



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

**MEME KANSERİ PATOGENEZİNDE ROBINİN'İN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ebru Nur DURSUN
ORCID: 0009-0004-7288-5730

Danışman
Prof. Dr. Ercan KURAR
ORCID: 0000-0002-9234-1560

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 24YL18007 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya –2025

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden hiçbir zaman desteğini ve rehberliğini esirgemeyen danışmanlığı ile her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ercan KURAR'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini benden esirgemeyen değerli Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr. Hasibe VURAL, Prof.Dr. Hatice Gül DURSUN'a,

Tüm akademik eğitimim boyunca bana her konuda yol gösteren hem akademik bilgi birikimini hem de psikolojik desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve yoluma her zaman ışık tutan Doç.Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ'e,

Eğitim sürecimde psikolojik desteğini ve akademik katkısını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. İlknur ÇINAR AYAN'a,

Hiçbir zaman bilgi birikimini ve yardımını esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi Fatma SEÇER ÇELİK ve Dr. Sedef AKÇAALAN'a,

Varlığını her zaman yanımda hissettiğim bilgisini ve dostluğunu benden esirgemeyen Arş. Gör. Vera AVCI'ya,

Araştırmamı 24YL18007 proje numarası ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hiçbir zaman maddi manevi desteğini esirgemeyen hayatımı anlamlı kılan çok kıymetli annem Rukiye DURSUN ve babam Mehmet DURSUN'a,

Her zaman yanımda olan ve motivasyonumu hep yüksek tutan arkadaşlarım Şebnem PEHLİVANOĞLU, Hatice İrem KOŞ, Şeyma MERMER, Muhammed Emin SARI, Narmin ALIYEVA, Farah BAYRAMLI ve Hüseyin AGAZADE'ye,

Teşekkür ederim.

Ebru Nur DURSUN

Temmuz 2025

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TEZ ONAY SAYFASI.....	v
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vi
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	vii
KISALTMALAR.....	viii
ÖZET.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Meme Kanseri	2
2.1.1. Meme kanseri epidemiyolojisi	3
2.1.2. Meme kanserinde risk faktörleri	4
2.1.3. Meme kanseri tipleri.....	8
2.2. Toll Benzeri Reseptörler	9
2.3. Apoptoz	11
2.3.1. Dışsal yol.....	12
2.3.2. İçsel yol	13
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	14
2.5. Robinin	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Hücre Kültürü.....	17
3.2. Hücre Canlılık Testi	17
3.3. Gerçek-Zamanlı PZR (qRT-PCR) ile Gen İfadesi Analizi	17
3.3.1. Hücrelerden total RNA izolasyonu	17
3.3.2. RNA miktarının belirlenmesi ve DNase-I enzimi uygulaması	18
3.3.3. Revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi.....	18
3.3.4. Hedef genlerin primer tasarımı	18
3.3.5. qRT-PCR reaksiyonu	19
3.4. Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA)	19
3.5. Hedef Genlerin Protein Seviyesinin Belirlenmesi	20
3.5.1. Protein izolasyonu	20
3.5.2. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi	21
3.5.3. Elektroforetik analizler.....	21
3.5.4. Western blot analizi.....	21

3.6. Koloni Oluşum Deneyi.....	22
3.7.İstatistiksel Analizler.....	22
4.BULGULAR	23
4.1. Hücre Kültürü.....	23
4.2. Robinin’in Canlılık Üzerine Etkisi	23
4.3. Robinin’in Hedef Genler Üzerine Etkisi	24
4.4. Robinin’in Apoptoz protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi (ELISA).....	26
4.5. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	27
4.6. Western Blot Analizi Sonuçları.....	27
4.7. Robinin’in Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesi Üzerine Etkisi.....	28
5.TARTIŞMA	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
6.1. Sonuç.....	35
6.2. Öneriler.....	35
7. KAYNAKLAR.....	36
8. EKLER.....	41
8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı	41

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **EBRU NUR DURSUN**'nın “**Meme Kanseri Patogenezinde Robinin'in Antikanser Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 17.07.2025

Tez Danışmanı	Prof.Dr. Ercan KURAR Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	İmzası
Jüri Üyesi	Doç.Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	İmzası
Jüri Üyesi	Dr.Öğr. Üyesi Fatma SEÇER ÇELİK Ankara Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 30/07/2025 tarih ve 18/22 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

“*Meme Kanseri Patogenezinde Robinin'in Antikanser Etkisinin Araştırılması.*” başlıklı tez çalışmamın toplam **53** sayfalık kısmına ilişkin, 29.07.2025 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%7** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

29.07.2025

Ebru Nur DURSUN

Prof. Dr. Ercan KURAR

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

17.07.2025

Ebru Nur DURSUN

KISALTMALAR

ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
BAX	: BCL2-ilişkili X protein
BCL2	: B hücreli lenfoma gen-2
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin)
EIF2A	: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	: Endoplazmik retikulum
FAS	: Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü
FBS	: Fetal bovine serum
GRP78	: Glikozla düzenlenen protein 78
HER2	: İnsan epidermal reseptör 2
KKH	: Kanser kök hücresi
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinazlar
MYD88	: Miyeloid farklılaşma faktörü 88
NF-κB	: Nükleer faktör-κB
ÖR	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
TIRAP	: TIR alanına sahip adaptör protein
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF	: Tümör nekroz faktör
TRAM	: TRIF ile ilişkili adaptör molekül
ÜNMK	: Üçlü negatif meme kanseri
VKİ	: Vücut kitle indeksi

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1 qRT-PCR analizinde kullanılan apoptoz, ER stresi, TLR ve referans genleri.....	19
Tablo 3.2. qRT-PCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri.....	20



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Kanser türlerinin insidans oranları	2
Şekil 2.2. Kanser türlerinin ölüm oranları	3
Şekil 2.3. Apoptozun dışsal yolu	13
Şekil 2.4. Apoptozun içsel yolu	14
Şekil 2.5. Robinin'nin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 4.1. MDA-MB-231 10X ve 40X mikroskop görüntüsü.....	23
Şekil 4.2. Robinin'in meme kanseri hücre hattında canlılık üzerine etkisi.....	23
Şekil 4.3. qRT-PCR sonucu elde edilen melt eğrileri	24
Şekil 4.4. TLR2 ve TLR4 gen ifadesindeki değişiklikler.....	25
Şekil 4.5. Apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesindeki değişiklikler	25
Şekil 4.6. ER stres ile ilişkili genlerin ifadesindeki değişiklikler	26
Şekil 4.7. Hücrelerin BAX, CASP7 ve CYCS protein seviyelerinde değişim.....	26
Şekil 4.8. BSA konsantrasyonu standart grafiği.....	27
Şekil 4.9. Robinin'in TLR2 ve TLR4 protein seviyesine etkisi	27
Şekil 4.10. Robinin'in CASP3, CASP8 ve P53 protein seviyesine etkisi.....	28
Şekil 4.11. Robinin'in hücrelerin koloni oluşturma yeteneğine etkisi	28

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

MEME KANSERİ PATOGENEZİNDE ROBINİN’İN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru Nur DURSUN

Konya-2025

Meme kanseri, kadınlarda en çok ölüme neden olan kanser türüdür. Meme kanserinde tümör gelişimine neden olan faktörler iyi anlaşılamamaktadır. Üçlü negatif meme kanserinin tümör agresifliği metastatik ve invaziv özellikleri diğer meme kanseri türlerine göre oldukça kötü prognozludur ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. Dolayısıyla, doğal flavonoidlerin ve sentetik türevlerinin antikanser aktivitelerinin araştırılması çok önemlidir. Toll benzeri reseptörler (TLR), patojenik yapılara yanıt verme yetenekleriyle yaygın olarak tanınan korunmuş bir reseptör ailesidir. Meme kanseri ve çevreleyen dokularında TLR genlerinin ifadesi değişen derecelerde yukarı veya aşağı düzenlenir. Meme kanserinde, TLR2 ve TLR4 ifadesi oldukça yüksek olması nedeniyle hücrenin apoptoza girmesine engel olmaktadır. Dolayısıyla bu durum yüksek mortalite ile ilişkilendirilmektedir. Robinin TLR yolağının önemli üyelerinden TLR2 ve TLR4’ün antagonistidir. Ancak, meme kanserinde TLR, apoptoz ve ER stresi ilişkili yollara etkisi henüz bilinmemektedir. Bu çalışma da; MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Robinin’in antikanser etkisi araştırılmıştır. Hücre proliferasyonuna etkisi CCK-8 sitotoksikite deneyi ile değerlendirilmiştir ve 48. saatte IC₅₀ değeri 16,67 µM olarak belirlenmiştir. Daha sonra Robinin’in meme kanseri hücrelerinde TLR2, TLR4, apoptoz (BAX, BCL2, CASP3, CASP7, CASP8, CASP9, CYCS, FADD, FAS ve P53) ve ER stres (ATF4, ATF6, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, HSP47, IRE1, PERK ve XBP1) sinyal yollarında bulunan gen ifadeleri üzerine etkinliği qRT-PCR ile tespit edilmiştir. BAX, CASP3, CASP7, CASP8, CYCS, FADD, ATF4, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, IRE1 ve XBP1’de anlamlı artış gözlenirken BCL2’nin baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca mRNA düzeyinde ifadesi anlamlı değişen bazı genlerin protein düzeyleri ELISA ve western blot testi ile değerlendirilmiştir. BAX, CASP3, CASP7, CASP8, CYCS ve P53 protein seviyesinde anlamlı artış olduğu görülmüştür. Robinin’in etkisinin *in vivo* çalışmalar ile desteklenerek moleküler düzeyde belirlenmesi, meme kanserinin adjuvan tedavisinde yeni bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, ER stres, Meme kanseri, Robinin.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
Medical Biology

[Master Thesis]

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECT OF ROBININ IN THE PATHOGENESIS OF BREAST CANCER

Ebru Nur DURSUN

Konya-2025

Breast cancer is the most common type of cancer that causes death. The factors that cause tumors in breast cancers are not well understood. The tumor aggressiveness, metastatic and invasive features of triple negative breast cancer have a very poor prognosis compared to other types of breast cancer and treatment options are often limited. Therefore, it is very important to investigate the anticancer properties of natural flavonoids and their synthetics. Toll-like receptors (TLR) are a type of receptor that is widely defined by its ability to respond to pathogenic structures. In breast cancer and its surrounding tissues, the expression of TLR genes are up- or down-regulated to varying degrees. In breast cancer, TLR2 and TLR4 expression is quite high, preventing the cell from entering apoptosis, which is thereby associated with high mortality. Robinin is an antagonist of TLR2 and TLR4, which are known as important members of the TLR pathway. However, effects of Robinin on TLR, apoptosis and ER stress-related pathways in breast cancer are not yet known. In this study, the anticancer effects of Robinin were investigated in MDA-MB-231 breast cancer cells. Its effect on cell proliferation was evaluated by CCK-8 cytotoxicity assay and the IC_{50} value was determined as 16.67 μ M at 48 hours. The effects of Robinin on gene expression of TLR2, TLR4, apoptosis (BAX, BCL2, CASP3, CASP7, CASP8, CASP9, CYCS, FADD, FAS and P53) and ER stress (ATF4, ATF6, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, HSP47, IRE1, PERK and XBP1) signaling pathways were evaluated using qRT-PCR. Significant increases were observed in BAX, CASP3, CASP7, CASP8, CYCS, FADD, ATF4, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, IRE1 and XBP1 expression levels. However, BCL2 was downregulated. In addition, ELISA and western blot tests were performed on genes that were significantly changed at the mRNA level. A significant increase was observed in the protein levels of BAX, CASP3, CASP7, CASP8, CYCS and P53. Determination of the effect of robinin at the molecular level supported by further *in vivo* studies is thought to be a potential novel agent in the adjuvant treatment of breast cancer.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer, ER stress, Robinin.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrol dışı çoğalarak vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir durumdur. Küresel bir sorun olarak meme kanseri dünyada en sık görülen kanserdir (Ferlay ve ark., 2021). Meme kanseri 40-50 yaşlardaki kadınlarda çok yaygın görülen kanser türüdür. Meme kanseri ~%20 ölüm ve %30 morbidite oranına sahiptir. Ayrıca hormonal dengesizlikler ve beslenme alışkanlıkları nedeniyle kanser görülme sıklığı gittikçe artmaktadır. Ancak meme kanseri de dahil olmak üzere tümör oluşumunun fizyolojik nedenleri henüz yeterince anlaşılamamıştır (Petroni ve ark., 2021). Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, meme kanserinin nedenleri ve ilerlemesinde genetik faktörlerin çok önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Bazı tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, meme kanseri riskini arttırmakta ve prognozunu kötüleştirmektedir. Ayrıca yaş, cinsiyet, hücresel stres, inflamatuvar denge, oksidatif hasar ve epigenetik değişiklikler gibi fizyolojik nedenlerin de meme kanseri gelişimine çok büyük katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. Bu risk faktörlerinin çoğu, hücre homeostazının bozulmasına, apoptoz mekanizmasının bozulup aksamasına dolayısıyla da istenmeyen hücre proliferasyonuna neden olabilmektedir (Sung ve ark., 2021).

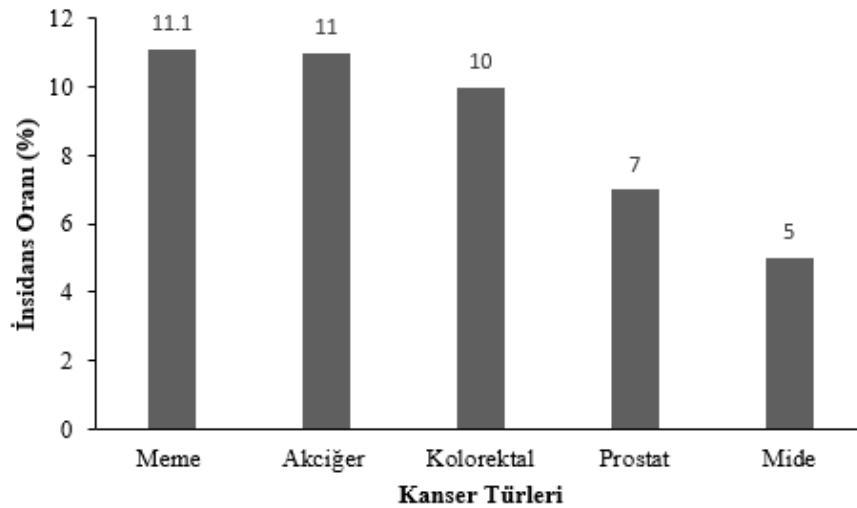
Meme kanserinin kötü prognozlu tipi olan üçlü negatif meme kanseri, en agresif ve heterojen alt tipi olarak bilinmektedir ve hormon tedavilerine yanıt vermediği için yalnızca kemoterapi ve radyasyon gibi tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Bazı Toll benzeri reseptörlerin (TLR) yüksek ekspresyonu kanser gelişimini arttırmakta metastaz ve invaziv özellikleri teşvik edebilmektedir. Örneğin, meme kanserinde özellikle TLR2 ve TLR4'nin aşırı ifadesi hücrelerin sağkalım yolağına girmesine neden olup tümör gelişimini desteklemektedir. Kanser hücrelerine karşı alternatif tedavi seçenekleri ve ajanlar araştırılmaktadır. Alternatif ajanlar arasında doğal bileşikler bulunmaktadır. Özellikle flavonoidler, çeşitli bitkilerde bulunan fenolik yapılara sahip bileşiklerdir. Robinin ise doğal biyoflavonoid grubuna aittir ve TLR2 /TLR4'ün inhibitörü olarak işlev görebilmektedir (Yang ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında; TLR2/TLR4 inhibitörü Robinin'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde proliferasyon, koloni oluşum yeteneği, TLR, apoptoz ve ER stresi sinyal yollarının gen ifadesi ve protein seviyesindeki değişimleri, dolayısıyla antikanser etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

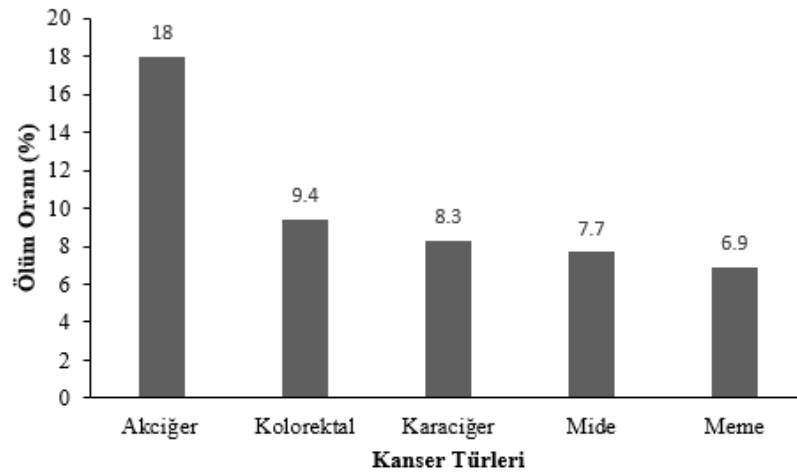
2.1. Meme Kanseri

Kanser, dünyadaki çoğu ülkede yüksek morbidite oranı ile en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Sadece kadınlar arasında yapılan istatistiklerde en yaygın görülen kanser meme kanseri olarak tespit edilmiştir. Bazı ülkelerde karaciğer ve rahim ağzı kanseri gibi diğer türlerinde insidansının arttığı görülmüştür. Kötü prognozlu tümörlere bağlı ölümler arasında kadınlarda, dünyada ~100 ülkede en yaygın ölüm nedeni meme kanseridir ve bu sırayı 42 ülkede rahim ağzı kanseri, 28 ülkede akciğer kanseri, bazı gelişmekte olan ülkelerde ise mide kanseri, karaciğer kanseri ve kolorektal kanseri takip etmektedir (Wéber ve ark., 2024). Güncel epidemiyoloji verileri; kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türü olan meme kanseri, insidansı 2,2 milyona (%11,1) ulaşarak akciğer kanserini geride bırakmıştır ve en yaygın kanser türü konumuna ulaşmıştır. Diğer kanser türlerinin görülme sıklığı ise sırayla; akciğer, kolorektal, prostat ve mide kanseri olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.1). Öte yandan, ~1,8 milyon ölüm ile akciğer kanserini kolorektal, karaciğer, mide ve kadınlarda meme kanseri izlemektedir (Şekil 2.2; Sung ve ark., 2021). Meme kanserinin insidansı ve mortalitesi küresel düzeyde hızlı bir artış göstermektedir ve son 20 yılda insidansı %58 oranında dikkat çekici bir yükseliş göstermiştir. Bu artışta çevresel ve genetik faktörlerin yanı sıra, yaşam tarzına ilişkin faktörler de önemli rol oynamaktadır (Wéber ve ark., 2024).



Şekil 2.1. Kanser türlerinin insidans oranları (Shang ve Xu, 2022).

2000-2018 yılları arasında, kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı dünya genelinde belirgin bir artış göstermiştir; 2000 yılında yaklaşık 1,03 milyon olan yeni vaka sayısı, 2018 itibarıyla ~2 milyona ulaşmıştır. Ancak bu verilere rağmen meme kanserinin mortalite oranlarında düşüş gözlemlenmiştir. 2000 yılında tüm ülkelerdeki toplam meme kanseri nedeni ölümler ~370.000 iken, 2012 yılında bu sayı çeşitli risk faktörleri nedeniyle artarak ~520.000'e yükselmiş; 2018 yılına gelindiğinde ise 310.000'e gerileyerek önemli ölçüde bir azalma gözlemlenmiştir (Bray ve ark., 2018).



Şekil 2.2. Kanser türlerinin ölüm oranları (Shang ve Xu, 2022).

2.1.1. Meme kanseri epidemiyolojisi

2003 yılından bu zamana kadar meme kanseri vakalarının sayısı ve insidansında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avustralya'da önemli bir artış gözlemlenirken mortalite oranlarında azalma gözlemlenmiştir (Siegel ve ark., 2023). Bu iki ülkenin insidans ve mortalite oranları Çin ile kıyaslandığında, ABD ve Avustralya'daki meme kanseri kaynaklı morbidite ve mortalite oranları belirgin şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Belirtilen ülkelerde meme kanseri insidansında artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, ABD ve Avustralya'da kadınlarda meme kanseri mortalite oranları azalırken, Çin'de bu oranların yükseldiği görülmüştür (Siegel ve ark., 2021).

2020 yılında ise, kadınlarda meme kanseri insidans oranıyla, akciğer kanserinin gerisinde kalarak küresel olarak en sık teşhis konulan kanser türü olmuştur. 2020 yılında ~2,2 milyon yeni vaka tespit edilmiş olup, bu rakam tüm kanser türlerindeki insidansın %11'ine karşılık gelmektedir (Sung ve ark., 2021). Sonuçta meme kanseri, dünyada yılda ~680.000 gibi büyük bir ölüm oranıyla en yaygın kanser kaynaklı ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda

gelmektedir. Kadınlarda, meme kanseri tüm kanser vakalarının yaklaşık olarak çeyreğini oluştururken kanser kaynaklı ölümlerin ise yaklaşık altıda birini oluşturmakta ve birçok ülkede morbidite ve mortalite oranı olarak ilk sırada yer almaktadır (Shang ve Xu, 2022). Meme kanseri risk faktörleri bu yayılımda en büyük etkidir. Meme kanseri risk faktörlerinin yaygınlığı, küresel ekonomik büyüme ve kadın iş gücündeki artışla birlikte, sosyokültürel ve çevresel faktörlerde yaşanan değişimlerden etkilenmiştir. Sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasındaki meme kanseri insidans farkları ise, az çocuk sahibi olma, obezite ve fiziksel aktivite eksikliği gibi faktörlerin etkisiyle giderek azalmakta veya kapanmaktadır (Shin, 2008).

Türkiye’de ise meme kanseri insidansı artış göstermiştir; 1994 yılında 100.000’de 24 iken, 2015’te 100.000’de 43,8 olarak tespit edilmiştir (Ozmen ve ark., 2015). Kanser Kontrol Daire Başkanlığı Kanser Kayıt Birimi tarafından yayınlanan Kanser Raporu 2018 verilerine göre, 2018 yılında yaklaşık 17.000 kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de meme kanseri tespit edilen vaka oranı ve mortalite oranı gittikçe artmaktadır Türkiye’deki bu artış, yapılan araştırma ve saha çalışmalarına göre yaşam biçimindeki değişimlere (erken adet görme, çocuk sahibi olmama, ilk doğumun 35 yaşından sonra gerçekleşmesi, emzirme süresinin kısalması, geç menopoz), beslenme alışkanlıklarındaki olumsuzluklara (obezite vb.), ayrıca nüfusun artması ve yaşlanma sürecine bağlı birtakım değişimlere bağlanmaktadır (Özmen ve ark., 2019).

2.1.2. Meme kanserinde risk faktörleri

Cinsiyet

Meme kanserinde cinsiyetin kadın olması yakalanma riskinin artmasında önemli rol oynayan en önemli risk faktörlerindendir ve bu durum, özellikle iki cinsiyet arasındaki hormon düzeylerindeki fark ve kadınlardaki bazı hormon düzeylerindeki artışa bağlıdır (Sharma, 2019). Erkeklerden farklı olarak kadınlarda meme dokusu östrojen (ÖR) ve progesteron (PR) gibi hormonlara karşı oldukça hassastır ve bu hormonların dengesindeki herhangi bir bozukluğun meydana gelmesi meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Dolaşım sistemindeki östrojen ve androjen seviyelerindeki dengesizlikler, yükselmeler, var olan meme kanserinde de pozitif korelasyona neden olabilmektedir (Folkerd ve Dowsett, 2013). Vücutta doğal olarak bulunan seks hormonlarının fizyolojik düzeylerindeki menopozdan önce ve sonra meydana gelen hormon düzeylerindeki değişiklikler, kadınlarda meme kanseri riskinin artmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Menopozdan önce ÖR ve PR hormon düzeylerindeki

düzensiz artışlar ve menopoz sonrasında ise östrojen seviyesinin azalması, meme dokusunda hormonal etmenlerle tümör gelişimini hızlandırabilmektedir. Bu hormonal farklılıklar, meme kanseri insidansının artışında etkili olan temel biyolojik mekanizmaların başında gelmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2013).

Yaşlılık

Meme kanseri vakalarının %75'i 45 yaş ve üzerindeki bireylerden oluşmaktadır ve bu hastaların önemli bölümü, yani %50'den fazlası ise 60 yaş üstüdür. Yaş, meme kanseri ilerlemesinde çok önemli bir risk faktörüdür (Sung ve ark., 2021). Sonuçta meme kanseri riskinin yaşla birlikte arttığı ve özellikle 50 yaşında ~%2,5, 60 yaşında ise %4 olduğu tespit edilmiştir (McGuire ve ark., 2015). Yapılan araştırmalarda hastaların yaş grupları ile meme kanseri alt türleri arasında bir ilişki bulunduğu ortaya çıkmıştır. Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), çoğunlukla 45 yaşın altındaki kadınlarda görülürken; 65 yaş ve üzerindeki hastalarda Lüminal A alt tipi meme kanseri tanısı konmaktadır (Beral ve ark., 2001).

Aile Geçmişi

Aile geçmişinde meme kanseri vakası bulunan hastaların istatistiksel olarak yakalanma riskinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Öyle ki meme kanseri vakalarının ~%15'inin yakın akrabalarından mutlaka bu hastalıktan tanı aldığı ortaya konmuştur (Beral ve ark., 2001). Özellikle birinci dereceden akrabaların kendi aralarında bu tip kanser vakalarının artması durumu açıklamaktadır. Birinci dereceden 45 yaşından önce bir aile öyküsüne sahip olanların hastalığa yakalanma olasılığı daha da artmaktadır (Micha, 2017). Meme kanserinde aile geçmişi bulunan vakalarda insidans, mortalite ve metastaz oranı diğer hastalara kıyasla daha yüksektir. Ayrıca aile geçmişi genetik, epigenetik ve çevresel faktörler ile birleşince risk daha da artmaktadır (Wu ve ark., 2018).

Mutasyonlar

Genetik mutasyonlar ve meme kanseri vakaları arasında çok önemli düzeyde bir korelasyon bulunmaktadır. Özellikle BRCA1 (17. kromozom) ve BRCA2 (13. kromozom) gen panelindedir ve penetrasyonu yüksektir. Bu iki gendeki mutasyonlar otozomal dominant bir kalıtım gösterirler. Bununla birlikte TP53 ve PTEN gibi önemli genlerdeki mutasyonlarda meme kanserinde tümör gelişiminde çok önemli rol oynamaktadır (Kechagioglou ve ark., 2014). Gen mutasyonlarından dolayı meme kanseri riskinin artmasıyla birlikte aynı genlerin

mutasyonları yumurtalık kanserine de neden olabilmektedir. Özellikle BRCA geni DNA onarımında rol oynayan birçok gen (ATM ve CHEK2) ile etkileşimde olduğu bilinmektedir (Renwick ve ark., 2006). Bu gen mutasyonları meme kanserini oldukça tetiklemektedir. Yapılan bir çalışmada XRCC2 genindeki mutasyonlarında meme kanseri riskini arttırdığı görülmüştür (Park ve ark., 2012).

Üreme

Bazı endojen hormonların (ÖR ve PR) seviyesinin artması kadınlarda meme kanserine yakalanma riskini de arttırmaktadır. Kadınlarda menarş, gebelik, emzirme ve menapoz gibi fizyolojik süreçlerde meydana gelen hormonal dengesizlikler meme kanserinin tetiklenmesine neden olmaktadır (Albrektsen ve ark., 2005). Bunun yanı sıra erken yaş gebelikleri ve doğum yapma sayısında artış meme kanserine yakalanma riskini de azaltmaktadır. Hormonlar meme kanseri mikro çevresinde oldukça önemlidir (Husby ve ark., 2018). Örneğin gebeliğin meme kanseri gelişimine karşı koruyucu bir etkisi vardır. Özellikle gebelikte preklampsi geçiren kadınlarla geçirmeyen kadınlar arasında kanser gelişimi açısından büyük fark olabilmektedir (Albrektsen ve ark., 2005).

Radyasyona Maruz Kalma

İkincil olarak radyasyona bağlı olarak gelişen tümörler aslında en önemli risk faktörlerinden olan yaş ile de ilişkilidir. Örneğin 40 yaşından önce radyasyona maruz kalanlarda meme kanserine yakalanma riski de artmıştır (Zhang ve ark., 2020). Ayrıca radyasyonla beraber aile geçmişinde meme kanseri olan kişilerinde meme kanseri olma olasılığının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ng ve Travis, 2009). Bir araştırmada, standart olarak uygulanan radyasyon tedavisine ek olarak direkt tümöre yapılan tedavilerin nüks olasılığını azalttığı ortaya konmuştur (Desing, 2001).

Fiziksel Aktivite

Fiziksel aktiviteyi bir rutin haline getiren kadınlarda meme kanserine yakalanma olasılığının düşük olmasının yanı sıra fiziksel aktivitenin meme kanseri üzerine koruyucu etkisi henüz kanıtlanamamıştır. Fiziksel aktivite ve meme kanseri arasındaki ilişkinin özellikle düzenli sporun, hormon düzensizliklerini giderdiği, bağışıklık sistemini kuvvetlendirdiği, yağ oranını azalttığı ve inflamatuvar sistemi baskıladığından dolayı olduğu düşünülmektedir (Maguire ve ark., 2007). Yapılan bir araştırmada aile geçmişinde meme kanseri bulunan ve

genetik olarak yatkın olan her yaştan oluşan kadın gruplarında fiziksel aktiviteyle birlikte meme kanseri vakalarının azaldığı görülmüştür (Kyu ve ark., 2016). Özellikle düzenli sporun koruyuculuğu yalnızca genetik olarak yatkın bireylerde değil aile öyküsü olmayan kadınlarda da devam etmektedir. Yapılan başka bir çalışmada fiziksel aktivitenin özellikle menopoz sonrası dönemde belirgin koruyucu etkisinin olduğu ve hormonal düzenlemede oldukça etkili olduğu ifade edilmiştir (McTiernan, 1997).

Obezite

Meme kanseri epidemiyolojisinde obezite en önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır ve kadınlarda meme kanserine yakalanma olasılığını önemli oranda arttırmaktadır. Obezite ve meme kanseri arasındaki bu korelasyon menapoza sonrası dönemde daha fazladır. Bu dönemde yağ dokusu değişmekte ÖR ve PR hormon seviyeleri düzensiz seyretmektedir. Özellikle ÖR seviyesinin yükselmesi meme kanseri riskini arttırabilmektedir. Menopoz döneminde olmayan obez kadınlarda da meme kanseri vaka sayısı oldukça fazladır. Bu hastalarda genelde kötü prognoz ve tümör agresifliği görülmektedir. Bunun nedeni obezitenin metabolik düzensizlik, kronik inflamasyon, insülin direnci ve şeker hastalığı gibi metabolik hastalıklara neden olmasıdır (Zhang ve ark., 2020). Yapılan araştırmalarda >40 yaş kadınlarda vücut kitle indeksinin (VKİ) meme kanseri vaka oranını arttırdığı gösterilmiştir. Araştırma bulgularına göre menopozdan sonra yüksek VKİ'ye sahip kadınların düşük olanlara göre yağ dokusunun ve ÖR seviyesinin artmasından dolayı meme kanserine yakalanma olasılığı yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca artan VKİ tümörün büyümesi ve agresifleşmesi için kısaca prognozun kötüleşmesi için önemli bir risk faktörüdür (Husby ve ark., 2018).

Sigara ve Alkol Kullanımı

Aşırı alkol tüketimi özellikle sindirim sisteminde oluşan tümör olasılığını arttırdığı birçok çalışma tespit edilmiştir. Bu durumun yanında alkol meme kanserinin de en büyük risk faktörlerinden biridir. Alkolün kansere neden olmasının ana nedeni içerdiği bileşenlerdir. Bu bileşenler endojen hormonların (ÖR ve PR) seviyesinde neden olduğu düzensizlikler meme kanseri ve rahim kanseri ile de ilişkilendirilmektedir (Rachdaoui ve Sarkar, 2013). Alkol tüketimi ve obezite birlikteliği ile karsinogenez riski daha da artmaktadır. Alkol tüketimi insan metabolizmasını oldukça fazla etkilemektedir. Alkol tüketimine bağlı olarak bireyde sağlıklı beslenme alışkanlıkları bozulabilir ve kanser gelişimi artabilir. Özellikle ÖR+ meme kanseri riskinin özellikle alkol tüketimiyle arttığı belirlenmiştir (Erol ve ark., 2019).

Alkol gibi sigarada bulunan birtakım bileşiklerde meme kanseri vakalarının artmasına neden olmaktadır. Özellikle sigara da bulunan kanserojen bileşikler P53 mutasyonuna neden olarak meme kanserinde artışa neden olmaktadır (Russo, 2002). Ayrıca pasif içicilikte bu risk faktöründe önemli rol oynamaktadır. Ayrıca uzun süre sigara kullanımı ve gebelik öncesi tütün kullanımı kadınlarda meme kanseri vakalarının artmasında çok önemli bir yere sahiptir (Jones ve ark., 2017).

2.1.3. Meme kanseri tipleri

Meme kanseri başlıca luminal, HER2+, üçlü negatif ve klauzin düşük şeklinde sınıflandırılmıştır. Luminal tipi meme kanseri, ÖR pozitif olan ve tüm meme kanserlerinin neredeyse %60'ını oluşturan oldukça yaygın bir meme kanseri tipidir. Bu tip kanserler invaziv ve metastatik tümörlere farklılaşabilmektedirler (Prat ve ark., 2016). Meme kanserinin bu tipi Luminal A ve B olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır. Luminal A tümörleri, ÖR ve PR reseptörleri yönünden zengindir ve HER2'den yoksundur. Bu tipte ÖR transkripsiyon faktörleri, luminal epitel hücreleri için karakteristik olan genleri aktive eder ve diğer tiplere göre iyi prognoza sahiptir. Luminal A tipinin aksine, Luminal B tümörleri daha kötü prognozludur. ÖR pozitifler ve PR negatif ve HER2 pozitif olabilirler (Ades ve ark., 2014). ÖR hem A hem de B alt tiplerinde neredeyse aynı seviyede ekspresyon gösterir ve Lüminal tipini diğer tiplerden ayırt etmede kullanılır. HER2+ meme kanseri alt tipi meme kanseri türlerinin %15'ini oluşturmaktadır. ÖR ve PR'nin eksikliğiyle beraber HER2'nin yüksek ekspresyonu görülmektedir. Ek olarak, HER2+ alt tipi kanser hücreleri, Lüminal grubundaki hücrelerden daha hızlı çoğalmaktadır. Bu yüzden Lüminal tipten daha kötü prognozludur (Prat ve ark., 2014).

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), ÖR, PR ve HER2'den yoksun olarak karakterize edilir ve tüm meme kanserlerinin ~%20'sini oluştururlar. ÜNMK, 30 yaşından küçük kadınlarda ve Afroamerikan kadınlarda daha yaygın olduğu ortaya çıkmıştır (Fei ve ark., 2021). Meme kanserinin bu tipi genellikle BRCA1 gen mutasyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Çok az bir kısmının nedeni ise BRCA2 gen mutasyonlarıdır. ÜNMK tipi kanser diğer türlere göre daha agresif metastatik ve invaziv, dolayısıyla kötü prognozludur ve hormon tedavisi yapılamadığı için tedavi seçenekleri sınırlıdır (Newman ve ark., 2015). Klauzin-düşük meme kanserleri de ÖR, PR ve HER2 reseptörlerinden yoksundur. Kötü prognozludur ve tüm metastatik invaziv tümörlerin %10'unu oluşturmaktadır (Pareja ve ark., 2016).

2.2. Toll Benzeri Reseptörler

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), transmembran grubuna dahil olan proteinlerdir ve özellikle doğuştan gelen bağışıklık sisteminin en önemli elamanlarındandır. TLR'ler, patojen grubunun özgün moleküler yapıtaşlarına (lipopolisakkaritler, peptidoglikanlar, lipoproteinler ve nükleik asitler Patojene Özgü Moleküler Desenlere (PAMP)) sıkı bir şekilde bağlanır ve hücrelerde inflamatuvar yanıtı başlatan hücre içi ve dışı birtakım sinyal yollarını aktif hale getirmektedir (Mukherjee ve ark., 2019).

Bu zamana kadar yapılan biyolojik testlerde memelilerde toplam 13 adet (TLR1–TLR13) TLR tespit edilmiştir. İnsanlarda ise TLR1–TLR10 olmak üzere 10 tanesi aktif haldedir. Farelerde ise TLR11, TLR12 ve TLR13 fonksiyonel olarak aktiftir. TLR'ler hücre içi (TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9) ve hücre dışı (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11) olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır (Behzadi, 2022).

Hücre dışında fazla miktarda lösin tekrar dizileri bulunan kısım ve hücre membranını geçebilen bir transmembran kısmını içeren ayrıca hücre içindeki sinyalleşmesinde görevli olan Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölümü olmak üzere TLR'ler temel olarak iki kısımdan oluşur (Mukherjee ve ark., 2019). TLR'nin hücrenin dışında kalan kısmı, MD2 reseptörüyle kontrollü olarak etkileşime girerek spesifik bir patojenik ligant ile bağlanır (Behzadi ve ark., 2021). Bu etkileşim sonucunda hücre içindeki TIR bölümü yapısal olarak bir değişikliği aktif hale getirir ve oluşan bu değişiklik, miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88), TIR alanı içeren interferon- β indükleyici adaptör (TRIF), TIR alanına sahip adaptör protein (TIRAP)/MyD88 adaptör benzeri (MAL) ve TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) gibi çeşitli adaptör görevinde olan proteinlerin hücre içine alınmasını kolaylaştırmaktadır (Mukherjee ve ark., 2016). TIRAP adaptör proteini, TLR2 ve TLR4 ile etkileşime girerek, MyD88'in hücre bünyesine alınmasını sağlar ve bu etkileşim, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ile mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK'ler) aktif hale getirmektedir. Böylece transkripsiyonel aktivasyon başlatılmaktadır. TRIF ise TLR3 ve TLR4'ün TIR bölgesiyle etkileşime girer ve mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'lar) nükleer faktör- κ B'nin (NF- κ B) ve interferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3)'ün aktivasyonunu başlatmaktadır (Mukherjee ve ark., 2019). Bu durum bakteri kökenli lipopolisakkaritin (LPS) TLR4-MD2 domaini ile bağlanmasını ve MyD88 bağımlı veya bağımsız sinyal yollarının etkileşimi başlatmaktadır (Mukherjee ve ark., 2016). TLR3 ten başka neredeyse tüm TLR'ler, bağışıklık hücrelerinin hepsinde çokça ifade edilmektedir. Ayrıca

çeşitli kanser türlerinde oldukça fazla ifade edilen MyD88 ile sinyal iletimi gerçekleşmektedir (Deguine ve Barton, 2014).

Birçok araştırma, MYD88'den bağımsız olarak TLR2 ve TLR4 ilişkili sinyal yollarının karsinogenezin ilerlemesinde çok önemli olduğunu ortaya koymuştur. Bu konuda, anormal TLR2 ve TLR4 artışının tespiti, meme, pankreas, tiroit, lenfoid, karaciğer, gastrik ve kolorektal gibi çeşitli kanser türlerinin ilerleyişinde önemli biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır (Zheng ve ark., 2020).

Literatür bilgileri, meme kanseri hücrelerinin ve kanser kök hücrelerinin (KKH) yaşamını devam ettirebilmesi ve çoğalmasında önemli bir rolü olan TLR2'yi aşırı olarak ifade ettiği gösterilmiştir. Özellikle kanser kök hücreleri (KKH), tümör hücrelerinin hayatta kalabilmesi için tümör kitlesine ait kendini yenileyebilen çoğalabilen hücre soylarına farklılaşabilmektedir. Bu durum metastatik süreçte çok önemli bir rol oynamaktadır (Wu ve ark., 2018). Meme kanseri kök hücreleri radyasyon ve kemoterapi gibi mevcut tedavi yöntemlerinin çoğunda direnç göstermektedir, dolayısıyla lokal ya da uzak organlara metastaz sıkça yaşanmaktadır. Bu durumda, meme kanseri tümörlerinin çoğu KKH varlığında kötü prognoz göstermektedir (Akkoç ve Toplu, 2016).

Meme kanseri hücrelerinde TLR2'nin aşırı aktive olması, birtakım otokrin mekanizma tarafından tetiklenir. Bu süreç, AKT, MAPK ve NF- κ B sinyal yollarının aktif hale gelmesine, IL-6, TGF- β gibi inflamatuvar sitokinlerin uyarılmasına neden olmaktadır. Ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörlerin artmasına dolayısıyla kanser gelişiminin hızlanmasına neden olmaktadır. IL-6 ve TGF- β , kanser kök hücrelerinde sırasıyla STAT3 ve Smad3 sinyal yollarını aktive edebilmektedir bu faktörler hücrelerin çoğalmasını, hayatta kalmasını, metastatik ve invaziv özelliklerini arttırmaktadır (Yang ve ark., 2014).

TLR2'nin meme kanserinde aşırı eksprese olması özellikle metastatik potansiyelini de arttırmaktadır. Ayrıca Wnt/ β -katenin ve NF- κ B sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayarak meme kanseri hücresinde mammosfer benzeri yapılar oluşturarak hücrelerin KKH gibi davranmasını sağlamaktadır (Mukherjee ve ark., 2016).

Meme kanserinde aşırı eksprese edilen TLR ise TLR4'tür. TLR4 meme kanserinde HMGB1 gibi hücresel ligantlar ile uyarıldığında inflamatuvar yanıtı başlatmaktadır. Bu durum hücre proliferasyonu ve metastazını da teşvik etmektedir. TLR4 bazı integrinleri denetler ve

aşırı ifadelenmesiyle kanser hücrelerinin adezyon ve invazyonunu artırır (Muresan ve ark., 2020).

Kanser türlerinde TLR4'ün aşırı ekspresyonu, özellikle meme kanseri hücre türlerinin metastatik özelliğini de arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca TLR4/MyD88 sinyalleşmesi çeşitli kanser türlerinde tümör gelişimi ve prognozda önemli etkileri bulunmaktadır. Yapılan bir araştırmada TLR4 ekspresyon düzeylerinin invaziv ve metastatik özellikleri arttırdığı ve dolayısıyla meme kanseri gelişiminde çok önemli rol oynadığı bilinmektedir (Mukherjee ve ark., 2023).

2.3. Apoptoz

Programlanmış hücre ölüm mekanizmalarından biri olan apoptoz, tıpkı nekroptoz, ferroptoz, otofaji ve piroptoz gibi hücrelerin ölüm mekanizması tiplerinden biridir. Kısaca apoptoz, hücre yüzeyine çıkan fosfolipidlerin ile birtakım sinyal olaylarından sonra kaspaz proteinlerinin aktivasyonu ile membranda kabarcıklar oluşması gibi bir dizi olayı içeren hücre ölüm mekanizmasıdır (Singh ve Lim, 2022). Apoptozda çok fazla düzenleyici bulunmaktadır bu düzenleyiciler kanserde çift yönlü bir etkiye sahip olabilmektedir. Apoptoz yeteri kadar aktif olmadığı zaman hücreler sağkalım yollarına başvurabilmektedir (Fulda ve Debatin, 2006). Bu sebeple, apoptozun etkili olması ile yeteri kadar aktive olamaması arasındaki denge oldukça güçtür. Bu büyük bir olasılıkla kanserin daha da ilerlemesine sebep olduğu görülmüştür. Meme kanseri dahil olmak üzere günümüzde kanser tedavisi olarak en yaygın tedavi kemoterapidir. Ancak bu tedavi yöntemi kalıntı tümör ve metastaza neden olabilmektedir (Sayers, 2011). Normal hücrelerde hücre dengesinden ve korunmasından da sorumlu olan apoptozun mekanizmasındaki birtakım bozukluklar aynı zamanda kanser hücrelerinin immün mekanizmadan kaçmasına ve ilaç tedavisine karşı dirençli olmasına neden olabilmektedir. Apoptozdaki önemli yollar, büyüme faktörleri ve sinyal yolları ile etkileşim halindedirler. Bu etkileşimdeki bozukluklar tümör gelişimini arttırabilmektedir (Kondratskyi ve ark., 2015).

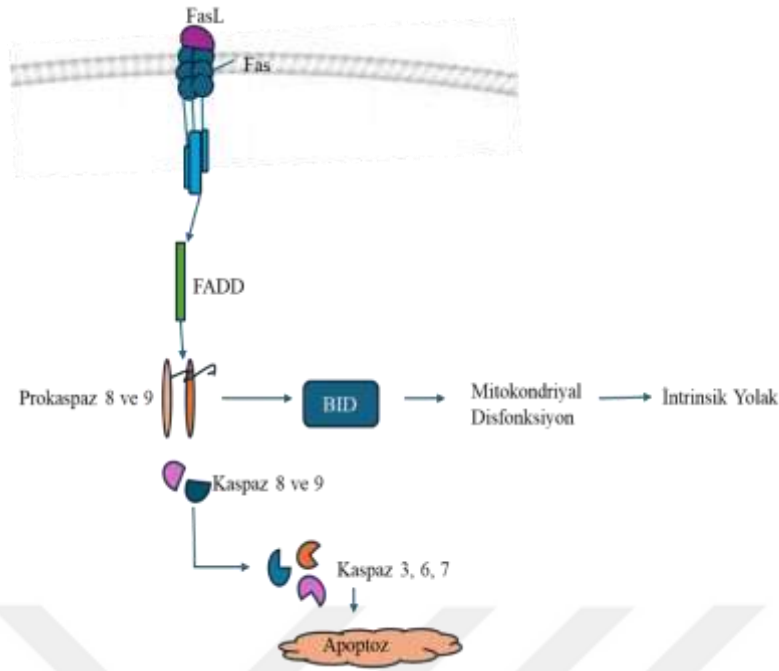
Apoptozun gerçekleşmesinde iki ana yolak bulunur, bu yollardan ilki ekstrinsik bir diğer ismiyle sitoplazmik yoldur. Bu yolda tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinden olan FAS ölüm ligandına bağlanır ve aktive edilir. İkinci yol ise, intrinsik yoldur ve mitokondriyal yol olarak da adlandırılır. Bu yolak uyarılınca mitokondrilerden sitokrom-c salınımını tetiklenir ve hücre içi birtakım enzimler aktive olur (Sayers, 2011). Bu iki yolda da düzenleyici ve parçalayıcı olarak görev yapan kaspaz adında enzimlerin aktivasyonu gerçekleşir ve bu enzimler hücre

ölümüne neden olmaktadır. Belirtilen iki yol da birbiriyle etkileşim halindedir. İkisi arasındaki ayırım oldukça zordur. Mesela Bcl-2'nin artışı dışsal yolla başlayan apoptozu baskılayabilmektedir (Yaghoubi ve ark., 2015).

2.3.1. Dışsal yol

Bu apoptoz yolağı, hücrenin membranında bulunan özel ölüm reseptörlerinin birtakım ligandlarla etkileşimi sonucu aktive olmaktadır ve içsel apoptoz yolağı mekanizmasını da aktive ederek programlanmış hücre ölümünü başlatır. Ayrıca, bu yolun sinyalleşme mekanizması hücre tipine göre de farklılık göstermektedir (Fulda ve Debatin, 2006).

Ekstrinsik yol, pro-apoptotik reseptörlerin hücre membranında bulunan benzer ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Ligandların etkileşimi, kaspaz 8 ve 10'un aktif olmasını sağlayan ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturmaktadır. DISC kompleksi sayesinde aktif hale gelen kaspaz 8 ve kaspaz 10, daha sonra içsel ve dışsal yolda ölüm kaspazları olarak da bilinen kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'yi aktive eder (Wu ve Bratton, 2013). Dışsal yol, membrandaki Fas ligandı ve Fas ile ilişkili kaspazlardan oluşmaktadır. Ekstrinsik yolun aktif olması için, ölüm reseptörleri (DR) adı verilen hücre yüzeyi reseptörlerinin bağlanması gerekmektedir. Fas, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve Apo-1 olarak da bilinmektedir. Fas aktivasyonu, virüsle enfekte olmuş bazı hücrelerin bağışıklık sistemindeki gözetiminden ve lenfositlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Dışsal yoldaki sıkıntıların malignite ve otoimmün hastalıkta neden olduğu bilinmektedir (Inoue ve ark., 2009). Fas ligandı (FasL) özellikle ölümle ilişkili görevleriyle tanınmasına rağmen hücre çoğalmasında ve inflamatuvar sistemde de rol oynamaktadır. Örneğin, ölüm uyarıcısı yolu tetiklediği zaman, membrana bağlı FasL inaktif olan Fas kompleksleriyle etkileşime girer ve ölüme neden olan sinyal kompleksini aktif hale getirir. Fas ölüme aracılık eden sinyal domaininde, adaptör protein, Fas ilişkili ölüm proteini, kaspaz 8 ve kaspaz 10 bulunmaktadır. Kaspaz 8'in aktivasyonu gerçekleşince, diğer kaspazlar da aktif olmaya başlar (Şekil 2.3). Bazı hücrelerde, kaspaz 8'in aktive olması ölüm için yeterli olabilmektedir. Bazı hücre tiplerinde ise kaspaz 8, Bid'i keserek içsel apoptotik yolla etkileşime girer ve bu da daha sonra sitokrom-c'nin salınmasına yol açabilmektedir böylece hücre içsel yolağa da yönelebilmektedir (Léveillé ve ark., 2010).



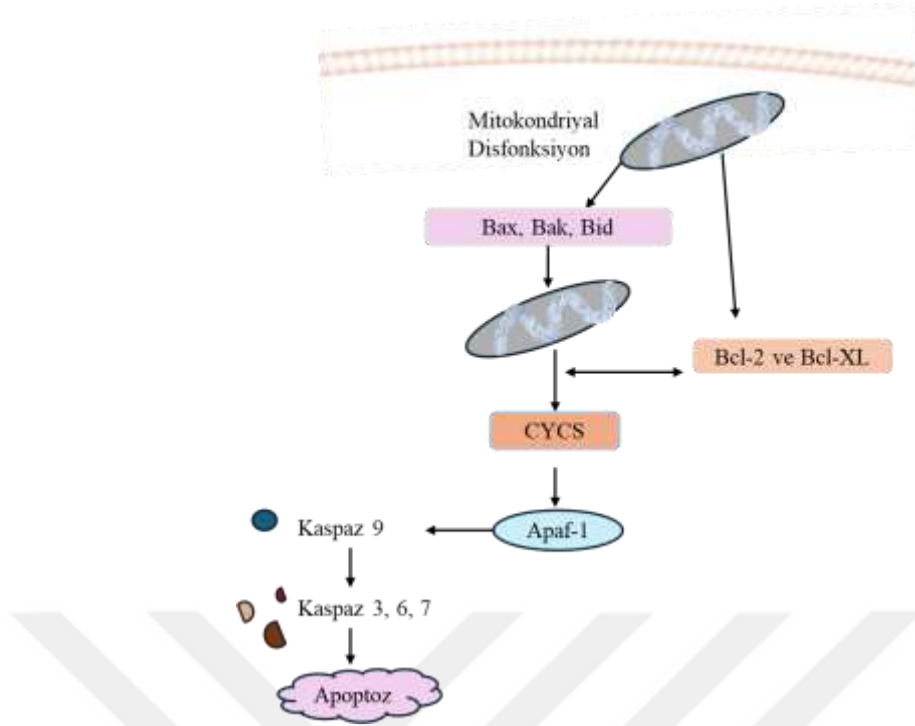
Şekil 2.3. Apoptozun dışsal yolu (Musumeci ve ark., 2015).

Apoptozda birbirleriyle etkileşimde olan yollar ekstrinsik yolun aktivasyonunu düzenleyebilmektedir. Bu düzenleyicilerin dengesizliğiyle bazı kanser türlerinde Fas gen mutasyonları veya delesyonları olabileceğinden bazı malign değişimlere de neden olabilmektedir. Ekstrinsik yolun düzenleyicileri ve inhibitörleri arasında, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri de bulunmaktadır (Li ve ark., 2021).

2.3.2. İçsel yol

İçsel yolun en önemli uyarıcı ve düzenleyicilerinden birisi Bcl-2 protein grubudur. Bcl-2 geni, kromozom 14 ve 18 translokasyonunda kırılma noktasında tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesi apoptoz ile ölümün en temel düzenleyicileridir ve birçok kanser türünde aşırı ifade edilir. Bcl-2'nin artan ekspresyonu kemoterapötik ilaçlara ve radyasyon tedavisine dirençe neden olabilmektedir. Artmış Bcl-2 ekspresyonunun azalması kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılayabilmektedir. Ayrıca, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücre döngüsünü G0 fazında durdurabilmektedir (Sayers, 2011).

Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Antiapoptotik Bcl-2 sınıfı, sitokrom-c salınımını baskılayarak apoptoz inhibitörü olarak etki ederken, proapoptotik sınıfı ise promotörler olarak görev alır. Proapoptotik denge yalnızca Bcl-2 miktarından çok Bcl-2 ve Bax arasındaki dengeye daha bağlıdır (Nair ve ark., 2014).



Şekil 2.4. Apoptozun içsel yolu (Singh ve Lim, 2022).

Yukarıda anlatılan ölüm sinyallerinden sonra proapoptotik proteinler, translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadır. Apoptoz sinyallerine yanıt olarak, dış mitokondriyal zar geçirgen hale gelmektedir ve sitokrom-c salınır. Sitokrom-c sitozole salındıktan sonra Apaf-1 ile etkileşime girerek kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3'ü aktive eder, bu da daha sonra tüm kaspazları aktive eder ve apoptoz gerçekleşir (Şekil 2.4). İçsel yolakta aktif hale gelen kaspazlar, çekirdekteki laminanın bozulmasına ve kaspaz-3 aracılığıyla hücre çekirdeği membranının parçalanmasına yol açar (Fulda & Debatin, 2006).

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), kesecik ve zarlardan oluşan bir organeldir. ER, mitokondri ile yakın temas halinde bulunmaktadır. Salgılanan, zarla çevrili ve bazı organel hedefli proteinlerin sentezi ve katlanması için oldukça önemli bir organeldir. ER lümeninin içinde bulunan proteinlerin katlanması için, ATP, Ca^{2+} ve disülfür bağı oluşumuna izin veren bir oksitleyici ortam gerekmektedir (Gorman ve ark., 2012). Hücredeki enerji düzeylerini, oksidatif stres seviyelerini veya Ca^{2+} konsantrasyonunu bozan koşullar, ER'nin protein katlama kapasitesini azaltabilmektedir. ER'de meydana gelen bu olumsuz koşullar, proteinlerin doğru katlanmasını engelleyen veya proteinlerin gereğinden fazla ER içinde işlenmesini veya taşınmasını bloklayan mutasyonlar, katlanmamış proteinlerin birikmesine ve dolayısıyla

agregasyonuna neden olabilmektedir ki bu durum ER stresi olarak adlandırılmaktadır (Lindholm ve ark., 2006). Hücreler ER stresinin zararlarından kurtulmak için toplu olarak katlanmamış protein tepkisi (UPR) olarak adlandırılan birtakım sinyaller vermektedir. Fakat bu yanıt daha fazla devam ederse hücreler ER stresi yoluyla ölüm yoluna yani apoptoza sürüklenmektedir. Kanseri, iskemi, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet dahil olmak üzere ER stresıyla ilişkili birçok hastalık tanımlanmıştır (Yoshida, 2007).

UPR, üç ER transmembran reseptöründe aktif olduğu kontrollü bir şekilde devam eden hücresel bir yanıttır. RNA benzeri endoplazmik retikulum kinazının (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) ve inozitol gerektiren enzim 1 (IRE1), glikoz düzenlenmiş protein (GRP78) ile ilişki yoluyla inaktif bir durumda tutulmaktadır. ER stresi koşulları altında, katlanmamış proteinlerin birikmesi GRP78 artışına ve üç ER stres reseptörünün aktivasyonuna yol açarak UPR aktivasyonunun devam etmesine neden olmaktadır (Schröder & Kaufman, 2005).

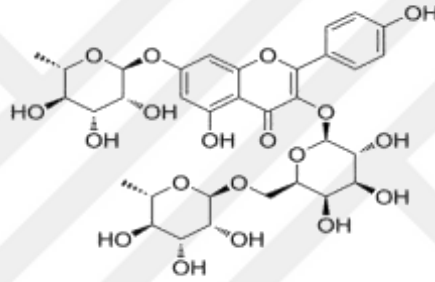
ER stresinin üç ana (PERK, ATF6 ve IRE1) aktive edici reseptörü hücre içi homeostazı sağlamak için farklı sinyal yollarını uyarmaktadır. PERK, protein sentezinin baskılanmasına sebep olurken ATF4'ün seviyesini artırır. Bu durumda ATF6 aktifleşerek protein katlanmasını düzenleyen birtakım genleri uyarmaktadır. IRE1 ekspresyonu ise XBP1 ifadenmesini destekler ve protein katlanmasını daha da artıran UPR yanıtının devam etmesini sağlayan genleri aktive eder. Aktive olan UPR yalnızca hücreyi koruyucu görev üstlenen bir yanıt değil, aynı zamanda uzun süreli aktif kaldığında hücrede apoptozu başlatan CHOP gibi faktörlerle hücre ölümüne de yol açabilir. Bu nedenle UPR, hücre sağkalımı ve ölümü arasındaki dengede kritik rol oynayan bir mekanizmadır (Gorman ve ark., 2012).

2.5 Robinin

Robinin (Kaempferol 3-O-robinoside-7-O-rhamnoside), bir kaempferol türevidir. Bitkilerde yaygın bulunan ve antiflojistik (anti-inflamatuar) dahil olmak üzere birçok biyolojik etki gösteren, doğal polifenolik bileşiklerin temel bir grubu olan flavonoidlere aittir. Robinin, *Robinia pseudoacacia* (yalancı akasya) bitkisinde yüksek oranda bulunmaktadır. Ayrıca *Astragalus* cinsine ait bitki türleri ve baklagillerden de bol miktarda izole edilebilmektedir. Robinin, özellikle baklagillerin yaprak ve çiçeklerinde zengin olarak bulunmakta, farmakolojik etkileriyle geniş bir biyolojik yelpazede değerlendirilmektedir (Tsiklauri ve ark., 2021).

Moleküler ağırlığı 740.66 olan Robinin (Şekil 2.5), ilk olarak *Vigna unguiculata* yaprağının flavonoid fraksiyonunda da saptanmıştır. Reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize edebilme yeteneği sayesinde antioksidan etki göstermekte, lipid peroksidasyonunu engelleyerek hücre zarını olumsuz etkileyen serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumaktadır. Ayrıca, NF-κB sinyal yolağını inhibe ederek proinflamatuvar sitokinlerin artışını baskılamakta böylece inflamatuvar yanıtı hafifletmektedir (Abhirami ve Ayyappan, 2024).

Yapılan araştırmalarda Robinin'in, TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu inhibe etme yetisi ile antikanser etki gösterdiği ve immün yanıt üzerinde de düzenleyici bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Antikanser özelliği ile *in vitro* araştırmalarda, özellikle pankreas ve tiroit kanseri hücre hatlarında çoğalmayı azaltarak apoptotik mekanizmaları aktive ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2023).



Şekil 2.5. Robinin'in kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Tez çalışması için Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesinde mevcut olan MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC® HTB-26™) kullanılmıştır. Hücre hattı, %1 Penisilin-Streptomisin (Capricorn; A.B.D.) ve %10 fetal sıgır serumu (FBS, Capricorn) ile zenginleştirilmiş RPMI 1640 (Biowest; A.B.D.) besiyeri ile %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatör kullanılarak 37°C'de uygun koşullar altında çoğaltılmıştır. Flasklarda belli bir yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri aspire edilip 4 mL PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco) kullanılarak yıkanmıştır. Daha sonra %0,25 EDTA içeren 2 mL tripsin (Biowest, A.B.D.) eklenerek hücre-hücre ve hücre-flask arasındaki bağlantı enzimatik reaksiyonla kopararak 37°C'de 4 dk inkübasyondan sonra hücrelerin kaldırılması sağlanmıştır. Tripsin enzim reaksiyonunu durdurmak için eklenen tripsinin iki katı kadar besiyeri eklenip hücreler falkona aktarıldıktan sonra 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant aspire edilip pellet besiyerinde çözündürülmüştür. Çözündürülen pellet daha sonra hücre sayımı ve ekimi gibi işlemlerde kullanılmıştır.

3.2. Hücre Canlılık Testi

Robinin'in MDA-MB-231 hücre hattında canlılık üzerine olan etkisini incelemek için hücre canlılık testi CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Abbkine; A.B.D.) solüsyonu kullanılmıştır. İlk olarak hücre sayımı için hücre süspansiyonu 1:1 (v:v) oranında tripan mavisi ile boyandıktan sonra boyanmamış olan hücreler hemositometre kullanılarak sayılmıştır. 2×10^3 hücre/kuyu kadar hücre, 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saatlik inkübasyon için 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp farklı konsantrasyonlardaki (0,25, 0,5, 1,5, 2,5, 5, 15, 25 ve 50 µM) Robinin ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Belirtilen saatler sonunda her bir kuyucuk içerisindeki 100 µL besiyeri üzerine 10 µL CCK-8 çözeltisi eklenmiştir. Plaka inkübatörde 3 saat bekletilmiştir. Inkübasyon sonunda bir mikropilaya okuyucu kullanarak 450 nm'de absorbans ölçülmüştür. IC₅₀ değeri aşağıdaki formül kullanılarak CompuSyn version 0.1 yazılımı ile hesaplanmıştır. Ayrıca diğer deneyler hesaplanan IC₅₀ değerine göre yapılmıştır. % Hücre Canlılık = (Örnek OD) / (Kontrol OD) x 100.

3.3. qRT-PCR ile Gen İfadesi Analizi

3.3.1. Hücrelerden total RNA izolasyonu

Tez projesinde kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı 6 kuyulu plakaya kuyu başına 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Robinin IC₅₀ dozu

hücrelere uygulanıp 48 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyuya 500 µL TRizol (GeneAll; A.B.D.) eklenip 5 dk inkübe edildikten sonra kazıyıcı kullanılarak plakadan kazınan hücreler ependorf tübe toplanıp 20 dk -20°C’de bekletilmesinin ardından 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ependorflara 100 µL kloroform eklenip 10 sn güçlü bir şekilde vorteks ve 15 dk oda sıcaklığında beklemeye bırakıldıktan sonra +4°C’de 14000 g de 15 dk santrifüj edilip üst faz başka bir ependorfa toplanmıştır. Toplanan üst faza 250 µL izopropanol ve 250 µL 2 M NaCl eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra +4 °C’de 14000 g de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan pellet 500 µL %70 etanol ile yıkanıp +4 °C’de 14000 g de 15 dk santrifüj edilmiştir. Pellet DNase ve RNase içermeyen suda çözündürülmüş total RNA elde edilmiştir. Total RNA -80°C’de saklanmıştır.

3.3.2. RNA miktarının belirlenmesi ve DNase-I enzimi uygulaması

İzole edilen total RNA’nın saflığı ve miktarı nanodrop cihazı kullanılarak 230, 260 ve 280 nm absorbands değerleri ölçülerek kimyasal kirlilik ve DNA kontaminasyonu A260/A280 ve A260/A230 değerleri referans alınarak belirlenmiştir. Ölçülen A260/A230 oranı için 2-2,4 ve A260/A280 oranı için ise 2±0,1 değerlerine yakın olan RNA örnekleri deneyler için kullanılmıştır.

İzole edilen total RNA’daki olası genomik DNA kontaminasyonlarının uzaklaştırılması için DNase-1 (Thermo Scientific; A.B.D.) enzimi kullanılmıştır. İlk olarak 4 µg total RNA üzerine 2 µL DNase-I reaksiyon mix ve 2 µL DNase-I enzimi eklendikten sonra 30 dk 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Enzim reaksiyonunu durdurmak için tüplere 2 µL EDTA eklendikten sonra 10 dk boyunca 65°C’de inkübe edilmiştir. Total RNA örnekleri -80°C’de saklanmıştır.

3.3.3. Revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi

DNase-I enzimi ile muamele edilen RNA’ları cDNA’ya dönüştürebilmek için iScript cDNA Sentez kiti (Bio-Rad; A.B.D.) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre 1 µg RNA üzerine 4 µL 5X iScript reaksiyon mixi ve 1 µL revers transkriptaz enzimi eklenmiştir ve RNA örnekleri 25°C’de 5 dk, 46°C’de 20 dk ve 95°C’de 1 dk inkübasyona bırakılmıştır, reaksiyon sonunda oluşan cDNA’lar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. Hedef genlerin primer tasarımı

Robinin’in MDA-MB-231 hücre hattında TLR2, TLR4, apoptoz ve ER stresi yolağında bulunan genlerin mRNA düzeyinde ifadesini tespit edebilmek için qRT-PCR kullanılmıştır. Bu doğrultuda hedeflenen genler ve analiz için kullanılacak olan referans gen (ACTB ve PGK1)

isimleri, tanımları ve Tablo 3.1’de tasarlanan primer dizileri ise Tablo 3.2 de verilmiştir (Güneş ve ark., 2022; Güneş, 2023; Solak ve ark., 2024).

Tablo 3.1 qRT-PCR analizinde kullanılan apoptoz, ER stresi, TLR ve referans genleri.

No	Gen sembolü	Gen tanımı
1	<i>BAX</i>	BCL2-ilişkili X proteini
2	<i>BCL2</i>	B hücreli CLL/lenfoma 2
3	<i>CASP3</i>	Kaspaz 3, apoptozla ilişkili sistein peptidaz
4	<i>CASP7</i>	Kaspaz 7, apoptozla ilişkili sistein peptidaz
5	<i>CASP8</i>	Kaspaz 8, apoptozla ilişkili sistein peptidaz
6	<i>CASP9</i>	Kaspaz 9, apoptozla ilişkili sistein peptidaz
7	<i>CYCS</i>	Sitokrom c, somatik
8	<i>FADD</i>	FAS ile ilişkili ölüm alanı proteini
9	<i>FAS</i>	Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü
10	<i>TP53</i>	Tümör protein p53
11	<i>ATF4</i>	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
12	<i>ATF6</i>	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
13	<i>CALR</i>	Kalretikülin
14	<i>CHOP</i>	C/EBP homolog protein
15	<i>EIF2A</i>	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa
16	<i>GRP78</i>	Glikozla düzenlenen protein 78
17	<i>HSP47</i>	Isı şoku proteini 47
18	<i>IRE1</i>	İnositol gerektiren kinaz 1
19	<i>PERK</i>	RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz
20	<i>XBP1</i>	X-Box bağlayıcı protein 1
21	<i>TLR2</i>	Toll benzeri reseptör 2
22	<i>TLR4</i>	Toll benzeri reseptör 4
23	<i>ACTB</i>	Aktin, Beta
24	<i>PGK1</i>	Fosfogliserat kinaz 1

3.3.5. qRT-PCR reaksiyonu

Hedef genlerin mRNA seviyesinde ifade düzeyleri RT-PCR cihazında (Bio-Rad CFX; Singapur) belirlenmiştir. qRT-PCR’da çift iplikli DNA’ya bağlanması için 5x EvaGreen (Solis BioDyne; A.B.D) kullanılmıştır. Reaksiyon başına 5 µL 5x EvaGreen, 2 µL cDNA, 12,5 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 3.2) ile nükleaz içermeyen su kullanılarak total hacim 10 µL’ye tamamlanmıştır. Oluşturulan reaksiyon 95°C’de 15 dk denatürasyon işleminden sonra 40 döngü boyunca 95°C’de 15 sn, 60°C’de 30 sn annealing ve 72°C’de 30 sn uzama işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon sonunda Ct değerleri ve erime eğrisi grafiklerinin sonuçları analiz edilmiştir. Referans gen olarak ACTB ve PGK1 kullanılmıştır.

3.4. Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA)

Kontrol ve Robinin grubunda kaspaz 7, (BT Lab; Cat#E2257Hu), BAX (BT Lab; Cat#E4977Hu) ve sitokrom-c (BT Lab; Cat#E7110Hu) protein düzeyi üretici firmanın talimatları doğrultusunda ELISA kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca; 40 µL örnek üzerine 10 µL biyotinlenmiş antikor ve 50 µL streptavidin HRP eklendikten sonra 1 saat 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Beş kez yıkama işlemlerinden sonra 50 µL substrat A ve 50 µL

substrat B solüsyonları eklenmiştir, 10 dk 37 °C de inkübasyon işleminin ardından 50 µL stop solüsyonu eklenip 450 nm dalga boyunda ELISA plaka okuyucuda (Biotek Epoch; 44 A.B.D.) ölçülmüştür.

Tablo 3.2. qRT-PCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri.

Gen	İleri primer dizisi	Geri primer dizisi	Uzunluk (bp)
<i>BAX</i>	GGAGCTGCAGAGGATGATTG	GGCCTTGAGCACCAGTTT	151
<i>BCL2</i>	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA	125
<i>CASP3</i>	GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA	TCAATGCCACAGTCCAGTTC	162
<i>CASP7</i>	CGAAACGGAACAGACAAAGATG	TTAAGAGGATGCAGGCGAAG	169
<i>CASP8</i>	GCCCAAACCTTCACAGCATTAG	GTGGTCCATGAGTTGGTAGATT	160
<i>CASP9</i>	CGACCTGACTGCCAAGAAA	CATCCATCTGTGCCGTAGAC	153
<i>CYCS</i>	GGAGAGGATACACTGATGGAGTA	GTCTGCCCTTTCTTCCTTCTT	102
<i>FADD</i>	TGACCGAGCTCAAGTTCCTATG	CCAGGTCGTTCTGTCTCCAG	108
<i>FAS</i>	GTGATGAAGGACATGGCTTAGA	GCCCAAACCTTCACAGCATTAG	156
<i>TP53</i>	GAGATGTTCCGAGAGCTGAATG	TTTATGGCGGGAGGTAGACT	129
<i>ATF4</i>	TTCGACCAGTCGGGTTTG	GGAGAACCCATGAGGTTTGA	93
<i>ATF6</i>	GAAGGGATCACCTGCTGTTAC	GTCCATCACCTGACAGTCAATC	152
<i>CALR</i>	CGGCTACGTGAAGCTGTT	ACGTTCTTGCCCTTGTAGTT	144
<i>CHOP</i>	AACGGAAACAGAGTGGTCAG	GGTCAGGCGCTCGATT	137
<i>EIF2A</i>	GGTTTCTTGGCAGCCATTT	TGCAACTTTAGGCTCCTCAC	100
<i>GRP78</i>	TGGTATTCTTCGAGTGACAGC	GACCATCCTTTCAATTTCTTCAGG	108
<i>HSP47</i>	AGATGCAGAAGAAGGCTGTT	GTTCTTGTCGATGGCCTCA	113
<i>IRE1</i>	GCGCATCACAAAGTGGAAGTA	ACATACAGAGTGGGCGTCA	75
<i>PERK</i>	CAAAGTAGATGACTGCAATTACGC	TCCAGCCACGCATTGAAATA	141
<i>XBP1</i>	CCAGAACATCTTCCCATTGGAT	GGGTCCAACCTTGTCAGAAAT	89
<i>TLR2</i>	TTATCCAGCACACGAATACACAG	AGGCATCTGGTAGAGTCATCAA	160
<i>TLR4</i>	CCCTGAGGCATTTAGGCAGCTA	AGGTAGAGAGGTGGCTTAGGCT	126
<i>ACTB</i>	AGCACGGCATCGTCACCAACT	TGGCTGGGGTGTTGAAGGTCT	179
<i>PGK1</i>	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC	AGCCACAGCCTCAGCATATTTC	104

3.5. Hedef Genlerin Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Kontrol ve Robinin uygulanan hücre grupları arasında mRNA ifadesinde anlamlı regülasyon görülen TLR2, TLR4, kaspaz 3, kaspaz 8 ve P53 protein düzeyindeki ifadesi western blot analizi ile belirlenmiştir.

3.5.1. Protein izolasyonu

Kuyu başına 5×10^5 hücre 6 kuyulu plakalara ekildikten sonra 37°C’de yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakılmıştır, IC₅₀ Robinin’in dozu uygulanmıştır. Ardından besiyeri aspire edilip 1 mL PBS ile yıkandıktan sonra plaka buz üzerine alınıp her bir kuyuya 1000 µl RIPA lizis buffer (VWR; A.B.D.) ve 10 µL proteaz inhibitör kokteyli (Sigma Aldrich; A.B.D) hazırlanıp iyice karıştırıldıktan sonra eklenip 15 dk buz içerisinde beklenmiştir. Daha sonra kuyular hücre kazıyıcı kullanılarak kazınıp ependorflara alındıktan sonra +4°C 14000 g’de 15 dk santrifüj edilip süpernatant başka bir ependorfa alınmıştır. Toplanan total protein -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.2. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

İzole edilen total protein örneklerinin konsantrasyonları Bradford (Thermo; Almanya) ve standart BSA (5-20 µg/30 µL, sığır serum albümini) kullanılarak tespit edilmiştir. Toplam 30 µL protein örneğine 90 µL bradford çözeltisi eklenip hazırlanan karışımdan 100 µL mikropalakaya konulup 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra mikropalaka okuyucuda (Biotek Epoch; 44 A.B.D.) 595 nm’de absorbans değeri ölçülmüştür ve BSA standart eğrisi dikkate alınarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 4.1).

3.5.3. Elektroforetik analizler

Konsantrasyonları belirlenen proteinler SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi ile ayrıştırılmıştır. İlk olarak ayırma jeli için 12,4 mL dH₂O (distile su), 9,6 mL %30 bisakrilamid solüsyonu, 7,6 mL 4X ayırma jeli solüsyonu, 446 µL %10 APS (amonyum persülfat) ve 20 µL TEMED karıştırılarak 1 mm kalınlığında ve 10 cm² boyutundaki cam plakalar arasına dökülmüştür. Hava kabarcığını önlemek ve düzgün bir alan oluşturmak için ayırma jelinin üst kısmı butanol ile kaplanmıştır. Polimerizasyon sonrası bütanol kurutma kâğıdı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yığınlama jeli için 8 mL dH₂O, 2,4 mL %30 bisakrilamid solüsyonu, 3552 µL 4X yığınlama solüsyonu, 264 µL %10 APS ve 40 µL TEMED eklenip ayırma jelinin üzerine dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrası kuyucuklar dH₂O ile yıkanmıştır. Toplam 30 µg protein örneği 6X örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp 95°C de 7 dk kaynatıldıktan sonra kuyucuklara yüklenmiştir. Proteinler yığınlama jeline geçene kadar 60 V, ayırma jeline ise 120 V elektroforez işlemi uygulanmıştır.

3.5.4. Western blot analizi

SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılan proteinlerin PVDF membrana aktarımı, transfer çözeltisi (14,41 gr glisin, 3,03 gr Tris, 10 mL %10 SDS çözeltisi, 250 mL dH₂O ve 150 mL metanol) kullanılarak transfer cihazında (BioRad) 1,5 A, 25 V akım ile yapılmıştır. Membranlar metanolde 30 sn bekletildikten sonra %3 süt tozu çözeltisinde 1 saat bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Membranlar primer antikorlarda +4°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Membranlar 3X 10 dk TBST ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Sekonder antikor ile 2 saat oda ısısında inkübe edilen membranlar, 3X 10 dk TBST ile yıkanmıştır. Daha sonra ECL solüsyonu (Advansta; K-12045-D20) ile 5 dk inkübe edilen membranlar görüntüleme cihazında (Azure Biosystems) görüntülenmiştir.

3.6. Koloni Oluşum Deneyi

Robinin'in MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşturma yeteneğine etkisini değerlendirmek için koloni deneyi yapılmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu plakaya 2×10^3 hücre/kuyu ekilmiş ve 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Robinin'in IC₅₀ dozu uygulandıktan sonra 7 gün süresince 2 günde bir besiyerleri yenilenmiştir. Koloni oluşumu gözlendikten sonra kuyular PBS ile yıkanıp -20°C'de 15 dk bekleme sonrası soğuk %99'luk etanol ile fikse olması sağlanmıştır. Koloniler kristal viyole ile boyanıp sayılmıştır.

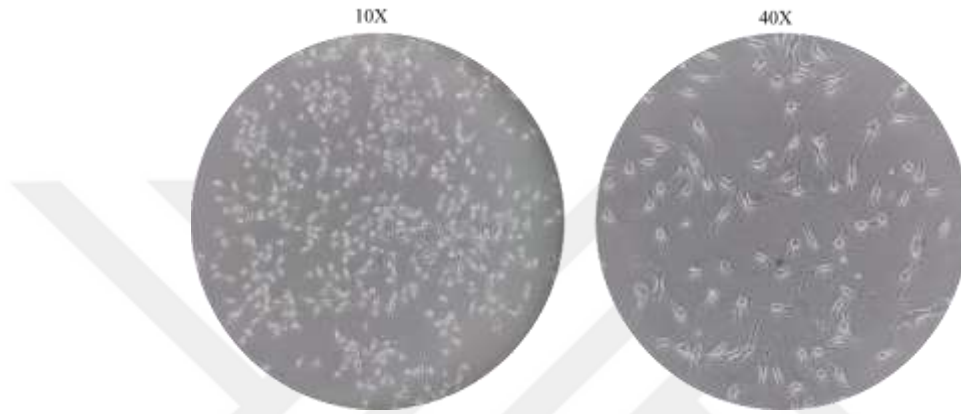
3.7. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada qRT-PCR kullanılarak hedef genlerin Ct değerleri ACTB ve PGK1 referans genleri ile normalize edilerek $2^{(-\Delta Ct)}$ değerleri kullanılmıştır. Deney gruplarının istatistik analizi SPSS 26.0 kullanılarak student *t-testi* ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü

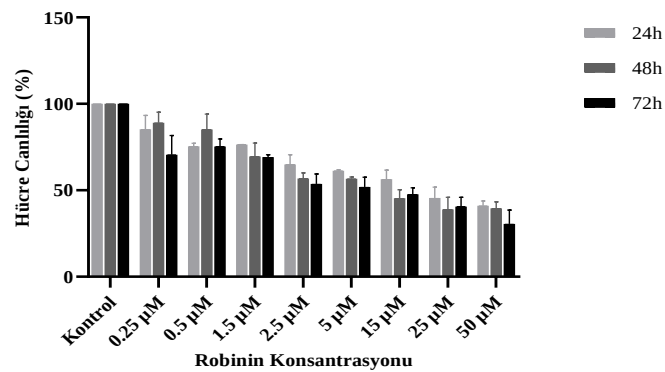
Bu tez projesinde kullanılan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı uygun nem, sıcaklık ve CO₂ oranına sahip bir etüvde inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Bu hücre hattı epitel-benzeri olarak sınıflandırılmaktadır. Hücreler, morfolojik olarak uzun ve ince bir yapıya sahiptir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MDA-MB-231 10X ve 40X mikroskop görüntüsü

4.2. Robinin'in Canlılık Üzerine Etkisi

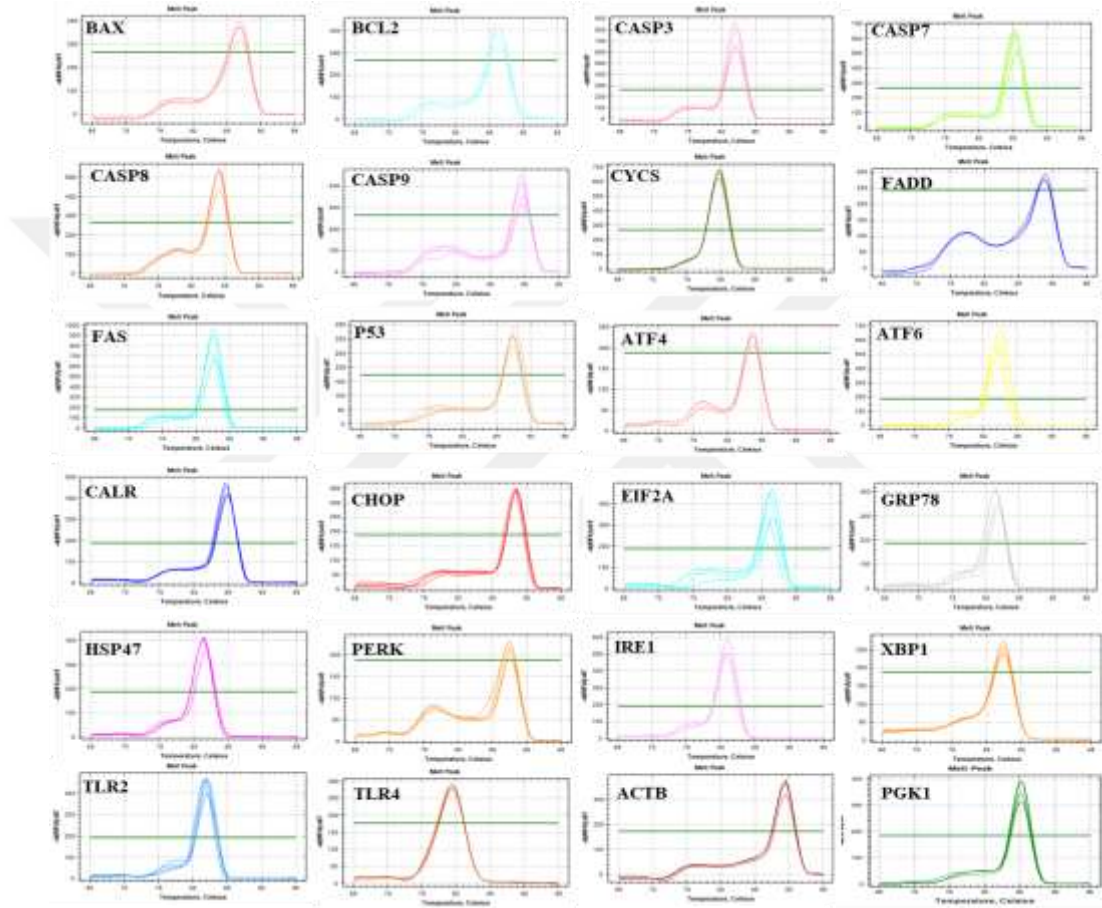
Robinin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığına etkisini incelemek için CCK8 testi yapılmıştır. MDA-MB-231 hücrelere farklı konsantrasyonlarda (0,25, 0,5, 1,5, 2,5, 5, 15, 25 ve 50 μ M) Robinin uygulanmıştır ve 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. IC₅₀ değeri Compusyn 0.1 programı kullanılarak 48. saat için 16,67 μ M olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Robinin'in meme kanseri hücre hattında canlılık üzerine etkisi.

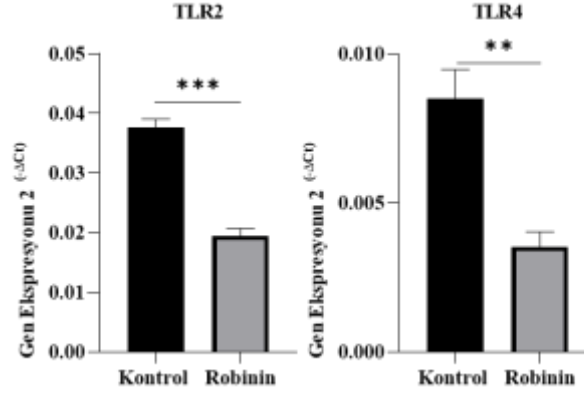
4.3. Robinin'in Hedef Genler Üzerine Etkisi

qRT-PCR sonucunda analiz edilen genlerin erime eğrisi grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Çalışmada kullanılan apoptoz, ER stresi, TLR ve referans genlerin spesifik olarak yükseltgendiği gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında Robinin'in TLR2, TLR4 (Şekil 4.4.), apoptoz (Şekil 4.5.) ve ER stres (Şekil 4.6.) yollarına ait genlerin mRNA seviyesinde ifadesi üzerine etkisi gösterilmiştir.

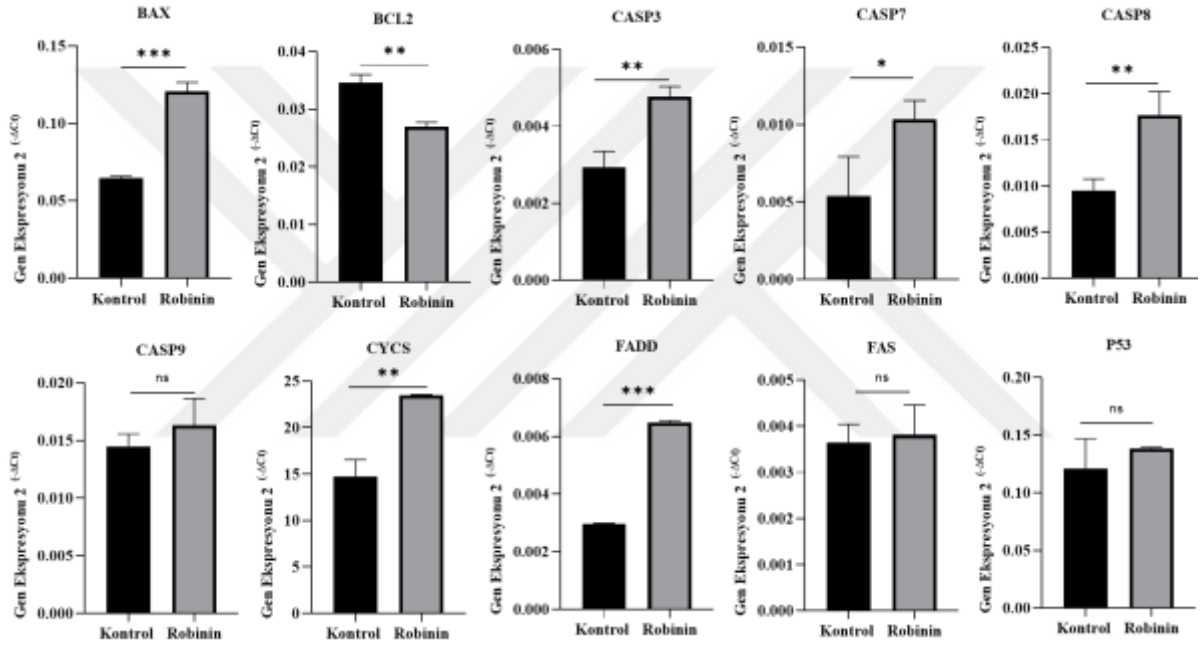


Şekil 4.3. qRT-PCR sonucu elde edilen melt eğrileri

Robinin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde TLR2 ($p \leq 0,001$) ve TLR4 ($p \leq 0,01$) ifadelerinin anlamlı düzeyde baskılandığı gözlenmiştir (Şekil 4.4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, Robinin uygulaması sonrası apoptoz yolağında bulunan BAX ($p \leq 0,001$), CASP3 ($p \leq 0,01$), CASP7 ($p \leq 0,05$), CASP8 ($p \leq 0,01$), CYCS ($p \leq 0,01$) ve FADD ($p \leq 0,001$) genlerin ifadesinde anlamlı artış gözlenmiştir. BCL-2 ($p \leq 0,01$) gen ifadesinin ise anlamlı olarak baskılandığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). CASP9, FAS ve P53 genlerinin ifadesinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yukarı regülasyon tespit edilmiştir.



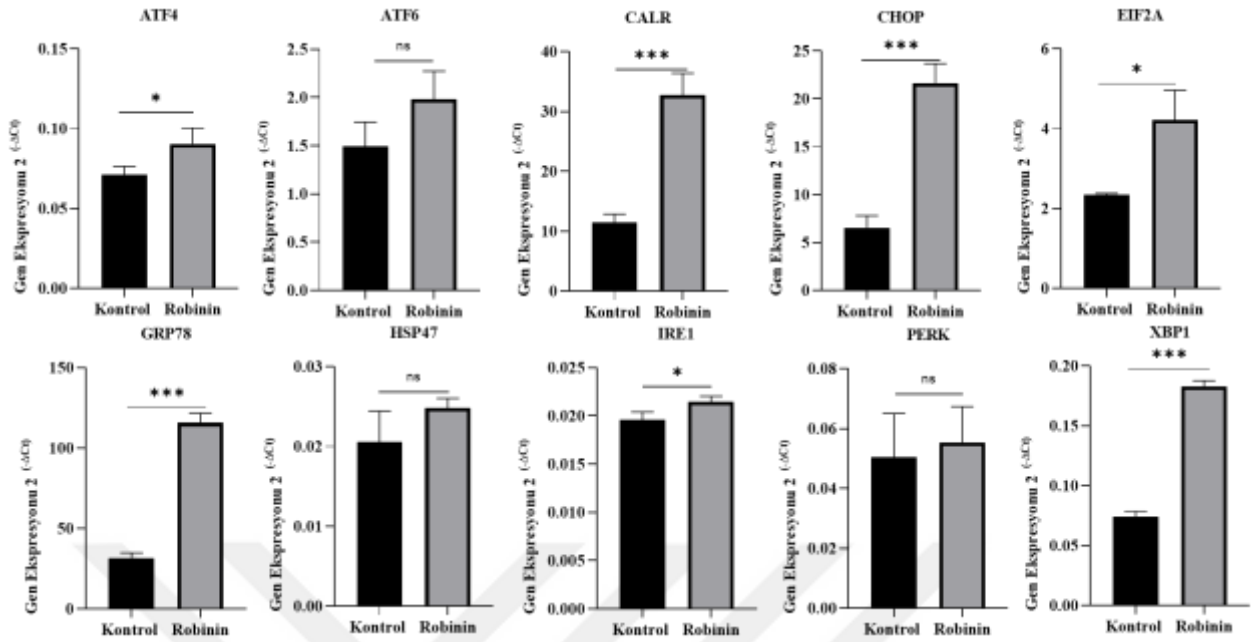
Şekil 4.4. TLR2 ve TLR4 gen ifadesindeki değişiklikler ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Şekil 4.5. Apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesindeki değişiklikler. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Robinin'in MDA-MB-231 hücrelerinde ER stres sinyal yolağı (ATF4, ATF6, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, HSP47, IRE1, PERK ve XBP1) genlerinin ifadesine etkisi belirlenmiştir. ATF4 ($p \leq 0,05$), CALR ($p \leq 0,001$), CHOP ($p \leq 0,001$), EIF2A ($p \leq 0,05$), GRP78 ($p \leq 0,001$), IRE1 ($p \leq 0,05$) ve XBP1 ($p \leq 0,001$) gen ifadelerinde anlamlı artış gözlenmiştir.

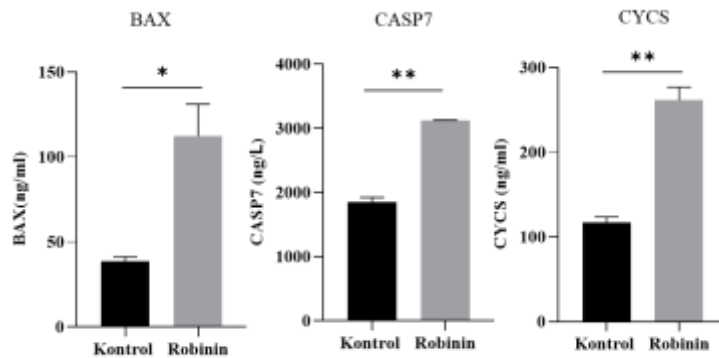
Ancak, HSP47 ve PERK ifadesinde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.6. ER stres ile ilişkili genlerin ifadesindeki değişiklikler. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.4. Robinin'in Apoptoz protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi (ELISA)

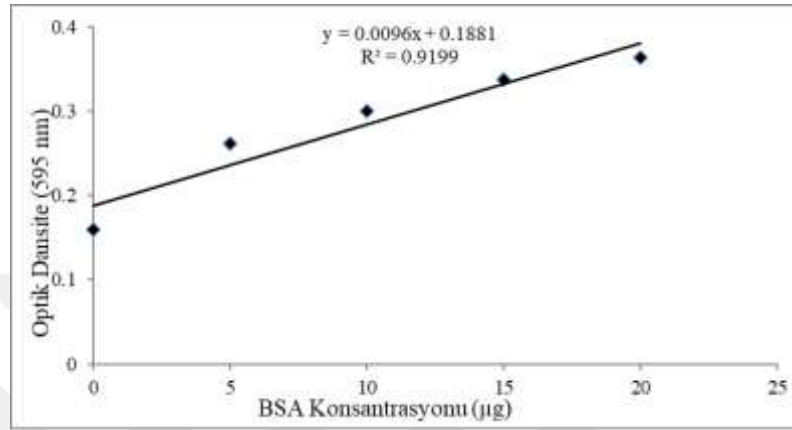
Robinin uygulamasından sonra hücrelerde BAX, CASP7 ve CYCS protein düzeyi değişimini incelemek için ELISA testi yapılmıştır. Robinin uygulaması sonrası BAX protein seviyesi $38,4 \pm 2,85$ ng/ml'den $112,34 \pm 18,76$ ng/ml'ye, CASP7 protein seviyesi $1850,5 \pm 70,71$ ng/L'den $3118 \pm 10,6$ ng/L'ye ve CYCS seviyesi ise $117,21 \pm 6,40$ ng/ml'den $261,28 \pm 15,68$ ng/ml'ye anlamlı düzeyde yükselmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Hücrelerin BAX, CASP7 ve CYCS protein seviyelerinde değişim

4.5. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

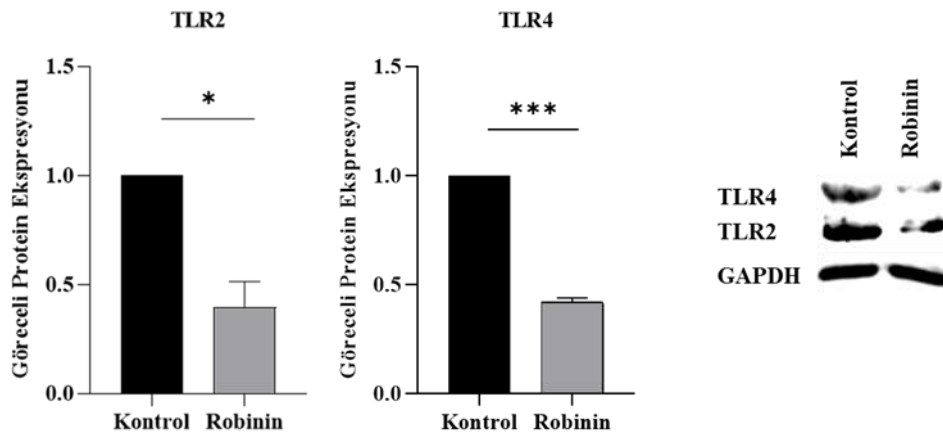
Kontrol ve doz gruplarının protein konsantrasyonlarını ölçmek için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Standart grafik çizildikten (Şekil. 4.8) sonra izole edilen kontrol ve doz gruplarının konsantrasyonları hesaplanan denkleme göre belirlenip western blot aşamasına geçilmiştir.



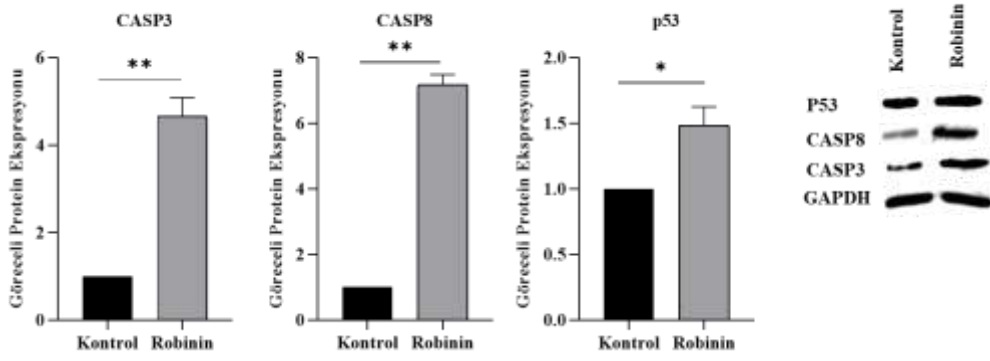
Şekil 4.8. BSA konsantrasyonu standart grafiği

4.6. Western Blot Analizi Sonuçları

TLR2, TLR4, CASP3, CASP8 ve P53 protein seviyeleri ise western blot yöntemi ile tespit edilmiştir. TLR2 ($p \leq 0,05$) ve TLR4 ($p \leq 0,001$) protein seviyesi Robinin uygulanan grupta anlamlı düzeyde baskılanmıştır (Şekil 4.9.). CASP3 ($p \leq 0,01$), CASP8 ($p \leq 0,01$) ve P53 ($p \leq 0,05$) protein seviyelerinde ise yukarı regülasyon gözlenmiştir (Şekil 4.10).



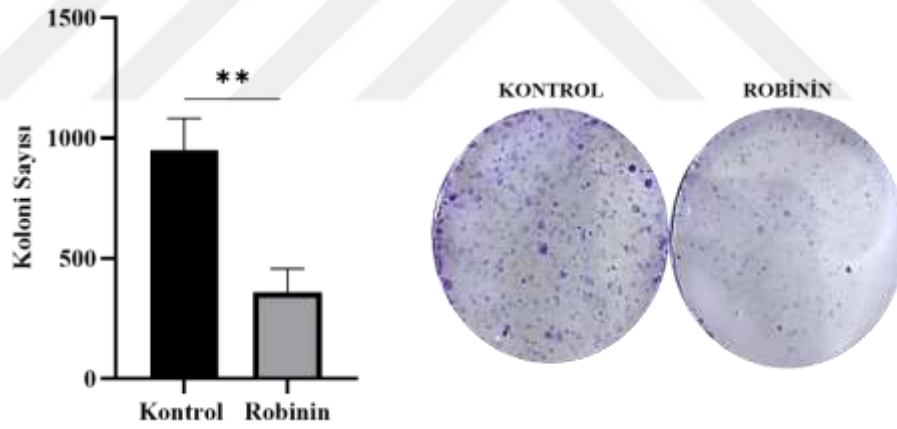
Şekil 4.9. Robinin'in TLR2 ve TLR4 protein seviyesine etkisi * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Şekil 4.10. Robinin'in CASP3, CASP8 ve P53 protein seviyesine etkisi * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.7. Robinin'in Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesi Üzerine Etkisi

Kontrol ve Robinin uygulanan MDA-MB-231 hücre gruplarının koloni oluşturma kapasitesi üzerine etkisini incelemek için koloni deneyi yapılmıştır. Robinin grubunda kontrol grubuna göre koloni oluşturma kapasitesi anlamlı olarak baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7.1).



Şekil 4.11. Robinin'in hücrelerin koloni oluşturma kapasitesine etkisi ** $p \leq 0,01$.

5. TARTIŞMA

Kadınlarda oldukça sık görülen meme kanseri, mortalite oranıyla akciğer kanserinden hemen sonra kanser sebepli ölümlerin ikinci sırasında gelmektedir. Kadınlarda meme kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri, rahim kanseri ve karaciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarının %51'ini oluşturduğu tespit edilmiştir. Sadece meme kanseri kadınlarda tanı konan kanserlerin %30'unu kapsamaktadır (Siegel ve ark., 2022).

Meme kanseri insidansı 15 yılda ~850.000'den 1.800.300'e artmıştır. Ayrıca en önemli risk faktörlerinden olan yaşa bağlı insidans oranı ise %30'dan %45'e çıkmıştır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yeni vaka insidans ve mortalite oranı yaşa ve cinsiyete bağlı olarak sürekli artmaktadır (Chen ve ark., 2020).

En önemli risk faktörlerinden olan yaş, obezite, hormon düzensizlikleri ve hormon alımı, menopoza girme yaşı, aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı meme kanserine yakalanma ve kanserin ilerlemesinde çok büyük bir rol oynamaktadır. Meme kanserinde kemoterapi, radyasyon ve cerrahi tedavi gibi çeşitli tedavi yolları kullanılmaktadır. Son zamanlarda meme kanserinde aşırı eksprese olan büyüme faktörlerini inhibe etmeye yönelik tedaviler ve adjuvan tedaviler yaygınlaşsa da insidans ve mortalite oranı yüksek seyretmektedir. Bu yüzden alternatif tedavi yolları aranmaktadır (Ramani ve ark., 2017).

Meme kanserinin başta HER2+, Luminal A, Luminal B, klauidin düşük ve üçlü negatif (ÜNMK) olmak üzere ve birçok alt tipi bulunmaktadır. Belirtilen alt tiplerinin çoğu östrojen ve progesteron reseptörlerine sahiptir. Meme kanseri lümen hücrelerinde özel olarak eksprese olan proteinlerin genlerine sahiptir ve Lümen A ve Lümen B olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

Östrojen ve progesteron reseptörlerince zengin olan fakat HER2 reseptörü olmayan Luminal A tipi, bu kanserin ~%50'ini kapsamaktadır diğer alt tiplere göre metastaz oranı düşük ve iyi prognozlu bir profile sahiptir. Diğer bir alt tip olan Luminal B ise, tüm meme kanseri tiplerinin ~%10'una sahiptir. Diğer Lümen tipine göre daha kötü prognozludur. Belirtilen üç reseptöre de (HER2, östrojen ve progesteron) sahiptir. Bu özelliklerinin yanında nüksetme ve metastaz olasılığı yüksektir. HER2 reseptörlerince zengin olan diğer tip ise ÖR ve PR reseptörlerince negatiftir. ÜNMK'ya göre daha iyi prognozludur ve metastaz olasılığı bu türe göre daha düşüktür (Allison, 2012; Eroles ve ark., 2012).

ÜNMK tipi tüm meme kanseri türlerinin ~%25'sini oluşturur. Bu tez çalışmasında kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı bu gruba ait özellikleri taşımaktadır. Özellikle ÖR ve PR reseptörlerince negatif olan bu grupta HER2 reseptörlerinin ifadesi ise çok az veya hiç olmayabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı hedefe yönelik tedaviler yapılamamaktadır. Meme kanserinin tüm alt tiplerine kıyasla ÜNMK en kötü prognozlu olandır. Nüksetme olasılığı çok yüksektir ve metastaz yeteneği oldukça gelişmiştir (Zagami ve Carey, 2022).

ÜNMK hücreleri karmaşık ve çok düzensiz olan bir genoma sahiptir. Ayrıca tümör içindeki heterojenitesi de oldukça yüksektir (Geyer ve ark., 2017). Yapılan araştırmalara göre ÜNMK hastalarında tanıdan sonra ilk 5-6 yıl içinde başka dokulara metastaz görülmekte ve dolayısıyla ölüm oranı daha yüksektir (El-Mesidy ve El-Kashif, 2009). Hastalara sadece kemoterapi ve radyasyon gibi tedaviler uygulanabilmektedir. Reseptörler yönünden negatif olan bu tipe çoğu yeni strateji uygulanamamaktadır. Bu yüzden yeni alternatif ve etkili terapötik strateji ve tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Apoptoz, hücre içi ve dışı birtakım yollar sayesinde hücre çoğalması ve hücre içi dengede çok önemli bir görevi olan hücre ölüm yoludur. Apoptoza giden bu sistemde meydana gelen problemler, dengesiz hücre artışına ve bunun sonucunda tümör oluşumuna yol açmaktadır. Apoptozun hem iç hem de dış tetikleyicileri mevcuttur (Pfeffer ve Singh, 2018). İçsel yoldan tetiklenen apoptoz BCL-2 tarafından yönetilmektedir. Bu yolda BAX ve BAK aktive edilir ve hücre yüzeyine sitokrom-c'nin salınmasını teşvik eder. Bu sayede APAF1 aktif olur ve CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9 ile CASP10'u aktive eder ve böylece apoptoz gerçekleşir (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Apoptozun bir diğer yolu olan dışsal yolda FAS ekspresyonu gibi hücre dışı birtakım sinyaller gerekmektedir. Bazı ölüm ligandlarıyla ölüm reseptörleri etkileşime girer ve bu etkileşime adaptör proteinde katılır ve DISC kompleksi oluşur ve bu kompleks kaspazları aktive eder (Fulda ve Debatin, 2006).

Bu tez çalışmasında da Robinin'in apoptoz (BAX, BCL2, CASP3, CASP7, CASP8, CASP9, CYCS, FADD, FAS ve P53) gen ifadesi değişimine etkisi araştırılmış ve BAX, CASP3, CASP7, CASP8, CYCS ve FADD genlerinde anlamlı yukarı regülasyon gözlenirken BCL-2 gen ifadesinin ise anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca protein seviyesini belirlemek için ELISA kullanılmış, BAX, CASP7 ve CYCS seviyesinde anlamlı artış gözlemlenmiştir. Ayrıca CASP3, CASP8 ve P53 protein seviyesi western blot yöntemi ile belirlenmiş olup anlamlı yukarı regülasyon tespit edilmiştir.

ER’de katlanmamış proteinlerin birikmiş olması hücreleri içsel ya da dışsal yol aracılığıyla apoptoza sürükleyebilir. Katlanmamış proteinlerin birikmesiyle reaktif oksijen türleri ve hücre içi denge bozulur ve hücrede UPR tepkisi gerçekleşir. ER stresi olarak adlandırılan bu olay da reaktif oksijen türleri ile hücre hemostazında dengesizliğe neden olabilir. Hücrede UPR (Katlanmamış Protein Tepkisi) aktivasyonu gelişir. Buna bağlı olarak, hücrelerde ATF4, ATF6, CALR, CHOP ve EIF2A gibi genlerin ekspresyonunda yukarı regülasyon gözlenmektedir (Evyapan ve ark., 2019; Kim ve Kim, 2018). Bu tez projesinde de ER stres (ATF4, ATF6, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, HSP47, IRE1, PERK ve XBP1) genlerinin ifadesi qRT-PCR ile tespit edilmiştir ve ATF4, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, IRE1 ve XBP1 gen ifadelerinde anlamlı artış gözlenmiştir.

Kanser hücrelerinin apoptoz yoluna girebilmesi için flavonoid bileşiklerin kullanmak oldukça akıllı bir yaklaşımdır. Bu konuda farklı flavonoid bileşiklerin etkinlikleri araştırılmaktadır. Flavonoid bileşikler bitki kökenli, bitkilere renk bazen de aroma verebilen ikincil metabolitlerdir. Flavonoidlerin antikanser, antiinflamatuvar, antidiyabetik ve antibakteriyel vb. birçok özelliğinin olduğu kanıtlanmıştır (Batra ve Sharma, 2013; Panche ve ark., 2016). Flavonoidler meme kanseri patogeneğinde birçok yolak ile etkileşime girebilir, hücre proliferasyonu ve metastaz gibi birçok kötü prognozu engelleyebilir ve kanser hücrelerinin ölümünü doğal yolları aktive ederek indükleyebilir (Ravishankar ve ark., 2013).

Doğal fenolik bir bileşik olan ve birçok bitkide bulunan Robinin, bazı çalışmalarda antikanser, antiinflamatuvar etkisi ve birçok biyolojik aktivitesi kanıtlanmış biyoflavonoid grubundadır. Robinin, birçok sinyal yollarıyla etkileşime girebilmektedir. Örneğin tirozin protein kinazları ve bağışıklık sisteminde rol oynayan önemli enzim reaksiyonlarının üzerinde etkili bir bileşik olabilmektedir (Gil ve Eom, 2023; Kumar ve Pandey, 2013; Panche ve ark., 2016).

Vigna unguiculata yaprağından izole edilen Robinin’in bir diğer özelliği de vücutta inflamatuvar yangıyı hafifletmek için aşırı artmış TLR2 ve TLR4’ün ekspresyonunu baskılayabilir (Janeesh ve ark., 2014). Apoptozu aktif edebilmenin bir diğer yolu ise apoptozun içsel ve dışsal yolağını engelleyen TLR’lerin yüksek ekspresyonunu baskılamaktır (Zhang ve Bliska, 2003). TLR’ler, normalde bağışıklık hücrelerinde ifade edilir ve bağışıklık sisteminde çok önemli reseptörlerdir (Mifsud ve ark., 2014; Palm ve ark., 2015; Shi ve ark., 2020). Kimokin ve sitokinlerin (TGF- β , IL-6 gibi) salınımını sağlayarak bağışıklık yanıtını düzenleyen TLR’lerin 10 üyesi bulunmaktadır. Ayrıca TLR’ler yalnızca inflamatuvar sistemde değil tümör

hücrelerinde de eksprese olmaktadır. Bu durum kanser gelişimini dolayısıyla metastazı destekleyebilmektedir (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2009).

Robinin'nin kalp dokusundaki lipid peroksidasyonunu ve inflamasyonunun belirteçlerinden siklooksijenaz-2 (COX-2) ile lipoksijenaz-15 (LOX-15) düzeylerini önemli ölçüde baskıladığı belirlenmiştir. Bunun yansısı TGF- β 1 yolağını düzenleyerek kardiyotoksisiteyi azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada Robinin'in oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (ox-LDL) uyarımı ile ekspresyonu artan TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu baskılayarak TLR-NF- κ B yolağını inhibe ettiği belirlenmiştir (Abhirami ve Ayyappan, 2024).

Yapılan bir çalışmada Robinin'nin ox-LDL ile uyarılmış insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PHMH) TLR2, TLR4 ve NF- κ B yolağı üzerindeki etkileri araştırılmıştır ve sonuçta, Robinin'in 6 μ g/mL konsantrasyonunda sitotoksik olmadığı ve 24 saatlik uygulamada anti-inflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca MCP-1, TNF- α , IL-6 ve ICAM-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin protein ekspresyon seviyeleri baskılanmıştır. TLR2 ve TLR4 düzeyleri ise mRNA düzeyinde baskılanmıştır. Robinin, ox-LDL'nin sebep olduğu NF- κ B yolağının aktivasyonunu, ROS ve lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. Dolayısıyla COX, LOX, iNOS ve PGE2 gibi inflamatuvar belirteç seviyelerini baskılamıştır (Janeesh ve ark., 2014). Ayrıca, adjuvan artrit modeli kullanılarak yapılan bir araştırmada, robinin metotreksat bileşiği ile kombine uygulandığında plazma IL-17 seviyesinde azalmaya neden olarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir (Tsiklauri ve ark., 2021). Ancak, Robinin'in antikanser etkisi üzerine olan araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu kapsamda bir çalışmada, insan meme kanseri hücrelerinde Robinin ve kaempferol flavonoidlerinin sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile eş zamanlı olarak tayini yapılmış ancak hücre proliferasyonu ve antikanser etkisine dair bir çalışma yapılmamıştır (Tsiklauri ve ark., 2011).

Meme kanseri açısından yapılan araştırmalarda TLR2, özellikle ÜNMK hücrelerinde çok yüksek seviyede ifade edilir. Örneğin MCF7 hücrelerine göre bu tez çalışmasında kullanılan MDA-MB-231 hücre hattında TLR2'nin aşırı ifadesi görülmüştür. Meme kanserinde TLR2'nin yüksek ekspresyonu, NF- κ B yolunu pozitif olarak etkilemektedir ve dolayısıyla IL-6 ve TGF- β gibi sitokinlerin ifadesini de arttırmaktadır (Xie ve ark., 2009). TLR2 gibi ÜNMK hücrelerinde TLR4'nin ifadesi de artış göstermiştir. Dolayısıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını arttırabilmektedir.

Robinin'in TLR2/TLR4 inhibitörü olma özelliğini kullanarak, kanser gelişimini destekleyen TLR2 ve TLR4'ün hedef alınması, yeni bir terapötik ajan olabilme ihtimalini güçlendirmiştir. Zhang ve ark. (2023) yaptığı bir çalışmada, Robinin, Mia-PACA2 ve PANC-1 pankreas kanseri hücre hatlarında antikanser etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu etkilerin, özellikle TLR2 üzerinden PI3K/AKT sinyal yolunu baskılamasıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Yapılan *in vitro* analizlerde Robinin (1 μ M, 24 saat), Mia-PACA2 ve PANC-1 hücre çoğalmasını ve göçünü anlamlı düzeyde baskılamış, EMT (Epitelyal Mezenkimal Geçiş) belirteçleri olan α -SMA ve Snail'in ekspresyon seviyesini ise azaltmıştır. Ayrıca hücrelerde IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuar sitokin seviyeleri de baskılanmıştır. Bir TLR2 agonisti olan CU-T12-9'un Robinin'in etkilerini kısmen geri döndürebilmesi için kullanılmış ve böylece bu etkinin TLR2 aracılığıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada yapılan hayvan deneylerinde ise, Robinin uygulamasının tümör hacminde anlamlı azalmaya neden olduğu ayrıca, vimentin ve α -SMA gibi EMT ile ilişkili proteinlerin seviyesinde baskılanmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, Robinin, TLR2-PI3K/AKT yolunu hedef alarak pankreas kanseri hücrelerinde tümör büyümesini, göçü, inflamasyonu ve EMT'yi baskılamıştır. Bu özellikleriyle pankreas kanseri tedavisinde potansiyel bir adjuvan ajan olarak değerlendirilmektedir (Zhang ve ark., 2023).

Robinin ile yapılan başka bir çalışmada ise Robinin'in tiroit kanseri hücre hattı (TPC-1 ve SW1736) üzerinde etkisi araştırılmıştır. Tiroit kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı olarak baskılamış, ayrıca TPC-1 ve SW1736 tiroit kanseri hücrelerinde oksidatif stresi arttırmış ve hücrelerdeki membran bütünlüğünü de bozmuştur. Robinin'in belirtilen tiroit kanseri hücre hatlarında uygulanmasıyla, 20 μ M/mL konsantrasyonda hücre proliferasyonu azalmış ve reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Oksidatif stresin artışı, hücresel stres ve apoptozun başlatılmasıyla bağdaştırılmıştır. Hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler ve çekirdek hasarı, Robinin'in apoptotik süreçleri etkin şekilde tetiklediğini göstermiştir. Moleküler düzeyde yapılan deneylerde, kaspaz 8 ve kaspaz 9'un mRNA seviyesindeki artış, Robinin'in apoptoz sinyal yollarını aktive ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, Bcl-2, c-Myc ve siklin D1 gibi proliferasyon ve antiapoptozla ilişkili proteinlerin seviyeleri baskılanmış olup Bax ve kaspaz 3 ekspresyon seviyesi artmıştır. Bu da Robinin'in mitokondriyal yol üzerinden apoptozu tetiklediğini göstermektedir (Shen ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında Robinin TLR2/TLR4 inhibitörü olma özelliği *in vitro* meme kanseri hücrelerinde değerlendirilmiştir. qRT-PCR ve western blot analizlerine göre Robinin meme kanseri hücre hattında TLR2 ve TLR4 gen ifadesi mRNA ve protein düzeyinde baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca Robinin hücrede ER stres ve apoptoz genlerinde önemli değişimlere neden olarak ER stresine yol açmış ve hücreyi apoptoza sürüklemiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Bu tez çalışmasının sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde Robinin'in antikanser etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak TLR2 ve TLR4 inhibitörü olarak kullanılan Robinin meme kanseri hücre hattında proliferasyona etkisi araştırılmış, hücre çoğalmasını baskıladığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 48. saat için 16,67 µM olarak bulunmuştur. Ayrıca hücrelerde koloni oluşumu kapasitesini azaltmıştır. Robinin meme kanserinde TLR2 ve TLR4'ü anlamlı olarak baskılamış olup bu durumun apoptoz ve ER stresine etkisi araştırılmıştır.

Apoptoz yolağında bulunan genlerin ifadesi qRT-PCR analizi değerlendirilmiştir. BAX, CASP3, CASP7, CASP8, CYCS ve FADD gibi önemli apoptoz genlerinde anlamlı artış gözlenirken BCL-2 gen ifadesi ise baskılanmıştır. ELISA ve western blot analizi sonucunda, BAX, CASP3, CASP7, CASP8 CYCS ve P53 protein düzeylerinde ise anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir.

Robinin'in antikanser özelliğinin anlaşılması için ayrıca ER stresine olan etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak: ATF4, CALR, CHOP, EIF2A, GRP78, IRE1 ve XBP1 gen ifadelerinde anlamlı yukarı regülasyon gözlenmiştir.

6.2. Öneriler

Yukarıda belirtilen sonuçlara göre; Robinin'nin meme kanseri hücre hattında proliferasyonu baskılayıp apoptozu ve ER stresini aktive ettiği görülmüş olup bu fenolik bileşiğin meme kanseri açısından terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini gösteren ön bulgular elde edilmiştir. Ancak, Robinin etkinliğinin daha iyi anlaşılması için *in vivo* deneylere ve ileri düzey araştırmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca Robinin'in etkisi birçok kanser türünde henüz araştırılmamıştır. Bu doğrultuda *in vitro* olarak hedef yolların belirlenip uygun kanser hücrelerinde etkisinin araştırılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abhirami, N., & Ayyappan, J. P. (2024). Cardioprotective effect of Robinin ameliorates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in H9c2 cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 1-14.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., et al. (2014). Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology*, 32(25), 2794-2803.
- Akkoç, A. N., & Toplu, N. (2016). Kanser Kök Hücresi. *Animal Health Production and Hygiene*, 5(1), 416-422.
- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S., & Kvåle, G. (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *British Journal of Cancer*, 92(1), 167-175.
- Allison, K. H. (2012). Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *American Journal of Clinical Pathology*, 138(6), 770-780.
- Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3, 439-459.
- Behzadi, P. (2022). Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in prostate cancer. In *Genetic Polymorphism and Disease* (pp. 379-399). CRC Press.
- Behzadi, P., García-Perdomo, H. A., & Karpiński, T. M. (2021). Toll-like receptors: general molecular and structural biology. *Journal of Immunology Research*, 2021(1), 9914854.
- Beral, V., Banks, E., & Reeves, G. (2001). Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *The Lancet*, 360(9337), 942-944.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., et al. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395-417.
- Chen, Z., Xu, L., Shi, W., Zeng, F., Zhuo, R., et al. (2020). Trends of female and male breast cancer incidence at the global, regional, and national levels, 1990–2017. *Breast Cancer Research and Treatment*, 180, 481-490.
- Deguine, J., & Barton, G. M. (2014). MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime Reports*, 6, 97.
- Desing, C. E. (2001). Development of three-dimensional radiotherapy techniques in breast cancer. *University of Leicester* (United Kingdom).
- El-Mesidy, S., & El-Kashif, A. (2009). Triple-negative breast cancer. *Research in Oncology*, 5(1-2), 1-4.
- Erol, A., Ho, A. M. C., Winham, S. J., & Karpyak, V. M. (2019). Sex hormones in alcohol consumption: a systematic review of evidence. *Addiction Biology*, 24(2), 157-169.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707.
- Evyapan, G., Ay, G., Cömertpay, G., & Lüleyp, H. (2019). Role of endoplasmic reticulum stress response in tumorigenesis. *Cukurova Medical Journal*, 44(1).
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., et al. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789.
- Fei, F., Siegal, G. P., & Wei, S. (2021). Characterization of estrogen receptor-low-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 188(1), 225-235.
- Folkerd, E., & Dowsett, M. (2013). Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *The Breast*, 22, S38-S43.
- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.
- Geyer, F. C., Pareja, F., Weigelt, B., Rakha, E., Ellis, I., et al. (2017). The spectrum of triple-negative breast disease: high-and low-grade lesions. *The American Journal of Pathology*, 187(10), 2139-2151.

- Gil, C. S., & Eom, S. H. (2023). Two different anti-algal control mechanisms in *Microcystis aeruginosa* induced by robinin or tannin rich plants. *Chemosphere*, 323, 138202.
- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jäger, R., & Samali, A. (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(3), 306-316.
- Güneş, C. E., Celik, F. S., Seçme, M., Elmas, L., Dodurga, Y., & Kurar, E. (2022). Glycoside oleandrin downregulates toll-like receptor pathway genes and associated miRNAs in human melanoma cells. *Gene*, 843, 146805.
- Güneş, C. E. (2023). Boric acid shows ER stress and apoptosis mediated anticancer activity in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 and PANC-1 cells. *Selçuk Tıp Dergisi*, 39(1), 1-6.
- Husby, A., Wohlfahrt, J., Øyen, N., & Melbye, M. (2018). Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nature Communications*, 9(1), 4255.
- Inoue, S., Browne, G., Melino, G., & Cohen, G. M. (2009). Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death & Differentiation*, 16(7), 1053-1061.
- Janeesh, P. A., Sasikala, V., Dhanya, C. R., & Abraham, A. (2014). Robinin modulates TLR/NF- κ B signaling pathway in oxidized LDL induced human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 18(1), 191-197.
- Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Wright, L. B., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the generations study cohort. *Breast Cancer Research*, 19, 1-14.
- Kechagioglou, P., Papi, R. M., Provatopoulou, X., Kalogera, E., Papadimitriou, E., et al. (2014). Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Research*, 34(3), 1387-1400.
- Kim, C., & Kim, B. (2018). Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. *Nutrients*, 10(8), 1021.
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., & Prevarskaia, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2532-2546.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 162750.
- Kyu, H. H., Bachman, V. F., Alexander, L. T., Mumford, J. E., Afshin, A., et al. (2016). Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Bmj*, 354.
- Léveillé, F., Papadia, S., Fricker, M., Bell, K. F., Soriano, F. X., et al. (2010). Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2623-2635.
- Li, K., van Delft, M. F., & Dewson, G. (2021). Too much death can kill you: inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease. *The EMBO Journal*, 40(14), e107341.
- Lindholm, D., Wootz, H., & Korhonen, L. J. C. D. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death & Differentiation*, 13(3), 385-392.
- Łukasiewicz, S., Czelelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., et al. (2021). Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-an updated review. *Cancers*, 13(17), 4287.
- Maguire, A., Douglas, I., Smeeth, L., & Thompson, M. (2007). Determinants of cholesterol and triglycerides recording in patients treated with lipid lowering therapy in UK primary care. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 16, S228-S228.
- McGuire, A., Brown, J. A., Malone, C., McLaughlin, R., & Kerin, M. J. (2015). Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*, 7(2), 908-929.
- McTiernan, A. (1997). Physical activity and the risk of breast cancer. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 7(4), 315.
- Micha, R. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*, 176(1), 100-106.
- Mifsud, E. J., Tan, A. C., & Jackson, D. C. (2014). TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease. *Frontiers in Immunology*, 5, 79.

- Mukherjee, S., Huda, S., & Sinha Babu, S. P. (2019). Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scandinavian Journal of Immunology*, 90(1), e12771.
- Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 193-204.
- Mukherjee, S., Patra, R., Behzadi, P., Masotti, A., Paolini, A., et al. (2023). Toll-like receptor-guided therapeutic intervention of human cancers: molecular and immunological perspectives. *Frontiers in Immunology*, 14, 1244345.
- Muresan, X. M., Bouchal, J., Culig, Z., & Souček, K. (2020). Toll-like receptor 3 in solid cancer and therapy resistance. *Cancers*, 12(11), 3227.
- Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Trovato, F. M., Weinberg, A. M., Al-Wasiyah, M. K., et al. (2015). Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20560-20575.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S., & Ashkenazi, A. (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. In *Methods in Enzymology* (Vol. 544, pp. 99-128). Academic Press.
- Newman, L. A., Reis-Filho, J. S., Morrow, M., Carey, L. A., & King, T. A. (2015). The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the cure symposium: triple-negative breast cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22, 874-882.
- Ng, A. K., & Travis, L. B. (2009). Radiation therapy and breast cancer risk. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(10), 1121-1128.
- Ozmen, V., Boylu, S., Ok, E., Canturk, N. Z., Celik, V., et al. (2015). Factors affecting breast cancer treatment delay in Turkey: A study from Turkish Federation of Breast Diseases Societies. *The European Journal of Public Health*, 25(1), 9-14.
- Özmen, V., Özmen, T., & Doğru, V. (2019). Breast cancer in Turkey; an analysis of 20.000 patients with breast cancer. *European Journal of Breast Health*, 15(3), 141.
- Palm, E., Demirel, I., Bengtsson, T., & Khalaf, H. (2015). The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Cytokine*, 76(2), 424-432.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47.
- Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., et al. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer*, 2(1), 1-11.
- Park, D. J., Lesueur, F., Nguyen-Dumont, T., Pertesi, M., Odefrey, F., et al. (2012). Rare mutations in XRCC2 increase the risk of breast cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 90(4), 734-739.
- Petroni, G., Buqué, A., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2021). Immunomodulation by targeted anticancer agents. *Cancer Cell*, 39(3), 310-345.
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448.
- Prat, A., Carey, L. A., Adamo, B., Vidal, M., Tabernero, J., et al. (2014). Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(8), dju152.
- Prat, A., Galván, P., Jimenez, B., Buckingham, W., Jeiranian, H. A., et al. (2016). Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy using core needle biopsy samples with the prosigna assay. *Clinical Cancer Research*, 22(3), 560-566.
- Rachdaoui, N., & Sarkar, D. K. (2013). Effects of alcohol on the endocrine system. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 42(3), 593-615.
- Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), 57-63.
- Ramani, K. V., Ramani, H., Alurkar, S., Ajaikumar, B. S., & Trivedi, R. G. (2017). *Breast Cancer: Medical Treatment, Side Effects, and Complementary Therapies*, 70(6), 120-140.

- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821-2831.
- Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., Kelly, P., Chagtai, T., et al. (2006). ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics*, 38(8), 873-875.
- Russo, I. H. (2002). Cigarette smoking and risk of breast cancer in women. *The Lancet*, 360(9339), 1033-1034.
- Sayers, T. J. (2011). Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60, 1173-1180.
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1-2), 29-63.
- Shang, C., & Xu, D. (2022). Epidemiology of Breast Cancer. *Oncologie (Tech Science Press)*, 24(4).
- Sharma, R. (2019). Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990–2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016. *Breast Cancer*, 26, 428-445.
- Shen, Y., Velu, P., Huang, X., & Dang, T. (2022). Evaluation of apoptotic and cytotoxic effect of robinin in TPC-1 and SW1736 human thyroid cancer cells. *Pharmacognosy Magazine*, 18(78).
- Shi, S., Xu, C., Fang, X., Zhang, Y., Li, H., et al. (2020). Expression profile of Toll like receptors in human breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, 21(2), 786-794.
- Shin, H. R. (2008). Global activity of cancer registries and cancer control and cancer incidence statistics in Korea. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 41(2), 84-91.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer statistics, 2021. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7-33.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1).
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48.
- Singh, P., & Lim, B. (2022). Targeting apoptosis in cancer. *Current Oncology Reports*, 24(3), 273-284.
- Solak, H., Gormus, Z. I. S., Koca, R. O., Gunes, C. E., Iyisoy, M. S., et al. (2024). The effect of neuropeptide Y1 receptor agonist on hypothalamic neurogenesis in rat experimental depression model. *Metabolic Brain Disease*, 40(1), 39.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tsiklauri, L., An, G., Ruszaj, D. M., Alaniya, M., Kemertelidze, E., et al. (2011). Simultaneous determination of the flavonoids robinin and kaempferol in human breast cancer cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(1), 109-113.
- Tsiklauri, L., Švík, K., Chrastina, M., Poništ, S., Dráfi, F., et al. (2021). Bioflavonoid robinin from *Astragalus falcatus* Lam. mildly improves the effect of methotrexate in rats with adjuvant arthritis. *Nutrients*, 13(4), 1268.
- Wéber, A., Vignat, J., Shah, R., Morgan, E., Laversanne, M., et al. (2024). Global burden of bladder cancer mortality in 2020 and 2040 according to GLOBOCAN estimates. *World Journal of Urology*, 42(1), 237.
- Wu, C. C., & Bratton, S. B. (2013). Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(6), 546-558.
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications*, 9(1), 3490.
- Xie, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, H., Wang, J., & Hu, Z. (2009). Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF- κ B in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(4), 1027-1032.

- Yaghoubi, A., Ghojzadeh, M., Abolhasani, S., Alikhah, H., & Khaki-Khatibi, F. (2015). Correlation of serum levels of vitronectin, malondialdehyde and Hs-CRP with disease severity in coronary artery disease. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 7(3), 113.
- Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., et al. (2014). Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PloS One*, 9(10), e109980.
- Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *The FEBS Journal*, 274(3), 630-658.
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ Breast Cancer*, 8(1), 95.
- Zhang, Q., Liu, J., Ao, N., Yu, H., Peng, Y., et al. (2020). Secondary cancer risk after radiation therapy for breast cancer with different radiotherapy techniques. *Scientific Reports*, 10(1), 1220.
- Zhang, W., Liu, W., & Hu, X. (2023). Robinin inhibits pancreatic cancer cell proliferation, EMT and inflammation via regulating TLR2-PI3k-AKT signaling pathway. *Cancer Cell International*, 23(1), 328.
- Zhang, X., Tworoger, S. S., Eliassen, A. H., & Hankinson, S. E. (2013). Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137, 883-892.
- Zhang, Y., & Bliska, J. B. (2003). Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infection and Immunity*, 71(3), 1513-1519.
- Zheng, C., Chen, J., Chu, F., Zhu, J., & Jin, T. (2020). Inflammatory role of TLR-MyD88 signaling in multiple sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 314.

8. EKLER

8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:202	Toplantı Tarihi: 19 Temmuz 2024
---------------------	---------------------------------

Karar Sayısı:2024/5130:(Başvuru ID: 20523) N.E.Ü. Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercan KURAR'ın “**Meme Kanseri Patogenezinde Robinin’in Antikanser Etkisinin Araştırılması**” başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Ebru Nur DURSUN'un yüksek lisans tez çalışmasının N.E.Ü. Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercan KURAR'ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Ercan KURAR

Yardımcı Araştırmacılar: Yüksek Lisans Öğrencisi Ebru Nur DURSUN



Prof. Dr. SaİM AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı