

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ODA-MMT (OCTADECYL AMINE-MONTMORILLONITE), DMA-MMT
(DIMETHYLDIDODECYL AMMONIUM-MONTMORILLONITE) S-1-
DODECYL-S-(α , α' – DIMETHYL- α'' ACETIC ACID) TRITHIOCARBONATE
GİBİ POLİMERLERİN MCF-7 HÜCRE HATTINDA BRCA-1, BRCA-2 VE
KASPAZ 3 GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

SERAP URAL

AĞUSTOS 2014

Biyoloji Anabilim Dalında Serap URAL tarafından hazırlanan ODA-MMT (OCTADECYL AMINE-MONTMORRILONITE), DMA-MMT (DIMETHYLDIDODECYL AMMONIUM – MONTMORILLONITE) S-1-DODECYL-S-(α , α' – DIMETHYL- α' ACETIC ACID) TRITHIOCARBONATE GİBİ POLİMERLERİN MCF-7 HÜCRE HATTINDA BRCA-1, BRCA-2 VE KASPAZ-3 GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç.Dr.Mustafa TÜRK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Siyami KARAHAN _____

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Mustafa TÜRK _____

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN _____

..... /..... /.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

(Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM)

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ODA-MMT (OCTADECYL AMINE-MONTMORILLONITE), DMA-MMT (DIMETHYLDIDODECYL AMMONIUM-MONTMORILLONITE) S-1-DODECYL-S-(α , α' – DIMETHYL- α'' ACETIC ACID) TRITHIOCARBONATE GİBİ POLİMERLERİN MCF-7 HÜCRE HATTINDA BRCA-1, BRCA-2 VE KASPAZ 3 GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

URAL, Serap

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Ağustos 2014, 74 sayfa

Günümüzde kanser, tedavisi tam anlamıyla mümkün olmayan bir hastalıktır. Kanser türlerinden biriside kadınlarda en sık rastlanan meme kanseridir. Bazı genlerde meydana gelen mutasyonlar, bazı kadınları meme ve diğer kanser türlerine karşı daha “yatkın” hale getirmektedir. Bu kalıtsal değişikliklerin olduğu genler arasında en çok bilinenler BRCA-1 ve BRCA-2 genleridir. BRCA-1 ve BRCA-2 genlerindeki mutasyonlar meme ve over kanserlerinin çok büyük bir bölümünde kanserleşme nedenidir. Meme kanserine neden olan bu genlerden başka, genlerinde olup olmadığı da halen araştırılmaktadır.

Çalışmamızda, ODA-MMT ve DMA-MMT polimerlerinin MCF-7 hücre hattında BRCA-1, BRCA-2 ve Kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla MCF-7 hücreleri değişik miktarlardaki polimerler ile muamele edilmiştir. Herhangi bir polimer ile muamele edilmeyen grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İlk olarak polimerlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve antiproliferatif etkisi real-time analyzer cihazı (RTCA) ile araştırılmıştır ve ODA-Raft kopolimeri hücreler için en toksik kopolimer olarak bulunmuştur. Daha sonra apoptotik ve nekrotik indeksin saptanması için ise ikili boyama ve annexin-5 boyama metodu kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre apoptotik etkiler kopolimerlerinin

düşük konsantrasyonlarında gözlemlenmiş ve konsantrasyonlardaki artış apoptotik etkiyi dahada arttırmıştır. Ayrıca yüksek konsantrasyondaki ODA-Raft kopolimerinin apoptotik etkisinin yüksek konsantrasyonlardaki DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerlerinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Son olarak polimerlere maruz kalmış MCF-7 hücrelerindeki BRCA-1, BRCA-2 ve Kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR yöntemi ile saptanmıştır. ODA-Raft ve DMA - Raft kopolimerlerinin Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesinin artmasında etkili olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: MCF-7, BRCA-1, BRCA-2, KASPAZ-3, RT-PCR, Apoptoz

ABSTRACT

EFFECT OF ODA-MMT (OCTADECYL AMINE-MONTMORILLONITE), DMA-MMT (DIMETHYLDIDODECYL AMMONIUM-MONTMORILLONITE) WITH S-1-DODECYL-S-(α , α' – DIMETHYL- α ” ACETIC ACID) TRITHIOCARBONATE AS POLIMERS ON BRCA-1, BRCA-2 AND CASPASE-3 GENE EXPRESSIONS IN MCF-7 CELLS IN VITRO

URAL, Serap

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Postgraduate Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Mustafa TÜRK

August 2014, 74 pages

Today, cancer is a disease for which total cure is not possible. One of the cancer types is the breast cancer that is frequently seen in women. Gene mutations occur in particular genes that make some women more “prone” to mammary cancer and other cancer types. Among the well-known genes that cause such hereditary alterations are BRCA-1 and BRCA-2. Mutations in BRCA-1 and BRCA-2 genes constitute a carcinogen factor in a considerable amount of mammary and ovary cancers. Involvement of genes other than these genes causing the mammary cancer is still a subject of research.

Our study has examined the impact of the ODA-MMT and DMA-MMT polimers on the MCF-7 cells of BRCA-1, BRCA-2, and Caspase-3 genes expression levels. MCF-7 cells have been treated with varying amounts of polimers. The group not treated with any polimer is considered as the control group. First, the cytotoxic effect and the anti-proliferative impact of the polimers were examined by real-time analyzer apparatus (RTCA) and the ODA-Raft has been determined as the most toxic

copolymer for MCF-7 cells. Later double and annexin-5 staining method have been used to assess the apoptotic and necrotic indexes. Considering the obtained data, copolymers of the apoptotic impacts have been observed at lower concentrations and increase in concentrations have further increased the apoptotic effect. Furthermore, it is established that the apoptotic effect of the ODA-Raft copolymer in high concentrations are more than DMA-MMT, DMA-Raft, and ODA-Raft copolymers. Finally, expression levels of BRCA-1, BRCA-2, and Caspase-3 genes in MCF-7 cells exposed to polimers have been determined by the Real-Time PCR method. It has been found that the ODA-Raft and DMA -Raft copolymers are affective in increasing the Caspase-3 gene expression level.

Key words: MCF-7, BRCA-1, BRCA-2, CASPASE-3 RT-PCR, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince yardımını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, her zaman bana yol gösterici olmuş , yüksek lisans tezimde danışmanım olan sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e

Polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Zakir M.O. RZAYE'e

Laboratuvar çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan sevgili Esra ARAT'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum

Serap URAL

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.	1
1.1. KANSER.....	2
1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	5
1.3. Kansere Yol Açan Risk Faktörleri.....	6
1.3.1. Davranışsal Risk Faktörleri.....	6
1.3.2. Biyolojik Risk Faktörleri.....	6
1.3.3. Çevresel Risk Faktörleri.....	7
1.3.4. Genetik Risk Faktörleri	7
1.4. Hücre Döngüsü ve Kanser	7
1.4.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	8

1.5. Kanser Oluşumu (Karsinogenez)	9
1.5.1. Aşırı Kanser Hücresi Üretiminin Nedenleri	10
1.5.1.1. Apoptoz	10
1.5.1.1.1. Kaspazlar	11
1.5.1.2. Hücre Proliferasyonunu Uyarıcı Genetik Defektler	13
1.5.1.3. Tümör Anjiyogenezi	15
1.6. Meme Kanseri	15
1.6.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	16
1.6.2. Meme Kanseri Oluşumunda Risk Etmenleri	17
1.6.2.1. Endokrin Etmenler	17
1.6.2.1.1. Reprodüktif Etmenler	17
1.6.2.1.2. Eksojen Hormonlar	19
1.6.2.2. Çevresel Etmenler	20
1.6.2.3. İyonlaştırıcı Işıklar	21
1.6.2.4. Elektromanyetik Alanlar	22
1.6.2.5. Fiziksel Etkinlik	22
1.6.2.6. Sigara	23
1.6.2.7. Obezite	23
1.6.2.8. Memenin Selim Lezyonları	23
1.6.2.9. Geçirilmiş Meme Kanseri	24
1.6.2.10. Genetik Etmenler	24

1.6.3. Meme Kanserinin Genetiği	24
1.6.3.1. Meme Kanserinde Rol Oynayan Genler	25
1.6.3.1.1. Onkogenler:.....	25
1.6.3.1.2. Büyüme Etmeni ve Büyüme Etmeni Almaç Genleri:	25
1.6.3.1.3. Tümör Baskılayıcı Genler	27
1.6.3.1.3.1. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri ve Fonksiyonları	27
1.7. PCR	30
1.7.1. Real-Time PCR	34
1.7.1.1. Kantitatif qRT-PCR.....	37
1.7.1.2. Relative qRT-PCR.....	38
1.7.2. Housekeeping Genler	39
1.8. Kullanılan Polimerler ile İlgili Genel Bilgiler.....	39
2. MATERYAL YÖNTEM.....	41
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	41
2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar	41
2.2.1. Besiyeri Hazırlanması	41
2.3. MCF-7 Hücre Kültürü.....	42
2.4. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksite Testi	42
2.5. Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Analizi	42
2.6. Annexin-V-Fluos İmmunokimyasal Boyama	43
2.7. Total RNA İzolsayonu	43

2.8. cDNA Sentezi.....	44
2.9. Relative qRT-PCR Deneyi	45
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
3.1. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksite Sonuçları	45
3.2. Apoptoz Sonuçları.....	49
3.3. Real-Time PCR Testinin Sonuçları	51
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	56
KAYNAKLAR.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.A. Dünya genelinde en çok ölüme neden olan kanser türleri (non-melonom cilt kanserleri hariç)	4
1.1.B. Türkiye’de 1999-2005 Yılları Arasındaki Kanser insidans Değerleri	4
1.1.C. Türkiye de en fazla görülen ilk on kanser türünün insidans değerleri	5
1.4.A. Hücre döngüsü	8
1.4.B. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	9
1.5.A. Kaspaz’ın yapısı	11
1.5.B. Ölüm Reseptörleri ve Mitokondriyal Yollarla Kaspaz-3 Aktivasyonunun Başlamasıyla Nükleusta Oluşan DNA Fragmantasyonu	13
1.6.A. 2002-2007 Yılları Arasında Türkiye’de Tüm Kanserlerden Ölümler İçinde Meme Kanserinin Yüzdeleri.....	16
1.6.B. 2002-2007 Yılları Arasında Türkiye’de Kadınlarda Tüm Kanserlerden Ölümler İçinde Meme Kanserinin Yüzdeleri	17
1.6.C. BRCA-1 proteinin fonksiyonel bölümleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu.....	28
1.6.D. BRCA-2 proteinin fonksiyonel domainleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu.....	29
1.7.A. Syber Green tekniğinin aşamaları	35
1.7.B. TaqMan Tekniğinin Aşamaları	36
1.7.C. Hibridizasyon Probu Örneği.....	37
1.7.C. PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri.	38
1.8. BATC ODA-MMT kompleksinin MCF-7 kanser hücreleri ile etkileşiminin şekilsel gösterimi.....	40

3.1.A. ODA-MMT, ODA–Raft, DMA-MMT ve DMA-Raft kopolimerlerinin MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisinin hücre indeksi ile logaritmik olarak hesaplanması.....	46
3.1.B. MCF-7 hücrelerine muamale edilen ODA-MMT ve DMA–Raft kopolimerlerinin Real-Time analyzer (RTCA) cihazından elde edilen analiz görüntüleri	47
3.1.C. MCF-7 hücrelerine muamale edilen ODA-RAFT ve DMA-MMT kopolimerlerinin Real-Time analyzer (RTCA) cihazından elde edilen analiz görüntüleri	48
3.2. Annexin-V boyası ve double staining yönteminde kullanılan Hoechst 33342 isimli boya ile boyanmış apoptotik hücre ve yine double staining yönteminde kullanılan PI boyası ile boyanmış nekrotik hücrelerin görüntüleri..	51
3.3.A. Kontrol grubu, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin BRCA-1 gen ekspresyon seviesindeki değişimler ...	53
3.3.B. Kontrol grubu, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin BRCA-2 gen ekspresyon seviesindeki değişimler ...	54
3.3.C. Kontrol grubu, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin Kaspaz-3 gen ekspresyon seviesindeki değişimler..	55
3.3.D. BRCA-1,BRCA-2 VE KASPAZ-3 Genlerinin Amplifikasyon(Çoğalma) Eğrileri.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
2.8. cDNA sentez profili	45
3.2. MCF-7 hücrelerine farklı miktarda muamele edilen kopolimerlerin apoptotik ve nekrotik indeksleri	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
ml	Mililitre
%	Yüzde
°C	Santigrat
CO ₂	Karbondioksit
µl	Mikrolitre
kDa	kilodalton
ph	hidrojenin gücü

KISALTMALAR DİZİNİ

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
BRCA-1	Meme Kanseri 1 Geni
BRCA-2	Meme Kanseri 2 geni
qRT-PCR	Quantitative Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
actb	Beta Aktin Housekeeping Geni
FBS	Fetal Bovin Serum
PBS	Fosfat Buffer Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium

1. GİRİŞ

Bu çalışmada ODA-MMT ve DMA-MMT polimerleri ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında BRCA-1, BRCA-2 ve Kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliğin bulunması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada herhangi bir polimere maruz bırakılmamış bir kontrol grubu MCF-7 hücre hattı ve herhangi bir polimer ile muamele edilmiş MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak iki hücre grubundaki sitotoksik etki ve antiproliferatif etki real-time analyzer cihazı (RTCA) ile tespit edildi. Hücrelerin apoptotik ve nekrotik indeksleri ikili boyama ve annexin-5 boyama metodu ile tesbit edildi. Son olarak polimerlere maruz kalmış MCF-7 hücrelerindeki gen ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR yöntemi ile saptandı.

Kanser, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir ölüm sebebidir. Kalp damar hastalıklarından sonra ikinci ölüm nedeni olarak görülmektedir [1]. En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer(%22), kolorektal(%12) ve prostat(%11) iken kadınlarda ise meme(%26), kolorektal(%14) ve midedir(%7) [2]. Böylesine önemli bir toplumsal sorunun nedeni, tanısı ve tedavisine yönelik çalışmalar hastaların yaşam süresi ve kalitesi açısından önemli bir yer tutmaktadır [1].

Tüm ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserine bir kadının tüm hayatı boyunca yakalanma riski 1/12-1/20 arasında değişmektedir [3]. Meme kanserinin bu kadar yaygın olmasına karşın, klinik olarak meme kanserli kadınların ancak %25'inde risk faktörleri tespit edilebilmektedir [4,5]. Meme kanserine neden olan tek bir faktör bulunmamakta, ileri yaş, kadın olmak, 12 yaşından önce adet görmek, 50 yaşından sonra menapoza girmek, ailede kanser hikayesinin olması, ilk canlı doğumunu 30 yaşından sonra yapmak gibi birtakım risk faktörlerinin meme kanserine yakalanma ve meme kanseri gelişim sürecini hızlandırdığı bilinmektedir [6].

Ayrıca birçok epidemiyolojik araştırmada pozitif aile öyküsü ile ilişkili risk belirlenmeye çalışılmış ve çalışmalar ailesel kümelenmenin etkili olduğunu göstermiştir [7].

Genetik eğilim özellikle son yıllarda meme kanseri etyolojisinde önemli rolü olduğu vurgulanan bir faktördür. 50 yıldan fazla bir süredir, meme kanseri için pozitif aile öyküsü olan kadınların bu hastalığı geliştirme açısından artmış risk altında oldukları hakkında birçok kanıt mevcuttur. Bu konudaki en göze çarpan örnekler herediter over ve meme kanseri sendromlarından sorumlu olan BRCA-1 ve BRCA-2 tümör supresör genlerdir [8].

Ayrıca kemoterapötik ajanlarda dahil olmak üzere hücreysel ölüm sinyalleriyle aktive olan kaspaz-3 genleri bir çok genetik eğilim temelli çalışmaya konu olmuştur [9].

Günümüzde hücre ve dokularda fizyolojik veya patolojik bir etkinin cevabının incelenmesi amacıyla mRNA ekspresyon çalışmalarına başvurulmaktadır. Doku ve hücrelerin mRNA düzeyinde incelenmesi, gen düzeyinde kantitatif analiz fırsatı vermektedir [10]. Revers transkriptaz (RT) reaksiyonunu takiben gerçekleştirilen PCR reaksiyonu mRNA seviyesini belirlenmesi için kullanılan etkili yöntemlerden biridir. Quantitative RT-PCR(qRT-PCR) yöntemi, mRNA seviyesinin belirlenebilmesi için en hassas ve en güvenilir seçenektir [11].

Çalışmamızda, başka bir çalışma kapsamında sentezlenmiş olan ODA-MMT ve DMA-MMT maddelerinin MCF-7 kanser hücre hatlarındaki belirli genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri incelenmiştir. Genler çalışmalarda meme kanseri ile ilişkilendirilmiş genlerden seçilmiştir. Bu genler; kaspaz-3, BRCA-1 ve BRCA-2 genleridir. Ayrıca apoptoz, nekrozositotoksite ve hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

1.1. KANSER

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar.

Günde vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen immün sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açar. Bunun birçok nedeni vardır. Bu nedenler;

- ✓ Mutasyon gösteren hücrelerin yaşama kabiliyetleri normal hücrelere göre daha azdır. Bu yüzden ölürlür.
- ✓ Mutasyon gösteren hücrelerin pek çoğunda bile hala aşırı büyümeyi önleyen normal geridönüm kontrol düzeneği("Tümör baskılayıcı genler") bulunur. Bu yüzden hayatta kalabilen mutant hücrelerin çok azı kanserli hücreye dönüşür.
- ✓ Sıklıkla, kanser potansiyeli taşıyan bu hücreler büyüyüp kanser oluşturmadan önce vücudun bağışıklık sistemi tarafından yok edilirler.

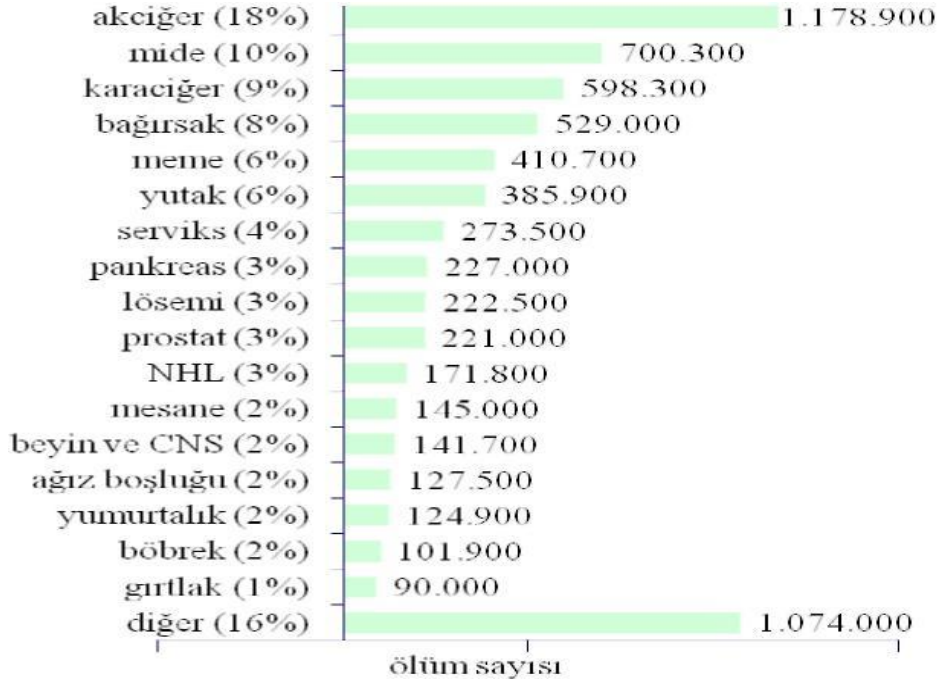
Kanser başlangıcı olan alanda en önemli özellik, kitlenin çevre dokulara girift, yapışık olmasıdır. İyi huylu (benign) tümörler genellikle sınırları belirgin kitlelerdir. Ancak kötü huylu (malign) tümörler, sınırları belirsiz ve çevre dokuya sıkıca yapışık halde bulunurlar. Kanserler oluşmaya başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre sınıflandırılırlar. Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyürler, farklı yayılma biçimleri gösterirler ve farklı tedavilere cevap verirler. Bu nedenle kanser hastalarının tedavisinde, var olan kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanır. Her kanser aynı yapıya sahip değildir [12].

2008 yılı Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan Dünya kanser raporunda 12,4 milyon tahmin edilen yeni vaka ve 7,6 milyon ölüm meydana geldiği belirtilmiştir. İnsidans yönünden dünyada en yaygın kanserler akciğer (1,52 milyon), meme (1,29 milyon) ve kolorektal (1,15milyon) kanserleridir. Kötü prognoz nedeniyle akciğer kanseri aynı zamanda en fazla ölüme (1,31 milyon) neden olan kanserken onu mide kanseri (780.000 ölüm) ve karaciğer kanseri (699.000 ölüm) izlemiştir.

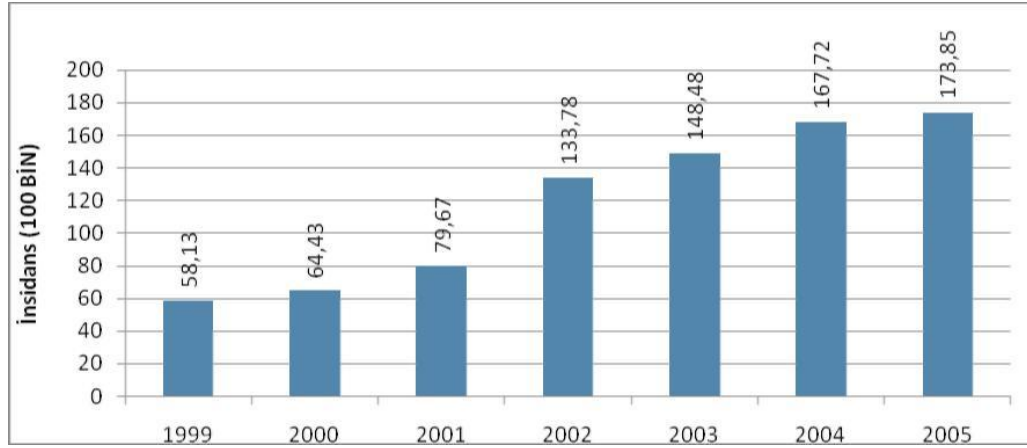
Kadınlarda meme kanseri gelişmiş bölgelerdeki tahmini 715.000 (toplamın %26,5'i) ve az gelişmiş ülkelerdeki 577.000 yeni vaka ile (%18,8) büyük farkla dünya genelindeki en yaygın kanser türüdür.

Gelişmiş ülkelerde meme, akciğer ve kolorektal kanserler gelişmiş ülkelerdeki ölümlerin toplamının %42,5'ini teşkil ederken, az gelişmiş ülkelerde rahim ağzı

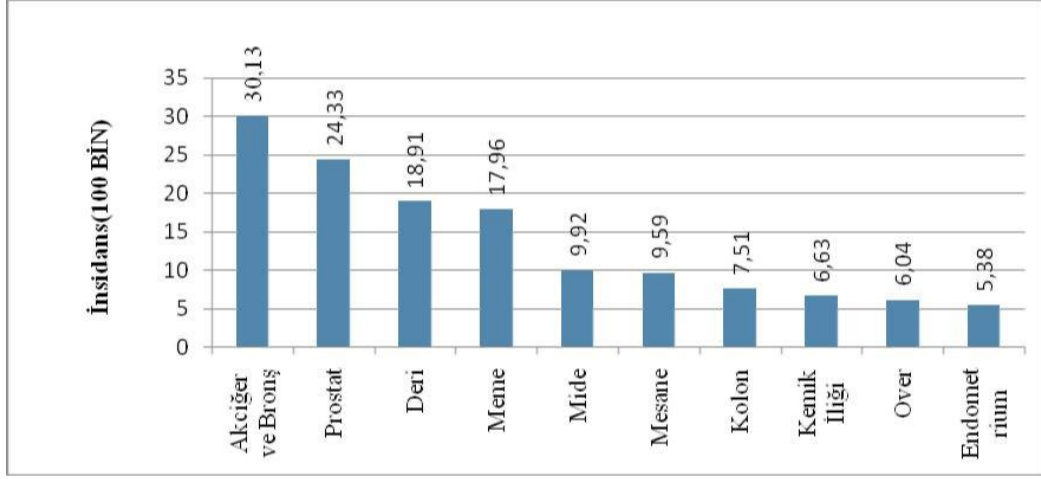
kanseri tahmini 275.000 ölümlle (toplamın %13,9'u) birinci sıradadır ve onu meme kanseri (252.000 ölüm, %12,7) ve mide kanseri (189.000 ölüm, %9,6) izlemektedir [48].



Şekil 1.1.A. Dünya genelinde en çok ölüme neden olan kanser türleri (non-melonom cilt kanserleri hariç) [49]



Şekil 1.1.B. Türkiye'de 1999-2005 Yılları Arasındaki Kanser insidans Değerleri [49]



Şekil 1.1.C. Türkiye de en fazla görülen ilk on kanser türünün insidans değerleri [49]

1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin altı önemli özelliği vardır:

Büyüme sinyallerinde otonomi; normal hücreler bölünebilmek için dışardan büyüme faktörü sinyaline ihtiyaç duyarlar fakat kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyaline bağımlı değildirler.

Büyüme sinyalleri engelleyicileri; normal hücreler engelleyici sinyallere homeostasi sağlamak için cevap verirler (vücuttaki hücrelerin çoğu aktif olarak bölünmez), kanser hücreleri büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermezler, mutasyonlar bu cevabın verilmesini engeller.

Programlı hücre ölümünde bozukluklar; genellikle normal hücreler DNA hasarına karşı apoptozla yok olurlar, kanser hücreleri apoptotik sinyallerden etkilenmezler.

Sınırsız replikasyon potansiyeli; normal hücrelerde hücrenin sınırlı sayıda iki katına çıkmasını belirleyen sayma düzeneği mevcuttur. Bu hücresel sayaç, her DNA replikasyonu sırasında meydana gelen kromozom uçlarının kısalmasını belirler (telomerler), kanser hücrelerinde telomerlerin uzunluğu korunur, telomer regülasyonunun değişmesi sınırsız replikasyon potansiyeline neden olur.

Anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu); normal hücrelerin oksijen ve besleyici sağlayabilmesi için kan damarlarına gerek vardır, fakat olgun bir insanda

dolaşım mimarisi sabittir. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, çünkü tümör sağkalımı ve yayılması için yeni kan damarların büyümesi gerekir.

İnvazyon ve metastaz; normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler, kanser hücreleri ise vücudun diğer bölgelerine göç ederler, mutasyonlar invazyon ile ilgili enzimlerin aktivitesini değiştirir ve hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler adezyon moleküllerini değiştirirler [16-17].

1.3. Kansere Yol Açan Risk Faktörleri

Belli bir tür kansere yakalanma olasılığını artıran her şey risk faktörüdür. Sigara, alkol vb. gibi risk faktörleri kontrol edilebilirken, yaş, genetik özellikler gibi bazı risk faktörleri kontrol edilememektedir. Pek çok risk faktörünün direkt olarak hastalığa neden olup olmadığı bilinmemektedir. Risk faktörlerinin bilinmesi önemlidir. Risk faktörleri dört grupta toplanmaktadır.

1.3.1. Davranışsal Risk Faktörleri

Sigara içmek, diyet, egzersiz ve alkol tüketimi gibi değiştirebileceğiniz risk faktörleridir.

1.3.2. Biyolojik Risk Faktörleri

Yaş, cinsiyet ve ırk gibi fiziksel özelliklerdir. Fiziksel ve biyolojik özelliklerin, kanser için risk faktörü olup olmayacağı, kanserin tipine bağlıdır. Belli tip kanserler için risk oluşturabilecek biyolojik ve fiziksel özellikler şunlar olabilir;

Cinsiyet: Bazı kanser türleri cinsiyetle ilişkilidir. Örneğin prostat bezi sadece erkeklerde olduğu için, prostat kanseri erkeklerde görülür. Meme kanseri hem kadın hem de erkeklerde görülebilir, ancak kadınların meme kanserine yakalanma riski daha yüksektir.

Yaş: Pek çok kanser türü yaşlılarda ortaya çıkar. 50 yaşın üstündeki kişilerde kanser görülme riski daha yüksektir.

İrk: Bazı ırklarda belli tip kanserler daha sık görülmektedir. Örneğin Amerikalı zencilerde prostat kanseri daha sık görülür.

Cilt: Sarışınlarda cilt kanseri daha sık görülmektedir.

1.3.3. Çevresel Risk Faktörleri

Yaşadığınız ya da çalıştığınız çevre koşulları kanser gelişimi için risk faktörü olabilir. Ev ya da iş yerinde bulunan bazı maddeler, kanser riskini artırır. Asbest, radon, hava kirliliği, UV radyasyon, sigaraya maruz kalma çevresel risk faktörlerindedir. Yine diyetle alınan bazı besinler kanser gelişim riskini artırırken, bazıları da koruyucu olabilmektedir.

1.3.4. Genetik Risk Faktörleri

Genetik Risk Faktörleri, aileden kalıtımsal olarak geçen genlerle ilişkilidir. Aile üyelerinden birinde genç yaşta kanser teşhis edilen bireylerde, üç veya daha fazla kuşakta aynı tip kanser öyküsü bulunanlarda, anne veya baba tarafından üçten fazla kanser olgusu bulunan kişilerde ve aile bireylerinden birinde iki veya daha fazla farklı tip kanser bulunan bireylerde kanser gelişme riski daha yüksektir [13].

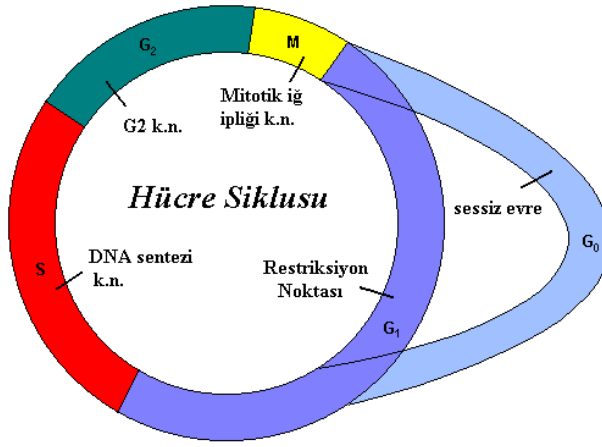
1.4. Hücre Döngüsü ve Kanser

Normalde hücreler proliferatif uyarılara bağlı olarak gereken durumlarda bölünürler. Kanserli hücrelerde ise mutasyonlar sonucunda normal hücrelerde görülen kontrollü büyüme süreci kaybolmuştur [18].

Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bu fazlar;

- G0 fazında, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.

- G1 fazında (ara faz, interfaz), spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.
- S fazında (DNA sentezi fazı) hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.
- G2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder.
- M fazında (mitozis) protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler [17].



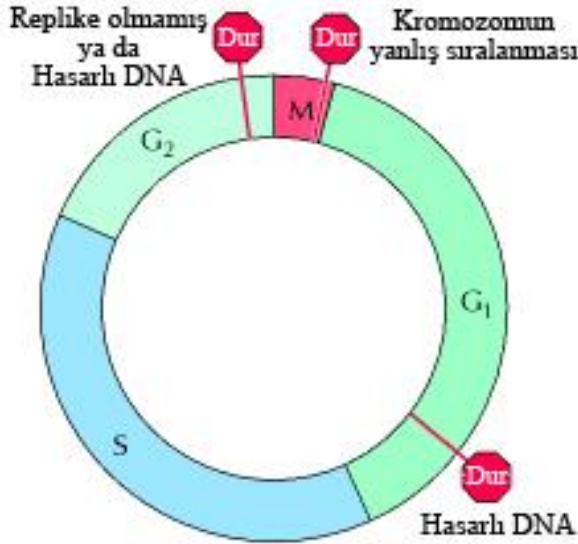
Şekil 1.4.A. Hücre döngüsü [144]

1.4.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bunların en önemlileri, ilki DNA sentezinden hemen önce ve ikincisi mitozisten hemen önce olan kontrol noktalarıdır. Bu dinlenme periodları, siklin bağımlı kinazların ve tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir. Gerçekte, bu fazdaki hücreler hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Bu kontrol noktalarında, varsa genetik bozukluklar düzeltilir. Sonuç olarak, hücre siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur.

İlk kontrol noktası geç G1 fazında, S fazına girmeden hemen önce gelir. DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller ve tüm mekanizma işler durumda olsa bile, hücrenin G1 fazını terketmeden önce DNA'nın doğru (hasarsız) bir durumda olması lazım. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptoza giderek ölürlür. Bu kontrol noktası p53 proteinin etki yerlerinden biridir.

İkinci kontrol noktası hücreler M (mitozis) fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre siklusu inhibitörleri, hücreyi, yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanmamışsa veya beraberindeki tüm proteinler, iplikçik materyalleri ve mitozisin tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanmamışsa hücre bu kontrol noktasında herşey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer [17].



Şekil 1.4.B. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları [145]

1.5. Kanser Oluşumu (Karsinogenez)

Kanser genetik bir hastalıktır. Kanser hücreleri karsinogenez sürecinde genetik değişikliklerin ve çevresel faktörlerin etkisiyle çok basamaklı bir süreç içinde bazı temel özellikler kazanır. Otonomi, kontrolsüz çoğalma, apoptozun baskılanması, anjiyogenez, invazyon ve metastaz özellikleri kazanan hücrelerin çoğalması ile kanser hastalığı ortaya çıkar [14].

Kanser hücrelerinde izlenen bu fonksiyonel değişikliklere hücrelerin genetik materyalinde meydana gelen bazı değişiklikler neden olur. Karsinogenez sürecindeki genetik değişiklikler genel olarak; genomik dayanıksızlık, kromozom kaybı, kromozomların yeniden düzenlenmesi veya insan kromozomlarının lokuslarına yabancı DNA dizilerinin (genellikle viral DNA dizileri) girmesi şeklinde özetlenebilir [32].

1.5.1. Aşırı Kanser Hücresi Üretiminin Nedenleri

Kanser dokusunda hızlı bir hücre çoğalması ve dokunun büyümesi söz konusudur. Kanser dokusunun büyümesinde belli başlı 3 ana mekanizma önemli rol oynamaktadır:

1. Apoptoz mekanizmasındaki problemler,
2. Hücre proliferasyonunu istenmeyen biçimde uyararak genetik defektler,
3. Tümör anjiyogenezi.

1.5.1.1. Apoptoz

Apoptoz, gereksinim duyulmayan veya fonksiyonu bozulmuş hücrelerin organizmaya zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan “programlanmış hücre ölümü” dür. Apoptoza giden hücrede birçok morfolojik değişiklik gözlenir; plazma membranında blepler oluşur, sitoplazma büzüşür ve hacim kaybeder, DNA kondensasyonu ve fragmantasyonu meydana gelir. Apoptoz ilerledikçe oluşan sitoplazmik blepler, ölmekte olan hücreden ayrılarak apoptotik cisimleri meydana getirirler. Apoptoz sırasında hücredeki intraselüler maddeler dışarı salınmaz ve inflamatuvar yanıt oluşmaz. Apoptoz, hücrenin gelişiminde, hücre homeostasisin sağlanmasında ve immün sistemde çok önemli görevler üstlenen bir hücre ölüm şeklidir. Apoptozun düzenlenmesinde meydana gelecek bir bozukluk; kanserden otoimmün ve nörodejeneratif bozukluklara kadar birçok hastalığın gelişmesini tetikleyebilir. Apoptoz, hücre içinden veya dışından gelen uyarıların alınması ile tetiklenir ve proteazlar (kaspazlar) aktif hale getirilir. Aktifleşen kaspazlar ile hedef

proteinler yıkılır ve oluşan apoptotik cisimler fagositoz yolu ile ortadan kaldırılırlar [19-20].

1.5.1.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar, üç ana parçadan oluşan proenzimler (30-50 μ) olarak eksprese edilirler; NH2-terminal parça, büyük parça (~20 kDa) ve küçük parça (~10 kDa) [21].



Şekil 1.5.A. Kaspaz'ın yapısı [146]

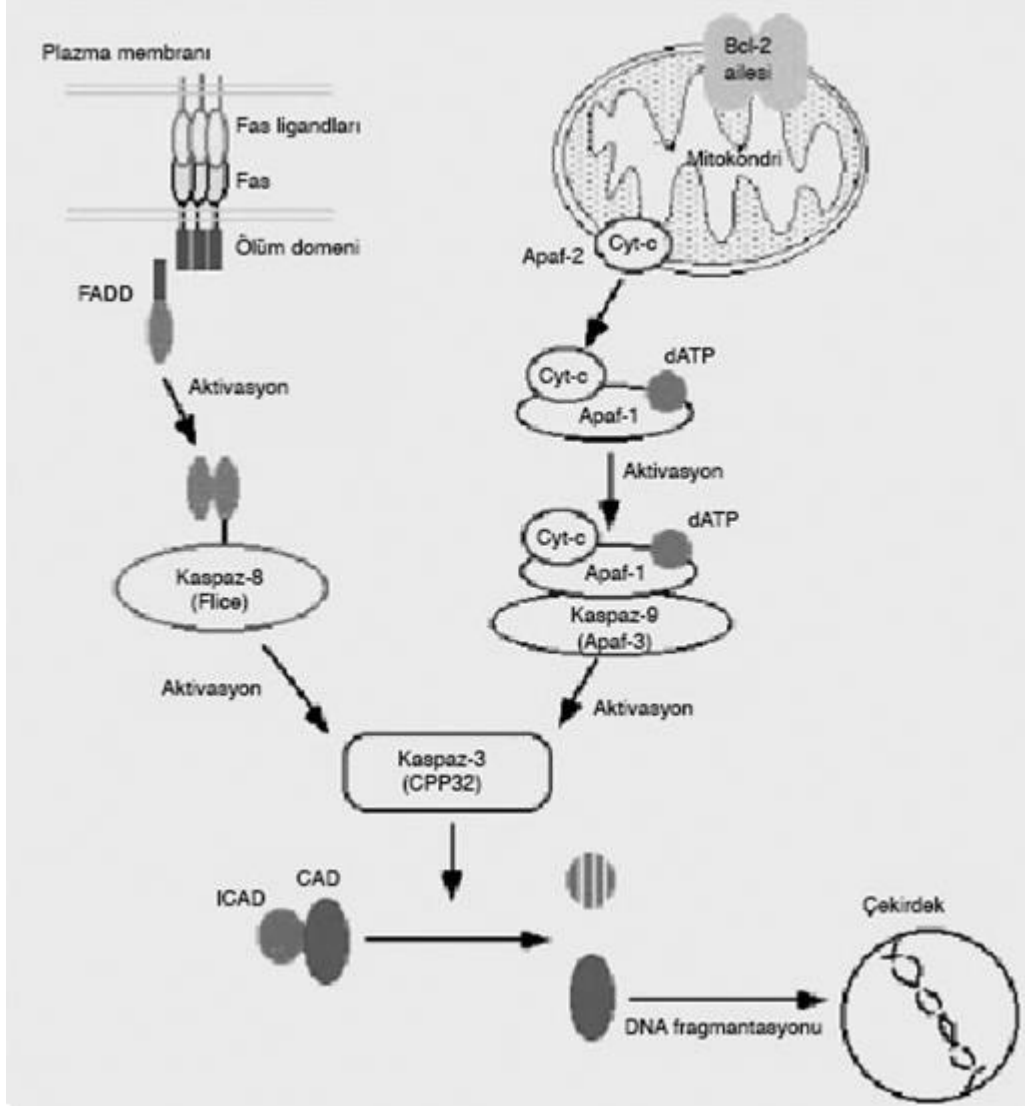
Kaspazlar, bir düzineden fazla proteaz içeren, etkin yerlerinde sistein içerdikleri ve substratları konumundaki proteinleri, aspartik asitten sonra kestikleri için bu ismi almışlardır [22]. Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar [23].

Kaspazlar, etkin olmayan öncüller (prokaspazlar) olarak sentezlenir ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler [22-24]. Başlatıcı kaspazın etkinleşmesi kendisinden sonraki diğer kaspazların etkinleşmesini ve hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme tepkimeyi, kaspaz kaskadını başlatır [22]. Kaspazlar, başlatıcı, etkileyici, inflamatuvar olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılırlar [25] :

- a) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9, 10)
- b) Etkileyici kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7)
- c) İnflamatuvar kaspazlar (diğerleri) [24]

Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini etkileyici kaspazlara iletirler. Etkileyici kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar [23]. Ölümlü gerçekleştiren etkileyici kaspazlardır. Etkileyici kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler.

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır [26]. Apoptozu aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptozun her üç yolunda da (mitokondriyal, ölüm reseptörleri, endoplazmik retikulum aracılıklı) aktif olarak görev alırlar [27-28]. Mitokondriyal yol, başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu içerir. Kaspaz-9, bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olması, kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9 da etkileyici kaspazlar, kaspaz -3,-6,-7'yi aktive eder. Ölüm reseptörleri yolunda ise, TNF'nin indüklediği hücre ölümü, başlatıcı kaspazlar, kaspaz -8 ve -10 un aktivasyonunu içerir. Daha sonra bu kaspazlar, etkileyici kaspazları, kaspaz -3, -6 ve -7 aktive ederler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kanser ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir [30-31].



Şekil 1.5.B. Ölüm Reseptörleri ve Mitokondriyal Yollarla Caspaz-3 Aktivasyonunun Başlamasıyla Nükleusta Oluşan DNA Fragmentasyonu [147]

1.5.1.2. Hücre Proliferasyonunu Uyaran Genetik Defektler

Kanser ile ilgili üç sınıf gen vardır: onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri.

Proto-onkogenler: Protoonkogenler normal hücrelerde hücre bölünmesinin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesinden sorumludur. Hücre membranındaki reseptöre bağlanan büyüme faktöründen, reseptöre ve çekirdeğe kadar giden yolakta rol alan tüm protonkogenler gerektiği zamanlarda aktivite göstererek normal hücre bölünmesi olaylarını kontrol ederler.

Bu süreçte rol alan genlerden herhangi birisinde aktivasyonu arttırıcı yönde bir değişiklik, mutasyon, meydana gelirse bu durum genellikle hücre çoğalmasının kontrolünün kayboması ile sonuçlanır. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için, bu genlerin ve/veya bu genlerin ürünlerinin inaktifleştirilmiş durumda olmaları gerekmektedir. Protoonkogen mutasyonlarının sonucunda onkogen adını verdiğimiz kontrolsüz hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olan genler oluşur [32].

Proto- onkogenleri onkogen haline dönüştüren olaylar :

- Nokta mutasyonlar
- Kromozomal translokasyonlar
- Gen amplifikasyonları
- Retroviral transdüksiyon

Onkogenler hücresele seviyede dominant etkiye sahiptir. Yani bir allelin mutasyonlu olması kanser oluşumu için yeterlidir [33].

Tümör baskılayıcı genler: Hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak tümör oluşumuna engel olan genlerdir [34]. Tümör baskılayıcı genlerin ürünü olan proteinlerin fonksiyon kaybı ile kontrolsüz hücre bölünmesi, anormal hücre büyümesi ve kusurlu hücre ölümü gerçekleşir. 2 grupta incelenir;

A) Hücresele işlevi düzenleyici genler: hücre siklus geçişlerini denetleyen genler.

B) Genomik instabilite genleri: genomik bütünlüğünün korunmasını sağlayan genler.

Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı genin kodlayıcı bölgesindeki yanlış anlamlı mutasyonlar, proteininin büyüklüğünü ve aktivitesini değiştiren eksilme, artma veya çerçeve kayması mutasyonlar ile oluşur. Bu olaylar proteinin aktivitesini azaltır ya da tamamen ortadan kaldırır [33].

Tümör baskılayıcı genler dominant yolla kalıtılır ancak hücredeki fenotipi resesiftir. Tek alleldeki mutasyon kanser oluşumu için yeterli değildir [1].

DNA tamir genleri: Kanser başlıca özelliği genomik karasızlıktır. Bu genler genomik bütünlüğü koruyarak hücrenin malign hale dönmesini dolaylı olarak

engelleyen genlerdir . Tamir genleri ise DNA sentezi sırasında oluşan hasarların düzeltilmesini sağlar . Farklı DNA tamir mekanizmaları mevcuttur [33].

1.5.1.3. Tümör Anjiyogenezi.

Kanser ile ilgili gen bozukluklarının yanı sıra pek çok kanser hücresi kendi büyümesini stimüle eden büyüme faktörleri üretir. Bu da kanserin ilerlemesine zemin hazırlar. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır. Bu, tümörlerin damar gelişimi olmaksızın nasıl yıllarca yaşamı tehdit etmeyecek şekil sabit halde kaldıklarının en iyi açıklamasıdır [36].

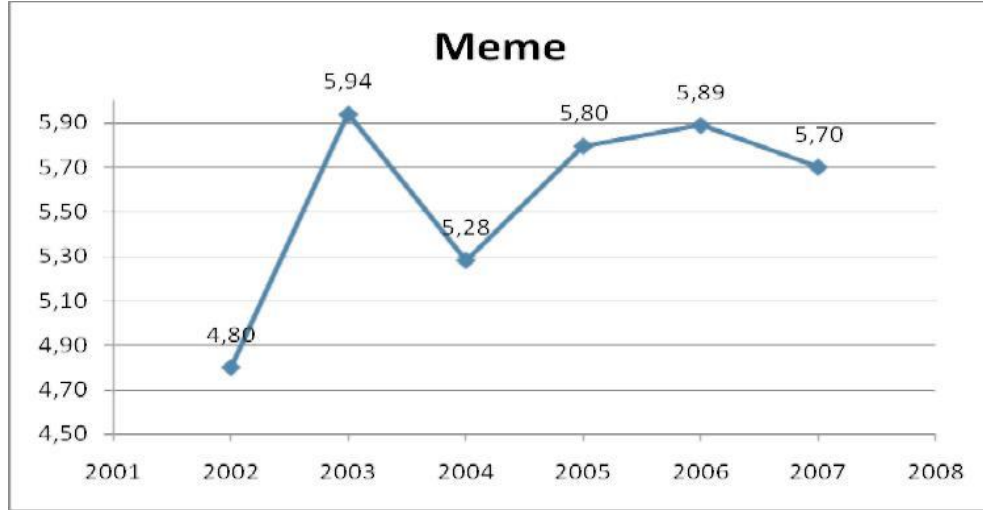
1.6. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır. Tek bir hastalık gibi görünse de, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalıktır ve hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Çevreyle, yaşam biçimiyle ve kalıtımla ilişkilidir [37-38-39]. Meme kanseri gelişiminin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanan genetik değişiklikler başta olmak üzere genetik hasarlarla olmaktadır. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu bu çok basamaklı gelişimde erken meydana gelen olaylardır. Bunları daha sonra kontrolsüz hücre bölünmesi ve/veya programlanmış hücre ölümünün bozulması takip eder [37-38].

Mutasyona uğramış formları meme kanseri riskini arttıran genlere meme kanseri yatkınlık genleri denir. Bu genlerin farklı alelleri kanserin ailevi formlarında olduğu gibi sporadik kanserlerde de önemli rol oynayabilir. Meme kanseriyle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili çok sayıda gen tanımlanmıştır. Kadın meme kanserlerinde bilinen asıl risk faktörü, artmış seviyelerdeki östrojene uzun süre maruz kalmayla ilişkilidir. Endojen ya da ekzojen östrojenlerin neden olduğu artmış hücre bölünmesi, hücre sayısını ve dolayısıyla mutasyonların gerçekleşme olasılığını artırır [38-40-41].

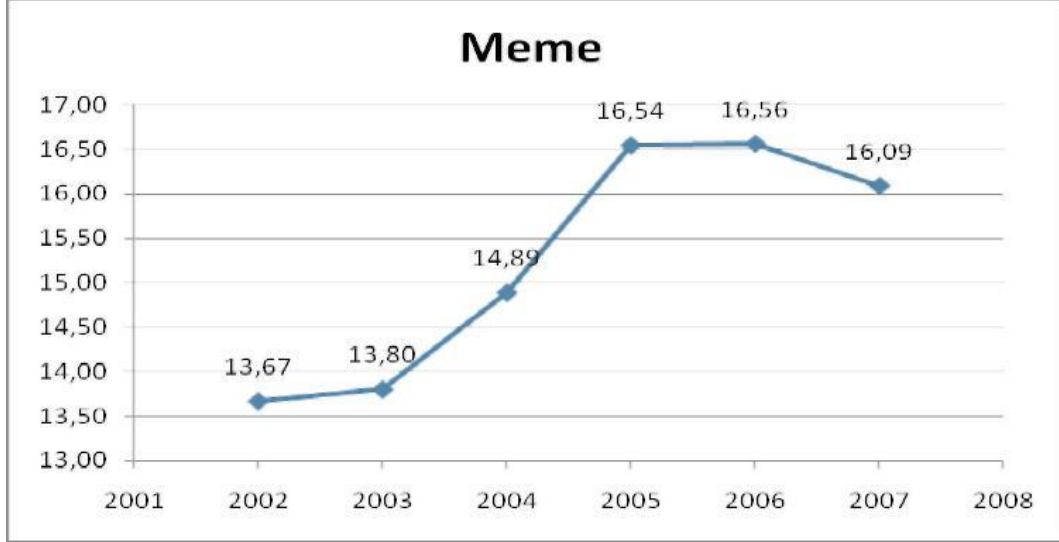
1.6.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türüdür. Dünya genelinde her yıl teşhis edilen her dört yeni kanser vakasından birinin kadın meme kanseri olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda 2002 yılında bildirilen yaklaşık 410.000 ölen vaka sayısı ile (toplam sayının %14 ü) global olarak kanser nedenli ölümler arasında meme kanseri ilk sırada yer almaktadır [48].



Şekil 1.6.A. 2002-2007 Yılları Arasında Türkiye’de Tüm Kanserlerden Ölümler İçinde Meme Kanserinin Yüzdeleri [49]

2002-2007 yılları arasında erkeklerde ve kadınlarda tüm kanserlerden ölümlerin içinde meme kanserinden ölümler 2002 yılında tüm kanser türlerinden ölümlerin %4.80’i iken 2003, 2004, 2005, 2006 ve 2007’de sırasıyla %5.94, %5.28, %5.80, %5.89 ve %5.70’i dir [49].



Şekil 1.6.B. 2002-2007 Yılları Arasında Türkiye’de Kadınlarda Tüm Kansерlerden Ölümler İçinde Meme Kansерinin Yüzdeleri [49]

2002-2007 yılları arasında kadınlarda tüm kanserlerden ölümlerin içinde meme kanserinin yüzdeleri sırasıyla %13.67, %13.80, %14.89, %16.54%, 16.56 ve %16.09 dur [49].

1.6.2. Meme Kanseri Oluşumunda Risk Etmenleri

1.6.2.1. Endokrin Etmenler

1.6.2.1.1. Reprodüktif Etmenler

a) Menarş Yaşı:

Erken menarşın meme kanseri gelişiminde bir risk etmeni olduğu gösterilmiştir [51-52]. Genel olarak menarşın geciktiği her yıl meme kanseri riskinin %20 azaldığı kabul edilmektedir [53]. Fakat, meme kanseri riski yönünden menstruasyonun başlama yaşı yanında ilk düzenli menstruasyon yaşı da önemlidir [54]. Menarşı takiben düzenli menstruasyonların 1 yıl içinde başlaması, düzenli menstruasyonları 1 yıldan geç başlayanlara göre riski iki katına çıkartmaktadır. Menarşı erken (12 yaş veya öncesinde) başlayan ve kısa sürede düzenli menstrüel dönemlere geçen kişilerde kanser riskinin menarşı geç başlayan (13 yaş veya üzerinde) ve uzun süre

düzensiz menstrüel dönemleri olan kişilere göre 4 kat fazla olduğu kabul edilmektedir [51-53].

Bu gözlemler düzenli yumurtlama dönemlerinin kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığını düşündürmektedir. Düzenli yumurtlama dönemlerine sahip bir kadında luteal fazda östrojen düzeyi anovulatuvar dönemlere sahip bir kadınlardan daha yüksek olacağından, düzenli yumurtlama dönemlerinin sayısının artması östrojene (ve progesterona) maruz kalmayı arttıracaktır. Yine menarşi geç başlayan kadınlarda anovulatuvar dönemlerin erken menarşlı kadınlara göre daha fazla olacağı ve dolayısıyla östrojene maruz kalmanın azalacağı gösterilmiştir [52-55].

b) Menopoz Yaşı:

Meme kanseri riski ile menopoz yaşı arasında da bir ilişki mevcuttur. 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski, 55 yaşından sonra menopoza girenlere göre yüzde elli azalmaktadır. Ortalama olarak menopozun her bir yıllık gecikmesi meme kanseri riskini %3 arttırmaktadır [56].

c) İlk Hamilelik – İlk Doğum Yaşı:

Yapılan çalışmalar sonucunda hamileliğin ve ilk hamilelik yaşının meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Hiç doğum yapmamış kadınlarda kanser riski, doğum yapmış kadınlara göre daha fazladır.

İlk doğumunu 30 yaşından sonra yapan bir kadında kanser riski, ilk doğumunu 20 yaşından önce yapan bir kadına göre 4 kat fazladır. Hiç doğurmamış kadınlarda ise, 20 yaş öncesinde doğum yapanlara göre risk 2 kat fazladır. 30 yaşından sonra doğum yapanlardaki kanser riski de hiç doğum yapmamış kadınlardakine göre daha fazladır. Bu durum 30 yaşından sonra yapılan doğumların, meme kanseri oluşumundaki koruyucu etkisini kaybettiğini göstermektedir [57-58].

Doğum sayısının artmasının meme kanseri üzerindeki etkisi araştırıldığında küçük de olsa koruyucu bir etkinin olduğu gösterilmiştir. Danimarka'da 14421 kadında yapılan bir çalışmada doğum sayısı arttıkça riskin azaldığı ve en düşük riskin 6 veya daha fazla doğum yapmış kadınlarda saptandığı belirtilmiştir [59].

d) Laktasyon:

Uzun süren laktasyonlar toplam yumurtlama dönemi sayısını azaltarak meme kanseri için koruyucu bir etki yaratmaktadır. Yapılan bir çalışmada 4-12 ay arasında emziren kadınlarda riskin %11; iki sene veya daha fazla emzirenlerde ise %25 oranında azaldığı gösterilmiştir. Yani sonuç olarak uzun süreli emzirme düşük meme kanseri riski ile ilişkilidir [60].

1.6.2.1.2. Eksojen Hormonlar

Sentetik ve doğal östrojenler hamileliğin önlenmesi veya menopoz sonrası değişikliklerin giderilebilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

a) Oral Kontraseptifler:

Östrojen ve progesteron içeren oral kontraseptifler ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Tüm bu çalışmalardan çıkartılabilecek tek kesin sonuç oral kontraseptiflerin meme kanserine karşı koruyucu etkilerinin olmadığıdır.

Yapılan çalışmalar sonucunda menopoz sonrası kadınlarda uzun süreli oral kontraseptif kullanımı ile meme kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Fakat menopoz öncesi dönemde uzun süreli oral kontraseptif kullanmış kadınlarda meme kanseri riskinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir.

Genellikle 35 yaş ve altındaki kadınlarda daha belirgin risk artışı gözlenmektedir. Araştırmalar sonucunda 10 yıl boyunca oral kontraseptif kullanan genç bir kadında hiç oral kontraseptif kullanmayan bir kadına göre meme kanseri oluşma riskinin %36 arttığı saptanmıştır [61-62].

b) Östrojen Replasman Tedavisi:

Menopoz sonrası ortaya çıkan değişiklikleri önlemek amacıyla östrojenler dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Menopoza giren kadınlarda en çok kullanılan

hormon tedavisi konjuge östrojen (0,625 mg/gün, 25 gün boyunca) olup, buna 14 ve 25 günlerde medroksiprogesteron asetatın (10 mg/gün) da eklenmesi şeklindedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda 5 yıl veya daha uzun süre hormon replasman tedavisi gören (konjuge östrojen kullanan) menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir [64].

Menopoz sonrası hormon kullanıp bıraktıktan sonra 5 yıl ve daha uzun süre geçen kadınlarda ise hormon kullanma süresi ne olursa olsun herhangi bir risk artışı saptanmamıştır [65].

Menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda dışardan verilen östrojenin meme kanseri oluşturma riski ile endojen östrojenin meme kanseri oluşturma riskini karşılaştıran çalışmalar da yapılmıştır. Sonuçta konjuge östrojen kullanımının meme kanseri riskini endojen östrojenlerin 2 katı kadar arttırdığı gözlenmiştir [66-67].

Bazı kadınların konjuge östrojenlerin karsinojenik etkilerine daha duyarlı olabileceği gösterilmiştir. Konjuge östrojen kullanımı ile ilişkili olarak meme kanseri risk artışının en fazla ailevi meme kanseri hikayesi olan kadınlarda olduğu özellikle belirtilmiştir [67].

1.6.2.2. Çevresel Etmenler

Dünya üzerinde meme kanseri görülme sıklığının ülkeden ülkeye değişmesi ve göç eden insanlarda artan meme kanseri sıklığının (göç ettikleri ülkesine uyan bir sıklığa erişmesi) sadece genetik etmenlerle açıklanamaması, dikkatlerin çevresel etmenler üzerinde toplanmasına neden olmuştur.

a) Beslenme

Diyetteki değişik maddelerin ve özellikle diyetdeki yağın meme kanseri riskini arttırabileceği düşünülmektedir; fakat meme kanseri riskini değiştirebilen özgül yiyecekler bugüne kadar saptanabilmiş değildir [70].

Sebze ve meyve tüketimi ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada yüksek oranda sebze ve meyve tüketimi ile düşük orandaki tüketim karşılaştırılmış ve yüksek oranda tüketimin koruyucu bir etkisinin söz konusu olabileceği belirtilmiştir [71].

b) Vitaminler

A Vitamini: A vitamininin içinde bulunduğu karotenoidler antioksidan özelliklere sahip olduklarından DNA hasarına yol açan tepkin oksijen radikallerine karşı hücresel savunmayı arttırabilir. A vitamini ayrıca hücre farklılaşmasında düzenleyici olarak görev aldığından hücrelerde habis dönüşümü önleyebileceği öne sürülmüştür [72].

A vitamini ile meme kanseri ilişkisini araştıran çalışmalarda, A vitamini alımının artması ile kanser riskinin azaldığı bildirilmiş ve A vitamininin meme kanseri oluşumunda anlamlı bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle menopoz öncesi dönemde kadınlardaki etkisinin belirgin olduğu bildirilmiştir [73-74].

E Vitamini: Antioksidan özelliklere sahip E vitamini ile yapılan çalışmalarda, E vitamininin meme kanseri oluşumunda koruyucu bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir [70-75-76-].

c) Alkol

Alkol alımıyla meme kanseri riski tartışmalı olmakla birlikte bu konu hakkında yapılan çalışmalar alkol alımının artması ile meme kanseri riskinin arttığını göstermektedir [77-79].

Alkolün meme kanseri riskini arttırıcı etkisinin mekanizmasını araştıran Reichman günde 12 gr alkol alımının menopoz öncesi dönemdeki kadınlarda toplam östrojen düzeyini arttırdığını göstermiştir. Alkolün bir diğer olumsuz etkisi folik asit etkisizleştirilmesi üzeriden olmaktadır. Folat seviyesindeki düşme DNA tamir mekanizmasında bozukluğa neden olduğundan alkol dolaylı olarak bir risk oluşturmaktadır [78].

1.6.2.3. İyonlaştırıcı Işımlar

Olgunlaşmasını tamamlamamış meme dokusu radyasyona çok duyarlıdır ve radyasyona maruz kalma sonrası gelişme bozuklukları ve meme kanseri oluşabilir [80].

Nükleer gereçlerden kaynaklanan radyasyon almış kişilerde, post-partum mastit nedeniyle radyoterapi uygulanmış kadınlarda ve floroskopi uygulanan kişiler üzerinde yapılan çalışmalarda memeye yüksek dozda uygulanan radyasyonun meme kanseri gelişim riskini arttırdığı gösterilmiştir [81].

Hiroşima ve Nagazaki'de 2. Dünya Savaşı'nda atılan atom bombası nedeni ile tüm vücut ışınlanmasına maruz kalan bireylerde yapılan değerlendirmede, tüm vücudu 0,9 cGy alan kadınlarda meme kanseri riskinin kontrol gruplarına göre 2-4 kat arttığı bildirilmiştir. En yüksek risk özellikle bombalama esnasında 10 yaşın altında olan kızlarda saptanmıştır [82].

1.6.2.4. Elektromanyetik Alanlar

Elektrik kablo işinde çalışan erkekler arasında meme kanseri görülme sıklığında artış olduğunun bildirilmesi, elektromanyetik alanların kadın meme kanseri etyolojisinde rolünün araştırılmasına neden olmuştur [83]. Bu amaçla elektrik işlerinde çalışan kadınlar arasında meme kanseri riski araştırılmış ve meme kanserine bağlı ölümlerde artış olduğu görülmüştür. Sonuç olarak elektromanyetik alanlara mesleki olarak maruz kalmanın meme kanseri riskini arttırdığı belirtilmiştir [84].

1.6.2.5. Fiziksel Etkinlik

Ağır fiziksel etkinliğin menarşı geciktirdiği; düzenli olarak bale yapan, yüzen veya koşan kızların menarşlarının geç başlaması ile gözlenmiştir. Bale yapan kızların incelendiği bir çalışmada bale yapanların ortalama menarş yaşı 15,5; kontrol grubunun menarş yaşı ise 12,5 bulunmuştur. Ayrıca baleye etkin olarak devam ettikleri sürece meme gelişiminin geciktiğide gözlenmiştir [85].

Diğer bir çalışmada, haftada en az 600 kcal harcayacak şekilde orta derece egzersiz yapan kızların, daha az fiziksel etkinlik gösteren kızlara göre yaklaşık üç misli daha fazla anovulatuvar dönemlerinin olduğu bildirilmiştir [86].

Ergenlik döneminde ve erişkin dönemde yapılan egzersizlerin meme kanseri riski üzerine etkisini araştıran bir başka çalışmada, egzersizin 40 yaşın altındaki kadınlarda meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiş ve haftada 4 saat veya daha fazla egzersiz yapan kadınlarda kanser riskini hiç yapmayanlara göre %60 daha az olduğu bildirilmiştir [87].

1.6.2.6. Sigara

Yapılan çalışmalar sonucunda meme kanseri riski ile sigara içimi arasında hiç bir ilişki gösterilememiştir [88-89].

1.6.2.7. Obezite

Yağ hücrelerinde östrojen yapımı ve östrojen ile meme kanseri arasında ilişki olması, obezitenin meme kanserine olan etkisini gündeme getirmiştir. Obezite menopoza sonrası dönemdeki kadınlarda meme kanseri riskini 2 kat arttırmaktadır; buna karşın menopoza öncesi dönemdeki kadınlarda insidans obezlerde düşük, zayıflarda fazladır [90-91]. Menopoza sonrası dönemdeki obez kadınlarda ayrıca meme kanseri mortalitesi de yüksektir, bu kısmen tanının gecikmesine bağlanmıştır [92].

1.6.2.8. Memenin Selim Lezyonları

Dupont ve Page tarafından yapılan bir çalışma 3303 hasta on binden fazla biyopsi yapılarak ortalama 17 yıl takip edilmiş ve çeşitli histolojik alt tipler ile meme kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Meme biyopsisinde proliferatif değişikliklere (sklerozis; adenozis, papilloma) sahip olan ve grubun %51'ini oluşturan kadınlarda meme kanseri riskinin proliferatif değişikliği bulunmayan kadınlardan 1,9 kat fazla olduğu hesaplanmıştır [93].

1.6.2.9. Geçirilmiş Meme Kanseri

Meme kanseri tanısı konup cerrahi olarak çıkartılmasından sonra kalan meme dokusu meme kanseri gelişimi bakımından risk altındadır. Cerrahi olarak kanserli memenin tümünün çıkartılmasını takiben aynı taraftaki memede ikinci kanser oluşum riski karşı memede oluşma riski kadardır. Meme kanseri olan bir kadında hayatı boyunca ikinci bir meme kanseri oluşma riski %25-30 civarındadır [94].

1.6.2.10. Genetik Etmenler

Meme kanserli hastaların ailesinde sıkça kanser hikayesine rastlanır. Meme kanserli bir kadının kız kardeşi ya da kızı hastalık açısından üç kat fazla risk altındadır. Hem annesi hem kız kardeşi meme kanseri olan bir kadında ise bu riskin 10 kat arttığı gözlenmiştir [37]. Annesinde menapoz öncesi bilateral meme kanseri görülen kadınların ortalama %50'sinde meme kanseri gelişir [40].

Meme kanseri bazı spesifik gruplarda daha sıktır. Örneğin beyaz ırkta siyah ırktan ve Musevi kadınlarda diğerlerinden daha sık görülür. Çoğu Asya ve Afrika ülkesinde hem meme kanseri riski ve hem de mortalitesi daha düşüktür. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da ise yüksek risk ve mortalite söz konusudur [38].

Meme kanseri vakalarının ortalama %5-10'unda otozomal dominant geçiş gösteren bir gen sorumlu tutulur. Meme kanserlerinin büyük kısmı ise kazanılan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar.

Özellikle BRCA-1 ve BRCA-2 genleri kalıtsal meme kanserlerinin büyük bir kısmından sorumlu tutulmaktadır [98-99].

1.6.3. Meme Kanserinin Genetiği

Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar kanserin genetik bir hastalık olduğunu göstermiştir. Bu alışmalar sonucunda sporadik ve kalıtsal kanserlerde çeşitli genlerde birtakım yapısal ve/veya işlevsel değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir.

Günümüze kadar kanser oluşumunun genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar, tüm kanserlerin oluşumunda üç gen sınıfının etkili olduğunu ve bu genlerde meydana gelen mutasyonların kanserleşmenin esasını oluşturduğunu göstermiştir. Bu genler sırasıyla proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla oluşan etkin kanser genleri olan onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir (Mismatch repair). Meme kanserinin ortaya çıkmasında da bu üç gen sınıfındaki mutasyonlar etkili olmaktadır [100].

1.6.3.1. Meme Kanserinde Rol Oynayan Genler

1.6.3.1.1. Onkogenler:

Proto-onkogenlerin mutasyona uğramasıyla kanserleşmeden sorumlu olan onkogenler oluşur. Meme kanseri oluşumunda siklin, c-myc, c-fos, cmyb, c-jun, Rar α , bcl-1, H-ras gibi onkogenlerin rolü olduğu gösterilmiştir [101].

1.6.3.1.2. Büyüme Etmeni ve Büyüme Etmeni Almaç Genleri:

Normal meme dokusunda büyüme etmenleri hücrelerdeki almaçlarına bağlanarak fosforillenme yolağını uyarır ve bunun sonucunda da hücre çoğalması gerçekleşir. Meme kanserinde ise büyüme etmenlerini kodlayan genlerin anormal ifadesi dolayısıyla hücre çoğalmasını tetikleyen sinyallerin sayısında ve yapısında değişiklikler meydana gelir. Bu da kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur.

a) Büyüme Etmeni genleri

Epidermal büyüme etmeni(EGF) geni

EGF etkisini hücre zarı üzerinde yer alan almacağına bağlanarak gösterir [Epidermal Büyüme Etmeni Almaç (EGFR) veya HER1. EGF'yi kodlayan gende meydana gelen değişiklikler meme kanseri oluşumunda etkili olup, özellikle meme kanserinin ilk evrelerinde kritik öneme sahiptir.

Transforme Edici Büyüme Etmeni (TGF) Geni:

TGF'ler ana 2 alt gruba ayrılır.

Birinci grup olan TGF α ailesi, meme epitel hücrelerinde çoğalmayı uyaran moleküllerden oluşur. TGF α ailesindeki molekülleri kodlayan genleri ifadelerindeki artış meme kanserlerinin erken aşamasında önemli rol oynar [102].

İkinci grup olan TGF β ailesindeki moleküller, TGF β almaçları aracılığı ile etkilerini gösterir. Yapılan çalışmalar sonucunda TGF β aile üyelerinin memede hücre çoğalmasını baskıladığı tespit edilmiştir [103].

Diğer Büyüme Etmenleri Genleri:

Meme kanseri ile ilişkili diğer büyüme etmeni aileleri İnsülin Benzeri Büyüme Etmeni (IGF), Trombosit Kaynaklı Büyüme Etmeni (PDGF), Fibroblast Büyüme Etmeni (FGF) aileleridir. Bunların hepsinin hücre zarına yerleşmiş tirozin kinaz özelliğine sahip birer almacı bulunmaktadır.

FGF ailesi üyeleri meme bezinin büyümesinde ve tümör gelişiminde rol oynar. Yapılan çalışmalarda, meme kanserlerinde FGF ailesi üyelerini kodlayan genlerde amplifikasyon olduğu gözlenmiştir [104].

b) Büyüme Etmeni Almaç Genleri

Meme gelişiminde ve meme karsinogenezinde rol oynayan büyüme etmenleri hücrede etkinliklerini almaçlarına bağlanarak gösterir. Büyüme etmeni almaçlarının hepsi 3 ana bölgeden oluşur. Bunlar; hücre zarının dışında bulunan ligand bağlayan bölge, almaçların birbiriyle temasından ve dimerleşmeden sorumlu hücre zarı içindeki bölge ve fosforillenmeden sorumlu tirozin kinaz etkinliğine sahip sitoplazmik bölgedir.

Büyüme etmeni almaçlarında etkinlik artışı 2 şekilde gerçekleşebilir.

1. Almaç molekülü normal yapısını koruduğu halde molekülü kodlayan gende meydana gelen amplifikasyon sonucunda almaç molekülü fazla sayıda yapılıır.
2. Almaç molekülünü kodlayan gende gerçekleşen mutasyonlar nedeniyle molekül sürekli etkin durumunu korur.

Meme kanseri açısından önem taşıyan almaçların büyük çoğunluğunu HER ailesi olarak bilinen almaçlar oluşturur. HER ailesinde 4 değişik protein yer alır. Bunlar; HER1, HER2, HER3, HER4'tür [105].

İnsan meme kanserlerinde klinik önemi kesin olarak bilinen HER ailesi üyesi HER2 (c-erbB2) proteindir. Meme kanserli hastaların üçte birinde HER2 proteinini kodlayan gende amplifikasyon veya aşırı ifade gözlenmektedir [106]. HER2 geninin aşırı ifadesinin ayrıca yayılma yeteneğini, gelatinaz IV etkinliğini ve hücre göç hızını arttırarak metastazı da uyardığı ve metastaz kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir [107].

1.6.3.1.3. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler proto-onkogenlerin aksine hücre çoğalmasını baskılayan genlerdir. Diğer kanserlerde olduğu gibi bu genlerde meydana gelen mutasyonlar meme kanseri oluşumuna neden olur [108].

Kalıtsal meme kanserli kadınların ortalama yarısında BRCA1 geninde, 1/3'ünde de BRCA2 geninde mutasyon görülür [109]. BRCA-1 ve BRCA-2 genlerine ek olarak TP53, FHIT, PTEN, nm23, p16 (MTS1), Rb1, DCC, CHEK2, ATM, FOXP1 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların da kalıtsal meme kanserine yol açtıkları gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı genlerden Rb1 ve TP53'teki mutasyonlar aynı zamanda sporadik meme kanserine de neden olan mutasyonlardır [108].

1.6.3.1.3.1. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri ve Fonksiyonları

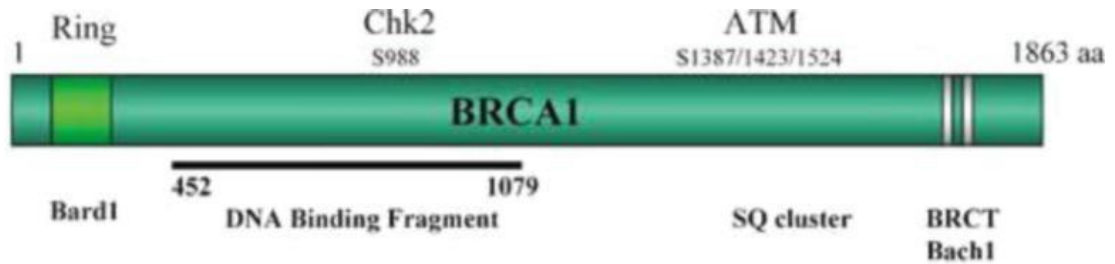
BRCA-1 geni 1863 a.a'lik, BRCA-2 geni ise 3418 a.a' lik bir proteini kodlar. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri genom stabilizasyonu sağlayacak proteinler kodlarlar. Dolayısıyla bu genlerdeki mutasyonlar genomik instabiliteye neden olur. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri genomik stabilitenin devam ettirilmesinde rol oynayan proteinler kodlar ve tümör süpressör gen gibi davranırlar [110].

Tümör supressör proteinler, gatekeeper ve caretakerlar olmak üzere temel olarak iki kategoriye ayrılırlar. BRCA-1 ve BRCA-2 proteinlerini genom tamirinden sorumlu caretaker grubuna dahil edilmektedirler [111].

BRCA-1 ve BRCA-2'deki mutasyonlar ve BRCA1 proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer “genom koruyucu” rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler. Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde 1000'den fazla birbirinden farklı DNA dizi değişikliğine dayanan mutasyonlar tespit edilmiştir [112].

a) BRCA-1 Geni

BRCA-1 geni, genomik stabilitenin devam ettirilmesinde rol oynayan nükleer bir fosfoproteini kodlar ve tümör süpressör gen gibi davranır. Kodlanan bu protein, BASC olarak bilinen , farklı tümör süpressörler proteinleri , DNA hasar sensörleri ve sinyal iletim elemanları ile beraber multi-birimli BRCA-1 ilişkili genom denetim birimini oluşturur. Bu genin ürünü RNA polimeraz II ile C-terminal domaini üzerinden bağlanır ve ayrıca histon deasetilaz kompleksi ile de etkileşime girer. Bu protein böylece transkripsiyonda, DNA çift iplik kırıklarında onarımı ve rekombinasyonda önemli roller oynar. Bu gendeki mutasyonlar yaklaşık kalıtsal meme kanserlerinin %40' ından kalıtsal meme ve over kanserlerinin %80 'ninin fazlasından sorumludur [111].



Şekil 1.6.C. BRCA-1 proteinin fonksiyonel bölümleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu [149]

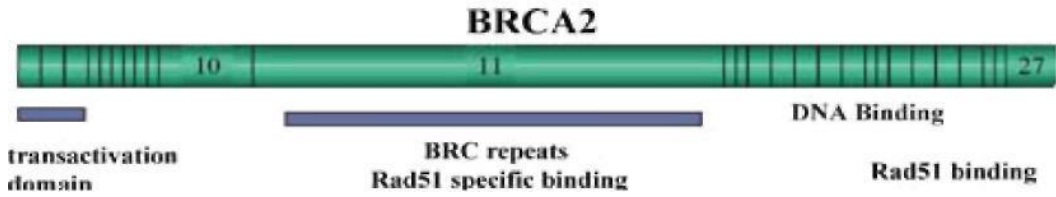
BRCA-1' in C-terminal ucu BRCT domaini olarak bilinen ve bir çok DNA tamir proteini tarafından tanınabilen bir amino asit sekansı içerir. BRCT domaini diğer DNA tamir proteinleriyle etkileşime girdiği ve bu etkileşim sonucu geniş protein

kompleksleri oluşturduğu düşünölen, protein-protein etkileşimlerinin gerçekleştiği bölge olarak kabul edilmektedir. Ayrıca BRCT domaini ve bu bölgeye yakın sekansların transkripsiyonel aktivasyon ve kromatin düzenlenmelerinde rol oynadığı düşünölmektedir [110-114-115].

Kanser oluşumuna yatkınlığa neden olan truncating mutasyonlar (eksik protein yapısı oluşumu) bu bölgelerde görölmektedir. Burada birçok missense mutasyon bulunmasına rağmen bunların çoğu sınıflandırılmamıştır. Kanser oluşumunu tetikleyen bu missense mutasyonlar BRCT tekrar peptitlerin yapısını bozmaktadır [111-115].

b) BRCA-2 Geni

BRCA-2 genin kodladığı protein kromozomal hasarın tamirinde ve hücre siklusunun kontrolünde görev almaktadır [117-114].



Şekil 1.6.D. BRCA-2 proteinin fonksiyonel domainleri ve etkileşimde bulunduğu proteinlerin lokalizasyonu.[149]

BRCA-2 geni çok geniş ve 8 adet BRC peptid motifi içeren 11. eksonu ile karakterizedir. BRC tekrar motifleri genetik rekombinasyondan sorumlu bir memeli proteini olan RAD51 ile etkileşimden sorumludurlar [51]. RAD51 ile etkileşimden sorumlu diğer bölge ise ekson 27 tarafından kodlanan C-terminal bölgesidir [119].

DNA hasarına yanıt olarak BRCA-2 ve RAD51 tamir bölgesinde birbirleriyle birleşerek bir kompleks oluştururlar. BRCA-2 proteinin bu işlem sırasında en önemli görevleri, RAD51 'in tamir bölgesine lokalizasyonunu sağlamak ve RAD51 'in

tamir edilecek DNA ' ya bağlanmasını sağlamaktır. BRCA-2 proteininden yoksun hücreler bu tamir yanıtını gerçekleştiremezler [113-120].

c) BRCA-1 ve BRCA-2 Genlerinin Fonksiyonları

BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinin yapıları birbirinden farklı olmasına rağmen fonksiyonlar benzerdir. Bu iki genden kodlanan proteinler hasarlanmış DNA' nın tamirinde önemli rol oynarlar [118].

BRCA-1 ve RAD51'in DNA çift iplik kırıklarında etkileşim halinde olduğu düşünülmektedir. Fonksiyonu BRCA-1' inki benzeyen BRCA-2 proteini, RAD51 ile direkt etkileşime girer. DNA hasar tamirinde rol oynayan bu üç protein genomik stabilitenin devamının sağlanmasında çok önemlidirler.

Kalıtsal meme kanserinden sorumlu olan genlerin özellikle BRCA-1 ve BRCA-2' nin kodladığı proteinlerin homolog rekombinasyon ile çift iplik kırıkların onarımında görevli olmaları, bu DNA onarımındaki bozukluğun, kadınlarda en yaygın kanserlerden birisinin gelişimine yol açabileceğini göstermektedir [116].

1.7. PCR

Bu teknik Kary Mullis tarafından 1985' te bulunmuş ve patenti alınmıştır. PCR; ilk defa, aynı yıl R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında kullanılmaya başlanmıştır. 1993 yılında bu çalışma Kary Mullis' e Nobel ödülünü kazandırmıştır.

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir invitro DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir [123].

Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, oligonükleotid primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle bağlanırlar. Oligonükleotid primerlerin spesifik olarak hedef dizilerine bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında

primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezi gerçekleşmiş olur. PCR döngüsü denaturasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları eksponansiyel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır [124-125].

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri: PCR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl₂' dir.

a) Kalıp DNA: PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA' da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir. Genomik DNA ve cDNA örneğinin elde edildiği RNA saf olarak izole edilmeli, proteinden ve alkolden çok iyi bir şekilde arındırılmış olmalıdır [124-126].

b) DNA polimeraz:

Orijinal PCR metodunda E.coli DNA polimeraz I'in Klenow parçası kullanılmıştır. Ancak bu enzim hedef çift zincirli DNA'yı denatüre etmek için gerekli olan sıcaklıktan daha düşük sıcaklıklarda bozulmaktadır. Bu nedenle ilk çalışmalarda her döngüden sonra reaksiyona enzim eklenmesi gerekiyordu. Buna ek olarak farklı sıcaklıklarda gerçekleşen denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları için bir sıcaklık banyosundan diğerine aktarılması gerekiyordu. Sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazın kullanımı, her denatürasyon basamağından sonra enzim eklenmesi gereğini ortadan kaldırdığı için PCR işlemini kolaylaştırmıştır. DNA polimerazlar polinükleotidin sadece 3' ucuna yeni nükleotid ekleyebilmektedir. Kullanılan ilk sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz *Thermus aquaticus*'dan izole edilen Taq DNA polimerazdır.

Taq polimeraz Amerika Yellowstone Doğal Parkında yaklaşık 85°C sıcaklıktaki kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmiştir. Bu

enzimin optimal çalışma sıcaklığı 70-80°C arasındadır. Bu sıcaklıkta enzim saniyede 35-100 nükleotid sentezleyebilme hızına sahiptir.

AmpliTaq® DNA polimeraz *E.coli* tarafından ifade edilen ve genetiği değiştirilmiş bir enzimdir. AmpliTaq® rekombinant olduğu için bu enzimin saflığı ve verimliliği doğal enzimden daha fazladır. Ancak DNA amplifikasyonu sırasında bazı homolog *E.coli* sekansları ile potansiyel bir kontaminasyon meydana gelebilir, bu durumda konak organizma olarak *E.coli*'de ifade edilmeyen bir DNA polimeraz tavsiye edilir. Hem Taq hemde AmpliTaq® DNA polimerazlar büyüyen zincirin başından nükleotidleri ayıran 5' uçtan 3' uca ekzonükleaz aktivitesine sahiptirler [127].

c) Reaksiyon Tampon Çözeltileri ve MgCl₂

PCR için reaksiyonda direk olarak yer alan maddelerin yanı sıra uygun bir tampon çözeltisine ihtiyaç duyulur. Tampon içeriği kullanılan enzimin özellik ve tipine bağlıdır ve birçok üretici enzimle beraber 10X tamponuda sağlar. Taq/AmpliTaq®DNA polimeraz ile en yaygın olarak kullanılan tampon;

10mM Tris ,pH 8.3

50mM KCl

1,5-2,5 mM MgCl₂ içermektedir.

PCR'da divalent katyonların bulunması çok önemlidir. Reaksiyon karışımında MgCl₂ konsantrasyonu 0,5ile 5 mM arasındadır. Mg⁺² iyonları;

-dNTP bağlanması için gerekli olan dNTP'ler ile çözülebilen bir karışım oluşturur

-Polimeraz aktivitesini artırır

-Primer/hedef DNA etkileşiminin T_m değerini artırır (böylece ikili etkileşimi daha dengeli hale getirir) [127].

d) dNTP'ler: Serbest deoksiribonükleosit trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) DNA sentezi için gereklidir. PCR için kullanılan her dNTP için konsantrasyon 20 ile 200 µM arasında olmalıdır ve yanlış bağlanma hatalarını önlemek için 4 dNTP eşit miktarda kullanılmalıdır [127].

e) Primerler: Genellikle kimyasal olarak sentezlenen, 15-20 bazlık DNA oligonükleotid dizileridir. Tamamlayıcı DNA ipliklerinden karşıt yönlerde DNA sentezini başlatabilmek için forward ve reverse olmak üzere iki adet primer kullanılır [124].

Başarılı bir PCR için en kritik parametre primerlerin tasarımıdır. Tüm koşulların uygun olduğu bir durumda, sadece zayıf tasarlanmış bir primer PCR reaksiyonun çalışmamasına neden olabilir. Bu yüzden ki PCR primerleri tasarlanırken çeşitli parametrelere dikkat edilmelidir. En kritikleri;

-Primer uzunluğu

-Erime sıcaklığı (T_m)

-Hassasiyet

-Tamamlayıcı primer sekansları

-G/C miktarı

-3' uç sekansıdır [127].

PCR'nin İşleyişi

a) Denaturasyon: Başlangıç denaturasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 °C) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin denaturasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu saptanmıştır. G+C den zengin hedefler için daha yüksek sıcaklıklar gereklidir. Denaturasyonun tam olarak gerçekleşmesi önemlidir. Tamamlanmamış denaturasyon DNA zincirlerinde kopmalara neden olarak ürün verimini azaltır. Ayrıca Taq DNA polimerazın yarı ömründe dikkate alınmalıdır. Taq DNA polimeraz enzimi 92,5 °C 'de 2 saatten fazla, 95 °C 'de 40 dakika ve 97°C'de ise 5 dakika yarı ömre sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır [124-126].

b) Primer Yapışması (Annealing): Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve sıcaklığı primerlerin uzunluğuna, baz içeriğine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Denaturasyonu takiben primerin bağlanması aşamasındaki T_m/bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından

büyük bir öneme sahiptir. 55-72 °C arası yapışma sıcaklıkları en iyi sonuçları verir [124-126].

c) Primer Uzaması (Extensiyon): Uzama zamanı hedef dizinin uzunluğuna, konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman 2 dakika yeterli olmakla birlikte, eğer uzun amplikonlar çoğaltılıyorsa süre arttırılır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur. En uygun döngü sayısı hedef DNA başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermekle beraber, ideal döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır [124].

1.7.1. Real-Time PCR

Higuchi ve arkadaşları, oluşturdukları PCR ürünlerini tarayan bir sistem geliştirmişlerdir. PCR kinetiginin analizine öncülük eden bu eş zamanlı sistem, her çoğaltma reaksiyonunda tespit için etidyum bromür, ultraviyole ışığı ile her örneği aydınlatacak termal döngü adaptörü ve floresans ışımının sonuçlarını toplayacak bir kamera eşliğinde bilgisayar sistemi içerir [15].

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR) olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesini sağlamıştır. Real-Time PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR döngüsünün yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışan ve aşama aşama reaksiyonu sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Real-Time PCR teknolojisinde diziye özgü problemler ve diziye özgü olmayan floresan boyalar kullanılır. Floresan boyalar sayesinde nicel ve nitel analizler yapılabilmektedir [35].

Real-Time PCR'da tarama yapmak için 4 farklı sistem mevcuttur. Bu 4 sistemde, PCR sırasında oluşan floresans ışımaya ölçmek üzere kurulmuştur. Yayılan floresans ışımaya miktarı, PCR ürün miktarıyla orantılıdır ve PCR reaksiyonu gözlemlemeye olanak sağlar [90].

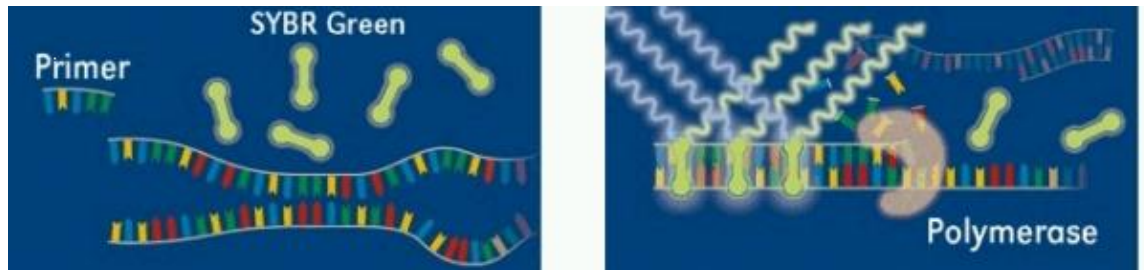
En basit ve ucuz olan sistem, çift zincirli DNA arasına giren boya teknolojisine dayanmaktadır. Bu teknolojiye, önceden hazır olan DNA ürününün üzerine boya kolayca uygulanabilir ve boyadan başka floresans işaretli oligonükleotid eklemek gerekmemektedir. Diğer üç sistem, floresans işaretli oligonükleotidlerin eklenmesi üzerine kuruludur. Yeterli miktarda floresans ışımaya; probun (hidroliz prob) [95] veya bağlanan bir (moleküler beacon) [96] veya iki (hibridizasyon prob) [35] oligonükleotidin ayrılması ile elde edilir.

➤ SYBR Green Probu

Yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren syber green boya kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir.

Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon tüpü içinde "syber green", primerler ve denature edilmiş DNA ayrı ayrı bulunduğu için floresans yok denecek kadar azdır. Primerin hedef moleküle bağlanmasını takiben az miktarda "syber green" çift sarmal yapıya katılmakta ve bunun sonucu olarak yayılan floresans miktarıda az olmaktadır, uzama aşamasında yeni sentezlenen çift sarmal DNA'nın yapısına gittikçe fazla miktarda boya katılarak zaman içinde floresans derecesinde artışa neden olmaktadır.

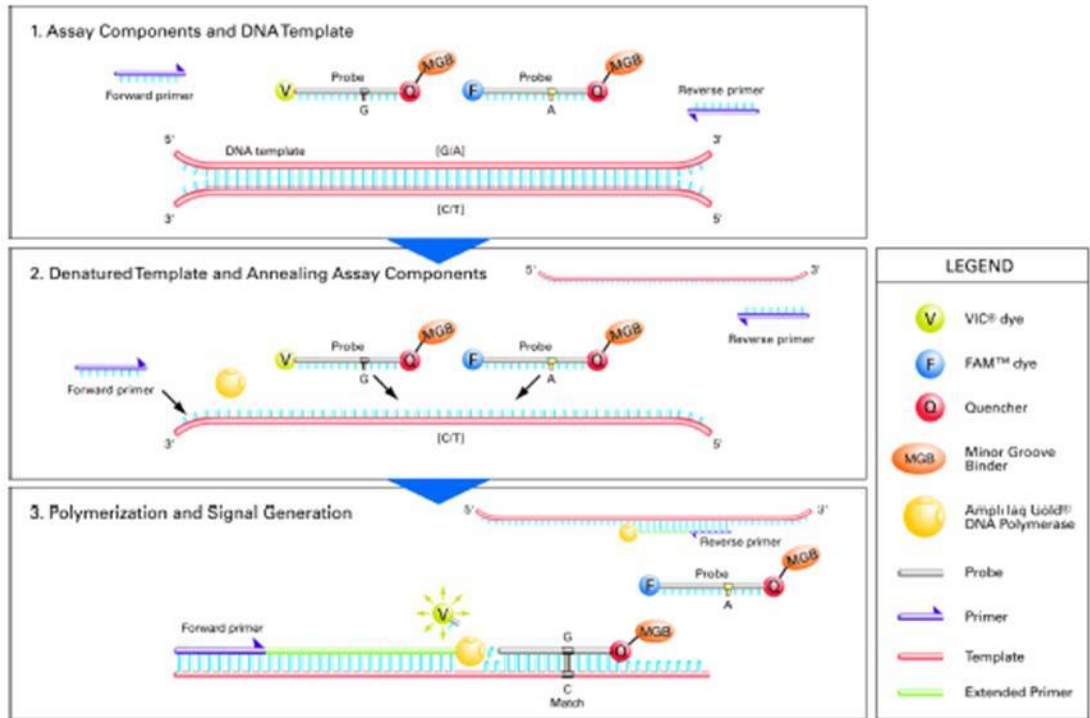
Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonları göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan "syber green", ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir [97].



Şekil 1.7.A. Syber Green tekniğinin aşamaları [148]

➤ TaqMan Probu

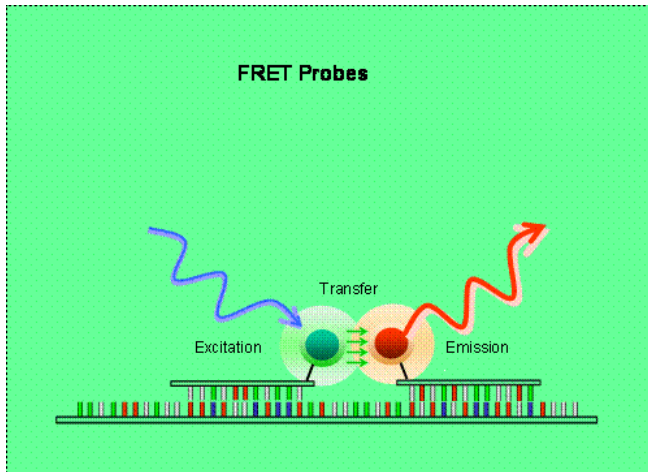
TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nukleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya baslar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplicon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır [128-129].



Şekil 1.7.B. TaqMan Tekniğinin Aşamaları [150]

➤ Hibridizasyon Problemleri

Lee ve arkadaşları, geliştirdikleri floresans işaretli problemlerle; PCR sonrasında probun erimesini analiz etmeyi mümkün kılmışlardır [130]. Bu problemler diziyeye özgü olup 2 probdan oluşmaktadır. Bu problemlerden bir tanesi, mutasyon içeren bölgeye spesifik tasarlanır, diğeri hemen bunun yakınında (3-5 nükleotid uzaklıkta) yerleştirilir [131]. LC-Red 640 işaretli hibridizasyon problemleri, mutasyon olmayan hedef diziyi hibridize ederek işaretleyici prob olarak fonksiyon kazanmasını sağlar. Diğer hibridizasyon probu, floresans ile işaretli olup, mutasyon probuna sıkı olarak bağlanır. İlk aşamada sadece floresans boya ışıldarken, kalıp DNA'ya hibridize olduktan sonra, bu iki prob yakın olacak şekilde yan yana gelirler ve bu floresans boyanın enerjisi Red 640 boyanın ışınmasına neden olur. Bu 2 boya arasındaki enerji yayılımına floresans rezonans enerji transferi (FRET) denir. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar [132].



Şekil 1.7.C. Hibridizasyon Probu Örneği[151]

1.7.1.1. Kantitatif qRT-PCR

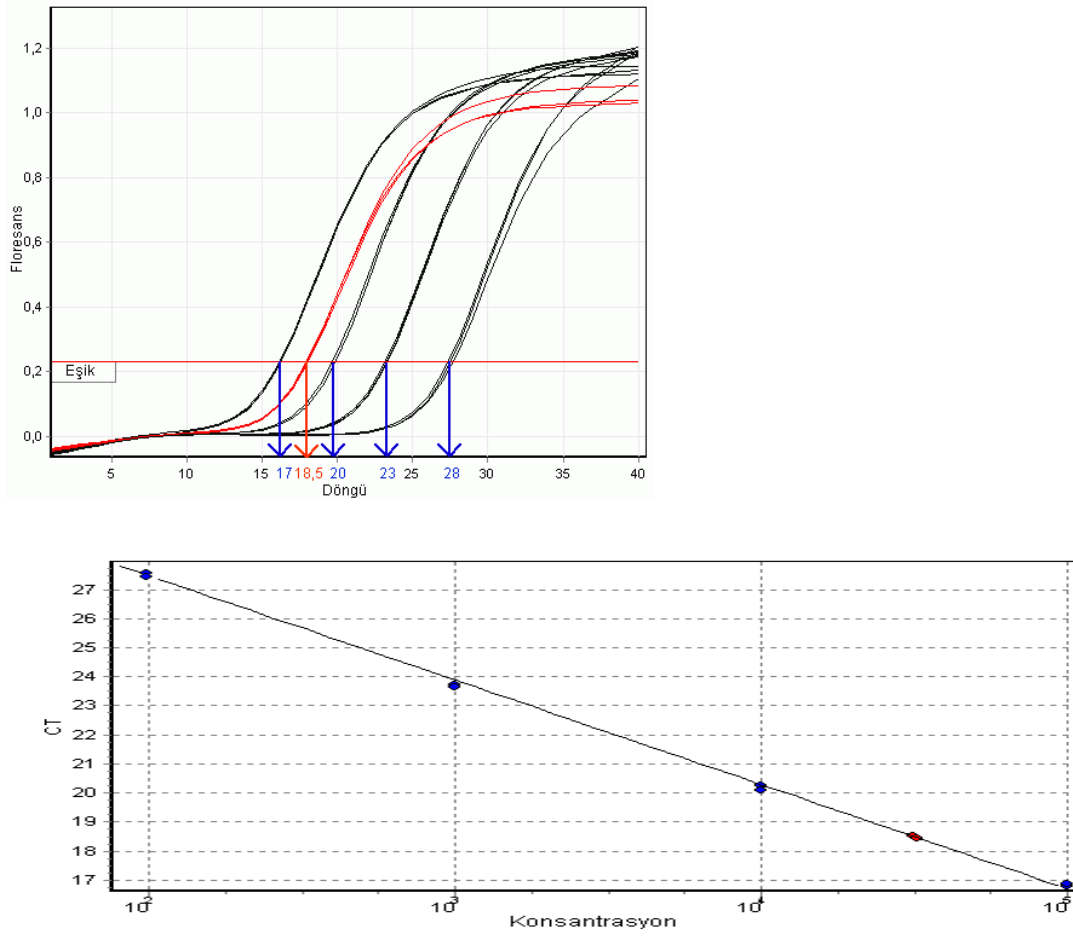
Herhangi bir örnekteki gen ekspresyon seviyesini ölçmek için absolute ya da relative qRT-PCR yöntemi kullanılabilir.[11]

a) Absolute qRT-PCR

Absolute (mutlak) qRT-PCR yönteminde analiz için kalibrasyon eğrisi çizimine ihtiyaç duyulmaktadır. Kalibrasyon eğrisi, konsantrasyonları belli olan standart ile

çizilmektedir. Standart olarak sulandırılmış pcr ürünü, rekombinant DNA ya da RNA, doğrusallaştırılmış plazmid yada doku örnekleri kullanılabilir [11].

Eşik döngü değeri (treshold cycle=ct) amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Absolute kantitasyon çalışmalarında kalıp DNA miktarı bilinen standart örnekler için Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır [132].



Şekil 1.7.C. PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri. A. Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri (mavi oklar) gösterilmiştir. Bir adet bilinmeyen örnek ve Ct değeri kırmızıyla gösterilmiştir. B. Standart örneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir. Bilinmeyen örnek kırmızı ile ifade edilmiştir [10].

1.7.1.2. Relative qRT-PCR

Relative qRT-PCR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır [133].

Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ekspresyonu değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin ekspresyon düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak housekeeping genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır [10].

1.7.2. Housekeeping Genler

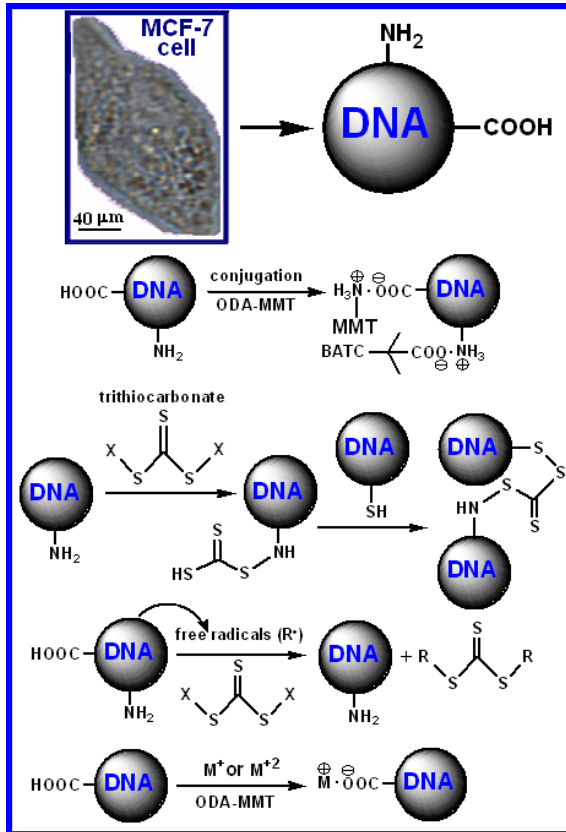
Bir hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tümünde eksprese olan ve ekspresyon seviyesi dokudan dokuya değişmeyen genlere housekeeping genler adı verilir. Bu genler, nükleik asit ve protein sentezi, besinlerin taşınması ve kullanımı, hücresel iskeletin ve organellerin biyosentezi gibi temel hücresel ve metabolik işlevler için gereklidir. Housekeeping genler hücrenin işleyişini düzenleyen genler olarak da ifade edilmektedir [134].

1.8. Kullanılan Polimerler ile İlgili Genel Bilgiler

Günümüzde, kil minerallerinin eşsiz özellikleri hakkında, özellikle de mmt kili ve onun organik türevleri ile ilaç formüllerinde ve kozmetik alanında [43-44], çeşitli çamur tedavilerinde [44-45], tıpta antibakteriyel taşıyıcı [46-47] ve antikanserojen ajan olarak [63-68], ilaç ve gen aktarımı sistemlerinde hedef ajan olarak [69-50] ve

doku mühendisliğinde ilaç hedefi olarak kullanımı ile ilgili birçok bilimsel yayın bulunmaktadır. MMT ayrıca İrritabl Barsak Sendromu tedavisinde efektif olarak [121] ve aflatoksikozisi önlemede kullanılmaktadır. Modifiye MMT bağırsaktan kolesterol emilimini nano ölçekte engellemekte [42] ve ürik asidi emmektedir [135]. MMT' nin ağır metalleri, toksinleri ve tehlikeli kimyasalları soğurmadaki etkinliği kanıtlanmıştır [136-137]. Yüksek iyon değişim kapasitesi, yüzey alanı genişliği ve yüksek soğurma kapasitesi [140], neaktif yüzey değişimi, negatiflik hali ve zehirli olmaması [141] gibi özellikleri sayesinde metal iyonlarının (Ag^+ ya da Cu^{2+}) antibakteriyel özelliklerini geliştirmede taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [47,138,139].

Kopolimerlerin sentezi, karakterizasyonu ve anti kansorejen etkileri Rzayev ve Türk'ün çalışmalarına konu olmuştur [142-143]. Çalışmalarında, sondaki trithiokarbonat ve karboksil işlevselliği kısmen dekarboksillenme gibi özelliklere sahip polimerlerin MCF-7 hücrelerinde yüksek antikanserojen etkiye sahip olduğu ve normal hücrelerde ise toksik olmadığını göstermişlerdir [143].



Şekil 1.8. BATC ODA-MMT kompleksinin MCF-7 kanser hücreleri ile etkileşiminin şekilsel gösterimi (Prof. Dr. Zakir M.O. RZAYEV tarafından resmedilmiştir)

2. MATERYAL YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

İstanbul üniversitesi Biomühendislik bölümü (MCF-7 kanser hücresi) Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İldam,Türkiye), soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich,Almanya), inverted mikroskop (Leica DM1 6000, İsveç), vorteks, elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2) , karbondioksitli etüv (BinderCB150), hemositometri (İnvitrogen,Countess), gerçek zamanlı hücre analiz sistemleri xCELLigence RTCA (Roche,Almanya), hassas terazi (Mettler toledo MS204)

Hücre kültürü flaskları ve diğer plastik malzemeler (Corning (NY, USA)),Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Serva ,İsrail), fetal calf serum (FCS,Serva,İsrail), Trypsin-EDTA (Serva,İsrail), hoechst 33342(Serva,İsrail) and propidium iodide (PI,Serva,İsrail), WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] (Roche,Almanya) . Annexin-V-fluos (Roche, Almanya), disposable pipet (2ml,5ml,10ml), Etanol (Merck, Almanya),PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD)

Real-time PCR cihazı (LightCycler ® 480 Instrument II, Roche, Almanya), Thermalcycler (Techne Tc Plus,Bibby Scientific,USA)

Total RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Almanya), cDNA sentez kiti (Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche, Almanya), gen ekspresyonu seviyesi saptama kiti (RealTime ready Catalog Assays, Roche, Almanya)

2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar

2.2.1. Besiyeri Hazırlanması

%89 Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12 (DMEM/F-12)

%10 Fetal bovin serum

%1 Penicillin-Streptomycin

2.3. MCF-7 Hücre Kültürü

Hücreler, L-glutamin içeren DMEM, 10% FBS and 1% antibiotik içeren flasklara aktarılır ve flask 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatöre kapağı hafif açık olacak şekilde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alınır ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum dökülür ve 0,5 ml tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 3500rpm'De 2 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti süspanse edilir.

2.4. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksite Testi

İnvitro ortamda polimerler ile muamele edilen hücrelerin proliferasyon ve sitotoksite testi real-time analyzer (RTCA) SP cihazı (Roche, Germany) ile yapılmıştır. L-glutamin'siz DMEM-F12 medyum ile pasajlanan MCF-7 hücreleri (her bir kuyucukta 10×10^3 hücre olacak şekilde) E-Plate 96'ya ekildi. Platelere CO₂ inkübatöründe (37 °C, 5%CO₂) 19 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında değişik miktarlardaki ODA-MMT, ODA-Raft, DMA-MMT ve DMA-Raft (aşağı yukarı 0–80 µg/mL) polimerler plate'deki hücrelerin üzerine eklendi. Hücrelerin logaritmik büyümeleri cihaz tarafından her 10 dakikada bir, 42 saat boyunca okundu ve ekrana aktarıldı. İnhibisyon konsantrasyonu polimerler için yarım olarak tespit edildi.

2.5. Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Analizi

Apoptotik ve nekrotik analiz ikili boyama ve annexin-V boyama methodu ile yapılmıştır. İkili boyama methodu hücre hatlarında apoptotik hücrelerin sayımı apoptotik hücrelerin çekirdeklerini sayarak yapılmıştır. 10% FBS ve 1% penisillin–streptomisin içeren DMEM-F12 L-glutamin'li medyum'da çoğaltılmış 37°C, 5% CO₂ inkübasyonu yapılan MCF-7 hücreleri (her bir well'de 20×10^3 hücre olacak

şekilde) 48 well plate'e eklendi. Deney grubundaki MCF-7 hücrelerine değişik miktarlardaki (10, 20, 40, and 80 µg/mL) ODA-MMT ve yine aynı miktardaki ODA-Raft, DMA-MMT ve DMA-Raft maddeleri 24 saat süreyle muamele edildi. Herhangi bir madde ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol grubu diğer hücreler ise deney grubu olarak değerlendirildi. Bu iki gruptaki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra Hoechst 33342 (2 lgmL), propidyum iodid (PI) (1 lgmL) boyaları ile boyanması için moleküler su (100 lgmL) da ilave edilerek 15 dakika süre ile oda sıcaklığında bırakıldı. Daha sonra boyanan hücrelerden 10–50 µL lam üzerine alınarak floresan mikroskopunda incelendi. Apoptotik ve nekrotik hücreler invertde floresan mikroskopunda ((DMI6000 (Leica)) DAPI ve FITC filitreleri kullanılarak sayıldı.

2.6. Annexin-V-Fluos İmmunokimyasal Boyama

Annexin-V-fluos, kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlanma proteindir ve apoptozu saptamak için kullanılır. MCF-7 hücreleri 10% FCS içeren DMEM ile birlikte 48-well plate her bir kuyucukta 10×10^3 hücre olacak şekilde ekilir. Ertesi gün deney grubundaki MCF-7 hücrelerinin medyumunu 10% FCS içeren taze medyum ile değiştirilir ve ODA-MMT, ODA-Raft, DMA-MMT ve DMA-Raft (10 µg/mL-80 µg/mL) polimerleri ile muamele edildi. Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin sadece medyumunu yenilendi. 24 saatlik muameleden sonra hücreler toplandı ve 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücreler boyandı daha sonra PBS ile yıkandı ve binding buffer (10 mMHEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) içerisinde yeniden suspense hale getirildi. Son konsantrasyonları 10 µg/mL ve 1 µg/mL olacak şekilde Annexin-V-Fluos ve PI süspense haldeki hücrelerin üzerine eklendi ve 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Hücreler ikinci kez PBS ile yıkandı ve yeniden binding bufferın içerisinde suspense edildi. Annexin-V-Fluos ile işaretlenmiş hücreler 40X objektif kullanılarak inverted floresan mikroskopunda incelendi. Her bir görüntü için rastgele seçilen üç mikroskop alanı değerlendirildi.

2.7. Total RNA İzolasyonu

Kontrol ve deney grubundaki hücrelerden total rna izolasyonu yapıldı. Kontrol grubu olan hücre hattına herhangi bir polimer ile muamele yapılmadı diğer gruptaki hücre

Hücreler 200µl PBS in içerisinde suspanse edildi. Üzerine hücrelerin parçalanması için 400 µl lysis-binding buffer eklenip vortekslendi. Her bir örnek için bir filitre toplama tüpüne yerleştirildi. Örneğin tamamı filitreli toplama tüplerine pipetlendi. Filitreli toplama tüpleri 8.000x g'de 15 saniye döndürüldü. Santrifüjden çıkarılan tüplerin toplama tüpleri yenisi ile değiştirildi. Ayrı bir tüp içerisinde, ortamdaki DNA'ları uzaklaştırmak için, 90 µl DNaz inkübasyon bufferı ve 10 µl DNaz I i karıştırdıktan sonra örneklerin üzerine pipetlendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra yıkama işlemi için 500 µl wash buffer I eklendi 8.000x g'de 15 saniye santrifüj edildi ve toplama tüpü değiştirildi. İkinci yıkama işlemi için 500 µl wash buffer II örneklerin üzerine eklendi, 8.000x g'de 15 saniye santrifüj edildi ve toplama kabı yine yenisi ile değiştirildi. Arta kalan yıkama solüsyonlarını ortamdaki uzaklaştırmak için 200µl wash buffer II örneklerin üzerine eklendi ve 13000xg'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpleri çıkarıldıktan sonra filitre temiz bir tüpün içine yerleştirildi ve RNA'nın filtreden tüpe aktarılabilmesi için 50 µl elüsyon buffer eklendi. Bu tüp 1 dakika boyunca 8.000x g'de santrifüj edildi ve filitre atıldı böylece total rna elde edilmiş oldu.

2.8. cDNA Sentezi

Her bir örnek için 5µl mRNA, 2 µl random primer ve 4,4 µl su pcr tüpünde karıştırıldı ve rna denatürasyonu için thermalcyler cihazında 65°C' de 10 dakika bekletildi. Daha sonra tüpler buz üzerine alındı ve cDNA sentezi için hazırlanmış olan karışım (Reverse transkriptaz reaksiyon buffer:4 µl,RNaz inhibitör: 0.5 µl, deoksiribonükleotid karışımı: 2 µl, DTT:1 µl, revers transkriptaz:1,1 µl) her bir tüpün üzerine eklenerek thermalcyler cihazına yerleştirildi. cDNA sentezi için kullanılan pcr döngüsü aşağıdaki gibidir;

		İŞLEM
29°C	10 dakika	İnkübasyon
48 °C	60 dakika	İnkübasyon
85 °C	5 dakika	Revers transkriptaz inaktivasyonu

Çizelge 2.8. cDNA sentez profili

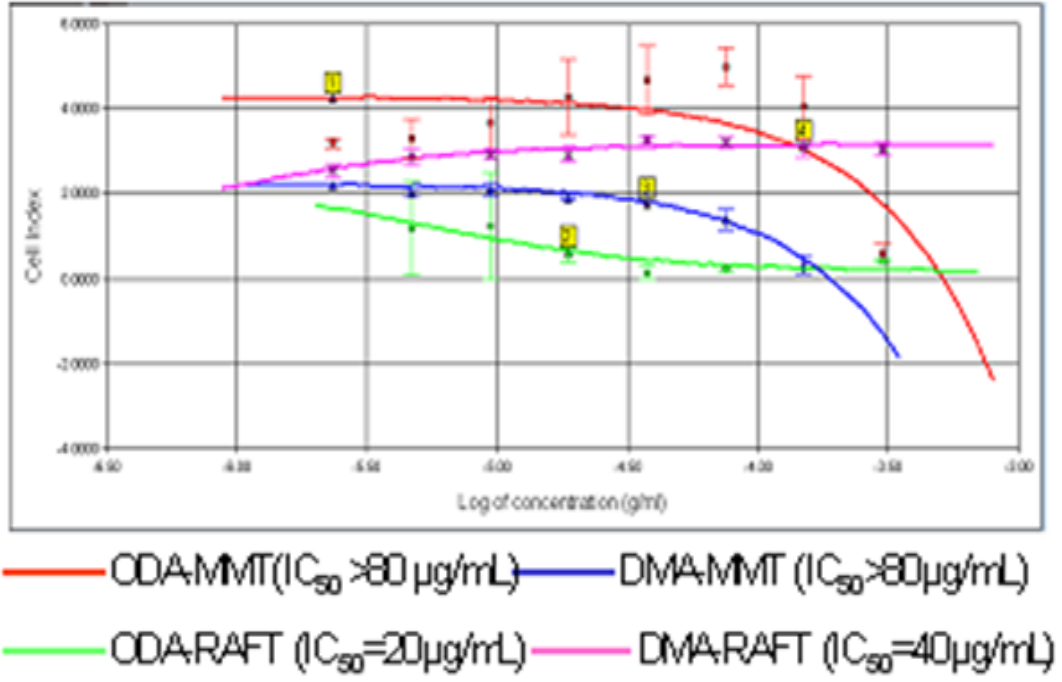
2.9. Relative qRT-PCR Deneyi

Bu çalışmada kaspaz-3 BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinin relative kantitasyonu RealTime ready Catalog Assay ile çalışılmıştır ve housekeeping gen olarak beta actin (actb) seçilmiştir. Bir önceki aşamada elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve reaksiyonlar tüm gruplar için ve her bir gen için ayrı ayrı kurulmuştur. Hazırlanan karışım; LightCycler ® 480 Probes Master:10 µl,RealTime ready Assay:1 µl (her bir gen için farklı kullanılmıştır.), su:4 µl. Bu karışımın üzerine 5 µl cDNA eklenerek LightCycler ® 480 cihazına yüklenmiştir.

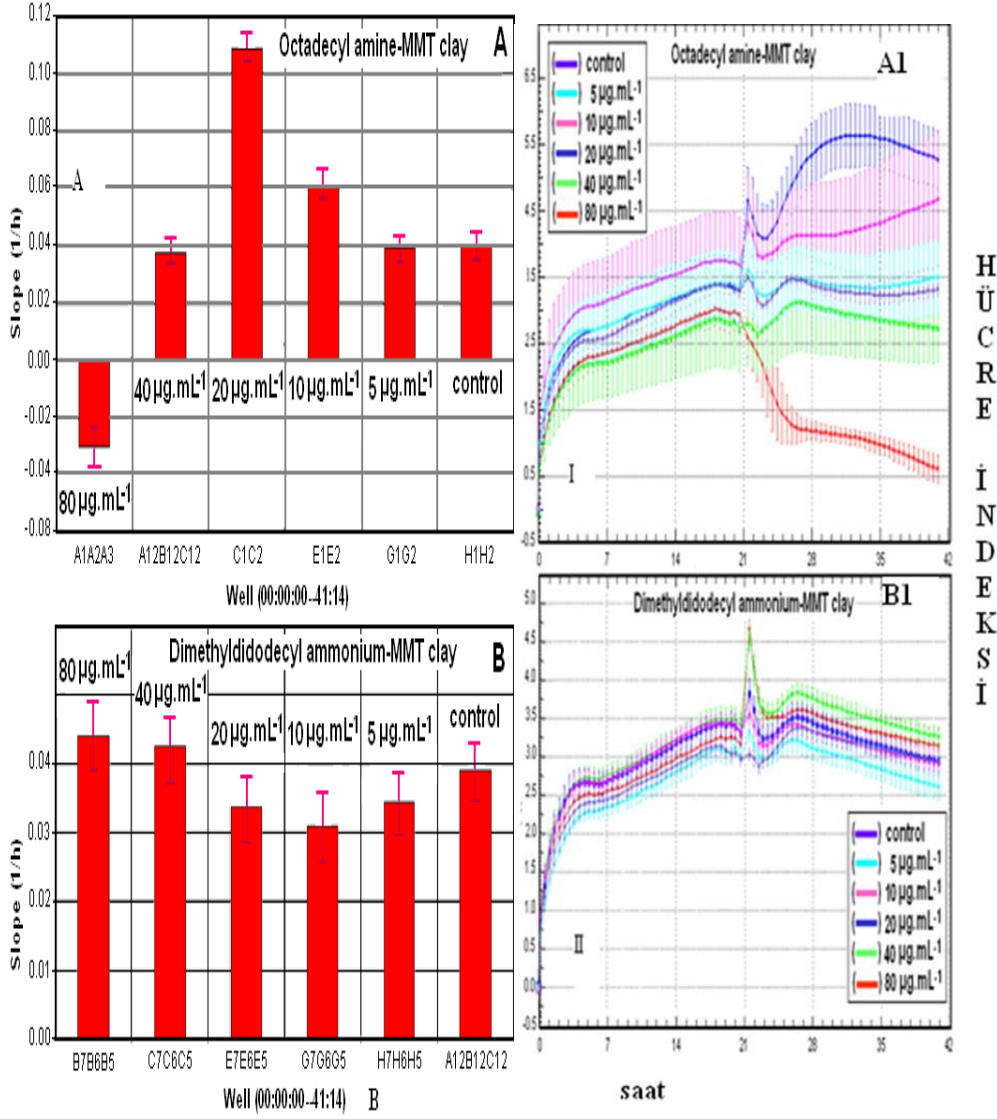
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksite Sonuçları

ODA-Raft ve DMA-Raft kopolimerlerinin MCF-7 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. RTCA sisteminin sonuçlarına göre kopolimerlerinin konsantrasyonlarının hücre ölümü üzerine etkisi büyük olmaktadır. Sitotoksite, doz-cevap eğrilerinin olduğu tablodaki hücrelerin %50' sini öldüren konsantrasyon (IC50) değerleri ile saptanmıştır. (şekil 3.1.A.) IC50 değerlerine göre ODA-raft kopolimeri hücreler için diğer kopolimerlerden daha toksik bulunmuştur. MCF-7 hücreleri için kopolimerlerin IC50 değerleri; ODA-Raft kopolimeri için 20 µg/mL, DMA-Raft kopolimeri için 40 µg/mL, ODA-MMT ve DMA-MMT kopolimerleri için ise 80 µg/mL'den daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar ayrıca düşük konsantrasyonların hücre için daha toksik olduğunu göstermiştir ve tüm veriler değerlendirildiğinde ODA-Raft kopolimeri çalışmada öne çıkmıştır.



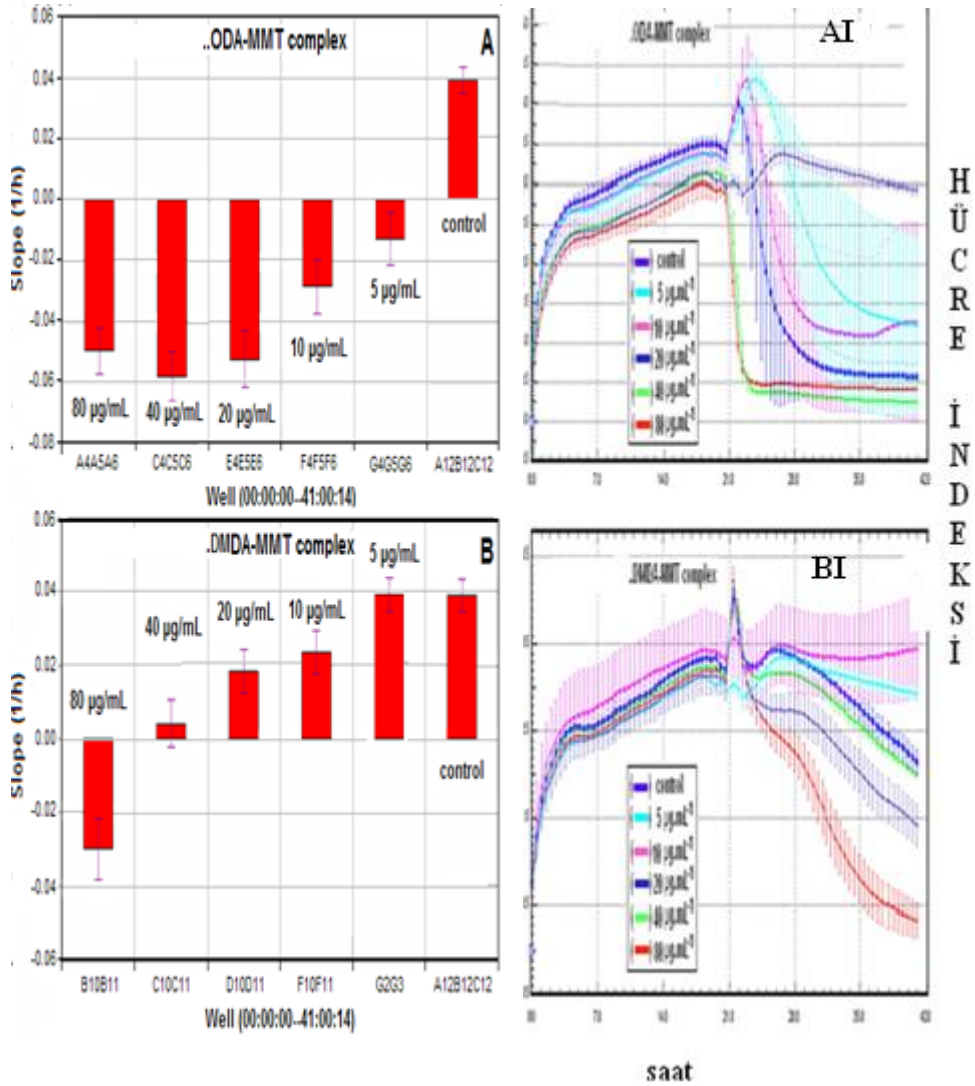
Şekil 3.1.A. ODA-MMT, ODA-Raft, DMA-MMT ve DMA-Raft kopolimerlerinin MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisinin hücre indeksi ile logaritmik olarak hesaplanması.



H
Ü
C
R
E
İ
N
D
E
K
S
İ

Şekil 3.1.B. MCF-7 hücrelerine muamale edilen ODA-MMT ve DMA-Raft kopolimerlerinin Real-Time analiz cihazından elde edilen analiz görüntüleri. Hücre indeksi 42 saat boyunca her 10 dakikada bir saptanmıştır; 20 saat sonra hücreler kopolimerler ile muamele edilmiştir (5-80 µg/mL): A1) ODA-MMT ile muamele edilmiş MFC-7 hücrelerinin proliferasyon eğrileri, B1) DMA-Raft ile muamele edilmiş MFC-7 hücrelerinin proliferasyon eğrileri. A) ODA-MMT kopolimerinin değişik konsantrasyonları ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin 42 saat boyunca indeksleri. Kontrol grubu hücreleri sadece hücre kültürü medyumunu içermektedir. Grafikte her bir sütun farklı konsantrasyonlardaki kopolimerleri göstermektedir. B) DMA-RAFT kopolimerinin değişik konsantrasyonları ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin 42 saat boyunca indeksleri. Kontrol grubu hücreleri

sadece hücre kültürü medyumu içermektedir. Grafikte her bir sütun farklı konsatrayonlardaki kopolimerleri göstermektedir.



Şekil 3.1.C. MCF-7 hücrelerine muamale edilen ODA-RAFT ve DMA-MMT kopolimerlerinin Real-Time analyzer (RTCA) cihazından elde edilen analiz görüntüleri. Hücre indeksi 42 saat boyunca her 10 dakikada bir saptanmıştır; 20 saat sonra hücreler kopolimerler ile muamele edilmiştir (5-80 $\mu\text{g/mL}$): AI) ODA-Raft ile muamele edilmiş MFC-7 hücrelerinin proliferasyon eğrileri, BI) DMA-MMT ile muamele edilmiş MFC-7 hücrelerinin proliferasyon eğrileri A) ODA-RAFT kopolimerinin değişik konsatrayonları ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin 42 saat boyunca indeksleri. Kontrol grubu hücreleri sadece hücre kültürü medyumu içermektedir. Grafikte her bir sütun farklı konsatrayonlardaki kopolimerleri göstermektedir. B) DMA-MMT kopolimerinin değişik konsatrayonları ile muamele

edilmiş MCF-7 hücrelerinin 42 saat boyunca indeksleri. Kontrol grubu hücreleri sadece hücre kültürü medyumu içermektedir. Grafikte her bir sütun farklı konsatrayonlardaki kopolimeleri göstermektedir.

3.2. Apoptoz Sonuçları

Apoptoz oranları iki farklı yöntem ile saptanmıştır; ikili boyama ve annexin-V boyama yöntemleri. Bu yöntemleri kullanarak elde edilen ortalama değerlere çizelge 2’de, floresan mikroskop görüntüleri şekil 3.2.’ de yer almaktadır. Apoptotik etkiler ODA-MMT, DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimelerinin düşük konsantrasyonlarında gözlemlenmiş ve konsantrasyonlardaki artış apoptotik etkiyi daha da arttırmıştır. ODA-Raft kopolimerinin apoptotik etkisi 40µg/mL (çizelge 3.2.) konsantrasyonuna kadar artmış, daha yüksek konsantrasyonda (80 µg/mL) ise 3-18% oranında azalma gözlenmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlardaki ODA-Raft kopolimerin apoptotik etkisinin yüksek konsantrasyonlardaki DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerlerinde daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Annexin-V boyama methodu ile apoptozu saptamak mümkündür. Şekil 3.2.-C’de gösterildiği gibi Annexin-v boyası apoptotik hücreleri membranlarındaki antikorlar ile reaksiyonundan dolayı apoptotik hücreler yeşil olarak gözlenmiştir. İkili boyama ise apoptozu saptamak için kullanılan bir diğer yöntemdir. Bu yöntemde Hoechst 33342 isimli boya kullanılmıştır ve bu boya canlı hücrelerin çekirdeklerini boyamıştır. Çekirdekler floresan mikroskopundaki DAPI filtresi ile bakıldığında hücre çekirdekleri mavi olarak gözlemlenmiştir. Bu yöntemle ayrıca hücre çekirdeklerinin morfolojiside gözlemlenebilmektedir. Apoptotik indeksin double staining ve annexin-V boyama yöntemleri ile saptanan bulgular çizelge 3.2. de özetlenmiştir ve floresan mikroskopundan elde edilen sonuç görüntüleri ise şekil 3.2.-A,B ‘de yer almaktadır.

ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş, annexin-V ile boyanmış hücrelerin nükleusları apoptotik olmayan hücrelere oranla daha da parlak bir mavi ile boyandığı gözlenmiştir. (şekil3.2.-B). Kontrol grubu olan hücrelerin çekirdeklerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. (şekil3.2.-A). DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ODA-Raft kopolimerine oranla daha düşük apoptotik etki

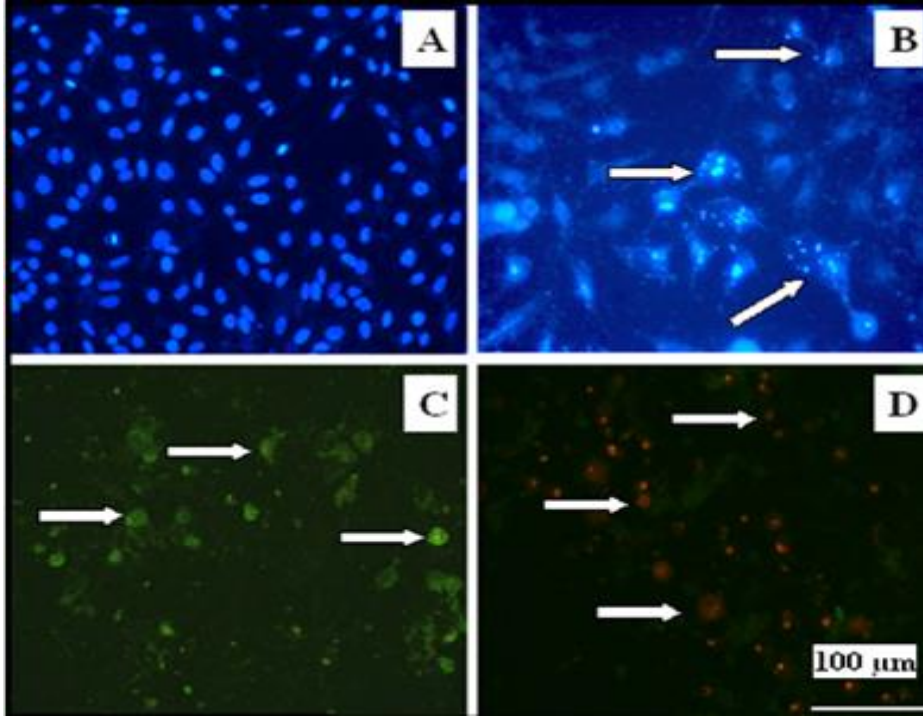
göstermiştir. ODA-Raft kopolimerinin en yüksek apoptotik indeksi $39\pm3\%$ oranında, $40\ \mu\text{g}/\text{ML}$ miktarındaki konsatrasyonunda saptanmıştır.

Polimerlerin Miktarları ($\mu\text{G}/\text{ML}$)	Apoptotik İndeks(%)				Nekrotik İndeks(%)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 2	3 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1
10	6 \pm 1	12 \pm 1	5 \pm 1	4 \pm 1	8 \pm 2	13 \pm 2	4 \pm 1	3 \pm 1
20	10 \pm 2	27 \pm 3	9 \pm 3	15 \pm 2	15 \pm 2	24 \pm 2	7 \pm 2	16 \pm 1
40	14 \pm 1	39 \pm 3	12 \pm 3	26 \pm 2	23 \pm 2	38 \pm 2	13 \pm 1	34 \pm 2
80	7 \pm 1	18 \pm 2	9 \pm 2	20 \pm 2	31 \pm 4	53 \pm 3	17 \pm 2	42 \pm 2

Çizelge 3.2. MCF-7 hücrelerine farklı miktarda muamele edilen kopolimerlerin apoptotik ve nekrotik indeksleri; (I)ODA-MMT, (II) ODA-Raft , (III)DMA–MMT ve (IV) DMA-Raft

Bu iki boyama yönteminde nekrotik hücrelerin tespiti için ayrıca propotiyum iodid (PI) boyası kullanılmıştır. PI boyası ölü hücelere ve plazma mebranı zarar görmüş hücelere direk olarak girer ve bu hücrelerin çekirdeklerinin floresan ışığı altında kırmızı gözükmesini sağlar. Çalışmamızda nekrotik hücrelerin indeksi floresan mikroskopunda, 480–520 nm dalga boyundaki FITC filtresi altında incelenmiştir ve nekrotik hücrelerin çekirdekleri kırmızı sağlıklı ya da apoptotik hücrelerin çekirdekleri yeşil olarak gözlemlenmiştir. Nekrotik hücrelerin görünümü şekil 3.2-D’de ve hücrelerin nekrotik indeksinin yüzdeleri çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Kopolimerlerin düşük konsatrasyonlarında hücrelerin nekrotik indeksleri çok yüksek bulunmamıştır. Konsatrasyonlar yükseltildiğinde nekrotik etkinin ve toksitenin gözle görülür biçimde arttığı gözlemlenmiştir. ODA-Raft kopolimerinin nekrotik etkisinin DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. (çizelge-2) ODA-Raft kopolimerleri nin $80\ \mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonundaki nekrotik etkisinin yüzdesi; $53\pm3\%$, DMA-RAFT kopolimerinin

80 µg/mL konsantrasyonundaki nekrotik etkisinin yüzdesi; 42 ± 2 % şeklinde bulunmuştur.



Şekil 3.2. Annexin-V boyası ve ikili boyama yönteminde kullanılan Hoechst 33342 isimli boya ile boyanmış apoptotik hücre ve yine ikili boyama yönteminde kullanılan PI boyası ile boyanmış nekrotik hücrelerin görüntüleri. (A) İkili boyama yöntemiyle boyanmış kontrol grubu MCF-7 hücleri (B) 40 µg/mL konsantrasyonunda ODA–Raft kopolimeri ile muamele edilmiş ikili boyama yöntemiyle boyanmış MCF-7 hücleri, apoptoza gitmiş hücreler ok ile gösterilmiştir (C) 40 µg/mL konsantrasyonunda ODA–Raft kopolimeri ile muamele edilmiş ve Annexin-V yöntemiyle boyanmış MCF-7 hücleri, apoptoza gitmiş hücreler ok ile gösterilmiştir. (D) 40 µg/mL konsantrasyonunda ODA–Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücleri, PI boyası ile boyanmış kırmızı görünen nekrotik hücre çekirdekleri ve yeşil görünen nekrotik olmayan hücre çekirdekleri ok ile gösterilmiştir. Fotoğraflar 200 X’ te Leica DM1 6000 model inverted mikroskopta çekilmiştir. Bar 100 µm göstermektedir.

3.3.Real-Time PCR Testinin Sonuçları

Farklı polimeler ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerindeki BRCA-1, BRCA-2 ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyesi relative qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir.

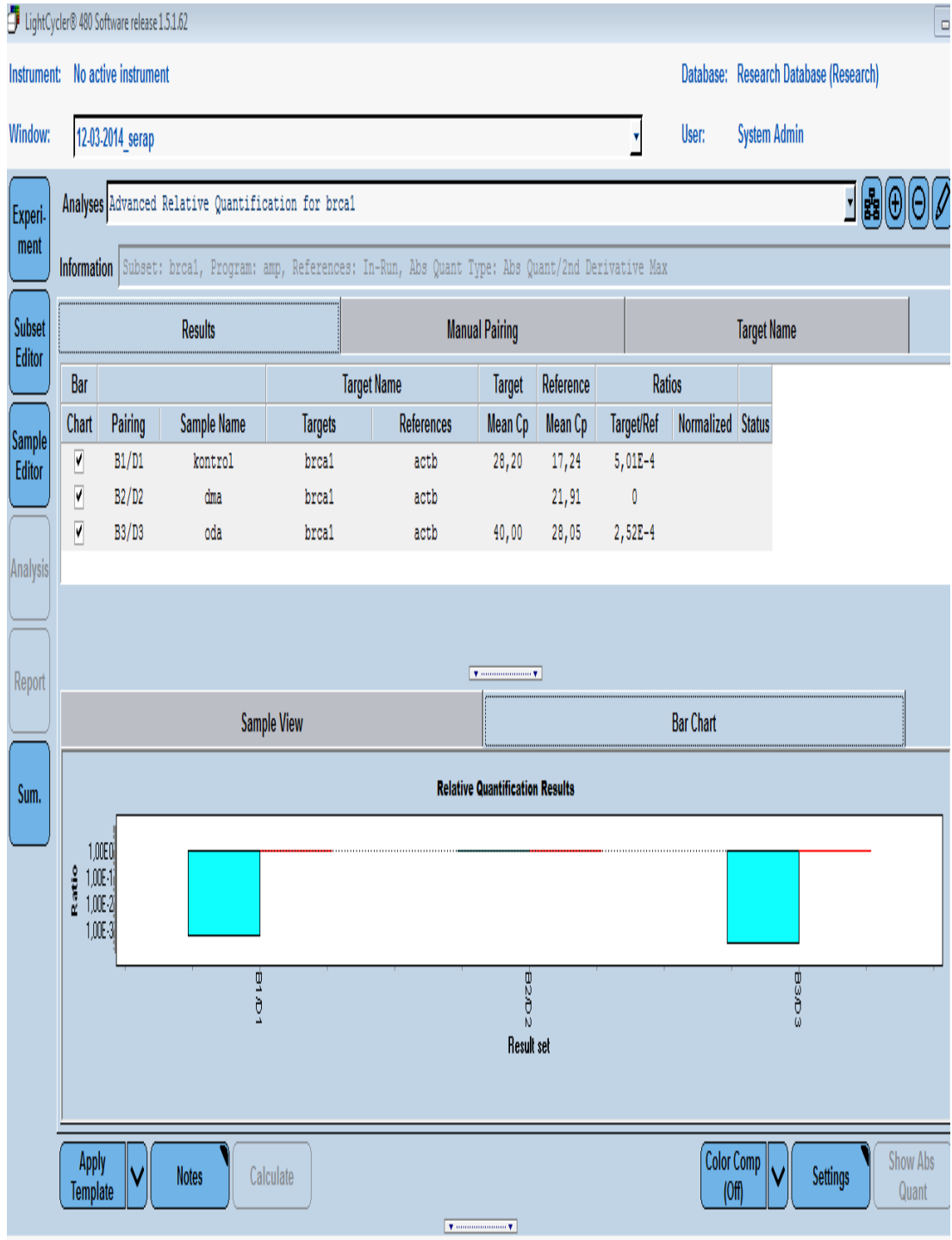
Göreceli kantitasyon yöntemi ile hücrelerdeki gen ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Hem deney hemde kontrol grubundaki house keeping genin hedef gene göre oranı hesaplandı ve deney grubundaki hücreler kontrol grubuna oranlanarak sonuçlar elde edildi.

Çalışmamızda bulunan değerlerin hesaplamaları için hedef(target) ve referans (referance) genlerin Cp (cutting point) değerleri kullanılmıştır ve hesaplama kullanılan yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Değerlendirme kontrol grubu değerlerine oranlanarak yapılmıştır.

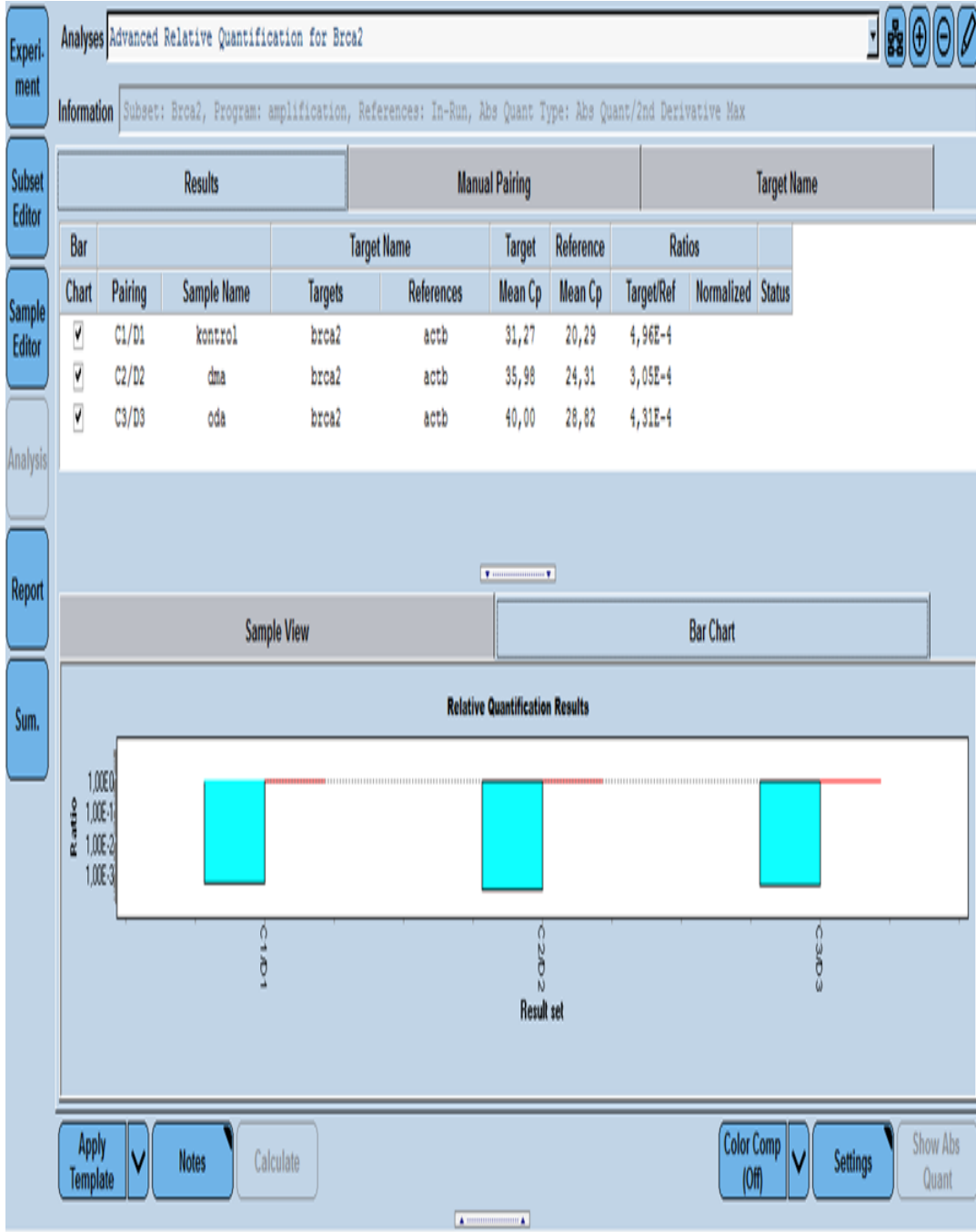
ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla BRCA-1 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 1.9 kat azalmıştır. DMA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla BRCA-1 gen ekspresyon seviyesinin artmasına veya azalmasına bir etkisi olmamıştır. (şekil 3.3.A.)

ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla BRCA-2 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 1,1 kat azalmıştır, DMA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla BRCA-2 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 1,6 kat azalmıştır. (şekil 3.3.B.)

ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 51 kat artmıştır. DMA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 113 kat artmıştır. DMA-Raft kopolimeri ODA-Raft kopolimerine oranla hücrelerde kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesinin artmasında daha etkili olmuştur.(şekil 3.3.C.)



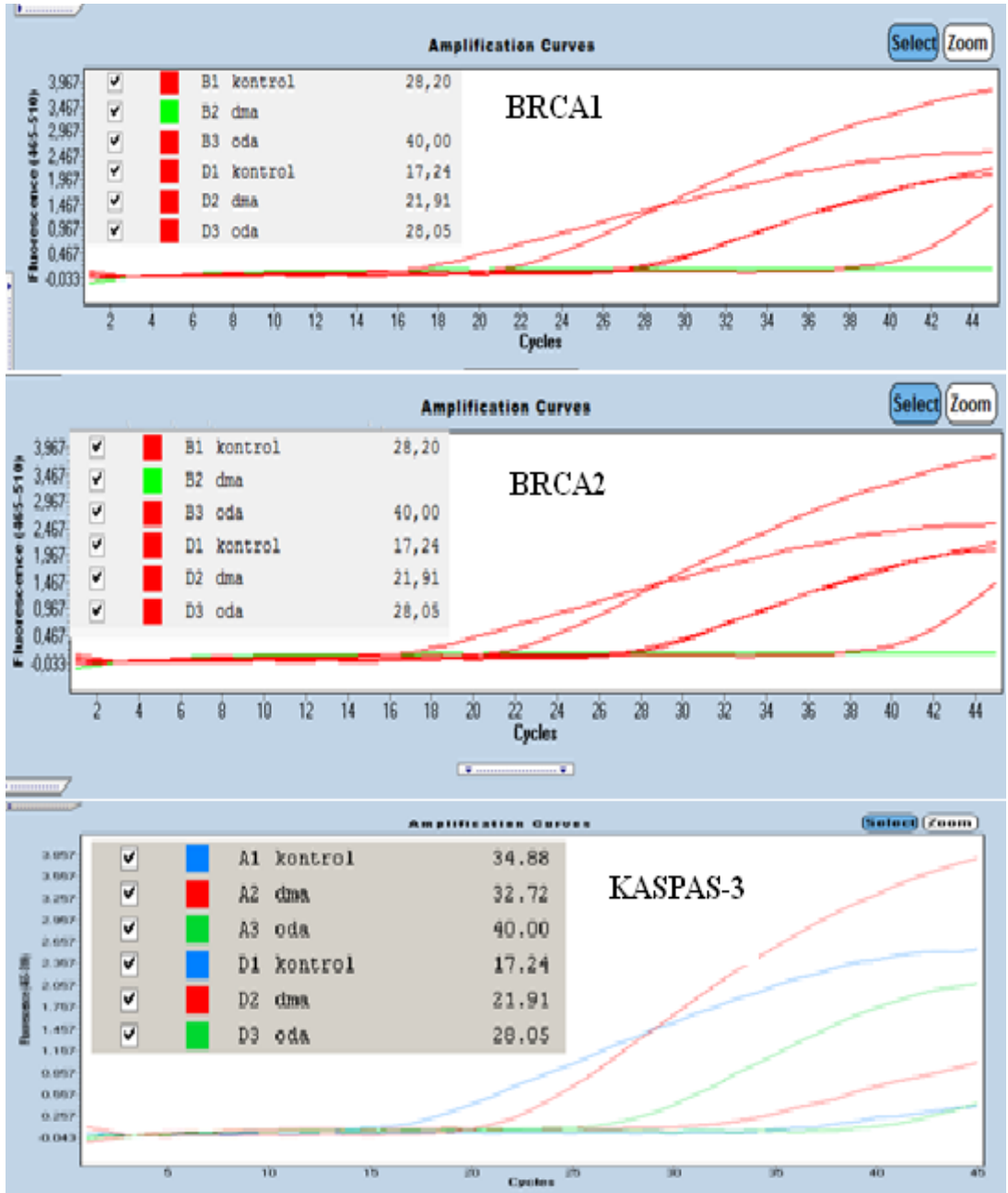
Şekil 3.3.A. Kontrol grubu, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin BRCA-1 gen ekspresyon seviyesindeki değişimler



Şekil 3.3.B. Kontrol grubu, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin BRCA-2 gen ekspresyon seviyesindeki değişimler



Şekil 3.3.C. Kontrol grubu, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerleri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesindeki değişimler



Şekil 3.3.D. BRCA-1, BRCA-2 VE KASPAS-3 Genlerinin Amplifikasyon (Çoğalma) Eğrileri

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Çalışmamızda, ODA-MMT ve DMA-MMT maddelerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkisi, apoptotik –nekrotik etkisi ve BRCA-1, BRCA-2 ve Kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi incelenmiştir.

RTCA sistemi ile ODA-RAFT ve DMA-RAFT kopolimerlerinin MCF-7 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Sitotoksite, doz-cevap eğrilerinin olduğu tablodaki hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC50) değerleri ile saptanmıştır. (şekil 3.1.A.) MCF-7 hücreleri için kopolimerlerin IC50 değerleri; ODA-Raft kopolimeri için 20 µg/mL, DMA-Raft kopolimeri için 40 µg/mL, ODA-MMT ve DMA-MMT kopolimerleri için ise 80 µg/mL'den daha yüksek bulunmuştur. RTCA sisteminin sonuçlarına göre kopolimerlerinin konsantrasyonlarının hücre ölümü üzerine etkisi büyük olmaktadır. Bu sonuçlar ayrıca düşük konsantrasyonların hücre için daha toksik olduğunu göstermiştir ve tüm veriler değerlendirildiğinde ODA-Raft kopolimeri MCF-7 hücreleri için diğer kopolimerlerden daha toksik bulunmuştur. (Şekil 3.1.A.)

Ayrıca ODA-MMT, DMA-MMT, ODA-Raft ve DMA-Raft kopolimerlerinin MCF-7 hücrelerine proliferatif etkisi incelenmiştir. Bu etkiyi gözlemleyebilmek için RTCA sisteminden faydalanıldı ve hücrelerin indeksleri 42 saat boyunca 10 dakikada bir sistem tarafından saptanmıştır.

ODA-MMT ile muamele edilmiş hücrelerde en çok antiproliferatif etki kopolimerin 80 µg/mL konsantrasyonunda, en çok proliferatif etki ise kopolimerin 20 µg/mL konsantrasyonunda saptanmıştır. (Şekil 3.1.B/A)

ODA-Raft ile muamele edilmiş hücrelerde kopolimerin tüm konsantrasyonlarında antiproliferatif etki saptanmıştır. Kopolimerin 40 µg/mL konsantrasyonu ise hücreler için en çok antiproliferatif etkisi olan değer olarak saptanmıştır. (Şekil 3.1.C/A)

DMA-MMT ile muamele edilmiş hücrelerde en çok antiproliferatif etki 80 µg/mL konsantrasyonunda, en çok proliferatif etki ise kopolimerin 5 µg/mL konsantrasyonunda saptanmıştır. (Şekil 3.1.C/B)

Kopolimerlerin hücreye apoptotik ve nekrotik etkileri ikili ve annexin-V boyama yöntemleri ile saptanmıştır. Bu yöntemleri kullanarak elde edilen ortalama değerlere çizelge 2'de, floresan mikroskop görüntüleri şekil 3.2.' de yer almaktadır.

Apoptotik etkiler ODA-MMT, DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerlerinin düşük konsantrasyonlarında gözlenmiş ve konsantrasyonlardaki artış apoptotik etkiyi daha da arttırmıştır. ODA-Raft kopolimerinin apoptotik etkisi

40µg/mL konsantrasyonunda artmış, daha yüksek konsantrasyonda(80 µg/mL) ise %3-18 oranında azalma gözlenmiştir. Diğer kopolimerlerin apoptotik etkisi ise 40µg/mL konsantrasyonunda en yüksek yüzdeye ulaşmış diğer konsantrasyonlarında ise ortalama %3-24 oranında azalma göstermiştir. Ayrıca ODA-Raft kopolimerin apoptotik etkisinin en yüksek olduğu 40µg/mL konsantrasyonundaki etkisi; DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerlerinin 40µg/mL konsantrasyonlarındaki etkilerinden ortalama % 13-27 oranında daha fazla olduğu gözlenmiştir. (Çizelge 3.2.)

ODA-MMT, DMA-MMT, DMA-Raft ve ODA-Raft kopolimerlerinin nekrotik etkileri en yüksek konsantrasyonlarında gözlenmiştir. ODA-Raft kopolimerinin en yüksek konsantrasyonu 80µg/mL'deki nekrotik etkisi % 9-36 oranında diğer kopolimerlerden daha fazla bulunmuştur. (Çizelge 3.2.)

İkili boyama yöntemiyle boyanmış kontrol grubu MCF-7 hücreleri herhangi bir kopolimer ile muamele edilmediği için floresan mikroskopu altında hücrelerin çekirdekleri canlı mavi renkte görülmüştür. (Şekil 3.2-A) Hücrelerde en yüksek apoptotik etkisi olan 40 µg/mL konsantrasyonunda ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücreleri ikili boyama yöntemiyle boyanmış, floresan mikroskop altında canlı mavi renk kontrol grubuna oranla çok daha az gözlenmiştir. (Şekil 3.2-B) Hücrelerde en yüksek apoptotik etkisi olan 40 µg/mL konsantrasyonunda ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücreleri Annexin-V yöntemiyle boyanmış, apoptoza gitmiş hücreler floresan mikroskop altında yeşil renkli gözlenmiştir. (Şekil 3.2-C) Hücrelerde en yüksek apoptotik etkisi olan 40 µg/mL konsantrasyonunda ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücreleri, PI boyası ile boyanmış floresan mikroskop altında görünen nekrotik hücre çekirdekleri kırmızı renkli ve nekrotik olmayan hücre çekirdekleri ise yeşil renkli gözlenmiştir.

BRCA-1, BRCA-2 ve Kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi Real-Time PCR yöntemi ile incelenmiştir.

ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna oranla BRCA-1 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 1.9 kat azalmıştır. DMA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna oranla BRCA-1

gen ekspresyon seviyesinin artmasına veya azalmasına bir etkisi olmamıştır. (şekil 3.3.A.)

ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla BRCA-2 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 1,1 kat azalmıştır. DMA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla BRCA-2 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 1,6 kat azalmıştır. (şekil 3.3.B.)

ODA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 51 kat artmıştır. DMA-Raft kopolimeri ile muamele edilmiş MCF-7 hücrlerinde kontrol grubuna oranla kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesi yaklaşık 113 kat artmıştır. DMA-Raft kopolimeri ODA-Raft kopolimerine oranla hücrelerde kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesinin artmasında daha etkili olmuştur.(şekil 3.3.C.)

Sunulan çalışmamızda ODA-Raft kopolimeri diğer kopolimerlerden daha yüksek bir sitotoksik etkiye, antiproliferatif etkiye ve en önemlisi de apoptotik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda ODA-Raft kopolimerinin kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesini arttırmasında gözlenmiştir. ODA-Raft kopolimerinin MCF-7 hücrelerindeki yüksek apoptotik etkisini, apoptotik yolda rol alan kaspaz-3 geninin ekspresyonunu arttırarak yarattığını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Oğur, G., 2005, Kanser, Kromozomlar, Genler, Türkiye Klinikleri, 1 , 2, s
- [2] Anonim, 1995. Dünyada Kanser İstatistikleri. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu (TKASKD), <http://turkkanser.org.tr> (Erişim tarihi:27.04.2014)
- [3] Engin, K.,2005,. Meme Kanserleri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 27-49 s
- [4] Kaur, J. S., Roubidoux, M. A., Sloan, J. ve Novotny, P., 2004, Can the gail model be useful in american and alaska native populations? Cancer, 100, 906-912 p.
- [5] Vogel, V G., 2000, (çev: Postgraduate Medicine Assessing Risk Of Breast Cancer, (6)May-1999) Meme kanseri riskinin değerlendirilmesi, Sendrom, Nisan, 66- 69 p.
- [6] Sakorafas, G. H., Krespis, E. at Pavlakis, G., 2002, Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective, Surgical Oncology, 10, 183-192 p.
- [7] Fattaneh A.Tavassoli, Peter Devilee. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs,Lyon,IARC Pres,2003.
- [8] W-Y Lee, Y-T Jin, T-W Chang, et.al. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. Histopathology, 1999;34:106-112.
- [9] Eswaran Devarajan¹, Aysegul A Sahin², Jack S Chen¹, Raghu R Krishnamurthy³,Neeraj Aggarwal³, Anne-Marie Brun³, Anna Sapino⁴, Fan Zhang¹, Dhawal Sharma¹,Xiao-He Yang⁵, Ann D Tora⁵ and Kapil Mehta*,Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance,8843 – 8851(2002)
- [10] Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda House keeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi .Yüksek Lisans Tezi. Anakara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü,Ankara, 2008.

- [11] Michael W. Pfaffl, in: Real-time PCR, Published by International University Line (Editor:T. Dorak), p 63-82 <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-rel-quant-book-ch3.pdf> (Erişim tarihi:26.04.2014)
- [12] Anonim, Wikipedi, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser> (Erişim tarihi:27.04.2014)
- [13]Anonim, <http://www.kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/15-risk-faktorleri.html> (Erişim tarihi:27.04.2014)
- [14] Akbulut, H ve Akbulut K.G. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 23
- [15] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993 Sep; 11 (9): 1026-30.
- [16] PECORINO, L., *Molecular biology of cancer*, Oxford University Press, 2005
- [17] LOWITZ, B.B, CASCIATO, D.A, *Medical oncology & principles of cancerbiology*, *Kanser biyolojisi ve onkogenler*, Lippincott Williams & Wilkins pres, 2004
- [18] Evan, G.I. and Vousden, K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342.
- [19] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007,35(4):495-516.
- [20] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications forcardiovascular disease. *Circ Res*. 1998, 82(11):1111-29.
- [21] Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2004, 1:39-51.
- [22] Tömekçe N.B.,Apoptozla ilişkili genler BCL2L12 ve PDCD4'ÜN lösemi hastalarındaki ekspresyon analizi. (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Üniversitesi; 2008
- [23] Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Ankara, 2003

- [24] Gültekin N., Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, Türk Kardiyol Dern Arş, 2008; 36:120-130u
- [25] Flandrin P., Guyotat D., Duval A., Cornillon J., Tavernier E., Nadal N., Campos L. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. Cell Stress and Chaperones, 2008; 13: 357–364
- [26] Pehlivan S., Kolorektal tümörlerde telomeraz aktivitesi ve apoptozis ile ilişkisi. (Tez) Fırat Üniversitesi, 2008
- [27] Ozawa H, Keone RW, Marcilla AE, Dioz PH, Dietrich WD: Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats, Exp. Neurol, 2002; 177:306–313.
- [28] Liu H., Jiang X., Zhang M., Pan Y., Yu Y., Zhang S., Ma X., Li Q., Chen K. Association of CASP9, CASP10 gene polymorphisms and tea drinking with colorectal cancer risk in the Han Chinese population. Journal of Zhejiang University-Science Biomedicine & Biotechnology: 2013; 14(1):47–57
- [29] Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and Currie A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics. Br. J. Cancer, 1972; 26: 239–257
- [30] Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis, Semin Cell Dev Biol. 2000; (3):191-01.
- [31] Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death processing of apoptosis-inducing factor (AIF), Biochem Biophys Res Commun. 2010, 396(1):95–100.
- [32] Fışkın, K. 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar 635-651.
- [33] Ekmekçi, A., 2006,. Gen Genetik Değişim ve Hastalıklar. Gazi Kitabevi; 217-220 s.
- [34] Lüleyap, H. Ü., 2008, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, 306-307 s .

- [35] Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem.* 1997 Dec;43(12):2262-7.
- [36] Zetter, B.R. 2008. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research *Nature Reviews/ Cancer* Volume 8.
- [37] Berardo, M.D., Allred, D.C., O'Connell, P., 1998, *Breast Cancer, Principles of molecular medicine*, 31, 625- 632 p.
- [38] Kenemans, P., Verstraeten, R.A., Verheijen, R.H.M., 2004, *Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer*, *Maturitas*, 49, 34-43 p.
- [39] Ünal, G., Ünal, H., 2001, *Meme Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri*, 42, 310-313 p
- [40] Kotnis, A., Sarin, R., Mulherkar, R., 2005, *Genotype, phenotype and cancer: Role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility*, *Journal of Bioscience*, 30, 93-102 p.
- [41] Mitrunen, K., Hirvonen, A., 2003, *Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in estrogen biosynthesis and metabolism*, *Mutation Research*, 544, 9-41 p.
- [42] T. D. Phillips, S. L. Lemke, P. G. Grant, *Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis*, *Adv. Exp Med. Biol.* 2002, 504, 157-171.
- [43] C. Veniale, A. López-Galindo, *Pharmaceutical applications of some Spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies*, *Appl. Clay Sci.* 1999, 14, 69-82.
- [44] A. Bettero, M. Marcazzan, M. Sementzato, *Rheologic and tensiometric features of clay minerals for thermal and cosmetic purposes: Proposal of protocol for their characterization*, *Mineralogical and Petrographica Acta*, 1999, 42, 277-286
- [45] S. Cara, G. Carcangiu, M. Palomba, M. Tamanini, *The bentonites in plothrapy: thermal propeties of clay pastes from Sardinia (Italy)*. *Appl. Clay Sci.* 2000, 16, 125-132.

- [46] C. S. F. Gomes, J. B. P. Silva, Minerals and clay minerals in medical geology, 2007, 36, 4-21.
- [47] H. He, D. Yang, P. Yuan, W. Shen, R. L. Frost, A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidini Acetas. J. Colloid. Interface Sci. 2006, 297(1), 235-243.
- [48] Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D. M. (Eds), (2004) GLOBOCA; 2002:cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase ;No.5. version 2.0. Lyon: IARC Press.
- [49]Haydar Koç, Kanser Epidemiyolojisi ve İstatistiksel Haritalandırma.Yüksek Lisans Tezi.Ondokuz Mayıs Üniverstiesi,Samsun,2010
- [50] W. F. Lee, Y. T. Fu, Effect of montmorillonite on the swelling behavior and drug-release behavior of nanocomposite hydrogels, J. Appl. Polym. Sci. 2003, 89, 3652-3660.
- [51] Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, Rosario I, Gray GE. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *Br J Cancer* 1981; 43(1): 72-76.
- [52] MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, Andersen AP, Aoki K, Cole P ve ark. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982; 29 (1): 13-20.
- [53] Henderson BE, Pick MC, Casagrande JT. Breast cancer and the oestrogen window hypothesis. *Lancet* 1981; 2: 263-267.
- [54] Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Kralio MD, Pike MC. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* 1985; 56 (5): 1206-1208.
- [55] Apter D, Vihko R. Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles.*J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57 (1): 82-86.
- [56] Brinto LA, Hoover R, Fraumeni JF Jr. Reproductive factors in the etiology of breast cancer. *Br J Cancer* 1983; 47 (6): 757-762.

- [57] Veronesi U, Goldhirsch A, Yarnold J. Breast Cancer. İçinde Peckham M, Pinedo H, Veronesi U, editor. Oxford Textbook of Oncology. Oxford:University Press; 1995. pp. 1243-1289.
- [58] Eweretz M, Duffy SW, Adami HO, Kvåle G, Lund E, Meirik O ve ark. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 1990; 46 (4): 597-603.
- [59] Mellempgaard A, Eweretz M, Lyng E. The association between risk of breast cancer and age at first pregnancy and parity in Maribo County, Denmark. *Acta Oncol* 1990; 29 (6): 705-708.
- [60] Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW ve ark. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330 (2): 81-87.
- [61] Romieu I, Berlin JA, Colditz G. Oral contraceptives and breast cancer. Review and meta-analysis. *Cancer* 1990; 66 (11): 2253-2263.
- [62] Thomas DB. Oral contraceptives and breast cancer: review of the epidemiologic literature. *Contraception* 1991; 43 (6): 597-642.
- [63] S. M. Magaña, P. Quintana, D. H. Aguilar, J. A. Toledo, C. Ángeles-Chávez, M. A. Cortés, L. León, R. M. T. Sánchez, Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *J.*
- [64] Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995; 332 (24): 1589-1593.
- [65] Key TJ, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1998; 24 (1): 29-43.
- [66] Grady D, Ernster V: Does postmenopausal hormone therapy cause breast cancer? *Am J Epidemiol* 1991; 134: 1396-1400.

- [67] Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA* 1991; 265 (15): 1985-1990.
- [68] B. Sun, B. Ranganathan, S.-S. Feng, Multifunctional poly(D,L-lactide-co-lycolide)/ montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer, *Biomaterials* 2008, 29, 475-486.
- [69] C. Viseras, C. Aguzzi, P. Cerezo, A. Lopez-Galindo, Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Appl. Clay Sci.* 2007, 36, 37-50.
- [70] Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, Katsouyanni K ve ark. Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (7): 561-569.
- [71] Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur J Cancer* 2000; 36 (5): 636-346.
- [72] Lubin F, Ruder AM, Wax Y, Modan B. Overweigh and changes in weight throughout adult life in breast cancer etiology. A case-control study. *Am J Epidemiol* 1985; 122 (4): 579-588.
- [73] Hunter DJ, Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of the intake of vitamins C, E, and A and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1993; 329 (4): 234-240.
- [74] Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, Rosner BA, Speizer FE, Colditz GA ve ark. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91 (6): 547-556.
- [75] Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE. Vitamin A, betacarotene, and the risk of cancer: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79 (3): 443-448.
- [76] Rohan TE, Howe GR, Friedenreich CM, Jain M, Miller AB. Dietary fiber, vitamins A, C, and E, risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control* 1993; 4 (1): 29-37.

- [77] Kuper H, Ye W, Weiderpass E, Ekblom A, Trichopoulos D, Nyrén O ve ark. Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox. *Br J Cancer* 2000; 83 (7): 949-951.
- [78] Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP ve ark. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85 (9):722-727.
- [79] Friedenreich CM, Howe GR, Miller AB, Jain MG. A cohort study of alcohol consumption and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1993; 137 (5): 512-520.
- [80] Underwood GB, Gaul LE. Disfiguring sequelae from radium therapy; results of treatment of a birthmark adjacent to the breast in a female infant. *Arch Derm Syphilol* 1948; 57 (5): 918.
- [81] Boice JD Jr, Monson RR. Breast cancer in women after repeated fluoroscopic examinations of the chest. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59 (3): 823-832.
- [82] Shimizu Y, Kato H, Schull WJ. Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat Res* 1990; 121 (2): 120-141.
- [83] Demers PA, Thomas DB, Rosenblatt KA, Jimenez LM, McTiernan A, Stalsberg H ve ark: Occupational exposure to elektromagnetic fields and breast cancer in men. *Am J Epidemiol* 1991; 134 (4): 340-347.
- [84] Loomis DP, Savitz DA, Ananth CV. Breast cancer mortality among female electrical workers in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86 (12): 921-925.
- [85] Frisch R, Gotz-Welbergen AV, McArthur JW, Albright T, Witschi J, Bullen B ve ark. Delayed menarche and amenorrhea of college athletes in relation to age of onset of training. *JAMA* 1981; 246 (14): 1559-1563.
- [86] Bernstein L, Ross RK, Lobo RA, Hanisch R, Krailo MD, Henderson BE. The effects of moderate physical activity on menstrual cycle patterns in adolescence: implications for breast cancer prevention. *Br J Cancer* 1987; 55 (6): 681-685.

- [87] Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86 (18): 1403-1408.
- [88] O'Connell DL, Hulka BS, Chambless LE, Wilkinson WE, Deubner DC. Cigarette smoking, alcohol consumption, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78 (2): 229-234.
- [89] Palmer JR, Rosenberg L. Cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15 (1): 145-156.
- [90] Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*. 2002 Jun;8(6):257-60. Review.
- [91] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast disease. Breast cancer-epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* 1994; 309 (6960): 1003-1006.
- [92] Tretli S, Haldorsen T, Ottestad L. The effect of pre-morbid height and weight on the survival of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1990; 62 (2): 299-303.
- [93] Dupont WD, Page DL. Risk factors of breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985; 312 (3): 146-151.
- [94] Henderson IC. Risk factors for breast cancer development. *Cancer* 1993; 71 (6 Suppl): 2127-2140.
- [95] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):995-1001.
- [96] Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996 Mar;14(3):303-8.
- [97] Grove DS. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *J biomol Tech* 1999;10:11-6
- [98] Andersen TI. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. *Acta Oncol* 1996; 35 (4): 407-410.

- [99] Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL ve ark. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72 (5): 1117-1130.
- [100] Engin, K.,2005,. *Meme Kanserleri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 55 s*
- [101] Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M ve ark. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69 (1): 119-128.
- [102] Ahmed SR, Badger B, Wright C, Manny A. Role of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) in basal and hormone-stimulated growth by estradiol, prolactin and progesterone in human and rat mammary tumor cells: studies using TGF-alpha and EGF receptor antibodies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 38 (6): 687-693.
- [103] Musgrove EA, Lee CS, Sutherland RL. Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* 1991; 11 (10): 5032-5043.
- [104] Kenney NJ, Dickson RB. Growth factor and sex steroid interactions in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996; 1 (2): 189-198.
- [105] Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000; 100 (1): 113-127.
- [106] Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198 (2-3): 165-184.
- [107] Tan M, Yao J, Yu D. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res* 1997; 57 (6): 1199-1205.
- [108] Iau PT, Macmillan RD, Blamey RW. Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer* 2001; 37 (3): 300-321.
- [109] Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348 (23): 2339-2347.

- [110] Puget , N., Sinilkova , O., Stoppa-Lyonnet , Audouinaud , C., Pages , S., Lynch , H ., Goldgar , D ., Lenoir , G., and Mazoyer , S., 1999 , An Alu- Mediated 6-kb Duplication in the BRCA1 Gene: A new founder mutation? , Am. J. Genet. 64: 1999.
- [111] Lixia, M., Zhijian, C., Chao, S., Chaojiang ,G and Congyi Z., Alternative splicing of breast cancer associated gene BRCA1 from Breast Cancer Cell Line , 2007 Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 1, , pp. 15-21
- [112] Saeki ,H., Siaud ,N., Christ ,N., Wiegant ,W., van Buul, Paul , Han, Mingguang., Zdzienicka ,Malgorzata ., Stark , Jeremy.,and Jasin ,M., Supression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions , PNAS vol .103 8768-8773p
- [113] Orelli , B., Bishop , D., 2001 , BRCA2 and homologous recombination , Breast Cancer Res : 294-298.
- [114] Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nat.Genet., 1996;14:185-187.
- [115] Venkitaraman , A., 2002 , Cancer Susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2 ,Cell , Vol 108 , 171-182
- [116] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.,2002, Molecular Biology Of The Cell, Fourth Edition.
- [117] Abaji , C., Cousineau , I., and Belmaaza , A., 2005 , BRCA2 Regulates homologous recombination in response to DNA damage : Implications for genome stability and carcinogenesis , Cancer Res 65 4117-4125.
- [118] Ayoub, N. And Rajendra,E., 2009,The Carboxyl Terminus of BRCA2 Links the Disassembly of RAD51 Complexes to Mitotic Entry, Current Biology 19, 1075-1085p
- [119] Krawczak , M, Reiss J., Cooper, DN., 1992 , The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. Hum Genet 90:41–54.

- [120] Smith D, Toft D. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11,1993)
- [121] J. P. Zheng, C. Z. Wang, X. X. Wang, H. Y. Wang, H. Zhuang, K. D. Yao, Preparation of biomimetic three-dimensional gelatin/montmorillonite-chitosan scaffold for tissue engineering, *React. Func. Polym.* 2007, 67 (9), 780-788.
- [122] Zheng, L., Li , S., Boyer , T., Lee , W., 2000, Lessons learned from BRCA1 and BRCA2 , *Oncogene* , 6159-6175.
- [123] Anonim,<http://yunus.hacettepe.edu.tr/~coner/GEN/04/PCR.htm>, (Erişim Tarihi,04.05.2014)
- [124] Güler Temizkan, Nazlı Arda. (Ed.) Moleküler Biyolojide kullanılan yöntemler. Genişletilmiş 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, 2004, s.90-120
- [125] Newton C. R. And Graham A. (1994) . ‘‘PCR’’,Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, UK
- [126] Erlich H. A(1990). ‘PCR Technology. Molecular Biology and Biotechnology’ (Edited by Robert A. Meyers), VCH Publishers, USA,641-648
- [127]Anonim,<http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20TR/bolum6.pdf>, (Erişim Tarihi,04.05.2014)
- [128] Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
- [129] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.*PCR Methods Appl.* 1995 Jun;4(6):357-62. Lucotte G, Mercier G. Population Genetics of Factor V Leiden in Europe. *Blood Cells, Molecules and Diseases.* 27(2):362-367,2001
- [130] Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug 11;21(16):3761-6.

- [131] Deligezer U, Akisik E, Dalay N. Gen polimorfizm analizinde light cycler floresan per tekniginin kullanilmasi: Myeloid losemili cocuk ve yetiskin hastalarda MTHFR C677T gen polimorfizm dagihmmm belirlenmesi. Turk Onkoloji Dergisi, Cilt 19, Sayi 4, 2004.
- [132] Womg. M. L. and Medrano J. F. 2005. Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 39(1),75-85
- [133] Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems Journal of Molecular Endocrinology 29, 23–39
- [134] Thompson &Thompson. 2005. Tıbbi Genetik. 6. Baskı. Güneş Kitabevi, 446 sayfa, Ankara
- [135] P. Pershkovich, J. Darlington, O. Sivak, P. P. Constantinides, K. M. Wasan, Inhibition of intestinal absorption of cholesterol by surface-modified nanostructured aluminosilicate compounds, J. Pharm. Sci. 2009,98 (7), 2390-2400.
- [136] J.-T. Li, Y.-L. Zhang, J.-Q. Ma, J. Gao, C.-S. Wang, J. Liu, Y.-X. Cao, Montmorillonite absorbs uric acid and decreases the concentration of uric acid in the serum, 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE 2008, art. no. 4535118, pp. 971-974.
- [137] D.Y. Yu, Z.R. Xu, X.G. Yang, In vitro, in vivo studies of Cu(II)-exchanged montmorillonite for the removal of lead (Pb), Animal Feed Sci. Technol. 2006, 127 (3-4), 327-335.
- [138] Z. Bekçi, Y. Seki, M. K. Yurdakoç, Equilibrium studies for trimethoprim adsorption on montmorillonite KSF, J. Hazard. Mater. 2006,133 (1-3), 233-242
- [139] F. Ohashi, A. Oya, L. Duclaux, F. Beguin, Structural model calculation of antimicrobial and antifungal agents delivered from clay minerals, Appl. Clay Sci. 1998, 12, 435-445.
- [140]] D. Zhao, J. Zhou, N. Liu, Preparation and characterization of Mingguang palygorskite supported with silver and copper for antibacterial behavior, Appl. Clay Sci. 2006, 33, 161-170.

- [141] S. Yariv, Introduction to organo-clay complexes and interactions. In: *Organo-Clay Complexes and Interactions* (S. Yariv, H. Cross (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 39-111.
- [142] M. I. Carretero, Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Appl. Clay Sci.* 2002, 21, 155-163
- [143] Zakir M. O. Rzayev, Mustafa Türk, Ernur A. Söylemez, Bioengineering functional copolymers. XXI. Synthesis of a novel end carboxyl-trithiocarbonate functionalized poly(maleic anhydride) and its interaction with cancer cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2012, 20, 5053-5061.
- [144] Anonim, http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s_liu/Html/Introduction.htm (Erişim tarihi:17.05.2014)
- [145] Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri ve Mide Kanserinde VEGF Düzeylerine Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2010
- [146] Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W., 1997, A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 272, 179, 07-11.
- [147] Anonim, http://old.tkd.org.tr/pages.asp?pg=:dergi/dergi_content&plng=tur&id=1643&dosya=159 (Erişim tarihi 17.05.2014)
- [148] Anonim, <http://www.dkfz.de/gpcf/lightcycler480.html> (Erişim tarihi 17.05.2014)
- [149] Powell S., Kachnic L., 2003, Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation, *Oncogene*, 5784-5791
- [150] Anonim, <http://www.dnavisio.com/taqman-genotyping-assays.php> (Erişim tarihi 17.05.2014)

[151]Anonim, <http://www.diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm>, (Erişim tarihi 17.05.2014)