

Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS TEZİ**;
Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi kalacak

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**POLİFENOLİK BİLEŞENLERİN HORMON POZİTİF VE
NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
MİGRASYON İLİŞKİLİ JAM-A, LFA-1 VE VLA-4 GEN
EKSPRESYONLARINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÜLÇİN ÖZKARA

**DANIŞMAN
PROF.DR.HÜLYA YILMAZ-AYDOĞAN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Gülçin ÖZKARA** tarafından **Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN**'ın danışmanlığında hazırlanan "**Polifenolik Bileşenlerin Hormon Pozitif ve Negatif Meme Kanseri Hücre Hatlarında Migrasyon İlişkili Jam A, LFA-I ve VLA-4 Gen Ekspresyonlarına Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 04/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Murat YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri (Danışman)

Prof. Dr. Hülya YILMAZ
AYDOĞAN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Murat KARTAL
Bezmialem V. Üni. Ecz. Fak.
Farmakognozi A.D.

Jüri

Doç. Dr. Tülin ÖZTÜRK
İ.Ü. Cerrahpaşa CTF Patoloji
A.D.

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 olmadığı beyan ederim.

Gülçin Özkara

İTHAF

Sevgili eşime ve kızıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylın'a,

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda benden desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan'a,

Tez çalışmam süresince değerli fikirleri ve yönlendirmeleriyle tez çalışmama her konuda destek olan saygıdeğer hocam Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuz Öztürk'e,

Yardımları ve destekleri için anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu'na, Prof. Dr. Ş. Ümit Zeybek'e, Prof. Dr. H. Arzu Ergen'e ve tüm Moleküler Tıp ABD kadrosuna,

Tez çalışmamın tamamlanmasında büyük emekleri olan anabilim dalımızdaki öğrenci arkadaşlarım M.Sc.Begüm Ceviz başta olmak üzere M.Sc. Gonca Candan'a, PhD. Allison Pınar Eronat'a, M.Sc. Funda Pehlivan'a, Dr. Fidan Malikova'ya, B.Sc. Çağatay Aydoğan'a, M.Sc. İncilay Çelik'e,

Her konuda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşime ve aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27649

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XXİ
ABSTRACT.....	XXİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MEME EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ VE ANATOMİSİ	3
2.2. MEME KANSERİ	4
2.2.1. Etiyoloji.....	4
2.2.2. Patogenez ve Sınıflandırma	7
2.3. ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE KANSER METASTAZINDAKİ ROLLERİ	11
2.3.1. Selektinler	11
2.3.2. Kaderinler.....	12
2.3.3. İmmünoglobulin Süper Ailesi (IgSF)	13
2.3.4. İntegrinler.....	14
2.3.5. Diğer Adezyon Molekülleri	17
2.4. HÜCRELER ARASI BAĞLANTILAR VE KANSER METASTAZINDAKİ ROLLERİ.....	18
2.4.1. Desmozomlar	18
2.4.2. Adherens Bağlantılar (Adherens Junctions)	19
2.4.3. Sıkı Bağlantılar (Tight Junctions).....	19
2.4.3.1. Junctional Adhesion Molecule (Jam).....	20
2.5. METASTAZ	21
2.5.1. Lokal İnvazyon	21
2.5.2. İntravazasyon	23

2.5.3. Dolaşımda Sağkalım ve İlgili Organda Durma.....	24
2.5.4. Ekstravazasyon (Transendotelial Migrasyon, Tümör Hücreleri Diapedezi)	25
2.5.5. Mikrometastaz Oluşumu	27
2.5.6. Metastatik Koloni Oluşumu	28
2.6. FENOLİK BİLEŞENLER	28
2.6.1. Fenolik Asitler-Hidroksisünamik ve hidroksibenzoik asitler	29
2.6.2. Flavonidler	30
2.7. FENOLİK BİLEŞENLERİN KANSER VE METASTAZDAKİ ROLLERİ.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Kullanılan Cihazlar	35
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	35
3.3. Mediumların ve Deneyde Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması	35
3.3.1. MCF-10A Hücre Hattı için %10'luk DMEM/F12 Mediumu (Bullet).....	35
3.3.2. MCF-7 Hücre Hattı için %10'luk DMEM Mediumu Hazırlığı	35
3.3.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı için %10'luk DMEM/F12 Mediumu.....	36
3.3.4. Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) Çözeltisi Hazırlığı.....	36
3.3.5. Polifenolik Bileşenlerden Oluşan Kokteylin Hazırlanması	36
3.4. Hücrelerin Çoğaltılması	36
3.4.1. Hücre Ekimi	36
3.4.2. Hücrelerin Kaldırılması ve Sayılması	36
3.5. Hücrelerin Dozlanması ve WST-1 ile Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi.....	37
3.6. RNA İzolasyonu (Exiqon miRCURY™ RNA izolasyon kiti (Cell&Plant), kat# 584382)	37
3.7. cDNA Çevrimi (iScript™ cDNA Sentez Kiti, kat# 1708890, Bio-Rad).....	38
3.8. Real-Time PCR ile Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	38
3.9. Yara iyileşmesi (Scratch) testi ile hücre migrasyonunun belirlenmesi.....	39
3.10. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Hücre Canlılığı WST-1 Deneyi Bulguları	41
4.1.1. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi	41
4.1.2. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi.....	42

4.1.3. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi.....	43
4.2. Polifenolik Kokteylin Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi (Real-Time PCR Sonuçları).....	45
4.2.1. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Hücrelerinde Jam-A Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi	45
4.2.2. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Hücrelerinde LFA-1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi	46
4.2.3. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Hücrelerinde VLA-4 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi	47
4.2.4. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Hücrelerinde Jam-A Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	47
4.2.5. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Hücrelerinde LFA-1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	49
4.2.6. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Hücrelerinde VLA-4 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	50
4.2.7. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücrelerinde Jam-A Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	51
4.2.8. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücrelerinde LFA-1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	53
4.2.9. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücrelerinde VLA-4 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	54
4.2.10. Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A genindeki rölatif ekspresyonun karşılaştırılması.....	55
4.2.11. Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde LFA-1 genindeki rölatif ekspresyonun karşılaştırılması.....	56
4.2.12. Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VLA-4 genindeki rölatif ekspresyonun karşılaştırılması	57
4.3. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	58
4.4. Polifenolik Kokteylin Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkisi (Scratch Testi Sonuçları).....	61
4.4.1. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri.....	61
4.4.2. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri	63

4.4.3. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri .65	
4.5. Polifenolik Kokteylin Hücre Morfolojisine Etkileri 67	
5. TARTIŞMA 70	
KAYNAKLAR 80	
HAM VERİLER 100	
FORMLAR 101	
ETİK KURUL KARARI 102	
PATENT HAKKI İZNİ 103	
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....104	
ÖZGEÇMİŞ 106	



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Meme kanseri risk faktörleri.....	6
Tablo 2-2: Meme kanseri alt tipleri ve ilgili belirteçler.....	9
Tablo 2-3: Bazı fenolik bileşenler ve bitkisel kaynakları.....	29
Tablo 3-1: cDNA çevrimi için PCR cihazı termal profili.....	38
Tablo 3-2: Gen ekspresyonu için Real-Time PCR cihazı termal profili.....	39
Tablo 4-1: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-7 hücrelerindeki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	42
Tablo 4-2: Polifenolik kokteylin saatlere göre MDA-MB-231 hücrelerindeki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	43
Tablo 4-3: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-10A hücrelerindeki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	44
Tablo 4-4: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 Hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	45
Tablo 4-5: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 Hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	47
Tablo 4-6: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 Hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	48
Tablo 4-7: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 Hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	49
Tablo 4-8: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 Hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	51
Tablo 4-9: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A Hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	52
Tablo 4-10: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A Hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	53
Tablo 4-11: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A Hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	55

Tablo 4-12: MCF-7 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A ve LFA-1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	59
Tablo 4-13: MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	59
Tablo 4-14: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-7 hücrelerindeki anti-migratif etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	62
Tablo 4-15: Polifenolik kokteylin saatlere göre MDA-MB-231 hücrelerindeki anti-migratif etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	64
Tablo 4-16: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-10A hücrelerindeki anti-migratif etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması.....	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meme Anatomisi ve Histolojisi.....	4
Şekil 2-2: Globocan 2018 verilerine göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidans (sol) ve mortalite (sağ) grafikleri.....	5
Şekil 2-3: Meme kanseri hastalarının dağılımı. A: Ailesel meme kanseri dağılımı, B: Meme kanseri riski ile ilişkili genler.....	7
Şekil 2-4: Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve görülme sıklığı.....	9
Şekil 2-5: Meme kanseri hücrelerinin tipleri ile agresiflikleri arasındaki ilişki.....	10
Şekil 2-6: Meme kanseri alt tipi ile meme epiteli hücreleri ilişkisi.....	11
Şekil 2-7A: İntegrin ailesi.....	15
Şekil 2-7B: İntegrin altbirimlerinin yerleşimi.....	15
Şekil 2-8: β 1-integrinler ve meme dokusundaki yerleşimleri.....	16
Şekil 2-9A: İntegrinlerde hücre içinden dışına (inside-out) sinyal iletimi	17
Şekil 2-9B: İntegrinlerde hücre dışından içine (outside-in) sinyal iletimi.....	17
Şekil 2-10: Hücreler arası bağlantılar ve ilgili proteinler.....	20
Şekil 2-11: Metastaz oluşum basamakları.....	21
Şekil 2-12: Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili moleküller ve sinyal yolları.....	23
Şekil 2-13: Tümör anjigenezi ile ilişkili moleküller.....	24
Şekil 2-14: Lökosit ve tümör ekstrasvazasyonunda yer alan moleküller.....	26
Şekil 2-15: Lökosit ve tümör hücresinin endotele tutunması.....	27
Şekil 2-16: Flavonoidler.....	30
Şekil 2-17: Propolisin etkilediği moleküler basamaklar.....	33
Şekil 4-1: Polifenolik kokteylin MCF-7 hücrelerinin canlılığına etkisi.....	41
Şekil 4-2: Polifenolik kokteylin MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkisi.....	43

Şekil 4-3: Polifenolik kokteylin MCF-10A hücrelerinin canlılığına etkisi.....	44
Şekil 4-4: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	46
Şekil 4-5: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	46
Şekil 4-6: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	48
Şekil 4-7: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	50
Şekil 4-8: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	51
Şekil 4-9: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	52
Şekil 4-10: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	54
Şekil 4-11: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi.....	55
Şekil 4-12: %20 PK verilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A geninde 48. saatteki rölatif ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.....	56
Şekil 4-13: %20 PK verilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde LFA-1 geninde 48. saatteki rölatif ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4-14: %20 PK verilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VLA-4 geninde 48. saatteki rölatif ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4-15: MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Ekspresyon Düzeylerinin (ΔCt) Karşılaştırılması.....	60
Şekil 4-16: MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A ve LFA-1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Karşılaştırılması.....	60

Şekil 4-17: MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde VLA-4 Gen Ekspresyon Düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Karşılaştırılması.....	61
Şekil 4-18: Polifenolik Kokteylin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri.....	62
Şekil 4-19: Polifenolik kokteylin MCF-7 hücreleri üzerine anti-migratif etkisinin doz ve saatlere göre karşılaştırılması.....	63
Şekil 4-20: Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri.....	64
Şekil 4-21: Polifenolik kokteylin MDA-MB-231 hücreleri üzerine anti-migratif etkisinin doz ve saatlere göre karşılaştırılması.....	65
Şekil 4-22: Polifenolik Kokteylin MCF-10A Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri.....	66
Şekil 4-23: Polifenolik kokteylin MCF-10A hücreleri üzerine anti-migratif etkisinin doz ve saatlere göre karşılaştırılması.....	67
Şekil 4-24: Polifenolik Kokteylin (%20) 48 saat sonra MCF-7 Hücre Morfolojisine Etkileri.....	68
Şekil 4-25: Polifenolik Kokteylin (%20) 48 saat sonra MDA-MB-231 Hücre Morfolojisine Etkileri.....	68
Şekil 4-26: Polifenolik Kokteylin (%20) 48 saat sonra MCF-10A Hücre Morfolojisine Etkileri.....	69
Şekil 5-1: Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 genlerindeki rölatif ekspresyon değişimlerinin birlikte değerlendirilmesi.....	75
Şekil 5-2: Polifenolik kokteylin anti-migratif etkisinin tüm hücre hatlarında genlerle birlikte gösterilmesi.....	77

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
ECM	Ekstraselüler Matriks
LFA-1(α L β 2, CD11a/CD18, ITGAL)	Lenfosit Fonksiyonu İlişkili Antijen 1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen 1)
Jam	Bağlantı Adezyon Molekülleri (Junctional Adhesion Molecule)
VLA-4 (α 4 β 1, CD49d/CD29, ITGA4)	Çok Geç Antijen-4 (Very Late Antigen-4)
-OH	Hidroksil
ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
HER2 (ERBB2/ HER2/neu), EGFR	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
Globocan	Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory)
Rh	Rhesus Faktör
+	Pozitif
-	Negatif
HR+	Hormon Pozitif
BRCA1	Meme Kanseri Yatkınlık Geni 1 (Breast Cancer Susceptibility Gene 1)
BRCA2	Meme Kanseri Yatkınlık Geni 2 (Breast Cancer Susceptibility Gene 2)

FEA	Flat Epitelyal Atipi
ADH	Atipik Duktal Hiperplazi
DCIS	Duktal Karsinoma İn Situ
IDC	İnvazif Duktal Karsinoma
ILC	İnvazif Lobüler Karsinoma
P53 (TP53)	Tümör Protein 53
MAP3KI	MAP Kinaz Kinaz Kinaz 1
FOXA1	Forkhead Box Proteini A1
FOXM1	Forkhead Box Proteini M1
ESR1	Östrojen Reseptörü 1
XBP1	X-box Bağlayıcı Protein 1 (X-box Binding Protein 1)
p	Kromozomun Kısa Kolu
q	Kromozomun Uzun Kolu
MDM2	Murine Double Minute 2 Geni
ATM	Ataksi Telenjiektazi Geni (Ataxia Telangiectasia Mutated)
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Düzenleme Enzim Katalitik Polipeptid (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Polypeptide-like)
FGFR4	Fibroblast Büyüme Föktörü Reseptörü 4 (Fibroblast Growth Factor Receptor 4)
Rb1	Retinoblastoma Geni 1
IgSF	İmmünoglobulin Süper Ailesi
sLe	Sialyl Lewis
NK	Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer)

Cadherin	Kaderin / Kalsiyuma Bağımlı Adezyon Molekülleri (Calcium Dependent Adherent Protein)
E-kaderin	Epitelyal Kaderin
N-kaderin	Nöronal Kaderin
P-kaderin	Plasental Kaderin
VE-Kaderin	Vasküler Endotelyal Kaderin (Vascular Endothelial Cadherin)
L1-CAM	L1 hücre Adezyon Molekülü (L1 Cell Adhesion Molecule)
N-CAM (CD56)	Nöral Hücre Adezyon Molekülü (Neuronal Cell Adhesion Molecule)
ICAM	Hücreler Arası Adezyon Molekülü (Intercellular Adhesion Molecule)
VCAM	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü (Vascular Cell Adhesion Molecule)
PECAM	Platelet Endotelyal Adezyon Molekülü (Platelet Endothelial Adhesion Molecule)
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
TCR	T hücre Reseptör Kompleksi
MAdCAM-1	Mukozal Addressin Hücre Adezyon Molekülü (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1)
ALCAM	Aktif Lökosit Hücre Adezyon Molekülü (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)
MIDAS	Metal İyon Bağımlı Yapışma Bölgesi (Metal Ion Dependent Adhesion Site)
ADMIDAS	Metal İyon Bağımlı Yapışma Bölgesi (MIDAS)'ne Komşu Bölge (Adjacent to MIDAS)

PSI	Pleksin-Semaforin-İntegrin (Plexin-Sempahorin-Integrin)
FAK	Fokal Adezyon Kinazı (Focal Adhesion Kinase)
ILK	İntegrin Bağlı Kinaz (Integrin Linked Kinase)
GFR	Büyüme Faktörü Reseptörleri
Mac-1 ($\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18)	Makrofaj-1 Antijeni (Macrophage-1 Antigen)
PSGL-1	P-selektin Glikoprotein Ligandı-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1)
PNAd	Periferal Nod Addressin Geni (Peripheral Node Addressin)
VAP-1	Vasküler Adezyon Protein
MUC-1	Müsin 1
EMT	Epitelyal- Mezenkimal Geçiş
DSC1-3	Desmocollin 1-3
DSG1-4	Desmoglein 1-4
PKP1-4	Plakofilin 1-4 (Plakophilin 1-4)
JUP	Plakogloblin
MMP	Matriks Metaloproteinaz Proteinlerini
uPA/uPAR	Proteolitik Ürokinaz-Tip Plazminojen Aktivatör
TGF β	Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor- β)
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
HIF-1	Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1 (Hypoxia Inducible Factor 1)
LOX	Lizil Oksidaz

CXCR	Kemokin Reseptörü (Chemokine Receptor)
Angptl4	Anjiopoetin Benzeri Protein 4 (Angiopoietinlike-4)
TAM	Tümör-İlişkili Makrofajları
IL-4	İnterlökin 4 (Interleukin 4)
PlGF	Plasental Büyüme Faktörü (Placental Growth Factor)
SDF-1	Stomal Kökenli Faktör-1 (Stromal Cell-Derived Factor-1)
MET	Mezenkimal-Epitelyal Dönüşüm
TIMP-2	Matriks Metalloproteinaz 2 Doku İnhibitörü (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2)
PAI	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphated Buffered Saline)
EGCG	Epigallokateşin 3-Gallat (Epigallocatechin Gallate)
CO ₂	Karbondioksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
WST-1	Suda Çözünür Tetrazolyum Tuzu (Water Soluble Tetrazolium Salt-1)
µl	Mikrolitre

ml	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
sn	Saniye
dk	Dakika
h	Saat
RT	Revers Transkripsiyon
ng	Nanogram
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Dnaz, Dnase	Deoksiribonükleaz
GAPDH	Glikoz 6-Fosfat Dehidrojenaz
Ct	Eşik Döngüsü (Cycle Threshold)
Δ Ct	Rölatif Ekspresyon
$\Delta\Delta$ Ct	Kat değişimi (fold change)
PK	Polifenolik kokteyl
Ort.	Ortalama
SD	Standart Sapma

ÖZET

Özkara G. (2019). Polifenolik Bileşenlerin Hormon Pozitif ve Negatif Meme Kanseri Hücre Hatlarında Migrasyon İlişkili Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Gen Ekspresyonlarına Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup dünya çapında kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir ve vakaların %90'ında ölüm nedeni metastazdır. Hücre migrasyonunu yöneten proteinler kanser metastazının ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. İntegrinler ve hücreler arası bağlantılar kanser proliferasyonu ve metastazında çok önemlidir. Polifenolik bileşenlerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkileri önceki çalışmalardan bilinmektedir. Tez projemizde polifenolik bileşenlerden oluşan kokteylin hücre migrasyonuna ve tümör metastazında birlikte etkileşim gösteren VLA-4 (very late antigen-4, $\alpha 4\beta 1$, ITGA4, CD49d/CD29) ve LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1, $\alpha L/\beta 2$, ITGAL, CD11a/CD18) integrinleri ve hücreler arası sıkı bağlantı proteinlerinden biri olan Jam-A (junctional adhesion molecule-A, F11R) genlerinin ekspresyonlarına etkisi ER+ MCF-7, triple-negatif MDA-MB-231 ve fibrokistik meme epiteli hücresi MCF-10A üzerinde araştırılmıştır. Polifenolik kokteylin %20'lik dozunun hücre kültürünün 48. saatinde MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A ekspresyonunda azalmaya ($p < 0,001$), MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde LFA-1 ekspresyonunda artışa ($p < 0,001$), MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VLA-4 ekspresyonunda azalmaya ($p < 0,0001$) neden olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda polifenolik kokteylin çalışmadaki hücre hatlarının herbirinde doz bağımlı şekilde hücre migrasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Polifenolik kokteylin %35'lik doz verilen MDA-MB-231 hücrelerinde hücre migrasyonunun tamamen durduğu gözlenmiştir. Polifenolik kokteylin anti-migratif etkisi MCF-7 hücrelerinde ise daha düşük dozlarda (%10) gerçekleşmiştir. Sonuçlarımız polifenolik bileşenlerin meme kanseri tümör hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin yanında anti-metastatik özelliklerinin de olduğunu ve polifenolik bileşenlerin kanser tedavisinin bir parçası olarak düşünülebileceğini belirtmektedir.

Anahtar Kelimeler: Polifenolik bileşenler, meme kanseri, metastaz, Jam-A, LFA-1, VLA-4

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27646

ABSTRACT

Ozkara G. (2019). Investigating the effect of polyphenolic compounds on gene expression of migration related genes Jam-A, LFA-1 and VLA-4 in hormon positive and negative breast cancer cell lines. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Istanbul.

Breast cancer is the most common type of cancer occurring in the women and leading cause of cancer mortality worldwide. Metastasis is the cause of cancer death in 90% of the cases. Proteins managing the cell migration play role in the occurrence of cancer metastasis. Integrins and cell junctions have crucial importance in cancer proliferation and metastasis. Cytotoxic and apoptotic effects of polyphenolic compounds on cancer cells have been known from the previous studies. In our thesis project, the effect of the cocktail consisting of polyphenolic compounds on the cell migration and gene expression of VLA-4 (very late antigen-4, $\alpha 4\beta 1$, ITGA4, CD49d/CD29) and LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1, $\alpha L/\beta 2$, ITGAL, CD11a/CD18) integrins and Jam-A (junctional adhesion molecule-A, F11R) which is one of the tight junctions, that interact with each other in the tumor metastasis were investigated in ER+ MCF-7, Triple-negative MDA-MB-231 and fibrocystic breast epithelial cell MCF-10A. Polyphenolic cocktail with 20% dose was found to cause a reduction in Jam-A gene expression in MCF-7 ve MCF-10A ($p<0,001$), an increase in LFA-1 gene expression in MDA-MB-231 and MCF-10A ($p<0,001$), a reduction in VLA-4 gene expression in MDA-MB-231 and MCF-10A ($p<0,0001$) cells at 48th hour of cell culture. Moreover, it was determined that polyphenolic cocktail decreased the cell migration in each and every cell in the study. It was observed that cell migration was totally arrested in MDA-MB-231 cells which were treated with 35% polyphenolic cocktail. Anti-migratory effect of the polyphenolic cocktail was occurred with lower doses (10%) in MCF-7 cells. Our results indicate that polyphenolic compounds have anti-metastatic effects in addition to their cytotoxic and apoptotic effects on breast cancer and might be considered as a part of cancer treatment.

Key Words: Polyphenolic compounds, breast cancer, metastasis, Jam-A, LFA-1, VLA-4

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 27646

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında kadınlarda en sık görülen ve kanserden ölüm nedenlerinin başında yer alan meme kanserinde vakaların %90'nının ölüm nedeni metastazdır (McSherry ve ark. 2011; Vazquez ve ark. 2017). Hücre migrasyonunu yöneten proteinler kanser metastazının ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (Zhao ve ark. 2014).

Normal meme kanallarındaki epitelyal hücre polaritesi komşu hücrelerle iletişim sağlayan ve adezyonu kolaylaştıran hücre içi multiprotein adezyon kompleksleriyle sağlanır. Birçok çalışma adezyon moleküllerinin meme kanserinin başlama ve ilerleyişinde anahtar düzenleyiciler olduğunu göstermektedir (McSherry ve ark. 2011). Kanser proliferasyonu ve metastazında önemli olan integrinler tümör mikroçevresinde hücrelerin birbiriyle etkileşimini artırılabilir (Vazquez ve ark. 2017). İntegrinler bir α ve bir β altbirimi içeren 24 farklı heterotrimerik hücre yüzey reseptörü ailesidir. İntegrinler, hücrelerin ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerine veya komşu hücrelerin yüzeyinde eksprese olan ligandlara adezyonunu sağlarlar (Vanderslice ve ark. 2013). Nötrofillerden salınan bir integrin olan LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) (α L/ β 2, CD11a/CD18) lökositlerin intra ve ekstrasvazasyonunu ve transendotelyal göçünü artırır (Vazquez ve ark. 2017).

Epitel ve endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı proteinlerinden biri olan Jam (junctional adhesion molecule) protein ailesi, hücre polaritesi, hücre geçirgenliği, lökosit migrasyonu gibi çeşitli hücreler arası adezif süreçlerde görev alırlar (McSherry ve ark. 2011; Zhao ve ark. 2014). Jam-A, LFA-1'in ligandı olarak erken safha lökosit transmigrasyonunda anahtar rol oynar (Williams ve ark. 1999; Naik ve Eckfeld, 2003). Jam-A gen ifadesi seviyeleri ile meme kanseri hücre göçü arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sonuçları çelişkilidir. Bazı çalışmalarda Jam-A gen ifadesi seviyelerinin meme kanseri hücrelerinde hücre göçü ile ters orantılı olduğu (Naik ve ark. 2008; Wang ve Lui, 2012; Cao ve ark.2014), bazılarında ise gen ifadesindeki artışın metastazı arttırdığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu (McSherry ve ark. 2009 ve 2011) gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda hematopoetik kökenli bir çok hücrede eksprese edilen ve lökosit transendotelyal göçünde ve tümör metastazında önemli bir role sahip olan VLA-4 (very late antigen-4, α 4 β 1, CD49d/CD29)'ün meme kanseri hücrelerinin akciğer, kemik ve beyine metastazlarında anormal ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir (Schlesinger ve Bendas, 2015; Sharma ve ark. 2017). Wang ve arkadaşları tarafından VLA-4'ün

transendotelial migrasyonda LFA-1 ile birlikte hareket ettiği önerilmiştir (Wang ve ark. 2005).

Bitkisel madde kombinasyonları kanser araştırmalarında en çok araştırılan konulardan biridir. Literatürde besinsel kaynakların etkilerini tek bir biyolojik yanıt yerine çeşitli yollardan gösterdikleri ve malign transformasyon sürecinde etkili olabilecekleri belirtilmektedir. Son yıllarda en çok dikkat çeken besin kaynaklı ajanlar arasında yer alan polifenollerin pleiotropik etkileri sayesinde meme dokusunda karsinojenik süreç ile mücadele edebileceği belirtilmiştir (Yang ve ark. 2009; Varinska ve ark. 2015).

Polifenoller, aromatik bir halkaya bağlı birden fazla fonksiyonel hidroksil (-OH) grubu içeren kimyasal bileşikler olup hücreler üzerinde farklı biyolojik etkilere sahiptir (Vermerris ve ark. 2006; Yordi ve ark. 2012). Polifenoller serbest radikalleri uzaklaştırma, çeşitli oksidazların inhibisyonu ve antioksidan enzimlerin uyarılması gibi antioksidan etkileri ile inflamasyon azaltıcı, antialerjik, ateroskleroza ve kansere karşı koruyucu role sahiptir (Nijveldt, 2001).

Daha önceki çalışmalarımızda apigenin, krisin, kateşin gibi polifenolik bileşenlerin MCF7 (ER/PR +, HER2-) (İÜ BAP 6043, İÜ BAP 28301) meme kanseri hücrelerinde tek başına ve birlikte verildiklerinde kanser hücreleri üzerine sitotoksik ve antikanserojenik etkinlikleri tespit edilmiştir. Tez projemiz kapsamında çeşitli polifenolik maddelerden belirlediğimiz kokteylin MCF-7, MDA-MB231 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10A kontrol hücre hatlarında hücre migrasyonu ile ilişkili olduğu düşünölen Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 genlerinin gen ifadelerinde oluşturması beklenen değişimin ve hücreler üzerindeki anti-migratif etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ VE ANATOMİSİ

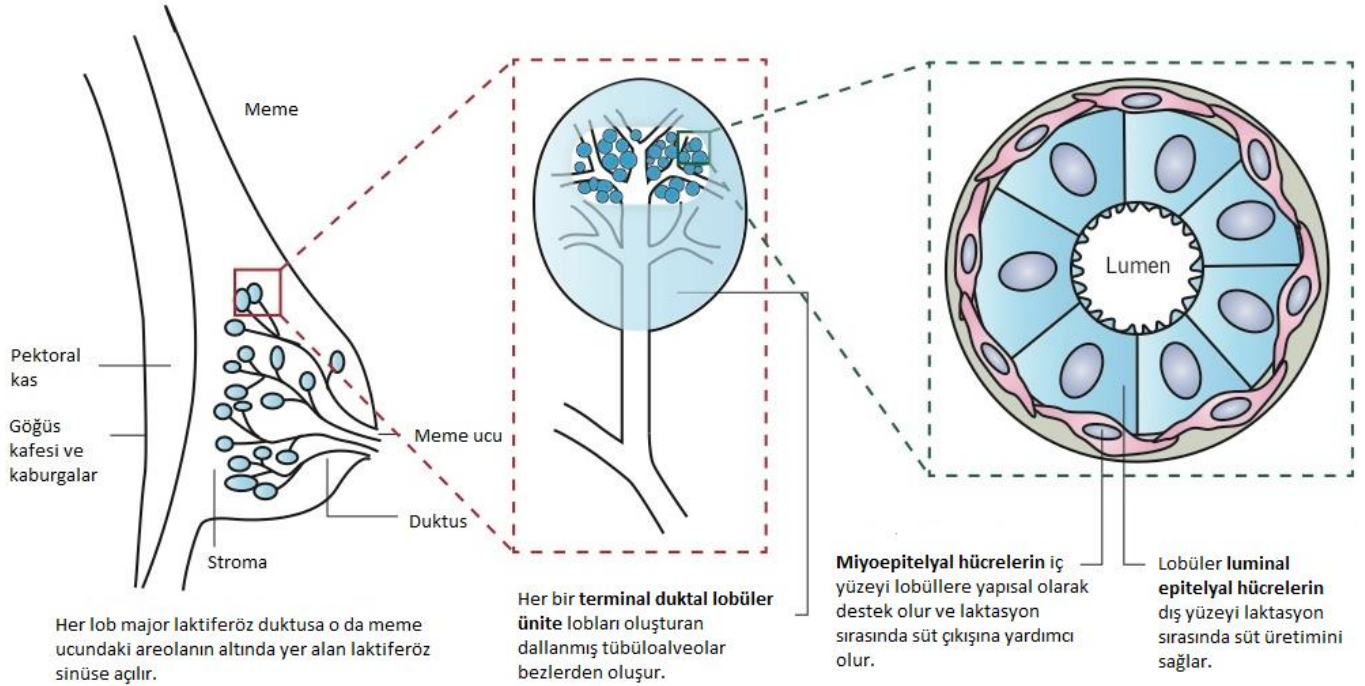
Meme, göğüs ön duvarında, 2.-6. kaburgalar arasında lokalize ve pektoralis major kası üzerinde yer alan, deri, subkutanöz doku, parankim (duktus, lob ve lobüller), destekleyici stroma, yağ doku, ligamentler, sinirler, lenf ve damar sistemine sahip yenidoğanın beslenmesi ve immünolojik olarak korunmasını sağlayan ve kadınlarda yaşam siklusu boyunca farklı zamanlarda (menarş, gebelik, laktasyon ve menopoz) farklı histolojik değişikliklere uğrayan ekzokrin bir bezdir (Yıldırım, 2012; Jesinger, 2014).

Meme, fetal gelişimin 5. ve 6. haftalarında kalınlaşmakta olan ektodermden gelişir (Brunicardi ve ark. 2004; Pandya ve Moore, 2011). Meme tomurcukları epidermin altındaki mezenşimin içine doğru büyür (Drew ve ark. 2007; Pandya ve Moore, 2011). Ektodermin içeri doğru büyümesiyle oluşan primer tomurcuktan her bir meme gelişir. Primer tomurcuklar, laktiferöz duktuslar ve onların dallarını oluşturan 15-20 adet sekonder tomurcukları oluşturur (Moore ve Persaud, 1998; Pandya ve Moore, 2011). Doğumda sadece ana laktiferöz duktuslar gelişmiştir, meme bezleri puberteye kadar gelişmeden kalır. Puberte ile overlerden salınan östrojen ve progesteron etkisiyle epitelyal ve destek doku elementlerinin proliferasyonu, meme bezleri gelişimi ve yağ dokuda artış görülür. Gebelikte ise östrojen, progesteron, büyüme hormonu, prolaktin ve plasental hormonların etkisiyle meme volümü ve dansitesinde artış gerçekleşir. Doğum sırasında salınan oksitosin hormonu myoepitelyal proliferasyon ve farklılaşmayı sağlar (Greenfield ve ark. 2001; Brunicardi ve ark. 2004; Pandya ve Moore, 2011). Doğumdan hemen sonra östrojen ve progesteron seviyelerindeki ani düşüş ile laktasyon gerçekleşir. Prolaktin, büyüme hormonu ve insülin süt üretimini ve salınımını uyarır. Menopozda ise duktal ve glandular elementlerde gerileme, yaşlanma ile duktus ve lobüllerin sayısında azalma, yağ doku ve stromal elementlerin ilerleyici regresyonu görülür (Pandya ve Moore, 2011).

Meme dokusu epitelyal ve stromal kısımlardan oluşur. Epitelyal kısım tüm dokunun %10-15'ini kapsar, kalan kısmı ise stroma oluşturur (Bland ve Copeland, 2009; Pandya ve Moore, 2011). Erişkin meme ortalama 15-20 lobdan oluşmakta olup her lob 20-40 adet lobül içerir. Lobüller dallanmış tubüloalveolar bezlerden oluşur. Her lob major laktiferöz sinüse o da meme ucundaki areolanın hemen altında yer alan laktiferöz sinüse açılır (Şekil 2-1). Lobların arasını adipöz doku doldurur. Memede iki tip epitel hücre (luminal,

miyoepitelyal, stromal doku (interlobüler, intralobüler) ve yapı (duktus, terminal duktal lobüler ünite) bulunur (Pandya ve Moore, 2011).

Şekil 2-1: Meme Anatomisi ve Histolojisi (Pandya and Moore, 2011)



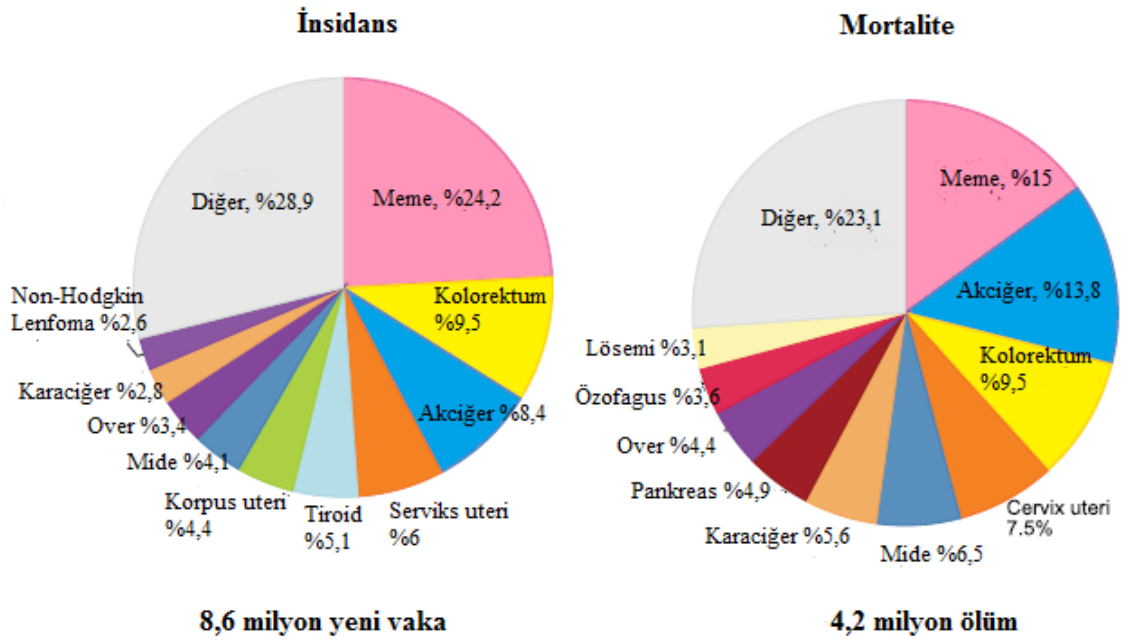
2.2. MEME KANSERİ

2.2.1. Etiyoloji

Globocan 2018 verilerine göre meme kanseri kadınlarda %24,2 görülme sıklığı ile başı çekmektedir ve %15 mortalite oranı ile kadınlarda en sık ölüm nedenidir (Şekil 2-2). Kadınlarda görülen kanser vakalarının 1/4'ü meme kanseridir (Bray ve ark. 2018). Kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı erkeklere göre 100 kat daha fazladır (Siegel, 2017; Sun ve ark. 2017). Meme kanseri oluşumunda herediter ve genetik faktörler %5-10 oranında (Bray ve ark. 2018) görülmekte olup meme kanseri oluşumu çoğunlukla diğer faktörlere (hormonal, üreme ve obezite ile ilgili endojen ve eksojen vs.) bağlıdır. Coğrafi faktörlerin etkisi tam olarak bilinmemekte olup pek çok ülkede meme kanseri sıklığı son 10 yılda artış göstermiştir. Bunun sebebi olarak çocuk sahibi olmayı geciktirme, az sayıda çocuk sahibi olma, sedanter yaşam, obezite, meme kanseri tarama tekniklerindeki gelişmeler ve meme kanseri konusunda farkındalığın artışı gösterilmektedir (Bray ve ark. 2018). Beş yıllık sağkalım oranları Kuzey Amerika ve

Japonya gibi gelişmiş ülkelerde %80 üzerindye, Cezayir gibi Afrika ülkelerinde %40'ın altındadır (Coleman ve ark. 2008; Sun ve ark. 2017).

Şekil 2-2: Globocan 2018 verilerine göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidans (sol) ve mortalite (sağ) grafikleri (Bray ve ark. 2018)

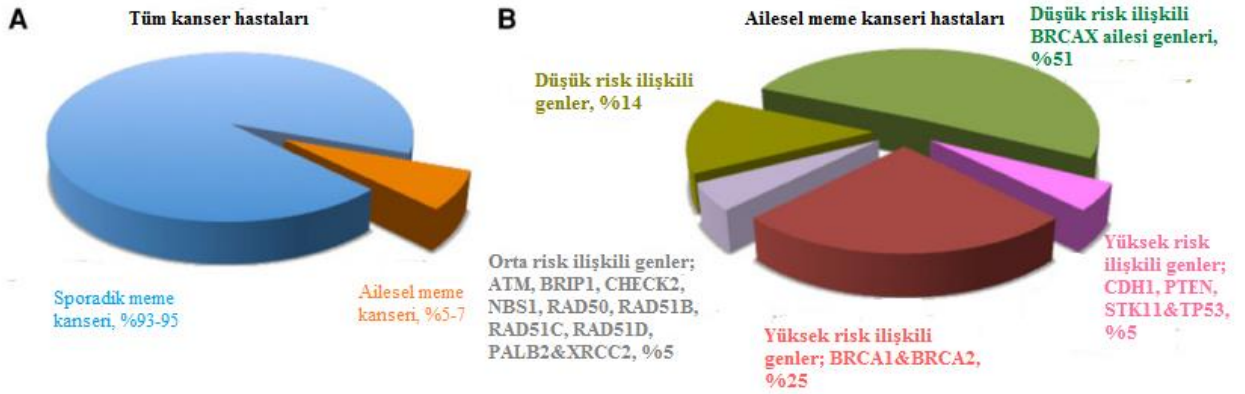


Meme kanseri etiyolojisinde rol oynadığı bilinen faktörler Tablo 2-1'de gösterilmiştir. Tüm meme kanseri vakalarının %5-7'si ailesel kaynaklıdır. Bu grubun yaklaşık olarak %25'inde altta yatan sebep penetransı yüksek olan BRCA1 (Miki ve ark.1994) ve BRCA2 (Wooster ve ark. 1994) genlerindeki germ hücre mutasyonlarıdır (Melchor ve Benitez, 2013). Meme kanseri görülen akrabaların sayısı ne.kadar fazla ve bunların tanı konulma yaşı ne kadar düşükse bireysel risk o oranda artar (Lalloo ve Evans, 2012). Meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiş genler Şekil 2-3'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Meme kanseri risk faktörleri

Meme Kanseri Risk Faktörleri		
Predispozan Faktörler	Tartışmalı Risk Faktörleri	Koruyucu Faktörler
-Kadın cinsiyet -Yaş (yaş arttıkça risk artar, ancak genç kadınlarda görülen tümör daha agresif) -Geç menopoz (50 yaş ve üzeri) -Gebelik özellikleri (ilk gebelik ne kadar geç yaşanırsa risk o oranda fazla, ilk çocuğun 33.gebelik haftası öncesi doğumu, ilk gebelikte plasenta ayrılması, beşten fazla miadında gebelik) -Nulliparite (doğum yapmamış olmak) -Doğum kontrol hapları -Menopoz sonrası hormon tedavisi -Genetik faktörler (BRCA-1 ve/veya 2 mutasyonu taşımak) -Ailede meme kanseri öyküsü -Benign meme bozuklukları (atipik hiperplazi vs) -Obezite -Diet (doymuş yağlardan zengin beslenme) -Alkol, sigara, hava kirliliği -Geceleri çalışma (20 yıl ve üzeri) -Sosyoekonomik durumun kötü olması -Diabet -Radyoterapi	-Kan grubu (A Rh+ yüksek risk) -Erken yaşta adet görme -Düşük öyküsü -Ovulasyon uyarıcı ilaçlar -Mamografide yoğun meme dansitesi -Kahve kullanımı (hormon kullanmış olanlarda risk artışı) -Uyku süresi (uzun uyku süresi ve uykusuzluk (insomnia) artmış risk)	-Miadında, erken yaşta (30 ve öncesi) birden fazla gebelik (her gebelik ile risk %10 azalır) -Ovulasyon görülen menstrüasyon döngüsü -Gebelik özellikleri (preeklampsi, gebelikte yoğun mide bulantısı yaşama) -Uzun süreli emzirmek -Fiziksel aktivite yapmak -Kahve kullanımı (menopoz sonrası) -D vitamini kullanımı

(Momenimovahed ve Salehiniya, 2019).



Şekil 2-3: Meme kanseri hastalarının dağılımı. A: Ailesel meme kanseri dağılımı, B: Meme kanseri riski ile ilişkili genler (Melchor ve Benitez, 2013)

2.2.2. Patogenez ve Sınıflandırma

Meme kanserleri, memenin normal epitel hücrelerinin zamanla farklı bir hücre tipine dönüşmesi ile gelişir. Memenin benign lezyonlarından olan flat epitelyal atipi (FEA) ve atipik duktal hiperplazi (ADH) hastada duktal karsinoma in situ (DCIS) ve invazif duktal karsinoma (IDC) için zemin hazırlar. FEA, bir veya daha fazla epitel hücre katmanı içeren dilate duktuslarla karakterizedir. ADH’de ise apikal-bazal polaritesini kaybetmiş hücreler içeren organizasyonu bozulmuş çoklu katmanlı duktuslar gözlenir. Myoepitelyal hücre katmanının bozulup hücrelerin bazal membranı aşması durumunda duktal lümen kaybolarak polarizasyonunu kaybetmiş olan hücreler DCIS oluştururlar (Rejon ve ark. 2016). Eğer polarizasyonunu kaybetmiş ve yer değiştirmiş anormal hücreler bulundukları yerde kalırlarsa (in situ) invazif olmayan meme kanserlerini, lobul ve duktuslarda kalmayıp diğer meme dokusuna ve diğer organlara yayılırlarsa invazif meme kanserlerini oluştururlar. Meme kanseri genetik ve klinik olarak heterojen bir kanser türüdür ve farklı fenotip ve klinik sonuçlara yol açan histolojik ve moleküler alt sınıflara ayrılır.

Histolojik olarak invazif meme kanserleri orjinine göre,

- İnvazif duktal karsinoma (IDC) (sıklığı %50-75);
- İnvazif lobüler karsinoma (ILC) (sıklığı %10-15),
- Miks tip -invazif duktal ve lobüler karsinoma (sıklığı %5-10),
- Nadir görülen diğer meme dokuları orjinli olanlar (sıklığı %1) olarak ayrılır (Dillon ve ark.2014).

Moleküler olarak invazif meme kanserleri,

- Hormon reseptör pozitif olanlar (HR+) (sıklığı %75) (östrojen reseptör alfa (ER α) ve/veya progesteron reseptörü (PR) eksprese edenler),
- Epidermal Growth Factor Receptor 2 (ERBB2, HER2, HER2/neu) ekspresyonu yüksek olanlar (sıklığı %15-20) (Piccart-Gebhart ve ark. 2005),
- ER, PR, ERBB2 ekspresyonu göstermeyenler (Triple-Negatif) (sıklığı %15) (Denkert ve ark. 2017) olarak ayrılır (Giordano ve ark. 2017).

ER α bir steroid hormon reseptörü ve transkripsiyon faktörüdür. Östrojen tarafından aktive edildiğinde meme kanseri hücrelerinde onkojenik büyüme yollarını aktive eder (Joshi ve Press, 2018). Diğer bir steroid hormon reseptörü olan PR de ER α sinyal yolağının bir belirtecidir. ER ve PR'nin tümör hücrelerinin en az %1'inde ekspresyonunun tespit edilmesi o tümörün HR+ sınıfına girmesi için yeterlidir (Hammond ve ark. 2010). Tedavide ER α sinyal yolağının aktivasyonunu engelleyen endokrin ajanlar kullanılır (Waks ve Winer, 2019).

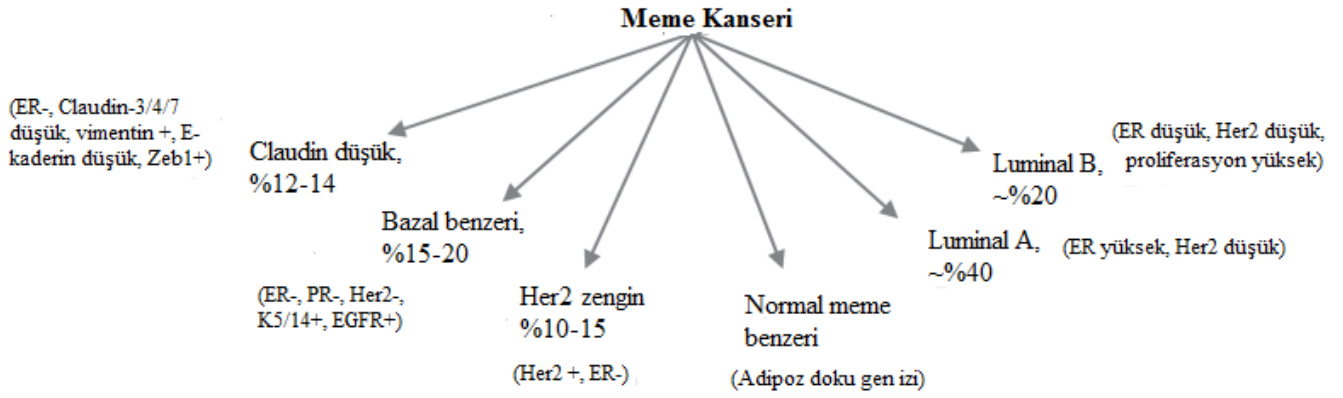
ERBB2 (HER2 veya HER2/neu), bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Piccart-Gebhart ve ark. 2005). Ancak ERBB2'yi hedefleyen anti-ERBB2 antikoları (trastuzumab ve pertuzumab gibi) ve tirozin kinaz inhibitörleri (lapatinib ve neratinib gibi) tedavide başarı sağlar (Waks ve Winer, 2019).

Triple-negatif meme kanserleri tanıyı takiben ilk 3-5 yıl içerisinde nüks görülebilen agresif tümörlerdir. Genellikle genç, siyahi veya Hispanik kadınlarda daha sık görülürken HR+ tümörler genelde daha yaşlı kadınlarda görülür (Foulkes ve ark. 2010). Evre 4 meme kanserlerinde ortalama sağ kalım HR+ ve ERBB2+ tümörlerde 5 yıl, triple-negatif tümörlerde 1 yıldır (Waks ve Winer, 2019).

Gen ekspresyonu çalışmalarından elde edilen veriler ışığında moleküler olarak yapılmış diğer bir sınıflamada ise invazif meme kanserleri farklı alt tiplere ayrılmıştır (Şekil 2-4 ve Tablo 2-2);

- Luminal A (ER ve/veya PR pozitif) (sıklığı %40),
- Luminal B (ER ve/veya PR pozitifliği daha az belirgin ve/veya HER2 pozitif, hızlı hücre proliferasyonu (Ki-67 pozitifliği) (sıklığı %10) (Cheang ve ark. 2009),
- HER2 zengin (ER-PR negatif, HER2 pozitif, hızlı hücre proliferasyonu (Ki-67 pozitifliği),
- Bazal benzeri tip (ER-PR-HER2 negatif, Keratin 5, 6, 17'nin fazla ekspresyonu, p53 ve BRCA1 mutasyon sıklığı) (O'Brien ve ark. 2010; Gonzalez-Angulo ve ark. 2011),

- Normal meme benzeri tip,
- Claudin düşük,tip (Herschkowitz ve ark. 2007).



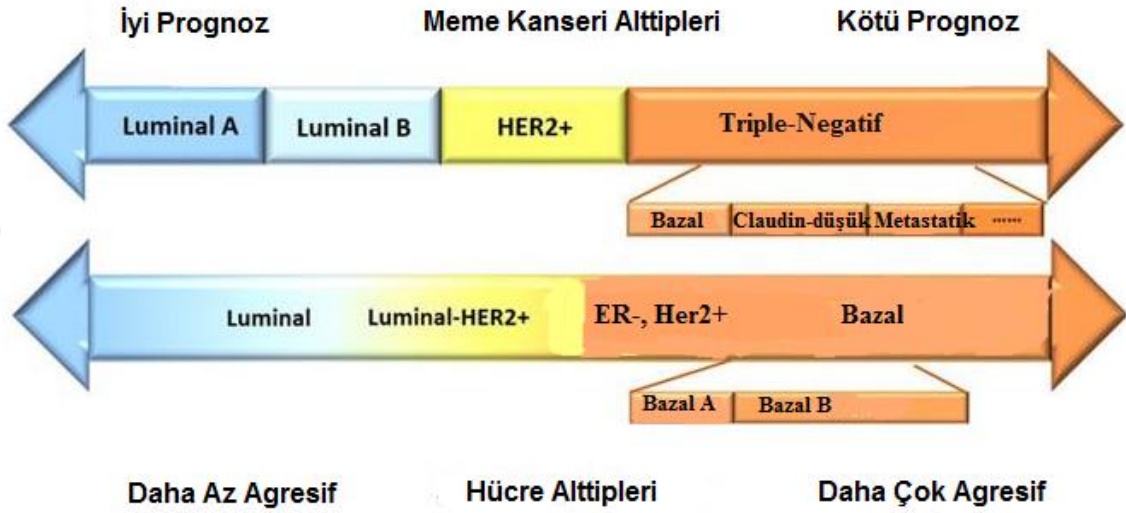
Şekil 2-4: Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve görülme sıklığı (Malhotra ve ark. 2010)

Tablo 2-2: Meme kanseri alt tipleri ve ilgili belirteçler

Meme kanseri alt tipi	Histolojik Tip	Histolojik Grade	ER ekspresyonu	HER2 ekspresyonu	Ki-67 ekspresyonu	Genetik değişiklikler
Luminal A	İnvazif karsinom, klasik lobular, tubular, müsinöz, nöroendokrin, kribriform	1-2	ER+	HER2-	Düşük	Mutasyonlar (PIK3CA, MAP3KI, GATA3, FOXA1) yüksek ekspresyon (ESR1, XBP1), insersiyon (1q, 8q), delesyon (8p, 16q)
Luminal B	İnvazif karsinom, mikropapiller	2-3	ER+/-	HER2+/-	Yüksek	Mutasyonlar (TP53, PIK3CA), amplifikasyon (siklin D1, MDM2, 8p12, 11q13), delesyon (ATM)
HER2	İnvazif karsinom, apokrin, pleomorfik lobular	2-3	ER+/-	HER2+	Yüksek	Amplifikasyon (HER2, siklin D1), mutasyon (TP53, APOBEC, PIK3CA), yüksek ekspresyon (FGFR4, EGFR)
Bazal benzeri tip	İnvazif karsinom, medullar, metaplastik, adenoik kistik, sekretuar	3	ER-	HER2-	Yüksek	Mutasyon (TP53), amplifikasyon (8q24), delesyon (Brca1, Rb1), DNA tamir genlerinde yüksek ekspresyon, FOXM1 aktivasyonu

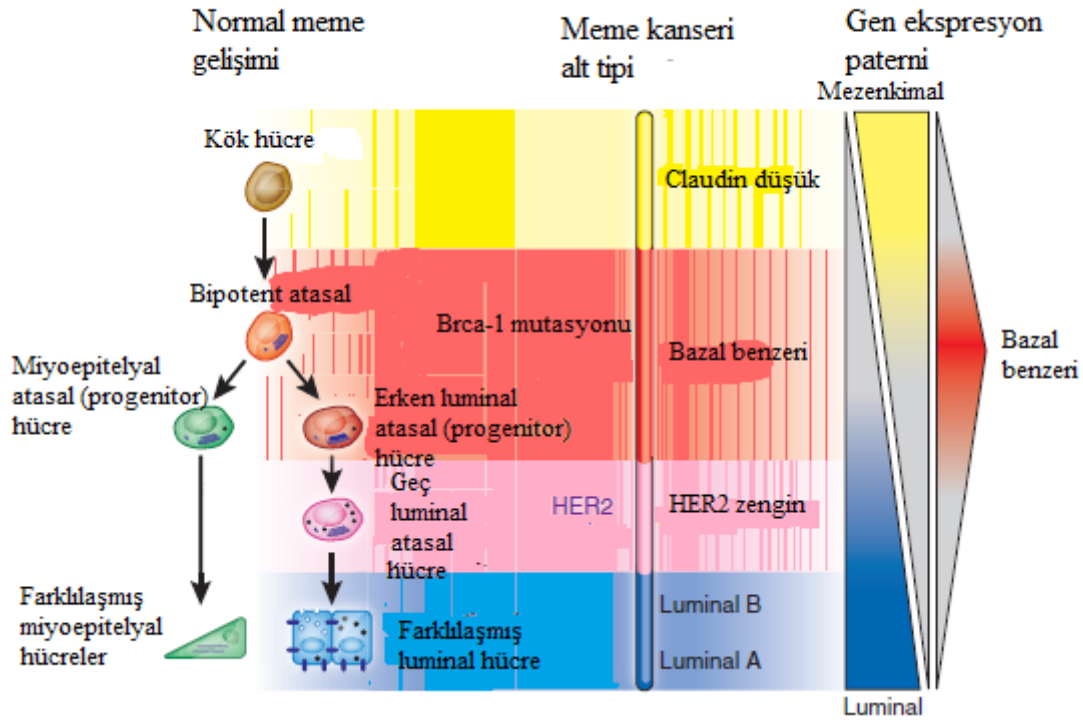
(Vuong ve ark. 2014).

Luminal A tümörlerinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında sağkalım oranları daha yüksektir. Bazal benzeri tip tümörler genellikle Evre 3 olarak nitelendirilir ve agresif klinik davranış gösterir (Vuong ve ark. 2014). Meme kanseri hücrelerinin tipleri ile agresiflikleri arasındaki ilişki Şekil 2-5'te gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Meme kanseri hücrelerinin tipleri ile agresiflikleri arasındaki ilişki (Dai ve ark. 2017)

Meme epitelindeki hücreler belli bir hiyerarşi içinde bulunur. Farklılaşmamış (indiferansiye) ER-negatif meme kök hücresi bir yandan kendini yenilerken (self-renewal) diğer yandan diğer atasal hücrelere farklılaşarak matür duktal ve alveolar hücreleri oluşturular (Prat ve Perou, 2009). Kanser kök hücre teorisine göre bir tümör içerisinde çoğu hücre düşük tümör oluşturuca potansiyele sahipken küçük bir grup hücre tümörün başlaması ve ilerlemesinden sorumludur. Meme kanserinde görülen bu heterojenite meme kök hücre hiyerarşisi içerisinde farklı seviyelerde meme kök/atasal hücrelerinin bulunmasından veya tek bir meme kök/atasal hücrenin çeşitli onkogenler aracılığıyla farklı tip kanserlere dönüşmesinden kaynaklanabileceğini savunur (Malhotra ve ark. 2010). Şekil 6'da meme kök/atasal hücrelerin kanser alt tiplerini oluşturan potansiyel hücreler ile ilişkisi ve tümör alt tiplerindeki gen ekspresyon paternleri arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 2-6: Meme kanseri alt tipi ile meme epiteli hücreleri ilişkisi (Prat ve Perou, 2009)

2.3. ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE KANSER METASTAZINDAKİ ROLLERİ

Adezyon molekülleri primer olarak hücre-hücre, hücre-ECM arası bağlanmayı sağlayan, hücre sinyalizasyonu, doku ve hücre yapısının korunması, doku tamiri, yara iyileşmesi, bağışıklık (lökosit göçü), tümör metastazı gibi süreçlerde rol alan hücre yüzey proteinleridir (Makrilia ve ark, 2009; Şensoy ve Öznurlu, 2009). Hücre adezyon molekülleri 5 grupta incelenir: hücre-hücre adezyonunda görev yapan selektin, kaderin, immünoglobulin süper ailesi (IgSF), ECM'e bağlanan integrinler ve diğerleri (müsin vb.) (Harjunpää ve ark. 2019).

2.3.1. Selektinler

Selektinler dolaşım sisteminde lökosit, platelet ve endotel arası etkileşimi sağlayan glikoprotein yapıda vasküler hücre adezyon molekülleridir (Şensoy ve Öznurlu, 2009; Bendas ve Borsig, 2012). Protein ve karbonhidrat ligandlara bağlanabilirler (Şensoy ve Öznurlu, 2009). Selektinler bulundukları hücrelere göre P- (plateletlerde α -granüllerinde ve endotelde Weibel-Palade cisimciklerinde), E- (active olmuş endotelde) ve L- (lökositlerde) selektinler olarak ayrılır (Bendas ve Borsig, 2012). Selektinler sentez

açısından farklı kinetiklere sahiptir; plateletler aktive olduklarında P-selektin hücre yüzeyine doğru hızla yer değiştirmek üzere dakikalar içinde sentezlenirken, E-selektin (ELAM-1) endotel hücrelerinden de novo transkripsiyon ile saatler içerisinde daha yavaş sentezlenir (Bendas ve Borsig, 2012).

Selektinler lökosit trafiği ve göçünde önemlidir. Selektinlerin en önemli fonksiyonu erken dönem lökosit yuvarlanmasındaki rolleridir. Lökositlerin endotel üzerinde sıralanıp yuvarlanma süreci selektinlerin ve karbonhidrat ligandlarının hızlı ve reversibl etkileşimi ile sağlanır. Selektin ligandları genellikle protein bir omurga üzerinde tetrasakkarid çekirdek yapı (sialyl Lewis^{x/a} (sLe^x/sLe^a)) taşıyan belirgin bir glikan yapı içermektedir (Bendas ve Borsig, 2012).

Normal durumda boşluklu organların lümenini kaplayan epitel hücreleri yüksek moleküler ağırlıklı ve O-bağlı glikan içeren müsin ile kaplıdır. Malign transformasyon sürecinde tümör hücreleri üzerindeki glikanlarda selektin ligandları olan sLe^x veya sLe^a ekspresyonları artar (Kannagi ve ark. 2004; Bendas ve Borsig, 2012) ve bu ligandları taşıyan tümör hücreleri dolaşımdaki lökosit, platelet ve endotel üzerindeki selektinlerle etkileşip bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçarak metastaz sürecine devam ederler. Plateletler ile etkileşimi gerçekleşmemiş tümör hücreleri dolaşımdan natural killer (NK) hücreleri ile uzaklaştırılır (Bendas ve Borsig, 2012). P-selektin yokluğunda fare akciğerlerinde tümör hücresi adezyonunun azaldığı gözlenmiştir (Ludwig ve ark. 2004; Bendas ve Borsig, 2012). İntravenöz enjeksiyon öncesi tümör hücre yüzeyinden müsinlerin uzaklaştırılması, lökosit göçü ve metastatik niş oluşumuna katılan L-selektinin yokluğunun metastazı azalttığı bildirilmiştir (Bendas ve Borsig, 2012). P- ve L-selektinlerin platelet ve lökositlerde aşırı ekspresyonları tümör metastazı için ideal ortam oluşturur (Farahani ve ark. 2014). Daha önceki çalışmalarda E-selektin aşağı regülasyonunun (downregülasyon) deneysel olarak karaciğer kanseri metastazında azalmaya yol açtığı, transgenik olarak karaciğerde aşırı ekspresyonunun ise karaciğere metastazını arttırdığı belirtilmiştir (Laubli ve Borsig, 2010; Bendas ve Borsig, 2012).

2.3.2. Kaderinler

Kaderinler hücre-hücre adezyonunda yer alan transmembran molekülleridir. Kaderinler aynı zamanda epitelyal-mezenkimal geçiş, hücre migrasyonu gibi süreçlerde kateninler (β -katenin/Wnt sinyal yolağı) aracılığıyla hücre sinyalizasyonunda görev alırlar (Makrilia ve ark. 2009). İsimlerinden de anlaşıldığı gibi yapı ve fonksiyonlarında

kalsiyum bağımlıdır (Cadherins-**Calcium dependent adherent proteins**). Kaderinler klasik tip (I ve II), protokaderin ve atipik kaderinler olmak üzere alt sınıflara ayrılır (Patel ve ark. 2003; Harjunpää ve ark. 2019). Genel olarak en çok bilinenleri E-kaderin (epitelyal), N-kaderin (nöronal) ve P-kaderin (plasental)'dir (Şensoy ve Öznurlu, 2009). E-kaderin komşu epitel hücrelerindeki E-kaderin molekülleri ile homofilik olarak etkileşime geçerek hücre adezyonunda görev alır (Van Roy ve ark. 2008). N-kaderin embriyolarda sinir sistemi, beyin, kalp, iskelet kası, kan damarları gibi dokuların gelişimi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır. Genelde nöronal hücrelerde eksprese olur ve nöronal hücrelerin intersellüler adezyonunda rol alır. Son zamanlarda meme, prostat, akciğer, karaciğer gibi kanserli dokularda N-kaderin ekspresyonunun değişikliğe uğradığı ve tümör invazyonu ve kanser metastazları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cao ve ark. 2019). VE-Kaderin (vascular endothelial cadherin) vasküler endotelde bulunup endotel arası bağlantıların korunması ve lökosit ekstrasvazasyonunda rol oynar (Vestweber, 2008).

Qureshi ve arkadaşları tarafından invazif lobular karsinomların %90'ında E-kaderin ekspresyonunun kaybolduğu bildirilmiştir (Qureshi ve ark. 2006). Elmoneim ve arkadaşlarının çalışmasında invazif duktal karsinoma vakalarında E-kaderin ekspresyonunun azaldığı (%37,1), N-kaderin ekspresyonunun arttığı (%51,9) bulunmuştur (Elmoneim ve Zaghoul, 2011). P-kaderinler normal meme dokusunda myoepitelyal hücrelerde eksprese olur, östrojen negatif meme kanserlerinde P-kaderinin ekspresyon seviyesindeki artış ile histolojik grade ve kötü prognoz arasında korelasyon bulunmuştur (Paredes ve ark. 2008).

2.3.3. İmmünoglobulin Süper Ailesi (IgSF)

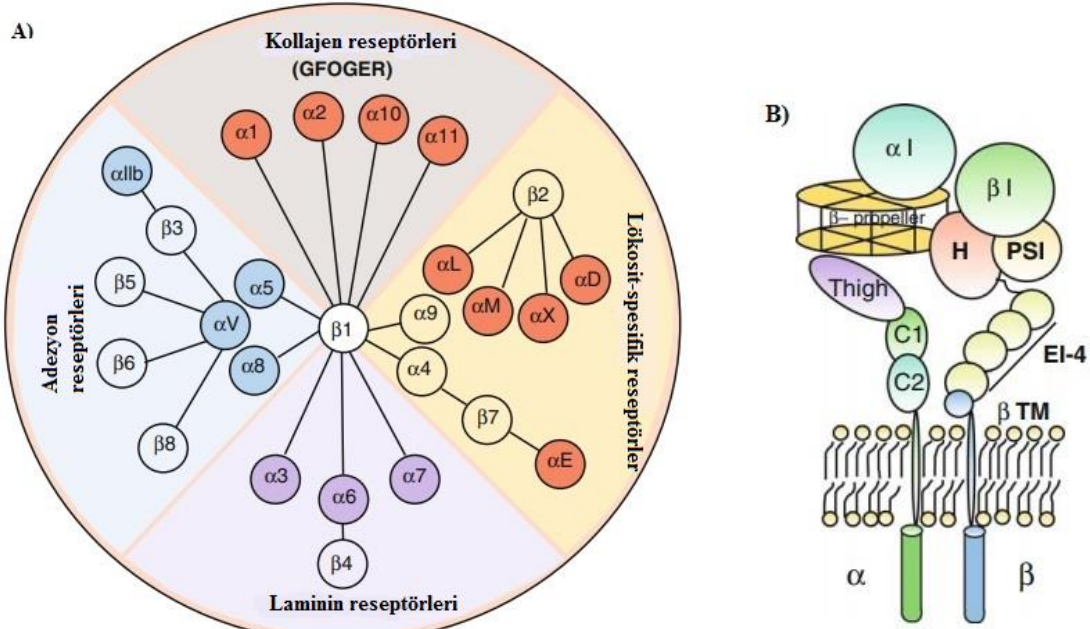
IgSF ailesinin tüm üyeleri en az bir immünoglobulin veya immünoglobulin benzeri domeyn içerir ve çoğu ekstrasellüler domeyn içeren tip 1 transmembran proteinidir (Harjunpää ve ark. 2019). Yara iyileşmesi ve immün cevap oluşumu gibi süreçlerde yer alırlar, lenfatik trafiği düzenleyici, inflamasyon alanında immünkompetent hücrelere saldırma gibi görevleri vardır (Farahani ve ark. 2014). Bu grupta, L1-CAM (merkezi ve periferik sinir sistemi), N-CAM (neuronal cell adhesion molecule, CD56) (nöral doku ve kas hücreleri), ICAM (intercellular adhesion molecule) (endotel, lökosit), VCAM (vascular cell adhesion molecule) (endotel, makrofaj, fibroblast), PECAM (platelet endothelial adhesion molecule) (lökosit, trombosit, endotel, platelet), LFA (lymphocyte function-associated antigen-1) (lökosit, endotel, epitelyal hücreler), MHC

(major histocompatibility complex) class I ve II molekülleri, TCR (T hücre reseptör kompleksi), MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) (endotel), ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) (endotel) gibi proteinler yer alır (Shin ve ark. 2006; Şensoy ve Öznurlu, 2009; Wai Wong ve ark.2012; Muller, 2013; Harjunpää ve ark. 2019). Diğer bir IgSF ailesi ise endotel, epitel ve nöral gibi pek çok dokuda hücre-hücre adezyonunu uyaran nektinlerdir. Nektinler birbirleriyle homofilik veya diğer nektinler veya ligandlarla heterofilik bağlantılar yapabilir, hücreler arası bağlantılar (adherens junctions) yapmak üzere kaderinler ile işbirliği yapabilirler. Çoğu tümörde nektinlerin artmış ekspresyonları bildirilmiştir (Samanta ve Almo, 2015; Harjunpää ve ark. 2019). ICAM-1/2, VCAM-1, MAdCAM-1 gibi moleküllerin downregülasyonları pek çok tümörle ilişkilendirilmiştir (Harjunpää ve ark. 2019). ICAM-1'in lenfatik endotelial hücrelerde bulunması karsinoma hücrelerinin lenf nodu metastazları için uygun ortam oluşturduğu belirtilmiştir. (Farahani ve ark. 2014).

2.3.4. İntegrinler

İntegrinler gelişimsel ve patolojik pek çok süreçte yer alan bir α ve bir β altbirimi içeren 24 farklı (18 α ve 8 β) heterotrimerik transmembran hücre yüzey reseptörü ailesidir (Şekil 2-7A). İntegrinlerin ekstrasellüler domeyni pek çok domeynden oluşur. Ligand spesifitesinden sorumlu α altbirimi 7 adet β -pervane yapısı ve ona bağlı C-1 ve C-2 domeynlerinin oluşturduğu bacak ve bacakların desteklediği ligand bağlayıcı baş kısmından oluşur. β -pervane yapısının 3 veya 4 tanesi Ca^{2+} bağlayıcı EF domeyni içerir. β -2 integrinlerin α altbirimlerinde Mg^{+2} bağımlı ligand bağlama gerçekleştiren I (A olarak da adlandırılır) domeyni yer alır. I domeyni merkezde β tabaka ve onu çevreleyen 7 adet α -heliks yapısından oluşur. Ligand bağlanmasına açık konformasyonda bu domeyde yer alan MIDAS (**M**etal **i**on **d**ependent **a**dhesion **s**ite) adı verilen alanda bulunan 3 adet yüzey kıvrımı (loop) Mg^{2+} iyonlarına bağlanırken 4. bağ ligandda yer alan glutamat veya aspartat aminoasitleri ile yapılır. Ligand bağlanmasının gerçekleşmediği kapalı konformasyonda 4. bağ su molekülleri ile yapılır. α zincir sitoplazmik domeynleri çok çeşitli olsa da hepsinde GFFKR dizi homolojisi görülür. Sitoiskelete bağlanan ve pek çok sinyal yolağını tetikleyen β altbirimi plexin-sempahorin-integrin (PSI), hibrit ve β 1 domeynleri ve 4 adet sistein aminoasiti açısından zengin EGF tekrarları içerir. β 1 domeyni de Mg^{2+} bağlayıcı MIDAS ve bitişiğinde inhibitor Ca^{2+} bağlayıcı ADMIDAS (adjacent to MIDAS) bölgesi içerir (Şekil 2-7B). Bu bölge Mg^{2+} ile bağlyken integrin

molekülünde konformasyonel değişiklik olur ve aktif form oluşur. Ligandın bağlı olmadığı zamanlarda α ve β zincirlerin ekstrasellüler baş kısımlarının her ikisi de aşağı doğru iken (inaktif form) ligand bağlandığında bu zincirlerin her ikisi de dik konumda (aktif) bulunur (Barczyk ve ark. 2010; Harjunpää ve ark. 2019).

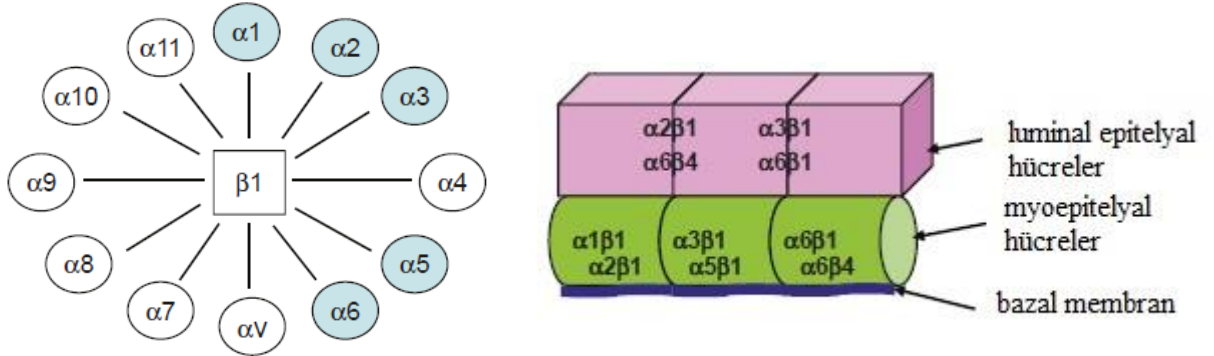


Şekil 2-7: A) İntegrin ailesi, B) İntegrin altbirimlerinin yerleşimi (Barczyk ve ark. 2010)

İntegrinlerin fibronektin, laminin, vitronektin, kollajen gibi ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri, büyüme faktörleri, sitokinler, ECM degradasyon proteazları gibi pek çok ligandı bulunduğundan integrinlerin sınıflandırılması oldukça zordur (Barczyk ve ark. 2010; Vanderslice ve ark.2013). İntegrinler ligand bağlayıcı özelliklerine veya taşıdıkları altbirimlerine göre sınıflandırılır. $\beta 1$, $\beta 2$ ve αv altbirimlerini taşıyan integrinler 3 büyük sınıfı oluşturur (Barczyk ve ark. 2010).

$\beta 1$ altbirimi integrinlerin 12 tanesinde bulunur (Şekil 2-8) ve kollajen, laminin, fibronektin, tenaskin C ve vitronektin gibi ECM ligandlarına bağlanır. Kıkırdak ve kemik oluşumu, iskelet kası gelişimi, epidermis oluşumu, serberal korteks gelişimi ve anjiogenez gibi pek çok süreçte görev alır. Meme epitelinde bazal membranda luminal kısma göre daha fazla bulunurlar ve meme dokusunun bütünlüğünün korunmasında önemlidirler. İn vitro çalışmalar $\beta 1$ -integrinlerin meme gelişiminde hormonal kontrolde önemli olduklarını göstermiştir. Meme kanseri hücreleriyle yapılan in vitro çalışmalarda

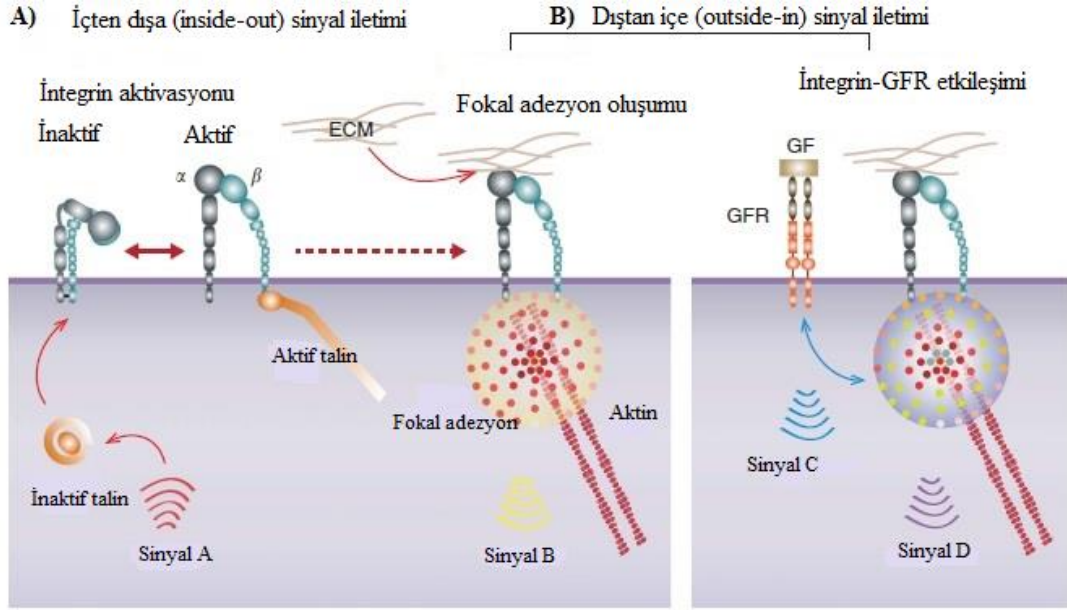
$\beta 1$ -integrinlerin tümör hücrelerinin proliferasyonu, sağkalımı ve invazifliği için önemli olduğu gösterilmiştir (Lahlou ve Muller, 2011).



Şekil 2-8: $\beta 1$ -integrinler (solda, memede eksprese olanlar mavi ile işaretlenmiştir) ve meme dokusundaki yerleşimleri (sağda) (Lahlou ve Muller, 2011)

İntegrinler farklı ligandlar bağlayabildikleri gibi, aynı ligand farklı integrinler tarafından da paylaşılabilir. Bu durum integrinlerin hücreler arası iletişimdaki önemini ortaya koyar (Bendas ve Borsig, 2012).

İntegrinler iki yönlü (hücre içinden dışına (inside-out) ve hücre dışından içine (outside-in) sinyal iletiminde rol alırlar. İntegrinlere hücre içi sinyaller intrasitoplazmik talin gibi adaptor proteinler aracılığıyla iletilince integrin β altbiriminin intrasitoplazmik kuyrukları aktive olur ve integrin konformasyonel değişikliğe uğrar, ekstrasellüler domeyn aktive olur ve integrinin ECM ligandlarına affinitesi artar (inside-out sinyalizasyon) (Şekil 2-9A) (Barczyk ve ark. 2010; Hamidi ve ark. 2016). İntegrin aktivasyonunda rol alan diğer hücre içi moleküller kindling, filamin, migfilin, FAK (focal adhesion kinase), ILK (integrin linked kinase)'dır (Barczyk ve ark. 2010). Öte yandan integrin-ECM etkileşimi hücre içi adaptor ve sinyal proteinlerini integrinin sitoplazmik domeynine getirerek fokal adezyonlar adı verilen makromoleküler komplekslerin oluşumunu uyarır bu da α -actinin, vinculin gibi sitoskelet elemanlarını aktive ederek diğer hücresel süreçleri başlatır (outside-in sinyalizasyon). Yine büyüme faktörü reseptörleri (GFR) ile integrin ekstrasellüler domeyni arasındaki etkileşim hücre içerisinde hücre migrasyonu, gen ekspresyonu gibi süreçleri başlatan farklı sinyaller oluşturur (Şekil 2-9B) (Hamidi ve ark. 2016; Harjunpää ve ark. 2019).



Şekil 2-9: İntegrinlerde hücre içinden dışına (inside-out) (A) ve hücre dışından içine (outside-in) (B) sinyal iletimi (Hamidi ve ark. 2016)

Lökositlerde çok çeşitli integrinler eksprese edilir; $\beta 1$ integrinler; $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29, VLA-4, ITGA4), $\beta 2$ integrinler; $\alpha L\beta 2$ (LFA-1, CD11a/CD18, ITGAL), $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, CD11b/CD18), $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18), $\alpha D\beta 2$ (CD11d/CD18). LFA-1 tüm lökositlerde eksprese edilirken Mac-1 myeloid lökosit, nötrofil ve NK, B ve bazı T lenfositlerde eksprese edilir. $\alpha X\beta 2$ daha çok myeloid dendritic hücrelerde, $\alpha D\beta 2$ ise nötrofil, monosit ve NK hücrelerinde eksprese edilir (Harjunpää ve ark. 2019). Lökositlerde eksprese edilen integrinler lökosit adezyonu ve transendotelyal migrasyonunda (diapedez) rol oynarlar.

Pek çok tümör epitel hücresi kaynaklı olduğundan ve integrinler epitel hücrelerinde de eksprese olduğundan kanser metastazında önemli moleküllerdir. Pek çok çalışmada integrin ekspresyon seviyelerindeki değişme kanser ilerleyişi, hasta sağkalım süresi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Tümör hücrelerinde $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ (CD51/ $\beta 5$), $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ gibi integrinlerin ekspresyonları melanoma, meme, prostat, pankreas ve akciğer kanserinde metastaz ile ilişkisi bildirilmiştir (Desgrosellier ve Cheresch, 2010; Bendas ve Borsig 2012).

2.3.5. Diğer Adezyon Molekülleri

P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) ve peripheral node addressin (PNAd) gibi müsinler

glikoprotein yapısındadır ve pek çok selektinin ligandı olarak görev yaparlar. Müsinler sindirim, solunum, urogenital sistemde yer alan epitel hücrelerini koruyan mukusun yapısında bulunurlar (Harjunpää ve ark. 2019). MUC-1 gibi müsinlerin kanser hücrelerin büyüme ve sağkalımında önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (Kufe 2009; Harjunpää ve ark. 2019). Ayrıca vasküler adezyon protein (VAP-1) gibi enzimlerin de hücre adezyonunda görev aldığı belirtilmiştir (Harjunpää ve ark. 2019).

2.4. HÜCRELER ARASI BAĞLANTILAR VE KANSER METASTAZINDAKİ ROLLERİ

Hücreler arası bağlantılar desmozomlar, adherens bağlantılar (adherens junctions) ve sıkı bağlantılar (tight junctions) olarak gruplandırılır ve hücrelerin birarada tutulması, hücreler arası sinyallerin iletilmesinde ve hücre adezyonunun sağlanmasında görev alırlar. Tümör hücrelerin epitelyal- mezenkimal geçiş (EMT) sürecine direnç göstererek epitelyal bütünlüğü korumaya çalışırlar. Onkojenik transformasyon ve kanser metastazında hücresel bağlantılar ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında değişiklikler, hücre-hücre adezyonunda düzensizlik ve bozulmalar meydana gelir (Knights ve ark. 2012).

2.4.1. Desmozomlar

Desmozomlar sitoskelet ve plazma membranı arasındaki bağlantı proteinleridir (Şekil 2-10). Sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgelerine bağlanan proteinler ile hücreler arası sitoskelet elemanlarının bağlanmasını sağlayarak mekanik bütünlük sağlarlar. Bu grupta kaderinler, armadillo protein ve plakinerler yer alır. Desmocollin (DSC1-3) ve desmoglein (DSG1-4) transmembran boşukta komşu hücrelerle hiper adeziv bağlantı sağlayan heterodimer kaderin proteinleridir. Mekanik strese karşı yoğun direnç gösterirler. Hücre dışında armadillo proteinler ile ilişki içerisindedirler. Armadillo proteinler olan plakophilin (PKP1-4) ve plakoglobin (JUP) transmembran kaderinler ve desmoplakin proteinleri ile etkileşim sağlayan 41 aminoasitlik ‘armadillo’ tekrarları içerirler. Desmozomal genler EMT sürecinde yer alan Snail, Slug ve Twist gibi transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir (Knights ve ark. 2012).

Desmoplakin Wnt sinyal yolağını ve β -katenin ekspresyonunu inhibe ederek tümör baskılayıcı protein olarak işlev görür. Tümör invazyonunda desmoplakin proteinindeki azalma sebebiyle desmozomal bütünlük bozulur. Plakophilin armadillo proteinlerinin tümör progresyonu ve metastazı ile ilişkisi belirtilmiştir. Bu proteinlerden

PKP3'ün downregülasyonunun in vitro epitel hücre migrasyonunda artışa ve nude farelerde deri ve akciğerde tümör oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (Kundu ve ark. 2008; Khapare ve ark. 2012).

2.4.2. Adherens Bağlantılar (Adherens Junctions)

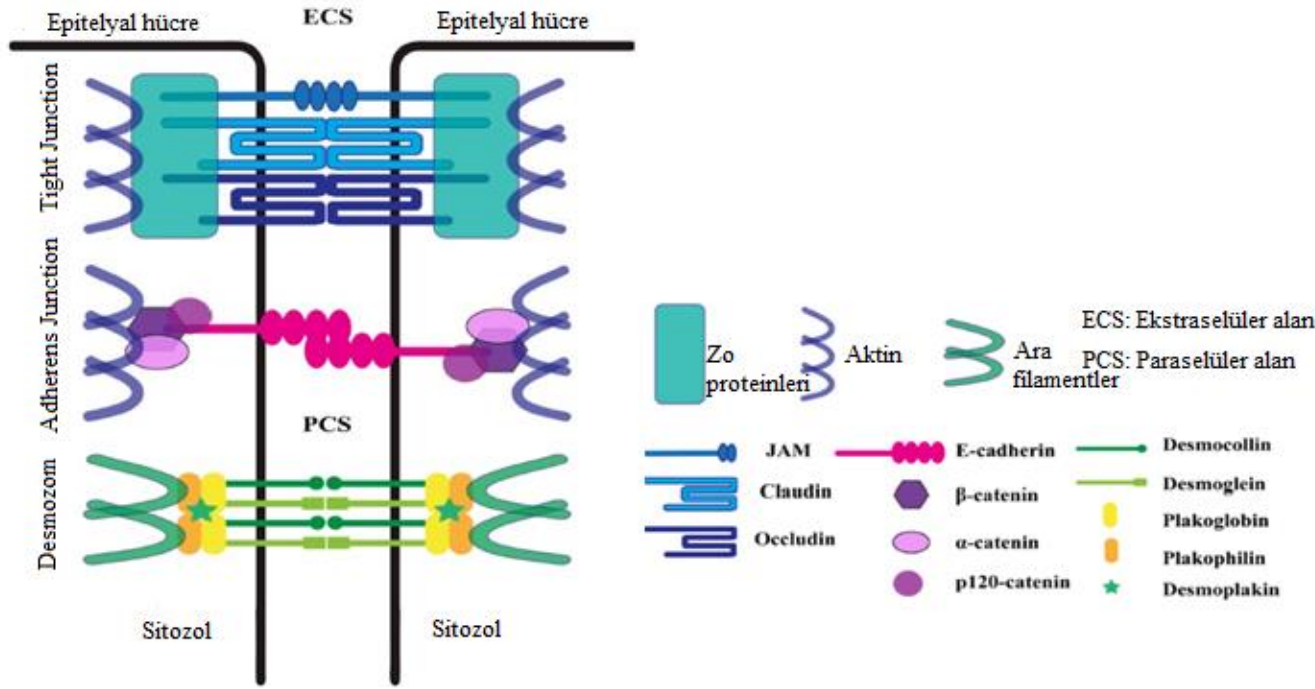
Adherens bağlantılar lateral hücre-hücre adezyonunda rol oynarlar. Bu bağlantılarda da desmozomlarda olduğu üzere kaderin, armadillo protein ve plaklin proteinler yer alır. Bağlantı alanlarındaki esas protein E-kaderin proteindir. Desmoglein, desmocollin ve N-kaderin EMT sürecinde yer alan diğer adherens bağlantı proteinleridir. Armadillo proteinlerden α - and β -katenin (CTNNA1-3, CTNNB1) p120-katenin (CTTND1-2) ile birlikte E-kaderin ve sitoskelet elemanı aktin arasındaki etkileşimi kolaylaştırır (Knights ve ark. 2012). Prostat, over, oral ve renal kanserlerde α - ve β -kateninlerin azalmış ekspresyonlarının hasta sağkalımını ve klinik sonuçları kötü etkilediği bildirilmiştir (Aaltomaa ve ark. 2005).

2.4.3. Sıkı Bağlantılar (Tight Junctions)

Epitel hücre membranlarının apiko-bazal bölgesinde lokalizedirler (Şekil 2-10). Hücreleri bağlayıcı görevlerinin dışında hücresel permaabilitenin düzenlenmesi ve hücre polaritesinin sağlanmasında bariyer olarak görev yaparlar (Knights ve ark. 2012). Kan-beyin, kan-retina, kan-testis bariyerlerindeki esas bağlantılardır. Endotel ve epitel arasındaki apikal ve bazolateral sıvı kompartmanlarını birbirinden ayırırlar (Salvador ve ark. 2016). Bağlantı kompleksi gap junction (nexus) ve sitoskelet elemanı aktin proteini ile etkileşimde olan junctional adhesion molecule (JAM) ve tricellulin ile ilişkili occludin ve claudin proteinlerinden oluşur. Sıkı bağlantı proteinleri claudin ve occludin proteinleri hücreler arası bağlantılardan iyonların geçişini kontrol ederek apikal-bazolateral permaabilitenin düzenlenmesinde görev alırlar (Knights ve ark. 2012). Tüm sıkı bağlantı proteinleri bağlantıda omurga görevi yapan periferik plak proteinleri ZO-1 ve-2 proteinleri ile etkileşimdedir (Salvador ve ark. 2016).

Occludin ekspresyonunun metastatik meme kanserlerinde belirgin olarak düştüğü gösterilmiştir (Martin ve ark. 2010). Occludin proteininin susturulmasının kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini uyardığı bildirilmiştir (Osana ve ark. 2016).

Claudin proteininin ekspresyon değişimleri pek çok çalışmada meme kanseri agresifliği ile ilişkilendirilmiştir (Morohashi ve ark. 2007; Kim ve ark. 2008; Lanigan ve ark. 2009).



Şekil 2-10: Hücreler arası bağlantılar ve ilgili proteinler (Knights ve ark. 2012)

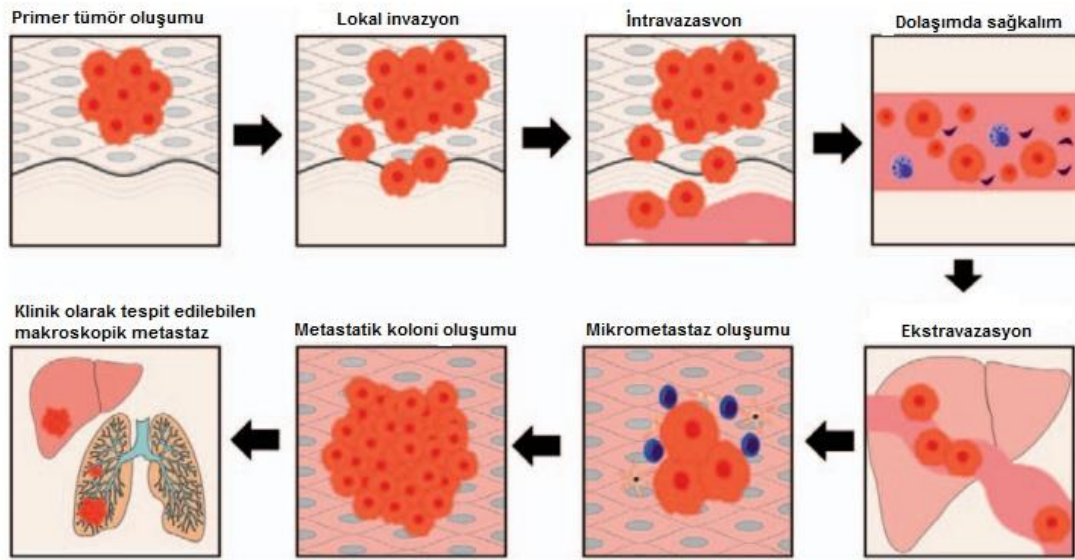
2.4.3.1. Junctional Adhesion Molecule (Jam)

Epitel ve endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı proteinlerinden biri olan Jam (junctional adhesion molecule) protein ailesi, plateletlerde ve pek çok lökosit hücresinde eksprese edilen, hücre polaritesi, hücre geçirgenliği, lökosit migrasyonu gibi çeşitli immün ve adeziv süreçlerde görev alan küçük proteinlerdir (Shin ve ark. 2006; McSherry ve ark. 2011; Zhao ve ark. 2014; Salvador ve ark. 2016; Yu ve Elble, 2016). Bu aile Ig benzeri domeyn içermesi nedeniyle Ig Süper ailesi adezyon moleküllerinden de sayılır ve Jam-A (1), -B (2), -C (3) ve -L (4) olarak sınıflandırılır. Epitel hücrelerinde Jam-A ve -C sıkı bağlantılarda yer alırken, Jam-B lateral membranda bulunur. Occludin ve claudinin aksine ekstrasellüler domeyni 2 adet Ig motif (N-terminal) ve sitoplazmik bir kuyruk (C-terminal) içeren tek bir transmembran domeyne sahiptir (Shin ve ark. 2006). Jam-A, LFA-1'in ligandı olarak erken safha lökosit transmigrasyonunda anahtar rol oynar (Williams ve ark. 1999; Naik ve Eckfeld, 2003). Literatürde Jam-A geni ekspresyonunun up ya da downregülasyonları pek çok kanser ile ilişkilendirilmiştir (McSherry ve ark. 2009 ve 2011; Naik ve ark. 2008; Cao ve ark. 2014; Tian ve ark. 2015; Ikeo ve ark. 2015). Jam-2 ekspresyonunun in vitro azaltılması kolorektal kanser hücrelerinde metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş ve Jam-2'nin tümör baskılayıcı ve metastazı önleyici özelliği

olabileceği önerilmiştir (Zhao ve ark. 2016). Hücreler arası bağlantılarda homodimerler veya Jam-B ile heterodimerler yapan Jam-C'nin yönlendirilmiş mutagenез ile mutasyona uğratılmasının akciğer kanseri hücre hatlarında tümörün metastatik özelliğini azalttığı gösterilmiştir (Garrido-Urbani ve ark. 2018).

2.5. METASTAZ

Kanser hücrelerinde metastaz pek çok biyokimyasal ve moleküler faktör tarafından yönlendirilen kompleks bir süreçtir. Literatürde metastaz kaskadı pek çok yazar tarafından aşağıdaki 6 basamak ile açıklanmıştır (Fidler, 2003; Valastyan ve Weinberg, 2011; Pacmayr ve ark. 2017) (Şekil 2-11).

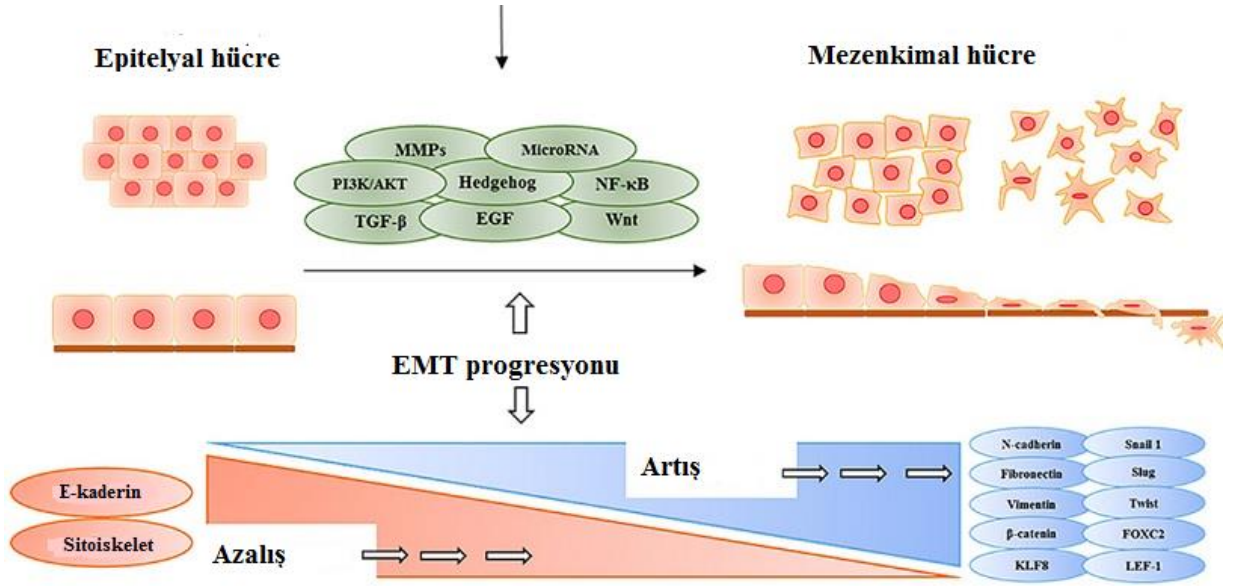


Şekil 2-11: Metastaz oluşum basamakları (Pacmayr ve ark. 2017)

2.5.1. Lokal İnvazyon

Hücre-hücre adezyonunun kısmi kaybı, hücre polaritenin ve şeklinin değişimi, hücre göçü gibi süreçlerin yaşandığı epitelyal- mezenkimal geçiş (EMT), embriyogenez (Tip 1 EMT), yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde (Tip 2 EMT) normal ve geri dönüşümlü bir süreç iken tümör metastazında (Tip 3 EMT) patolojik olarak yer alır (Knights ve ark. 2012). Kanser hücrelerine dönüşecek olan normal epitel hücreleri komşu epitel hücrelerine hücreler arası bağlantılar ile bağlıdır. Patolojik EMT sürecinde hücre-hücre adezyonu, hücre- ECM adezyonu çözülmeye ve hücre polaritesi kaybedilmeye başlanır (ilgili moleküllerde downregülasyon), mezenkimal hücre adezyon moleküllerinin hücre yüzeyinde upregülasyonu görülerek mezenkimal-kök hücre görünümüne yeni invazif bir hücreye dönüşüm gerçekleşir (Sökeland ve Schumacher,

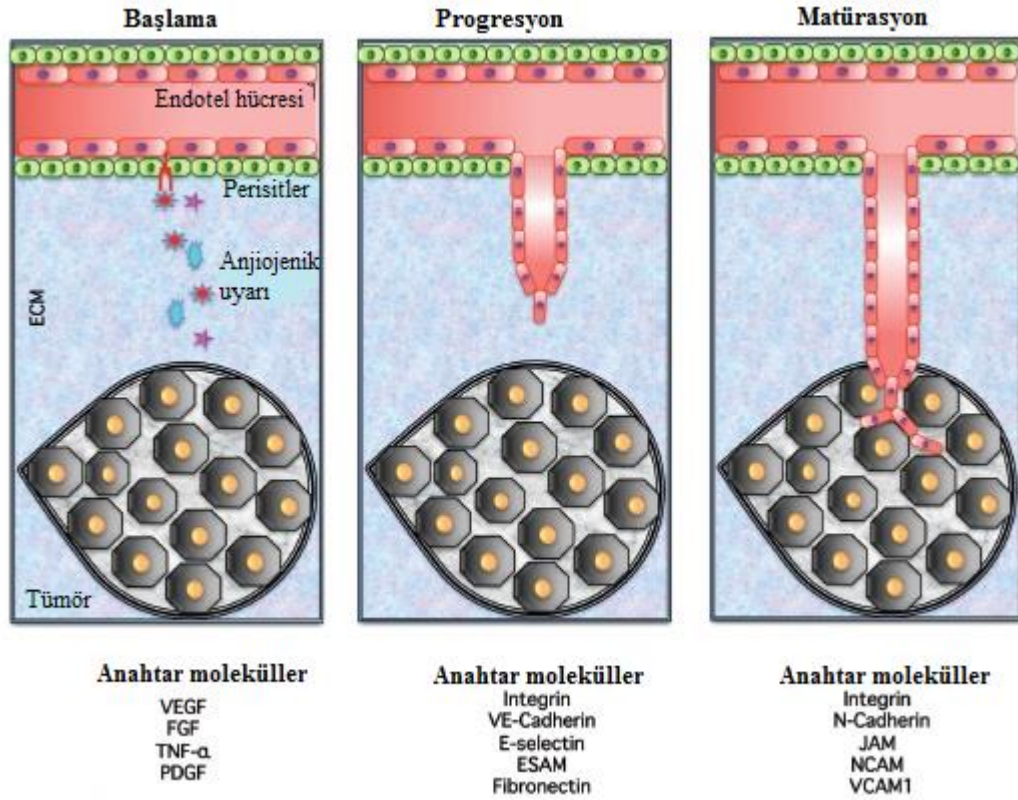
2019). Metastaz ile ilişkili EMT sürecinde tümör hücreleri bazal membran ve lamina propriayı aşp bağ dokuyu işgal eder ve farklılaşmış (diferansiye) hücreler farklılaşmamış (indiferansiye) hücrelere dönüşür. ECM bağlantısının kaybetmesi sonucu apoptoza (anoikiz) giden epitel hücrelerinin aksine tümör hücreleri primer tümörden ayrılmak için mekanizmalar geliştirirler. Bu süreçlerde epitelyal hücre-hücre adezyonunun ana proteini olan E-kaderin Slug, Snail, Twist ve ZEB-1/-2 gibi transkripsiyon faktörleri ile down-regüle olarak epitelin daha geçirgen olmasına yol açar (Thiery ve ark. 2009; Pacmayr ve ark. 2017). Kanser hücrelerinin EMT sürecinde E-kaderin ekspresyonu kaybolur, de novo N-kaderin ekspresyonu veya ekspresyonunda artış görülür. E-kaderin ekspresyonundaki kaybolma epitel hücreleri arasındaki bağlantıların, apiko-bazal hücre polaritesinin ve epitel doku yapısının bozulmasına neden olurken, N-kaderin ekspresyonundaki artış ise kanser hücrelerinin primer dokudan serbestleşmesinin, invazif kapasite kazanmasını kolaylaştırır (Mrozik ve ark. 2018). ‘Kaderin değişimi (cadherin-switch)’ olarak adlandırılan bu olay tümörün invazifliği ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Gheldof ve Berx, 2013). Meme, pankreas, akciğer, mesane gibi kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda normal E-kaderin ekspresyonu gösteren hücrelerin epiteloïd fenotip gösterdiği ve invazif olmadığı, düşük E-kaderin ekspresyonu gösterenlerin ise fibroblast benzeri fenotip gösterdiği ve invazif olduğu belirtilmiştir (Farahani ve ark. 2014). Bazal membran, integrin-aracılı hücre-matriks adezyonlarının sinyal iletimi süreçlerinde yer alması nedeniyle invazyonda önemli role sahiptir (Bissell ve Hines, 2011; Valastyan ve Weinberg, 2011). ECM degradasyonu sağlayan tümör hücreleri tarafından salgılanan Matriks Metaloproteinaz (MMP) proteinlerinin de süreçte yer alması ile ECM geçilir ve stromaya ulaşan tümör hücreleri burada çoğalır (Chiang ve ark. 2016; Pacmayr ve ark. 2017). EMT ile ilişkili moleküller ve sinyal yolları Şekil 2-12’de sunulmuştur. Stromaya geçen tümör hücrelerinin burada fibroblast, myofibroblast, endotel hücreleri, adiposit, makrofaj ve diğer immün sistem hücreleri ile karşılaşması ile stromada inflamasyon görülür (Joyce ve Pollard, 2009; Pacmayr ve ark. 2017).



Şekil 2-12: Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili moleküller ve sinyal yolları (Lee ve ark. 2017)

2.5.2. İntravazasyon

Tümör hücrelerinin salgıladığı MMP-1, -2, ve -9 ile birlikte proteolitik ürokinaz-tip plazminojen aktivatör sisteminin (uPA/uPAR) aktivasyonu ile kan ve lenf damarlarına girmesine intravazasyon adı verilir (Chiang ve ark. 2016; Pacmayr ve ark. 2017). İntravazasyon tümör hücrelerinin perisit ve endotel bariyerini aşmasını kolaylaştıran transforming growth factor-β (TGFβ) ve vascular endothelial growth factor (VEGF) gibi moleküller aracılığıyla hızlanır (Anderberg ve ark. 2013; Reymond ve ark. 2013). VEGF gibi moleküller aracılığıyla anjiogenezi başlar ve yeni damarlar oluşturularak çoğalan tümör hücrelerinin daha fazla besin ve oksijene ulaşması sağlanır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Hipoksi de anjiogenezi ile ilgili moleküler yolları tetikleyici bir faktördür. Hipoksik koşullarda aktive olan hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) ile anjiogenezi uyarıcı faktörler, anaerobik metabolizma, hücre motilitesi ve apoptoza karşı direnç sağlayan faktörler aktiflenir. HIF-1 ayrıca tümör hücrelerin organ spesifik yayılımını sağlayan bir kemokin reseptörü olan CXCR4 gen ekspresyonunu uyarır ve kollajen metabolizmasında etkili lizil oksidaz (LOX) enzimi ile etkileşir (Erler ve ark, 2006; Kozłowski ve ark. 2015). Tümör anjiogenezi ile ilgili moleküller Şekil 2-13’de sunulmuştur.



Şekil 2-13: Tümör anjigenezi ile ilişkili moleküller

2.5.3. Dolaşımda Sağkalım ve İlgili Organda Durma

Tümör hücrelerinin küçük bir kısmı dolaşımda hayatta kalıp metastaz oluşturabilir. Pek çok tümör hücresi hemodinamik güçler, anoikiz, sitotoksik immün sistem hücrelerinin saldırısı sonucu dolaşımdan uzaklaştırılır (Kozłowski ve ark. 2015). Tümör hücreleri normal hücre sağkalımında önemli olan integrin-bağımlı ECM adezyonu sağlayan moleküllerden yoksundur. Bu moleküllerden yoksun olan ve ECM'e tutunamayan epitel hücreleri anoikiz adı verilen apoptoz mekanizması ile dolaşımdan uzaklaştırılır (Paoli ve ark. 2013). Kanser hücreleri ise integrin gibi moleküllerde yaptıkları değişiklikler ile anoikize karşı direnç geliştirip dolaşımda varlıklarını sürdürebilirler (Valastyan ve Weinberg, 2011). Ayrıca kanser hücreleri doku faktörü, L-, P- Selektinler, trombin, Katepsin B, MMP-2/-14 gibi faktörler salgılayarak platelet agregasyonunu uyarıp kendilerine platelet kalkanı oluşturarak immün sistemden kaçarlar (Joyce ve Pollard, 2009; Valastyan ve Weinberg, 2011; Yan ve Jurasz, 2016).

Tümör hücreleri belirli organlara afinite gösterirler. Buna doku tropizmi adı verilir. Bunun sebeplerinden birisi her organ tarafından salınan belirli kemokinlerin uygun reseptörlerinin tümör hücresinde eksprese olmasıdır. Örneğin meme kanserinde

chemokine receptor -4 (CXCR4), -2 (CXCR2) eksprese eden tümör hücreleri bu reseptörün ligandının (CXCL12) daha çok bulunduğu organlara (akciğer, karaciğer, kemik iliği gibi) göç ederken ERBB eksprese edenler daha çok santral sinir sistemini tercih ederler (Weil ve ark. 2005; Sarvaiya ve ark. 2013; Pacmayr ve ark. 2017). Dolaşım sistemiyle ilgili organa ulaştıklarında durup o organın kan damarlarındaki endoteli geçip organa ulaşmaya çalışırlar (ekstravazyon).

2.5.4. Ekstravazyon (Transendotelyal Migrasyon, Tümör Hücresi Diapedezi)

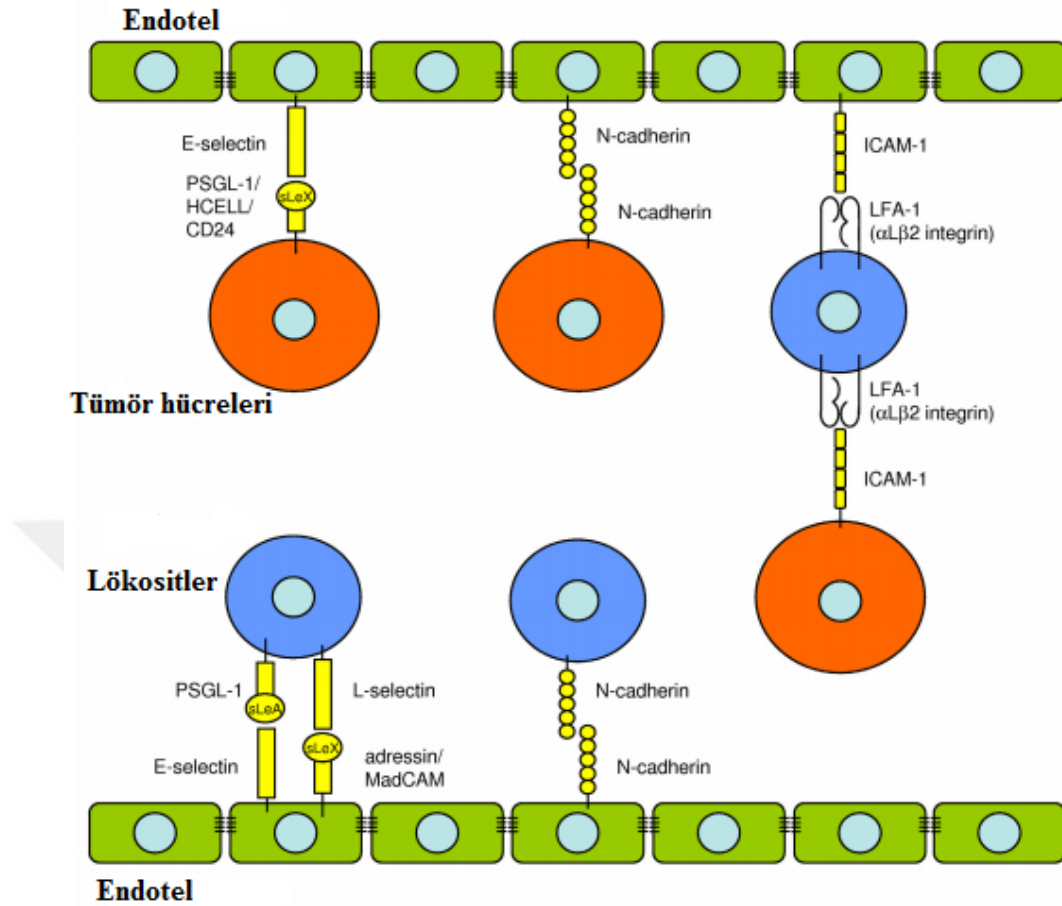
Dolaşımdaki tümör hücreleri ilgili organların damar sistemine ulaştıklarında lümen içinde büyüyerek mikro koloni oluştururlar ve sonunda damar duvarını delerek parankim dokuya ulaşırlar (DeNardo ve ark. 2009). Dolaşımdaki tümör hücrelerinin endoteli aşip organlara ulaşması ekstravazyon olarak adlandırılır. Primer tümör tarafından salgılanan vascular hyperpermeability like protein angiopoietinlike-4 (Angptl4) ve MMP-1/-2 gibi faktörler ile ekstravazyon süreci uyarılır (Valastyan ve Weinberg, 2011). Stromadaki CD4⁺ T lenfositler tümör-ilişkili makrofajları (TAM) uyararak karsinoma hücrelerindeki EGFR sinyal yolağını aktive ederler (DeNardo ve ark. 2009). Meme kanseri hücrelerinden salgılanan IL-4 ise TAM'lardaki katepsin proteaz aktivitesini uyararak karsinoma hücrelerinin invazyonunu artırır (Gocheva ve ark. 2010). Literatürdeki bu bulgular tümör hücrelerinin önce stromada inflamasyonu uyardığı sonra da oluşan inflamasyonu metastaz lehine kullandıklarını ortaya koyar.

Ektravazyon hem lökosit hem de tümör hücrelerinde üç aşamalı bir süreçtir; yuvarlanma, adezyon, vasküler endotelden geçiş (transmigrasyon, diapedez). Lökositler transmigrasyonda hem paraselüler (iki endotel hücresi arasından geçiş, hücreler arası bağlantılar bozulur) hem de transselüler (endotel hücresi içinden geçiş, hücreler arası bağlantılar bozulmaz) yolu kullanırlar, kanser hücreleri ise lökositlerden daha büyük oldukları için endotel arasına sıkışıp kalamazlar endotelyal bağlantıları bozarak paraselüler şekilde geçerler (Sökeland ve Schumacher, 2019). Lökositler tarafından oluşturulan inflamasyon sonucu endotel yüzeyinde E-ve P-selektin, lökosit yüzeyinde L-selektin eksprese edilir. Lökosit selektinler aracılığıyla endotele düşük affinite ile bağlanıp kan akımı yüzünden yuvarlanmaya başlar. MadCAM, PSGL-1 gibi moleküller yuvarlanma sürecinde rol oynar. Tümör hücresi ve lökosit ekstravazyonunda rol oynayan moleküller Şekil 2-14'de verilmiştir. Tümör hücrelerinde selektin ekspresyonu olmaz, onlar ligandları (N-kaderin) aracılığıyla veya lökositleri/plateletleri kullanarak

bağlanırlar (Şekil 2-15). Tümör hücrelerinde eksprese edilen ICAM-1/2 aracılığıyla lökositlerdeki $\beta 2$ integrinlere (LFA1, Mac-1) bağlanır ve böylece endotelde bulunan VE-kaderin fosforilasyona uğrayarak endotel arası bağlantılar gevşer. Bir yandan kemokinler aracılığıyla aktive olan integrinler (inside-out sinyalizasyon) yardımıyla endotel ile sıkı bağlantı gerçekleşirken (adezyon) bir yandan da lökosit/ tümör hücresi endotel arası bağlantıya sızar (transmigrasyon, diapedez). Adezyonda lökositlerde eksprese olan LFA-1 endotel sıkı bağlantılarından Jam-A ile, Mac-1 ise Jam-C ile, lökositlerdeki PECAM-1 de endoteldeki PECAM-1 ile etkileşime geçer. Tümör hücresi ve lökositlerde eksprese olan $\beta 1$ integrinlerden VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) ise endoteldeki VCAM-1, fibronektin ve Jam-B ile bağlanır (Strell ve Entschladen, 2008; Filippi, 2016). Tümör hücreleri ve lökositler farklı moleküller eksprese etseler de endoteldeki ligandları ve ekstrasvazasyon süreci benzerdir.

	Yuvarlanma	Adezyon	Diapedez
Tümör hücreleri	PSGL-1 – E-selectin HCELL – E-selectin CD24 – E-selectin CEA – E/L-selectin N-cadherin – N-cadherin ICAM-1/LFA-1 mediated rolling via leukocytes	$\alpha 4\beta 1/\beta 7$ – VCAM CD44v6 – galectin-3 Lamp1/2 – galectin-3 $\alpha v\beta 3$ – LI-CAM	N-cadherin – N-cadherin Apoptotic mechanisms
Lökositler	PSGL-1 – E-selectin HCELL – E-selectin CD24 – E-selectin L-selectin – peripheral lymph node adressin L-selectin – MadCAM N-cadherin – N-cadherin	LFA-1 – ICAM-1/2 Mac-1 – ICAM-1/2 LFA-1 – JAM-A Mac-1 – JAM-C VLA-1 – VCAM LI-CAM – VLA-5 glycosylated proteins – galectins	paraselüler JAM-C – JAM-B LFA-1 – JAM-A VLA-4 – JAM-B Mac-1 – JAM-C CD99 – CD99 PECAM-1 – PECAM-1 transselüler LFA-1 – ICAM-1 PECAM-1 – PECAM-1

Şekil 2-14: Lökosit ve tümör ekstrasvazasyonunda yer alan moleküller (Strell ve Entschladen, 2008)



Şekil 2-15: Lökosit ve tümör hücrelerinin endotele tutunması (Strell ve Entschladen, 2008)

2.5.5. Mikrometastaz Oluşumu

Metastaz oluşumu için karsinoma hücrelerinin kendine yabancı bir organın parankim dokusunda hayatta kalması esastır. Bunu sağlayabilmek için primer kanser hücreleri dolaşıma LOX gibi gidecekleri dokunun fibroblastlarından fibronektin gibi molekülleri uyaran, tümör oluşacak alanda VEGF-A, placental growth factor (PlGF), transforming growth factor- β (TGF β), S100A8/-9 gibi moleküllerin up-regülasyonunu uyaran sinyaller salgılayarak tümörün gelecekteki proliferasyon zemini olacak olan ‘metastatik niş’i oluştururlar (Kaplan ve ark. 2005; Erler ve ark. 2009; Valastyan ve Weinberg, 2011). Fibronektin reseptörü olan integrin $\alpha 4 \beta 1$ (CD49d/CD29, VLA-4, ITGA4) ve VEGF reseptörü (VEGFR1+) eksprese eden hematopoetik kök hücreler kemik iliğinden metastaz alanına doğru yola çıkarlar. Daha sonra bu hematopoetik hücreler MMP-9 gibi molekülleri salgılayıp diğer integrinleri de uyatarak karsinoma hücreleri için kemoatraktan ECM moleküllerden biri olan stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) gibi

moleküllerin salınımını gerçekleştirirler. Bu gibi predispozan değişiklikler ile gidilecek dokunun mikroçevresinde tümörün hayatta kalabileceği değişiklikler gerçekleştirilir (Psaila ve Lyden, 2009; Valasyan ve Weinberg, 2011).

2.5.6. Metastatik Koloni Oluşumu

Metastatik alanda daha önceden gerçekleşen EMT tersine dönerek mezenkimal-epitelyal dönüşüm gerçekleşir (MET) ve tümör hücreleri çoğalarak organda makro koloniler oluşturur (Sökland ve Schumacher, 2019). Kanser hastalarının %50'sinde makroskopik metastazlar gerçekleşir. Oluşan mikrometastazlar farklı dokulara dağılıp makroskopik metastazlar oluşturabilir. Ancak bu belli bir paternde gerçekleşmez (Pacmayr ve Treese, 2017). Tümör hücreleri bazen bulundukları yerde yıllarca sessizce yer alabilirler. Adaptif (edinsel) immünite sayesinde sessizleştirilerek bir süre ikincil bir tümör oluşumuna yol açamazlar ancak genetik modifikasyonlar ve mikroçevre ile etkileşerek, örneğin Snail gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile immünsupresyon görülür ve tümör zamanla metastatik hale dönüşebilirler (Farahani ve ark. 2014; Kozłowski ve ark. 2015). 1889'da Stephen Paget'in 'tohum ve toprak' teorisinde önerdiği gibi kanserli hücrelerin bir organa metastaz yapabilmesi o organın (toprak) kanser hücrelerinin (tohum) büyümesi için ne kadar elverişli olduğuna bağlıdır. Bazı organların mikroçevreleri tümör hücreleri için elverişli olmayabilir. Örneğin melanoma hücreleri akciğerin sub-kutanöz dokusuna kolayca metastaz yaparken doku ve damarsal yapı olarak buraya çok benzer olan böbrekteki sub-kutanöz dokuda yerleşemez (Valastyan ve ark. 2011).

2.6. FENOLİK BİLEŞENLER

Fenolik veya polifenolik bileşenler, bitkilerin büyüme ve üremesinde gerekli olan ve bitkiler tarafından patojen ve strese karşı koruma mekanizması olarak sentezlenen moleküllerdir (Yordi ve ark. 2012). Fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubu olan bir aromatik halkaya sahip bileşikler olarak tanımlanır ve yapıları, basit molekülden (fenolik asit), yüksek moleküler ağırlıklı kompleks polimerlere (tannin) kadar değişebilir (El Gharras, 2009; Yordi ve ark. 2012). En kabul edilen sınıflandırmada fenolik bileşikler flavonoidler ve flavonoid olmayan polifenoller olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır ve bu sınıflandırma literatürde yaygın olarak kullanılmıştır (De la Rosa ve ark. 2009). En sık rastlanan grup flavonoidler olmakla birlikte diğer önemli alt gruplar ise fenolik asitler-hidroksiaminik asit (kafeik, ferulik, p-kumarik asit), stilbenoidler (resveratrol ve

piceatannol), benzoik asit türevleridir (gallik ve ellajik asit) (Yordi ve ark. 2012). Tablo 2-3'te karbon atomlarına göre yapılan sınıflandırmada fenolik bileşenler ve bitkisel kaynakları verilmiştir.

Tablo 2-3: Bazı fenolik bileşenler ve bitkisel kaynakları

Kimyasal iskelet	Sınıf	Sınıfa ait örnek	Bitkisel kaynak
C6	Basit fenoller	Hidrokinon	Gayuba
C6-C1	Benzoik asitler	p-hidroksibenzoik asit	Beyaz şarap, Hindistan cevizi kabuğu
C6-C3	Hidroksinamik asitler	Kafeik asit	Elma, armut, kırmızı şarap
C6-C3	Kumarinler	Scopoletin	Yeşil çay, tarçın, dut
C6-C4	Naftokuinonlar	Vitamin K1	İspanak, tahıllar, lahana
C6-C2-C6	Stilbenoidler	Trans-resveratrol	Üzüm, fıstık
C6-C3-C6	Flavonoidler	Luteolin	Üzüm, zeytin
(C6-C3-C6)	Kondanse tanninler	Prosiyanidin	Üzüm, kırmızı şarap, vişne

(Yordi ve ark. 2012)

2.6.1. Fenolik Asitler-Hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitler

Fenolik asitler, gıda maddelerinde bulunan flavonoid olmayan polifenolik bileşiklerdir ve benzen halkasına bağlı bir karboksil grubu ile tanımlanır (Lafay ve Gil - Izquierdo, 2008). Benzoik ve sinamik asitler olmak üzere iki ana fenolik bileşikten türetilirler. Gallik, p-hidroksibenzoik ve vanillik hidroksibenzoik türevine örnek olurken kafeik, ferulik ve sinamik asitler, hidroksinamik asitlere aittir (Amarowicz ve ark. 2009).

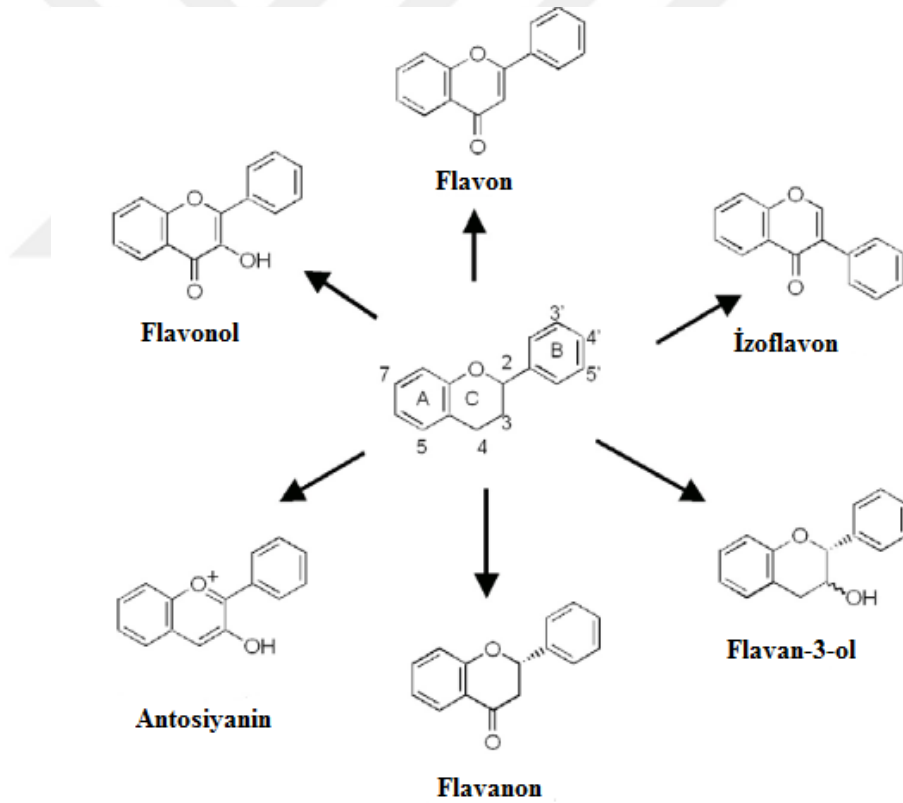
Hidroksisinamik asitler meyveler (özellikle kırmızı renkli olanlar), sebzeler, çay, kakao, şarap, çay yaprakları, kahve ve kepekli tahıllar dahil olmak üzere birçok gıda ürününde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (El Gharras, 2009).

Hidroksisinamik asitler ek olarak, fenilpropanoidler olarak da bilinen C6-C3 karbon iskeletlerine sahip fenolik bileşikler olan kurkuminoidleri, kumarinleri ve içerir. Kurkuminoidler arasında en çok çalışılan, kurkumindir (Tsuda, 2018). Kurkuminlerle ilgili birçok klinik çalışma yapılmış olup bu analizlere dayanarak, kurkuminin cilt hastalıkları, artritle ilgili hastalıklar, metabolik hastalıklar ve ve ülseratif kolit gibi birçok hastalıkta faydalı olabileceğine dair kanıtlar öne sürülmüştür (Pagano ve ark. 2018).

Hidroksibenzoik asitler, temel olarak kronik hastalıklarda antioksidan özellikleri nedeniyle bilinir. Epidemiyolojik çalışmalar, hidroksibenzoik asit alımı ile kardiyovasküler hastalıklar ve obezite riski arasında ters bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Guo ve ark. 2017).

2.6.2. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Flavonoidlerin temel yapısı, heterosiklik piron halkasına (C) bağlanmış iki benzen halkasını (A ve B) içerir. Flavonoidler, B ve C halkaları arasındaki bağlantıya, B halkasının yapısı ve üç halkanın hidroksilasyonu ve glikozilasyon modellerine bağlı olmalarına göre adlandırılırlar (Wang ve ark. 2018); flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinleri içeren farklı alt gruplara ayrılırlar (Şekil 2-16).



Şekil 2-16: Flavonoidler (Nishiumi ve ark. 2011)

Flavonlar en büyük gruplardan birini temsil eder ve temel yapı içinde fonksiyonel bir C2 = C3 çift bağına sahiptir. Flavonoidler sıklıkla farklı pozisyonlarda hidroksile, glikozile (şekere bağlı) veya metoksile şekilde bulunur. Polimerizasyon, konjugasyon ve fonksiyonel grupların yer değiştirmesindeki bu çeşitlilik, biyolojik ve farmakolojik faaliyetlerin geniş bir yelpazesini oluşturur (Wang ve ark. 2018).

Flavonoidlerin biyoyararlanımı farklı alt sınıflar arasında değişmektedir, ancak bunların birçoğunda oldukça zayıf olduğu, bu nedenle in vivo olarak etkili konsantrasyonlara ulaşmada bir engel olduğu gösterilmiştir. Yapısal özellikler, flavonoidlerin emilimini ve biyoyararlanımını belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, glikozitlerin absorpsiyonu genellikle aglikon muadillerinden daha düşüktür ve deglikosilasyon oranı, şekerlerin sayısı ve türü ile belirlenir (Izumi ve ark. 2000). Glikosilasyon tipi, flavonoidlerin bağırsaktaki hidrolizini etkiler. Örneğin C-glikozil flavonoidlerin hidrolizi, O-glikozitlere kıyasla daha az etkilidir. Hidroksile edilmiş formların aksine, O-metillenmiş flavonoidlerin gecikmeli emilimi ve membranlar boyunca geçirgenliği artırması sayesinde daha iyi biyoyararlanıma sahiptir (Hostetler ve ark. 2012).

Flavonoidler, meyve, sebze, baklagiller, çay, bitter çikolata vb. ile diyetle alınır. Bu yiyeceklerin bazı belirli kısımları flavonoidlerce daha zengindir (Li ve ark. 2014). Flavonoid içeren gıdaların alımı, farklı ülkelerin yemek kültürlerine bağlı olarak değişebilir. Örneğin, soya fasulyesi tüketimi oryantal kültürlerde tarihsel olarak ilişkilendirildiği için daha çok kullanılırken, çay tüketimi Birleşik Krallık, İrlanda veya Türkiye gibi ülkelerde daha yüksektir (Sanlier ve ark. 2018; Shukla ve ark. 2016).

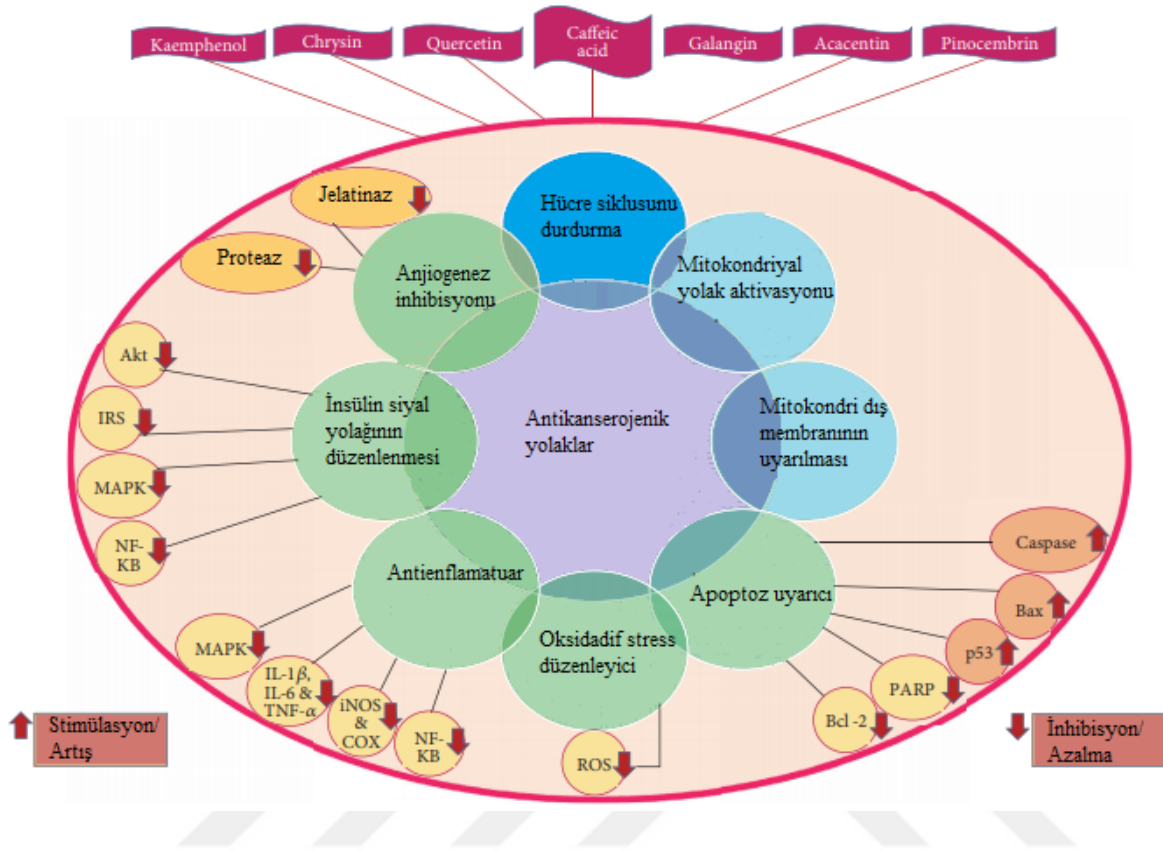
Flavonoidler bağırsakta yoğun şekilde metabolize edilir ve sonuç olarak metabolitleri karaciğere taşınarak burada metabolize olurlar. Karaciğerde oluşan metabolitler, hedef hücrelere taşınabilir, mikrobiyota tarafından aglikonlara hidrolize edilen safra atılımı yoluyla enterohepatik dolaşıma tekrar girebilir veya idrar veya dışkı yoluyla atılabilir. Bağırsakta emilim göstermeyen ve kolona ulaşan flavonoid metabolitleri, kolonik mikrobiyota ile bozunup yeniden emilebilir (Thilakarathna ve Rupasinghe, 2013). Flavonoidlerin biyoyararlanımı, belirli bir alt sınıfta daha çok olmasına rağmen genel olarak düşüktür (Hu ve ark. 2017). Bu yüzden bazı çalışmalarda, flavonoidlerin biyoyararlanımının, biyoyararlanımlarını sınırlayan enzimlerin inhibe edilmesi gibi farklı yaklaşımlarla iyileştirilmesine odaklanılmıştır.

2.7. FENOLİK BİLEŞENLERİN KANSER VE METASTAZDAKİ ROLLERİ

Diyetle flavanon alımının özofagus kanserini azalttığı, EGCC alımının sigara içen erkeklerde mide kanserini azalttığı, flavonoid alımının sigara içen erkeklerde pankreas kanseri riskini, izoflavon alımının erkeklerde ve postmenopozal kadınlarda kolon kanseri riskini düşürdüğü bildirilmiştir (Veeramuthu ve ark. 2017).

Zerdeçalda bulunan kurkumin ve yeşil çayda bulunan EGCG polifenollerinin farelerde melanoma hücreleri ile uyarılmış akciğer kanseri metastazını MMP enzimlerini inhibe ederek engellediği bildirilmiştir (Menon ve ark. 1999). Karadutta bulunan antosiyaninlerin akciğer kanseri hücrelerinde in vitro olarak MMP-2 ve uPA ekspresyonunu azaltırken TIMP-2 (matriks metaloproteinaz-2 inhibitörü) ve PAI (plazminojen aktivatör inhibitörü) ekspresyonunu arttırarak hücre migrasyonunu engellediği gösterilmiştir (Chen ve ark. 2006). Flavonollerden kuersetinin mide adenokarsinomu, karaciğer karsinomu ve akciğer adenokarsinomu hücrelerinde tirozin kinaz ve anjiogenez ile ilişkili basamakları inhibe ederek anti-metastatik etki gösterdiği belirtilmiştir (Tan ve ark. 2013).

Flavonoidlerin kanserde etki mekanizması tümörde hücre siklusunu durdurma, heat-shock protein (HSP) inhibisyonu, tirozin kinaz inhibisyonu, p53 down regülasyonu, Ras proteininde inhibisyon, protein kinazların inhibisyonu ile anjiogenezin inhibisyonu gibi mekanizmalarla olduğu belirtilmiştir (Veeramuthu ve ark. 2017). Polifenolik bileşenler açısından zengin propolisin kanseröz olmayan dokularda hidrojen peroksit üretimini sağlayarak anjiogenezi uyardığı kanserli dokularda ise yara iyileşmesi cevabını önleyerek, tümör hücrelerinin sağkalımını düşürerek ve jelatinaz, proteaz gibi enzimleri inhibe ederek anjiogenezi önlediği belirtilmiştir. Polifenolik bileşenler açısından zengin propolisin moleküler etki mekanizmaları Şekil 2-17’de verilmiştir.



Şekil 2-17: Propolisin etkilediği moleküler basamaklar (Pasupuleti ve ark. 2017)

Epidemiyolojik çalışmalar ve sistematik analizler flavonoidler bakımından zengin diyetlerin meme kanseri riski ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir (Hui ve ark. 2013; Sak, 2017). Flavonoidlerin sadece kanser hücrelerini değil aynı zamanda tümör mikro çevresinin diğer bileşenlerini de modüle etme kabiliyeti ile meme kanserinin önlenmesi ve tedavisi için ilgi çekici bir konu olmuştur (Parihar ve ark. 2015). Flavonoidlerin kanserdeki sağlığa faydalı etkileri, esas olarak kanser hücrelerine odaklanmakta, tümörle ilişkili genlerin düzenlenmesini, sinyal yollarını, metastazı ve apoptoza direncini anlamayı amaçlamaktadır (Madunic ve ark. 2018; Nguyen ve ark. 2017). Bununla birlikte, flavonoidlerin tümör mikro çevresini modüle etmesi ile tümör gelişimini, ilerlemesini ve metastazını durdurmak için birçok yolda etkili olduğu görülmüştür (Wang ve ark. 2017). Meme kanseri tümör mikro çevresinin ana bileşenleri olan adipositler ve bunların kanser hücreleri ile etkileşimi meme kanserinin ilerlemesi ve invazyonunda (Hoy ve ark. 2017), anormal gen ekspresyon profillerinin indüksiyonunda

(Nickel ve ark. 2018) ve terapötik dirençte (Bougaret ve ark. 2018) rol oynar. Flavonoidler adipogenezi inhibe edebilir, obezite ve obezite ile ilişkili kanseri azaltabilir (Hsu ve Yen, 2007). T hücrelerinin, apigenin (Xu ve ark. 2008), dendritik hücrelerin kuersetin (Huang ve ark. 2010) tarafından modülasyonu, immün sistemin baskılanması ve inflamasyonun üstesinden gelinmesi için çok önemli olabilir (Bauer ve ark. 2017). Bu nedenle, flavonoidlerin sadece kanser hücrelerini değil aynı zamanda diğer tümör mikro çevre ortaklarını da modüle etme kabiliyeti, onların meme kanserini önleme ve terapötik ajan olarak kullanılmasında eşsiz bir molekül olabileceklerini göstermektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar hava kabini (Nuaire), inkübatör (Thermo Scientific), ışık mikroskobu (Olympus CKX41), vorteks (Velp Scientifica), su banyosu (Mettler), +4 (Bosch), -20 (Bosch), ve -80 °C buzdolapları, sıvı azot tankı, spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Spectrum), 15, 50, 1,5 ml tüpler için santrifüjler (Thermo Scientific Heraeus Labofuge ve Biofuge Pico), hücre sayım cihazı (Beckman Coulter, Vi-Cell Xr), NanoDrop™ 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific), PCR cihazı (BioRad), Real-Time PCR cihazı (Roche LightCycler® 480), 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl pipetörler (Eppendorf), serolojik pipet için pipetör

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

75 ve 25 cm² flasklar (Sarstedt), 1, 5, 10, 25 ml serolojik pipetler (Sarstedt), pipet uçları (Eppendorf), 96 kuyucuklu plakalar (Sarstedt), 6 kuyucuklu plakalar (Greiner), 500 ml'lik 0,22 µm'lik vakumlu filtre sistemi (Corning), hücre kazıyıcı (cell scraper) (Sarstedt), 1,5 ml eppendorf tüpler, 15 ve 50 ml konik tüpler (Sarstedt), Vi-Cell hücre sayım tüpleri, 25-gauge enjektör, 0,2 ml PCR tüpleri, 96 kuyucuklu Real-Time PCR plakaları (Roche), optik adhesiv kapatıcı (seal) (Roche) ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).

3.3. Mediumların ve Deneyde Kullanılan Diğer Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. MCF-10A Hücre Hattı için %10'luk DMEM/F12 Mediumu (Bullet)

Hazırlığı

500 ml DMEM/F12 (L-Glutamin içermeyen) (Biosera) medyumuna içerisine 5ml L-Glutamin (%1) (Biosera), 5 ml Penisilin (%1) (Biosera), 50 ml FBS (Biosera), 50 µl kolera toksini (100 ng/ml) (Sigma-Aldrich), 500 µl insülin (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich), 250 µl hidrokortizon (0,5 µg/ml) (Sigma-Aldrich), 500 µl Amfoterisin (Sigma-Aldrich), 150 µl EGF (PeproTech) konularak 500 ml'lik 0,22 µm porları olan filtreden geçirildi.

3.3.2. MCF-7 Hücre Hattı için %10'luk DMEM Mediumu Hazırlığı

500 ml DMEM (L-Glutamin içermeyen, Yüksek oranda Glikoz içeren) (Biosera) medyumuna içerisine 5ml L-Glutamin (%1), 5 ml Penisilin (%1), 50 ml FBS konularak 0,22 µm porları olan filtreden geçirildi.

3.3.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı için %10'luk DMEM/F12 Mediumu

Hazırlığı

500 ml DMEM/F12 (L-Glutamin içermeyen) medyumuna içerisine 5ml L-Glutamin (%1), 5 ml Penisilin (%1), 50 ml FBS, konularak 0,22 µm porları olan filtreden geçirildi.

3.3.4. Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) Çözeltisi Hazırlığı

Üreticinin belirttiği şekilde 500 ml distile suya 5 tablet PBS (Amresco) atılarak çözünmesi sağlandı ve 500 ml'lik 0,22 µm porları olan filtreden geçirildi.

3.3.5. Polifenolik Bileşenlerden Oluşan Kokteylin Hazırlanması

Apigenin, Luteolin, Epigallocateşin 3-gallat (EGCG) gibi polifenolik maddelerin herbiri %60'lık etil alkolde çözündürülerek 500 µg/ml konsantrasyonda ana stok olarak hazırlandı ve -20 °C dondurucuda saklandı. Daha önceki çalışmalarımızda (İ.Ü. BAP 6043, İ.Ü. BAP 28301, İ.Ü. BAP 22858) (patent aşamasında) belirlenen oranlarda polifenolik maddeler eklenerek %3 fetal sıgır serumu (FBS) içeren medium ile karışım hazırlandı.

3.4. Hücrelerin Çoğaltılması

3.4.1. Hücre Ekimi

ATCC'den temin edilen hücreler 25 cm² flasklara uygun %10'luk medyum içerisine 6 ml toplam hacim içerisine ekildi. Ekilen flasklar 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂'li ve nemli inkübatörde çoğaltıldı. %80 konfluent olan hücreler 25 cm² flasktan kaldırılarak 75 cm² flaska 10 ml toplam hacim içerisine geçirildi (pasajlandı).

3.4.2. Hücrelerin Kaldırılması ve Sayılması

Hücreler flasklardan kaldırılırken hücreler 25 cm² flask için 3 ml, 75 cm² flask için 4 ml PBS ile yıkandı. 25 cm² flaska 2 ml, 75 cm² flaska 3 ml Tripsin-EDTA (Biosera) konulup 5dk 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂'li ve nemli inkübatörde bekletildi. Tripsin-EDTA inhibisyonu için konulan Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar FBS içeren medyum konuldu. 100 µl hücre ve medyum karışımı 400 µl medyum ile Vi-Cell sayım tüplerine konuldu ve Vi-Cell cihazında sayım yapıldı. Dilüsyon faktörü (x5) ile çarpılıp toplam hacimdeki hücre sayısı hesaplandı. Flask içeriği 15 ml konik tüp içerisine konularak 1500 rpm hızda 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp pellet istenen hücre sayısına göre uygun medyum ile yeniden süspansiyon edildi.

3.5. Hücrelerin Dozlanması ve WST-1 ile Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

WST-1 analizi, tetrazolyum tuzunun canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla sarı renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır. Canlı hücre sayısındaki artış ile formazan oluşumu doğru orantılı olup oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak belirlenir. WST-1 analizi için hücreler 96-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 µl'de 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve çoğalmaları için 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂'li ve nemli inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin kuyucuklarda çoğaldığı invert mikroskopta bakılıp kontrol edildikten sonra medyumları çekildi ve polifenolik kokteylin (PK) hücrenin uygun medyum ile hazırlanmış %5, %20, %35, %50, %75 ve %100'lük dozları kuyucuklara toplam hacim 100 µl olacak şekilde uygulandı. Her doz ve kontrol 3 tekrarlı çalışıldı. Kuyucuklara 10 µl Cell Proliferation Reagent Kit (WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium sodium salt)) (Roche) eklenip 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂'li ve nemli inkübatörde 3 saat inkübasyon sonrası polifenolik kokteylin yukarıda belirtilen dozlarının uygulanmasını takiben 24., 48. ve 72. saatlerinde 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm alındı.

3.6. RNA İzolasyonu (Exiqon miRCURY™ RNA izolasyon kiti (Cell&Plant), kat# 584382)

Her hücre hattı için 3 tekrarlı %20'lik polifenolik kokteyl uygulanacak (dozlu) ve uygulanmayacak (dozsuz, kontrol), 0.ve 48.saat RNA izolasyonu yapılacak şekilde toplamda 12 adet 25 cm² flasklara her birinde 5 ml %3 FBS içeren medyum ile 3×10^6 hücre ekildi. 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyon yapıldı. 24 saat sonra medyum uzaklaştırıldı ve doz uygulanacak flasklara 5 ml %20lik polifenolik kokteyl, kontrol flasklarına sadece %3 FBS içeren medium konuldu. 0. ve 48. saat RNA izolasyonu öncesi flask içeriği uzaklaştırılıp hücreler 3 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırılarak 350 µl Lizis buffer konuldu. Flask yüzeyi hücre kazıyıcı ile kazındı ve flask içeriği 1,5 ml eppendorf tüpe aktarıldı. 200 µl absolü alkol konularak 10 sn vortekslendi. Elde edilen lizat genomik DNA'nın parçalanması için 25-gauge enjektörden geçirildi. 600 µl hücre lizatı alınarak spin kolonlara yüklendi ve 2200 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı kalan kolonlar 5000 rpm'de 1 dk tekrar santrifüj edildi. Spin kolonlara 400 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) konulup 4450 rpm'de 2 dk santrifüj işlemi yapılarak kolonlar yıkandı. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edildi. Resinin kuruması için tüpler boş şekilde 4550 rpm'de 2 dk daha santrifüj edildi. Kolonlar 1,5

ml'lik eppendorf tüplere transfer edilerek üzerine 50 µl Elution buffer konulması takiben 4450 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek RNA elde edildi. NanoDrop™ spektrofotometrede RNA konsantrasyon ve saflık ölçümleri gerçekleştirildi ve RNA tüpleri -80 °C dondurucuda saklandı.

3.7. cDNA Çevrimi (iScript™ cDNA Sentez Kiti, kat# 1708890, Bio-Rad)

En düşük konsantrasyondaki RNA'ya göre (27,7 ng/µl) tüm RNA konsantrasyonları eşitlenerek 0,2 ml PCR tüplerine reaksiyon başına 1 µl iScript revers transkriptaz, 4 µl iScript reaksiyon karışımı ve toplamda 15 µl RNA ve nükleaz içermeyen (nuclease free) su konularak toplam hacim 20 µl olacak şekilde Tablo 4'te verilen protokol ile PCR cihazında cDNA çevrimi gerçekleştirildi:

Tablo 3-1: cDNA çevrimi için PCR cihazı termal profili

Primerin Bağlanması	25 °C'de 5 dk
Revers Transkripsiyon (RT)	46 °C'de 20 dk
RT İnaktivasyonu	95 °C'de 1 dk

Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.8. Real-Time PCR ile Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

96 kuyucuklu Real-Time PCR plakalarına reaksiyon başına 1 µl TaqMan® JAM-A, LFA-1 ve VLA-4, GAPDH (endojen kontrol) problemleri (20x konsantre) (Thermo Fisher Scientific) ve 10 µl Real-Time PCR master miks (2x konsantre) (Jena Bioscience), 2 µl cDNA ve 7 µl DNaz içermeyen (DNase free) steril su konularak ve plaka optik adhesiv kapatıcı ile kapatılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde aşağıdaki (Tablo 5) termal profil kullanılarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3-2: Gen ekspresyonu için Real-Time PCR cihazı termal profili

Denatürasyon ve Taq polimeraz aktivasyonu	95 °C’de 2 dk	1 siklus
Denatürasyon	95 °C’de 15 sn	40 siklus
Primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongation)	60 °C’de 1 dk	

Real-Time PCR cihazı ile gen primer-problarının verdiği Ct (Cycle Treshold) (gen ifadesinin görüldüğü ilk PCR döngüsü) değerlerine göre aşağıdaki hesaplama yapıldı:

ΔCt (örnek) = Ct (örnek, ilgili gen (JAM-A, LFA-1, VLA-4)) - Ct (örnek, endojen kontrol geni (GAPDH))

Yukarıdaki hesaplama hem %20 dozlu fenolik bileşen uygulanmış hem de uygulanmamış olanlara (dozsuz, kontrol) her biyolojik tekrar için ayrı ayrı yapıldı. 0. ve 48. saat kontrollerin ortalama ΔCt değeri hesaplandı. Aşağıdaki hesaplama ile 0. ve 48. saat $\Delta\Delta Ct$ değerleri bulundu.

ΔCt (dozlu) - ΔCt ort (dozsuz, kontrol) = $\Delta\Delta Ct$ (kat değişimi (fold change))

Ekspresyon görülmemiş olanlara $\Delta\Delta Ct$ hesaplayabilmek için Ct değeri olarak 45 verildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile dozsuz (kontrol) göre %20 doz uygulanmış hücrelerdeki ilgili genin ifadesindeki kat olarak artış veya azalışlar belirlendi.

3.9. Yara iyileşmesi (Scratch) testi ile hücre migrasyonun belirlenmesi

6 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde uygun sayıda hücre (yaklaşık olarak 5×10^5) 2 ml %10 medyum ile ekildi. Hücreler %80-100 konfluent olduklarında scratch öncesi %0 medyum konularak 24 saat hücreler aç bırakıldı. 200 µl pipet ucu (sarı uç) ile düz olması için cetvel kullanarak dikey çizik atıldı. Medyum çekilip, 2 kez 1 ml PBS ile yıkama yapıldı ve oluşan çizğin yeri işaretlendi. Kontrol kuyucukları hariç kuyucuklara MCF-7 ve MCF-10A için fenolik bileşenin %5’lik ve %10’luk, MDA-MB-231 için fenolik bileşenin %5’lik ve %35’lik dozu %3’lük medyum ile 2 ml total hacimde

uygulandı. Kontrol kuyucuklarına sadece 2 ml %3'lük medyum konuldu. Belirlenen saatlerde (0, 4, 8, 24 ve 48. saat) işaretli yerden 10X büyütmede fotoğraf çekimi yapıldı. Image J programı ve ‘MRI wound healing tool’ uygulaması (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool) çizik sonucu oluşturulan boşluğun alanı saatlere göre hesaplanarak boşluğun kapanma yüzdesi belirlendi.

3.10. İstatistiksel Analiz

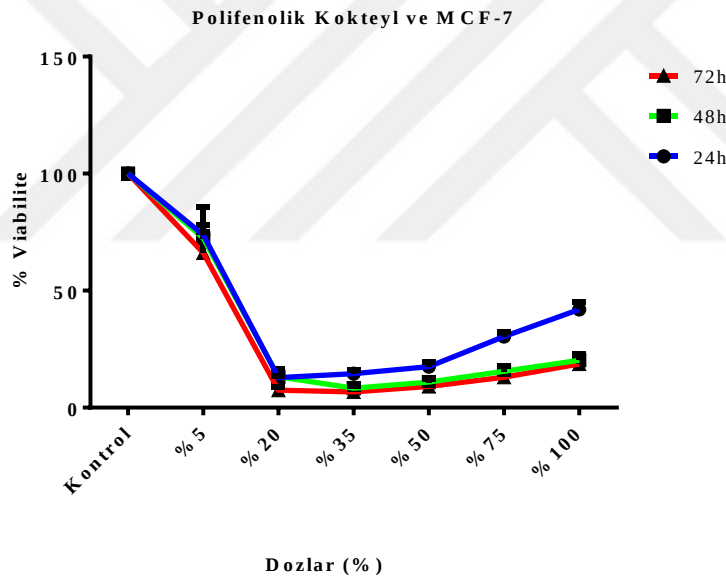
İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 6 programı kullanılmıştır. MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 hücre hatlarına uygulanan polifenolik kokteylin hücre canlılığına, gen ekspresyonlarına (ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerlerinin karşılaştırılması) ve hücre migrasyonuna (% kapanma) etkisi Two-Way Anova testi kullanılarak yapılmıştır. Dozların farklı konsantrasyonları uygulanmış ve doz uygulanmamış hücreler Tukey ve Sidak testleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol hücrelerindeki gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler One-Way Anova, Dunnetts test ve t-test kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı WST-1 Deneyi Bulguları

4.1.1. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi

Hazırladığımız polifenolik kokteylin farklı dozları kokteyl uygulanmamış MCF-7 hücreleri (kontrol) ile karşılaştırıldığında her üç saatte de %5’lik dozdan itibaren sitotoksik etki gözlenmiş ve %20’lik dozdan itibaren tüm saatlerde hücre canlılığında önemli derecede bir azalma görülmüştür (Şekil 4-1). Polifenolik kokteylin tüm dozlarının kontrollere göre hücre canlılığına olumsuz etkisi tüm saatler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4-1).



Şekil 4-1: Polifenolik kokteylin MCF-7 hücrelerinin canlılığına etkisi

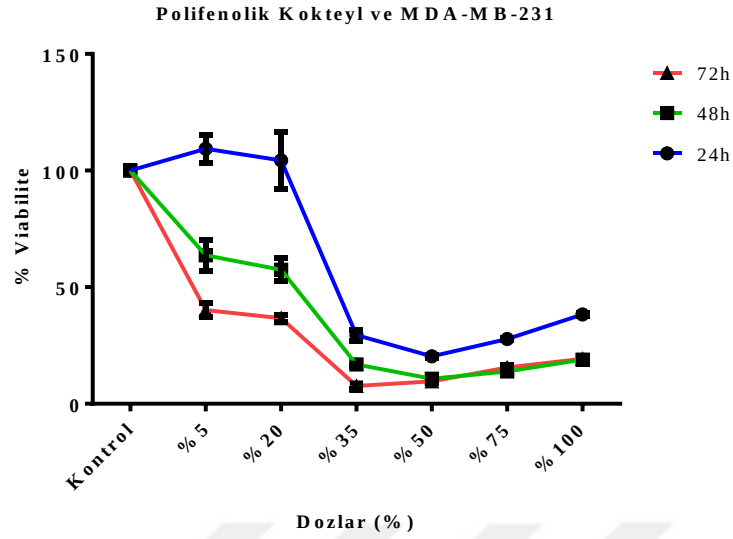
Tablo 4-1: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-7 hücrelerindeki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

% PK	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p-değeri	Ort.±SD	p-değeri	Ort.±SD	p-değeri
%5 PK	73,86±11,87	< 0,0001*	72,38±2,66	< 0,0001*	66,12±11,98	< 0,0001*
%20 PK	12,80±0,79	< 0,0001*	13,17±3,36	< 0,0001*	7,49±1,43	< 0,0001*
%35 PK	14,56±1,32	< 0,0001*	8,31±0,71	< 0,0001*	6,71±1,20	< 0,0001*
%50 PK	17,49±2,12	< 0,0001*	10,96±1,28	< 0,0001*	9,06±0,78	< 0,0001*
%75 PK	30,40±2,04	< 0,0001*	15,58±2,27	< 0,0001*	12,99±1,52	< 0,0001*
%100 PK	41,98±3,36	< 0,0001*	20,22±2,86	< 0,0001*	18,68±1,62	< 0,0001*

İstatistiksel analiz Two-way Anova (Tukey) testi ile yapılmıştır. * p <0,05.

4.1.2. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi

MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattında 24. saatten itibaren sitotoksik etki başlamış ve IC50 dozu (hücrelerin yarısında sitotoksik etki yapan doz) polifenolik kokteylin %20-%35 dozları arasında olduğu belirlenmiştir. 48. ve 72. saatlerde sitotoksik etki %5 dozundan başlamış olup 48. saat için IC50 aralığı yine %20-%35 aralığında tespit edilirken 72. saatte %5 oranında gözlemlenmiştir (Şekil 4-2). Polifenolik kokteylin %20’lik dozunun 24. saat uygulaması dışında tüm dozlar ve saatlerde hücre canlılığında kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Tablo 4-2).



Şekil 4-2: Polifenolik kokteylin MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkisi

Tablo 4-2: Polifenolik kokteylin saatlere göre MDA-MB-231 hücrelerindeki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

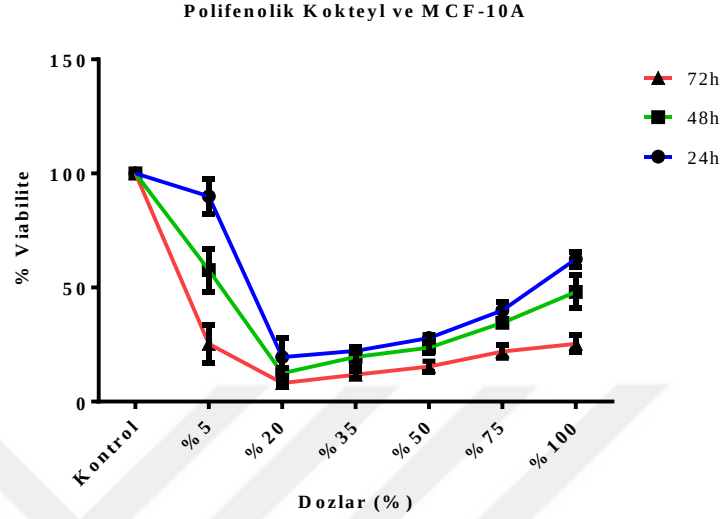
% PK	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p-değeri	Ort.±SD	p-değeri	Ort.±SD	p-değeri
%5 PK	109,35±6,04	0,0113*	63,69±6,77	< 0,0001*	40,16±3,00	< 0,0001*
%20 PK	104,32±12,11	0,6327	57,47±4,98	< 0,0001*	36,68±1,52	< 0,0001*
%35 PK	29,44±2,34	< 0,0001*	16,88±0,47	< 0,0001*	7,70±1,20	< 0,0001*
%50 PK	20,36±0,77	< 0,0001*	10,74±0,88	< 0,0001*	9,59±0,55	< 0,0001*
%75 PK	27,75±0,36	< 0,0001*	13,88±0,65	< 0,0001*	15,53±1,04	< 0,0001*
%100 PK	38,27±0,49	< 0,0001*	18,91±0,24	< 0,0001*	19,34±1,32	< 0,0001*

İstatistiksel analiz Two-way Anova (Tukey) testi ile yapılmıştır, * p<0,05.

4.1.3. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi

MCF-10A hücre hattında her üç saatte de %5 doz oranından itibaren sitotoksik etki gözlenmiştir. %20'lik dozdan itibaren tüm saatlerde hücre canlılığında ciddi bir

azalma görülmüştür (Şekil 4-3). Polifenolik kokteylin tüm dozlarının kontrollere göre hücre canlılığına olumsuz etkisi tüm saatler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4-3).



Şekil 4-3: Polifenolik kokteylin MCF-10A hücrelerinin canlılığına etkisi

Tablo 4-3: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-10A hücrelerindeki etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

% PK	% Hücre Canlılığı 24.Saat		% Hücre Canlılığı 48.Saat		% Hücre Canlılığı 72.Saat	
	Ort.±SD	p-değeri	Ort.±SD	p-değeri	Ort.±SD	p-değeri
%5 PK	89,94±7,87	0,0397*	57,61±9,33	< 0,0001*	25,28±8,38	< 0,0001*
%20 PK	19,52±8,50	< 0,0001*	12,41±2,24	< 0,0001*	8,15±1,25	< 0,0001*
%35 PK	22,21±1,14	< 0,0001*	19,62±4,33	< 0,0001*	11,80±1,44	< 0,0001*
%50 PK	27,86±1,54	< 0,0001*	23,64±2,43	< 0,0001*	15,36±2,39	< 0,0001*
%75 PK	39,95±3,50	< 0,0001*	34,57±1,08	< 0,0001*	21,91±2,91	< 0,0001*
%100 PK	62,42±3,21	< 0,0001*	48,11±7,18	< 0,0001*	25,31±3,71	< 0,0001*

İstatistiksel analiz Two-way Anova (Tukey) testi ile yapılmıştır, * p<0,05

4.2. Polifenolik Kokteylin Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi (Real-Time PCR Sonuçları)

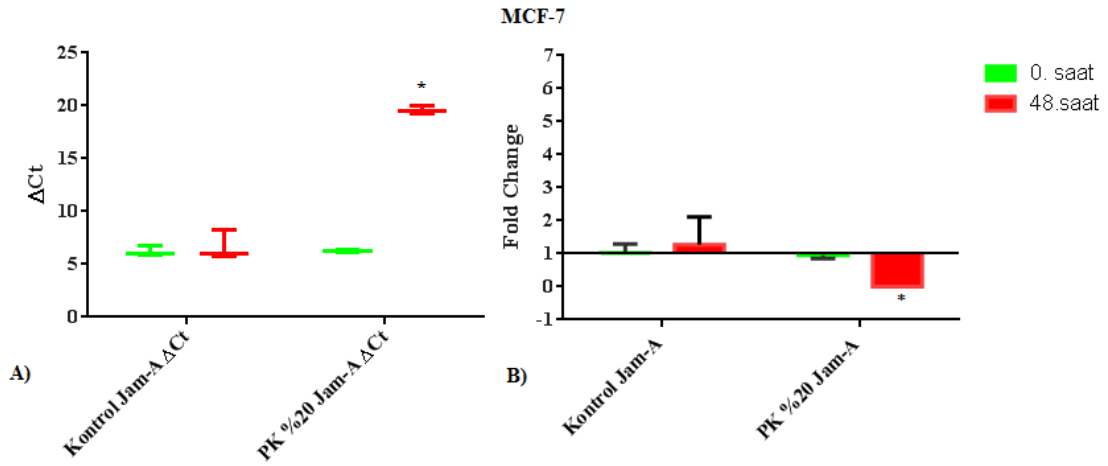
4.2.1. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Hücrelerinde Jam-A Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

0. ve 48. saat ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada %20 polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde Jam-A gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p=0,0001$) (Şekil 4-4A). 48. saatte MCF-7 kontrol hücrelerinde Jam-A gen ekspresyonu devam ederken polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde Jam-A gen ekspresyonu belirlenemeyecek seviyededir. Azalmadaki değişimi hesaplayabilmek için Ct değeri 45 alınmıştır (Tablo 4-4). Buna göre polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir downregülasyon görülmektedir (Şekil 4-4B).

Tablo 4-4: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 Hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MCF-7	Jam-A Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	ΔCt Ort.±SD	ΔCt p- değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort.±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort.±SD
Kontrol (0.h)	30,68±0,81	24,45±1,21	6,22±0,40		4,967054E-009 ±0,40		1,02±0,26
PK %20 (0.h)	28,97 ±1,42	22,33±1,07	6,29±0,15		0,06±0,15		0,95±0,10
Kontrol (48.h)	32,41±1,40	25,78±0,46	6,63±1,38	0,988	-1,390775E-007 ±1,38	>0,999	1,27±0,83
PK %20 (48.h)	45±0*	25,42±0,40	19,57±0,40	0,0001 **	12,93±0,40	0,0001**	1,306E-004 ±3,507E-005

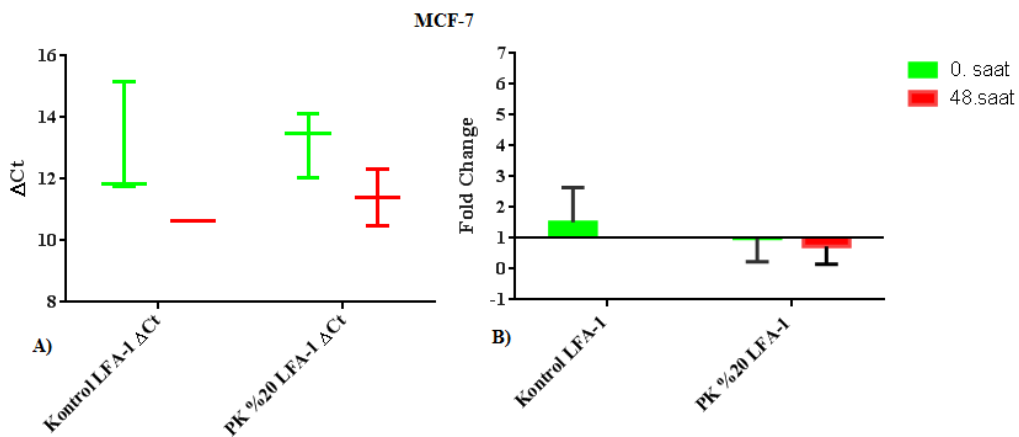
Two-Way Anova, Sidak testi, *ekspresyon görülmedi, ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ hesaplayabilmek için Ct değeri 45 alındı, ** $p<0,05$



Şekil 4-4: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi, * $p < 0,05$

4.2.2. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Hücrelerinde LFA-1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonunun downregüle olduğu görülmektedir (Şekil 4-5B), ancak ΔC_t ve $\Delta \Delta C_t$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4-5A) (Tablo 4-5).



Şekil 4-5: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

Tablo 4-5: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 Hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MCF-7	LFA-1 Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort. ±SD	ΔCt Ort. ±SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort. ±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort. ±SD
Kontrol 0h	37,37±0,77	24,45±1,21	12,91±1,93		3.576279E-007±1,93		1,51±1,12
PK %20 0h	35,54±0,25	22,33±1,07	13,20±1,07		0,29±1,07		0,99±0,76
Kontrol 48h	36,32±0	25,78±0,46	10,66±0	0,388	0±0	>0,999	1±0
PK %20 48h	37,79±1,85	25,42±0,40	11,39±1,28	0,371	0,73±1,28	0,990	0,72±0,57

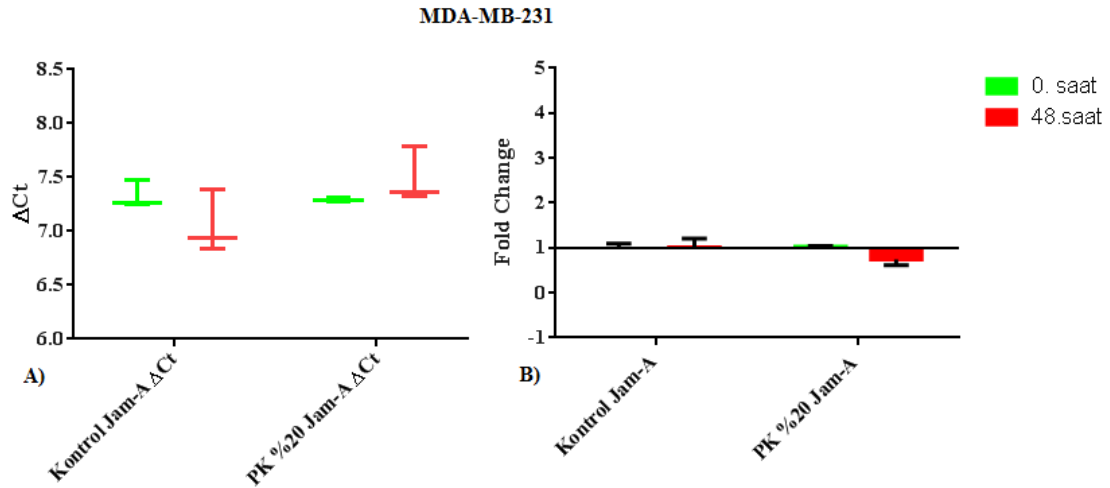
Two-Way Anova, Sidak testi

4.2.3. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Hücrelerinde VLA-4 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

MCF-7 hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonu görülmemiştir.

4.2.4. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Hücrelerinde Jam-A Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonunda downregülasyon görülse de (Şekil 4-6B) ancak ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-6A) (Tablo 4-6).



Şekil 4-6: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

Tablo 4-6: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MDA-MB-231	Jam-A Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	ΔCt Ort.±SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort.±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort.±SD
Kontrol (0.h)	28,28±0,54	20,95±0,67	7,33±0,13		2,484E-009±0,13		1,00±0,08
PK %20 (0.h)	28,17±0,12	20,88±0,10	7,29±0,02		-0,04±0,02		1,02±0,01
Kontrol (48.h)	27,63±1,18	20,57±0,88	7,05±0,29	0,997	2,484E-009±0,29	>0,999	1,01±0,19
PK %20 (48.h)	29,81±0,27	22,31±0,08	7,49±0,25	0,999	0,44±0,25	0,927	0,74±0,12

Two-Way Anova, Sidak testi.

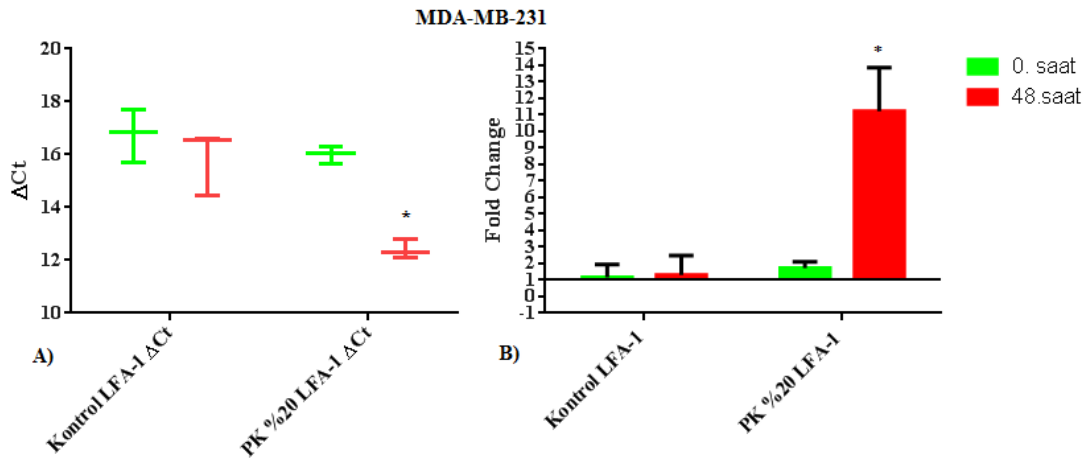
4.2.5. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Hücrelerinde LFA-1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

MDA-MB-231 hücrelerinde 0. ve 48. saat ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada %20 polifenolik kokteyl uygulanan grupta LFA-1 geni ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 4-7A, Tablo 4-7). Polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni upregüle olmaktadır (Şekil 4-7B).

Tablo 4-7: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MDA-MB-231	LFA-1 Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	ΔCt Ort.±SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort.±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort.±SD
Kontrol (0.h)	37,71±1,21	20,95±0,67	16,75±0,99		1,043E-007±0,99		1,17±0,78
PK %20 (0.h)	36,87±0,21	20,88±0,10	15,99±0,31		-0,76±0,31		1,72±0,38
Kontrol (48.h)	36,43±1,70	20,57±0,88	15,85±1,22	0,325	1,192E-007±1,22	>0,999	1,29±1,19
PK %20 (48.h)	34,71±0,39	22,31±0,08	12,39±0,35	<0,0001*	-3,46±0,35	<0,0001*	11,22±2,64

Two-Way Anova, Sidak testi, * $p<0,05$



Şekil 4-7: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi, * $p<0,05$.

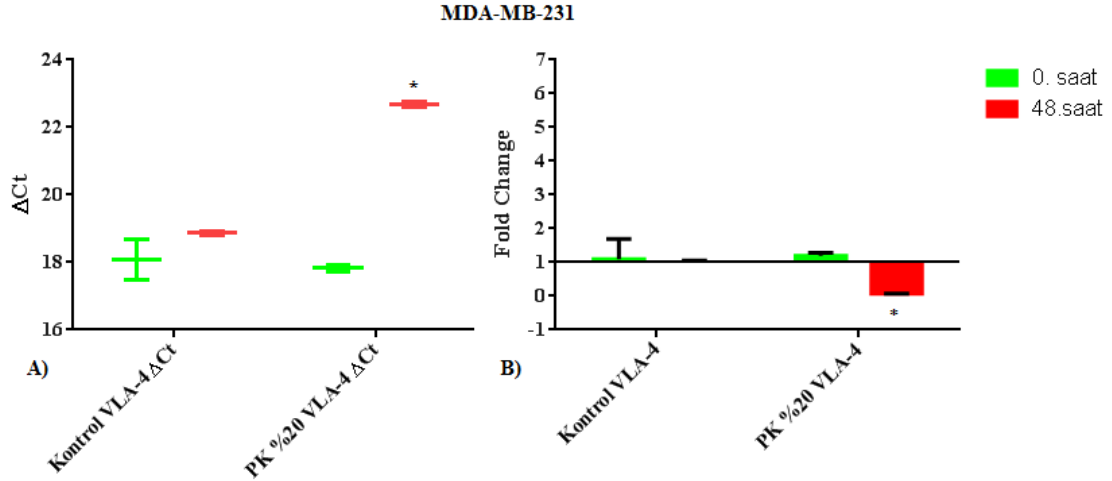
4.2.6. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Hücrelerinde VLA-4 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

0. ve 48. saat ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada %20 polifenolik kokteyl uygulanan grupta VLA-4 geni ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 4-8A). 48. saatte MDA-MB-231 kontrol hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonu devam ederken polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde VLA-4 geni ekspresyonu belirlenemeyecek kadar az bulunmuştur. Azalmadaki değişimi hesaplayabilmek için Ct değeri 45 alınmıştır (Tablo 4-8). Buna göre polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre VLA-4 geni ekspresyonunun downregüle olduğu görülmüştür (Şekil 4-8B).

Tablo 4-8: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MDA-MB-231	VLA-4 Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	ΔCt Ort.±SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort.±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort.±SD
Kontrol (0.h)	38,86±0,01	20,95±0,67	18,07±0,84		0,00±0,84		1,08±0,60
PK %20 (0.h)	38,75±0,19	20,88±0,10	17,82±0,12		-0,24±0,12		1,18±0,09
Kontrol (48.h)	38,94±0,36	20,57±0,88	18,86±0,06	0,716	0,00±0,06	>0,999	1,00±0,04
PK %20 (48.h)	45±0*	22,31±0,08	22,68±0,08	<0,0001**	3,81±0,08	<0,0001**	0,07±0,004

Two-Way Anova, Sidak testi, *ekspresyon görülmedi, ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ hesaplayabilmek için Ct değeri 45 alındı, **p<0,05



Şekil 4-8: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi, * p<0,05.

4.2.7. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücrelerinde Jam-A Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

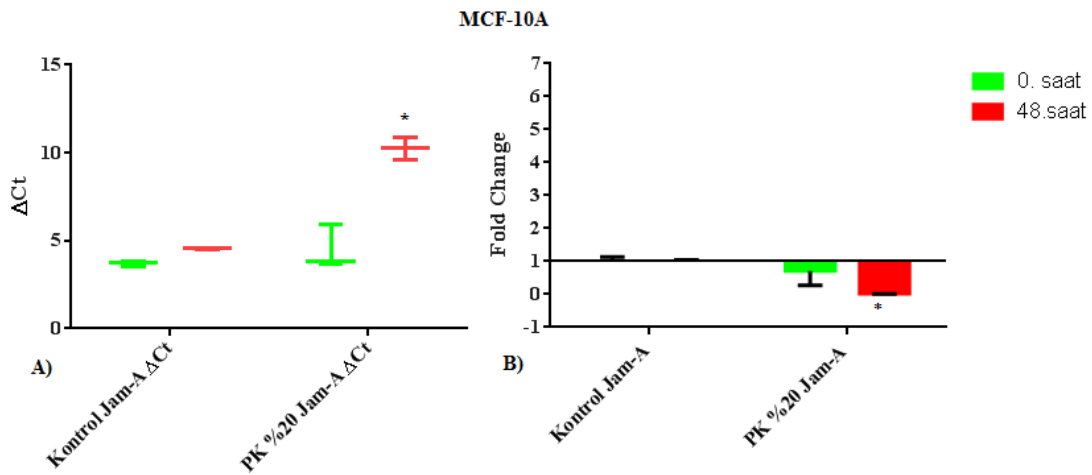
0. ve 48. saat ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada %20 polifenolik kokteyl uygulanan grupta Jam-A geninde down regülasyon görülmüş ve

kontrole göre bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$) (Tablo 4-9; Şekil 4-9A ve B).

Tablo 4-9: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MCF-10A	Jam-A Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	Δ Ct Ort.±SD	Δ Ct p-değeri	$\Delta\Delta$ Ct Ort.±SD	$\Delta\Delta$ Ct p-değeri	$2^{-\Delta\Delta$ Ct Ort.±SD
Kontrol (0.h)	26,67±0,75	22,68±0,89	3,69±0,17		0±0,17		1,00±0,12
PK %20 (0.h)	26,90±1,23	22,41±0,06	4,48±1,27		0,79±1,27		0,71±0,43
Kontrol (48.h)	28,75±3,69	22,06±0,13	4,55±0,06	0,983	0±0,06	>0,999	1,00±0,04
PK %20 (48.h)	33,89±1,91	24,55±0,35	10,26±0,61	<0,0001*	5,70±0,61	<0,0001*	0,02±0,009

Two-Way Anova, Sidak testi, * $p<0,05$.



Şekil 4-9: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde Jam-A geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi, * $p<0,05$.

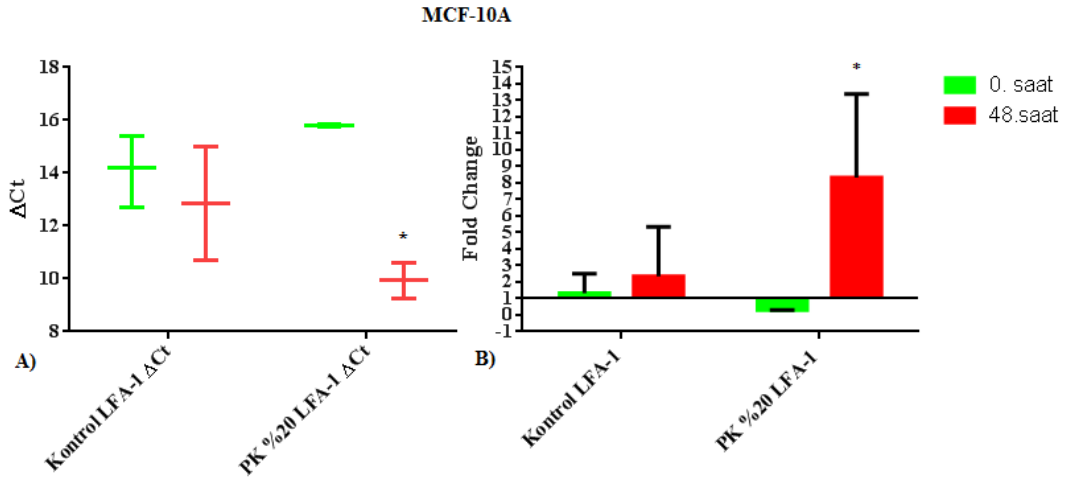
4.2.8. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücrelerinde LFA-1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

MCF-10A hücrelerinde 0. ve 48. saat ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada %20 polifenolik kokteyl uygulanan grupta LFA-1 geni ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4-10A, Tablo 4-10). Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-10A hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonunun upregüle olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-10B).

Tablo 4-10: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

MCF-10A	LFA-1 Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	ΔCt Ort.±SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort.±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort.±SD
Kontrol (0.h)	36,77±1,02	22,68±0,89	14,09±1,36		2,980E-008±1,36		1,33±1,17
PK %20 (0.h)	38,22±0,14	22,41±0,06	15,78±0,06		1,68±0,06		0,31±0,01
Kontrol (48.h)	36,60±0,84	22,06±0,13	12,84±3,05	0,806	0±3,05	>0,999	2,34±2,99
PK %20 (48.h)	34,68±0,84	24,55±0,35	9,93±0,93	<0,0001*	-2,91±0,93	<0,0008*	8,33±5,04

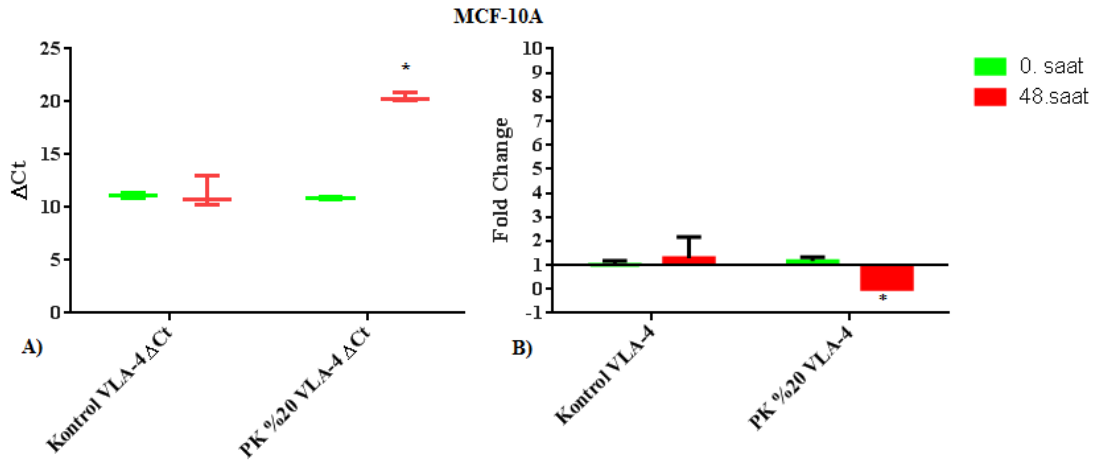
Two-Way Anova, Sidak testi, * $p<0,05$.



Şekil 4-10: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde LFA-1 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi, * $p < 0,05$.

4.2.9. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücrelerinde VLA-4 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

0. ve 48. saat ΔC_t ve $\Delta \Delta C_t$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada %20 polifenolik kokteyl uygulanan grupta VLA-4 geni ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 4-11A). 48. saatte MCF-10A kontrol hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonu devam ederken polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde VLA-4 geni ekspresyonu belirlenemeyecek kadar az bulunmuştur. Azalmadaki değişimi hesaplayabilmek için C_t değeri 45 alınmıştır (Tablo 4-11). Buna göre polifenolik kokteyl uygulanan MCF-10A hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre VLA-4 geni ekspresyonunun downregüle olduğu görülmüştür (Şekil 4-11B).



Şekil 4-11: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi, * $p < 0,05$.

Tablo 4-11: Polifenolik kokteyl uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonunun saatlere göre değişimi

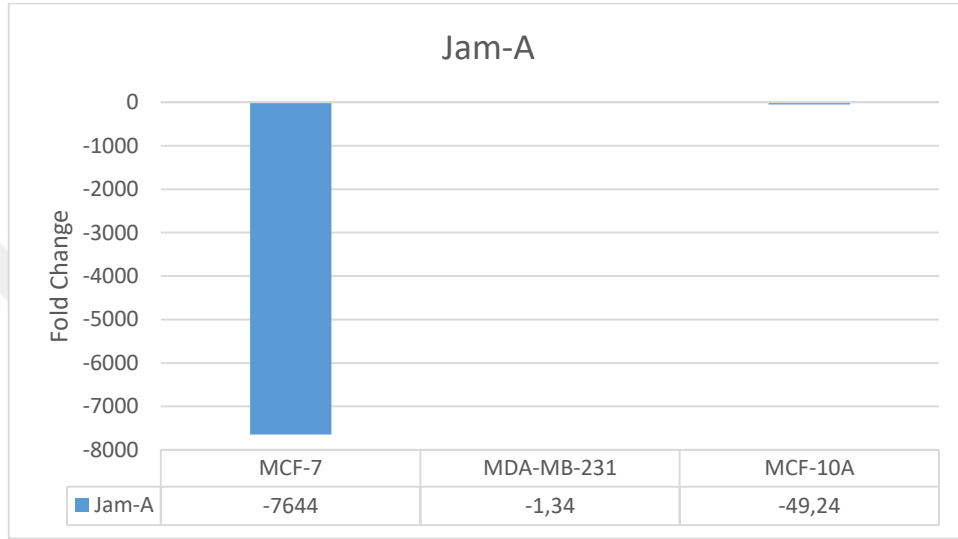
MCF-10A	VLA-4 Ct Ort.±SD	GAPDH Ct Ort.±SD	ΔCt Ort.±SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$ Ort.±SD	$\Delta\Delta Ct$ p-değeri	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ort.±SD
Kontrol (0.h)	33,78±1,13	22,68±0,89	11,10±0,24		-3,725E-009±0,24		1,00±0,16
PK %20 (0.h)	33,34±0,14	22,41±0,06	10,90±0,21		-0,20±0,21		1,15±0,17
Kontrol (48.h)	33,39±1,43	22,06±0,13	11,33±1,41	>0,999	1,987E-008±1,41	>0,999	1,28±0,88
PK %20 (48.h)	45,00±0	24,55±0,35	20,44±0,35	<0,0001*	9,11±0,35	<0,0001*	0,002±4,224 E-004

Two-Way Anova, Sidak testi, * $p < 0,05$.

4.2.10. Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A genindeki rölatif ekspresyonun karşılaştırılması

Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonu ~7644 kat azalmıştır ($p = 0,0001$). Polifenolik

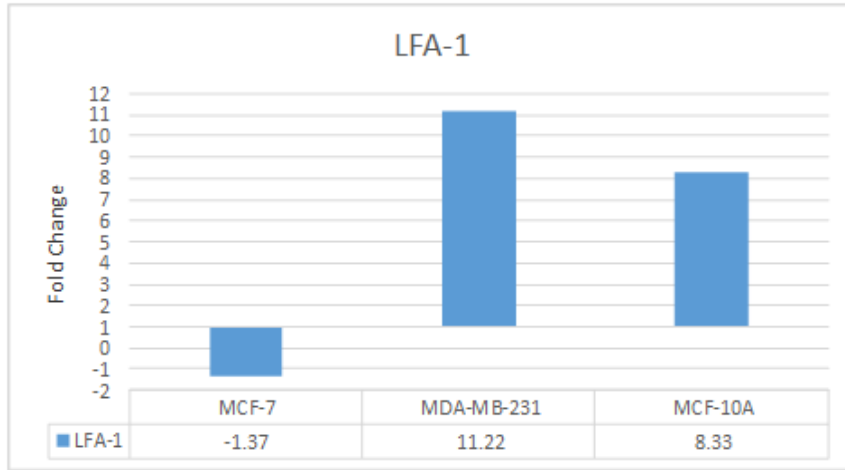
kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonu 1,34 kat azalmış görülmektedir ancak bu fark kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-10A hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonu 49,24 kat azalmıştır ($p<0,0001$) (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: %20 PK verilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A geninde 48. saatteki rölatif ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması

4.2.11. Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde LFA-1 genindeki rölatif ekspresyonun karşılaştırılması

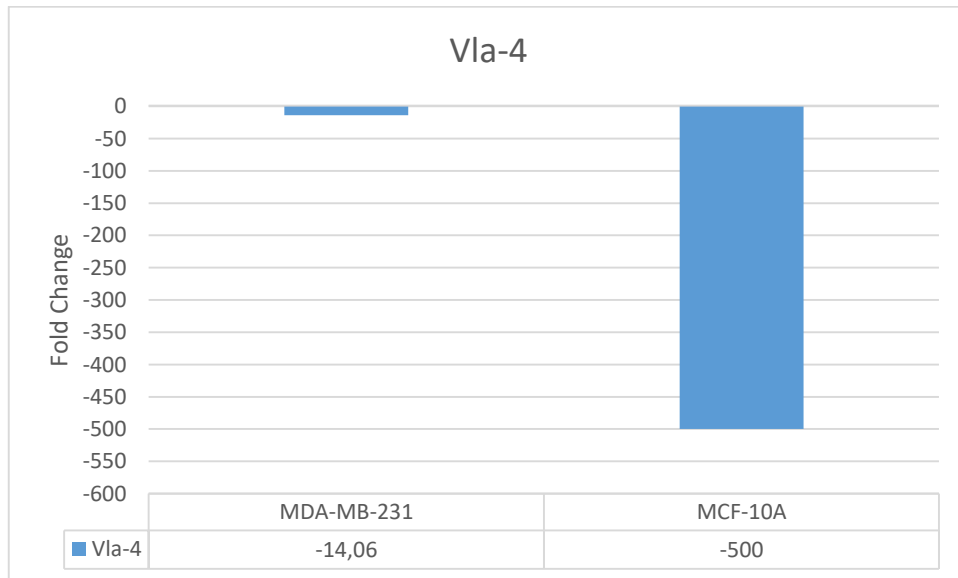
Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonu 1,37 kat azalmış görülmektedir, ancak kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonu 11,22 kat artmıştır ($p<0,0001$). Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-10A hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonu 8,33 kat artmıştır ($p<0,001$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: %20 PK verilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde LFA-1 geninde 48. saatteki rölatif ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması

4.2.12. Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VLA-4 genindeki rölatif ekspresyonun karşılaştırılması

MCF-7 hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonu görülmemiştir. Polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre VLA-4 geni ekspresyonu ~14,06 kat ($p < 0,0001$), MCF-10A hücrelerinde ~500 kat azalmıştır ($p < 0,0001$) (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: %20 PK verilen MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde VLA-4 geninde 48. saatteki rölatif ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması

4.3. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

İnvazif ER+ MCF-7 ve triple-negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin Jam-A gen ekspresyon düzeyleri (ΔCt) invazif olmayan fibrokistik MCF-10A epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında MCF-10A'ya göre MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlılık bulundu (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,003$) (Tablo 4-12 ve 4-13, Şekil 4-15A). MCF-7 hücrelerinde Jam-A gen ekspresyonu MCF-10A hücrelerine göre 12 kat daha az bulunurken (Tablo 4-12), MDA-MB-231 hücrelerinde 12,46 kat daha az bulunmuştur (Tablo 4-13) (Şekil 4-16). Buna göre Jam-A gen ekspresyonu hücrelere göre MCF-10A>MCF-7>MDA-MB-231 olarak değişmektedir (Şekil 4-15A).

MCF-7 hücrelerinde LFA-1 gen ekspresyonu MCF-10A hücrelerine göre 2,26 kat daha fazla bulunurken (Tablo 4-12, Şekil 4-16), MDA-MB-231 hücrelerinde 6,32 kat daha az bulunmuştur (Tablo 4-13, Şekil 4-16) ancak ΔCt değerleri arasında yapılan karşılaştırmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde MCF-10A'ya göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$) (sırasıyla Tablo 4-12 ve 4-13, Şekil 4-15B). LFA-1 gen ekspresyonu hücrelere göre MCF-7>MCF-10A>MDA-MB-231 olarak değişmektedir (Şekil 4-15B).

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde VLA-4 gen ekspresyon düzeyleri (ΔCt) invazif olmayan fibrokistik MCF-10A epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında MCF-10A'ya göre MDA-MB-231 hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p=0,007$) (Tablo 4-13, Şekil 4-15C). MDA-MB-231 hücrelerinde VLA-4 gen ekspresyonu MCF-10A hücrelerine göre 125,36 kat daha az bulunmuştur (Şekil 4-17). MCF-7 hücrelerinde VLA-4 ekspresyonu görülmediğinden karşılaştırma yapılamamıştır.

Tablo 4-12: MCF-7 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A ve LFA-1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Genler	MCF-10A ΔCt Ort. $\pm$ SD	MCF-7 ΔCt Ort. $\pm$ SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Jam-A	3,69 $\pm$ 0,17	6,22 $\pm$ 0,40	p=0,013* ¹	2,53	0,173 5,77 kat az
LFA-1	14,09 $\pm$ 1,36	12,91 $\pm$ 1,93	p=0,650 ¹	-1,18	2,26 2,26 kat fazla

* p<0,05

¹ One-Way Anova, Dunnett's multipl comparisons test

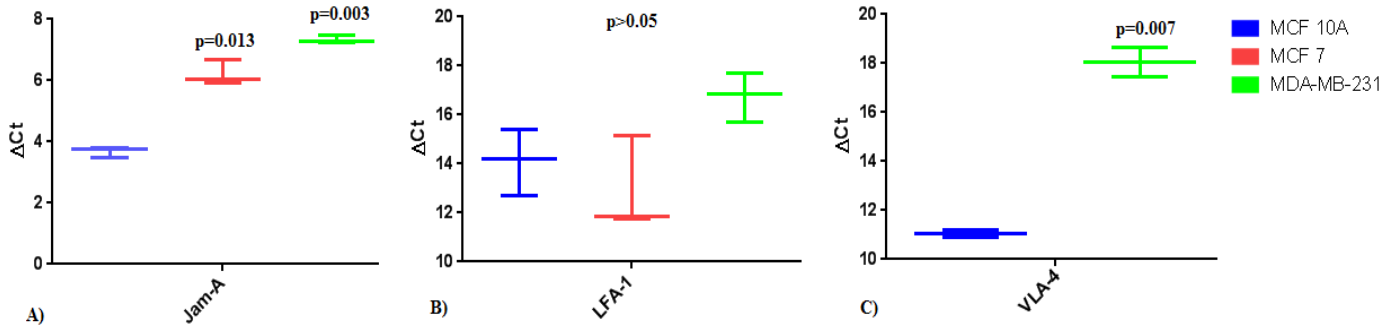
Tablo 4-13: MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Genler	MCF-10A ΔCt Ort. $\pm$ SD	MDA-MB-231 ΔCt Ort. $\pm$ SD	ΔCt p-değeri	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Jam-A	3,69 $\pm$ 0,17	7,33 $\pm$ 0,13	p=0,003* ¹	3,64	0,08 12,46 kat az
LFA-1	14,09 $\pm$ 1,36	16,75 $\pm$ 0,99	p=0,115 ¹	2,66	0,15 6,32 kat az
VLA-4	11,10 $\pm$ 0,24	18,07 $\pm$ 0,84	p=0,007* ²	6,97	0,007 125,36 kat az

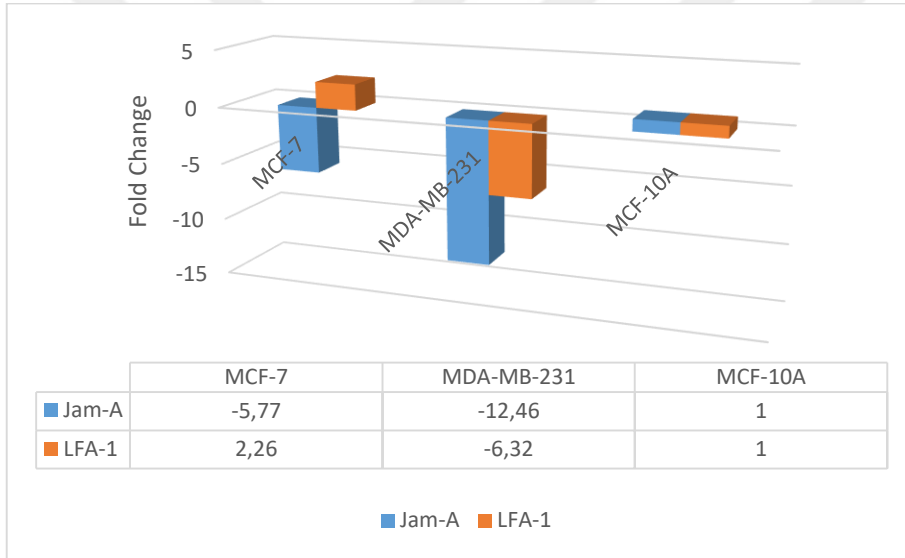
* p<0,05

¹ One-Way Anova, Dunnett's multipl comparisons test

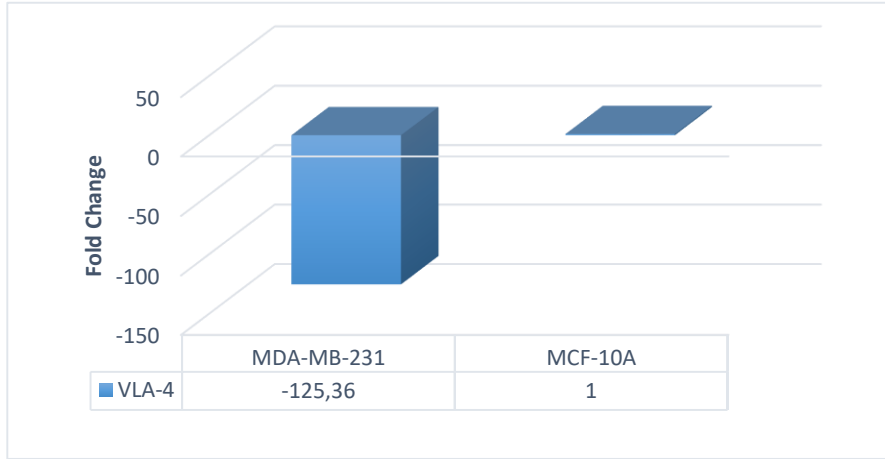
² T-test



Şekil 4-15: MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 Ekspresyon Düzeylerinin (ΔC_t) Karşılaştırılması



Şekil 4-16: MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde Jam-A ve LFA-1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Karşılaştırılması

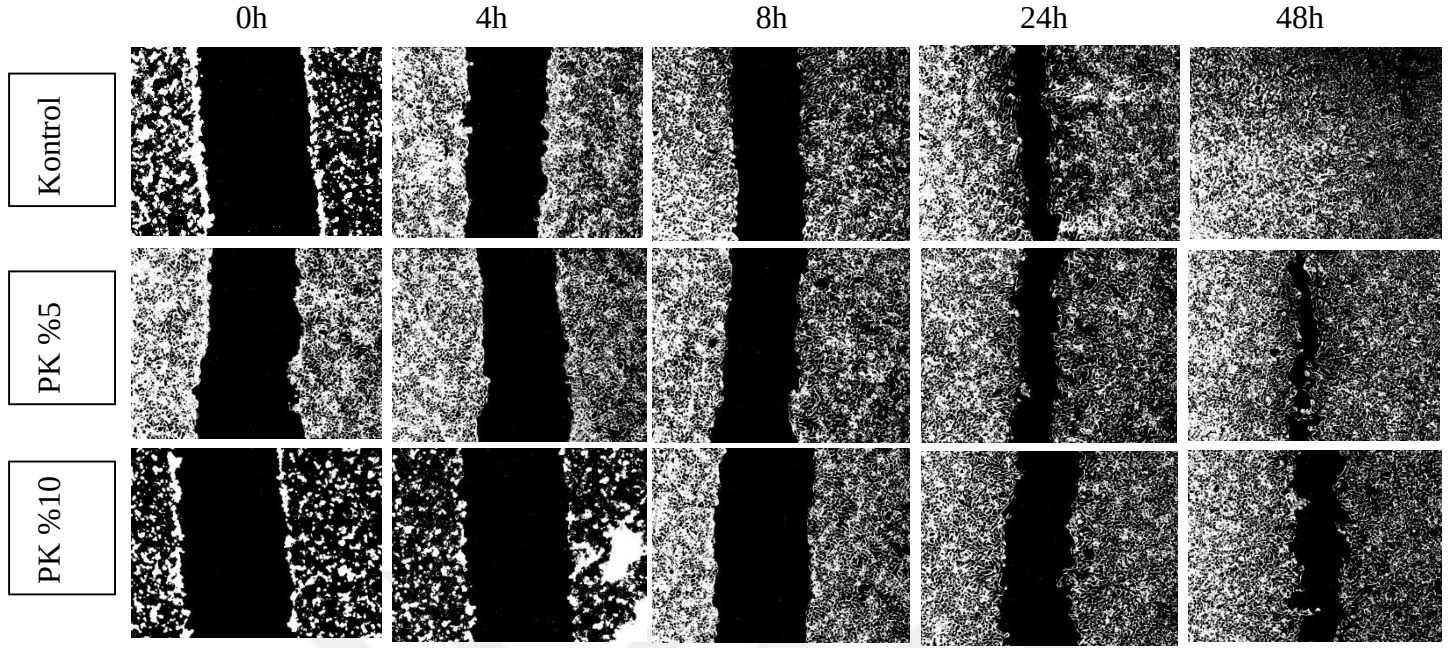


Şekil 4-17: MDA-MB-231 ve MCF-10A Kontrol Hücrelerinde VLA-4 Gen Ekspresyon Düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Karşılaştırılması

4.4. Polifenolik Kokteylin Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkisi (Scratch Testi Sonuçları)

4.4.1. Polifenolik Kokteylin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri

Polifenolik kokteylin hücre migrasyonuna etkisi MCF-7 hücrelerinde incelendiğinde doza bağımlı şekilde hücre migrasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4-18). %5'lik dozun kontrole göre 4., 8. ve 24. saatlerde hücre migrasyonu üzerine negatif etkisi istatistiksel olarak anlamlı görülürken, %10'lik dozun tüm saatlerde hücre migrasyonunu istatistiksel olarak azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 4-14, Şekil 4-19).

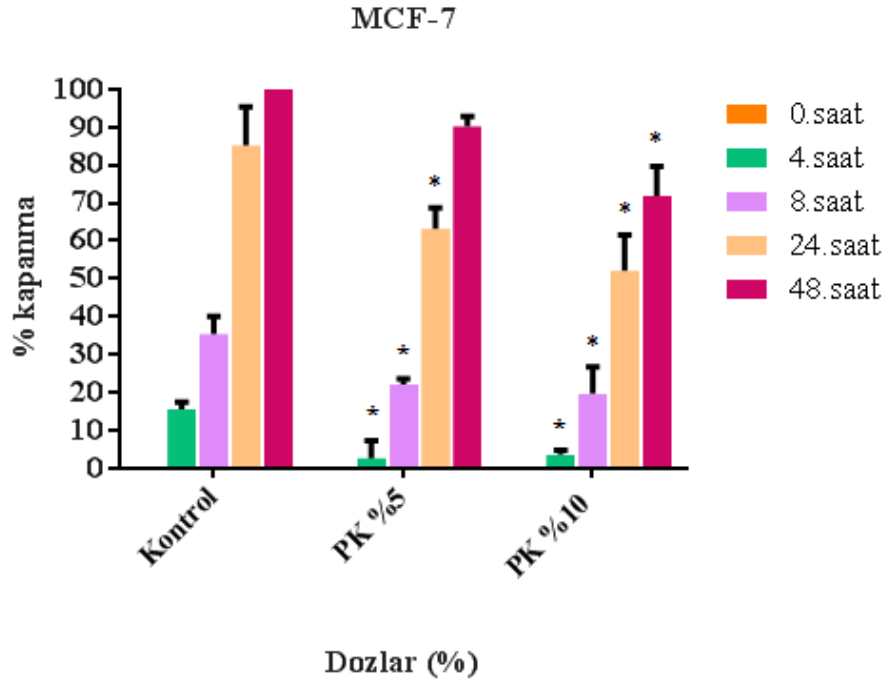


Şekil 4-18: Polifenolik Kokteylin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri

Tablo 4-14: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-7 hücrelerindeki anti-migratif etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

% PK	4.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p- değeri	8.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p- değeri	24.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p-değeri	48.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p-değeri
Kontrol	15,51 ± 1,94		35,39 ± 4,56		85,17 ± 10,10		100 ± 0	
%5 PK	2,65 ± 4,59	0,011*	22,04 ± 1,54	0,008*	63,13 ± 5,62	<0,0001*	90,16 ± 2,62	0,061
%10 PK	3,53 ± 1,20	0,019*	19,64 ± 7,10	0,001*	52,15 ± 9,35	<0,0001*	71,80 ± 7,76	<0,0001*

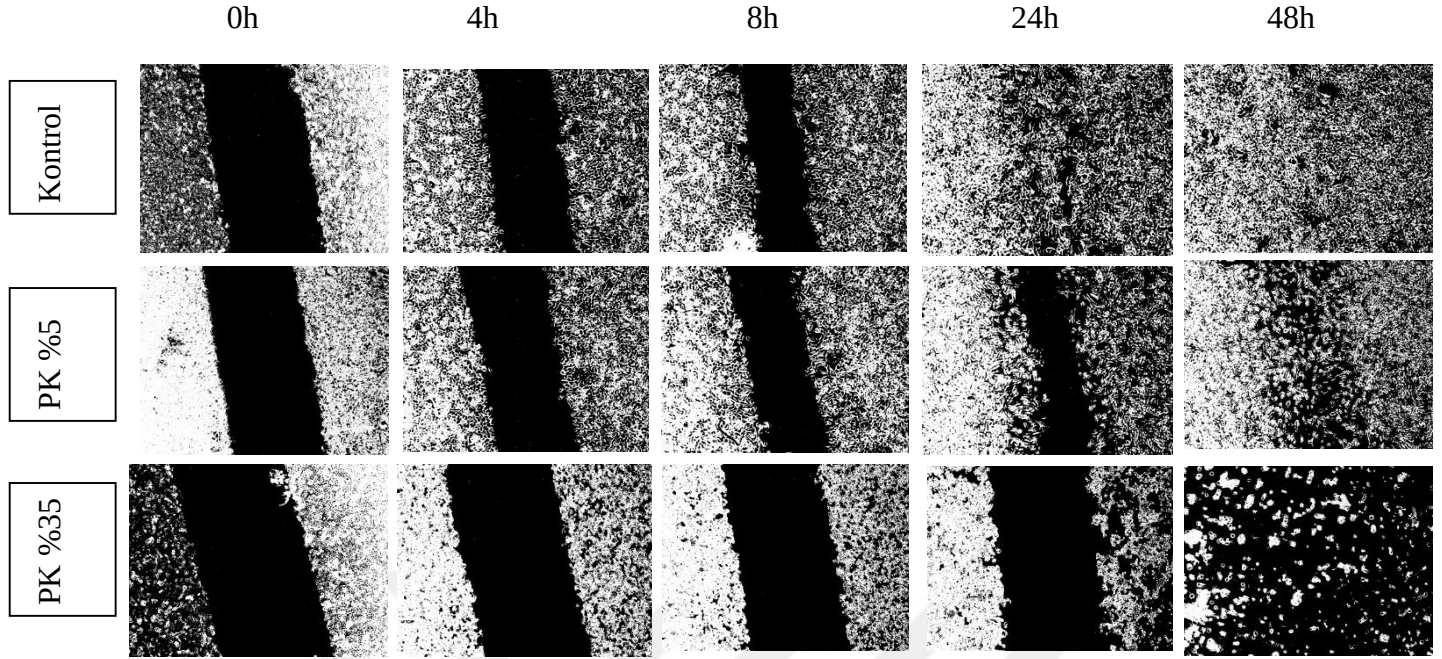
Two-way Anova, Tukey testi, * p<0,05



Şekil 4-19: Polifenolik kokteylin MCF-7 hücreleri üzerine anti-migratif etkisinin doz ve saatlere göre karşılaştırılması, * $p < 0,05$

4.4.2. Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri

Polifenolik kokteylin hücre migrasyonuna etkisi MDA-MB-231 hücrelerinde incelendiğinde hücre migrasyonunu azaltıcı etkisi doza bağımlı şekilde görülmüştür (Şekil 4-20). %5'lik dozun kontrole göre sadece 24. saatlerde hücre migrasyonu üzerine negatif etkisi istatistiksel olarak anlamlı görülürken, %35'lik doz için anti-migratif etki tüm saatlerde istatistiksel anlamlılık göstermiştir ($p < 0,05$) (Tablo 4-15, Şekil 4-21). %35'lik dozun 48. saate kadar hücrelerin migrasyonunu durdurduğu 48.saatte tüm hücreleri plaka yüzeyinden kaldırarak hücreler üzerine sitotoksik etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4-20).

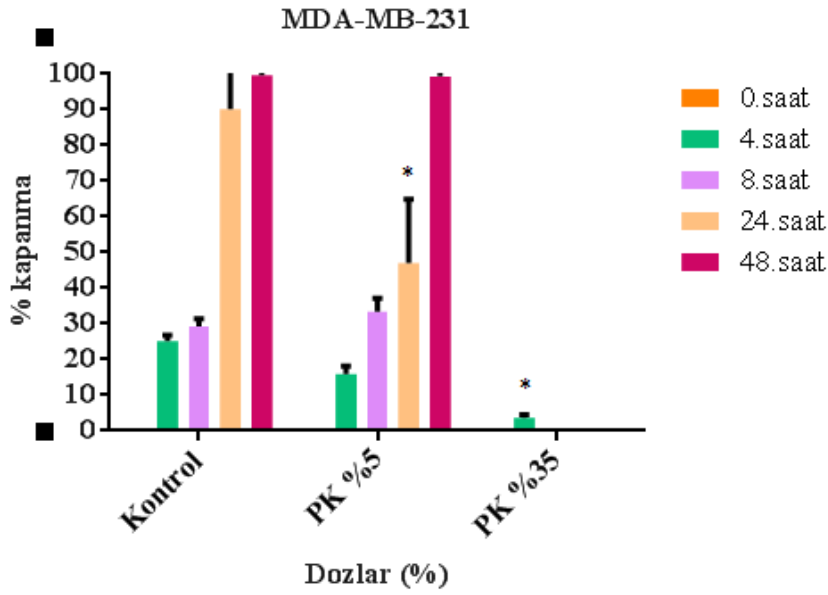


Şekil 4-20: Polifenolik Kokteylin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri

Tablo 4-15: Polifenolik kokteylin saatlere göre MDA-MB-231 hücrelerindeki anti-migratif etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

% PK	4.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p- değeri	8.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p- değeri	24.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p- değeri	48.saat %Ortalama Kapanma ±SD	p- değeri
Kontrol	25,09 ± 1,70		29,31 ± 2,05		90,15 ± 10,10		99,65 ± 0,60	
%5 PK	15,95 ± 2,21	0,127	33,48 ± 3,70	0,633	47,07 ± 17,87	<0,0001*	99,43 ± 0,72	0,998
%35 PK	3,59 ± 0,93	0,0006*	0 ± 0	<0,0001*	0 ± 0	<0,0001*	0 ± 0	<0,0001*

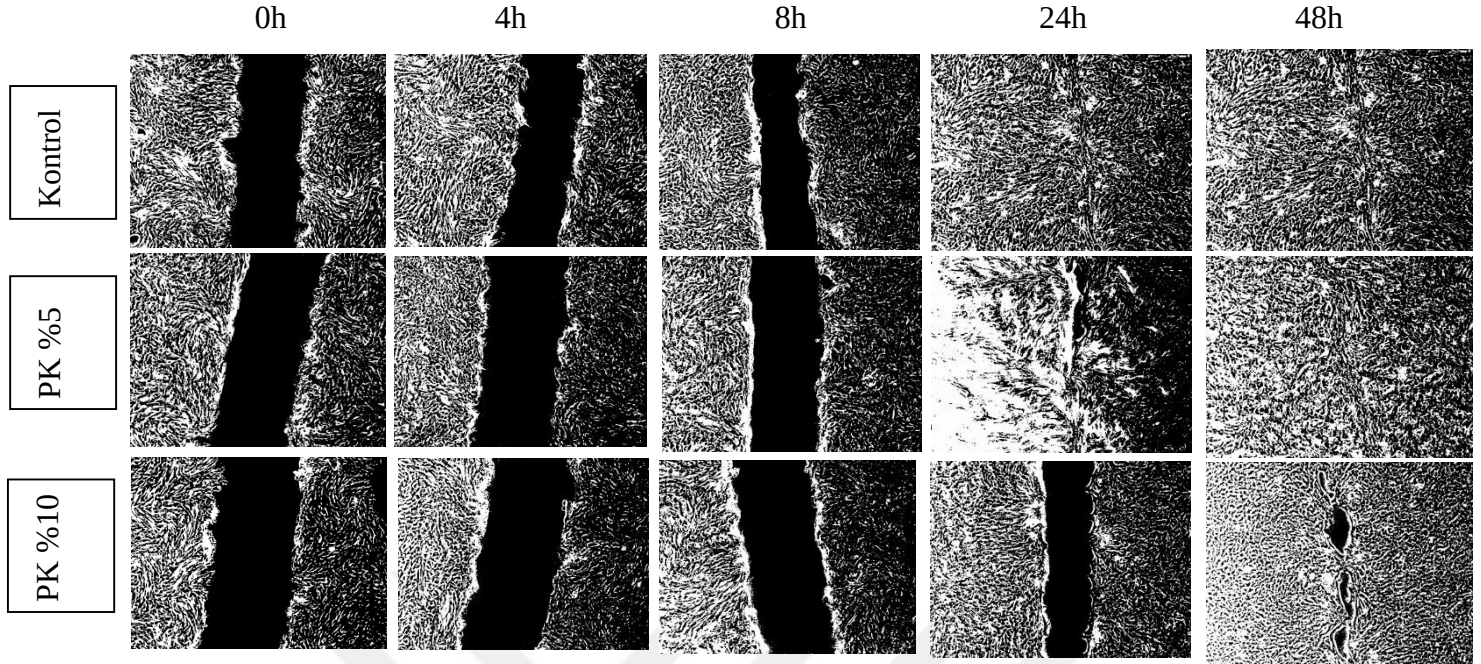
Two-way Anova, Tukey testi, * p<0,05



Şekil 4-21: Polifenolik kokteylin MDA-MB-231 hücreleri üzerine anti-migratif etkisinin doz ve saatlere göre karşılaştırılması, * $p < 0.05$

4.4.3. Polifenolik Kokteylin MCF-10A Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri

Polifenolik kokteylin hücre migrasyonuna etkisi MCF-10A hücrelerinde incelendiğinde 24. saate kadar hücre migrasyonunu engellediği ancak hücrelerin 24. saatten itibaren toparlanarak göç etmeye devam ettiği 48. saatte oluşturulan çizimin %10'luk dozda bile neredeyse kapandığı görülmüştür (Şekil 4-22). Her iki dozda da kontrole göre sadece 24. saatlerde anti-migratif etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 4-16, Şekil 4-23).

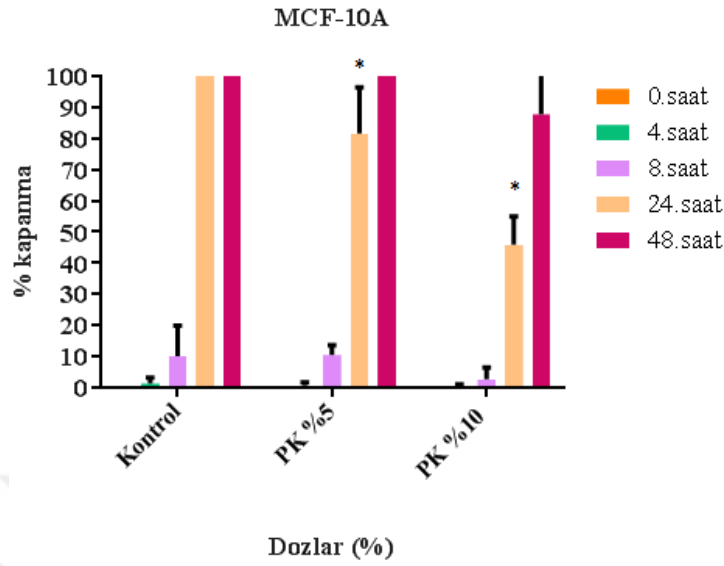


Şekil 4-22: Polifenolik Kokteylin MCF-10A Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Anti-Migratif Etkileri

Tablo 4-16: Polifenolik kokteylin saatlere göre MCF-10A hücrelerindeki anti-migratif etkisinin kontrol hücreleri (dozsuz) ile karşılaştırılması

% PK	4.saat %Ort. Kapanma ±SD	p- değeri	8.saat %Ort. Kapanma ±SD	p- değeri	24.saat %Ort. Kapanma ±SD	p-değeri	48.saat %Ort. Kapanma ±SD	p- değeri
Kontrol	1,33 ±1,88		10,06 ± 9,85		100 ± 0		100 ± 0	
%5 PK	0,59 ± 1,03	0,991	10,44 ± 3,18	0,997	81,62 ± 14,70	0,014*	100 ± 0	>0,999
%10 PK	0,44 ± 0,62	0,989	2,68 ± 3,79	0,498	45,85 ± 9,10	<0,0001*	87,71 ± 13,32	0,162

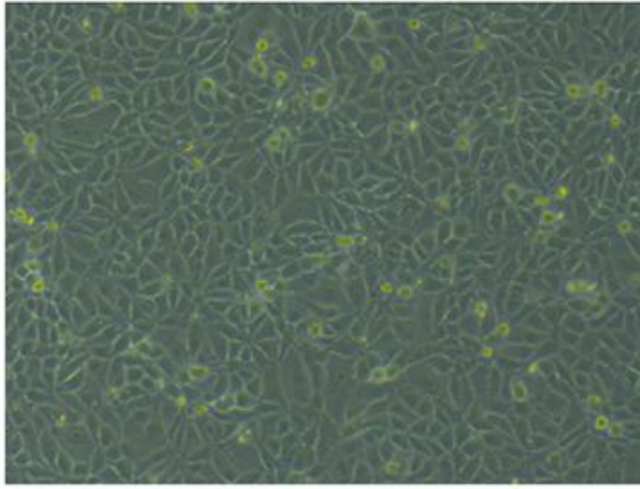
Two-way Anova, Tukey testi, * p<0,05



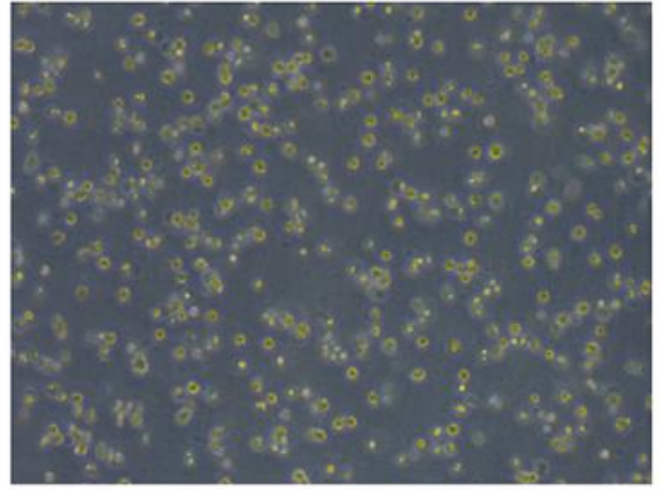
Şekil 4-23: Polifenolik kokteylin MCF-10A hücreleri üzerine anti-migratif etkisi, * $p < 0.05$

4.5. Polifenolik Kokteylin Hücre Morfolojisine Etkileri

Polifenolik kokteylin %20'lik dozu 48 saat sonra hücre morfolojisinde ciddi değişiklikler yapmaktadır. Polifenolik kokteyl verilen tüm hücrelerde 48 saat sonra hücre sayısında azalma, sitoplazmada küçülme, hücre zarı bütünlüğünde bozulma meydana geldiği ve hücreler arası bağlantıların koparak hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-24, 4-25, 4-26).

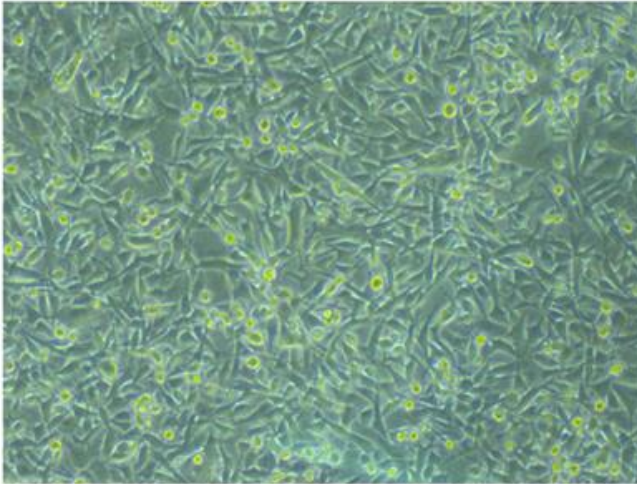


48. saat MCF-7 kontrol (20X)

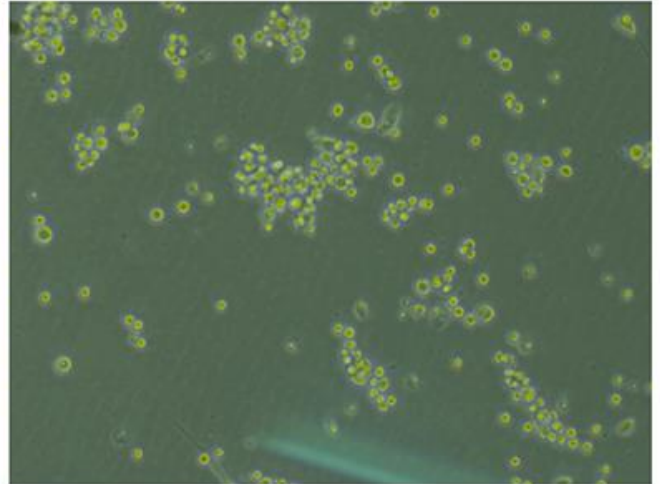


48. saat MCF-7 %20 PK (20X)

Şekil 4-24: Polifenolik Kokteylin (%20) 48 saat sonra MCF-7 Hücre Morfolojisine Etkileri

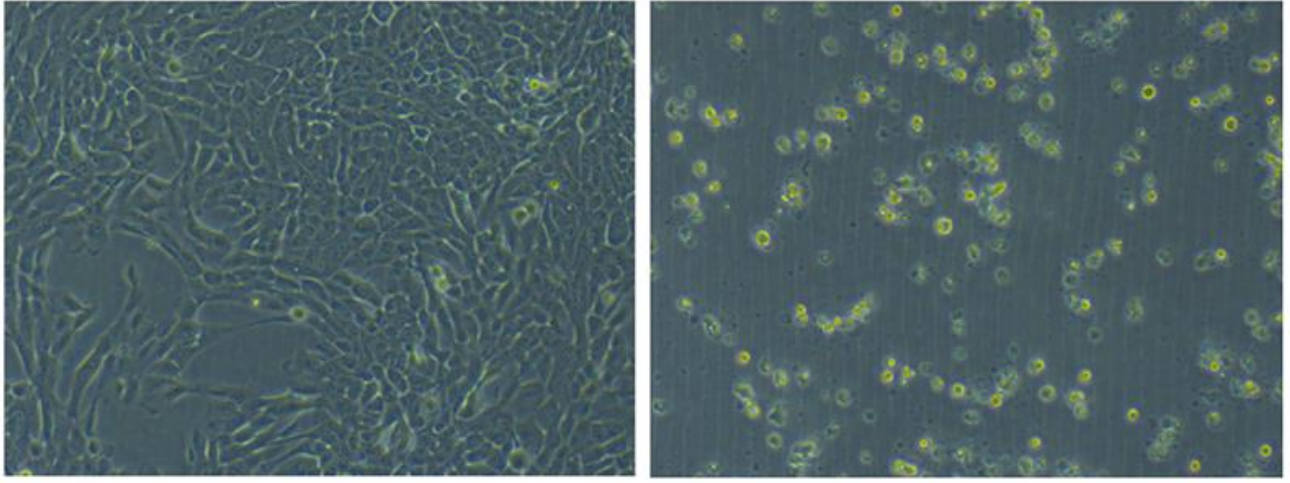


48. saat MDA-MB-231 kontrol (20X)



48. saat MDA-MB-231 %20 PK (20X)

Şekil 4-25: Polifenolik Kokteylin (%20) 48 saat sonra MDA-MB-231 Hücre Morfolojisine Etkileri



48. saat MCF-10A kontrol (20X)

48. saat MCF-10A %20 PK (20X)

Şekil 4-26: Polifenolik Kokteylin (%20) 48 saat sonra MCF- 10A Hücre Morfolojisine Etkileri

5. TARTIŞMA

Kadınlarda en sık görülen kanser tipi olan meme kanseri vakalarında başlıca ölüm nedeni metastazdır (McSherry ve ark. 2011; Vazquez ve ark. 2017). Hücre migrasyonunu yöneten proteinlerin kanser metastazının ortaya çıkmasında rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (Bendas ve Borsig 2012; Knights ve ark. 2012; Zhao ve ark. 2014). Bu nedenle hücre migrasyonu ile ilgili mekanizmaların aydınlatılması meme kanserinde metastazı önlemede tedavi yöntemleri geliştirmek açısından önemlidir.

Epitel ve endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı proteinlerinden biri olan Jam A (junctional adhesion molecule-A) upregülasyonunun nazofarenks kanser hücrelerinde EMT sürecini başlattığı ve Jam-A'nın susturulmasının bu durumu geri çevirdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda Jam-A ekspresyon seviyeleri nazofarenks kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Tian ve ark. 2015). Jam-A'nın susturulmasının mide kanserinde proliferasyonu uyardığı, apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Ikeo ve ark. 2015). Jam-A'nın küçük hücreli akciğer kanserinde ekspresyon seviyesindeki artış ile tümör gelişimi arasında korelasyon olduğu ve Jam-A'nın in vitro olarak susturulmasının akciğer kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2013).

Jam-A gen ifadesi seviyeleri ile meme kanserinde hücre göçü arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sonuçları ise çelişkilidir. Bazı çalışmalarda Jam-A gen ifadesi seviyelerinin meme kanseri hücrelerinde hücre göçü ile ters orantılı ilişkisi olduğu (Naik ve ark. 2008; Wang ve Lui, 2012; Cao ve ark. 2014), bazılarında ise Jam-A ve Her-2 genlerinin ekspresyonlarında ve dolayısıyla tümör agresifliği arasında pozitif ilişki olduğu (McSherry ve ark. 2009 ve 2011) gösterilmiştir. Jam-A ve Her-2 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon belirtilmiş ve Jam-A'nın tümör agresifliği ile ilişkisi ortaya konmuştur (Brennan ve ark. 2013). Yine son zamanlarda yapılan bir çalışmada Jam-A'nın aşırı ekspresyonunun ve in vitro olarak ekstrasellüler domeni kesilmiş halinin anti-HER2 terapisine direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Leech ve ark. 2018). MCF-7 hücrelerinde Jam-A'nın susturulması ile Rap1 GTPaz aracılı $\beta 1$ integrin ekspresyonu azaltılmasıyla hücre migrasyonunda azalma olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar Jam-A'nın meme kanseri hücre göçünde önemini vurgulamıştır (McSherry ve ark. 2011). Bir diğer çalışmada transforme edici büyüme faktörü beta-1 (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)'in Jam-A'yı aşağı yönde düzenleyerek

(downregölasyon) meme kanserinde invazyonu baskıladığı belirtilmiştir (Wang ve Lui, 2012). Jam-A'nın genellikle meme, akciğer ve böbrek tümörlerinde upregüle olduğu ve ksenograft insan tümörlerine in vivo olarak Jam-A antikoru verilmesinin tümör büyümesini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (Goetsch ve ark. 2013). Jam-A downregülasyonunun apoptozu arttırarak meme kanseri gelişimini azalttığı bildirilmiştir (Murakami ve ark. 2011). Çalışmamızda invazif ER+ MCF-7 ve triple-negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin Jam-A gen ekspresyon düzeyleri (ΔCt) invazif olmayan fibrokistik MCF-10A epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında MCF-10A'ya göre MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,003$). MCF-7 hücrelerinde Jam-A gen ekspresyonu MCF-10A hücrelerine göre 5,77 kat daha az bulunurken, MDA-MB-231 hücrelerinde 12,46 kat daha az bulunmuştur. Buna göre Jam-A gen ekspresyonu hücrelere göre $MCF-10A > MCF-7 > MDA-MB-231$ olarak değişmektedir. Buna göre bizim  alışmamızda Jam-A geninin meme kanseri hücrelerinde invazyon ile ters ilişkili olabileceği söylenebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceden meme kanseri hücrelerinde Jam-A ve hücre migrasyonu arasında ters ilişki bulan diğer  alışmaları (Naik ve ark. 2008; Wang ve Lui, 2012; Cao ve ark. 2014) desteklemektedir. Literatürde Jam-A geninin düşük ekspresyonu ile invazyon arasında ilişki kuran diğer çalışmalar da mevcuttur (Fong ve ark. 2012; Koshiba ve ark. 2009; Huang ve ark. 2014). Ayrıca renal hücreli karsinomda Jam-A downregülasyonu ile hücre-hücre bağlantılarının kaybının tümör hücrelerinin migrasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Gutwein ve ark. 2009). Fong ve arkadaşlarının çalışmasında Jam-A'nın düşük ekspresyonu ile pankreas kanserinde metastaz ve kötü prognoz arasında ilişki kurulmuştur (Fong ve ark. 2012). Jam-A ekspresyonu ile endometrium kanserinde myometrial invazyon arasında ters ilişki saptanmıştır (Koshiba ve ark. 2009). Düşük Jam-A ekspresyonu mide kanseri hastalarında tümör boyutu, lenfatik damar invazyonu, lenf nodu metastazı, TNM grade ve düşük sağkalım arasında ilişki bulunmuştur (Huang ve ark. 2014).

Çalışmamızda 48. saatte MCF-7 kontrol hücrelerinde Jam-A gen ekspresyonu devam ederken %20 polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde Jam-A gen ekspresyonu belirlenemeyecek seviyededir. Azalmadaki değişimi hesaplayabilmek için Ct değer 45 alındığında polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonunun ~7644 kat azaldığı görülmüştür (şekil 5-1A). Polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol

hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonu 1,34 kat azalmış görülmektedir (Şekil 5-1A) ancak ΔC_t ve $\Delta\Delta C_t$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 5-1B). Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-10A hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre Jam-A geni ekspresyonu 49,24 kat azalmıştır (Şekil 5-1A). Bu verilere göre polifenolik kokteylin Jam-A geni ekspresyonunu MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde azalttığı ama etkinliğini en çok MCF-7 hücresinde gösterdiği görülmüştür. Polifenolik kokteyl MDA-MB-231 hücrelerinde Jam-A geninin ekspresyonunu etkilememiştir.

LFA-1 genelde lökositlerde eksprese olan bir gen olduğundan tümör hücrelerinde bu genin ekspresyonu ile ilgili çalışmalar literatürde sınırlıdır. Çin Han populasyonunda yapılan bir çalışmada LFA-1 rs8058823 ve rs2230433 polimorfizmleri infiltratif duktal meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Rs8058823 AG, rs2230433 CG genotiplerinin infiltratif duktal meme kanseri için riski arttırdığı önerilmiştir (Fu ve ark. 2011). Tokat ve arkadaşlarının çalışmasında ise rs8058823 normal AA genotipi ve A alleli, rs2230433 nadir GG genotipi meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada JAM-A rs790056 T aleli ve LFA-1 rs8058823 A aleli birlikteliğinin meme kanseri için riski arttırdığı önerilmiştir (Tokat ve ark. 2018). Wang ve ark. CD44 ile LFA-1 ve VLA-4 arasındaki çarpaz bağlantının ekzositoz ile MDA-MB-435S meme kanseri hücrelerinde LFA-1 ve VLA-4'ün ekspresyonunu uyarak meme kanseri hücrelerinin transendotelial migrasyonunu uyardığını bildirmiştir (Wang ve ark. 2005). Tümörlü alanda LFA-1'in lökosit ekstrasvazasyonunda gerekli olduğu LFA-1/ICAM-1 etkileşimin melanoma kanser hücrelerinin endotele transmigrasyonuna yardım ettiği savunulmuştur (Ghislin ve ark. 2012). Soto ve arkadaşları MDA-MB-231 hücrelerinde LFA-1 ekspresyonunun durdurulmasının farelerde beyin metastazını engellediğini göstermiştir (Soto ve ark. 2016). Diğer taraftan in vitro ve in vivo çalışmalarda LFA-1/ICAM-1 birlikteliğinin kanser hücrelerine karşı immün cevap oluşturduğu belirtilmiştir (Ferrini ve ark. 1994; Cohen ve ark. 2003; Hochman ve ark. 2013).

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde LFA-1 gen ekspresyonu MCF-10A hücrelerine göre 2,26 kat daha fazla bulunurken, MDA-MB-231 hücrelerinde 6,32 kat daha az bulunmuştur. Ancak ΔC_t değerleri arasında yapılan karşılaştırmada invazif olmayan fibrokistik MCF-10A epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlılık

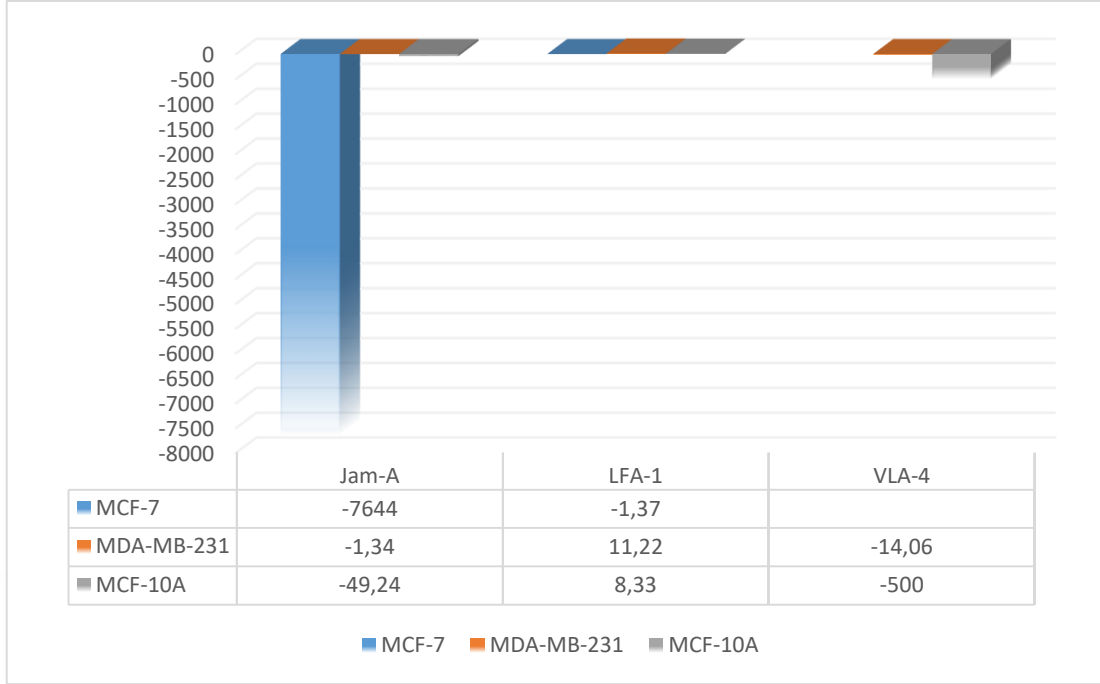
bulunmamıştır ($p>0,05$). Çalışmamızda LFA-1 gen ekspresyonunun hücelere göre MCF-7>MCF-10A>MDA-MB-231 olarak değiştiği ancak bu değişimin MCF-10A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Vasse ve arkadaşlarının çalışmasında LFA-1 ekspresyonu MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre daha fazla tespit edilmiş ve NaPa (Sodium phenylacetate)'ın doz bağımlı şekilde MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde LFA-1 ve ICAM-1 ekspresyonunda artışa ve hücrelerin migrasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Vasse ve ark. 2001). Budinsky ve arkadaşlarının çalışmasında ise VCAM-1, LFA-1 alpha, LFA-1 beta ve beta-3 integrin HBL-100, MCF-7, SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücrelerinin hiçbirinde tespit edilememiştir (Budinsky ve ark. 1997). Çalışmamızda %20'lik polifenolik kokteyl uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonu 1,37 kat azalmış (Şekil 5-1A), ancak ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 5-1B). %20'lik polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonunun 11,22 kat arttığı tespit edilmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 5-1A). Polifenolik kokteyl uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise 48. saatteki kontrol hücrelerine göre LFA-1 geni ekspresyonu 8,33 kat artmıştır ($p<0,001$) (Şekil 5-1A). Buna göre polifenolik kokteyl MCF-7 hücrelerinde LFA-1 gen ekspresyonunu etkilemezken MDA-MB-31 ve MCF-10A hücrelerinde arttırmıştır. Bu etki MDA-MB-231 hücrelerinde daha belirgindir.

Endotelde VLA-4 aracılı VCAM-1 etkileşiminin melanom hücrelerinde hücre adezyonu ve TEM için gerekli olduğu ve selektin ligandlar olmasa bile tümör hücrelerinde ekstrasvazasyonu desteklediği ve böylece VLA-4'ün bir adezyon molekülü gibi davrandığı bildirilmiştir (Liang ve Dong, 2008; Bendas ve Borsig 2012). Gastrointestinal stromal tümörlerde VLA-4 ekspresyonu ile uzak organ metastazı arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Pulkka ve ark. 2018). Çeşitli çalışmalarda hematopoetik kökenli bir çok hücrede eksprese edilen ve lökosit transendotelyal göçünde ve tümör metastazında önemli bir role sahip olan VLA-4 (very late antigen-4, $\alpha 4\beta 1$, CD49d/CD29)'ün meme kanseri hücrelerinin akciğer, kemik ve beyine metastazlarında anormal ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir (Schlesinger ve Bendas, 2015; Sharma ve ark. 2017). Wang ve arkadaşları tarafından transendotelyal migrasyonda VLA-4'ün LFA-1 ile birlikte hareket ettiği önerilmiştir. Aynı çalışmada CD44'ün MDA-MB-435S ve Hs578T meme kanseri hücrelerinde LFA-1 ve VLA-4 ekspresyonunu arttırdığı

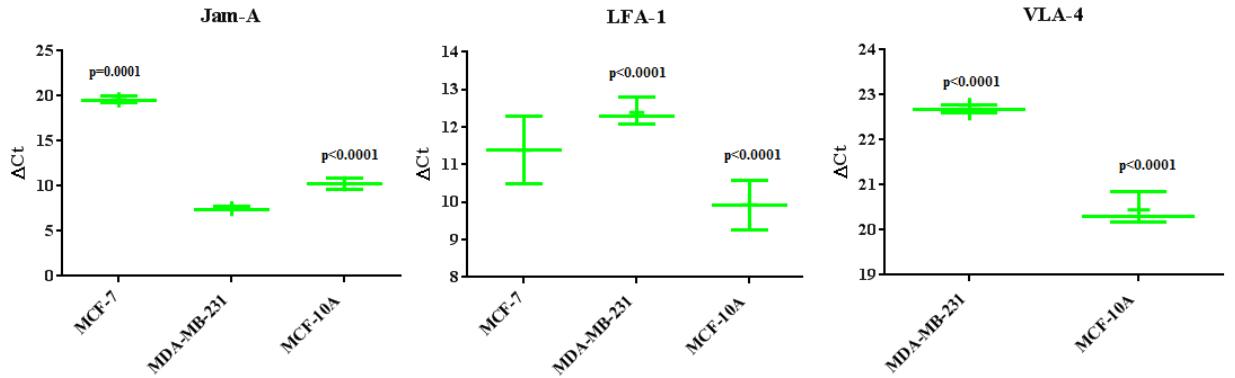
gösterilmiştir (Wang ve ark. 2005). Lian ve arkadaşları meme kanseri dokularında ITGA-4 (VLA-4) geninde hipermetilasyonlar tespit etmişlerdir (Lian ve ark. 2012). β 1-integrinlerin in vitro inhibisyonunun tümör hücrelerinin proliferasyonunda azalmaya, apoptozunda artmaya neden olduğu belirtilmiştir (Park ve ark. 2006). Hanieh ve arkadaşları bir aril hidrokarbon reseptör agonisti olan Flavipin'in MDA-MB-231 hücrelerinde ITGA-4 (VLA-4) ekspresyonunu ve in vitro hücre migrasyonunu azalttığını göstermişlerdir (Hanieh ve ark. 2016).

Çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde VLA-4 gen ekspresyon düzeyleri (Δ Ct) invazif olmayan fibrokistik MCF-10A epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücrelerinde VLA-4 gen ekspresyonu MCF-10A hücrelerine göre 125,36 kat daha az bulunmuştur ($p=0,007$). MCF-7 hücrelerinde VLA-4 ekspresyonu görülmediğinden karşılaştırma yapılamamıştır. Çalışmamızdaki bulgulara benzer olarak Budinsky ve arkadaşları immünohistokimya yöntemiyle MCF-7, SK-BR-3 ve ZR-75-1 meme kanseri hücrelerinde ICAM-1 ve VLA-4 ekspresyonunun meme fibroadenom hücreleri ve normal meme epiteli hücrelerine göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada VLA-4 ekspresyonunu flow sitometri analizi ile sadece benign hücre hattı HBL-100'de gösterilmiş, MCF-7, SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücre hatlarında ise tespit edilememiştir (Budinsky ve ark. 1997). Çalışmamızda %20 polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde 48. saatte kontrol hücrelerinde VLA-4 geni ekspresyonu devam ederken polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde VLA-4 geni ekspresyonu belirlenemeyecek kadar az bulunmuştur. Azalmadaki değişimi hesaplayabilmek için Ct değeri 45 alınmış ve buna göre yapılan hesaplamada polifenolik kokteyl uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatteki kontrol hücrelerine göre VLA-4 geni ekspresyonunun ~14,06 kat azaldığı, MCF-10A hücrelerinde ise ~500 kat azaldığı görülmüştür ($p<0,0001$) (Şekil 5-1A ve B). Buna göre polifenolik kokteylin VLA-4 geni ekspresyonunu hem MCF-10A hem de MDA-MB-231 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı ama bu azaltıcı etkisini daha çok MCF-10A hücrelerinde yaptığı belirlenmiştir.

A)



B)



Şekil 5-1: Polifenolik kokteyl verilmiş MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 genlerindeki rölatif ekspresyon değişimlerinin birlikte değerlendirilmesi

Polifenolik kokteylin ‘scratch testi’ ile hücre migrasyonuna etkisine baktığımızda tüm hücrelerde doza bağımlı şekilde hücre migrasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu testte uygulanan dozlar hücrelerin WST-1 grafiklerine göre karar verilmiştir. Buna göre MCF-7 ve MCF-10A için sitotoksik doz %5-10 arasında iken, MDA-MB-231 için %20-35 aralığındadır. Bu sebeple MCF-10A ve MCF-7 hücreleri için ‘scratch testi’nde %5 ve %10’luk doz kullanılırken, MDA-MB-231 hücreleri için %5 ve %35’lik doz kullanılmıştır.

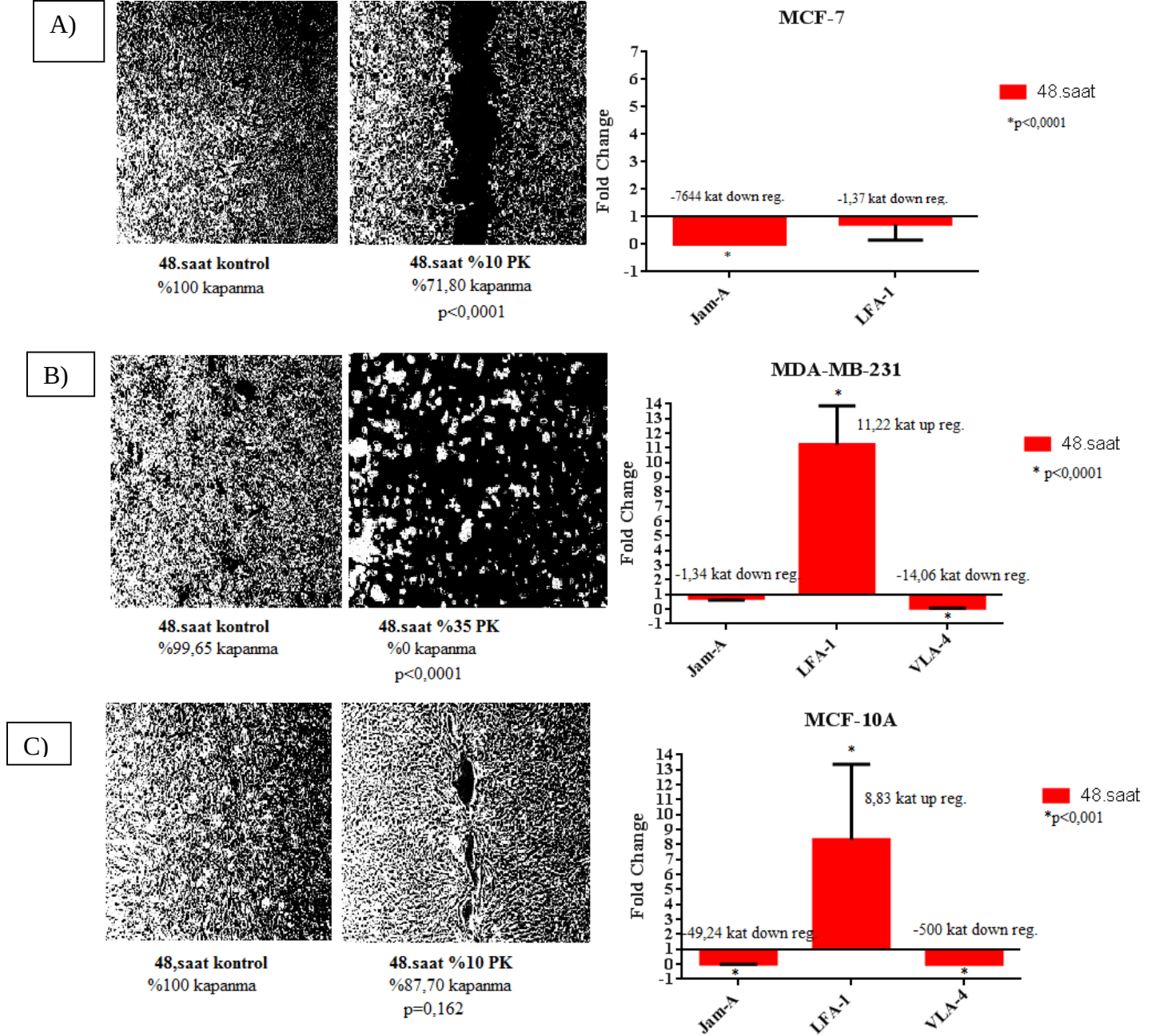
Polifenolik kokteylin hücre migrasyonu üzerine negatif etkisine tüm hücrelerde birlikte baktığımızda 48. saatte %10’luk polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde

MCF-7 %71,80 kapanırken (Şekil 5-2A) MCF-10A %87,70 kapanmıştır (Şekil 5-2C). %35'lik doz uygulanan MDA-MB-231 ise hiç kapanmamıştır (Şekil 5-2B). %20 polifenolik kokteyl uygulanmış hücrelerde 48. saatte Jam-A gen ekspresyonu MCF-7'de ~7644 kat azalırken (Şekil 5-2A), MCF-10A'da 49,24 kat azalmakta (Şekil 5-2C), MDA-MB-231'de değişmemektedir (Şekil 5-2B). Polifenolik kokteyl ile MCF-10A'ya göre daha az kapanan MCF-7'de Jam-A ekspresyonunun MCF-10A'ya göre daha fazla azalması Jam-A'nın MCF-7'de hücre migrasyonu ile ilişkili olduğunu ve polifenolik kokteylin MCF-7 hücrelerinde JAM-A ekspresyonunu azaltarak hücre migrasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. Öte yandan doz uygulanmamış hücrelerdeki ekspresyon seviyeleri Jam-A için MCF-10A>MCF-7>MDA-MB-231 olması ve MCF-10A'nın hücre kültüründe Tripsin-EDTA ile flasktan en zor kaldırılan hücre olması hücreler arası sıkı bağlantıların çokluğu ve Jam-A geni ekspresyonu fazla olan bir hücre olmasından kaynaklanabilir. MCF-10A her ne kadar fibroblastik, non-invazif bir hücre olsa da hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilmektedir. Bu progresyon hücre kültüründe sağlanan besin maddeleri ile gerçekleşmektedir. MCF-10A hücrelerinde Jam-A ekspresyonu kullanılan besin maddeleri tarafından tetikleniyor olabilir. %35'lik polifenolik kokteyl verilen MDA-MB-231 hücrelerinde 48. saatte hücre migrasyonu tamamen durmuşken Jam-A seviyelerinin kontrole göre değişmemesi ise polifenolik kokteylin MDA-MB-231 hücrelerinde hücre migrasyonunu Jam-A üzerinden engellemediği başka yolları etkilediğini göstermektedir.

LFA-1 gen ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinde değişmemesi polifenolik kokteylin anti-migratif etkisini MCF-7 hücrelerinde LFA-1 üzerinden gerçekleştirmediğini gösterir (Şekil 5-2A). LFA-1 gen ekspresyonunun MCF-10A ve MDA-MB-231'de artması ve en az kapanan (MDA-MB-231) hücrede gen ekspresyonunun en çok artması (MCF-10A 8,83 kat, MDA-MB-231 11,22 kat) MDA-MB-231 hücrelerinde LFA-1 gen ekspresyon seviyesi ile hücre migrasyonu arasında ters ilişki olabileceğini ve polifenolik kokteylin bu hücre hattında LFA-1 gen ekspresyonunu artırarak anti-migratif etki edebileceğini göstermektedir (Şekil 5-2B).

MDA-MB-231 hücrelerinde VLA-4 gen ekspresyonunun non-invazif MCF-10A hücrelerine göre 125,36 kat daha az bulunması ($p=0,007$) VLA-4 ve MDA-MB-231 hücre migrasyonu arasında ters ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Wang ve arkadaşları tarafından transendotelial migrasyonda VLA-4'ün LFA-1 ile birlikte hareket ettiği önerilmiştir (Wang ve ark. 2005). Ancak çalışmamızda polifenolik kokteyl verilen

hücrelerde MCF-10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde LFA-1 gene ekspresyonu artarken VLA-4 azalmıştır (Şekil 5-2C ve 5-2B). Polifenolik kokteyl uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre gen ekspresyonunda azalmaya yol açması polifenolik kokteylin anti-migratif etkisini VLA-4 üzerinden yapabileceğini göstermektedir.



Şekil 5-2: Polifenolik kokteylin anti-migratif etkisinin tüm hücre hatlarında genlerle birlikte gösterilmesi

Fenolik bileşenlerin hücre migrasyonuna etkilerini araştıran çalışmalara baktığımızda, luteolinin MDA-MB-231 hücrelerinde VEGF-A üretimini azaltarak hücre migrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Sun ve ark. 2015; Cook ve ark. 2017). EGCG'nin MMP'ler üzerinden etki ederek meme kanseri hücrelerinde in vitro olarak migrasyonu azalttığı tespit edilmiştir (Sen ve ark. 2010; Sen ve Chatterjee, 2011). Slivova ve arkadaşları EGCG'nin uPA sekresyonunu uyarak meme kanseri hücrelerinin invazyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Slivova ve ark. 2005). Zhang ve arkadaşları EGCG'nin MCF-7 hücrelerinde vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) ekspresyonunu ve Rac1 aktivitesi azaltmak suretiyle hücre migrasyonunu engellediğini bildirmiştir (Zhang ve ark. 2009). Apigenin ve luteolinin MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-1 ekspresyonu ve CYP1A1 aktivitesini azaltarak hücre migrasyonunu engellediği belirtilmiştir (Hong ve ark. 2018). Apigeninin MDA-MB-231 hücrelerinde u-PA'nın parsiyel olarak ekspresyonunu azalttığını ve MMP-9 sekresyonunu tamamen inhibe ederek invazyonu engellediği bildirilmiştir (Lindenmeyer ve ark. 2001). Kabala-Dzik ve arkadaşları fenolik bileşenlerce zengin propolisin içerdiği CA (kafeik asit) ve CAPE (kafeik asit fenetil ester) bileşenlerinin MDA-MB-231 hücrelerinde hücre migrasyonu azalttığını, CAPE'in CA'ya göre iki kat fazla anti-migratif etkisi olduğunu göstermiştir (Kabala-Dzik ve ark. 2017). Bonuccelli ve arkadaşlarının çalışmasında CAPE'in MCF-7 hücrelerinde hücre migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Bonuccelli ve ark. 2017). Wadhwa ve arkadaşları tarafından CAPE ve CAPE+ gamma cyclodextrin (γ CD) kompleksinin bireysel ve birlikte MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde anti-migratif etkisi tespit edilmiştir (Wadhwa ve ark. 2016). Xuan ve arkadaşlarının çalışmasında Çin propolisinin etanol ekstraktının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde ANXA7 gen ekspresyonunu arttırdığı, NF- κ B p65 seviyelerini düşürdüğü gözlenmiş ve ekstraktın antimigratif etkisi araştırılmıştır. Anti-migratif etki MDA-MB-231 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulurken MCF-7 hücrelerinde hücre migrasyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Xuan ve ark. 2014). Frion-Herrera ve arkadaşları farklı tip Küba propolisleriyle (kırmızı, kahverengi, yeşil) yaptıkları çalışmada kırmızı propolisin MDA-MB-231 hücrelerinde anti-apoptotik ve anti-migratif etkilerini bildirmiştir (Frion-Herrera ve ark. 2018). Chang ve arkadaşları CAPE ve Çin propolisinin etanol ekstraktının, Lipopolisakkarid (LPS) ile uyarılmış MDA-MB-231 hücrelerinde, inflamatuvar mikroçevrede, hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu TLR4 sinyal yolağının inhibisyonu, apoptozis ve otofaji aracılığıyla engellediğini bildirmiştir

(Chang ve ark. 2017). Yine propolis içeriğinde bulunan bir flavon olan krisinin triple-negatif meme kanseri hücrelerinde doz bağımlı şekilde hücre migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Krisinin bu hücrelerde E-kaderin geni ekspresyonunu arttırırken MMP-10, vimentin, snail, slug genlerini azalttığı bildirilmiştir (Yang ve ark. 2014).

Literatürde polifenolik bileşenlerin Jam-A, LFA-1 ve VLA-4 üzerine etkilerini araştıran çalışma yoktur, bu nedenle çalışmamız özgündür. Çalışmamızda polifenolik kokteyl içindeki bileşiklerin bireysel olarak meme kanseri hücre hatlarındaki hücre migrasyonuna etkilerine bakılmadı. Ancak bireysel olarak bu bileşenlerin sitotoksik ve apoptotik etkilerine daha önceki çalışmalarımızda bakılmış ve fenolik bileşenler açısından yoğun propolisin MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 ve fibrokistik MCF-10A hücre hatlarında düşük dozlarda bile %50 sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Seyhan ve ark. 2017 ve 2018) (İÜ BAP 6043, İÜ BAP 28301). Hücre migrasyonlarını karşılaştırmak için çalışmamızda en basit migrasyon testi olan ‘scratch testi’ kullanılmış ve hücre migrasyonu kabaca değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarımız diğer kalitatif ve kantitatif invazyon testleri ile tekrarlanmalıdır. LFA-1 daha çok lökositlerde eksprese olan bir gendir ve tümör metastazında daha çok lökositler üzerinden etki göstermektedir. Çalışmamızda tümör hücreleri ile tümör hücreleriyle etkileşime giren lökositler arasındaki LFA-1 gen ekspresyon seviyelerine bakılamamıştır. Sonuçlarımız polifenolik bileşenlerin meme kanseri tümör hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin yanında anti-metastatik özelliklerinin de olduğunu ve polifenolik bileşenlerin kanser tedavisinin bir parçası olarak düşünülebileceğini gösterse de sonraki çalışmalarda hücre migrasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin proteomik analizlerle izlenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aaltomaa S., Karja V., Lipponen P., Isotalo T., Kankkunen J.P., Talja M., Mokka R. (2005). Reduced α - and β -catenin expression predicts shortened survival in local prostate cancer. *Anticancer Research*, **25**, 4707-4712.
- Amarowicz R., Carle R., Dongowski G., Durazzo A., Galensa R., Kammerer D., et al. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, **53**, S151–S183.
- Anderberg, C., Cunha S.I., Zhai Z., Cortez E., Pardali E., Johnson J.R., et al. (2013). Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J. Exp. Med.* **210**, 563–579.
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.*, **339**, 269–280.
- Bauer D., Redmon N., Mazzio E., Soliman K.F. (2017). Apigenin inhibits TNF α /IL-1 α -induced CCL2 release through IKBK-epsilon signaling in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *PLoS ONE*, **12**, e0175558.
- Bendas G., Borsig L. (2012). Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins and, the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol.*, **2012**, 676731.
- Bissell M., Hines W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.*, **17**, 320–329.
- Bland K., Copeland E. (2009). *The Breast-Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders.
- Bonuccelli G., De Francesco E.M., de Boer R., Tanowitz H.B., Lisanti, M.P. (2017). NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of vitamin C and CAPE as natural products targeting “stemness”. *Oncotarget*, **8**, 20667–20678.
- Bougaret L., Delort L., Billard H., LeHuede C., Boby C., DelaFoye A., et al. (2018). Adipocyte/breast cancer cell crosstalk in obesity interferes with the anti-proliferative efficacy of tamoxifen. *PLoS ONE*, **13**, e0191571

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN.* **68**, 394–424.

Brennan K., McSherry E.A., Hudson L., Kay E.W., Hill A.D.K., Young L.S., et al. (2013). Junctional adhesion molecule-A is co-expressed with HER2 in breast tumors and acts as a novel regulator of HER2 protein degradation and signaling. *Oncogene*, **32**, 2799–804.

Brunnicardi F., Andersen D., Billiar T., et al. (2004). *Schwartz's Principles of Surgery*. 8th ed. New York, NY: The McGraw-Hill Medical Publishing Division.

Budinsky A.C., Brodowicz T., Wiltchke C., Czerwenka K., Michl I., Crainer M., Zielinski C.C. (1997). Decreased expression of ICAM-1 and its production by tumor necrosis factor on breast-cancer cells in vitro. *Int. J. Cancer*, **71**, 1086–1090.

Cao M., Nie W., Li J., Zhang Y., Yan X., Guan X., et al. (2014). MicroRNA-495 induces breast cancer cell migration by targeting JAM-A. *Protein Cell.* **5(11)**, 862-72.

Cao Z.Q., Wang Z., Leng P. (2019). Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **118**, 109320.

Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., et al. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, **295**, 2492–2502.

Chae Y.K., Choi W.M., Bae W.H., Anker J., Andrew A., Davis A.A., Agte S., et al. (2018). Overexpression of adhesion molecules and barrier molecules is associated with differential infiltration of immune cells in nonsmall cell lung cancer. *Scientific Reports*, **8(1)**, 1023.

Chang H., Wang Y., Yin X., Liu X., Xuan H. (2017). Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **17**, 471.

Cheang M.C., Chia S.K., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J., et al. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **101(10)**, 736-750.

Chen P.N., Chu S.C., Chiou H.L., Kuo W.H., Chiang C.L., Hsieh Y.S. (2006). Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyaniding 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett.*, **235(2)**, 248-59.

Chiang S.P., Cabrera R.M., Segall J.E. (2016). Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol* **311**, C1–C14.

Cohen S., Haimovich J., Hollander N. (2003). Anti-idiotypic x antiLFA-1 bispecific antibodies inhibit metastasis of B cell lymphoma. *J Immunol.*, **170**, 2695–2701.

Coleman M., Quaresma M., Berrino F., Lutz J.M., Angelis R., Capocaccia R., et al.(2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* **9**, 730–56.

Cook M.T., Liang Y., Besch-Williford C., Hyder S.M. (2017). Luteolin inhibits lung metastasis, cell migration, and viability of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, **9**, 9–19.

Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, **8(16)**, 3131-3141.

De la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E., Gonzalez-Aguilar G.A. (2009). *Fruit and Vegetable Phytochemicals-Chemistry, Nutritional Value, and Stability* (1st. ed.). Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell.

DeNardo D.G., Barreto J.B., Andreu P., Vasquez L., Tawfik D., Kolhatkar N., Coussens L.M. (2009). CD4⁺ cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, **16**, 91–102.

Denkert C., Liedtke C., Tutt A., von Minckwitz G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet.* **389(10087)**, 2430-2442.

Desgrosellier J.S., Cheres D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, **10 (1)**, 9–22.

Dillon D., Guidi A.J., Schnitt S.J. (2014). Pathology of invasive breast cancer. In: Harris J.R., Lippman M.E., Morrow M., Osborne C.K., eds. *Diseases of the Breast*. 5th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health.

Drew P., Cawthorn S., Michell M. (2007). Interventional Ultrasound of the Breast- Anatomy of the Breast by Menos Lagopoulos London, UK: Informa Healthcare; 11–22.

El Gharas H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, **44(12)**, 2512–2518.

Elmoneim H.M., Zaghoul N.M. (2011). Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinopathological variant: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics (Sao Paulo)*, **66(10)**, 1765-71.

Erler J.T., Bennewith K.L., Nicolau M., Dornhöfer N., Kong C., Le Q.T., et al. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, **440**, 1222-1226.

Erler J.T., Bennewith K.L., Cox T.R., Lang G., Bird D., Koong A., et al. (2009). Hypoxia induced lysyl oxidase is critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the metastatic niche. *Cancer Cell*, **15**, 35-44.

Farahani E., Patra H.K., Jangamreddy J.R., Rashedi I., Kawalec M., Rao Pariti R.K, et al. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*, **35(4)**, 747–759.

Ferrini S., Sforzini S., Cambiaggi A., Poggi A., Meazza R., Canevari S., Colnaghi M.I., Moretta L. (1994). The LFA-1/ICAM cell adhesion pathway is involved in tumor-cell lysis mediated by bispecific monoclonal-antibody-targeted T lymphocytes. *International journal of cancer*, **56**, 846–852.

Fidler I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, **3**, 453–458.

Filippi M. D. (2016). Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Advances in immunology*, **129**, 25–53.

Fong D., Spizzo G., Mitterer M., Seeber A., Steurer M., Gasti G., et al. (2012). Low expression of junctional adhesion molecule A is associated with metastasis and poor survival in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.*, **19**, 4330-4336.

Foulkes W.D., Smith I.E., Reis-Filho J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.*, **363**(20), 1938-1948.

Frion-Herrera Y., Diaz-Garcia A., Ruiz-Fuentez J., Rodriguez-Sanchez H., Sforsin J.M. (2019). The cytotoxic effect of propolis on breast cancer cells involve PI3K/Akt and ERK1/2 pathways, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation. *Inflammopharmacology*, **27**(5), 1081–1089.

Fu Z., Jiao M., Zhang M., Xu F., Yuan W., Pang D., Li D. (2011). LFA-1 gene polymorphisms are associated with the sporadic infiltrative duct breast carcinoma in Chinese Han women of Heilongjiang Province. *Breast Cancer Res Treat*, **127**, 265-271.

Garrido-Urbani S., Vonlaufen A., Stalin J., De Grandis M., Ropraz P., Jemelin S., et al. (2018). Junctional adhesion molecule C (JAM-C) dimerization aids cancer cell migration and metastasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*, **1865**(4), 638-649.

Gheldof A., Berx G. (2013). Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, **116**, 317–336.

Ghislin S., Obino D., Middendorp S., Boggetto N., AlcaideLoridan C., Deshayes F. (2012). LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC cancer*, **12**, 455.

Giordano S.B., Gradishar W. (2017). Breast cancer: updates and advances in 2016. *Curr Opin Obstet Gynecol.* **29**(1), 12-17.

Gocheva V., Wang H.W., Gadea B.B., Shree T., Hunter K.E., Garfall A.L., et al. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.*, **24**, 241–255.

Goetsch L., Haeuw J.F., Beau-Larvor C., Gonzalez A., Zanna L., Malissard M., et al. (2013). A novel role for junctional adhesion molecule-A in tumor proliferation: modulation by an anti-JAM-A monoclonal antibody. *Int J Cancer*, **132**, 1463-1474.

Gonzalez-Angulo A.M., Timms K.M., Liu S., Chen L., Litton J.K., Potter J., et al. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. **17(5)**, 1082-1089.

Greenfield L., Mulholland M., Oldham K., et al. (2001). *Surgery: Scientific Principles and Practice*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Guo X., Tresserra-Rimbau A., Estruch R., Martínez-González M.A., Medina-Remón A., Fitó M., et al. (2017). Polyphenol levels are inversely correlated with body weight and obesity in an elderly population after 5 years of follow up (The Randomised PREDIMED Study). *Nutrients*, **9(5)**, pii: E452.

Gutwein P., Schramme A., Voss B., Abdel-Bakky M.S., Doberstein K., Ludwig A., et al. (2009). Downregulation of junctional adhesion molecule-A is involved in the progression of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **380**, 387-391.

Hamidi H., Pietila M., Ivaska J. (2016). The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *British Journal of Cancer*, **115**: 1017-1023.

Hammond M.E., Hayes D.F., Dowsett M., Allred D.C., Hagerty K.L., Badve S., et al. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.*, **28(16)**, 2784-2795.

Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.

Hanieh H., Mohafez O., Hairul-Islam V.I., Alzahrani A., Bani Ismail M., Thirugnanasambantham K. (2016). Novel Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist Suppresses Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, **11(12)**, e0167650.

Harjunpää H., Lloret Asens M., Guenther C., Fagerholm S.C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.*, **10**, 1078.

Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, **8**, R76

Hochman J., Shen D.F., Gottesman M.M., Chan C.C. (2013). Anti LFA-1 antibodies enhance metastasis of ocular lymphoma to the brain and contralateral eye. *Clin & exp met.*, **30**, 91–102.

Hong J., Fristiohady A., Nguyen C.H., Milovanovic D., Huttary N., Grieger S., et al. (2018). Apigenin and Luteolin Attenuate the Breaching of MDA-MB231 Breast Cancer Spheroids Through the Lymph Endothelial Barrier in Vitro. *Front. Pharmacol.*, **9**, 220.

Hostetler G., Riedl K., Cardenas H., Diosa-Toro M., Arango D., Schwartz S., et al. (2012). Flavone deglycosylation increases their anti-inflammatory activity and absorption. *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**, 558–569.

Hoy A.J., Balaban S., Saunders D.N. (2017). Adipocyte–tumor cell metabolic crosstalk in breast cancer. *Trends Mol. Med.* **23**, 381–392

Hu M., Wu B., Liu Z. (2017). Bioavailability of polyphenols and flavonoids in the era of precision medicine. *Molecular Pharmaceutics*, **14**, 2861–2863.

Huang R.Y., Yu Y.L., Cheng W.C., OuYang C.N., Fu E., Chu C.L. (2010). Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *J. Immunol.*, **184**, 6815–6821.

Huang J.Y., Xu Y.Y., Sun Z., Wang Z.N., Zhu Z., Song Y.X., et al. (2014). Low junctional adhesion molecule A expression correlates with poor prognosis in gastric cancer. *J Surg Res.*, **192**, 494-502.

Hui C., Qi X., Qianyong Z., Xiaoli P., Jundong Z., Mantian M. (2013). Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies.

PLoS ONE, **8**, e54318.

Hsu C.L., Yen G.C. (2007). Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8404–8410.

Ikeo K., Oshima T., Shan J., Matsui H., Tomita T., Fukui H. et al. (2015) Junctional adhesion molecule-A promotes proliferation and inhibits apoptosis of gastric cancer. *Hepato-Gastroenterol.*, **62(138)**, 540–545.

Izumi T., Piscula M.K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., et al. (2000). Soy Isoflavone Aglycones Are Absorbed Faster and in Higher Amounts than Their Glucosides in Humans. *Journal of Nutrition*, **130 (7)**: 1695-9.

Jesinger R.A. (2014). Breast Anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol.* **17(1)**, 3-9.

Joshi H., Press M.F. (2018). Molecular oncology of breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS, Gradishar WJ, eds. *The Breast*. Philadelphia, PA: Elsevier; 22.

Joyce J.A., Pollard J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, **9**, 239–252.

Kabala-Dzik A., Rzepecka-Stojko A., Kubina R., Jastrzebska-Stojko Z., Stojko R., Wojtyczka R.D., Stojko J. (2017). Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients*, **9**, 1144.

Kannagi R., Izawa M., Koike T, Miyazaki K, Kimura N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science*, **95 (5)**, 377–384.

Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, **438**, 820–827.

Khapare N., Kundu S.T., Sehgal L., Sawant M., Priya R., Gosavi P., et al. (2012). Plakophilin3 leads to an increase in PRL3 levels promoting K8 dephosphorylation, which is required for transformation and metastasis. *PLoS One*, **7**, e38561.

- Kim T.H., Huh J.H., Lee S., Kang H., Kim G.I., An H.J. (2008). Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*, 53(1), 48-55.
- Knights A.J., Funnell A.P.W., Crossley M., Pearson C.M.R. (2012). Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Res.*, **8**, 61–69.
- Koshiba H., Hosokawa K., Kubo A., Tokomitsu N., Watanabe A., Honjo H. (2009). Junctional adhesion molecule A expression in human endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, **19**, 208-213.
- Kozłowski J., Kozłowska A., Kocki J. (2015). Breast cancer metastasis – insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw*, **69**, 447-451.
- Kufe D.W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, **9**, 874–85.
- Kundu S.T., Gosavi P., Khapare N., Patel R., Hosing A.S., Maru G.B., et al. (2008). Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis. *Int. J. Cancer*, **123(10)**, 2303-14.
- Lafay S., Gill-Izquierdo A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 301-311.
- Lahlou H., Muller W.J. (2011). β 1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer. *Breast Cancer Research*, **13**, 229.
- Lalloo F., Evans D.G. F. (2012). Familial breast cancer. *Clin Genet*. **82**, 105–114.
- Lanigan F., McKiernan E., Brennan D.J., Hegarty S., Millikan R.C., McBryan J., et al. (2009). Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumor grade in breast cancer. *Int. J. Cancer*, **124(9)**, 2088-97.
- Laubli H., Borsig L. (2010). Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenvironment*, **3(1)**, 97–105.

Lee H.M., Hwang K.A., Choi K.C. (2017). Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects on endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **457**, 103-113.

Leech A.O., Vellanki S.H.K., Rutherford E.J., Keogh A., Jahns H., Hudson L., et al. (2018). Cleavage of the extracellular domain of junctional adhesion molecule-A is associated with resistance to anti-HER2 therapies in breast cancer settings. *Breast Cancer Research*, **20** (1), 140.

Li X., Wang T., Zhou B., Gao W., Cao J., Huang L. (2014). Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (*Pyrus* spp). *Food Chemistry*, **152**, 531–538.

Lian Z.Q., Wang Q., Li W.P., Zhang A.Q., Wu L. (2012). Screening of significantly hypermethylated genes in breast cancer using microarray-based methylated-CpG island recovery assay and identification of their expression levels. *International Journal of Oncology*, **41**, 629-638.

Liang S., Dong C. (2008). Integrin VLA-4 enhances sialyl- Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. *American Journal of Physiology*, **295**(3), C701–C707.

Lindenmeyer F., Li H., Menashi S., Soria C., Lu H. (2001). Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer*, **39**(1), 139-47.

Ludwig R.J., Boehme B., Podda M., Henscheler R., Jager E., Tandi C., et al. (2004). Endothelial P selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Research*, **64**(8), 2743–2750.

Madunic I.V., Madunic J., Antunovic M., Paradžik M., Garaj-Vrhovac V., Breljak D., Marijanovic I., Gajski G. (2018). Apigenin, a dietary flavonoid, induces apoptosis, DNA damage, and oxidative stress in human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **391**, 537–550.

- Makrilia N., Kollias A., Manolopoulos L., Sygios K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest.*, **27**: 1023–1037.
- Malhotra G.K., Xiangshan Z., Band H., Band B. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, **10(10)**, 955-960.
- Martin T.A., Mansel R.E., Jiang W.G. (2010). Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. *Int. J. Mol. Med.*, **26 (5)**, 723-34.
- McSherry E.A., Brennan K., Hudson L., Hill A.D., Hopkins A.M. (2011). Breast cancer cell migration is regulated through junctional adhesion molecule-A- mediated activation of Rap1 GTPase. *Breast Cancer Res.* **13(2)**, R31.
- McSherry E.A., McGee S.F., Jirstrom K., Doyle E.M., Brennan D.J., Landberg G., et al. (2009). JAM-A expression positively correlates with poor prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer.* **125(6)**, 1343-51.
- Melchor L., Benitez J. (2013). The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet.* **132**, 845–863.
- Menon L.G., Kuttan R., Kuttan G. (1999). Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett.*, **141(1-2)**, 159-65.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* **266(5182)**, 66–71.
- Momenimovahed Z., Salehiniya H. (2019) Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, **11**, 151-164.
- Moore K., Persaud T. (1998). *The Developing Human—Clinically Oriented Embryology*. 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company.
- Morohashi S., Kusumi T., Sato F., Odagiri H., Chiba H., Yoshihara S., et al. (2007). Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.*, **20(2)**, 139-43.

Muller W.A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol.*, **50**, 7–22.

Murakami M., Giampietro C., Giannotta M., Corada M., Torselli I., Orsenigo F., et al. (2011). Abrogation of junctional adhesion molecule-A expression induces cell apoptosis and reduces breast cancer progression. *PLoS One*, **6**, e21242.

Naik M.U., Naik T.U., Suckow A.T., Duncan M.K., Naik U.P. (2008). Attenuation of junctional adhesion molecule-A is a contributing factor for breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* **68(7)**, 2194-203.

Naik U.P., Eckfeld K. (2003). Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1). *J Biol Regul Homeost Agents.* **17(4)**, 341- 7.

Nickel A., Blücher C., Al Kadri O., Schwagarus N., Müller S., Schaab M., et al. (2018). Adipocytes induce distinct gene expression profiles in mammary tumor cells and enhance inflammatory signaling in invasive breast cancer cells. *Sci. Rep.*, **8**, 9482.

Nguyen L.T., Lee Y.H., Sharma A.R., Park J.B., Jagga S., Sharma, G., et al. (2017). Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **21**, 205–213.

Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**, 418–425.

Nishiumi S., Miyamoto S., Kawabata K., Ohnishi K., Mukai R., Murakami A. et al. (2011). Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front. Biosci.*, **3**, 1332-62.

O'Brien K.M., Cole S.R., Tse C.K., Perou C.M., Carey L.A., Foulkes W.D. et al. (2010). Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res.* **16(24)**, 6100-6110. 23.

Osanai M., Murata M., Nishikiori N., Chiba H., Kojima T., Sawada N. (2006) Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via

modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. *Cancer Research*, **66**(18), 9125–9133.

Pacmayr E., Treese C., Stein U. (2017). Underlying Mechanisms for Distant Metastasis – Molecular Biology. *Visc Med.*, **33**, 11–20.

Pagano E., Romano B., Izzo A.A., Borrelli F. (2018). The clinical efficacy of curcumin-containing nutraceuticals: An overview of systematic reviews. *Pharmacological Research*, **134**, 79–91.

Paget S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.*, **8**, 98-101.

Pandya S., Moore R. (2011). Breast Development and Anatomy. *Clin. Obstet.Gynecol.* **54** (1), 91–95.

Paoli P., Giannoni E., Chiarugi P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, **1833**(12), 3481-3498.

Paredes J., Correia A.L, Ribeiro A.S., Milanezi F., Cameselle-Teijeiro J., Schmitt F.C. (2008). Breast carcinomas that co-express E- and P- cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmatic localisation and poor patient survival. *Journal Clin Pathol.*, **61**, 856-62.

Parihar A., Grotewold E., Doseff A.I. (2015). *Flavonoid dietetics: Mechanisms and emerging roles of plant nutraceuticals. In Pigments in Fruits and Vegetables*. Springer: New York, NY, USA; 93–126.

Park C.C., Zhang H., Pallavicini M., Gray J.W., Baehner F., Park C.J., Bissell M.J. (2006). Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Research*, **66**, 1526-1535.

Pasupuleti V.R., Sammugam L., Ramesh N., Gan S.H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1259510.

Patel S.D., Chen C.P., Bahna F., Honig B., Shapiro L. (2003). Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol.*, **13**, 690–8.

Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B., et al. (2005). Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* **353(16)**, 1659-1672.

Psaila B., Lyden D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, **9**, 285–293.

Pulkka O.P., Mpindi J.P., Tynnenen O., Nilsson B., Kallioniemi O., Sihto H., Joensuu H. J. (2018). Clinical relevance of integrin alpha 4 in gastrointestinal stromal tumours. *Cell. Mol. Med.*, **22 (4)**, 2220-2230.

Qureshi H.S., Linden M.D., Divine G. (2006). E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol*, **125**, 377-85.

Rejon C., Al-Masri M., McCaffrey L. (2016). Cell Polarity Proteins in Breast Cancer Progression. *J Cell Biochem.* **117(10)**, 2215-23.

Reymond N., d'Águal B.B., Ridley A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, **13(12)**, 858-870.

Sak K. (2017). Intake of individual flavonoids and risk of carcinogenesis: Overview of epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, **69**, 1119–1150.

Salvador E., Burek M., Förster C.Y. (2016). Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep.*, **4**, 135–145.

Samanta D., Almo S.C. (2015). Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity. *Cell Mol Life Sci.*, **72**, 645–58.

Sanlier N., Atik I., Atik A. (2018). A minireview of effects of white tea consumption on diseases. *Trends in Food Science & Technology*, **82**, 82–88.

Sarvaiya P.J., Guo D., Ulasov I., Gabikian P., Lesniak M.S. (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, **4**, 2171–2185.

Schlesinger M., Bendas G. (2015). Contribution of very late antigen-4 (VLA-4) integrin to cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. **34**(4), 575–591.

Sen T., Chatterjee A. (2011). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates EGF-induced MMP-9 in breast cancer cells: involvement of integrin receptor $\alpha 5\beta 1$ in the process. *Eur J Nutr.*, **50**, 465–478.

Sen T., Dutta A., Chatterjee A. (2010). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anti-Cancer Drugs*, **21**: 632–644.

Şensoy E., Öznurlu Y. (2009). Hücre adezyon molekülleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, **4** (1), 57-68.

Seyhan F., Yılmaz E., Timirci-Kahraman Ö., Saygılı N., Kısakesen H.İ., Eronat A.P., et al. (2017). Anatolian Honey Is Not Only Sweet but Can Also Protect from Breast Cancer: Elixir for Women from Artemis to Present. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, **69** (9), 677-688.

Seyhan F., Yılmaz E., Timirci-Kahraman Ö., Saygılı N., Kısakesen H.İ., Gazioğlu S, et al. (2018). Different Propolis Samples, Phenolic Content, and Breast Cancer Cell Lines: Variable Cytotoxicity Ranging from Ineffective to Potent. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, **71**(5), 619-631.

Sharma R., Khaket T.P., Dutta C., Chakraborty B., Mukherjee T.K. (2017). Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. *Cell Oncol (Dordr)*. **40**(3), 199-208.

Shin K., Fogg V.C., Margolis B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **22**, 207–235.

Shukla S., Park J., Kim D.H., Hong S.Y., Lee J.S., Kim M. (2016). Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture Doenjang, a Korean fermented soybean sauce variety. *Food Control*,

59, 854–861.

Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. (2017). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* **67**, 7-30.

Slivova V., Zaloga G., DeMichele S.J., Mukerji P., Huang Y.S., Siddiqui R., et al. (2005). Green tea polyphenols modulate secretion of urokinase plasminogen activator (uPA) and inhibit invasive behavior of breast cancer cells. *Nutr. Cancer*, **52**, 66–73.

Sökeland G., Schumacher U. (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Molecular Cancer*, **18**, 12.

Soto M.S., O'Brien E.R., Andreou K., Scrace S.F., Zakaria R., Jenkinson M.D., et al. (2016). Disruption of tumour-host communication by downregulation of LFA-1 reduces COX-2 and e-NOS expression and inhibits brain metastasis growth. *Oncotarget*, **7(32)**, 52375-52391.

Strell C., Entschladen F. (2008). Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, **6**, 10.

Sun D.W., Zhang H.D., Mao L., Mao C.F., Chen W., Cui M., et al. (2015). Luteolin inhibits breast cancer development and progression in vitro and in vivo by suppressing notch signaling and regulating miRNAs. *Cell Physiol Biochem*, **37(5)**, 1693–1711.

Sun Y.S., Zhao Z., Yang Z.N., Xu F., Lu H.J., Zhu Z.Y., et al. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **13(11)**, 1387-1397.

Tan W., Lin L., Li M., Zhang Y., Tong Y., Xiao D., Ding J. (2003). Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur. J. Pharmacol.*, **459**, 255-262.

Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**, 871–890.

Thilakarathna S.H., Rupasinghe H. P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, **5**, 3367–3387.

Tian, Y., Tian, Y., Zhang W., Wei, F., Yang, J., Luo, X., et al. (2015). Junctional adhesion molecule-A, an epithelial-mesenchymal transition inducer, correlates with metastasis and poor prognosis in human nasopharyngeal cancer. *Carcinogenesis*, **36**, 41–48.

- Tsuda T. (2018). Curcumin as a functional food-derived factor: Degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food & Function*, **9(2)**, 705–714.
- Valastyan S., Weinberg R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, **147**, 275–292.
- Van Roy F., Berx G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3756–3788.
- Vanderslice P., Biediger R.J., Woodside D.G., Brown W.S., Khounlo S., Warier N.D., et al. (2013). Small Molecule Agonist of Very Late Antigen-4 (VLA-4) Integrin Induces Progenitor Cell Adhesion. *J Biol Chem.* **288(27)**, 19414–19428.
- Varinska L., Gal P., Mojzisova G., Mirossay L., Mojzis J. (2015). Soy and breast cancer: Focus on angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 11728–11749.
- Vasse M., Thibout D., Paysant J., Legrand E., Sorial C., Crépin M. (2001). Decrease of breast cancer cell invasiveness by sodium phenylacetate (NaPa) is associated with an increased expression of adhesive molecules. *British Journal of Cancer*, **84(6)**, 802–807.
- Vazquez Rodriguez G., Abrahamsson A., Jensen LD., Dabrosin C. (2017). Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Migration via Recruitment and Activation of Neutrophils. *Cancer Immunol Res.* **5(3)**, 234–247.
- Veeramuthu D., Raj W.R.T., Al-Dhabi N.A., Savarimuthu I. (2017). *Flavonoids: Anticancer properties*, Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health, Goncalo C. Justino, IntechOpen, DOI: 10.5772/68095.
- Vermerris W., Nicholson R. (2006). *Phenolic Compounds Biochemistry*. Dordrecht, The Netherlands; Springer: 1–34.
- Vestweber D. (2008). VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **28(2)**, 223–232.
- Vuong D., Simpson P.T., Green B., Cummings M.C., Lakhani S.R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.*, **465(1)**, 1–14.

- Wadhwa R., Nigam N., Bhargava P., Dhanjal J.K., Goyal S., Grover A., et al. (2016). Molecular characterization and enhancement of anticancer activity of caffeic acid phenethyl ester by gamma cyclodextrin. *J. Cancer*, **7**, 1755–1771.
- Wai Wong C., Dye D.E., Coombe D.R. (2012). The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *J Int J Cell Biol.*, **2012**, 340296.
- Waks A.G, Winer E.P. (2019). Breast cancer treatment. *JAMA*, **321(3)**, 288-300.
- Wang G., Wang J.J., Guan R., Du L., Gao J., Fu X.L.J. (2017). Strategies to target glucose metabolism in tumor microenvironment on cancer by flavonoids. *Nutr. Cancer.*, **69**, 534–554.
- Wang H.S., Hung Y., Su C.H., Peng S.T., Guo Y.J., Lai M.C., et al. (2005). CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha L beta2) and VLA-4 (alpha4beta1). *Exp Cell Res.* **304(1)**, 116-26.
- Wang T.Y., Li Q., Bi K.S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13**, 12–23.
- Wang Y., Lui W.Y. (2012). Transforming growth factor- β 1 attenuates junctional adhesion molecule-A and contributes to breast cancer cell invasion. *Eur J Cancer*, **48**, 3475-3487.
- Weil R.J., Palmieri D.C., Bronder J.L., Stark A.M., Steeg P.S. (2005). Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am. J. Pathol.*, **167**, 913-920.
- Williams L.A., Martin-Padura I., Dejana E., Hogg N., Simmons D.L. (1999). Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol. Immunol.* **36**, 1175–1188.
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. **265(5181)**, 2088–2090.

Xu L., Zhang L., Bertucci A.M., Pope R.M., Datta S.K. (2008). Apigenin, a dietary flavonoid, sensitizes human T cells for activation-induced cell death by inhibiting PKB/Akt and NF- κ B activation pathway. *Immunol. Lett.*, **121**, 74–83.

Xuan H., Li Z., Yan H., Sang Q., Wang K., He Q., et al. (2014) Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID: 280120.

Yan M., Jurasz P. (2016). The role of platelets in the tumor microenvironment: from solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta*, **1863**, 392–400.

Yang B., Huang J., Xiang T., Yin X., Luo X., Huang J., et al. (2014). 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*, **34(1)**, 105-112.

Yang C.S., Lambert J.D., Sang S. (2009). Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch. Toxicol.* **83**, 11–21.

Yıldırım M. (2012). *İnsan Anatomisi*. 7.baskı. İstanbul, Nobel Matbaacılık.

Yordi E., Perez E., Matos M., Villares E. (2012). *Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence, Nutrition, Well Being and Health*, IntechOpen, DOI: 10.5772/29471.

Zhang M, Luo W, Huang B, Liu Z., Zhang Q., Qiu X., et al. (2013). Overexpression of JAM-A in non-small cell lung cancer correlates with tumor progression. *PLoS One*, **8**, e79173.

Zhang Y., Han G., Fan B., Zhou Y., Zhou X., Wei L., Zhang J. (2009). Green tea (-)-epigallocatechin-3 gallate down-regulates VASP expression and inhibits breast cancer cell migration and invasion by attenuating Rac1 activity. *Eur J Pharmacol.*, **606(1-3)**, 172-9.

Zhao C., Lu F., Chen H., Zhao X., Sun J., Chen H. (2014). Dysregulation of JAM-A plays an important role in human tumor progression. *Int J Clin Exp Pathol.* **7(10)**, 7242-8.

Zhao H., Yu H., Martin T.A., Zhang Y., Chen G., Jiang W.G. (2016). Effect of junctional adhesion molecule-2 expression on cell growth, invasion and migration in human colorectal cancer. *Internatinal Journal of Oncology*, **48**, 929-936.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

POLİFENOLİK BİLEŞENLERİN
HORMON POZİTİF VE
NEGATİF MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA
MİGRASYON İLİŞKİLİ JAM-A,
LFA-1 VE VLA-4 GEN
EKSPRESYONLARINA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gönderim Tarihi: 01-Kasım-2019 14:41:11 (UTC+3:00)

Gönderim Numarası: 1204900132

Dosya adı: POLİFENOLİK BİLEŞENLERİN HORMON POZİTİF VE NEGATİF MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA MİGRASYON İLİŞKİLİ JAM-A, LFA-1 VE VLA-4 GEN EKSPRESYONLARINA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI.docx (119.13K)

Kelime sayısı: 18714

Karakter sayısı: 129410

POLİFENOLİK BİLEŞENLERİN HORMON POZİTİF VE
NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
MİGRASYON İLİŞKİLİ JAM-A, LFA-1 VE VLA-4 GEN
EKSPRESYONLARINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 8	% 4	% 3	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Adam M. Zawada, Kyrill S. Rogacev, Stephan H. Schirmer, Martina Sester, Michael Böhm, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine. "Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease", Immunobiology, 2012 Yayın	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	isfaw2019.isfaw.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülçin	Soyadı	Özkara
Doğ.Yeri	Kırklareli	Doğ.Tar.	12/06/1982
Email	gulcinozkara@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Haliç Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	2004
Lise	Lüleburgaz Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Embriyolog	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, IVF Laboratuvarı	2015-2019
2.	Aplikasyon Uzmanı	Medsantek Ltd.Şti.	2013-2014
3.	Embriyolog	IVI Tüp Bebek Merkezi, İstanbul	2008-2012
4	Embriyolog	IVI Tüp Bebek Merkezi, Barselona	2007-2008
5	Satış ve Aplikasyon Uzmanı	Medsantek Ltd.Şti.	2004-2007

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YÖKDİL Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	95	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			

(Diğer)	Puanı			
---------	-------	--	--	--

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
SPSS	İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- 1) The relationship between serum ApoM and lipid levels in restenosis patients.** Gülçin ÖZKARA, Zahra JAVADOVA, Ezgi Irmak ASLAN, Onur KILIÇARSLAN, Özgür Selim SER, Ahmet YILDIZ, Oğuz ÖZTÜRK, Hülya YILMAZ-AYDOĞAN. 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 27-29 Sep 2019, Istanbul (Poster sunumu).
- 2) Septin12 c.474 G>A Polymorphism as a risk factor in teratozoospermia patients.** Gülçin Özkara, Nagehan Ersoy-Tunalı. VII. International Congress of Molecular Medicine. 5-7 September 2019, Istanbul (Sözlü sunum).
- 3) Association of LOX-1 rs1800449 (G473A) mutation with osteoporosis risk in Turkish post-menopausal women.** Gülçin Özkara, Özlem Küçük Hüseyin, Mehmet Uyar, Hülya Yılmaz-Aydoğan, Özlem Kurt. VII. International Congress of Molecular Medicine. 5-7 September 2019, Istanbul (Sözlü sunum).
- 4) Role of SNPs CPT1A and CROT genes in the carnitine-shuttle in coronary artery disease: a case-control study.** Aslıhan Demircan, Ender Coskunpinar, Deniz Kanca, Gulcin Ozkara, Fatih Yanar, Ozlem Kurnaz-Gomleksiz, Zehra Bugra, Oguz Ozturk, Hulya Yilmaz-Aydogan. Turkish Journal of Biochemistry (2019). 20180546, ISSN (Online) 1303-829X, ISSN (Print) 0250-4685. <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0546>.
- 5) BMP 5'UTR+ 104 T/C gene variation: can be a predictive marker for serum HDL and apolipoprotein A1 levels in male patients with coronary heart disease.** Basak Akadam-Teker, Gulcin Ozkara, Ozlem Kurnaz-Gomleksiz, zehra Bugra, Erhan Teker, Oguz Ozturk, Hulya Yilmaz-Aydogan. Molecular Biology Reports (2018) 45:1269-1276. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4283-8>.

- 6) **Effect of air bubbles localization and migration after embryo transfer on assisted reproductive technology outcome.** Cem FıCıCıoglu, Pınar Ozcan, Melis G. Kocer, Mert Yesiladalı, Oya Alagoz, Gulcin Ozkara, Ahter T. Tayyar, Cigdem Altunok, Fertility and Sterility (2018) 109(2):310-314. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.10.032.
- 7) **Mikroakışkan Çip Kullanımının Blastokist Gelişimine Etkisi (The Effect of Microfluidic Sperm Chip Utilization on Blastocyst Development).** G.Ozkara, O.Alagoz, A.İsmicoglu, M.G.Kocer, C.FıCıCıoglu. 19th World Congress on In Vitro Fertilization in conjunction with VI. Society of Reproductive Medicine and Surgery Congress, 4-8 October 2017 Antalya-Turkey. Abstract:0234, P-69. TJRMS 2017; 1(3): 191-292. DOI: 10.240474/tjms.01032017SP (Poster sunumu).
- 8) **Düşük Sperm Değerlerine Sahip Hastalarda Mikroakışkan Çip Kullanımının Blastokist Gelişimine Etkisi (The Effect of Microfluidic Sperm Chips on Blastocyst Development in Patients with Poor Sperm Parameters).** G.Ozkara, O.Alagoz, A.İsmicoglu, M.G.Kocer, C.FıCıCıoglu. 19th World Congress on In Vitro Fertilization in conjunction with VI. Society of Reproductive Medicine and Surgery Congress, 4-8 October 2017 Antalya-Turkey. Abstract:0237, P-71. TJRMS 2017; 1(3): 191-292. DOI: 10.240474/tjms.01032017SP (Poster sunumu).
- 9) **Single versus sequential medium, which is better?** G.Ozkara, O.Alagoz, A.İsmicoglu, M.G.Kocer, C.FıCıCıoglu. 19th World Congress on In Vitro Fertilization in conjunction with VI. Society of Reproductive Medicine and Surgery Congress, 4-8 October 2017 Antalya-Turkey. Abstract:0200, P-49. TJRMS 2017; 1(3): 191-292. DOI: 10.240474/tjms.01032017SP (Poster sunumu).
- 10) **Does dual triggering has an effect to oocyte maturation at ART cycles?** M.G.Kocer C.FıCıCıoglu. G.Ozkara, O.Alagoz. 19th World Congress on In Vitro Fertilization in conjunction with VI. Society of Reproductive Medicine and Surgery Congress, 4-8 October 2017 Antalya-Turkey. Abstract:203, P-50. TJRMS 2017; 1(3): 191-292. DOI: 10.240474/tjms.01032017SP (Poster sunumu).

- 11) Düşük Over Rezervine Sahip İnfertil Hastaların Antagonist Protokol Tedavisinde Dual Trigger Uygulamasının Oosit Maturasyonua Etkisi (The Effect of Dual Triggering with Antagonist Protocol on Oocyte Maturation in Patients with Diminished Ovarian Reserve).** M.G.Kocer C.Fıncıoğlu, G.Ozkara, O.Alagoz. 19th World Congress on In Vitro Fertilization in conjunction with VI. Society of Reproductive Medicine and Surgery Congress, 4-8 October 2017 Antalya-Turkey. Abstract:0212, P-55. TJRMS 2017; 1(3): 191-292. DOI: 10.240474/tjms.01032017SP (Poster sunumu).
- 12) Improving Pregnancy Rate in IVF Cycles by Preparing Sperm via Microfluidic Sperm Chips.** O.Alagoz, G.Ozkara, M.G.Kocer C.Fıncıoğlu. 33rd Annual Meeting of ESHRE, Geneva-Switzerland.(2017) (www.humrep.oxfordjournals.org , volume 32 supp 1 2017 abstract book P-087) (Poster sunumu).
- 13) Association Between CPT1A/CROT Gene Variations and Dyslipidemia Phenotype in Patients with Coronary Artery Disease.** A.Demircan, E.Coskunpınar, D.Kanca, G.Ozkara, Z.Bugra, O.Ozturk, H.Yılmaz Aydoğan. VI. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul-Turkey (2017) Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology. May 2017 Vol 02, Number 01,Supplement 01, P-172 (Poster sunumu)..
- 14) The role of septin12 codon 474 G>A polymorphism in male infertility.** N.Ersoy Tunalı, G.Ozkara, H.Subasıoğlu, F.Bener. 30th Annual Meeting of ESHRE, Munich-Germany (2014) (www.humrep.oxfordjournals.org , volume 29 supp 1 2014 abstract book P-442) (Poster sunumu).
- 15) The effect of oocyte morphology on embryo quality in young patients with polycystic ovary syndrome.** E. Soydan, G. Gülebenzer, E. Karatekelioğlu, E. Budak, T. Pehlivan Budak. 28th Annual Meeting of ESHRE, 2-4 July Istanbul-Turkey (2012). P-164. Human Reproduction, Volume 27, Issue suppl_2, 1 January 2012, Pages ii162–ii205, <https://doi.org/10.1093/humrep/27.s2.77> (Poster sunumu).
- 16) Üreme Tıbbında Kalite Yönetimi;** Çeviri: Uzm. Dr. Erdal Budak, Gülçin Gülebenzer, Esra Soydan, Dr.Tuğçe Pehlivan Budak; Yardımla Üreme Teknikleri

Temel Kitabı-Laboratuvar ve Klinik Görüşler; 2.Baskı; David K.Gardner et al (Nobel Tıp 2010) (**Kitap Çevirisi**)

Sertifikalar

SPSS Uygulamalı Biyoistatistik Kursu- VII. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi, 2019.
Kıdemli Klinik Embriyolog Sertifikası (Senior Clinical Embryologist), Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE), 2018.

T.C. Sağlık Bakanlığı ÜYTE Laboratuvar Sertifikası – Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, İstanbul, 2015

PGS uygulamalarında Yeni Nesil Dizileme Uygulama Kursu, Mikrogen, Ankara, 2015

QuantStudio 3D Dijital PCR Sistemi Eğitimi, Life Technologies, Almanya, 2013

Özel İlgi Alanları (Hobileri):