

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRİSİNİN İMMÜNMODULATÖR ETKİ YOLUYLA MEME KANSERİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ANTI-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ezgi BALKAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

EKİM 2024

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRİSİNİN İMMÜNMODULATÖR ETKİ YOLUYLA MEME KANSERİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ANTI-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ezgi BALKAN  
(185316002)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

EKİM 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185316002 numaralı Doktora Öğrencisi Ezgi BALKAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KRİSİNİN İMMÜNMODULATÖR ETKİ YOLUYLA MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ANTİ-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı:**      **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri:**      **Prof. Dr. Şahabettin SELEK** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Prof. Dr. Fahri AKBAŞ** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Doç. Dr. Eray Metin GÜLER** .....  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU ALDOĞAN**  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa .....

**Teslim Tarihi**      : 12 Aralık 2024

**Savunma Tarihi**      : 22 Ekim 2024



*Metikoma ve Aileme,*

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmamın her aşamasında, akademik deneyim ve tecrübelerini benimle paylaşarak çalışmamın gerçekleşmesini sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim.

Bilgi ve birikimlerini paylaşmaktan geri durmayan, hoşgörü ve nezaketlerini her zaman gösteren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz Prof. Dr. Şahabettin Selek'e ve Doç. Dr. Ömer Faruk Özer'e teşekkür ederim.

Çalışmalarına verdiği desteklerden ötürü değerli hocalarım, Dr. Öğr. Üyesi Ebu Hacıosmanoğlu ALDOĞAN, Doç. Dr. Huri DEDEAKAYOĞULLARI, Doç. Dr. Eray Metin GÜLER, Doç. Dr. Özge Pasin ve Dr. Öğr. Üyesi Vildan Betül Yenigün'e teşekkür ederim.

Akademik çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana akademik ve manevi anlamda destek olan değerli çalışma arkadaşlarım, Dr. Öğr. Üyesi Betül ŞEKERCİ, Dr. Özlem BİLDİK, Arş. Gör. Zeynep ÖZMAN, Öğr. Gör. Ebru KANIMDAN, Öğr. Gör. Ufuk SARIKAYA, Arş. Gör. Fatmanur BABALI BALIBEY, Arş. Gör. Dr. Metin DEMİREL, Uzm. Dr. Öznur YAŞAR, Uzm. Dr. Tuğçe Yıldız, Dr. Fatma Nur Köktaşoğlu, Uzm. Biyolog Alime Sarıkaya ve Uzm. Biyolog Mehtap Alim'e teşekkürlerimi sunarım. TUBİTAK Bİçaba programı kapsamında stajyer olarak tez projemde görev alan lisans öğrencisi İbrahim Halil Ceyran'a çabalarından ötürü teşekkür ederim.

Rutin biyokimya ekibinden tekniker arkadaşım Erdem AKALIN'a ve araştırma laboratuvarımızın önemli üyesi Mustafa KARABONCUK'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağlayan, beni her zaman teşvik ederek maddi manevi desteklerini üzerimden esirgemeyen, oğlum Mete'ye sevgi ve ilgilerini eksik etmeyen annem Akide Balkan'a, babam Ali Balkan'a, kardeşim Buğra Balkan ve eşi Elif Balkan'a sonsuz teşekkür ederim.

222S161 numaralı 1002-A Hızlı Destek Modülü kapsamında projeme destek olan TUBİTAK SBAG kurul başkanlığında teşekkür ederim.

20220406 evrak numarası ile projeme destek olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Ekim 2024

Ezgi Balkan

## BEYAN

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



Ezgi Balkan

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ .....                                                           | iv   |
| BEYAN .....                                                           | v    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                     | vi   |
| KISALTMALAR .....                                                     | ix   |
| SEMBOLLER .....                                                       | xi   |
| TABLO LİSTESİ .....                                                   | xii  |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                                   | xiii |
| ÖZET .....                                                            | xv   |
| SUMMARY .....                                                         | xvii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                | 1    |
| 1.1 Problemin Tanımı ve Önemi .....                                   | 1    |
| 1.2 Araştırmanın Amacı .....                                          | 2    |
| 1.3 Araştırmanın Hipotezi .....                                       | 2    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                               | 4    |
| 2.1 Kanser .....                                                      | 4    |
| 2.2 Meme Kanseri .....                                                | 5    |
| 2.2.1 Meme kanseri risk faktörleri .....                              | 6    |
| 2.2.1.1 Genetik risk faktörleri .....                                 | 6    |
| 2.2.1.2 Hormonal risk faktörleri .....                                | 6    |
| 2.2.1.2 Davranışsal ve çevresel risk faktörleri .....                 | 7    |
| 2.2.2 Temel meme kanseri tipleri .....                                | 8    |
| 2.2.2.1 İnvaziv olmayan meme tümörleri .....                          | 9    |
| 2.2.2.2 İnfiltrate eden meme tümörleri .....                          | 9    |
| 2.2.2.3 Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) .....                        | 10   |
| 2.2.3 Hormon ekspresyonlarına göre meme kanseri tipleri .....         | 12   |
| 2.2.4 Meme kanseri tedavileri .....                                   | 13   |
| 2.2.5 Meme Kanseri Tedavilerinde Ana Sinyal Yolakları .....           | 15   |
| 2.3 Bağışıklık Sistemine Bakış .....                                  | 18   |
| 2.3.1 Doğuştan gelen immün yanıt .....                                | 18   |
| 2.3.1.1 Nötrofil toplanması .....                                     | 19   |
| 2.3.1.2 Kompleman sistem .....                                        | 20   |
| 2.3.1.3 Eozonofiller .....                                            | 21   |
| 2.3.1.4 Mast hücreler ve bazofiller .....                             | 21   |
| 2.3.1.5 Doğal öldürücü (NK) hücreler .....                            | 21   |
| 2.3.1.6 Doğuştan gelen immünite ile patojenlerin ayırt edilmesi ..... | 22   |
| 2.3.1.7 Hücreler arası iletişim .....                                 | 23   |
| 2.3.2 Kazanılmış bağışıklık .....                                     | 25   |

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.2.1 T ve B hücrelerinde antijene özgü reseptörlerin oluşumu .....                | 25        |
| 2.3.2.2 T lenfositler .....                                                          | 27        |
| 2.4 Bağışıklık Sistemi ve Kansere Arasındaki İlişki .....                            | 29        |
| 2.4.1 Kanserde T hücrelerinin Rolü .....                                             | 32        |
| 2.4.1.1 Jurkat T hücreleri .....                                                     | 33        |
| 2.5 Doğal Öldürücü (NK) Hücreler .....                                               | 35        |
| 2.5.1 NK hücrelerinin Gelişimi, Sınıflandırılması ve Dağılımı .....                  | 35        |
| 2.5.2 NK Hücrelerinin Aktivasyonu ve İnhibisyonu .....                               | 36        |
| 2.5.3 NK Hücrelerini artıran düzenleyici sitokinler .....                            | 37        |
| 2.5.4 NK Hücre aracılı anti-tümör mekanizmaları .....                                | 38        |
| 2.5.5 NK-92 hücre hattı .....                                                        | 40        |
| 2.6 Kanserde Makrofajların Rolü .....                                                | 41        |
| 2.6.1 RAW 264.7 makrofaj hücre hattı .....                                           | 42        |
| 2.7 PD1/PD-L1 İmmün Kontrol Noktası Proteinleri .....                                | 43        |
| 2.7.1 P13K/AKT/MTOR sinyal yolağı ile PD/PD-L1 sinyal yolağı arasındaki ilişki ..... | 45        |
| 2.8 Mevcut Kanser İmmünoterapi Yaklaşımları .....                                    | 46        |
| 2.9 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün (EGFR) Meme Kanseriindeki Rolü.. .....     | 48        |
| 2.10 Flavonoidler .....                                                              | 51        |
| 2.10.1 Flavonoidlerin sınıflandırılması .....                                        | 52        |
| 2.10.2 Bitkilerde flavonoid sentezi .....                                            | 55        |
| 2.10.3 Flavonoidlerin farmakolojik özellikleri .....                                 | 56        |
| 2.10.3.1 Flavonoidlerin anti-oksidan özellikleri .....                               | 56        |
| 2.10.3.2 Flavonoidlerin pro-oksidan özellikleri .....                                | 57        |
| 2.10.4 Flavonoidler ve apoptoz .....                                                 | 60        |
| 2.10.4.1 Apoptoz .....                                                               | 60        |
| 2.10.4.2 Kanser tedavisinde öne çıkan apoptotik flavonoidler .....                   | 62        |
| 2.10.5 Flavonoidler ve Bağışıklık Sistemi .....                                      | 64        |
| 2.10.6 Fitokimyasalların kanser kemopreventif rolü .....                             | 68        |
| 2.11 Krisin .....                                                                    | 71        |
| 2.11.1 Krisin ve kanser .....                                                        | 73        |
| 2.11.2 Krisin ve meme kanseri .....                                                  | 74        |
| 2.11.3 Krisinin immünomodulator etkileri .....                                       | 75        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                                      | <b>77</b> |
| 3.1 Gereçler .....                                                                   | 77        |
| 3.1.1 Cihazlar .....                                                                 | 77        |
| 3.1.2 Kimyasal listesi .....                                                         | 78        |
| 3.2 Yöntem .....                                                                     | 79        |
| 3.2.1 Krisin stok çözeltisinin hazırlanması .....                                    | 79        |
| 3.2.2 Hücre kültürü .....                                                            | 80        |
| 3.2.3 Hücre canlılığı analizleri .....                                               | 80        |
| 3.2.3.1 MTT testi .....                                                              | 80        |
| 3.2.3.2 WST-1 hücre canlılığı testi .....                                            | 81        |
| 3.2.4 Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) üretim analizleri .....                | 82        |
| 3.2.5 Apoptotik aktivite tayin analizleri .....                                      | 84        |
| 3.2.6 Bağışıklık sistemi hücrelerinin stimülasyonu .....                             | 87        |
| 3.2.6.1 NK hücrelerinin IL-2 ile stimülasyonu .....                                  | 87        |
| 3.2.6.2 Jurkat T hücrelerinin PHA-M ile stimülasyonu .....                           | 88        |



|                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.6.3 Makrofaj hücrelerinin LPS ile stimülasyonu .....                                                                            | 88         |
| 3.2.7 NK hücrelerinin akış sitometri ile aktivasyon analizi .....                                                                   | 89         |
| 3.2.8 Meme kanseri hücrelerinin EGF ile indüklenmesi .....                                                                          | 90         |
| 3.2.9 Ko-kültür protokolleri .....                                                                                                  | 90         |
| 3.2.10 Sandviç ELISA yöntemi.....                                                                                                   | 93         |
| 3.2.10.1 Krisin ile uyarılan NK hücrelerinde ifn- $\gamma$ kuantifikasyonu .....                                                    | 95         |
| 3.2.10.2 Krisin ile uyarılan IL-2 düzeyinin Jurkat T hücresinde<br>kuantifikasyonu .....                                            | 96         |
| 3.2.10.3 Krisin ile uyarılan tnf- $\alpha$ ve granzim-b düzeylerinin ko-kültür<br>modellerinde kuantifikasyonu .....                | 96         |
| 3.2.10.4 Krisin ile uyarılan IFN $\gamma$ , IL-2 ve Granzim-B düzeylerinin T hücresi<br>ko-kültür modellerinde kuantifikasyonu..... | 97         |
| 3.2.11 Nitrik oksit üretiminin ölçümü .....                                                                                         | 98         |
| 3.2.12 Western blot yöntemi ile PD-L1, p-akt ve p-mtor protein düzeylerinin<br>belirlenmesi.....                                    | 100        |
| 3.2.13 İmmünfloresan (IF) boyama yöntemi.....                                                                                       | 105        |
| 3.2.14 İstatiksel analiz .....                                                                                                      | 108        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                                                            | <b>109</b> |
| 4.1 Krisinin Anti-Proliferatif Etkileri .....                                                                                       | 109        |
| 4.2 Krisinin Hücre İçi ROS Üretimine Etkileri .....                                                                                 | 110        |
| 4.3 Krisinin Apoptotik Etkileri.....                                                                                                | 112        |
| 4.4 Krisinin NK-92 Hücrelerinin Çoğalması ve Aktivasyonu Üzerine Etkisi .....                                                       | 115        |
| 4.5 Krisinin Jurkat T Hücre Çoğalması ve Aktivitesi Üzerine Etkisi .....                                                            | 118        |
| 4.6 Krisinin RAW makrofaj Hücre Çoğalması ve Aktivitesi Üzerine Etkisi .....                                                        | 120        |
| 4.7 Krisinin Makrofaj Hücre Aracılı Sitotoksik Yanıt Üzerine Etkileri.....                                                          | 121        |
| 4.8 EGF'nin Meme Kanseri Hücre Hatlarına Olan Proliferatif Etkisi .....                                                             | 125        |
| 4.9 Krisinin T Hücre Aracılı Anti-Meme Kanseri Etkisi .....                                                                         | 125        |
| 4.10 Krisinin NK-Hücre Aracılı Meme Kanseri Hücre Sitotoksitesine Etkisi ..                                                         | 127        |
| 4.11 Krisinin Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki PD-L1 Protein Düzeylerine Olan<br>Etkisi.....                                         | 130        |
| 4.12 Krisinin Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki pmTOR/ pakt Protein Düzeylerine<br>Olan Etkisi .....                                  | 134        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                                                             | <b>137</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                                                                                                   | <b>149</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                                               | <b>151</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                                                                                   | <b>172</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                                                               | <b>177</b> |

## KISALTMALAR

|               |                                               |
|---------------|-----------------------------------------------|
| <b>AKT</b>    | : Serin/treonin kinaz enzimi                  |
| <b>APC</b>    | : Antijen Sunan Hücre                         |
| <b>ATP</b>    | : Adenozin Trifosfat                          |
| <b>BAX</b>    | : Bcl-2 ile ilişkili X proteini               |
| <b>BİTEs</b>  | : Bispesifik T-hücre Sağlayıcısı              |
| <b>BH3</b>    | : Bcl-2 homoloji 3                            |
| <b>BRCA-1</b> | : Meme kanseri-1 geni                         |
| <b>BRCA-2</b> | : Meme kanseri-2 geni                         |
| <b>BSA</b>    | : Bovin Serum Albumin                         |
| <b>CAR</b>    | : Kimerik Antijen Reseptör                    |
| <b>CAT</b>    | : Katalaz                                     |
| <b>COX</b>    | : Siklooksijenaz                              |
| <b>CTL</b>    | : Sitotoksik T lenfositleri                   |
| <b>CXC</b>    | : CXC Kemokinleri                             |
| <b>DC</b>     | : Dentritik Hücre                             |
| <b>DCIS</b>   | : Duktal Karsinoma In Situ                    |
| <b>DMSO</b>   | : Dimetil Sülfoksit                           |
| <b>DNA</b>    | : Deoksiribonükleik Asit                      |
| <b>EGF</b>    | : Epidermal Büyüme Faktörü                    |
| <b>EGFR</b>   | : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü          |
| <b>ER</b>     | : Östrojen Reseptörü                          |
| <b>ERK</b>    | : Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz      |
| <b>FITC:</b>  | : Fluorescein-5-isotiyosiyanat                |
| <b>FNS:</b>   | : Flavonoid Non-Spesifik Yollar               |
| <b>HDAC:</b>  | : Histon Deasetilaz                           |
| <b>HSCT:</b>  | : Hematopoietik Kök Hücre Nakli               |
| <b>IDC:</b>   | : İnvazif Duktal Karsinom                     |
| <b>IGFR:</b>  | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü    |
| <b>IgE:</b>   | : İmmünglobulin                               |
| <b>ILC</b>    | : İnnat Lenfoid Hücreler                      |
| <b>IFN</b>    | : İnterferon                                  |
| <b>LPS</b>    | : Lipopolisakkarit                            |
| <b>M1</b>     | : Makrofaj Tipi 1                             |
| <b>M2</b>     | : Makrofaj Tipi 2                             |
| <b>mAB</b>    | : Monoklonal Antikor                          |
| <b>MAPK</b>   | : Mitojen-Aktive Protein Kinaz                |
| <b>MDSC</b>   | : Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler       |
| <b>MHC-I</b>  | : Majör Histokompatibilite Kompleksi Sınıf I  |
| <b>MHC-II</b> | : Majör Histokompatibilite Kompleksi Sınıf II |
| <b>MTOR</b>   | : Memeli Hedefli Rapamisin Molekülü           |
| <b>NADH</b>   | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen     |
| <b>NADPH</b>  | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat       |
| <b>NK</b>     | : Doğal Öldürücü Hücreler                     |

|              |                                        |
|--------------|----------------------------------------|
| <b>NO</b>    | : Nitrik Oksit                         |
| <b>NOS</b>   | : Nitrik Oksit Sentaz                  |
| <b>OD</b>    | : Optik Dansite                        |
| <b>PBS</b>   | : Fosfat Tamponlu Salin                |
| <b>PBMC</b>  | : Periferik Kan Mononükleer Hücreler   |
| <b>PD-1</b>  | : Programlanmış Hücre Ölümü 1          |
| <b>PD-L1</b> | : Programlanmış Hücre Ölümü Ligandı 1  |
| <b>PI</b>    | : Fosfotidil Serin                     |
| <b>PHA-M</b> | : Fitohemaglutinin-M                   |
| <b>PI3K</b>  | : Fosfatidilinositol 3-kinaz           |
| <b>PIP3</b>  | : Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat |
| <b>PTEN</b>  | : Fosfat ve Tensin Homoloğu            |
| <b>PVDF</b>  | : Poliviniliden Florür                 |
| <b>RNA</b>   | : Ribonükleik Asit                     |
| <b>ROS</b>   | : Reaktif Oksijen Türleri              |
| <b>RTK</b>   | : Reseptör Tirozin Kinaz               |
| <b>TAM</b>   | : Tümörle İlişkili Makrofajlar         |
| <b>TCR</b>   | : T Hücresi Reseptörü                  |
| <b>Th1</b>   | : Yardımcı T hücresi 1                 |
| <b>Th2</b>   | : Yardımcı T hücresi 2                 |
| <b>TKİ</b>   | : Tirozin Kinaz İnhibitörü             |
| <b>TME</b>   | : Tümör Mikro Çevresi                  |
| <b>TNBC</b>  | : Üçlü Negatif Meme Kanseri            |
| <b>TNF</b>   | : Tümör Nekroz Faktörü                 |
| <b>Treg</b>  | : Regülatör T Hücreleri                |
| <b>XO</b>    | : Ksantin Oksidaz                      |
| <b>UV:</b>   | : Ultraviyole Işıklar                  |

## SEMBOLLER

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| $\alpha$           | : Alfa               |
| $\gamma$           | : Gama               |
| %                  | : Yüzde              |
| $\mu\text{g}$      | : Mikrogram          |
| $\mu\text{mol}$    | : Mikromol           |
| $\mu\text{m}$      | : Mikrometre         |
| $\mu\text{M}$      | : Mikromolar         |
| $^{\circ}\text{C}$ | : Derece Santigrat   |
| IU                 | : Uluslararası birim |
| kDa                | : Kilo dalton        |
| L                  | : Litre              |
| Mg                 | : Miligram           |
| mL                 | : Mililitre          |
| Nm                 | : Nanometre          |
| Ng                 | : Nanogram           |
| Pg                 | : Pikogram           |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tablo 2.1 :</b> Eksprese ettiği hormonlara göre meme kanseri tipleri, tedavi seçenekleri ve prognozları ..... | 12  |
| <b>Tablo 2.2 :</b> Mevcut meme kanseri tedavi yöntemleri .....                                                   | 15  |
| <b>Tablo 2.3 :</b> Flavonoid tiplerinin kanser hücrelerindeki apoptoz mekanizmaları .....                        | 62  |
| <b>Tablo 3.1 :</b> Cihaz listesi .....                                                                           | 77  |
| <b>Tablo 3.2 :</b> Kullanılan kitlerin listesi .....                                                             | 78  |
| <b>Tablo 3.3 :</b> Hücre gruplarının protein konsantrasyonları .....                                             | 101 |
| <b>Tablo 3.4 :</b> SDS-PAGE jel çözeltilerinin bileşenleri .....                                                 | 102 |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|            |                                                                                       |     |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 2.1  | : Meme kanseri tiplerinin ana sınıflandırması .....                                   | 12  |
| Şekil 2.2  | : PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı .....                                                   | 18  |
| Şekil 2.3  | : Doğuştan gelen immün yanıt ve kazanılmış immün yanıt hücreleri .....                | 19  |
| Şekil 2.4  | : T ve B lenfositlerin spesifik immünitedeki rolleri. ....                            | 26  |
| Şekil 2.5  | : Endojen ve eksojen patojenler tarafından T hücrelerinin aktivasyonu. ....           | 29  |
| Şekil 2.6  | : Kanserın immün-düzenlenme fazları .....                                             | 31  |
| Şekil 2.7  | : CD8 <sup>+</sup> hücrelerinin kanser hücresi öldürme mekanizmaları .....            | 33  |
| Şekil 2.8  | : NK hücre alt sınıfları ve fonksiyonları .....                                       | 36  |
| Şekil 2.9  | : NK hücrelerinin inhibisyon ve aktivasyonu .....                                     | 37  |
| Şekil 2.10 | : NK hücrelerinin aktivitelerini düzenleyen sitokinler .....                          | 38  |
| Şekil 2.11 | : NK hücrelerinin kanser hücreleri üzerindeki aktiviteleri .....                      | 40  |
| Şekil 2.12 | : Neoplazmada makrofajların rolü ve aktiviteleri .....                                | 42  |
| Şekil 2.13 | : T hücresi ve kanser hücreleri arasındaki PD1/PD-L1 etkileşimi .....                 | 45  |
| Şekil 2.14 | : PD-L1 ekspresyonunu düzenleyen PI3K/AKT/MTOR sinyal yolağı ...                      | 46  |
| Şekil 2.15 | : EGFR inhibitörleri ve aşağı akış sinyal yolları .....                               | 50  |
| Şekil 2.16 | : Yaygın olarak bilinen flavonoidlerin kimyasal yapıları ve sınıflandırması .....     | 55  |
| Şekil 2.17 | : Flavonoidlerin anti-oksıdan ve pro-oksıdan etkilerinin özeti .....                  | 59  |
| Şekil 2.18 | : Balda bulunan polifenollerin temel immünomodulatör etkileri. ....                   | 68  |
| Şekil 2.19 | : Karsinogenez evreleri ve kemoprevensiyon .....                                      | 71  |
| Şekil 2.20 | : Krisinin terapötik aktiviteleri. ....                                               | 73  |
| Şekil 3.1  | : MTT test protokol özeti .....                                                       | 82  |
| Şekil 3.2  | : WST-1 testi protokol özeti .....                                                    | 82  |
| Şekil 3.3  | : DCFH-DA floresan probu ile hücre içi ROS ölçüm prensibi .....                       | 84  |
| Şekil 3.4  | : NK hücrelerinin IL-2 ile uyarımı .....                                              | 88  |
| Şekil 3.5  | : NK-92 ve meme kanseri hücre hatları ko-kültür modeli .....                          | 91  |
| Şekil 3.6  | : Jurkat T hücreleri ve meme kanseri hücreleri ko-kültür modeli .....                 | 92  |
| Şekil 3.7  | : Makrofaj hücresi ve meme kanseri ko-kültür modeli. ....                             | 93  |
| Şekil 3.8  | : Sandviç ELISA test prensibi .....                                                   | 95  |
| Şekil 3.9  | : IFN- $\gamma$ standart eğrisi .....                                                 | 95  |
| Şekil 3.10 | : IL-2 standart eğri grafiğı .....                                                    | 96  |
| Şekil 3.11 | : TNF- $\alpha$ , granzim-b standard eğri grafikleri. ....                            | 97  |
| Şekil 3.12 | : Griess reaktifi ile nitrik oksit ölçümü .....                                       | 99  |
| Şekil 3.13 | : Nitrit konsantrasyonu standart eğrisi .....                                         | 99  |
| Şekil 3.14 | : İmmünfloresan Boyama Yöntemi Özet Şeması .....                                      | 108 |
| Şekil 4.1  | : Hücre canlılığı analizleri. ....                                                    | 110 |
| Şekil 4.2  | : Krisinin Hücre içi ROS üretimine etkisi. ....                                       | 112 |
| Şekil 4.3  | : Krisinin apoptotik etkilerinin immunofloresan mikroskop altındaki görüntüleri ..... | 114 |
| Şekil 4.4  | : Krisinin apoptotik etkilerinin kuantitatif sonuçları .....                          | 115 |

|                   |                                                                                                                               |     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.5</b>  | : Krisinin NK-92 hücre çoğalması ve aktivitesi üzerine etkisi.....                                                            | 117 |
| <b>Şekil 4.6</b>  | : Krisinin Jurkat t hücre çoğalması ve aktivitesi üzerine etkisi. ....                                                        | 119 |
| <b>Şekil 4.7</b>  | : Krisinin makrofaj hücre canlılığına ve NO üretimine etkisi .....                                                            | 121 |
| <b>Şekil 4.8</b>  | : Krisinin makrofaj aracılı meme kanseri hücre ölümüne olan etkisi....                                                        | 122 |
| <b>Şekil 4.9</b>  | : Krisinin makrofaj aracılı meme kanseri apoptozuna olan etkisi .....                                                         | 124 |
| <b>Şekil 4.10</b> | : Epidermal büyüme faktörünün (EGF) meme kanseri hücre hatlarına olan proliferatif etkisi. ....                               | 125 |
| <b>Şekil 4.11</b> | : Krisinin t hücresi aracılı meme kanseri hücrelerinin yok edilmesi üzerine etkisi .....                                      | 127 |
| <b>Şekil 4.12</b> | : Krisinin NK-hücre aracılı meme kanseri hücre sitotoksitesine etkisi ....                                                    | 129 |
| <b>Şekil 4.13</b> | : Krisinin MCF-7 hücre hattındaki PD-L1 protein düzeyine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi. ....             | 131 |
| <b>Şekil 4.14</b> | : Krisinin MDA-MB-231 hücre hattındaki PD-L1 protein düzeyine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi. ....        | 132 |
| <b>Şekil 4.15</b> | : Krisinin meme kanseri hücre hatlarındaki PD-L1 düzeylerinin IF mikroskopik görüntüleri .....                                | 133 |
| <b>Şekil 4.16</b> | : PD-L1 immünfloresan görüntüleme kantitatif analiz sonuçları .....                                                           | 133 |
| <b>Şekil 4.17</b> | : Krisinin meme kanseri hücre hatlarındaki p-akt protein düzeylerine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi. .... | 135 |
| <b>Şekil 4.18</b> | : Krisinin meme kanseri hücre hatlarındaki p-mTOR protein düzeylerine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi..... | 136 |

# KRİSİNİN İMMÜNMODULATÖR ETKİ YOLUYLA MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ANTI-TÜMÖR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Krisin (5,7-dihidroksiflavon), doğal olarak bitki ve arı ürünlerinde bulunan bir flavonoiddir ve önemli biyolojik aktiviteleriyle, özellikle de anti-kanser etkileriyle bilinir. Faydalı özellikleri kısmen bağışıklık hücrelerini aktive etme yeteneğine atfedilmiştir. Bu çalışmanın ilk amacı; krisinin doğal öldürücü (NK) NK-92 hücreleri, Jurkat T hücreleri ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin aktivitelerini ve bu hücrelerin MCF-7 ve MDA-MB-231 gibi iki farklı tipte meme kanseri hücre hattına karşı olan anti-tümöral potansiyellerini nasıl değiştirdiğini araştırmaktır. İkinci olarak krisin etken maddesinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki immün kaçış mekanizmalarında önemli rol oynayan programlı hücre ölümü ligand-1 (PD-L1) protein ekspresyonuna ve yine kanser hücrelerinin hayatta kalım proteinlerinden olan p-akt ve p-mTOR protein ekspresyonları üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

İlk olarak, krisinin meme kanseri ve normal meme hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkisi, reaktif oksijen türleri (ROS) üretim aktivitesi ve apoptotik etkisi sırasıyla MTT testi, DCF-DA floresan probu kullanılarak immünofloresan (IF) boyama ve akış sitometri testi, ve akridin oranj ve etidyum bromür (AO/EB) çift boyaması ile Annexin V/PI boyaması kullanılarak IF boyaması ve akış sitometri analizleri ile ölçüldü. NK-92, Jurkat T hücreleri ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin proliferasyonları WST-1 testi ile analiz edildi. NK-92 hücrelerinin etkinliği, IL-2 varlığında akış sitometri ile CD56<sup>+</sup> yüzey protein ekspresyonunun analizi ve IFN- $\gamma$  üretiminin enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) ile spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle değerlendirildi. PHA-M ile indüklenen Jurkat T hücrelerinin aktivitesindeki değişiklik, ELISA yöntemiyle belirlendi. Makrofaj hücre hattında ise TNF- $\alpha$  ve nitrik oksit (NO) düzeylerinin ELISA ve Griess reaktifi ile ölçülmesiyle aktivasyon analizleri yapıldı. Krisin uygulanan NK-92 hücreleri doğrudan meme kanseri hücreleri ile birlikte kültüre edildi; meme kanseri hücrelerinin canlılığı MTT testi ile ölçüldü, süpernatantlardaki sitokinler ve granzim-B miktarları ELISA ile, NO miktarı ise Griess reaktifi ile ölçüldü. Krisine maruz bırakılmış meme kanseri hücreleri, PHA-M ile stimüle edilen Jurkat T hücreleri ile doğrudan ko-kültüre edildi; süpernatantlardaki sitokin düzeyleri ELISA testi ile belirlendi. Krisin uygulanan makrofaj hücrelerinin büyüme ortamları ile meme kanseri hücre süpernatantları birlikte kültüre edildi; meme kanseri hücrelerindeki apoptoz düzeyi AO/EB çift boyaması ve Aleksa-fluor-488 bağlı kaspaz-3 ölçümü IF yöntem ile gösterildi. PD-L1 protein düzeyleri EGF ile indüklenen meme kanseri hücrelerinde IF boyama ve western-blot yöntemleri ile analiz edildi. Yine meme kanseri hücrelerindeki p-akt ve p-mTOR protein ekspresyonları western-blot yöntemi ile değerlendirildi.

Krisin, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde artan intraselüler ROS üretimi ile sitotoksik ve apoptotik aktivite gösterdi. Ayrıca, NK-92 ve T hücrelerinin her iki meme kanseri hücre hattına karşı sitotoksitesini önemli ölçüde artırdı ve en belirgin etki



MCF-7 hücrelerinde (%20) gözlemlendi. Bu sitotoksik etki IL-2 ve PHA-M varlığında daha da artarken, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinde azaldı. NK-92 hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına karşı anti-tümöral yanıtı, granzim-B, TNF- $\alpha$  ve NO üretimindeki artışla ilişkili bulundu. Benzer şekilde, Jurkat T hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına karşı aktivasyonu, granzime-B, IL-2 ve IFN- $\gamma$  üretimindeki artışla karakterize edildi. Makrofaj hücrelerinin anti-kanser yanıtı ise, meme kanseri hücrelerinde artan apoptoz ile ilişkilendirildi. Ayrıca, NK-92 hücrelerinin krisin ile uyarılması artmış IFN- $\gamma$  üretimi ve CD56 ekspresyonu ile, Jurkat T hücrelerinin uyarılması IL-2 üretimi ile, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin uyarılması ise NO üretiminin artışıyla karakterize edildi. İki farklı meme kanseri hücre hattında EGF ile artan PD-L1 ve p-akt protein düzeyleri krisin ile inhibe olurken, p-mTOR protein ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmedi. Bulgular, krisinin iki farklı meme kanseri hücre hattına karşı NK-92, T ve makrofaj hücrelerinin aktivasyonuna ve fonksiyonel artışına önemli ölçüde katkıda bulunduğunu, immün yanıtın kaçış mekanizmasında öneme sahip olan PD-L1 proteinini ve kanser progresyonunda rol oynayan p-akt düzeylerini azaltarak kanser tedavisinde hem terapötik hem de kanserin ilerlemesini önlemede kemo-preventif bir ajan olarak kullanılma potansiyelini desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Krisin, NK hücresi, T hücresi, Makrofaj, Meme Kanseri, İmmün Kontrol Noktası Proteinleri

# **INVESTIGATION OF THE ANTI-TUMOR EFFECT OF CHRYSIN ON BREAST CANCER CELLS THROUGH IMMUNOMODULATORY ACTION**

## **SUMMARY**

Chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is a flavonoid naturally found in plants and bee products, recognized for its significant biological activities, particularly its anti-cancer properties. These beneficial effects are partly attributed to its ability to activate immune cells. The primary aim of this study is to investigate how chrysin modulates the activities of natural killer (NK-92) cells, Jurkat T cells, and RAW 264.7 macrophages, and their anti-tumoral potentials against two different breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. The second objective is to assess the effects of chrysin on the expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1), a protein involved in immune evasion, as well as the expression of survival proteins p-akt and p-mTOR in breast cancer cells.

Firstly, the anti-proliferative effects of chrysin on breast cancer and normal breast cell lines, its reactive oxygen species (ROS) production activity, and apoptotic effects were measured using MTT assay, DCF-DA fluorescent probe with immunofluorescence (IF) staining, flow cytometry, and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double staining, as well as Annexin V/PI staining for IF staining and flow cytometry analyses. Proliferation of NK-92, Jurkat T cells, and RAW 264.7 macrophages was analyzed by WST-1 assay. The activity of NK-92 cells was evaluated through CD56+ surface protein expression analysis via flow cytometry in the presence of IL-2, and IFN- $\gamma$  production was measured spectrophotometrically by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Changes in the activity of PHA-M-induced Jurkat T cells were determined by ELISA. Activation of the macrophage cell line was analyzed through measurements of TNF- $\alpha$  and nitric oxide (NO) levels using ELISA and Griess reagent. Chrysin-treated NK-92 cells were directly co-cultured with breast cancer cells; cancer cell viability was measured by MTT assay, and the amounts of cytokines and granzyme-B in supernatants were measured using ELISA, while NO levels were measured using Griess reagent. Chrysin-exposed breast cancer cells were co-cultured directly with PHA-M-stimulated Jurkat T cells; cytokine levels in the supernatants were determined by ELISA. Macrophage cells treated with chrysin were co-cultured with breast cancer cell supernatants; the apoptosis level in breast cancer cells was demonstrated using AO/EB double staining and Alexa-fluor-488-coupled caspase-3 measurement by IF method. PD-L1 protein levels in EGF-induced breast cancer cells were analyzed by IF staining and western blotting, while the expression of p-Akt and p-mTOR proteins in breast cancer cells was evaluated by western blotting.

Chrysin exhibited cytotoxic and apoptotic activity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells by increasing intracellular ROS production. Moreover, it significantly enhanced the cytotoxicity of NK-92 and T cells against both breast cancer cell lines, with the most prominent effect observed in MCF-7 cells (20%). This cytotoxic effect was further increased in the presence of IL-2 and PHA-M but decreased in EGF-treated breast cancer cells. The anti-tumoral response of NK-92 cells against breast cancer cell lines was associated with increased production of granzyme-B, TNF- $\alpha$ , and NO. Similarly,

the activation of Jurkat T cells against breast cancer cell lines was characterized by increased production of granzyme-B, IL-2, and IFN- $\gamma$ . The anti-cancer response of macrophage cells was related to increased apoptosis in breast cancer cells. Furthermore, chrysin-stimulated NK-92 cells were characterized by increased IFN- $\gamma$  production and CD56 expression, Jurkat T cells by increased IL-2 production, and RAW 264.7 macrophages by increased NO production. In two different breast cancer cell lines, the PD-L1 and p-Akt protein levels elevated by EGF were inhibited by chrysin, while no significant increase in p-mTOR protein expression was observed. The findings suggest that chrysin significantly contributes to the activation and functional enhancement of NK-92, T, and macrophage cells against two different breast cancer cell lines. It also supports the potential use of chrysin as both a therapeutic and chemopreventive agent in cancer treatment by reducing PD-L1 and p-Akt levels, which play a role in cancer progression.

**Keywords:** Chrysin, NK cell, T cell, Macrophage, Breast Cancer, Immune Checkpoint Proteins



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olması ve 2020 yılında akciğer kanseri vakalarını da geçerek dünyada 2 milyondan fazla kadında görülmesi nedeniyle küresel bir toplum sağlığı problemidir [1]. Bununla birlikte, benzer klinik patolojik özellikler sergilemelerine rağmen, hastaların tedaviye yanıtları farklı olabilmektedir [2]. Ayrıca, vücudumuzda sürekli olarak hücresel seviyede kanser olduğu, fakat oluşan tümör hücrelerinin özellikle antijen sunan hücreler (APC) ve doğal öldürücü (NK) hücreler veya T hücreleri gibi ilgili efektör hücrelerin etkileşimi ile bağışıklık sistemi tarafından saptandığı ve elimine edildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, kanser hücreleri bağışıklık sistemden kaçış mekanizmaları geliştirerek proliferasyonlarını sürdürebilmektedir [3]. Kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden önemli kaçma yollarından biri de programlı hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1) isimdeki proteinleri hücre yüzeyinde yoğun bir şekilde barındırmasıdır. Ayrıca, NK, T ve makrofaj hücrelerinin aktivitesi ile meme dahil olmak üzere diğer solid tümör oluşumunun baskılanması arasında bir ilişki olduğu da çalışmalarla gösterilmiştir [4].

Meme kanserinin güncel tedavisinde iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapötikler ve biyobenzer ilaçlar halen birincil olarak kullanılmaktadır [5]. Bunlara ek olarak günümüzde indirekt etkili immunomodülatör ajanlar, onkojenik yolları veya immün kontrol noktası proteinlerini hedefleyen inhibitörler de tedaviyi tamamlayıcı olarak uygulanmaktadır [6]. Fakat, yapılan klinik çalışmalar, bu tür ajanların vücudun anti-enflamatuar yanıt sistemini bozduğunu, oto-immün hastalıklara yakalanma riskini arttırdığını ve kanser hücreleri dışındaki hücrelerde T hücresi yanıtlarını bozduklarını göstermiştir [7]. Bu yan etkileri nedeniyle, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla elde edilebilirlikleri kolay, yan etkileri düşük, kanser hücrelerine selektif ve anti-kanser özellikleri bilinen doğal etken maddelerin, immün kontrol noktası inhibisyonu veya immün sistem hücrelerinin aktivasyonu yollarıyla tümöre karşı olan bağışıklık yanıtını değiştirip değiştiremeyeceği sorusu yanıtlanmaya çalışılmaktadır [8].

## 1.2 Araştırmanın Amacı

Yukarda belirtilen problemin tanımı ve önemine uygun olarak yapılan bu araştırmanın amacı anti-kanser etkinliği bilinen ve doğal bir flavonoid olan krisin (5,7-dihidroksiflavon) etken maddesinin farklı dozlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme karsinomu hücre hatlarına üzerine olan sitotoksik, apoptotik ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretme kapasitesini, kanser hücresi yaşamında önemli olan akt/mtor yolak proteinleri üzerindeki etkisini *in vitro* olarak göstermek ve bu aktivitelerin immünmodulasyonla ilişkisini incelemek amacıyla, krisinin meme kanseri hücrelerindeki PD-L1 protein ekspresyonlarını, NK hücrelerinin, T hücrelerinin ve makrofaj hücrelerinin aktivasyonlarını ve bu hücrelerin meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik yanıtlarını nasıl değiştirdiğini araştırmaktır. Araştırma, krisinin insan immün sistem hücrelerinin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesine olan etkisini gösteren bir çalışma bulunmaması ve krisinin meme kanseri hücrelerindeki anti-kanser özelliğinin *in vitro* ortamda PD-L1 gibi immün kontrol noktası proteiniyle ilişkilendirildiği ve PD-L1'i düzenleyen mekanizmaların ortaya konduğu bir çalışma olmaması sebebiyle özgündür.

## 1.3 Araştırmanın Hipotezi

Araştırmanın hipotezi; “Krisin etken maddesi NK, T ve makrofaj hücrelerinin aktivasyonlarını artırarak, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine olan sitotoksik yanıtları güçlendirir. Meme kanseri hücrelerinde PD-L1 protein ekspresyon düzeylerini inhibe eder ve bu hücre hatlarının ilerlemesinde sorumlu bazı akt/mtor sinyal yolağı protein ifadelerini değiştirir” olarak açıklanabilir. İleri sürülen hipotezin doğruluğunu araştırmak için;

- Hücre kültür bankalarından temin edilen MCF-7; meme adenokarsinomu ve MDA-MB-231; triple negatif meme kanseri hücre hatları farklı konsantrasyonlarda krisin ile inkübe edilerek, krisinin sitotoksik, reaktif oksijen türü üretme ve pro-apoptotik etkileri,
- Etken maddemizin bu hücre hatlarındaki immün kontrol noktası ligand proteinlerinden olan PDL-1 ekspresyon düzeylerine olan etkisi,
- Hücre bankalarından elde edilen Jurkat-T hücrelerinin aktivasyonu ve birlikte ko-kültüre edildiği meme kanser hücre hatları üzerindeki T hücresi aracılı sitotoksik etkinin krisin uygulaması sonrası nasıl değiştiği,

- Krisinin NK-92 hücreleri kullanılarak doğal öldürücü NK hücrelerinin proliferasyonu, NK hücrelerinin etkinlik belirteçleri olan sitokin salınımı ve meme kanseri hücrelerindeki anti-tümoral özelliği üzerine olan etkisi,
- RAW 264.7 makrofaj hücre hattı kullanılarak krisinin makrofaj hücrelerinin aktivasyonu ve meme kanserine karşı olan sitotoksik etkisi,
- Meme kanseri hücrelerinin proliferasyonundan sorumluluğu olduğu bilinen EGFR/EGF sinyal yolunun PD-L1 ile olan bağlantısı ve krisinin bu bağlantıdaki etkisi,
- Yine meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunda ve PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan akt/mtor yolak protein ifadeleri üzerindeki etkisi,

İncelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kanser

Kanser, dünya genelinde ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve tüm insan toplumlarını etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Genel olarak, kanserin yaygınlığı her geçen gün giderek artmaktadır; yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde bile, 2023 yılına kadar yaklaşık 1,958,310 kişi kansere yakalanmış ve bunların 609,820 'si bu hastalıktan dolayı hayatını kaybetmiştir [9]. Ne yazık ki, kanser doku seviyesinde yüksek çeşitliliğe sahip bir hastalıktır ve bu çeşitlilik, spesifik tanısında ve ardından tedavi etkinliğinde büyük bir zorluk teşkil etmektedir [10]. Erkeklerde, en yüksek yüzdelerde görülen kanser türleri sırasıyla prostat, akciğer ve bronş, kolon ve rektum, ve mesane kanserleridir. Kadınlarda ise, kanser yaygınlığı en çok meme, akciğer ve bronş, kolon ve rektum, uterus korpusu ve tiroid kanserlerinde görülmektedir. Bu veriler, prostat ve meme kanserlerinin erkekler ve kadınlarda büyük bir kanser oranını oluşturduğunu göstermektedir [9]. Çocuklar için en yüksek yüzde oranlarına sahip kanser türleri ise kan kanseri, beyinle ilgili kanserler ve lenf düğümleri kanserleridir [11]. Kanser, genlerde ardışık bir dizi mutasyonla meydana gelir ve bu mutasyonlar hücre işlevlerini değiştirir. Kimyasal bileşikler, gen mutasyonlarının ve kanser hücrelerinin oluşumunda belirgin bir role sahiptir. Ayrıca, sigara içmek akciğer kanserine yol açan birçok kanserojen kimyasal bileşiği içerir [12]. İlginç bir şekilde, kanserojen özelliklere sahip çevresel kaynaklı kimyasal maddeler hücrelerin sitoplazması ve çekirdeği üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etki ederek genetik bozukluklara ve gen mutasyonlarına neden olur [13, 14]. Virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınları diğer kanserojen faktörlerdir ve tüm kanserlerin yaklaşık %13'ünü oluşturur [15]. Genel olarak, kanser hücresel ilişkileri bozar ve hayati genlerin işlev bozukluğuna yol açar. Bu bozulma, hücre döngüsünü etkiler ve anormal çoğalmaya neden olur. Proto-onkogenler, normal koşullar altında hücre bölünmesi ve büyümesinden sorumludur, ancak genetik mutasyonlar sırasında onkogenlere dönüşürler, bu da hücre varlığı için en tehlikelidir [16]. Ek olarak, tümör baskılayıcı genlerin eksikliği de kontrolsüz hücre bölünmesini tetikler. Normalde, tamir genleri

protein ve enzimlere dönüşerek onarıcı özelliklere sahip olurlar ve tespit edilmiş 30'dan fazla tamir proteini bulunmaktadır. Örneğin DNA'dan urasilin çıkarılması, DNA hasarını atlayarak ultraviyole ışık tarafından indüklenen ana DNA lezyonlarını ortadan kaldırır, bu fonksiyon tamir genlerinin DNA'yı başarıyla onarmadaki esas işlevlerinden biridir [17, 18]. Kanseri oluşturan etkileyen bir diğer önemli faktör ise epigenetiktir. Epigenetik, gen ifadesindeki kalıtsal değişikliklerin, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın incelenmesini ifade eder ve hücre yaşamı için dinamik bir fenomendir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve nükleozom pozisyonu gibi epigenetik değişiklikler, kanser oluşumunda önemli rol oynar [19]. Kanseri hücreleri, DNA metilasyonunda (toplam 5-metil sitozinin yaklaşık %5-6 oranında azalması) büyük bir azalma ile karakterizedir. H4K16'nın tek asetillenmiş formunun genel azalması, kanser hücrelerindeki histon modifikasyonlarının çoğunluğunu oluşturur. Tüm kromatin modifiye edici protein aileleri kanserle ilişkilidir, ancak çoğu durumda, işlevlerinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala aydınlatılamamıştır [20].

## **2.2 Meme Kanseri**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olması ve 2020 yılında akciğer kanseri vakalarını da geçerek dünyada 2 milyondan fazla kadında görülmesi nedeniyle küresel bir toplum sağlığı problemidir. Son kırk yılda meme kanseri vakalarında dikkate değer bir artış yaşanmıştır. 2020'de küresel olarak yaklaşık 685.000 yeni meme kanseri vakası meydana gelmiştir ve farklı ülkeler ve bölgeler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır [21]. Dikkat çekici olan, meme kanseri mortalite oranlarının güçlü ekonomilere sahip ülkelere yüksek olmasıdır. 2040 yılına kadar meme kanserinden bir milyondan fazla kişinin hayatını kaybedeceği ve üç milyondan fazla kişinin teşhis edileceği tahmin edilmektedir [22]. Erken tanı ve tedavi alanındaki ilerlemelere rağmen, kanser hala kadınlar arasında yaygın bir hastalıktır ve kansere bağlı ölümleri artırmakta, dünya genelinde sağlığı tehdit etmektedir. Tümör progresyon hızı, yeni damar oluşturma ve metastaz hızının yüksek olması nedeniyle mortalitesi yüksektir. Bununla birlikte, benzer klinik patolojik özellikler sergilemelerine rağmen, hastaların tedaviye yanıtları farklı olabilmektedir. Bu da çeşitli kanser alt tiplerinin farklı patofizyolojik özelliklerinin önemini göstermektedir. Gerçekten de genomik, epigenetik, transkripsiyonel ve proteomik analizler, meme



kanseri alt tiplerinin yolak aktivitesi ve ilerlemesi açısından farklılık gösterebileceğini ortaya koymuştur [2]. Meme kanseri tedavilerine tarihsel olarak bakıldığında, seçici olmayan sitotoksik kemoterapiler, radyasyon ve cerrahi işlemler meme kanseri tedavisinin hala ana unsurlarıdır. Bu tedaviler hasta sağkalımını önemli ölçüde artırır ancak sık sık önemli yan etkiler ve öngörülemez tedavi sonuçlarına sebep olabilirler [23]. Son yıllarda özellikle hedefli ilaçlar, meme kanseri tedavi paradigmasını değiştirmiş ve daha iyi hasta sonuçları ve hassas tıp vaat ederek meme kanseriyle mücadelede güçlü bir araç haline gelmiştir [24].

### **2.2.1 Meme kanseri risk faktörleri**

Risk faktörleri, tümörlerin başlangıcı ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar ve değiştirilebilir ve değiştirilemez faktörler olarak kategorize edilebilir. Değiştirilebilir risk faktörlerini belirlemek, küresel kanser yükünü önemli ölçüde azaltabilir. Meme kanseri için, diğer kanser türleriyle ortak olan risk faktörlerinin yanı sıra, bu kansere özgü faktörler de vardır [25, 26].

#### **2.2.1.1 Genetik risk faktörleri**

Kalıtsal meme kanseri, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturur. Pozitif bir aile öyküsüne sahip bireyler, özellikle de birinci derece akrabaları etkilenmiş olanlar, meme kanseri açısından önemli ölçüde artmış bir risk altındadır [27]. BRCA1 (17q21) ve BRCA2 (13q13), homolog rekombinasyon yoluyla DNA tamirinde rol oynayan iki yaygın genetik mutasyondur. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları sırasıyla %35 ve %25 oranında kalıtsal meme kanserinden sorumludur. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının prevalansı, bazı belirli popülasyonlarda nispeten yüksektir. BRCA1 ve BRCA2'nin yanı sıra, PTEN, TP53, CDH1 ve STK11 gibi diğer yüksek geçişli genler de meme kanseri ile ilişkilidir; orta penetranslı genler arasında ise DNA tamiri ve hücre döngüsü kontrolünde yer alan CHEK2, BRIP1, ATM ve PALB2 bulunur. Hastalarda gözlemlenen farklı genetik mutasyonlar, meme kanserinin belirli moleküler alt tipleri ile ilişkilidir [28, 29].

#### **2.2.1.2 Hormonal risk faktörleri**

Bir steroid hormon olan östrojen, kadın cinsel özelliklerinin gelişmesinden sorumludur ve metabolizmada önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, östrojen ve östrojen metabolitleri, ER üzerinde etki göstererek hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü ilerlemesini etkileyerek veya DNA'ya oksidatif hasar vererek potansiyel olarak

kanserojen etkilere de sahip olabilir. Bu nedenle, hem endojen hem de eksojen östrojen kaynaklarının neden olduğu anormal derecede yüksek östrojen seviyeleri, meme kanseri gelişme riskini artırabilir [30].

Gebelikle ilgili birkaç faktör, meme kanseri riskinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İlk doğum yaşıyla ilgili olarak, artan yaş, HR-pozitif meme kanseri riskini artırıyor gibi görünmektedir. İlk çocuğunu 30 yaşında veya daha büyük yaşta doğuran kadınlar, 25-29 yaş arasında doğum yapanlara kıyasla daha yüksek bir meme kanseri riski taşır [31]. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, bu ilişkinin etnik kökene özgü bir profile sahip olduğunu da bulmuştur [32].

Emzirme, meme kanseri riskini azaltmada iyi bilinen bir diğer faktördür. Büyük ölçekli bir çalışma, her 12 aylık emzirmenin meme kanseri riskini %4,3 oranında azalttığını bildirmiştir. Bir meta-analiz, emzirmenin HR-negatif hastalığa karşı koruyucu etkiler gösterebileceğini sonuçlandırmıştır. Ayrıca, BRCA1 taşıyıcılarında riskin azaldığını, ancak BRCA2 taşıyıcılarında azalmanın olmadığını gözlemlemiştir [33]. Koruyucu etkiler, anne sütündeki immünolojik bileşenleri içeren biyolojik mekanizmalara ve meme hücrelerinin yenilenmesi ve farklılaşmasına bağlanabilir [34].

#### **2.2.1.2 Davranışsal ve çevresel risk faktörleri**

Birçok gözlemsel çalışma, daha fazla fiziksel aktivitenin daha düşük meme kanseri riskleri ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Doz-cevap analizleri, aktivite seviyesinin ne kadar yüksekse, riskin o kadar düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hareketsiz davranışın da meme kanseri için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve aralarında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Fiziksel aktivitenin faydalı etkilerinin altında yatan potansiyel biyolojik gerekçeler, vücut yağının azalması ve dolayısıyla endojen cinsiyet hormonlarına maruziyetin azalmasıdır [35]. Diğer olası mekanizmalar arasında insülin ve diğer büyüme faktörlerinin azalması, yanı sıra bağışıklık sistemi tepkilerindeki değişiklikler yer alabilir. Ayrıca yapılan çalışmalar, özellikle ER-pozitif alt tipler için postmenopozal kadınlarda obezitenin artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 10 çalışmanın önceki bir meta-analizi, BMI'de her 5 birimlik artışın ER-pozitif ve progesteron reseptörü (PR)-pozitif tümörler geliştirme riskini %33 oranında artırdığı sonucuna varmıştır [36] .

Diyet de meme kanseri için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Batı ve Akdeniz diyetleri, iki temel diyet kalıbı olarak, belirgin özelliklere ve meme kanseri riski ile ilişkilere sahiptir [37]. Batı diyeti genellikle yüksek kalorili ve düşük besin değerine sahiptir. Doymuş yağ alımı ile meme kanseri arasındaki ilişki konusunda uzun süredir devam eden bir tartışma olsa da, bazı çalışmalar özellikle HR-pozitif tümörlerle pozitif bir ilişki bulmuştur, ancak diğer tiplerle önemli bir bağlantı bulamamıştır [38]. Çalışmalar, Akdeniz diyetine bağlı kalmanın hem premenopozal hem de postmenopozal kadınlarda meme kanseri geliştirme riskini azalttığını göstermiştir, bu durum tüm moleküler alt tipler arasında tutarlıdır. Diyetin ana bileşenlerindeki antioksidanlar, oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltmaktan sorumlu olabilir, böylece potansiyel olarak daha düşük kanser insidansına yol açabilir [39].

Alkol tüketimi meme kanserinde bir risk arttırıcı olarak tanımlanmıştır ve çalışmalar, bir doz-cevap ilişkisi göstermektedir [40]. 53 çalışmanın bir meta-analizi, günlük alkol tüketiminde her 10 gramlık artış için riskin %7 oranında arttığını bulmuştur. Günde 12.5 g/d'den az tüketen hafif içiciler bile, içmeyenlere kıyasla %5 artmış riskle karşı karşıyadır [41].

Çalışmalar hem aktif hem de pasif sigara içmenin meme kanseri ile ilişkili olduğu konusunda düşük ancak tutarlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. 934,681 katılımcıyı içeren 14 kohort çalışmasının dikkat çekici bir birleşik analizi, meme kanseri riskinin, özellikle ER-pozitif meme kanserinin, ilk doğumdan önce sigara içme süresiyle arttığını bulmuştur [42]. Tütün dumanındaki karsinojenik bileşikler, örneğin polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aromatik aminler, meme dokuları tarafından emilir ve metabolize edilir ve meme kanserinin gelişimine katkıda bulunur [43].

Radyasyon maruziyeti de, meme kanseri için iyi bilinen risk faktörlerinden biridir. Japon atom bombası kurtulanlarının yaşam süresi çalışmasında, hem kadın meme kanseri hem de metastatik meme kanseri insidansı önemli ölçüde artmıştır [44]. Kadın meme kanseri riski, iyonize radyasyon dozu ile doğrusal olarak artar ve bu risk, maruziyet yaşı ve erişilen yaş ile değişir [45].

### **2.2.2 Temel meme kanseri tipleri**

Meme Kanseri tipleri invaziv olmayan ve invaziv infiltre olanlar olarak iki ayrı grupta incelenebilir (Şekil 2.1). Bu gruplar da kendi arasında subtiplere ayrılmıştır. Ayrıca

meme kanserleri, hücrelerinin yüzeyinde bulunan belirli hormon reseptörlerine göre de sınıflandırılabilirler (Tablo 2.1).

#### **2.2.2.1 İnvaziv olmayan meme tümörleri**

Duktal karsinoma in situ (DCIS) olarak da adlandırılan intraduktal adenokarsinom, invaziv olmayan ve pre-invaziv bir meme kanseri türüdür ve en yaygın meme kanseri türlerinden biridir. Duktal karsinoma in situ kendi başına vücudun diğer bölgelerine yayılmasa da, invaziv tümörlere dönüşme riski oldukça yüksektir. Bu nedenle, herhangi bir bireyin invaziv kanser geliştirmesini önlemek için erken teşhis ve uygun tedavi gereklidir [46].

Lobüler karsinoma in situ (LCIS) ise, memedeki süt üreten bezlerin içindeki lobüllerde meydana gelir. Lobüler karsinoma in situ “karsinoma” kelimesini içermesine rağmen, aslında meme kanseri türü değildir. Ancak, LCIS gelecekte meme kanseri geliştirme riski taşıyan bir faktördür. LCIS tedavi edilebilir bir durumdur ve bu teşhisi alanlar için görünüm oldukça iyidir [47].

#### **2.2.2.2 İnfiltr eden meme tümörleri**

İnfiltr eden meme tümörleri invazivdir ve komşu meme stromasına yayılır. Ayrıca, lobüllerin ötesine geçerler ve genellikle memede bulunan kanallar ve lobüllerle sınırlı kalmazlar. İnvaziv maligniteler her zaman vücudun diğer bölgelerine, organlara ve lenf düğümlerine yayılma potansiyeline ve vücutta hareket edebilme yeteneğine sahiptir. Sonuç olarak, özellikle agresif olan meme tümörleri bu gruba girer [48]. Sürece dahil olan hücre veya dokuların türüne bağlı olarak, invaziv meme kanserinin birçok alt tipi vardır, ancak bunlar iki kategoriye ayrılabilir:

- İnvaziv duktal karsinom (IDC); İnfiltr eden duktal karsinomdur, invaziv duktal karsinom veya “IDC” olarak bilinir ve en yaygın meme kanseri türüdür. IDC'nin, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %80' ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. IDC kategorisine dahil olan bazı alt gruplar arasında meme kribriform karsinomu, meme kapiller kanseri, meme müsinöz karsinomu ve meme tübüler karsinomu bulunur. Diğer alt gruplar arasında meme medüller karsinomu ve meme tübüler karsinomu da bulunmaktadır [49].

- İnvaziv lobüler karsinomlar (ILC); en yaygın ikinci tümör türüdür ve tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık yüzde on ila on beşini oluşturur. Her yaş grubundaki

kadınları etkileyebilmesine rağmen, ILC en çok orta yaşlı veya daha yaşlı kadınlarda görülür. ILC alt tipi, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %90–95'ini oluşturur. IDC ve ILC maligniteleri, mevcut olan belirgin tanısal özelliklere sahiptir. Öte yandan, lob karsinomları, tek tek, tek sıralar halinde ve tabakalar halinde düzenlenmiş canlı hücrelerden kaynaklanır [50]. Buna ek olarak, bir dizi moleküler ve genetik anormallikleri vardır. Kanal ve lob karsinomları arasındaki farkı ayırt etmek son derece önemlidir çünkü her tür karsinom için prognozlar ve tedavi seçenekleri birbirinden oldukça farklı olabilir [48].

MCF-7 meme kanseri hücre modeli; meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan ve en çok bilinen insan meme adenokarsinoma hücre hatlarından biridir. 1970 yılında Michigan Üniversitesi'nde izole edilmiştir ve östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri çalışmalarında önemli bir model olarak kullanılır. MCF-7 hücreleri epitelyal kökenlidir ve tipik olarak adezyon ile kültüre edilirler, yani yüzeye yapışarak büyürler. Bu hücreler östrojen reseptörü (ER) pozitif ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olup, HER2/neu geninin düşük seviyelerde ekspresyonunu yaparlar. Östrojen reseptör pozitifliği, bu hücre hattının hormon duyarlılığını ve dolayısıyla hormon tedavisi araştırmaları için uygunluğunu belirler. MCF-7 hücreleri, östrojen varlığında proliferasyon hızını artırır, bu da onları hormon bağımlı meme kanseri araştırmaları için ideal bir model yapar. MCF-7 hücreleri, östrojen reseptör pozitifliği nedeniyle, anti-östrojen tedavilerinin (örneğin, tamoksifen) etkinliğini incelemek için kullanılır. Bu hücre hattı, meme kanseri hücrelerinin büyüme, farklılaşma ve apoptoz süreçlerini incelemek için de yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Hayvan modellerinde tümör oluşturma kapasiteleri nedeniyle tümör biyolojisi çalışmaları için de önemlidir [51].

### **2.2.2.3 Üçlü negatif meme kanseri (TNBC)**

TNBC; en agresif meme kanseri türlerinden biridir [52]. Bu kanserler, meme dokusunda anormal progesteron, östrojen ve insan büyüme faktörü reseptörü 2 ekspresyonu sonucunda gelişir. İmmünohistokimyasal sonuçlara göre, TNBC'ler sıklıkla %1'lik progesteron ve östrojen reseptörleri ile %0 ila 1+ arasında insan büyüme faktörü reseptörü 2 ekspresyonu sergiler. TNBC'ler dört farklı transkripsiyonel alt gruba ayrılabilir. Bunlar arasında iki bazal alt tip BL1 ve BL2, mezenkimal alt tip M, lüminal androjen reseptörü alt tipi ve androjen reseptörü pozitif TNBC alt tipi bulunmaktadır. Üçlü negatif meme kanserleri (TNBC), tüm meme

kanseri vakalarının %12-17'sini oluşturur ve kendiliğinden tekrarlama geçmişine sahiptir. TNBC'ler, diğer meme kanseri alt tiplerinin klinik özelliklerine kıyasla daha agresif davranış sergiler. Bu tümörler kötü bir prognoza sahiptir ve belirli metastaz modelleri ile ayırt edilir. Yeni teşhis edilen meme kanseri vakalarının %24'ünü oluşturan üçlü negatif meme kanserlerinin görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. TNBC, 2018 yılında kadınlarda en yaygın meme kanseri türüydü ve 2020 araştırmalarına göre tahmini olarak 2,088,849 vaka tespit edilmiştir [53].

MDA-MB-231 hücre hattı da triple negatif meme kanseri (TNBC) çalışmaları için yaygın olarak kullanılan bir insan meme kanseri hücre hattıdır. 1973 yılında M.D. Anderson Kanseri Merkezi'nde izole edilmiştir ve özellikle agresif, metastatik ve tedaviye dirençli özellikleriyle bilinir. Bu hücreler, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2/neu (ERBB2) ekspresyonu yapmazlar. Bu nedenle "triple negatif" olarak sınıflandırılırlar, ki bu da onları tedaviye dirençli bir meme kanseri modeli haline getirir. Bu hücreler oldukça invazivdir ve diğer organlara metastaz yapma yeteneğine sahiptir [54]. Bu özellik, araştırmacıların kanser hücrelerinin metastaz sürecini incelemesine olanak tanır. Tüm bu özellikleri dolayısıyla, ilaç direncine karşı geliştirilen tedavi stratejilerinde, hayvan modelleri ile yürütülen metastaz çalışmalarında, genetik değişikliklerin ve mutasyonların kanser gelişimi üzerindeki etkilerini incelemede ve kemoterapi, hedeflenmiş tedaviler ve immünoterapilerin etkinliğini test etmede yaygın olarak kullanılır [55].

Ayrıca meme kanserleri oldukça heterojendir. Meme kanserinin heterojenliği, kanser hücrelerinin genomik, epigenomik, transkriptomik ve proteomik özelliklerindeki farklılıklara atfedilir [56]. Bu faktörler, tümörün proliferasyon, apoptoz, metastaz ve tedaviye yanıt gibi özelliklerini etkiler. Bu heterojenlik, farklı hastalar arasındaki veya farklı metastazlardaki tümör dokularında (intertümör heterojenliği) ve aynı hastadan gelen bireysel tümör içinde (intratümör heterojenliği) de gözlemlenir. Heterojenlik aynı zamanda mekansal ve zamansaldır. Zamansal heterojenlik, tümör progresyonu sırasında kanser hücrelerinin moleküler yapısındaki dinamik değişiklikleri ifade eder. Mekansal heterojenlik, farklı hücre popülasyonlarının karmaşık tümör yapılarındaki dağılımını ve etkileşimlerini tanımlar. Birçok akademisyen, meme kanserinin dünya çapında kadınlarda en heterojen kanser türü olduğuyla ilgili çalışmalar

yayınlanmışlardır. Meme kanseri heterojenliği, erken teşhis, tedavi seçimi ve prognoz tahmini zorluğunu artırır [57].



Şekil 2.1 : Meme kanseri tiplerinin ana sınıflandırması [46].

### 2.2.3 Hormon ekspresyonlarına göre meme kanseri tipleri

Meme kanserleri, hücrelerinin yüzeyinde bulunan belirli hormon reseptörlerine göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma, tedavi seçeneklerini belirlemede ve hastalığın seyrini tahmin etmede kritik bir rol oynar [58]. Meme kanserleri genellikle Tablo 2.1’ de gösterildiği gibi hormon reseptörlerine göre sınıflandırılır. Tablo 2.1’ de ayrıca farklı tiplerin tedavi ve prognozları da anlatılmaktadır [58].

**Tablo 2.1 :** Eksprese ettiği hormonlara göre meme kanseri tipleri, tedavi seçenekleri ve prognozları [58].

| Hormon Reseptörü                        | Tanım                                                                                            | Tedavi                                                                                                                                                                      | Prognoz                                                                                                            |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Östrojen Reseptörü Pozitif (ER+)</b> | -Östrojen hormonuna yanıt verir.<br><br>-Hücre, büyümesini teşvik etmek için östrojeni kullanır. | -Genellikle hormon tedavisine yanıt verir.<br><br>-Tedavi seçenekleri; tamoksifen, aromataz inhibitörleri (örneğin anastrozol, letrozol), ve diğer anti-östrojen tedaviler. | -Genellikle daha yavaş büyür ve hormon tedavilerine iyi yanıt verir, bu da prognozu genellikle daha pozitif yapar. |

**Tablo 2.1 (devam):** Eksprese ettiği hormonlara göre meme kanseri tipleri, tedavi seçenekleri ve prognozları

| <b>Hormon<br/>Reseptörü</b>                                                          | <b>Tanım</b>                                                                                                                                                                    | <b>Tedavi</b>                                                                                                                                                                                   | <b>Prognoz</b>                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Progesteron<br/>Reseptörü Pozitif<br/>(PR+)</b>                                   | -Progesteron hormonuna yanıt verir. -Genellikle östrojen reseptörü pozitif olanlarla birlikte bulunur.                                                                          | -PR+ meme kanserleri, ER+ kanserler gibi, hormon tedavisine iyi yanıt verir                                                                                                                     | -Genellikle tedaviye daha iyi yanıt veren ve daha iyi prognoza sahip bir kanser tipi olarak kabul edilir.                         |
| <b>İnsan Epidermal<br/>Büyüme Faktörü<br/>Reseptörü 2 (HER2)<br/>Pozitif (HER2+)</b> | -HER2 bazı meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde aşırı miktarda bulunur.<br><br>-HER2 proteini, hücre büyümesini teşvik eder ve HER2+ meme kanserleri genellikle daha agresiftir. | -Genellikle hedefe yönelik tedavilerle (örneğin, trastuzumab, pertuzumab, lapatinib) tedavi edilir.                                                                                             | -Tedavi edilmezse HER2+ meme kanserleri daha agresif olabilir, ancak HER2 hedefli tedavilerle prognoz önemli ölçüde iyileşmiştir. |
| <b>Triple Negatif Meme<br/>Kanseri (TNBC)</b>                                        | -Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 proteini eksprese etmeyen meme kanseridir.                                                                         | -Hormon tedavilerine veya HER2 hedefli tedavilere yanıt vermez.<br><br>-Kemoterapi genellikle birincil tedavi seçeneğidir. - İmmünoterapi ve yeni hedefli tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. | -Genellikle daha agresif seyrederek ve diğer alt tiplerden daha kötü bir prognoza sahip olabilir                                  |
| <b>Östrojen Reseptörü<br/>Negatif (ER-)</b>                                          | -Östrojen hormonuna yanıt vermezler.                                                                                                                                            | -Genellikle kemoterapi ve/veya hedefe yönelik tedavilerle gerçekleştirilir.                                                                                                                     | -Genellikle agresiftir ve hormon tedavilerinin uygulanamaması nedeniyle prognoz genellikle kötüdür.                               |
| <b>Progesteron<br/>Reseptörü Negatif<br/>(PR-)</b>                                   | -Progesteron hormonuna yanıt vermez.                                                                                                                                            | -Hormon tedavisine yanıt vermez<br><br>-Genellikle kemoterapi uygulanır.                                                                                                                        | -Hormon tedavilerine daha az duyarlılık ve potansiyel olarak daha agresif bir seyir ile ilişkilendirilebilir.                     |

#### 2.2.4 Meme kanseri tedavileri

Meme kanseri tedavisinde tümör hücrelerinin diğer organlara yayılmasını önlemek için kullanılan geleneksel tedavi yöntemleri arasında cerrahi, radyasyon terapisi,



kemoterapi ve hormonal terapiler bulunur (Tablo 2.2, konvasiyonel terapiler). Meme kanseri heterojen bir hastalık olduğu için, tedavisi tümörün hücrel ve moleküler özellikleri, hastalığın evresi ve geçmişi gibi çoklu faktörlere bağlıdır [59]. Önemli bir nokta olarak, meme kanseri hastalarının, hastalığın erken evresinde teşhis ve tedavi edildiğinde %90'dan fazla bir hayatta kalma oranı vardır [60].

Son zamanlarda meme kanseri tedavileri arasında, kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalmasında önemli rol oynayan molekülleri hedef alan ilaçlar, hedefe yönelik tedavi olarak da bilinir (Tablo 2.2, yeni terapiler). Örneğin, alpelisib (PIQRAY), tümör büyümesini teşvik eden fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolunu özgül olarak inhibe eder. Alpelisib tedavisi, hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif, PI3KCA mutant ileri meme kanseri hastalarında ilerleme olmadan sağkalım süresini uzatır [61]. Bir diğer örnek Talazoparib (TALZENNA) olup, DNA hasar onarım yollarının temel bir parçası olan poli-ADP-Riboz Polimeraz inhibitörü olarak, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını tehlikeye atar ve 2018 yılında lokal ileri veya metastatik HER-2 negatif, BRCA1/2 mutasyonlu meme kanseri tedavisinde onaylanmıştır [62]. Ayrıca, histon deasetilaz enzim inhibitörlerinin (örneğin tucidinostat) tümörü teşvik eden sinyalleri engelleyerek tümör büyümesini baskıladığı, halen klinik deneylerde araştırılmaktadır [63].

Son yıllarda, immünoterapi de kanser hücrelerine karşı bağışıklık yanıtını artırmayı amaçlayan bir kanser tedavisi türü olarak, belirli kanser türlerindeki hastaların sağkalımını iyileştirmede bir çıkır açıcı olarak tanınmıştır [64]. Bağışıklık hücrelerinin normal hücrelere karşı tepki vermesini önlemek için 'kapalı sinyal' olarak hizmet eden bağışıklık kontrol noktası moleküllerine müdahale eden birçok ilaç geliştirilmiştir. Bu tür bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin kanserde kullanılması, kanser hücrelerine karşı bağışıklık yanıtını serbest bırakır ve aktive eder. Bu ilaçlardan biri olan Atezolizumab (Tecentriq), bağışıklık kontrol noktası molekülü olan programlı hücre ölümü ligandı 1'i (PD-L1) özgül olarak inhibe eder ve böylece kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve saldırıya uğramasını teşvik eder [65]. 2019 yılında FDA tarafından, hormon reseptörlerini veya HER2'yi ifade etmeyen ancak PD-L1 ifadesine sahip ileri meme tümörlerinin tedavisi için kemoterapi ile birlikte kullanılmak üzere onaylanmıştır. PD1/PD-L1 immün kontrol noktası proteinleri ve meme kanseri arasındaki ilişki ilerideki bölümlerde detaylı olarak anlatılacaktır.

Meme kanseri tedavisinde bugüne kadar karşılaşılan en büyük zorluk, sağlıklı hücrelere zarar vermeden, minimal yan etkilerle kanser hücrelerinin hedeflenerek yok edilmesidir. Genetik olarak mühendislik yapılmış T lenfositlerin, belirli bir molekülü ifade eden tümör hücrelerini özgül olarak tanıyıp öldürmesini içeren adoptif T hücresi terapisi ve kanser aşılı gibi yaklaşımlar, tümör hücrelerini yüksek özgüllük ve verimlilikle yok etmek için umut verici tedavi faydaları sağlayabilir [66, 67]. Son olarak, prediktif biyomarkernlara dayanan hedeflenmiş kombinasyon tedavileri özelleştirilmesi ve taşıyıcı sistemler, örneğin nanopartiküller aracılığıyla etkili ilaç teslimi gibi, meme kanseri tedavisini iyileştirmede büyük bir potansiyele sahiptir [68].

**Tablo 2.2 :** Mevcut meme kanseri tedavi yöntemleri.

| <b>Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri</b>     |                                                                               |                                                        |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i><b>Konvansiyonel Terapi</b></i>        | <i><b>Yenilikçi Tedaviler</b></i>                                             | <i><b>Umut Vaadeden Teknolojiler</b></i>               |
| Lumpektomi ve Mastektomi                  | Atezolizumab (Anti-PD-L1 mAB)                                                 | Nanopartiküller                                        |
| Radyoterapi                               | Talazoparib-PARP inhibitör                                                    | HDAC inhibitör-Tucidinostat                            |
| Kemoterapi                                | Alpelisib-PI3K inhibitör                                                      | Genetik olarak değiştirilmiş T hücreler,               |
| Hormon Terapisi (Hormon pozitif tümörler) | Kombine Terapiler (tümörün evresine ve moleküler yapısına göre karar verilir) | Rekombinant Sitokinler, Kanser Aşıları Nanopartiküller |

### 2.2.5 Meme kanseri tedavilerinde ana sinyal yolları

#### *RTK Sinyal Yolu Kaskadı*

RTK kaskadının aktivasyonu genellikle HER2, EGFR, IGFR, FGFR1, KIT gibi membran reseptörlerinde başlar. Reseptörler ile ligandların bağlanması, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) veya Ras sinyal yolunu aktive eder. PI3K aktive olduğunda, inositol içeren membran lipitlerini fosforile eder. Fosforilasyon ürünü olan PIP3, AKT'ye bağlanır. Ayrıca, meme kanseri hücrelerinde PTEN, PIP3'ün defosforilasyonu yoluyla Akt aktivitesini engelleme işlevini kaybeder. AKT daha sonra birkaç substratı fosforile ederek, rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) olarak

bilinen yolun aktivasyonuna yol açar. Ras yolu aktive edildiğinde, Ras proteinleri, hücre dışı büyüme faktörlerinden sinyalleri, inaktif GDP bağlı ve aktif GTP bağlı durumlar arasında geçiş yaparak iletir ve aşağı akışta RAF protein kinazlarını aktive eder. RAF kinazlarının baskın substratları, MAPK/ERK kinazları, MEK1 ve MEK2'dir. ERK, hücre döngüsü ilerlemesi, farklılaşma gibi süreçleri kontrol eden transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen ekspresyonunda geniş çaplı değişiklikler oluşturur [69].

#### *Notch Sinyal Yolu Kaskadı*

Notch kaskadının aktivasyonu genellikle Notch reseptörlerinin (NICD) ve ligandların (Jagged, Delta) dış hücre bölgesindeki bağlanmaları ile başlar. NICD, çekirdeğe geçerek, Hes ve Hey gibi çeşitli genlerin aşağı akışta hedef genlerin transaktivasyonuna neden olur. Bu transkripsiyonel hedefler arasında transkripsiyon faktörleri (NF- $\kappa$ B2 ve c-Myc), hücre döngüsü düzenleyicileri (siklin D1 ve p21) ve büyüme faktörü reseptörleri (HER2) ve anjiyogenez ve apoptoz düzenleyicileri bulunur. Bu nedenle, Notch yolunun kesintiye uğraması, farklılaşma, anjiyogenez ve apoptoz, hücre büyümesi üzerinde önemli aşağı akış etkilerine sahip olabilir [70].

#### *Wnt Sinyal Yolu Kaskadı*

Wnt yolu, yukarı regüle edilen Wnt reseptörü frizzled-7 (FZD7) ve Wnt ko-reseptörü LRP6 tarafından aktive edilir. Dishevelled ve/veya Axin aracılığıyla yapılan sinyalizasyon, normalde  $\beta$ -katenini kararsız hale getiren bir multiprotein kompleksini inaktive eder. Çekirdekte,  $\beta$ -katenin, T hücre faktörü /lenfoid artırmacı faktör-1 ailesinin proteinlerine bağlanır ve birkaç hedef genin ekspresyonunu modüle eder. Wnt/ $\beta$ -katenin hedef genleri arasında hücre proliferasyonu ve apoptozu kontrol eden genler yer alır, bu da kanserin başlatılması ve ilerlemesi üzerinde aracılık eder [71].

#### *Östrojen Sinyal Yolu Kaskadı*

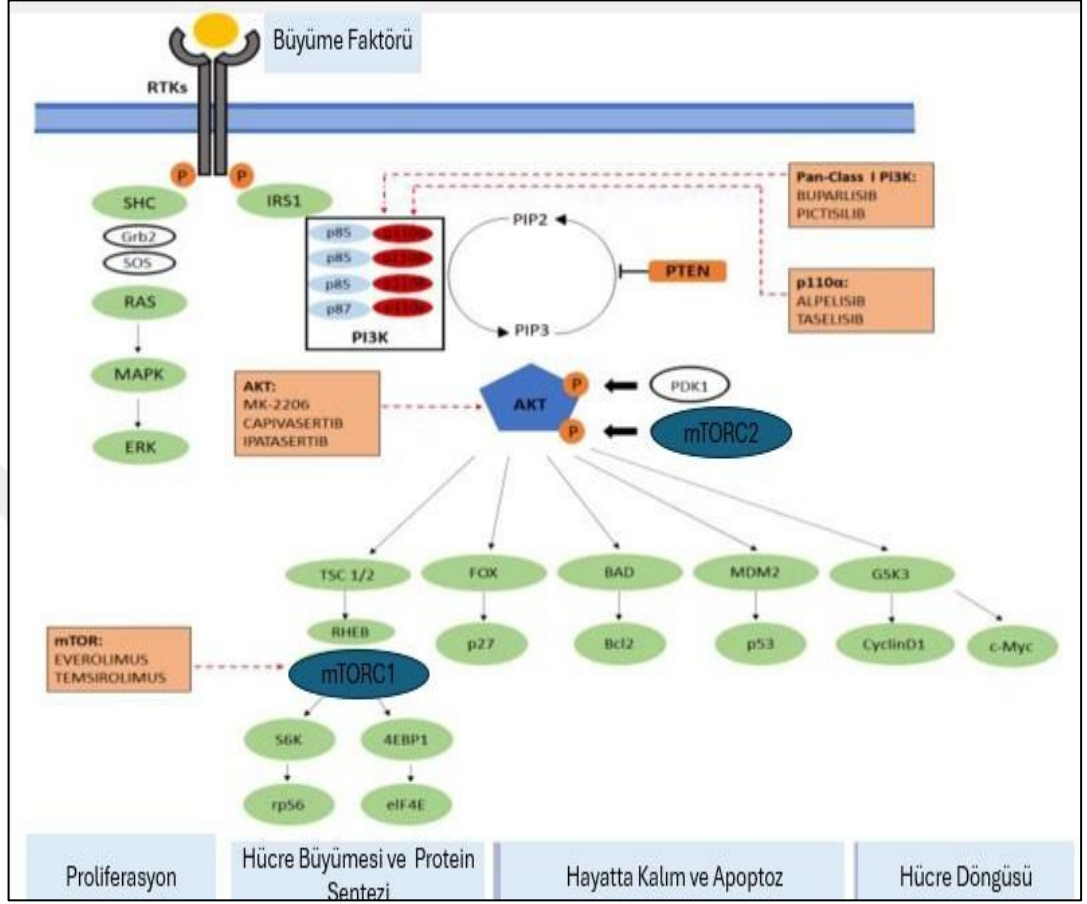
Meme kanserinde östrojen yolu, 'çekirdek başlatmalı steroid sinyalizasyonu' aracılığıyla hücrel etkilerini gösterir. Sitoplazmadaki östrojenler, doğrudan çekirdek membranındaki östrojen reseptörüne bağlanır, bu da çekirdeğe geçiş yapar, DNA'daki ERE elementlerine bağlanır ve ERE'ye bağlı genlerin ekspresyonunu aktive eder. Bu ERE'ye bağlı genler, meme kanseri hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonunda rol oynayan genlerin bir setini düzenler [72].

### *PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu Kaskadı*

Fosfatidilinositol 3-Kinaz/ protein kinaz B/ memeli hedef rapamisin (PI3K/AKT/mTOR) yolu, tirozin kinaz reseptörlerinin (RTK) ve G-protein bağlı reseptörlerin aktivasyonu yoluyla hücre metabolizması, büyüme, proliferasyon ve apoptozda fizyolojik olarak rol oynar [73]. Özellikle PI3K'ler, üç sınıfa (sınıf I, II ve III) ayrılan, dizilim homolojilerine ve *in vitro* substrat tercihlerine göre sınıflandırılan bir dizi hücre içi kinaz ailesidir. Sınıf I, ana PI3K enzim ailesidir. Aktive edilen reseptörlere göre sınıf IA ve sınıf IB olarak daha da alt sınıflara ayrılır. Sınıf IA, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörleriyle doğrudan etkileşime giren farklı katalitik ve düzenleyici alt birimlerden oluşur. IA-PI3K'ler, G protein-bağlı reseptörler, RTK'lar ve küçük G protein RAS gibi hücre yüzeyi reseptörleri tarafından aktive edilir. Buna karşılık, GTPazlar gibi küçük moleküller, sınıf II enzimlerini aktive eder [73]. PI3K yolunun merkezi aracısı, mTOR da dahil olmak üzere 100'den fazla substratı aktive eden AKT'dir. Buna karşılık, PTEN, PI3K sinyalizasyonunun ana negatif düzenleyicisidir (Şekil 2.2). Kanser gelişimi sırasında, PI3K/AKT/mTOR yolundaki değişiklikler, başlıca PIK3CA ve AKT mutasyonlarına, RTK'ların aşırı ekspresyonuna veya PTEN kaybına bağlıdır [74].

PI3K/AKT/mTOR meme kanseri tedavi başarısızlığında önemli bir sinyal yoludur. Yolun deregülasyonunun ana nedenleri, PIK3CA mutasyonları, AKT mutasyonları veya tensin homolog (PTEN) kaybıdır. Endokrin direnç ve anti-HER2-hedefli ajan dirençlerinin de en bilinen mekanizması bu yolaktaki bozukluklardır. PI3K/AKT/mTOR mutasyonları, diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla hormon reseptörü pozitif (HR+) meme kanserlerinde daha sık görülür [75]. Dolayısıyla bu yolaktaki proteinleri hedef alan tedavi stratejileri geliştirmek agresif meme kanseri tipleri için de oldukça mantıklıdır [76]. Bu sinyal kaskadı üzerine geliştirilen ilaçların ilki; mTOR inhibitörü olan Everolimus, BOLERO 2 klinik deneme sonuçlarına dayanarak eksemestan ile kombinasyon halinde onaylanmıştır [77]. İkincisi, kısa bir süre önce endokrin direncine sahip PI3K-mutant HR+ metastatik meme kanserinde Fulvestrant ile kombinasyon halinde onaylanan Alpelisib'dir. PI3K/AKT/mTOR

sinyal yolunun kanser hücrelerindeki rolü ve mevcut geliştirilen ilaçların özeti Şekil 2.2 'de gösterilmiştir.



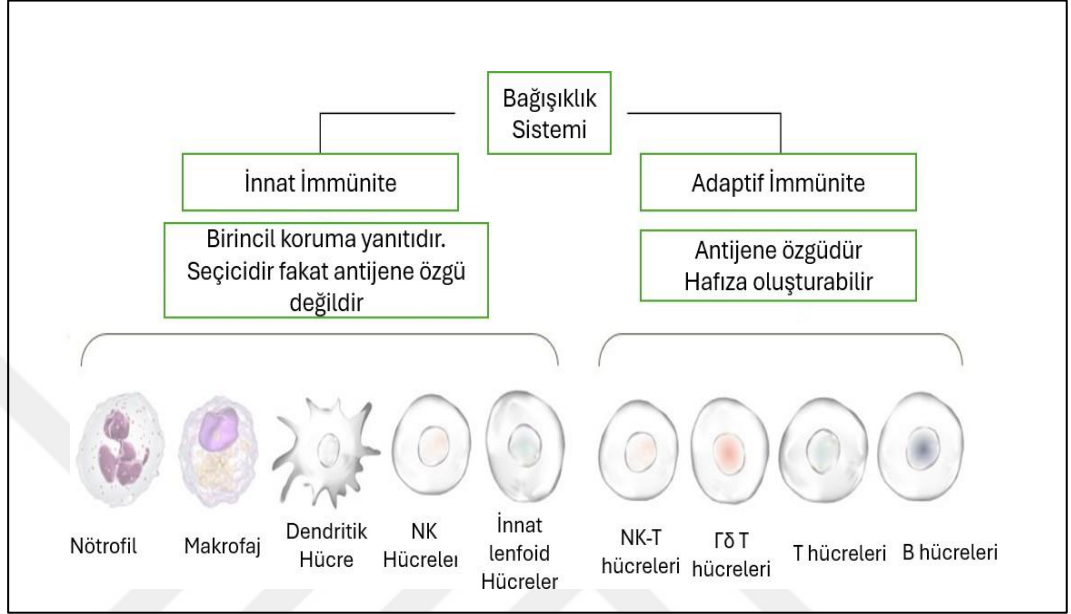
Şekil 2.2 : PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı [78].

## 2.3 Bağışıklık Sistemine Bakış

### 2.3.1 Doğuştan gelen immün yanıt

İmmünite, tepkinin hızı ve özgüllüğü ile belirlenen iki kısma ayrılır. Bunlar, doğuştan gelen (innat) ve kazanılmış (adaptif) yanıtlar olarak adlandırılır; ayrı gibi olsalar da pratikte aralarında çok fazla etkileşim vardır (Şekil 2.3). Doğuştan gelen bağışıklık terimi bazen fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik bariyerleri de kapsar, ancak daha çok bağışıklık sisteminin hemen savunma sağlayan unsurlarını (nötrofiller, monositler, makrofajlar, kompleman, sitokinler ve akut faz proteinleri) içerir. Tepkinin yüksek düzeyde korunmuş doğası, en basit hayvanlarda bile görülür ve hayatta kalmadaki önemini teyit eder. Kazanılmış bağışıklık ise, daha gelişmiş canlıların bağışıklık sisteminin ayırt edici özelliğidir. Bu yanıt, T lenfositleri ve B lenfositleri aracılığıyla antijene özgü reaksiyonlardan oluşur. Doğuştan gelen yanıt hızlıdır, ancak bazen

özgüllük eksikliği nedeniyle normal dokulara zarar verebilirken, kazanılmış yanıt kesin olup, gelişmesi birkaç gün veya hafta sürebilir. Kazanılmış yanıtın hafızası vardır, bu yüzden sonraki maruziyetlerde daha güçlü ve hızlı bir yanıt oluşur, ancak bu anında gerçekleşmez [79, 80].



**Şekil 2.3 :** Doğuştan gelen immün yanıt ve kazanılmış immün yanıt hücreleri.

### 2.3.1.1 Nötrofil toplanması

Doğuştan gelen tepkinin merkezi bir özelliği, enfeksiyon bölgesinde nötrofillerin toplanması ve aktivasyonu ile patojenlerin yok edilmesidir. Bu süreç yanlış bir şekilde meydana geldiğinde bağ dokusu hastalıklarına, vaskülite ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna yol açar. Yeni anti-inflamatuvar tedavilerin geliştirilmesi için bu sürecin altında yatan mekanizmalara büyük ilgi gösterilmektedir [81]. Enfeksiyonun veya doku hasarının çok erken evrelerinde, aktive olmuş makrofajlardan sitokinler salınır. Bu sitokinlerden ikisi, granülosit ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörleri, kemik iliğindeki miyeloid öncüllerin bölünmesini uyarır, milyonlarca hücrenin dolaşıma salınmasına ve karakteristik bir nötrofil lökositozuna neden olur. Nötrofiller, bağışıklık yanıtına dahil olan çoğu hücre gibi belirli bir bölgede statik değildir, aksine vücutta dolaşan mobil hücrelerdir. Genellikle kan dolaşımında serbestçe dolaşan havuzda bulunurlar veya damar endotelinde yuvarlanan havuz olarak hareket ederler. Nötrofiller, enfeksiyon bölgesine gitmek için proinflamatuvar mediatörler, adezyon molekülleri, kemotaktik faktörler ve kemokinleri içeren çok aşamalı bir süreç kullanır [82, 83]. Başlangıçta bu mekanizma nötrofil sistemine özgü olduğu söylenece

de, artık tüm lökositlerin bu lokalizasyon mekanizmasını kullandığı araştırmalarla açıklanmıştır. Toplanan nötrofiller, sitoplazmik membran çıkıntıları olan psödopodiler oluşturarak partikül etrafında zarla çevrili bir vezikül (fagozom) oluşturur ve bu, nötrofil sitoplazmik granülleri ile birleşerek fagolizozomları oluşturur. Daha sonra oksijene bağımlı yanıt ya da solunum patlaması ile bir NADPH oksidaz tarafından oksijen ardışık olarak indirgenir ve hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve tekil oksijen gibi toksik oksijen metabolitler üretilir. Oksijene bağımlı olmayan yanıtta ise, nötrofil sitoplazmik granüllerinde bulunan son derece toksik katyonik proteinler ve enzimler (örneğin, miyeloperoksidaz ve lizozim) kullanılır. Kapsüllü bazı organizmalar, örneğin pnömokok ve hemofilus, nötrofil fagositozuna duyarlı değildirler, ancak önce antikorla kaplanırlarsa bu durum değişir. Bu durum, antikor eksikliği olan bireylerin, normal nötrofil sayıları ve işlevlerine rağmen, bu tür enfeksiyonlara neden bu kadar duyarlı olduklarını açıklar [84].

### **2.3.1.2 Kompleman sistem**

Kompleman sistemi, doğuştan gelen bağışıklıkta birkaç önemli işleve sahiptir ve bazıları düzenleyici olan en az 20 serum glikoproteininden oluşur. Bu proteinler, amplifikasyon aşamaları ile bir kaskad dizisinde aktive edilir. Bu, tek bir molekülün aktivasyonunun binlerce molekülün üretilmesine yol açacağı anlamına gelir. Kompleman aktivasyonunun üç yolu vardır ve bunlar yabancı bir maddenin varlığı ile tetiklenebilir. Klasik yol antijen-antikor reaksiyonları ile, alternatif yol maya ve gram negatif bakterilerin polisakkaritleri ile aktive edilir. Daha yakın zamanda tanımlanan mannan bağlayıcı lektin yolu ise klasik diziyi C1rs kompleksi bağımsız olarak aktive ederek besler ve virüsler ve mayalar da dahil olmak üzere mikroplar üzerindeki mannoz içeren proteinler ve karbonhidratlar tarafından uyarılır. Üç yolun tümü, merkezi C3 bileşeninin aktivasyonu ile birleşir. Bu, hücre yüzeyinde bir transmembran poru (membran saldırı kompleksi) oluşturan ve osmotik lizis yoluyla ölüme neden olan C5–C9'un toplanmasıyla son ortak yola yol açar. Kompleman aktivasyonu, bir hücrenin veya organizmanın yüzeyine odaklanmıştır; bu, inhibitör proteinlerin sınırlı erişime sahip olduğu korumalı bir bölge oluşturur. Normal konakçı hücreler, C3 konvertazı inhibe eden ve kompleman aktivasyonunun ilerlemesini engelleyen kompleman reseptör tipi 1 faktörü taşır. Ancak mikroplar bu moleküllerden yoksundur ve komplemana duyarlıdır [85].

### **2.3.1.3 Eozonofiller**

Eozinofillerin ana fizyolojik rolü, konağı parazitik (özellikle nematod) enfeksiyonlardan korumaktır. Bu tür enfeksiyonlar, organizmayı kaplayan antikorları üreten antijene özgü IgE üretimini indükler. Eozinofiller, düşük afiniteli reseptörlerini (FcRII) kullanarak antikora bağlanır. Eozinofiller fagositik değildir, ancak organizmaların yüzeyine salındığında son derece sitotoksik olan büyük granüllerinde majör bazik protein, eozinofilik katyonik protein, eozinofil peroksidaz ve eozinofil kaynaklı nörotoksin içerirler. Daha gelişmiş ülkelerde eozinofil, daha sık olarak alerjik reaksiyonlarda patolojik bir katılımcı olarak görülmektedir [86].

### **2.3.1.4 Mast hücreler ve bazofiller**

Bazofiller ve mast hücreleri, diğer beyaz kan hücrelerine kıyasla sayıca nispeten azdır, ancak anjiyoödem ve anafilaksi gibi en şiddetli immünolojik reaksiyonların bazılarında rol oynarlar. İçerdikleri enzimler ve doku yerleşimlerine göre sınıflandırılan en az iki mast hücresi popülasyonu vardır. T mast hücreleri (mukozal mast hücreleri) sadece tripsin içerirken, bağ dokusu mast hücreleri hem tripsin hem de kimotripsin içerir. Bazofiller ise, kanda bulunan morfolojik olarak mast hücrelerine benzer hücrelerdir. Mast hücreleri ve bazofiller, herhangi bir lokal IgE'yi hızla emen IgE FcRI (CD23) için yüksek afiniteli reseptörler taşır. Bu reseptörlerin, antijenin IgE'sine çapraz bağlanması, degranülasyona ve aktif aminler olan histamin ve serotonin gibi önceden oluşmuş mediatörlerin salınmasına yol açar. Ayrıca, vasküler geçirgenliğin artmasına, bronkokonstriksiyona ve inflamatuvar yanıtın oluşmasında görev alan B4, C4, D4 ve E4 lökotrienleri, prostaglandinler ve trombosit aktive edici faktör gibi membran kaynaklı mediatörlerin üretilmesine yol açar [87].

### **2.3.1.5 Doğal öldürücü (NK) hücreler**

Doğal öldürücü (NK) hücreler, lenfosit morfolojisine sahiptir ancak spesifik bir antijen reseptörü taşımazlar. Anormal hücreleri iki şekilde tanırlar. İlk olarak, immünoglobulin reseptörleri (FcR) taşırlar ve antikorla kaplanmış hedeflere bağlanarak antikora bağımlı hücrel sitotoksositeye yol açarlar. İkinci olarak, yüzeylerinde MHC sınıf I için reseptörler bulunur. Bu reseptör, bir hücreyle etkileşim sırasında bağlanmaz ise NK hücreleri hedefi lizise uğratmak üzere programlanmıştır. Bu, doğal öldürücü hücrenin yapıştığı hücrenin yüzeyine perforinler salgılayarak gerçekleştirilir. Perforinler hücre zarında delikler açar ve granzimlerin bu gözeneklerden hücreye enjekte edilmesini sağlar. Granzimler, hedef hücrede apoptozu



indükler. Normal konakçı hücreler MHC sınıf I pozitifdir; bu molekülün doğal öldürücü hücre üzerindeki reseptörüne bağlanması, ölüm yolunu engeller. Tümör hücreleri ve virüsler (özellikle herpesvirus ailesindekiler) sıklıkla sınıf I'in aşağı regülasyonuna neden olur. Bu, patojen için sitotoksik T hücreleri tarafından tanınmanın engellenmesi açısından bir avantaj sağlayabilir, ancak onları doğal öldürücü hücre saldırısına açık bırakır. Bu nedenle, doğal öldürücü hücreler büyük ölçüde ekstraselüler organizmaların, çoğunlukla bakterilerin, yok edilmesiyle sınırlıdır. Bu sistem, özellikle virüsler, mikobakteriler, bazı mantarlar, protozoalar veya diğer fakültatif intraselüler patojenler gibi intraselüler organizmaları tespit edemez. Ayrıca, yanıt oldukça spesifik olmayan ve genellikle zayıf hedeflenmiş olup, ayrım gözetmeksizin doku hasarına yol açabilir [88]. NK hücrelerinin özellikleri ve kanser hücreleriyle olan ilişkileri ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılmıştır.

#### **2.3.1.6 Doğuştan gelen immünite ile patojenlerin ayırt edilmesi**

Antijen spesifik olmamasına rağmen, doğuştan gelen sistem yabancı molekülleri kendinden ayırt edebilir [89]. Fagositler, lektin benzeri aktiviteye sahip desen tanıma reseptörleri taşır. Bu reseptörler, mikrolarda bulunan ancak konakçı hücrelerde bulunmayan patojenle ilişkili moleküler desenler olarak adlandırılan yapıları tanır. Örneğin, gram negatif bakterilerin hücre duvarlarındaki lipopolisakkaritler, gram pozitif bakterilerin lipoteikoik asitleri ve mayaların mannanları bu yapılara örnektir. Desen tanıma reseptör molekülleri, işlevlerine göre üç gruba ayrılır; endositozu indükleyerek antijen sunumunu artıranlar, nükleer faktör transdüksiyonunu ve hücre aktivasyonunu başlatanlar (toll benzeri reseptörler) ve örneğin opsonin olarak işlev gören mannan bağlayıcı lektin gibi salgılananlar. Bu tanıma yolları hakkındaki artan bilgiler, doğuştan gelen yanıt ile spesifik yanıt arasındaki yakın ilişkiyi doğrulamaktadır. Bir desen tanıma reseptörü mikrolardaki geniş desenleri tanır ve ardından işlenmiş ürünü antijen spesifik T hücrelerine sunar. Fagositoz, opsonizasyon ve kompleman aracılı lizis gibi doğuştan gelen yanıtın enfeksiyöz ajanları ortadan kaldırmasına olanak tanıyan etkileşimler, mikropların yüzeyine maruz kalmayı gerektirir. Yanıt, bu nedenle, büyük ölçüde ekstraselüler organizmaların, çoğunlukla bakterilerin, yok edilmesiyle sınırlıdır. Bu sistem, özellikle virüsler, mikobakteriler, bazı mantarlar, protozoalar veya diğer fakültatif intraselüler patojenler gibi intraselüler organizmaları tespit edemez. Ayrıca, yanıt oldukça spesifik olmayan ve genellikle zayıf hedeflenmiş olup, ayrım gözetmeksizin doku hasarına yol açabilir [90].

### 2.3.1.7 Hücresel iletişim

Hücrelerin etkili bir şekilde çalışabilmesi için inflamasyon bölgelerine toplanmaları ve uygun şekilde aktive edilmeleri gerekir. Bu, hücresel reseptörlerin çekirdek ile içsel olarak sinyal verdiği ve reseptörlere bağlanabilen sitokinler gibi dış faktörlerle ve diğer adezyon molekülleriyle etkileşim yoluyla gerçekleştirilir.

#### *Adezyon Molekülleri*

Adezyon molekülleri, hücreler arası etkileşimlerde yer alan yüzeye bağlı moleküllerdir [91]. Ana işlevleri, hücre göçünün yönlendirilmesi, fagositoz ve hücre sel sitotoksisite gibi süreçlerde hücrelerin yakın temasının gerektiği durumları kolaylaştırmaktır. Adezyon molekülleri, sitoplazmik proteinler ve hücre iskeleti bileşenleri ile ilişki kurarak hücre iskeleti yeniden düzenlenmesine neden olur ve hücrelerin yönlendirilmiş hareket yapmalarını sağlar. Adezyon molekülünün bağlanmasından sonra sinyal transdüksiyonu, hücre aktivasyonu, reseptör ifadesinde değişiklik, sitokin üretimi ve hücre hayatta kalmasına etkiler de dahil olmak üzere çeşitli sonuçlar doğurur. Yapı ve işlevlerine göre sınıflandırılmış adezyon molekül aileleri vardır. Başlıca olanlar hücreler arası adezyon molekülleri, integrinler, selektinler ve kalsiyuma bağımlı aderinsler olan kadherinlerdir. Lökositler ve vasküler endotel üzerinde bulunan moleküllere ek olarak, dokuya özgü adezyon molekülleri olan adresinler de vardır. Bunlar, esas olarak lenfositlerin bağırsak, akciğer, deri, periferik lenf düğümleri gibi belirli lenfoid doku gruplarına ve muhtemelen beyin, akciğer ve sinoviyuma yönlendirilmesinde rol oynar [92].

#### *Kemokinler*

Kemokinler, lökosit göçünde önemli bir rol oynayan sitokin ailesinin belirli üyeleridir. Hücrelerin yönlendirilmiş hareketini indüklemek gibi önemli bir kemotaktik işlevleri vardır [93]. Kemokinler, iki sistein (C) kalıntısının diğer amino asitlerle kıyaslandığında pozisyonlarına göre adlandırılır ve CXC (alfa-kemokinler) ve CC (beta-kemokinler) olarak iki ana alt gruba ayrılır [94]. Kemokinler, proinflamatuvar sitokinler veya bakteriyel ürünlerle uyarıldığında çoğu hücre tarafından üretilir ve kemokin reseptörleri tüm lökositlerde bulunur. Kemokinlerin etkileri, kompleman aktivasyon ürünleri gibi diğer kemotaktik maddelere kıyasla daha uzun sürelidir, çünkü hücre yüzeylerinde ve ekstraselüler matrikste bulunan glikozaminoglikanlara bağlanırlar. Lökositlerin toplanmasına neden olan kemokinlere inflamatuvar

kemokinler denir. Ayrıca, dalak ve diğer lenfoid dokularda lökositlerin yerleşimini düzenleyen lenfoid kemokinler de vardır [95].

### *Sitokinler*

Sitokinler, bir hücre tarafından salgılanarak kendisinin veya başka bir hücrenin davranışını değiştiren küçük moleküler ağırlıklı habercilerdir. Sitokinler, spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyaller gönderir. Çoğu çözünür olmasına rağmen, bazıları zar bağlı olabilir ve bu da sitokin ile reseptör arasındaki ayrımı zorlaştırır [96]. Sitokinler neredeyse tüm hücreler tarafından üretilir ve çok çeşitli işlevlere sahiptir. Biyolojik etki, sitokine ve ilgili hücreye bağlıdır, ancak genellikle bu moleküller hücre aktivasyonunu, bölünmeyi, apoptozu veya hareketi etkiler. Otokrin, parakrin veya endokrin haberciler olarak işlev görürler [97]. Lökositler tarafından üretilen ve esas olarak diğer beyaz kan hücreleri üzerinde etkisi olan sitokinlere interlökinler denir. Kemotaktik aktiviteye sahip sitokinlere kemokinler denir. Kök hücrelerin farklılaşmasına ve çoğalmasına neden olan sitokinlere ise koloni uyarıcı faktörler, viral replikasyonu engelleyenlere ise interferonlar denir.

### *İnterferonlar*

İnterferonlar, bağışıklıkta özel bir role sahip büyük bir sitokin sınıfıdır. Tip 1 (alfa ve beta interferonlar) ve tip 2 (gama veya immün interferon) olarak ikiye ayrılırlar. Tip 1 interferonlar güçlü antiviral aktiviteye sahiptir ve enfeksiyona tepki olarak esas olarak fibroblastlar ve monositler tarafından üretilir. Hem alfa hem de beta interferon aynı hücresel reseptöre bağlanır ve viral RNA ve DNA üretimini engelleyen veya bozan moleküllerin hücre içinde üretimini teşvik ederek enfekte olmamış hücreleri korur. Virüsle enfekte olmuş hücrelerin, spesifik sitotoksik T lenfositleri tarafından tanınmasını artıran MHC sınıf I moleküllerinin ifadesini artırır. Tip 1 interferonlar ayrıca antiproliferatif bir işleve sahiptir. İnterferon ailesinin önemli üyesi interferon gamma (ifn- $\gamma$ )'nın birbirinden farklı işlevleri vardır. İfn-  $\gamma$  doğrudan bağışıklık sistemi üzerinde etkili olarak makrofaj ve nötrofil hücre içi öldürmesini aktive eder, doğal öldürücü hücre fonksiyonunu uyarır ve antijen sunan hücrelerde MHC sınıf II ifadesini artırarak antijen sunumunu güçlendirir. Gama interferon sadece bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilir ve tip 1 interferonlardan farklı bir reseptör kullanır. Ayrıca doğuştan nötrofil kusurunun (kronik granüloamatöz hastalık) tedavisinde, interferon veya onun reseptörünün üretiminde kusurları olan hastalarda ve bazı makrofaj bazı

enfeksiyonların (leishmaniasis, atipik mikobakteriyel hastalık) yardımcı tedavisinde kullanılır [98].

### **2.3.2 Kazanılmış bağışıklık**

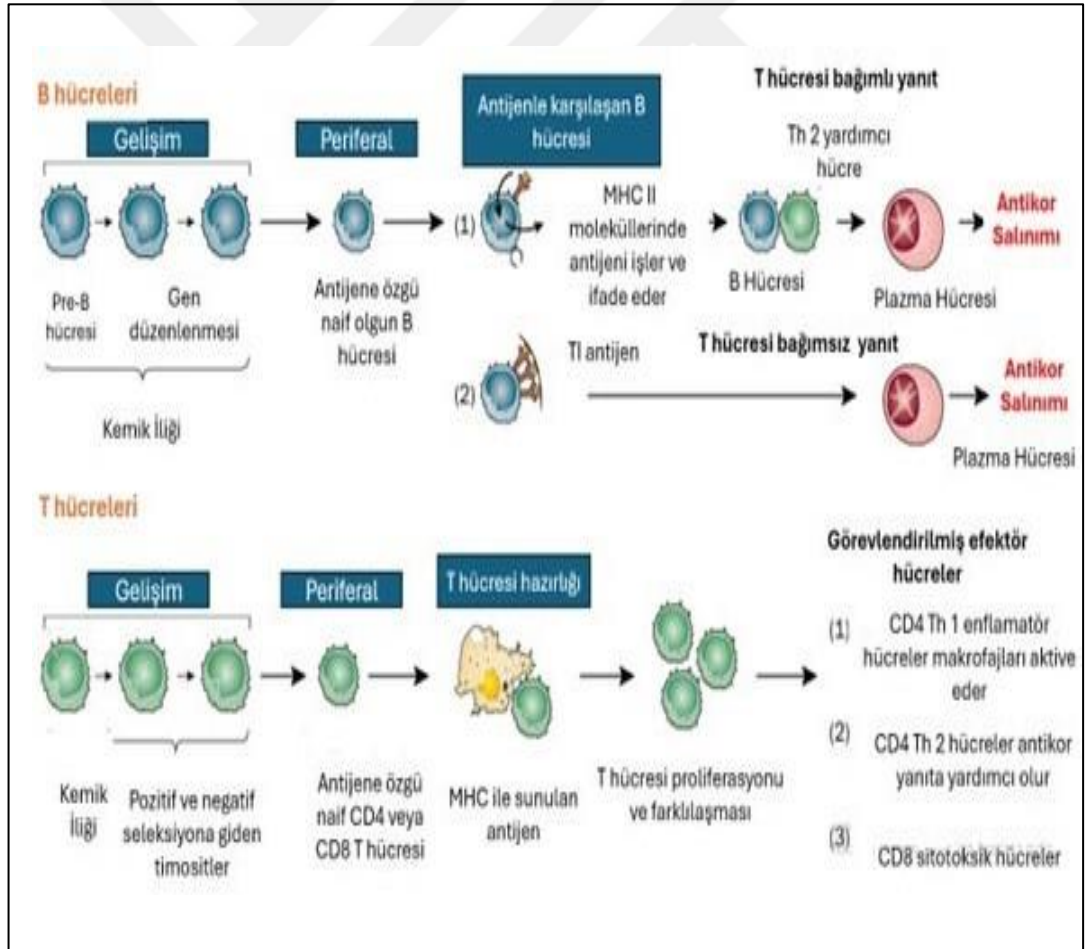
Edinsel bağışıklığın karakteristik özelliği, hedefe yönelik efektör yanıtları yönlendirmek için T ve B hücrelerindeki antijene özgü reseptörlerin iki aşamada kullanılmasıdır. İlk olarak, antijen, antijene özgü T veya B hücresi tarafından sunulur ve tanınır, bu da hücrenin hazırlanmasına, aktivasyonuna ve farklılaşmasına yol açar. Bu genellikle lenfoid dokunun özel ortamında gerçekleşir. İkinci olarak, efektör yanıt, aktive olmuş T hücrelerinin lenfoid dokudan ayrılarak hastalık bölgesine yönelmesi veya aktive olmuş B hücrelerinden (plazma hücreleri) kan ve doku sıvılarına antikor salınması ve böylece enfeksiyon odağına ulaşmasıyla gerçekleşir (Şekil 2.4) [99].

#### **2.3.2.1 T ve B hücrelerinde antijene özgü reseptörlerin oluşumu**

B ve T lenfositleri, kemik iliği içindeki öncü hücrelerden gelişir. B hücreleri gelişimleri boyunca iliğin içinde kalır, ancak T hücreleri erken bir aşamada timusa göç ederek timositler haline gelirler. Her iki hücre tipinde de antijene özgü reseptörlerin üretimi, reseptörlerin antijen bağlayan bölgelerini (komplementer belirleyici bölgeler) kodlayan birden fazla DNA segmentinin rastgele yeniden düzenlenmesi ve birleştirilmesi sürecinin sonucudur. Gen yeniden düzenlenmesi, hücrelerin gelişiminin erken döneminde, antijene maruz kalmadan önce gerçekleşir ve bu, yaşam boyu karşılaşılması muhtemel patojenlerin kapsamını karşılayacak şekilde 108'den fazla T hücre reseptörü ve antikor özgüllüğünden oluşan bir repertuarın üretilmesine yol açar [100, 101].

Gen yeniden düzenleme süreçlerindeki benzerliklere rağmen, T ve B hücre reseptörleri antijeni farklı şekilde tanır. T hücre reseptörü, genellikle sekiz ila dokuz amino asitten oluşan doğrusal peptitleri bağlar. Bu genellikle hücre içi işlemeye parçalanmış antijen anlamına gelir. Antikor, epitopların konformasyonel yapısını tanır ve bu tür antijenler işlemeye ihtiyaç duymaz. T ve B hücrelerinin yeni klonlarının oluşturulması yaşam boyu devam eder, ancak 20'li yaşların ortalarından sonra yavaşlar, bu da bu bireylerin kemik iliği naklinden sonra veya HIV ile ilişkili immün yetmezlikte etkili antiretroviral tedavinin başlatılmasından sonra bağışıklık sistemlerini yeniden yapılandırmalarının daha yavaş olmasına neden olur [102].

Timus ve kemik iliğinden gen yeniden düzenlenmesi geçirmiş olarak çıkan hücreler naiftir, yani henüz bir bağışıklık yanıtı içinde spesifik antijenleriyle karşılaşmamışlardır. Bu hücreler, lenf düğümleri, dalak, bademcikler ve mukozaya bağlı lenfoid doku gibi ikincil lenfoid dokuları doldururlar. Yabancı bir partikülle spesifik olarak reaksiyona girebilen sadece birkaç naif T ve B hücresi olduğundan, bu hücrelerin spesifik antijenleriyle karşılaşabilmesi için onları bir araya getirecek bir sisteme ihtiyaç vardır. Lenfoid dokular, bu sürecin gerçekleşmesi için mikro çevre sağlar. T ve B lenfositlerine ek olarak, bu dokular etkin antijen sunan hücreler içerir ve T ve B lenfositlerini sürdürmek için gerekli sitokinleri üretebilirler. Lenfoid dokular, hücrelerin doku içinde hareket etmesine ve lenfositlerin antijenle temas etme şansının artmasına olanak tanıyan düzenli bir dizi halinde adezyon molekülleri ifade ederler. Lenfoid organlar, lenfatikler ve kan damarları aracılığıyla dokularla iletişim kurar [103].



Şekil 2.4 : T ve B lenfositlerin spesifik immünitedeki roller [104].

### 2.3.2.2 T lenfositler

Reseptör yeniden düzenlemesi gerçekleştikten sonra, T ve B hücreleri antijenlerine yanıt verebilir ve bir bağışıklık tepkisi başlatabilirler. Ancak, hücre aktivasyonu sıkı ve seçici bir şekilde düzenlenmiştir, böylece sadece zararlı antijenler tepkiyi tetikler. Bu düzenleme özellikle T lenfosit aktivasyonunun başlatılmasını içerir. Bu, antijenin, T hücresine kendi MHC molekülünün peptit bağlanma oyuğunda sunulmasını gerektirir. Bunun nedeni, T-hücre reseptörünün sadece antijenik epitopu tanımakla kalmayıp, peptitin kendi MHC molekülü ile ilişkili kompleksini de tanınmasıdır. T hücrelerinin kendi MHC ve peptit ile yeterince reaksiyona girerek bağışıklık tepkilerini indükleyebilen, ancak kendi doku yıkımına neden olabilecek derecede aşırı MHC-reaktif olmayan hücrelerin olumlu seçilimi süreci, timusta gerçekleşir. Naif T hücrelerini, lenf düğümlerinin yüksek endotelial venüllerindeki adezyon moleküllerine bağlanan reseptörler (periferik düğüm adresinleri) taşır, düğümlere girerler ve birçok antijen sunan hücreye geçici olarak bağlanarak geçerler. T lenfositlerinin yaklaşık %95'i lenfoid doku içinde tutulur, ancak statik değildirler; kan veya lenf yoluyla bir lenfoid dokudan diğerine sürekli olarak hareket ederler ve tüm vücutta 1-2 gün içinde dolaşırlar. Lenfositlerin trafiği oldukça yoğundur; lenfoid dokunun efferent lenfindeki hücre çıkışı  $3,0 \times 10^7$  hücre/g'dır. Bu nedenle, kısa bir süre içinde bir T hücresinin antijeniyle karşılaşması beklenir. T hücresi, antijenini taşıyan bir antijen sunan hücre ile karşılaştığında, aktivasyon sonraki 2-3 gün içinde gerçekleşir [104].

Antijenin MHC'ye yüklenmesinin iki yolu vardır. Antijen hücre içinde endojen olarak üretilmiş olabilir (örneğin viral veya tümör proteinleri gibi) ve hücre içi işleme yolları aracılığıyla MHC sınıf I ile kompleks oluşturur (Şekil 2.5). Alternatif olarak, uzmanlaşmış antijen sunan hücreler, endositoz yoluyla ekzojen antijeni almış olabilir. Antijen sunan hücreler arasında dendritik hücreler (lenf düğümlerinin interdigitate dendritik hücreleri, kanda örtülü hücreler ve derideki Langerhans hücreleri), B hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ekzojen antijen, endojen antijenden farklı bir yol üzerinden işlenir ve MHC sınıf II molekülleri ile yeniden ifade edilir. MHC sınıf II, normal koşullarda yalnızca bu uzmanlaşmış hücreler üzerinde ifade edilir (Şekil 2.5) [105].

T hücre reseptörü tarafından antijenin tanınması, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücreleri için farklılık gösterir. CD4 lenfositleri yalnızca MHC sınıf II ile sunulan antijeni tanırken,

CD8 hücreleri MHC sınıf I ile sunulan antijeni tanır. CD4+ ve CD8+ hücrelerinin çok farklı işlevleri olduğundan, bir antijeni sunmak için kullanılan MHC molekülü, oluşturulan efektör yanıtın türünü belirleyecektir. MHC sınıf I molekülleriyle komplekslenen endojen antijenler, CD8+ sitotoksik T hücrelerini aktive eder. Tüm çekirdekli hücreler MHC sınıf I'i ifade ettiğinden, bu, virüs veya diğer hücre içi patojenlerle enfekte olmuş veya anormal tümör antijenleri üreten herhangi bir hücrenin bu antijenleri sınıf I ile sunabileceği ve sitotoksik saldırı ile ortadan kaldırılabileceği anlamına gelir. Bu CD8 yanıtları tanıdıkları hücreye yüksek oranda hedeflenirken, CD4 aktivasyonu, çevresindeki geniş bir hücre yelpazesini aktive eden sitokinlerin üretilmesine yol açar [106].

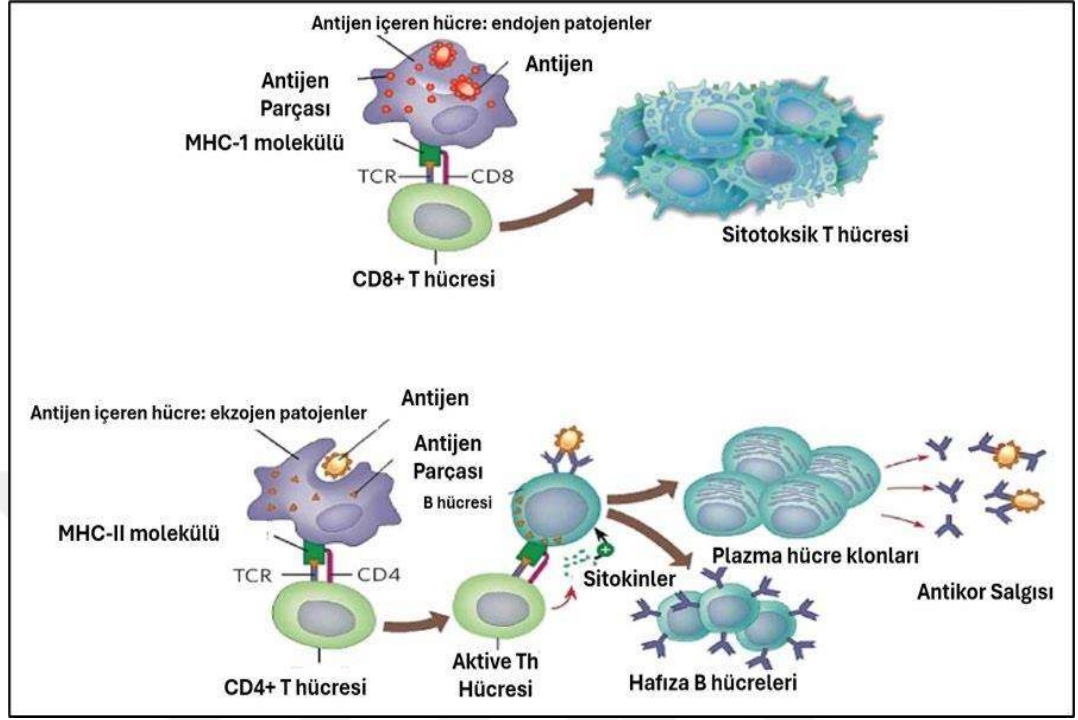
#### *Efektör T Hücreleri*

İki ana efektör T hücresi türü tanımlanmıştır: T yardımcı (Th) ve T sitotoksik (Tc) hücreleri, sırasıyla yüzeylerinde CD4 veya CD8 molekülleri taşır. CD4+ Th hücreleri, yabancı antijeni tanıyan ve patojeni ortadan kaldırmak için hücre aracılı bağışıklık yanıtının diğer bölümlerini aktive eden bağışıklık yanıtının düzenleyici hücreleridir. Ayrıca B hücrelerinin aktivasyonunda da önemli bir rol oynarlar. CD8+ sitotoksik hücreler, antiviral ve muhtemelen antitümör aktivitede yer alır. Her iki tip hücre de hücre içi patojenlerin kontrolünde büyük rol oynar [107].

#### *T Yardımcı (CD4+) Hücreleri*

Th hücreleri, ürettikleri sitokin desenine göre işlevsel olarak alt gruplara ayrılır. Uyarıldıklarında, öncül Th0 lenfositleri ya Th1 ya da Th2 hücrelerine dönüşür. Bu hücreler arasındaki fark yalnızca salgıladıkları sitokinlerde olup, morfolojik olarak ayırt edilemezler. Ancak, ürettikleri yanıt çok farklıdır. Th1 hücreleri, T hücre proliferasyonunu (otokrin bir yanıtla CD4+ hücrelerinkini de içeren) indükleyen interlekin 2 (IL-2) üretir. IL-2, CD8+ T hücre bölünmesini ve sitotoksitesini, aktivasyon eşiklerini düşürerek uyarır. Th1 hücreleri tarafından üretilen diğer ana sitokin, makrofajları mikobakteriler, mantarlar ve protozoalar gibi hücre içi patojenleri öldürmek üzere aktive eden ve doğal öldürücü hücrelerde sitotoksitesiyi indükleyen ifn- $\gamma$ 'dır. İnterferon reseptörüne sahip olmayan hastaların ciddi mikobakteriyel enfeksiyonlar geçirmesi, bu sitokinin önemini göstermektedir. Bu nedenle Th1 sitokinleri, esas olarak hücre aracılı inflamatuvar bir yanıtı indükler. İnterferon gama,

diğer Th0 hücrelerini Th1 hücrelerine dönüşmeye teşvik ederken Th2 farklılaşmasını engellediği için pozitif bir geri besleme döngüsü vardır [108].



**Şekil 2.5 :** Endojen ve eksojen patojenler tarafından T hücrelerinin aktivasyonu [109].

#### 2.4 Bağışıklık Sistemi ve Kanser Arasındaki İlişki

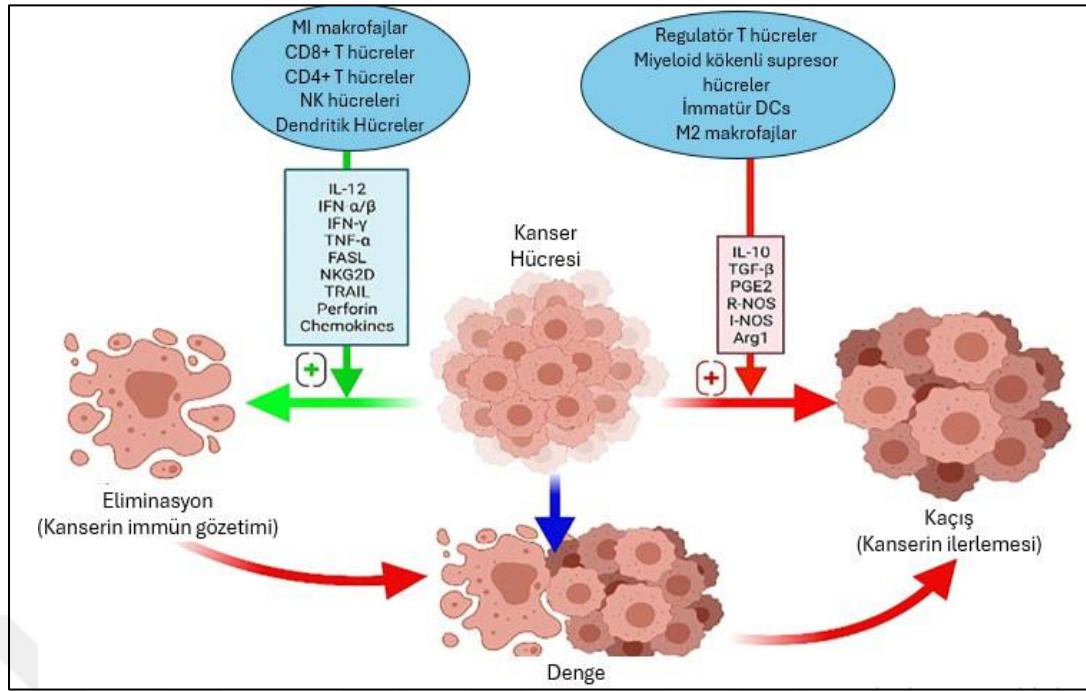
1909 yılında Ehrlich [110], bağışıklık sisteminin kanser gelişimini düzenlediğini ve konakçıyı neoplastik hastalıklardan koruduğunu öne sürdü ve bu, Burnet ve Thomas tarafından kanser immün gözetim hipotezi olarak resmen tanıtıldı [111]. Ancak, bu kavramı destekleyen güçlü deneysel kanıtların olmaması nedeniyle bu hipotez kısa süre sonra terk edildi. Daha yakın zamanda, yeni araştırma araçlarının, teknolojilerin ve iyi tanımlanmış fare kanser modellerinde belirli gen işlevlerini değiştiren yaklaşımların birlikte kullanılması, kanser ile bağışıklık sistemi arasındaki ilişkinin önemini göstermiştir [112]. Hayvan modellerinden elde edilen doğrudan deneysel veriler, insanlardan elde edilen korelatif verilerle birlikte, işlevsel bir kanser immün gözetim sürecinin gerçekten var olduğunu ve dışsal bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiğini göstermektedir. İşlevsel bir kanser immün gözetim sürecinin varlığını destekleyen güçlü kanıtlara rağmen, immünokompetan bireyler yine de kanser geliştirebilirler [113]. Bu ikilem, bağışıklık sisteminin sadece konakçıyı tümör gelişimine karşı korumakla kalmayıp, aynı zamanda immünojenisitesi azaltılmış



tümörleri seçerek tümör büyümesini teşvik etme kapasitesine de sahip olduğunu göstererek daha da netleşmiştir. Kansere immün düzenleme; kansere immün düzenlemenin üç E'si ('elimination', 'equilibrium', 'escape') olarak topluca adlandırılan eliminasyon, denge ve kaçış olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur (Şekil 2.6) [114].

Kansere immün düzenlemesinin eliminasyon aşaması, bağışıklık sisteminin, içsel tümör baskılayıcı mekanizmaların başarısız olması sonucunda gelişen tümör hücrelerini tespit edip ortadan kaldırdığı, kansere immün gözetim kavramını temsil eder [115]. Eliminasyon aşaması, tüm tümör hücreleri başarıyla yok edildiğinde tamamlanmış olarak kabul edilir veya sadece bazı tümör hücreleri ortadan kaldırıldığında eksik olarak kabul edilir. Kısmi tümör eliminasyonu durumunda, immün düzenleme teorisi, bağışıklık sistemi ile gelişen tümör arasında geçici bir dinamik denge durumunun gelişebileceğini öne sürer. Denge aşamasında, konakçının bağışıklık sistemi ve eliminasyon aşamasından sağ kurtulan herhangi bir tümör hücresi varyantı, dinamik bir denge durumuna girer. Bu durumda, bağışıklık hücreleri ve onların sitokinleri, tümör hücreleri üzerinde, birçok genetik olarak kararsız ve mutasyona uğramış tümör hücresini içeren bir tümör yatağını sınırlamak için yeterli olan, ancak tamamen ortadan kaldıramayan güçlü ve amansız bir seçim baskısı uygular. Orijinal tümör hücresi varyantlarının çoğu yok edilse de, farklı mutasyonlar taşıyan yeni varyantlar ortaya çıkabilir ve bu varyantlar, bağışıklık saldırısına karşı artan direnç sağlayabilir [116]. Eliminasyon aşamasından sağ kurtulan kanser hücrelerinin heterojenliği ve genetik kararsızlığı, tümör hücrelerinin konakçının bağışıklık saldırısına nihayetinde direnmesine olanak sağlar.

Kaçış aşamasında, bağışıklık sistemi artık tümör büyümesini sınırlayamaz ve sonuçta sürekli büyüyen bir tümör oluşur. Kansere hücrelerinin bağışıklık sisteminin koruyucu ağından kaçma yeteneği, genellikle kanserin yedinci ayırt edici özelliği olarak kabul edilir [117].



**Şekil 2.6 :** Kanserinin immün-düzenlenme fazları [116].

Sonuç olarak son yıllarda, çok sayıda deneysel *in-vitro* ve *in-vivo* çalışma, bağışıklık sisteminin kanserdeki rolünün anlaşılmasını ilerletmiştir. Bazı bağışıklık hücreleri (CD8+ CTL, TH1, NK hücreleri) ve bunlara özgü sitokin IFN-γ, kanser ilerlemesini engellerken, TH2, MDSC gibi diğer bağışıklık hücreleri ve bunlardan türetilen sitokinler tümör ilerlemesini teşvik ediyor gibi görünmektedir. Benzer şekilde, CD8+ CTL, TH1 ve NK hücreleri ile yüksek derecede infiltre olmuş tümörler, olumlu prognostik öneme sahip gibi görünürken, TH2, MDSC, M2 makrofajlar, Treg ve TH17 hücrelerinin infiltre olduğu tümörler, çoğu kanserde olumsuz prognostik öneme sahiptir. Ancak, bu bağışıklık hücre tiplerinin her zaman tümör karşıtı veya her zaman tümör yanlısı olduğu net bir ayrım yapmak ve kesin sınıflamalar oluşturmak zordur; çünkü bu hücrelerin doğası, tümör mikroçevresi tarafından belirlenir ve bazı bağışıklık hücreleri, heterojenlikleri ve esneklikleri nedeniyle kanserde paradoksal roller de oynar. Bu hücrelerin tümör yanlısı ve tümör karşıtı özellikleri, farklılaşma şekillerine göre değişir ve bu da tümör mikroçevresindeki sitokin sinyaline bağlıdır. Dolayısıyla, bu hücrelerin etkilerini, mikroçevredeki diğer sitokinler ve bağışıklık hücreleri ile ilişkili olarak daha derinlemesine anlamak, kanser için etkili bir immüno-terapötik yaklaşım keşfetmek için önemlidir [118]. Bu bağlamda, ileriki bölümlerde yapılan tezin içeriği kapsamında T hücrelerinin, NK hücrelerinin ve makrofaj hücrelerinin tümör karşıtı özellikleri detaylı olarak anlatılacak, immün kontrol noktası proteinlerinin özellikleri ve anti-kanser tedavideki rolü üstünde durulacak ve doğal

bileşenlerle bu hücrelerin ve bu proteinlerin anti-tümoral özelliklerinin modüle edilmesi detaylandırılacaktır.

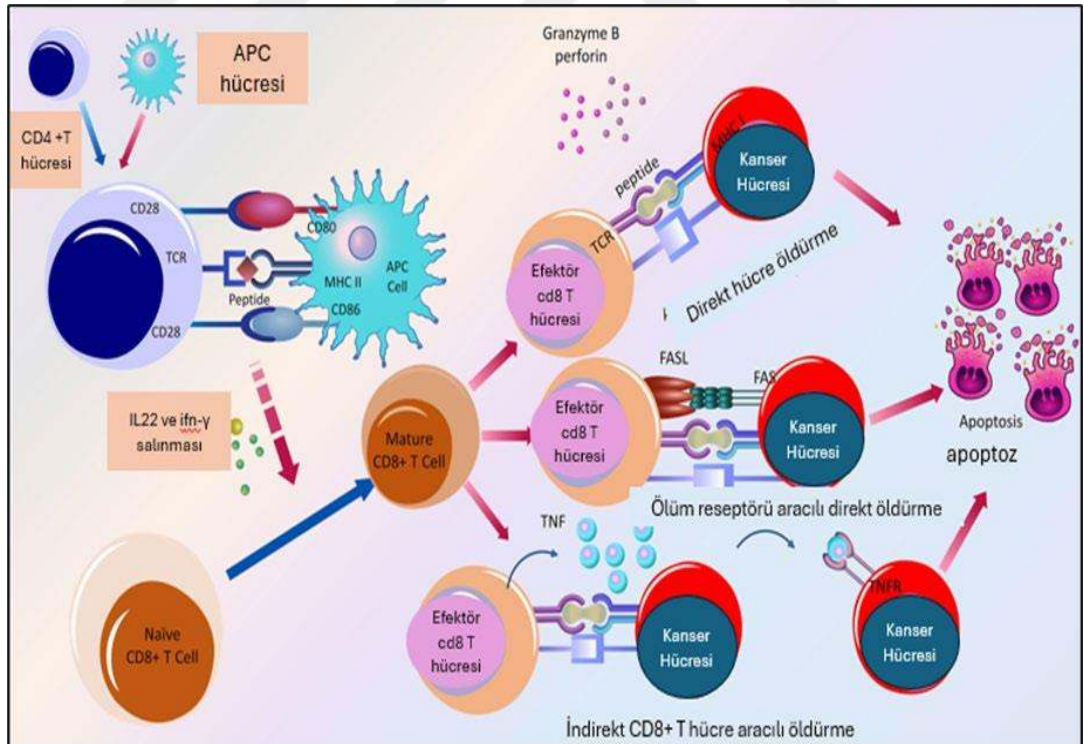
#### **2.4.1 Kanserde T hücrelerinin rolü**

T hücrelerini aktivasyonu ve endojen ve ekzojen patojenlere karşı geliştirdiği hücresel immün yanıtta rolleri 2.3.2.2' de detaylı olarak anlatılmıştır. Buna ek olarak; otuz yıllık araştırmalar, CD4+ T hücrelerinin insan tümör reddinde önemli katılımcılar olduğunu göstermiştir. Bu hücreler, sitotoksik CD8+ T hücrelerini hazırlayarak CD8+-aracılı tümör eliminasyonunu destekleyebilirler. Ayrıca, CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesi doğrudan tümör hücresi eliminasyonuna katılabilir [119]. CD8+ T hücreleri, CD4+ T hücrelerinin inaktivasyonunda etkili moleküller olarak hareket eden farklılaşmış sitotoksik lenfositlerdir. Bununla birlikte, efektör-hafıza fonksiyonu sergilemezler, tümör hücreleriyle savaşmada azalmış etkinliğe sahip olabilirler ve tümör reddinde daha fazla yorgunluğa eğilimlidirler. Bu durum, CD4+ T hücrelerinin CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını indüklediğini, etkinliklerini ve efektör hafıza CD8+ T hücrelerine dönüşme yeteneklerini koruduğunu göstermektedir [120].

CD4+ T hücreleri MHC sınıf II molekülleriyle karşılaştığında, IFN- $\gamma$  salınır ve konakçı hücreleri tümör hücrelerini ortadan kaldırmaya teşvik eder. IFN- $\gamma$ , Mig ve interferon-gama indüklenabilir protein 10 kDa (IP-10) olmak üzere iki CXC kemokin salgılanmasını teşvik eder. Bu kemokinler, tümör vaskülatürünü yok ederek anti-anjiyojenik eylemler sergiler, büyüme inhibisyonuna ve tümör nekrozuna yol açar. Ek olarak, IFN- $\gamma$  makrofajları TNF ve nitrik oksit salgılamaya aktive eder [121].

CD8, bir transmembran glikoprotein olup, CTL'ler eksprese edilir. Bu hücreler, antikanser bağışıklıkta hayati bir rol oynar ve etkili kanser immünoterapisinin temelini oluşturur [122]. CAR (Chimeric Antigen Receptor), genetik olarak yeniden yapılandırılmış bir reseptör türüdür ve CD8+ T hücreleri ile birlikte adoptif hücre transferi (ACT) sırasında kullanılır. Bu prosedürler, birçok kanser türüne karşı immünoterapide önemli bir etki yaratmıştır. Şu anda, CAR-T hücrelerinin yanı sıra immün kontrol noktaları ve yolları da klinik deneylerde değerlendirilmektedir.

CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositleri, antijen sunan hücreler (APC'ler) veya diğer hedef hücreler tarafından sunulan antijenik peptitlere yüzeysel olarak bağlanır ve MHC-1 molekülleri ile etkileşime geçerek hedef antijenleri veya hücreleri yok ederler. Ayrıca, CD8<sup>+</sup> T hücreleri, mekanik kuvvet yardımıyla porlar oluşturarak tümör hücreleriyle etkileşime geçer ve apoptoz başlatır. Bu hücreler, granzim, katepsin C ve perforin içeren ölüm indükleyici granülleri birleştirir. Perforin ve granülisin endositozu yoluyla da hedef veya tümör hücrelerinde porlar oluşturulabilir. Ayrıca, CD8<sup>+</sup> T hücreleri, Fas ligandı ekspres eder ve bu ligand, hedef hücrelerdeki Fas reseptörüne bağlanarak kaspazları ve endonükleazları tetikler. Bu durum, hedef hücre DNA'sının segmentasyonuna yol açar ve Fas ile ilişkili ölüm alanlarını aktive eder [123]. Kontrollü antikorlar, bağışıklık-onkolojiye immün kontrol noktası inhibisyonu yoluyla bağlanır ve çeşitli kanserlerin klinik sonuçlarını iyileştirir. Bu yaklaşım, bağışıklık tepkisinin tümörlere karşı etkinliğini artırır ve zayıflamış CD8<sup>+</sup> T hücrelerini yeniden canlandırır [124]. Bu strateji, onkolojide devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Şekil 2.7' de CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin anti-kanser yanıtındaki rolleri ve nasıl aktive edildikleri özetlenmiştir.



Şekil 2.7 : CD8<sup>+</sup> hücrelerinin kanser hücresi öldürme mekanizmaları [125].

#### 2.4.1.1 Jurkat T hücreleri

1980'lerin ortalarına gelindiğinde, T-hücre biyologları, nispeten yeni bir alan olan sinyal transdüksiyonunun, antijenik uyarılarla T-hücre aktivasyonuna dair

alışmalarına doğrudan uygulanabilir olduğunu fark ettiler. Yirmi yıllık yoğun incelemeinin ardından, T-hücre reseptörü (TCR) sinyalleşmesindeki ana bileşenlerin çoğu tanımlanmış ve en azından kısmen karakterize edilmiştir. TCR sinyalleşme araştırmalarının ilk günlerinde, immünologlar, TCR uyarımına biyolojik olarak anlamlı yanıtlar verebilen çeşitli fare ve insan T-hücre hatlarını kullanma imkanına sahiptiler. Bu grubun önde gelen üyeleri arasında insan (örneğin, HPB-ALL, HuT-78) ve fare (EL4, LBRM-33) kaynaklı transformasyon geirmış T-hücre hatları bulunmaktaydı. Bu hücre hatlarının her birinin kullanımından büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, tartışmasız bu grubun en bilinen ve tarihsel olarak en önemli olanı, insan lösemik T-hücre hattı olan Jurkat T hücresidir [126].

İnsan T hücrelerini kültürde tutmak için insan T hücre büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu soruna olası bir çözüm, Steven Gillis ve James Watson tarafından sağlanmıştır. Onlar, spontan veya indüklenabilir olarak büyük miktarlarda interlekin-2 (IL-2) salgılayan transformasyona uğramış insan T-hücre hatlarını taramış ve Fred Hutchinson Kanser Araştırma Merkezi'nden John Hansen'in elde ettiği birkaç lösemik hücre hatlarından biri olan Jurkat hücrelerinin, fitohemaglutinin (PHA) ile uyarımdan sonra özellikle güçlü IL-2 üreticileri olduğunu bulmuşlardır [127]. Bu hücre hattını bu enfeksiyondan arındırma süreci sonunda birçok T hücre immünoloğu tarafından kullanılan standart Jurkat hücre hattı haline gelen Jurkat E6-1 klonunu ortaya çıkardı.

Jurkat T hücreleri, yuvarlak şekilli ve süspansiyon kültüründe büyüyen hücrelerdir. Hızlı bölünme özelliğine sahiptirler ve kültürde genellikle kümeler oluştururlar. Hücrelerin morfolojisi, ışık mikroskobunda kolayca gözlemlenebilir. Jurkat hücreleri, TCR aracılı sinyalleşme yollarının moleküler mekanizmalarını incelemek için model sistem olarak kullanılır. Bu alışmalar, T hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve farklılaşması hakkında önemli bilgiler sağlar. Ayrıca, IL-2 üretimini incelemek için kullanılan bu hücreler sayesinde immünolojik yanıtların ve T hücre büyüme faktörlerinin işlevleri anlaşılabilir. Bu hücre hattı, NF-κB, AP-1 ve NFAT gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve fonksiyonlarını incelemek için de kullanılır. Sonuç olarak, hızlı büyüme ve kolay kültüre edilme koşulları, güçlü ve sürekli IL-2 üretimi, TCR/CD3 sinyalleşme yollarının detaylı incelenmesine olanak tanınması ve genetik manipölasyonlara uygunluk açısından incelendiğinde Jurkat

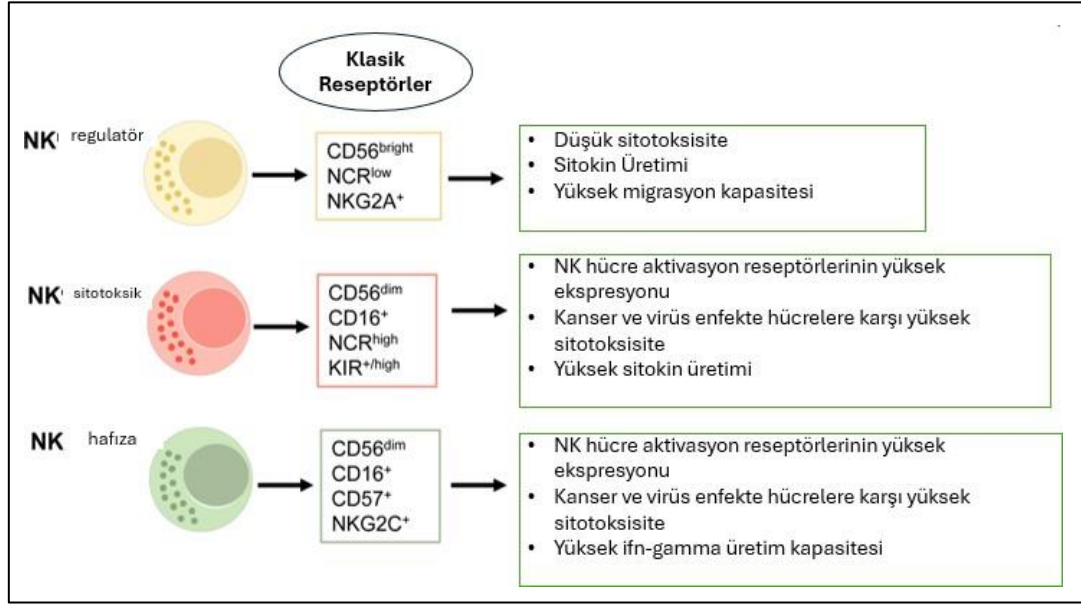
hücreleri çeşitli genetik ve biyokimyasal deneylerde geniş kullanım imkanı sağlamaktadır [128].

## **2.5 Doğal Öldürücü (NK) Hücreler**

### **2.5.1 NK hücrelerinin gelişimi, sınıflandırılması ve dağılımı**

NK hücreleri, T ve B lenfositlerinden daha büyük, sitoplazmik granüller içeren özel lenfosit alt popülasyonlarıdır [129]. 1975 yılında Herberman ve arkadaşları ile Kiessling ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve keşfedilmişlerdir [130]. NK hücreleri, CD34+ hematopoietik progenitör hücrelerden sürekli bir süreçle ortaya çıkar ve bu süreçte ortak lenfosit progenitörleri CD34'ü aşağı regüle ederken CD56'yı yukarı regüle eder. Bu olaylar, NK hücrelerinin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını teşvik eder [131].

NK hücreleri birçok yüzey belirteci ifade ettiğinden, farklı NK hücre alt gruplarını sınıflandırmak için farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. CD56 ifadesine dayanarak, CD56 düşük/soluk ve CD56 parlak olmak üzere iki hücre alt grubuna ayrılırlar. Özellikle, CD56 düşük/soluk NK hücreleri anti-tümör sitotoksiktir, ancak her iki alt grup da sitokin salgılayabilir [132]. NKp46 ve NKp80 aktive edici yüzey reseptörleri her iki NK hücre alt grubunda da ifade edilir [133, 134]. CD56 parlak NK hücreleri, CD16 ve PEN5 ifade ederek CD56 soluk NK hücrelerine özelleşir. Benzer şekilde, farelerde CD11b, CD226 (DNAM-1), CD27 ve KLRG1 ifadelerine dayalı olarak kategorize edilen farklı alt gruplar çalışılmıştır. NK hücreleri, kemik iliği, karaciğer, akciğerler, lenf düğümleri, dalak, karaciğer ve periferik kan dahil olmak üzere lenfoid ve lenfoid olmayan dokular boyunca geniş çapta dağılmıştır. Çalışmalar ayrıca farelerin uterus, bağırsaklar, deri, yağ dokusu, mesane, timus, bademcikler, böbrekler, pankreas ve beyin gibi çeşitli diğer organlarında da NK hücreleri bulmuştur. Genel olarak, CD56 düşük/soluk alt grubu insan kanında baskındır, oysa CD56 parlak alt grubu lenf düğümlerinde daha baskındır [135]. Genel olarak; NK hücreleri klasik reseptörleri ekspresyon etmeleri ve bu reseptörlerin ekspresyon düzeylerine göre, (örneğin, adezyon molekülleri-CD56 ve CD57, aktive edici reseptörler-CD16, NCR, KIR ve NKG2C, inhibitör reseptörler-NKG2A) düzenleyici ve sitotoksik fenotipler ile bellek NK hücreleri olarak alt gruplara ayrılır ve bu alt gruplar fonksiyonel olarak farklılık gösterirler (Şekil 2.8) [136, 137].



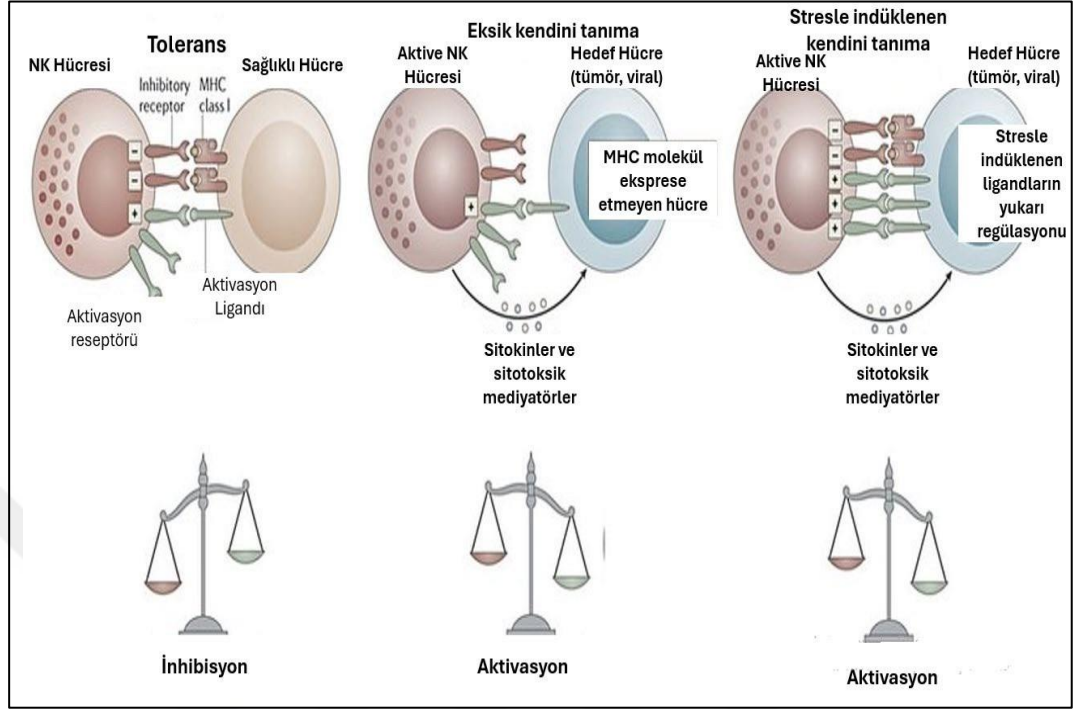
**Şekil 2.8 : NK hücre alt sınıfları ve fonksiyonları [138].**

### 2.5.2 NK Hücrelerinin aktivasyonu ve inhibisyonu

NK hücreleri tarafından birçok baskılayıcı ve aktive edici sinyal molekülü salgılanır. Durağan durumda, baskılayıcı reseptörler NK hücrelerinin aktivasyonunu ve ardından gelen öldürücü etkilerini engeller. NK hücreleri, hedef hücreleri MHC bağımlı olmayan bir şekilde tanır ve ardından hedef hücrelerde ifade edilen MHC-I molekülünü tanır [137]. Bu tanıma, NK hücrelerinin uyarılmasını bastırır ve vücudu saldırmaktan korur. Stres altında, hedef hücreler MHC-I ifadesini azaltır. Sonuç olarak, NK hücreleri baskılayıcı sinyalleri kaybeder ve “eksik kendini tanıma” süreciyle aktive olur. Yapılan çalışmalarla elde edilen kanıtlar, NK hücrelerinin patojen kodlu moleküllerin veya kendiliğinden ifade edilen proteinlerin potansiyel tanınması ile aktive edici reseptörler ifade ettiğini öne sürmektedir. Normal koşullar altında, patojen kodlu biyomoleküller konakçı tarafından salgılanmaz ve bu tür bir tanıma “kendiliğinden tanıma” olarak adlandırılır. Ayrıca, hastalık bulaşmış veya dönüşmüş hücrelerin kendiliğinden üretilen proteinleri yukarı regüle ettiği bulunmuştur. Bu fenomen “stresle tetiklenen kendini tanıma” olarak adlandırılmıştır. Uyarıcı reseptörler arasında sitotoksosite reseptörleri NKp44, NKp46 ve NKp30; C-tipi lektin reseptörleri NKG2E/H, CD94/NKG2C, NKG2F ve NKG2D; ve KIR'ler KIR-3DS ve KIR-2DS yer alırken, baskılayıcı reseptörler arasında CD94/NKG2A/B ve KIR'ler KIR-2DL ve KIR-3DL bulunur. Sonuç olarak, NK hücreleri, hedef hücrelerin doğasına bağlı olarak çok sayıda uyarıcı ve baskılayıcı sinyalin



tanımlanması yoluyla hedeflerini tanır [139]. NK hücrelerinin aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları Şekil 2.9’ da özetlenmiştir.



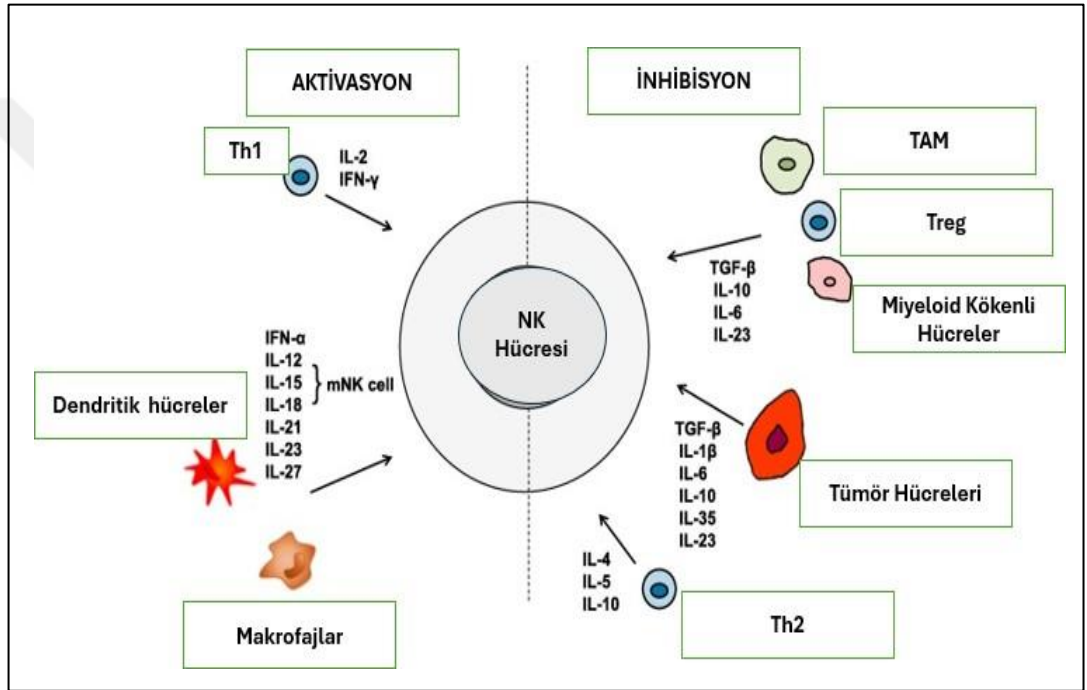
Şekil 2.9 : NK hücrelerinin inhibisyon ve aktivasyonu [140].

### 2.5.3 NK hücrelerini artıran düzenleyici sitokinler

NK hücreleri üzerindeki devam eden araştırmalar, viral enfeksiyonların erken düzenlenmesinde, HSC transplantasyonunda (HSCT; iyileştirilmiş greftleme, greft karşı tümör etkisi ve greft karşı konak hastalığı) ve kanser immün gözetiminde oynadıkları kritik roller hakkında artan kanıtlar sunmaktadır. Çeşitli düzenleyici sitokinler, NK hücrelerinin tümör hedefleri olarak işlevlerini indükler. Birçok sitokin (IL-2, IL-21, IL-12, IL-18 ve IL-15) ve tip I interferonlar, NK hücrelerinin *in vitro* çoğaltılması ve adaptif transfer öncesi indüklenmesi için kullanılabilir [141]. Özellikle, bireysel aktive edici reseptörler, naif NK hücrelerinde sitokin salgılanmasını veya sitotoksisiteyi tetikler. Sitokinlere maruz kalmak, NK hücrelerinin ön aktivasyonunda önemli bir rol oynar. IL-12, NK hücrelerinin aktive edici reseptörlerinden gelen sinyali artırır. IL-12, IL-15 ve IL-18 ile birleştiğinde, ekzojen IL-2 ile aşılanmış immün yetmezliği olan farelerde büyüyen hafıza benzeri bir NK hücre popülasyonunu indükler [142]. IL-15 sitokini, NK hücrelerinde IL-15 sinyal mekanizmalarını oluşturma konusundaki ilerlemelerle IL-2 ile birlikte en güçlü etki gösteren sitokindir. Metastatik kanserleri olan bireyleri içeren bir faz I klinik çalışmada, günlük IL-15 uygulamasının NK hücrelerinin çoğalmasını indüklediği ve



NK hücre sayılarını önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada, IL-15 ile tetiklenen NK hücrelerinin, dirençli katı tümörleri olan altı adet pediatrik bireyin dördünde klinik bir reaksiyonu indüklediği bulunmuştur [143]. Tip I ifn da, NK hücrelerini aktive etme potansiyeline sahip proinflamatuvar bir sitokindir ve hücreleri aktive edici reseptörler tarafından aktivasyona hazırlar. Bu bağlamda, düzenleyici sitokinler, NK hücrelerini tümörleri öldürmek için harekete geçirmede vazgeçilmez roller oynar. NK hücrelerini aktive eden birçok sitokin, şu anda klinik veya preklinal gelişim aşamasındadır [144]. NK hücre aktivasyonunu düzenleyici sitokinler Şekil 2.10’da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 : NK hücrelerinin aktivitelerini düzenleyen sitokinler [145]

#### 2.5.4 NK hücre aracılı anti-tümör mekanizmaları

##### *Doğrudan kanser öldürme*

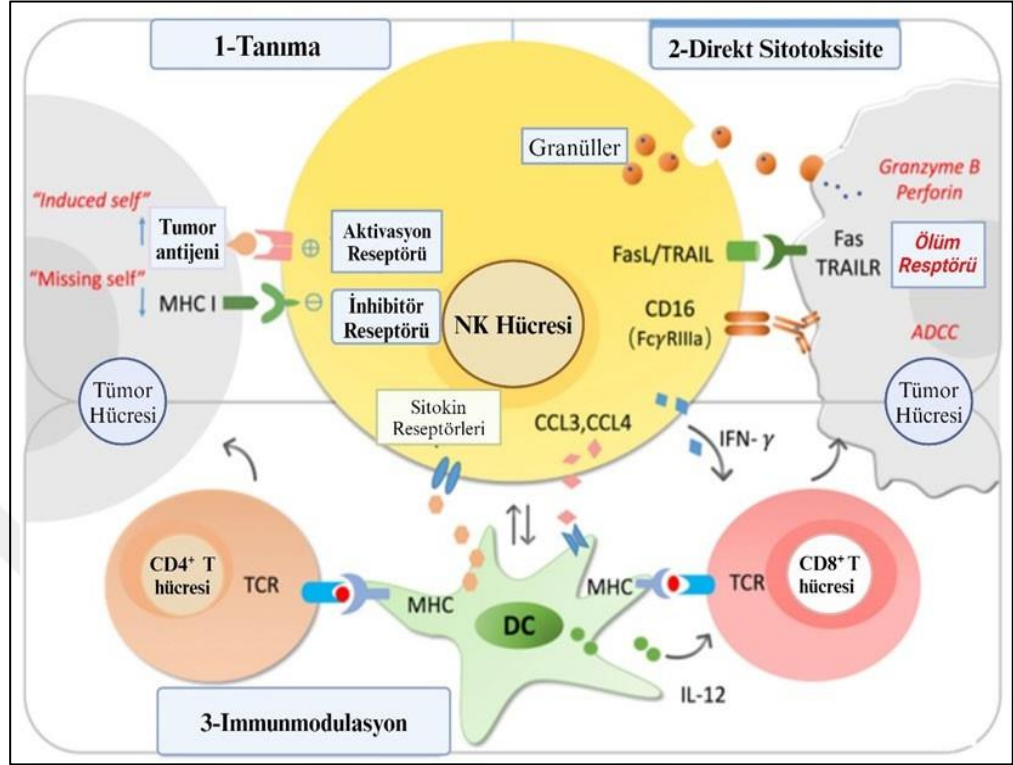
Önceki çalışmalara göre, NK hücreleri sağlıklı hücreleri tümör hücrelerinden ayırt etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Özellikle, NK hücrelerinin tümör hücrelerini öldürmesi MHC-I ve antikor bağımlı değildir [136]. Tümöre saldıran sitotoksik T hücrelerinden kaçmak için, tümör hücrelerinin yüzeyinde MHC-I ifadesi sıklıkla azalır veya kaybolur. Ancak, MHC-I'in kendi kendine ifadesinden vazgeçen veya “değişmiş-kendi” stres-indüklenebilir proteinler taşıyan tümörler, NK hücrelerini uyaran reseptörler için kanser hücrelerinde düzenlenmemiş ligand ifadesine neden olur. Bu nedenle, NK hücreleri belirli “stres” veya “tehlike” sinyallerinin ilk tanınması

yoluyla uyarıldığından, tümör hücrelerinin ideal NK hücresi hedefleri olduğuna şüphe yoktur. NK hücrelerinin tümör hücrelerini tanımasının “kendi kendini silme” modeli, ilk olarak MHC-I eksik homolog kanser hücrelerinin seçici reddinin NK hücreleri kullanılarak analiz edilmesi yoluyla gösterilmiştir [146]. Ayrıca, NK hücre inhibitör reseptörleri, MHC-I ifadesindeki bu eksikliği tespit edebilir. Aktivasyon reseptörleri aracılığıyla NK hücreleri, stresle tetiklenen kendi ligandlarını tespit ederek belirli MHC-I yeterli kanser hücrelerini öldürebilir. Kısaca, NK hücreleri tarafından aracılık edilen doğrudan sitotoksiste, önemli antikanser etkiler gösterir. NK hücreleri, çeşitli mekanizmalarla kanser hücrelerini doğrudan öldürür, bu mekanizmalar şöyle tanımlanır: (1) NK hücreleri, perforin ve granzim öldürücü medyatörlerini serbest bırakarak malign hücrelerin apoptozunu sağlar, bu süreç NK hücre tanıma reseptörünün tümör hücreleriyle doğrudan temasını gerektirir; CD56 düşük/soluk NK hücre alt grubu esas olarak bu mekanizma ile hedef hücreleri öldürür [147]. (2) NK hücreleri, TNF ailesi moleküllerinin (FasL, TRAIL ve mTNF) tümör hücre membran ligandlarına bağlanması yoluyla apoptozu tetikler. Bu süreç, NK hücre tanıma reseptörünün tümör hücresiyle doğrudan temasını gerektirmez ve CD56 parlak NK hücre alt grubu malin hücreleri öldürür [148]. (3) NK hücreleri, antitümör antikorları IgG1 ve IgG3 arasında köprü görevi görür, burada Fab spesifik olarak tümörü tanıırken Fc segmenti NK hücre FcR $\gamma$  IIIa'ya bağlanarak antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksiteyi tetikler [149]. (4) NK hücreleri, farklı mekanizmalarla antitümör etkiler gösteren, tümör anjiyogenezini inhibe etmek ve adaptif bağışıklık yanıtlarını aktive etmek gibi IFN- $\gamma$  içeren birçok sitokin üretir [150] (Şekil 2.11).

#### *Dolaylı kanser öldürme*

NK hücreleri, bağışıklık sistemi hücrelerinin işlevleri üzerindeki olası etkileriyle bağışıklık modüle edici etkilere sahiptir. Uyarılmış NK hücreleri tarafından salgılanan IFN- $\gamma$ , CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin sitotoksik T lenfositlerine (CTL'ler) dönüşümünü ve CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin Th1 hücrelerine özelleşmesini tetikler. Bu da CTL farklılaşmasını teşvik eder. NK hücre kökenli sitokinler, B hücreleri tarafından üretilen antitümör antikorlarını da modüle edebilir [151]. Ayrıca antitümör bağışıklığını teşvik etmek için aktive olmuş NK hücreleri, DC stimülasyonu ve olgunlaşmasını düzenler. Bu DC'ler, NK hücresi ile tetiklenen tümör lizisinden kaynaklanan kanser-spesifik

antijenleri ve CD8+ T hücrelerini çapraz sunabildiklerinden, antijen-spesifik CTL yanıtlarının üretimini potansiyel olarak teşvik eder [152] (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 : NK hücrelerinin kanser hücreleri üzerindeki aktiviteleri [153].

### 2.5.5 NK-92 hücre hattı

NK-92 hücre hattı, 1992 yılında keşfedildiği için bu adı almıştır ve Kanada, Vancouver'daki British Columbia Kanser Ajansı'nda bulunan bir laboratuvarında, agresif bir NK hücre lenfoması teşhisi konmuş bir hastadan alınan mononükleer kan hücrelerinden üretilmiştir. NK hücreleriyle karşılaştırıldığında tutarlı bir şekilde yüksek sitotoksik aktivite gösterir. Bu geniş ve tutarlı yüksek sitolitik aktivitenin birkaç nedeni vardır: (i) NK-92 hücreleri, kan türevi IL-2 bağımlı NK hücrelerinden daha fazla granzim içerir, bu nedenle NK-92 ile sitotoksik etki, kan NK hücrelerine kıyasla çok daha düşük etkileyici-hedef oranında gerçekleşir; (ii) NK-92 hücreleri, NK hücre fonksiyonunu allojenik hücrelerle karşılaştığında susturan inhibitör KIR ailesinin yalnızca bir reseptörünü ifade eder; (iii) NK-92, tümör hedefleriyle etkileşimde önemli olan NKG2D gibi bir dizi aktifleştirici reseptörün yanı sıra adezyon reseptörlerini (lökosit fonksiyonuyla ilişkili antijen-1, interhücrel adezyon molekülü) ifade eder; (iv) NK-92 hücreleri, hipoksik tümör dokusu mikroçevresinde aktivite kaybı göstermez, ve (v) NK-92, kan NK hücrelerine kıyasla hedef hücreleri

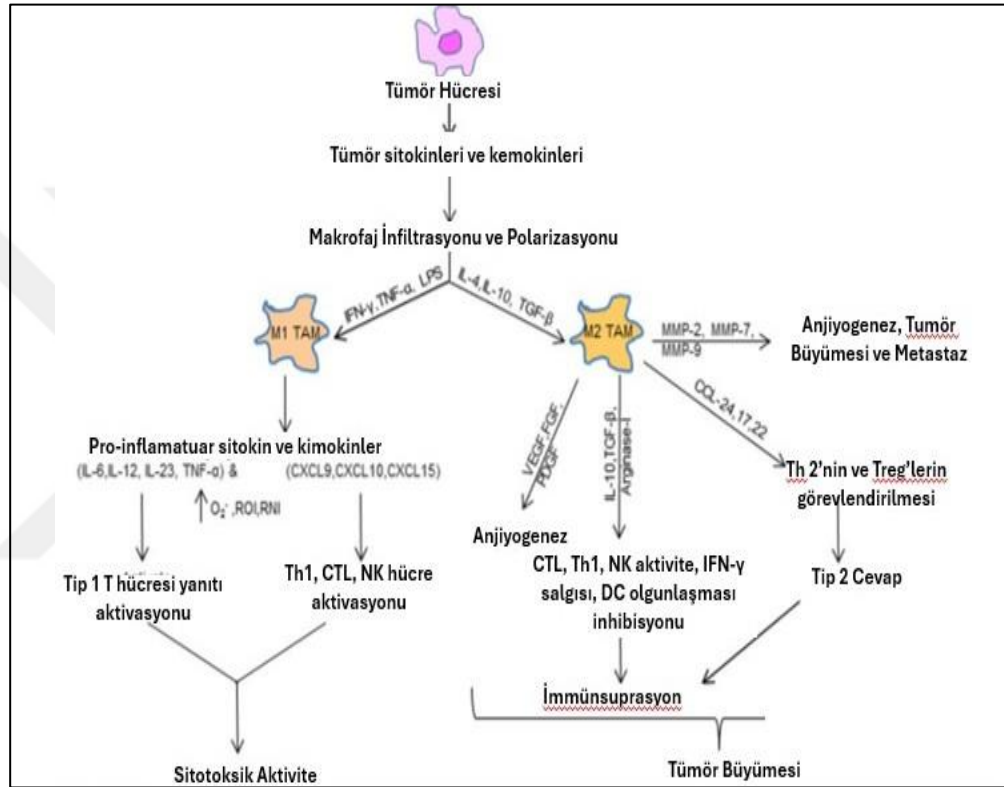
çok daha büyük ölçüde seri olarak öldürebilir . *In vitro* ve *in vivo* yapılan pek çok çalışma, mühendislikle değiştirilmemiş ana NK-92 hücrelerinin insan kanser hücre hatlarını ve birincil kanser hücrelerini etkili bir şekilde öldürebildiğini doğrulamıştır [154].

## 2.6 Kanserde Makrofajların Rolü

Makrofajlar, patojenlere karşı doğuştan ve adaptif bağışıklık yanıtlarında, normal doku homeostazında, enfeksiyon veya yaralanma sonrasında yabancı ve kendine ait antijenlerin sunumunda, inflamasyonun çözülmesinde ve yara iyileşmesinde hayati roller oynayan, geniş bir alana yayılmış doğuştan gelen bağışıklık hücreleridir [155]. Makrofajlar, kemokinler gibi tümör kaynaklı çekiciler tarafından tümör bölgesine çekilir, tümör hücreleriyle etkileşime girerler. Bu hücreler, yaygın olarak tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) olarak bilinir. Makrofajların bu şekilde infiltre olması, çeşitli insan karsinomlarında kötü prognoz ile ilişkilidir. Diğer bağışıklık efektör hücreleri gibi makrofajlar da birden fazla alt tipe sahip olabilir ve mikroçevreye bağlı olarak çeşitli fenotipler alabilirler. Makrofajlar, sitokinler, farklı oksijen konsantrasyonu (hipoksiye karşı normoksi) gibi çeşitli mikroçevresel uyarıcılarla aktive edilebilir ve işlevsel olarak farklı fenotiplere polarize edilebilirler. Klasik olarak aktive edilmiş (M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş (M2) makrofajlar bu fenotiplerin iki uç noktasıdır. Makrofajlar, bağışıklık uyarıcılarına (IFN- $\gamma$ ) yanıt olarak tek başına veya lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel bileşenlerle ya da TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerle birlikte klasik (M1) makrofaj aktivasyonuna uğrarlar [156]. Buna karşılık, aynı makrofajlar TH2 sitokinleri (IL-4, IL-13), IL-10 ve transformasyon büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ile uyarıldığında M2 makrofajlarına polarize olurlar [157].

Polarizasyon makrofajların ayırt edici bir özelliğidir ve bu makrofajların farklı sitokin profilleri nedeniyle, işlevleri de farklıdır. M1 makrofajları, yüksek düzeyde proinflamatuvar sitokinler (örn., TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 ve IL-23) salgılayarak tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir ve tümör yıkıcı reaksiyonları tetikler [158]. Buna karşılık, M2 makrofajları, IL-10, TGF- $\beta$  ve arginaz-1 gibi geniş bir yelpazede anti-inflamatuvar sitokinler ifade ederler ve böylece tümör büyümesi için immünosupresif bir mikroçevre sağlarlar. Farklı şekilde polarize olmuş makrofajlar ayrıca farklı kemokin ifade desenleri gösterebilir. M1 makrofajları, TH1, CD8+ sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) ve NK hücrelerinin alımını teşvik eden bir dizi

proinflamatuar kemokin (CXCL9, CXCL10 ve CXCL15) ifade ederek, bu hücrelerin hücre içi patojenleri öldürme kapasitelerini artırır. Genel olarak, bu TAM hücreleri, M1 tipi hücreler olarak, TH1 ve NK hücrelerinin büyümesini ve kemokinler ve sitokinler (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 ve IL-12) üreterek alımını teşvik eden proinflamatuar olabilirler ve aynı zamanda TGF- $\beta$  ve IL-10 üretimi yoluyla antikanser bağışıklığını inhibe eden M2 benzeri TAM ile tümör gelişimini ve immün regülasyonu teşvik edebilirler ve böylece kanserde çift yönlü roller oynayabilirler [159] (Şekil 2.12).



**Şekil 2.12 : Neoplazmada makrofajların rolü ve aktiviteleri [118].**

### 2.6.1 RAW 264.7 makrofaj hücre hattı

RAW 264.7 hücre hattı, immünolojik araştırmalar alanında temel olan fare makrofajları için sağlam bir model olarak hizmet eder. Erkek BALB/c faresinden türetilen bu hücreler, Abelson fare lösemi virüsü tarafından dönüştürülerek makrofaj benzeri bir hücre hattı oluşturulmuştur. Fonksiyonel stabiliteleri ve hem fagositoz hem de pinositoz yapabilme yetenekleri nedeniyle, RAW 264.7 hücreleri, konak-patojen etkileşimlerinin incelenmesi için vazgeçilmezdir ve immünolojik araştırma çabalarında köşe taşıdır. Antijen sunan hücreler olarak, RAW 264.7 hücreleri bağışıklık sisteminde kritik bir rol oynar. Fonksiyonları, basit patojen tanımanın ötesine geçerek antijenleri işleme ve T hücrelerine sunma süreçlerini kapsar, böylece

kapsamlı bir bağışıklık yanıtını düzenler. Bu dinamik, bağışıklık sisteminin yabancı unsurları nasıl tanıyıp etkisiz hale getirdiğini daha derinlemesine anlamayı sağlar. RAW 264.7 hücreleri, M0 makrofajları olarak temel durumlarında, M1 pro-inflamatuar veya M2 anti-inflamatuar fenotipe polarize olma kapasitesine sahiptir. Bu polarizasyon yeteneği, araştırmacılara çeşitli sitokinlerin ve çevresel faktörlerin makrofaj fonksiyonu ve bağışıklık yanıtları üzerindeki etkilerini incelemek için bir model sağlar. RAW 264.7 hücreleri, özellikle lipopolisakkarit (LPS) gibi uyarıcılara maruz kaldıklarında, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  gibi çeşitli proinflamatuar sitokinleri üretirler. Bu hücre hattı, nitrik oksit (NO) üretir ve bu da bağışıklık yanıtlarında ve patojenlere karşı savunmada önemli bir rol oynar. NO üretimi, özellikle inflammatuar koşullarda önemlidir. Doğal ürünlerde biyolojik aktivite taraması, RAW 264.7 hücrelerinin başarılı olduğu bir diğer uygulama alanıdır [160].

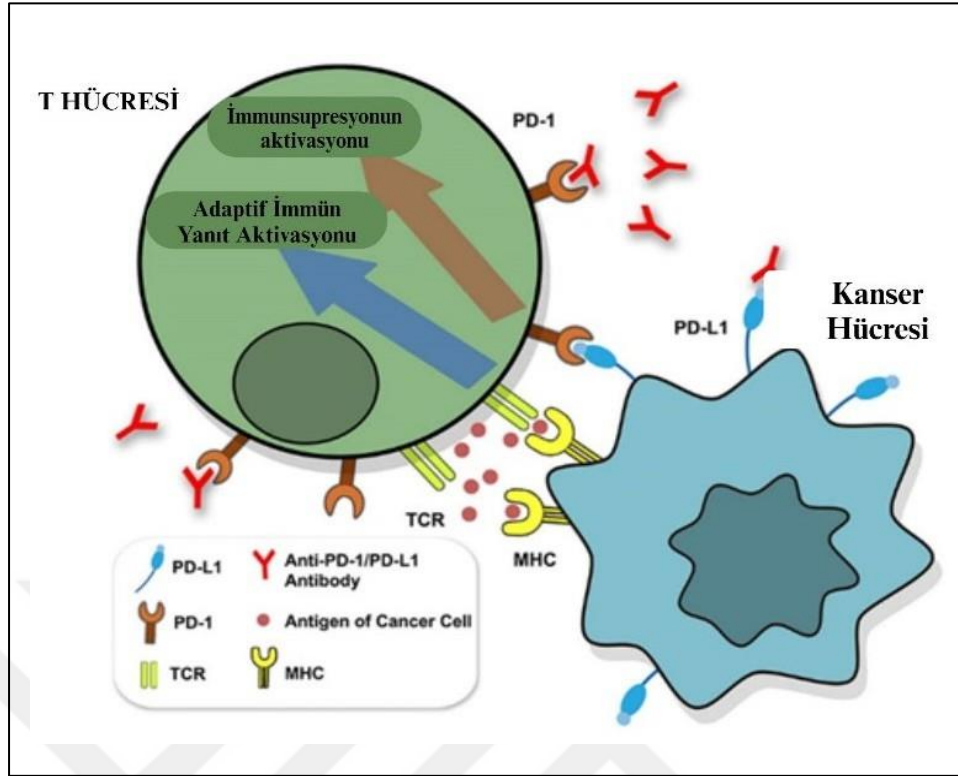
## **2.7 PD1/PD-L1 İmmün Kontrol Noktası Proteinleri**

Programlı hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1), B7-H1 ve CD274 olarak da bilinir ve kendi reseptörü programlı hücre ölümü-1 (PD-1) ile etkileşime girerek T hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde düzenler ve birçok kanser türünün bağışıklık kaçınmasında önemli bir rol oynar [161]. PD-L1 ifadesi sıkça tümör hücrelerinde ve dendritik hücreler (DC'ler) ve makrofajlar gibi tümörle ilişkilendirilmiş antijen sunan hücrelerde (APC'ler) tespit edilmiştir. Bu hücreler, T hücre yüzeyinde bulunan PD-1 reseptörünü tanır ve bu etkileşim bağışıklık baskılanmasına neden olur. T hücrelerindeki T hücre reseptörlerinin (TCR) ve kanser hücrelerindeki MHC'nin bağlanması, adaptif bağışıklık yanıtını aktive eder. PD-1 ve PD-L1'in bağlanması ise T hücrelerinin sinyal iletimini engelleyerek bağışıklık yanıtını baskılayabilir. Anti-PD-1/PD-L1 bir antikolar ise bu baskıyı tersine çevirebilirler (Şekil 2.13). PD-1'e yönelik nivolumab ve pembrolizumab gibi monoklonal antikolar ve PD-L1 antikoru atezolizumab, etkili bir şekilde PD-1/PD-L1 etkileşimini engelleyerek bağışıklık kontrol noktası engelleme yaklaşımı ile formüle edilmişlerdir. Bu tedavi yaklaşımı kapsamında geliştirilen bir çok ilaç kanser tedavisi için FDA onayını almıştır [162].

Solid tümörlerde, PD-1/PD-L1 inhibisyon yolları, tümör hücre yüzeyinde PD-L1 ifadesinin artırılması yoluyla bağışıklık sistemini susturmak için kullanılabilir. PD-L1 ifadesi, büyük tümör boyutu, yüksek proliferasyon, östrojen reseptörü-negatif durumu ve HER2-pozitif durumu ile ilişkilendirilmiştir ve over ve meme kanseri durumlarında

sağkalım ile ters korelasyon gösterir. PD-L1, üçlü negatif meme kanserlerinin %20'sinde ifade edilir. Bu, birçok katı tümöre karşı antitümör bağışıklığının tetiklendiğini ancak immünsüpresif faktörler tarafından dengelendiğini gösterir. Canlı organizmalarda yapılan çalışmalarda, PD-L1'in tümör oluşumunu ve invazivliğini artırdığı ve tümör hücrelerini belirli CD8+ T-hücrelerine karşı daha az hassas hale getirdiği gösterilmiştir. PD-1 ifadesi susturulmuş farelerde melanom tümör büyümesi geniş çapta baskılanmıştır. Ayrıca, canlı organizmalarda yapılan çalışmalarda, PD-1/PD-L1 yolaklarının spesifik antikolar kullanılarak bloke edilmesinin, hücrel immünoterapilerde daha güçlü tümör gerilemesine yol açtığı gösterilmiştir [163].

Kanser hücrelerinde PD-L1 ve/veya PD-L2 ifadesinin saptanması, kanser tedavisi ve prognozu için önemli sonuçlar doğurabilir. Araştırmalar, kanserin şiddeti ile TIL'lerdeki CD279 varlığı ve kötü hasta sonuçları arasında bir bağlantı ortaya koymuştur. Kanser hücrelerinde bulunan PD-L1, sitotoksik CD8+ T hücrelerindeki CD279 reseptörleri ile etkileşime girdiğinde, bu hücrelerde apoptozu tetikler [164]. Normal meme dokusunda PD-L1 ifadesi düşük seviyelerdeyken, meme kanseri dokusu örnekleri ve hücre hatları bu proteinin bol miktarda ifade edildiğini göstermiştir. Meme kanseri hastası üzerinde yapılan bir çalışma, PD-L1 ifade seviyelerini klinik-patolojik parametrelerle karşılaştırmak için yürütülmüştür. Meme kanserinde, kanser hücrelerinde yüksek seviye PD-L1 ifadesi, yüksek boyutlu Grade III tümörler ve östrojen reseptörleri (ER) veya progesteron reseptörleri (PR) ifade etmeyen tümörler ile ilişkilidir. CD279 ve PD-L1 ekseni keşfi, kanser tedavisinde anlamlı bir yenilik olmuştur [165]. Kemoterapötik ajanların PD-L1 ifadesi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar, doksorubisinin hücre yüzeyinde PD-L1 ifadesini azalttığını fakat çekirdekte artırdığını göstermiştir. Ancak, PI3/AKT yolunun inhibe edilmesinin bu artışı önleyebildiği bulunmuştur [166]. Yang Zheng ve ark. MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinin T hücreleri ile birlikte kültür edilmesinin yüksek PD-L1 ifadesine ve T hücre aktivasyonu ile sitokin salımının önemli ölçüde inhibe edilmesine yol açtığını bulmuştur [167].



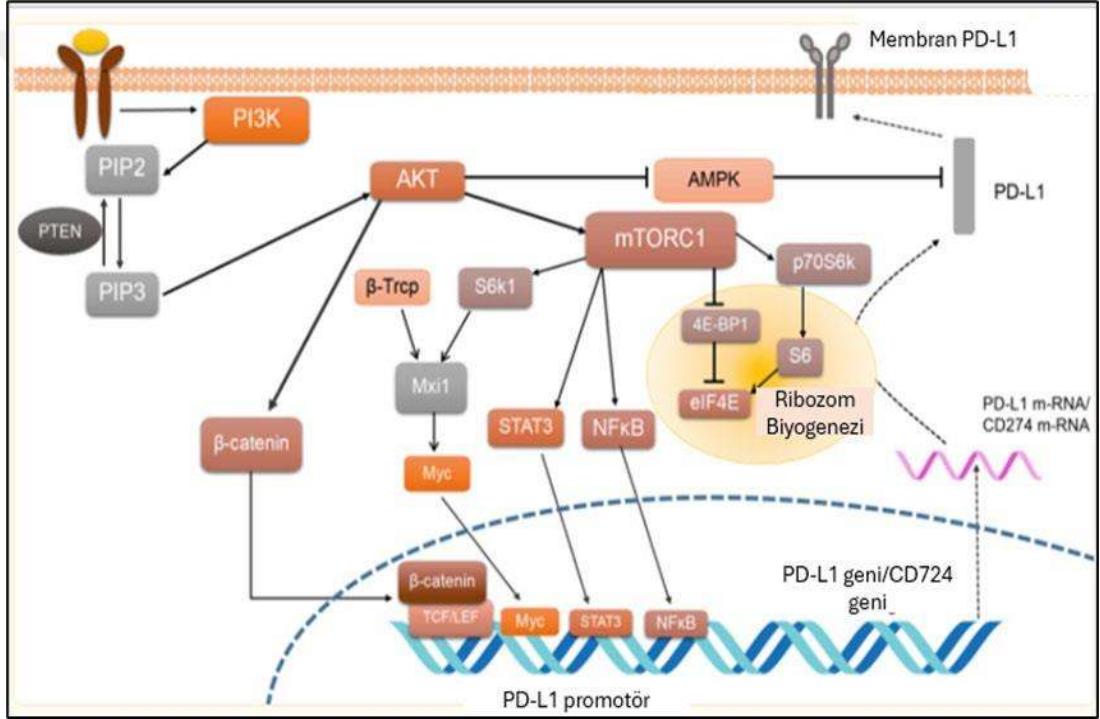
**Şekil 2.13 :** T hücresi ve kanser hücreleri arasındaki PD1/PD-L1 etkileşimi [168].

### 2.7.1 PI3K/AKT/MTOR sinyal yolağı ile PD/PD-L1 sinyal yolağı arasındaki ilişki

Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Akt yolunun, kanser hücrelerinde PD-L1 regülasyonunda rol oynadığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [169] (Şekil 2.14). Örneğin PI3K inhibitörlerinin, BRAF inhibitörüne dirençli melanom hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir [170]. Akt inhibisyonu ise, PTEN'in tükenmesiyle meydana gelen PD-L1 artışını ortadan kaldırır. PI3K/Akt sinyalleme yoluyla PD-L1 artışları, transkripsiyonel yukarı düzenleme ve posttranslasyonel süreçler ile birlikte gelir; kolon kanseri hücrelerinde, Akt'nin uyarılması, PD-L1 mRNA ekspresyon seviyelerinden bağımsız olarak PD-L1 protein aşırı ekspresyonuna neden olabilir. Akt'nin, PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisini mTOR/S6'nın aracılık ettiğine dair bir kanıt olmasa da, Akt inhibisyonu PD-L1 ekspresyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. PI3K/AKT/mTOR ile ilişkili inhibitörler (örneğin, mTOR inhibitörü rapamisin) PD-L1 ekspresyonunu azaltırken, artırılmış AKT/mTOR ekspresyonunun uyarılması PD-L1 ekspresyonunu artırır (fare deneylerinde doğrulanmıştır) [171].



PD-1/PD-L1, yalnızca tümör hücrelerinde değil, aynı zamanda bağışıklık mikroçevresinde de PI3K/AKT yolunu aktive eder. Meme kanserinde, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC) olarak adlandırılan bir elementteki PD-1'in, B hücresindeki PD-L1'e bağlanarak, B hücresinde PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B sinyal yolunu aktive edebildiği bulunmuştur [172]. Daha sonra B hücresi uyarılması, T hücre bağışıklık yanıtını engellemiş ve tümör hücrelerinin bağışıklık kaçışını teşvik etmiştir. Yüksek PD-L1 ekspresyonunun yalnızca mTOR'a bağımlı olduğu konusunda doğrudan bir kanıt olmasa da, AKT/mTOR yol aktivasyonunun yüksek PD-L1 ekspresyonunu teşvik ederek kanser hücrelerinin bağışıklık kaçışını destekleyebileceği iyi bilinmektedir [173].



**Şekil 2.14 :** PD-L1 ekspresyonunu düzenleyen PI3K/AKT/MTOR sinyal yolağı [169].

## 2.8 Mevcut Kanser İmmünoterapi Yaklaşımları

Bağışıklık sistemini tanıyarak ve kanseri ortadan kaldırmaya yönlendiren tedavi yaklaşımları, kanser immünoterapisi olarak bilinir ve kanser tedavisinin ayrı bir ayağı olarak ortaya çıkmıştır. En umut verici tedavi yaklaşımları arasında terapötik kanser aşılı, immün kontrol noktası blokajı, iki spesifik T hücre angajörü (BiTEs) ve adaptif hücre terapileri (ACT) yer alır. Bu yaklaşımlar, tümör antijenlerine karşı ya endojen ya da tasarlanmış bir T hücre temelli bağışıklık yanıtını ortaya çıkarmayı amaçlayan

ortak bir etki mekanizmasını paylaşır. Ayrıca, özellikle antijen sunan hücreler olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile bağışıklık efektörleri arasındaki etkileşimler, kanser immünoterapilerinin etkinliğinin temelinde yatar ve bu hücreleri hedefleyen yaklaşımlar da geliştirilme aşamasındadır. Aşağıda kanser immunterapide kullanılan en son yöntemler anlatılmıştır [64].

#### *Terapötik Kanser Aşıları*

Terapötik kanser aşıları, dendritik hücreler tarafından antijenin alınması, işlenmesi ve sunulması yoluyla tümör antijenlerine karşı endojen T hücre bağışıklık yanıtını tetikler. Tümör antijenleri, KRAS veya p53 gibi yaygın olarak mutasyona uğramış varyantlar gibi birkaç kanser türü arasında paylaşılan antijenler ya da bireyin tümörüne özgü somatik mutasyonlara sahip kişiselleştirilmiş neoantijenler olabilir. Bağışıklık aktivasyonunu indüklemeye yöntemleri arasında çıplak veya nanoparçacıkla kaplanmış DNA, RNA veya peptitlerin enjeksiyonu, *ex vivo* puls edilen otolog dendritik hücreler ve ışınlanmış tümör hücreleri yer alır. Bir dendritik hücre aşısı olan Sipuleucel-T, 2010 yılında metastatik, kastrasyona dirençli prostat kanseri tedavisi için onaylanmış olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından onaylanan tek aşı tedavisidir [174].

#### *İmmün Kontrol Noktası Blokajı*

Aktive olmuş T hücreleri, antitümör bağışıklığında merkezi bir rol oynar ve yüzeylerinde sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4 (CTLA-4) ve programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) gibi inhibitör reseptörler ifade ederler. Bu reseptörlerin kendi ligandlarına bağlanması, T hücre sitotoksik aktivitesinin azalmasına ve inhibitör sinyal yollarının etkinleşmesine yol açar. Birçok tümör, PD-L1'in ekspresyonunu artırarak T hücre yanıtlarından kaçınır. Bu inhibitör etkileşimin kesilmesi, T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu artırarak antitümör yanıtları indükler. CTLA-4 (ipilimumab), PD-1 (pembrolizumab, nivolumab ve cemiplimab) veya PD-L1 (atezolizumab, durvalumab ve avelumab) hedefleyen insanlaştırılmış monoklonal blokaj antikorları, tek ajanlar olarak ya da kemoterapilerle kombinasyon halinde yaklaşık 50 kanser türünde kullanılmış olup, en büyük başarı melanomda gözlemlenmiştir. Ancak, kontrol noktası blokaj tedavisinin vaatlerine rağmen, yalnızca azınlıkta kalan hastalar tam yanıt alır, çünkü bu tedavinin etkinliği tümör mutasyon yüküne ve uygun antitümör T hücre fonksiyonuna bağlıdır. Ayrıca, PD-1/PD-L1 inhibisyonu CTLA-4 blokajına göre daha az yan etki gösterse de, her iki tedavi de otoimmün hastalıkları

teşvik etme ve kontrol noktası kaynaklı pnömonit gibi yaşamı tehdit eden toksisiteler geliştirme potansiyeline sahiptir [175].

#### *Adaptif Hücre Terapileri*

ACT, hastaya tümörün ortadan kaldırılmasını teşvik etmek amacıyla infüze edilen *ex vivo* genişletilmiş, otolog veya allojenik bağışıklık hücrelerinden oluşan çeşitli bir gruba ifade eder. En yaygın kullanılan adaptif hücre terapileri arasında tümör infiltrasyonu yapan lenfositler (TIL) veya transgenik TCR veya kimera antijen reseptörü (CAR) ifade eden genetiği değiştirilmiş T hücreleri yer alır. TIL ve transgenik TCR T hücrelerinden farklı olarak, CAR-T hücreleri MHC'den bağımsızdır ve herhangi bir TAA'yı hedef almak için değiştirilebilir. 2022 yılı itibarıyla, B hücreli lösemi ve lenfoma tedavisi için CD19'u hedefleyen dört ve r/r miyelom tedavisi için BCMA'yı hedefleyen iki CAR-T hücre tedavisi olmak üzere FDA tarafından onaylanmış altı CAR-T hücre tedavisi bulunmaktadır. ACT'nin katı tümörlerdeki etkinliğini artırmak için geniş bir genetik modifikasyon stratejisi geliştirilmiş olup, transgenik TCR'ler, NK hücre reseptörleri (NKR), CAR'lar veya TCR benzeri CAR'lar ifade edecek şekilde doğal öldürücü hücrelerin veya makrofajların mühendisliği de son yıllarda yapılmaktadır [176].

### **2.9 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün (EGFR) Meme Kanseriindeki Rolü**

Onkolojide, prognostik faktörler ve tedaviye yanıtı bulma çalışmaları yoğun bir araştırma alanıdır. Bu alandaki ilerlemeler, kanser ilaç tedavisini seçilmemiş hastalarda kullanılan hedeflenmemiş antitümör ajanlarından, tümör moleküler biyolojisine dayalı olarak hastaya spesifik hedeflenmiş antitümör ajanlarına dönüştürecektir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü üyeleri, bugüne kadar tanımlanmış en dikkat çekici kanser moleküler hedefleri arasındadır. Epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR)/ErbB ailesi dört adet reseptörden oluşur; EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (HER2/neu/ErbB2), ErbB3 (HER3) olarak ve ErbB4 (HER4) [177]. HER2, meme kanserlerinin %20-25'inde aşırı eksprese edilir ve meme kanserinde en iyi tanımlanmış terapötik hedeftir.

Meme kanserinde EGFR aşırı ekspresyonu, büyük tümör boyutu, kötü diferansiyasyon ve kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir. EGFR aşırı ekspresyonu tüm meme kanseri alt

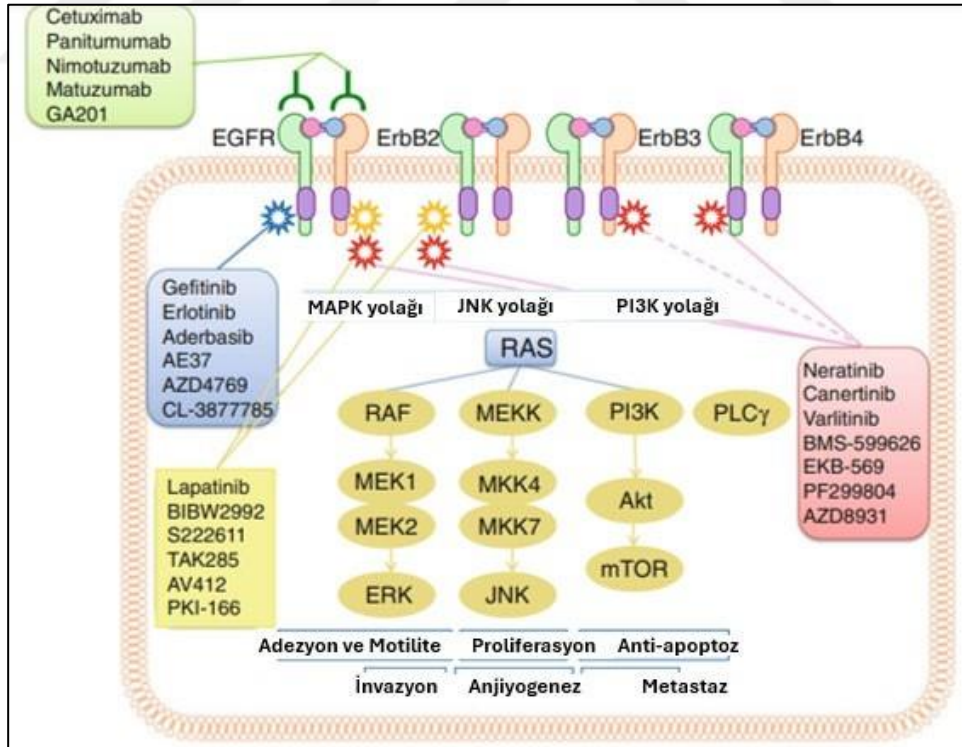
tiplerinde gözlenmesine rağmen, EGFR, TNBC ve özellikle agresif olan inflamatuvar meme kanserinde (IBC) daha sık aşırı eksprese edilir. Bu fenotipteki hastaların tedavisi, bu hastalıkların agresif doğası ve klinik olarak anlamlı tedavi hedeflerinin olmaması nedeniyle zor olmuştur [178]. Meme kanserinde EGFR'nin rolü incelenmiş ve EGFR'yi hedefleyen gefitinib, cetuximab, lapatinib gibi çeşitli tedaviler geliştirilmiştir [179]. Ancak, meme kanserinde EGFR'yi hedefleyen tedavilerin klinik çalışmaları hayal kırıklığı yaratmıştır.

EGFR ailesi, bir ekstrasellüler ligand bağlanma alanı ve bir intrasellüler reseptör tirozin kinaz alanı içeren, transmembran glikoproteinlerinden oluşan 4 reseptörü içerir. EGFR reseptörleri tarafından aktive edilen başlıca sinyal yolları, PI3 kinaz, Ras-Raf-MAPK, JNK ve PLCc' dir (Şekil 2.15) [179]. Hücresel düzeyde, ligandlar sadece hücre proliferasyonunu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda adezyon ve hareketliliği de değiştirir ve apoptoza karşı koruma sağlar; fizyolojik düzeyde ise invazyonu ve anjiyogenezi teşvik eder. EGFR ailesinin üyelerinin aktivasyonu, 3 boyutlu kültürde meme epitelyal hücrelerinin dağılmasını ve invazyonunu teşvik eder ve bu durum hücre polarizasyonunun kaybı ve diğer epitelyal diferansiyasyon özellikleri ile ilişkilidir.

Şu anda, meme kanserlerinin yaygın moleküler özelliklere dayalı olarak sınıflandırılması, en iyi tedavi stratejilerini seçmek için vazgeçilmezdir. EGFR aşırı ekspresyonu, TNBC vakalarının en az %50'sinde bulunur, bu da diğer meme kanseri alt tiplerinde görülen oranlardan daha yüksek bir ekspresyon oranıdır. TNBC'deki yüksek EGFR aşırı ekspresyon oranı nedeniyle, EGFR inhibitörleri, TNBC tedavisi için geliştirilen hedeflenmiş ajanlar arasında yer almaktadır. Lee ve arkadaşları yakın zamanda EGFR'yi hedef alan tedavinin, TNBC hücrelerinin sitotoksik terapiye karşı başlangıç duyarlılığını artırmak için kullanılabileceğini göstermişlerdir [180].

IBC, klinik olarak en agresif meme kanseri alt tipi olup, aynı zamanda EGFR aşırı ekspresyonu ile de ilişkilidir: IBC'lerin %30'u EGFR eksprese eder. EGFR pozitif IBC'li hastalar, EGFR negatif tümörleri olan hastalara kıyasla daha kötü bir 5 yıllık genel sağkalım oranına sahiptir ve IBC'deki EGFR ekspresyonu, tekrarlama riskinin artmasıyla ilişkilidir [181].

Bugüne kadar, EGFR'ye karşı moleküler hedefli ajanlar, küçük molekül EGFR inhibitörleri (TKI'lar) ve anti-EGFR monoklonal antikorları (MAb'lar) olmuştur. Tirozin kinazlar, büyüme faktörü reseptörlerinin ve onkoproteinlerin sitoplazmik alanları ile ilişkilidir ve birçok tirozin kinaz, mutasyona uğrarsa veya aşırı eksprese edilirse, transformasyon potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, tirozin kinazlar, kanser ilaçlarının geliştirilmesi için mükemmel bir hedef teşkil eder [182]. EGFR'nin küçük molekül inhibitörleri, saf EGFR TKI'ları ve çift etkili EGFR ve HER2 TKI'ları olarak sınıflandırılabilir. MAb'lar, normal bağırsak epiteline ulaşma kapasitesine daha az sahiptir, bu da oral kinaz inhibitörü Lapatinib gibi ishalin doz sınırlayıcı bir toksisite olduğu durumlarda, MAb'larla EGFR blokajı için bir avantaj gibi görünmektedir; ancak, MAb'larla bu durum genel olarak gözlenmemiştir. Ayrıca, MAb'lar, küçük molekül EGFR inhibitörleriyle görülmeyen antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksiteyi aracılık eden immün yanıtları aktive etme gibi diğer mekanizmalar aracılığıyla da çalışabilirler. Şekil 2.15' te EGFR yolağı mevcut inhibitörleri ve bu inhibitörlerin hangi proteinleri etkileyerek anti-kanser tedavide yer aldıkları gösterilmiştir.



**Şekil 2.15 :** EGFR inhibitörleri ve aşağı akış sinyal yolları [179].

Yukarıda anlatılanlardan açıkça anlaşıldığı gibi EGFR'nin aktivasyonu, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve metastazda önemli bir rol oynayan bir dizi

hücre içi sinyal yolunu tetikleyebilir. Ayrıca, düzenleyici T hücrelerini aktive ederek veya T hücre kemotaktik maddelerinin seviyesini azaltarak bağışıklık tepkisinin baskılanmasına da sebep olabilir [183]. EGF reseptörlerinin tümörün bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmasına olan etkisi PD-L1 immün kontrol noktası proteiniyle de ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur. Özofagus kanser hücreleriyle yapılan bir çalışmada; PD-L1 ekspresyonunun, EGFR sinyali aktive edildiğinde EGFR'ye bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığı bulunmuştur [184]. Küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde EGF uyarımı ile EGFR aktivasyonunun

PD-L1 ekspresyonunu indüklediği ve EGFR-TKI'lar ile inhibe etmenin ise, T hücrelerinin baskılanmasını ortadan kaldırdığı ve ifn- $\gamma$  üretimini artırdığı bulunmuştur [185]. Preklinik veriler, EGFR sinyal yolunun, MHC I ve MHC II'nin aşağı regülasyonu, PD-L1 ekspresyonunun yukarı regülasyonu, Treg'lerin sayısı ve aktivitesinin artması ve CTL'lerin aktivitesinin baskılanmasını içeren bağışıklık modülatör etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca, PD-1/PD-L1 yolunun, EGFR-TKI'lara karşı direncin olası faktörlerinden biri olabileceği düşünülmektedir [186].

## 2.10 Flavonoidler

Flavonoidler, önemli ikincil metabolitler grubundan olup, meyveler, sebzeler, otlar, saplar, tahıllar, kuruyemişler, çiçekler ve tohumlar gibi birçok yerde yaygın olarak bulunur [187]. Şu ana kadar, 10.000'den fazla flavonoid bileşiği izole edilmiş ve tanımlanmıştır [188]. Flavonoidler, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklar üzerinde faydalı biyokimyasal ve antioksidan etkilere sahiptir. Flavonoidler, geniş bir yelpazede sağlık destekleyici etkilere sahip olup, besin takviyeleri, ilaçlar, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşen olarak görülmektedir. Bu durum, flavonoidlerin anti-enflamatuvar, anti-oksidatif, anti-kanserojenik, anti-mutajenik ve immün-modülatör özelliklerinin yanı sıra anahtar hücrel enzim işlevlerini düzenleme yeteneklerine dayanmaktadır [189].

Flavonoidler, fenilpropanoid metabolik yolu aracılığıyla sentezlenir ve A, B ve C olarak etiketlenen üç halka (C6-C3-C6) şeklinde düzenlenmiş 15 karbon atomu içerir [190]. Bitkilerde flavonoid bileşikleri genellikle çiçekler, meyveler, yapraklar ve tohumlarda bulunur ve bunlar, bitkinin renk, koku ve tat özelliklerinden sorumludur.

Flavonoidler, abiyotik (ultraviyole radyasyonu, soğuk, tuz, kuraklık ve ağır metaller) ve biyotik (otoburlar, bakteriler, mantarlar) streslere karşı koruyucu roller oynar. Flavonoidler, kimyasal yapılarına, doyumluk derecelerine ve karbon halkasının oksidasyonuna göre flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, kalkonlar, flavanoller ve antosiyaninler gibi çeşitli türlere ayrılır (Şekil 2.16). Flavonoidler son yıllarda artan araştırma ilgisi çekmiştir. Bu nedenle, flavonoidlerin sınıflandırılmasını, biyosentezini, biyolojik aktivitelerini ve ilaç endüstrilerindeki potansiyel uygulamalarını ortaya koymak önemlidir [191].

### 2.10.1 Flavonoidlerin sınıflandırması

Flavonoidler, bitki hücre vakuollerinde genellikle C-glikozitler veya O-glikozitler formunda bulunur [192]. Flavonoidlerin temel moleküler yapısı, temel C6-C3-C6 iskeletine (A, B ve C olarak etiketlenmiş, bağlıdır. Flavonoidler, temel iskeletlerinde yapılan değişikliklere göre yedi alt sınıfa ayrılır; bu alt sınıflar flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, kalkonlar, flavanoller ve antosiyaninleri içerir [193].

#### *Flavonlar*

Flavonlar, en büyük flavonoid sınıflarından biri olup, 2. pozisyonda bir fenil ikamesi taşıyan 4H-kromen-4-on içerir. Flavonlar çoğunlukla kereviz, maydanoz, kırmızı biber, papatya, nane ve ginkgo gibi bitkilerde 7-O-glikozitler olarak bulunur [194] . Apigenin, luteolin ve krisin yaygın flavonlardan üçüdür (Şekil 2.16). Doğada apigenin genellikle bir şeker molekülünün trisiklik çekirdek yapısına hidroksil grupları (O-glikozitler) aracılığıyla veya doğrudan karbona (C-glikozitler) bağlandığı glikozilasyon formunda bulunur. Apigenin, pankreatik hücrelerde serbest radikalleri temizleyebilir ve antioksidan enzim aktivitesini düzenleyebilir ve ayrıca kanser, nöroenflamasyon ve kardiyovasküler hastalıklarda iltihabı azaltabilir [194].

#### *Flavonoller*

Flavonoller, 3-hidroksi flavon olarak da adlandırılır ve A- ve B-halkalarındaki belirli ikamelerle tanımlanabilir, bu halkalar üç karbon zinciriyle birbirine bağlanır. Flavonoller, A-halkasında 5. ve 7. pozisyonlarda hidroksil gruplarına sahiptir ve DNA'yı UV kaynaklı hasarlardan korumak için genellikle epidermal hücrelerde bulunur. Dört tür flavonol bileşiği (kuersetin, galangin, kaempferol ve mirisetin) sebzeler ve meyvelerde, örneğin kuşkonmaz, soğan, marul, brokoli, domates ve elmalarda yaygın olarak bulunur (Şekil 2.16). Flavonoller, antioksidan, antibakteriyel,

kardiyoprotektif, antikanser ve antiviral aktiviteler dahil olmak üzere ilginç biyolojik aktiviteler sergiler [195].

#### *Flavanonlar*

Flavanonlar (dihidro-flavonlar), doymuş bir C-halkasına sahiptir. C-halkasındaki 2. ve 3. pozisyonlar arasındaki doymuş çift bağ, flavanonlar ile diğer flavonoid bileşikleri arasındaki tek yapısal farkı temsil eder. Flavanonlar başlıca turunçgillerde, örneğin portakal, limon, mandalina, greyfurt, klementin ve misket limonunda bulunur. Yapısal farklılıklarına bağlı olarak, flavanonlar naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin, pinosembrin, likvitin ve eriodiktiol formunda bulunabilir. Bunlar arasında, naringenin ve hesperetin, başlıca diyet flavanonları olarak neredeyse sadece turunçgillerde bulunur (Şekil 2.16). Naringin, antioksidan enzimlerin (CAT, PON, GPx ve SOD) aktivitesini artırabilir ve bağışıklık sistemini güçlendirebilir [196].

#### *İzoflavonoidler*

İzoflavonlar, diphenylpropane (C6–C3–C6) iskeletinin heterosiklik C-halkasında C3 pozisyonunda bir B-halkasına sahip olup, bu özellik diğer flavonoidlerden tek kimyasal yapısal farklarını oluşturur. İzoflavonlar, genistein, daidzein ve glisitein olmak üzere üç gruba ayrılır (Şekil 2.16). İzoflavonlar, güçlü östrojenik aktivite sergileyen fitoöstrojenlerdir. Fitoöstrojenler, insan kadın hormonu 17- $\beta$ -östradiol ile benzer yapıya sahiptir ve östrojen reseptörlerine bağlanır. Ayrıca, izoflavonlar güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olup, serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarını engelleyerek kanser riskini azaltabilir [197].

#### *Flavan-3-ol*

Flavanoller, kateşinler veya flavan-3-oller olarak da adlandırılır ve C-halkasında 3. pozisyonunda bir hidroksil grubu ile karakterize edilir. Flavan-3-ol'ler, C-halkasında 2. ve 3. pozisyonlar arasında çift bağ içermez. Çeşitli flavanoller, kateşin, gallokateşin 3-galat, gallokateşin, epikateşin, epikateşin 3-galat, kateşin 3-galat ve epikateşin 3-galat gibi birçok meyvede (örneğin elma, muz, armut ve yaban mersini) yaygın olarak bulunur. Flavanoller, kan damarlarındaki NO içeriğini artırarak tütüne karşı kan damarlarını koruyabilir. Flavanol açısından zengin bir diyet, endotel fonksiyonunun kalıcı olarak iyileşmesini sağlayabilir ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimini önleyebilir [198].

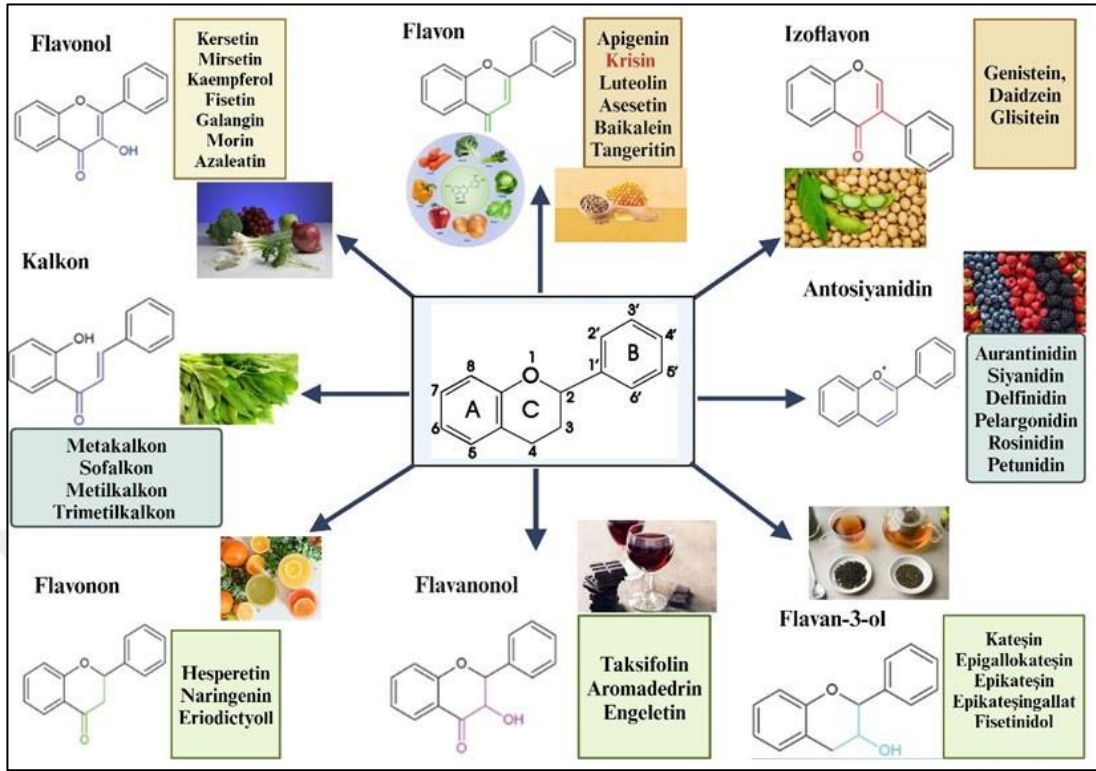


### *Antosiyaninler*

Antosiyaninler, glikozillenmiş polifenolik bileşikler olarak, çiçekler, tohumlar, meyveler ve vejetatif dokuların mikro ortamındaki pH'a bağlı olarak turuncu, kırmızı, mor ve mavi gibi geniş bir renk yelpazesine sahip çözünür vakuoler pigmentlerdir. Birçok bitkide 650'den fazla antosiyanin tanımlanmıştır; bunlar beş maddeye gruplandırılmıştır, bunlar siyadin, delphinidin, malvidin, pelargonidin ve peonidin ve bunların türevleridir. Antosiyaninler, başta frenk üzümü, üzüm ve böğürtlen gibi çeşitli meyve ve sebzelerin dış hücre tabakasında bulunur. Antosiyaninlerin antioksidan yeteneği, halka yönelimi ve piron halkası çevresindeki serbest hidroksillerin konumu ve sayısı ile ilişkilidir. Antosiyaninler, görsel keskinlik, kolesterol yıkımı ve insanlarda kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılması gibi önemli roller oynar [199].

### *Kalkonlar*

Kalkonlar (1,3-diaril-2-propen-1-onlar), doğal açık zincir flavonoidler olup, A ve B-halkalarında üçe kadar modifiye edilmiş veya edilmemiş C5-, C10- ve C15-prenil gruplarını taşır. Antioksidan, antibakteriyel, anthelmintik, antiülser, antiviral, antiparaziter ve antikanser etkiler dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik etki yelpazesi sergilerler. Kalkonlar, flavonoidlerin ve izoflavonoidlerin öncüleridir Xanthohumol ve isbavirakalon, bol biyolojik ve farmakolojik aktivite sergileyen iki temsilci türevidir (Şekil 2.16). Genel olarak, –OH gruplarının sayısı ve konumu, flavonoid biyoaktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. –OH grupları, benzen halkasının karbon atomlarına (3,5,7 ve 3',4'-dihidroksi ikame paternine) bağlanabilir, bu da flavonoidlerin biyoaktivitesini doğrudan belirler. Ayrıca, –OH grubunun konumu da flavonoid biyoaktivitesini etkiler. En etkili radikal temizleyiciler, B-halkasında 3',4'-dihidroksi ikame paterni ve/veya C-3 pozisyonunda hidroksil grubu bulunan flavonoidlerdir [200].



Şekil 2.16 : Yaygın olarak bilinen flavonoidlerin kimyasal yapıları ve sınıflandırması.

### 2.10.2 Bitkilerde flavonoid sentezi

Flavonoid sentezi, şikimat yolu ile asetat yolunun kesişiminde gerçekleşir. İlk p-kumaroil-CoA üretebilir ve ikincisi C2 zincir uzamasını düzenler. Fenilalanin amonyak liyazı (PAL), fenilalanini amonyak ve sinamik asite deamine eder. Ardından, C4H (sinamik asit 4-hidroksilaz), 4-kumarik asit üretimini katalize eder ve 4CL (4-kumarik asit: CoA ligaz) 4-kumarik asidi 4-kumaroil-CoA'ya dönüştürür; bu, lignin ve flavonoid biyosentezini düzenleyen fenilpropanoid metabolik yolunda anahtar bir enzimdir. CHS (kalkon sentaz), üç molekül malonil-CoA ve bir molekül p-kumaroil-CoA'yı naringenin kalkon oluşturmak üzere katalize edebilir. Malonil-CoA, flavonoidler ve poliketidler dahil olmak üzere doğal ürünlerin sentezi için önemli bir öncüdür. CHI (kalkon izomeraz), naringenin-kalkonu flavanonlara dönüştürür. Önemli bir flavonoid iskeleti olarak naringenin, sırasıyla flavonlar ve izoflavonlar oluşturmak için FNS I ve FNS II (flavon sentaz I ve flavon sentaz II) ve IFS (izoflavon sentaz) tarafından katalize edilir. Ayrıca, flavanon-3-hidroksilaz (F3H), flavonol 3'-hidroksilaz (F3'H) ve flavonol 3'5'-hidroksilaz (F3'5'H), sırasıyla naringenini dihidro-mirisetin, dihidro-kaempferol ve dihidro-kuersetin oluşturmak üzere katalize eder.

Flavanol sentaz, dihidroflavonoller flavonollere (kaempferol, kuersetin ve mirisetin) dönüştürür, bu da dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR) tarafından lükosiyanidinlere dönüştürülür, bu da lükosiyanidin dioksigenaz (LDOX) tarafından antosiyanidinler üretmek üzere katalize edilir. Antosiyanidinler ve lükosiyanidinler, sırasıyla lükosiyanidin redüktaz (LAR) ve antosiyanidin redüktaz (ANR) tarafından katalize edilerek proantosiyanidinlere dönüştürülür. Antosiyaninlerin modifikasyonu, glikozilasyon, metilasyon ve asilasyon dahil olmak üzere vakuoler antosiyaninlerin stabilizasyonundan sorumludur [201].

### **2.10.3 Flavonoidlerin farmakolojik özellikleri**

#### **2.10.3.1 Flavonoidlerin anti-oksidan özellikleri**

Antioksidan terimi bilimsel literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntemlere bağlı olarak birden fazla şekilde tanımlanabilir. Bu nedenle, Halliwell ve Gutteridge [202], antioksidanı "hedef moleküle oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde" olarak tanımlamayı önermiştir. Bu tanımın da işaret ettiği gibi, bu bileşiklerin fizyolojik rolü, serbest radikallerin dahil olduğu kimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak hücresel bileşenlere zarar gelmesini önlemektir.

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, farklı matrislerdeki sabit rollerine ve yapılarındaki hidroksil gruplarının konumuna ve sayısına bağlıdır. Antioksidan aktivite mekanizmaları başlıca altı süreci içerir [203]: (1) ROS'un doğrudan uzaklaştırılması: *İn vitro* olarak, flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, hidroksil gruplarının düzenlenmesine bağlıdır. B-halkasındaki ortodihidroksi yapısı, flavonoid fenoksil radikallerinin elektron delokalizasyonuna katılmasına olanak tanır ve bu, B-halkasında bir elektronun yer değiştirmesine neden olarak antioksidan aktivite sergiler. Bu yapılar antioksidan aktiviteyi artırır. Kateşin polimerlerinin polimerizasyonu yoluyla, moleküllerinde çok sayıda hidroksil grubu bulunması nedeniyle mükemmel antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, serbest radikal temizleme aktivitesinin, fenolik halkadaki çift bağlar ve hidroksil yan zincirleri ve antosiyanidinlerin glikozillenmesi yoluyla desteklendiği bulunmuştur. (2) Antioksidan enzimlerin aktivasyonu: Bazı flavonoidler, nitrik oksit sentaz ve ksantin oksidaz gibi serbest radikal üreten enzimlerin aktivitelerini baskılayabilir. Dahası, flavonoidler, faz II detoksifiye edici enzimlerin (örneğin, NAD(P)H-kinoon oksidoredüktaz, glutatyon

S-transferaz ve UDP-glukuronosiltransferaz) indüksiyonu dahil olmak üzere antioksidan enzimleri aktive eder ve bunlar, elektrofilik toksik maddelere ve oksidatif strese karşı ana savunma enzimleridir. (3) Oksidazların inhibisyonu: Flavonoidler, ksantin oksidaz (XO) ve süperoksit anyonunun üretimini katalize eden protein kinaz C aktivitelerini inhibe ederek antioksidan aktivite gösterir. Ayrıca, flavonoidler, siklooksijenaz, NADH oksidaz, mikrosomal monooksijenaz ve lipojenaz aktivitelerini inhibe edebilir. (4) Metal şelatlama aktivitesi: Hidroksiflavonlar, metal katyonlarla kompleksler oluşturabilir ve şelatlama özellikleri, hidroksil ikamelerinin sayısına ve konumuna bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. Belirli flavonoidler, redoks-aktif geçiş metal iyonlarının toksisitesini azaltabilir. Lesjak ve ark., kuersetin, kateşin ve rutin'in Fe (III)'e karşı yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur [204]. Çok sayıda flavonoid, karbonil grubu ile OH grupları arasında stabil metal kompleksleri oluşturabilir. Flavonoidler,  $\alpha$ -tokoferol radikallerine hidrojen donörü olarak işlev görür ve  $\alpha$ -tokoferol radikalleri ile etkileşime girerek LDL oksidasyonunu geciktirme potansiyeline sahiptir. Torello ve ark. (2021), çeşitli flavonoidlerin (örneğin, kuersetin, epigallokateşin galat ve naringin) *in vitro* olarak LDL oksidasyonuna karşı güçlü inhibitör aktivite gösterdiğini bildirmiştir [205]. (6) Nitrik oksitin neden olduğu oksidatif stresi hafifletmek. NO, kan damarlarının genişlemesini sürdürmede önemli bir rol oynar ve NO kaybı, damar sisteminde oksidatif strese neden olur. Flavonoidler, indüklenabilir NOS ekspresyonunu inhibe ederek birkaç lipopolisakkaritle aktive edilmiş hücrede NO üretimini inhibe edebilir.

#### **2.10.3.2 Flavonoidlerin pro-oksidan özellikleri**

Fenolik asitler, flavonoidler ve flavonoid olmayanlar gibi birçok diyet fenolik bileşiği, hatta C vitamini ve E vitamini gibi antioksidan vitaminler, belirli koşullar altında prooksidan hâline gelebilir ve dolayısıyla diğer bileşiklerin oksidasyonunu teşvik edebilir [206].

Prooksidan aktivitenin, bir flavonoid molekülündeki toplam hidroksil gruplarının sayısı ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir [207]. Mono- ve dihidroksiflavonoid serileri, tespit edilebilir bir prooksidan aktivite göstermemişken, özellikle B-halkasında bulunan birden fazla hidroksil grubu, Fenton reaksiyonunda hidroksil radikallerinin üretimini önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca, flavonların 2,3-çift bağı ve 4-okso düzenlemesinin, oksijen varlığında iki değerlikli bakır tarafından indüklenen ROS oluşumunu teşvik edebileceğine dair kanıtlar vardır. Flavonoid prooksidan

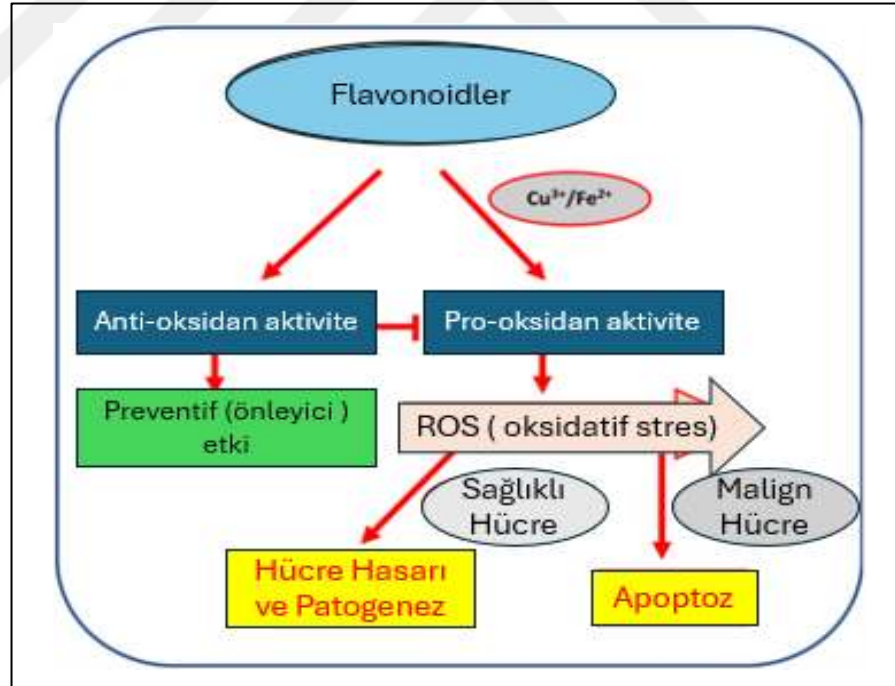
fonksiyonunun, diğer yararlı fonksiyonlarına bağlı olabileceği mümkündür. Örneğin, epigallokateşin galat, apoptozu teşvik eder ve bakterisidal aktiviteye sahiptir; bu, O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmek üzere indirgenmesi yeteneğiyle ilişkilidir [208].

Flavonoidlerin olası prooksidan etkileri, serbest geçiş metal iyonları oksidasyon süreçlerine dahil olduğunda özellikle *in vivo* olarak önemli olabilir. Flavonoidler, Cu(II)'yi Cu(I)'ye indirgeme yeteneğine sahiptir ve bu da serbest radikallerin oluşumunu mümkün kılar. Sağlıklı bir insan vücudunda metal iyonları, serbest radikal reaksiyonlarını katalize edemeyecek formlarda (örneğin ferritin veya seruloplazmin içinde) büyük ölçüde tutulmuş gibi görünmektedir. Ancak, doku yaralanmaları demir veya bakır salınmasına neden olabilir ve aterosklerotik lezyonlarda katalitik metal iyonları ölçülmüştür [209]. Bu durumlarda flavonoidlerin prooksidan olarak hareket etme potansiyeli göz ardı edilemez. Ayrıca kanser hücrelerinde de demir ve bakır iyonlarının daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu da flavonoidlerin hücre içi ROS'u artırarak prooksidan etki mekanizmasıyla anti-kanser etki gösterebileceğinin kanıtıdır [210].

Flavonoidlerin prooksidan özellikleri, konsantrasyona da bağlı gibi görünmektedir. Örneğin, Yen ve arkadaşları [211], insan lenfositlerinde kuersetin, naringenin, hesperetin ve morinin prooksidan özelliklerini izlemişlerdir. Flavanonlar naringenin ve hesperetin 0–200 µM aralığında eklendiğinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu tespit edilemezken, flavonoller kuersetin ve morin sırasıyla 25–200 µM ve 125–200 µM aralığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunu artırmıştır. Süperoksit anyon radikalinin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumu, her bir flavonoidin artan konsantrasyonu ile birlikte arttığı ayrıca bu bileşiklerin komet testi ile belirlendiği üzere, konsantrasyona bağlı olarak DNA iplik kırılmalarını indükleyebildiği bulunmuştur [211].

Flavonoidler, DNA tek iplik kırılmalarını da indüklerler. Yamashita ve arkadaşları, kuersetin tarafından neden olunan yerleşik DNA hasarının mekanizmasını çözmüşlerdir. A veya B halkasındaki katekol grubu, DNA'ya bağlanmış bir Cu(II) iyonu tarafından oksitlenir, bu da DNA hasarından sorumlu ROS üretebilir [212]. Buna karşılık, kaempferol ve luteolin, Cu(II) varlığında bile çok az DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur. Poliifenolik flavonoidler tarafından nükleer antioksidan savunmanın (GSH ve GST) bozulması, mutajenitelerinden sorumlu olabilecek oksidatif DNA hasarına yol açabilir [213].

Görünüşe göre belirli bir flavonoidin prooksidan veya antioksidan özellikleri, en çok konsantrasyonuna bağlıdır. Ancak, pro-oksidan özelliklerini yalnızca toksik olarak görmek yanıltıcıdır. Flavonodiler geçiş metallerinin varlığında hücre içi oksidatif stresi artırarak malin tümör hücrelerinin apoptoza uğramasına da sebep olmaktadır (Şekil 2.17). Prooksidan özellikleri, flavonoidlerin hücre işlevlerinin koordinasyonuna katkıda bulunduğu bir hücre sinyalizasyonu ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenle, flavonoidler yalnızca antioksidan olarak değerlendirilemezler, çünkü belirli reaksiyon koşullarında prooksidan aktivite de sergileyebilirler. Bu beklenmedik davranış, bazı flavonoidlerin *in vivo* olarak gözlemlenen toksisitesini kısmen açıklayabilir. Ancak, pratikte prooksidan etkiler de faydalı olabilir, çünkü hafif bir oksidatif stres derecesi uygulayarak, antioksidan savunmaların ve biyotransformasyon enzimlerinin seviyeleri yükseltilir ve bu da genel sitoproteksiyona yol açar [214]. Flavonoidlerin *in vivo* olarak ne ölçüde anti- veya prooksidan olarak hareket edebildiği hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konu açıkça daha fazla araştırma gerektirmektedir. Açıklanabilmiş etkileri Şekil 2.17’de gösterilmiştir.



Şekil 2.17 : Flavonoidlerin anti-oksidan ve pro-oksidan etkilerinin özetini [215].

## 2.10.4 Flavonoidler ve apoptoz

### 2.10.4.1 Apoptoz

Apoptoz, bir dizi sinyal iletim kaskadı ve hücresel proteinler tarafından düzenlenen ve sistemli bir şekilde organize edilmiş bir süreçtir. Genetik olarak belirlenmiş hücrelerin ortadan kaldırılmasını içeren ayırt edici ve önemli bir “programlanmış” hücre ölümü modu olarak tanınmış ve kabul edilmiştir [216]. Apoptoz, normal gelişim ve yaşlanma süreçlerinde ve dokulardaki hücre popülasyonlarını dengelemek için homeostatik bir mekanizma olarak çalışır. Ayrıca, bağışıklık tepkilerinde veya hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da meydana gelir. Kanseri, AIDS, diyabet ve Parkinson sendromu gibi birçok diğer hastalık, apoptoz yollarındaki dengesizlikler ve hatalı mekanizmalar sonucu ortaya çıkar. Bu nedenle, apoptoz mekanizmalarının ve ilgili yolların derinlemesine anlaşılması, hastalığın anlaşılmasına katkı sağladığı gibi hastalık tedavisinde de önemlidir [216].

#### *Apoptotik Proteinler*

Apoptotik proteinlerin sınıflandırılması, esas olarak apoptozdaki rollerine bağlıdır. Pro-apoptotik proteinler, protein ailelerine bağlı olarak (1) kaspazlar ve (2) Bcl-2 ailesi olmak üzere sınıflandırılırlar: Kaspazlar, aspartat-spesifik sistein proteazlarıdır [217] ve apoptozun indüksiyonunda kilit bir rol oynar ve genellikle inaktif heterodimerler olarak bilinen prokaspazlar şeklinde bulunurlar. Yapılarına ve işlevlerine göre sınıflandırılmış 14 bilinen kaspaz proteini vardır. Bcl-2 ailesi ise, programlanmış hücre ölümü yoluyla hücre davranışını düzenler. Mitokondrinin dış zarında yer alan bu protein ailesi, esas olarak sitokrom c'nin salınımını modüle eder. Bcl-2 protein ailesi, BH3 bölgesinin varlığı ile yapısal olarak ayırt edilir. Bcl-2 ailesi, çoklu bölge içeren Bax/Bak aracılığıyla apoptozu indükleyebilir veya Puma, Noxa, Bim, Bad, Smac/Diablo, Htrta/Omi, Arts gibi yalnızca BH3 ailesine ait anti-apoptotik proteinleri inhibe eder [218].

#### *Apoptotik Yolaklar*

Apoptoza katkıda bulunan iki ana yolak vardır. Birincisi, dıştan (ekstrinsik) kaynaklanan/ölüm reseptörü ile indüklenen yolak, ikincisi ise mitokondriyal stresin dahil olduğu içsel (intrinsik) yolaktır. Dıştan kaynaklanan yolda, sinyal iletim kaskadının aktivasyonu, Fas ve TNF gibi üçlü ölüm ligandlarına ölüm sinyallerinin

bağlanması yoluyla gerçekleşir. Bir hücre dışı ölüm sinyali alındığında, ölüm reseptörlerinin iç zar FADD/TRADD bölgelerine bağlı başlatıcı prokaspazlar-8 ve -10 aktive olur ve bu da bir DISC kompleksinin oluşumu ile sonuçlanır ve böylece sinyal iletim kaskadı devam eder. Ardından aktive olan kaspaz-3, yalnızca BH3 domaini içeren Bid proteini aracılığıyla mitokondriyal amplifikasyon döngüsünü aktive eder, bu da dıştan kaynaklanan ve içsel yollar arasında bir bağlantı görevi görür.

Mitokondriyal membranda yer alan aktif bir form olan t-Bid, pro-apoptotik çoklu domain Bcl-2 proteinleri Bax ve Bak'ı aktive ederek içsel kaskaddan sorumludur. Aktive Bax ve Bak, mitokondriyal zar potansiyelinin değişimi ve gözeneklerin oluşumu yoluyla mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin artmasına aracılık eder ve sitokrom c'nin salınmasıyla sonuçlanır. Sitokrom c, Apaf 1 proteini ve prokaspaz-9, bir apoptozom oluşturur ve kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptotik kaskadı artırır. İçsel yolak, ayrıca oksidatif stres, hipoksi, artmış hücre içi kalsiyum iyonları konsantrasyonu, enfeksiyon veya Bax ve Bak'ı da uyaran pro-apoptotik Bad proteinini engelleyen büyüme faktörlerinin çekilmesi yoluyla içsel olarak aktive edilebilir. Bax ve Bak'ın aktivasyonu, anti-apoptotik proteinler Bcl-xL ve Bcl-2'nin inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşir [219].

Sitokrom c, ER yüzeyindeki inositol 1,4,5 fosfat aktivasyonu yoluyla  $Ca^{2+}$  iyonlarının salınmasını etkiler ve bu da mitokondriye  $Ca^{2+}$  birikmesine yol açarak mitokondriyal stresi ve gözenek oluşumunu artırır. Artan hücre içi  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonu ayrıca çekirdek ve hücre zarlarının parçalanmasını hedefleyen hücre içi bir endonükleaz olan kalpainin aktivasyonunu tetikler. Kaspaz-3'ün mitokondriyal döngü amplifikasyonundaki işlevine ek olarak, kaspaz-3 aynı zamanda DNA onarım süreci ile ilişkili olan PARP'yi inhibe eden ve parçalayan bir infaz kaspazı olarak kabul edilir. Daha önce bahsedilen reaksiyonlar/yollar, hücre büzülmesi ve kabarcıklaşma, apoptoz cisimciklerinin oluşumu ve fagositik hücrelerin saldırmasını sağlayan fosfatidil serin "Annexin V" tarafından etkilenen zar değişiklikleri gibi karakteristik fizyolojik ve morfolojik değişikliklere yol açar. Buna göre, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, nükleer zarın bozulması ve mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ile birlikte yüksek ATP tüketimi gibi değişiklikler de dahildir [220] [221].



#### 2.10.4.2 Kanser tedavisinde öne çıkan apoptotik flavonoidler

Son zamanlarda, bitki bazlı kanser tedavisi, dünya genelinde oldukça aktif bir araştırma alanı olmuştur. Bitki ekstraktlarının, apoptotik yolları modüle ederek çeşitli kanser türlerinin tedavisinde güçlü adaylar olduğu kanıtlanmıştır. Ana mekanizma, apoptotik proteinlerin içsel ve dışsal olarak aktivasyonunu, ROS seviyesinin yükseltilmesini ve DNA hasarının indüklenmesini içerir. Doğal yollarla elde edilen fitokimyasalların içindeki etken maddelerin apoptotik yolları aktive etme yoluyla gösterdikleri anti-kanser etkiler de halen çalışmalarla gösterilmektedir. Sıklıkla çalışılan bazı flavonoidlerin anti-kanser etkileri ve mekanizmaları Tablo 2.3'te gösterilmiştir [222, 223].

**Tablo 2.3 :** Flavonoid tiplerinin kanser hücrelerindeki apoptoz mekanizmaları. (Oklar yukarı yönde ve aşağı yönde regülasyonunu temsil etmektedir.)

| Flavonoid Türü         | Kanser Hücre Tipi                     | Apoptoz Mekanizması                                                     |
|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hesperetin</b>      | • Mide kanseri hücre hattı            | • sitokrom c, APAF-1, kaspaz-3 ve -9 ve Bax/Bcl-2 ↑                     |
|                        | • HT-29 (Kolorektal)                  | • Fas, FADD ligand, kaspaz-9 ↑                                          |
|                        | • MCF-7, MDA-MB-231 (Meme)            | • p53, Bcl-2 ↑                                                          |
|                        | • Pc3 (Pankreas)                      | • Pro-apoptotik gen ekspresyonu                                         |
| <b>Naringenin</b>      | • SGC-7901 (Serviks)                  | • p53, PARP, kaspaz-3, Bax/Bcl-2 sitokrom-c, AIF/Endo-G mobilizasyonu ↑ |
|                        | • A431, HepG2 (Epidermoid, Karaciğer) | • kaspaz-3 ↑                                                            |
|                        | • MCF-7 (Meme)                        | • p53, kaspaz-3, -8 ve -9, PARP, Bax ↑                                  |
|                        | • SiHa (Serviks epitel)               | • Fas/FasL ↑                                                            |
| <b>Epikateşin</b>      | • HCT-116 (kolon), renal tübüler      | • Pro-apoptotik etki ↑                                                  |
| <b>Epigallocateşin</b> | • HCT-116 (kolon), renal tübüler      | • Pro-apoptotik etki ↑                                                  |

**Tablo 2.3 (devam):** Flavonoid tiplerinin kanser hücrelerindeki apoptoz mekanizmaları.

| Flavonoid Türü                | Kanser Hücre Tipi               | Apoptoz Mekanizması                                      |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Epikateşin<br>Epigallocateşin | • Prostat karsinomu             | • TRAIL aracılı apoptoz ↑                                |
|                               | • NSCLC (Küçük hücreli akciğer) | • kaspaz-3 ↑                                             |
|                               | • T47D (meme)                   | • Bax/Bcl-2, p53, p21, kaspaz-3,9 PTEN,PI3K, AKT, Bcl-2  |
|                               | • MDA-MB-468, MDA-MB-231(meme)  | • p21 ve p27 , Ki-67                                     |
|                               | • HT-29 (kolorektal)            | • Akt, ERK1/2 veya p38 MAPK ↓                            |
| Kersetin                      | • 293T (böbrek)                 | • Bax/Bcl-2, kaspaz-3 sitokrom c                         |
|                               | • A549 (akciğer)                | • Bcl-Xl ↓                                               |
|                               | • MCF-7 (meme)                  | • Bax ↑, kaspaz-3, Bcl-2,                                |
|                               | • HL-60 (lösemi)                | • Cox-2, kaspaz-3, Bax ↑, Bad, Bcl-2, sitokrom c ve PARP |
|                               | • LNCaP (prostat)               | • PI3K/AKT ↓                                             |
| Kamferol                      | • MDA-MB-453 (meme)             | • P53 ↑                                                  |
|                               | • OVCAR-3 (over)                | • kaspaz-3, kaspaz-7, p53, Bax, Bad ↑, Bcl-xL ↓          |
|                               | • HeLa (Uterus)                 | • Bax/Bcl-2 ↑                                            |
| Apigenin                      | • PC-3, DU145 (prostat)         | • HDAC enzimatik aktivite , BAX ↑                        |
|                               | • SCC25, A431 (epidermoid)      | • ↑ROS , ↓glutasyon, TNF-R ve TRAIL-R ↑                  |

**Tablo 2.3 (devam):** Flavonoid tiplerinin Kanser Hücrelerindeki Apoptoz Mekanizmaları.

| Flavonoid Türü | Kanser Hücre Tipi                          | Apoptoz Mekanizması                      |
|----------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Krisin</b>  | • HeLa (Uterus)                            | • DNA fragmentasyonu, p38 ve NF-κB/p65 ↑ |
|                | • U937 (histiyokistik lenfoma)             | • kaspaz-3, PLC-1 degradasyonu ↑         |
|                | • A549 (akciğer)                           | • TRAIL ↑                                |
|                | • HepG2, QGY7701 (karaciğer)               | • p53, Bax, kaspaz-3, -8, -9             |
|                | • HCT-116 (kolorektal), CNE1 (nazofarenks) | • TRAIL ↑                                |

#### 2.10.5 Flavonoidler ve bağışıklık sistemi

Bağışıklık sistemi, insan vücudunu hastalıklardan, enfeksiyonlardan ve hasarlı hücrelerden koruyarak sağlığı sürdürmek ve yaşam süresini uzatmak için gerekli organlardan, metabolik ve hücresel süreçlerden oluşur. Son zamanlarda, COVID-19'un çalışmalarının sonuçları göstermiştir ki; bağışıklık yanıtı zayıf olan kişiler, yaşlılar, kanser hastaları ve organ nakli hastaları gibi kişilerde bu hastalık daha fazla morbidite ve mortaliteye neden olmuştur. Ancak, sürekli bir bağışıklık yanıtı da vücuda zarar verebilir. Örneğin, otoimmün hastalıklar, bağışıklık toleransının kaybı ile başlar ve T- veya B-hücrelerinin aktivasyonu yoluyla doku hasarına yol açabilir.

Son birkaç on yılda, birçok çalışma, doğal bileşiklerin bağışıklığı düzenleyerek çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur [224]. Bunlar arasında flavonoidler doğada yaygın olarak bulunur ve antiviral, antienflamatuvar, antikanser ve antioksidan dahil olmak üzere geniş biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu biyolojik aktiviteleri nedeniyle, flavonoidler, kimyasal katkı maddeleri yerine taze ve bozulabilir gıdaların korunmasında kullanılmıştır. Ayrıca, birçok çalışma, flavonoidlerin potansiyel immünomodülatör aktiviteye de sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, flavonoidlerin bağışıklık düzenlemesindeki moleküler ve biyolojik mekanizması kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır.

Polifenollerin ve flavonoidlerin bağışıklık sistemi elemanlarına olan etkisi ve etkileşimleri literatürde uzun yıllardır çalışılmaktadır. Bu bölümde tezin konusuyla ilişkili olarak; özellikle bal ve arı ürünlerinin içeriğinde bulunan flavonoidlerin immünmodulator etkileri anlatılacaktır. Birçok kanıt, balın immünomodulator bir ajan olarak etkinliğini vurgulamıştır. Yaklaşık 20 yıl önce yayımlanan bir çalışmada, MM6 monositik hücre hattının manuka ve çayır ballarına maruz bırakılması, reaktif oksijen türleri (ROS) salınımında önemli bir azalmaya yol açmıştır. Bu azalma, proinflatuar sitokin olan TNF- $\alpha$  üretiminde önemli bir artışla birlikte gözlemlenmiştir. Balın immünomodulator etkilerini indüklemeye mekanizmasının, baldaki hidrojen peroksit seviyelerinin artmasından kaynaklandığı ve bunun MM6 hücreleri tarafından ROS salınımı üzerinde negatif geri bildirim etkisi yarattığı öne sürülmüştür [225].

Birçok kanıt, balda bulunan başlıca fenolik ve flavonoid bileşiklerin immünomodulator rolünü vurgulamıştır (Şekil 2.18). Örneğin, bir çalışmada kuersetinin, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) aktivasyonunu baskılayarak makrofajlar tarafından LPS kaynaklı TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 salınımını inhibe ettiği bulunmuştur [226]. Benzer şekilde, fare dendritik hücrelerinin kuersetin ile tedavi edilmesi, proinflatuar sitokinler ve kemokinlerin üretiminde azalmaya yol açmıştır. Bu, MHC II ve kostimulator moleküllerin ekspresyon seviyelerinde bir azalma ile birlikte gerçekleşmiş ve T hücrelerinin aktivasyonunu engellemiştir [227]. İnsan mast hücrelerinde Fc epsilon R I (Fc $\epsilon$ RI) tetiklenmesinden sonra veya alerjik olmayan IL-6 bağımlı yollar aracılığıyla IL-6 salınımı, kuersetin ile etkili bir şekilde inhibe edilebilmiştir. Bununla birlikte, insan periferik kan mononükleer hücrelerinin kuersetin ile tedavisinin, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ekspresyonunu ve sentezini tercihli olarak indüklerken IL-4 üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Veriler, kuersetinin farklı şekilde Th1 hücrelerini aktive edebileceğini ve böylece bu flavonoidin antitümör etkisi için olası bir mekanizma sağladığını göstermiştir [227]. Kuersetinin immünomodulator etkisi, farklı otoimmün hastalık durumlarında da incelenmiştir. Bir çalışmada, multipl skleroz hastalarından izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC'ler) kuersetin ile tedavisi, bu hücrelerin çoğalmasında bir azalmaya ve TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  sitokinlerinin salınımında bir düşüşe neden olmuştur [228]. Benzer şekilde, kuersetinin TNF- $\alpha$  sekresyonunu baskıladığı ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) modelinde hastalığın başlangıcını engellediği

gösterilmiştir. Son olarak, deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde, kuersetin Th1 farklılaşmasını engellemiştir. Mevcut kanıtlara dayanarak, kuersetinin geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olduğu görülmektedir; bu aktiviteler arasında antienflamatuar, antiviral, antioksidan ve antikarsinojenik etkiler bulunmaktadır [229].

Diğer polifenollerin de immünomodülatör aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Luteolin, ERK ve p38'in aktivasyonunu azaltarak LPS kaynaklı fare makrofajlarında proinflamatuar sitokinlerin gen ekspresyonunu ve TNF- $\alpha$  salınımını inhibe etmiştir. Benzer şekilde, luteolin, TNF- $\alpha$  sekresyonunu ve fare makrofajlarında STAT1, STAT3 ve siklooksijenaz 2 (COX-2) aktivasyonunu engellemiştir. Luteolin ayrıca, NF $\kappa$ B aktivasyonunu ve bağırsak epitel hücreleri ve RAW 264.7 hücreleri ile ortak kültürde TNF- $\alpha$  sekresyonunu baskılamıştır. Ayrıca, fare ve insan otoimmün T hücrelerinin proliferasyonunu ve IFN- $\gamma$  üretimini inhibe edebilmiştir. Hastalık modellerinde, astımlı farelerin luteolin ile 8 hafta boyunca tedavi edilmesi, nötrofil ve eozinofil sayılarında bir azalmaya ve IL-4 salınımının baskılanmasına yol açmıştır [230],[231].

Apigenin tedavisinin, NF $\kappa$ B luciferaz transgenik farelerin akciğerlerinde LPS kaynaklı luciferaz ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Bir kolit modelinde, apigenin inflamasyonu azaltmış ve bu, kolonik hasar skorunun düşmesiyle birlikte gerçekleşmiştir. Ayrıca, apigenin tedavisi, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve CC kemokin ligand 2 (CCL-2) inflammatuar markerlerinin ekspresyonunu normalleştirmiştir. Fare astım modelinde, apigenin uygulanması, ovalbumin (OVA) ile indüklenen eozinofillerin ve Th17 hücrelerinin artışını inhibe etmiştir. Apigenin ve luteolinin birleştirilmesi, fare ve insan otoimmün T hücre yanıtlarını inhibe etmiş ve bu da farklı flavonoid bileşiklerin antienflamatuar aktivitelerinin istenmeyen bağışıklık yanıtlarını kontrol altına almak için birleştirilebileceğini düşündürmüştür [232, 233].

Krisin'in de LPS kaynaklı PBMC'lerde proinflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Oral krisin uygulaması, IBD taşıyan farelerin kolon dokularındaki hücre kültürü süpernatantlarında IL-6 ve IL-1 $\beta$  salınımını azaltmıştır. Ek olarak, krisin tedavisi, fare nötrofillerindeki miyeloperoksidaz aktivitesinde önemli bir azalmaya yol açmıştır. Deneysel otoimmün nörit (EAN) modelinde, belirtilerin başlangıcında başlayan oral krisin tedavisi, hastalığın klinik seyrinin şiddetini ve süresini hafifletmiş ve siyatik sinirlerin inflammatuar hücre infiltrasyonu ve demiyelinizasyonunu

azaltmıştır. Krisin'in anti-enflamatuar bir ajan olarak etkinliği, deneysel otoimmün üveit, atopik dermatit ve ilaç kaynaklı pulmoner fibroz gibi diğer hastalık modellerinde de gösterilmiştir [234, 235, 236].

Bir izoflavon bileşiği olan genistein, monositlerde LPS kaynaklı NFκB aktivasyonunu da inhibe edebilmiştir [230]. Benzer şekilde, galanginin, IκBα'nın parçalanmasını ve p65 NFκB'nin translokasyonunu durdurduğu ve mast hücrelerinde TNF-α, IL-6, IL-1β ve IL-8 gen ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur. Polifenol olan kafeik asidin, TLR4 yolunu ve LPS kaynaklı NFκB aktivasyonunu baskıladığı da gösterilmiştir. Buna karşılık, flavanol bileşiği olan kateşinin immün uyarıcı aktiviteleri olduğu ve fare splenositlerinden IFN-γ, IL-12 ve IL-2 salınımını indüklediği ve makrofajların CD80 ve CD86 kostimülör proteinlerin ekspresyonunu artırarak antijen sunma kapasitesini aktive ettiği gösterilmiştir [237, 238].

Bal polifenollerinin kanserle savaşta immünomodülatör rolü de birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, luteolin, tümör mikroçevresinde tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ler) toplanmasında yer alan CCL2 kemokin salgısını baskılamıştır. Bu, Lewis akciğer karsinomu hücrelerinin göçünün inhibisyonu ile birlikte olmuştur. Apigeninin, A375 melanoma hücrelerinde IFN-γ aracılı STAT1 aktivasyonunu inhibe ettiği ve böylece PD-1/PD-L1 aracılı anti-tümör bağışıklık yanıtlarının inhibisyonunu hafiflettiği bulunmuştur. Apigenin tedavisi, DC'lerde PD-L1 ekspresyonunu azaltmış ve böylece konakçı T hücre bağışıklığını artırmıştır. Benzer şekilde, kuersetinin PD-1/PD-L1 etkileşimini engellediği gösterilmiştir. Genistein'in, M2 polarize makrofajları ve IL8/STAT3 sinyal yolunu bozarak SKOV3 ve OVCA-3R over kanseri hücrelerinin kök hücre özelliklerini inhibe ettiği bulunmuştur. Bir melanoma modelinde, oral krisin tedavisi, 14 ve 21 günlük tedavi sonrasında tümör büyümesini sırasıyla %60 ve %70 oranında baskılamıştır. Bu, sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinin öldürme aktivitesinde bir artışla birlikte olmuştur. Benzer şekilde, krisin tedavisi, lösemik BALB/c farelerinden izole edilen splenositlerde NK hücrelerinin sitotoksitesini artırmıştır. Bu bulgular, çeşitli flavonoid bileşiklerinin prelinik kanser modellerinde anti-tümör bağışıklık yanıtlarını artırmadaki etkinliğini doğrulamakta ve bu etkilerden muhtemelen birden fazla mekanizmanın sorumlu olduğunu düşündürmektedir [239-241].



Kanser hücrelerinin karakteristik özelliği, normal hücrelerden daha hızlı büyüme yetenekleridir. Çoğu kemoterapi ajanı, bu hızlı büyüyen hücreleri hedef alacak şekilde tasarlanmıştır ve bu hücrelerin büyümesini engeller, öldürür veya yavaşlatır. Bununla birlikte, bu kemoterapi ilaçları normal sağlıklı hücreleri de olumsuz etkiler veya öldürür. Bu nedenle, hasta ciddi yan etkiler yaşar ve tedavi etkinliği azalır veya sınırlanır. Karsinogenez, çeşitli moleküler mekanizmalar ve sinyal molekülleri aracılığıyla ilerler. Kanser kemoprevensiyonu, kanserogenezi durdurmak veya kesin moleküler sinyal mekanizmalarını yenmek için doğal ve yapay araçlar kullanmayı teşvik eder [245]. Bu araçlar esasen bloke edici ve baskılayıcı ajanlar olarak ikiye ayrılır. Tıbbi bitkilerden türetilen bileşiklerle yapılan kemoprevensiyon, beslenme aracılığıyla önleme üzerine yoğunlaşan gelişmiş bir kanser araştırma alanıdır. Temel bir biyolojik gözlemden klinik olarak etkili antikanser bileşenlere veya ajanlara kadar bir kemopreventif ajan geliştirmek zordur. Kemoprevensiyon süreci her zaman güvenli ve uzun vadeli olmalı ve kullanılan bileşikler, sağlıklı ve yaşlı hastalarla birlikte komorbiditeleri olan hastalar için uzun süreli kullanım için uygun olmalıdır.

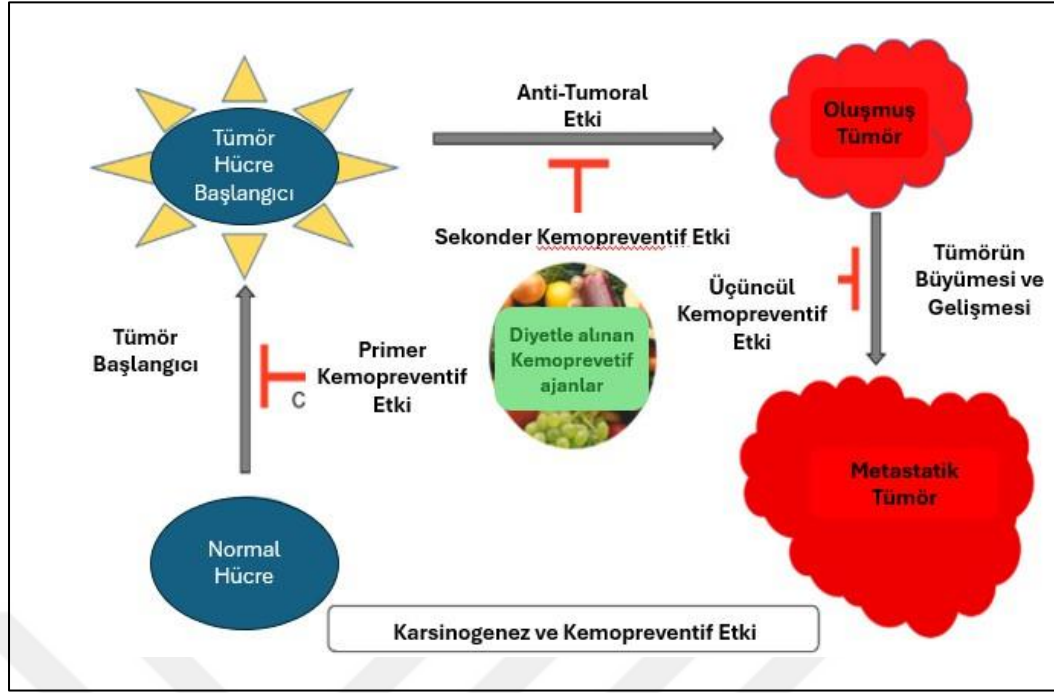
Birçok epidemiyolojik çalışma, düzenli meyve ve sebze tüketiminin birçok kanserin görülme olasılığını önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir [246]. Tıbbi bitkilerden veya bitkisel diyetlerden elde edilen biyoaktif bileşikler, diyet fitokimyasalları son zamanlarda kanser kemoprevensiyonunda önemli rollerini göstermiştir ve bu da kanser önleme ve tedavisinde yeni ve alternatif bir yöntem geliştirilmesine yol açmıştır. Birçok fitokimyasalın olası kanser kemopreventif etkilerini araştırmak için klinik deneyler yapılmıştır [247]. Wattenberg, 1985 yılında kemopreventif ajanları, karsinojen oluşumunun inhibitörleri, bloke edici ajanlar ve baskılayıcı ajanlar olarak sınıflandırmıştır. İlk tür, karsinojenin öncülerden oluşmasını önler, ikinci tür ise karsinojenle indüklenen mutasyonları, belirli metabolik karsinojen aktivasyon yollarını engelleyerek, belirli reaktif oksijen türlerini (ROS) yakalayarak kanser hücrelerinin oluşmasını engeller ve ayrıca detoksifikasyon sürecini artırır [248]. Ayrıca sekonder kemoprevensiyon son yıllarda dikkat çeken immuno-modulatör etkiyi de içerir. Bu etki ile tümör henüz başlangıç evresindeyken immün sistem elemanları tarafından tespit edilip büyümesi durdurulur. Son olarak, üçüncü tür ise, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını durdurarak ve apoptoz, otofaji, nekroz vb. yoluyla tümör ilerlemesini önler. Üçüncül etki genellikle pro-oksidan mekanizma ile gerçekleşir. Bitkisel kökenli biyoaktif bileşiklerin çoğu, kanser gelişim sürecini bu



yolların herhangi biriyle engeller. Kemopreventif bileşiklerin, konvansiyonel kemoterapi ilaçlarının etkinliğini artırdığı da gösterilmiştir. Kansere kemoprevensiyonunun önemli amacı, erken evre kanser riskini azaltmak ve tümörlerin ikincil yayılmasını önlemektir [249].

Kanser karşıtı kemoterapilerin en büyük dezavantajlarından biri, sürekli tedaviler sırasında gelişen dirençtir. Bitkisel ürünlerin geleneksel kanser karşıtı ilaçlarla birlikte kullanıldığına dair bazı raporlar mevcuttur ve sonuçlar, bu bitkisel kombinasyonların, kanser karşıtı kemoterapötik ilaçların sürekli kullanımı sonrasında ortaya çıkan kemoterapi direncini yeniden duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Bu nedenle, bitkisel ürünlerin kanser karşıtı ilaç konjugatlarıyla yapılan kombinasyon tedavileri iyileşme etkinliğini artırır ve istenen tedavi sonuçlarını elde eder. Diyet fitokimyasalları kemoprevensiyon sürecinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu kanser önleme fikri, bitkilerdeki çeşitli kimyasal bileşenler, kimyasalların karmaşık yapısı, karakteristik biyolojik etkiler, maliyet etkinliği, kolay erişilebilirlik ve azaltılmış veya daha az toksik yan etkiler nedeniyle artan bir araştırma odağı kazanmaktadır. Fitokimyasallar arasında polifenolik bileşikler, kanser tedavileri ve önleme sürecinde önemli bir rol oynar, çünkü kanseri başlatma, teşvik etme ve ilerleme aşamalarında engelleme işlevleri vardır [250].

Flavonoidlerin de dahil olduğu bitkisel polifenolik bileşikler, çeşitli yollar aracılığıyla kanser oluşum süreçlerini değiştirir ve etkinlikleri kullanılan doku tipine ve dozajlara bağlı olarak değişir. Polifenollerin rolü üzerine bazı klinik çalışmalar bildirilmesine rağmen, besleyici polifenolik bileşiklerin anti-kanserojenik rolleri genellikle *in vitro* ve *in vivo* modellerde çalışılmıştır. Yeşil çay ekstresinin güvenli dozlarının ileri evre kanserli hastalarda günde 4,2 g veya günde üç kez 1,0 g olduğu ve ileri evre akciğer kanseri olan hastalarda günde 3 g olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda gözlemlenen toksisite, doğrudan kafein (nörolojik ve gastrointestinal etkiler) dozlarıyla ilişkilendirilmiştir. Başka bir çalışma, moleküler biyobelirteçlerin ifadesine dayalı olarak yeşil çayın antikanser aktivitesini bildirmiştir. Günde 6 g/ml yeşil çay alımıyla karaciğer ve prostat kanseri hastalarında prostat spesifik antijen ve idrar 8-hidroksideoksiguanozin biyomarker düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir [251, 252].

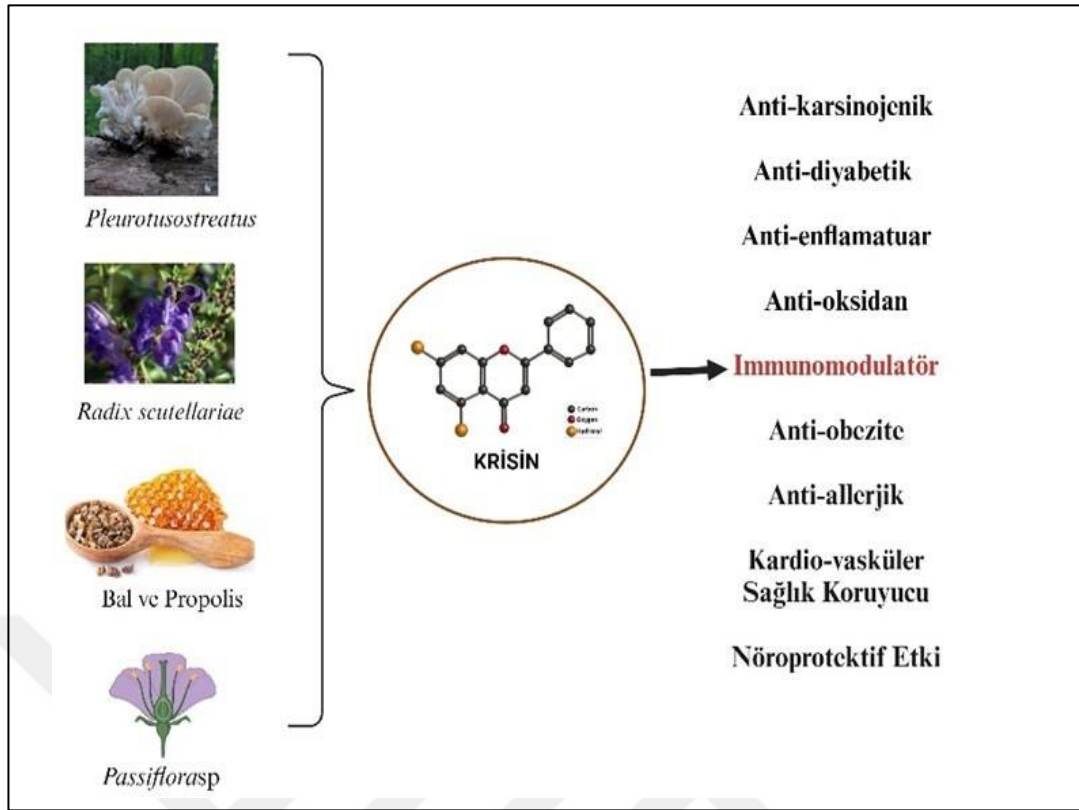


**Şekil 2.19 :** Karsinogenez evreleri ve kemoprevensiyon [253].

## 2.11 Krisin

Krisin ( $C_{15}H_{10}O_4$ ) birçok bitki özünde, özellikle de ekonomik değeri ve tıbbi etkisi büyük olan arı propolisi, mavi tutku çiçeği (*Passiflora caerulea*) ve bal gibi maddelerde bol miktarda bulunan bir diyet fitokimyasalıdır (Şekil 2.20) [254]. Diğer flavonoidlerin aksine, krisin terapötik faydaları mevcut literatürde hala gelişmekte olup, sınırlı biyoyararlanımı ve emilimi nedeniyle dikkat çekmektedir. Krisinin birçok biyolojik ve farmakolojik etkinliği vardır; bunlar arasında antioksidan [255], anti-inflamatuar, antibakteriyel [256], anti-hipertansif [257], anti-alerjik [258], vazodilatör [259], anti-diyabetik [260], anti-anksiyete [261], antiviral [262], anti-östrojen [263], karaciğer koruyucu [264], anti-aging [265] ve anti-kanser etkileri [266] bulunduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Şekil 2.20). Krisinin anti-inflamatuar ve antioksidan etkilerinin gösterilmesi, ayrıca çeşitli insan ve sıçan hücre tiplerinde apoptozisi indükleyerek kanser önleyici aktivite sergilemesi anti-kanser potansiyeli açısından umut vaadedici olmuştur. Bu bileşiğin anti-kanser mekanizmalarına bakıldığında; kanser hücrelerinde mitokondriden sitokrom C salınımını kolaylaştırarak, kaspaz-3'ü aktive ederek, XIAP molekülünün aktivitesini inhibe ederek ve AKT fosforilasyonunu azaltıp PI3K yolunu tetikleyerek apoptozu indüklediği çalışmalarla kanıtlanmıştır [267].

İnsanlar üzerinde yapılan bir *in vivo* çalışma, oral yolla alınan krisinin (400 mg) düşük biyoyararlanıma sahip bir bileşik olduğunu göstermiştir; bu durum esas olarak gastrointestinal sistemdeki hızlı metabolizmaya bağlıdır. Doğal bileşiklerin metabolik yollarını araştırmak için mikrobiyal ve enzimatik dönüşümler kullanılır. Farmasötik öneme sahip flavonoid türevlerinin biyotransformasyon yoluyla elde edilmesi yaygın olarak bilinen ve bu bileşiklerin biyoyararlanımını artırmayı amaçlayan bir yöntemdir. Flavonoidlerin ana iskeletinde yapılan değişiklikler, biyolojik aktiviteleri üzerinde güçlü etkilere sahiptir. Liu ve ekibi [268], krisin, baikalin ve vagonin gibi türevlerinin sentezinden sorumlu olan flavon hidrolazları ve metiltransferazları içeren bir dizi enzim tespit etmiştir. İnsanlar ve farelerde krisin metabolizmasının iki baskın ürünü krisin-7-sülfat (C7S) ve krisin-7-glukuronid (C7G)'dir. Farelere oral olarak verilen krisinin (20 mg kg<sup>-1</sup>) C<sub>max</sub> değeri sadece 10 nmol L<sup>-1</sup> iken, sırasıyla C7S ve C7G için pik plazma konsantrasyonları 160 ve 130 nmol L<sup>-1</sup> olarak ölçülmüştür. Başka bir çalışmada, sağlıklı insan gönüllülere oral yolla 400 mg krisin verilmiş ve sonrasında C7S, krisin ile karşılaştırıldığında yaklaşık 30 kat daha yüksek AUC<sub>0-∞</sub> değerlerine ulaşmış ve dolayısıyla biyoyararlanımları artırılmıştır. İçinde yüksek miktarda polifenolik madde bulunduran fitokimyasalların düşük biyoyararlanımına rağmen belirli biyolojik hedeflere ulaşarak etkili olabilirler. Bu durum özellikle bağışıklık sistemiyle ilişkilendirildiğinde daha anlamlı hale gelir. Düşük biyoyararlanıma sahip bir anti-kanser ajanı, vücutta düşük konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen, bağışıklık hücreleri üzerinde güçlü bir modülatör etki yaratabilir. Bu etken madde, bağışıklık hücrelerini (örneğin, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler veya dendritik hücreler gibi) aktive ederek veya güçlendirerek vücudun kendi kanser hücrelerine karşı savunma mekanizmasını tetikleyebilir [269].



Şekil 2.20 : Krisinin terapötik aktiviteleri [270].

### 2.11.1 Krisin ve kanser

Kanserin moleküler biyolojisi üzerine büyük ilerlemeler kaydedilmiş olup, anti-kanser terapilerde çığır açan gelişmeler sağlanmıştır. Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi birçok çalışma, diyet fitokimyasalları ile kanser önlenmesi arasında bir ilişki önermiştir. Deneysel kanıtlar, birçok fitokimyasalın düşük toksisite ile anti-kanser aktivitesine sahip olduğunu göstermekte, bu da onları insanlarda kullanımı için güvenli kılmaktadır. Krisin flavonoidi, kanserde oksidan/antioksidan dengesini düzenleyen lipid peroksidasyonu ve antioksidanlar üzerinde durumunu iyileştirir [271]. Krisinin ana anti-kanser mekanizmaları, hücresel proliferasyonu baskılamayı, inflamasyonu azaltmayı ve apoptotik hücre ölümünü indüksiyonunu içerir. Ayrıca, krisin, tümör hücresi tarafından indüklenen anjiyogenezin etkin bir inhibitörü olabilir. Krisinin anti-kanser etkilerinin moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, bu bileşiğin kanser hücrelerinde apoptozisi mitokondriden sitokrom C'nin salınımını kolaylaştırarak, (2) kaspaz-3'ü aktive ederek ve XIAP molekülünün aktivitesini inhibe ederek, (3) AKT fosforilasyonunu azaltarak ve PI3K yolunu tetikleyerek indüklediği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Rauf ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, krisinin anti-tümör ve antioksidan etkinlikleri ile alerjik inflamasyon üzerindeki koruyucu etkileri kanıtlanmıştır [272]. Bu çalışmada,

reseptör-ligand kompleksinin in siliko analizi, krisinin COX-1 bağlanma yerine zayıf bir etkileşim gösterdiğini, ancak COX-2 bağlanma yerine dikkate değer bir etkileşim sergilediğini göstermektedir. Krisin uygulaması, lipid peroksidasyonu ve antioksidanların durumunu iyileştirerek karsinogenez sırasında oksidan ve antioksidan durumun homeostazını da düzenlemiştir [271]. Krisin, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak Notch1 sinyal yolunun aktivasyonu ile ilgili apoptoz yoluyla tümör büyümesini inhibe ettiği yapılan bir çalışma ile bulunmuştur [185]. İlginç bir şekilde, krisin takviyesinin ardından  $\beta$ -arrestin-2 ifadesindeki değişiklikler, çok yönlü bir sinyal molekülü, birçok sinyal yolunu etkiler [273]. Krisin ve sisplatinin kombinasyonu, HepG2 kanser hücrelerinin apoptozunu önemli ölçüde artırır. Krisin ve sisplatin kombinasyonu, ERK1/2'yi aktive ederek p53 gen ifadesini stabilize eder, bu da HepG2 hücrelerinde p53'ün fosforilasyonunu teşvik eder [274]. Krisin ayrıca, renal karsinogenez sırasında tümör teşvik edici ve inflamasyonla ilgili birçok biyobelirteci engellediği için renal karsinogenezin önlenmesinde potansiyel bir adaydır [275]. Sonuç olarak, anti-kanser etki mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda tüm bu çalışmalar krisinin tümör oluşumunu engelleme yerine tümör oluşumunu geciktirme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varmıştır fakat krisinin kemoprevensiyonun ikinci basamağı olan tümör oluşumunu engellemedeki [253] rolü yeterince iyi anlaşılamamıştır.

### 2.11.2 Krisin ve meme kanseri

Krisinin meme kanserindeki rolüne baktığımızda, bu etken maddenin hipoksi koşullarına (düşük oksijen koşulları) maruz kaldıkları 2 gün sonunda hayatta kalma oranlarını önemli derecede azalttığı, krisinin tümör mikroçevresini taklit eden stres koşullarında hücre canlılığını inhibe etme etkinliği gösterdiği bulunmuştur [276]. Yapılan başka bir çalışmada; MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini doza ve zamana bağlı olarak engelleyerek ve hücrelerde apoptozisi tetikleyerek antikanser etkili olduğu bildirilmiştir [277]. Krisinin TNBC hücrelerinin de göç ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığı ve bu etkinin doza bağlı olduğu gösterilmiştir. TNBC hücrelerinde e-kadherin ifadesini artırırken, vimentin, snail ve slug ifadelerini azaltmıştır. Bu sonuçlar, krisinin epitel-mezenkimal geçişte tersine çevirme etkisi olduğunu öne sürmektedir [212]. Krisin ve silibinin ilacının, doz ve zamana bağlı olarak tek başına kullanıldığında T47D meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe etmişlerdir. İki ilacın birleştirilmesi, meme kanseri hücre hattında büyüme

inhibisyonunu sinerjik olarak artırmıştır [278]. Krisinin MCF-7 ve BT474 hücrelerinde genomik stabiliteyi bozduğunu, hücre sağkalımını inhibe ettiği, MCF-7 hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına duyarlılığını artırdığı, DNA çift zincir kırığı onarımını bozduğu ve DNA hasarının birikimine yol açtığı da ortaya konmuştur [279].

### 2.11.3 Krisinin immünomodulatör etkileri

Krisinin bağışıklık sistemi üzerinde çeşitli biyolojik etkiler gösterdiğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır. Krisin konsantrasyona ve bulunduğu mikroçevreye bağlı olarak anti-inflamatuar aktiviteler sergileyerek immün-inflamatuar yanıtları baskılar. Birçok çalışmada, krisinin bağışıklık sistemi üzerindeki koruyucu etkileri ve moleküler mekanizmaları doğrulanmıştır [280]. Doğal öldürücü (NK) hücreler, virüs enfeksiyonuna ve tümör bağışıklık denetimine karşı ilk doğal hücresel yanıttır. Bu nedenle, tümör ve virüsle enfekte hücrelerin eliminasyonunda önemli olan doğal bağışıklık sisteminin kritik bir sitotoksik lenfosit tipidir. Aynı zamanda, esas olarak dendritik hücre ve makrofajın aktivitesini teşvik eden IFN- $\gamma$  gibi sitokinler üretirler. NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin modülasyonu ile ilgili olarak krisinin zıt etkileri tanımlanmıştır. Krisin, krisin ile tedavi edilen WEHI-3 lösemili BALB/c farelerinde izole edilmiş dalak hücrelerinde NK sitotoksitesini artırabilir. Ayrıca, başka bir çalışma, karın cerrahisinden önce krisin uygulamasının, cerrahi baskılanmanın NK hücre aktivitesini hafifletebileceğini göstermiştir [281]. Lin ve arkadaşlarının yaptığı *in vivo* çalışmaya göre, krisin, murin WEHI-3 hücre hattı kaynaklı lösemide T-hücresi (CD3), B-hücresi (CD19) ve makrofaj (Mac-3) yüzey işaretleyicilerinin seviyesini artırabilir [282]. Ancak, monosit işaretleyicisi (CD11b) seviyesi üzerinde herhangi bir önemli etkisi bulunmamaktadır. Diğer bazı çalışmalar, krisin, luteolin, apigenin ve baicalein gibi bazı flavonların insan astımında eozinofilik inflammatuar reaksiyonları inhibe edebileceğini öne sürülmüştür [283]. Ayrıca, histolojik çalışmalar krisinin hava yolu içinde inflammatuar hücrelerin infiltrasyonunu azaltabileceğini göstermiştir. Krisin, eozinofiller, nötrofiller, makrofajlar, lenfositler ve monositler üzerinde doza bağlı etkilere sahip olmuş ve bronkoalveoler lavaj sıvısında inflammatuar hücrelerin toplam sayısını da azaltmıştır [284].

Yapılan çalışmalar özellikle krisinin bağışıklık sistemi üzerindeki immünoregülatör ve anti-enflamatuar özelliklerini vurgulamaktadır. Çoklu muhtemel biyolojik aktivitelere ve immün-modüle edici özelliklere, aynı zamanda antioksidatif etkilere sahip oldukları görülmektedir [280]. Krisin, NF-kB'nin bir antagonistidir ve NF-kB, pro-enflamatuar

sitokinlerin (örneğin IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), indüklenabilir enzimlerin (örneğin COX-2 ve iNOS), adezyon moleküllerinin (örneğin ICAM, VCAM, E-selektin), kemokinlerin ve bazı akut faz proteinlerinin kodlandığı genlerin ifadesini kontrol eder. Tüm bunlar, bağışıklık sistemi ve nörodejeneratif hastalıklardaki çoğu inflamatuvar süreci kontrol etmede önemli roller oynar. Ayrıca, krisin, IgE seviyesini, hava yolundaki inflamasyon hücrelerini ve alerjik reaksiyonlarda, örneğin astımda, (Th1)T-bet/(Th2) GATA-3 oranını azaltabilir. Bir araya getirildiğinde, deneysel modeller krisin'in, bağışıklık sistemi sorunları olan hastaların önlenmesinde ve yönetiminde iyi bir aday olabileceğini göstermektedir [285]. 2022'de yayınlanmış tek bir çalışmada ise krisinin hepatoselüler tümörlerin ilerlemesini etkili bir şekilde engelleyebileceğini ve farelerde CD4/CD8-pozitif T hücre oranı ile birlikte farelerin anti-tümör bağışıklığını destekleyebileceği gösterilmiştir [286] .

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereçler

##### 3.1.1 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1’ de listelenmiştir.

**Tablo 3.1 : Cihaz listesi**

| Cihaz Adı                       | Marka                          | Kullanım Amacı                                                                                  |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hücre Kültürü Kabini (Class II) | Safe Fast Classic Faster Air   | Hücre kültürü deneyleri için kullanılmıştır.                                                    |
| Karbondioksit İnkübatörü        | ESCO-Panasonic                 | Hücrelerin büyütülmesi için kullanılmıştır.                                                     |
| Ters Işık Mikroskobu            | Novel                          | Hücre kültürü deneylerinde görüntüleme için kullanılmıştır.                                     |
| Floresan Mikroskop              | Cell Discoverer 7 (Carl Zeiss) | Apoptoz, ROS analizi ve Immunfloresan boyama deneylerinde kullanılmıştır.                       |
| Akış Sitometrisi                | BD FACS Canto II               | Apoptoz, ROS analizi, NK hücre analizleri için kullanılmıştır.                                  |
| Multiplaka Okuyucu              | Thermo Varioskan               | Fotometrik ve Florometrik absorbans okumaları için kullanılmıştır.                              |
| Elisa Okuyucu                   | Thermo Multiskan FC            | ELISA deneylerinde absorbans okumaları için kullanılmıştır.                                     |
| ELISE plaka Yıkayıcı            | Thermo WELLWASH                | ELISA deneylerinde yıkama aşamalarında kullanılmıştır.                                          |
| Soğutmalı Santrifüj             | Hermle                         | Hücre kültürü çalışmalarında, hücre pelleti veya supernatant eldesinde kullanılmıştır.          |
| Western blot sistemi            | Biorad                         | Protein ekspresyonu ölçmede kullanılan western blot çalışmaları için kullanılmıştır.            |
| Jel Görüntüleme Cihazı          | Vilbert Laurmart Fusion Fx5    | Western Blot sonrası membranlardaki protein ekspresyonlarını ölçmek için kullanılmıştır.        |
| Derin Dondurucu (-20°C / -80°C) | Uğur / Haier                   | FBS, Trypsin/EDTA, Pen/Strep, L-Glutamin, antikor ve hücrelerin saklanması için kullanılmıştır. |



**Tablo 3.1 (devam): Cihaz listesi.**

| <b>Cihaz Adı</b>             | <b>Marka</b>              | <b>Kullanım Amacı</b>                                                              |
|------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Buzdolabı (+4)               | Uğur                      | Örnek, kit, medyum, tampon vb'nin saklanması için kullanılmıştır.                  |
| pH metre                     | Milwaukee Instruments Inc | Hazırlanan tamponlarda pH ayarlaması için kullanılmıştır.                          |
| Hassas Terazi                | Mettler Toledo            | Numunelerin tartılmasında kullanılmıştır.                                          |
| Distile ve deiyoze su cihazı | Sartorius Stedim          | Tüm deneylerde kullanılmıştır.                                                     |
| Vortex                       | Stuart                    | Tüm deneylerde kullanılmıştır.                                                     |
| Mini Santrifüj               | Thermo, MYSPIN 6          | Tüm deneylerde kısa süreli santrifüjler için kullanılmıştır.                       |
| Elektroforez Güç Kaynağı     | Biorad                    | Protein örneklerinin jel üzerinde yürütülmesinde kullanılmıştır.                   |
| Otomatik Pipetler            | Eppendorf                 | Tüm deneylerde kullanılmıştır.                                                     |
| Manyetik Karıştırıcı         | Stuart                    | Tampon hazırlamada kullanılmıştır.                                                 |
| Sonikatör                    | Weightlab Instruments     | Flavonoid etken maddenin çözülmesi için kullanılmıştır.                            |
| Sıcak su banyosu             | Memmert                   | Hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır.                                         |
| Isıtıcı blok                 | Daihan                    | Western-blot ön aşamasında protein denatürasyonu için kullanılmıştır.              |
| Buz makinası                 | Maestrogen Inc            | Western-blot, immün floresan boyama ve akış sitometri deneylerinde kullanılmıştır. |

### 3.1.2 Kimyasal listesi

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar EK bölümünde Tablo A1’de yer almaktadır.

### 3.1.3 Kullanılan kitlerin listesi

Tez çalışmasında kullanılan kitler Tablo 3.2’de yer almaktadır.

**Tablo 3.2 : Kullanılan kitlerin listesi**

| <b>Kit Adı</b> | <b>Marka</b> | <b>Kullanım Amacı</b>                        |
|----------------|--------------|----------------------------------------------|
| MTT assay Kit  | Sigma        | Sitotoksosite deneyleri için kullanılmıştır. |

**Tablo 3.2 (devam):** Kullanılan kitlerin listesi

| Kit Adı                                  | Marka                       | Kullanım Amacı                                                                           |
|------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| WST-1 assay Kit                          | Cayman                      | Suspense hücrelerde sitotoksosite deneyleri için kullanılmıştır.                         |
| Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit   | ThermoFisher Scientific     | Akış sitometrisinde apoptoz ölçümleri için kullanılmıştır.                               |
| İnsan IFN- $\gamma$ ELISA Kiti           | Sunred Biotechnology        | İmmün sistem hücre süpernatantlarında ifn- $\gamma$ düzeyini ölçmek için kullanılmıştır. |
| İnsan TNF- $\alpha$ ELISA kiti           | BT LAB                      | İmmün sistem hücre süpernatantlarında tmf- $\alpha$ düzeyini ölçmek için kullanılmıştır  |
| İnsan IL-2 ELISA kiti                    | BT LAB                      | İmmün sistem hücre süpernatantlarında IL-2 düzeyini ölçmek için kullanılmıştır           |
| Granzim-B elisa Kiti                     | Elabscience Binovation Inc. | İmmün sistem hücre süpernatantlarında granzim-b düzeyini ölçmek için kullanılmıştır      |
| Perforin Elisa Kiti                      | Elabscience Binovation Inc. | İmmün sistem hücre süpernatantlarında perforin düzeyini ölçmek için kullanılmıştır       |
| Pierce™ Bovin Serum Albumin Standart Set | ThermoFisher Scientific     | Protein ölçümünde standart olarak kullanılmıştır.                                        |

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1 Krisin stok çözeltisinin hazırlanması

Hücre kültürü ortamına eklenmeden önce moleküler ağırlığı 254.4 g/mol olan krisin hassas terazide istenilen konsantrasyonlarda hazırlanmak için tartılmış, DMSO ve hücre besiyerlerinde çözülmüş, sonrasında 1 saat ultrasonik banyoda 37°C’de bekletilerek stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Krisin polar ortamda iyi çözünen bir etken madde değildir, bu nedenle stok çözelti hazırlarken tartımlarda 1 mg’dan fazla krisin tartılmamıştır, krisin ağırlığı bu miktarı geçtiğinde maddenin çöktüğü gözlenmiştir. DMSO'nun son konsantrasyonu %1 (hacim/hacim) değerini aşmamıştır ve bu konsantrasyon tek başına herhangi bir etkiye neden olmamıştır.

### 3.2.2 Hücre kültürü

İnsan meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231), insan meme epitelyal hücre hattı (MCF-10A), NK-92 hücreleri, Jurkat T hücreleri ve RAW 264.7 hücreleri American Type Culture Collection'dan (Manassas, VA, ABD) temin edilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı HG (DMEM HG, Gibco, ABD) ile, MCF-10A hücreleri DMEM-F12K (DMEM/Ham's F-12, Capricorn) ile ve Jurkat hücreleri RPMI 1640 ortamında (Gibco, ABD) kültüre edilmiştir. NK-92 hücreleri alfa-MEM mediumda kültüre edilmiştir. MCF-7, MDA-MB-231, Jurkat T hücreleri ve RAW 264.7 kültür ortamlarına %10 fetal bovin serumu (gibco) ve %1 penisilin/streptomisin (Thermo Fisher Scientific) eklenmiştir. NK-92 hücreleri alfa-MEM (Gibco) besiyerinde büyütülmüştür. Besiyerinin içine 100 U/ml IL-2, %12.5 Horse Serum, %12.5 FBS, %1 P/S, % 2 L-glutamin eklenmiştir. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş bir inkübatörde 37 °C'de kültüre edilmiştir.

### 3.2.3 Hücre canlılığı analizleri

#### 3.2.3.1 MTT testi

Meme kanseri hücrelerinin ve epitel meme hücrelerinin proliferatif aktivitesi, daha önce belirlenen metodolojilere uygun olarak MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum indirgeme deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Ayrıca meme kanseri hücrelerinde hangi epidermal büyüme faktörü (EGF) konsantrasyonunun hücreleri proliferate ettiğini ve toksik olabileceğini test etmek için de MTT hücre canlılığı testi kullanılmıştır.

Hücreler 96 kuyucuklu plakalarda  $5 \cdot 10^3$  hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilmiş ve bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücreler farklı konsantrasyonlarda krisin (12,5-250  $\mu$ M) veya kontrol olarak DMSO ile belirtilen konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Hücre proliferasyonunu incelemek için, her kuyucuğa 10  $\mu$ L MTT çözeltisi (5 mg/ml) eklenmiştir. Ardından formazanı çözmek için kuyucuk başına 100  $\mu$ L DMSO eklenmiş ve absorbans 570 nm 'de Multiplak okuyucuda (Thermo Varioskan) fotometrik olarak ölçülmüştür. Hücre canlılığı kontrol grubu hücreleri % 100 canlılıkta kabul edilerek % hücre canlılığı aşağıdaki denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı } (DG \text{ Abs } \div KG \text{ Abs Absorbansı }) \times 100$$

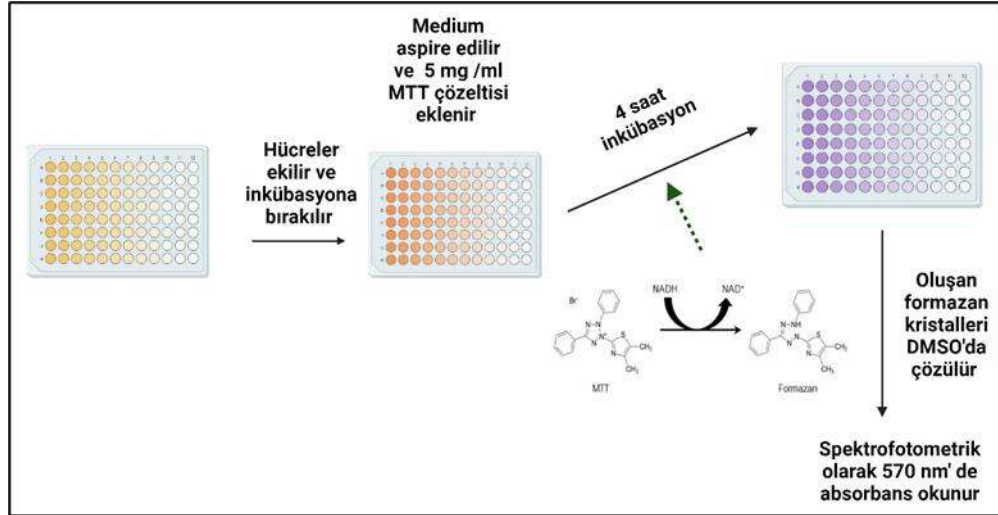
3.1

- **Deney Grubu Absorbansı (DG Abs):** Test edilen koşullar altında bulunan hücrelerin absorbans değeri.
- **Kontrol Grubu Absorbansı (KG Abs):** Sağlıklı ve herhangi bir muamele görmeyen (negatif kontrol) hücrelerin absorbans değeri.

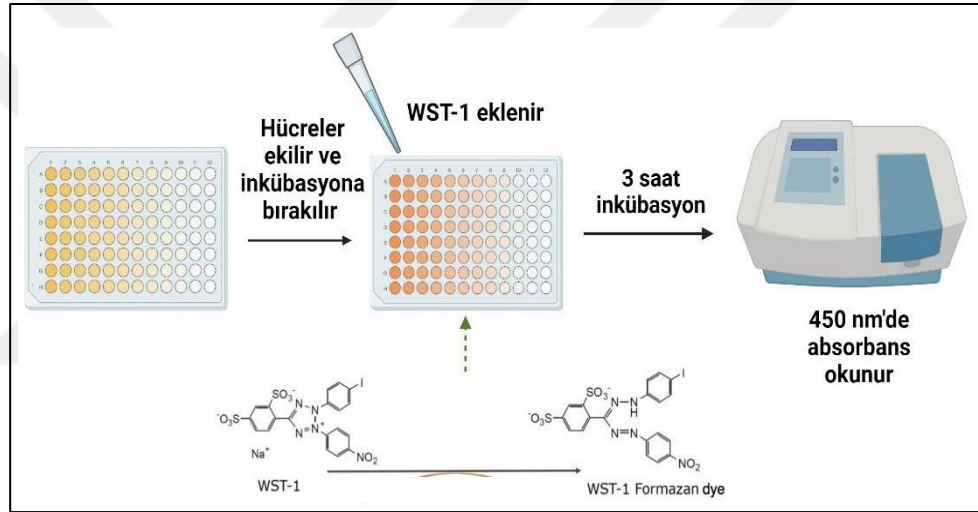
### 3.2.3.2 WST-1 hücre canlılığı testi

NK-92, Jurkat T ve RAW Makrofaj 264.7 hücreleri üretici kitine göre WST-1 Hücre Proliferasyon deneyi (Cayman Chemical, ABD) ile analiz edilmiştir (Şekil 3.2). Cayman'ın WST-1 hücre çoğalmasa testi, herhangi bir *in vitro* modelde hücre çoğalmasının indüksiyonunu ve inhibisyonunu araştırmak için kullanılır. Bu çalışmada WST-1 testinin seçilme sebebi, süspanse hücre canlılıklarının analiz edilmesinde MTT testine nazaran daha uygulanabilir bir protokole sahip olmasıdır.

Test, canlı hücrelerde tetrazolyumun enzimatik bölünmesine dayanmaktadır. Hücreler 96 'lık hücre plaklarına 5.103 -104 hücre/kuyucuk olacak 100 µL hücre mediumuna ekilmiştir ve yeterli doluluk oranına (%80) erişilene kadar inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler farklı konsantrasyonlarda krisine maruz bırakılmıştır. Kitin içinden çıkan elektron mediyatör solüsyon ve WST-1 üretici reaktifi çözündürölür, deneyden hemen önce eşit hacimlerde karıştırılır. Hazırlanan toplam hacim deneyde yer alan plak kuyusu sayısına göre değişir. Karışım solüsyonundan her bir kuyuya 10 µl eklenir ve 1 dakika boyunca orbital karıştırıcıda hafifçe sallanır. Daha sonra yapışma özellikli hücreler 2 saat, süspanse hücreler 4 saat olacak şekilde 37<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinin sonunda yine 1 dakika kadar homojenliği sağlamak için orbital karıştırıcıda yavaşça karıştırılır. Sonrasında absorbans 450 nm'de Multiplak okuyucuda (Thermo Varioskan) fotometrik olarak ölçüm yapılır.



Şekil 3.1 : MTT test protokol özeti.



Şekil 3.2 : WST-1 testi protokol özeti.

### 3.2.4 Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) üretim analizleri

#### İmmünofloresans Boyama:

Hücre içi ROS seviyeleri, hücre geçirgen DCFH-DA'nın floresan diklorofloresin (DCF) haline oksidatif dönüşümü aracılığıyla ölçülmüştür.  $2.5 \times 10^5$  hücre/yuva yoğunluğunda 6 yuvalı plakalarda kültüre edildikten sonra, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kontrol olarak DMSO ve farklı konsantrasyonlarda krisin (200-300  $\mu$ M) ile 48 saat süreyle işlem görmüştür. Hücreler ROS'u tespit etmek için karanlıkta 37°C'de 1 saat süreyle 10  $\mu$ M 7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA, D6665; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ile inkübe edilmiştir. Hücreler PBS ile üç kez yıkandıktan sonra DCF floresansı, Carl Zeiss (Almanya) tarafından üretilen Cell Discoverer 7 floresans mikroskobu kullanılarak çoklu görüş alanlarından tespit edilmiştir. 3 rastgele görüşten 100'den fazla hücre sayılmıştır. ROS seviyeleri, % aşırı boyanmış hücreler olarak

temsil edilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Pozitif kontrol, hücrelerin 1 saat boyunca 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmesiyle elde edilmiştir.

#### Akış Sitometrik Analiz:

ROSLar, eşleşmemiş elektronlara sahip hidroksil radikalleri veya peroksitler içeren moleküllerdir. Sağlıklı aerobik hücrelerde, ROS doğal olarak oksidatif fosforilasyon, oksidoredüktaz enzimleri veya metal katalizli oksidasyon sonucu kontrollü bir hızda yan ürün olarak üretilir. Ancak, ROS bazı stres koşulları altında, özellikle çevresel oksidanlara ve belirli ilaçlara maruz kalma durumunda indüklenebilir ve bu da oksidatif strese yol açar. Aşırı ROS, hücrelerin yapı taşlarına, DNA, proteinler ve lipitler de dahil olmak üzere zarar verebilir ve nihayetinde hücre ölümüne neden olabilir. Hücre geçirgen 2', 7'-diklorodihidroflüorescein diasetat (H2DCFDA), yaygın olarak kullanılan bir ROS göstergesidir. Non-flüoresan indirgenmiş flüorescein H2DCFDA, hücre içi ROS tarafından oksitlenebilir ve flüoresan 2', 7'-dikloroflüorescein (DCF) haline dönüştürülebilir. Bu protokolde, hücre içi ROS'u etiketlemek için H2DCFDA uygulanmış ve DCF yoğunluğunu akış sitometrisi ile Chang ve arkadaşlarının tarif ettiği gibi tespit edilmiştir [287]. Sırasıyla 48 saat boyunca MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 200 ve 300 µM krisin maruziyetinden sonra, hücreler ılık 1X PBS ile yıkandı, tripsinizasyon ile hasat edildi. Tripsinizasyonu durdurmak için 1 ml tam kültür ortamı (10% FBS) eklendi ve hücreler yukarı aşağı nazikçe pipetlenerek süspansiyon haline getirildi. Hücreler, oda sıcaklığında 200 x g'de 5 dakika süreyle santrifüjlenerek toplandı ve supernatant aspire edildi. Hücre pelleti 4 ml DPBS ile yıkanır ve oda sıcaklığında 200 x g'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti, nazikçe yukarı aşağı pipetlenerek PBS ile 10 µmol/L CM-H2DCFDA ile yeniden süspansiyon haline getirildi (500 µl/tüp). Hücreler karanlıkta 37 °C'de inkübatörde 45 dakika inkübe edilir ve hemen ROS tespiti için 488 nm lazer kullanarak uyarılacak ve 535 nm'de tespit edilecek şekilde akış sitometri analizi için FACS Canto II (Becton Dickson) ile işleme alındı. Akış sitometrisinde toplam 5,000 olay analiz edildi. Pozitif kontrol olarak, hücreler önceden ısıtılmış DPBS ile üç kez yıkadıktan sonra, DPBS içinde 1 M stoktan hazırlanmış taze 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

Analizde; X eksen, hücre boyutuna göre relatif olan ileri saçılma (FSC) parametresini temsil ederken, Y eksen ise hücre içindeki bileşenlerle ilişkili olan yan saçılma (SSC)

Hücre  
membranı

### 3.2.5 Apoptotik aktivite tayin analizleri

AO/EtBr çift boyama tekniği, McGahon ve ark. [288] tarafından tanımlandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Akridin oranj boyası, nükleik asitleri boyamak için kullanılan floresan bir boya olup, genellikle hücre ölümünün tipini (apoptoz veya nekroz) belirlemek ve hücre canlılığı analizleri yapmak için kullanılır. Bu boya, çift zincirli DNA'yı yeşil renkte ve tek zincirli RNA'yı kırmızı renkte floresan verir şekilde boyar. Özellikle apoptotik hücrelerde DNA yapısı bozulduğu için akridin oranj farklı floresan özellikler gösterir, bu da apoptotik hücrelerin nekrotik hücrelerden ayırt edilmesine olanak tanır. Etidyum bromür (EtBr), nükleik asitleri, özellikle DNA ve RNA'yı boyamak için yaygın olarak kullanılan bir floresan boyadır. Genellikle agaroz jel elektroforezi gibi tekniklerde, DNA bantlarını görselleştirmek amacıyla kullanılır. EtBr, DNA molekülüne interkalasyon yapar, yani çift sarmal yapının bazları arasına yerleşir ve UV ışığı altında parlak turuncu-kırmızı bir floresan yayar. Bu özellik, DNA'nın jel üzerinde tespit edilmesini sağlar.

84

Krisin ve LPS ile stimüle edilmiş (3.2.6.3'te detaylı anlatılmıştır) makrofaj hücre supernatanları ile ko-kültüre edilen (ko-kültür detayları bölüm 3.2.9'da tarif edilmiştir) meme kanseri hücrelerinin apoptoza uğrayıp uğramadığını tespit etmek için de AO/EtBr çift boyama yöntemi kullanıldı.

Bu iki farklı deney gruplarının bulunduğu kuyucuklardan besiyerleri çekildi ve 1 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 1 saat boyunca % 4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında inkübe edilerek plakalara sabitlendi. 1X PBS ile üç kez yıkandıktan sonra, kuyulara 500 µL AO/EtBr boyama çözeltisi (100 µg/mL AO ve 100 µg/mL EtBr içeren bir boyar madde karışımı) eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. 1X PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra, hücre morfolojileri bir floresan mikroskop altında (Cell discoverer 7, Carl Zeiss, Almanya) incelendi. Akridin Oranj boyası için mikroskop programında kayıtlı olan akridin oranj kanalı, etbr boyası için EtBr kanalı seçildi ve iki kanal da açıkken hücreler görüntülendi. İstatistiksel analiz için en az 100 hücre sayıldı ve sonuçlar en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama değerler olarak ifade edildi. Deneyde, akridin oranji (AO) hem canlı hem de canlı olmayan hücreleri boyamak için kullanılırken, etidyum bromür (EtBr) membran bütünlüğü bozulmuş canlı olmayan hücreleri seçici olarak boyar. Canlı hücreler yeşil floresans sergilerken, erken apoptotik hücreler çekirdeklerinde yeşil noktalar gösterir. Geç apoptotik hücreler turuncu bir renklendirme sergiler ve yoğunlaşmış ve/veya parçalanmış çekirdekler gösterir. Nekrotik hücreler de turuncu veya kırmızı boyanır, bu hücreler canlı hücrelere çekirdek morfolojisi açısından benzer, ancak kromatinleri yoğunlaşmış değildir.

#### Anneksin V/PI Boyama:

Anneksin V, apoptozun erken evrelerini tespit etmek için kullanılır. Apoptoz sırasında, fosfatidilserin adı verilen bir fosfolipid normalde hücre zarının iç yüzeyinde bulunur, ancak apoptoz başladığında hücre zarının dış yüzeyine taşınır. Annexin V, fosfatidilserine yüksek afiniteyle bağlanarak apoptoza giren hücreleri etiketler. Bu sayede, erken apoptoz hücreleri tespit edilebilir. Propidyum İyodid (PI), hücre zarından geçemeyen bir boyadır ve sadece zarı hasar görmüş hücrelere girebilir. Bu nedenle, PI genellikle ölü veya nekrotik hücreleri işaretlemek için kullanılır. Sağlıklı veya erken apoptoza giren hücreler, zarı bütün olduğu için PI'yi geçirmez. Ancak, geç apoptoz veya nekroz aşamasına gelen hücrelerde zar bütünlüğü bozulduğunda PI hücre



içine girer ve nükleik asitlere bağlanarak floresan yayar. Bu iki boya genellikle birlikte kullanılır çünkü her biri hücre ölümünün farklı aşamalarını işaret eder. Kombinasyon şu amaçlara hizmet eder:

- Annexin V (+), PI (-): Erken apoptoz
- Annexin V (+), PI (+): Geç apoptoz veya nekroz
- Annexin V (-), PI (+): Nekroz
- Annexin V (-), PI (-): Canlı hücreler

Bu kombinasyon, hücre ölümünün zamanlamasını ve tipini daha doğru bir şekilde belirlemeyi sağlar.

Apoptozu tespit etmek için eBioscience'dan (Thermo Fisher Scientific, ABD) Annexin V-FITC boyama kiti, üreticinin talimatlarına göre kullanıldı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyulu plakalarda kuyu başına  $1.5 \times 10^5$  hücre yoğunluğunda ekildi ve gece boyunca yapışmaları sağlandı. Daha sonra hücreler çeşitli konsantrasyonlarda krisin ( $150-200 \mu\text{M}$ ) ve kontrol olarak DMSO ile 48 saat boyunca işlem gördü. Tripsin sindirimi sonrası, hücreler 200 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti, 100  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC etiketleme çözeltisinde yeniden süspansiyon haline getirildi ve  $15-20^\circ\text{C}$ 'de 10–15 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, örnekler hemen akış sitometrisi (Becton Dickinson, FACS Canto II) kullanılarak 488 nm'de uyarım ve 525 nm'de emisyon ile analiz edildi. Analizde; X eksen, hücre boyutuna göre relatif olan ileri saçılma (FSC) parametresini temsil ederken, Y eksen ise hücre içindeki bileşenlerle ilişkili olan yan saçılma (SSC) parametresini gösterir. Kapı alma, analiz ettiğimiz hücrelerin yoğun olarak toplandığı ana popülasyonu alma stratejisine dayanır. Daha sonra bu kapıdaki yoğun hücre popülasyonundaki FITC floresan boyası işaretli Annexin V'i (x ekseninde) ve PE floresan boya işaretli PI'yı eksprese eden hücre (y ekseninde) sayıları gösterildi. Akış sitometri diyagram sonuçlarına göre canlı hücrelerin, erken apoptozdaki hücrelerin, geç apoptozdaki hücrelerin ve ölü hücrelerin tüm popülasyona göre yüzdeleri sayısal olarak verildi.

#### *İmmunofloresan Boyama ile Kaspaz-3 Ekspresyonunun Ölçülmesi:*

Krisin ve LPS ile stimüle edilmiş (3.2.6.3'te detaylı anlatılmıştır) makrofaj hücre supernatanları ile ko-kültüre edilen (ko-kültür detayları bölüm 3.2.9'da tarif edilmiştir) meme kanseri hücrelerinin apoptoza uğrayıp uğramadığını tespit etmek için kanser hücrelerindeki bir apoptoz belirteci olan kaspaz-3 protein ekspresyonu ölçüldü. Önce

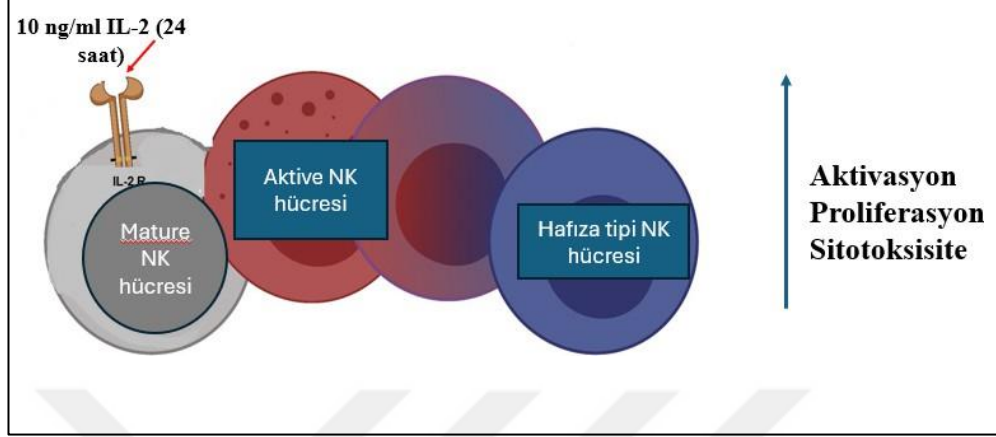
12'lik plakalarda olan hücrelerin besiyerleri çekildi ve 45 dk boyunca her bir kuyucuk için 300 µl olacak şekilde %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında sabitlendi. Sabitleme sonrası hücreler permeabilizasyon için yine 300'er µl %0.1 Triton X-100 ile muamele edildi ve ardından bloklama çözeltisi (%1 BSA) ile 1 saat inkübe edildi. Hücreler, her bir kuyucukta 200 µl, 1/500 oranında ne içindeydi anti-kaspaz-3 (cell signaling) primer antikoru ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. 1X PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra yine 200 µl 1/1000 oranında tavşan tabanlı Aleksa-Fluor-488 sekonder antikor (BioLegend) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek kaspaz-3'ün işaretlenmesi sağlandı. Fazla antikorlar PBS ile yıkandı ve hücreler her kuyucuğa 200 µl daha önceden 1xPBS içinde çözülerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanan 1µg/ml DAPI solusyonu ile çekirdek boyaması yapıldı. Son adımda, örnekler floresan mikroskobu ile incelenerek kaspaz-3 aktivitesi tespit edildi. Aleksa Fluor-488'in maksimum emisyon dalga boyu 519 nm, eksitasyon dalga boyu ise 488 nm olan bir floresan maddedir. Cell Discoverer 7 (Carl Zeiss) floresan mikroskobunda kanal olarak Aleksa-Fluor ve DAPI kanalları seçilmiş ve bu iki kanal açıkken mikroskobik görüntüleme yapılmıştır. Her bir gruptan en az 10 fotoğraf çekilmiş ve bu çekilen görüntülerde Aleksa-Fluor sinyali veren hücreler hücrelerin toplam hücre sayılarına oranı yüzde olarak verilmiştir.

### **3.2.6 Bağışıklık sistemi hücrelerinin stimülasyonu**

#### **3.2.6.1 NK hücrelerinin IL-2 ile stimülasyonu**

NK-92 hücrelerinin besiyerlerine 100U/ml IL-2 bu hücrelerin büyümeleri IL-2 bağımlı olduğu için ilave edilmiştir fakat sitotoksik NK hücre modeli oluşturmak için ekstra IL-2'ye gerek duyulmaktadır [289]. Tipik olarak, düşük dozlarda IL-2, NK hücrelerinin temel aktivitesini uyarırken, daha yüksek dozlar (500-1000 IU/ml) sitotoksik aktiviteyi artırabilir. NK hücrelerinin IL-2 ile uyarma yöntemi Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Stok insan rekombinant IL-2 proteini (Peprotech) NK-92'nin besiyerinde steril şartlarda çözülerek 250 µg /ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu stok çözelti daha sonra -200C'de saklanmıştır. 12'lik hücre plakalarına 5X10<sup>4</sup> sayıda ekilmiş ve 24 saat büyütülmüş NK-92 hücrelerine farklı IL-2 dozları (0-50 ng/ml) 12 saat ve 24 saat boyunca uygulanmış, kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler 2 ml'lik eppendorf tüplere toplanmış ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Her bir grubun hücre süpernatantları başka bir tüpe toplanmıştır ve gruplardaki ifn-gamma düzeyleri ELISA

yöntemi ile ölçülmüştür (ELISA bölümünde ayrıntılı anlatılmıştır). Bu deneyler sonucunda elde edilen optimum inkübasyon süresi ve IL-2 konsantrasyonu (10ng/ml) sonraki ko-kültür modeli deneylerinde de kullanılmıştır.



Şekil 3.4 : NK hücrelerinin IL-2 ile uyarımı.

#### 3.2.6.2 Jurkat T hücrelerinin PHA-M ile stimülasyonu

Jurkat T hücrelerinin PHA ile stimülasyonu, bağışıklık sistemi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [290]. PHA, Jurkat hücrelerinin T hücresi benzeri reseptörlerine bağlanarak hücre aktivasyonunu başlatır. Bu süreç, normal T hücrelerinde olduğu gibi, hücrel sinyal iletim yollarını harekete geçirir. 12'lik hücre plakalarına  $5 \times 10^4$  sayıda ekilen Jurkat T hücreleri 1 gün boyunca inkübasyon koşullarında büyütülmüş ve daha sonra farklı dozlarda PHA-M (gibco)'ye (%0, %1, %1.5, %2, %5) farklı saatlerde maruz bırakılmıştır (3,6,12 ve 24 saat). PHA-M ile inkübasyon süreleri biten farklı gruplara 3.2.3.2'de tarif edildiği gibi WST-1 hücre proliferasyon analizi yapılmıştır ve en iyi doz ve inkübasyon süresi kontrol grubundaki hücre sayısı ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Daha sonra yürütülen çalışmalarda bu dozlar ve inkübasyon süreleri kullanılmıştır.

#### 3.2.6.3 Makrofaj hücrelerinin LPS ile stimülasyonu

LPS, gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan bir bileşendir ve güçlü bir makrofaj aktivatörüdür. LPS, özellikle Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) aracılığıyla makrofajları aktive eder ve onları M1 fenotipe doğru yönlendirir. 6'lık hücre plakalarına  $5 \times 10^4$  sayıda ekilen RAW 264.7 hücreleri 24 saat inkübasyon koşullarında büyütülmüştür. İnkübasyon sonrasında farklı dozlarda (100-500-1000 ng/ml) LPS (sigma) makrofaj hücre besiyerlerine 6, 12 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır.  $1 \mu\text{g/ml}$

LPS steril 10 ml 1XPBS içinde çözülerek hazırlanmıştır ve bu stok çözeltiden seyreltilmiştir. Sonrasında hücrelerin besiyerleri çekilmiş, ve 1 ml PBS içinde bir hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırılmıştır. Bu hücreler + 4°C'ye ayarlı santrifüjde 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve hücre süpernatantlarından TNF-alfa miktarları ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Önceki araştırmalar, LPS ile indüklenen makrofajlarda M1 makrofaj polarizasyonunda TNF- $\alpha$ 'nın önemli bir rol oynadığını tespit etmiştir. Bu nedenle uygun doz ve inkübasyonu belirlemek için gruplardaki TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçülmüştür.

### 3.2.7 NK hücrelerinin akış sitometri ile aktivasyon analizi

CD56<sup>+</sup> yüzey ifadesinin değerlendirilmesi, doğal katil (NK) hücrelerinin aktivasyon durumunu değerlendirmek için hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir [291]. CD56<sup>+</sup> ifadesinin analizi için, IL-2 ile uyarılmış NK-92 hücreleri 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda krisin (0-125-200  $\mu$ M) ve DMSO (kontrol) ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler tripsinize edildi ve iki kez soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilen hücrelerin süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100  $\mu$ L PBS eklendi. Her bir grup içinde yaklaşık  $1 \times 10^6$  sayıda hücre bulunan hücre solüsyonları 5'er  $\mu$ L PE-konjuge anti-CD56 antikoru (1:100 seyreltme; Biolegend Inc.) ve FITC-konjuge CD3 antikoru (1:100 seyreltme; Biolegend Inc.) ile karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Hücreleri, her  $1 \times 10^6$  hücre için 1–2 mL PBS tamponu ekleyerek yıkandı ve +2 ila +8 °C'de  $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı tamamen aspire edildi. Ardından hücreler en az 200  $\mu$ L PBS içinde akış sitometrisine götürüldü. Veriler FACS Canto II akış sitometresi (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, ABD) ve BD FACSDiva™ Yazılımı kullanılarak analiz edildi. Konjuge antikorlar ile boyalı örneklerin akış sitometrisi analizinde önce FSC (Forward Scatter) ve SSC (Side Scatter) üzerinden hücrelerin büyüklüğü ve granülaritesi belirlendi ölü hücreler ve kalıntılar dışlandı. Canlı hücreler arasında lenfosit popülasyonunu seçmek için FSC ve SSC kullanılır. NK hücreleri, genellikle bu lenfosit bölgesinde bulunur, çünkü NK hücreleri küçük ve orta büyüklükte lenfositlerdir. SSC/CD45 kapısı alınarak lenfositler belirlendi. NK hücreleri için belirleyici yüzey markörleri CD3<sup>-</sup> ve CD56<sup>+</sup>'dir. CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> hücreler NK hücreleri olarak seçildi. Genellikle CD3<sup>-</sup> CD56dim popülasyonu sitotoksik NK hücrelerini, CD3<sup>-</sup> CD56bright popülasyonu ise immünmodülatör NK hücrelerini temsil eder. Gruplar arasındaki CD56 ekspresyon seviyeleri % olarak karşılaştırıldı.

### 3.2.8 Meme kanseri hücrelerinin EGF ile indüklenmesi

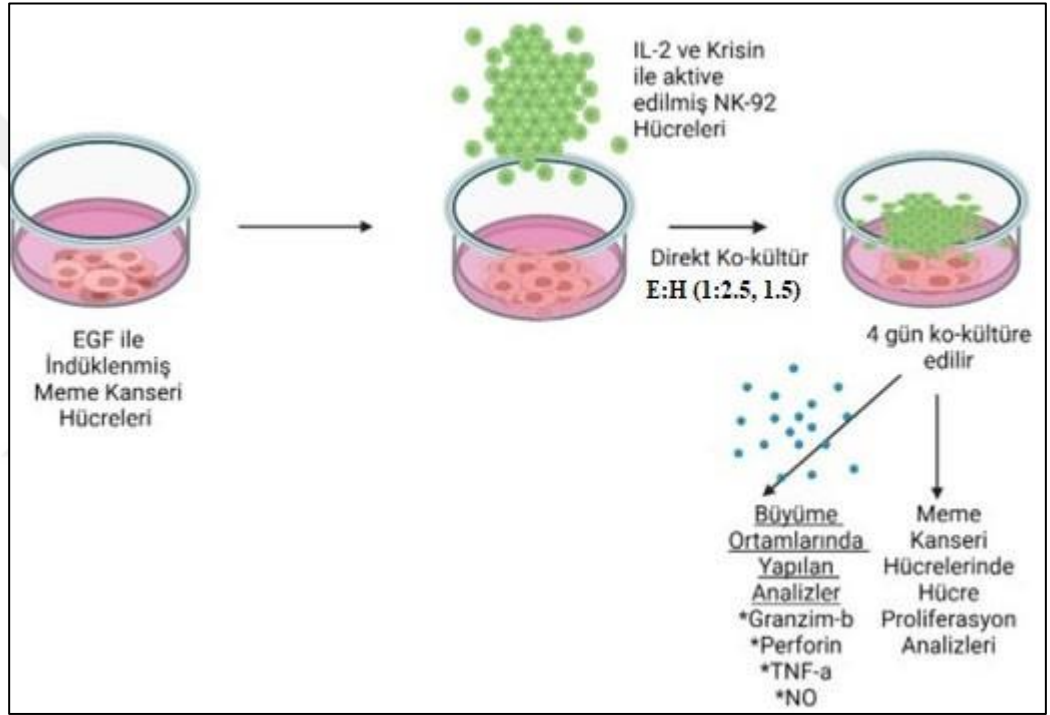
Kanser hücrelerinin epidermal büyüme faktörü (EGF) ile indüklenmesi, kanser araştırmalarında önemli bir süreçtir çünkü EGF, hücre proliferasyonunu, farklılaşmayı ve hayatta kalmayı düzenleyen güçlü bir mitojendir. Kanser hücreleri özellikle epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) üzerinden EGF sinyali aldığı anda, hücre bölünmesi ve büyümesi gibi süreçleri başlatır. Bu sinyal iletimi, kanser hücrelerinin büyümesine ve metastaz yapma kapasitesine katkıda bulunan bir dizi hücresel olayı harekete geçirir. 100 µg insan rekombinant EGF (peprotech) proteini steril ortamda 2 ml %2 FBS içeren tam DMEM HG besiyerinde çözülmüş ve 50 µg/ml EGF hazırlanmıştır. Bu stok EGF’den 1000 ng/ml konsantrasyonda EGF içeren solüsyon hazırlanmış ve bu konsantrasyondan daha düşük çeşitli dozlarda (0-10,25,50,100,250,500,1000 ng/ml) EGF, 24 saat önce  $5 \times 10^3$  sayıda 96’lık hücre plaklarına ekilmiş ve büyümüş MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine verilmiştir. Kontrol gruplarına herhangi bir madde uygulanmamıştır. EGF uygulandığında besiyerleri daha düşük, yani %2 FBS içeren besiyerleri ile değiştirilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrası meme kanseri hücrelerinin proliferasyonları WST-1 hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiştir. Bu ölçümün amacı; hangi EGF dozlarının meme kanseri hücrelerini proliferere ettiğini veya herhangi bir sitotoksik etkisi olup olmadığını değerlendirmektir.

### 3.2.9 Ko-kültür protokolleri

#### **NK-92 ve Meme Kanseri Hücrelerinin Birlikte Kültüre Edilmesi**

1. Krisin tedavisinin NK hücre sitotoksitesini artırıp artırmadığını değerlendirmek için, 12’lik hücre plaklarına  $1.5 \times 10^5$  sayıda NK-92 hücresi ekildi. 1 gün sonra 10 ng/ml IL-2 (peprotech) ve çeşitli konsantrasyonlarda (100,125,200 µM) hücre besiyerlerinde hazırlanmış krisin 24 saat boyunca inkübasyon koşullarında NK-92 hücrelerine uygulandı.
2. 12’lik hücre plakalarına  $0.5 \times 10^5$  hücre sayısında ekilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ise daha önce belirlenen etkin EGF dozu (50 ng/ml) ile 48 saat boyunca uygun inkübasyon koşullarında inkübe edildi.
3. Meme kanseri hücrelerinin ve NK-92 hücrelerinin yukarıda belirtilen inkübasyon süreleri sonunda kuyucuklardaki canlı hücre sayıları thoma lamında sayıldı.

4. NK-92 efektör hücreleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hedef hücrelerine, E: H oranları; 2.5:1 ve 5:1 olacak şekilde 4 gün direkt-kokültüre bırakıldı (Şekil 3.4). Bu oranlar literatür bilgileri ile belirlenmiştir [292]. Hangi E:H oranının iki en iyi sitotoksik yanıt oluşturulduğunu belirlemek için yapılmıştır.
5. İnkübasyon süresi sonunda meme kanseri hücrelerine 3.2.2.1’de tarif edildiği gibi MTT hücre canlılığı testi ve büyüme ortamlarındaki bazı sitokin ve bileşenlerin miktarları ölçüldü. Genel test protokolü Şekil 3.5’ te şematize edilmiştir.



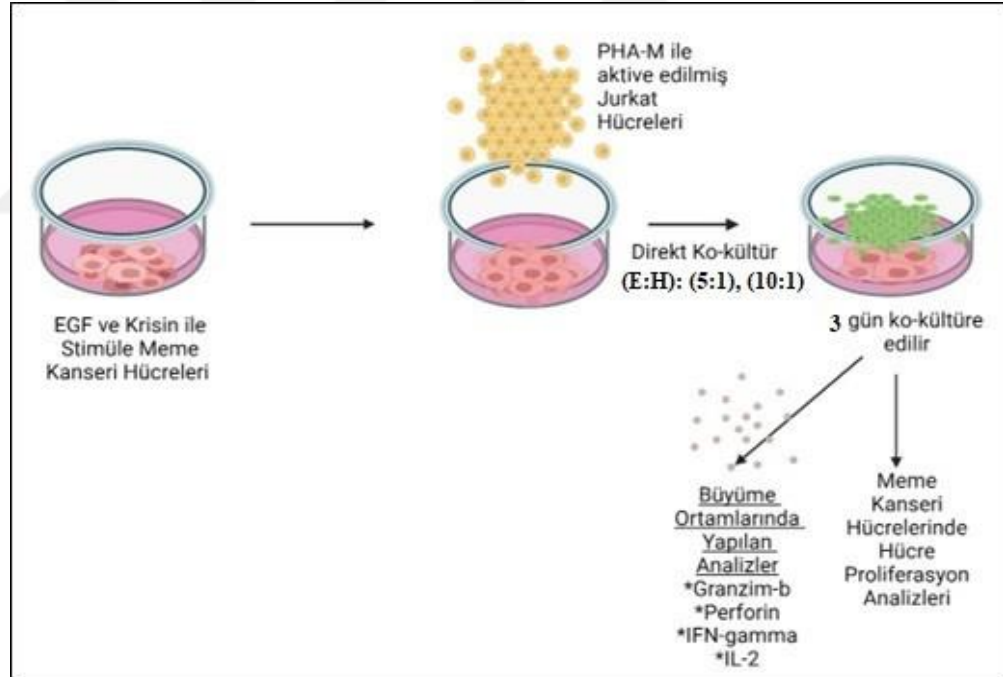
**Şekil 3.5 :** NK-92 ve meme kanseri hücre hatları ko-kültür modeli.

#### **Jurkat T Hücrelerinin ve Meme Kanseri Hücrelerinin Birlikte Ko-Kültüre Edilmesi**

1. Meme Kanserlerine uygulanan krisin tedavisinin Jurkat T hücre sitotoksitesini değiştirip değiştirmediğini değerlendirmek için, 12’lik hücre plaklarına  $1.5 \times 10^5$  sayıda Jurkat T hücresi ekildi. 1 gün sonra Jurkat T hücreleri %1.5 PHA ile 6 saat inkübasyona bırakıldı ve aktive edildi.
2. 12’lik hücre plakalarına  $0.5 \times 10^5$  hücre sayısında ekilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ise daha önce belirlenen etkin EGF dozu (50 ng/ml) ile 48 saat boyunca uygun inkübasyon koşullarında inkübe edildikten sonra besiyeri % 10

FBS içeren tam medyum ile değiştirildi ve farklı konsantrasyonlarda krisin (100, 200  $\mu$ M) ile 24 saat muamele edildi.

3. Meme kanseri hücrelerinin ve Jurkat T hücrelerinin yukarıda belirtilen inkübasyon süreleri sonunda kuyucuklardaki hücre sayıları thoma lamında sayıldı.
4. T efektör hücreleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hedef hücrelerine, E: H oranları; 5:1 ve 10:1 olacak şekilde 3 gün direkt-kokültüre bırakıldı (Şekil 3.4). Ko-kültür öncesinde meme kanseri hücre hatlarının besiyerleri yenilendi. Bu oranlar literatür bilgileri ile belirlenmiştir. Hangi E:H oranının iki en iyi sitotoksik yanıt oluşturulduğunu belirlemek için yapılmıştır.
5. İnkübasyon süresi sonunda meme kanseri hücrelerine 3.2.2.1’de tarif edildiği gibi MTT hücre canlılığı testi ve büyüme ortamlarındaki bazı sitokin ve bileşenlerin miktarları ölçüldü. Genel test protokolü Şekil 3.6’ da şematize edilmiştir.



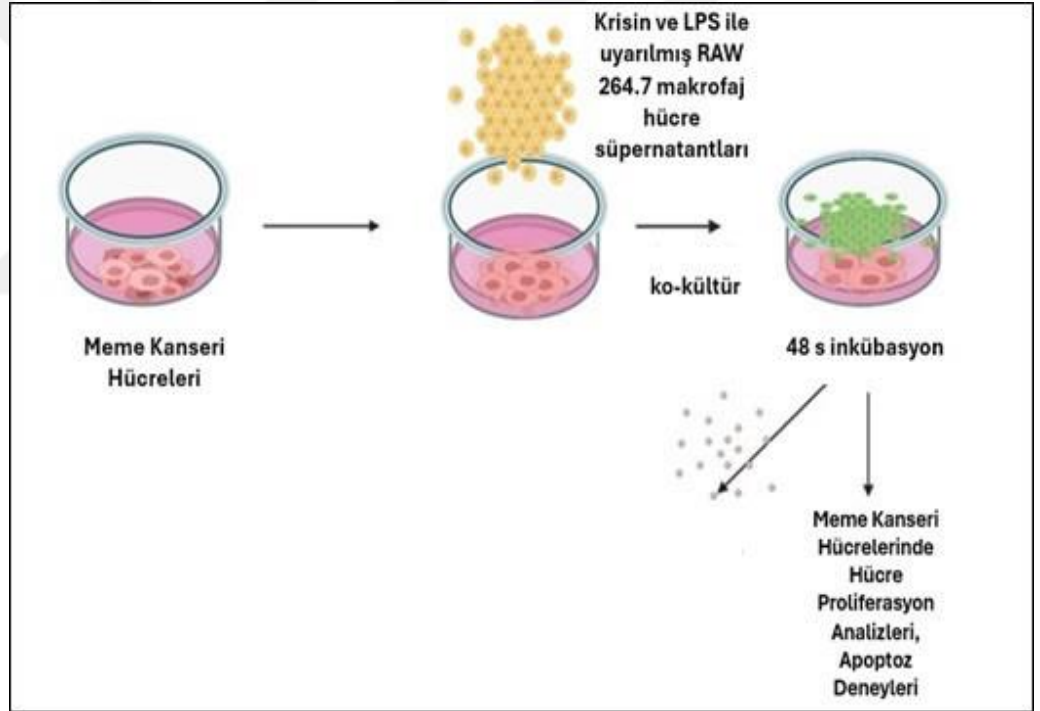
Şekil 3.6 : Jurkat T hücreleri ve meme kanseri hücreleri ko-kültür modeli.

#### **RAW 264.7 Supernatantlarının ve Meme Kanseri Hücrelerinin Birlikte Ko-Kültüre Edilmesi**

1. Krisin tedavisinin makrofaj hücre sitotoksitesini artırıp artırmadığını değerlendirmek için, 12’lik hücre plaklarına  $1.5 \times 10^5$  sayıda RAW 264.7 hücresi ekildi. 1 gün sonra  $1 \mu$ g/ml LPS (sigma) 6 saat ve çeşitli

konsantrasyonlarda (50-75  $\mu$ ) hücre besiyerlerinde hazırlanmış krisin 24 saat boyunca inkübasyon koşullarında makrofaj hücrelerine uygulandı.

2. 12'lik hücre plakalarına  $0.5 \times 10^5$  hücre sayısında ekilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 24 saat boyunca inkübe edildi ve yapışıp çoğalması sağlandı.
3. İnkübasyon süreleri sonunda makrofaj hücrelerinin besiyerleri çekilip 2'lik eppendorflara alındı ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatanatlar toplandı.
4. Toplana süpernatantlar konflue olmuş MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin olduğu kuyucuklara eklendi ve 48 saat ko-kültüre edildi.
5. İnkübasyon süresi sonunda meme kanseri hücrelerine 3.2.2.1'de tarif edildiği gibi MTT hücre canlılığı testi, apoptoz testleri yapıldı. Genel test protokolü Şekil 3.7' de tarif edilmiştir.



**Şekil 3.7 :** Makrofaj hücresi ve meme kanseri ko-kültür modeli.

### 3.2.10 Sandviç ELISA yöntemi

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), enzime bağlı immünosorbent testi anlamına gelir ve genellikle enzim immünoassay (EIA) olarak da bilinir. Diğer immünoassay yöntemlerinde olduğu gibi, ELISA'da da hedef antijenin tespiti için antikor-antijen etkileşimlerinin yüksek özgüllüğünden yararlanılır. Bir ELISA testinde, antijenin katı bir yüzeye tutturulması gerekir. Bu işlem, ya doğrudan antijenin sabitlenmesiyle ya da yüzeye bağlanmış bir yakalama antikoru aracılığıyla

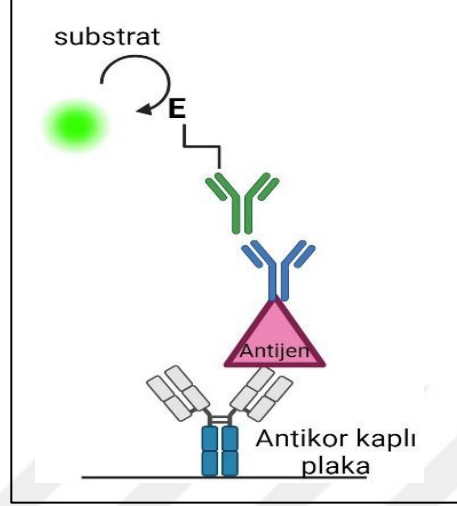


gerçekleştirilir. Antijen daha sonra, bir enzim veya florofor gibi tespit edilebilir bir molekül ile konjuge edilmiş bir tespit antikoru ile etkileşime girer. ELISA genellikle çoklu kuyucuklara sahip bir üzerinde yapılır. Bu plakalar, antijenin sabitlenmesi için katı bir yüzey sağlar. Bu şekilde, analitler diğer numune bileşenlerinden ayrılır, bu da tespiti kolaylaştırır. Bu özelliği, ELISA'yı aynı anda birçok numune üzerinde kolayca uygulanabilen bir yöntem haline getirir.

Çalışmanın deneylerinde Sandviç-ELISA prensibine dayalı (Şekil 3.8) ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin deneysel aşamaları aşağıda sıralanmıştır.

- 1) 96'lık ELISA plakalarının kullanıldığı deneylerde her kuyucuğa 100µL standart veya numune eklendi. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
- 2) Sıvıyı boşaltıldı ve hemen her kuyucuğa 100µL Biotinile Tespit Antikoru (Biotinylated Detection Ab) çalışma çözeltisi eklendi. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Plakalar aspire edildi ve 3 yıkama tampon ile yıkandı.
- 3) Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 5 kez yıkandı.
- 4) Her kuyucuğa 90µL Substrat Reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 5) Her kuyucuğa 50µL Durdurma Çözeltisi eklendi.
- 6) Kuyucuklar hemen 450 nm dalga boyunda okundu.
- 7) Standard eğrileri ELISA okuyucu'da (Multiskan FC, Thermo) standard eklenen kuyucuklar kalibratör seçilerek ve konsantrasyonları girilerek ELISA plaka okuyucunun programında çizildi. Her bir parameter için kendi standard eğrileri oluşturuldu ve bu eğrilerin formülleri elde edildi.  $R^2$  (denklemin belirleme katsayısı) değerleri 0.9 ve 1 arasında olan eğri formülleri numunelerdeki ilgili antijen miktarlarının ölçümünde kullanıldı.

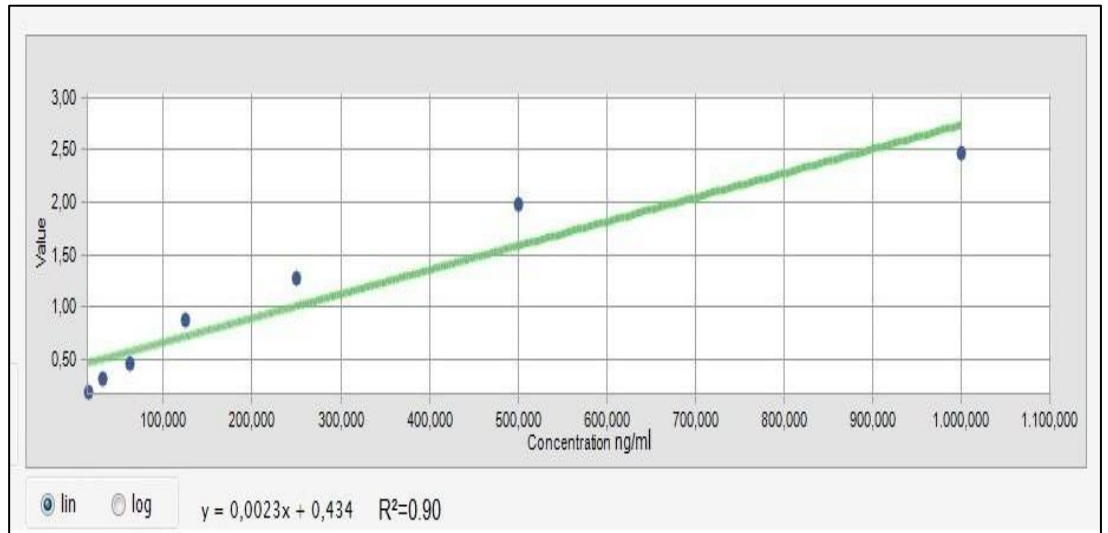
Çalışmanın deneylerinde hücre kültürü süpernatant numunelerinde IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Granzim-b, IL-2 ve IL-12 düzeyleri yukarda detaylı olarak tarif edilen sandviç ELISA protokolü kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerin ön aşamaları, hangi deney gruplarında yapıldığı ve kit bilgileri aşağıdaki bölümlerde yer almaktadır.



Şekil 3.8 : Sandviç ELISA test prensibi.

#### 3.2.10.1 Krisin ile uyarılan NK hücrelerinde ifn- $\gamma$ kuantifikasyonu

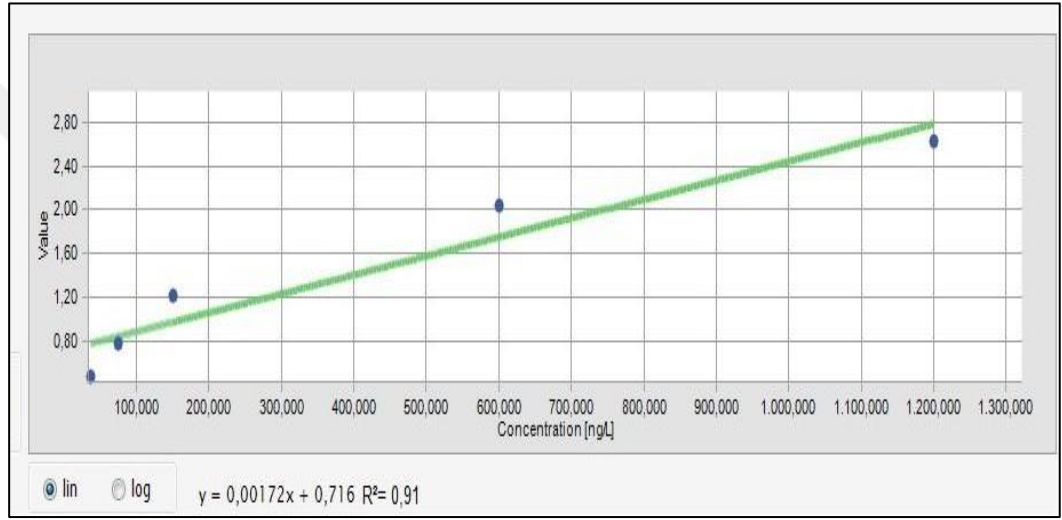
NK-92 hücreleri, 10 ng/ml IL-2 ve çeşitli konsantrasyonlarda krisin (25-50-100-125-200  $\mu$ M) varlığında 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında, hücreler 1500xg'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı. Toplanan süpernatantlar, 3.2.10.'da anlatılan ELISA metoduna ve kullanılan kitin kullanıcı talimatlarındaki yönergelerine göre "İnsan IFN-gamma ELISA kiti" (Sunred Biotechnology) kullanılarak ifn- $\gamma$  için analiz edildi. IFN-  $\gamma$  miktarlarının ölçüldüğü standart eğrisi Şekil 3.9' da gösterilmiştir.



Şekil 3.9 : IFN- $\gamma$  standart eğrisi.

### 3.2.10.2 Krisin ile uyarılan IL-2 düzeyinin Jurkat T hücresinde kuantifikasyonu

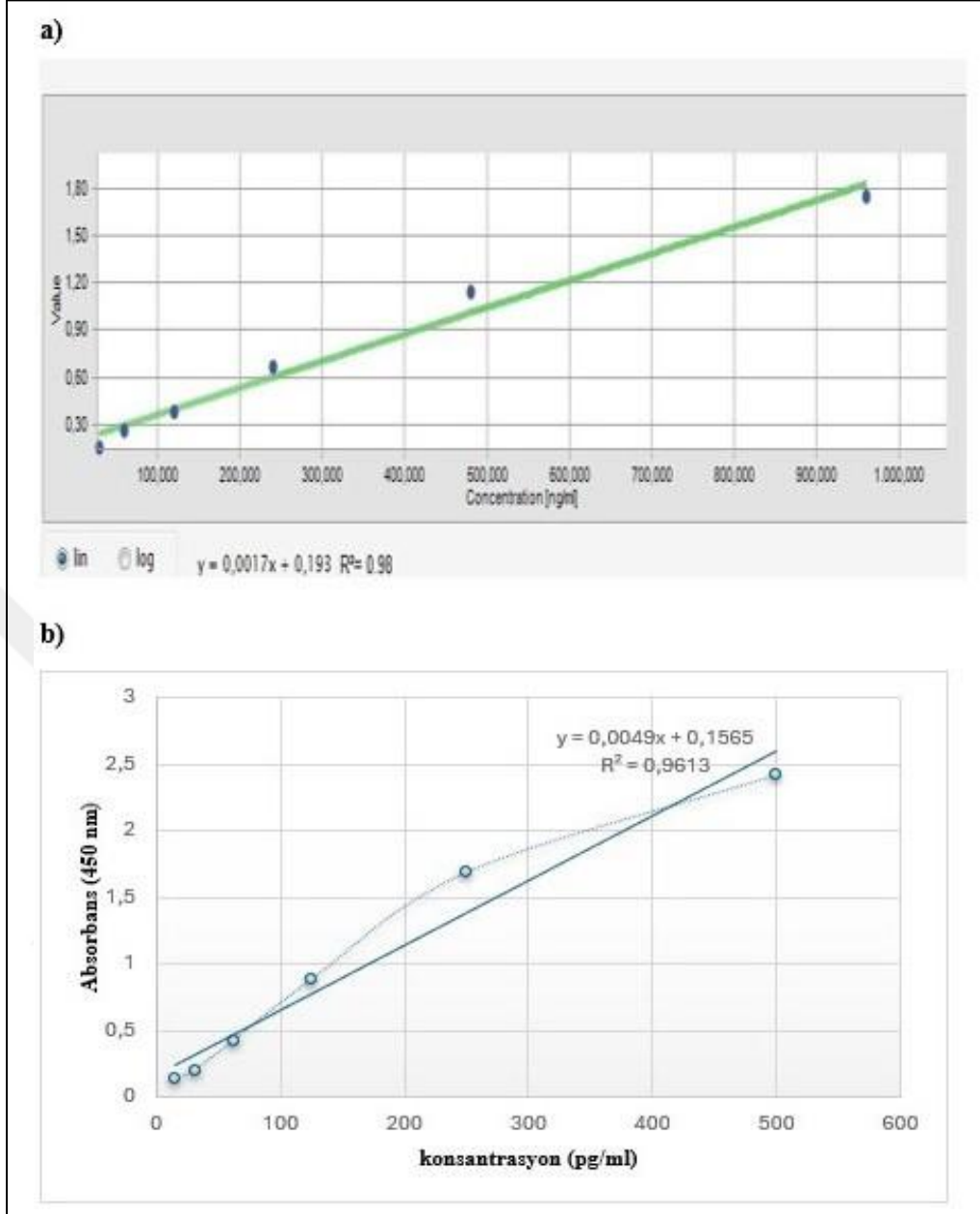
Jurkat T hücreleri, iki farklı dozda krisin (100,200  $\mu$ M) ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Bir grup, krisin inkübasyonlarının sonundan 6 saat önce %1.5 PHA-M (Gibco) ile maruz bırakıldı, diğer grup ise sonundan 12 saat önce maruz bırakıldı. Farklı inkübasyon süreleri, en optimal süreyi bulmayı amaçlamıştır. Daha sonra, hücreler 1500xg'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve supernatanlar toplandı. Toplanan supernatanlar, 3.2.10.' da anlatılan ELISA metoduna ve üreticinin talimatlarına göre bir insan "İnsan IL-2 ELISA kiti" (BT LAB) kullanılarak IL-2 için analiz edildi. Hücre süpernatantlarındaki IL-2 konsantrasyonları şekil 3.10'daki standart eğri formülüne göre hesaplandı.



Şekil 3.10 : IL-2 standart eğri grafiği .

### 3.2.10.3 Krisin ile uyarılan tnf- $\alpha$ ve granzim-b düzeylerinin ko-kültür modellerinde kuantifikasyonu

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, 10 ng/ml IL-2 varlığında 48 saat boyunca krisin ile aktive edilmiş ya da edilmemiş NK-92 hücreleri ile ko-inkübe edildi (125  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M). İnkübasyon periyodundan sonra, EGF (50 ng/ml) ile 24 saat boyunca işlem görmüş meme kanseri hücreleri, aktive NK-92 hücreleri ile nemlendirilmiş CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de 4 gün süreyle ko-kültüre edildi. Daha sonra, intrasellüler indüklenmiş TNF- $\alpha$  ve Granzim-B seviyeleri 3.2.10.' da anlatılan ELISA metoduna üreticinin talimatlarına göre "İnsan TNF- $\alpha$  Elisa kiti" ve "granzim-B ELISA kiti" (BT LAB, Elabscience Binovation Inc.) kullanılarak kuantifiye edildi. Ko-kültür büyüme ortamlarındaki tnf-  $\alpha$  ve granzim-b konsantrasyonları şekil 3.11'deki standart eğri formüllerine göre hesaplandı.



Şekil 3.11 : a) TNF- $\alpha$  b) granzim-b standard eğri grafikleri.

#### 3.2.10.4 Krisin ile uyarılan IFN $\gamma$ , IL-2 ve granzim-B düzeylerinin T hücresi ko-kültür modellerinde kuantifikasyonu

Hücreleri santrifüj edilen besiyerlerinin süpernatantları toplandı ve medyada salgılanan IFN- $\gamma$ , IL-2 ve Granzim-B konsantrasyonları, 3.2.10.' da anlatılan ELISA metoduna ve üreticinin protokol talimatlarına göre "insan IFN- $\gamma$  ELİSA kiti", İnsan IL-2 ELİSA kiti" ve "Granzim-B ELISA Kiti" ile (Sunred Biotechnology, BT LAB, Elabscience Binovation Inc.) kullanılarak belirlendi. Hücre süpernatantlarındaki IFN $\gamma$ , IL-2 konsantrasyonları şekil 3.9, 3.10 ve 3.11' daki standart eğri formüllerine göre hesaplandı.

### 3.2.11 Nitrik oksit üretiminin ölçümü

NK-92 hücreleri ile meme kanseri hücrelerinin ko-kültür supernatanlarında ve LPS ve krisin uygulanmış RAW.264.7 hücrelerine nitrit konsantrasyonu, Griess reaksiyonu aracılığıyla [293] belirlendi.

#### Griess reaktifi hazırlanışı

Griess reaktifi, genellikle nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ölçümleri için kullanılan bir kimyasal reaktiftir. Bu reaktif iki bileşenden oluşur: Reaktif A (Sülfanilamid Çözeltisi) ve Reaktif B (N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür Çözeltisi).

#### Gerekli malzemeler:

- Sülfanilamid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ )
- N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür
- Fosforik Asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (%85'lik çözeltisi)
- Distile su

#### Hazırlama adımları:

##### 1. Reaktif A: Sülfanilamid Çözeltisi (0.1% w/v)

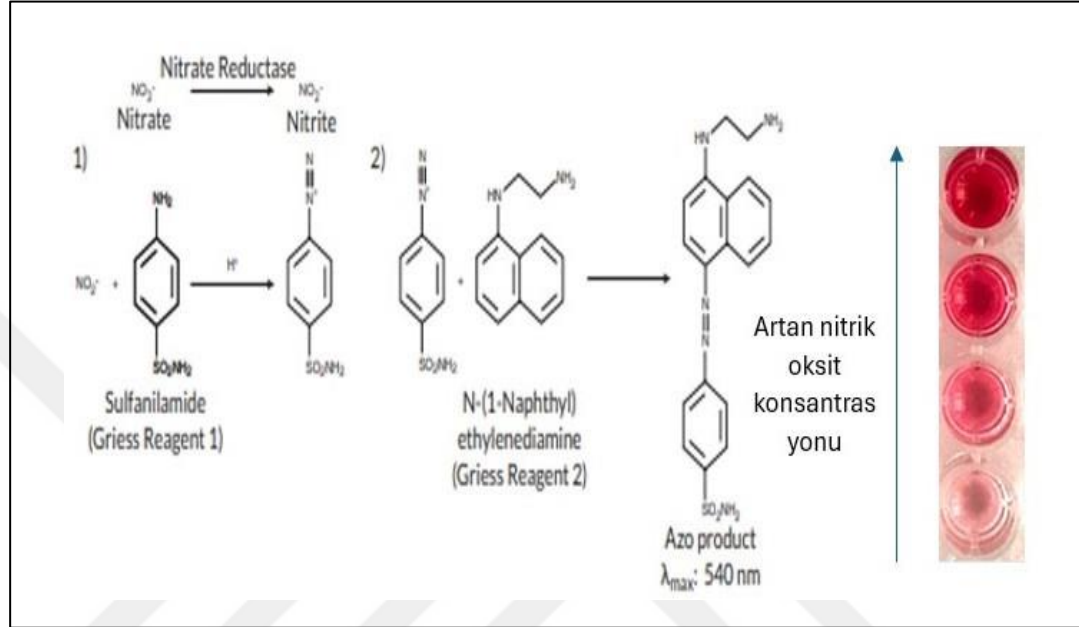
- 100 mL distile suya 0.1 g sülfanilamid eklendi.
- Üzerine 10 mL %85'lik fosforik asit eklendi.
- Karışımı iyice çözünene kadar karıştırdı.
- Çözeltinin hacmini distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

##### 2. Reaktif B: N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür Çözeltisi (0.1% w/v)

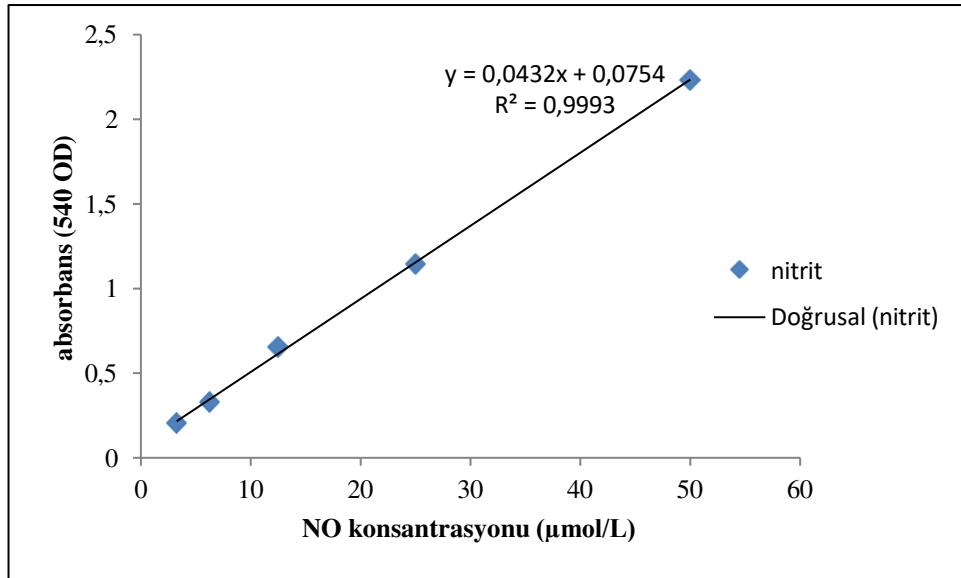
- 100 mL distile suya 0.1 g N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür eklendi.
- İyice çözünene kadar karıştırıldı.
- Çözeltinin hacmini distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Bu reaktifler de oda sıcaklığında saklanır ve Griess reaktifi kullanımı sırasında, Reaktif A ve Reaktif B eşit hacimlerde (1:1 oranında) karıştırılarak taze hazırlanır. Bu karışımı, nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) içeren örnekler ile reaksiyona soktuğunuzda pembe/mor bir renk oluşur ve bu renk, nitrit miktarıyla orantılıdır. Griess testi prensibi ve renk değişimi Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Özetle, her örnekten 100 µl supernatant ve eşit hacimde reaktif A ve reaktif B' den oluşan 100 µl Griess reaktifi ile birleştirildi. Karışım, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve absorbans daha sonra bir mikropilaka okuyucu (Varioskan Multiplate Reader) kullanılarak 540 nm'de ölçüldü. Sonuçlar, Şekil 3.13'te bulduğumuz standart eğrisine göre hesaplandı.



Şekil 3.12 : Griess reaktifi ile nitrik oksit ölçümü.



Şekil 3.13 : Nitrit konsantrasyonu standart eğrisi.

### **3.2.12 Western blot yöntemi ile PD-L1, p-akt ve p-mtor protein düzeylerinin belirlenmesi**

6'lık hücre plaklarına ekilen meme kanseri hücrelerine, etkin krisin dozları 4 saat boyunca uygulandıktan sonra, 24 saat de EGF (10ng/ml)' e maruz bırakılacaktır. İnkübasyon sonrası, fosfat tamponu ile yıkanan hücreler RIPA tamponu ile lize edilecek ve her grup için protein miktarları Bradford yöntemi ile protein standartları kullanılarak belirlenecektir. %1 DMSO uygulanmış kontrol grubu dahil her bir gruptan 20-50 µg arası protein %12,5'luk SDS jeline yüklenecek ve 100 V' da proteinler ayrılana kadar yürütülecektir. Daha sonra proteinler PVDF membrana aktarılacak ve PD-L1, p-akt, p-mtor antikorları ile her bir grubun ilgili protein ekspresyon düzeyleri belirlenecektir.

#### **Protein ekstraksiyonu**

Protein ekstraksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla 6'lık hücre plaklarına ekilen meme kanseri hücrelerine, etkin krisin dozları 4 saat boyunca uygulandıktan sonra, 48 saat de EGF (10ng/ml)' e maruz bırakıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra hücreler bir kez PBS tamponuyla yıkandı, ardından hücreler önceden ısıtılmış tripsin ile flakondan çıkarılarak 2 ml'lik tüplere kondu. Ortamdan tripsini çıkarmak için hücreler 1600 x g'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüje edildi, süpernatant çıkarıldı ve pellet PBS ile yıkandı. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. 1 ml RIPA lizis tamponu, 1 ml 1X RIPA tamponu, 20 µl PMSF, 10 µl Proteaz İnhibitör Kokteyli ve 10 µl sodyum orovanadat çözeltisi içeren tampon hazırlandı ve hücrelerin lizisi için her tüpe 150 µl RIPA tamponu eklendi. Tüpler 10 saniye vortekslenip 10 dakika buzda inkübe edildi, bu vorteksleme ve inkübasyon işlemleri üç kez tekrarlandı. Ardından, her tüpteki lizatlar 13000 x g'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar nazıkçe alındı ve -20°C'deki dondurucuda saklandı.

#### **Protein konsantrasyonunun belirlenmesi**

Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları, sığır serum albumini standardı (M. M. Bradford, 1976) kullanılarak Quick Start Bradford Assay (Bio-Rad) ile ölçüldü. Bu testin prensibi, protein moleküllerinin asidik koşullar altında Comassie Brilliant Blue G-250 ile bağlanarak renginin kahverengiden sabit bir mavi forma dönüşmesidir. Bu mavi protein-boya formu 595 nm dalga boyunda bir spektrofotometre ile tespit edildi (Varioskan Flash, Thermo Scientific).

### Reaktifler

- Bradford Reaktifi (Thermo Scientific): 1 L boya çözeltisi metanol ve fosforik asit içermektedir. Standart 5 ml prosedüründe 200 test veya mikrolaka prosedüründe 4000 test için yeterlidir.
- Sığır Serum Albümini Standart Seti (Thermo Scientific)
- BSA'nın 7 farklı konsantrasyonda (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml) 2 ml'lik tüplerde set halinde sunulmuştur.
- Protein Örneği: Protein örneklerine herhangi bir seyreltme işlemi yapılmamıştır. Bradford reaktifi 4°C depolamadan çıkarıldı ve ortam sıcaklığına getirildi. Her standart ve bilinmeyen örnek solüsyonu 96 kuyulu mikrolaka kuyucuklarına 5 µl olarak pipetlendi. Ardından 250 µl 1x boya reaktifi eklendi ve en az 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında 1 saatten fazla inkübe edilmemelidir. Varioskan Flash spektrofotometresi 595 nm'ye ayarlandı ve standartların ve bilinmeyenlerin absorbansı ölçüldü.

Bir standart eğrisi, 595 nm değerlerinin (y eksen) µg/ml cinsinden konsantrasyona karşı (x eksen) grafiği çizilerek oluşturuldu. Bilinmeyen örnek konsantrasyonu, standart eğri kullanılarak belirlendi. Örnekler seyreltilmişse, kullanılan seyreltme faktörü ile çarpılarak nihai konsantrasyon ayarlandı. Standart eğri formülü bulundu ve örneklerin protein konsantrasyonları Denklem 3.2' ye hesaplandı. Tablo 3.4'te örneklerin protein konsantrasyonları (mg/ml) cinsinden gösterilmiştir.

Standart eğrisi formülü:  $y : 0,4338x + 0,286$  ( $R^2: 0,9868$ )

$$Protein\ Kons(\frac{mm}{ml}) = ((OD_{595nm}) \div standart\ formülü\ eğimi \times DF \quad 3.2$$

(Kons: konsantrasyon , DF: dilüsyon faktörü)

**Tablo 3.3 :** Hücre gruplarının protein konsantrasyonları.

| mg/ml          | Kontrol | EGF <sup>+</sup> | EGF+Krisin<br>100 µm | EGF+Krisin<br>200 µm | Krisin<br>100 µm | Krisin<br>200<br>µm |
|----------------|---------|------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------------|
| MCF-7          | 1,74    | 2,28             | 1,72                 | 1,11                 | 1,60             | 1,37                |
| MDA-MB-<br>231 | 2,30    | 2,16             | 1,79                 | 1,57                 | 1,68             | 1,85                |



## **Protein ekspresyonlarının belirlenmesi**

### *Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)*

EGF ile önceden uyarılmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki immün kontrol noktası proteinlerinden olan PD-L1 ve p-akt, p-mTOR proteinlerinin ekspresyonları Towbin ve arkadaşlarının (1979) tarif ettiği şekilde [294] Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Western blot'un ilk aşaması, proteinlerin Laemmli (1970) tarafından tanımlanan kesikli tampon sisteminde %8'lik üst üste gelen jel ve %12'lik ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrılmasıdır. Ayırıcı ve üst üste gelen jel çözeltileri taze hazırlanmıştır. Tablo 3.5'te ayırma ve yığma jel çözeltilerinin bileşenleri gösterilmiştir.

**Tablo 3.4 : SDS-PAGE jel çözeltilerinin bileşenleri.**

| <b>Bileşenler</b>             | <b>Ayırma Jel Solüsyonu</b> | <b>Yükleme Jel Solüsyonu</b> |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <b>Monomer Konsantrasyonu</b> | % 12                        | % 8                          |
| <b>Jel Solüsyonu</b>          | 3300 µL                     | 1100 µL                      |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>        | 3100 µL                     | 1000 µL                      |
| <b>Ayırma Tamponu</b>         | 3600 µL                     | ---                          |
| <b>Yükleme Tamponu</b>        | ---                         | 1300 µL                      |
| <b>10% SDS</b>                | 30 µL                       | 10 µL                        |
| <b>10% APS</b>                | 30 µL                       | 10 µL                        |
| <b>TEMED</b>                  | 10 µL                       | 3 µL                         |
| <b>Total Hacim</b>            | 10 mL                       | 3 ml                         |

## **Reaktifler**

- Jel Çözeltisi: 30,0 g akrilamid ve 0,8 g N,N-bis-methylene-akrilamid, toplam hacmi 100 ml olan H<sub>2</sub>O içinde karıştırıldı. Çözelti, 0,45 µm filtreden geçirildi ve karanlıkta 4°C'de saklandı.
- Yükleme Tamponu (0,5 M Tris-Cl içeren %0,4 SDS, pH 6,8): 6,05 g Tris baz, 40 ml H<sub>2</sub>O içinde çözüldü. pH, 3N HCl ile 6,8'e ayarlandı ve toplam

hacim 100 ml'ye H<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Çözelti, 0,45 µm filtreden geçirildi ve 0,4 g SDS eklendi. Sonunda pH tekrar kontrol edilmelidir.

- Ayırma Tamponu (1,5 M Tris-Cl içeren %0,4 SDS, pH 8,8): 91 g Tris baz, 300 ml H<sub>2</sub>O içinde çözüldü. pH, 1N HCl ile 8,8'e ayarlandı. Toplam hacim, 500 ml'ye H<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Çözelti, 0,45 µm filtreden geçirildi ve ardından 2 g SDS eklendi. Sonunda pH tekrar kontrol edilmelidir.
- TEMED (Tetrametiletilendiamin) (Bio-rad) ticari olarak temin edildi.
- Amonyum Per-sülfat : 40 mg APS, 400 µl saf su içinde çözüldü.
- Örnek Seyreltme Tamponu (Laemmli): Bio-Rad Laboratories, Inc.'den ticari olarak temin edilen Laemmli örnek tamponu, 31,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), %10 gliserol, %0,005 Bromofenol Mavisini içerir. Kullanımdan önce, 950 µl Laemmli örnek tamponuna 50 µl 2-merkaptoetanol, indirgeme ajanı olarak eklendi.
- Elektroforez Yürütme Tamponu: 0,25 M Tris, 1,92 M glisin (10x Stok, kullanım öncesi %0,1 SDS eklenerek 1x'e seyreltilir). 15 g Tris-baz, 350 ml saf su ile çözüldü, ardından 72 g glisin eklendi. Karışımın hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çalışma tamponu, 10x stok çözelti olarak hazırlandı ve kullanıldığında 1x'e seyreltilerek kullanıldı. Kullanımdan önce 1 litre 1x çözeltiye 1 g SDS eklendi.

Elektroforez deneylerinde; dikey plaka jel elektroforezi, Mini-PROTEAN tetra hücresi (Bio-Rad, Richmon, CA) ile yapıldı. Ayırıcı jel çözeltisi (%8) hazırlandıktan sonra, hemen sandviç ünitesine tarak altındaki 1 cm'ye kadar aktarıldı. Düz bir jel yüzeyi elde etmek için ayırıcı jelin üstü izopropanol ile kaplandı. Ayırıcı jel polimerize olduktan sonra izopropanol alındı ve yükleme jel plakaya koyuldu, ardından tarak olabildiğince hızlı bir şekilde yerleştirildi. Yığma jel polimerize olduğunda, tarak çıkarıldı. Kuyular 1x yürütme tamponu ile dolduruldu ve hava kabarcıkları ile kalan jel parçacıklarını çıkarmak için Pasteur pipeti kullanılarak temizlendi.

1 mg/ml (20 µg) konsantrasyonunda protein elde etmek için, proteinler denklem 3.3'e göre saf su ile seyreltilmiştir ve her bir kuyuya eşit miktarda protein içerecek şekilde eşit hacimde örnek yüklenmiştir.

$$Hacim (v) = 20 - (20 \div Protein\ Konsantrasyonu) \quad 3.3$$

V, protein lizatlarını çözmek için eklenmesi gereken dH<sub>2</sub>O hacmini tanımlar. Örneklerin 1 birimi, 1 birim 2X Laemmli seyreltme tamponu (SDB) ile

seyreltilmiştir. Seyreltmeden sonra, örnekler 95°C'de 10 dakika boyunca ısı bloğunda denatürasyon için inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 10 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve ardından 5 saniye boyunca kısa bir santrifüje tabi tutulmuştur. 30 µl örnek, jeldeki farklı kuyulara yüklenmiştir. 7 µl protein bandı (Thermoscientific) işaretleyici olarak yüklenmiştir. Örnekler yüklendikten sonra tampon tankı çalışma tamponu ile doldurulmuş ve güç kabloları ile hücre kapağı tanka yerleştirilmiştir. Ardından tank Bio-Rad güç kaynağına bağlanmış ve elektroforez başlangıçta 10mA-60V'de çalıştırılmıştır. Örnekler sıkışıp aynı seviyeye geldiğinde voltaj 20mA-120V'a çıkarılmıştır.

### **İmmün-Blotlama**

#### *Reaktifler:*

- Transfer Tamponu: (25mM Tris, 192mM Glisin, pH: 8.3) (10X): 30,3 g Tris-baz ve 144 g glisin, 1 L saf suda çözüldü. Ardından, 100 mL 10X transfer tamponu 200 mL metanol ile karıştırıldı ve hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
- TBS: (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH: 7.4) (10X): 87,66 g NaCl ve 12,11 g Tris, 1 L saf suda çözüldü. pH'ı yaklaşık 7,8'e ayarlamak için yaklaşık 5 mL HCl kullanıldı.
- TBS-Tween (TBST): 100 mL 10X TBS tamponu 2 mL Tween-20 ile karıştırıldı ve hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
- Bloklama Çözeltisi: (%5 Yağsız Kuru Süt): 5 g yağsız kuru süt, 100 mL TBST içinde çözüldü.
- Primer Antikor: 1/200 ila 1/1000 dilüsyonlar. Dilüsyon, %2,5 yağsız kuru süt ile yapıldı.
- Sekonder Antikor: 1/500 ila 1/5000 dilüsyonlar. Dilüsyon, %2,5 yağsız kuru süt ile yapıldı.
- Clarity Western ECL Substratı (Bio-Rad, Richmon, CA): ECL substrat çözeltisi, Clarity Western Peroksit Reaktif ve Western Luminol/Güçlendirici Reaktif içerir. 3 mL peroksit çözeltisi ve 3 mL luminol güçlendirici çözeltisi karıştırıldı ve her membran için bu karışımdan 6 mL kullanıldı.

Transblotlama işleminin ilk aşamasında, jel camlardan çıkarıldı ve 10 dakika boyunca transfer tamponuna yerleştirildi. poliviniliden florür (PVDF) membranı, jel ile aynı boyutta kesildi. Başarılı bir trans-blotlama için, hidrofobik PVDF membranı %100

metanol ile 30 saniye aktive edilerek daha hidrofilik hale getirildi. Ardından membran, 5 dakika boyunca saf suda bekletildi. İki filtre kağıdı da birkaç saniye boyunca transfer tamponu ile ıslatıldı. Daha sonra iki filtre kağıdı, jel ve PVDF membranı trans-blot turbo sistemine yerleştirildi. Proteinlerin PVDF membranına transferi, Trans-blot Turbo Blotlama Sistemi (Bio-Rad, Richmon, CA) ile 25V ve 2,5A'de 10 dakika boyunca gerçekleştirildi.

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra, membran 5 dakika boyunca TBST ile yıkandı. Ardından, membran oda sıcaklığında bir saat boyunca bloke edici solüsyonda inkübe edildi. Bloklama adımından sonra, membran 5 dakika boyunca 5 kez TBST ile yıkandı. Daha sonra, membran sırasıyla 1/1000, 1/1000, 1/500 ve 1/1000 oranlarında seyreltilmiş PD-L1 (ebioscience), p-akt (elabsicence), p-mtor (cell signaling) ve b-aktin (cell signaling) primer antikorları ile 4°C sıcaklıkta gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikorlarla yapılan inkübasyondan sonra, bağlanmamış primer antikoru uzaklaştırmak için membran 5 kez, her biri 5 dakika olmak üzere TBST ile yıkandı. Ardından, membran 1/2000 seyreltilmiş horseradish peroksidaz (HRP) konjuge edilmiş sekonder antikor (cell signaling) ile inkübe edildi. PD-L1, p-akt ve b-aktin fare tabanlı, p-mtor ise tavşan tabanlı primer antikorlar olduğundan, bu antikorlara uygun olarak fare ve tavşan tabanlı sekonder antikorlar kullanılmıştır. Sonrasında, bağlanmamış sekonder antikoru uzaklaştırmak için membran tekrar 5 kez, her biri 5 dakika boyunca TBST ile yıkandı. HRP konjuge sekonder antikorun görselleştirilmesi için membran 10 dakika boyunca ECL substratı ile inkübe edildi ve ardından Fusion FX Chemi-Imaging Sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) altında görüntülendi. "Housekeeping" protein olarak ve yüklenen protein miktarlarının eşit konsantrasyonda olduğunu doğrulamak için b-aktin kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J görselleştirme yazılımı ile analiz edildi. İlgili proteinlerin bant yoğunlukları, b-aktin bant yoğunluğuna bölünerek Graphpad Version 8. Programı kullanılarak grafikler oluşturuldu.

### **3.2.13 İmmünfloresan (IF) boyama yöntemi**

İmmünfloresan boyama, hücrelerde belirli proteinlerin lokalizasyonunu görselleştirmek için primer ve sekonder antikorlar kullanılarak yapılan bir yöntemdir. Sabitlenmiş hücreler üzerinde primer ve sekonder antikorlar kullanılarak yapılan immünfloresan boyama için olan protokol aşağıda anlatılmış ve Şekil 3.14'te özetlenmiştir.

### **Gerekli malzemeler:**

- Hücre kültürü plakları (örneğin 6 veya 12 kuyulu plaka)
- 1X PBS (fosfat tamponlu salin)
- %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi
- Triton X-100 (permeabilizasyon için)
- Bloklama solüsyonu (örneğin %5 BSA veya %5 serum PBS içinde)
- Primer antikor (hedef proteine özgü)
- Sekonder antikor (fluoresan konjugatlı, örneğin FITC veya Alexa Fluor ile)
- DAPI (çekirdek boyama)
- Fluoresan mikroskop

### **Protokol adımları:**

#### *Hücrelerin Sabitlenmesi (Fiksasyon:*

Tedavi uygulanan hücre grupları hücre kültür ortamından dikkatlice çıkarıldı ve 2-3 kez PBS ile yıkandı. Hücreler % 4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi ile oda sıcaklığında 40 dakika boyunca tutuldu ve sabitlendi. Sabitlemeden sonra, hücreleri tekrar 2-3 kez PBS ile yıkandı.

#### *Hücrelerin Permeabilizasyonu*

Hücre zarını geçirgen hale getirmek için hücreleri % 0.1-0.5 Triton X-100 veya Saponin içeren PBS ile oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi. Permeabilizasyon sonrası, hücreleri 2-3 kez PBS ile yıkandı.

#### *Bloklama*

Spesifik olmayan bağlanmayı engellemek için hücreleri %5 BSA veya %5 serum içeren PBS ile oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Bloklama solüsyonunu döküldü.

#### *Primer Antikor İnkübasyonu*

Hedef proteine özgü primer antikoru, bloklama solüsyonunda uygun seyreltilmiş halde (örneğin 1/100 veya 1/500) hazırlayın. Primer antikoru hücrelere kuyucuğun yüzeyine kaplayacak hacimde eklendi (takriben 300 µl) ve oda sıcaklığında 1-2 saat inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra, hücreleri 3 kez, her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı.

### *Sekonder Antikor İnkübasyonu*

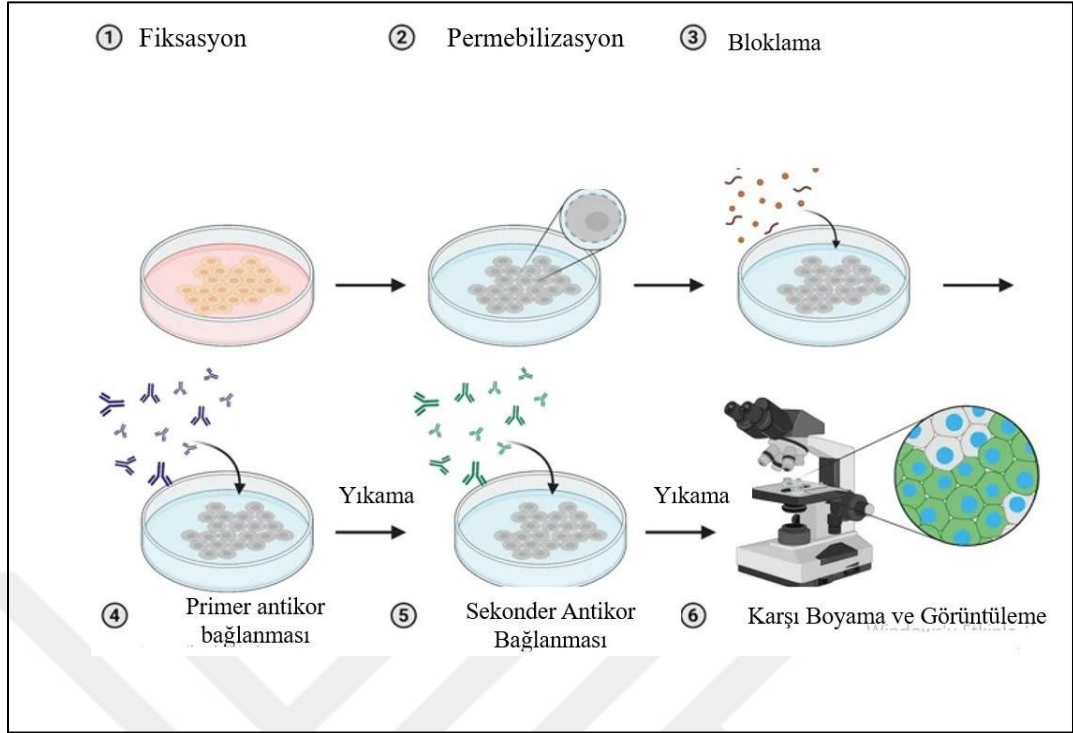
Floresan konjugatlı sekonder antikor, bloklama solüsyonunda uygun seyreltilmiş halde (1/2000) hazırlandı. Deneylerde sekonder antikor olarak aleksa-flor-488 (fare) ve aleksa flor-488 (tavşan) antikorları kullanılmıştır. Sekonder antikor hücrelere eklendi (primer antikor miktarı kadar) ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra, hücreleri 3 kez, her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı. İşlemler karanlıkta yapılmalıdır çünkü sekonder antikorlar ışığa duyarlıdır.

### *DAPI ile Çekirdek Boyama*

Çekirdekleri boyamak için DAPI çözeltisi (örneğin 1/1000 seyreltilmiş) ile 5-10 dakika inkübe edildi. DAPI boyaması sonrasında hücreleri 2 kez PBS ile yıkandı ve hızlıca mikroskop analizine götürüldü.

### *Mikroskopi*

Hücreleri mikroskop altında gözlemlemek için Cell Discoverer 7 (Carl Zeiss) floresan mikroskopunun plak bölümüne yerleştirildi. Hedef proteinlerin lokalizasyonunu gözlemlemek için uygun floresan filtreleri kullanılması önemlidir (Alexa Fluor 488 için yeşil kanal, DAPI için mavi kanal). Görüntülemeye her bir hücre grubunun olduğu kuyulardan en az 10 adet görüntü çekilmiştir. Görüntülerin netlik ayarlarının ve hücre morfolojilerinin en iyi yakalandığı objektif 20X olmuştur. Bu görüntülerde yakalanan toplam hücre sayıları ve Aleksafluor-488 işaretli PD-L1 ve kaspaz-3 antikorlarını eksprese eden hücreler sayılmış ve ilgili proteinleri eksprese eden hücre sayılarının yüzdeleri hesaplanmıştır. Sonuçlar % PD-L1 ve % kaspaz-3 olarak verilmiştir.



Şekil 3.14 : İmmünfloresan boyama yöntemi özet şeması.

#### 3.2.14 İstatiksel analiz

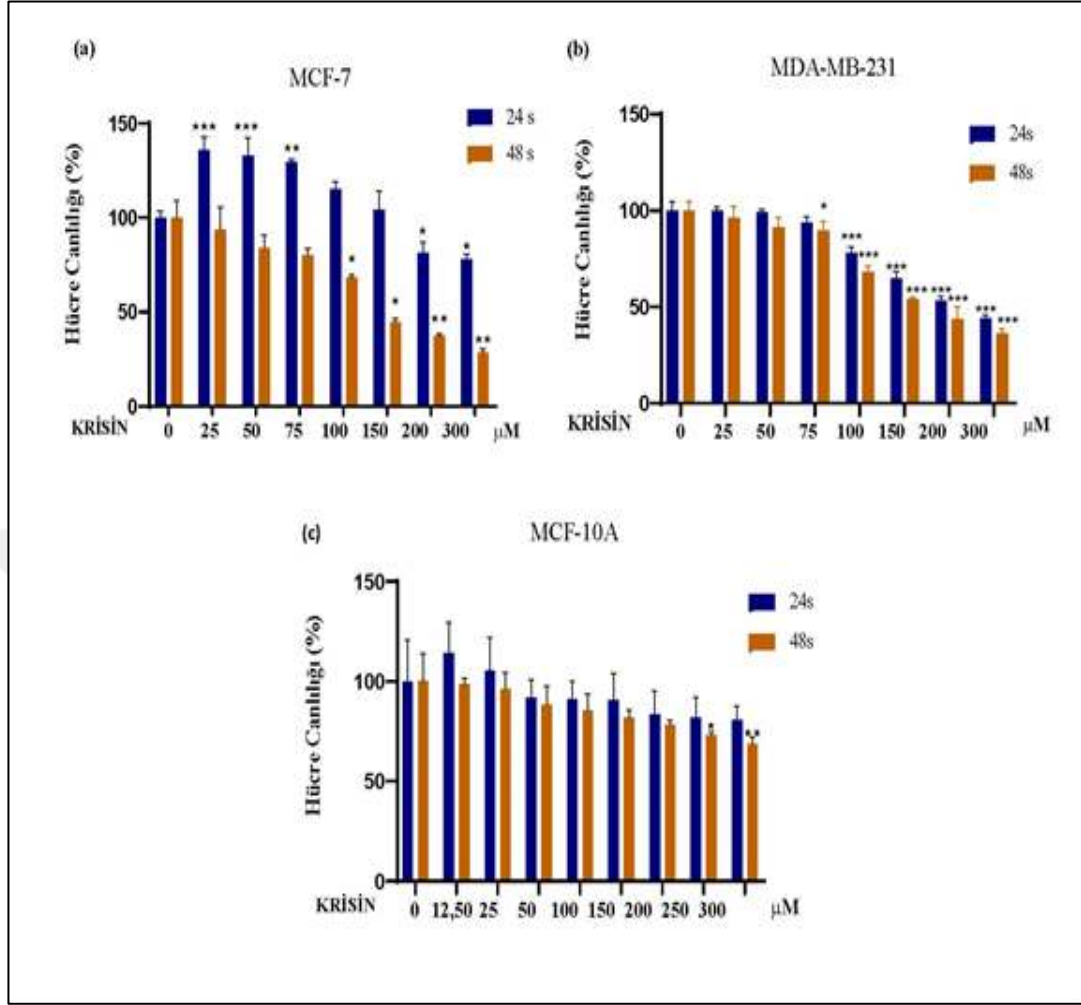
Her deney üç kez tekrarlandı ve veriler, deneysel sonuçların ortalama  $\pm$  standart hata (SD) olarak sunuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar, çoklu karşılaştırmalar ile birlikte tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey'in post-hoc testi ile iki yönlü ANOVA kullanılarak yapıldı. Korelasyon analizleri, GraphPad Prism yazılımı, Versiyon 8.0 kullanılarak gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Krisinin Anti-Proliferatif Etkileri

Önceki çalışmalar, krisinin meme kanseri hücrelerine karşı olan anti-kanser özelliklerini bildirmiştir [277]. Bu çalışmada da krisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri üzerindeki etkilerini göstermek için krisinin hücre proliferasyonu, hücre için ROS üretimi ve apoptotik etkilerini değerlendirmek üzere bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı deneyleri sonuçları Şekil 4.1a-c'de gösterildiği gibi, krisinin 24 saatlik inkübasyon sonrası MCF-7 hücre hattında düşük dozlarda (25-50-75  $\mu$ M) anlamlı bir şekilde artırırken ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ), bu dozlardan sonra hücre ölümü başlamıştır ancak 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda % 50 hücre ölümüne ulaşamamıştır. Ancak 48 saatlik inkübasyon süresi sonundan yapılan ölçümler, her iki hücre hattında da doza bağlı bir azalma göstermiştir. Özellikle, krisinin MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki büyüme inhibe edici etkisi, MDA-MB-231 hücrelerine göre daha güçlü olmakla birlikte ve sırasıyla 48 saatlik yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri; 150  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M bulunmuştur. Ayrıca, normal bir meme hücre hattı olan MCF-10A için 48 saatlik inkübasyon sonrası IC50 değeri 300  $\mu$ M'ün üzerinde bulundu, bu da krisinin normal meme hücrelerini önemli ölçüde etkilemeden kanserli hücre hatlarına karşı seçici bir sitotoksikite gösterdiğini ispatlamıştır. Bu sitotoksikite bulguları ve IC50 değerleri ışığında, devam eden deneylerde hücre hatları 300  $\mu$ M üzerindeki sitotoksik konsantrasyonlara maruz bırakılmamıştır.





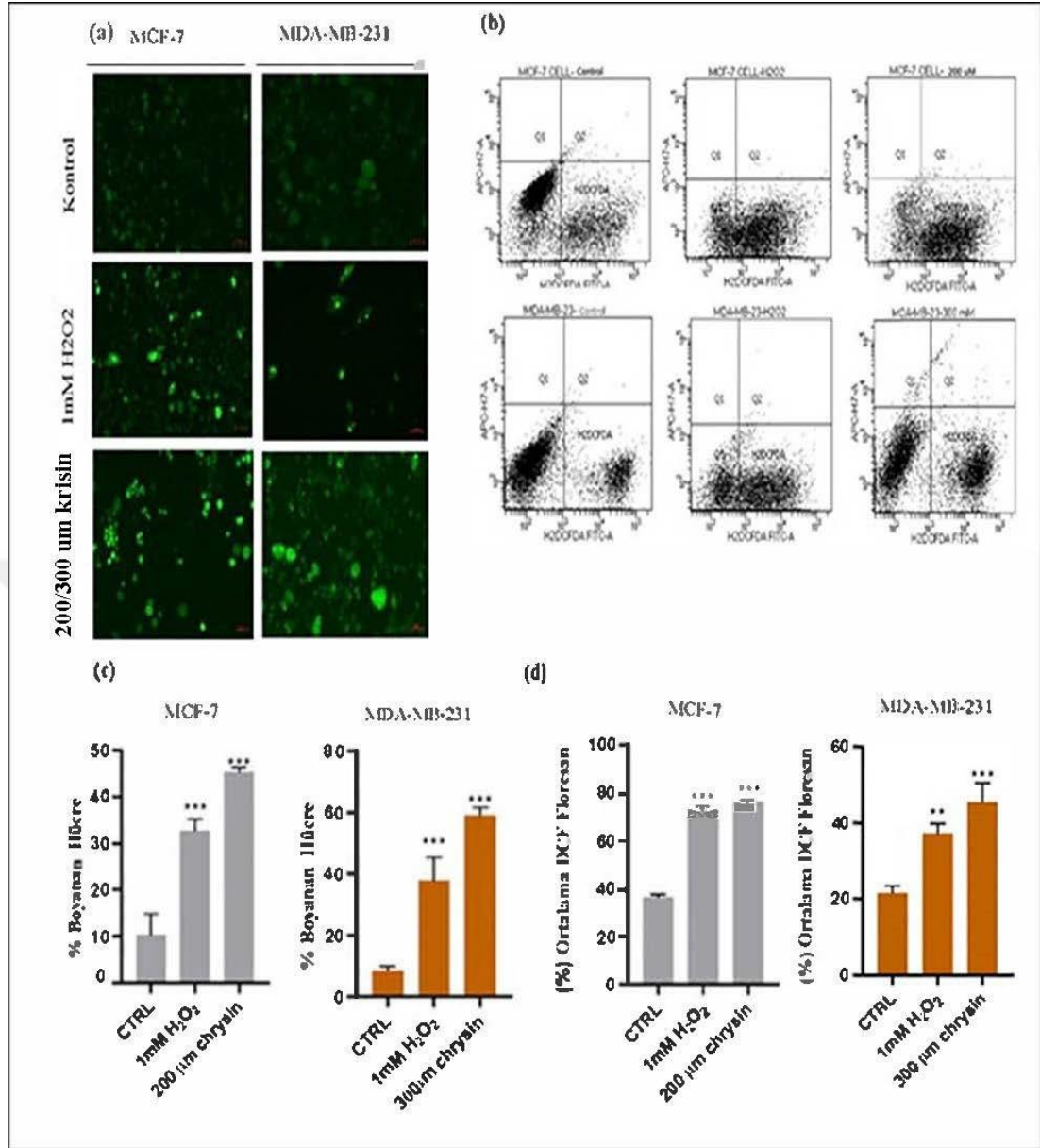
**Şekil 4.1 :** Hücre canlılığı analizleri. 24-48 saatlik a) MCF-7 hücre hattı, b) MDA-MB-231 hücre hattı, c) MCF-10A hattı MTT testi sonuçları. Değerler, üç ayrı deneyin triplikatları olarak ortalamaları alınmış ve ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir. \* kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001

## 4.2 Krişinin Hücre İçi ROS Üretimine Etkileri

Önceki araştırmalar, ROS üretiminin, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkili yolların aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü ve apoptozu tetikleyebileceğini bildirmiştir [295]. Ayrıca, ROS, kanser hücreleri ile bağışıklık hücreleri arasındaki etkileşim dinamiklerini modüle etmede de yer alır ve böylece kansere karşı bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde kilit bir rol oynar [296]. Bu nedenle, bu çalışmada krişinle muamele edilen ve edilmeyen hücrelerdeki hücre içi ROS üretimi, akış sitometrisi ve immünofloresan boyama yöntemlerini kullanarak belirlendi. İmmünofloresan görüntüleme deneylerinde; MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, kontrol olarak DMSO, pozitif kontrol olarak 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 4 saat ve farklı

konsantrasyonlardaki krisin (200-300 $\mu$ M) ile 48 saat süreyle muamele edildikten sonra DCFDA floresan probu ile boyandı. Üç rastgele hücre görüntüsünden 100'den fazla hücre sayıldı ve ROS üreten hücrelerin yüzdeleri şekil 4.2.(b)'de gösterildi. Akış sitometri deneylerinde ise hücreler, 4 saatlik 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 48 saatlik DMSO (kontrol) ve krisin (200-300 $\mu$ M) tedavisi sonrası akış sitometri analizi öncesi DCFDA ile boyandı. Şekil 4.2 (d) akış sitometri sonuçlarının (4.2.(c)) kantitatif verilerini göstermektedir. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 48 saat boyunca 200  $\mu$ M ve 300  $\mu$ M krisinle muamele edilmesi, DCF-reaktif ROS'ta bir artışa neden oldu. Ayrıca, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 4 saat muamele edilen grup ve krisin uygulanan grup arasındaki ROS miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir benzerlik bulundu ( $P < 0.001$ ).





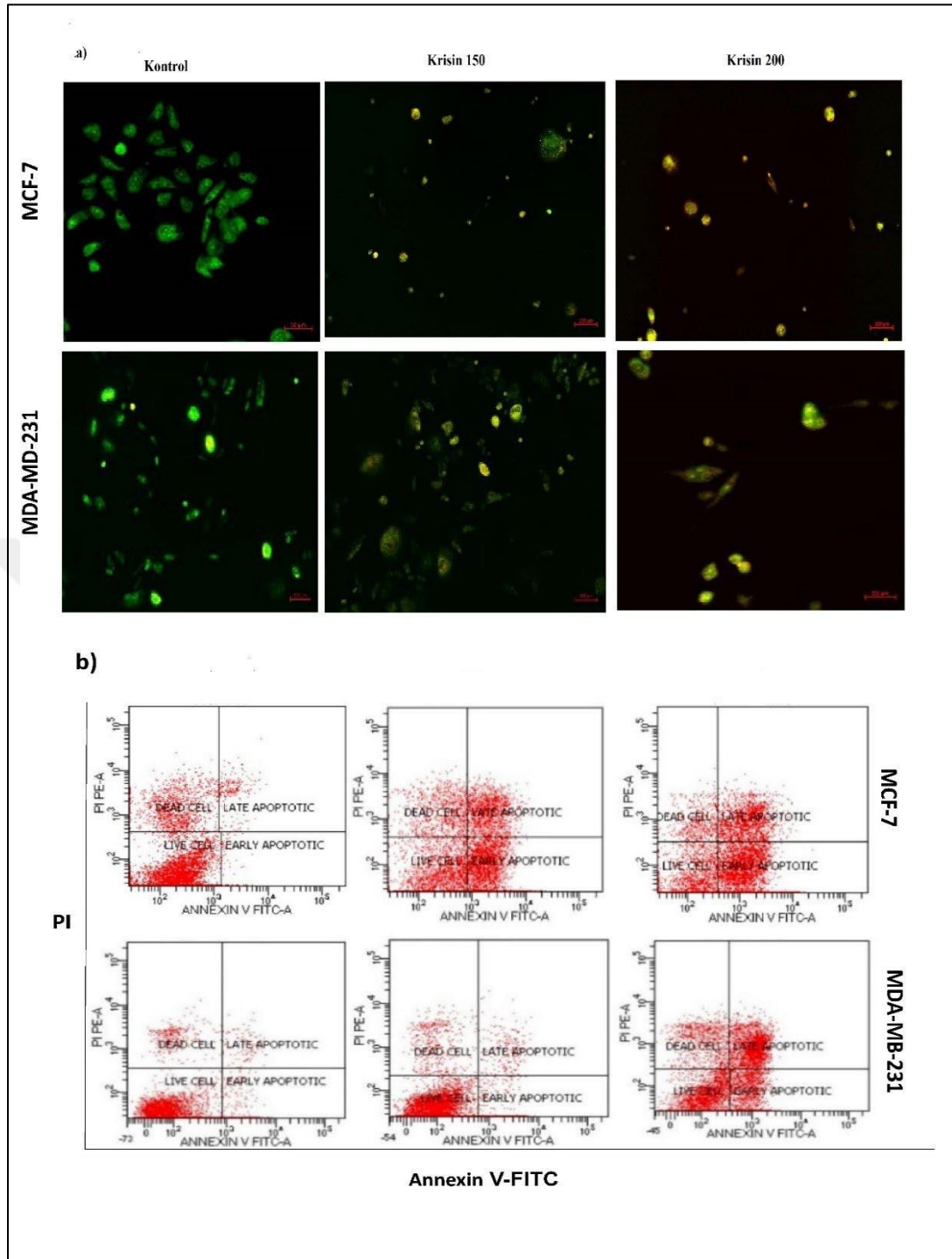
**Şekil 4.2 : Krisinin Hücre içi ROS üretimine etkisi.** Ölçek çubuğu = 50 µm. Veriler, üç bağımsız deneyi temsil eden bir deneyden alınmıştır. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \* kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 ve \*\*\*P < 0.001.

### 4.3 Krisinin Apoptotik Etkileri

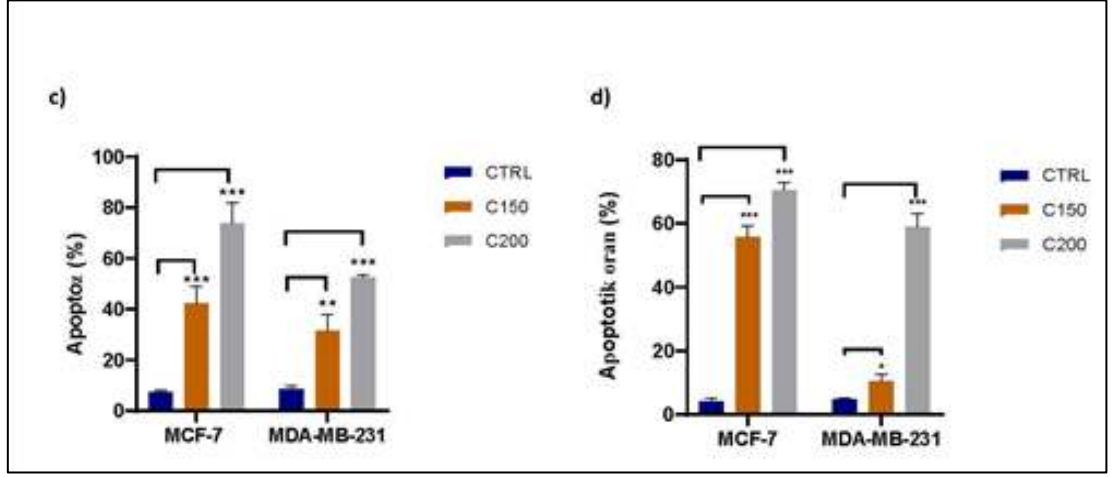
Krisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisini değerlendirmek için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler; akridin oranj/EtBr çift boyaması ile hücrelerin floresan mikroskop altında görüntülenmesi ve FITC/Annexin V boyaması ile akış sitometri cihazında apoptotik hücrelerin sayılmasıdır. Yöntemlerin detayları materyal ve metot bölümünde açıklanmıştır.

Akridin oranj/EtBr çift boyaması yoluyla hücre ölümünün değerlendirilmesi; kontrol grupları (%1 DMSO) ve krisin uygulanan gruplar arasında belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.3). Kontrol grubu, floresan mikroskop altında incelendiğinde, hücreler sağlıklı bir durum sergileyerek, yeşil görünümlü ve turuncu veya kırmızı lekeler olmadan (Şekil 4.3.a) görüntülendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 150 µm ve 200 µm dozunda krisin ile 48 saatlik muamele sonrasında, hücrelerin önemli bir kısmı sarımsı turuncudan turuncuya kadar değişen apoptoz özellikleri sergiledi. Her iki hücre hattında da apoptoz yüzdesi önemli ölçüde arttı ( $P < 0.01$ , ve  $P < 0.001$ ), ancak MCF-7 hücrelerinde apoptozun daha düşük dozlarda başladığı görüldü (Şekil 4.3.b). Bu bulgu, FACS (akan hücre ölçer) cihazı kullanılarak yapılan apoptoz analizinden elde edilen sonuçlarla (Şekil 4.3(b)) tutarlı bulundu.

FACS ile gerçekleştirilen analizler, apoptoz indüksiyonunun artan krisin konsantrasyonlarıyla yükseldiğini gösterdi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat boyunca 150 µm ve 200 µm krisin ile muamele sonrasında, sırasıyla %55,7, %70,5, %10,4 ve %58,9 oranında Annexin V'nin meme kanseri hücrelerine bağlandığı bulundu (Şekil 4.4.(b)). Bu sonuçlar, krisinin özellikle MCF-7 hücrelerinde, MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla, apoptozun bir göstergesi olan fosfatidilserinin dışa vurulmasını önemli ölçüde artırdığını göstermektedir ve 150 µM krisin muamelesi, MCF-7 hücrelerinde erken ve geç apoptotik popülasyonların yüzdelерinde önemli artışlara ( $P < 0.001$ ) neden olmuştur, benzer önemli bir etki MDA-MB-231 hücrelerinde sadece 200 µM dozunda gözlenmiştir.



**Şekil 4.3 :** Krisinin apoptotik etkilerinin immunofloresan mikroskop altındaki görüntüleri (Ölçek çubuğu = 20 µm) ve akış sitometri diyagramları.



**Şekil 4.4 : Kresinin apoptotik etkilerinin kuantitatif sonuçları.** c) IF görüntüleme sonuçları. d) Akış sitometri sonuçları. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile yapılmıştır. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \* kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001.

#### 4.4 Kresinin NK-92 Hücrelerinin Çoğalması ve Aktivasyonu Üzerine Etkisi

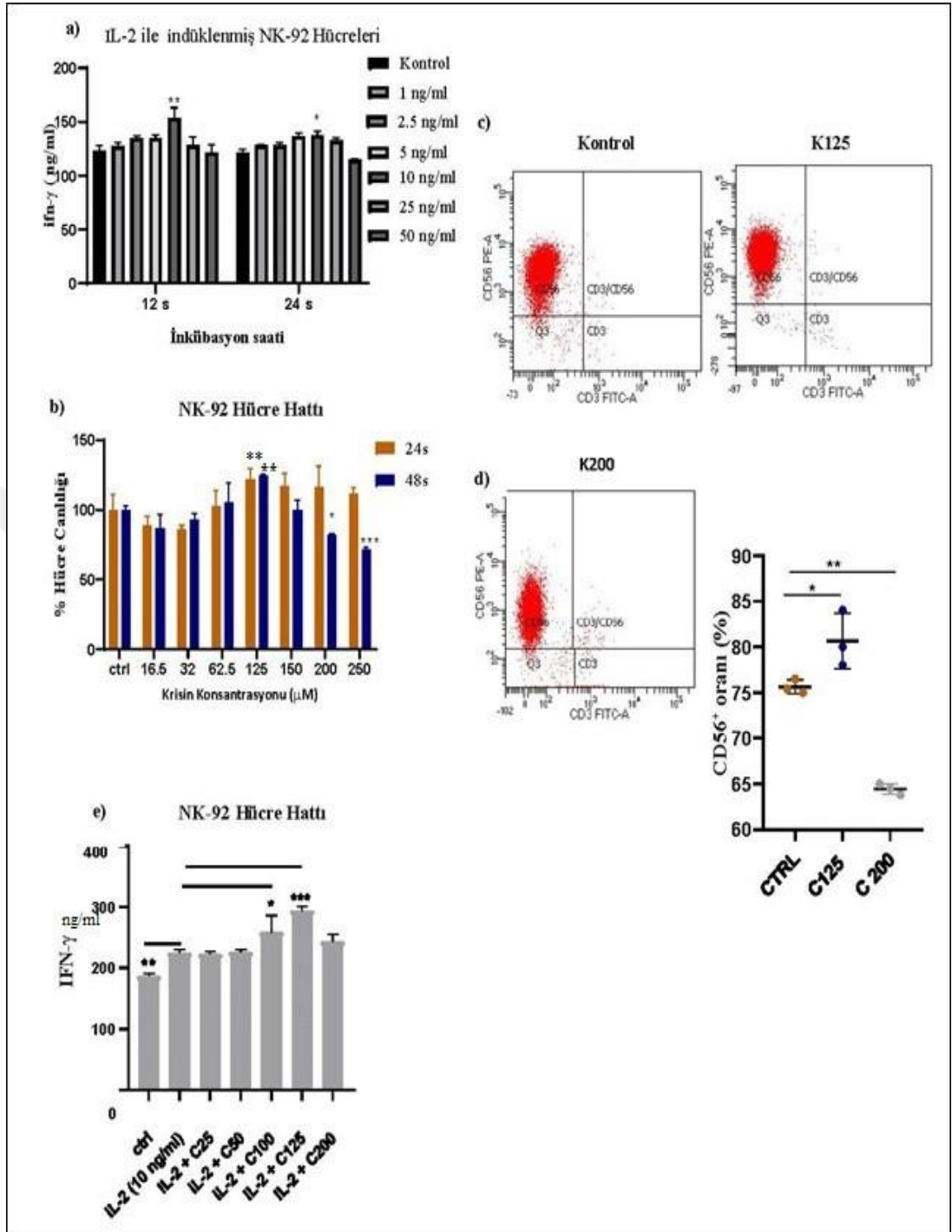
Flavonoidler, proinflatuar sitokinlerin salınımını teşvik ederek NK hücrelerinin antitümör aktivitesinin etkinliğini artırabilir [297]. Bu bilgi ışığında, kresinin NK-92 hücrelerindeki çoğaltma ve aktivasyon etkilerini göstermeyi amaçladık. Hücre canlılığı analizi ile kresinin NK-92 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi, çeşitli kresin konsantrasyonlarının (16.5-250  $\mu$ M) 24 ve 48 saat boyunca uygulanarak, kontrol grubuyla (%1 DMSO) karşılaştırılması yoluyla değerlendirildi. Ayrıca, akış sitometrisi ile CD56+ yüzey protein düzeyleri ölçüldü. IL-2 ve farklı kresin konsantrasyonları (25-200  $\mu$ M) ile indüklenen NK-92 hücrelerinin süpernatantlarında IFN- $\gamma$  üretimi, ELISA yöntemiyle araştırıldı.

Öncelikle, bu çalışmada NK-92 hücrelerinin stimülasyonu için en uygun IL-2 dozunu ve inkübasyon süresini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0-50 ng/ml) 12 ve 24 saat uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, 10 ng/ml IL-2 dozunun 12 saat ve 24 uygulanmasının IFN- $\gamma$  üretimi üzerinde anlamlı etkiler yarattığını göstermektedir ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Fakat 12 saatlik inkübasyon 24 saat inkübasyonla karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre daha anlamlı bir ifn-gamma üretimi görülmüştür (Şekil 4.5.(a)). 10 ng/ml IL-2 dozunun hem hücre canlılığı hem de sitotoksik yanıt açısından en optimal etkiyi sağlama potansiyeli olduğu düşünüldüğünden devamında yapılan deneylerde bu konsantrasyon ile devam edilmiştir.

Krisinin NK-92 hücrelerindeki etkilerini değerlendirmek için hücre canlılığı WST-1 hücre proliferasyon yöntemiyle değerlendirildi. Düşük dozlarda krisin tedavisiyle NK-92 hücre canlılığında bir azalma eğilimi gösterirken, 32 mM'den yüksek dozlarda anlamlı artışlar gözlemlendi, ancak en yüksek canlılık 24 saatlik ve 48 saatlik grupta 125  $\mu$ M krisin dozunda görüldü ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (Şekil 4.5.(b)). Bu durum krisinin doza bağlı etkisine dair bir kanıt olarak kabul edilebilir. Ayrıca NK-92 hücrelerinin viabilitesi 200 ve 250  $\mu$ M krisin ile 48 saatlik inkübasyon sonrası anlamlı ölçüde düşmüştür ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ).

Krisinin NK-92 hücreleri üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için, akış sitometrisi kullanarak NK hücre yüzey işaretleyicilerinden biri olan CD56<sup>+</sup> proteinin ifadesini analiz edildi. NK-92 hücreleri DMSO (kontrol) ve seçilen iki doz krisin (125-200  $\mu$ M) ile muamele edildi ve ardından CD3-FITC (negatif hücre yüzey işaretleyicisi) ve CD56-PE antikoları ile boyandı. Bulgularımız, kontrol grubuna kıyasla 125  $\mu$ M dozunda krisinle hafif ancak anlamlı bir artış gösterdi, ancak şaşırtıcı bir şekilde 200  $\mu$ M dozunda bir azalma gösterdi. Bu sonuç, krisin uygulamasıyla NK hücre aktivitesi arasında konsantrasyona bağımlı bir bağlantı olduğunu ortaya koyan diğer bir bulgu oldu. Hücre proliferasyonu deneylerinde 125  $\mu$ M dozda en anlamlı artışı gösteren NK-92 hücrelerinin CD56<sup>+</sup> ekspresyon düzeyleri de yine bu dozda kontrol grubuna göre %6.6'lık artış göstermiş ve NK hücre fenotipinde bir iyileşmenin kanıtı olabileceğini öne sürmüştür (Şekil 4.5. (c)).

NK-92 hücrelerinin işlevsel kapasitesi üzerindeki krisin etkisi, çeşitli krisin konsantrasyonlarında (25-200  $\mu$ M) interleukin-2 (IL-2) varlığında IFN- $\gamma$  üretiminin ELISA yoluyla ölçülmesiyle değerlendirildi. Çünkü IFN- $\gamma$ , NK hücrelerinin, NK-92 dahil, sitotoksik işlevlerini iyileştirerek, tümör mikroçevresini modüle eden ve kanser hücrelerine karşı daha etkili bir immün yanıtı teşvik ederek anti-kanser etkilerini önemli ölçüde artıran bir sitokindir [298]. Sonuçlar, krisin tedavisine yanıt olarak IFN- $\gamma$  üretiminde krisinin 100  $\mu$ M dozundan itibaren bir artış gösterdi ve en dramatik artış 125  $\mu$ M krisin uygulanan grupta görüldü ( $p < 0.01$ ) (Şekil 4.5. (d)(e)). ELISA yöntemi ile ölçülen IFN- $\gamma$  düzeyi, krisinin sadece NK-92 hücre çoğalmasını ve fenotipini modüle etmekle kalmayıp, aynı zamanda işlevsel aktivitelerini de artırabildiğini ortaya koydu.



**Şekil 4.5 :** Krisinin NK-92 hücre çoğalması ve aktivitesi üzerine etkisi. a) Farklı IL-2 dozlarının NK-92 hücrelerindeki ifn-gamma düzeyine etkisi b) Farklı krisin dozlarının NK-92 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi c) Krisinin NK-92 hücrelerindeki CD56 ekspresyonuna etkisi. c),d). e) Krisinin NK hücrelerindeki ifn-gamma üretimine etkisi Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001.



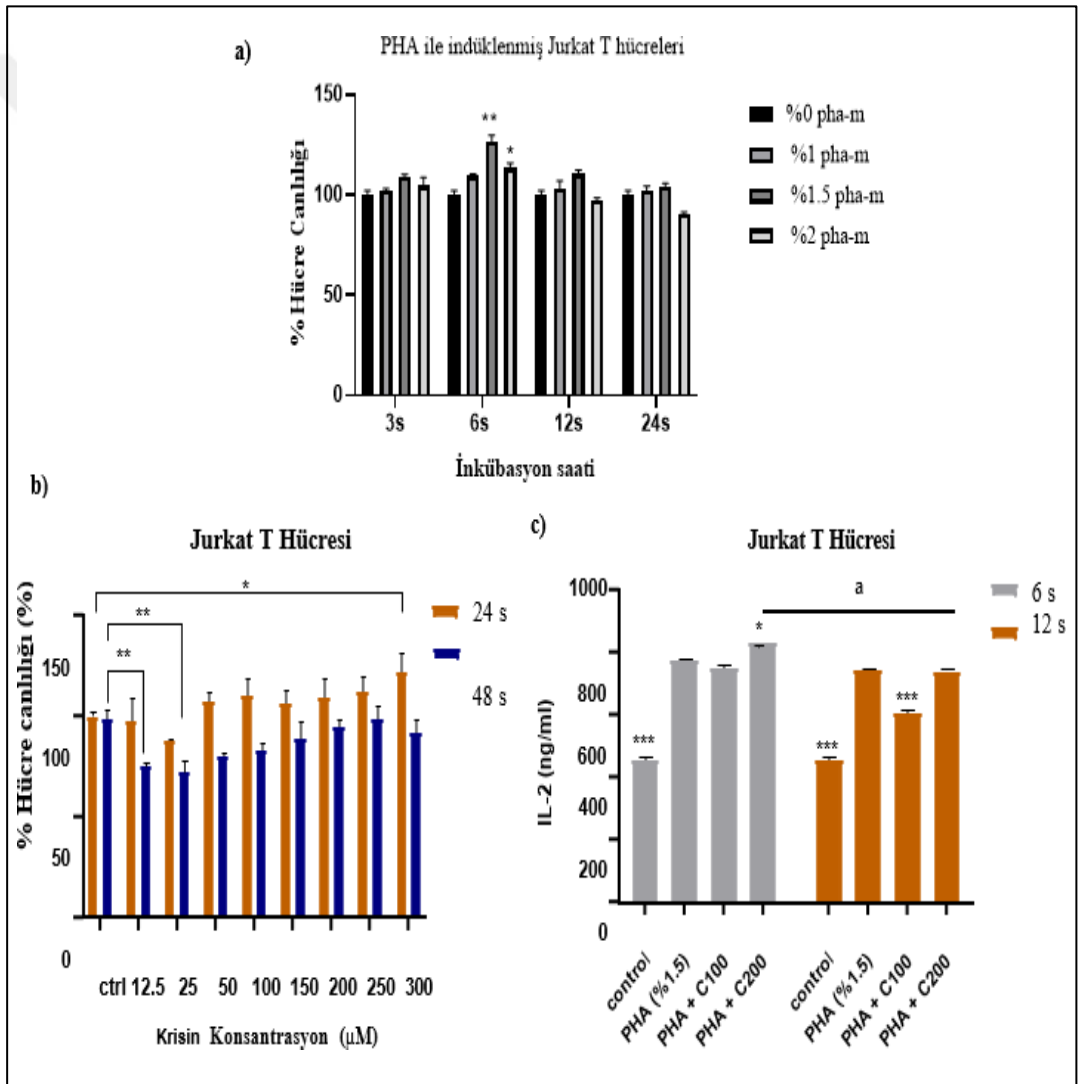
#### 4.5 Krisinin Jurkat T Hücre Çoğalması ve Aktivitesi Üzerine Etkisi

Krisin, T hücrelerinin aktivasyonu dahil olmak üzere potansiyel immünomodülatör etkilere sahip bir flavonoiddir [299]. T hücre aktivasyonunu etkileme yeteneği, anti-inflamatuar ve antikanser etkiler gibi önerilen sağlık faydalarına katkıda bulunabilir.

PHA-M, T hücrelerini aktive etmek için immünolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bitki türevi bir lektindir. Bu, çoğalma, sitokin üretimi ve T hücrelerinin bağışıklık yanıtındaki rolü dahil olmak üzere T hücre fonksiyonunun çeşitli yönlerini incelemek için kritiktir. PHA-M kullanılarak, araştırmacılar, belirli antijenlere ve antijen sunan hücrelere ihtiyaç duymadan deneyleri daha basit ve daha kontrollü hale getirebilir, ancak PHA-M konsantrasyonu ve maruz kalma süresi deney düzenine ve hedeflerine bağlı olarak değişebilir. Öncelikle, bu çalışmada T hücrelerinin stimülasyonu için en uygun PHA dozunu ve inkübasyon süresini belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (%0, %1, %1.5, %2) uygulamalar yapılmıştır. Elde edilen bulgular, %1 ve %2 oranında PHA'nın 6 saatlik uygulamasının T hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı derecede artırdığını göstermiştir. Özellikle, %1.5'luk PHA-M dozunun T hücrelerinin optimal stimülasyonunu sağlayabileceği ve immün yanıtın en yüksek seviyeye ulaştırabileceği potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Daha sonra T hücre stimülasyonu yapılan deney protokollerinde bulunan %1.5 doz ve 6 saat inkübasyon süresi kullanılmıştır.

Krisinin T hücrelerindeki etkilerini göstermek için Jurkat T hücrelerinde hücre canlılığı analizleri yapılmıştır. WST-1 deneyinin sonuçlarında; DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 300  $\mu$ M konsantrasyonunda 24 saatlik bir tedavi sonrası sadece T hücrelerinde dikkate değer bir artış gözlenmiştir. 48 saatlik uzun bir inkübasyon periyodunda, daha düşük konsantrasyonlarda (12.5-25  $\mu$ M) hücre canlılığında bir azalma görülürken ( $p < 0.01$ ), yüksek dozlarda önemli bir fark görülmemiştir (Şekil 4.6.a). Bu bulgular, krisinin Jurkat T hücrelerinin canlılığını ne belirgin şekilde azalttığını ne de artırdığını kanıtlamaktadır. Daha sonra, T hücreleri aktive edildiğinde IL-2 ürettikleri ve IL-2 reseptörlerini ifade ettikleri, kendi büyüme ve çoğalmalarını teşvik eden bir otoi halkası oluşturduğu bilindiği için [300], PHA ile indüklenmiş T hücrelerinde krisinin IL-2 sitokin salımı üzerindeki etkisi ELISA deneyleri kullanılarak değerlendirildi. Jurkat T hücrelerine iki farklı zaman aralığında %1,5 PHA-M uygulandı ve hangi maruz kalma süresinin en uygun

olduğunu belirlemek için IL-2 miktarını ELISA ile ölçüldü. Ayrıca, bu süreler boyunca hücreleri 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M krisin ile muamele edildi. PHA ile indüklenmiş gruplarda, her iki maruz kalma süresinde de IL-2 salgısında bir artış gözlemlendi, ancak daha etkili maruz kalma süresinin şekil 4.6.(a)'da bulunduğu gibi 6 saat olduğu gösterildi ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.6.b). Ayrıca, PHA ile indüklenmiş gruba kıyasla, diğer gruplara göre en anlamlı artış 200  $\mu$ M krisin dozunda görüldü fakat yine de NK-92 hücre sonuçlarında olduğu gibi krisin kaynaklı yüksek bir stimülasyon görülmedi (Şekil 4.6.(c). Hatta, yapılan 100  $\mu$ M krisin ile 12 saatlik inkübasyonun IL-2 sitokin salgısında bir azalmaya neden olduğunu buldu. Bu sonuç, flavonoidlerin Jurkat T hücrelerine uygulanma süresi ve dozlarının önemini vurgulamaktadır.



**Şekil 4.6 :** Krisinin Jurkat t hücre çoğalması ve aktivitesi üzerine etkisi. a) Farklı inkübasyon sürelerinde, çeşitli konsantrasyonlarda PHA ile

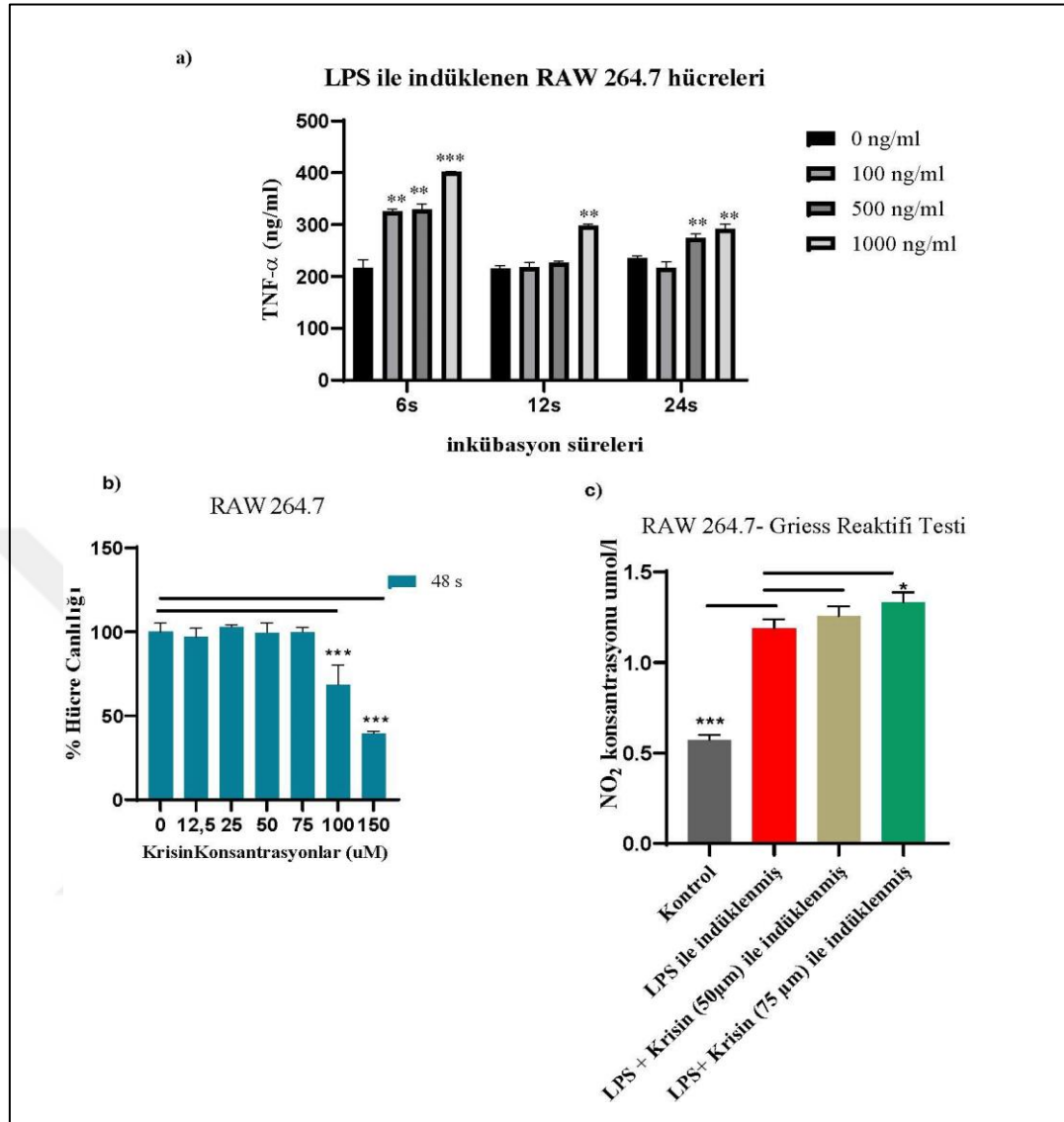
indüklenmiş Jurkat T hücrelerinin hücre canlılıkları. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*Kontrol grubu ile olan anlamlılık düzeylerini gösterir. a, 6 saat ve 12 saatlik C200 uygulamaları arasındaki anlamlı farkı gösterir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001, aP < 0.05;

#### 4.6 Krisinin RAW makrofaj Hücre Çoğalması ve Aktivitesi Üzerine Etkisi

Makrofajlar, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkta rol oynayan monositlerin farklılaşmasıyla üretilir. Makrofajların polarizasyonu, mikroçevredeki sitokinlere dayanır ve bu sitokinler, spesifik reseptör ekspresyonları ve sitokin ve kemokin üretimi bakımından farklıdır. M1 tipi makrofajlar, TNF- $\alpha$  ve lipopolisakkarit gibi Th1 sitokinleri tarafından tetiklenirken, M2 tipi makrofajlar IL-4 ve IL-13 gibi Th2 sitokinleri tarafından indüklenir [301]. Bu çalışmada da; mürin makrofaj RAW 264.7 hücre süpernatantlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri LPS ve krisin ile uyarıldıktan sonra incelendi. Öncelikle, çalıştığımız M0 tipi makrofaj hücre hattının hangi LPS dozu ve inkübasyon süresinde stimüle olup M1 makrofaj olabileceği araştırıldı. 1000 ng/ml LPS dozunun 6 saatlik uygulamasının kontrole göre TNF- $\alpha$  düzeyini 2 kat artırdığı ve bu artışın 100 ve 500 ng/ml dozlara göre daha anlamlı olduğu ( $p < 0.01$ ) bulundu (Şekil 4.7.(a)). Bu sonuç ışığında, devamında yürütülen deney protokollerinde makrofaj hücreleri 6 saat boyunca 1  $\mu$ g/ml LPS dozu ile aktive edildi.

Krisinin RAW 264.7 makrofaj hücrelerine toksik olmayan dozu da araştırıldı ve 100  $\mu$ M'ın altındaki dozlarda toksik özellik göstermediği bulundu (Şekil 4.7 (b)). Sonraki deneylerde bu toksik olmayan krisin dozları kullanıldı.

LPS ve krisin ile indüklenen makrofaj süpernatantlarının NO konsantrasyonu Griess reaktifi ile ölçüldü ve LPS ile indüklenen grupla karşılaştırıldığında kontrol grubunda nitrik oksit düzeyi anlamlı ölçüde düşük bulundu ( $P < 0.001$ ). NO düzeyleri LPS uygulanmış grupla karşılaştırıldığında yalnızca 75  $\mu$ M krisin uygulanan grupta anlamlı artış görülürken ( $P < 0.05$ ) (Şekil 4.7 (c)), 50  $\mu$ M krisin uygulanan grupta ise anlamlı bir artış görülmemiştir. Bu, krisinin makrofaj hücrelerinde toksik olmayan 75  $\mu$ M dozda inflamasyonu artıran etkileri olduğunu göstermektedir. Griess reaktifi ile NO düzeyinin ölçülmesi deneylerinin birincil amaçlarından biri; krisinin LPS ile enflamatuar modeli oluşturulmuş makrofaj hücrelerinde hangi dozda inflamasyonu artırabileceğini bulmaktır.

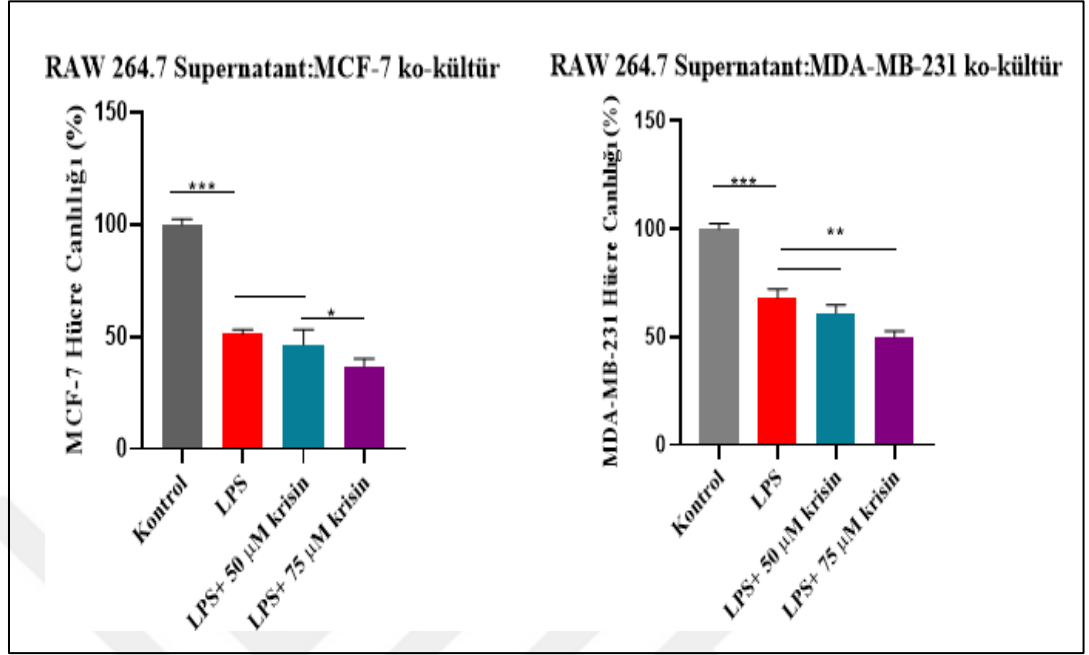


**Şekil 4.7 : Kresinin makrofaj hücre canlılığına ve NO üretimine etkisi.** Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001, aP < 0.05; a, 6 saat ve 12 saatlik C200 uygulamaları arasındaki anlamlı farkı gösterir.

#### 4.7 Kresinin Makrofaj Hücre Aracılı Sitotoksik Yanıt Üzerine Etkileri

Makrofajlarla yürütülen deneylerin ikinci aşamasında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları indüklenmemiş, yalnızca LPS ile indüklenmiş ve LPS + kresin (50,75 μM) ile indüklenmiş makrofaj hücre süpernatantları ile 48 saat ko-kültüre edilmiştir. Bu hücre hatlarının MTT hücre canlılığı test sonuçlarına göre; LPS ile oluşan

sitotoksik etkiyi iki hücre hattında da 75  $\mu$ M krisin uygulaması 50  $\mu$ M doza göre anlamlı olarak artırmıştır (Şekil 4.8).



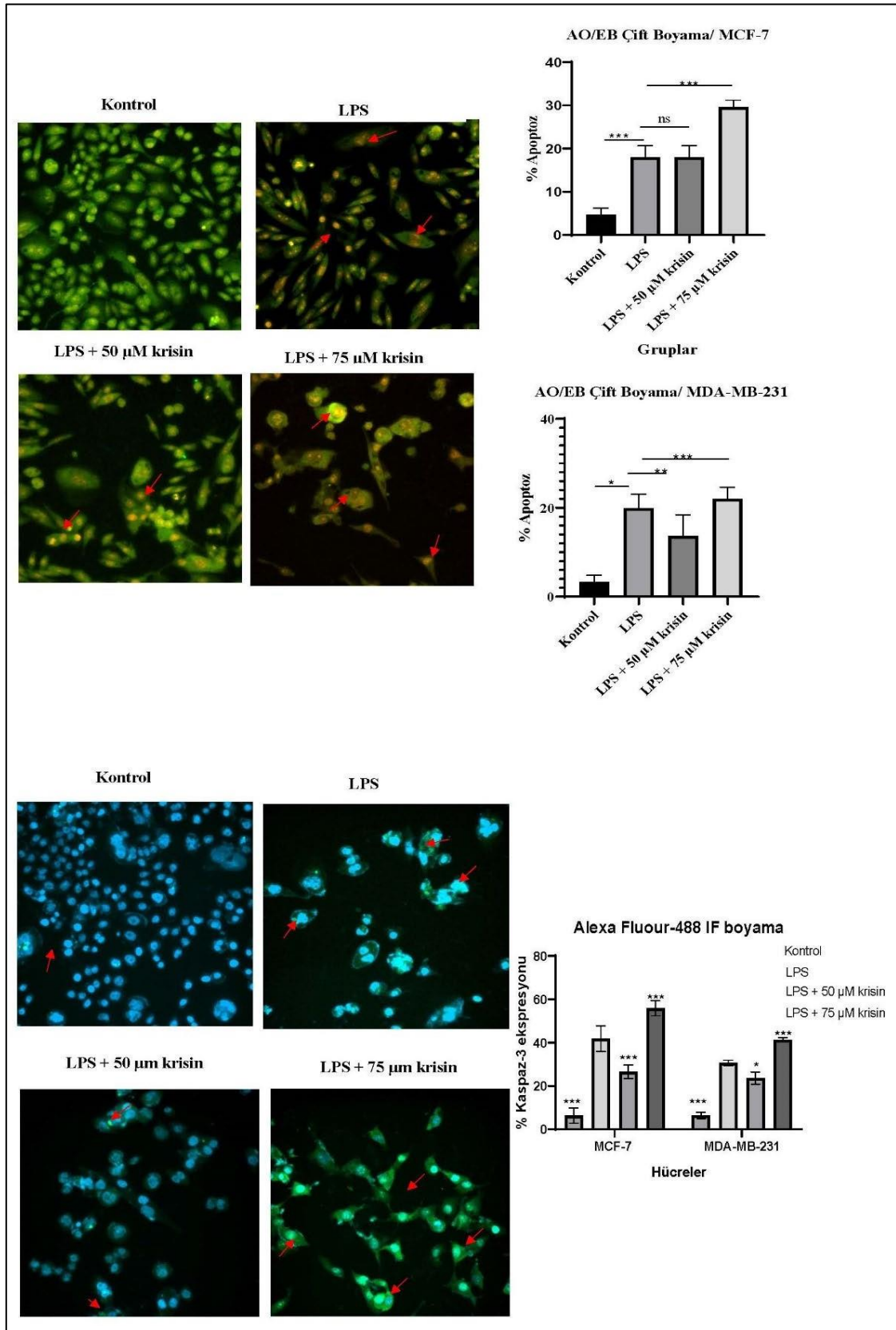
**Şekil 4.8 :** Krisinin makrofaj aracılı meme kanseri hücre ölümüne olan etkisi.

Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001, aP < 0.05; a, 6 saat ve 12 saatlik C200 uygulamaları arasındaki anlamlı farkı gösterir.

Stimüle edilmiş makrofaj hücre süpernatantlarının meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi değerlendirildikten sonra bu hücrelerin kanserli hücreleri apoptoz yoluyla öldürüp öldürmediği iki farklı apoptoz testi ile değerlendirilmiştir. İlkinde fikse edilmiş meme kanseri hücreleri AO/EB ile boyanmış ve floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. LPS ile indüklenen makrofaj süpernatant grubuyla ko-kültüre edilen meme kanseri hücre hatlarında apoptoz kontrole göre anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.9). İki hücre hattı birbiriyle karşılaştırıldığında MCF-7'nin MDA-MB-231 hücre hattına göre daha çok etkilendiği görülmüştür. Krisin ile indüklenmiş gruplarla yapılan ko-kültür sonrasında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, yalnızca LPS ile indüklenen gruba göre apoptoz yapan hücre sayısı her 50  $\mu$ M dozda MCF-7 hücrelerinde apoptozda anlamlı bir artışa sebep olmamış, MDA-MB-23 hücrelerinde düşük anlamlılıkta ( $p < 0.5$ ) bir değişime sebep olmuştur. 50  $\mu$ M konsantrasyondan farklı olarak 75  $\mu$ M krisine maruz kalan makrofaj hücre süpernatantları her iki hücre hattında da yalnızca LPS ile indüklenen gruba göre apoptozu anlamlı olarak artmıştır ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.9). Bu sonuçlar; makrofaj hücrelerinin belirlenen dozda LPS ve 75  $\mu$ M krisin ile indüklendiğinde her iki meme kanseri hücrelerine de sitotoksik etkiyi apoptoz ile gösterdiğine kanıt olabilir. İkinci

olarak; hücreler çekirdekler için (DAPI, mavi) ve kaspaz-3 (anti-kaspaz-3-Alexa Fluor 488, yeşil) ile boyanmıştır. Kaspaz-3 (apoptoz belirteci) sinyali, kontrol grubuna göre LPS ile indüklenen makrofaj süpernatantları ile ko-kültüre olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde artmıştır. Ayrıca 75  $\mu$ M krisin ve LPS ile indüklenen RAW makrofaj süpernatantları LPS ile indüklenen grupla karşılaştırıldığında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-3 sinyalini artırmıştır. Fakat LPS ve 50  $\mu$ M krisin ile indüklenen makrofaj hücrelerinde LPS ile indüklenen kaspaz-3 sinyalinde yalnızca LPS ile indüklenen gruba göre her iki hücre hattında da anlamlı düşüşler gözlenmiştir ( $p<0.001$ ,  $p<0.5$ ) (Şekil 4.9).

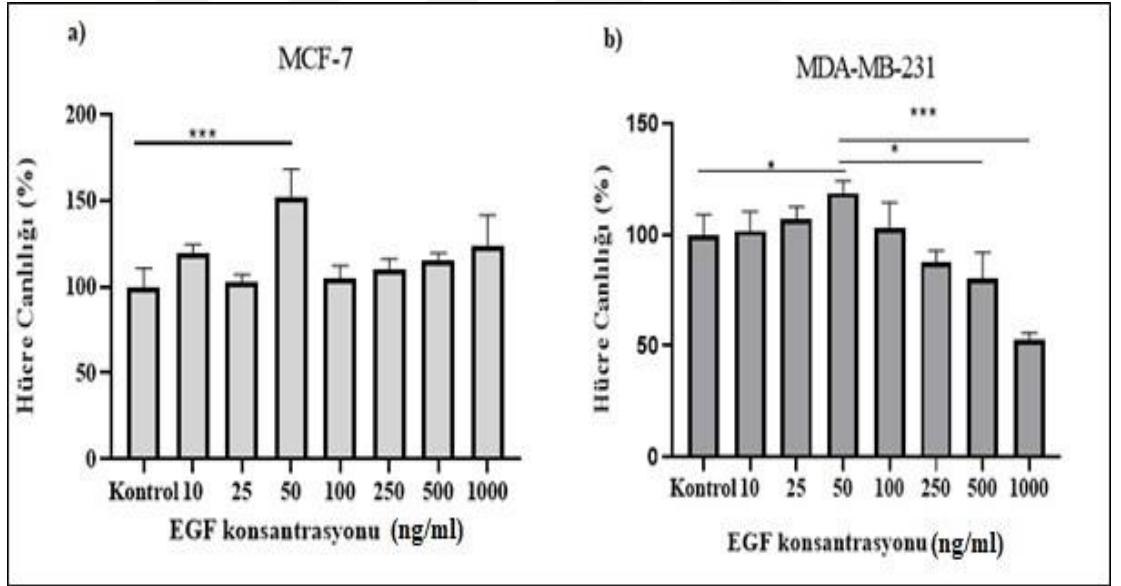




**Şekil 4.9 :** Kresinin makrofaj aracılı meme kanseri apoptozuna olan etkisi. AO/EB çift boyama ve Alexa-Fluor-488 işaretli kaspaz-3 proteinlerinin mikroskopik görüntüleri ve sayısal analizleri. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001

#### 4.8 EGF'nin Meme Kanseri Hücre Hatlarına Olan Proliferatif Etkisi

Farklı EGF konsantrasyonlarının varlığında veya yokluğunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin büyümesini incelemek MTT hücre proliferasyon testi yapıldı. Epidermal büyüme faktörünün (EGF) meme kanseri hücre hatları büyümesi üzerindeki etkisini incelememizin temel sebebi, EGF'nin kanser hücrelerinin proliferasyonu ve hayatta kalma süreçlerinde kritik bir rol oynadığına dair literatürde yer alan bulgulara dayanmaktadır. Bu çalışmada temel olarak, EGF'nin meme kanseri hücrelerine karşı geliştirilen anti-kanser yanıtları nasıl etkilediğini de incelemektir. Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde, 48 boyunca uygulanan 50 ng/ml EGF dozunun her iki hücre hattında da kontrol grubuna göre anlamlı bir hücre proliferasyonuna sebep olduğu bulundu ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.5$ ). Dikkat çekici bir şekilde, 500 ve 1000 ng/ml EGF dozları MDA-MB-231 hücre hattında 50ng/ml grubuna göre anlamlı olarak azalma görüldü ( $p < 0.5$ ,  $p < 0.001$ ) (Şekil 4.10). Bu bulgular, EGF'nin hücre proliferasyonunu her dozda indüklediğini, optimum dozun belirlenmesi gerektiği sonucunu anlatmaktadır.



**Şekil 4.10 :** Epidermal büyüme faktörünün (EGF) meme kanseri hücre hatlarına olan proliferatif etkisi. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ve \*\*\* $P < 0.001$ .

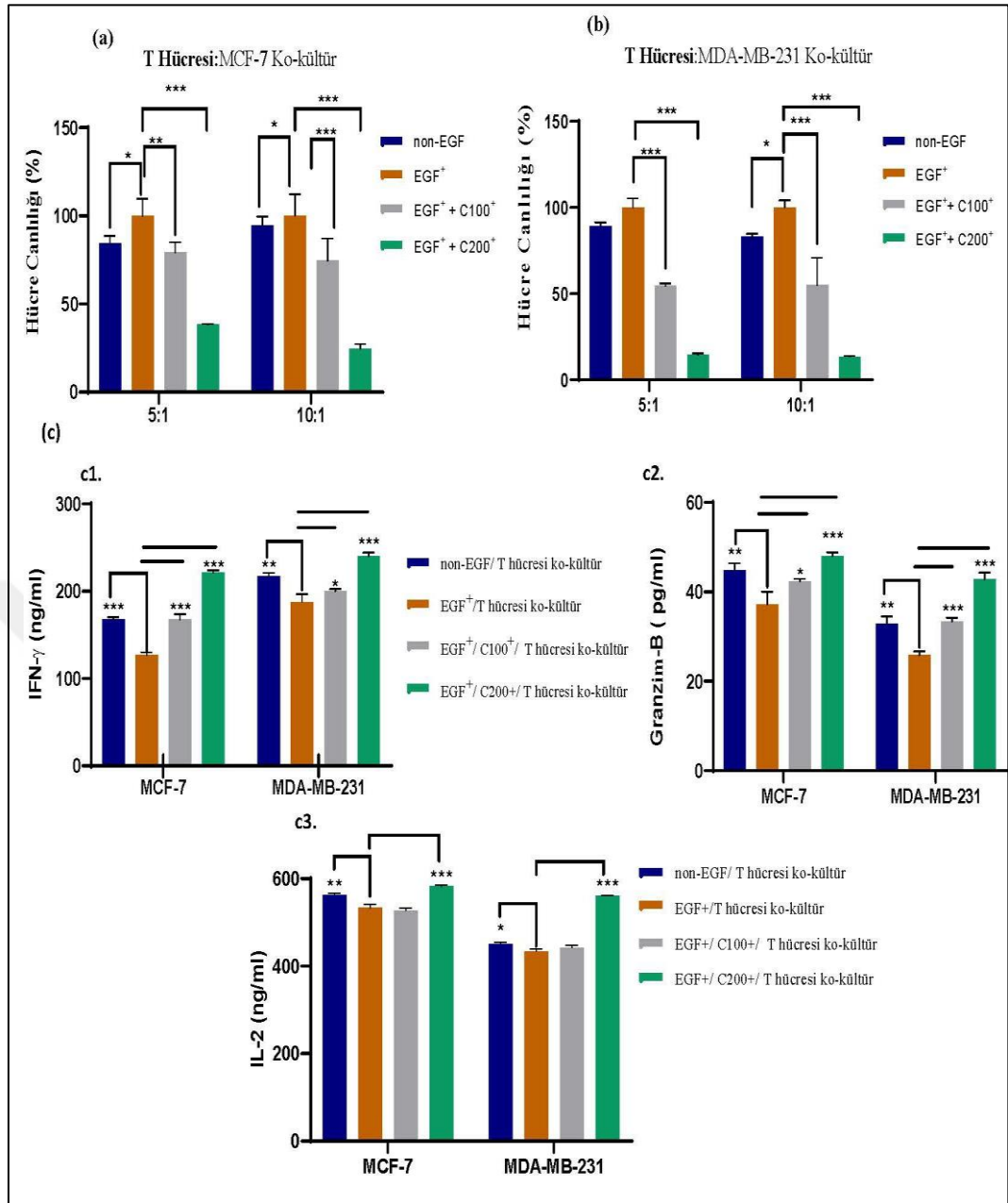
#### 4.9 Krisinin T Hücre Aracılı Anti-Meme Kanseri Etkisi

Bağışıklık sisteminin, özellikle T hücrelerinin, kanser hücrelerini hedef alıp yok etme rolü göz önüne alındığında, çalışmamız krisinin, T hücreleri aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin yok edilmesi üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Bu



amaçla, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile birlikte Jurkat T hücrelerini kullanarak, T hücreleri aracılı meme kanseri hücrelerinin yok edilmesini değerlendirmeye yönelik deneyler kurulmuştur. Meme kanseri hücreleri, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile tek başına veya iki farklı krisin konsantrasyonu (100 ve 200  $\mu$ M) ile birleştirilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, Jurkat T hücreleri 6 saat süreyle PHA-M ile aktive edilmiş ve daha sonra 72 saat boyunca T hücreleri ve mem kanseri hücreleri direkt olarak ko-kültüre edilmiştir. Şekil 4.11(a) ve 4.11.(b)'de gösterildiği gibi, Jurkat T hücrelerinin MCF-7 ve MDA-MB-231'e kıyasla hem 5 hem de 10 kat fazla hücre sayısında eklenmesi, kalan meme kanseri hücrelerinin miktarının etkili bir şekilde azalmasını sağlamış, EGF tedavisi ise açıkça T hücrelerinin öldürme yeteneğini baskılayarak, kalan meme kanseri hücrelerinde bir artışa neden olmuştur. Meme kanseri hücrelerinin canlılığını ölçen MTT deneyi yoluyla yapılan T hücre öldürme deneylerinden elde edilen sonuçlar, krisin tedavisinin T hücreleri aracılı meme kanseri hücre öldürmesini güçlendirdiğini göstermiştir. 200  $\mu$ M krisin, ortalama olarak 5x ve 10x Jurkat tedavi gruplarında sırasıyla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hayatta kalanların %68, %85, %75 ve %87 oranında azalmasına neden olan güçlü bir etki sergilemiştir.

Ayrıca, MCF-7, MDA-MB-231 ve Jurkat T hücre kültürlerinin (10:1 oranı) büyüme medyasında IFN-gamma, IL-2 ve granzim-B seviyelerini ölçmek için ELISA deneyleri yapıldı. Bu parametreler T hücre aktivasyonunun göstergeleri olduğu için, ko-kültür ortamlarındaki düzeylerini araştırmak, T hücre sitotoksitesinin hangi sitokinler aracılığıyla olduğunu belirlemek açısından önemlidir. ELISA analizlerinden elde edilen sonuçlar, EGF ile tedavi edilen grupta IL-2, IFN- $\gamma$  ve granzim-B salgısının önemli ölçüde baskılandığını, bu durumun T hücre aktivitesinin bozulduğunu göstermektedir (Şekil 4.11.(c)). EGF ile tedavi edilen gruplarda IL-2 seviyeleri büyüme medyasında önemli ölçüde azalmış ve krisin uygulaması sonrası dramatik bir şekilde artmıştır, bu da krisin etken maddesinin proliferasyonu uyarılmış meme kanseri hücrelerine olan T hücre aktivitesinin üzerindeki olumlu etkilerini önermektedir (Şekil 4.11.(c1),(c2),(c3)). Bu bulgular, krisinin, T hücreleri aracılı yanıtların meme kanseri hücrelerine karşı etkinliğini artıran kanser immün-terapisinde bir adjuvan olarak potansiyelini vurgulamaktadır.



**Şekil 4.11 : Krisinin t hücreleri aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin yok edilmesi**

üzerine etkisi. a), b) T hücreleri ile ko-kültüre edilen meme kanseri hücrelerinin hücre canlılık analizleri. c1),c2),c3) Ko-kültür ortamlarındaki ifn-gamma, granzim-b ve IL-2 düzeylerinin ELISA ile ölçüm sonuçları. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir (n = 3, \*\*\* p < 0.0001, \*\* p < 0.001 ve \* p < 0.05).

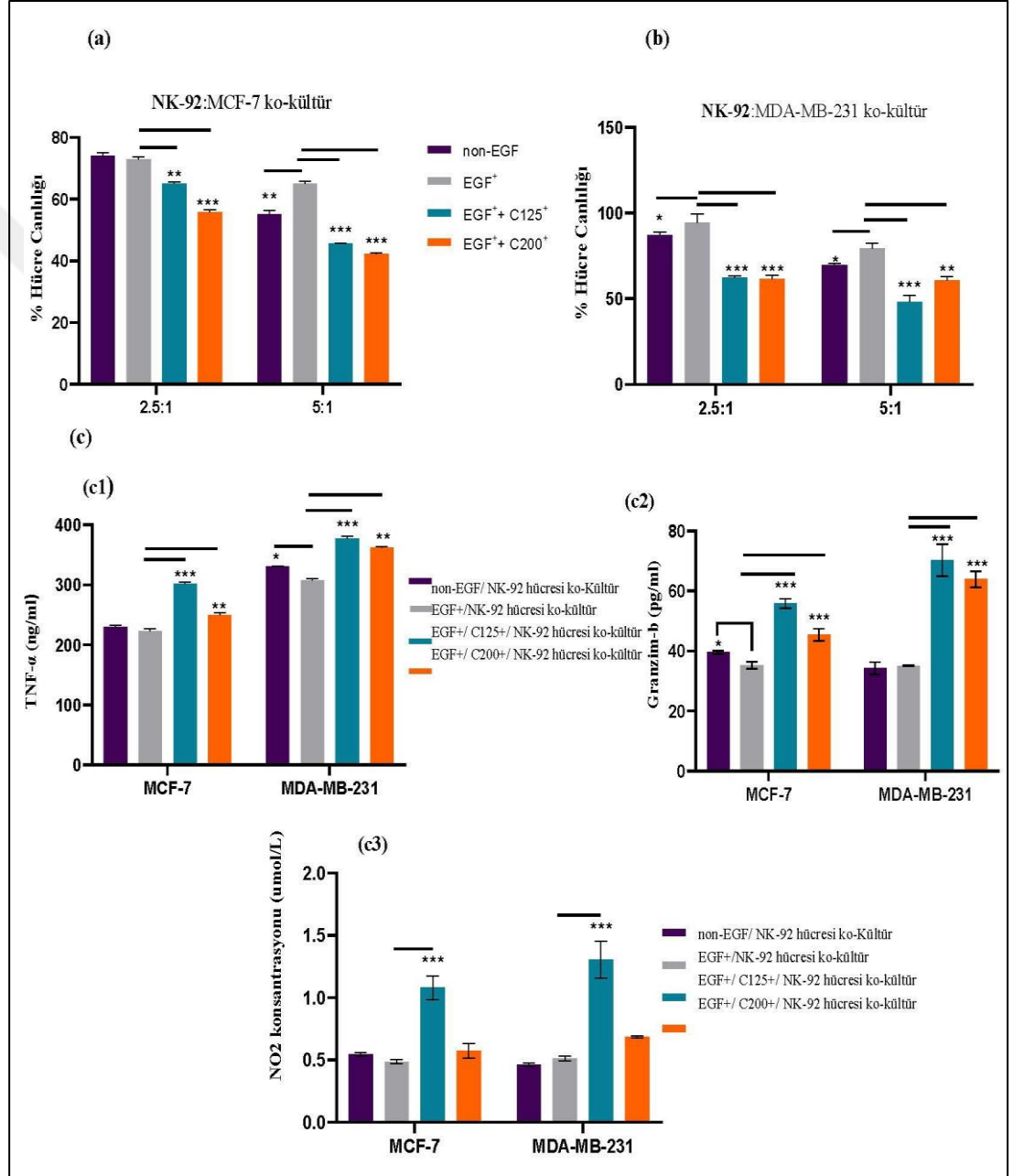
#### 4.10 Krisinin NK-Hücre Aracılığıyla Meme Kanseri Hücre Sitotoksitesine Etkisi

NK hücreleri, tümörlere ve çeşitli kanser formlarına karşı vücudun savunmasında merkezi bir rol oynayan doğal bağışıklık sisteminin kritik bileşenleridir. NK-92 hücreleri de, önceden duyarlaştırma olmaksızın çeşitli kanser hücre hatlarına karşı güçlü bir sitotoksik aktivite sergiler. Bu sitotoksiste, öncelikle tümör hücrelerinde stresle indüklenen ligandların tanınması yoluyla, apoptozu tetikleyen ve pro-

inflatuar sitokinler üreten perforin ve granzimlerin salınımı ile aracılık edilir ve böylece anti-tümör etkilerine katkıda bulunur [302]. Interlökin-2 (IL-2), ilk olarak "T hücre büyüme faktörü" olarak tanımlanan immün-stimülatör bir sitokindir. Daha sonra, aktive olmuş T hücreleri tarafından üretilen IL-2'nin, enfeksiyona karşı NK hücre yanıtlarını *in vivo* olarak artırabileceği ve NK hücrelerini *in vitro* olarak aktive edebileceği gösterilmiştir [302].

İlk olarak, NK-92 hücreleri başlangıçta IL-2 varlığında 12 saat boyunca kültüre alındı ve ardından 48 saat boyunca farklı krisin konsantrasyonları (125  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) ile muamele edildi. Daha sonra MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, 24 saat boyunca DMSO (non-EGF grubu) ve EGF (50 ng/ml) ile muamele edildi ve ardından etken hedef oranlarında 2.5:1 ve 5:1 oranında aktive edilmiş NK-92 hücreleri ile 4 gün boyunca inkübe edildi. Canlılık, MTT deneyi kullanılarak değerlendirildi, hayatta kalan hücrelerin göreceli yoğunlukları EGF uygulanmayan %100 canlılıkta olacak şekilde ayarlandı ve anlamlılık EGF tedavi edilen grupla ilişkilendirildi. Şekil 4.12.(a) ve 4.12.(b)' de yer alan sonuçlar; krisinin NK-92 hücrelerinin her iki meme kanseri hücre hattına karşı sitotoksitesini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Krisin tarafından 125  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M dozlarında uyarılan NK sitotoksik aktivitesi MCF-7 hücrelerinde benzer görünürken, MDA-MB-231 hücrelerinde 125  $\mu$ M dozunda daha belirgin bir fark gözlemlendi ( $P < 0.001$ ). NK hücrelerinin hedef hücrelere 5:1 oranında uygulandığı gruplarda daha yüksek sitotoksik aktivite gözlemlendi. Ayrıca, EGF ile indüklenen gruplarda, her iki meme kanseri hücresi de NK-92 ile kültüre alındığında hücre canlılığı kontrol (non-EGF) grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti. Bu, EGF'nin NK-92 hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitesini sınırlandırabileceğini öne sürmektedir. TNF- $\alpha$ , Granzim-B ve NO'nun ko-kültür modellerindeki (5:1 oranı) süpernatantlarda üretimi ELISA ve Griess reaktif deneyi kullanılarak kantifiye edildi. Birlikte, TNF-alfa ve Granzim B, NK hücrelerinin kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini önemli ölçüde artırır. Koordineli eylemleri sadece tümör hücrelerini doğrudan öldürmekle kalmaz, aynı zamanda etkili bir anti-tümör yanıtını sürdürmek için bağışıklık ortamını da modüle eder. TNF-alfa ve Granzim B seviyeleri, sadece MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol (non-EGF) grubuna kıyasla EGF ile indüklenmiş meme kanseri gruplarında önemli ölçüde azaldı ( $p < 0.05$ ). C(krisin) 125  $\mu$ M ve C200  $\mu$ M ile muamele edilen NK hücre grupları EGF+ gruplarla karşılaştırıldığında, her iki dozda da sitokin salımlarında

önemli artışlar ölçüldü. NO, ayrıca kanser hücrelerini hedef alıp yok etme yeteneklerini artırarak ve tümörlere karşı bağışıklık yanıtlarını başlatıp sürdüren kritik sitokinlerin üretimini modüle edebilen başka bir reaktif gazöz moleküldür. EGF ile indüklenmiş meme kanseri gruplarında kontrol grubuna kıyasla NO seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmezken, 125  $\mu$ M krisin ile muamele edilen NK-92 hücreleri ile ko-kültüre alınan her iki meme kanseri hücre hattında da EGF tedavi edilen gruba kıyasla anlamlı bir fark bulundu ( $P < 0.001$ ) (Şekil 4.12.(c3)).



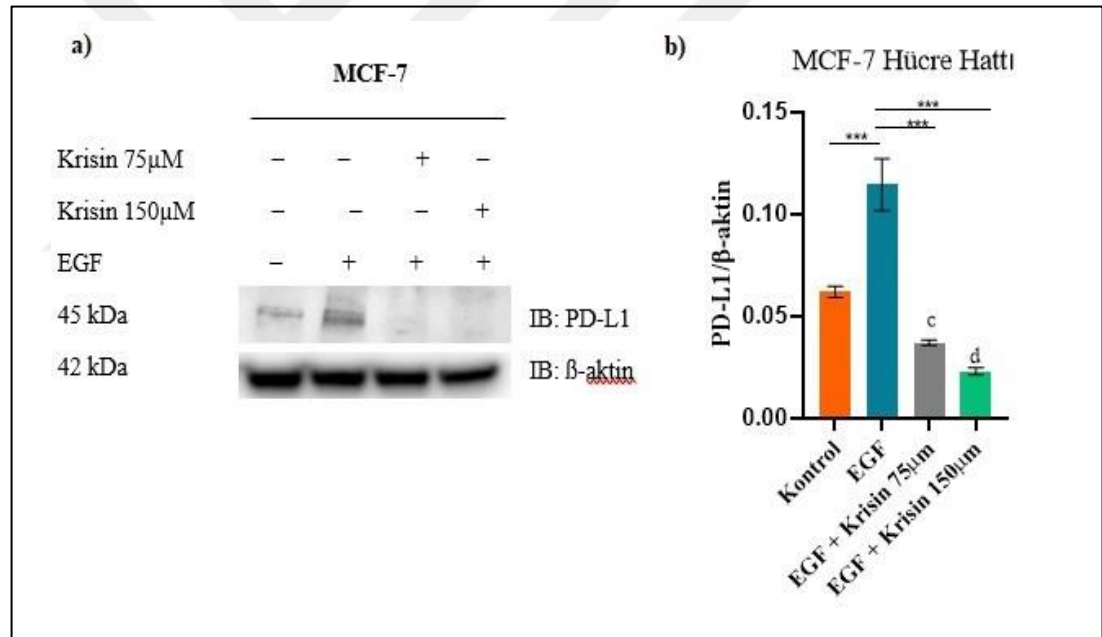
**Şekil 4.12 : Krisinin NK-hücre aracılı meme kanseri hücre sitotoksitesine**

**etkisi.** a) NK-92 ile ko-kültüre edilen meme kanseri hücrelerinin hücre canlılık analizleri. c1),c2),c3) Ko-kültür ortamlarındaki tnF-a, granzim-b ve NO<sub>2</sub> düzeylerinin ELISA ile ölçüm sonuçları. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir (n = 3, \*\*\* p < 0.0001, \*\* p < 0.001 ve \* p < 0.05).

#### 4.11 Krisinin Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki PD-L1 Protein Düzeylerine Olan Etkisi

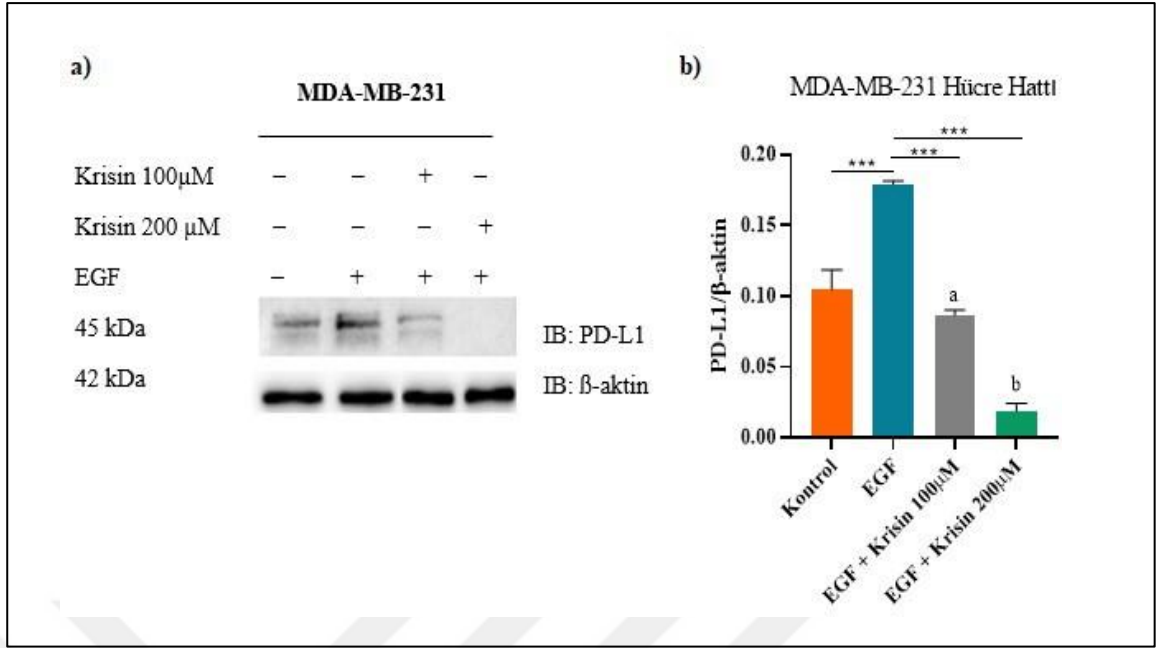
PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), immün sistem hücreleri ve bazı kanser hücreleri üzerinde bulunan bir protein olup, immün sistemin kanser hücrelerini tanıyıp yok etmesini engelleyerek bu hücrelerin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olur. PD-L1'in inhibisyonu (engellenmesi), immünoterapinin bir parçası olarak kanser tedavisinde önemli bir stratejidir çünkü PD-L1'in aktivitesinin engellenmesi, immün sistemin kanser hücrelerini daha etkili bir şekilde tanıyıp yok etmesine olanak tanır [163]. Krisinin PD-L1 üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Bu çalışmada, krisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki PD-L1 protein ekspresyonuna olan etkisi EGF varlığında ve yokluğunda gösterilmiştir. Dikkat çekici sonuçlardan biri her iki meme kanseri hücre hattında da daha önce proliferatif etkisi olduğu gösterilen 50 ng/ml konsantrasyon ve 24 saat EGF uygulamasının PD-L1 düzeyini anlamlı ölçüde yükseltmesidir ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4.13-14). Bu meme kanseri hücre hatlarındaki EGF reseptörlerinin EGF ile uyarılması ve PD-L1 düzeyi arasındaki ilişkiyi ortaya koyar. Ayrıca her iki hücre hattında da krisin doza bağlı bir etki göstermiştir. MCF-7 hücre hattında EGF ile indüklenen PD-L1 protein ekspresyonu 24 saat, 75 ve 150  $\mu$ M krisin maruziyeti sonrası sırasıyla 3.3 ve 5 kat azalmıştır (Şekil 4.13.(a), (b)). EGF ile indüklenmeyen ve krisin uygulanmayan kontrol grubuna göreyse her iki dozda da anlamlı fark vardır ( $p < 0.01$ , ve  $P < 0.001$ ). MDA-MB-231 hücre hattında ise; EGF ile indüklenen PD-L1 protein düzeyleri yine doza bağlı olarak 24 saat, 100 ve 200  $\mu$ M krisin uygulaması sonrası sırasıyla 5 kat ve 7 kat azalma göstermiştir. Kontrol grubuna göreyse 100  $\mu$ M dozda anlamlı bir artış bulunmazken 200  $\mu$ M dozda PD-L1 düzeyi azalmıştır (Şekil 4.14. (a), (b)). Bu iki hücre hattından elde edilen verilere göre; EGF uygulaması iki farklı meme kanseri hücre hattındaki PD-L1 düzeylerini anlamlı fakat MDA-MB-231'de daha yüksek oranda artırmış ve krisinin agresif olan bu meme kanseri hücresinde oransal olarak daha yüksek bir PD-L1 ekspresyon inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir.

Ardından, krisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde EGF tarafından indüklenen PD-L1 ekspresyonunun yukarı düzenlenmesine etkisini incelemek için immüno Floresan analizleri gerçekleştirdik (Şekil 4.15 (a), (b)). İmmünoblot analizinden elde edilen verilerle uyumlu olarak, western-blot deneylerindekiyle eşit olarak uygulanan farklı krisin dozlarının Aleksa-fluor 488 floresan işaretli PD-L1 boyamasından elde edilen floresan sinyalinin her iki hücre hattında da EGF ile artan PD-L1 ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığını göstermektedir. MCF-7 hücre hatlarındaki anlamlılık ( $p < 0.05$ ), MDA-MB-231'e göre ( $p < 0.001$ ) daha az anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.15 (a), (b)). MCF-7 hücrelerinde iki farklı krisin dozu uygulaması sonrası kontrol grubuna göre anlamlı farklılık bulunmamıştır, bu; krisinin egf indüksiyonu sonrası artan PD-L1 protein düzeyinin krisin ile indüksiyon öncesindeki düzeye geldiğini göstermektedir. MDA-MB-231'de ise 200  $\mu\text{M}$  doz grubu ve kontrol grubu arasındaki anlamlı ölçüde olmayan bir farklılık bulunmuştur.

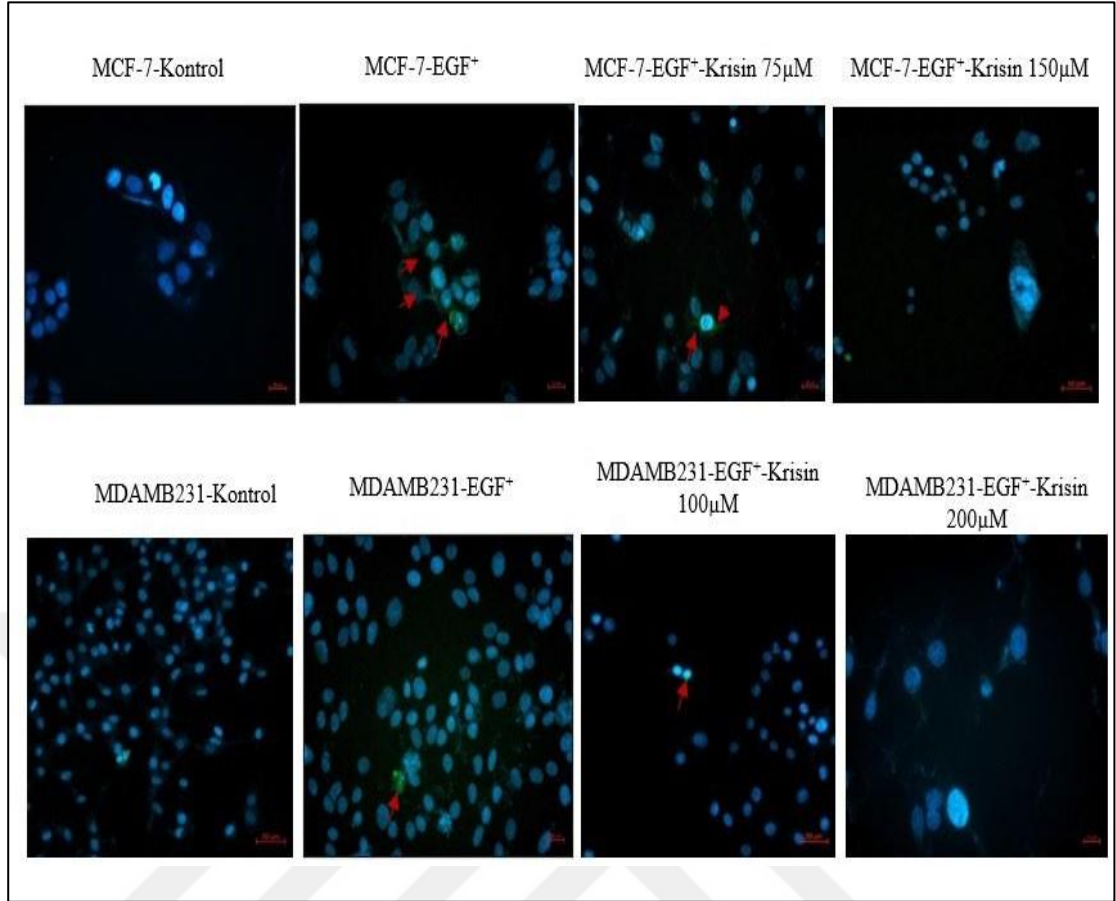


**Şekil 4.13 : Krisinin MCF-7 hücre hattındaki PD-L1 protein düzeyine olan**

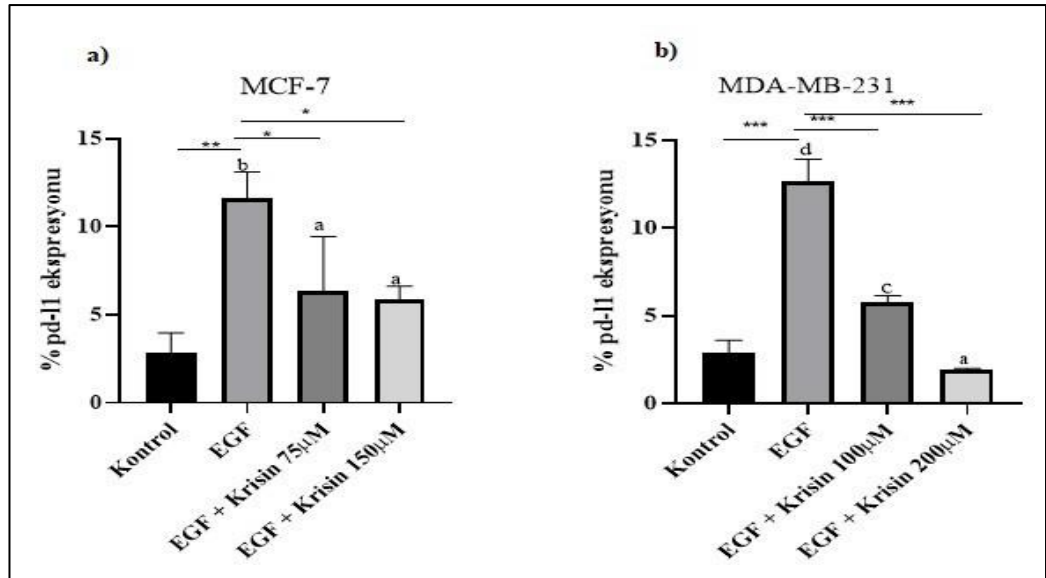
**etkisinin immünoblotlama ile değerlendirilmesi.** a) Western-blot protein bant görüntüleri. b) protein bant yoğunluklarının sayısal analizi ve PD-L1 protein ekspresyon değerleri. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \* egf uygulanan gruba göre anlamlılığı, c ve d kontrol grubuna göre olan anlamlılığı temsil etmektedir. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ve \*\*\* $P < 0.001$ . c $P < 0.01$  ve d $P < 0.001$ .



**Şekil 4.14 :** Krisinin MDA-MB-231 hücre hattındaki PD-L1 protein düzeyine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi. a) Western-blot protein bant görüntüleri. b) protein bant yoğunluklarının sayısal analizi ve PD-L1 protein ekspresyon değerleri. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \* EGF uygulanan gruba göre anlamlılığı, c ve d kontrol grubuna göre olan anlamlılığı temsil etmektedir \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001. ans ve b < 0.05.



**Şekil 4.15 :** Krisinin meme kanseri hücre hatlarındaki PD-L1 düzeylerinin IF mikroskopik görüntüleri. AlexaFluor-488 işaretli PD-L1 proteinler yeşil, DAPI boyaması ile boyanan çekirdekler mavi renkte görünmektedir. Ölçek çubukları (20-50 µm) görüntülerin sağ alt köşesinde gösterilmiştir. PD-L1 ekspresyonuna işaret olan yeşil bölgeler kırmızı ok ile işaretlenmiştir.



**Şekil 4.16 :** PD-L1 immünfloresan görüntüleme kuantitatif analiz sonuçları. Her bir gruptan 10 görüntü seçilip görüntü başına düşen hücre sayıları ve hücrelerin içinden Alexa-Fluor 488 floresan ışımaması gösteren hücreler sayılmıştır. Floresan ışımaya yapan hücrelerin yüzdesi, % PD-L1 ekspresyonu olarak grafikte gösterilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \* EGF uygulanan gruba göre anlamlılığı, a,b,c ve d kontrol grubuna göre olan anlamlılığı temsil etmektedir \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001. <sup>a</sup>ns, <sup>b</sup>< 0.05. <sup>c</sup>P < 0.01, <sup>d</sup>P < 0.001

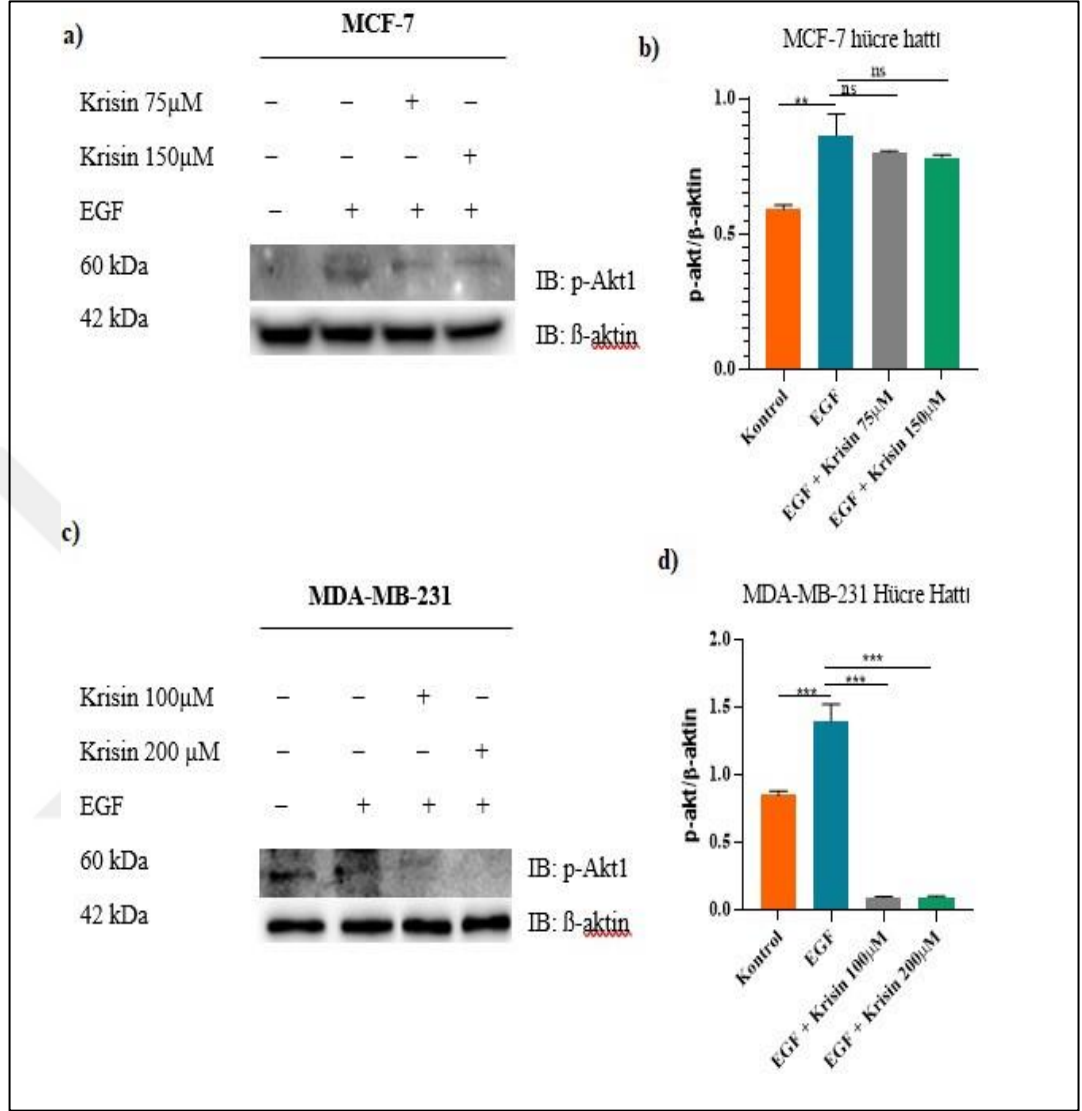


#### 4.12 Krisinin Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki pmTOR/ pakt Protein Düzeylerine Olan Etkisi

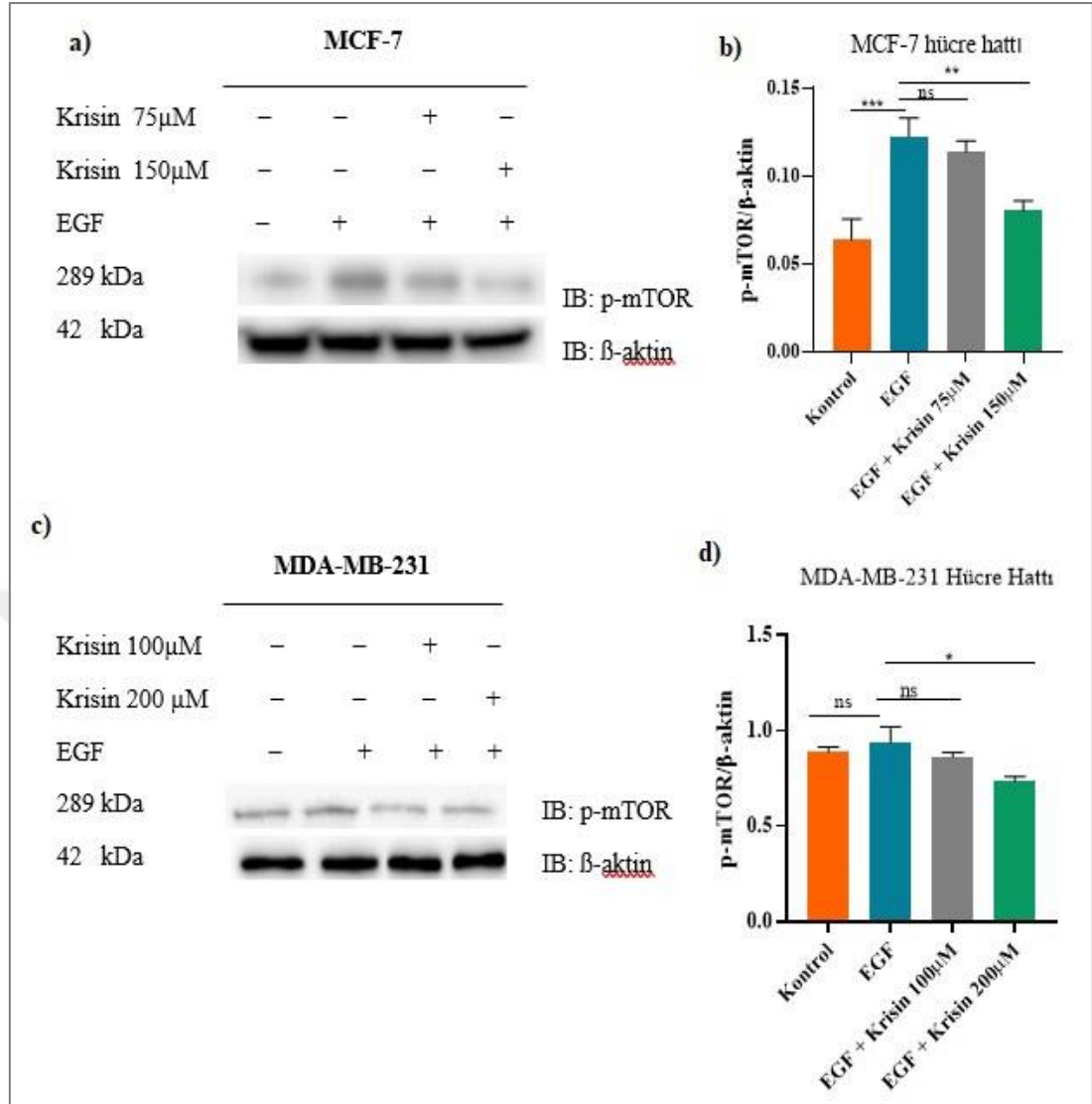
PI3K–AKT–mTOR sinyal yolları, hücrelerin büyümesi, çoğalması, göç etmesi ve hatta istilacı hale gelmesinde önemli bir rol oynamaktadır [303]. Bu sinyal yolunun meme karsinogenez bağlamında aşırı aktive olduğu bilinir ve artan hücre proliferasyonu, apoptozdan kaçış ve metastaz ile ilişkilidir. Ayrıca bu yolak PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesine de katılabilir. Anormal PI3K/AKT/mTOR yolak aktivasyonunun PD-L1 proteininde artışa yol açtığı bilinmektedir [169]. Krisinin AKT–mTOR yolları ile ilişkili protein ekspresyonlarında oluşturduğu değişiklikleri araştırmak için westernblot deneyleri yapılmıştır. AKT–mTOR sinyal yolu proteinlerinin fosforilasyon durumları, Şekil 4.17'de sunulan western-blot testleri ile değerlendirilmiştir. Bir proteinin fosforile formu, genellikle protein aktivitesini, lokalizasyonunu, protein-protein etkileşimlerini ve hücresel süreçlere katılımını etkiler [304]. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında PD-L1 protein ekspresyonunu artırdığı gösterilmiş EGF'in fosforile mTOR ve fosforile AKT seviyelerini nasıl etkilediği değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre; EGF meme kanseri hücre proliferasyonundan sorumlu olduğu bilinen akt proteinin fosforilasyonunu her iki meme kanseri hücre hattında da anlamlı düzeyde artırmıştır ( $p<0.001$ ). Dikkat çekici olan, MDA-MB-231 hücrelerinde p-akt düzeyi krisin uygulaması sonrası anlamlı ölçüde düşerken, MCF-7 hücrelerinde aynı anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 4.17 (b), (d)).

Çalışmalar, mTOR'un vücuttaki birçok sinyal yolunda yer aldığını göstermiştir. Tümör hücrelerinde anormal şekilde aktive olan mTOR, tümör hücrelerinin büyümesini, metastaz yapmasını ve yeni sağlıklı dokulara yayılmasını teşvik eden sinyaller gönderir. Çeşitli kanıtlar, tümörlerde sıkça anormal şekilde aktive olan mTOR yolunun, bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve işlevini düzenleyebileceğini göstermektedir [305]. Bu çalışmada EGF indüksiyonu ve sonrasında farklı krisin konsantrasyonuna maruz kalan meme kanseri hücrelerindeki fosforile mTOR (p- mTOR) protein düzeyleri western-blotting yöntemi ile analiz edilmiştir. MCF-7 hücre hattında 50 ng/ml EGF indüksiyonu sonrasında p-mtor düzeyi anlamlı ölçüde artmıştır ( $p<0.01$ ), fakat krisin EGF indüksiyonu sonrası artan p-mtor ekspresyonunu anlamlı ölçüde inhibe etmemiştir (Şekil 4.18 (a), (b)). MDA-MB-231 hücre hattına baktığımızda MCF-7 hücrelerinden farklı olarak EGF, p-

mTOR ekspresyonunu anlamlı olarak değiştirmemiştir. Sonuçlara göre yalnızca 200  $\mu$ M krisin uygulaması p- mTOR seviyesini ~1 kat düşürmüştür (  $p < 0.05$ ) (Şekil 4.18 (c), (d)).



**Şekil 4.17 :** Krisinin meme kanseri hücre hatlarındaki p-akt protein düzeylerine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi. a) MCF-7 hücrelerinin p-akt ve b-aktin protein bant görüntüleri. b) MCF-7 protein ekspresyonlarının sayısal analizi. c) MDA-MB-231 hücrelerinin p-akt ve b-aktin protein bant görüntüleri. d) MDA-MB-231 protein ekspresyonlarının sayısal analizi. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001



**Şekil 4.18 :** Krisinin meme kanseri hücre hatlarındaki p-mTOR protein düzeylerine olan etkisinin immünblotlama ile değerlendirilmesi. a) MCF-7 hücrelerinin p-mTOR ve β-aktin protein bant görüntüleri. b) MCF-7 protein ekspresyonlarının sayısal analizi. c) MDA-MB-231 hücrelerinin p-mTOR ve β-aktin protein bant görüntüleri. d) MDA-MB-231 protein ekspresyonlarının sayısal analizi. Tüm deneyler 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Hata çubukları SD'yi temsil etmektedir. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, ve \*\*\*P < 0.001

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda, birçok bitkide, balda ve propoliste doğal olarak bulunan bir flavonoid olan krisin, potansiyel anti-kanser özellikleri nedeniyle ilgi çekmektedir [306]. Ortaya çıkan kanıtlar, krisinin birçok moleküler mekanizma aracılığıyla çeşitli anti-kanser etkileri gösterebildiğini ve böylece kanserin başlamasını, ilerlemesini ve metastazını engelleyebildiğini öne sürmüştür [307]. Krisinin bu potansiyel faydaları, özellikle hücre proliferasyonu, apoptotik yolların aktivasyonu, anjiyogenезin baskılanması ve invazyonun önlenmesi gibi süreçlerle ilişkili olabilir. Ancak, bu etkilerin özellikle kanser immün yanıtı üzerindeki rolleri yeterince aydınlatılamamıştır. Mevcut literatürde krisinin immün modölatör etkileri üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır [308]. Özellikle, krisinin immün sistemi nasıl etkilediği, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi unsurlarının kanserle savaşma kapasitesini nasıl artırabileceği gibi konular belirsizliğini korumaktadır. Dolayısıyla, krisinin kanser immün yanıtındaki potansiyel rolünü anlamak için ileri düzey deneysel ve klinik çalışmalar gerekmektedir. Bu çalışmalar, krisinin immünoterapi yaklaşımlarıyla birlikte kullanılabilirliğini ve bu mekanizmalar aracılığıyla kanser tedavisindeki etkinliğini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Bu tartışmada krisinin anti-meme kanseri mekanizmaları, ROS üretimini modüle etme, apoptozisi teşvik etme, NK, T ve makrofaj hücrelerinin aktivitelerini ve bu hücrelerin anti-kanser yanıtlarını nasıl değiştirdiğine dair çok yönlü rolleri vurgulanacaktır. Ayrıca, krisinin meme kanseri hücrelerinin immün yanıtıdan kaçış mekanizmalarından biri olan immün kontrol noktası proteini PD-L1 ekspresyonuna olan etkisinin EGF ile ilişkilendirildiği sonuçlar değerlendirilecektir. Son olarak krisinin meme kanser hücrelerinin proliferasyonu ve ilerlemesinde öneme sahip olan AKT/mTOR yolağındaki protein ifadelerine olan etkisi ile ilgili elde edilen sonuçlar tartışılacaktır.

Daha önce yapılan çalışmalarda krisinin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak önemli antiproliferatif etki gösterdiği ve 50 µM IC50 dozunda belirgin şekilde apoptoz indüklediği gösterilmiştir [277]. Diğer çalışmalarda, metastatik üçlü negatif meme kanseri (TNBC) üzerindeki krisin etkileri incelenmiş, krisinin MDA-

MB-231 hücre canlılığını ve TNBC hücre göçünü ve invazyonunu doza bağımlı olarak önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur [309, 310]. Biz de çalışmamızda, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat 150, 222  $\mu$ M krisin ile tedavi edilmesinin, bu hücrelerin büyümesini ölçüde inhibe ettiği bulduk. Bulduğumuz bu IC50 dozlarının literatürdeki bazı çalışmaların sonuçlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Kanser hücre hatlarının canlılık analizleri en az üç tekrarla farklı zamanlarda yapılmıştır. Ayrıca, bazı çalışmalarda bizim çalışmamızda bulunan değerlere daha yakın sonuçlar da rapor edilmiştir. Örneğin; bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla, rutenyum ve krisin birlikte kompleksinin MCF-7 hücre canlılığı üzerinde 100  $\mu$ M'de önemli bir anti-proliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir. 2023 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise, krisinin MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatlik IC50 değeri 115,77  $\mu$ M olarak bulunmuştur [311]. Ayrıca, yine 2023 yılında yayımlanan bir diğer çalışmada, MDA-MB-231 hücre hatlarında 70  $\mu$ M krisin ve radyasyon birlikte tedavisinde önemli bir apoptotik etki gözlemlenmiştir [312].

ROS üretiminin de prostat, mesane, endometriyal ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanser hücre tiplerinde krisin tedavisi ile indüklendiği önceki çalışmalarda gösterilmiştir [295, 313] [314],[315]. Krisinin meme kanserinde ROS üretimi üzerindeki etkisi çoğunlukla türevleri veya nanopartikül formlarıyla yapılan araştırmalarla incelenmiştir [316, 317]. Çalışmamızda, krisin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 1 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasından daha fazla hücre içi ROS üretimini 300 $\mu$ M dozunda, hem immunofloresan hem de akış sitometri analizi ile artırdığını gösterdik. Hücre ölümünün ROS'a bağlı olarak gerçekleştiğini ve bu etkinin yalnızca yüksek dozlarda yakalandığı da dikkat çekici sonuçlardan biri olmuştur. Hücre içi ROS, genellikle hücre stresin ve oksidatif hasarın bir göstergesi olarak bilinmekle birlikte, orta ve yüksek seviyelerde üretilen ROS'un kemopreventif etkiler sunduğuna dair artan kanıtlar mevcuttur [318]. Bu çalışmanın eksik yanlarından biri, intrasellüler ROS üretimi ile bağışıklık sistemi arasındaki ilişkinin doğrudan gösterilmemiş olmasıdır. ROS'un kanser hücreleri üzerindeki etkileri geniş çapta incelenmiş olsa da, bağışıklık sistemi hücrelerinin ROS seviyelerine verdiği tepkiler ve bu mekanizmaların anti-kanser etkilerdeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. İleriki deneylerde yapılan nitrik oksit ölçümü ise bu konuda bazı ipuçları sağlamış ve bağışıklık sisteminin anti-kanser etkilerinde hücre içi oksidatif stresin potansiyel rolüne işaret etmiştir. Bu bulgu, bağışıklık hücrelerinin, özellikle makrofajlar ve NK hücreleri gibi etkili immün unsurların, ROS aracılığıyla kansere karşı

nasıl bir yanıt geliştirdiği sorusunu gündeme getirmektedir. İleride yapılacak daha kapsamlı çalışmalar, bağışıklık sisteminin ROS üretimine verdiği tepkileri ve bu tepkilerin kanser hücreleri üzerindeki inhibe edici etkilerini daha detaylı inceleyerek, bu ilişkinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

Krisin'in apoptotik etkisi immunofloresan boyama ve Annexin V/PI boyama ile tespit edilmiş ve literatürdeki çalışmalara benzer şekilde, özellikle MCF-7 hücrelerinde IC50 dozlarında apoptotik etkinin önemli ölçüde arttığını gözlemlenmiştir [266, 311]. Bu çalışmalar, MCF-7 (ER+) ve MDA-MB-231 (üçlü negatif) gibi iki farklı meme kanseri tipinin bu çalışmanın sonuçları ile benzer şekilde krisin tedavisine farklı yanıtlar verdiğini göstermiştir.

NK hücreleri, stres altındaki hücreleri, kanserli ve belli enfekte hücreleri tanımlamak üzere tasarlanmış, doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olan sitotoksik lenfositlerdir. Tümör hücrelerini önceden aktive olmaksızın hızla ortadan kaldırma yeteneğine sahiptirler. NK hücrelerinin sitotoksik eylemi, por oluşturan protein perforin ve pro-kaspazı aktive eden enzim granzim-B içeren granüllerin salınmasını içerir [88]. Kersetin, mirisetin ve naringenin gibi bazı diyet flavonoidleri NK-92 hücrelerinin sitolitik aktivitesini teşvik eder ve böylece diyet türevli immün-modülatör kemopreventif ajanlar olarak büyük potansiyele sahiptirler [319, 237, 320]. Bir çalışmada, apigenin, luteolin ve kersetin ile uyarılmış NK hücrelerinin sitokin üretimi, enzim bağlı immüno-sorbent deneyi ile ölçülmüş ve luteolin, sadece IL-2 salgısını artıran kersetine karşın, NK hücrelerinde tip-1 sitokin üretimini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir [321]. Krisinin de lösemili farelerden izole edilen splenositlerde NK hücrelerinde artıran sitotoksikite gösterdiği ve potansiyel olarak NK hücre fonksiyonunun cerrahi inhibisyonunu azaltabildiği, bu da metastaz yoluyla kanserin yayılma olasılığını azaltabildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [281, 282]. Flavonoidler ve krisin ile yapılan bu iki çalışmaya ek olarak, biz de belirli dozlarda 24 ve 48 saatlik krisin tedavilerinin NK-92 hücrelerinde çoğalmayı teşvik ettiğini ve uygun dozda IL-2 ile uyarılmış hücrelerde IFN- $\gamma$  seviyelerini değiştirdiğini gösterdik. En dikkate değer sonuç, farklı dozların sergilediği belirgin etkiler oldu ve bu da; flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin uygulamasında dozun önemini vurguladı [322]. Ayrıca, meme kanseri hücreleri ile oluşturulan ko-kültür modellerinde, NK-92 hücreleri ile dört gün boyunca kültüre edilen meme kanseri hücrelerinin ortak ko-kültür medyumlarındaki TNF- $\alpha$  ve granzim-B konsantrasyonlarında artış bulunmuştur. TNF- $\alpha$ 'nın hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda sitokin ile uyarılmış NK hücrelerinde

IFN- $\gamma$  üretimini artırdığı ve immün yanıtların modülasyonunda kilit bir rol oynadığı bilinmektedir [323]. Ayrıca, bir serin proteaz olan granzim-B de NK hücreleri tarafından hedef hücrelerde apoptozu indüklemek için kullanılan ana etki moleküllerinden biridir [324]. Dolayısıyla kanser hücreleriyle karşılaşmış NK hücrelerinin TNF- $\alpha$  ve granzim-B gibi sitokin ve enzimleri salgılayarak sitotoksik etki gösterdiği bizim çalışmamızla da doğrulanmış ve buna ek olarak da krisinin bu moleküllerin salgılanması üzerindeki uyarıcı etkisi rapor edilmiştir. Bu sitokin ve proteinlerin yanı sıra, NO üretimi ile NK hücre işlevi arasında anlamlı bir bağlantı olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. NO üretiminin inhibisyonunun NK hücrelerinde IL-2 seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. NO sentez geni baskılanan farelerde, NK hücre yanıtlarının durduğu da bulunmuştur [325-327]. İlginç bir şekilde her iki meme kanseri hücre hattı ve NK-92 ko-kültür modellerinde NO seviyelerinin TNF- $\alpha$  ve granzim-B seviyesine kıyasla önemli ölçüde arttığını bulduk, bu da NK-92 hücrelerinin tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi ile NO üretimi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, krisin'in belirli dozlarda NO üretimini modüle etmesi, literatürde daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ışığında TNF- $\alpha$  ve granzim-B salınımındaki artışların da sebebi olarak gösterilebilir. Ancak, NKG2D veya KIR2DL2 gibi NK hücre reseptör protein [328] ifadelerinin değerlendirilmesi yoluyla krisinin NK-92 hücreleri üzerindeki etkisini de ileri çalışmalarla göstermek gerekmektedir.

NK hücrelerinde CD56 yüzey işaretleyicisi, çeşitli NK hücre alt kümeleri ile NK-92 hücre hatlarını ayırt etmek için kullanılır. NK hücreleri üzerindeki ifadesi, özellikle sitotoksikite ve sitokin üretimi açısından onların işlevselliği ile korele olup, vücudun malignitelere karşı savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynar [329]. Çeşitli çalışmalarda, apigenin, soya izoflavonları veya *Astragalus complanatus*'tan izole edilen flavonoidler gibi flavonlar, kanser tedavisinde NK hücrelerinin immünostimülatörü olarak hizmet eden CD56 ifade seviyesini belirgin bir şekilde artırdığı bulunmuştur [330-332]. Krisin'in NK hücrelerindeki CD56 ifadesi üzerindeki etkisini gösteren çalışmalar dikkate değer şekilde sınırlıdır. Sadece bir çalışmada; kurkuminin fare hematopoetik kök hücrelerinin potansiyelini NK hücrelerine dönüşme yeteneğini CD56 ifadesi aracılığıyla koruduğu gösterilmiştir [333]. Yaptığımız bu çalışmada da, NK-92 hücrelerinde CD56 ifadesinin, NK-92 proliferasyonu ve IFN- $\gamma$  seviyesinde artış olduğu 125  $\mu$ M dozunda arttığı ancak daha yüksek 200  $\mu$ M dozda azaldığı bulunmuştur. Bu nedenle, krisin'in NK hücreleri üzerindeki etkisinin doza bağımlı bir şekilde modüle edebileceği söylenebilir.

Jurkat T hücreleri ile yapılan deneylerin sonuçları, krisin'in sitotoksik T hücresi yanıtında da önemli bir doza bağımlı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı olan Jurkat hücreleri, T-hücre lösemisi tanısı almış bir hastanın periferik kanından türetilmiştir. Öncelikle, T-hücre reseptörü (TCR) tarafından tetiklenen sinyal yollarının çözülmesi ve malin hücreler için hedef olan farklı kemokin reseptörlerinin ifadesinin araştırılması için bir model T-hücre hattı olarak hizmet eder. Daha önce belirtildiği üzere, PHA ile uyarıldıktan sonra, Jurkat hücreleri özellikle yüksek seviyede IL-2 üretimi göstermiştir [334]. PHA'nın Jurkat hücrelerinde IL-2 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokin salınımı aracılığıyla optimal uyarılma koşullarını bulmak amacıyla yapılan bir çalışmada, 0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  PHA konsantrasyonunun 24 saatte IL-2'nin en yüksek salınımına ve 12 saatte TNF-alfa'nın en yüksek salınımına yol açtığı gözlemlenmiştir [335]. Benzer şekilde, ön deneylerimizin bulgularına ve başka bir çalışmanın bulgularıyla tutarlı olarak [336], 1.5% PHA-M'nin kontrol ile karşılaştırıldığında hem 6 saatte hem de 12 saatte IL-2 seviyelerini önemli ölçüde artırdığını bulduk, ancak krisin ile birlikte uygulamanın 6 saatlik uygulamanın IL-2 seviyelerini daha da önemli ölçüde artırdığını gösterdi. Bu, fenolik bir bileşik olan krisinin, T hücrelerinin optimal uyarılma koşullarını değiştirebileceğini göstermektedir.

NK-92 hücrelerindeki gözlemlerden farklı olarak, Jurkat T hücrelerinde krisin'in artan dozlarının uygulanması, hücre proliferasyonunda önemli bir artışa yol açmadı. Bu, deneysel kurulumda NK hücreleri ile kullanılandan farklı bir strateji belirlememize yol açtı. Ko-kültür deneylerinde, meme kanseri hücreleri önce krisin'in IC50 dozları ile tedavi edildi ve T hücrelerinin tümör öldürme yanıtı üzerindeki etkinin değiştiği gözlemlendi. Benzer bir ko-kültür deney protokolü ile kurulan önceki bir çalışmada, flavonoidler apigenin ve kurkuminin T hücre aracılı melanom hücre öldürmesini artırdığı ve ko-kültür supernatanlarında IL-2 salgısını artırdığı gösterilmiştir [239]. Başka bir çalışmanın sonuçlarına dayanarak; krisin, IFN- $\gamma$  ile indüklenmiş hepatosellüler karsinomla kurulan ko-kültür sistemde PHA ve PMA ile uyarılmış T hücrelerinin bağışıklık aktivitesini tetiklemiştir [239]. Krisinin potansiyel olarak Th1 hücrelerinin fonksiyonlarını güçlendirdiği, böylece sitotoksik T hücrelerin anti-melanom yanıtını kuvvetlendirerek CD8+ T bağışıklık yanıtını da artırdığı bilinmektedir [337]. Diğer yandan, bir enfeksiyon modeli çalışmada PBMC'lerde pro-enflamatuar sitokin üretimini (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) doza bağımlı olarak azalttığı, makrofaj seviyesini düşürdüğü ancak T lenfositlerini değiştirmede gösterilmiştir [338]. Ayrıca, LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde NK-



$\kappa$ B aktivasyonunu ve TNF- $\alpha$  & IL-6 sitokinlerini inhibe etmiştir [339]. Dolayısıyla Jurkat T hücreleri ile yaptığımız deneyler krisin'in immünoestimülatör özelliklerini ortaya koymuştur. Meme kanseri hücreleri ile kurduğumuz ko-kültür modelinde, PHA ile uyarılmış T hücreleri IFN- $\gamma$ , IL-2 sitokinleri ve granzim-B seviyelerini artırarak kansere karşı geliştirilen bağışıklık yanıtını modüle etmiştir. Krisin ile yapılan benzer bir çalışmanın olmaması nedeniyle, sonuçlarımız krisinin bağışıklık sisteminin kapasitesini artırmadaki ve çeşitli sağlık sorunlarının önlenmesi ve tedavisindeki potansiyel faydalarını desteklemektedir.

Makrofaj hücreleri, mikroçevrelerindeki farklı sinyallere ve indükleyicilere yanıt olarak esnek bir şekilde farklı fonksiyonel fenotiplere dönüşebilirler. Bu dönüşüm, makrofajların fenotipik polarizasyonu olarak adlandırılır ve en yaygın olarak iki ana kategoriye ayrılır: M1 (klasik aktive edilmiş) ve M2 (alternatif aktive edilmiş) makrofajlar. Bu farklı fenotipler, makrofajların immün yanıtındaki rollerini belirler ve enfeksiyon, inflamasyon, doku onarımı ve tümör mikroçevresinde farklı etkiler gösterebilirler [301]. M1 Makrofajları genellikle bakteriyel ürünler, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) gibi pro-enflamatuvar sitokinler veya lipopolisakkarit (LPS) gibi moleküllerle uyarıldıklarında gelişirler. Bu makrofajlar yüksek düzeyde pro-enflamatuvar sitokinler (örn. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) üretir, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) gibi moleküller salgılar ve mikrobiyal patojenlere ve kanser hücrelerine karşı güçlü bir savunma sağlarlar [340]. LPS, özellikle bakteriyel enfeksiyonlarda sıkça karşılaşılan bir patojenik molekül olduğu için M1 tipi makrofaj polarizasyonunun ana uyarıcılarından biridir [341]. Bu çalışmada, LPS'nin optimum dozlarda bir M1 makrofaj polarizasyon uyarıcısı olarak işlev gördüğü göz önüne alınarak, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin kanser hücrelerine karşı geliştireceği sitotoksik yanıtı indükleyeceği düşünülmüş ve en uygun LPS konsantrasyonu ve inkübasyon süresi bulunmuştur. Bulunan 1  $\mu$ g/ml doz daha önce mürin makrofajlarla yapılan çalışma ile benzerdir [342]. Yapılan başka bir çalışmada 2.5  $\mu$ g/ml LPS dozunun makrofaj hücre canlılığını anlamlı olarak artırdığını göstermiştir [343] fakat bu çalışmada inkübasyon süresi bizim çalışmamızdakinden farklı olarak 48 saattir. M0 makrofaj tipi olan RAW 264.7 hücre hattının kansere karşı sitotoksik etkisi olduğu bilinen M1 tipine dönüşümü CD80 ve CD206 gibi yüzey protein belirteçlerinin ekspresyon değişiminin veya immünfloresan görüntüleme ile aktin yapılarının ve nüklei farklılıklarının analiz edilmesi ile doğrulanabilir. Çalışmamızda nitrik oksit konsantrasyonunun artışının gösterilmesi ile doğrulama yapılsa da bu tip farklı

testlerle doğrulama yapılmaması çalışmanın eksik yanlarından biridir. Ayrıca, makrofaj polarizasyonunun sadece iki kategoriden ibaret olmadığı, farklı mikroçevresel faktörler ve kombinasyonların makrofajların daha karmaşık ve dinamik fenotipler sergilemesine yol açabileceği de unutulmamalıdır [344].

Bazı flavonoid bileşiklerinin makrofajların kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini artırabileceğini göstermektedir. Makrofajlar üzerindeki etkileri açısından değerlendirildiğinde, flavonoidlerin özellikle M1 tipi makrofaj polarizasyonunu destekleyebileceği ve bu yolla kanser hücrelerine karşı daha güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturabilecekleri görülmüştür [299]. Kuerstein, kaempferol ve apigenin gibi yaygın flavonoidlerin, makrofajların pro-enflamatuvar fenotipe geçişini teşvik ederek, kanser hücrelerine karşı olan sitotoksik aktivitelerini artırdığı literatürde yer almaktadır [345] [346, 347]. Bu flavonoidler, makrofajların reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretimini artırarak, kanser hücrelerinde DNA hasarına ve hücre ölümüne yol açabilir. Ayrıca, bu bileşiklerin makrofajlar tarafından salgılanan pro-enflamatuvar sitokinlerin (örneğin TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) üretimini artırarak, kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını engelleyebileceği de öne sürülmektedir [156]. Daha önce yapılan bir çalışma ile bir krisin türevinin makrofajları TLR-4'ü hedefleyerek M1 makrofaja polarize ettiği gösterilmiştir [348]. Başka bir çalışmada ise *indigofera tinctoria* bitkisinin yapraklarından izole edilmiş krisinin immünomodülatör etkisi, LPS ile uyarılmış mürin makrofajlar üzerinde farklı testlerle (ROS üretimi, gen ekspresyonu ve NF- $\kappa$ B nükleer translokasyonu) değerlendirmiştir ve NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe ederek makrofajların işlevlerini artırmak suretiyle doğuştan gelen bağışıklık yanıtını artırma yeteneğine sahip olduğunu ve güçlü immünomodülatör potansiyeli olduğu ifade edilmiştir [308]. Biz de daha önce yapılan çalışmalar ışığında, krisinin LPS ile indüklenmiş ve sitotoksik etki potansiyeli artırılmış makrofaj hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına olan anti-kanser yanıtını diğer çalışmalarda gösterilen hücre öldürme mekanizmalarına ek olarak apoptotik etki ile artırdığını gösterdik. Yapılan bazı çalışmalar ise krisinin ve bazı diğer flavonoidlerin makrofaj hücrelerinde NO seviyesini düşürdüğünü [349] rapor etmiştir. Ancak bizim bulgularımıza benzer olarak krisin, hesperitin ve epigallokateşinin NO seviyelerini doza bağımlı olarak modüle ederek, pro-inflamatuvar sitokin üreterek veya makrofaj hücrelerinin M2 polarizasyonunu suprese ederek anti-kanser etki gösterebileceğini bildirmiştir [350, 351]. Ayrıca sonuçlarımız, farklı dozlarda uygulanan krisin etken maddesinin makrofaj hücrelerinin kanser hücrelerine karşı gösterdiği

sitotoksik yanıt üzerinde farklı etkiler yarattığı da gözlemlenmiştir. Özellikle 75  $\mu$ M konsantrasyonda krisin, makrofajların belirgin bir şekilde kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini indüklerken, 50  $\mu$ M dozda bu etkilerin gözlenmemesi dikkat çekicidir. Bu durum, polifenollerin doz, hedef sistem ve hücre tipi ile hedef hücrenin biyolojik durumu gibi faktörlere bağlı olarak farklı ve bazen paradoksal etkiler göstermesini [352] destekler niteliktedir. Bu doz bağımlı farklılıklar, kanser tedavisinde fitokimyasalların uygun doz aralıklarının dikkatle belirlenmesi gerektiğine işaret eder.

Çalışmamızdaki önemli sonuçlardan biri, NK ve T hücrelerinin meme kanseri hücre hatlarına karşı tepkisinde EGF tedavisinin etkisi olmuştur. Araştırmalar, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) meme kanseri hücrelerinin çoğalması ve göçünde hayati bir rol oynadığını göstermektedir. EGFR'lar çeşitli insan kanserlerinde belirgin bir şekilde aşırı ifade edilmekte ve meme kanseri prognozu için olumsuz göstergeler olarak kabul edilmektedir [353]. Önceki bir çalışma, EGF'nin kolon kanseri kök hücrelerinde PD-L1'in hücre zarına taşınmasını kolaylaştırdığını ve böylece kanser immünoterapisinde rol oynadığını öne sürmektedir [354]. Başka bir çalışmada, krisin türevi olan CHM-09, EGFR inhibitörleri ile birlikte hücre çoğalmasını ve göçünü inhibe etme, apoptozu tetikleme ve hücre döngüsü durdurma gibi benzer etkiler göstermiştir [355]. EGF'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde ifade edilen EGFR reseptörünün aktivasyonunu takiben T hücreleri ve NK hücrelerinin antikanser yanıtı üzerindeki etkisinin gösterilmesi örneğin, meme kanseri hücrelerinde EGFR ve immün kontrol proteinleri arasındaki bağlantıyı kurma konusunda ön çalışma olarak hizmet edebilir [356, 357]. Bu durum, uyguladığımız EGF tedavisinin NK-92 ve T hücrelerinin tepkilerini kontrol gruplarına göre önemli ölçüde değiştirmesi nedeniyledir. Ancak, STAT yolları veya PI3K/AKT/mTOR gibi EGF/EGFR ile ilişkili yollar üzerindeki etkileri göstermek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

PD-1/PD-L1 yolak blokajına dayalı immünoterapi, birçok tür kanserin tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış ve bu nedenle klinik uygulamalar için bir dizi FDA onayı almış, paradigma değiştirici ve çığır açan bir terapötik yaklaşımı temsil etmektedir [328]. Bu immün kontrol noktası hedefli terapiler, PD-1 ve PD-L1'in etkileşimini bloke eden monoklonal antikolar temelinde geliştirilmektedir. Tümör hücrelerinde ve ev sahibi antijen içeren hücrelerde (APC) PD-L1 ifadesinin, tümör immün kaçınılmazlığı ve kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir [358, 359]. Bu nedenle, hem tümör hücrelerinde hem de APC'lerde PD-L1 ifadesini azaltabilen hedefli terapiler, PD-1/PD-

L1 immün kontrol noktası ile müdahale ederek ev sahibi bağışıklığını yeniden aktive etmek için alternatif bir terapötik yaklaşım haline gelebilir. Meme kanseri hücrelerine karşı anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini gösterdiğimiz krisin; literatürlerle de benzer bir şekilde, EGF ile uyarılan meme kanseri hücrelerinde PD-L1 protein ekspresyonunu artırmıştır. Yapılan bir çalışma kolon kanseri kök hücrelerinde EGF'nin PD-L1'in hücre yüzeyine taşınmasını teşvik ettiğini göstermiştir [354]. Küçük hücreli akciğer kanseri ile yürütülen bir çalışmada ise EGFR ile PD1/PD-L1 yolağı arasındaki bağlantı araştırılmış ve EGFR sinyal yolunun tümör hücrelerinde MHC I/II ve PD-L1 ekspresyonunu ve lenfositlerin aktivitesini düzenleyerek bağışıklık düzenleyici etkisi olduğunu bildirmiştir [186]. Başka bir çalışmada ise, özofagus skuamoz kanserinde EGFR sinyal yolunun aktivasyonu ile PD-L1 ekspresyonunun EGFR'ye bağımlı bir şekilde önemli ölçüde arttığını ve EGFR sinyal yolunun bloke edilmesi durumunda keskin bir şekilde azaldığı bulmuştur. Yükselen PD-L1 ekspresyonu EGFR-STAT3 sinyal yoluyla ilişkili olmayıp, EGFR-PI3K-AKT, EGFR-Ras-Raf-Erk ve EGFR-PLC-  sinyal yollarından etkilenmiş olabileceği sonucuna varılmıştır [183, 184]. Yine küçük hücreli akciğer kanser hücrelerinde EGF uyarımı ile EGFR aktivasyonunun PD-L1 ekspresyonunu indükleyebileceği bulunmuş hatta EGFR'yi EGFR-TKI'ler ile inhibe etmenin, T hücrelerinin baskılanmasını ortadan kaldırarak interferon-  y retimini de arttırabileceği bildirilmiştir [360]. Literatürde, EGF ile uyarılan meme kanseri hücrelerindeki PD-L1 ifadesi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır bu nedenle çalışmanın sonuçları PD-L1 proteini ve EGF arasındaki ilişkinin anlaşılması açısından literatüre katkı sağlamıştır.

 mm n kontrol noktası blokaj terapileri sitotoksik T hücreleri üzerinde bulunan immün kontrol-noktası reseptörlerini ilgili ligandlarıyla bağlanmasını bloke etmeyi hedefleyen terapilerdir [361]. Tümöre ve viral enfeksiyonlara karşı verilen hızlı yanıtta etkili olan NK hücreleri, dendritik hücreler gibi antijen-içeren hücreler (APCs) ve T-hücrelerini regüle eden hücrelerde (Treg) de immün kontrol noktası reseptörleri bulunur [360]. Dolayısıyla, immün kontrol noktası blokörleri tümör hücrelerine karşı geliştirilen immün yanıtın artmasını sağlayan önemli ajanlar olup FDA onaylı anti-PD-L1 ve anti-PD1 ilaçlar geliştirilmiştir [362]. Bununla birlikte, yapılan klinik çalışmalar, bu tür ajanların vücudun anti-enflamatuar yanıt sistemini bozduğunu, oto-immün hastalıklara yakalanma riskini arttırdığını ve kanser hücreleri dışındaki hücrelerde T hücresi yanıtlarını bozduklarını göstermiştir [363]. Bu yan etkileri nedeniyle, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla

elde edilebilirlikleri kolay, yan etkileri düşük, kanser hücrelerine selektif ve anti-kanser özellikleri bilinen doğal etken maddelerin, immün kontrol noktası inhibisyonu gibi immün-modulasyon yollarıyla tümöre karşı olan bağışıklık yanıtını değiştirip değiştiremeyeceği sorusu yanıtlanmaya çalışılmaktadır. Doğal ürünler, PD-1 ve PD-L1 etkileşiminin doğrudan bloke edilmesi, tümörlerde PD-1/PD-L1 seviyelerinin baskılanması ve kombinasyon tedavisi dahil olmak üzere çeşitli stratejiler yoluyla PD-1/PD-L1 eksenini hedefleyebilir [364]. Çalışmalar, özellikle bitkilerde veya balda bulunan polifenollerin (örn; kurkumin, resveratrol), kardiyotonik steroidlerin (örn; digoksin ve bufalin), terpenoidlerin (örn; paklitaksel, artemisinin ve triptolid), polisakaritlerin (örn; lentinan), saponinler, ve kapsaisin potansiyel immünomodülatör etkilerini göstermiştir [227, 365, 366, 367, 368]. 2022'de yayınlanmış tek bir çalışmada ise krisinin, PD-L1'in *in vivo* ve *in vitro* ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği, T hücrelerinin proliferasyonunu ve IL-2 konsantrasyonunu artırabildiği ortaya konmuştur [337]. Ancak, krisinin meme kanseri hücrelerindeki anti-kanser özelliğinin *in vitro* ortamda PD-L1 gibi immün kontrol noktası proteiniyle ilişkilendirildiği ve PD-L1'i düzenleyen mekanizmaların ortaya konduğu bir çalışma yoktur. Literatürde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin diğer bazı kanser hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında en yüksek PD-L1 seviyesini ifade etmiş oldukları ve bu durum onların daha yüksek immünosupresif etkileri olduğu bildirilmiştir [167]. Bu nedenle bu iki meme kanseri hücre hattında PD-L1 ifadesinin değişimini analiz etmek anlamlıdır. Bu çalışma ile daha önce çeşitli fitokimyasallar ile yürütülen çalışmalara benzer şekilde krisinin PD-L1 protein düzeyleri uyarılmış iki farklı meme kanseri hücre hattında da PD-L1 ifadesini inhibe etmiş olması çalışmanın en dikkat çekici sonuçlarından biridir. İki farklı meme kanseri hücre hattı incelendiğinde MCF-7 hücrelerinde ekspresyon düzeyi indüklenen PD-L1 düzeyi MDA-MB-231 hücrelerine göre daha fazla inhibe edilmiştir. Bunun sebebi; genomik, epigenetik, transkripsiyonel ve proteomik analizler neticesinde meme kanseri alt tiplerinin farklı yolak aktivitesi ve ilerlemesi göstermeleri olabilir [2]. Örneğin, MCF-7 (östrojen ve progesteron pozitif) ve MDA-MB-231 (üçlü negatif) hücreleri, her ikisinin de invaziv duktal/meme karsinomu hücreleri olmalarına rağmen birçok fenotipik/genotipik farklılıklara sahip olmaları ve tedaviye yanıt bakımından önemli farklılıklar gösterirler. Krisinin düşük biyoyararlanımı düşünüldüğünde [369], PD-L1 proteinlerine olan etkisini ve immünomodülatör özelliğini *in vivo* hayvan modelleriyle yürütülen prelinik çalışmalar ve ileri klinik çalışmalar ile desteklemek gerekmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda propoliste bulunan galangin ve pinocembrin flavonoidlerinin hepatoselüler karsinom hücrelerinde PI3K/Akt yolağını regüle ettiği gösterilmiştir [268]. Krisinin ise kolorektal kanser hücrelerinde ve serebral iskemik farelerin beyin dokularındaki ve nöroblastom hücre hatlarında PI3K/Akt/mTOR yolağını düzenlediği bilinmektedir [370, 315]. Çalışmamızda, akt proteininin fosforilasyonunun EGF ile proliferasyonu ve PD-L1 düzeyi uyarılmış meme kanseri hücrelerinde azaldığı gözlemlenirken, p-mTOR proteini için aynı durum gözlenmemiştir. Bu farklılığın birkaç olası nedeni olabilir. İlk olarak, AKT ve mTOR sinyal yollarının birbirinden bağımsız olarak farklı düzenleyici mekanizmalara sahip olabileceği düşünülmektedir [371, 372]. AKT, hücre içi sinyalizasyonu başlatan bir kinaz olarak, genellikle çeşitli çevresel uyaranlar ve büyüme faktörleri tarafından daha hızlı ve dinamik bir şekilde fosforile olabilir. Buna karşılık, mTOR proteini daha karmaşık ve geniş bir protein kompleksinin parçasıdır ve bu nedenle fosforilasyonu daha dirençli olabilir veya spesifik olarak belirli uyaranlarla aktive olabilir. Bir diğer olasılık ise, AKT'nin fosforilasyonunun flavonoidlerle daha doğrudan hedef alınabileceği ve bu nedenle mTOR'a kıyasla daha hızlı bir inhibisyona uğrayabileceğidir [373]. Flavonoidler, hücre sinyalleme yollarında çoklu hedeflere etki ederken, AKT kinazını spesifik olarak baskılayabilir. Flavonoidlerin AKT'nin upstream regülatörleri olan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) veya fosfoinositid bağımlı kinaz-1 (PDK1) üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir [374]. Bu da AKT'nin fosforilasyonunu daha doğrudan inhibe ederken, mTOR komplekslerinin düzenlenmesinin daha dirençli kalmasını sağlayabilir.

AKT protein ekspresyonunun iki meme kanseri hücre hattında da krisin ile inhibe edilmesi çalışmamızın önemli bulgularından biridir. Krisinin özellikle AKT fosforilasyonunu baskılayarak hücre proliferasyonu ve hayatta kalma mekanizmalarını hedef alması, kanser tedavisinde önemli bir strateji olabilir. Bu inhibisyon, hücre döngüsünü durdurma, apoptozun indüklenmesi ve hücrel stres yanıtlarının artırılması gibi çeşitli yollardan kanser hücrelerinin büyümesini sınırlandırabilir. Ancak, AKT inhibisyonunun mTOR üzerindeki dolaylı etkilerinin sınırlı kalması, bu iki yol arasında daha karmaşık bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, AKT'yi inhibe eden krisinin mTOR sinyal yoluna etkileri daha ayrıntılı olarak incelenmeli ve bu bileşiklerin hangi koşullarda her iki proteini de etkin bir şekilde baskılayabileceği araştırılmalıdır.

AKT-mTOR yolu, meme kanserinde yer alan birçok onkogenin aktivasyonu için bir yakınsama noktası olarak hizmet ettiğinden, bu yolun muhtemelen PD-L1

ekspresyonunun kontrolünden sorumlu olup olmadığını araştıran çalışmalar da kısıtlıdır [375]. Dahası krisinin agresif ve agresif olmayan iki farklı meme kanseri hücre hattı türünde EGF indüksiyonu ile Akt/mTOR sinyal yolağı üzerinden PD-L1 ekspresyonunu düzenlediğinin araştırıldığı bir çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır. Bu mekanizmanın aydınlatılması ile literatürden farklı olarak; krisinin yalnızca PD-L1 üzerine olan etkisi değıl aynı zamanda PD-L1' e olan etkisini muhtemel bir üst bir sinyal yolağı ile gerçekleşip gerçekleştirmediği de ortaya konulabilir. Biz de alışmamızda EGF ile PD-L1 düzeyinin arttığını ve krisinin bu artışı inhibe ettiğini, p-akt düzeyiyle paralel bir şekilde gösterdik fakat krisin etken maddesinin akt/mtor yolağı üzerinden PD-L1 protein ekspresyonunu inhibe ettiğini gösterebilmek için daha ileri moleküler mekanizma çalışmalarına ihtiyaç vardır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, krisinin doğal yollarla elde edilen bir flavonoid olarak, meme kanseri hücrelerine karşı anti-proliferatif, hücre içi ROS'u artırıcı ve anti-apoptotik etkiler sergilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, *in vitro* modellerde NK-92, Jurkat T ve RAW makrofaj hücrelerinin aktivitelerini artırdığı gözlemlenmiştir. Krisin, NK, T ve makrofaj hücrelerine bağlı sitotoksik etkileri doz bağımlı bir şekilde modifiye etme potansiyeline sahiptir. Özellikle, EGF ile proliferasyonu indüklenmiş meme kanseri hücrelerinde PD-L1 düzeylerini inhibe ederek, immün sistemden kaçış mekanizmalarından biri olan PD-1/PD-L1 yolaklarına etkisi gözlemlenmiş ve bu durum, krisinin immünomodülatör bir ajan olarak kullanılma potansiyelini vurgulamıştır.

NK-92 hücrelerinde krisin, kanser hücrelerine karşı TNF- $\alpha$ , granzim B ve nitrik oksit (NO) üretiminin yukarı regülasyonu ile sitotoksik etkileri kolaylaştırırken, T hücrelerindeki etkiler IFN- $\gamma$ , granzim B ve IL-2 seviyelerinin yükselmesiyle aracılık edilmiştir. Makrofaj hücrelerinde ise nitrik oksit üretiminin indüklenmesi sonucunda kanser hücrelerinde apoptoz tetiklenmiştir. Akt/mTOR yolakları üzerindeki etkileri de incelenmiş olup, krisinin Akt fosforilasyonunu anlamlı derecede azalttığı ancak mTOR proteini üzerinde aynı etkiyi göstermediği tespit edilmiştir. Bu durum, krisinin bu yolaktaki fonksiyonunun daha ileri çalışmalarla aydınlatılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çalışma sonunda krisinin meme kanseri tedavisinde tek başına veya kombinasyonlar halinde klinik olarak kullanılma potansiyeli ortaya konmuştur. Sonuçlar ışığında daha ileri çalışmalar ile krisin veya türevlerinin formüle edildiği ilaçlar geliştirilebilir ve bu sayede konvansiyonel tedavilere göre daha az maliyetli ve elde edilebilirliği kolay bir alternatif tedavi seçeneği sunulur. Ayrıca, tıp alanında bağışıklık sistemi modülasyonu temelli tedavi oluşturmaya yönelik alternatif kimyasallar ve doğal kaynaklı bileşiklerin araştırılmasını da destekler sonuçlar elde edilmiştir.

Ancak, krisinin bağışıklık yanıt üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve klinikte kullanılabilir bir ilaca dönüşebilmesi için *in vivo* hayvan modeli çalışmaların yanı sıra



klirik çalışmalara da ihtiyaç vardır. İleri klinik çalışmaların yanı sıra *in vitro* ve *in vivo* olarak da daha ileri moleküler tekniklerin kullanıldığı çalışmalar planlanmalıdır. Örneğin; PD-L1 üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için bu protein ekspresyonunun susturulduğu genetik olarak modifiye edilmiş hayvan ve hücre kültürü modellerinde krisinin etkileri değerlendirilmeli, NK hücrelerindeki etkileri insan kaynaklı kan örneklerinden veya hayvan modeli çalışmalar ile gösterilmeli, T hücrelerinin yanıtlarının araştırılmasında T hücrelerine özgü yüzey proteinlerine olan etkileri yine preklinik çalışmalarla ortaya konmalıdır. Akt/mTOR yolağı ve PD-L1 proteinleri arasındaki ilişki ve bu yolaklar üzerindeki krisin etkisi de hem translasyonel hem de transkripsiyonel düzeyde sinyal yolaklarındaki diğer genlerin de ifadeleri araştırılarak değerlendirilmelidir. Tüm bu öneriler krisinin bu çalışma ile ortaya konmuş olan immünmodulator etki potansiyelini destekleyecek ve literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] **Sung, H., et al.**, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. 71(3): p. 209-249.
- [2] **Yersal, O. & S. Barutca**, *Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications*. World J Clin Oncol, 2014. 5(3): p. 412-24.
- [3] **Tang, S., et al.**, *Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle*. Int Immunopharmacol, 2020. 86: p. 106700.
- [4] **Gonzalez, H., C. Hagerling, & Z. Werb**, *Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression*. Genes Dev, 2018. 32(19-20): p. 1267-1284.
- [5] **Ferraiuolo, R.M. & K.U. Wagner**, *Regulation and New Treatment Strategies in Breast Cancer*. J Life Sci (Westlake Village), 2019. 1(3): p. 23-38.
- [6] **Wang, K., et al.** *Natural Products as Targeted Modulators of the Immune System*. Journal of immunology research, 2018. 2018, 7862782 DOI: 10.1155/2018/7862782.
- [7] **Martins, F., et al.**, *Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance*. Nat Rev Clin Oncol, 2019. 16(9): p. 563-580.
- [8] **Agarwal, G., et al.**, *Current status and contemporary approaches to the discovery of antitumor agents from higher plants*. Biotechnology advances, 2020. 38: p. 107337.
- [9] **Siegel, R.L., et al.**, *Cancer statistics, 2023*. CA Cancer J Clin, 2023. 73(1): p. 17-48.
- [10] **Fisher, R., L. Pusztai, & C. Swanton**, *Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics*. British journal of cancer, 2013. 108(3): p. 479-485.
- [11] **Schottenfeld, D. & J.F. Fraumeni Jr**, *Cancer epidemiology and prevention*. 2006: Oxford University Press.
- [12] **Aizawa, K., et al.**, *Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation*. International journal of cancer, 2016. 139(5): p. 1171-1181.
- [13] **Poon, S.L., et al.**, *Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention*. Genome medicine, 2014. 6: p. 1-14.
- [14] **Antwi, S.O., et al.**, *Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer*. Cancer Causes & Control, 2015. 26: p. 1583-1591.
- [15] **de Martel, C., et al.**, *Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis*. Lancet Glob Health, 2020. 8(2): p. e180-e190.

- [16] **Matlashewski, G., et al.**, *Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene*. The EMBO journal, 1984. 3(13): p. 3257-3262.
- [17] **Wei, Q., L. Li, & D. Chen**, *DNA repair, genetic instability, and cancer*. 2007: World scientific.
- [18] **Wood, R.D., M. Mitchell, & T. Lindahl**, *Human DNA repair genes*, 2005. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. 577(1-2): p. 275-283.
- [19] **Portela, A. & M. Esteller**, *Epigenetic modifications and human disease*. Nature Biotechnology, 2010. 28(10): p. 1057-1068.
- [20] **Goelz, S.E., et al.**, *Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms*. Science, 1985. 228(4696): p. 187-190.
- [21] **Giaquinto, A.N., et al.**, *Breast Cancer Statistics, 2022*. CA Cancer J Clin, 2022. 72(6): p. 524-541.
- [22] **Arnold, M., et al.**, *Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040*. The Breast, 2022. 66: p. 15-23.
- [23] **Brown, N.A. & K.S. Elenitoba-Johnson**, *Enabling precision oncology through precision diagnostics*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2020. 15(1): p. 97-121.
- [24] **Nicolini, A. & P. Ferrari**, *Targeted Therapies and Drug Resistance in Advanced Breast Cancer, Alternative Strategies and the Way beyond*. Cancers, 2024. 16(2): p. 466.
- [25] **Tran, K.B., et al.**, *The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. The Lancet, 2022. 400(10352): p. 563-591.
- [26] **Singletary, S.E.**, *Rating the risk factors for breast cancer*. Annals of surgery, 2003. 237(4): p. 474-482.
- [27] **Shiovitz, S. & L.A. Korde**, *Genetics of breast cancer: a topic in evolution*. Ann Oncol, 2015. 26(7): p. 1291-9.
- [28] **Antoniou, A., et al.**, *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. The American Journal of Human Genetics, 2003. 72(5): p. 1117-1130.
- [29] **Hu, C., et al.**, *A population-based study of genes previously implicated in breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2021. 384(5): p. 440-451.
- [30] **Al-Shami, K., et al.**, *Estrogens and the risk of breast cancer: A narrative review of literature*. Heliyon, 2023. 9(9).
- [31] **Aurin, J., H. Thorlacius, & S.T. Butt**, *Age at first childbirth and breast cancer survival: a prospective cohort study*. BMC research notes, 2020. 13(1): p. 9.
- [32] **Nelson, H.D., et al.**, *Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis*. Annals of internal medicine, 2012. 156(9): p. 635-648.
- [33] **Islami, F., et al.**, *Breastfeeding and breast cancer risk by receptor status—a systematic review and meta-analysis*. Annals of Oncology, 2015. 26(12): p. 2398-2407.
- [34] **Yang, L. & K.H. Jacobsen**, *A systematic review of the association between breastfeeding and breast cancer*. Journal of women's health, 2008. 17(10): p. 1635-1645.

- [35] **Diao, X., et al.**, *Physical activity and cancer risk: a dose-response analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. Cancer Commun (Lond), 2023. 43(11): p. 1229-1243.
- [36] **Suzuki, R., et al.**, *Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status--a meta-analysis*. Int J Cancer, 2009. 124(3): p. 698-712.
- [37] **Tsai, H.H., et al.**, *The Risk of Breast Cancer between Western and Mediterranean Dietary Patterns*. Nutrients, 2023. 15(9).
- [38] **Sieri, S., et al.**, *Dietary fat intake and development of specific breast cancer subtypes*. J Natl Cancer Inst, 2014. 106(5).
- [39] **Sellem, L., et al.**, *Saturated, mono- and polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk: results from the French prospective cohort NutriNet-Santé*. Eur J Nutr, 2019. 58(4): p. 1515-1527.
- [40] **Seitz, H.K., et al.**, *Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012*. Alcohol Alcohol, 2012. 47(3): p. 204-12.
- [41] **Hamajima, N., et al.**, *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. 87(11): p. 1234-45.
- [42] **Gaudet, M.M., et al.**, *Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies*. Int J Epidemiol, 2017. 46(3): p. 881-893.
- [43] **Macacu, A., et al.**, *Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2015. 154(2): p. 213-24.
- [44] **Land, C.E., et al.**, *Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990*. Radiat Res, 2003. 160(6): p. 707-17.
- [45] **Ronckers, C.M., C.A. Erdmann, & C.E. Land**, *Radiation and breast cancer: a review of current evidence*. Breast Cancer Res, 2005. 7(1): p. 21-32.
- [46] **Cuthrell, K.M. & N. Tzenios**, *Breast Cancer: Updated and Deep Insights*. International Research Journal of Oncology, 2023. 6(1): p. 104-118.
- [47] **Wazir, U., et al.**, *Pleomorphic lobular carcinoma in situ: Current evidence and a systemic review*. Oncol Lett, 2016. 12(6): p. 4863-4868.
- [48] **Curtis, C., et al.**, *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups*. Nature, 2012. 486(7403): p. 346-52.
- [49] **Barroso-Sousa, R. & O. Metzger-Filho**, *Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications*. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2016. 8(4): p. 261-266.
- [50] **Bae, S.Y., et al.**, *Mucinous carcinoma of the breast in comparison with invasive ductal carcinoma: clinicopathologic characteristics and prognosis*. J Breast Cancer, 2011. 14(4): p. 308-13.
- [51] **Comşa, Ş., A.M. Cîmpean, & M. Raica**, *The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research*. Anticancer Res, 2015. 35(6): p. 3147-54.
- [52] **Chavez, K.J., S.V. Garimella, & S. Lipkowitz**, *Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer*. Breast Dis, 2010. 32(1-2): p. 35-48.

- [53] **Bianchini, G., et al.**, *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. 13(11): p. 674-690.
- [54] **Badve, S., et al.**, *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists*. Mod Pathol, 2011. 24(2): p. 157-67.
- [55] **Bonnefoi, H., et al.**, *A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1)*. Ann Oncol, 2016. 27(5): p. 812-8.
- [56] **Visvader, J.E.**, *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. 469(7330): p. 314-22.
- [57] **Dagogo-Jack, I. &A.T. Shaw**, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. 15(2): p. 81-94.
- [58] **Wei, S.**, *Hormone receptors in breast cancer: An update on the uncommon subtypes*. Pathology - Research and Practice, 2023. 250: p. 154791.
- [59] **Waks, A.G. &E.P. Winer**, *Breast Cancer Treatment: A Review*. Jama, 2019. 321(3): p. 288-300.
- [60] **Wang, L.**, *Early Diagnosis of Breast Cancer*. Sensors (Basel), 2017. 17(7).
- [61] **André, F., et al.**, *Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2019. 380(20): p. 1929-1940.
- [62] **Litton, J.K., et al.**, *Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation*. N Engl J Med, 2018. 379(8): p. 753-763.
- [63] **Jiang, Z., et al.**, *Tucidinostat plus exemestane for postmenopausal patients with advanced, hormone receptor-positive breast cancer (ACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2019. 20(6): p. 806-815.
- [64] **Dagher, O.K., et al.**, *Advances in cancer immunotherapies*. Cell, 2023. 186(8): p. 1814-1814.e1.
- [65] **Schmid, P., et al.**, *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. N Engl J Med, 2018. 379(22): p. 2108-2121.
- [66] **Bajgain, P., et al.**, *CAR T cell therapy for breast cancer: harnessing the tumor milieu to drive T cell activation*. J Immunother Cancer, 2018. 6(1): p. 34.
- [67] **Marconi, R., et al.**, *Cytokine Modulation in Breast Cancer Patients Undergoing Radiotherapy: A Revision of the Most Recent Studies*. Int J Mol Sci, 2019. 20(2).
- [68] **Nounou, M.I., et al.**, *Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies*. Breast Cancer (Auckl), 2015. 9(Suppl 2): p. 17-34.
- [69] **Sudhesh Dev, S., et al.**, *Receptor Tyrosine Kinases and Their Signaling Pathways as Therapeutic Targets of Curcumin in Cancer*. Frontiers in Pharmacology, 2021. 12.
- [70] **Zhou, B., et al.**, *Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022. 7(1): p. 95.
- [71] **Komiya, Y. &R. Habas**, *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis, 2008. 4(2): p. 68-75.
- [72] **Fuentes, N. &P. Silveyra**, *Estrogen receptor signaling mechanisms*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2019. 116: p. 135-170.
- [73] **Liu, P., et al.**, *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2009. 8(8): p. 627-44.

- [74] **Paddock, M.N., S.J. Field, & L.C. Cantley**, *Treating cancer with phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors: increasing efficacy and overcoming resistance*. J Lipid Res, 2019. 60(4): p. 747-752.
- [75] **Samuels, Y., et al.**, *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. Science, 2004. 304(5670): p. 554.
- [76] **Yang, J., et al.**, *Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials*. Mol Cancer, 2019. 18(1): p. 26.
- [77] **Omarini, C., et al.**, *Mutational Profile of Metastatic Breast Cancer Tissue in Patients Treated with Exemestane Plus Everolimus*. BioMed Research International, 2018. 2018(1): p. 3756981.
- [78] **Cerma, K., et al.**, *Targeting PI3K/AKT/mTOR Pathway in Breast Cancer: From Biology to Clinical Challenges*. Biomedicines, 2023. 11(1): p. 109.
- [79] **Delves, P.J. & I.M. Roitt**, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(1): p. 37-49.
- [80] **Delves, P.J. & I.M. Roitt**, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(2): p. 108-17.
- [81] **Németh, T., M. Sperandio, & A. Mócsai**, *Neutrophils as emerging therapeutic targets*. Nature Reviews Drug Discovery, 2020. 19(4): p. 253-275.
- [82] **Kolaczowska, E. & P. Kubes**, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nature Reviews Immunology, 2013. 13(3): p. 159-175.
- [83] **Mócsai, A., B. Walzog, & C.A. Lowell**, *Intracellular signalling during neutrophil recruitment*. Cardiovascular Research, 2015. 107(3): p. 373-385.
- [84] **Coxon, A., et al.**, *Fc $\gamma$ 3b3/RIII Mediates Neutrophil Recruitment to Immune Complexes: A Mechanism for Neutrophil Accumulation in Immune-Mediated Inflammation*. Immunity, 2001. 14(6): p. 693-704.
- [85] **Dunkelberger, J.R. & W.-C. Song**, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Research, 2010. 20(1): p. 34-50.
- [86] **Acharya, K.R. & S.J. Ackerman**, *Eosinophil Granule Proteins: Form and Function*. Journal of Biological Chemistry, 2014. 289(25): p. 17406-17415.
- [87] **Varricchi, G., et al.**, *Human mast cells and basophils—How are they similar how are they different?* Immunological Reviews, 2018. 282(1): p. 8-34.
- [88] **Vivier, E., et al.**, *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. 9(5): p. 503-10.
- [89] **van den Berg, T.K., J.A. Yoder, & G.W. Litman**, *On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale*. Trends in immunology, 2004. 25(1): p. 11-16.
- [90] **Aplin, A.E., A.K. Howe, & R.L. Juliano**, *Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth*. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(6): p. 737-44.
- [91] **Mousa, S.A.**, *Cell Adhesion Molecules: Potential Therapeutic & Diagnostic Implications*. Molecular Biotechnology, 2008. 38(1): p. 33-40.
- [92] **Horstkorte, R. & B. Fuss**, *Chapter 9 - Cell Adhesion Molecules*, in *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*, S.T. Brady, et al., Editors. 2012, Academic Press: New York. p. 165-179.
- [93] **Fernandez, E.J. & E. Lolis**, *Structure, Function, and Inhibition of Chemokines*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002. 42(Volume 42, 2002): p. 469-499.
- [94] **Zlotnik, A., O. Yoshie, & H. Nomiyama**, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biology, 2006. 7(12): p. 243.

- [95] **Ono, S.J., et al.**, *Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. 111(6): p. 1185-1199.
- [96] **Oppenheim, J.J.**, *Cytokines: Past, Present, and Future*. International Journal of Hematology, 2001. 74(1): p. 3-8.
- [97] O'Shea, J.J., M. Gadina, & R.M. Siegel, 9 - *Cytokines and Cytokine Receptors*, in *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, R.R. Rich, et al., Editors. 2019, Elsevier: London. p. 127-155.e1.
- [98] **Pestka, S., C.D. Krause, & M.R. Walter**, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunological Reviews, 2004. 202(1): p. 8-32.
- [99] **Iwasaki, A. & R. Medzhitov**, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. 16(4): p. 343-53.
- [100] **Cyster, J.G. & C.D.C. Allen**, *B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions*. Cell, 2019. 177(3): p. 524-540.
- [101] **Curtsinger, J.M. & M.F. Mescher**, *Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation*. Curr Opin Immunol, 2010. 22(3): p. 333-40.
- [102] **Wucherpfennig, K.W., et al.**, *Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition*. Seminars in Immunology, 2007. 19(4): p. 216-224.
- [103] **Klose, C.S.N. & D. Artis**, *Innate lymphoid cells control signaling circuits to regulate tissue-specific immunity*. Cell Research, 2020. 30(6): p. 475-491.
- [104] **Parkin, J. & B. Cohen**, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. 357(9270): p. 1777-89.
- [105] **Rock, K.L., E. Reits, & J. Neefjes**, *Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules*. Trends Immunol, 2016. 37(11): p. 724-737.
- [106] **Hwang, J.-R., et al.**, *Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development*. Experimental & Molecular Medicine, 2020. 52(5): p. 750-761.
- [107] **Dikiy, S. & A.Y. Rudensky**, *Principles of regulatory T cell function*. Immunity, 2023. 56(2): p. 240-255.
- [108] **Lee, G.R.**, *Molecular Mechanisms of T Helper Cell Differentiation and Functional Specialization*. Immune Netw, 2023. 23(1): p. e4.
- [109] **Wolfert, M.A. & G.J. Boons**, *Adaptive immune activation: glycosylation does matter*. Nat Chem Biol, 2013. 9(12): p. 776-84.
- [110] **Ehrlich, P.**, *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde: Ueber den jetzigen Stand Der Karzinomforschung*. Weekblad Jaargang Eerst helft, 1909. 5: p. 273.
- [111] **Burnet, M.**, *Cancer—a biological approach: I. The processes of control. II. The significance of somatic mutation*. British medical journal, 1957. 1(5022): p. 779.
- [112] **Strausberg, R.L.**, *Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival*. Genome Biology, 2005. 6: p. 1-4.
- [113] **Dunn, G.P., L.J. Old, & R.D. Schreiber**, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 329-60.
- [114] **Dunn, G.P., et al.**, *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. 3(11): p. 991-8.
- [115] **Dunn, G.P., L.J. Old, & R.D. Schreiber**, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. 21(2): p. 137-48.
- [116] **Swann, J.B. & M.J. Smyth**, *Immune surveillance of tumors*. J Clin Invest, 2007. 117(5): p. 1137-46.

- [117] **Cavallo, F., et al.**, 2011: *the immune hallmarks of cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2011. 60(3): p. 319-26.
- [118] **Lakshmi Narendra, B., et al.**, *Immune system: a double-edged sword in cancer*. Inflammation Research, 2013. 62(9): p. 823-834.
- [119] **Sacher, A.G., et al.**, *Cytotoxic CD4+ T cells in bladder cancer—a new license to kill*. Cancer Cell, 2020. 38(1): p. 28-30.
- [120] **Joyce, J.A. & D.T. Fearon**, *T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment*. Science, 2015. 348(6230): p. 74-80.
- [121] **Mumberg, D., et al.**, *CD4+ T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN- $\gamma$* . Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. 96(15): p. 8633-8638.
- [122] **Farhood, B., M. Najafi, & K. Mortezaee**, *CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review*. Journal of cellular physiology, 2019. 234(6): p. 8509-8521.
- [123] **Raskov, H., et al.**, *Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy*. British journal of cancer, 2021. 124(2): p. 359-367.
- [124] **Zahavi, D. & L. Weiner**, *Monoclonal antibodies in cancer therapy*. Antibodies, 2020. 9(3): p. 34.
- [125] **Ahmed, H., et al.**, *Role of T cells in cancer immunotherapy: Opportunities and challenges*. Cancer Pathogenesis and Therapy, 2023. 1(2): p. 116-126.
- [126] **Abraham, R.T. & A. Weiss**, *Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(4): p. 301-8.
- [127] **Watson, J., et al.**, *Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. I. Purification of a class of murine lymphokines*. J Exp Med, 1979. 150(4): p. 849-61.
- [128] **Carrasco-Padilla, C., et al.**, *T cell activation and effector function in the human Jurkat T cell model*. Methods Cell Biol, 2023. 178: p. 25-41.
- [129] **Huntington, N.D., J. Cursons, & J. Rautela**, *The cancer-natural killer cell immunity cycle*. Nat Rev Cancer, 2020. 20(8): p. 437-454.
- [130] **Herberman, R.B., M.E. Nunn, & D.H. Lavrin**, *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity*. Int J Cancer, 1975. 16(2): p. 216-29.
- [131] **Naujoks, W., et al.**, *Characterization of Surface Receptor Expression and Cytotoxicity of Human NK Cells and NK Cell Subsets in Overweight and Obese Humans*. Front Immunol, 2020. 11: p. 573200.
- [132] **El-Deeb, N.M., et al.**, *Modulation of NKG2D, KIR2DL and Cytokine Production by Pleurotus ostreatus Glucan Enhances Natural Killer Cell Cytotoxicity Toward Cancer Cells*. Front Cell Dev Biol, 2019. 7: p. 165.
- [133] **Mandelboim, O., et al.**, *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. Nature, 2001. 409(6823): p. 1055-60.
- [134] **Welte, S., et al.**, *Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction*. Nat Immunol, 2006. 7(12): p. 1334-42.
- [135] **Freud, A.G., et al.**, *The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity*. Immunity, 2017. 47(5): p. 820-833.
- [136] **Cheng, M., et al.**, *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. Cellular & Molecular Immunology, 2013. 10(3): p. 230-252.



- [137] **Cooley, S., et al.**, *A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature*. *Blood*, 2007. 110(2): p. 578-86.
- [138] **Cao, Y., et al.**, *Immune checkpoint molecules in natural killer cells as potential targets for cancer immunotherapy*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020. 5(1): p. 250.
- [139] **Baychelier, F., et al.**, *Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44*. *Blood*, 2013. 122(17): p. 2935-42.
- [140] **Hertwig, L.**, *The implication of natural killer cells and neutrophils in autoimmune disorders of the central nervous system*. 2016, Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät.
- [141] **Guillerey, C., N.D. Huntington, & M.J. Smyth**, *Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy*. *Nat Immunol*, 2016. 17(9): p. 1025-36.
- [142] **Oka, N., et al.**, *IL-12 regulates the expansion, phenotype, and function of murine NK cells activated by IL-15 and IL-18*. *Cancer Immunol Immunother*, 2020. 69(9): p. 1699-1712.
- [143] **Pérez-Martínez, A., et al.**, *A phase I/II trial of interleukin-15--stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors*. *Cytotherapy*, 2015. 17(11): p. 1594-603.
- [144] **Romee, R., et al.**, *Cytokine activation induces human memory-like NK cells*. *Blood*, 2012. 120(24): p. 4751-60.
- [145] **Konjević, G.M., et al.**, *The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment*. *Cytokine*, 2019. 117: p. 30-40.
- [146] **Ljunggren, H.G. & K. Kärre**, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*, 1990. 11(7): p. 237-44.
- [147] **Zwirner, N.W., C.I. Domaica, & M.B. Fuertes**, *Regulatory functions of NK cells during infections and cancer*. *J Leukoc Biol*, 2021. 109(1): p. 185-194.
- [148] **Myers, J.A. & J.S. Miller**, *Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021. 18(2): p. 85-100.
- [149] **Hatjiharissi, E., et al.**, *Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism*. *Blood*, 2007. 110(7): p. 2561-4.
- [150] **Smyth, M.J., et al.**, *Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide*. *Blood*, 2002. 99(4): p. 1259-66.
- [151] **Bryceson, Y.T., et al.**, *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. *Immunol Rev*, 2006. 214: p. 73-91.
- [152] **Kelly, J.M., et al.**, *Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection*. *Nat Immunol*, 2002. 3(1): p. 83-90.
- [153] **Wang, F., J.K.C. Lau, & J. Yu**, *The role of natural killer cell in gastrointestinal cancer: killer or helper*. *Oncogene*, 2021. 40(4): p. 717-730.
- [154] **Klingemann, H.**, *The NK-92 cell line-30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer*. *Cytotherapy*, 2023. 25(5): p. 451-457.
- [155] **Siveen, K.S. & G. Kuttan**, *Role of macrophages in tumour progression*. *Immunol Lett*, 2009. 123(2): p. 97-102.
- [156] **Mantovani, A., et al.**, *Macrophages as tools and targets in cancer therapy*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2022. 21(11): p. 799-820.

- [157] **Martinez, F.O., L. Helming, & S. Gordon**, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 451-83.
- [158] **Fairweather, D. & D. Cihakova**, *Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2009. 33(3-4): p. 222-30.
- [159] **Mantovani, A., et al.**, *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. 25(12): p. 677-86.
- [160] **Taciak, B., et al.**, *Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages*. *PLoS One*, 2018. 13(6): p. e0198943.
- [161] **Wu, C., et al.**, *Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance*. *Acta Histochem*, 2006. 108(1): p. 19-24.
- [162] **Zou, W., J.D. Wolchok, & L. Chen**, *PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations*. *Science translational medicine*, 2016. 8(328): p. 328rv4-328rv4.
- [163] **Wu, P., et al.**, *PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0131403.
- [164] **Mandai, M.**, *PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment-from basic research to clinical application*. *Int J Clin Oncol*, 2016. 21(3): p. 447.
- [165] **Yasunaga, M.**, *Antibody therapeutics and immunoregulation in cancer and autoimmune disease*. *Semin Cancer Biol*, 2020. 64: p. 1-12.
- [166] **Ghebeh, H., et al.**, *Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule*. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(4): p. R48.
- [167] **Zheng, Y., Y.C. Fang, & J. Li**, *PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity*. *Oncol Lett*, 2019. 18(5): p. 5399-5407.
- [168] **Zhang, J.-y., et al.**, *PD-1/PD-L1 Based Combinational Cancer Therapy: Icing on the Cake*. *Frontiers in Pharmacology*, 2020. 11.
- [169] **Quan, Z., et al.**, *Clinical implications of the interaction between PD-1/PD-L1 and PI3K/AKT/mTOR pathway in progression and treatment of non-small cell lung cancer*. *J Cancer*, 2022. 13(13): p. 3434-3443.
- [170] **Kleffel, S., et al.**, *Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth*. *Cell*, 2015. 162(6): p. 1242-56.
- [171] **Lastwika, K.J., et al.**, *Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT–mTOR pathway in non–small cell lung cancer*. *Cancer research*, 2016. 76(2): p. 227-238.
- [172] **Liu, M., et al.**, *Myeloid-derived suppressor cells regulate the immunosuppressive functions of PD-1(-)PD-L1(+) Bregs through PD-L1/PI3K/AKT/NF-κB axis in breast cancer*. *Cell Death Dis*, 2021. 12(5): p. 465.
- [173] **Boussiotis, V.A.**, *Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway*. *N Engl J Med*, 2016. 375(18): p. 1767-1778.
- [174] **Kantoff, P.W., et al.**, *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2010. 363(5): p. 411-22.
- [175] **Wang, J., T. Yang, & J. Xu**, *Therapeutic Development of Immune Checkpoint Inhibitors*. *Adv Exp Med Biol*, 2020. 1248: p. 619-649.
- [176] **Finck, A.V., et al.**, *Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond*. *Nat Med*, 2022. 28(4): p. 678-689.

- [177] **Mendelsohn, J. & J. Baselga**, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2003. 21(14): p. 2787-99.
- [178] **Burness, M.L., T.A. Grushko, & O.I. Olopade**, *Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker?* Cancer J, 2010. 16(1): p. 23-32.
- [179] **Masuda, H., et al.**, *Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. 136(2): p. 331-45.
- [180] **Lee, M.J., et al.**, *Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks*. Cell, 2012. 149(4): p. 780-94.
- [181] **Cabioglu, N., et al.**, *Expression of growth factor and chemokine receptors: new insights in the biology of inflammatory breast cancer*. Ann Oncol, 2007. 18(6): p. 1021-9.
- [182] **Pivarcsi, A., et al.**, *Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(48): p. 19055-60.
- [183] **Zhang, W., et al.**, *Induction of PD-L1 expression by epidermal growth factor receptor-mediated signaling in esophageal squamous cell carcinoma*. Onco Targets Ther, 2017. 10: p. 763-771.
- [184] **Chen, N., et al.**, *Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation*. Journal of Thoracic Oncology, 2015. 10(6): p. 910-923.
- [185] **Yu, X.M., et al.**, *Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo*. Cancer, 2013. 119(4): p. 774-81.
- [186] **Li, X., et al.**, *Interactions between EGFR and PD-1/PD-L1 pathway: Implications for treatment of NSCLC*. Cancer Letters, 2018. 418: p. 1-9.
- [187] **Erica, L.S., et al.**, *Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology*, in *Flavonoids*, C.J. Goncalo, Editor. 2017, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 1.
- [188] **Ullah, A., et al.**, *Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent*. Molecules, 2020. 25(22): p. 5243.
- [189] **Panche, A.N., A.D. Diwan, & S.R. Chandra**, *Flavonoids: an overview*. J Nutr Sci, 2016. 5: p. e47.
- [190] **do Nascimento, R.P., et al.**, *Neuroimmunomodulatory Properties of Flavonoids and Derivates: A Potential Action as Adjuvants for the Treatment of Glioblastoma*. Pharmaceutics, 2022. 14(1): p. 116.
- [191] **Dias, M.C., D.C.G.A. Pinto, & A.M.S. Silva**, *Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity*. Molecules, 2021. 26(17): p. 5377.
- [192] **Cortez, R., et al.**, *Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017. 16(1): p. 180-198.
- [193] **Brahmachari, G.**, *Naturally occurring flavanones: An overview*. Natural Product Communications, 2008. 3(8): p. 1934578X0800300820.
- [194] **Shukla, R., et al.**, *Role of flavonoids in management of inflammatory disorders, in Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases*. 2019, Elsevier. p. 293-322.

- [195] **Mahmud, A.R., et al.**, *Natural flavonols: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for various diseases*. Beni Suef Univ J Basic Appl Sci, 2023. 12(1): p. 47.
- [196] **Najmanová, I., et al.**, *The pharmacokinetics of flavanones*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020. 60(18): p. 3155-3171.
- [197] **Miadoková, E.**, *Isoflavonoids - an overview of their biological activities and potential health benefits*. Interdiscip Toxicol, 2009. 2(4): p. 211-8.
- [198] **Crowe-White, K.M., et al.**, *Flavan-3-ols and Cardiometabolic Health: First Ever Dietary Bioactive Guideline*. Adv Nutr, 2022. 13(6): p. 2070-2083.
- [199] **Gonzali, S. & P. Perata**, *Anthocyanins from Purple Tomatoes as Novel Antioxidants to Promote Human Health*. Antioxidants, 2020. 9(10): p. 1017.
- [200] **Jasim, H.A., et al.**, *Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads*. Biomolecules, 2021. 11(8): p. 1203.
- [201] **Liga, S., C. Paul, & F. Péter**, *Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques*. Plants, 2023. 12(14): p. 2732.
- [202] **Halliwell, B. & J.M. Gutteridge**, *Free radicals in biology and medicine*. 2015: Oxford university press, USA.
- [203] **Vicente, O. & M. Boscaiu**, *Flavonoids: Antioxidant Compounds for Plant Defence... and for a Healthy Human Diet*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2018. 46(1): p. 14-21.
- [204] **Simunkova, M., et al.**, *Antioxidant vs. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu (II) ions: A ROS-scavenging activity, fenton reaction and DNA damage study*. International journal of molecular sciences, 2021. 22(4): p. 1619.
- [205] **Torello, C.O., M.C. Alvarez, & S.T. Olalla Saad**, *Polyphenolic Flavonoid Compound Quercetin Effects in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes*. Molecules, 2021. 26(19): p. 5781.
- [206] **Procházková, D., I. Boušová, & N. Wilhelmová**, *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. Fitoterapia, 2011. 82(4): p. 513-523.
- [207] **Cao, G., E. Sofic, & R.L. Prior**, *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free radical biology and medicine, 1997. 22(5): p. 749-760.
- [208] **Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, & D.J. Bobilya**, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of nutritional biochemistry, 2002. 13(10): p. 572-584.
- [209] **Stadler, N., R.A. Lindner, & M.J. Davies**, *Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. 24(5): p. 949-954.
- [210] **Müller, S., et al.**, *Copper and iron orchestrate cell-state transitions in cancer and immunity*. Trends in Cell Biology.
- [211] **Yen, G.-C., et al.**, *Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2003. 67(6): p. 1215-1222.
- [212] **Yang, B., et al.**, *Chrysin inhibits metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells by modulating matrix metalloproteinase-10, epithelial to mesenchymal transition, and PI3K/Akt signaling pathway*. Journal of Applied Toxicology, 2014. 34(1): p. 105-112.

- [213] **Yamashita, N., H. Tanemura, & S. Kawanishi**, *Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II)*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999. 425(1): p. 107-115.
- [214] **Halliwell, B.**, *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?* Archives of biochemistry and biophysics, 2008. 476(2): p. 107-112.
- [215] **Sakihama, Y., et al.**, *Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants*. Toxicology, 2002. 177(1): p. 67-80.
- [216] **Wong, R.S.**, *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. 30(1): p. 87.
- [217] **Fan, T.J., et al.**, *Caspase family proteases and apoptosis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. 37(11): p. 719-27.
- [218] **Opferman, J.T. & A. Kothari**, *Anti-apoptotic BCL-2 family members in development*. Cell Death Differ, 2018. 25(1): p. 37-45.
- [219] **Jan, R. & G.E. Chaudhry**, *Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics*. Adv Pharm Bull, 2019. 9(2): p. 205-218.
- [220] **Momeni, H.R.**, *Role of calpain in apoptosis*. Cell J, 2011. 13(2): p. 65-72.
- [221] **Stewart, T.A., K.T. Yapa, & G.R. Monteith**, *Altered calcium signaling in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2015. 1848(10 Pt B): p. 2502-11.
- [222] **Kasibhatla, S. & B. Tseng**, *Why target apoptosis in cancer treatment?* Mol Cancer Ther, 2003. 2(6): p. 573-80.
- [223] **Abotaleb, M., et al.**, *Flavonoids in Cancer and Apoptosis*. Cancers (Basel), 2018. 11(1).
- [224] **Shakoor, H., et al.**, *Immunomodulatory Effects of Dietary Polyphenols*. Nutrients, 2021. 13(3): p. 728.
- [225] **Tonks, A., et al.**, *Stimulation of TNF- $\alpha$  release in monocytes by honey*. Cytokine, 2001. 14(4): p. 240-242.
- [226] **Cho, S.-Y., et al.**, *Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- $\kappa$ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage*. Molecular and cellular biochemistry, 2003. 243: p. 153-160.
- [227] **Huang, R.-Y., et al.**, *Immunosuppressive Effect of Quercetin on Dendritic Cell Activation and Function*. The Journal of Immunology, 2010. 184(12): p. 6815-6821.
- [228] **Kandere-Grzybowska, K., et al.**, *Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin*. British Journal of Pharmacology, 2006. 148(2): p. 208-215.
- [229] **Nair, M.P.N., et al.**, *The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN $\gamma$ ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2002. 1593(1): p. 29-36.
- [230] **García-Lafuente, A., et al.**, *Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease*. Inflammation Research, 2009. 58(9): p. 537-552.

- [231] **Xagorari, A., C. Roussos, & A. Papapetropoulos**, *Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin*. British Journal of Pharmacology, 2002. 136(7): p. 1058-1064.
- [232] **Cardenas, H., et al.**, *Dietary Apigenin Exerts Immune-Regulatory Activity in Vivo by Reducing NF- $\kappa$ B Activity, Halting Leukocyte Infiltration and Restoring Normal Metabolic Function*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. 17(3): p. 323.
- [233] **Ai, X.-Y., et al.**, *Apigenin inhibits colonic inflammation and tumorigenesis by suppressing STAT3-NF- $\kappa$ B signaling*. Oncotarget, 2017. 8(59).
- [234] **Shin, E.K., et al.**, *Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. 381(4): p. 502-507.
- [235] **Xiao, J., et al.**, *Chrysin attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing immuno-inflammatory responses*. Neuroscience, 2014. 262: p. 156-164.
- [236] **Meng, X., et al.**, *Preventive effect of chrysin on experimental autoimmune uveitis triggered by injection of human IRBP peptide 1-20 in mice*. Cell Mol Immunol, 2017. 14(8): p. 702-711.
- [237] **Kim, H.H., Y. Bae, & S.H. Kim**, *Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation*. Food Chem Toxicol, 2013. 57: p. 209-16.
- [238] **Sung, N.-Y., et al.**, *The procyanidin trimer C1 induces macrophage activation via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, leading to Th1 polarization in murine splenocytes*. European Journal of Pharmacology, 2013. 714(1): p. 218-228.
- [239] **Xu, L., et al.**, *Apigenin suppresses PD-L1 expression in melanoma and host dendritic cells to elicit synergistic therapeutic effects*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018. 37(1): p. 261.
- [240] **Li, W., et al.**, *Immune Checkpoint PD-1/PD-L1 CTLA-4/CD80 are Blocked by Rhus verniciflua Stokes and its Active Compounds*. Molecules, 2019. 24(22).
- [241] **Sassi, A., et al.**, *Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study*. Chem Biol Interact, 2018. 283: p. 10-19.
- [242] **Masad, R.J., et al.**, *The Immunomodulatory Effects of Honey and Associated Flavonoids in Cancer*. Nutrients, 2021. 13(4).
- [243] **De Flora, S. & L.R. Ferguson**, *Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. 591(1): p. 8-15.
- [244] **Manson, M.M.**, *Cancer prevention—the potential for diet to modulate molecular signalling*. Trends in molecular medicine, 2003. 9(1): p. 11-18.
- [245] **Landis-Piowar, K.R. & N.R. Iyer**, *Cancer chemoprevention: current state of the art*. Cancer growth and metastasis, 2014. 7: p. CGM. S11288.
- [246] **González-Vallinas, M., et al.**, *Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives*. Nutrition Reviews, 2013. 71(9): p. 585-599.
- [247] **Hosseini, A. & A. Ghorbani**, *Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies*. Avicenna J Phytomed, 2015. 5(2): p. 84-97.
- [248] **Wattenberg, L.W.**, *Chemoprevention of Cancer*. Preventive Medicine, 1996. 25(1): p. 44-45.

- [249] **Khan, H.Y., et al.**, *A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols*. Curr Drug Targets, 2012. 13(14): p. 1738-49.
- [250] **Ramos, S.**, *Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways*. Molecular nutrition & food research, 2008. 52(5): p. 507-526.
- [251] **Laurie, S.A., et al.**, *Phase I study of green tea extract in patients with advanced lung cancer*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2005. 55: p. 33-38.
- [252] **Jatoi, A., et al.**, *A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2003. 97(6): p. 1442-1446.
- [253] **George, B.P., R. Chandran, & H. Abrahamse**, *Role of Phytochemicals in Cancer Chemoprevention: Insights*. Antioxidants, 2021. 10(9): p. 1455.
- [254] **Mani, R. & V. Natesan**, *Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action*. Phytochemistry, 2018. 145: p. 187-196.
- [255] **Chen, Y.H., et al.**, *Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae*. Food Chem, 2012. 134(2): p. 717-24.
- [256] **Gresa-Arribas, N., et al.**, *Inhibition of CCAAT/enhancer binding protein  $\delta$  expression by chrysin in microglial cells results in anti-inflammatory and neuroprotective effects*. J Neurochem, 2010. 115(2): p. 526-36.
- [257] **Villar, I.C., et al.**, *Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats*. Planta medica, 2002. 68(09): p. 847-850.
- [258] **Du, Q., et al.**, *Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice*. Mol Med Rep, 2012. 6(1): p. 100-4.
- [259] **Duarte, J., et al.**, *Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta*. Planta Med, 2001. 67(6): p. 567-9.
- [260] **Torres-Piedra, M., et al.**, *A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition*. Eur J Med Chem, 2010. 45(6): p. 2606-12.
- [261] **Brown, E., et al.**, *Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a Passiflora incarnata extract, in the laboratory rat*. Aana j, 2007. 75(5): p. 333-7.
- [262] **Critchfield, J.W., S.T. Butera, & T.M. Folks**, *Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996. 12(1): p. 39-46.
- [263] **Machala, M., et al.**, *Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of Dracaena cinnabari: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity*. Phytother Res, 2001. 15(2): p. 114-8.
- [264] **Pushpavalli, G., C. Veeramani, & K.V. Pugalendi**, *Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D-galactosamine-induced hepatotoxicity rats*. Food Chem Toxicol, 2010. 48(6): p. 1654-9.
- [265] **Anand, K.V., et al.**, *Protective role of chrysin against oxidative stress in d-galactose-induced aging in an experimental rat model*. Geriatr Gerontol Int, 2012. 12(4): p. 741-50.

- [266] **Khoo, B.Y., S.L. Chua, & P. Balaram**, *Apoptotic Effects of Chrysin in Human Cancer Cell Lines*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. 11(5): p. 2188-2199.
- [267] **Shao, J.J., et al.**, *AMP-activated protein kinase (AMPK) activation is involved in chrysin-induced growth inhibition and apoptosis in cultured A549 lung cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 423(3): p. 448-53.
- [268] **Liu, Y., et al.**, *Galangin and Pinocembrin from Propolis Ameliorate Insulin Resistance in HepG2 Cells via Regulating Akt/mTOR Signaling*. Evid Based Complement Alternat Med, 2018. 2018: p. 7971842.
- [269] **Afshari, A.R., et al.**, *Harnessing the capacity of phytochemicals to enhance immune checkpoint inhibitor therapy of cancers: A focus on brain malignancies*. Cancer Letters, 2024. 593: p. 216955.
- [270] **Naz, S., et al.**, *Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties*. Life Sciences, 2019. 235: p. 116797.
- [271] **Karthikeyan, S., et al.**, *Chemopreventive potential of chrysin in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis*. International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases, 2013. 3(1): p. 46-53.
- [272] **Rauf, A., et al.**, *Suppression of inflammatory response by chrysin, a flavone isolated from Potentilla evestita Th. Wolf. In silico predictive study on its mechanistic effect*. Fitoterapia, 2015. 103: p. 129-35.
- [273] **Khan, M.S., H. Devaraj, & N. Devaraj**, *Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2011. 251(1): p. 85-94.
- [274] **Li, X., et al.**, *Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53*. Chemico-Biological Interactions, 2015. 232: p. 12-20.
- [275] **Rehman, M.U., et al.**, *Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF- $\kappa$ B*. Toxicol Lett, 2013. 216(2-3): p. 146-58.
- [276] **Lirdprapamongkol, K., et al.**, *A flavonoid chrysin suppresses hypoxic survival and metastatic growth of mouse breast cancer cells*. Oncol Rep, 2013. 30(5): p. 2357-2364.
- [277] **Samarghandian, S., et al.**, *Inhibitory and Cytotoxic Activities of Chrysin on Human Breast Adenocarcinoma Cells by Induction of Apoptosis*. Pharmacogn Mag, 2016. 12(Suppl 4): p. S436-s440.
- [278] **Javan Maasomi, Z., et al.**, *Synergistic Anticancer Effects of Silibinin and Chrysin in T47D Breast Cancer Cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. 18(5): p. 1283-1287.
- [279] **Geng, A., et al.**, *Chrysin impairs genomic stability by suppressing DNA double-strand break repair in breast cancer cells*. Cell Cycle, 2022. 21(4): p. 379-391.
- [280] **Zeinali, M., S.A. Rezaee, & H. Hosseinzadeh**, *An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. 92: p. 998-1009.
- [281] **Beaumont, D.M., et al.**, *The effects of chrysin, a Passiflora incarnata extract, on natural killer cell activity in male Sprague-Dawley rats undergoing abdominal surgery*. Aana j, 2008. 76(2): p. 113-7.



- [282] **Lin, C.C., et al.**, *Chrysin, a natural and biologically active flavonoid, influences a murine leukemia model in vivo through enhancing populations of T-and B-cells, and promoting macrophage phagocytosis and NK cell cytotoxicity.* In Vivo, 2012. 26(4): p. 665-70.
- [283] **Lee, J.Y., J.M. Kim, & C.J. Kim**, *Flavones derived from nature attenuate the immediate and late-phase asthmatic responses to aerosolized-ovalbumin exposure in conscious guinea pigs.* Inflamm Res, 2014. 63(1): p. 53-60.
- [284] **Yao, J., et al.**, *Chrysin alleviates allergic inflammation and airway remodeling in a murine model of chronic asthma.* Int Immunopharmacol, 2016. 32: p. 24-31.
- [285] **Wadibhasme, P.G., M.M. Ghaisas, & P.A. Thakurdesai**, *Anti-asthmatic potential of chrysin on ovalbumin-induced bronchoalveolar hyperresponsiveness in rats.* Pharm Biol, 2011. 49(5): p. 508-15.
- [286] **Rong, W., et al.**, *Chrysin inhibits hepatocellular carcinoma progression through suppressing programmed death ligand 1 expression.* Phytomedicine, 2022. 95: p. 153867.
- [287] **Chang, H.Y., et al.**, *Ectopic ATP synthase blockade suppresses lung adenocarcinoma growth by activating the unfolded protein response.* Cancer Res, 2012. 72(18): p. 4696-706.
- [288] **McGahon, A.J., et al.**, *The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro.* Methods Cell Biol, 1995. 46: p. 153-85.
- [289] **Wu, Y., Z. Tian, & H. Wei**, *Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines.* Frontiers in Immunology, 2017. 8.
- [290] **Ceuppens, J.L., et al.**, *Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal.* J Immunol, 1988. 141(11): p. 3868-74.
- [291] **Poli, A., et al.**, *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset.* Immunology, 2009. 126(4): p. 458-65.
- [292] **Pech, M.F., et al.**, *Systematic identification of cancer cell vulnerabilities to natural killer cell-mediated immune surveillance.* Elife, 2019. 8.
- [293] **Deng, T., et al.**, *A novel strategy for colorimetric detection of hydroxyl radicals based on a modified Griess test.* Talanta, 2019. 195: p. 152-157.
- [294] **Towbin, H., T. Staehelin, & J. Gordon**, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
- [295] **Ryu, S., et al.**, *Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress.* Journal of Cellular Physiology, 2017. 232(12): p. 3786-3797.
- [296] **Liu, R., et al.**, *Oxidative Stress in Cancer Immunotherapy: Molecular Mechanisms and Potential Applications.* Antioxidants (Basel), 2022. 11(5).
- [297] **Burkard, M., et al.**, *Dietary flavonoids and modulation of natural killer cells: implications in malignant and viral diseases.* J Nutr Biochem, 2017. 46: p. 1-12.
- [298] **Cui, F., et al.**, *NK cell-produced IFN- $\gamma$  regulates cell growth and apoptosis of colorectal cancer by regulating IL-15.* Exp Ther Med, 2020. 19(2): p. 1400-1406.
- [299] **Mendes, L.F., et al.**, *Flavonoid-mediated immunomodulation of human macrophages involves key metabolites and metabolic pathways.* Scientific Reports, 2019. 9(1): p. 14906.

- [300] **Wahlgren, J., et al.**, *Activated human T cells secrete exosomes that participate in IL-2 mediated immune response signaling*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e49723.
- [301] **Yunna, C., et al.**, *Macrophage M1/M2 polarization*. Eur J Pharmacol, 2020. 877: p. 173090.
- [302] **Zhang, C., Y. Hu, & C. Shi**, *Targeting Natural Killer Cells for Tumor Immunotherapy*. Frontiers in Immunology, 2020. 11.
- [303] **Janku, F., T.A. Yap, & F. Meric-Bernstam**, *Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?* Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. 15(5): p. 273-291.
- [304] **Ardito, F., et al.**, *The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)*. Int J Mol Med, 2017. 40(2): p. 271-280.
- [305] **Zou, Z., et al.**, *mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges*. Cell & Bioscience, 2020. 10(1): p. 31.
- [306] **Salari, N., et al.**, *Anti-cancer Activity of Chrysin in Cancer Therapy: a Systematic Review*. Indian J Surg Oncol, 2022. 13(4): p. 681-690.
- [307] **Talebi, M., et al.**, *Emerging cellular and molecular mechanisms underlying anticancer indications of chrysin*. Cancer Cell International, 2021. 21(1): p. 214.
- [308] **Boothapandi, M. & R. Ramanibai**, *Immunomodulatory effect of natural flavonoid chrysin (5, 7-dihydroxyflavone) on LPS stimulated RAW 264.7 macrophages via inhibition of NF- $\kappa$ B activation*. Process Biochemistry, 2019. 84: p. 186-195.
- [309] **Hong, T.B., et al.**, *Potential Effects of Chrysin on MDA-MB-231 Cells*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. 11(3): p. 1057-1069.
- [310] **Roy, S., A. Sil, & T. Chakraborty**, *Potentiating apoptosis and modulation of p53, Bcl2, and Bax by a novel chrysin ruthenium complex for effective chemotherapeutic efficacy against breast cancer*. Journal of Cellular Physiology, 2019. 234(4): p. 4888-4909.
- [311] **Çetinkaya, S.**, *Chrysin Mediates the Induction of Apoptosis in Breast Cancer Cells via the Inhibition of the WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway*, in *Preprints*. 2023, Preprints.
- [312] **Jafari, S., et al.**, *Synergistic effect of chrysin and radiotherapy against triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines*. Clinical and Translational Oncology, 2023. 25(8): p. 2559-2568.
- [313] **Xu, Y., et al.**, *Chrysin induces cell growth arrest, apoptosis, and ER stress and inhibits the activation of STAT3 through the generation of ROS in bladder cancer cells*. Oncol Lett, 2018. 15(6): p. 9117-9125.
- [314] **He, Y., et al.**, *Chrysin induces autophagy through the inactivation of the ROS-mediated Akt/mTOR signaling pathway in endometrial cancer*. Int J Mol Med, 2021. 48(3): p. 172.
- [315] **Lin, Y.-M., et al.**, *Chrysin Attenuates Cell Viability of Human Colorectal Cancer Cells through Autophagy Induction Unlike 5-Fluorouracil/Oxaliplatin*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. 19(6): p. 1763.
- [316] **Zhao, X.-C., et al.**, *Induction of apoptosis by 5,7-dihydroxy-8-nitrochrysin in breast cancer cells: The role of reactive oxygen species and Akt*. Int J Oncol, 2010. 37(5): p. 1345-1352.

- [317] **Gnanasekar, S., et al.**, *Chrysin-Anchored Silver and Gold Nanoparticle-Reduced Graphene Oxide Composites for Breast Cancer Therapy*. ACS Applied Nano Materials, 2020. 3(5): p. 4574-4585.
- [318] **Nakamura, H. & K. Takada**, *Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions*. Cancer Sci, 2021. 112(10): p. 3945-3952.
- [319] **Bae, J.-H., et al.**, *Quercetin enhances susceptibility to NK cell-mediated lysis of tumor cells through induction of NKG2D ligands and suppression of HSP70*. Journal of Immunotherapy, 2010. 33(4): p. 391-401.
- [320] **Lindqvist, C., et al.**, *Potentiation of natural killer cell activity with myricetin*. Anticancer Research, 2014. 34(8): p. 3975-3979.
- [321] **Aung Myo Oo, M.N.M.N., Ohn Mar Lwin, Nordin Simbak, Liyana Hazwani Mohd Adnan, Uthakar S Mahadeva Rao**, *Immunomodulatory effects of apigenin, luteolin, and quercetin through natural killer cell cytokine secretion*. Vol. Volume: 12. 2022: Issue: 9. 121-126.
- [322] **Yahfoufi, N., et al.**, *The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols*. Nutrients, 2018. 10(11).
- [323] **Almishri, W., et al.**, *TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2*. J Innate Immun, 2016. 8(6): p. 617-629.
- [324] **Ida, H., et al.**, *Granzyme B and natural killer (NK) cell death*. Mod Rheumatol, 2005. 15(5): p. 315-22.
- [325] **Yim, C.-Y., et al.**, *Nitric oxide synthesis contributes to IL-2-induced antitumor responses against intraperitoneal Meth A tumor*. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1995. 155(9): p. 4382-4390.
- [326] **Orucevic, A. & P.K. Lala**, *Effects of NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester, an Inhibitor of Nitric Oxide Synthesis, on IL-2-Induced LAK Cell Generation in Vivo and in Vitro in Healthy and Tumor-Bearing Mice*. Cellular immunology, 1996. 169(1): p. 125-132.
- [327] **Diefenbach, A., et al.**, *Type 1 interferon (IFN $\alpha/\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite*. Immunity, 1998. 8(1): p. 77-87.
- [328] **Sun, P.D.**, *Structure and function of natural-killer-cell receptors*. Immunol Res, 2003. 27(2-3): p. 539-48.
- [329] **Van Acker, H.H., et al.**, *CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?* Front Immunol, 2017. 8: p. 892.
- [330] **Feng, Y.-B., et al.**, *Immunopotential effects of apigenin on NK cell proliferation and killing pancreatic cancer cells*. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2023. 37: p. 03946320231161174.
- [331] **Han, R., et al.**, *Effect of total flavonoids from the seeds of Astragali complanati on natural killer cell function*. J Ethnopharmacol, 2015. 173: p. 157-65.
- [332] **Lesinski, G.B., et al.**, *Consumption of soy isoflavone enriched bread in men with prostate cancer is associated with reduced proinflammatory cytokines and immunosuppressive cells*. Cancer Prev Res (Phila), 2015. 8(11): p. 1036-44.
- [333] **Li, Y., et al.**, *Antioxidant Small Molecule Compound Chrysin Promotes the Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells*. Frontiers in Pharmacology, 2020. 11.
- [334] **Korichneva, I.L., et al.**, *Interleukin-2- and phytohemagglutinin-activated proliferation of human T-lymphocytes is accompanied by stimulation of phosphoinositide turnover*. Biochim Biophys Acta, 1989. 1014(2): p. 173-7.

- [335] **Kaewthawee, N. &S. Brimson**, *The effects of ursolic acid on cytokine production via the MAPK pathways in leukemic T-cells*. Excli j, 2013. 12: p. 102-14.
- [336] **Zheng, M., et al.**, *Curcumin induces apoptotic cell death of activated human CD4+ T cells via increasing endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction*. Int Immunopharmacol, 2013. 15(3): p. 517-23.
- [337] **Rong, W., et al.**, *Chrysin inhibits hepatocellular carcinoma progression through suppressing programmed death ligand 1 expression*. Phytomedicine, 2022. 95: p. 153867.
- [338] **Lu, R., et al.**, *Chrysin enhances antitumour immunity response through the IL-12-STAT4 signal pathway in the B16F10 melanoma mouse model*. Scandinavian Journal of Immunology, 2022. 96(2): p. e13177.
- [339] **Hougee, S., et al.**, *Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages*. Biochemical Pharmacology, 2005. 69(2): p. 241-248.
- [340] **Fernando, M.R., et al.**, *The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages*. PLoS One, 2014. 9(4): p. e94188.
- [341] **Orecchioni, M., et al.**, *Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages*. Front Immunol, 2019. 10: p. 1084.
- [342] **Sonowal, H. &K.V. Ramana**, *2'-Hydroxyflavanone prevents LPS-induced inflammatory response and cytotoxicity in murine macrophages*. Toxicol In Vitro, 2020. 69: p. 104966.
- [343] **Lin, H.-C. &J.-Y. Lin**, *M1 Polarization but Anti-LPS-Induced Inflammation and Anti-MCF-7 Breast Cancer Cell Growth Effects of Five Selected Polysaccharides*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020. 2020(1): p. 9450246.
- [344] **Han, J., et al.**, *Dynamic polarization of tumor-associated macrophages and their interaction with intratumoral T cells in an inflamed tumor microenvironment: from mechanistic insights to therapeutic opportunities*. Front Immunol, 2023. 14: p. 1160340.
- [345] **Tsai, C.F., et al.**, *Regulatory Effects of Quercetin on M1/M2 Macrophage Polarization and Oxidative/Antioxidative Balance*. Nutrients, 2021. 14(1).
- [346] **Almatroudi, A., et al.**, *Effects and Mechanisms of Kaempferol in the Management of Cancers through Modulation of Inflammation and Signal Transduction Pathways*. Int J Mol Sci, 2023. 24(10).
- [347] **Salmiheimo, A.N.E., et al.**, *Increasing the Inflammatory Competence of Macrophages with IL-6 or with Combination of IL-4 and LPS Restrains the Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells*. Journal of Cancer, 2016. 7(1): p. 42-49.
- [348] **Feng, X., et al.**, *A novel chrysin thiazole derivative polarizes macrophages to an M1 phenotype via targeting TLR4*. Int Immunopharmacol, 2020. 88: p. 106986.
- [349] **Fan, H., et al.**, *Phyllolobium chinense Fisch Flavonoids (PCFF) Suppresses the M1 Polarization of LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages by Inhibiting NF-κB/iNOS Signaling Pathway*. Frontiers in Pharmacology, 2020. 11.

- [350] **Sassi, A., et al.**, *Immunomodulatory potential of hesperetin and chrysin through the cellular and humoral response*. European Journal of Pharmacology, 2017. 812: p. 91-96.
- [351] **Jang, J.-Y., et al.**, *Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization*. BMC Cancer, 2013. 13(1): p. 421.
- [352] **Focaccetti, C., et al.**, *Polyphenols as Immunomodulatory Compounds in the Tumor Microenvironment: Friends or Foes?* International Journal of Molecular Sciences, 2019. 20(7): p. 1714.
- [353] **Wang, J., et al.**, *Jab1 is a target of EGFR signaling in ER $\alpha$ -negative breast cancer*. Breast cancer research, 2008. 10: p. 1-11.
- [354] **Chen, M., et al.**, *Insulin and epithelial growth factor (EGF) promote programmed death ligand 1(PD-L1) production and transport in colon cancer stem cells*. BMC Cancer, 2019. 19(1): p. 153.
- [355] **Manupati, K., et al.**, *Inhibiting epidermal growth factor receptor signalling potentiates mesenchymal–epithelial transition of breast cancer stem cells and their responsiveness to anticancer drugs*. The FEBS Journal, 2017. 284(12): p. 1830-1854.
- [356] **Corkery, B., et al.**, *Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer*. Annals of Oncology, 2009. 20(5): p. 862-867.
- [357] **Garbar, C., et al.**, *Chemotherapy treatment induces an increase of autophagy in the luminal breast cancer cell MCF7, but not in the triple-negative MDA-MB231*. Scientific Reports, 2017. 7(1): p. 7201.
- [358] **Lin, H., et al.**, *Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression*. J Clin Invest, 2018. 128(2): p. 805-815.
- [359] **Tang, H., et al.**, *PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression*. J Clin Invest, 2018. 128(2): p. 580-588.
- [360] **Kim, H.R., et al.**, *PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients*. Scientific Reports, 2016. 6(1): p. 36956.
- [361] **Chen, L. & X. Han**, *Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future*. J Clin Invest, 2015. 125(9): p. 3384-91.
- [362] **Twomey, J.D. & B. Zhang**, *Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics*. Aaps j, 2021. 23(2): p. 39.
- [363] **Martins, F., et al.**, *Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance*. Nature reviews Clinical oncology, 2019. 16(9): p. 563-580.
- [364] **Ri, M.H., J. Ma, & X. Jin**, *Development of natural products for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy against cancer*. Journal of Ethnopharmacology, 2021. 281: p. 114370.
- [365] **Bahrami, A., et al.**, *Modulation of regulatory T cells by natural products in cancer*. Cancer Lett, 2019. 459: p. 72-85.
- [366] **Kepp, O., et al.**, *Anticancer activity of cardiac glycosides: At the frontier between cell-autonomous and immunological effects*. Oncoimmunology, 2012. 1(9): p. 1640-1642.

- [367] **Grudzien, M. &A. Rapak**, *Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation*. J Immunol Res, 2018. 2018: p. 4868417.
- [368] **Schnekenburger, M., M. Dicato, & M.F. Diederich**, *Anticancer potential of naturally occurring immunoepigenetic modulators: A promising avenue?* Cancer, 2019. 125(10): p. 1612-1628.
- [369] **Thilakarathna, S.H. &H.P. Rupasinghe**, *Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement*. Nutrients, 2013. 5(9): p. 3367-87.
- [370] **Li, T.F., et al.**, *Chrysin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway*. Neurochem Int, 2019. 129: p. 104496.
- [371] **Manning, B.D. &A. Toker**, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. 169(3): p. 381-405.
- [372] **Panwar, V., et al.**, *Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023. 8(1): p. 375.
- [373] **Dirimanov, S. &P. Högger**, *Screening of Inhibitory Effects of Polyphenols on Akt-Phosphorylation in Endothelial Cells and Determination of Structure-Activity Features*. Biomolecules, 2019. 9(6).
- [374] **Zughaibi, T.A., et al.**, *Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway by Different Flavonoids: A Cancer Chemopreventive Approach*. Int J Mol Sci, 2021. 22(22).
- [375] **Caforio, M., et al.**, *PI3K/Akt Pathway: The Indestructible Role of a Vintage Target as a Support to the Most Recent Immunotherapeutic Approaches*. Cancers (Basel), 2021. 13(16).

## **EKLER**

**EK A:** ETİK KURUL KARAR BELGESİ

**EK B:** TABLO A.1



## EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.11.2022-84499



T.C.  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Teknoloji Transfer Ofisi  
Etik Kurullar Birimi

Sayı : E-54022451-050.05.04-84499  
Konu : 2021/379 Etik Kurul Kararı

09.11.2022

Sayın Prof.Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

İlgi : E-54022451-050.05.04-42857.pdf

2021/379 numaralı "Krisinin İmmunmodulator Etki Yoluyla Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Olan Anti -Tümör Etkisinin Araştırılması" başlıklı başvurunuz Üniversitemiz Etik Kurullar Birimi' nin 30.11.2021 tarihli, 25 sayılı Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş olup, mevcudun oybirliğiyle onaylanmasına karar verilmiştir.

Gereğini ve bilgilerinizi arz/rica ederim.

Sorumlu Araştırmacı;  
Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

Yardımcı Araştırmacılar;  
Araş. Gör. Ezgi DURMUŞ  
Araş. Gör. Zeynep ÖZMAN

Prof.Dr. İsmail MERAL  
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik  
Kurulu Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu :BSP47U9HL4 Pin Kodu :49852 Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSP47U9HL4&eS=84499>  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi)  
Fatih/İstanbul Bilgi için: Zübeyde ÖZDEMİR  
Telefon No:0 (212) 523 22 88 Faks No:0 (212) 533 23 36 Unvan: Sorumlu  
e-Posta:info@bezmialem.edu.tr İnternet Adresi:www.bezmialem.edu.tr



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



## EK B: TABLO

**Tablo A1:** Kullanılan kimyasalların listesi

| Kimyasal Adı                           | Marka         | Kullanım Amacı                                                                   |
|----------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Sodyum Klorür (NaCl)                   | Sigma-Aldrich | Tüm bu kimyasallar genel laboratuvar solüsyon ve tamponları için kullanılmıştır. |
| Potasyum Klorür (KCl)                  | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| Tris HCl                               | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| Tris Baz                               | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| Etil Alkol                             | Merck         | Sterilizasyon için kullanılmıştır.                                               |
| Metil Alkol                            | Merck         | Westernblot deneylerinde membran nötralizasyonu için kullanılmıştır.             |
| Fetal Sığır Serum                      | Gibco         | Genel hücre kültürü çalışmaları için kullanılmışlardır.                          |
| Penisilin/Streptomisin                 | Gibco         |                                                                                  |
| F12K Medyum                            | Gibco         |                                                                                  |
| DMEM HG medyum                         | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| RPMI medyum                            | PanBiotech    |                                                                                  |
| Alfa-MEM medyum                        | Gibco         | Flavonoid etken madde olarak kullanılmıştır.                                     |
| Tripsin-EDTA                           | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| L- Glutamin                            | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| Dondurma Medyum                        | ABM           |                                                                                  |
| Horse Serum                            | Sigma-Aldrich |                                                                                  |
| Krisin                                 | Sigma-Aldrich | T hücrelerinin stimülasyonu için kullanılmıştır                                  |
| Fitoaglutinin-M (PHA-M)                | Gibco         |                                                                                  |
| Rekombinant İnsan EGF                  | Peptotech     | Hücre içi reaktif oksijen türlerinin ölçümü için kullanılmıştır.                 |
| İnsan IL-2 rekombinant protein         | Gibco         | NK-92 hücre stimülasyonu için kullanılmıştır.                                    |

**Tablo A1 (devamı):** Kullanılan kimyasalların listesi

| Kimyasal Adı                                                           | Marka                     | Kullanım Amacı                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD274 (PD-L1, B7-H1) Monoklonal Antikor (MIH1)                         | eBioscience               | Kanser hücrelerindeki PD-L1 protein ekspresyonunu tespit etmek için kullanılmıştır.                  |
| p-akt1 Monoklonal Antikor (Ser473),                                    | Elabscience, E-AB-51038   | Kanser hücrelerindeki p-akt protein ekspresyonunu tespit etmek için kullanılmıştır.                  |
| p-mTOR Monoklonal antikor (Ser2448)                                    | Cell Signaling, #2971     | Kanser hücrelerindeki p-mtor protein ekspresyonunu tespit etmek için kullanılmıştır.                 |
| Kaspaz-3 Monoklonal antikor                                            | Cell Signaling, #9662     | İmmünfloresan Boyama ile apoptotik etki tayininde kullanılmıştır.                                    |
| FITC anti-fare CD3 Antikor                                             | Biolegend, #100203        | Akış sitometri testinde negatif işaretleyici olarak kullanılmıştır.                                  |
| PE Anti-İnsan CD56/NCAM Antikor (5.1H11)                               | Elabscience               | Akış sitometri testinde pozitif işaretleyici olarak kullanılmıştır.                                  |
| Anti-fare IgG, HRP-bağlı sekonder antikor                              | Cell signaling technology | Westernblot deneylerinde sekonder antikor olarak kullanılmıştır.                                     |
| Anti-tavşan IgG, HRP-bağlı sekonder antikor                            | Cell signaling technology | Westernblot deneylerinde sekonder antikor olarak kullanılmıştır.                                     |
| Alexa Fluor® 488 Donkey anti-rabbit IgG (minimal x-reactivity) Antikor | Biolegend, 406416         | IF boyama deneylerinde primer antikora bağlanan floresan işaretleyici antikor olarak kullanılmıştır. |
| Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse IgG (minimal x-reactivity) Antibody   | Biolegend, 405319         | IF boyama deneylerinde primer antikora bağlanan floresan işaretleyici antikor olarak kullanılmıştır. |
| DAPI                                                                   | ThermoFisher Scientific   | İF boyama deneylerinde çekirdek boyası olarak kullanılmıştır.                                        |
| Clarity Western ECL Substrate, 500 ml                                  | Biorad                    | Westernblot deneylerinde membrandaki proteinlerin görüntülenmesi için kullanılmıştır.                |
| Modifiye Griess Reaktifi                                               | Sigma-Aldrich             | NO ölçümü için kullanılmıştır.                                                                       |
| Akridin turuncusu                                                      | Sigma-Aldrich             | Apoptoz testleri için kullanılmıştır.                                                                |
| Etidyum Bromür                                                         | Sigma-Aldrich             | Apoptoz ve DNA Hasarı görüntülenmesi için kullanılmıştır.                                            |
| Mini-PROTEAN Precast Jel                                               | Biorad                    | Westernblotta proteinlerin jelde yürütülmesinde kullanılmıştır.                                      |

**Tablo A1 (devamı):** Kullanılan kimyasalların listesi

| Kimyasal Adı                         | Marka            | Kullanım Amacı                                 |
|--------------------------------------|------------------|------------------------------------------------|
| Dimetil Sülfoksit (DMSO)             | Sigma-Aldrich    | Etken madde hazırlığında kullanılmıştır        |
| Blotting-Grade Blocker               | Biorad           | Western-blot deneylerinde kullanılmıştır       |
| Triton-X                             | Sigma-Aldrich    | TBST- tampon hazırlığında kullanılmıştır       |
| Sodyum Hidroksit (NaOH)              | Sigma-Aldrich    | Tamponların pH ayarlamasında kullanılmıştır.   |
| HCl                                  | Sigma-Aldrich    | Tamponların pH ayarlamasında kullanılmıştır.   |
| RIPA Tampon Kokteyli                 | Santa Cruz       | Hücre lizisi için kullanılır.                  |
| Bradford Reaktifi (Thermoscientific) | BioRad           | Protein ölçümü için kullanılır.                |
| Laemlli Sample Buffer (4x)           | Biorad           | Western Blotta örnek yüklerken kullanılmıştır. |
| Protein Ladder                       | ThermoScientific | Western blotta standart olarak kullanılmıştır. |

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Ezgi BALKAN

**Doğum Tarihi ve Yeri** :

**E-posta** :

## ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, ODTÜ/Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji
- **Yüksek Lisans** : 2018, ODTÜ/Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyokimya

## MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2017-Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

## DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Durmus, E.**, Ozman, Z., Ceyran, İ. H., Pasin, Ö., & Kocyigit, A., (2024). Chrysin Enhances Anti-cancer Activity of Jurkat T Cell and NK-92 Cells Against Human Breast Cancer Cell Lines.. Chemistry & Biodiversity .
- Krisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerine Olan İmmün Sistem Aracılı Sitotoksik Yanıt Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, **Durmuş E.**, Özman Z., Ceyran İ. H., Koçyiğit A., 26. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 11-13 Kasım 2023, ss.21
- Chrysin Modulates Apoptotic Effects of LPS-Induced RAW 264.7 Macrophage in MCF-7 Breast Cancer Cells **DURMUŞ E.**, ÖZMAN Z., KOÇYİĞİT A. International Conference of Biochemists and Molecular Biologists in Bosnia and Herzegovina - ABMBBIH,Sarajevo, Bosna-Hersek, 18 - 20 Mayıs 2023

## DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Yenigun, V. B., Kocyigit, A., Kanımdan, E., **Balkan, E.**, & Gul, A. Z. (2024). Copper (II) Increases Anti-Proliferative Activity of Thymoquinone in Colon Cancer Cells by Increasing Genotoxic, Apoptotic, and Reactive Oxygen Species Generating Effects. Toxicon, 108103.
- Kocyigit, A., Kanımdan, E., Yenigun, V. B., Ozman, Z., Balıbey, F. B., **Durmuş, E.**, ... Yasar, O. (2024). Olive Leaf Extract Downregulates the Protein

Expression of Key SARS-CoV-2 Entry Enzyme ACE-2, TMPRSS2, and Furin.. Chemistry & biodiversity.

- Propolis Enhances 5-Fluorouracil Mediated Antitumor Efficacy and Reduces Side Effects in Colorectal Cancer: An in Vitro and in Vivo Study, Kocyigit A., Guler E. M., **Durmuş E.**, Yenigun V. B., Kanımdan E., Ozman Z., Yasar O., Goren A. C., Hekimoglu R., E., Oruc H. H., et al.CHEMISTRY & BIODIVERSITY, cilt.20, sa.9, 2023 (SCI-Expanded)
- Effects of Bioactive Pulp-capping Materials on Cell Viability, Differentiation, and Mineralization Behaviors of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro. Gungor A. S., **Durmus E.**, Kurt B., Kocyigit A., Dalkilic E., Arisu H. D. Operative dentistry, cilt.48, ss.317-328, 2023 (SCI-Expanded)
- Cognition and BDNF levels in prediabetes and diabetes: A mediation analysis of a cross-sectional study Sümbül Şekerci B., Şekerci A., Pasin Ö., **Durmuş E.**, Yuksel-Salduz Z. İ. FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY, cilt.14, 2023 (SCI-Expanded)
- Circulating furin, IL-6, and presepsin levels and disease severity in SARS-CoV-2-infected patients. Kocyigit A., Sogut O., **Durmus E.**, Kanımdan E., Guler E. M., Kaplan O., Yenigun V. B., Eren C., Ozman Z., Yasar O. Science progress, cilt.104, 2021 (SCI-Expanded)
- Quercus pyrenaica Honeydew Honey With High Phenolic Contents Cause DNA Damage, Apoptosis, and Cell Death Through Generation of Reactive Oxygen Species in Gastric Adenocarcinoma Cells KOÇYİĞİT A., Aydogdu G., **BALKAN E.**, Yenigun V. B., GÜLER E. M., BULUT H., KÖKTAŞOĞLU F., Goeren A. C., Atayoglu A. T. INTEGRATIVE CANCER THERAPIES, cilt.18, 2019 (SCI-Expanded)
- Induction of Apoptosis through Oxidative Stress Caused by Rubus tereticaulis Leaves Extracts in A549 Cells Öter G. N., **Durmuş E.**, Şen A., Koçyiğit A., European Journal of Biology, cilt.83, sa.1, ss.50-59, 2024 (Hakemli Dergi)
- Hedera helix (Wall Ivy) leaf ethanol extract shows cytotoxic and apoptotic effects in glioblastoma cells by generating reactive oxygen species Yenigün V. B., Koçyiğit A., Kanımdan E., **Durmuş E.**, Köktaşoğlu F., Acta Medica, cilt.54, sa.4, ss.295-303, 2023 (Hakemli Dergi)
- Cuscuta Campestris Tedavisi İle Mide Kanseri Hücrelerinde Apoptozun İndüklenmesi Ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu Yoluyla Proliferasyonun Engellenmesi BULUT H., **DURMUS E.**, HACIOSMANOĞLU E., BOZALI K., SENTÜRK H., KOCYIGIT A. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi, cilt.54, sa.2, ss.271-280, 2021 (Hakemli Dergi)
- Rheum ribes L.'nin etanol ekstraktlarının malign melanomahücreleri üzerine anti-kanser etkinliği KİRMİT A., TAKIM K., **BALKAN E.**, GÜLER E. M., YENİGÜN V. B., BULUT H., KOÇYİĞİT A. Journal of Health Sciences and Medicine, cilt.3, sa.2, ss.148-152, 2020 (Hakemli Dergi)
- Role of Propolis in Cancer Chemoprevention KOÇYİĞİT A., **DURMUŞ E.**, ÖZMAN Z.3.International Food Chemistry Congress, Antalya, Türkiye, 28 Şubat - 03 Mart 2024
- Verbascum sinuatum extract induces cell death in K7M2 osteosarcoma cells by its immunomodulatory effect on LPS-stimulated RAW 264.7 cells ÖZMAN Z., **DURMUŞ E.**, BAŞARICI M. T., KOÇYİĞİT A.,International Conference of Biochemists and Molecular Biologists in Bosnia and Herzegovina - ABMBBIH, Sarajevo, Bosna-Hersek, 18 Mayıs 2023, ss.60

- Püren Ve Manuka Ballarının Mide Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması Özman Z., Babalı Balıbey F., **Durmuş E.**, Koçyiğit A. Uluslararası Biyokimya Kongresi 2022 // 33. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, Türkiye, 26 - 30 Ekim 2022, cilt.47,ss.137
- Propolisin Kolorektal Kanserde 5-Fluorourasilin Etkinliğini Artırması Ve Yan Etkilerini Düşürmesi Üzerine Olan In Vitro Ve In Vivo Bir Çalışma **Durmuş E.**, Güler E. M., Yenigün V. B., Özman Z., Kanimdan E., Koçyiğit A., Uluslararası Biyokimya Kongresi 2022 / 33. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, Türkiye, 26 - 30 Ekim 2022, Cilt.47, Ss.101-102
- Verbascum Siniatum Ekstraktının Osteosarkom Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi ÖZMAN Z., BAŞARICI M. T., **DURMUŞ E.**, KOÇYİĞİT A., Beslenme ve Metabolizma Sempozyumu, İstanbul, Türkiye, 16 Aralık 2022,
- Kırmızı Kantaronun Etanolik Ekstresi ve İnfüzyonunun Fitokimyasal Özelliklerinin Karşılaştırılması ve Mide Kanseri Üzerindeki Anti-Kanser Etkisinin Değerlendirilmesi **Durmuş E.**, Koçyiğit A. Beslenme ve Metabolizma Sempozyumu, İstanbul, Türkiye, 16 Mart 2023
- Investigation of Ganoderma Resinaceum's Cytotoxic, Genotoxic, Apoptotic and Autophagic Effects on Gastric Adenocarcinoma Cells Kaymakcı M. A., GÜLER E. M., **BALKAN E.**, KOÇYİĞİT A. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi 14 Mart Bilimsellik Komitesi, İstanbul, Türkiye, 14 Mart 2019
- Işkin Kökü Ekstresinin Malign Melanom Hücreleri Üzerine Anti-Kanser Etkisinin Araştırılması Kirit A., Koçyiğit A., Takim K., Yenigün V. B., Bulut H., Güler E. M., **Balkan E.** 2. Uluslararası Gap Matematik - Mühendislik - Fen Vesağlık Bilimleri Kongresi, Şanlıurfa, Türkiye, 4 - 07 Ekim 2018, ss.118-123
- Quercus Pyrenaica Honeydew Honey Induces DNA Damage, Apoptosis and Cell Death Through Generation of Reactive Oxygen Species in Gastric Cancer Cells KOÇYİĞİT A., Aydoğdu G., **BALKAN E.**, YENİGÜN V. B., DEDEKAYOĞULLARI H., GÜLER E. M.,
- KÖKTAŞOĞLU F. 20th ISANH International Conference on Oxidative Stress, Redox Homeostasis Antioxidants - Paris Redox 2018, Paris, Fransa, 25 - 26 Haziran 2018
- In Vitro Antioxidant and Anticancer Activities of Some Local Plants from Bolu Province of Turkey Kasapoğlu K. N., KOÇYİĞİT A., YENİGÜN V. B., **BALKAN E.**, Demircan E., Karbancıoğlu-Güler F., Özçelik B. 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Kayseri, Türkiye, 08 Kasım 2017, cilt.1, sa.10, ss.1063
- **E. Durmuş**, Koçyiğit A., Adalı O., Plant Phenolic Oleuropein Inhibits HT-29 Colon Cancer Cell Proliferation Through DNA Damage, ROS Generation and Downregulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes, 44nd FEBS Congress, From Molecules to Living Systems, Krakow, Poland, July 2019.