T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİMOKİNON'UN MEME KANSERİ HÜCRESİNE ETKİSİ

Hakan VATANSEV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2014

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİMOKİNON'UN MEME KANSERİ HÜCRESİNE ETKİSİ

Hakan VATANSEV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202045 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren danışmanım Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda katkıda bulunan ve ilgisini esirgemeyen; Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ali ÜNLÜ, hayatım boyunca maddi ve manevi desteğiyle yanımda olan ve çalışmalarıma yaptığı katkıları için de Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e, çok teşekkür ederim.

Eğitimim esnasında bana destek ve emek veren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyesi hocalarıma, araştırma görevlilerine, özellikle laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Uzm. Dr. Fikret AKYÜREK, Arş. Gör. Emine Nedime KORUCU, Yük. Biyolog Gülsüm TEKİN, Biyolog Yasemin KAHVECİ, Biyolog Hatice Müge SAMANCI DURSUN'a, sonuçların değerlendirilmesine katkıda bulunan Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ ile Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA'ya ve tüm Tıbbi Biyokimya çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman olduğu gibi bu süreçte de moral ve motivasyon sağlayan başta annem, babam ve eşim olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... İ

İÇİNDEKİLER ..... İİ

SİMGELER ve KISALTMALAR V

ÇİZELGE ve ŞEKİL DİZİNİ ..... İX

1. GİRİŞ 1

1.1. Kanser 4

1.2. Hücre Siklusu 5

1.2.1. Hücre Siklusunun Fazları 6

1.3. Apopitoz 7

1.4. Onkogenler 9

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler 9

1.6. Meme Kanseri 10

1.6.1. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler 11

1.6.1.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri 11

1.6.1.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler 12

1.6.1.3. Steroid Reseptörleri 12

1.6.1.4. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler 13

1.6.1.5. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri 14

1.6.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri 14

1.6.3. Klinikte Meme Kanseri 15

1.6.4. Meme Kanseri Tedavisi 16

1.7. *Nigella sativa* (Çörek otu) 17

1.7.1. *Nigella sativa*'nın Kimyasal Bileşimi 18

1.8. Timokinon (TQ) 18

1.8.1. Antioksidan Etkisi 19

1.8.2. Antimikrobiyal Etkisi 20

1.8.3. Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi 20

1.8.4. Analjezik ve Antiinflamatuar Etkisi 21

1.8.5. Antidiyabetik Etkisi 21
1.8.6. Antiallerjik Etkisi 22
1.8.7. Sindirim Sistemine Etkisi 22
1.8.8. Sinir Sistemine Etkisi 22
1.8.9. Solunum Sistemine Etkisi 23
1.8.10. Üriner Sisteme Etkisi 23
1.8.11. İmmün Sisteme Etkisi 23
1.8.12. Karaciğer Koruyucu Etkisi 24
1.8.13. Dolaşım Sistemine Etkisi 24
1.8.14. Kemikler Üzerine Etkisi 24
1.8.15. Antihiperlipidemik ve Antihiperkolesterolemik Etkisi 25
1.9. Kanser Hücrelerinin Enerji Metabolizması 25
2. GEREÇ ve YÖNTEM 29
2.1. Gereçler 29
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 29
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri 30
2.2.Metod 31
2.2.1. Hücre Kültürü 31
2.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi 32
2.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi 33
2.2.4. TQ'un MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi 34
2.2.5. Hücrelerin ATP, ADP ve AMP Ölçümüne Hazırlanması 34
2.2.6. Hücrelerin Protein Analizi 35
2.2.7. Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi 36
2.3. İstatistik Analizleri 39
3. BULGULAR 40
3.1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu 40
3.2. TQ'un MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi 41
3.3. TQ'un IC_{50} Değerinin Belirlenmesi 43
3.4. Hücrelerin Protein Analizi Sonuçları 44
3.5. Hücrelerin ATP, ADP, AMP Ölçümü Sonuçları 44
4. TARTIŞMA 48

5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... 58

6. ÖZET..... 59

7. SUMMARY 60

8. KAYNAKLAR 61

9. EKLER..... 74

EK. A Etik Kurul Kararı

10. ÖZGEÇMİŞ..... 75

SİMGELER ve KISALTMALAR

143B	Malign kanser hücre serisi
518A2	Melanoma kanser hücre serisi
6-MP	6-merkaptopurin
ADP	Adenozin difosfat
AEC	Adenilat enerji şarjı
Akt	Protein kinaz
α-Tomatin	Steroid yapılı bir glikoalkoloid
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
ARDS	Akut solunum sıkıntısı sendromu
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni
BRCA2	Meme kanserine yatkınlık geni
BSA	Bovin Serum Albumin
BT-474	Meme kanseri hücre serisi
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CerbB-2 (Her2/neu)	Büyüme faktörü reseptörü
COX	Siklooksijenaz
CsA	Siklosporin A
DCIS	İnvaziv olmayan duktal karsinom
DIM	Di-indol metan
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle vasatı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOX	Doksorubisin
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Bovin Serum
GTP9	Guanozin trifosfat dokuz
GTPaz	Guanozin trifosfataz
Gy	Gray

H_2O_2	Hidrojen peroksit
HaCaT	Malign olmayan meme kanseri hücresi
HCT-16	Kolon kanseri hücre serisi
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HeLa	Serviks kanseri hücre serisi
Hep G2	Karaciğer kanseri hücre serisi
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HF	İnsan deri fibroblast hücre serisi
HL-60	Lösemi hücre serisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi
HS-1793	Resveratrol türevi bir madde
HT-29	Kolon kanseri hücre serisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC_{50}	Inhibition concentration fifty
IDC	İnvaziv duktal karsinom
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
IR	İyonize radyasyon
İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KBM-5	Lösemi hücre serisi
KB-V1 / Vbl	Serviks kanseri hücre serisi
KCI	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
LCIS	İnvaziv olmayan lobüler karsinom
LDH	Laktat Dehidrojenaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LNM35	Akciğer kanseri hücre serisi
LO	Lipooksijenaz
LP	Lipozom
LT	Lökotrien
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MCF-7 / Topo	Meme kanseri hücre serisi
MCF-7	Meme kanseri hücre serisi
MDA-MB-231	Meme kanseri hücre serisi

MDA-MB-435	Meme kanseri hücre serisi
MDA-MB-435s	Meme kanseri hücre serisi
MDA-MB-468	Meme kanseri hücre serisi
MMP-9	Matriks metalloproteinaz 9
mRNA	Mesajcı RNA
μM	Mikromolar
MTT	Toksisite değerlendirme metodu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
NaOH	Sodyum hidroksit
NB4	Lösemi hücre serisi
NCI	Uluslararası Kanser Enstitüsü
NCI-H23	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre serisi
NCI-H460	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre serisi
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NIH/3T3	Malign olmayan meme kanseri hücresi
NP	Nanopartikül
NQO1	NADPH kinon oksidoredüktaz bir
O_2^-	Süperoksit anyon radikali
OH	Hidroksil radikali
P1	Pürinoseptör
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PC-3	Prostat kanseri hücre serisi
PEG	Polietilen glikol
PG	Prostoglandin
PI3K	Fosfo inositid-3 kinaz
PLF	Periodontal doku fibroblast hücre serisi
PLGA	Poli laktik ko-glikolik asit
PPAR	Peroksizom çoğaltıcısı ile uyarılan reseptör
PR	Progesteron Reseptörü
PSG	Penisillin streptomycin glutamin
PTEN	Tümör baskılayıcı gen
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribo Nükleik Asit

ROS	Reaktif oksijen türleri
STZ	Streptozotosin
T-47D	Meme kanseri hücre serisi
TAM	Tamoksifen
TCA	Tümör kemo-duyarlılık testi
TG	Trigliserit
TK	Total kolesterol
TNF	Tümör nekroz faktörü
TQ	Timokinon
TQRF	Yüksek fraksiyonlu timokinon
U266	Melanoma kanser hücre serisi
U937	Lösemi hücre serisi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WST	Toksisite değerlendirme metodu
XIAP	Antiapoptotik gen
XTT	Toksisite değerlendirme metodu
Zol	Zoledronik asit

ÇİZELGE ve ŞEKİL DİZİNİ

Çizelge 2.1. ATP-ADP-AMP çalışması için HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri 37

Çizelge 3.1. TQ doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırılması 42

Çizelge 3.2. Grupların 64. saate göre yüzde değişim miktarları 43

Çizelge 3.3. TQ'un farklı zamanlarda enerji düzeyine etkisinin karşılaştırılması 45

Şekil 1.1. Hücre siklusu 6

Şekil 1.2. *Nigella sativa*'nın temel bileşenleri 19

Şekil 2.1. Elektronik sensör analizörü, cihaz ve E-plate 16 32

Şekil 2.2. Hücrelerin elektrik empedansının ölçümü 33

Şekil 2.3. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi 36

Şekil 2.4. ATP'nin standart ve doğrusallık eğrisi 38

Şekil 2.5. ADP'nin standart ve doğrusallık eğrisi 38

Şekil 2.6. AMP'nin standart ve doğrusallık eğrisi 39

Şekil 2.7. 100 µM ATP, ADP ve AMP mix standardının kromotogramı 39

Şekil 3.1. Farklı sayılardaki MCF-7 hücrelerinin 152 saatlik büyüme eğrileri 40

Şekil 3.2. TQ'un MCF-7 hücrelerine 152 saat boyunca etkisi 41

Şekil 3.3. TQ için IC_{50} Değerinin Belirlenmesi 43

Şekil.3.4. Kontrol gruplarının ATP, ADP, AMP düzeyleri 46

Şekil 3.5. TQ gruplarının ATP, ADP, AMP düzeyleri 46

Şekil 3.6. Kontrol ve TQ gruplarının enerji düzeyleri 47

Şekil 3.7. Kontrol ve TQ gruplarının enerji yükü 47

1. GİRİŞ

Meme kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, kadınlarda çok yaygın görülen bir kanser türüdür. Erkeklerde meme kanseri çok nadir olup, tüm meme kanserlerinin %1'den azı erkeklerde görülür. Dünya genelinde kanserden ölüm sebepleri arasında meme kanseri; tüm cinsiyetlerde, akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (Giordano ve ark 2004, Jemal ve ark 2009). Dünyada her yıl bir milyon kadına meme kanseri tanısı konulduğu ve 410.000 kadının bu hastalık nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmektedir (Montazeri 2008). GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakasının geliştiği ve en çok tanı konulan kanserlerin sırasıyla akciğer kanseri (%13,0) ve meme kanseri (%11,9) olduğu belirtilmiştir (Cancer 2013).

Sosyoekonomik ve sosyokültürel yönden birbirinden farklı toplumlarda gözlemlenen meme kanseri verileri karşılaştırıldığında birbirinden farklı insidans ve mortalite değerleri ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri insidansının gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek, meme kanserinden ölümün ise gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha düşük olması dikkat çekicidir. Bu durum az gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınların meme kanseri teşhis, tarama ve tedavi hizmetlerine ulaşmaktaki zorluklardan kaynaklandığını göstermiştir. Bu yüzden, özellikle az gelişmiş ülkelerde meme kanserinin erken teşhis, tarama ve tedavisine yönelik çabaların arttırılması son derece önemlidir (Colditz ve ark 2006).

İnsanlarda meme kanserinin nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Meme kanseri genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü etkileşimin olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda meme kanseri etyolojisinde; endokrin etkenler (östrojen ve progesteron hormon konsantrasyonu ve metabolizması), endokrin dışı etkenler (iyonize radyasyon, alkol, sigara, metaller, kozmik radyasyon, elektromanyetik alanlar, organik çözeltiler ve virüs gibi biyolojik ajanlar), davranışsal faktörler (stres, depresyon), genetik yatkınlık, tanımlanmış meme patolojileri, endojen hormonal faktörler (erken menarş, geç menapoz, çocuk doğurmak, laktasyon/emzirme, indüklenmiş abortus ve düşük), eksojen hormonal faktörler (oral kontraseptifler, östrojen replasman tedavisi), obezite, beslenme alışkanlıkları tanımlanmıştır (Colak ve ark 2005).

Epidemiyolojik çalışmalar, beslenme faktörleri ile ilişkili kanser türleri arasında mide, kolon, meme ve prostat kanserlerine karşı yakalanma riskini minimize etmek adına hayvansal gıdalar yerine lifçe zengin, mineral ve vitamin içeriği yüksek bitkisel gıdaların daha çok tüketilmesinin, yeterli ve dengeli beslenmenin son derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Moorman ve Terry 2004).

Günümüzde insan sağlığının korunması amacıyla kullanılan ilaçların ve kimyasal maddelerin risk oluşturması nedeniyle tıp, gıda ve çevre alanlarında yapılan araştırmaların çoğu hem hastalıkların tedavisinde hem de koruyucu hekimlikte bitkisel ürünlerin önemini ortaya koymaktadır (Dattner 2003).

Çörek otu tohumu ve tohumundan elde edilen preparatlar eskiden olduğu gibi günümüzde de hala Uzakdoğu ve bazı Asya ülkelerinde halk hekimliğinde, soğuk algınlığı, baş ağrısı, astım, gaz giderici, idrar söktürücü, sarılık, çeşitli romatizma ve iltihap hastalıkları ve benzeri pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Ghamdi 2001). Yapılan çalışmalar çörekotu tohumu ve bileşenlerinin antikanserojenik (Kaseb ve ark 2007), antitümöral (Badary 1999), antibakteriyel (Halawani 2009), antioksidan (Burits ve Bucar 2000), antiinflamatuar ve analjezik (El-Dakhakhny ve ark 2002), antiülserojenik (Kanter ve ark 2005), antidiyabetik (Pari ve Sankaranarayanan 2009), bağışıklık sistemini güçlendirici (Salem 2005) etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Yapılan araştırmalarda antiproliferatif, antioksidan bir madde olan ve kanser hücrelerinde apopitozu indüklemesi yönüyle dikkat çeken timokinon'un (TQ), meme ve over adenokarsinomu (Shoieb ve ark 2003), kolorektal kanser (Gali-Muhtasib ve ark 2004a), neoplastik keratinositler (Gali-Muhtasib ve ark 2004b), insan osteosarkomu (Roepke 2007), fibrosarkoma, akciğer karsinomu, prostat kanseri (Kaseb ve ark 2007) gibi pek çok kanser türlerinde de kanserli hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki gösterdiğini ortaya konmaktadır.

Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkması veya ilavesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan, organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir (Baykal ve ark 2002). Serbest radikaller, söz konusu eşleşmemiş elektronları nedeniyle oldukça kararsız bir yapı gösterirler ve lipid, protein veya

karbonhidrat gibi moleküllerle, hücre hasarına sebep olacak şekilde etkileşerek kararlı yapı kazanmak isterler. Oksijen içeren herhangi bir serbest radikal, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak anılır. En yaygın reaktif oksijen türleri süperoksit anyon radikali (O_2^{-}) ve hidroksil radikalidir (OH^{-}). Antioksidanlar, radikal oluşumunu önleme, oluşan radikalleri ortamdan uzaklaştırma, hasar gören molekülleri onarma ve temizleme gibi görevleri olan moleküllerdir. TQ'un süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri de dahil olmak üzere çeşitli oksijen türleri üzerinde radikal temizleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (Badary ve ark 2003).

Pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma ile *Nigella sativa* tohumlarının ve aktif bileşenlerinin antitümör etkileri gösterilmiştir. *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağının etkileri, insanlarda görülen farklı kanserler üzerinde araştırılmış ve yağın bazılarına karşı sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Buna örnek olarak; MCF-7 meme kanseri hücrelerinin *Nigella sativa*'nın sulu ve alkollü ekstraktlarının tek başına veya hidrojen peroksit (H_2O_2) ile birlikte muamele edilmesiyle, kanser hücre proliferasyonunu durduğu gösterilmiştir (Swamy ve Tan 2000). TQ ve ditimokinon, sitotoksik etkisini, hücre G1 fazında iken apopitozu (programlanmış hücre ölümü) tetikleyerek durdurmaktadır. Hücre büyümesinin durdurulması ise p53'ün gen ekspresyonu ile protein ekspresyonunun arttırılması ve antiapoptotik Bcl-2 proteininin inhibe edilmesi ile sağlanmaktadır (Gali-Muhtasib ve ark 2004a). TQ'un üç temel mekanizmayla antitümör etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bunlar apopitoz, anjiogenez inhibisyonu ve hücre döngüsünün durdurulmasıdır (Abukhader 2013).

Çalışmamızın amacı; literatürde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, antiproliferatif, antitümör ve antioksidan etkinliği ortaya konan TQ'un insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisini eş zamanlı araştırmaktır. Çalışmamızda hücre kültürü laboratuvarında, TQ'un farklı konsantrasyon ve sürelerde MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna etkisini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle ortaya koymak ve bu hücrelerin ATP, ADP, AMP düzeylerini ile toplam enerji yüklerini tespit ederek enerji düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisite için pek çok manipülasyon içeren, son nokta ölçüm yapan ve optik tabanlı analiz yöntemleri olduğu için de

bileşik girişimine imkan sağlayan birçok yöntem vardır. Gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi, hücresel olayları hücre kültürü e-plate'lerinin zeminine yerleştirilmiş mikro elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçerek hiçbir işaretleme yapmadan gerçek zamanlı olarak analiz edebilmektedir. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir. Gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemleri ile son nokta metodlarıyla elde edilmesi mümkün olmayan bir veri elde edilebilmektedir. Biz de bu nedenle analizlerimizde TQ'un etkilerini görmek açısından gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemini kullandık.

Çörek otu tohumlarının TQ içeriği yönünden faydalı oldukları ve özellikle kanser riskine karşı TQ'un etkili bir bitkisel bileşik olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, TQ'un ortaya konulmuş olumlu etkilerini desteklerse, kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak TQ'un önemi vurgulanacaktır. Sonuçların daha sonraki çalışmalara doz ve zaman bağımlılığı açısından yön vermesi ve ışık tutması beklenmektedir.

1.1. Kanser

Kanser, vücuttaki bir hücre veya hücre grubunun iç ve dış etkilerle farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu meydana gelmektedir. Kanser hücreleri, komşu normal hücrelere göre daha hızlı çoğalırlar. Normal hücrelerin bölünmesi belli bir zaman sonra dururken, kanserli hücrelerin bölünmesi hiçbir zaman durmaz. Bulundukları yerden başka bölgelere kan veya lenf damarları ile taşınarak metastaz oluştururlar (Hanahan ve Weinberg 2000). Normal hücrelerde hücre çoğalması ile apopitoza bağlı hücre kayıpları arasında uyumlu bir denge vardır. Kanserli hücrelerde bu denge bozularak kontrol mekanizması kaybolur (Ruddon 2007). Vücudun değişik yerlerine taşınan kanserli hücreler invazyon yaparak organizma organlarına zarar verirler. Taşındıkları yerlerde kanserli hücreler büyüdükçe tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler (Ringer ve Schniper 2000).

Malign tümörler genelde doğrudan yayılma, lenfatik ve kan dolaşım sistemleri yoluyla metastaz kabiliyetlerinden dolayı kötü bir prognoza sahiptir

(Croce 2008).

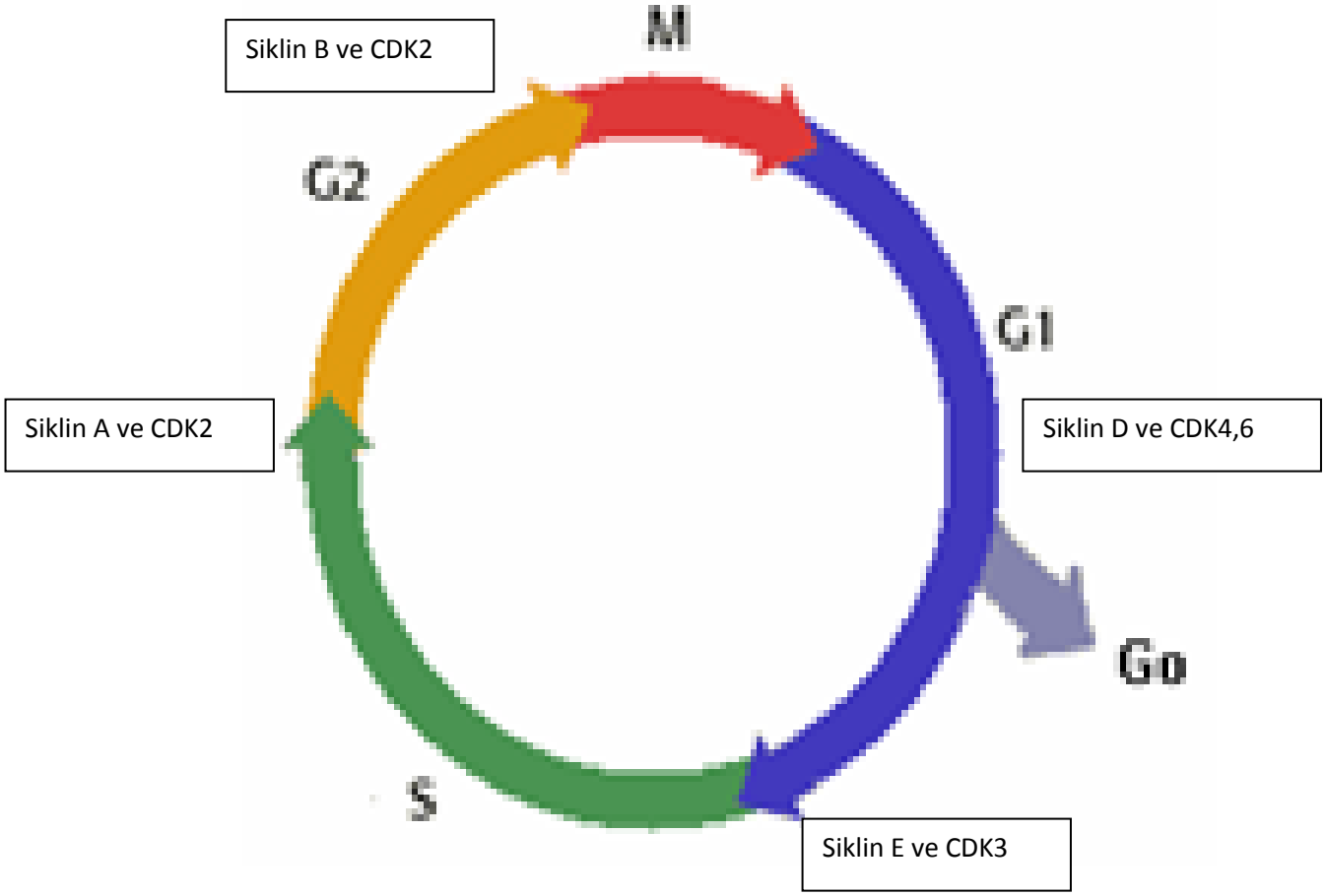
Tümör hücreleri kendi proliferasyonlarını uyarabilme kabiliyetine sahip olup, bu kabiliyetlerini kendi büyüme hormonlarını sentezleyerek sağlarlar. Tümör hücreleri daha az yapışkan olup hücre dışı yüzeyle etkileşime girmeden alt alta ya da üst üste büyürler. Belirli bir yoğunluğa ulaşan normal hücrelerin proliferasyonu durabilirken, tümör hücrelerinin proliferasyonu durmaksızın devam edebilir (Aydıner ve ark 2000).

1.2. Hücre Siklusu

Hücre siklusu, bütün ökaryotik organizmalarda temel olarak aynı olan hücre büyümesi ve proliferasyonu programıdır. Ökaryotik bir hücrenin siklusu 4 faza ayrılır. Bunlar G1, S, G2 ve M fazlarıdır. (Şekil 1.1.) Siklus, bazı iç ve dış büyüme faktörlerince düzenlenir. Hücreyi bölünmeye sevk eden çeşitli biyokimyasal sinyaller mevcut olup bu sinyaller vasıtasıyla siklusa giren bir hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre siklusu süresince bazı onkogen ve hücre siklusuna özgü proteinler eş zamanlı olarak aktif ve inaktif hale gelir (Vermeulen ve ark 2003).

Hücre siklusunun ilerlemesi ve hücre çoğalması, büyüme kontrol genleri vasıtasıyla gerçekleşir. Hücre siklusunda, hücre G0 fazında olabilir ya da hücre uyarılarak büyüme meydana gelir. Hücre siklusunda bazı önemli kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktaları, siklusun daha önceki evrelerinde tamamlanması gereken olaylar tamamlanmamışsa bu noktalarda hücre siklusu durdurularak önceki işlemin tamamlanması sağlanır. En belirgin kontrol noktaları; G1 fazından S fazına geçerken, G2 fazından M fazına geçerken ve mitozun metafaz safhasındakilerdir. Bu kontrol noktalarında siklusa özgü proteinler olan siklin (düzenleyici alt birim) ve siklin bağımlı-kinazlar (katalitik alt birim) rol almaktadır. Siklin-bağımlı kinazlar tek başına inaktif olup siklinler ile birleştiklerinde aktif hale gelir. Siklinler bu aktivasyonu sağlayan spesifik proteinlerdir. Siklinler siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar (Alberts ve ark 2002).

Hücre siklusu bölünmenin yanı sıra, farklılaşma ve apopitoz gibi temel hücresel fonksiyonları da düzenlemektedir. Hücre siklusunun düzenlenmesini ve kontrolünü sağlayan birçok kompleks mekanizma vardır. Hücre siklusu kontrol noktalarındaki değişimler ile hücre siklusunun düzenlenmesinde oluşabilecek hatalar kontrolsüz hücre büyümesine yol açabilir. Bu olumsuz durum kansere neden olabilir. Nitekim kanserlerde hücre siklusunun düzenleyici proteinlerinin düzeylerinde anormallikler saptanmaktadır (Sherr 1996, Zieske 2000).



Şekil 1.1. Hücre siklusu
(http://www.belgeci.com/mitoz-bolunme.html).

1.2.1. Hücre Siklusunun Fazları

Hücreler, interfaz boyunca sabit bir hızla büyür. İki mitoz arasında geçen süre ile bölünen hücrelerin iki katına çıkma süresi aynıdır.

G1 fazı (ara faz, interfaz), mitoz ve DNA replikasyonu arasındaki fazdır. Bu evrede hücreler boyutlarını artırırlar, RNA üretirler, protein ve ATP sentezlerler. G1

fazı boyunca kromozomlar prereplikasyon komplekslerini oluşturmak üzere modifiye olurlar. Yapısal proteinler, ribozomlar, membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elemanın sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılır.

S fazında (sentez fazı), RNA sentezi G1'deki gibi devam etmekteyken, protein sentezi ise en yüksek seviyeye ulaşır. DNA replikasyonu yoluyla, her kromozomun kopyası yapılarak kromozom sayısının ikiye katlanması sağlanır.

G2 fazında, DNA iplikçikleri kısalır, boyanabilir-iyi görünen kromozomlar oluşarak DNA sentezi tamamlanır ve hücre büyümeye, yeni proteinler sentezlemeye devam eder. Bu evrede bu fazın sonundaki diğer bir kontrol noktası olan G2 kontrol noktasında hücrenin mitoza girmeye ve bölünmeye hazır olup olmadığı kontrol edilir.

M fazında (mitoz fazı), protein ve RNA sentezi yavaşlar. Ana hücreden diploid sayıda kromozom içeriği olan iki yeni yavru hücre oluşur. Oluşan yeni hücrelerin genetik materyali ana hücrenin aynısıdır. Hücre bu dönemden sonra ya tekrar bölünmeye girmek üzere hazırlık yapmak için G1 fazına girer ya da dinlenme fazı olan G0'da kalarak canlılığını devam ettirir.

G0 fazında, hücreler canlılığını devam ettirir ve genellikle spesifik bir işlev görmek üzere programlanırlar (Vinay ve ark 2004).

Meme kanserlerinde siklin-D1 ve siklin-E'nin %30 oranında aşırı üretimi saptanmış ve bu siklinlerin prognostik faktör olabilecekleri ileri sürülmüştür (Keyomarsi ve ark 1995, Zukerberg ve ark 1995).

1.3. Apopitoz

Apopitoz Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan bir terim olup hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak ilk kez 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Apopitoz terimi ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından 1972 yılında kullanılmıştır (Kerr ve ark 1972).

Apopitoz organizmada görevini tamamlamış ya da hasara uğramış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümüdür (Vinay ve ark 2004). Apopitoz, birtakım genetik faktörler ya da hücre dışı lezyonlar ile aktive edilen ve hücre tarafından programlanmış bir mekanizma ile hücre ölümünü kontrol eden bir işlemdir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Doğadaki birçok canlının embriyo döneminden yaşlanıp ölünceye kadar yaşam süreçlerinde görülen sayısız biyolojik olayların ve hastalıkların ortaya çıkma mekanizmalarında, herhangi bir nedenle stabilitesi bozularak, artık organizma için zararlı hale gelen hücrelerin yok oluş evrelerinde apopitoz çok büyük önem taşır.

Apopitoz, intrensek ve ekstrensek yollarla uyarılır. Her iki yolda da kaspazlar aktive olur. Ekstrensek yol, "ölüm reseptörleri" adı verilen hücre yüzey reseptörlerine spesifik ölüm ligandlarının (death ligand) bağlanması sonucu aktifleşir. Ölüm reseptörleri, "Tümör Nekroz Faktörü/Sinir Büyüme Faktörü", (TNF/NGF) reseptör süper ailesine ait olan hücre yüzey sitokin reseptörleridir (Thorburn 2004, Guicciardi ve Gores 2009). İntrensek yol ise, mitokondrinin anahtar rol üstlendiği bir yoldur. DNA hasarı, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, serbest radikaller ve viral enfeksiyonlar mitokondriyal merkezli apopitozu indükleyen tetikleyiciler olup, bu tetikleyiciler reseptör aracılı değildirler. İntrensek yolun işleyişi, proapopitotik ve antiapopitotik proteinler tarafından düzenlenir. Mitokondriden sitoplazmaya salınan proapopitotik bir protein olan sitokrom C, apopitozun başlamasını ve sonlanmasını kontrol eden en önemli proteindir (Wang 2001, Campello ve Scorrano 2010).

Kaspazlar, apopitoz sürecinin başlatılmasından sonlandırılmasına kadar her basamağında anahtar rol oynayan sistein proteazlardır (Chang ve Yang 2000). Memelilerde tanımlanmış olan 14 farklı kaspaz vardır. Bunların 11 tanesi insanlarda bulunan kaspazlardır ve bunlardan 7 tanesi apopitozda görevlidir. Apopitotik kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve sonlandırıcı kaspazlar olarak iki gruba ayrılır. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10) apopitozun başlatılmasından, sonlandırıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ise apopitotik sürecin sonlandırılmasından sorumludur (Riedl ve Shi 2004).

Hücre ölümünün diğer bir şekli ise nekrozdur. Nekroz, hücrenin kendi içinde gerçekleşen olaylardan ziyade, dış faktörler sonucu olumsuz şartlarda ortaya çıkar. Nekroz, eş zamanlı gerçekleşen iki olaydan kaynaklanır. Bunlar hücrenin enzimatik sindirimi ve protein denatürasyonu olaylarıdır (Vinay ve ark 2004, Altunkaynak ve Özbek 2008).

1.4. Onkogenler

Hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü olan apopitoz için aldıkları iletileri hücre membranından başlamak üzere çekirdeğe kadar sürdürdükleri sinyal ileti mekanizmasında işlev gören birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genlere "protoonkogen" denir. Protoonkogenler, hücre büyüme ve proliferasyonu olaylarının başlamasında temel rolü oynayan; hücre bölünmesini uyaran veya inhibe eden veya özelleşmiş hücreye farklılaşmasını başlatan proteinleri kodlar (Yokuş ve Çakır 2012). Bu protoonkogenler herhangi bir nedenle mutasyona uğrarlarsa normal hücre kanser hücresine dönüşebilir. Bu dönüşümü sağlayan genlere de "onkogen" denir (Vogelstein ve Kinzler 2004).

Ras geni: Ras proteinleri, monomerik Guanozin 3 fosfat (GTP9) bağlayan, hücre bölünmesini, hücre farklılaşmasını, hücre içi protein taşınmasını, büyüme faktörü sinyal iletimini sağlayan genel de inaktif halde olan GTPaz'lardır (Takai ve ark 2001). Ras genlerindeki mutasyonlar, tüm insan kanserlerinin %30'unda görülmekte olup nokta mutasyonu ile aktivasyonun en önemli şekilleridir (Schubbert ve ark 2007).

Fosfoinositid-3 kinaz (PI-3K) geni: İnsan kanserlerinin çoğunda kontrolsüz olarak aktivite gösterir. Apopitozu baskılayarak tümör hücrelerinin proliferasyonu, migrasyon ve invazyon, tümör büyümesi gibi karsinogenezde çok önemli yeri olan basamakların devam etmesinde rol oynayan moleküllerin aktivitelerini düzenler (Engelman 2009, Baselga 2011).

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini düzenleyerek, tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler, büyüme inhibitör yolunun değişik bileşenlerini kodlamaktadır. Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin, birinde veya birkaçındaki mutasyon tümör oluşumuna neden olmaktadır (Vermeulen ve ark 2003, Yokuş ve Çakır 2012).

Rb geni: Retinoblastoma (Rb) geni hücre siklusunun G1/S kontrol noktasında aktivite gösteren bir gen olup hücre siklusunu G1 fazında inhibe eder. Rb geni aktif olduğunda tümör gelişmez. Büyüme uyarısı, hücreden büyüme faktörlerinin salınımı ile başlar. Büyüme faktörleri hücre zarında tirozin kinaz reseptörlerine bağlanır ve sinyaller sitoplazma proteinlerine iletilir. Bu sinyaller çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin salınımına ve hücrenin hücre siklusuna girmesini sağlar (Compagni ve Christofori 2000, Cabadak 2008).

p53 geni: Bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan p53, DNA hasarı, onkogen aktivasyonu gibi hücrede meydana gelen birçok bozukluk sonrası aktive edilerek hasarlı hücrenin prolifere olup, yayılımını engelleyecek olan gen ekspresyon programını başlatmaktadır (Latonen ve Laiho 2005). Apopitoz'un kontrolü, hücre döngüsünün düzenlenmesi, büyümenin durdurulması, hücre siklusunun inhibisyonu, hücresel strese yanıt olarak farklılaşma, tümör anjiogenezinin kontrolü ve hızlandırılmış DNA tamirinde yer alan birçok genin regülasyonu gibi birçok önemli görevi vardır (Osborne ve Brooks 2006). Tüm kanserler arasında en sık mutasyona uğrayan gendir. p53 genindeki mutasyonlar, insan kanserlerinin %50-55' nin oluşum etkenidir (Hanazono ve ark 2006).

1.6. Meme Kanseri

Meme kanseri, bütün dünyada kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türüdür. Erkeklerde meme kanseri çok nadir olup, tüm meme kanserlerinin %1'den azı erkeklerde görülür. Görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında da ikinci sırada yer almaktadır (Aslan ve ark 2007, Yarbro ve ark 2010). Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) 2000-2004 verilerine göre her sekiz kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri

gelişebileceği ve her 30 kadından birinin meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (Curado ve ark 2007). IARC online güncel veri tabanı olan GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya'da en çok tanı konulan kanserler; akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) olduğu belirtilmiştir (Cancer 2013). Ülkemizdeki duruma bakıldığında ise, sağlık bakanlığı istatistiklerine göre tüm kanser türleri arasında meme kanseri görülme oranının %24 olduğu ve kadınlarda daha yaygın görüldüğü bildirilmektedir. Ülkemizde mevcut verilere göre meme kanseri görülme sıklığının, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında olduğu tahmin edilmektedir (Özmen ve ark 2009, Somunoğlu 2009).

Meme, süt bezleri ve üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşur. Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle gelişmektedir. Meme kanserleri, kanser hücrelerinin lokalize olduğu yere veya yayılma eğilimlerine göre sınıflandırılabilirler. Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir. Eğer kanser hücreleri kaynaklandıkları yerle sınırlı kalırlarsa in situ, yayılma eğilimi gösterirlerse invaziv meme kanseri olarak adlandırılırlar. Meme kanseri metastazları akciğer, kemik, lenf nodu ve beyinde ortaya çıkmaktadırlar (Society 2007).

1.6.1. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Meme kanseri, hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok aşamalı uzun bir süreçte ortaya çıkar. Kanser oluşumunda rol oynayan önemli onkogen ve tümör baskılayıcı genler vardır. Bu iki gen grubu kanser oluşumunda birbirine zıt etki gösterirler. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde görev alan genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerlerken onkogenler, malign dönüşümüne neden olur. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (Osborne ve ark 2004, Öztürk 2006). Hem sağlıklı hem de kanserli meme dokularında en fazla görülen ve etkili olduğu düşünülen onkogenler Ras, Myc,

CerbB-2 olarak söylenebilir (Klijn ve ark 1992, Winer ve ark 2001). Tümör baskılayıcı genlerden ise en çok p53 üzerinde durulmaktadır (Reed ve ark 2000).

1.6.1.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri

CerbB-2 (HER2/Neu): HER2 reseptörleri hücre içindeki sinyal iletim yollarını etkinleştirerek hücrenin farklılaşmasına ve çoğalmasına neden olurlar. Meme kanseri için prediktif ve prognostik öneme sahip bir molekül grubudur. Bu gen, tümör gelişimi ve ilerlemesi ile yakından ilgili olup bu genin amplifikasyonu klinik olarak son derece önemlidir (Öztürk 2006, Atalay 2010).

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz aktivitesine sahip erbB hücre reseptör grubunun üyesidir. Bu reseptörler, hücre dışında ligand bağlanma parçası ve hücre içi tirozin kinaz parçası olan trans membran glikoproteinlerdir. EGFR ailesi HER2, HER3 ve HER4 alt gruplarından oluşur. Epidermal büyüme faktörünün reseptörüne bağlanmasıyla epidermal büyüme faktörü hücre içine alınır. Bunun akabinde nukleustaki transkripsiyon faktörleri aktive olarak hücre bölünmesi uyarılır. EGFR, onkogenik herhangi bir mutasyona uğrarsa kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile birlikte tümör oluşumu gerçekleşebilir. EGFR' nün fizyolojik olmayan bu aktivasyonu meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde karşımıza çıkmaktadır (Kılıç 2012).

1.6.1.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler

Meme kanserinde c-jun, c-myc ve c-fos genleri ile östrojen ve progesteron protoonkogenlerinin indüklendiği bildirilmiştir (Van der Burg ve ark 1992).

c-Myc: Bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apopitozda düzenleyici olarak görev yapan bir fosfoproteindir (Adhikary ve Eilers 2005). Hücre proliferasyonuyla birlikte RNA, protein sentezi, ve enerji metabolizması üzerinde düzenleyici görevleri bulunmaktadır. Hücre büyümesinin kontrolünde c-Myc proteininin bu düzenleyici özellikleri göz önüne alındığında mRNA ya da protein düzeyindeki çok küçük bir değişim hücrede istenmeyen değişikliklere neden olmaktadır. c-Myc geninin yapısındaki değişiklikler veya aşırı

üretiminin meme kanserine neden olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla c-Myc aktivitesi çok sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (Chung ve Levens 2005, Grandori ve ark 2005).

1.6.1.3. Steroid Reseptörleri

Östrojen reseptörü (ÖR) ve Progesteron reseptörü (PR), nükleer hormon reseptör ailesine bağlı gen düzenlenmesinde görev alan reseptörlerdir. Hücre sitozolünde bulunurlar ve ligand-bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak çalışırlar. ÖR' nün, ÖR-α ve ÖR-β şeklinde iki izoformu tanımlanmıştır. Bunlar pek çok açıdan benzeseler de, transkripsiyon özellikleri açısından farklıdırlar. ÖR-α, meme karsinogenezinde son derece önemli olup aşırı üretimi meme kanserli hastalarda prognostik ve prediktif bir faktördür. ÖR-β'nın genetik olarak ekspresyon düzeyi tam olarak aydınlatılamadığından prognostik değeri yeterince tanımlanamamıştır. PR ise ligand yokluğunda transkripsiyonel olarak inaktif olup ligandın bağlanması ile monomerik reseptör yapısal değişikliğe uğrar ve aktive olur. PR'nin meme dokusunda üç ana izoformu vardır. İnvazif meme karsinomlarının büyük çoğunluğunda PR-A ve PR-B reseptörü saptanmıştır. Ayrıca ÖR-α ve PR'ü içeren meme tümörlerinin endokrin tedaviye cevaplarının steroid reseptörler içermeyen tümörlere göre daha iyi olduğu bildirilmiştir (Sorlie ve ark 2001, Anderson 2002).

1.6.1.4. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler

Bcl-2 – Apopitoz genleri: Antiapopitotik ve proapopitotik genler olarak birbirine zıt etkili iki gruptan oluşan ve apopitozu düzenlemede en önemli role sahip onkoprotein grubudur (Altunkaynak ve Özbek 2008). Antiapopitotik grup elektron transport zincirine ve oksidatif fosforilasyona katılan sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını engelleyerek apopitozu baskılarken, proapopitotik grup ise sitokrom C'nin salınmasını sağlayarak apopitozu indüklemektedir. Meme tümör dokularında Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunu gösteren çalışmalar olup, Bcl-2 ekspresyonunun meme kanserinde bağımsız bir prognostik faktör olduğu tam olarak ortaya konmamıştır (Sierra ve ark 2000, Vinay ve ark 2004).

Telomeraz: Telomerazın kromozom stabilitesinde, gen ekspresyonunda, DNA replikasyonu sırasında telomerlerin tamamlanmasında, hücre bölünmesinde, yaşlanmada ve tümör oluşumunda rol aldığı bildirilmektedir (Meyerson 2000). Telomeraz, somatik hücrelerde inaktif iken sürekli bölünen ve kanser hücrelerinde aktif hale gelmektedir. Meme ve diğer birçok kanser türünde telomeraz aktivitesi tespit edilmiş, bu çalışmalar malign tümör fenotiplerinin ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur (Herbert ve ark 2001).

1.6.1.5. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Meme kanserli vakaların sadece %5-10'unda kalıtsal geçiş söz konusudur. Kalıtsal meme kanserlerinin %80'inden sorumlu iki gen vardır. Bunlar; BRCA-1 ve BRCA-2 genleridir.

BRCA1 ve BRCA2 genleri: BRCA1 geni, 17. kromozomun uzun kolunun 21. bölgesinde, BRCA2 geni ise 13. kromozomun uzun kolunun 12. bölgesinde yerleşiktir (Bellosillo ve Tusquets 2006, Balabas ve ark 2010). BRCA1 geni, DNA tamiri ve hücre döngüsünün kontrolünde görev alan bir tümör baskılayıcı gendir. Meme kanseri aile hikayesi olan kişilerin yaklaşık %20'si BRCA1 geninde mutasyon taşımaktadır. Meme kanseri oluşumunda BRCA2 genindeki mutasyonlar BRCA1 genine göre daha az etkilidir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda BRCA1 gen ekspresyonundaki azalmanın,tümör büyüme seviyelerinde artış sağladığı görülürken; BRCA1 gen ekspresyonundaki artışın ise apopitoza ve büyümenin durdurulmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Mirza ve ark 2007). BRCA1 ve BRCA2 genleri meme kanseri için en etkin mutasyonları taşıdığından meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılması önemli parametrelerdendir.

1.6.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

İnsanlarda meme kanserinin hangi nedenlerle ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemekle beraber, çok değişik ajanların kromozomal mutasyonlara neden olarak meme kanseri gelişimi ile yakından ilgili olduğu düşünülmektedir (Driedger ve Eyles 2001, Colak ve ark 2005). Meme kanserine neden olan tek bir faktör bulunmamakla

beraber birtakım risk faktörlerinin bu hastalığa yakalanma ve gelişim sürecini hızlandırdığı belirtilmektedir (Topuz ve ark 2003). Meme kanserinin görülme sıklığı, bu risk faktörleriyle bağlantılı olarak değişkenlik göstermektedir (Aslan ve Gürkan 2007). Meme kanseri oluşumundan sorumlu birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar;

- Yaş
- Ailevi meme kanseri öyküsü
- Doğurganlık öyküsü
- Kişisel meme kanseri öyküsü
- Menstrüel aktivite
- Meme kanseri gelişimine yatkın genleri taşımak
- Geçirilmiş meme biyopsisi
- Işınlanma (radyoterapi)
- Erken menarş
- Östrojen replasman tedavisi
- Oral kontraseptiflerin kullanılması
- Alkol ve sigara kullanımı
- Obezite ve beslenme alışkanlıkları
- Geç menopoz
- Emzirme
- Doğum ve ilk doğum yaşı
- Over veya uterus kanser öyküsü

1.6.3. Klinikte Meme Kanseri

Meme kanserleri in situ (invaziv olmayan) ve invaziv karsinomlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. İn situ karsinomda kanser hücreleri meme içinde belli bir alanda olup yayılma göstermezler. İn situ lobüler karsinom (LCIS), süt bezlerinde görülürken in situ duktal karsinom (DCIS) süt kanalları içinde görülmektedir. İnvaziv karsinom ise meme kanseri, süt bezleri veya süt kanallarına yayılmış ve diğer organlara yayılma potansiyeline sahip kanserlerdir. İnvaziv lobüler karsinom (ILC),

süt bezlerinden başlayarak çevre dokulara yayılır. İnvaziv duktal karsinom (IDC) da süt kanallarından başlayarak prolifere olur ve çevre dokulara yayılır. İnvaziv karsinomlar diğer organlara ve lenf düğümlerine metastaz yapabilme kabiliyetini lenfatik ve dolaşım sistemini invaze ederek sağlar (Aydıner ve ark 2000).

Patolojik tip ve derecesi, lenf düğümü durumu, tümör büyüklüğü, etnik yapı, lenfatik ve vasküler invazyon, ile tanı yaşı meme kanserinde önemli prognostik faktörlerdir. Bunun yanında onkogenler, tümör baskılayıcı genler, steroid hormon reseptörleri de meme karsinomu prognozu üzerine etkili moleküler faktörlerdir (Weigel ve Dowsett 2010).

1.6.4. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin tedavisi, tanı konulduğunda hastalığın safhası, kanserin hücre yapısı, reseptör durumu, onkojenlerin olup olmaması, hastanın yaşı, hastanın sağlık durumuna göre farklılıklar gösterir. Günümüzde meme kanseri tedavisi genel cerrahi, tıbbi onkoloji, radyasyon onkolojisi, patoloji, radyoloji ve nükleer tıp gibi uzmanlık dallarının koordineli çalışması, doğru tedavinin seçimi ile etkili bir noktaya gelmiştir.

1) Cerrahi tedavi: Cerrahi operasyonun birkaç farklı uygulaması vardır. Bu uygulamalar temelde iki ana gruba ayrılır. Bunlardan birincisi meme koruyucu cerrahisi denilen kanserli dokunun ve/veya çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokunun alınıp çıkartıldığı cerrahi operasyondur. Diğeri ise, radikal mastektomi denilen memenin tümünün alınması işlemidir.

2) Radyoterapi: Radyoterapi tümör dokusuna ya da tümör çıkarıldıktan sonra çevre dokuya verilen yüksek enerjili lokal ışın tedavisidir. Meme koruyucu cerrahi sonrasında korunan meme dokusuna yapılan radyoterapinin lokal nüks riskini %70-80 oranlarında azaltıldığı bilinmekte olup, günümüzde radyoterapi rutin olarak meme koruyucu tedavi sonrasında kullanılmaktadır. Radyoterapi, koltuk altı lenf nodlarının ileri safhada olduğu durumlarda da uygulanmaktadır.

3) Kemoterapi: Kanser hücrelerini öldürmek ya da tümör büyümesini durdurmak üzere farklı ilaç veya ilaç kombinasyonlarının ağızdan veya damardan verilerek bu sayede diğer organlara yayılan tümörlerin yok edilmesini hedefleyen bir tedavi yöntemidir. Meme kanserinde etkili bir tedavi yöntemidir.

4) Hormon Tedavisi: Kanser hücrelerinin büyümek için ihtiyaç duyduğu hormonları engellemek amacı ile uygun hormonların hastaya verilmesi yöntemidir. Östrojen hormonu, meme kanseri hücrelerinin içerdikleri hormon reseptörlerini etkileyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemektedir. Hormon reseptörü-pozitif meme kanserlerinde hormon tedavisi östrojen aktivitesini durdurarak olumlu etkiler göstermektedir.

5) Biyolojik Tedavi: Monoklonal antikorlar ve bazı spesifik aşılar aracılığı ile vücut savunma sistemlerinin harekete geçirilmesi esasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Trastuzumab gibi bazı monoklonal antikorlar, meme kanserinde aşırı miktarda eksprese edilen HER2/neu proteinine bağlanarak onları inaktive eder. Bu sayede kanserli hücrelerin büyümesi ve bölünmesi önlenir (http://kanser.gov.tr/kanser /kanser-tedavisi.html).

1.7. *Nigella sativa* (Çörek otu)

Nigella sativa (Çörek otu), Ortadoğu ve Uzakdoğu ülkelerinde 2000 yılı aşkın süredir birçok hastalığın tedavisinde kullanılan doğal bitkisel ilaçlar grubunda yer alan şifalı bir bitki olup tıbbi alanda kullanımının yanında gıda üretiminde bazı gıdaların formülasyonlarında özellikle unlu gıdalarda kullanılan bir baharattır (Dauksas ve ark 2002, Turner 2004, Salem 2005, Aggarwal ve ark 2008). Çörek otu, Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) familyasının bir üyesi olup siyah tohum, siyah kimyon veya bereket tanesi olarak bilinmektedir. 20-30 cm yükseklikte, az tüylü bir yıllık otsu bitkidir. Çiçeği beş parçalı olup beyaz, açık veya koyu mavi renkli olabilmektedir. Besin olarak kullanılan kısmı kapsül içerisinde bulunan bu kapsüller ezildiğinde kokusu kolaylıkla hissedilebilen acımsı lezzetli özel kokulu tanelerden oluşan tohumudur. Kapsül olgunlaştığı zaman açılır ve hava ile temas ederek tohumları siyahlaşır (Baytop 1984, Salem 2005). Çörek otu'nun anavatanı Güney ve Doğu Avrupa, Doğu Akdeniz ülkeleridir. Ülkemizde ise Burdur, Isparta, Antalya,

Kütahya ve Konya yörelerinde ekilmektedir (Baytop 1999). Türkiye'de 12-14 arasında Nigella türü yetişmekte olup bunlardan *Nigella sativa, Nigella damascena ve Nigella arvensis* tohumları halk hekimliğinde ve baharat olarak kullanılmaktadır (Seçmen ve ark 2004).

Nigella sativa uzun yıllardır halk hekimliğinde hipertansiyon, romatizma, gastrointestinal hastalıklar, yanıklar, cilt hastalıkları, karaciğer ve böbrek hastalıklarında, diyabet, konstipasyon, astım, bronşit, diyare, dispepsi, baş ağrısı, baş dönmesi, sarılık, ateş, grip gibi birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır (Burits ve Bucar 2000, El-Dakhakhny ve ark 2000, Randhawa 2002, Ali ve Blunden 2003, Badary ve ark 2003, Hajhashemi ve ark 2004, Salem 2005, Ramadan 2007).

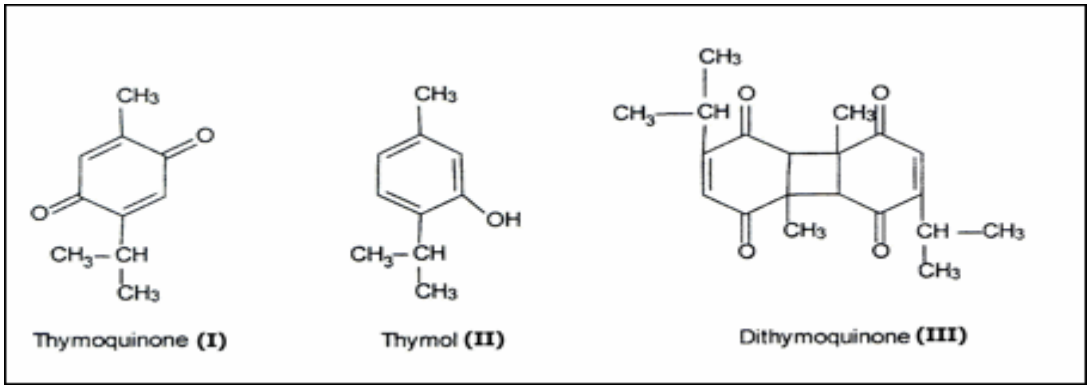
1.7.1. *Nigella Sativa'*nın Kimyasal Bileşimi

Nigella Sativa tohumlarının kimyasal içerikleri bitkisinin yetiştiği coğrafi bölgeye, iklime, çeşidine ve bitkinin hasat mevsimine göre küçük değişiklikler göstermekle birlikte, tohumlar ortalama %36-38 sabit yağ (doymamış yağ asitlerince zengin), protein, karbonhidrat, saponin, alkoloit ve %0,4-2,5 oranında uçucu yağ içermektedir (Khan 1999, Ali ve Blunden 2003). Sabit yağ bileşiminin %55-60 linoleik asit, %21-23 oleik asit, %11-13 palmitik asit, %1,2 miristik asit, %2,9 stearik, %1,7 eikasodienoik asit ve az miktarda araşidik asitten oluştuğu bildirilmiştir (Nickavar ve ark 2003, Kıralan 2006).

1.8. Timokinon (TQ)

TQ ($C_{10}H_{10}O_2$; 2–izopropil-5-metil-1,4–benzokinon), çörek otu uçucu yağının temel biyoaktif bileşeni olup; çörek otu uçucu yağında %18,4-24 oranında bulunan 164,2 g/mol molekül ağırlığında birçok biyolojik ve farmakolojik yararı olan koyu sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpen kinondur (Arslan ve ark 2005, Pari ve Sankaranarayanan 2009, Cooper 2010). TQ'un ilk defa 1963 yılında El-Dakhakhny tarafından yapılan bir çalışma ile izole edildiği bildirilmiştir (Badary ve ark 2003, Khader ve ark 2009). *Nigella Sativa'*nın ana bileşeni TQ olmakla birlikte, timol, ditimokinon, timohidrokinon bileşiklerinin (Şekil 1.2) de bu bileşime eşlik

ettiği yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri ile gösterilmiştir (Ghosheh ve ark 1999, Gali-Muhtasib ve ark 2006).



Şekil 1.2. *Nigella sativa'nın* temel bileşenleri (Ragheb ve ark 2009).

TQ'un antioksidan (Khalife ve Lupidi 2007, Yıldız ve ark 2008, Bourgou ve ark 2010), antimikrobiyal (Mahmoud ve ark 2002, Aljabre ve ark 2005, Akhtar ve ark 2007, Halawani 2009), antitümöral ve antikanserojenik (Gali-Muhtasib ve ark 2004a, Islam ve ark 2004, Salem 2005, Ivankovic ve ark 2006, Kaseb ve ark 2007, Roepke ve ark 2007), analjezik ve antiinflamatuar (El-Dakhakhny ve ark 2002, Chakrabarty ve ark 2003, Mansour and Tornhamre 2004, El Mezayen ve ark 2006, El Gazzar ve ark 2007), antidiyabetik (Fararh ve ark 2005, Kanter ve ark 2009, Pari ve Sankaranarayanan 2009), antialerjik (Al-Majed ve ark 2001, Ali ve Blunden 2003, Kanter ve ark 2003, Ragheb ve ark 2009), antihiperlipidemik ve antihiperkolesterolemik (Zaoui ve ark 2002, Al-Naqeep ve ark 2009, Ismail ve ark 2010, Bacakgüllü ve Avcı 2013) etkilerinin yanı sıra sindirim sistemine (El-Abhar ve ark 2003, Mahgoub 2003, Arslan ve ark 2005, Kanter ve ark 2005), sinir sistemine (Hosseinzadeh ve Parvardeh 2004, Al-Majed ve ark 2006, Raza ve ark 2006, Kanter 2008), solunum sistemine (Isık ve ark 2005, El Gazzar ve ark 2006b, El Gazzar ve ark 2006a), boşaltım sistemine (Badary ve ark 1997, Sayed-Ahmed ve Nagi 2007, Hadjzadeh ve ark 2008), immün sisteme (El-Mahmoudy ve ark 2002, Kaya ve ark 2003, Salem 2005), karaciğere (Mansour 2000, Alsaif 2007, Nagi ve Almakki 2009), dolaşım sistemine (El Tahir ve ark 1993, Nagi ve Mansour 2000), kemiklere (Kirui ve ark 2004, Budancamanak ve 2006, Tekeoğlu ve ark 2007) olumlu birçok etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

1.8.1. Antioksidan Etkisi

Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronları nedeniyle kararsız bir yapıya sahip olup, biyolojik yapılarda oksidan hasarlara neden olur. Bu hasarlar kanser ve kardiyovasküler bozukluklar gibi hastalıklara yol açar (Salem 2005). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar TQ'un bu serbest radikallere karşı önemli derecede antioksidan etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Burits ve Bucar 2000, Gündüz ve ark 2002). TQ'un çeşitli mekanizmalar ile antioksidan etki gösterdiği, hidroksil radikalleri ve süperoksit radikal anyonu içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olduğu bildirilmektedir (Badary ve ark 2003).

Bir çalışmada: TQ'un 5-hidroksieikozotetraenoik asit ve 5-lipoksijenaz üretimlerini inhibe ederek antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir (El-Dakhakhny ve ark 2002). Doksorubisin (DOX) ile indüklenen nefropatide ise nefropatiyi baskıladığı, lipid peroksidasyonuna engel olarak antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir (Badary ve ark 2000).

1.8.2. Antimikrobiyal Etkisi

TQ'un antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada TQ, *S. aureus* bakterilerine karşı yüksek derecede duyarlılık gösterdiği TQ'un 3 μg/ml dozunun bakteriyostatik, 6 μg/ml dozunun ise, bakterisit etkili olduğu bildirilmektedir (Halawani 2009). Diğer bir çalışmada ise, çörek otu tohumlarının yağı ve bileşenlerinin *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde antibakteriyel özellikleri araştırılmış, pozitif kontrol olarak kloramfenikol'ün kullanıldığı çalışmada çörekotu yağının antibakteriyel etkisinin TQ'dan geldiği saptanmıştır (Bourgou ve ark 2010). TQ'un antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, TQ'un eter ekstresinin aktivitesi araştırılmış sonuç olarak TQ'un etkili bir bitkisel antidermatofit ilaç kaynağı olduğu, özellikle deri mantar enfeksiyonlarına karşı son derece etkili olduğu bildirilmiştir (Aljabre ve ark 2005). Diğer bir çalışmada ise, tropikal bir hastalık olan Şistozomiyazis ile enfekte edilen fare hücrelerinde kromozomal bozukluklara karşı potansiyel koruyucu bir madde olduğu bildirilmiştir (Aboul-Ela 2002).

1.8.3. Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi

Pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma çörek otu tohumlarının hem uçucu yağı hem de aktif bileşenlerinin antitümör etkilere sahip olduğu saptanmıştır. İnsanlarda görülen farklı kanserler üzerinde yapılan araştırmalarda, çörek otu tohumlarının uçucu yağının bazılarına karşı sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Ali ve Blunden 2003, Salem 2005). Çörek otu'nun en önemli biyoaktif bileşeni olan TQ'un potansiyel bir kemoterapötik ve kemopreventif bir bileşen olduğu, TQ'un antiproliferatif etkisiyle hücresel döngüde büyük önemi olan apopitozu uyardığı bildirilmiştir (El-Mahdy ve ark 2005).

Yapılan araştırmalarda TQ'un prostat kanseri (Kaseb ve ark 2007), meme kanseri (Swamy ve Tan 2000), karaciğer kanseri (Ahmed ve ark 2008), kolorektal kanser (Gali-Muhtasib ve ark 2004a), insan osteosarkomu (Roepke ve ark 2007) gibi pek çok kanser türünde kanserli hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya konmuştur.

1.8.4. Analjezik ve Antiinflamatuar Etkisi

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada: TQ'un ağrının erken ve geç safhalarında etkili olduğu ve ağrıyı baskıladığı bildirilmiştir (Abdel-Fattah ve ark 2000). İnflamasyon, siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LO) olmak üzere başlıca iki enzim tarafından düzenlenir. Bunlardan COX yolunda prostoglandinler (PG) sentezlenirken LO yolunda ise, lökotrienler (LT) sentezlenir. Bu biyolojik maddeler organizmada alerji ve inflamasyonun aracıları olarak görev alırlar. Yapılan bir çalışmada, TQ'un kalsiyum iyonoforu ile uyarılan rat peritonal lökositlerindeki araşidonik metabolizmasının hem COX hem de LO yollarını inhibe ederek antiinflamatuar etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Mansour 2000, El Mezayen ve ark 2006). Yapılan bir diğer araştırmada ise, TQ'un antiinflamatuar etkisinin 100 mg/kg'lık asetil salisilik asite neredeyse eşdeğer olduğu ileri sürülmüştür (Gali-Muhtasib ve ark 2006).

1.8.5. Antidiyabetik Etkisi

Diyabetes Mellitus organizmadaki insülin sentezi yetersizliği ya da insülin direncinden kaynaklanan şiddet derecesi kişiden kişiye değişen metabolik bir hastalıktır. Deneysel olarak indüklenmiş diyabetik hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, TQ hipoglisemik ve antidiyabetik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir

(El-Mahmoudy ve ark 2005, Fararh ve ark 2005). TQ'un insülin sekresyonu üzerindeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, TQ'un, insülin sekresyonunu artırarak glikoz yıkımını artırdığı ve glukoneogenezi engelleyerek kan glukoz düzeyinin düşmesini sağladığı belirtilmiştir. Geçmişe yönelik kan glukoz düzeyi incelemesinde klinik öneme sahip HbA1C üzerine TQ'un etkisinin araştırıldığı bir çalışmada TQ'un total HbA1C düzeyini önemli derecede düşürdüğü bildirilmiştir (Pari ve Sankaranarayanan 2009).Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan farelerde gebelik döneminde TQ verilmesinin embriyoların maturasyonu ve büyüklüklerinde artışa neden olduğu, bunun yanında serbest radikal miktarını azaltıp embriyo malformasyon oranlarını düşürdüğü tespit edilmiştir (Al-Enazi 2007). Bu çalışma ile gebelik döneminde TQ kullanımının son derece yararlı olduğu ortaya konmuştur.

1.8.6. Antiallerjik Etkisi

Vücut dokularından salgılanan bazı histaminik maddeler astım hastalığında olduğu gibi bazen allerjik reaksiyonlar oluşturabilmektedir. Yapılan araştırmalarda, TQ'un bu histaminik maddelerin baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir (Kanter ve ark 2003, Ragheb ve ark 2009). Bir klinik çalışmada allerjik rinit, atopik ekzema gibi rahatsızlıkları bulunan hastalara TQ uygulanmış sonuç olarak; IgE, eozinofil, plazma ve idrardaki endojen kortizol miktarlarında belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir (Kalus ve ark 2003). Diğer bir çalışmada ise TQ'un antialerjik etkisini histamin ve serotonin reseptörlerini seçimsiz olarak bloke ederek gösterdiği bildirilmiştir (Al-Majed ve ark 2001).

1.8.7. Sindirim Sistemine Etkisi

Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada etanol tarafından indüklenen gastrik ülserin gelişimini TQ'un engelleyebileceği ve TQ'un bu gastroprotektif özelliğinin antioksidan özelliği ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Arslan ve ark 2005). İskemi/reperfüzyon oluşturulan ratlarda yapılan bir çalışmada ise, TQ'un mide mukozasındaki redoks durumunun korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (El-Abhar ve ark 2003).

1.8.8. Sinir Sistemine Etkisi

Serebral iskemi gibi nöral bozuklukların patolojilerinde TQ'un nöroprotektif bir bileşik olduğu bildirilmektedir (Al-Majed ve ark 2006). Bir araştırmada kronik toluene maruz kalan ratlarda TQ verilmesinin hipokampusdaki nörodejenerasyonlarda morfolojik düzelme sağladığı ve tedavi için faydalı olabileceği ileri sürülmüştür (Kanter 2008).

1.8.9. Solunum Sistemine Etkisi

Göğüs cerrahisi ve yoğun bakım tedavisinde görülebilen akut akciğer yaralanması ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) önemli klinik sorunlardan olup bu sorunlara karşı uygulanan tedavi metotlarının çoğu destek amaçlıdır. TQ'un akut solunum sıkıntısı sendromunda etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlara insan mide suyu verilerek ARDS oluşturulmuş, TQ uygulanan ratlarda TQ'un akciğer dokusunu insan mide suyunun zararlı etkilerinden koruduğunu ve oksijenasyonu iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Isık ve ark 2005). Diğer bir çalışmada ise, farelere intraperitoneal (i.p.) enjekte edilen TQ hava yolu ile verilmiş TQ akciğer eozinofilinde önemli bir artış sağlamıştır (El Gazzar ve ark 2006b).

1.8.10. Üriner Sisteme Etkisi

Ratlarda etilen glikolün neden olduğu böbrek taşları üzerine TQ'un etkisinin araştırıldığı bir çalışmada: TQ'un serum kalsiyum miktarını belirgin oranda artırdığı, idrarda oksalat konsantrasyonunu azalttığı, bu sayede kalsiyum oksalat birikintilerinin daha az sayıda ve daha küçük şekilde olmasını sağladığı bildirilmiştir (Hadjzadeh ve ark 2008). Kemoterapötik ilaç olarak kullanılan fakat nefrotoksisite ve kemik iliği fonksiyonunun inhibisyonu gibi şiddetli yan etkileri olan cisplatin'in olumsuz etkilerine karşı TQ'un iyileştirici etkisi ratlar üzerinde araştırılmış, TQ'un serum üre ve kreatinin düzeyinde belirgin bir azalma ile birlikte böbreklerdeki nefrotoksisiteyi azalttığı gözlemlenmiştir (Badary ve ark 1997).

1.8.11. İmmün Sisteme Etkisi

TQ'un kazanılmış bağışıklık grubunda yer alan T hücrelerinin ve immün yanıta aracılık eden öldürücü hücrelerin artışını sağladığı ve belirgin bir immünomodülatör etki gösterdiği bildirilmektedir (Salem 2005). İnflamasyonlu ve otoimmün hastalıkların tedavisinde TQ'un etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; TQ lipopolisakkarit tarafından uyarılan makrofajların supernatantlarında nitrit üretimini

azaltmış, periton makrofajlarındaki indüklenebilir nitrik oksit sentaz (İNOS) protein düzeyini de konsantrasyona bağlı olarak düşürmüştür (El-Mahmoudy ve ark 2002).

1.8.12. Karaciğer Koruyucu Etkisi

Mansour'un 2000 yılında fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada TQ'un yükselmiş olan serum enzimlerini (ALT, AST, LDH) ve hepatik malondialdehit (MDA) düzeyini azaltarak hepatotoksisiteyi regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuç TQ'un, alkolün neden olduğu karaciğer hastalıklarının tedavisinde etkin olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Mansour 2000). Benzer bir çalışmada; etanolle hepatotoksisite oluşturulan ratlarda TQ'un etkisi araştırılmış ve olumlu sonuçlar gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada farelere oral yoldan TQ verilmiş, verilen TQ kinon redüktaz ve glutatyon transferaz enzim aktivitelerini artırmıştır. Tüm bu sonuçlar, TQ'un karsinojenlere ve toksisiteye karşı koruyucu bir bileşik olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Nagi ve Almakki 2009).

1.8.13. Dolaşım Sistemine Etkisi

DOX farklı kanser türlerinin tedavisi için kullanılan yapısında kinon içeren bir antibiyotiktir. Buna karşın kardiyomiyopati, kalp krizi ve kardiyotoksisite gibi yan etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlıdır. TQ'un bu yan etkilerin aktivitesinin azaltılmasına karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada olumlu sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (Nagi ve Mansour 2000). Enomoto ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada ise TQ, trombosit agregasyonu, kanın koagülasyonu ve fibrinoliz aktiviteleri üzerine olumlu etkiler göstermiş, trombozisin çaresi olarak görülen asetil salisilik asitten 30 kat daha fazla inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (Enomoto ve ark 2001).

1.8.14. Kemikler Üzerine Etkisi

TQ'un artrit için güvenli ve etkili bir tedavi olduğunu ve romatoid artritin tedavisi için faydalı olabileceği Budancamanak ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışma ile gösterilmiştir (Budancamanak ve ark 2006). Femoral bozukluğu olan hayvan modelleri üzerinde TQ'un kemik iyileşmesindeki etkilerinin

değerlendirildiği bir diğer çalışmada; TQ uygulanan deneysel grubun iyileşme süresini kısalttığı, anatomik şekillerinin daha düzgün olduğu, diğer yaşamsal ve reprodüktif organlara belirgin bir yan etki göstermediği bildirilmiştir (Kirui ve ark 2004).

1.8.15. Antihiperlipidemik ve Antihiperkolesterolemik Etkisi

Badary ve arkadaşlarının 2000 yılında ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada; TQ'un DOX tarafından indüklenen hiperlipidemik nefropati ve oksidatif stres üzerindeki etkisini araştırmışlar, TQ'un, DOX'in indüklediği albuminüriyi ve proteinüriyi ciddi miktarda engellediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçla birlikte, TQ'un hiperlipidemik nefropatiye karşı etkili bir bileşik olduğunu ortaya konmuştur (Badary ve ark 2000). Yapılan diğer bir çalışmada; standart yemle beslenen ratlarda 50 mg/kg dozunda gavajla TQ verilmesi 6 hafta sonunda hem standart diyette hem de yüksek yağlı diyette canlı ağırlığı önemli oranda düşürdüğü bildirilmiştir (Bacakgüllü ve Avcı 2013). Tavşanlar üzerinde ateroskleroz modeliyle oluşturulan bir çalışmada; TQ'un oksidatif stresi, Siklosporin A (CsA) ve hiperlipideminin birlikte sebep olduğu aterogenezi azalttığı bildirilmektedir (Ragheb ve ark 2009). Albümino yapılan bir çalışmada TQ'un kandaki TK, TG, HDL ve LDL düzeyleri üzerine etkisi araştırılmış, sonuçlarda TQ'un tüm değerlerde düşüşe neden olduğu saptanmıştır (Bamosa ve ark 2002). İsmail ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada; hiperkolesterolemi ile indüklenen ratlarda TQ'un ve zengin fraksiyonlu timokinonun (TQRF) lipitler üzerindeki antioksidan aktiviteleri araştırılmış. Elde edilen sonuçlarda, TQ ve TQRF'un ratların plazma ve karaciğer antioksidan kapasitesini iyileştirip, karaciğer antioksidan genlerinin ekspresyonunu yükselttiği bildirilmiştir (Ismail ve ark 2010).

1.9. Kanser Hücrelerinin Enerji Metabolizması

ATP, ADP, AMP ve nükleozid türevi adenozin gibi nükleotidler, tüm hayvan organ sistemlerinde bulunan, hücre içi ve hücre dışı mekanizmalarda aktif rol alan moleküllerdir (Yegutkin 2008).ATP ve adenozin, merkezi sinir sistemi de dahil olmakla beraber tüm vücutta bulunur. Bir pürin nükleotid olan ATP'nin hücresel metabolizma rolüne ek olarak hücre dışında sinaptik transmisyon, tat, kemik

oluşumu, erkek üreme, kan basıncı düzenleme ve inflamasyon gibi birçok fizyolojik işlemde önemli rolü vardır. Hücre dışında, bu moleküller sinaptik transmisyonu spesifik hücre yüzey pürinerjik ve adenozin reseptörleri vasıtasıyla modüle eder. Pürinoseptörler P1 ve P2 olmak üzere iki kategoriye ayrılır. P2 tipi reseptörler de P2X ve P2Y olmak üzere ikiye ayrılmıştır. P2Y tipi reseptörler G-proteinine bağlı reseptörler iken P2X tipi reseptörler ligand bağımlı iyon kanallarıdır. Adenozin gibi nükleozitler ile aktive olan pürinoseptörler P1 tipi olarak adlandırılırken, ATP gibi nükleotidler ile aktive olan pürinoseptörlere P2 tipi olarak adlandırılmıştır (Latini ve Pedata 2001, Uğur 2001, Miller ve ark 2011). Plazma membranında pürinoseptörlere bağlanan extraselüler ATP hücre içi sinyal kaskadları başlatır (Graff ve ark 2000). Extrasellüler nükleotidler ve nükleosidler çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alır. Bu süreçlerde bu biyolojik moleküllerin etkileri pürinoseptörler vasıtasıyla yönlendirilir. P2X7 reseptörlerinin bağışıklık hücrelerinde görülen apoptotik ve nekrotik değişimlerin oluşumunda önemli rolünün olduğu bildirilmektedir (Ferrari ve ark 1999). ATP, çeşitli sinyal iletim yollarında metabolik reaksiyonların aktivasyonu için gerekli enzimlerin allosterik düzenleyicisi olup, kofaktör olarak metabolik fonksiyonu vardır (Kiesslich ve ark 2003). Adenin nükleotidleri, nükleik asit biyosentezinden sorumludur. DNA ve RNA için yapı taşları olarak görev yaparlar. Adenin nükleotidleri ile piridin nükleotidleri hücre içi oksidasyon-redüksiyon tepkimelerini ve enerji düzeyini düzenler. Aynı zamanda fosfat vericileri olarak da görev alırlar. Piridin nükleotidleri hücresel savunma sisteminin önemli bir parçası olup, metabolizmalarında oluşabilecek herhangi bir olumsuzluk kalp krizi, kalp yetmezliği, aritmi gibi rahatsızlıklara yol açabilir (Nakamura ve ark 2012).

Hücre metabolizmasında pek çok reaksiyon hücrenin enerjik durumuna göre kontrol edilir. Bir hücre veya dokunun enerji durumu adenilat enerji şarjı (AEC) ile ifade edilir. AEC hesaplaması [ATP +(0,5*ADP)]/(AMP + ADP + ATP)] formülü ile yapılmaktadır (Jeremy ve ark 2007).

Yeryüzünde tüm organizmalar enerji kaynağı olarak glikolizden yararlanır. Glikoliz sırasında glikoz hücresel enerji ihtiyacını karşılamak için her aşaması spesifik bir enzimle katalize edilen biyokimyasal bir yıkıma uğrar. Glikoliz, sitoplazmada gerçekleşir ve sadece iki mol ATP üretilir. Atmosferik oksijenin artması ile hücreler enerji üretmek için oksidatif fosforilasyon yapar. Bu sayede

glikolitik yolda metabolit başına daha fazla ATP üretilir. Glikoliz ve oksidatif fosforilasyon moleküler ara çevrim sisteminde beraber hareket ederler. Glikolizin son ürünü olan pirüvat aerobik koşullar altında mitokondride asetil CoA'ya dönüştürülür ve okside olmak üzere oksaloasetat ile birleşerek oksidatif fosforilasyon başlatılır. Anaerobik koşullar altında ise sitoplazmada pirüvat, laktat dehidrojenaz enzimi ile laktata dönüştürülür. Hücre içi pH'ın muhafaza edilebilmesi için oluşan laktat, monokarboksilat taşıyıcıları ile hücre dışına atılır (Granchi ve Minutolo 2012).

Canlı hücrede gerçekleşen tüm metabolik olaylar enerji gerektirir. Enerji üretimi hücresel enerji ihtiyacı ile ilgili olup, ATP üretimi hücre çevresine ve hücresel koşullara göre değişir. Memeli hücreleri ATP üretmek için hem glikoliz hem de oksidatif fosforilasyondan faydalanır. Normal koşullarda, hücre metabolizması enerji ihtiyacının %70'ni oksidatif fosforilasyondan sağlar. Ancak hipokside glikoliz zayıflar ve bu açığın kapatılması için hücre içine daha fazla glikoz alımı gerçekleşir. Bu nedenle, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon hücrenin enerji dengesini korumak için işbirliği içindedir. Pek çok kanser hücresinde normal hücrelerin tersine normoksi veya hipokside enerji üretimi için glikoliz kullanılır (Jang ve ark 2013).

Kanser hücrelerinin enerji metabolizması normal hücre metabolizmasından farklı olup, kanser hücreleri aerobik glikoliz için yüksek oranda glikoz ve glutamin tüketirler. Kanser hücreleri heterojen olup, her bir kanser dokusu metabolik fenotip ve hedef doku yönünden farklılık gösterir. Hatta aynı kanser hücreleri bile kendi içinde metabolik farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılık kanser hücrelerinin enerji metabolik yollarının da farklı olduğunu göstermektedir (Griguer ve ark 2005, Miccheli ve ark 2006). Bu nedenle kanser tedavisinde iyi bir terapötik sonuç almak için öncelikli olarak ilgili kanser hücresinin enerji metabolizmasını incelemek son derece önemlidir (Zheng 2012).

Toplam ATP üretimi için glikolitik katkı genellikle %50-60 kadardır (Zu ve Guppy 2004). Tümör hücrelerinde oksidatif fosforilasyon ATP üretimi için hala önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. HL-60, HeLa, 143B ve U937 malign tümör hücre hatlarının metabolik fenotipleri oksidatif fosforilasyon olmasına rağmen, bu fenotipleri hipoksi durumunda değişmektedir (Herst ve Berridge 2007). Örneğin,

serviks kanseri HeLa hücreleri ve meme kanseri MCF-7 hücrelerinde oksidatif fosforilasyonun toplam ATP üretimine katkısı normalde, sırasıyla %79, %91 iken hipoksi durumunda bu oran %29 ve %36'ya düşmektedir (Rodriguez-Enriquez ve ark 2010).Bazı durumlarda, kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyonun komşu stromal hücrelerden bile daha fazla olduğu bildirilmektedir (Bonuccelli ve ark 2010).

Kanser hücreleri için aerobik glikoliz daha kolay ve daha elverişli bir metabolik yoldur. Kanser hücreleri glikolizi sadece enerji gereksinimleri için değil aynı zamanda büyümeleri ve çoğalmaları için gerekli nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi biyomoleküllerin sentezi için de kullanır (Zheng 2012).

Çoğu kanser hücresi enerji kaynağı olarak glikozu kullanmasına rağmen bazı kanser hücreleri glutamini kullanmaktadır. Kanser metabolizmasında glutaminolizis enerji üretiminde alternatif bir metabolik yoldur (DeBerardinis ve Cheng 2010). Birçok *in vitro* çalışmada, tümör hücrelerinin enerji kaynağı ile birlikte hücre metabolizmasının etkin bir modülatörü olarak glutamine ihtiyaç duyduğu yönünde kanıtlar ileri sürülmüştür (Turowski ve ark 1994, Soh ve ark 2005). Glutaminin normal dokulardaki oksidatif hasara karşı koruma fonksiyonu vardır. Ancak kanser ile birlikte bu fonksiyonunu kaybeder. Hiperkatabolik bir durum olan kanser vakalarında glutaminin önemli miktarı iskelet kasları tarafından sağlanır. Ancak zaman geçtikçe sentez artışı ile kompanse edilemeyecek derecede belirgin glutamin deplesyonu olur. Glutamin deplesyonu oluşunca, glutamin metabolizmasında üretilen bir ürün olan glutatyon da deplese olur. Bu durumun kanser hastalarında radyoterapi ve kemoterapi ile oluşan doku hasarının genişliğini de artırdığı bildirilmektedir (Bartlett ve ark 1995, Savarese ve ark 2003).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Timokinon: Sigma-Aldrich 27-4666
- Etanol: Merck K38169483 750
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650
- ATP: Sigma-Aldrich A7699
- ADP: Sigma-Aldrich A2754
- AMP: Sigma-Aldrich A1752
- KH_2P0_4:Merck A0047373 923
- KOH: Merck B0201933 811
- KC1: Sigma-Aldrich 12636
- Sodyum-Potasyum tartarat: Merck A875387 811
- Na_2C0_3: Sigma-Aldrich S7795
- $CuS0_4.5\ H_20$: Merck A897690 739
- Folinciocalteu's fenol: Merck HC140610
- Cell Lysis Buffer Solution: Merck MSP010065
- NaOH: Sigma-Aldrich S8045
- BSA (Bovin Serum Albumin): Sigma-Aldrich A2153
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No: 01-lA
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND, BI03-031-1C)
- Glutamin-L-glutamin Solution, 29.2mg/ml in Saline (200 mmol) (BIO-IND, BI03-020-1B)
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND, BI04-127-1B)

- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-lA
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol (BIO-IND, BI03-053-lB)

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri

- $C0_2$ inkübatörü: SANYO O_2/CO_2 INCUBATOR MCO-175M
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Işık mikroskobu: Leica Dmil Led (inverted microscop)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): ALTUS AL 302
- -40°C buzdolabı: SANYO MDF-U425
- -80°C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Cihazı: Roche Diagnostics GmbH, Penzbeerg, Germany
- E-PLATE 16: ACEA biosciences, Inc. Cat No: 05469813001
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm
- Steril filtre: 0,45µm Lot No: N0403113103
- Flask: TC Flask,75 cm^2, Canted Neck, Anti-Tip, Plug Seal, Sterile (CORNING, CC430720)
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked (5 ve 10 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Shimadzu DGU-20A3R
- Spektrofotometre: Perkin Emler Lambda 25 UV/Vis Spectrometer
- Kolon: Vertical VertiSep™ GES C18 HPLC column, 4,6x150 mm, 5 µm

2.2. Metod

2.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 meme kanseri hücre serisi kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz bir kadından izole edilmiş meme kanseri hücre serisidir. MCF-7 hücreleri epitelyal, östrojen reseptörü pozitif ve invaziftir. MCF-7 hücre serisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Bedir tarafından hediye edilmiştir.

MCF-7 hücreleri nemlendirilmiş, %5 CO_2 içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren DMEM besi yerinde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajlanması 4-5 günde bir olacak şekilde, tripsin-EDTA ile kaldırılması ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 75 $cm^{2'}$lik flasklarda besi yerine alınması şeklinde yapıldı.

Hücre stoklanması ise tripsinlenen hücrelerin, santrifüj'den sonra besi yerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak, -20°C'de 1 gece beklettikten sonra -80°C'de ve sonra sıvı azot tankına konularak saklanması şeklinde gerçekleştirildi. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37 °C'de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, petri kabında taze besi yeriyle pasajlandı.

Hücre sayımı için; tripsinlenen hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti, 1-2 ml besi yerine alındı. Karıştırılarak 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına aktarılmış, Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

2.2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi

xCELLigence® (Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi) sistem, hücre mönitörizasyonunun belirlenmesi için hassas, kantitatif, dinamik ve eş zamanlı çalışan bir sistemdir. Bu sistemin en önemli üstünlüğü, diğer metotlara göre pek çok manipülasyonun azaltılmış olması, anlık veri sağlaması ve bileşik ya da renk girişimine sebep verebilecek olumsuzluklarının olmamasıdır. Elektrik empedans okuma yoluyla eş zamanlı olarak hücre canlılığı ölçümüne izin verir. Sistem; elektronik sensör analizörü, cihaz ve 16 ya da 96‟lık e-platelerden (Şekil 2.1.) olmak üzere üç bileşeni kapsar.



Şekil 2.1. Elektronik sensör analizörü, cihaz ve E-plate 16 (http://www.acebio.com./productlist 2).

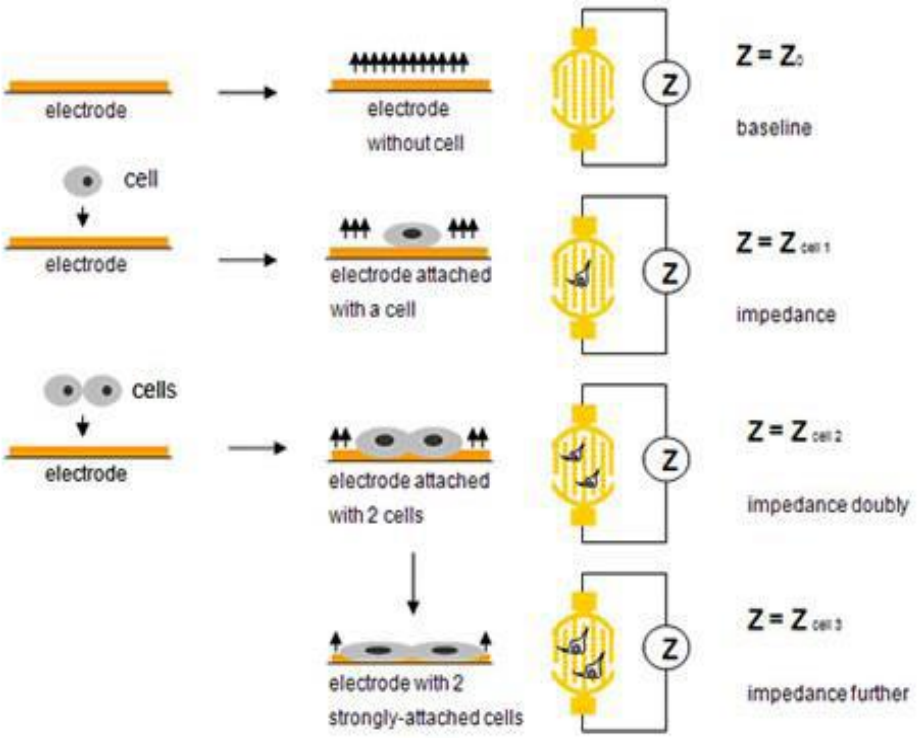
Plateler, kuyu tabanlarına gömülmüş uygun geometriye sahip mikro elektrotlardan oluşur. Bunun tersine diğer empedans sensörleri kuyunun yüzey alanının %80'ini kaplar. Bu sistem hücre sensör elektrod merkezli olarak geliştirilmiştir. İnkübatör içinde bulunan cihaza plateler yerleştirilir ve yazılım kontrolü altında, sensör analizörü ölçüm için kuyuları otomatik olarak seçer.

$$CI = \max_{i=1\ldots N} \left(\frac{R(\text{hücre}(fi))}{Rb(fi)-1} \right)$$

N= empedansı ölçülen frekans noktalarının sayısıdır.

R (hücre)= hücrenin bulunduğu kuyunun hücre elektrot empedansıdır.

Rb = medyumun bulunduğu kuyunun arka plan empedansıdır.



Şekil 2.2. Hücrelerin elektrik empedansının ölçümü (http://www.aceabio.com/theory.aspx).

Bu sistem e-platelerdeki hücrelerin bulunduğu kuyuların altında, birleşik haldeki mikro elektrotlar üzerindeki elektrik empedansını ölçer (Şekil 2.2.). Önce, e-plate'deki kuyular boşken sistemden geçen elektrik akımı, boş kuyucuğun empedansına eşit olur. Hücreler elektrotlara yerleşmeye başladığından itibaren ise sistemden geçen akım hücrelerin elektrik empedansına eşit olur. Sürekli olarak empedans ölçümü yapar. Empedans verisi bilgisayara gönderilir ve yazılım tarafından analiz edilir.

2.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi deneyinde önce 100'er µl DMEM, 16 kuyulu e-platelerin (mikro elektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna koyuldu ve DMEM'in yarım saat kuyulara yerleşmesi beklendi. Ardından hücre sayımı yapıldı ve farklı sayılarda (5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000) hücre karışımı hazırlandı. Farklı sayılardaki MCF-7 hücreleri, önceden içine DMEM koyduğumuz kuyulara 100'er µl olacak şekilde eklendi.

Hücrelerin besi yeri 72. saatte değiştirildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, e-platelerde 196 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi. Buradan MCF–7 hücrelerinin prolifere olduğu ideal hücre sayısını bulup sonraki deneyler bu sayıyla çalışıldı.

2.2.4. TQ'un MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

TQ, konsantrasyonu 6.10^{-2} M olacak şekilde %99,9'luk etanolde çözüldü ve 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -40°C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu TQ'dan dilüsyon yapılarak hazırlandı.

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesinde yapıldığı gibi, 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, belirlenmiş olan TQ'un doz gruplan (5, 25, 50, 100 µM) ile 24 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 24 saatte bir tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 152 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.5. Hücrelerin ATP, ADP ve AMP Ölçümüne Hazırlanması

TQ uygulanan hücrelerin IC_{50} (hücrelerin %50'sini inhibe eden madde miktarı) değerleri cihazdan elde edilen proliferasyon eğrisi grafiklerinden belirlendi. IC_{50} değeri hücrelerin enerji düzeylerinin hesaplanmasında baz alındı. IC_{50} değeri TQ için 11,6 µM olarak hesaplandı.

TQ ve kontrol grubu için 3'er adet 25 cm^2'lik petri kabına, 250.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. TQ uygulanacak petri kaplarındaki hücreler ekim işleminden 24 saat sonra her 48 saatte bir 11,6 µM TQ ile muamele edildi. Kontrol grubunun ise sadece DMEM'i değiştirildi. Hücrelere TQ uygulandıktan sonra 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücreler tripsinize edildi. Hücreler en son PBS ile yıkandı ve 1 ml filtreden geçirilmiş hücre lizis tampon çözeltisi eklenerek -80°C'ye kaldırıldı.

Hücrelerin enerji düzeylerini ölçmeden önce ön işlemler yapıldı. -80°C'den çıkarılan hücreler, sonikatörde 30 dk süreyle parçalandı. Parçalanan hücreler 14.000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant alınıp filtreden geçirilerek

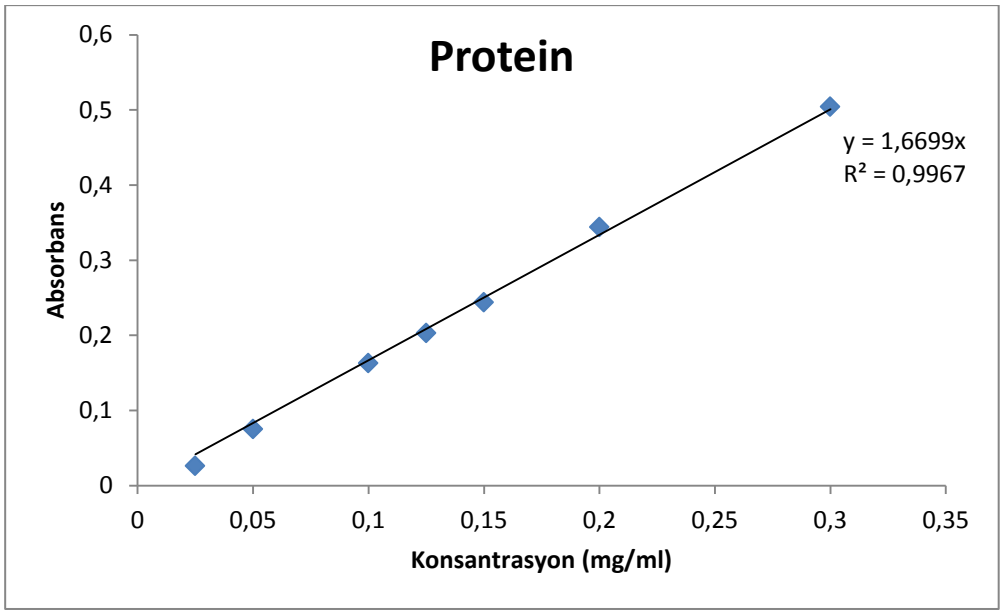
hücrelerin nükleus ve diğer organelleri uzaklaştırıldı. Bu sayede sadece hücrelerin sitozolünü içeren numuneler cihaza verilmeye uygun hale getirilmiş oldu. Numuneleri cihaza vermeden önce hücrelerin protein miktarı analiz edildi.

2.2.6. Hücrelerin Protein Analizi

Hücrelerin enerji düzeylerinin ölçümünden önce protein miktarları analiz edildi.Protein analizi Lowry metodu kullanılarak yapıldı (http://www.protein.ege.edu.tr/Konular/Protein%20tay.pdf). Buna göre;

- A reaktifi; 1 g sodyum-potasyum tartarat ve 0.5 g $CuS0_4.5H_20$ 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- B reaktifi; 20 g Na_2C0_3 ve 4 g NaOH bir litre distile suda çözülerek hazırlandı
- C reaktifi; 50 ml B reaktifi içerisine1 ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.
- D reaktifi; Folin reaktifi

Protein analizinde standart olarak BSA kullanıldı. BSA'nın stok çözeltisi 1 mg/ml olacak şekilde distile suyla hazırlandı. Diğer standartlar (0,025-0,05-0,1-0,125-0,15-0,2-0,3 mg/ml) da, hazırlanan bu çözeltiden distile suyla seri dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Çalışma aralığına uygun konsantrasyonda hazırlanan 0,5 ml'lik numune çözeltileri, kör ve protein çözeltilerinin her birine 2,5 ml C reaktifi katıldı. Çözeltiler vortekslenerek 10 dakika beklendi. Daha sonra çözeltilere 0,25 ml Folin reaktifi eklenerek tekrar vortekslenerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Ardından 700 nm'de distile suya karşı spektrofotometre cihazında tüm çözeltilerin absorbansları ölçüldü. Son olarak standart eğri grafiği hazırlanarak örneklerdeki protein derişimi hesaplandı. (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi.

2.2.7. Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi

Mobil faz, içinde 160 mM KH_2PO_4ve 100 mM KCI içeren solüsyonun pH'ı doygun KOH ile 6,5'a ayarlanarak, 0.45 µm'lik selüloz asetat filtreden süzülüp degaze edilmesiyle hazırlandı.

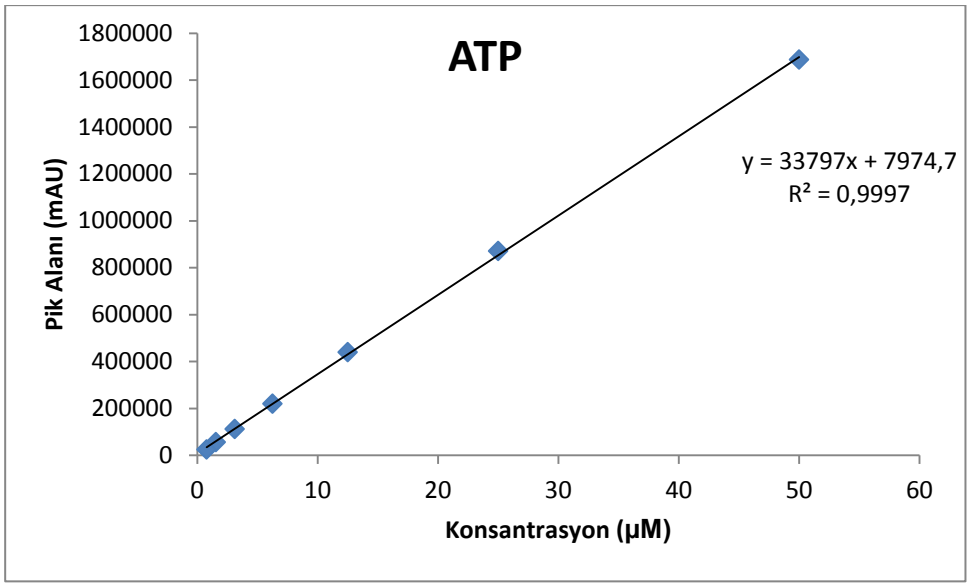
ATP, ADP, AMP standartları; ATP'den 50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,781 µM konsantrasyonlarında, ADP'den 10-5-2,5-1,25-0,625-0,312-0,156 µM konsantrasyonlarında, AMP'den 50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,781 µM konsantrasyonlarında hem tek standartlar şeklinde, hem de mix standartlar şeklinde distile suyla hazırlandı.

Ölçüme geçmeden önce HPLC cihazı ATP-ADP-AMP çalışma koşullarına ayarlandı (Çizelge 2.1.).

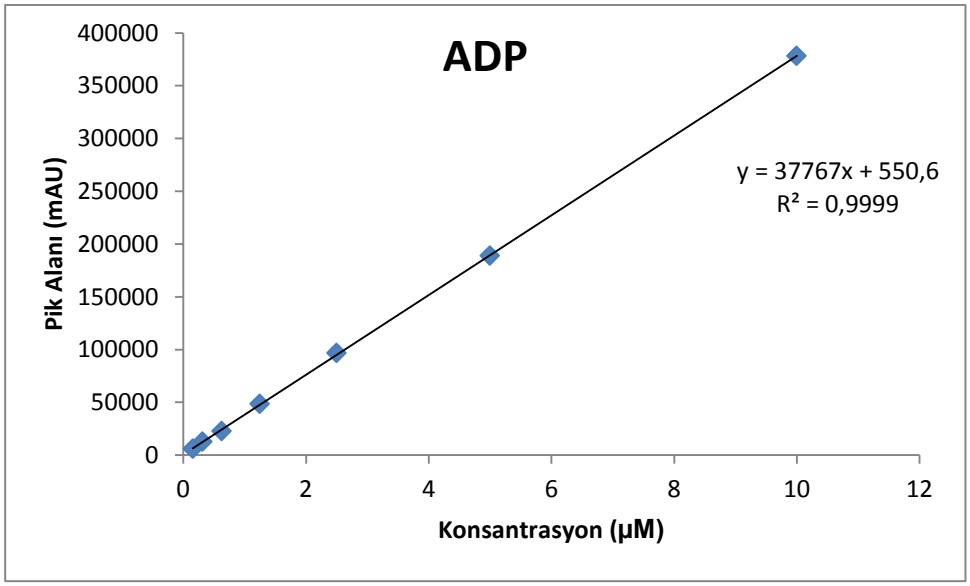
Çizelge 2.1. ATP-ADP-AMP çalışması için HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri.

Çalışma Koşullan	Sistem Parametreleri
HPLC modeli	Shimadzu DGU-20A3R
Dedektör	UV dedektör
Mobil faz	pH'ı 6,5 olan içinde 160 mMKH_2P0_4-100mMKCl içeren çözelti
Analitik kolon	GES C18 HPLC column, 4,6x150 mm, 5 µm
Dalga boyu	254nm
Akım hızı	lml/dk
Numune hacmi	50 µL
Çalışma süresi	15 dk
Ayırım	Ters faz iyon değişimi

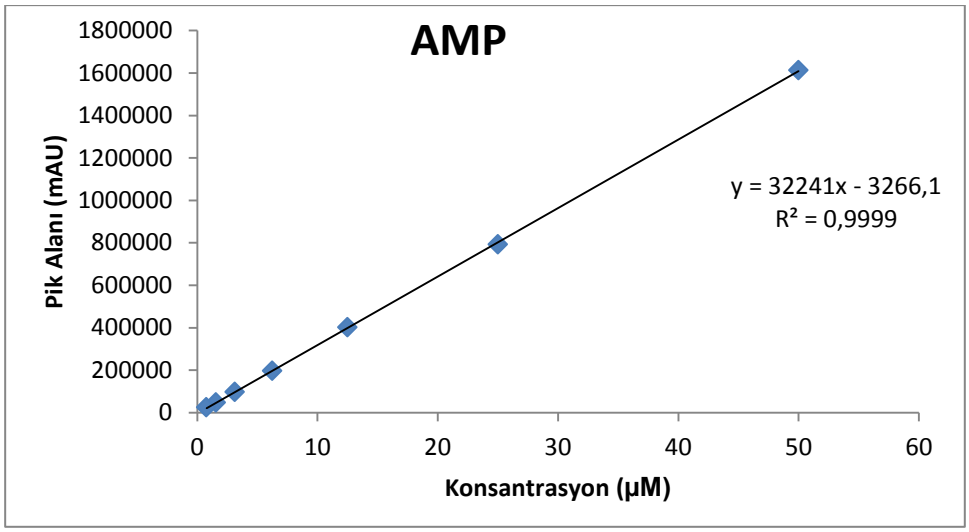
50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,781 µM konsantrasyonlarda hazırlanan ATP, 10-5-2,5-1,25-0,625-0,312-0,156 µM konsantrasyonlarda hazırlanan ADP ve 50-25-12,5-6,25-3,125-1,56-0,781 µM konsantrasyonda hazırlanan AMP standartları HPLC sistemine verildikten sonra, piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, ATP, ADP ve AMP standart eğrileri çizildi. ATP, ADP, AMP standart eğri ve doğrusallık denklemleri sırasıyla Şekil 2.4., Şekil 2.5., ve Şekil 2.6.'de gösterilmiştir. Şekil 2.7.'de ATP, ADP ve AMP mix standartlarının kromotogramı görülmektedir. Elde edilen standart değerlere göre, numunelerden elde edilen pik alanlarından ATP, ADP ve AMP konsantrasyonları hesaplandı. Önceden hazırlanan hücreler de standartların ardından cihaza verildi ve standartlara göre numunelerin pik alanları değerlendirildi.



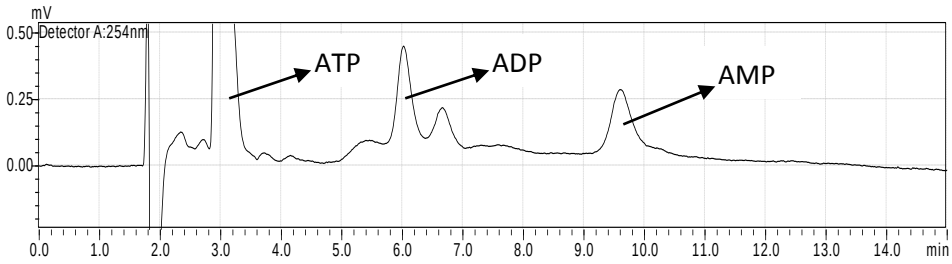
Şekil 2.4. ATP'nin standart ve doğrusallık eğrisi.



Şekil 2.5. ADP'nin standart ve doğrusallık eğrisi.



Şekil 2.6. AMP'nin standart ve doğrusallık eğrisi.



Şekil 2.7. 100 µM ATP, ADP ve AMP mix standardının kromotogramı.

2.3. İstatistik Analizleri

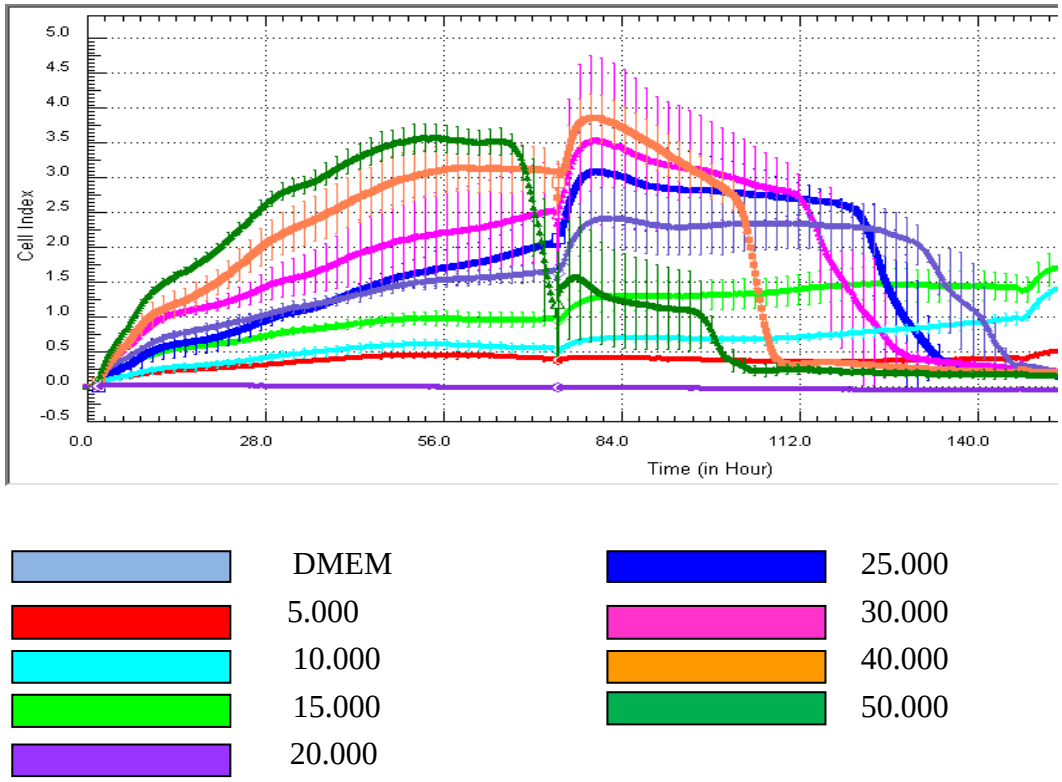
İstatistik analizler SPSS 16,0 paket programı ile yapılmıştır. Çeşitli dozlarda TQ ile muamele edilen MCF-7 hücre serisi proliferasyonu verileri ve enerji düzeyleri verileri normal dağılıma uyup uymadığının incelenmesinde Kolmogorov-Smirnov testi yapıldı. Buna göre verilerin normal dağılım gösterdiği görüldü. Bunun üzerine doz grupları ve zamanlar arasındaki farklılıkların etkileşimli olarak incelenmesi için tekrarlı ölçümlerde One Way Anova varyans analizi yapılmıştır. Her doz grubundaki zamanlar açısından farklılık Post Hoc Dunnett testi ile analiz edilmiştir. Dunnett testi kontrol ve etanol grubuna göre ayrı ayrı yapılmıştır. Farklı zaman aralıklarındaki enerji düzeyi verileri "t" testi ile değerlendirilmiştir. İstatistikî farklılık için $p<0,05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu

Şekil 3.1.'de, 5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000 gibi farklı sayılardaki MCF–7 hücrelerinin büyüme eğrileri görülmektedir. Hücrelerin besi yeri 72. saatte değiştirilmiştir. Grafikteki ani çıkış ve inişler hücrelerin besi yerinin değiştirilmesinden kaynaklanmaktadır.

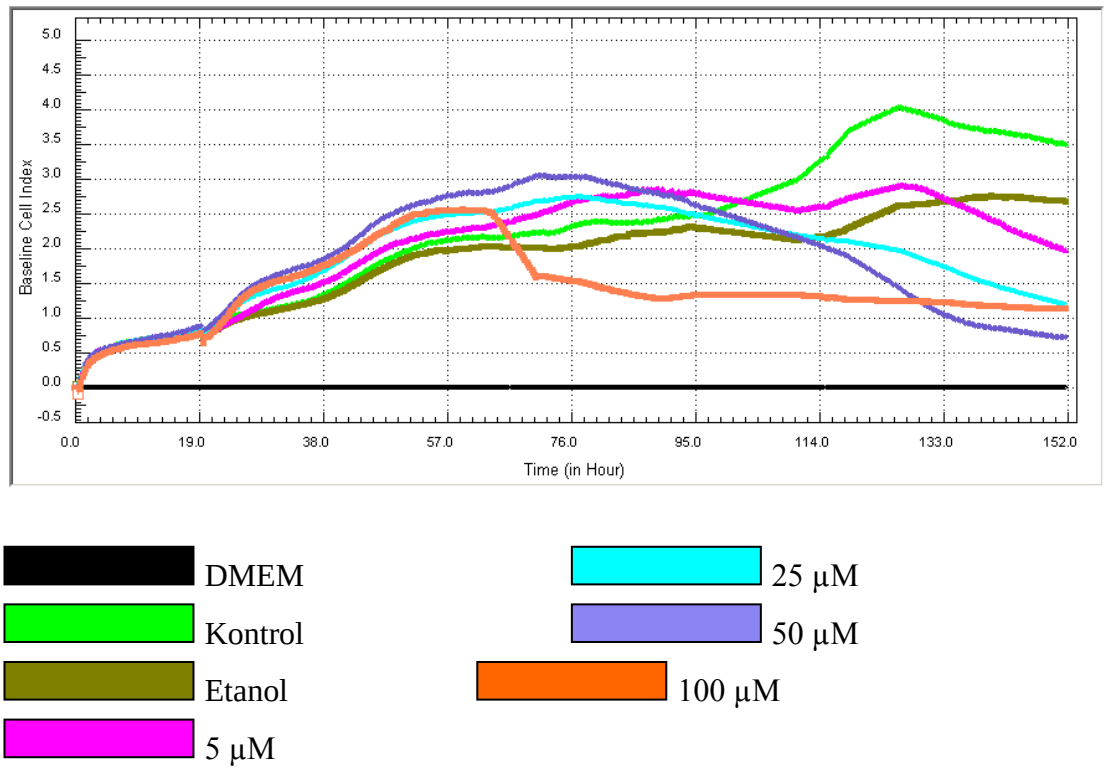
Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi 30 000 ve üstü sayıdaki hücrelerin, diğer sayıdaki hücrelere göre daha erken bir zaman diliminde ölmeye başladığı gözlemlendi. MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunun devam ettiği hücre sayıları 10 000 ve 15 000 olarak tespit edildi. Yine uygulanacak maddelerin etkili olduğu doz aralığı tespit edilirken uygulanan maddelerin etkilerinin geç ortaya çıkması nedeniyle çalışmalar 10 000 hücre sayısıyla gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Farklı sayılardaki MCF-7 hücrelerinin 152 saatlik büyüme eğrileri.

3.2. TQ'un MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

TQ'un MCF-7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. TQ'un 5, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 152 saat boyunca izlendi. Şekil 3.2.'de anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TQ'un, hücreleri doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü.



Şekil 3.2.TQ'un MCF-7 hücrelerine 152 saat boyunca etkisi.

TQ'un MCF-7 hücrelerine etkisine ait istatistiksel sonuçlar, farklı zamanlarda doz grupları arası karşılaştırma Çizelge 3.1.'de, doz gruplarının farklı zamanlardaki yüzde değişim miktarı ise Çizelge 3.2. de verilmiştir. Çizelge 3.1. incelendiğinde 64. saatte doz grupları hücre indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,38). Doz grupları arasındaki fark sırasıyla 88., 112., 136. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,003; p=0,0001; 0,0001). 88. saatte doz grupları arasındaki farklara bakıldığında en yüksek değeri 2,73 indeksi ile 50 µM doz grubu, en düşük değeri 1,23 ile 100 µM doz grubu göstermiştir. Doz grupları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, kontrol ve etanol grubuna göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 88. saatte, hem kontrol (p=0,009) hem

de etanol (p=0,03) ile 100 µM doz grubu, 112. saatte, hem kontrol (p=0,0001) hem de etanol (p=0,01) ile 100 µM doz grubu, kontrol ile 25 µM (p=0,018), 50 µM (p=0,0003) doz grubu ve etanol (p=0,02) grubu, 136. saatte ise, kontrol ile 25 µM (p=0,003), 50 µM (p=0,007), 100 µM (p=0,008) doz grubu ve etanol (p=0,04) grubu arasında anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar doz faktörü ile zaman faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılığın zamana bağımlı olarak değiştiğini göstermiştir.

TQ ilk uygulamadan sonra 64.saate kadar, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu etkilememiş olsa da, inhibitör etkisini 64. saatten sonra göstermeye başlamıştır. 64. saat başlangıç kabul edilerek oluşturulan Çizelge 3.2. incelendiğinde 25 µM doz grubunda 112. saatte %16,5 olan yüzde azalış, 136. saatte %29,63 olmakta, 50 µM doz grubunda 112. saatte %18,92 olan yüzde azalış, 136. saatte %13,51 olmakta, 100 µM doz grubunda ise 88. saatte %46,75 olan yüzde azalış, 112. saatte %48,05 olmakta, 136. saatte ise %48,48 olmaktadır. Ortaya çıkan bu sonuçlar TQ'un, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarında MCF-7 hücrelerini doz ve zaman bağımlı olarak anlamlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir.

Çizelge 3.1. TQ doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırılması.

	Kontrol	5 µM TQ	25 µM TQ	50 µM TQ	100 µM TQ	Etanol	p
64.saat (Ort ± std)	1,85 ± 0,68	2,20 ± 0,31	2,43 ± 0,29	2,22 ± 0,44	2,31 ± 0,17	1,86 ± 0,09	0,38
88.saat (Ort ± std)	2,32 ± 0,49	2,48 ± 0,45	2,47 ± 0,23	2,73 ± 0,44	1,23 ± 0,11[a,j]	2,10 ± 0,07	0,003
112.saat (Ort ± std)	2,80 ± 0,51[k]	2,59 ± 0,33	2,04 ± 0,15[b]	1,80 ± 0,21[c]	1,20 ± 0,10[d,l]	2,05 ± 0,06[e,k]	0,0001
136.saat (Ort ± std)	3,77 ± 0,63[m]	2,71 ± 0,22	1,71 ± 0,21[f]	1,92 ± 0,86[g]	1,19 ± 0,83[h]	2,36 ± 0,15[i,m]	0,0001

**Varyans analizi Post Hoc Dunnett testi (kontrol grubuna göre);a: 88. saatte, kontrol-100 µM TQ p:0,009,b: 112. saatte, kontrol-25 µM TQ p:0,018, c: 112. saatte, kontrol-50 µM TQ p:0,003, d: 112. saatte, kontrol-100 µM TQ p:0,0001, e: 112. saatte, kontrol-etanol p:0,02, f: 136.saatte kontrol-25 µM TQ p:0,003, g: 136.saatte kontrol-50 µM TQ p:0,007, h: 136.saatte kontrol-100 µM TQ p:0,008, i: 136.saatte kontrol-etanol p:0,04, Varyans analizi Post Hoc Dunnett testi (etanol grubuna göre);j: 88. saatte etanol-100 µM TQ p:0,03, k: 112. saatte etanol-kontrol p:0,02, l: 112. saatte etanol-100 µM TQ p:0,01, m: 136. saatte etanol-kontrol p:0,04*

Çizelge 3.2. Grupların 64. saate göre yüzde değişim miktarları.

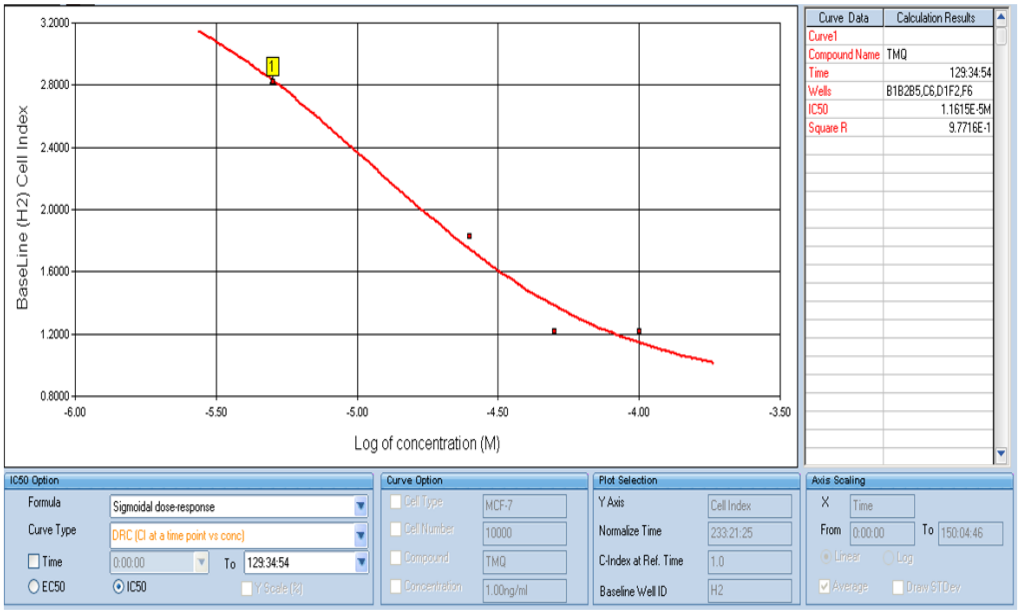
	Kontrol	5 µM TQ	25 µM TQ	50 µM TQ	100 µM TQ
88. saat	25,41	12,73	1,65	22,97	-46,75
112. saat	51,35	17,73	-16,05	-18,92	-48,05
136. saat	103,78	23,18	-29,63	-13,51	-48,48

**Yüzde Değişim=((Son değer/Başlangıç değer)*100) formülü ile hesaplanmıştır.*

3.3. TQ'un IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

TQ, doz ve zamana bağımlı olarak antiproliferatif etki göstermesine karşı, bu etkinin moleküler etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

TQ verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinden IC_{50} değeri Şekil 3.3.'de görüldüğü üzere: 11,6 µM (r^2= 0,97) olarak hesaplanmıştır. Bu değer cihaz tarafından, kontrol ve etanol grupları hariç, uygulanan tüm doz gruplarının, 129. saatte logaritmalarının alınması ve bu değerle birlikte hücre indeks değerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde hesaplanmıştır. Bu grafik çizimine göre r^2 değerine de bakılarak, TQ için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değer hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. TQ için IC_{50} Değerinin Belirlenmesi.

3.4. Hücrelerin Protein Analizi Sonuçları

Hücrelerin proteini için farklı konsantrasyonlardaki standartlar kullanılarak, spektrofotometrede 700 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi Şekil 2.3.'de gösterilmiştir. Elde edilen bu standart eğriye göre hücrelerin protein miktarları bulunmuştur.

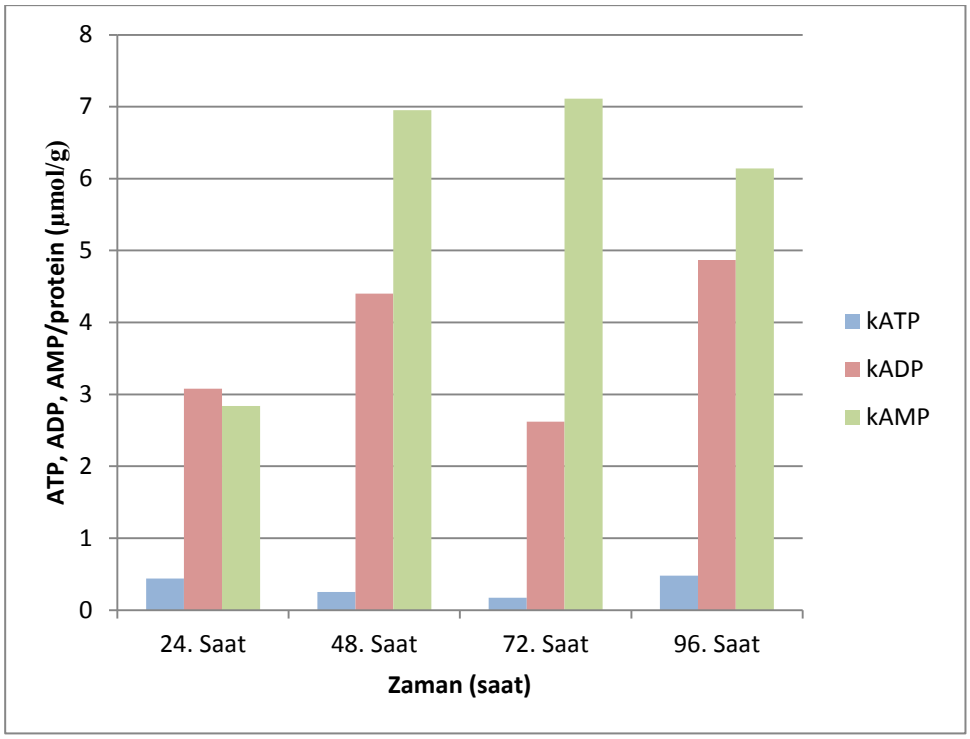
3.5. Hücrelerin ATP, ADP, AMP Ölçümü Sonuçları

Hücrelerin ATP, ADP ve AMP değerleri HPLC'de ölçülmüş ve enerji hesabı ATP, ADP ve AMP'nin tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulunmuştur. Ayrıca AEC hesaplaması ile hücrelerin toplam enerji yükü hesaplanmıştır. Bulunan bu değerlere ait grafikler, Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.'de verilmiştir.

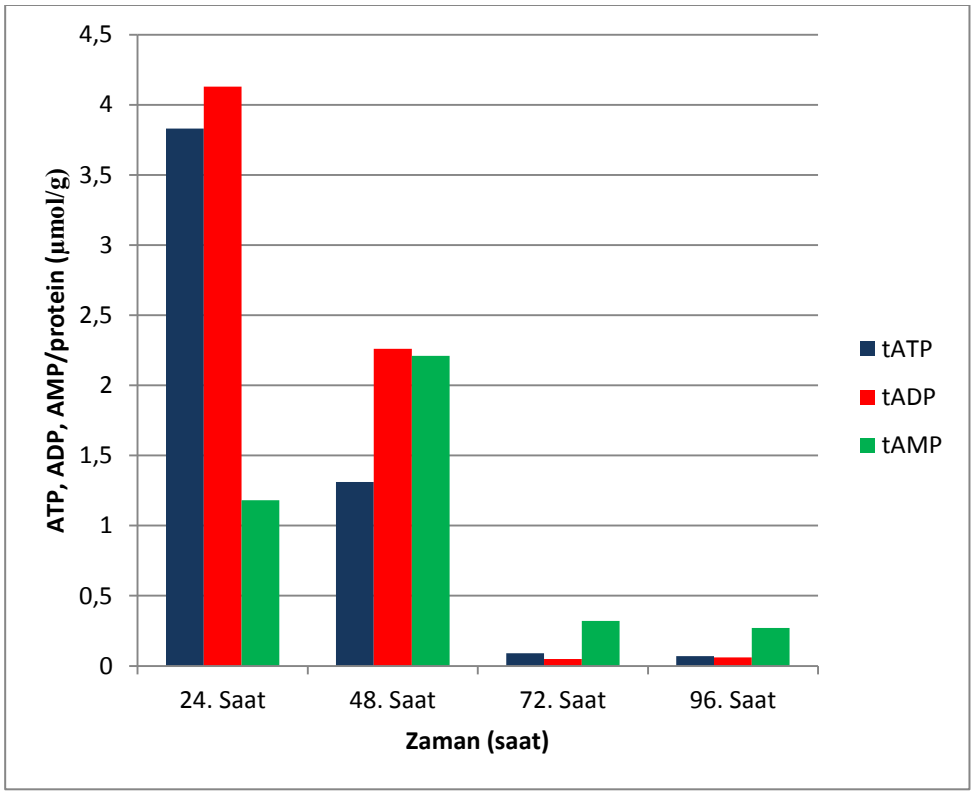
TQ'un, MCF-7 hücrelerinin enerji düzeylerine etkisi farklı zamanlar göz önüne alınarak istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3.). Elde ettiğimiz sonuçlarda; 24. saatte, kADP ile tADP ($p=0,05$), kEnerji Yükü ile tEnerji Yükü ($p=0,01$), 48. saatte kAMP ile tAMP ($p=0,02$), 72. saatte, kATP ile tATP ($p=0,01$), kADP ile tADP ($p=0,03$), kAMP ile tAMP ($p=0,05$), kEnerji Yükü ile tEnerji Yükü ($p=0,01$), 96. saatte kADP ile tADP ($p=0,02$), kAMP ile tAMP ($p=0,03$) grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 3.3.TQ'un farklı zamanlarda enerji düzeyine etkisinin karşılaştırılması.

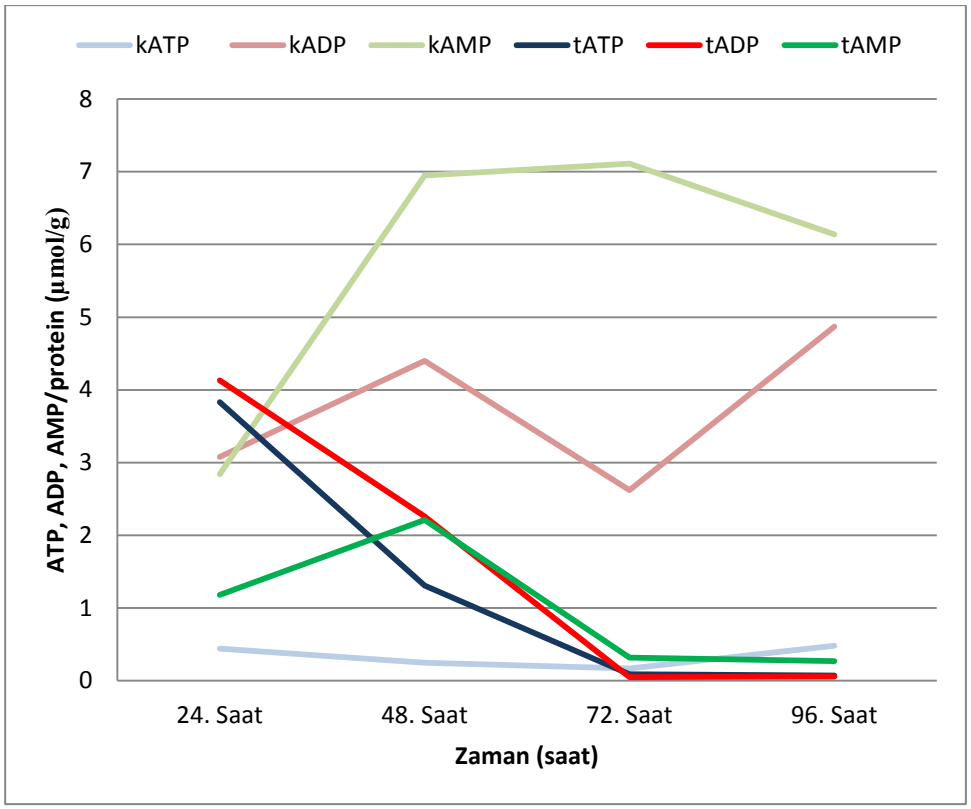
	kATP (Ort ± std)	tATP (Ort ± std)	p
24. Saat	0,44 ± 0,21	3,83 ± 1,96	0,14
48. Saat	0,25 ± 0,02	1,31 ± 0,54	0,11
72. Saat	0,17 ± 0,01	0,09 ± 0,01	**0,01**
96. Saat	0,48 ± 0,37	0,07 ± 0,01	0,26
	kADP (Ort ± std)	tADP (Ort ± std)	p
24. Saat	3,08 ± 0,35	4,13 ± 0,02	**0,05**
48. Saat	4,40 ± 0,73	2,26 ± 0,21	0,06
72. Saat	2,62 ± 0,69	0,05 ± 0,02	**0,03**
96. Saat	4,87 ± 0,95	0,06 ± 0,02	**0,02**
	kAMP (Ort ± std)	tAMP (Ort ± std)	p
24. Saat	2,84 ± 0,99	1,18 ± 1,01	0,24
48. Saat	6,95 ± 0,95	2,21 ± 0,37	**0,02**
72. Saat	7,11 ± 2,30	0,32 ± 0,06	**0,05**
96. Saat	6,14 ± 1,55	0,27 ± 0,01	**0,03**
	kENERJİ YÜKÜ (Ort ± std)	tENERJİ YÜKÜ (Ort ± std)	p
24. Saat	0,31 ± 0,16	0,64 ± 0,01	**0.01**
48. Saat	0,21 ± 0,001	0,42 ± 0,08	0,07
72. Saat	0,15 ± 0,01	0,25 ± 0,01	**0,01**
96. Saat	0,26 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,83



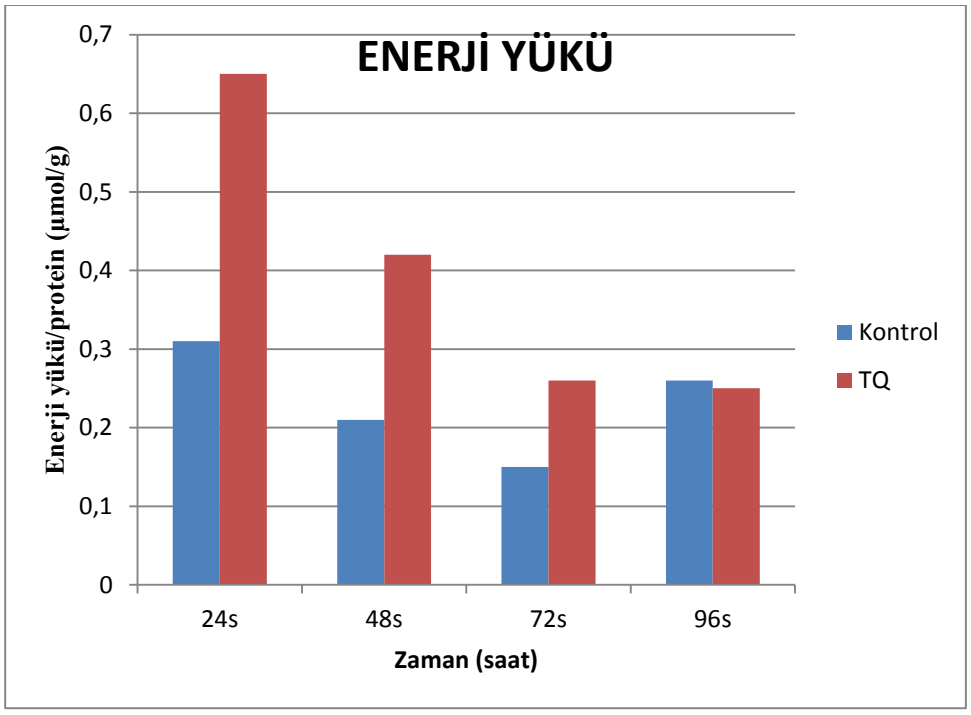
Şekil 3.4. Kontrol gruplarının ATP, ADP ve AMP düzeyleri.



Şekil 3.5. TQ gruplarının ATP, ADP ve AMP düzeyleri.



Şekil 3.6. Kontrol ve TQ gruplarının enerji düzeyleri.



Şekil 3.7. Kontrol ve TQ gruplarının enerji yükü.

4. TARTIŞMA

TQ, çörek otu yağının en önemli biyoaktif bileşeni olup, *in vitro* ve *in vivo* yapılan pek çok çalışma ile TQ'un kanserli hücre serileri ve hayvan modellerindeki antikanserojenik etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar TQ'un kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkisini ortaya koymuştur.

Epidemiyolojik çalışmalar, antikanser ajan olan TQ'un kansere yakalanma riskini düşürdüğünü, bununla birlikte kanser hastalarında tek başına veya çeşitli kemoterapötik ilaçlarla beraber kullanıldığında etkili bir antiproliferatif bileşik olduğunu göstermektedir. Genel olarak bakıldığında TQ antiproliferatif etkinliğini üç şekilde ortaya koymaktadır. Bunlar; apopitozun indüklenmesi, anjiogenez inhibisyonu ve hücre döngüsünün durdurulmasıdır (Abukhader 2013).

TQ'un meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini gözlemlediğimiz çalışmamızda, TQ'un enerji düzeyleri ile olan ilişkisini de inceledik.

Attoub ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un, LNM35 akciğer, HepG2 karaciğer, HT-29 kolon, MDA-MB-435 melanoma, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre serilerindeki etkisini araştırmışlardır. Hücreler, TQ'un 1, 10, 25, 50, 100 μM dozlarıyla muamele edilmiş ve TQ'un etkisi uygulamadan sonraki 24. saatte analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda TQ'un IC_{50} konsantrasyonu 24. saatte HepG2 hücreleri dışındaki hücrelerde 50-78 μM arasında hesaplanırken, HepG2 hücrelerinde 34 μM olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla TQ artan doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bununla birlikte TQ'un, cisplatin gibi kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında bu ilaçların etkilerine sinerjik etki sağladığını bildirmişlerdir. Ayrıca immünoblot yöntemiyle yaptıkları çalışmada artan TQ konsantrasyonunun, amacı DNA hasarı ve proapopitotik mitokondriyal sinyal yolağının inaktif hale getirilmesi olan Akt fosforilasyonunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği sonucuna varmışlardır (Attoub ve ark 2013).

PI3K/Akt yolağı hücre büyümesini, hücre çoğalmasını, hücre sağ kalımını ve tümör oluşumunu kontrol eden önemli bir sinyal yolağıdır (Franke ve ark 2003). Arafa ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un, insan meme kanseri MCF-7 hücre serisinin bir alt türü olan DOX dirençli MCF-7 hücrelerindeki antiproliferatif etkisini

PI3K/Akt yolağını inceleyerek araştırmışlardır. MTT yöntemi ile yaptıkları çalışmada hücreler, TQ'un 25, 50, 100 μM dozlarıyla muamele edilmiş ve TQ'un etkisi uygulamadan sonraki 12, 24, 48. saatlerde analiz edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda kontrol grubuna kıyasla TQ'un artan doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, 100 μM TQ'un 12, 24, 48. saat sonunda hücrelerde sırasıyla yaklaşık %70, %50, %35 oranında inhibisyon sağladığını bildirmişlerdir. Ayrıca TQ'un Akt fosforilasyonunu inhibe ederek apopitozu indüklediği, PTEN gen ekspresyonunu artırdığı, bu artışa paralel olarak p53 ve p21 gen ekspresyonlarını da artırarak kanserli hücrelerin büyümesini G2/M fazında durdurduğunu bildirmişlerdir (Arafa el ve ark 2011).

Meme kanseri tedavisinde yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için meme kanseri gelişimi ve ilerlemesinden sorumlu moleküler faktörleri inceleyen pek çok çalışma yapılmıştır. Connelly ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un, insan meme kanseri dokularında ve hücre serilerinde aktive olan, hücre proliferasyonu, anjiogenez ve metastazında etkili bir transkripsiyonel faktör olan NF-kB'ye (Nükleer faktör kappa B) etkisini *in vivo* PyVT (polioma orta-T onkogentransjenik) fare modeli üzerinde araştırmışlardır. TQ'la muamele ettikleri farelerde, kontrol grubuna kıyasla tümör hacmi ve ağırlığında belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlardan TQ'un NF-kB inhibisyonunu sağlayarak hücre proliferasyonunu azalttığını ve apopitozun indüklendiğini bildirmişlerdir (Connelly ve ark 2011).

Effenberger ve ark. yaptıkları çalışmada ise, TQ'un, farklı alkil gruplarıyla (monoterpen, seksiterpen, betulinik asit v.b.) türevlendirilmiş konjugatlarının antikanserojenik etkisi HF malign olmayan insan deri fibroblast, HL-60 insan lösemi, 518A2 melanoma, çoklu ilaca dirençli KB-V1/Vbl serviks ve MCF-7/Topo meme kanseri hücre serilerinde incelenmiştir. Konjugatlar TQ'un 6. karbonuna değişik yan zincir uzunluğuna sahip alkil gruplarının esterleştirilmesiyle elde edilmiştir. MTT yöntemi ile yaptıkları hücre proliferasyonu analizinde yan zincir uzunluğu kısa 4 karbonlu olan türevlerin, yan zincir uzunluğu uzun çok karbonlulara göre daha antiproliferatif etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. TQ'un 72. saat sonunda IC_{50} konsantrasyonu 518A2 hücrelerinde 3,9 ± 0,7 μM, çoklu ilaca dirençli KB-V1/Vbl hücrelerinde 7,0 ± 1,7 μM, MCF-7/Topo hücrelerinde 6 μM, malign olmayan deri fibroblast hücrelerinde ise 17,6 μM olarak hesaplanmıştır. En düşük IC_{50}

konsantrasyonu ise, HL-60 hücrelerinde 130 ± 20 nM olarak hesaplanmıştır (Effenberger ve ark 2010).

DOX, streptomiçes metaboliti olup, kanser hastalarında kemoterapötik tedavide kullanılan antrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Yumuşak doku sarkoma ve lenfoma tümörlerine karşı antitümöral etkileri son derece yüksektir. Buna karşın kardiyotoksite ve yüksek çoklu ilaç direnci yüzünden kemoterapötik tedavide klinik olarak kullanımı sınırlıdır. Effenberger ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada, yalnız TQ, yalnız DOX ve eşit miktarda alınarak oluşturulan DOX-TQ konjugatının HF, HL-60, 518A2, HT-29, KB-V1/Vbl, MCF-7/Topo hücre serilerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiştir. MTT yöntemi ile yaptıkları hücre canlılık deneyinde 72. saat sonunda hesapladıkları IC_{50} konsantrasyonlarını kıyasladıklarında, başta HL-60 ve MCF-7/Topo hücre serileri olmak üzere, tüm kanserli hücre serilerinde DOX-TQ konjugatının hücre proliferasyonunu belirgin derecede inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca DOX-TQ konjugatının proapopitotik kaspaz 3, 8, 9 gen ekspresyonlarını artırarak apopitozu indüklediğini ve serbest radikal miktarını düşürdüğünü bildirmişlerdir (Effenberger-Neidnicht ve Schobert 2011).

TQ, lipofilik kabiliyeti yüksek, hidrofilik kabiliyeti düşük bitkisel kaynaklı bir ilaçtır. Suda çözünürlülüğünün az olması kemoterapötik tedavide biyoyararlanımını sınırlandırırken, yağda çözünürlülüğünün fazla olması da yetersiz formülasyon karakterine yol açmaktadır. Lipozomlar ise, TQ gibi bitkisel ilaçların söz konusu problemlerini gideren çok yönlü ilaç taşıyıcılarıdır. Odeh ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ ve TQ-LP'ın (TQ yüklü lipozom) antiproliferatif etkisini MTT yöntemi ile MCF-7, T-47D ve PLF (periodontal doku fibroblast) hücrelerinde analiz etmişlerdir. TQ-LP'ın IC_{50} konsantrasyonu MCF-7, T-47D, PLF hücrelerinde sırasıyla 200µM, 75 µM, 350 µM hesaplanırken, TQ'un IC_{50} konsantrasyonu MCF-7, T-47D, PLF hücrelerinde sırasıyla 40 µM, 15 µM, 85 µM hesaplanmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında lipozomlar TQ'un fiziksel kabiliyetini düzenleyip dengelerken, antiproliferatif etki gösterdiği konsantrasyon değerini yükselttiği ortaya çıkmaktadır (Odeh ve ark 2012).

Hücrede, sinyal iletimi, hücre gelişimi, proliferasyon ve apopitozu düzenleyen yolaklarda meydana gelen değişimler meme kanserinde rol oynarlar. Bu nedenle PI3K/Akt sinyal yolağı meme kanseri çalışmalarında önemli bir yere sahiptir

(Yuan ve Cantley 2008). Rajput ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un PI3K/Akt sinyal yolağına olan etkisini incelemişlerdir. MTT yöntemi ile yaptıkları hücre proliferasyonu çalışmasında MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47D meme kanseri hücreleri 12, 24, 48 saat süreyle 0-160 μM arasında değişen dozlarda TQ'la muamele edilmiştir. 12. saat sonunda tüm hücrelere karşı TQ'un IC_{50} konsantrasyonu 60-90 μM arasında değişirken, 24. saat sonunda bu değer 25-35 μM aralığına gerilemiş, 48. saat sonunda 12-20 μM olarak hesaplanmıştır. TQ, antiproliferatif etkisini en fazla T-47D ve MDA-MB-468 hücrelerinde göstermiş, 48. saat sonunda IC_{50} konsantrasyonu 18.06 ± 0.71 ve12.30 ± 0.62 μM olarak hesaplanmıştır. Western blot yöntemi ile yaptıkları protein analizinde ise Bcl-2 ve survivin antiapopitotik protein seviyelerinin azaldığını, Bad ve Bax proapopitotik protein seviyelerinin yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlarla TQ'un, hücre siklusunu G1 fazında durdurduğunu, hücre siklusunu olumsuz etkileyen siklin D1 protein translasyon miktarını inhibe ederek apopitozu indüklediğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri tüm bu olumlu sonuçlar TQ'un PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe ettiğini ortaya koymaktadır (Rajput ve ark 2013a).

Tamoksifen (TAM), selektif östrojen reseptör modülatörlerinin kaynağı olup, meme kanserinde kullanılan sentetik nonsteroid yapıda bir antiöstrojen ajandır. Diğer antiöstrojenlere oranla daha güçlü bir antitümör etkisi ve daha az sistemik etkilerinin olması önemli avantajıdır (Jordan 1988). TAM'in, östrojen reseptörü negatif hastalarla kıyaslandığında, östrojen reseptörü pozitif hastalarda daha faydalı olduğu bildirilmektedir (Ctsu 2005). Rajput ve ark. yaptıkları bir diğer çalışmada, TQ'un ve TAM'in bir antiapoptotik protein olan XIAP aracılı PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonuna etkisi *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. MTT yöntemi kullanılarak yapılan proliferasyon deneyinde MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47D hücreleri ile malign olmayan NIH/3T3 ve HaCaT meme kanseri hücreleri değişik konsantrasyonlarda TQ, TAM, TQ-TAM'e maruz bırakılmıştır. Kullanılan madde konsantrasyonu TQ için 0.01-60 μM, TAM için 0.01-40 μM, TQ-TAM için TQ'dan 5 μM, TAM'den 0.01-20 μM aralığında değişmektedir. Elde ettikleri sonuçlarda, 48. saat sonunda özellikle MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47D hücrelerinde hesaplanan TQ-TAM için IC_{50} konsantrasyonu daha düşük olup 2,80-5,09 μM arasında değişmektedir. Ayrıca yaptıkları invazyon ve migrasyon deneylerinde TQ-TAM'in son derece olumlu sonuçlar verdiği, apopitozun

indüklendiği, hücre siklusunun G1 fazında durdurulduğu bildirilmektedir. *İn vivo* yaptıkları çalışmada ise, TQ-TAM'in ksenograft modeliyle oluşturulmuş MDA-MB-231 hücreleri taşıyan farelerde tümör kitlesinin büyüklüğünü ve ağırlığını düşürdüğü bildirilmektedir (Rajput ve ark 2013b).

Yapılan pek çok çalışma ile TQ'un antiproliferatif ve antiinflamatuar etki gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan yeni araştırmalar TQ'un bu etkilerini artırmak için TQ ile birlikte hangi terapötik bileşiklerin kullanılabileceğini göstermektedir. Bu amaca yönelik olarak Ravindran ve ark. yaptıkları bir çalışmada polimer esaslı nanoparçacık yaklaşımını kullanmışlardır. NP'ler (Nanopartikül), sistemik atıl taşıyıcılar olup, terapötik bileşiklerin hedef dokulara ve hücrelere taşınmasında ve biyoyararlanımlarının artırılmasında etkin rol oynamaktadır. Söz konusu bu çalışmada TQ, PLGA (poli laktik-ko-glikolik asit) ve PEG-5000 (polietilen glikol) içeren biyolojik nanopartikülat formülasyonunda %97,5 verimle kapsüllenerek TQ-NP kapsülü oluşturulmuştur. Proliferasyon deneyinde MTT yöntemi kullanılarak KBM-5 lösemi, HCT-16 kolon, PC-3 prostat, U-266 melanoma kanser hücreleri 10 μM yalnız TQ'a ve her birinin konsantrasyonu 10 μM olan TQ-NP'a 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Hesaplanan IC_{50} konsantrasyonlarına bakıldığında TQ-NP'ın IC_{50} konsantrasyonu tüm bu hücrelerde daha düşük değerde olup hücre proliferasyonunu daha düşük konsantrasyonda inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca TQ-NP'ın, yalnız TQ'a kıyasla hücre proliferasyonu, metastazı ve anjiogenezinde önemli olan NF-kB aktivitesini daha kolay inhibe ettiği, siklin D1, matriksmetalloproteinaz (MMP-9), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), gen ekspresyonlarını baskılayarak apopitozu uyardığı bildirilmektedir (Ravindran ve ark 2010).

NQO1 (NADPH kinon oksidoredüktaz 1) meme kanseri hücrelerinde yüksek miktarda üretilen multifonksiyonel sitoprotektif bir flavonoiddir. TQ gibi kinon türevi bileşiklerin sitotoksik etkisini inhibe eder. Western blot yöntemi ile yapılan protein analizlerinde MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, diğer meme kanseri hücrelerine oranla daha fazla NQO1 ekspresyonunun olduğu saptanmıştır. Sutton ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un, NQO1 aracılı meme kanseri hücrelerine olan etkileri incelenmiştir. Hücre proliferasyon deneyi MTT yöntemi ile yapılmış, HER2 negatif dört farklı meme kanseri hücresi (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-

47D) 2,5-25 μM arasında değişen konsantrasyonda TQ'a 24, 48, 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Hücre proliferasyon deneyi hücrelerin östrojen, progesteron reseptörleri ve p53 durumu göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda, MCF-7 dışındaki hücrelerde TQ artan doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ederken, MCF-7 hücrelerinde 72. saat sonunda inhibisyon gözlenmemiştir. MCF-7 hücrelerinde TQ antiproliferatif etkisini 24. saat sonunda ancak 100 μM konsantrasyonda göstermiştir (Sutton ve ark 2012).

Sutton ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada, p53 yokluğunda TQ'un östrojen reseptörü negatif MDA-MB-231, MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerine olan etkisini araştırmışlardır. Hücre proliferasyon deneyi, MTT yöntemi kullanılarak hücrelerin 24, 48, 72 saat süreyle 1-25 μM arasında değişen TQ konsantrasyonuyla muamele edilmesiyle yapılmıştır. Elde ettikleri sonuçlarda, TQ'un MDA-MB-468 hücrelerinde aynı zaman aralığında daha düşük konsantrasyonda antiproliferatif etki sağladığını bildirilmektedir. Ayrıca TQ'un hücre siklusunu G1 fazında durdurarak apopitozu indüklediği bildirilmiştir (Sutton ve ark 2014).

Meme kanserli vakalarda, hastalığın erken teşhis edildiği durumlarda lokal tedavi için cerrahi müdahale ve radyoterapi yöntemleri kullanılırken, uzak organlara metastazı olan vakalarda sistemik tedavi için immünoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Lokal ve sistemik tedavi yöntemlerinin sıralı bir şekilde uygulanma zorunluluğu olmayıp, hastanın ihtiyacına göre en fazla yararı sağlamak, kullanılan yöntemin yan etkilerini azaltmak için yöntemler karıştırılarak kullanılabilir (Jameel ve ark 2004).

Kullanılan radyasyon dozuna karşı tümör hücrelerinin gösterdiği direnç ile normal hücre/doku toleransı, radyoterapi uygulamalarının başarısını etkileyen iki temel unsurdur. Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarda, radyoterapi uygulamalarının kemoterapi uygulamalarıyla kombine edildiği kemo-radyo uygulamaların kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkiyi artırdığı bildirilmektedir. Bu bilgiler ışığında radyoterapi uygulamalarına sinerjik ve supraaditif etki sağlayacak, ucuz, sindirimi toksik olmayan biyoaktif moleküller keşfedilmeye çalışılmaktadır (Liang ve ark 2003, Jameel ve ark 2004). Velho ve ark. yaptıkları bir çalışmada, IR (iyonize radyasyon) ile kombine edilen TQ'un MCF-7 ve T-47D meme kanseri

hücrelerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiştir. MTT yöntemi ile yaptıkları proliferasyon deneyinde 1-250 μM arasında TQ ile 0-3 Gy (Gray) arasında IR 24 saat süreyle hücrelere muamele edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda TQ'un tek başına muamele edildiği MCF-7 ve T-47D hücrelerinde IC_{50} konsantrasyonu sırasıyla 104 μM ve 37 μM iken, TQ-IR kombinasyonunun IC_{50} konsantrasyonu sırasıyla 72 μM ve 18 μM olarak hesaplanmıştır. Çıkan sonuçlar TQ-IR kombinasyonunun hücre proliferasyonunu daha düşük konsantrasyonda inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca TQ-IR kombinasyonunun MCF-7 ve T-47D hücrelerini sırasıyla %55 ve %68 oranında apopitoza sürüklediği, hücre siklusunu G1/S ve G2/M fazlarında durdurduğu bildirilmektedir (Velho-Pereira ve ark 2011).

Peroksizom çoğaltıcısı ile uyarılan reseptörler (PPAR) her biri farklı genler tarafından kodlanan, insan vücudunun değişik bölgelerinde değişik ifade edilen ligand aktivasyonlu transkripsiyon faktörleridir. PPAR'lerin α, β veya γ şeklinde üç türü olup PPAR- γ'nın hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apopitoz olaylarında önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Berger ve Moller 2002). PPAR-γ'nın antiproliferatif etkisi, meme kanseri hücre serileri dahil olmak üzere birçok değişik kanser hücresi serisinde ortaya konmuştur (Kumar ve ark 2009). Woo ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un, MCF-7, MDA-MB-231 ve BT-474 meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkisi PPAR-γ sinyal yolağı üzerinden değerlendirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda, TQ'un PPAR-γ sinyal aktivitesini artırarak meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, özellikle kaspaz aktivasyonu yoluyla MCF-7 hücrelerindeki apopitoz ve Bax/Bcl-2 oranını artırdığı, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu ve migrasyonunu baskıladığı bildirilmektedir (Woo ve ark 2011).

Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı, apopitoz, hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi hücresel faliyetlerin düzenlenmesinde son derece önemli bir yolaktır. Woo ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada, ksenograft fare modeliyle oluşturulmuş meme kanseri üzerinde DOX ile birlikte uygulanan TQ'un antiproliferatif etkisi MAPK sinyal yolağı ve ROS miktarı üzerinden araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda TQ'un, p38 tümör baskılayıcı genini aktive ederek, MAPK sinyal yolağını inhibe ettiği, ROS

miktarını azalttığı, XIAP ve Bcl-2 gibi antiapopitotik genleri baskılayarak apopitozu indüklediği bildirilmektedir (Woo ve ark 2013).

Motaghed ve ark. yaptıkları bir çalışmada, TQ'un antiproliferatif etkisi MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 24, 48, 72 saat süreyle 25, 50, 100 µM konsantrasyonda TQ'a maruz bırakılmasıyla analiz edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda TQ'un artan doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiş, IC_{50} konsantrasyonu 25 µM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 12 saat sonunda 25 µM TQ'un sub-G1 fazında belirgin hücre birikmesini sağladığını, 50 µM TQ'un ise G2 fazını durdurduğu, 24 saat sonunda 25 µM ve 100 µM TQ'un geç apopitotik hücre sayısını yükselttiği, 72 saat sonunda ise 25 µM TQ'un S fazını durdurduğu bildirilmektedir (Motaghed ve ark 2013).

Resveratrol, başta kırmızı üzüm olmak üzere, yer fıstığı ve çilekte bulunan önemli bir polifenolik ve fitoaleksin maddedir. Günümüzde resveratrol, kanser hastalarında kemoterapötik tedavide kullanılmasına karşın, tedavide etkin bir sonuç almak için yüksek doz uygulaması gerektirmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar resveratrol'ün bu dezavantajını gidermek adına yoğunlaşmış olup, kanser hücrelerine karşı daha düşük dozda daha etkin olabilecek resveratrol türevleri araştırılmaktadır. Jeong ve ark. yaptıkları bir çalışmada, MCF-7 insan meme kanseri hücreleri, 90-150 µM arasında değişen konsantrasyonda resveratrol ve 30-90 µM resveratrol türevi olan HS-1793 bileşiğine 72 saat süreyle maruz bırakılarak kanser hücrelerinin ATP konsantrasyonlarındaki değişim biyolüminesans somatik hücre deney kiti ile analiz edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda, 24. saatten sonra HS-1793 bileşiğinin resveratrol'a oranla daha düşük konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinin ATP konsantrasyonunu düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Jeong ve ark 2012).

Vinorelbin, metastatik meme kanserli hastaların kemoterapötik tedavilerinde kullanılan yarı sentetik bir bitki alkoloididir. Meme kanserinde EGFR ifadesindeki farklılığa vinorelbin'in etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, EGFR ifadesi birbirinden farklı MCF-7, MDA-MB-435 ve MDA-MB-435s insan meme kanseri hücre serilerinden oluşan 50 meme kanserli örnek kullanılarak vinorelbin'in bu hücre serilerinin enerji düzeyine olan etkisi ATP-Tümör kemo duyarlılık testi (TCA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında bu 50 örneğin

tamamında vinorelbin'in %42 oranında ATP konsantrasyonunu düşürdüğü ve MCF-7 hücre serilerinin vinorelbin'e karşı daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Ning ve ark 2011).

Literatür taramamızda, TQ ile yapılmış herhangi bir enerji düzeyi çalışmasına rastlanılmadı. Ancak farklı bazı etken maddelerle veya bunların kemoterapötik ilaç kombinasyonlarıyla yapılmış enerji düzeyi çalışmaları görülmüştür.

Berberin, antitümör etkisinin yanında kalp-damar koruyucu etkisi olan bir alkoloiddir. Lv ve ark. yaptıkları bir çalışmada, berberin'in, kemoterapötik tedavide kullanılan DOX kaynaklı kardiyomiyosit apopitozunu hücre içi AMP ve ATP konsantrasyonunu artırarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Lv ve ark 2012).

3,3-Diindolmetan (DIM) lahana, brokoli ve brüksel lahanası gibi sebzelerin yapısında bulunan antitümöral etkili biyoaktif bir bileşiktir. Gong ve ark. yaptıkları bir çalışmada, DIM'ın, MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde hücre içi ATP konsantrasyonunu uygulamadan 2 saat sonra %36 oranında düşürdüğünü bildirmişlerdir (Gong ve ark 2006).

α-Tomatin, domatesin yapısında bulunan steroid yapıda bir glikoalkoloiddir. Olgunlaşmamış yeşil domateste daha fazla bulunmasına karşın, olgunlaşmış domateste miktarı azalmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile α-Tomatin'in antikanser etkili bir bileşik olduğu bildirilmektedir. Sucha ve ark. yaptıkları bir çalışmada, α-Tomatin'in, MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin ATP konsantrasyonuna olan etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla 1, 3, 6, 9 μM α-Tomatin, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 saat süreyle MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Biyolüminesans ATP deney kiti ile yaptıkları enerji düzeyi çalışmasında elde ettikleri sonuçlarda α-Tomatin'in doz ve zamana bağlı olarak MCF-7 hücrelerinin ATP konsantrasyonunu kontrol grubuna kıyasla belirgin derecede düşürdüğü bildirilmektedir (Sucha ve ark 2013).

Zoledronik asit (Zol), bifosfonat grubu bir bileşik olup, kemik metastazı olan meme kanserli hastaların kemoterapötik tedavilerinde kullanılan antitümöral bir bileşiktir. Fehm ve ark. ATP-TCA deney kiti ile yaptıkları bir çalışmada, Zol'in

meme kanseri hücrelerinin ATP konsantrasyonunu belirgin derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir (Fehm ve ark 2012).

Kaur ve ark. yaptıkları bir diğer bir çalışmada ise, 6-Merkaptopurin (6-MP) ve dasatinib kombinasyonunun, MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri, NCI-H23 ve NCI-H460 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, A498 ve 786-O böbrek kanseri hücrelerinin ATP konsantrasyonuna olan etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, böbrek kanseri hücreleri bu kombinasyon bileşiğe direnç gösterirken, meme ve akciğer kanseri hücrelerinin ATP konsantrasyonunda belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir (Kaur ve ark 2013).

Bu çalışmada kullanılan TQ'un MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar yukarıda belirtilen diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız doz miktarları literatürlerde kullanılan doz miktarlarına paralel olup, çalışmamızı diğer çalışmalardan ayıran en önemli fark proliferasyon etkisinin daha geniş bir zaman diliminde gözlemlenmiş olmasıdır. Çalışmamızda TQ, MCF-7 hücrelerinin inhibisyonuna etkisini uygulanmadan sonra 64. saatte göstermiştir. TQ, inhibitör etkisini en fazla 100µM dozda gösterirken, en az etkiyi 5 ve 25 µM da göstermiştir. TQ için 129. saat sonunda hesapladığımız IC_{50} konsantrasyonu 11,6 µM olup, hesaplanan bu değer yukarıda geçen IC_{50} konsantrasyonlarıyla uyum göstermektedir. Ayrıca hücre proliferasyon inhibisyonu 64. saatte başlamasına rağmen istatistiki anlamlılık 88. saatten başlayarak artmaktadır.

Çalışmamızda TQ'un, MCF-7 hücre serisindeki enerji düzeylerine etkisi incelendiğinde ise TQ 72. saatten itibaren hücrelerin ATP, ADP, AMP düzeylerini ve toplam enerji yüklerini anlamlı olarak düşürmekte olup, zaman ilerledikçe bu anlamlılığın arttığı görülmüştür. Bu durumun hücre proliferasyonu inhibisyon değerlerimizle paralellik gösterdiği düşünüldüğünde hücre proliferasyonu inhibisyonu ile enerji düzeyleri arasındaki etkileşimden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma timokinon'un, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle ortaya koymuştur. Aynı şekilde kanser hücrelerinin enerji metabolizmasındaki değişiklikler, ATP, ADP, AMP düzeyleri ölçülerek ve toplam enerji yükleri hesap edilerek incelenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma timokinon'un antikanserojenik, antitümöral ve antiproliferatif özellikleri başta olmak üzere tüm yönleriyle kanser hastalarında diğer tedavilere destek olabileceği görüşlerini güçlendirmektedir. Kanser hücrelerine uygulanan antikanserojenik özellikteki timokinon'un hücre proliferasyonunu inhibe etmesiyle, hücrelerin enerji düzeylerindeki değişim arasındaki ilişki net olarak bilinmemektedir. Etki mekanizmaları ile ilgili daha ileri çalışmalar bu konuya büyük katkı sağlayacaktır

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Timokinon'un Meme Kanseri Hücresine Etkisi

Hakan VATANSEV

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014

Nigella Sativa (Çörek otu)'nın en önemli biyoaktif bileşeni olan timokinon'un antikanserojenik, antitümöral, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri nedeniyle son yıllarda bir çok çalışmaya konu olduğu göze çarpmaktadır. Hücre kültürü ve deney hayvan çalışmalarıyla, karsinogenezde timokinon'un kanser önleyici etkileri ortaya konmuştur. Buna karşın bu etkilerinin moleküler etki mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır.

Çalışmamızda kanser hücresi proliferasyonu inhibitörleri olarak değerlendirilen çörek otu'nun en önemli bileşeni timokinon'un ($C_{10}H_{10}O_2$; 2–izopropil-5-metil-1,4–benzokinon), MCF-7 meme kanseri hücre serisinde, farklı konsantrasyon ve sürelerde hücre proliferasyonu üzerine etkisini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle (xCELLigence) ortaya koymayı amaçladık.

Bu amaçla hücre kültürü laboratuvarında timokinon uygulanan MCF-7 hücrelerinin doz ve zaman bağımlı olarak proliferasyonunun inhibisyonu gözlemlendi. Hücrelerin proliferasyonundaki değişiklikler, gerçek zamanlı hücre algılama sistemi kullanılarak değerlendirildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, mikro elektrot içeren özel hücre kültürü kuyucuklarında, deney süresince her 15 dk'da bir sürekli olarak izlendi ve eş zamanlı doz gruplarından alınan örneklerde enerji düzeyleri analizleri gerçekleştirildi. Hücrelerin enerji düzeyi HPLC yöntemi ile belirlendi.

Sonuç olarak, timokinon'un meme kanseri hücresi proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği ve enerji düzeylerini de azalttığı gözlenmiştir. Bu değerlendirmeyle birlikte, timokinon'un hücre proliferasyonuna etki mekanizmasıyla ilgili daha ileri çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: MCF-7; proliferasyon; timokinon; xCELLigence.

7. SUMMARY

Effect of Thymoquinone on the Breast Cancer Cell

Thymoquinone, which is the most crucial bioactive component of *Nigella sativa* (Black cumin), has recently attracted the attention of researchers, due to anti-carcinogenic, antitumoral, antioxidant and antiproliferative properties. Cell culture and experimental animal studies have been shown cancer-preventive effects of thymoquinone in carcinogenesis. However, molecular action mechanisms of these effects are not clear.

Thymoquinone ($C_{10}H_{10}O_2$; 2–isopropyl-5-methyl-1,4–benzoquinone) is the most important component of black cumin, evaluated as inhibitors of proliferation of cancer cells. In our study, we investigated the effect of thymoquinone with different concentrations and durations to cell proliferation in MCF-7 breast cancer cell line by real-time analyser (xCELLigence).

A real-time cell analyzer was used to evaluate the effects of different doses of thymoquinone on the proliferation of MCF–7 breast cancer cell line. Changes in the number of cells in special cell culture flasks that containing micro-electrodes was observed continuously every 15 minutes during the experimental period and simultaneous energy levels in samples collected from dose group analyzes were performed. Energy levels of cells measured by HPLC method.

As a result, thymoquinone inhibited the human breast cancer cells proliferation as dose and time dependent manner and it has been observed that the energy levels of cells reduced. Studies of the mechanisms of action of thymoquinone on cell proliferation will be informative in this regard.

Keywords: MCF-7; proliferation; thymoquinone; xCELLigence.

8. KAYNAKLAR

1. Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of Nigella sativa oil and its major component, thymoquinone, in mice. Eur J Pharmacol. 2000; 400(1): 89-97.

2. Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on Nigella sativa seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. Mutat Res. 2002;516(1-2): 11-17.

3. Abukhader MM. Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: Fact or fiction? Pharmacogn Rev. 2013; 7(14): 117-120.

4. http://www.acebio.com./productlist 2. Erişim tarihi: 24.12.2013

5. http://www.aceabio.com/theory.aspx. Erişim tarihi: 24.12.2013

6. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by myc proteins. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6(8): 635-645.

7. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. Planta Med. 2008; 74(13): 1560-1569.

8. Ahmed WA, Hassan SA, Galeb FM, El-Taweel MA, Abu-Bedair FA. The in vitro promising therapeutic activity of thymoquinone on hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Global Veterinaria. 2008; 2(5): 233-241.

9. Akhtar N, Alakloby OM, Aljabre SHM, Alqurashi ARM, Randhawa MA. Comparison of antifungal activity of thymoquinone and amphotericin B against Fusarium solani in vitro. Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences). 2007; 8(2): 1428.

10. Al-Enazi MM. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice. Pak J Biol Sci. 2007; 10(18): 3115-3119.

11. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of Nigella sativa. J Ethnopharmacol. 2001; 76(1): 45-48.

12. Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol. 2006; 543(1): 40-47.

13. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, El-Kashef HA. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2001; 110(5-6): 333-345.

14. Al-Naqeep G, Ismail M, Yazan LS. Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. J Funct Foods. 2009; 1(3): 298-303.

15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York, Garland Science, 2002; (19) 1065-1126.

16. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res. 2003; 17(4): 299-305.

17. Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of Nigella sativa and its active principle, thymoquinone. J Ethnopharmacol. 2005; 101(1-3): 116-119.

18. Alsaif MA. Effect of thymoquinome on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. J Med Sci. 2007; (7): 1164-1170.

19. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apopitoz Nedir? Tıp Araş Derg. 2008; 6(2): 93-104.

20. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. Breast Cancer Res. 2002; 4(5): 197-201.

21. Arafa el SA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, El-Mahdy MA, Wani AA. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. Mutat Res. 2011; 706(1-2): 28-35.

22. Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Sayan H,Celik IL. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. Nutr Res. 2005;25(7): 673-680.

23. Aslan A, Temiz M, Yiğit Y, Can R, Canbolant E, Yiğit F. Hemşirelik Yüksek Okulu öğrencilerinin meme kanseri hakkında bilgi, tutum ve davranışları. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni. 2007; 6(3): 193-198.

24. Aslan FE, Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. Meme Sağlığı Dergisi. 2007; 3: 63-68.

25. Atalay C. HER2 pozitif meme kanserine cerrahi yaklaşım nasıl olmalı? Meme Sağlığı Dergisi. 2010;6(1).

26. Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, Al Safi M, Takahashi T, Adem A. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. Fundam Clin Pharmacol. 2013; 27(5): 557-569.

27. Aydıner A, Dinçer M, Topuz E. Klinik Onkoloji. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları-Tunç Matbaası, 2000: 70-81.

28. Bacakgüllü E, Avcı G. Effects of thymoquinone on plasma leptin, ınsulin, thyroid hormones and lipid profile in rats fed a fatty diet. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2013; 19(6).

29. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. J Ethnopharmacol. 1999; 67(2): 135-142.

30. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. Toxicology. 2000; 143(3): 219-226.

31. Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Sohaibani MO, Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. Can J Physiol Pharmacol. 1997; 75(12): 1356-1361.

32. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. Drug Chem Toxicol. 2003; 26(2): 87-98.

33. Balabas A, Skasko E, Nowakowska D, Niwinska A, Blecharz P. Novel germline mutations in BRCA2 gene among breast and breast-ovarian cancer families from Poland. Fam Cancer. 2010; 9(3): 267-274.

34. Bamosa AO, Ali BA, Al-Hawsawi ZA. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. Indian J Physiol Pharmacol. 2002; 46(2): 195-201.

35. Bartlett DL, Charland S, Torosian MH. Effect of glutamine on tumor and host growth. Ann Surg Oncol. 1995; 2(1): 71-76.

36. Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. Oncologist. 2011; 16(1):12-19.

37. Baykal Y, Gök F, Erikçi SD. Serbest radikaller ve oksidatif hasar. Sendrom. 2002; 14(1): 94-100.

38. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Yayınları No:3255, 1984; 211.

39. Baytop T. Geçmişte ve Bugün Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi Ltd Şti,1999; 359

40. http://www.belgeci.com/mitoz-bolunme.html. Erişim tarihi: 20.02.2014

41. Bellosillo B, Tusquets I. Pitfalls and caveats in BRCA sequencing. Ultrastruct Pathol. 2006; 30(3): 229-235.

42. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med. 2002; 53: 409-435.

43. Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. Cell Cycle. 2010; 9(17): 3506-3514.

44. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. S Afr J Bot. 2010; 76(2): 210-216.

45. Brooks SA, Harris A. SDS-PAGE and Western Blotting to Detect Proteins and Glycoproteins of Interest in Breast Cancer Research In: Osborne C, Brooks SA, editors. Breast Cancer Research Protocols. Totowa. New Jersey, Humana Press, 2006; 120(3); 217-229

46. Budancamanak M, Kanter M, Demirel A, Ocakcı A, Uysal H, Karakaya C. Protective effects of thymoquinone and methotrexate on the renal injury in collagen-induced arthritis. Arch Toxicol. 2006; 80(11): 768-776.

47. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytother Res. 2000; 14(5): 323-328.

48. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2008; 9(3): 51-61.

49. Campello S, Scorrano L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. Embo Reports. 2010; 11(9): 678-684.

50. Cancer IARC. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon, France, 2013

51. Chakrabarty A, Emerson MR, Levine SM. Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. Mult Scler. 2003; 9(4): 372-381.

52. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(4): 821-846.

53. Chung HJ, Levens D. C-myc expression: keep the noise down! Mol Cells. 2005; 20(2): 157-166.

54. Colak T, Akca T, Dirlik M, Caglıkulekci M, Seyrek E, Cinel L, Bozdogan R, Aydın S. Signet ring cell carcinoma of the breast as a source of pelvic floor metastatic mass. Acta Chir Belg. 2005; 105(2): 224-226.

55. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology identifying the causes and preventability of cancer? Nat Rev Cancer. 2006; 6(1): 75-83.

56. Compagni A, Christofori G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. Br J Cancer. 2000; 83(1): 1-5.

57. Connelly L, Barham W, Onishko HM, Sherrill T, Chodosh LA, Blackwell TS,Yull FE. Inhibition of NF-kappa B activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden. Oncogene. 2011; 30(12): 1402-1412.

58. Cooper C. Organic Chemist's Desk Reference. 2th ed. Boca Rotan, CRC Press, 2010; 140.

59. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med. 2008; 358(5): 502-511.

60. Ctsu RI. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet. 2005; 365: 1687-1717.

61. Curado M, Edwards B, Shin H, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer Incidence in Five Continents. Lyon, IARC Scientific Publications No:160, 2007:IX.

62. Dattner AM. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future.Dermatol Ther. 2003: 16(2): 106-113.

63. Dauksas E, Venskutonis P, Sivik B. Comparison of oil from Nigella damascena seed recovered by pressing, conventional solvent extraction and carbon dioxide extraction. J Food Sci. 2002; 67(3): 1021-1024.

64. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. Oncogene. 2010; 29(3): 313-324.

65. Driedger SM, Eyles J. Organochlorines and breast cancer: the uses of scientific evidence in claims making. Soc Sci Med. 2001; 52(10): 1589-1605.

66. Effenberger-Neidnicht K, Schobert R. Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin. Cancer Chemother Pharmacol. 2011; 67(4): 867-874.

67. Effenberger K, Breyer S, Schobert R. Terpene conjugates of the Nigella sativa seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. Chem Biodivers. 2010; 7(1): 129-139.

68. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of Nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. J Ethnopharmacol. 2003; 84(2-3): 251-258.

69. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of Nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2000; 72(1-2): 299-304.

70. El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HP. Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. J Ethnopharmacol. 2002;81(2): 161-164.

71. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. Int J Cancer. 2005; 117(3): 409-417.

72. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N, Takewaki T. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. Int Immunopharmacol. 2002; 2(11): 1603-1611.

73. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. Int Immunopharmacol. 2005; 5(1): 195-207.

74. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. Int Immunopharmacol. 2006a; 6(7): 1135-1142.

75. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. Biochim Biophys Acta. 2006b; 1760(7): 1088-1095.

76. El Gazzar M, El Mezayen RA, Nicolls MR, Dreskin SC. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NF-kappaB nuclear transactivation. Biochimica et Biophysica Acta. 2007; 1770(4): 556-564.

77. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunol Lett.2006; 106(1): 72-81.

78. El Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (Nigella sativa) in rats: elucidation of the mechanism of action. Gen Pharmacol. 1993; 24(5): 1123-1131.

79. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat Rev Cancer. 2009; 9(8): 550-562.

80. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y, Singab AN, Okuyama T. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of Nigella sativa L. Biol Pharm Bull. 2001; 24(3): 307-310.

81. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. Res Vet Sci.2005; 79(3): 219-223.

82. Fehm T, Zwirner M, Wallwiener D, Seeger H, Neubauer H. Antitumor activity of zoledronic acid in primary breast cancer cells determined by the ATP tumor chemosensitivity assay. Bmc Cancer. 2012; 12: 308.

83. Ferrari D, Los M, Bauer MKA. P2X purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of celi death. Febs Letters. 1999; 447: 71-75.

84. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. Oncogene. 2003; 22(56): 8983-8998.

85. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. Int J Oncol. 2004a; 25(4): 857-866.

86. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. Int J Biochem Cell Biol. 2006; 38(8): 1249-1253.

87. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. Anticancer Drugs. 2004b; 15(4): 389-399.

88. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L.). J Pharm Biomed Anal. 1999; 19(5): 757-762.

89. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. Breast carcinoma in men. Cancer. 2004; 101(1): 51-57.

90. Gong Y, Sohn H, Xue L, Firestone GL, Bjeldanes LF. 3,3'-Diindolylmethane is a novel mitochondrial H(+)-ATP synthase inhibitor that can induce p21(Cip1/Waf1) expression by induction of oxidative stress in human breast cancer cells. Cancer Res. 2006; 66(9): 4880-4887.

91. Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, Lee GM. ATP release by mechanıcally loaded porcıne chondrons in pellet culture. Arthritis Rheum. 2000; 43: 1571-1579.

92. Granchi C, Minutolo F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. Chem Med Chem. 2012; 7(8): 1318-1350.

93. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. Nat Cell Bio. 2005; 7(3): 311-318.

94. Griguer CE, Oliva CR, Gillespie GY. Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. J Neurooncol. 2005; 74(2): 123-133.

95. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. Faseb J. 2009; 23(6): 1625-1637.

96. Gunduz H, Dede S, Agaoglu ZT, Atasoy N, Mert N. Serum trace elements status of rabbits supplemented with Nigella sativa, vitamins C and E, and selenium against damage by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Biol Trace Elem Res. 2002; 89(1): 65-73.

97. Hadjzade MA, Mohammadian N, Rahmani Z, Rassouli FB. Effect of thymoquinone on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. Urol J. 2008; 5(3): 149-155.

98. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytother Res. 2004; 18(3): 195-199.

99. Halawani E. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of Nigella sativa L. and their interaction with some antibiotics. Advan Biol Res. 2009; 3(5-6): 148-152.

100. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100(1): 57-70.

101. Hanazono K, Natsugoe S, Stein HJ, Aikou T, Hoefler H, Siewert JR. Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression. Oncol Rep. 2006; 15(4): 821-824.

102. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. Breast Cancer Res. 2001; 3(3): 146-149.

103. Herst PM, Berridge MV. Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. Biochim Biophys Acta. 2007; 1767(2): 170-177.

104. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, in mice. Phytomedicine. 2004; 11(1): 56-64.

105. Isik FA, Kati I, Bayram I, Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. Eur J Cardiothorac Surg. 2005; 28(2): 301-305.

106. Islam N, Begum P, Ahsan T, Huque S, Ahsan M. Immunosuppressive and cytotoxic properties of Nigella sativa. Phytother Res. 2004; 18(5): 395-398.

107. Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. Nigella sativa thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. Free Radic Biol Med. 2010; 48(5): 664-672.

108. Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Jurin M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. Exp Oncol. 2006; 28(3): 220-224.

109. Jameel JK, Rao VS, Cawkwell L, Drew PJ. Radioresistance in carcinoma of the breast. Breast. 2004; 13(6): 452-460.

110. Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. Exp Mol Med. 2013; 45: 45.

111. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009; 59(4): 225-249.

112. Jeong SH, Song IS, Kim HK, Lee SR, Song S, Suh H, Yoon YG, Yoo YH, Kim N, Rhee BD, Ko KS, Han J. An analogue of resveratrol HS-1793 exhibits anticancer activity against MCF-7 cells via inhibition of mitochondrial biogenesis gene expression. Mol Cells. 2012; 34(4): 357-365.

113. Jeremy B, John T, Lubert S. Biochemistry. 6th ed. New York, WH Freeman and co, 2007; (15): 428.

114. Jordan VC. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: a tribute to the late Arthur L. Walpole. Breast Cancer Res Treat. 1988; 11(3): 197-209.

115. Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M, Smekalova A, Lichius JJ, Kiesewetter H. Effect of Nigella sativa (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. Phytother Res. 2003; 17(10): 1209-1214.

116. http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-tedavisi.html. Erişim tarihi: 29.12.2013

117. Kanter M. Nigella sativa and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. Neurochemical research. 2008; 33(3): 579-588.

118. Kanter M, Akpolat M, Aktas C. Protective effects of the volatile oil of Nigella sativa seeds on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats: a light and electron microscopic study. J Mol Histol. 2009; 40(5-6): 379-385.

119. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of Nigella sativa L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. World J Gastroenterol.2005; 11(42): 6662-6666.

120. Kanter M, Meral I, Dede S, Gunduz H, Cemek M, Ozbek H, Uygan I. Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl4-treated rats. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003; 50(5): 264-268.

121. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. 2007; 67(16): 7782-7788.

122. Kaur G, Behrsing H, Parchment RE, Millin MD, Teicher BA. Analyses of the combination of 6-MP and dasatinib in cell culture. Int J Oncol. 2013; 43(1): 13-22.

123. Kaya MS, Kara M, Özbek H. Çörek otu (Nigella sativa) tohumunun insan hücresel bağışıklık sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri. Genel Tıp Derg. 2003; 13: 109-112.

124. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26(4): 239-257.

125. Keyomarsi K, Conte D, Toyofuku W, Fox MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. Oncogene.1995 11(5): 941-950.

126. Khader M, Bresgen N, Eckl PM. In vitro toxicological properties of thymoquinone. Food Chem Toxicol. 2009; 47(1): 129-133.

127. Khalife KH, Lupidi G. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. Free Radic Res. 2007; 41(2): 153-161.

128. Khan MA. Chemical composition and medicinal properties of Nigella sativa Linn. Inflammopharmacology. 1999; 7(1): 15-35.

129. Kiesslich T, Benno Oberdanner C, Krammer B, Plaetzer K. Fast and reliable determination of intracellular ATP from cells cultured in 96-well microplates. J Biochem Biophys Methods. 2003; 57(3): 247-251.

130. Kılıç A. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör İnhibitörleri ve Dermatolojik Yan Etkiler. Turk J Dermatol. 2012; 6(4).

131. Kıralan M. Ayçiçek yağının oksidatif stabilitesi üzerine ısırgan (Urtica diocia), keten (Linum usitassium), kişniş (Coriandrum sativum) ve çörekotu (Nigella sativa) tohum ekstraktlarının etkileri. Ankara, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi,2006

132. Kirui PK, Cameron J, Benghuzzi HA, Tucci M, Patel R, Adah F, Russell G. Effects of sustained delivery of thymoqiunone on bone healing of male rats. Biomed Sci Instrum. 2004; 40: 111-116.

133. Klijn J, Berns P, Schmitz P, Foekens J. The Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) in Human Breast Cancer: A Review on 5232 Patients. Endocrine reviews. 1992; 13(1): 3-17.

134. Kumar AP, Quake AL, Chang MK, Zhou T, Lim KS, Singh T, Hewitt RE, Salto-Tellez M, Pervaiz S, Clement MV. Repression of NHE1 expression by PPARgamma activation is a potential new approach for specific inhibition of the growth of tumor cells in vitro and in vivo. Cancer Res. 2009; 69(22): 8636-8644.

135. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J Neurochem. 2001; 79(3): 463-484.

136. Latonen L, Laiho M. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. Biochim Biophys Acta. 2005; 1755(2): 71-89.

137. Liang K, Lu Y, Jin W, Ang KK, Milas L, Fan Z. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. Mol Cancer Ther. 2003; 2(11): 1113-1120.

138. Lv X, Yu X, Wang Y, Wang F, Li H, Wang Y, Lu D, Qi R,Wang H. Berberine inhibits doxorubicin-triggered cardiomyocyte apoptosis via attenuating mitochondrial dysfunction and increasing Bcl-2 expression. PLoS One. 2012; 7(10): e47351.

139. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. Toxicol Lett. 2003; 143(2): 133-143.

140. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of Nigella sativa oil against the liver damage induced by Schistosoma mansoni infection in mice J Ethnopharmacol. 2002; 79(1): 1-11.

141. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. J Enzyme Inhib Med Chem. 2004; 19(5): 431-436.

142. Mansour MA. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. Life Sci. 2000; 66(26): 2583-2591.

143. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. J Clin Oncol. 2000; 18(13): 2626-2634.

144. Micchel A, Tomassini A, Puccetti C, Valerio M, Peluso G, Tuccillo F, Calvani M, Manetti C, Conti F. Metabolic profiling by 13C-NMR spectroscopy: [1,2-13C2]glucose reveals a heterogeneous metabolism in human leukemia T cells. Biochimie. 2006; 88(5): 437-448.

145. Miller CM, Boulter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, Saunders BM, Wiley JS, Smith NC. The role of the P2X(7) receptor in infectious diseases. PLoS Pathog. 2011; 7(11): e1002212.

146. Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. Life Sci. 2007; 81(4): 280-287.

147. Montazeri A. Health-related quality of life in breast cancer patients: a bibliographic review of the literature from 1974 to 2007. J Exp Clin Cancer Res. 2008; 27: 32.

148. Moorman PG, Terry PD. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. Am J Clin Nutr. 2004; 80(1): 5-14.

149. Motaghed M, Al-Hassan FM, Hamid SS. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7. Pharmacognosy Res. 2013; 5(3): 200-206.

150. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Phytother Res. 2009; 23(9): 1295-1298.

151. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. Pharmacol Res. 2000; 41(3): 283-289.

152. Nakamura M, Bhatnagar A, Sadoshima J. Overview of pyridine nucleotides review series. Circ Res. 2012; 111(5): 604-610.

153. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L. from Iran. Z Naturforsch C. 2003; 58(9-10): 629-631.

154. Ning YL, Qi CJ, Lu XZ, Zhu YL, Qian KQ, Zhao JZ. The predictive value of epidermal growth factor receptor expression for sensitivity to vinorelbine in breast cancer. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011; 109(6): 499-505.

155. Odeh F, Ismail SI, Abu-Dahab R, Mahmoud IS, Al Bawab A. Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. Drug Deliv. 2012; 19(8): 371-377.

156. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. Oncologist. 2004; 9(4): 361-377.

157. Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E, Güllüoğlu BM, Işıkdoğan A, Topal U, Uhri M. Türkiye'de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması-Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu. Meme SağlığıDergisi. 2009; 5(3).

158. Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 2006; 15-26.

159. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci. 2009; 85(23-26): 830-834.

160. http://www.protein.ege.edu.tr/Konular/Protein%20tay.pdf. Erişim tarihi: 21.05.2014

161. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. Saudi J Kidney Dis Transpl.2009; 20(5): 741-752.

162. Rajput S, Kumar BN, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. Life Sci. 2013a; 93(21): 783-790.

163. Rajput S, Kumar BN, Sarkar S, Das S, Azab B, Santhekadur PK, Das SK, Emdad L, Sarkar D, Fisher PB, Mandal M. Targeted apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. PLoS One. 2013b; 8(4): e61342.

164. Ramadan MF. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (N sativa) L. London, Int J Food Sci Tech. 2007; 10(42): 1208-1218

165. Randhawa MA, Al-Ghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effectes of Nigella sativa. J Med Res. 2002; 41(2): 77-83

166. Ravindran J, Nair HB, Sung B, Prasad S, Tekmal RR, Aggarwal BB. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential. Biochem Pharmacol. 2010; 79(11): 1640-1647.

167. Raza M, Alghasham AA, Alorainy MS, El-Hadiyah TM. Beneficial interaction of thymoquinone and sodium valproate in experimental models of epilepsy: reduction in hepatotoxicity of valproate. Scientia Pharmaceutica. 2006; 74(4): 159.

168. Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Nesland JM. The prognostic value of p53 and c-erb b-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. Cancer. 2000; 88(4): 804-813.

169. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Bio. 2004; 5(11): 897-907.

170. Ringer DP, Schniper L. Principles of Cancer Biology. RC Bast, DW Kufe, RE Pollock, RR Weischselbaum, JF Holland & E. Frei, Cancer medicine. BC Decker Inc., Hamilton, Ontario. 2000: 25-30.

171. Rodriguez-Enriquez S, Carreno-Fuentes L, Gallardo-Perez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marin-Hernandez A, Olin-Sandoval V, Torres-Marquez ME,Moreno-Sanchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. Int J Biochem Cell Biol. 2010; 42(10): 1744-1751.

172. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. Cancer Biol Ther.2007 6(2): 160-169.

173. Ruddon RW. Cancer Biology. New York, Oxford University Press, 2007; (1): 4-9

174. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. Int Immunopharmacol. 2005; 5(13-14): 1749-1770.

175. Savarese DM, Savy G, Vahdat L, Wischmeyer PE, Corey B. Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. Cancer Treat Rev. 2003; 29(6): 501-513.

176. Sayed-Ahmed MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007; 34(5-6): 399-405.

177. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer. 2007; 7(4): 295-308.

178. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. Tohumlu Bitkiler Sistemetiği (Ders Kitabı). İzmir, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:116, 2004.

179. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science. 1996; 274(5293): 1672-1677.

180. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol. 2003; 22(1): 107-113.

181. Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, Moreno A, Fabra A. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. Int J Cancer. 2000; 89(2): 142-147.

182. Society AC. Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008. Atlanta, 2007.

183. Soh H, Wasa M, Wang HS, Fukuzawa M. Glutamine regulates amino acid transport and glutathione levels in a human neuroblastoma cell line. Pediatr Surg Int. 2005; 21(1): 29-33.

184. Somunoğlu S. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi. 2009; 4(10): 103-122.

185. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Pr Nati Acad Sci. 2001; 98(19): 10869-10874.

186. Sucha L, Hroch M, Rezacova M, Rudolf E, Havelek R, Sispera L, Cmielova J, Kohlerova R, Bezrouk A, Tomsik P. The cytotoxic effect of alpha-tomatine in MCF-7 human adenocarcinoma breast cancer cells depends on its interaction with cholesterol in incubation media and does not involve apoptosis induction. Oncol Rep. 2013; 30(6): 2593-2602.

187. Sutton KM, Doucette CD, Hoskin DW. NADPH quinone oxidoreductase 1 mediates breast cancer cell resistance to thymoquinone-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 426(3): 421-426.

188. Sutton KM, Greenshields AL, Hoskin DW. Thymoquinone, a bioactive component of black caraway seeds, causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells with mutant p53. Nutr Cancer. 2014; 66(3): 408-418.

189. Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of Nigella sativa L. seeds. J Ethnopharmacol. 2000; 70(1): 1-7.

190. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev. 2001; 81(1): 153-208.

191. Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. Phytother Res. 2007; 21(9): 895-897.

192. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. Cell Signal. 2004; 16(2): 139-144.

193. Topuz E, Aydıner A, Dinçer M. Meme Kanseri. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 349-350.

194. Turner RJ. Botanica. İtaly, Köneman, 2004:605

195. Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA, Basson MD. Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines. Cancer Res. 1994 54(22): 5974-5980.

196. Uğur M. P2X Purinoseptörler: moleküler, biyolojik, farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikleri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2001; 54(2).

197. Van Der Burg B, Kalkhoven E, Isbrucker L, De Laat SW. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; 42(5): 457-465.

198. Velho-Pereira R, Kumar A, Pandey BN, Jagtap AG, Mishra KP. Radiosensitization in human breast carcinoma cells by thymoquinone: role of cell cycle and apoptosis. Cell Biol Int.2011 35(10): 1025-1029.

199. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003; 36(3): 131-149.

200. Vinay K, Abbas A, Fauston N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. New York, Saunders, 2004: 623-625.

201. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med. 2004; 10(8): 789-799.

202. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 2001; 15(22): 2922-2933.

203. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. Endocr Relat Cancer. 2010; 17(4): R245-262.

204. Winer E, Morrow M, Osborne CK, Harris J. Malignant Tumors of the Breast. Cancer: Principles & Practice of Oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 1651-1717.

205. Woo CC, Hsu A, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: the role of p38 MAPK and ROS. PLoS One. 2013; 8(10): e75356.

206. Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KH. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR-gamma pathway. Biochem Pharmacol. 2011; 82(5): 464-475.

207. Yarbro C, Wujcik D, Gobel BH. Cancer Nursing: Principles and Practice. Sudbury, Jones & Bartlett Learning, 2010; 74(2)

208. Yegutkin GG. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta. 2008; 1783(5): 673-694.

209. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H, Ocak AR, Bitiren M. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World J Gastroenterol. 2008; 14(33): 5204-5209.

210. Yokuş BÇ, Ülker D. Kanser Biyokimyası. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 2012; 1(2): 7-18.

211. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene. 2008; 27(41): 5497-5510.

212. Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of Nigella sativa fixed oil on blood homeostasis in rat. J Ethnopharmacol. 2002; 79(1): 23-26.

213. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). Oncol Lett. 2012; 4(6): 1151-1157.

214. Zieske JD. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair. Prog Retin Eye Res. 2000; 19(3): 257-270.

215. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313(3): 459-465.

216. Zukerberg LR, Yang W-I, Gadd M, Thor AD, Koerner FC, Schmidt EV, Arnold A. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mod Pathol. 1995; 8(5): 560-567.

10. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Konya'da doğdu. İlk ve orta tahsilini Konya'da yaptı. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Gıda ve sağlık alanlarında çeşitli faaliyetlerde bulundu. Avrupa Birliği hibeli Hijyen ve Sanitasyon konulu projede eğitici olarak görev aldı. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Evli, 2 çocuk babasıdır.