rağmen Afrika kökenli Amerikalı kadınların bu hastalıktan ölme riski daha yüksektir.
Menstüral Öykü	12 yaştan önce menarj 55 yaş sonrası menapoz	Artırır	Menarş ve menapoz arasındaki intervalin uzaması meme kanseri riskini yükseltir.
Doğum	Doğum yapmayan, ilk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuranlar	Artırır	Doğum yapmamış kadınlar meme kanseri açısından yüksek riskli gruba girer
Emzirme		Tartışmalı	Meme kanseri riskini azaltmada emzirmemenin etkisini inceleyen çalışmalarda sonuçlar tartışmalıdır.
Östrojen Alımı	Oral kontraseptifler ve hormone replasman tedavisi	Tartışmalı	Erken veya uzun süreli oral kontraseptif kullanımı ve uzun süreli (10-15 yıl üzeri) östrojen replasman tedavisinin riski artırdığı saptanmıştır. Östrojen ve progesteron kombine kullanılan preparatların meme kanseri riskini etkilemediği saptanmıştır.
Alkol		Artırır	Günde 2 bardaktan fazla alkol alınması riski artırmaktadır. Diğer olası bir neden de

			alkolün meme dokusundaki hücre permabilitesinde değişikliğe yol açması olduğuna inanılmaktadır.
Yağlı diyet		Tartışmalı	Özellikle aşırı yağlı diyetin meme kanserini artırdığı düşünülmektedir.
Obezite		Tartışmalı	Meme kanseri riskini artırdığı bildirilmesine rağmen hala tartışılmaktadır. Östrojen adipos dokuda birikmekte bu da endojen östrojen üretimini artırmakta ve meme dokusunun daha fazla östrojene maruz kalmasına neden olmaktadır
Radyasyon		Artırır	Özellikle 30 yaş altında ve puberteden önce radyasyona maruz kalmak riski artırır

1.4.3. Meme Kanserinin Biyolojik Davranışı

Normal meme dokusunun kanser hücrelerine dönüşmesi çok aşamalı, karmaşık bir süreçtir. Başlangıçta, normal hücrelerde gerçekleşen ve nükleer ya da sitoplazmik onkogenleri aktive eden, transkripsiyonu düzenleyen mekanizmaları, sinyal moleküllerini etkileyen, büyüme faktörü ve reseptör etkileşimini bozan veya tümör supressör genlerin aktivitesini baskılayan çeşitli değişiklikler bu hücrelere belirli çoğalma avantajı sağlar. Buna paralel olarak ortaya çıkan yeni değişiklikler çok aşamalı meme karsinogenezinde komşu dokulara invaze olabilen, immün denetimden kaçan ve metastaz yapabilen klonlar oluşturur. Bu klonlar, normal hücre çoğalmasını düzenleyen doğal sinyallere yanıt verme yeteneğini de kaybederek denetimsiz çoğalmaya başlar (Ünver, 1998). Meme kanserinin karsinogenezi süreci, sırasıyla benin proliferatif meme lezyonları, karsinoma in situ, erken dönem meme kanseri (evre 1- 2), lokal ileri evre meme kanseri (evre 3) ve invaziv kanser evrelerinden oluşmaktadır (Kumar ve ark., 2008).

Meme kanserinin en önemli iki özelliği, farklı hastalarda davranışının değişken olması ve diğer bazı kanser türlerine göre çoğalmasının daha yavaş gerçekleşmesidir. (Clark ve ark., 1987) Meme kanserinin prelinik dönemde logaritmik ve sürekli bir büyüme gösterdiği tahmin edilmektedir. Memedeki kitle 1 cm çapa ulaştığında palpe edilebilir tümör boyutlarındadır ve bu büyüklükteki bir kitle yaklaşık 10^9 tümör hücresi içerir. Malignite gelişiminin tek hücreden başladığı kabul edildiğinde, bu tek hücrenin 10^9 hücre olması için 30 bölünme gerekmektedir. Meme kanserinde prelinik tümör ikilenme süresi ortalama 100 gün ise bu durumda meme kanseri olgularında yaklaşık 10 yıllık bir prelinik evre söz konusudur. Meme kanserinde tanı konulduktan sonraki doğal seyir de oldukça yavaştır. Tedavi edilmeyen olgularda medyan yaşam süresi 2.7 yıldır (Henderson ve Canellos, 1980; Clark ve ark., 1987).

Meme kanseri tümörleri diğer pek çok tümöre göre daha yavaş büyümektedir. Örneğin, meme kanserinde tahmini ikilenme süresi 83 gün iken embriyonel tümörlerde 27 gündür. Yine meme kanserinde ortalama %10 olarak belirlenen S-faz fraksiyonu yüksek dereceli lenfomalarda %24 tür (Henderson ve ark., 1989)

1.4.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserlerinin sınıflandırılması klinik veya histopatolojik olarak yapılır ve kanser hücrelerinin lokalizasyonu ve yaygınlığına göre meme kanser tipleri isimlendirilmektedir. Genel olarak hücreler süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde lokalize ise lobüler, medullada ise medüller meme kanseri olarak adlandırılır. Kanser hücreleri, çevresindeki bazal hücreleri aştığında invazif, aşmadığında in situ olarak isimlendirilirler. İnvazif duktal karsinom en fazla görülen meme kanseri tipi olup tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %75'inde oluşturduğu bildirilmiştir (Schneider ve ark., 2006).

En yaygın olarak kullanılmakta olan sınıflandırma, Dünya Sağlık Örgütü'nün Meme Tümörleri Sınıflamasıdır. Bu sınıflama tablo 1.4.'de gösterilmiştir (İnanç, 1997).

Çizelge 1.4. Meme kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması

A. Noninvasif Karsinomlar
1. İntraduktal Karsinomlar
2. Lobuler Karsinoma İnsitu
B. İnvazif Karsinomlar
1. İnvazif Duktal Karsinoma
2. İntraduktal Komponent Belirgin İnvazif Duktal Karsinoma
3. İnvazif Lobuler Karsinoma
4. Müsinoz Karsinoma
5. Meduller Karsinoma
6. Papiller Karsinoma
7. Tübüler Karsinoma
8. Adenoid Kist Karsinoma
9. Sekretuar Karsinoma
10. Apokrin Gland Karsinoma
11. Metaplazi ile Birlikte Olan Karsinomalar
a. Squamoz Tip
b. Spindle Hücre Tipi
c. Osseöz ve Kartilajinöz Tip
d. Miks Tip
e. Diğerleri
C. Memenin Paget Hastalığı

1.4.5. Meme Kanserinin Genetiği

Genetik değişiklikler germline mutasyonlarla kalıtılır veya sonradan somatik mutasyonlarla kazanılır. Sonradan kazanılan mutasyonlar çevresel karsinojenlere maruz kalmayla oluşabilir, bunlar fiziksel (örneğin, iyonize radyasyon), kimyasal (ör, polisiklik hidrokarbonlar) ve biyolojik karsinojenlerdir (ör, virüsler) (Hu ve ark., 2000). Meme kanserine riski arttıran BRCA-1, BRCA-2, p53, Cowden, AR ve AT geni otozomal geçişli ailesel vakalarının bir çoğundan sorumludur. Ailesel meme kanseri vakalarında bu tümör supresor genler ve DNA

tamir genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenirken c-erb-2 onkogeninin ekspresyonunda artış tanımlanmıştır (Kuzey, 2007).

BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasına, DNA hasarında hücrel cevaba, transkripsiyonel düzenlemeye ve hücrel proliferasyona katılırlar (Unger ve Weber, 2000). BRCA1 kromozom 17 üzerinde bulunur ve otozomal dominant geçiş gösterir, kalıtsal kadın meme kanserlerinin büyük çoğunluğundan (%42) sorumlu olduğu görülür (Gayther ve ark., 1998). Kalıtsal kanserlerde BRCA2 genini taşıyan 13q bölgesinin olmaması, muhtemelen, genetik değişiklikleri başlatmasıyla ilişkili bir durum olarak gösterilmektedir (Kainu ve ark., 2000). BRCA2 genindeki mutasyonlar, kalıtsal meme kanserli kadın vakaların %32' sinde ve erkek meme kanserli vakaların çoğunda gösterilmiştir (Gayther ve ark., 1998). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınların olduğu ailelerde, bu mutasyonların yanında kadınlar 70 yaşına gelmiş ise, riskin %80' leri aşması söz konusudur. Ailesel vakalara karşın, düşük penetranslı genlerin, meme kanserinin sporadik vakalarına katkıda bulunduğu ve diğerlerine oranla daha geç yaşta teşhis edildiği gösterilmiştir (Rebbeck, 1999). Tüm bu verilerden hareketle, meme tümörleri oluşumuna birçok genetik ve çevresel faktörün aracılık edebileceği kaçınılmaz bir sonuçtur.

1.5. FENOLİK BİLEŞİKLER

Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu düşünülen çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Saldamlı, 2007). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubudur ve günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır . Bunlara sürekli yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir (Cemeroğlu,2004). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Coşkun, 2006; Aydın ve Üstün, 2007). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin meydana gelmesinde etkilidirler. Özellikle

ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar (Cemeroğlu, 2004; Zor, 2007; Güngör, 2007).

İçerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak meyveler sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Pehlivan ve Güteryüz, 2004). Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle "biyoflavonoid" adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Saldamlı, 2007; Cemeroğlu, 2004). Ayrıca gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; enzim inhibisyonuna neden olmaları ve değişik gıdalarda kalite kontrol kriteri olmaları gibi nedenlerle de önem taşımaktadırlar (Saldamlı, 2007).

Polifenoller; fenolik asitler ve flavonoidler şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, ellajik asit ve vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir (Saldamlı, 2007; Balasundram ve ark., 2006).

Flavonoidler ise kendi içerisinde altı alt gruba ayrılmaktadır; Kuarsetin ve kaemferol flavonollara, genistein isoflavanoitlere, kateşin ve epigalaktokateşin /gallat flavanollara, hesperidin flavanonlara, pelargonidin ve siyanidin antosiyanidinlere ve krisin flavonlara dahildir (Kusano ve Ferrari, 2008).

1.5.1. Ellajik Asit

Ellajik asit, bitkilerde fenol yapısında doğal olarak bulunan ve anti-mutajenik, anti-kanserojenik aktivitesi olan bir maddedir (Wood ve ark., 1982).

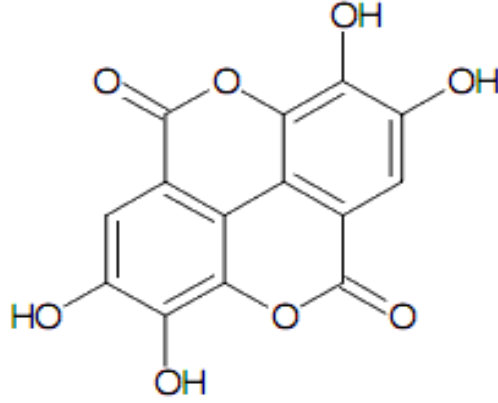
Ellajik asit, ellagitaninlerin bazı kimyasal işlemler geçirmesi sonucunda oluşur. Ellajik asitin bir hücre tarafından algılanması ve kullanılabilmesi için uygun bir yapıda bulunması gereklidir. Bu form, şeker molekülleri ile birleşmesi

sonucunda oluşmaktadır (Vasconcellos, 2000). Bütün meyve ve sebzeler içerisinde, en çok kırmızı (*Rubus ideaus*) ve siyah (*Rubus occidentalis*) ahudutlarda bulunan ellajik asit, vücutta kansere yol açan kimyasalları inaktif duruma getirerek bir antikanserojen etki göstermektedir (Stoner ve Mukhtar,1995). Ayrıca ellajik asit yaşlanmayı geciktirici etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalarda özellikle kırmızı ahudutlarından elde edilen ellajik asitin, bazı kanser tipinde, kanserli hücrelerin gelişmesini engellediği tespit edilmiştir (Glen ve Halvorson, 2001; Kresty ve ark., 2001).

Polifenollerin antioksidan özelliği, yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışmada saptanmıştır. Buna ilave olarak, ellajik asitin, *in vitro* da hidroksi anyonu ve süperoksit anyonuna karşı koruyucu potansiyeli olduğu tespit edilmiştir. Mide içinde ellajik asitin etanola karşı mukosal korunumunu sağladığı gözlemlenmiştir (Vasconcellos, 2000). Ayrıca SOD ile eşit potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Çünkü süperoksit radikaller ülserativ kolon inflamasyon hastalığına neden olur. Ellajik asit, kolonik lezyonlara karşı hastalıktan koruyucu etki gösterir. Bu da ellajik asitin savunucu özelliğini göstermektedir (Imaly ve Linn, 1988)

1.5.2. Ellajik Asitin Kimyasal Yapısı

Ellajik asit (EA), doğada birçok bitkide serbest ve ellajitanen glikozitleri halinde bulunan polifenolik bir bileşiktir. Ellajik asit 302.19 g/mol moleküler ağırlığı ile hekzahidroksidifenik asidin dilaktonudur. Ellajik asit, doğada zayıf bir asit olup, 360°C üzerindeki yüksek erime noktası ile çok kararlı bir bileşiktir. Ellajik asit, hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grupları (sırasıyla hidrojen bağ vericisi ve alıcısı olarak rol oynayabilir) ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ellajik asit ısıya oldukça dayanıklıdır. Dört fenolik grup, ellajik aside kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonları ile kompleks form oluşturmasını sağlamaktadır. Ellajik asit; suda az çözündüğü halde (Bala ve ark., 2006) metanolde, etanolde ve dimetil sülfoksitte iyi çözünmektedir (Aguilera-Carbo ve ark., 2007). Şekil 1.8 'de Ellajik asidin kimyasal yapısı gösterilmiştir (Bala ve ark., 2006).



Şekil 1.8. Ellajik Asit Kimyasal Yapısı

1.5.3. Ellajik Asitin Biyolojik Aktivitesi

Ellajik asidin antioksidan, antikanserojenik, antiöstrojenik ve antimutajenik etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Papoutsis ve ark., 2005; Aviram ve ark., 2000; Gil ve ark., 2000). Ellajik asit, serumda kansere neden olan kimyasalların temizlenmesini sağlar. Kanser hücrelerini temizler, hücresel DNA’da kanserojenlerin bağlanmasını engeller, yüksek oranda yıkıcı serbest oksijen radikallerini temizler veya bağlar. Böylece bir antioksidan görevini yapar. Yıkıcı kanser hücrelerine karşı immün sistemini uyarır (Nixon, 2002).

Ayrıca ellajik asit lipid peroksidasyonunda E vitamininden daha fazla antioksidan etki göstermektedir. Aynı araştırmacılar ellajik asidin suda çözünürlüğünün sınırlı olması, metanol ve dimetil sülfoksit gibi organik çözücülerde daha iyi çözünmesinden dolayı iyi bir lipofilik antioksidan gibi rol oynayabileceğini açıklamaktadırlar (Gil ve ark., 2000).

Ellajik asidin bir diğer etkisinin de bakteriyel membranın önemli fonksiyonlarını önleyerek, mikroorganizmaların gelişmesinin engellenmesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca membran yüzeyine yerleşen ellajik asit gibi fenolik fitokimyasallar hücre çevresinde bir hidrofobiklik yaratarak membran yapısında bir değişiklik meydana getirmektedir (Vattem ve ark., 2005).

1.5.4. Ellajik Asidin Etki Mekanizması

Ellajik asidin insan sağlığı üzerindeki koruyucu etkisinin kimyasal mekanizmasının anlaşılması zordur. Literatürde bulunan pek çok teori hücresel çalışmalara dayanmaktadır. Bu teoriler, DNA'ya kanserojen maddelerin bağlanması engellemesini, kanserojen aktivasyonunun inhibisyonunu, kanserojen detoksifikasyonunun teşvikini ve kanserojenlerin reaktif formları ile kompleks oluşturmasını kapsamaktadır (Whitley, 2005). Örneğin, antikanserojen etkileri konusunda değişik mekanizmaları olduğu bildirilen ferulik asit, kafeik asit ve ellajik asidin polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), mikotoksinler ve nitrozaminlerin kanserojen etkilerini inhibe ettikleri birçok in vitro çalışma ve hayvan denemesiyle kanıtlanmıştır. Ancak diğer fenolik asitlerden farklı olarak ellajik asidin doğrudan enjeksiyon yolunun yanında, oral yoldan gıdalarla verilmesi halinde de antikanserojen etkili olduğu bildirilmektedir.

Ellajik asidin insan sağlığı üzerine diğer önemli bir etkisinin de östrojen reseptör (ER) alt tipleri olan ER α ve ER β yoluyla östrojenik/antiöstrojenik aktivite olduğu bildirilmektedir (Larrosa ve ark., 2006; Papoutsi ve ark., 2005). Ellajik asidin, sentetik seçici östrojen reseptör modulatrlerine (SERM) benzer SERM zellikleri gösteren doğal seçici ER α ve ER β ligand olduğunu saptamışlardır (Vattem ve ark., 2005).

1.5.5. Ellajik Asidin Kanser Tedavisindeki Yeri

Ellajik asidin antikanserojen etki mekanizmaları incelendiğinde, intestinal detoksifikasyon enzimleri olarak nitelendirilen Faz II enzimlerini indükledikleri (rneğin glutation-S-transferaz enziminin aktivitesini stimule etmekte ve karaciğerde sentezini arttırmaktadır) ve böylece kanserojen maddenin barsakta emilimini inhibe ettikleri bildirilmektedir. Diğer taraftan ellajik asit; prokanserojenlerin aktivasyonunu katalize eden Faz I enzimlerini de engelleyebilmektedir. Hayvan denemeleri sonuçlarına göre yalnızca enzim sistemi etkilenmemekte, aynı zamanda sitokrom P450 miktarında da düşüş gözlenmektedir (Watzl ve Leitzmann, 2005).

Ellajik asidin antikanserojen etki mekanizması konusunda bir diğer çalışmada ellajik asit ile DNA arasında kovalent bağların varlığı saptanmış ve

böylece DNA'nın maskelenerek kanserojen madde ile bağlanmasının engellendiği belirtilmiştir (Huetz et al., 2005). Diğer taraftan ellajik asidin DNA replikasyonunda, kopyalama, rekombinasyon, hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli olan Topoizomeras I ve II enzimlerinin çalışmasını önleyerek tümör hücresinin gelişimini engellediği de bildirilmektedir (Hurley, 1998). PAH'ların antikanserojen etkilerini fenolik asitlerle inhibisyonu konusunda yapılan çalışmada ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve ellajik asit gibi asitler arasında en yüksek antikanserojen etkinin ellajik asit tarafından sağlandığı ve bu konuda diğerlerinden 80-300 defa daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (Watzl ve Leitzmann, 2005). Ayrıca ellajik asidin, aflatoksin B1'in DNA'ya bağlanma etkilerini ve mutasyonlar oluşturmalarını önlediği de bildirilmektedir (Fajardo, 1992). Ellajik asidin antikanserojen etki mekanizması konusunda bir diğer çalışmada serbest oksijen radikallerinin ve kanserojenlerin reaktif metabolitlerini etkisiz hale getirerek kanser başlangıcını engellediği bildirilmektedir. Metabolizmada oluşan serbest oksijen radikalleri, DNA zincirinin ayrılması ve mutasyonlara neden olmaktadır. Ellajik asit ise bu prosesi engelleyebilen kuvvetli bir antioksidandır (Hannum, 2004).

1.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü, bir organ veya dokudan alınan belirli bir grup hücrenin, uygun fizikokimyasal ve biyolojik işlemler sonucu in-vitro koşullarda üretilmesi tekniğidir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'un kurbağa embriyolarında yapmış olduğu çalışmalara dayanır. İlerleyen yıllarda uygun kültür besi ortamlarının geliştirilmesi ve besi ortamının içine antibiyotik eklenmesi kontaminasyon sorununu çözmüş ve bu teknolojinin, hastalıkların patogenezinin araştırılmasında, ilaç denemelerinin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde birinci basamak çalışma içine girmesinin yolunu açmıştır. Günümüzde yapılan biyomedikal araştırmalarda primer kültür ya da hücre hattı olarak, çalışmaların ilk fazını oluşturur. Primer kültürler sınırlı pasaj kapasitesinden dolayı fazla uzun yaşatılamazlar ancak, hücre hatlarının sınırsız pasaj yeteneğine sahip olduklarından dolayı çok uzun süre (hatta sonsuz) kullanma avantajı vardır . Hücre hatları bir organ veya dokuya özgül hücrelerin

kuvvetli bir virus antijeninin promoteri ile immortalizasyon işlemlerinden geçtikten sonra oluşan ve sürekli bölünme yeteneği olan ölümsüz hücrelerdir (Uçar, 2003).

Hücre hatları genel olarak süspansiyon ve monolayer kültürler olarak iki grupta toplanırlar. Süspansiyon kültürler daha çok kan ve kemik iliği gibi yumuşak doku tümörlerinin hücre hatlarını oluştururlar ve bu hücreler, içinde bulundukları kaba yapışmazlar. Monolayer kültürler ise fibroblast, epitel, sinir doku gibi tümörlerin hücre hatlarıdır ve içinde bulundukları kaba yapışır.

Hücreler geldikleri kökene göre farklı zamanlarda bölünürler. Bundan dolayı kültür besisi ortamı, beslenme, üreme ve yaşam ortamı gibi şartlar hücreden hücreye değişiklik gösterir (Uçar, 2003).

Çizelge 1.5. Yaygın Olarak Kullanılan Hücre Serileri

Hücre Serisi	Hücre Tipi ve Kökeni
K-563	KML transforme eritrolösemi hücre dizisi
ARH-77	Plazma hücreli lösemi hücre dizisi
RPMI-8226	Hafif zincir sekrete eden plazmasitoma hücre dizisi
MCF-7	Meme adenokarsinomu hücre dizisi
A2780	Yumurtalık kanser hücre dizisi
HCT-116	Kolon kansinoma hücre dizisi (insan)
A-549	Akciğer kanseri epitel hücre dizisi (insan)
3T3	Fibroblast (fare)
BHK21	Fibroblast (hamster)
L6	Miyoblast (rat)
PCI2	Kromaffin hücresi (rat)
SP2	Plazma hücresi (rat)
COS	Böbrek (maymun)
293	Böbrek (insan), adenovirüsle transforme edilmiş
CHO	Over (hamster)
DT40	Lenfoma hücresi (civ civ)
RI	Embriyonik kök hücreler (fare)
E14.1	Embriyonik kök hücreler (fare)

T24	Mesane epitel hücresi (insan)
HepG2	Karaciğer epitel hücresi (insan)
HEK293	Böbrek epitel hücresi (insan)
HL-60	Lösemi hücresi (insan)
SH-SY5Y	Nöroblastoma hücresi (insan)
S2	Makrofaj benzeri hücreler (drosophila)
BY2	Farklılaşmamış meristematik hücreler (tütün)

1.6.1.Hücre Kültürü Tarihçesi

Hücre kültürü, hücrelerin belirli bir besi ortamında çoğaltılmasıdır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarının günümüzde önemli bir yeri vardır. Çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak in vitro sonuçlar elde edilebilir. Hücre kültürü çalışmalarının geçmişine bakacak olursak ilk olarak 1885'te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. 1907 yılında Harrison, kurbağa embriyonik dokusundan kültür yaparak aksonların gelişimini göstermiş, daha sonra da 1910 yılında Burrows, tavuk embriyonik dokularını geliştirmek üzere tavuk plazması kullanmıştır. Lewis&Lewis ise 1911 yılında ilk sıvı mediumu kullanmıştır. 1913'te Carrel, hücrelerin steril koşullarda düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre artabildiklerini göstermiştir. Earle ve arkadaşları 1948'de L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını tespit etmiş, Gey ve arkadaşları 1952'de bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin HeLa sürekli serisini ortaya koymuşlardır. 1986'da Martin, Evans ve arkadaşları fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek bu hücrelerin kültürünü yapmışlardır. 1998'de ise Thomson, Gearhart ve yardımcıları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır (Uçar, 2003).

1.6.2. Hücrelerin İnkübasyonu ve Bakımı

Hücreler karanlıkta inkübe edilmelidirler çünkü ışık besiyerindeki ve hücre yapısındaki bazı organik yapıları bozarak hücre için toksik hale getirebilir. Hücre kültürleri günlük olarak kontrol edilir. Morfolojik görünüm, mediumun rengi ve hücrelerin rengi incelenir. Günlük olarak sonuçlar laboratuvar defterine kayıt edilir. Deftere kültürün adı, hücre serisi adı, besiyeri bileşimi, standart mediuma modifikasyon yapıp yapılmadığı ve gözlemler yazılır. Büyüme kontrolü invert mikroskopla yapılır; canlılık testleri, trypan blue ile yapılırsa ışık mikroskopunda, etidyum bromür akridin oranj ile yapılırsa floresan mikroskopunda kontrol edilir.

Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kültürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da gecikme fazı denilen bir döneme girerler. Bunu en yüksek metabolik aktivitenin gözlemlendiği logaritmik artış(üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı bir durağan evreye girer (tüm üreme yüzeyleri kaplanmıştır). Hücrelerin nüfus yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınırlar (harvesting). İdeal olanı hücrelerin durağan evreye girmeden önce kültürden alınmalarıdır. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir.

Mekanik: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda bu yöntem tercih edilebilir.

Proteolitik enzimler: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon serum içeren tam kültür ortamının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir.

EDTA: Tek başına EDTA kullanılarak da hücreler yüzeyden ayrılabilir.

Kültür ortamı (besiyeri) için gereken bileşenler ve üreme gereksinimleri Tablo 1.7 'de özetlendiği gibi sağlanmalıdır. Kültür kapları CO₂ etüvüne (37°C; %5 CO₂) konduğu zaman gaz giriş-çıkışı için kapların ağzı hafif açık

olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan sakınılması da gereklidir. Hücre kültürü çalışmalarında da tüm laboratuvar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir.

Çizelge 1.6. Memeli hücresi için hücre kültürü besiyerinin bileşenleri

Amino asitler	Vitaminler	Tuzlar	Diğerleri	Proteinler (serum yerine)
Arjinin Sistin Glutamin Histidin İzölösün Lösin Lizin Metiyonin Fenilalanin Treonin Tryptofan Tirozin Valin	Biotin Kaolin Folat Nikotinamid Pantotenat Piridoksin Tiyamin Riboflavin	NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ MgCl ₂	Glukoz Penisilin Streptomisin Fenol kırmızısı Tam serum	İnsülin Transferrin Büyüme faktörleri

1.7. MEME KANSERİNİ ÇALIŞMADA MODEL SİSTEMLER

Model sistemler, insan üzerinde deney yapmanın mümkün veya etik olmadığı durumlarda, insandaki hastalıkların sebeplerini ve tedavi seçeneklerini belirlemek için kullanılırlar. Biyolojik bir fenomeni anlamayı sağlayan model sistemler (organizma, doku ve hücre hatları) aynı zamanda diğer organizmaların işleyişi hakkında fikir verebilir. Araştırmalarda kullanılacak model sistemlerin (büyüklük, üreme süreleri, erişilebilirlik, manipülasyon kolaylığı, genetik bilgi sisteminin basitliği, mekanizmalarının korunmuşluk derecesi, ekonomik değeri gibi) belirli özelliklerinin olması gerekir. Meme kanseri oldukça kompleks kanser türlerinden olup, bu hastalığın meme kanserini hücre düzeyinde modelleyen hücre hatları üzerinden çalışılması, tercih edilen yaklaşımlar arasındadır. Çalışılacak etken maddelerin ilk denemelerinin hücre hatlarında, daha sonra ksenograft modellerde ve daha sonra faz I, faz II, faz III denemeleriyle insanlarda çalışılması mümkündür.

Meme kanserini hücresel seviyede modellemede kullanılan birçok hücre hattı tanımlanmıştır.

Çizelge 1.7. Meme kanserinin hücre düzeyinde modellemesi olan hücre hatlarının özellikleri
(Breast Cancer Res Treat, 2007)

Hücre Hatları	Meme Kanserinin Alt Tipleri	ER Durumları	HER-2 Durumları
MDA-MB-453	Luminal	Neg	Amplified
SKBR-3	Luminal	Neg	Amplified
SUM-190	Luminal	Neg	Amplified
SUM-225	Luminal	Neg	Amplified
UACC-893	Luminal	Neg	Amplified
EFM-192A	Luminal	Pos	Amplified
HCC-202	Luminal	Pos	Amplified
UACC-732	Luminal	Pos	Amplified
UACC-812	Luminal	Pos	Amplified
ZR-75-30	Luminal	Pos	Amplified
HCC-1500	Luminal	Pos	Amplified
KPL-1	Luminal	Pos	Normal
MDA-MB-134	Luminal	Pos	Normal
MDA-MB-175	Luminal	Pos	Normal
MDA-MB-415	Luminal	Pos	Normal
ZR-75-1	Luminal	Pos	Normal
CAMA-1	Luminal	Pos	Normal
BT-474	Luminal	Pos	Amplified
HCC-1419	Luminal	Pos	Amplified
MDA-MB-361	Luminal	Pos	Amplified
EFM-19	Luminal	Pos	Normal
MCF-7	Luminal	Pos	Normal
T-47D	Luminal	Pos	Normal
BT-20	Basal	Neg	Normal

HCC-38	Basal	Neg	Normal
MDA-MB-468	Basal	Neg	Normal
HCC-1954	Basal	Neg	Amplified
HCC-1143	Basal	Neg	Normal
HCC-1187	Basal	Neg	Normal
HCC-1937	Basal	Neg	Normal
HCC-1806	Basal	Neg	Normal
HCC-70	Basal	Neg	Normal
CAL-51	Post-EMT	Neg	Normal
Hs5781	Post-EMT	Neg	Normal
MDA-MB-157	Post-EMT	Neg	Normal
MDA-MB-231	Post-EMT	Neg	Normal
MDA-MB-435	Post-EMT	Neg	Normal
MDA-MB-436	Post-EMT	Neg	Normal
HCC-1569	Post-EMT	Neg	Amplified

1.7.1. MDA-MB-231 Hücre Hattının Özellikleri

MDA-MB-231 hücreleri 51 yaşındaki meme adenokarsinomalı bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Anormal bir karyotipe sahip olan hücre hattı anöploid yapıdadır. Karyotip analizinde kromozom sayılarının triploide yakın değerlerde (52-68) olduğu gözlenmiş, az miktarda normal ve az sayıda kromozoma sahiptir. N8 ve N15 kromozomları mevcut değildir. Bu kromozomlar sitogenetik analizlerde belirteç (marker) olarak kullanılmaktadır. Meme kanseri hücrelerinin belli özelliklerini modelleyen bu hücre hattı, invaziv kanseri *in vitro* koşullarda çalışılmak için oldukça uygun bir modeldir. Östrojen reseptör negatif olan MDA-MB-231 hücreleri normal meme hücrelerinin gösterdiği özelliklerini kaybetmiştir. MDA-MB-231 hücre hatlarında WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. Ayrıca HER-2 geninin ekspresyonu da normaldir. Epitelyal morfolojide olan MDA-MB-231 hücreleri, EGF ve TGF α sentezler. Ayrıca, tümör baskılayıcı gen, p53, MMP-1, MMP-2, MMP-9 ve vimentin gibi invazyon faktörlerinin de ekspresyonu vardır (O'Connor ve ark., 1997). MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen bu değişimler, tümör ilerlemesi, metastaz oluşumu ve

programlı hücre ölümüne direnç kazanmasıyla ilgilidir (Geisler ve ark., 2003, Greenblatt ve ark., 1994). Mutant p53 geni içeren MDA-MB-231 hücreleri, canlılık sinyallerini güçlendirerek erken tümör gelişiminde apoptozisten kaçmaktadır (Hui ve ark., 2006).

1.7.2. SKBR-3 Hücre Hattının Özellikleri

SKBR-3 hücreleri 43 yaşındaki meme adenokarsinomalı bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Hücre hattı hipertriploid karyotipe sahip yapıdadır. N1, N14 ve N17 kromozomları mevcut değildir. Meme kanseri hücrelerinin belli özelliklerini modelleyen bu hücre hattı, invaziv kanseri *in vitro* koşullarda çalışılmak için oldukça uygun bir modeldir. Östrojen reseptör negatif olan SKBR-3 hücreleri normal meme hücrelerinin gösterdiği özelliklerini kaybetmiştir. SKBR-3 hücre hattında HER2/c-erb-2 geninin aşırı ekspresyonu söz konusudur. Epitelyal morfolojide olan SKBR-3 hücreleri adherent özellik göstermektedirler.

Epitelyal özellik gösteren SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının *in vitro* koşullarda çoğaltıldıklarında karakteristik farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Normal hücreler, kültür ortamında bulunan büyüme (çoğalma) faktörlerinin etkisiyle belli bir yoğunluğa ulaşıncaya kadar çoğalmaktadırlar. Ardından hücreler G0 fazına geçip çoğalmaları durmaktadır. Tümör hücreleri ise kültür ortamında sürekli çoğalarak yüksek yoğunluğa ulaşmaktadırlar. Tümör hücrelerinin büyüme (çoğalma) faktörüne gereksinimleri azaldığı gibi, bazı durumlarda kendi kendilerine çoğalmalarını uyaran faktörler de üretebilmektedirler (Sporn ve Roberts, 1986).

MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Hücre Serileri

Çalışmamızda ATCC'den sağlanan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre serileri kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ellajik Asit (Fluka), RPMI-1640, Acridin Orange, MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue), Dimetilsülfoksit (DMSO), Phosphate Buffered Saline (PBS), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Penicilin streptomycine, L-glutamin Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (Tripsin- EDTA), Trypan Blue (GIBCO), Osmium tetraoksit, Glutaraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science); diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

2.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 ve 75 cm² 'lik flask (TPP), 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam pipetler (1, 2, 5 ve 10mL hacimlerinde), pastör pipetler, enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mL'lik Durham şişeleri, steril santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL) (TPP), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı (Marienfeld), 10, 100 ve 1000 µL'lik pipet takımı ve uçları (Eppendorf), Steril cam petri kapları, Lamel 15x15, Rodajlı lam, Kryotüp, Grid

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik kabini Class 2(Logic), Mikroplate okuyucu (Molecular Devices), Işık mikroskobu (Leica DM 500), Inverted mikroskop (Leica DMIL LED), Santrifüj (Hettich), Hassas Terazî (Ohaus), CO₂ inkübatörü (New Brunswick), Floresan Mikroskop, TEM (FEI), Kuru Hava Sterilizatörü (Analytik jena), Su Banyosu (GFL Thermolab), Otoklav (Nüve), Çeker Ocak (İnterlab), Buzdolabı (Arçelik), Derin Dondurucu (-20)(Arçelik), sıvı azot tankı, otomatik pipetler (eppendorf)

2.2. METOD

Çalışmamızda SKBR-3 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücre dizileri kullanıldı. Deneye ATCC'den kuru buz içerisinde gelen hücrelerin kültüre edilmesi ile başlandı. Deneylerde kullanılacak yeterli hücre miktarlarına ulaşabilmek için pasajlama işlemi yapıldı. Her bir hücre grubundan yeterli sayıda flask ve stok elde edildikten sonra deneye başlandı.

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Sterilizasyon

Çalışmalarda kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat, yine bazı cam ve plastik malzemeler ve sıvı solüsyonlar da alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C ,1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 mm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.2.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanışı

Kültürde kullanılan hücre tipine özel besiyerleri hazırlandı. Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir sisede ve por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek hazırlandı.

2.2.1.3. Hücre Serilerinin Kültüre Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre serileri ATCC'den sağlandı. Hazırlanan besiyeri (%10 FBS, %1 penicillin streptomycine, %1 L-glutamin, %1 HEPES Buffer %87 RPMI 1640) su banyosu yada inkübatörde 37 °C'ye kadar ısıtılır. -196 °C 'de sıvı azot tankında bulunan hücreler tanktan çıkarılır ve 37 °C su banyosunda kapak kısmından tutarak ve su içerisinde hafifçe sallayarak içeriğinin tamamen erimesi sağlanır. Açmadan önce kryotüp % 70 alkol ile ıslatılmış kağıt mendil ile silinir. Laminar hava akışlı kabin içerisinde, hücre içeriğini 10 ml besiyeri içeren steril santrifüj tüpüne yavaşça transfer edilir. Dakika 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısım döküldükten sonra, hücre peletini uygun miktarda besiyeri ile homojenize edilir. Hücreler kültür flaskına alınıp 37°C 'de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilir.

2.2.1.4. Hücre Serilerinin Pasajlanması

Hücre kültüründeki kullanılmış besi ortamını pipet yardımıyla boşaltılır. Kültür kabının hücre bulunmayan yüzeyine doğru PBS ilave edilerek hücrelerin kültür yüzeyi PBS ile bir kez yıkanır. Daha sonra 1X tripsin-EDTA solüsyonu konularak yapışan hücre hatlarının flasktan kalkması sağlanır. Kültür kabına eklenen tripsin- EDTA hücreler yuvarlaklaşmaya kadar (yaklaşık 5-15 dakika) 37 °C inkübatörde bekletilir. Bu süre içerisinde hücrelerde yuvarlaşma olup olmadığını mikroskopta kontrol edilir.

Tripsinin hücrelere zarar vermesinin engellemek için hücreler kalktıktan sonra besi ortamı ilave edilerek hücreler pipet yardımıyla homojenize edilir. 1200 rpm’de 5dk santrifüj yapılır. Süpernatant atılır ve hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenip, hücreler pipet yardımıyla homojenize edilip flasklara bölünür.

2.2.1.5. Hücre Serilerinin Stoklanması

Yeterli hücre sayısı yoğunluğuna ulaşan hücre serileri, PBS ile yıkandıktan sonra, 1X tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılıp besiyeri eklenip, 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında besiyeri yardımıyla hücre süspansiyonu hazırlanır. Süspanse hücre kültürlerinin canlılık oranları ve hücre yoğunluğunu belirlenir. Her bir krayotüp için 1800µl hücre besiyeri konulup, 30 dk kuru buz üzerinde bekletilir. 30 dakika sonra her bir kryotüpe 200 µl DMSO çözeltisi ilave edilip kryotüpler -20 °C’ye kaldırılır. 3-4 saat sonrasında vialler sıvı azot tankına yerleştirilerek stoklama işlemi tamamlanır.

2.2.1.6. Tripan Mavisi ile Hücrelerin Sayımı

Tripan Blue boyama yöntemi, hücre sayımı için tavsiye edilen çeşitli yöntemlerden biridir. Bu metoda göre canlı hücreler boyanmaz, ölü hücreler boyanır.

Boyama işlemi için eppendorf tüpüne tripan mavisi solüsyonundan 0.1 ml, sayımı yapılacak hücre solüsyonundan 0.9 ml eklendi. Süspansiyon köpük oluşturmayacak şekilde dikkatlice homojenize edildi. Oda ısısında 5 dakika bekletildi. Hemosimetrenin lam ve lameli alkol ile temizlendi. Lam üzerine lameli hafifçe bastırarak yerleştirildi. 0.05 ml (50µl) kadar boyanmış hücre

süspansiyonunu alınıp, hemosimetrenin lamı ile lameli arasına yavaşça akıtıldı. 30-60 sn hücrelerin hareketsizleşmesi için beklenildi. Mikroskop yardımıyla 10X veya 20X objektif kullanarak, hemosimetrenin tüm karelerindeki canlı hücreler (boya absorbe etmeyen) sayıldı. Sayım sırasında en sağdaki üçlü çizgiden başlanarak küçük karelerin içindeki tüm hücreleri, sağ çizgi üzerindeki ve en üst çizgi üzerindeki sayarak yukarı, daha sonra sağdaki küçük kareden aynı prensiple aşağıya doğru inildi, alt çizgidekileri saydıktan sonra yandaki küçük karelere geçildi. Tüm alan sayılınca kadar işleme devam edildi. Boyayı absorbe etmiş olan (ölü) hücreleri de aynı şekilde sayıldı.

Milimetredeki canlı ve ölü hücre sayılarını belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{dilasyon oranı} \times 10^4}{\text{(hücre sayısı/ml)}} = \text{canlı yada ölü hücre yoğunluğu}$$

9

Canlılık oranını belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\frac{\text{Sayılan canlı hücre miktarı}}{\text{Sayılan toplam hücre miktarı}} \times 100 = \text{canlılık oranı (\% olarak)}$$

Buna göre canlı hücrelerin sayısı belirlenip hücre süspansiyonundan istenen miktar kadar alındı.

2.2.1.7. Hücrelerin İkilenme Zamanının Hesaplanması

Düzenli olarak en az 3 sub kültürü yapılan hücreler tripsin işlemi ile kültür flaskından kaldırıldılar. Hücre süspansiyonları 50 ml besiyeri içinde 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı. Altı well-platelere çift kontrollü olarak hücre süspansiyonundan her göze 2 ml ilave edildi. 37°C ' de %5 CO_2 'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Sırasıyla 24, 48 ve 72. saatte trypan blue dye exclusion testi ile hücrelerin sayımları gerçekleştirildi. 5×10^4 hücre/ml SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre baz alınarak hücrelerin ikilenme zamanı hesaplandı. Bu yöntem ile SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ikilenme zamanı 72 saat olarak hesaplandı. Hücrelerin ikilenme zamanına bağlı olarak da deneylerde 72 ve 96 saat kullanıldı.

2.2.2. Ellajik Asit Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Hücre Serileri ile Etkileşimi

Ellajik asitin stok çözeltisi; 1ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 10mgr ellajik asit çözülerek uygun pH ayarlaması yapılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyon +4⁰ C'de saklanmıştır. Deneye alınmak üzere stoktan çıkarılan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre serileri gerekli sayıya ulaştıktan sonra ellajik asitin bu hücreler üzerinde sitotoksik etkisini ve doz aralığını belirlemek için MTT yönteminden yararlanılmıştır. Hazırlanan stok solüsyonundan taze besiyeri ile seyreltmeler yapılarak ellajik asitin 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30µM, 40 µM, 50µM, 100 µM, 150 µM, ve 200 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Çalışılan doz aralığında çıkan sonuçlar sonucu hesaplanan EC 50 değeri floresan mikroskop ve TEM için kullanılmıştır.

2.2.3. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) Sitotoksisite Testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. En sık kullanım alanları: Sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medium komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Mosmann, 1983).

SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre serilerinden mililitresinde 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonunu test edilecek numune sayısına yetecek oranda 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına 100µl /göz olacak şekilde 12 kanallı pipet yardımı ile taksim edilerek, %5 CO₂ 'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında gözlerdeki tüm

besiyeri boşaltıldı. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan ellajik asit solüsyonu 96 kuyulu hücre kültürü plakalarının her kuyusuna 100µl /göz olacak şekilde 12 kanallı pipet yardımı ile taksim edildi, %5 CO₂ 'li etüvde 72 ve 96 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bütün gözler boşaltıldı. Bütün gözlere %10 serumlu besiyeri 100 µl /göz olacak şekilde 12 kanallı pipet yardımı ile taksim edildi. Daha sonra MTT solüsyonundan 13 µl/göz olacak şekilde 12 kanallı pipet yardımı ile taksim edildi ve plaka ışık almayacak şekilde alimünyum folyo ile sarıldı. Etüvde 4 saat bekletildikten sonra doku kültürü mikroskopunda formazan kristallerinin oluşup oluşmadığını kontrol edildi. Plaka ters çevrilerek bütün gözlerinden MTT boyası uzaklaştırıldı. Formazan kristallerini çözmek için bütün gözlere izopropil alkolden 100 µl/göz olacak şekilde 12 kanallı pipet yardımı eklenip, 10 dk inkübe edildikten sonra 570 nm dalga boyunda absorbensı okutulup değerlendirildi.

Sitotoksisitenin yüzde canlılık üzerinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır;

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - [(\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması} / \text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}) \times 100]$$

Bu test her iki hücre serisinde de 3'er defa olmak üzere tekrar edilmiştir.

2.2.4. Floresan Mikroskop ile Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi

Numuneden spesifik görüntü veya sinyal almak için floresan mikroskopi yöntemi geliştirilmiştir. Floresan prensip temel seviyedeki (ground state) bir elektronun eksternal enerji ile uyarılarak bir üst seviyeye yükseltilmesi ve bu seviyede labil olan elektronun tekrar temel seviyeye dönerken spesifik bir dalga boyunda ışıma yapması şeklinde özetlenebilir. Floresan mikroskopi en temel olarak spesifik yapıların morfolojisinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Akridin oranj (AO) çift veya tek zincirli nükleik asitlere bağlanabilen, hücrenin çekirdeğine DNA ve RNA'yı seçici bir şekilde boyayabilen, hücrenin çekirdeği hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan floresan özellikle metakromik bir boyadır. Maksimum absorpsiyonu yaklaşık 455- 490 nm 'dir. AO, hücre içindeki tek zincirli nükleik asitleri kırmızıya, çift zincirli nükleik asitleri de yeşile boyamaktadır (Kapusinski, 1990; Kapusinski ve ark., 1982).

Ellajik asit uygulanan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre serilerindeki morfolojik değişiklikleri belirlemek için; 3×10^4 hücre/ml steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarılmıştır. MTT deney sonuçlarına göre hesaplanan EC 50 değeri SKBR-3 hücrelerine 72 saat için $178 \mu\text{M}$, 96 saat için $78 \mu\text{M}$ ellajik asit hücrelere eklenerek inkübasyona tabi tutulmuştur. MDA-MB-231 hücrelerine 72 saat için $80 \mu\text{M}$, 96 saat için $50 \mu\text{M}$ ellajik asit uygulanmıştır. Bu sürenin bitiminde hücreler 3 defa 1x PBS solüsyonu ile yıkanıp %70 etanolde 15 dk boyunca fikse edilmiştir. Daha sonra AO ($0,1 \text{ mg/ml}$) ile 10 dk inkübe edilip son kez 1x PBS ile yıkanmıştır. Hazırlanan numuneler floresan mikroskopunda incelenmek üzere preparat haline getirilip, incelenmiştir.

2.2.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik subselüler detaylar da incelenebilir (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi). Elektron mikroskobu çalışmalarında, nukleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir.

Ellajik asitin SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre serileri üzerine olan ince yapısal değişikliklerini incelemek için ; 3×10^4 ml SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücreleri en etkin derişimlerde ellajik asit ile muamele edildikten sonra 72 ve 96 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda ellajik asit ile etkileştirilen hücreler TEM’de incelenmesi için doku takibi protokolü uygulanmıştır.

- **Fiksatif Hazırlama :** İlk fiksatif tamponlanmış glutaraldehittir.

Fosfat Tamponu;

Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlanmıştır.

İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içerisinde 4-24 saat arasında $+4^\circ\text{C}$ ’de fikse edilmiştir.

- **Yıkama:** Fikse olmuş hücrelerden fiksatiyi uzaklaştırmak için hücreler tampon çözeltisi ile yıkanır. (3x15 dk)
- **İkinci Tespit (Osmium Tetraoksit) :** Yıkanan hücreler %1’lik OSO_4 içerisine alınıp, 2 saat süreyle rotatorda döndürülerek, fiske edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3x15 dk. yıkanır.
- **Dehidratasyon:** Etil alkol ile yapılır.
 - % 50 Alkol 15 dk. X2 +4 °C
 - % 70 Alkol 15 dk. X2 +4 °C
 - % 90 Alkol 15 dk. X2 +4 °C
 - % 96 Alkol 30 dk. X2 +4 °C
 - Absolu Alkol 30 dk. X1 +4 °C
 - Absolu Alkol 30 dk. X1 +25 °C
- **Şeffaflandırma:**
 - Propilenoksit 30 dk. X2
 - Resin+ propilenoksit (1/1)

Hücreler bu karışımda 2 saat süreyle rotatorda döndürülür.

- **Bloklama:** Taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılır. Polimerizasyon işlemi 48 saat boyunca 60 °C’de yapılır.

Resin Solüsyonunun Hazırlanması:

Araldit CY212 20 ml,
DDSA 20ml,
BDMA 0,6 ml,
Dibütilfitalat 1 ml,

- **Kesitlerin Boyanması:** Uranil asetat boyasının hazırlanması;
Metil Alkol 80 ml,

Uranil asetat 2gr,

Distile su 20 ml,

Bu boya içerisinde gridler 45-60 dk. bekletilip, distile suyla yıkanır (boya kullanılmadan önce süzölmelidir).

- **Kurşun Sitrat Boyasının Hazırlanması:**

A Karışımı

10 N NaOH 2 gr,

Distile su 5 ml

B Karışımı

Kurşun sitrat 200 mgr,

Distile su 50 ml,

B karışımı üzerine 0,5ml A karışımı katılıp, kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır. (pH 12-13 arasında olmalıdır). Temiz bir falkona konup, karanlıkta ve +4 °C’ de saklanır. Boyanan kesitler elektron mikroskobunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.6. EC 50 Değerinin Hesaplanması

MTT sitotoksosite testi sonuçlarına göre SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 72 ve 96 saat EC 50 değerleri Probit analizi ile hesaplanmıştır.

3.BULGULAR

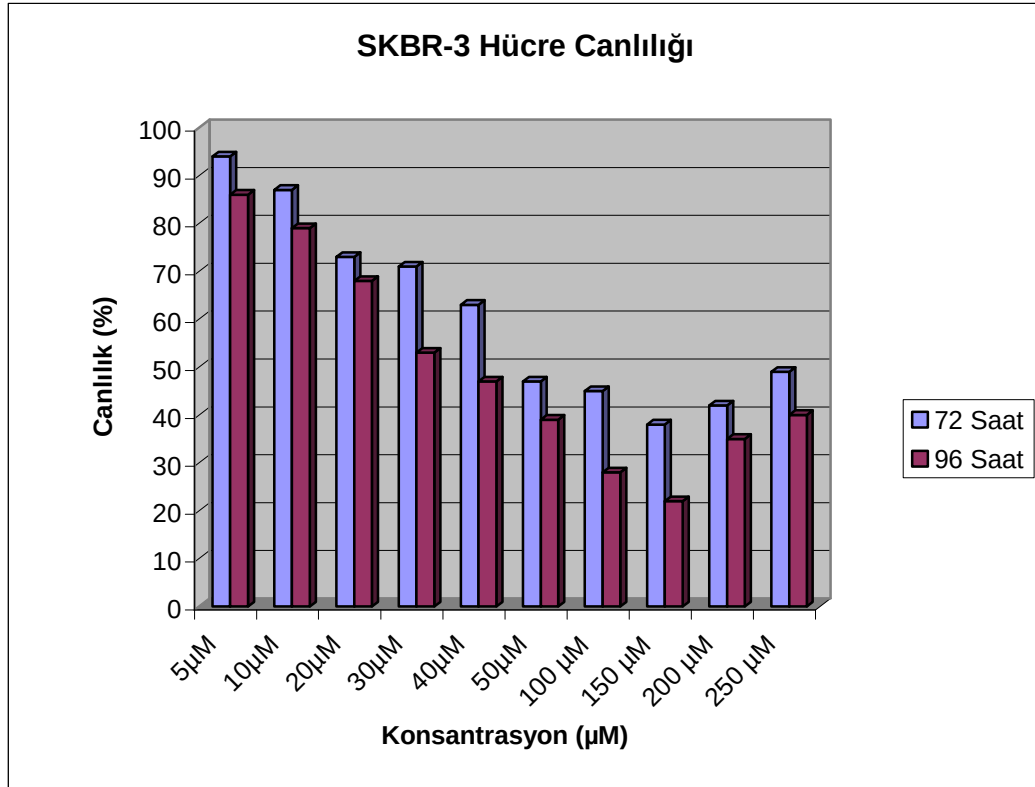
3.1. MTT Sitotoksisite Bulguları

3.1.1. Ellajik Asitin SKBR-3 Hücrelerinde Doz ve Zamana Bağlı Sitotoksik Etkisini Değerlendirme Bulguları

Ellajik asidin uygulandığı SKBR-3 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, 72 ve 96 saatlik inkübasyonu sonrası uygulanan maddenin tüm dozlarında mitokondriyal aktivite de zamana ve doza bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde bir azalma gözlenmektedir. Ellajik asitin uygulanan düşük dozlarından itibaren hücre canlılığı üzerinde azalma gözlenmiştir. Uygulanan ellajik asit konsantrasyonunun 72 saatlik inkübasyonu sonrasında da sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Ancak SKBR-3 hücrelerinin canlılık oranında 96 saatte daha fazla azalma gözlenmiştir. Bu hücre hattına uygulanan ellajik asitin en düşük dozu olan 5µM’ da ölüm yüzdesi 72 saatte %6, 96 saatte %14 olarak bulunmuştur. 250µM’a kadar ellajik asitin 10 farklı konsantrasyonu uygulanmıştır ancak en etkin doz 150 µM olarak bulunmuştur. Uygulanan 150 µM ellajik asit konsantrasyonunda ise ölüm yüzdesi ; 72 saatte %62, 96 saatte %78 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Ellajik asidin uygulandığı SKBR-3 hücrelerinin 72 ve 96 saat canlılık yüzde değerleri

Dozlar	Canlılık Yüzdeleri (%)	Canlılık Yüzdeleri (%)
	72 Saat	96 Saat
5 μ M	94	86
10 μ M	87	79
20 μ M	73	68
30 μ M	71	53
40 μ M	63	47
50 μ M	47	39
100 μ M	45	28
150 μ M	38	22
200 μ M	42	35
250 μ M	49	40



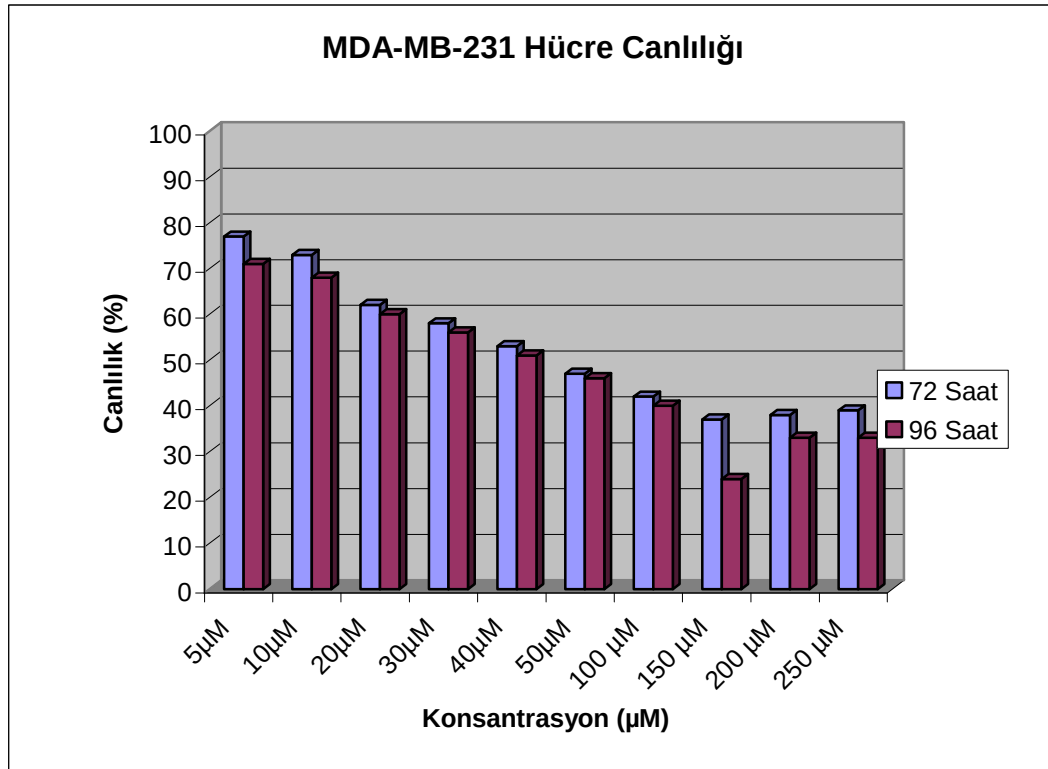
Şekil 3.1. Ellajik asitin uygulandığı SKBR-3 hücrelerinin 72 ve 96 saatlik hücre canlılığı grafiği.

3.1.2. Ellajik Asitin MDA-MB-231 Hücrelerinde Doz ve Zamana Bağlı Sitotoksik Etkisini Değerlendirme Bulguları

Ellajik asidin uygulandığı MDA-MB-231 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, 72 ve 96 saatlik inkübasyonu sonrası uygulanan maddenin tüm dozlarında mitokondriyal aktivite de zamana ve doza bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde bir azalma gözlenmektedir. Ellajik asitin uygulanan düşük dozlarından itibaren hücre canlılığı üzerinde azalma gözlenmiştir. SKBR-3 hücrelerine göre uygulanan ilk dozlarda daha fazla hücre ölümü elde edilmiştir. En fazla hücre ölümü elde edilen doz her iki hücre tipinde de 150µM olarak bulunmuştur. Uygulanan ellajik asit konsantrasyonunun 72 saatlik inkübasyonu sonrasında da sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık oranında 96 saatte daha fazla azalma gözlenmiştir. Bu hücre hattına uygulanan ellajik asitin en düşük dozu olan 5µM’ da ölüm yüzdesi 72 saatte %23, 96 saatte %29 olarak bulunmuştur. 250µM’a kadar ellajik asitin 10 farklı konsantrasyonu uygulanmıştır ancak en etkin doz 150 µM olarak bulunmuştur. En etkili dozdaki ölüm oranları her iki hücre tipinde de benzerlik göstermektedir. Uygulanan 150 µM ellajik asit konsantrasyonunda ise ölüm yüzdesi ; 72 saatte %63, 96 saatte %76 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.2. Ellajik asidin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinin 72 ve 96 saat canlılık yüzde değerleri.

Dozlar	Canlılık Yüzde (%)	Canlılık Yüzde (%)
	72 Saat	96 Saat
5µM	77	71
10µM	73	68
20µM	62	60
30µM	58	56
40µM	53	51
50µM	47	46
100 µM	42	40
150 µM	37	24
200 µM	38	33
250 µM	39	33

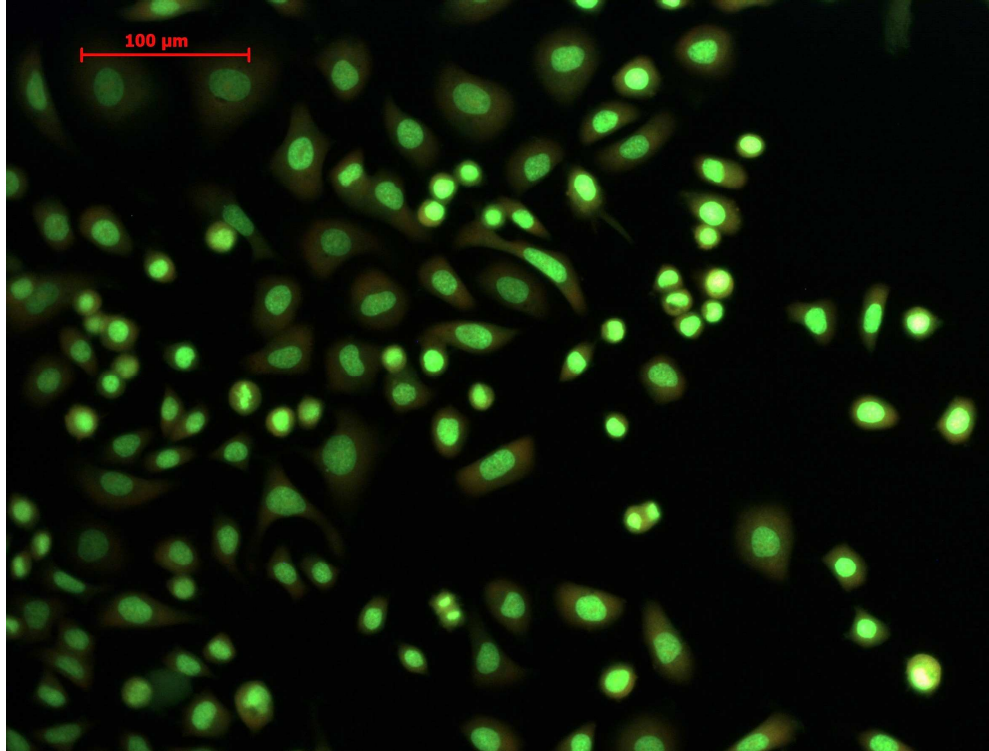


Şekil 3.2. Ellajik asidin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinin 72 ve 96 saatlik hücre canlılığı grafiği.

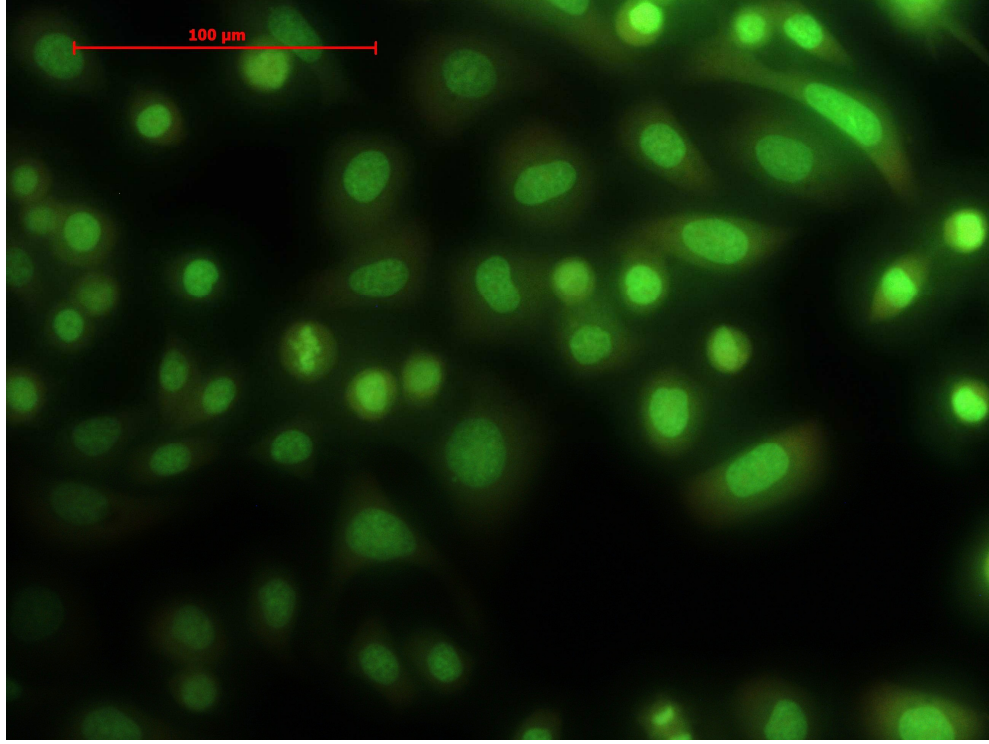
3.2. Floresan Mikroskop ile Morfolojik İncelenme Bulguları

3.2.1. Ellajik Asitin EC 50 Değerinin SKBR-3 Hücrelerindeki Yapısal Değişikliklerin Floresan Mikroskobu İnceleme Bulguları

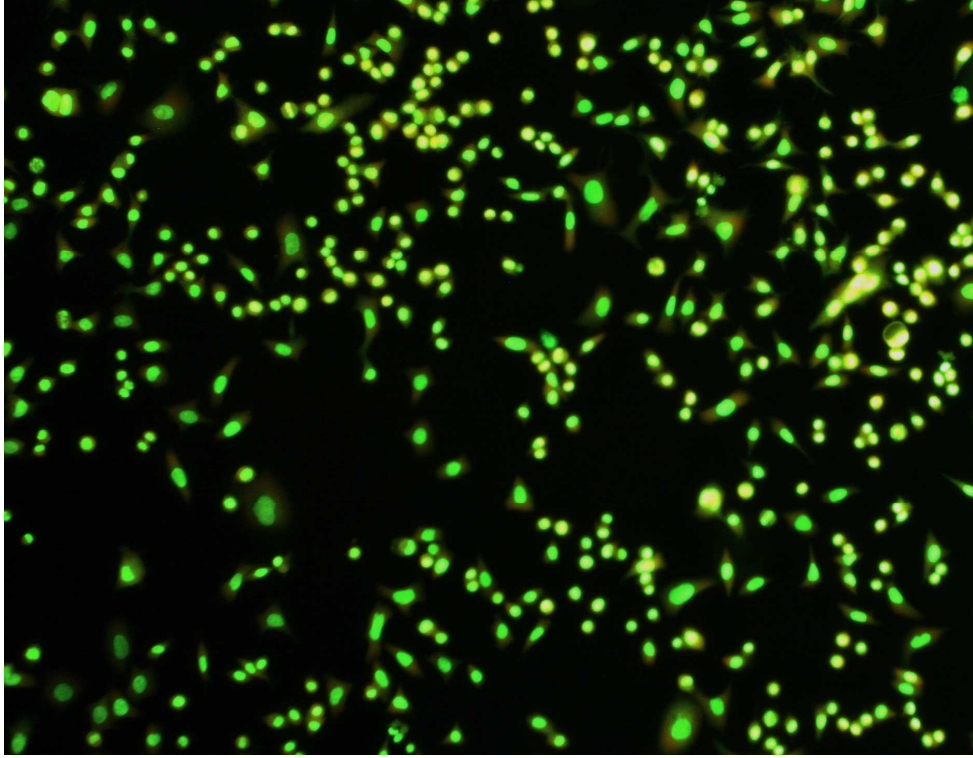
SKBR-3 hücrelerinin 72. saat (Şekil 3.3) ve 96. saat (Şekil 3.4.) genel morfolojik yapısına floresan mikroskobu ile bakıldığında, hücrelerin, hücreler arası bağlantıların ve çekirdeğin düzgün morfolojik yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ellajik asit uygulanan SKBR-3 hücrelerinin 72. saat (Şekil 3.5) ve 96. saat (Şekil 3.6) genel morfolojik yapısı MTT sitotoksikite testi sonuçlarını doğrulamaktadır. Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimler ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. Ellajik asitin genel olarak hücre serilerinde belirgin şekilde boşluklar, hücre şeklinin yuvarlaklaşması, hücreler arası bağlantılarda kopmalar, çekirdekte deformasyonlar, hücre hacminde azalma ve apoptotik cisimciklerin oluşumları görülmüştür. Ellajik asit genel olarak hücrenin sitoplazmasına yayılarak hücrelerde belirgin bir hasar verdiği gözlemlenmiştir.



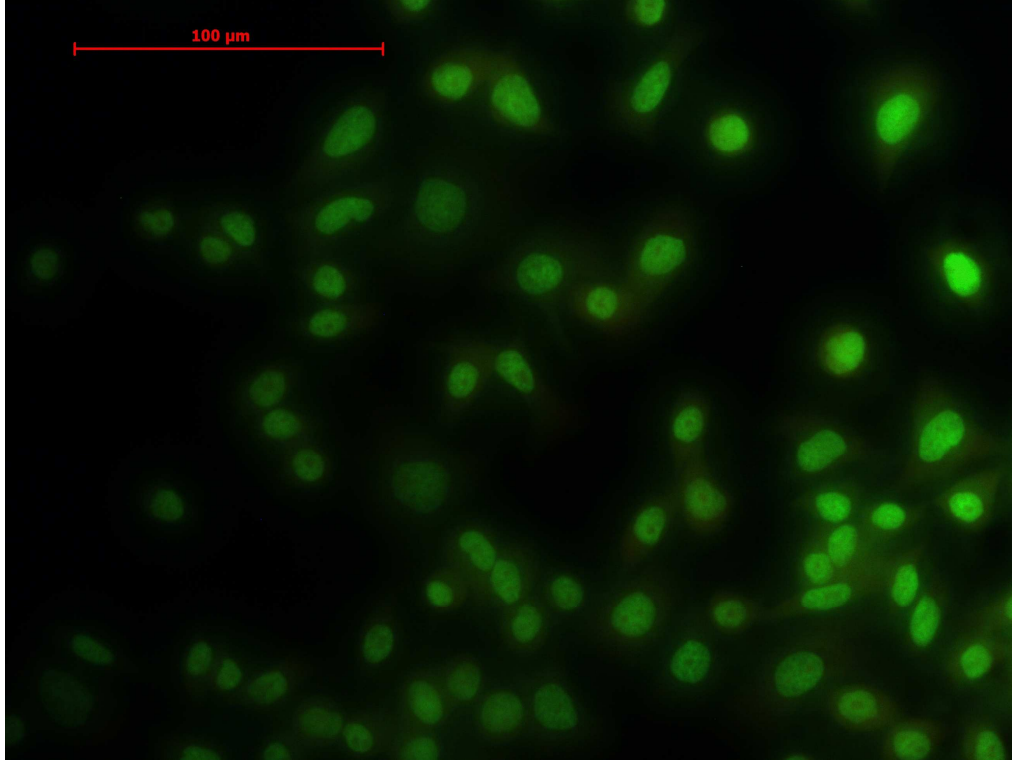
Şekil 3.3. Akridin oranj ile boyanan SKBR-3 hücrelerinin 72. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



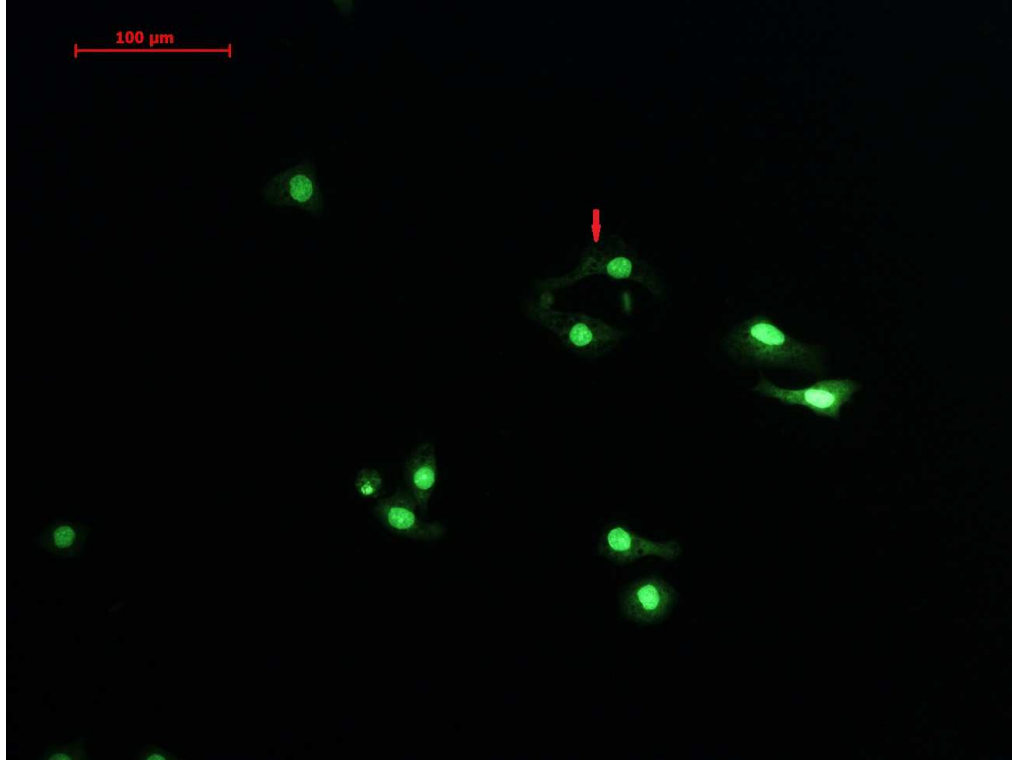
Şekil 3.3. (Devam) Akridin oranj ile boyanan SKBR-3 hücrelerinin 72.saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



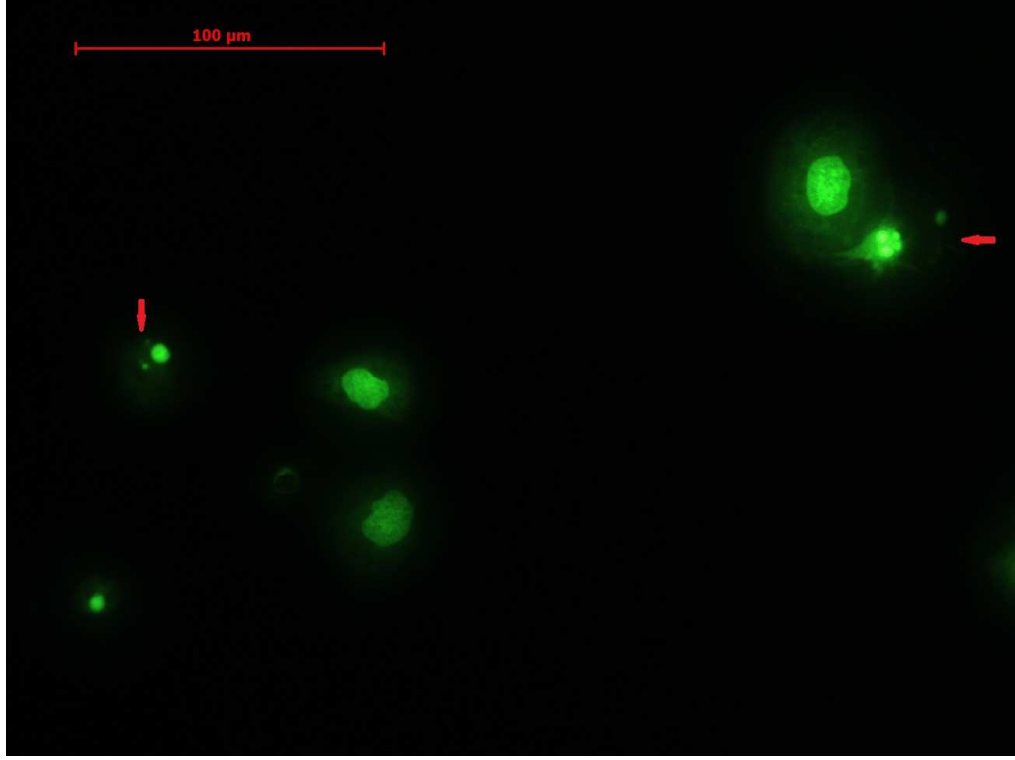
Şekil 3.4. Akridin oranj ile boyanan SKBR-3 hücrelerinin 96. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



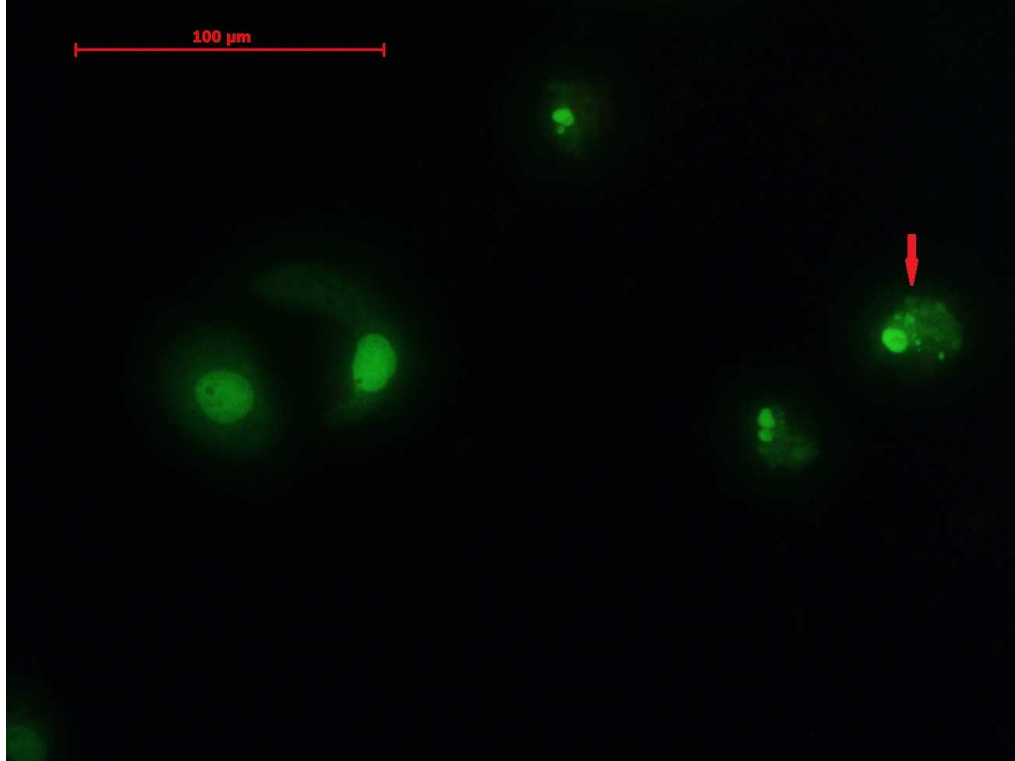
Şekil 3.4. (Devam) Akridin oranj ile boyanan SKBR-3 hücrelerinin 96. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



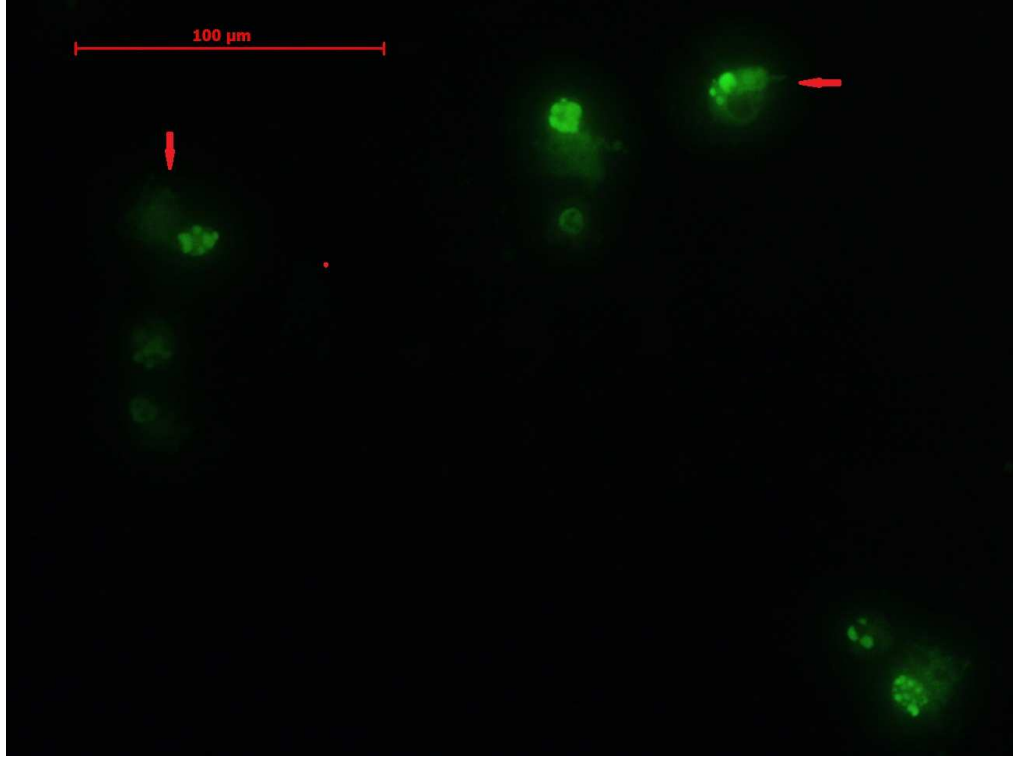
Şekil 3.5. Ellajik asitin EC 50 değerinin 72. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskobunda değerlendirilmesi



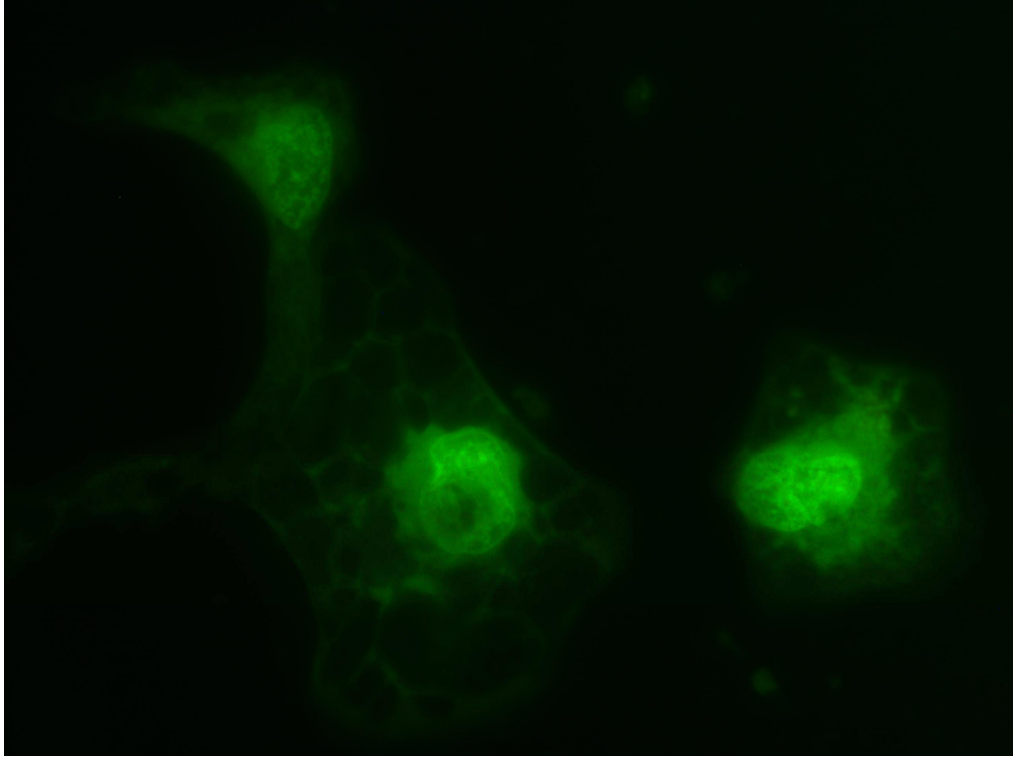
Şekil 3.5. (Devam) Ellajik asitin EC 50 değerinin 72. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi



Şekil 3.6. Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi



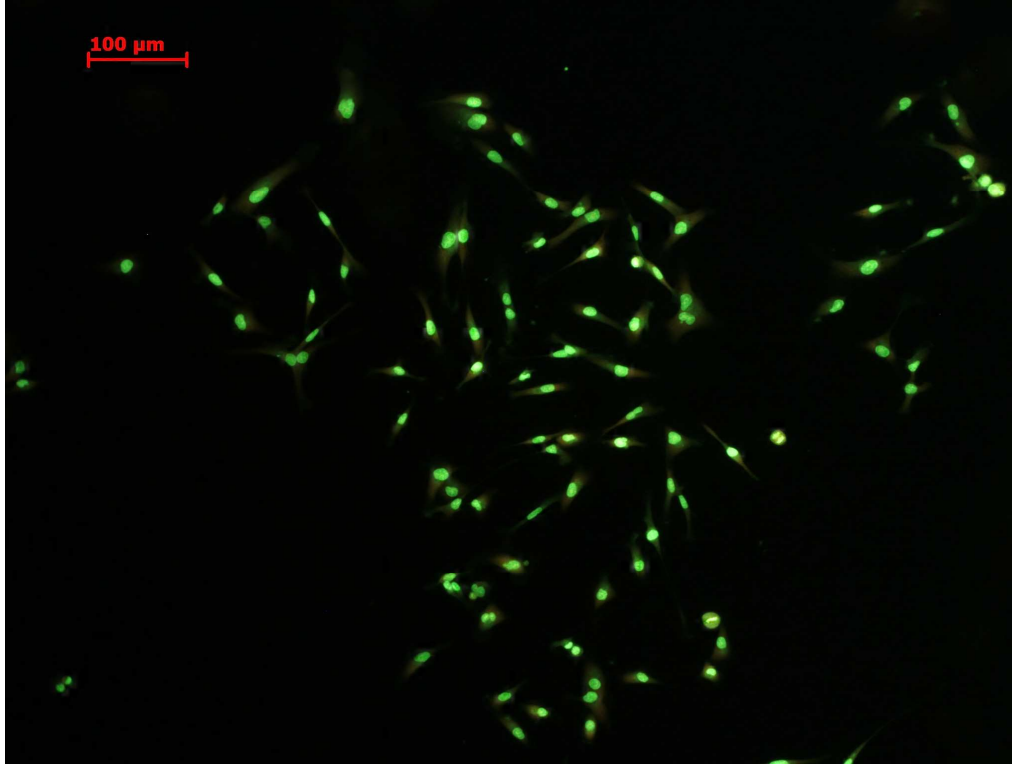
Şekil 3.6. (Devam) Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi



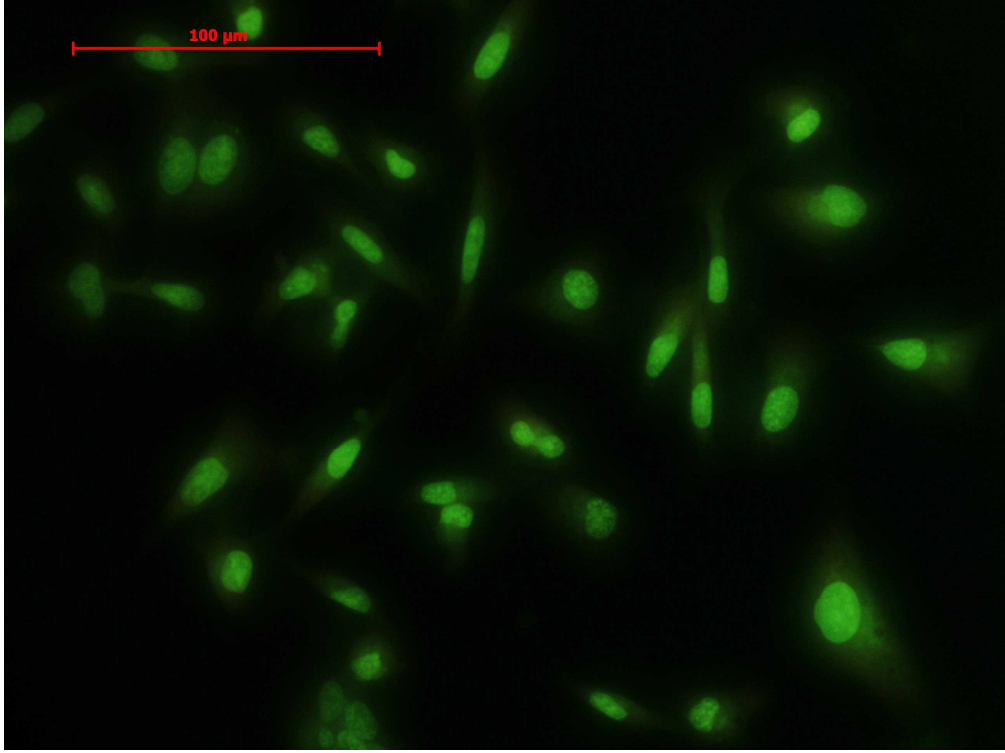
Şekil 3.6. (Devam) Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değışikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değlendirilmesi

3.2.2. Ellajik Asitin EC 50 Değerinin MDA-MB-231 Hücrelerindeki Yapısal Değişikliklerin Floresan Mikroskobu İnceleme Bulguları

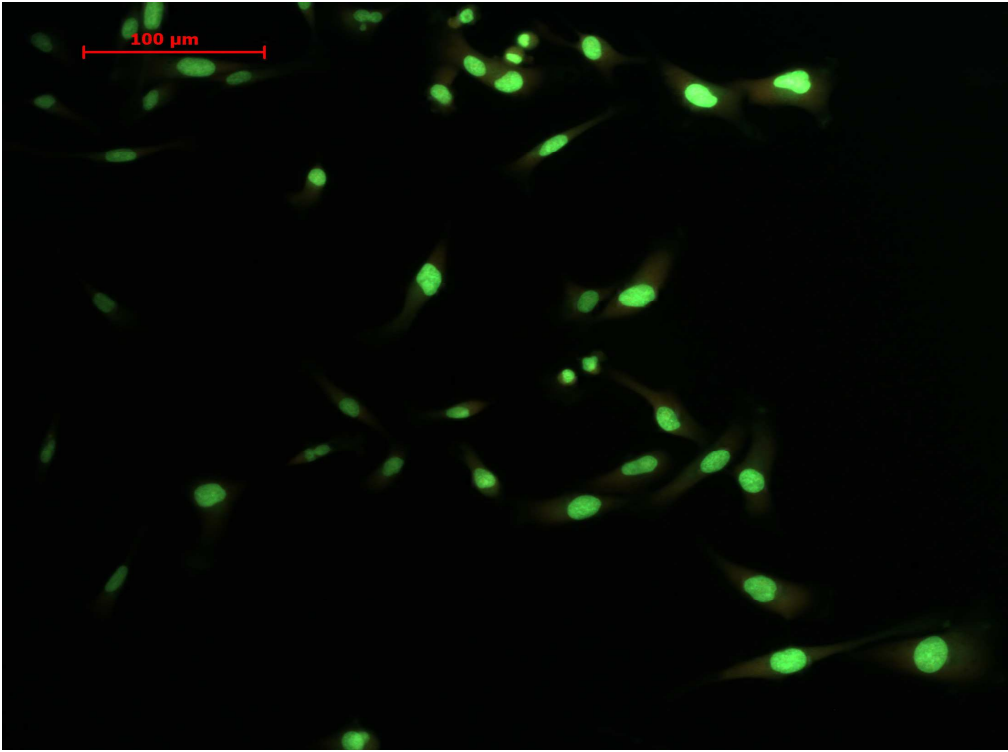
MDA-MB-231 hücrelerinin 72. saat (Şekil 3.7) ve 96. saat (Şekil 3.8) genel morfolojik yapısına floresan mikroskop ile bakıldığında, hücrelerin, hücreler arası bağlantıların ve çekirdeğin düzgün morfolojik yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ellajik asit uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72. saat (Şekil 3.9) ve 96. saat (Şekil 3.10) genel morfolojik yapısı MTT sitotoksikite testi sonuçlarını doğrulamaktadır. Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimler ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. Ellajik asitin genel olarak hücre serilerinde belirgin şekilde boşluklar, hücre şeklinin yuvarlaklaşması, hücreler arası bağlantılarda kopmalar, çekirdekte deformasyonlar, hücre hacminde azalma ve apoptotik cisimciklerin oluşumları görülmüştür. Ellajik asit genel olarak hücrenin sitoplazmasına yayılarak hücrelerde belirgin bir hasar verdiği gözlemlenmiştir.



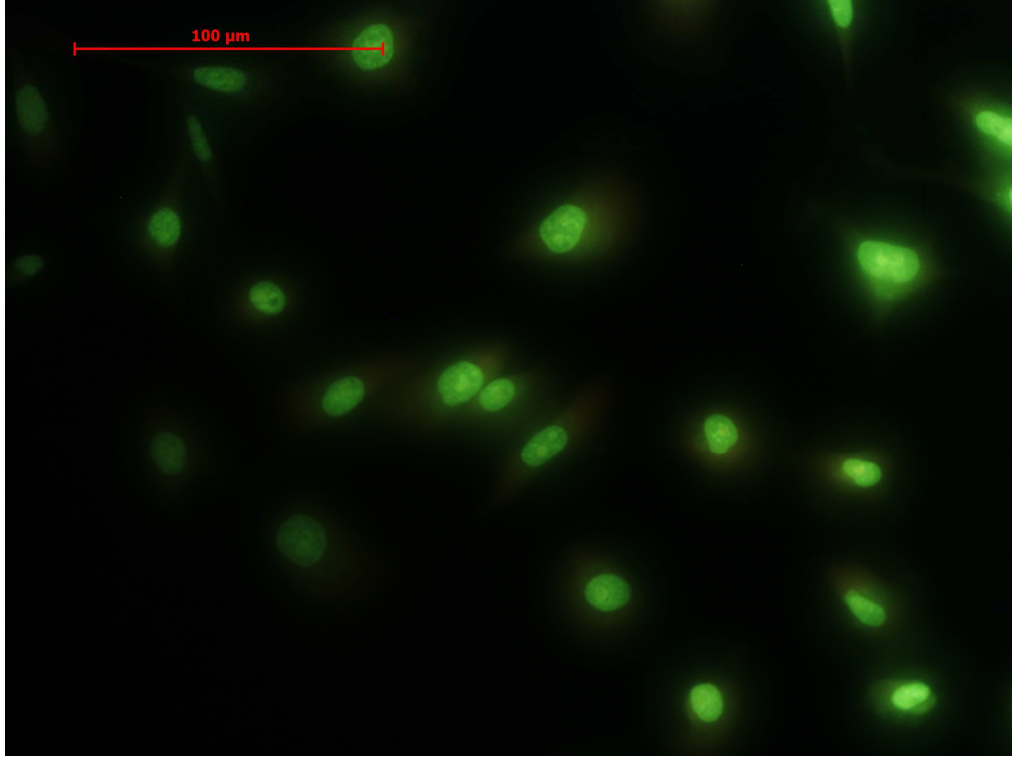
Şekil 3.7. Akridin oranj ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



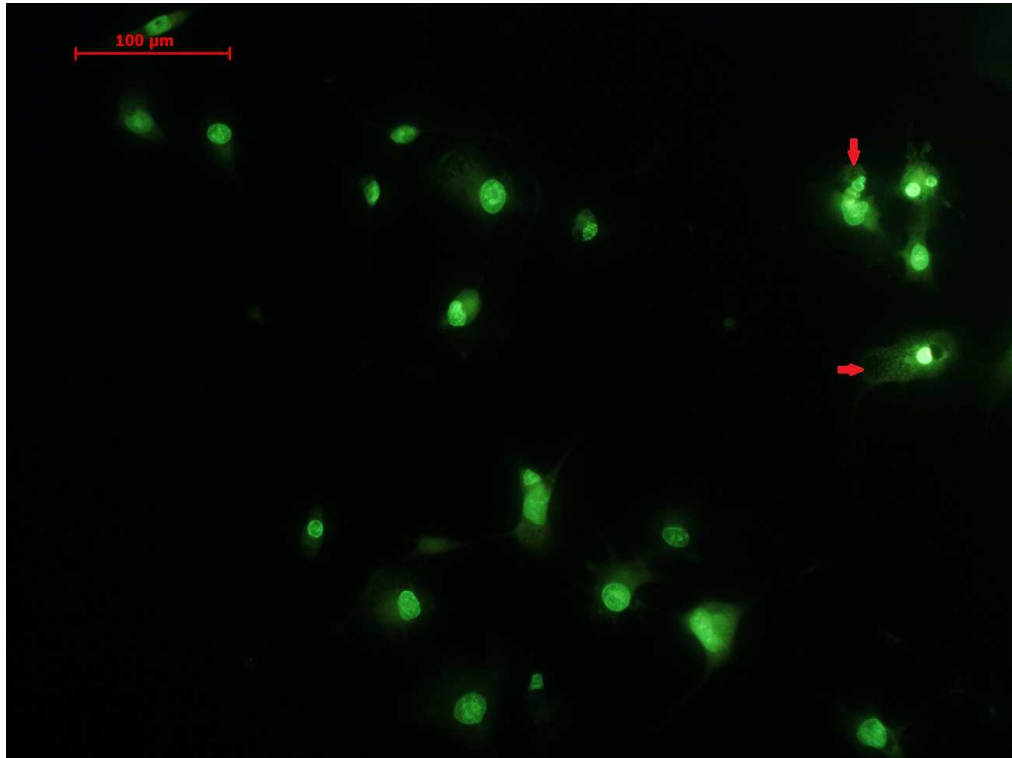
Şekil 3.7. (Devam) Akridin oranj ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinin 72. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



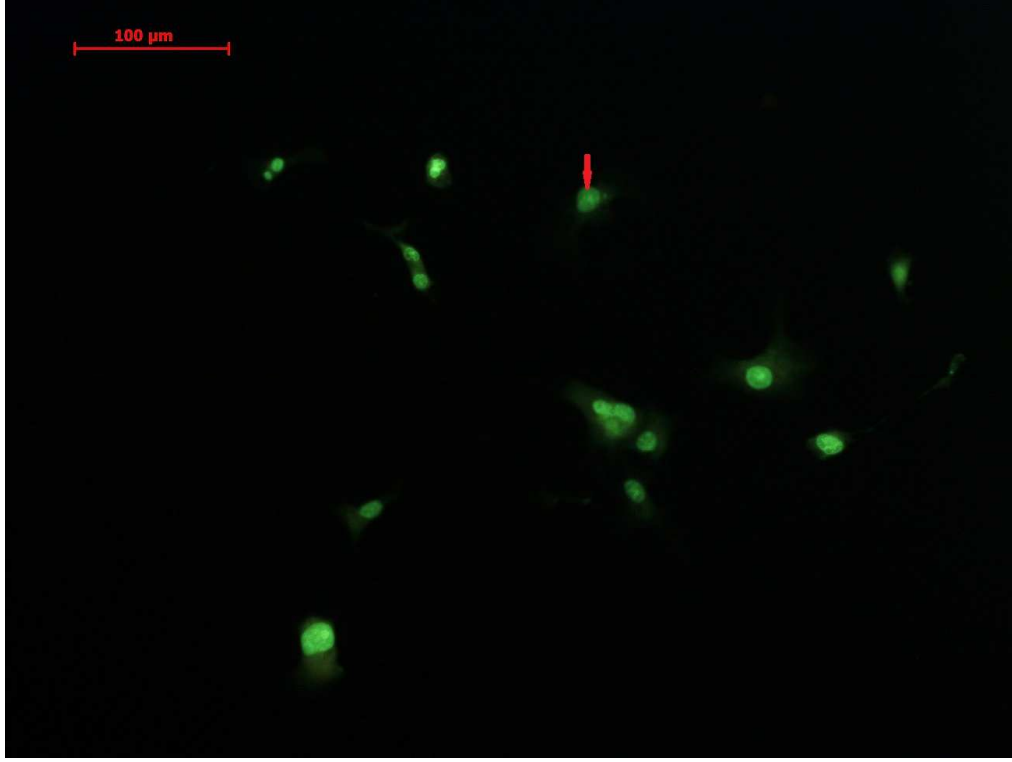
Şekil 3.8. Akridin oranj ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinin 96. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



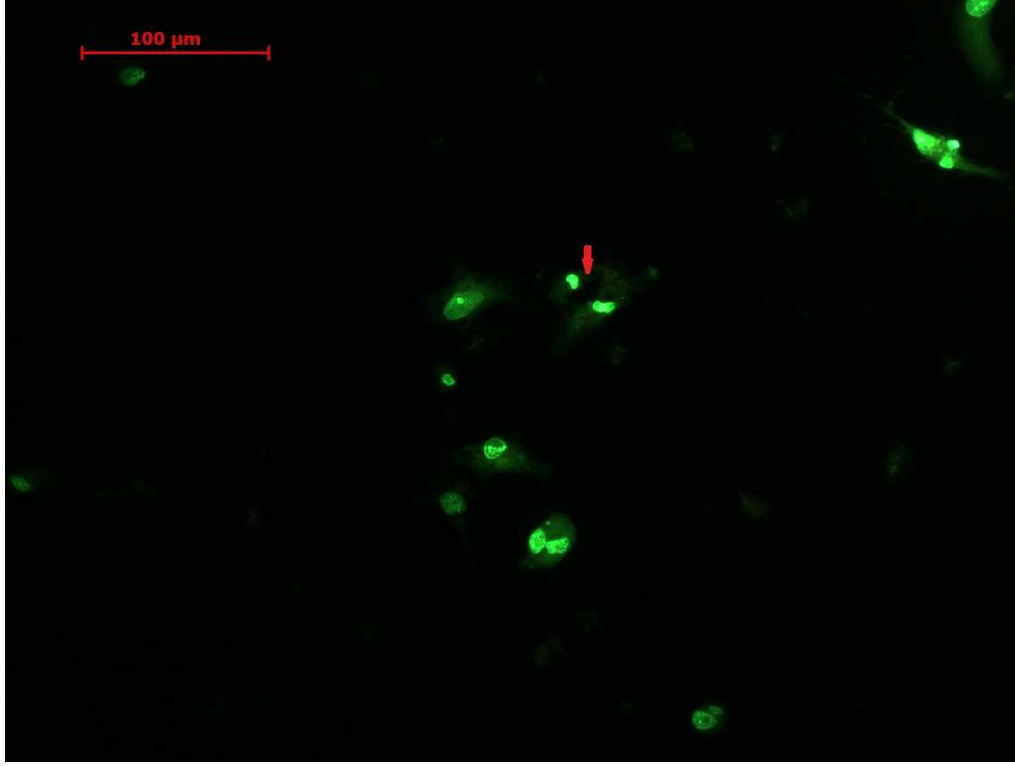
Şekil 3.8. (Devam) Akridin oranj ile boyanan MDA-MB-231 hücrelerinin 96. saat sonundaki genel morfolojik yapısının floresan mikroskop ile görüntülenmesi



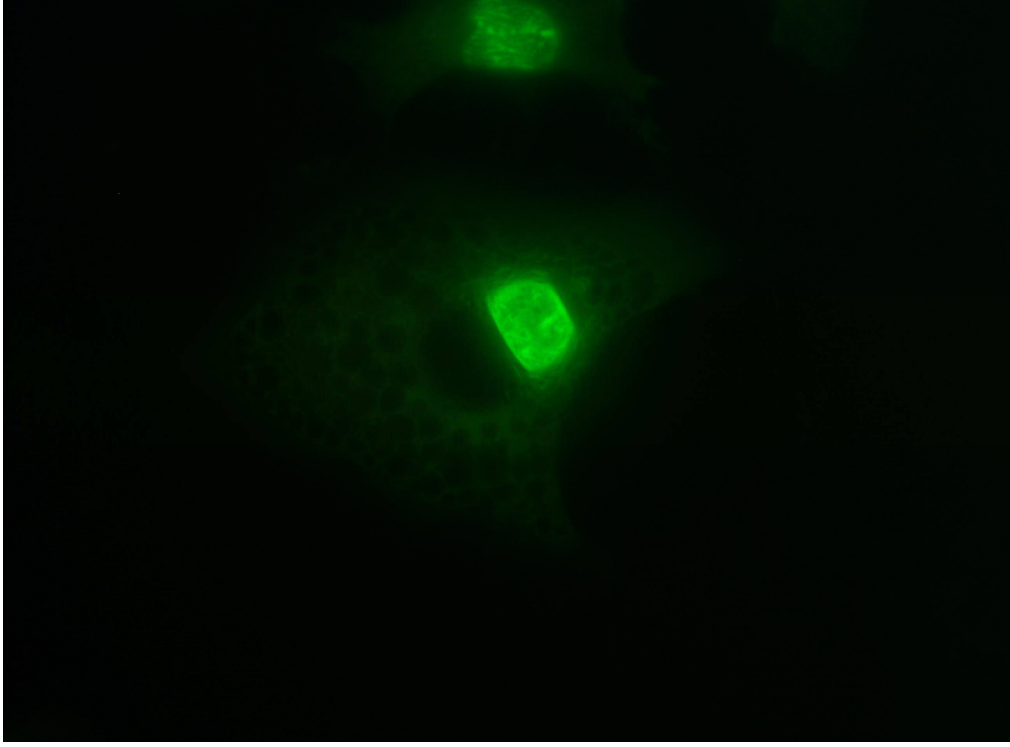
Şekil 3.8. (Devam) Ellajik asitin EC 50 değerinin 72. saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi



Şekil 3.9. Ellajik asitin EC 50 değerinin 72. saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi



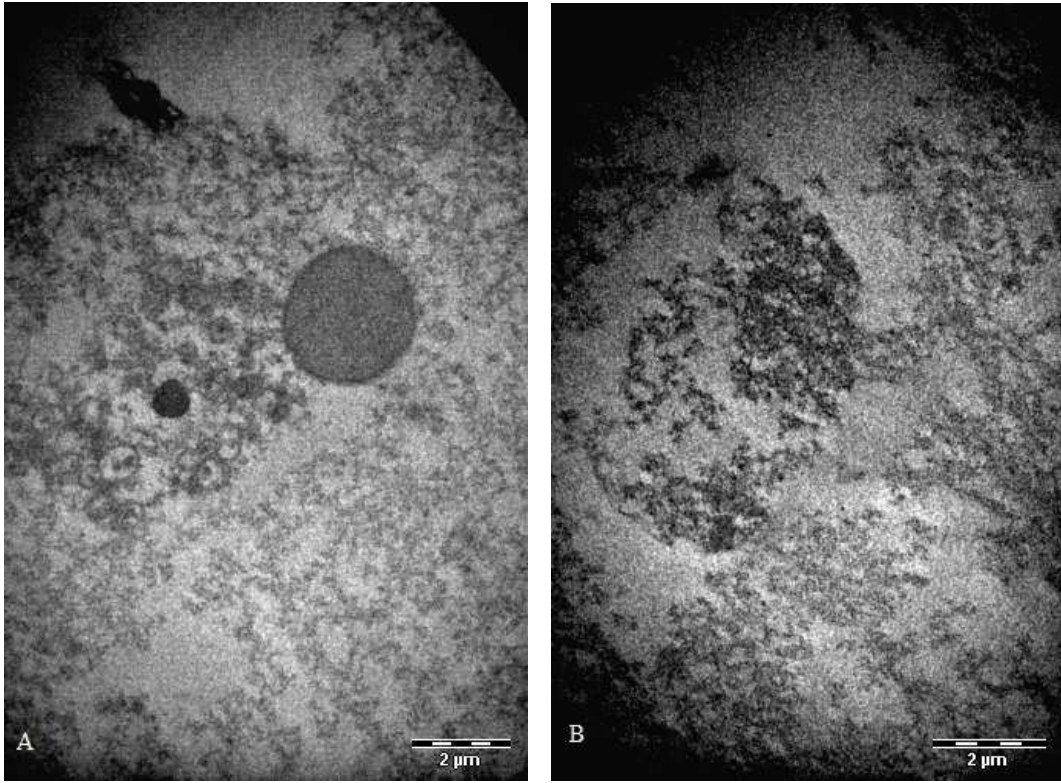
Şekil 3.10. Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmesi



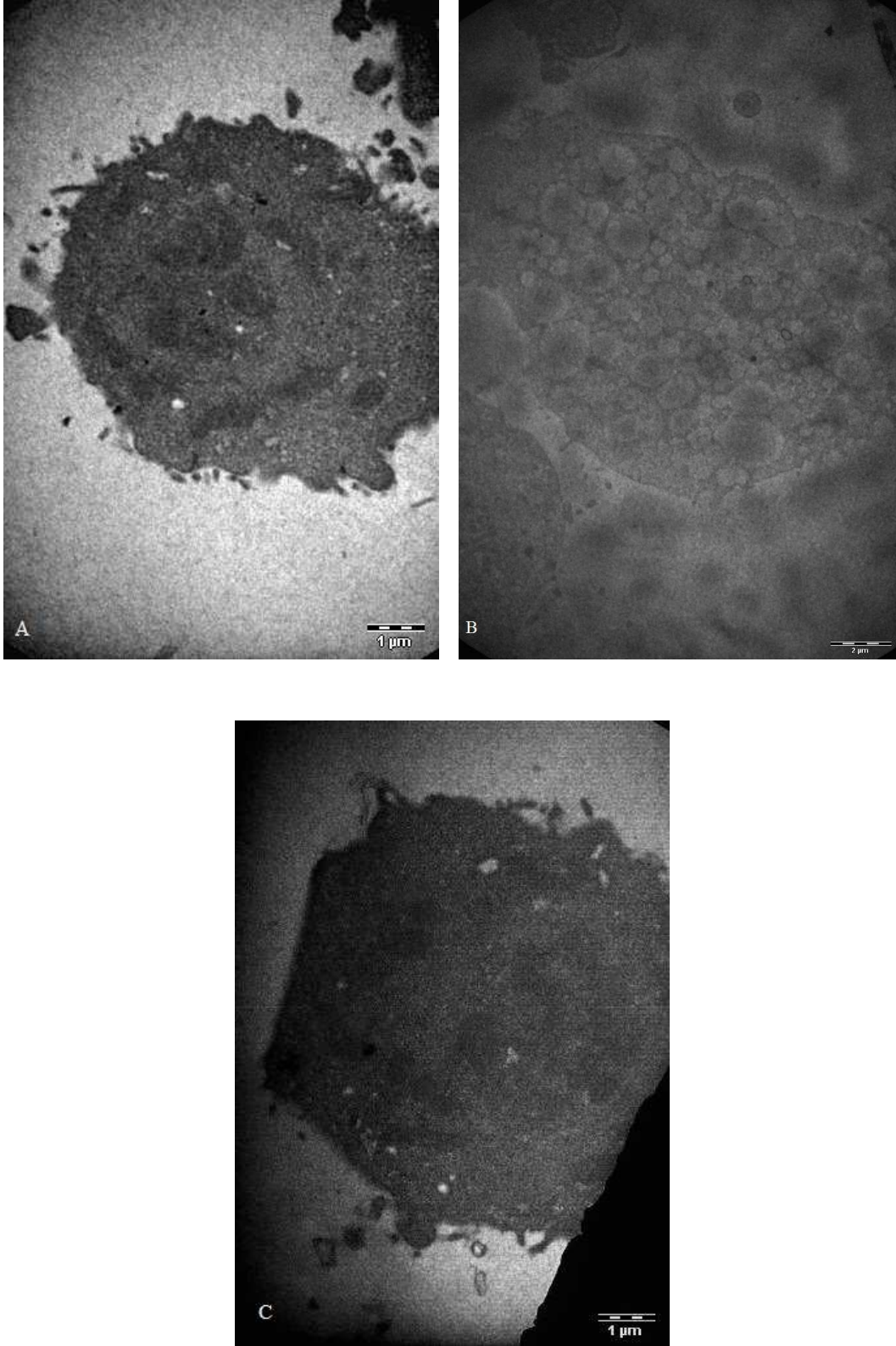
Şekil 3.10. (Devam) Ellajik asitin EC 50 değerinin 96. saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki yapısal değışikliklerinin akridin oranj boyama ile floresan mikroskobunda değlendirilmesi

3.3. Geçirimli Elektron Mikroskop ile İnce Yapısal Değişiklik İnceleme Bulguları

Ellajik asitin EC 50 değeri uygulanan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücrelerini elektron mikroskopunda incelediğimizde hücrelerin morfolojisinin yuvarlak bir hal aldığı gözlenmiştir. Apoptozun morfolojik özelliklerinden biri olan apoptotik cisimcikler oluşumları tespit edilmiştir, ayrıca otofajik vakuol miktarında artış gözlenmiştir. Hücre içerisinde yer yer boşluklar oluşmuştur. Hücre organellerinde yapısal hasarlar gözlenmiştir. Şekil 3.11 (A) 'da hücre çekirdeğinin yuvarlaklaştığı gözlenmiştir. Şekil 3.11 (B) 'de ellajik asitin hücre içerisinde dağılarak hücrede çok belirgin hasar oluşturduğu gözlenmiştir. Şekil 3.12 (A) 'da hücrenin genetik materyalinde yüzük şeklinde nüklear kondensasyon gözlenmiştir. Şekil 3.12 (B)' de hücre içerisinde oluşan vakuolizasyon floresan mikroskopunda gözlenen Şekil 3.6 ile paralellik göstermektedir.



Şekil 3.11. Ellajik asitin EC 50 değerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin taramalı elektron mikroskopunda değerlendirilmesi. **(A)** X8200 **(B)** X9900



Şekil 3.12. Ellajik asitin EC 50 değerinin SKBR-3 hücreleri üzerindeki yapısal değişikliklerinin taramalı elektron mikroskopunda değerlendirilmesi. **(A)** X11500 **(B)** X6000 **(C)** X11500

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern çağın insanları artan bir sıklıkta kanserle ve kanser yüzünden ölümlerle karşılaşmaktadır. İstatistikler erkeklerde; akciğer, bağırsak, rektum ve prostat kanserinin, kadınlarda meme, bağırsak, rektum ve mide kanserinin sık görüldüğünü rapor etmektedir (Abdulla ve Greber, 2000). Meme kanseri kadınlarda yalnız en sık görülen değil, aynı zamanda birçok ülkede kadınlarda kanserden ölümlerin başında gelmektedir. Yaşam boyunca her on kadından biri meme kanseri olma ve bunların üçte biri ise meme kanserinden ölme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Meme kanserinin erken teşhisinin hayatta kalma oranını arttırdığı bilinmektedir (McPherson ve ark., 2000). Son yıllarda meme kanseri insidansında artış; mortalitesinde ise azalma izlenmektedir (Jemal ve ark., 2010). Bunun nedeninin tarama yöntemlerinin gelişmesine bağlı erken teşhis edilen olgu sayısındaki artış ya da tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar birçok doğal ürünün, dünya çapında görülen kanserlere karşı kimyasal koruyucu ajanlar olduğunu göstermiştir. Bu ürünlerin en temel grubu güçlü antioksidanlar, diğerleri doğal olarak bulunan fenolik bileşenler ve kalanları da koruyucu özellikleri olan reaktif gruplardır. Bu doğal ürünler; sebzelerde, meyvelerde, bitki ekstraktlarında ve bitkiler de bulunmaktadır (Reddy ve ark., 2003).

Günümüzde mikro metastazlarla ilerlediği bilinen meme kanseri oluşumunun preklinik evrede önlenmesi açısından doğal ürünler önem teşkil etmektedir. Son yıllarda, bitkiler ve hayvanlardan elde edilen bileşiklere karşı tıp alanında ilaç olarak kullanılması olasılığı yüzünden artan bir ilgi vardır. Bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal ürünlerin avantajları çok fazladır. Farmasötik ve kozmetik açılarından, elde edilen bileşikler büyük bir orana ve biyolojik etkilere sahiptir. Bu özellikler, yeni aktif moleküllerin ortaya çıkarılması ile, yapı fonksiyon ilişkilerinin çalışılması sonucu yeni biyolojik mekanizmaların keşfedilmesiyle, daha aktif ve istenmeyen yan etkilere sahip olmayan ilaçların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca doğal ürünler her yerde ve bol olarak bulunmaktadır. Bu yüzden doğal ürünler yeni aktif bileşiklerin elde edilmesi için önemli araştırma kaynaklarıdır (Rancan ve ark., 2002).

Geçtiğimiz on yıl içinde kanser araştırmalarındaki ilerlemeler kanser biyolojisi ve genetiğini anlamamızı kolaylaştırmıştır. Bu çalışmaların içinde en önemlisi, apoptozu kontrol eden genlerin malignansi üzerinde, apoptotik mekanizmanın bozulması nedeniyle tümör oluşumu, gelişimi ve metastaza yol açmasının saptanmış olmasıdır. Bu nedenle, doğal ürünler kullanılarak tümör baskılanması apoptozun başlatılması yolu ile olabilir. Bu da doğal ürünlerle kanser tedavisi için genetik bir temel sağlamaktadır (Reddy ve ark., 2003).

Ellajik asit, bitkilerdeki fenol yapısında doğal olarak bulunan ve anti-mutajenik, anti-kanserojenik aktivitesi olan bir maddedir.

Losso ve arkadaşlarının yaptıkları ellajik asitin antiproliferatif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada normal hücre serisi olarak insan akciğer fibroblast hücre hattı HEL 299, tümör hücre serisi olarak Caco-2 (kolon), MCF-7 (meme), Hs 578T (meme) ve DU 145 (prostat) kanseri gibi farklı hücre serileri kullanılmıştır. Ellajik asitin 10 - 100 $\mu\text{mol/L}$ ' lik konsantrasyonu ile 24 saatlik inkübasyon sonrası ellajik asitin fibroblast hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Kolon, meme ve prostat hücre hatları üzerinde de güçlü antiproliferatif etki göstermektedir. Çalışmalar sonucunda ellajik asitin normal ve kanser hücre hatları üzerinde seçici sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği düşünülmektedir (Losso ve ark., 2004).

Kim ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada farklı insan meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF-7 üzerine ellajik asitin antiproliferatif etkisi araştırılmıştır. Çalışmada ellajik asitin 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM ve 250 μM olarak 5 farklı konsantrasyonu 24 saat süreyle hücrelere uygulanmıştır. Çalışma da kullanılan 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 250 μM konsantrasyondaki dozlar bizim çalışmamızda kullandığımız dozlarla aynıdır. MDA-MB-231 hücreleri üzerinde ellajik asitin kontrole göre anlamlı antiproliferatif etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar 24 saatlik ellajik asit inkübasyonu sonrasında bizim çalışmamızda kullandığımız MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini bulmuşlardır. Deneylerimizde 72 saat sonrasında bulduğumuz hücre canlılığı üzerindeki etkisine oranla 24 saatte daha az etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak araştırmacıların da 72 saatlik inkübasyon sonrasında bizim değerlerimize benzer değerler bulacağı

düşünülmektedir. Araştırmacıların aynı konsantrasyon ve inkübasyon süresinin MCF-7 hücresi üzerinde proliferatif etki göstermediği, daha yüksek konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak ellajik asitin iki farklı meme kanseri hücre üzerinde farklı antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (Kim ve ark., 2009)

Taninlerden tannik asit ile ellajik ve gallik asitlerin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Chinese hamster hücre dizisi B14'e, bu maddelerin 15, 30, 60, 120, 180 ve 240 μM dozları uygulanmıştır. 1 saat sonra kontrole göre, 15 μM 'den 60 μM doğru DNA dal kırıklarında bir artış olduğu, bu artışın 60 μM 'de en fazla olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığı incelendiğinde de, hücre ölümünün en fazla 60 μM de olduğu ve ölüm oranının % 50'ye vardığı, 120 μM 'den 240 μM doğru da hücre ölümünün daha az olduğu tesbit edilmiştir (Labieniec ve Gabryelak, 2003).

Khanduja ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ellajik asit verilen sıçanlarda GSH enzim aktivitesinin arttığını bulmuşlar ve bu artışı ellajik asitin okside glutasyonu rejenere edebileceğini ve GSH sentezini arttırabileceğini iddia ederek izah etmişlerdir (Khanduja ve ark., 1999). Bunlara benzer birçok çalışmada da polifenollerin katalaz, GSH-Px ve SOD gibi birçok antioksidanın aktivitesini arttırdığı rapor edilmektedir (Akkuş, 1995; Rodrigo ve ark., 2002).

H_2O_2 ve AlCl_3 verilmiş sıçanların üzerine, Ellajik asit ve Hesperetin'in etkisinin incelendiği bir çalışmada incelenen bütün dokulardaki MDA değerleri H_2O_2 ve AlCl_3 gruplarında yüksek çıkması, bu maddelerin radikal etki göstererek oksidatif stresi artırdığına delil teşkil etmektedir. AlCl_3 +Ellajik asit grubu serum, karaciğer ve beyin dokularında ellajik asitin etkisiyle, AlCl_3 grubuna göre MDA değerleri düşük çıkmıştır. Bu sonuç, ellajik asitin oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir (Khanduja ve ark., 1999).

Çalışmada seçilen SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatları meme kanserinin farklı moleküler özelliklerini temsil etmektedir. SKBR-3 hücre hattı, Luminal tipte meme kanserini temsil ederken, MDA-MB-231 hücre hattı, Post-EMT tipte meme kanserini temsil etmektedir. Heterojen bir hastalığı farklı özellikleriyle temsil eden hücre hatlarıyla çalışmak, *in vitro* deney bulgularının klinik düzeye yansıtılmasının geçerliliği noktasında önemlidir.

Çalışmamızda ellajik asitin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT canlılık analizi ile belirlenmiştir. SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ikilenme zamanını 72 saat bulunmuştur. Buna bağlı olarak da ellajik asit uygulanan hücreler 72 ve 96 saatlik inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Çalışmamızda ellajik asitin 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM, 100µM, 150µM, 200µM, 250µM konsantrasyondaki dozları MTT sitotoksite testi ile çalışılmıştır. MTT sonuçları değerlendirildiğinde ellajik asitin konsantrasyonuyla SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre canlılığı inhibisyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir. Ellajik asitin 72. ve 96. saat sonunda en az etkili olan 5µM konsantrasyonunda, SKBR-3 hücrelerinde 72 saatte %94 canlılık, 96 saatte %86 canlılık olarak hesaplanmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık değeri 72 saat için % 77 ve 96 saat için %71 olarak bulunmuştur. SKBR-3 hücresinde 10µM konsantrasyonda 72 saatte canlılık %87, 96 saatte canlılık %79 olarak bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinin 10µM konsantrasyonunda 72. saatte canlılık %73, 96. saatte canlılık % 68 olarak bulunmuştur. Ellajik asit, uygulanan düşük konsantrasyonlarına rağmen her iki hücre tipinde de hücre canlılığını azaltıcı yönde etki göstermiştir. Ellajik asitin hücre ölümünü tetikleyici etkisi hem konsantrasyona hem de süreye bağlı olarak artmaktadır. Ellajik asit uygulanan hücrelerin 72 ve 96 saatlik inkübasyonları sonrası en az canlılık her iki hücre tipinde de 150µM konsantrasyonda gözlenmiştir. En etkili doz 150 µM ellajik asit uygulandığında SKBR-3 hücrelerinde canlılık 72 saatte %38, 96 saatte %22 olarak bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde ise 150 µM ellajik asit uygulandığında canlılık 72 saatte %37, 96 saatte %24 olarak bulunmuştur. 200µM ve 250µM ellajik asit konsantrasyonu her iki hücre tipinde de 150µM konsantrasyona göre daha az etkili bulunmuştur. SKBR-3 hücrelerinde 200 µM konsantrasyon sonucu 72. saatte canlılık %42, 96. saatte %35 olarak bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde 200µM konsantrasyon sonrası canlılık %38, 96. saatte canlılık %33 olarak bulunmuştur. 250µM konsantrasyon ellajik asit SKBR-3 hücrelerine uygulandığında 72 saate canlılık %49, 96 saatte canlılık % 40 olarak bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerine 250µM ellajik asit konsantrasyonu uygulandığında 72 saatte canlılık %39, 96 saatte canlılık %33 olarak hesaplanmıştır. Her iki hücre tipinde de 200 µM ve 250 µM konsantrasyonlarda

hücre canlılığı artmıştır. Ellajik asitin en etkili olduğu doz yapılan çalışmamız sonrası 150µM olarak bulunmuştur. 200 ve 250µM konsantrasyon sonrası hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir. Ancak 150µM konsantrasyondaki kadar etkili olmamıştır. Bu durumu 96 saat süre boyunca aynı kalan ellajik asit konsantrasyonuna rağmen 96 saatlik bir süreçte kanser hücreleri çok hızlı bölünme göstererek hücre sayılarını arttırmaya devam ediyorlar. Canlı olan bu hücrelerde MTT sitotoksikite testine göre ışımaya veriyor ve hücrelerde azalan canlılık değerinin bulunmasına neden olmaktadır.

Çalışmanın son kısmında, hücre hatlarında olan yapısal ve ince yapısal değişiklikleri incelemek için TEM ve floresan mikroskobundan faydalanılmıştır. Floresan mikroskobu görüntüleri MTT sitotoksikite sonuçlarının doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Ellajik asitin uygulandığı hücrelerde; hücreler arası boşluklar, hücrelerin genel morfolojik yapısında bozukluklar, hücreler arası bağlantılarda kopmalar, hücrenin çekirdeğinde meydana gelen deformasyonlar ve alınan ince kesitlerde organel bazında değişiklikler gözlemlenmiştir. Ayrıca hücrelerin apoptoza gittiği gözlenmektedir.

Sonuç olarak ellajik asitin MTT ve Floresan boyama yöntemleri ile elde edilen verileri iki hücre tipinde karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde,

Ellajik asitin zamana ve doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle ellajik asit antikanser ilaç çalışmalarında ümit verici bir madde olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abdulla, M., Greber, P. (2000), "Role of diet modification in cancer prevention," *Biofactors*, **12(1-4)**, 45-51.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Faveal-Torres, E., Aguilar, C. N. (2007), "Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins," *Applied Microbiology Biotechnology*, **78(2)**, 189-199.
- Akkuş, İ. (1995), "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri," Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksoy, M. (1984), "Beslenme ve Kanser".
<http://www.saglik.org.tr/upload/dosyalar/beslenme-ve-kanser.pdf>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P. (2002), "The cell cycle and programmed cell death," *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York.
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E. (2008), "Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?," *Tıp Araştırma Dergisi*, **6(2)**, 93-104.
- Anonim (2002), "Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri (1995- 1999)," T. C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı, Ankara, Bakanlık Yayın No: 618, 145.
- Aslan, A., Temiz, M., Yiğit, Y., Can, R., Canbolant, E., Yiğit F. (2007), "Hemşirelik Yüksek Okulu Öğrencilerinin Meme Kanseri Hakkında Bilgi, Tutum ve Davranışları," *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, **6 (3)**, 193-198.
- Aslan, F. ve Gürkan, A. (2007), "Kadınlarda Meme Kanseri Risk Düzeyi," *Meme Sağlığı Dergisi*, **3(2)**, 63-68.
- Aslan, G. (2010), "Tümör İmmünolojisi," *Türk J Immunol.*, 15: 1.
- Akşit, H. Ve Bildik, A. (2008), "Apoptosis," *YYÜ. VETERİNERLİK FAKÜLTESİ DERGİSİ*, **19(1)**, 55-63.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B. (2000), "Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic

- apolipoprotein E-deficient mice,” *American Journal of Clinical Nutrition*, **71(5)**, 1062-1076.
- Aydın, S.A, Üstün, F. (2007), “Tanenler 1 Kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemler,” *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **33 (1)**, 21-31.
- Aydıntuğ, S. (2004), “Meme Kanserinde Erken Tanı,” *STED.*, **13 (6)**, 226-229.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N. (2006), “Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40(1)**, 206-210.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, Samir. (2006), “Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses,” *Food Chemistry*, **99**, 191– 203.
- Baloğlu, E. (2001), *Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Analogs*, Doktor of Philosophy in Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Bartelink, H., Benz, C., Cleveland, D., Dorn, R., Gralow, J., Gradishar, W.J., Grant, K., Heimann, R., Hellman, S., Hudis, C., Kerbel, R., Lippman, M., Lung, J., Posner, M.C., Steeg, P., Vestal, R., Weichselbaum, R.R., Zetter, B. (2003) “Expedition Inspiration Fund for Breast Cancer Research Meeting 2003,” *Breast Cancer Research and Treatment*, **80**, 139-144.
- Berger, M.S., Locher, G.W., Saurer. S., Gullick, W.J., Waterfield, M.D., Groner, B., Hynes, N.E. (1988), “Correlation of c-erb-B-2 Gene Amplification and Protein Expression in Human Breast Carcinoma with Nodal Status and Nuclear Grading,” *Cancer Res.*, **48**, 1238-1243.
- Bos J. (1989), “ras Oncogenes in Human Cancer: A Review,” *Cancer Res.*, **49 (17)**, 49-4682.
- Burtis, A. C., Ashwood, R. E. (2005), *Klinik Biyokimya Temel İlkeler*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Buyru, N., Tiğli, H., Özcan, F. ve Dalay, N. (2003), “Ras Oncogenes Mutation in Urine Sediments of Patients with Bladder Cancer,” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36(4)**, 399-402.
- Cabadak , H. (2008), “Hücre Siklusu ve Kanser,” *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **9(3)**, 51-61.

- Cameron, R. ve Feuer, G. (2000), "Incidence of Apoptosis and its Pathological and Biochemical Manifestations," *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, (Ed: Cameron, R.G ve Feuer, G.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1-35.
- Cemeroğlu, B. (2004), "Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi", Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, No: 35, 77-88.
- Clark G.M., Sledge JR G.W., Osborne, C.K., McGuire, W.L. (1987), "Survival from first recurrence: relatif importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patient," *J Clin Oncol.*, **5**, 55-61.
- Coşkun, F. (2006), "Gıdalarda bulunan doğal koruyucular," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**, 27-33.
- Cummings, M.C., Winterford, C.M. ve Walker, N.I. (1997), "Apoptosis," *Am J Surg Pathol.*, **21(1)**, 862.
- Curtin, J.F. ve Cotter, T.G. (2003), "Apoptosis: Historical Perspectives," *Assays Biochem.*, **39**, 1-10.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999), "Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis," *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 383-424.
- Ekmekçi, A., Konaç, E., Önen, H.İ. (2008) "Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık," *Marmara Medical Journal*, **21(3)**, 282-285.
- Ekshyyan, O. ve Aw, T.Y. (2004), "Apoptosis in Acute and Chronic Neurological Disorders," *Frontiers in Bioscience*, **9**, 1567-1576.
- Erkut., S.D., *Meme Kanseri Oluşturulmuş Farelerde N-Asetilsisteinin Arginaz Enzim Aktivitesi, Ornitin ve Üre Düzeyleri Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2006.
- Fajardo, J. E. (1992), *Phenolic compounds in peanut: Studies on pod maturity, ellagic acid, elicitors, growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus, seed protein profiles, and isozymes*, Doctor of Philosophy Thesis, Texas A & M University. Texas.
- Fischer, U., Schulze-Osthoff, K. (2005), "Apoptosis-based therapies and drug targets," *Cell Death and Differentiation*, **12**, 942-961.

- Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M.D., Struwing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto J., Rebbeck, T.R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B.A., Gayther S.A., Zelada-Hedman, M. et al. (1998), "Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families," *Am J Hum Genet.*, **62(3)**, 676-89.
- Imaly, J.A., Linn, S. (1988), "DNA damage and oxygen radical toxicity," *Science*, **240(4857)**, 1302- 1309.
- Kainu T., Juo S.H., Desper R., Schaffer A.A., Gillanders E., Rozenblum E., Freas-Lutz D., Weaver D., Stephan D., Bailey-Wilson J., Kallioniemi O.P., Tirkkonen M., Syrjakoski K., Kuukasjarvi T., Koivisto P., Karhu R., Holli K., Arason A., Johannesdottir G., Bergthorsson J.T., Johannsdottir H., Egilsson V., Barkardottir R.B., Johannsson O., Haraldsson K., Sandberg T., Holmberg E., Gronberg H., Olsson H., Borg A., Vehmanen P., Eerola H., Heikkila P., Pyrhonen S. and Nevanlinna H. (2000), "Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative novel breast cancer susceptibility locus," *Proc Natl Acad Sci USA*, **97(17)**, 9603-9608.
- Kandaş, N.Ö. (2004), "Apoptosis, Programlı Hücre Ölümü," *Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, **5(1)**, 7-10.
- Kapuscinski, J. (1990), "Interaction of nucleic acid with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes," *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 1323-1329.
- Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z. ve Melamed, M.R. (1982), "Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA," *Cytometry*, **2**, 201-211.
- Karabulut, B., Göker, E., Sezgin, V.C., Özdemir, N., Şanlı, U.A., Sanal, S., Uslu, R. (2003), "Meme Kanserinde c-erb-2 Ekspresyonu ile Diğer Prognostik Faktörler Arasında İlişki Var Mı ?," *Ege Tıp Dergisi*, **42 (3)**, 161 -165.
- Kasof, G., Degenhardt, K., Perez, D., Thomas, A., ve White, E. (1999), "Overview: A Matter of Life and Death," *Signalling Pathways in*

- Apoptosis*, (Ed: Watters,D. Ve Lavin, M.), Harwood academic publishers, Singapore, 1-28.
- Kopnin, B.P. (2000), "Targets of Oncogenes and Tumor Supressors: Key for Understanding Basic Mechanism of Carcinogenesis, " *Biochemistry*, **65(1)**, 5-33.
- Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V. And Syal, N. (1999), "Prevention of NNitrosodiethylamine-induced Lung Tumorigenesis by Ellagic Acid and Quercetin in Mice," *Food and Chemical Toxicology*, **37** , 313-318.
- Kim, H.A., Lee, R.A., Moon, B.I., Choe, K.J. (2009), " Ellagic Acid Shows Different Anti-proliferative Effects Between the MDA-MB-231 and MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line," *J Breast Cancer*, **12(2)**, 85-91.
- Geisler, S., Al, B.D., Johnsen, H., Aas, T., Geisler, J., Akslen, L.A., Anker, G., Lonning, P.E. (2003), "TP53 Gene Mutations Predict the Response to Neoadjuvant Treatment with 5-fluorouracil and Mitomycin in Locally Advanced Breast Cancer," *Clin Cancer Res.*, **9**, 5582-5588.
- Gewies, A. (2003), *ApoReview - Introduction to Apoptosis*.
<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. (2000), "Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing," *J. Agric. Food Chem.*, **48(10)**, 4581-4589.
- Glen, A., Halvorson, M.D. (2001), *Chemopreventive properties of phytochemical ellagic insurance formula*.
http://www.hopeforcancer.com/eif_book let.pdf
- Green, D.R. ve Kromer, G. (2004), "The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death," *Science*, **305(5684)**, 626-629.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Haris, C.C. (1994), "Mutations in the p53 tumor suppressor genes: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis," *Cancer Res.*, **54(18)**, 4855-4878.
- Güngör, N. (2007), *Dut Pekmezinin Bazı Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Depolamanın Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Hamzaoglu, O., Özcan, U. (2006), *Türkiye Sağlık İstatistikleri*, Türk Tabipler Birliği Yayınları, Ankara.
- Hanasaki, Y., Owaga, S., Fukui, S. (1994), "The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids," *Free Radic Biol Med.*, **16(6)**, 845-50.
- Hannum, S.M. (2004), "Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44(1)**, 1-17.
- Haris, C.C. (1996), "Structure and Function of The p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies," *Journal of the National Cancer Institute*, **88(20)**, 1442-55.
- Henderson, I.C., Canellos, G.P. (1980), "Cancer of the breast-the past decade," *The New England Journal of Medicine*, **302**, 17-30.
- Henderson, I.C., Harris, J.R., Kine, D.W., Hellman, S. (1989), "Cancer of the Breast," *Cancer Principles and Practice of Oncology*, (Ed: Devita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A.), JB Lippincott Company, Philadelphia, 1197-1268.
- Hui, L., Zheng Y., Yan, Y., Bargonetti, J., Foster, D.A. (2006), "Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D," *Oncogene*, **25**, 7305-7310.
- Hurley, R.E. (1998), *Interactions of N-methyl-N-nitrosourea and ellagic acid in developmental toxicology*, Doctor of Philosophy Thesis, Colorado State University, Colorado.
- İnanç, S. (1997), "Meme Kanserinin Doğal Seyri ve Prognostik Faktörler," *Meme Kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi*, (Ed: Topuz, E.), İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 72-101.
- Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J., Thun, M.J. (2004), "Cancer statistics," *Cancer J Clin.* 54-58.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010), "Cancer Statistics," *CA Cancer J Clin.*, **60**, 277-300.

- Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V., Syal, N. (1999), "Prevention of N-Nitrosodiethylamine- induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice," *Food and Chemical Toxicology*, **37(4)**, 313- 318.
- King, K.L. ve Cidlowski, J.A. (1995), "Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death," *Journal of Cellular Biochemistry*, **58(2)**, 175-180
- Kresty, L.A., Mors, M.A., Morgan, C., Carlton, P.S., Lu, J., Gupta, A., Blackwood. M., Stoner, G.D. (2001) "Chemoprevention of Esophageal Tumorigenesis by Dietary Administration of Lyophilized Black Raspberries," *Cancer Research*, **61**, 6112- 6119.
- Kumar. V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (2008), *Basic Pathology* (Ed: Çevikbaş, U.), Nobel, İstanbul.
- Kusano, C., Ferrari, B. (2008), "Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies," *J Cell Mol Biol.*, **7(1)**, 1-15.
- Kutluk, T., Kars, A. (1992), *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara.
- Kuzey, G.M. (2007), *Temel Patoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Labieniec, M. ve Gabryelak, T. (2003), "Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14," *Mutation Research*, **539(1-2)**, 127-135.
- Lacasse, E.L., Holcik, M., Korneluk, R.G. ve Machenzie, A.E. (2005), "Apoptosis in health, disease and therapy overview and methodology," *Apoptosis in Health and Disease*, (Ed: Holcik, M., Lacasse, E., Machenzi, A. ve Korneluk, R.), Cambridge University Pres, United Kingdom, 1-48.
- Lalloo, F. (2002), *Genetis for Oncologists: The Molecular Genetic Basis of Oncologic Disorders*, Remedica Publishing, Oxford.
- Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Garcia-Conesa, M.T., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C. (2006), "Urolithins, Ellagic Acid-Derived Metabolites Produced by Human Colonic Microflora, Exhibit Estrogenic and Antiestrogenic Activities," *J. Agric. Food Chem.*, **54(5)**, 1611-1620.
- Losso, J.N., Bansodea, R.R., Trappey, A., Bawadi, H.A., Truax R. (2004), "In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid," *Journal of Nutritional Biochemistry* **15**, 672–678.

- Lotem, J. ve Sachs, L. (2002), "Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia," *Oncogene*, **21(21)**, 3284-3254.
- Lozano, G. ve Elledge, S. J. (2000), "p53 sends nucleotides to repair DNA," *Nature*, **404**, 24-25.
- Meindl, A. (2002), "Comprehensive analysis of 987 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population," *Int J Cancer*, **97(4)**, 472-480.
- McPherson, K., Steel, C., Dixon, J. M. (2000), "Breast cancer -Epidemiology, risk factors, and genetics," *British Medical Journal*, **321**, 624-628.
- Mosmann, T.R. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Mukhtar, H., Das, M., Bickers, D.R. (1986), "Inhibition of 3-Methylcholanthrene induced Skin Tumorigenicity in BALB/c Mice by Chronic Oral Feeding of Trace Amounts of Ellagic Acid in Drinking Water," *Cancer Research*, **46**, 2262-2265.
- Nigg, E.A. (1995), "Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle," *Bioessays*, **17(6)**, 471-480.
- Nixon, D. (2002), *Oregon canneberries; what research is revealing about red raspberries*.
www.oregon-berries.com
- O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Friend, S., Jr, A.J.F., Kohn, K.W. (1997), "Characterization of the p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents," *Cancer Res.*, **57**, 4285-4300.
- Özçimen, A. (2005), *Steroid'in HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında, Apoptoz ve Farklılaşma Üzerindeki Etkisi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Papoutsis, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G. P., Moutsatsou, P. (2005), "Evaluation of Estrogenic/Antiestrogenic Activity of Ellagic

- Acid via the Estrogen Receptor Subtypes ER α and ER β ,” *J. Agric. Food Chem.*, **53(20)**, 7715-7720.
- Park, M., ve Lee , S. (2003), “Cell Cycle and Cancer ,” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36(1)**, 60-65.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005), “Global cancer statistics,” *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- Pecorino, L. (2008), *Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Pres Inc., New York.
- Pehlivan, M., Güleriyüz, M. (2004), “Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi,” *Bahçe*, **33 (1-2)**, 51 – 57.
- Pınarbaşı, E. (2007), “Apoptosiz (Programlı Hücre Ölümü),” *Moleküler Biyoloji*, (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyola., B.), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 423-467.
- Potten, C. ve Wilson, J. (2004), “Apoptosis The Life and Death of Cells,” Cambridge University of Press, United States Of America.
- Puri, P.L., Maclachlan, T.K., Levrero, M. ve Giordano, A. (1999), “The Intrinsic Cell Cycle: From Yeast to Mammals,” *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*, (Ed: Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A., ve Denhardt, D.T.), A John Wiley& Sons, Inc., United States America, 15-80.
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernandez, E., Hidalgo, M.E., Quihot, W., Rubio, C., Boehm, F., Piazena,H., Oltmanns, U. (2002), “Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **68**, 133-139.
- Rebbeck, T.R. (1999), “Inherited genetic predisposition in breast cancer,” *Cancer*, **86(11)**, 2493-2501.
- Reed, J.C. (1999), “Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer,” *Current Opinion in Oncology*, **11**, 68-75.
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D. (2003), “Natural products for cancer prevention: a global perspective,” *Pharmacology&Therapeutics*, **99(1)**, 1-13.

- Ricci, J.E., Waterhouse, N. ve Green, D.R. (2003), "Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma," *Cell Death & Differentiation*, **10(5)**, 488-492.
- Rodrigo, R., Rivera, G., Orellana, M., Araya, J., Bosco, C. (2002), "Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine," *Life Sci.*, **71(24)**, 2881- 2895.
- Russo, J., Hu, Y.F., Yang, X. and Russo, I.H. (2000), " Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer," *J Natl Cancer Inst Monogr*, **27**, 17-37.
- Saldamlı, İ. (2007), *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492.
- Sandal, T. (2002), "Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer," *The Oncologist*, **7**, 73-81.
- Saunders, M.W., Birchall, M.A. (1998), "Molecular Biology Series Apoptosis, Matters of Life and Death," *The Journal of Laryngology and Otology*, **112**, 822-826.
- Schneider, A., Schulz-Schaeffer, W., Hartmann, T., Schulz, J.B., Simons, M. (2006), "Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons," *Neurobiology of Disease*, **23(3)**, 573-577.
- Schroter, M., Peli, J., Hane, M., Tschopp, J. ve Reichmann, E. (2000), "Fas-dependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance," *Oncogene*, **19(14)**, 1794- 1800.
- Senderowicz, A.M. (2004), "Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies," *Curr Opin Cell Biol.*, **16(6)**, 670-678.
- Serbes, U. (2009), "HeLa Hücre Kültürlerinde Apoptoz ve Moleküler Mekanizması," Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., Lakhani, S.R. (2005), "Molecular evolution of breast cancer," *The Journal of Pathology*, **205(2)**, 248-54.
- Smerak, P.H., Sestakova, Z., Polivkova, Z., Barta, I., Turek, B., Bartova, J., Langova, M., Andel, M. (2002), "Antimutagenic Effects of Ellagic Acid

- and its Effect on The Immune Response in Mice,” *Czech J. Food Sci.*, **20(5)**, 181- 191.
- Somunoğlu, S. (2007), “Meme Kanserinde Risk Faktörleri,” *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, **2(5)**.
- Somunoğlu, S. (2009), “Meme Kanseri: Belirtileri ve Erken Tanıda Kullanılan Tarama Yöntemleri,” *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, **4(10)**.
- Spandidos. D.A. (2007). “Oncogenes and tumor supressor genes as paradigms in oncogenes.” *Journal of BUON*, **12(1)**, 9-12.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B. (1986), “Suppression of Carcinogenesis by Retinoids: Interactions with Peptide Growth Factors and Their Receptors as a Key Mechanism,” *Princess Takamatsu Symp*, **16**, 149-158.
- Stephen, J.E. (1996), “Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis,” *Science*, **274 (5293)**, 1664-1672
- Stoner, G. D., Mukhtar, H. (1995), “Polyphenols as cancer chemopreventive agent,” *Journal of Cellular Biochemistry*, **22**, 169- 180.
- Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A. (2001), “Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system,” *Oncogene*, **20(2)**, 167-77.
- Tavassoli, F.A., Devilee, P. (2003), “World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs,” Lyon IARC Press, 227-228.
- Teich, M.N. (1996), “Oncogenes and Cancer,” *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, (Ed: Franks, L.M. ve Teich, N.M.) Oxford University Pres INC., New York, 233-260.
- Thiede, C., Kim, T.D. ve Neubauer, A. (2000), “Use of p53 as Cancer Cell Target for Gene Therapy,” *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, (Ed: Cameron, R.G. ve Feuer, G.), Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 236-255.
- Tsujimoto Y. (1998), “Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria?,” *Genes to Cell* , **3(11)**, 697-707.
- Uçar, F. (2003), “Hücre Kültüründe Temel İlkeler,” *Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültür Teknikleri*, (Ed. Ovalı E.), 7-16
- Ulukaya, E., *Akciğer Kanserleri*.

<http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>

Ulukaya, E. (2003), *Apoptosis Ders Notları*.

http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf

Unger M.A. and Weber B.L. (2000), "Recent advances in breast cancer biology," *Curr Opin Oncol.*, **12(6)**, 521-525.

Ünver, S., *Meme Kanserinde Doku Ferritin Düzeyinin Standart Prognostik Parametrelerle Korelasyonu ve Prognostik Önemi*, Uzmanlık Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul, 1998.

Vasconcellos, J. A. (2000), *Functional foods. Concepts and health benefits*,
<http://www.leatherheadfood.com/>

Vattem, D.A., Jang, H.D., Levin, R., Shetty, K. (2005), "Synergism of Cranberry Phenolics with Ellagic Acid and Rosmarinic Acid for Antimutagenic and DNA Protection Functions," *Journal of Food Biochemistry*, **30(1)**, 98-116.

Wang, X., Christiani, D.C., Mark, E.J., Nelson, H., Wiencke, J.K., Gunn, L., Wain, J.C., Kelsey, K.T. (1999), "Carcinogen exposure, p53 alteration, and K-ras mutation in synchronous multiple primary lung carcinoma," *Cancer* , **85(8)**, 1734-1739.

Weinberg, R.A. (2007), "The Nature of Cancer ," *The Biology of Cancer*, Garland Science, Taylor& Francis Group, LLC, United States of America.

Willingham, M. C. (1999), "Cytochemical Methods for The Detection of Apoptosis," *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **47(9)**, 1101-1109.

Wolf, B.B. ve Green, D.R. (2002), "Apoptosis: Letting Slip the Dogs of War," *Curr. Biol.*, **12(5)**, 177-179.

Wood, A.W., Huang, M.T., Chang, R.L., Newmark, H.L., Lehr, R.E., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H. (1982), "Inhibition of the mutagenicity of bay region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic asit," *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 5513–5517.

Zhang, H. (2007), "Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging," *J Cell Physiol.*, **210(3)**, 567-574.

- Yılmaz, İ. (2005), *Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin Tunel Yöntemi ile Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Yüksel, S., Saydam, G., Uslu, R., Sanli, U.A., Terzioğlu, E., Büyükkececi, F. ve Omay, S.B. (2002), “Arsenic trioxide and methylprednisolone use different signal transduction pathways in leukemic differentiation,” *Leukemia Research*, **26(4)** , 391-398.
- Zor, M. (2007), *Depolamanın Ayva Reçelinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi , Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Watzl, B., Leitzmann, C. (2005), *Bioaktive substanzen in lebensmitteln*. Hippokrates, 254s.