



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA JUGLON VE
KURKUMİN UYGULAMASININ mt-ATP6 VE
SİTOKROM P450 MOLEKÜLLERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Saliha AYDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Bivoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Eylül-2019

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Saliha AYDEMİR tarafından hazırlanan “MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının mt-ATP6 ve Sitokrom P450 Moleküllerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr.Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN

FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 181315003 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Saliha AYDEMİR

12.09.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının mt-ATP6 ve Sitokrom P450 Moleküllerine Etkilerinin İncelenmesi

Saliha AYDEMİR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

2019,63 Sayfa

Jüri

Dr.Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞCI

Dr.Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA

Meme kanseri, dünyada kadınlarda en sık görülen malign kanserdir. Sürekli artan sayıda meme kanseri vakası nedeniyle, birincil ve ikincil korunmada etkili aktiviteler geliştirmek hayati önem taşımaktadır. Her iki tür kanser önleme yöntemini birleştiren en iyi değer vaat eden yöntemlerden biri, kimyasal müdahale gibi görünmektedir. Karsinojenez sürecini inhibe etmek, geciktirmek veya tersine çevirmek için doğal veya sentetik bileşikler kullanır. Doğal kökenli kemoprevansiyon maddeler arasında, geniş spektrumlu bir anti-kanser polifenol türevi olan kurkumin ve juglona büyük önem verilmektedir.

Çalışmamızda kurkuminin ve juglonun farklı doz gruplarında *MCF-7* ve *MDA-MB-231* meme kanseri hücre hatlarında proliferasyonuna etkileri MTT hücre canlılık testi ile analiz edildi. Hücrelere 24 saat boyunca kurkumin ve juglon ile farklı dozlarda muamele edildi. Real time PCR ve Western blot yöntemiyle *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ve protein ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında kurkumin uygulaması sonucunda, *CYP3A4*'ün ve *mt-ATP6*' nın ekspresyonlarının arttığı, *MCF-7* hücrelerine juglon uygulaması sonucu *CYP3A4*'ün ekspresyonunun arttığı ayrıca *mt-ATP6* gen ifadelerinin azaldığı belirlenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında, hem kurkumin hem de juglon uygulaması sonucunda *CYP3A4*'ün ve *mt-ATP6* gen ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir.

İfade analizleri yapıldıktan sonra, bu moleküllere ait özgün antikorlar kullanılarak Western blot çalışmaları yapılmıştır. *MCF-7* hücrelerinde kurkumin uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* proteinlerinin kontrol grubuna göre ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. *MCF-7* hücrelerinde juglon uygulamasının *CYP3A4* proteininin kontrol grubuna göre ifadesini arttırdığı, *mtATP6* proteininin ifadesinde kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde kurkumin uygulaması sonucu *CYP3A4* proteininin ifadesinde kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. *MDA-MB-231* hücrelerinde juglon uygulaması sonucu *CYP3A4* ve *mt-ATP6* proteinlerinin ifadesinde kontrol grubuna göre, artış belirlenmiştir.

Yapılan literatür taramasında kurkumin ve juglonun *mtATP6* ve sitokrom p450 sistemini açıklayacak yayına rastlanmamıştır. Çalışmamızda mitokondriyal enerji metabolizması ve antioksidan sistem üzerine etkileri bu moleküllerdeki değişimlerle açıklanmaya çalışılmıştır. Bunun sonucunda da tedaviye yönelik strateji geliştirilmiş olacaktır.

Anahtar Kelimeler: juglon, kurkumin, mcf-7, mda-mb-231, meme kanseri, mt-atp6, sitokrom p450

ABSTRACT

MS/Ph.D THESIS

Investigation of MT-ATP6 and Cytochrome P450 Molecules' effects on Juglone and Curcumin Treatment in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines

Saliha AYDEMİR

**NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF NATURAL
& APPLIED SCIENCES**

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS MASTER'S THESIS

Advisor: Asst.Prof.Dr.Emine Nedime KORUCU

2019,63 Pages

Jury

Asst.Prof.Dr. Emine Nedime KORUCU

Assoc.Prof.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Asst.Prof.Dr. Dudu ERKOÇ KAYA

Breast cancer is the most common malignant cancer in women in the world. Due to the ever increasing number of breast cancer cases, developing effective activities in primary and secondary prevention is vital. One of the best-value methods combining both types of cancer prevention seems to be chemical intervention. It uses natural or synthetic compounds to inhibit, delay or reverse the carcinogenesis process. Among the chemoprevention agents of natural origin, curcumin and juglone, a broad spectrum anti-cancer polyphenol derivative, are of great importance.

In this study, the effects of curcumin and juglone on proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines in different dose groups were analyzed by MTT cell viability test. The cells were treated with curcumin and juglone at different doses for 24 hours. CYP3A4 and mt-ATP6 gene and protein expressions were compared with the control group by real time PCR and Western blot method.

As a result of the application of curcumin in MCF-7 breast cancer cell line, it was determined that the expression of CYP3A4 and mt-ATP6 were increased and that expression of CYP3A4 was increased as a result of juglone application in MCF-7 cells and mt-ATP6 gene expression was decreased.

In the MDA-MB-231 cell line, it was found that CYP3A4 and mt-ATP6 gene expression decreased as a result of both curcumin and juglone application.

After expression analysis, Western blot studies were performed using specific antibodies of these molecules. It was determined that the application of curcumin in MCF-7 cells increased the expression of CYP3A4 and mt-ATP6 proteins compared to control group. In MCF-7 cells, it was determined that juglone application increased the expression of CYP3A4 protein compared to control group and decreased expression of mtATP6 protein compared to control group.

It was determined that the expression of CYP3A4 protein decreased in MDA-MB-231 cells compared to the control group. The increase in the expression of CYP3A4 and mt-ATP6 proteins in MDA-MB-231 cells as a result of juglone application was determined compared to the control group.

In the literature review, no publication was found to explain the mtATP6 and cytochrome p450 system of curcumin and juglone. In our study, the effects of mitochondrial energy metabolism and antioxidant system on these molecules are explained. As a result, a treatment strategy will be developed.

Keywords: : juglon, kurkumin, mcf-7, mda-mb-231, breast cancer, mt-atp6, cytochrome p450

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez aşaması sürecinde bilgi birikimi ve katkılarıyla desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Dr.Ögr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' ya,

Tez süresince desteklerini eksik etmeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Tezimin deney aşamasında gerek maddi gerekse manevi desteğini eksik etmeyen Arş. Görv. Fatma GÖKTÜRK'e

Hayatım boyunca her anımda yanımda olarak beni yalnız bırakmayan aileme ve Benim için fedakarlık gösteren, maddi ve manevi destekçim olan ve her durumda ilk yardımına koşan sevgili eşim Sefa AYDEMİR'e,

Teşekkür ederim.

Saliha AYDEMİR
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Meme Kanseri.....	1
1.1.1.Meme Kanserinde Risk Faktörleri.....	1
1.1.2.Meme Kanseri Sınıflandırılması.....	2
1.1.3.Meme Kanserinin Evrelemesi.....	2
1.1.4.Meme Kanseri Tedavisi.....	3
1.2.MCF-7 Hücre Hattı.....	5
1.2.1. MCF-7 Hücre Hattının Kökeni.....	5
1.2.2. MCF-7 Hücre Hattının Kullanım Alanları.....	5
1.2.3.MCF-7 Hücre Hattının Özellikleri.....	5
1.2.4.MCF-7 Hücre Hattının Kararlılığı.....	6
1.3.MDA-MB-231	6
1.3.1. MDA-MB-231 Hücre Hattının Kökeni.....	6
1.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattının Özellikleri.....	6
1.3.3. MDA-MB-231 Hücre Hattının Uygulamaları.....	7
1.4.Juglon.....	7
1.5.Kurkumin.....	9
1.6.Sitokrom P40.....	11
1.6.1.CYP3A4.....	12
1.7.mt-ATP6.....	14
2.MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
2.1.MTT.....	16
2.2.Kullanılan Cihazlar.....	17

2.3.Hücre Kültürü.....	18
2.4.Hücrelerin Dondurulması.....	18
2.5. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	18
2.6. Hücrelerin Pasajlanması.....	18
2.7.Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	19
2.8.Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	19
2.9.Kurkumin Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	20
2.10.Kurkuminin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	20
2.11.Gen İfadeleri Analizleri.....	21
2.12.Total RNA İzalasyonu.....	21
2.13.Cdna Sentezi.....	22
2.14.PCR.....	22
2.15. Western Blot ile Protein Kantitasyon Analizi.....	23
2.16.İstatiksel Analiz.....	23
2.17.Hücrelerin Protein Analizleri.....	24
3.BULGULAR.....	25
3.1.Juglon ve Kurkuminin Sitotoksik Etkisi.....	25
3.2. MCF-7 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	29
3.3.MCF-7 Hücrelerinde Juglon Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	30
3.4.MDA-MB 231 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	31
3.5. MDA-MB 231 Hücrelerinde Juglon Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	32
3.6. MCF-7 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Protein Ekspresyonlarına Etkisi.....	33
3.7. MCF-7 Hücrelerinde Juglon Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Protein Ekspresyonlarına Etkisi.....	35
3.8.MDA-MB 231 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Protein Ekspresyonlarına Etkisi.....	37
3.9.MDA-MB 231 Hücrelerinde juglon Uygulamasının CYP3A4 ve mt-ATP6 Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	39

4.TARTIŞMA.....	41
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
EKLER.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	63



İSMGELER VE KISALTMALAR

TNM	Tümör-non Metastaz
UICC	Union International Contre Cancer
AJCC	American Joint Commite on Cancer
TNM	Tümör-nodemetastasis
TAM	Tamoksifen
LHRH	Luteinizan Hormon Salgılatıcı Hormon
Aİ	Aromataz İnhibitörleri
GnRH	Gonodotropin Salgılatıcı Hormon
CMF	Siklofosfamidmetotreksat-5-florourasil
CA	Siklofosfamid-doksorubisin
FAC	5-Floroursil- Doksorubisin- Siklofosfamid
TNF alfa	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
CSC	Meme Kanseri Kök Hücreleri
FBS	Fetal Sığır Serumumu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
MDR1	Multi İlaç Direçli Gen

1. GİRİŞ

1.1. Meme Kanseri

Kadınlardaki kanser ölüm sebeplerinden biri meme kanseridir. 2010 yılında Amerika'da kadınlarda 207 binden fazla meme kanseri bulgusu, erkeklerde de yaklaşık 2 bin bulgu oluşması öngörülmektedir. Kadınlarda en yaygın görülen ve kanserle ilişkili, en fazla teşhis konulan kanserdir ve kanser sebebi ölümlerde meme kanseri (% 15) akciğer kanserinden (% 26) sonra 2. sırada yer almaktadır (American Cancer Society). Meme kanserinden ölüm oranları 1990'da azalmıştır. Bu azalmayı erken tanı ve tedavinin gelişmesi etkilemektedir.

Türkiye'de 2005 yılı me kanseri sonuçlarına göre meme kanseri, Türkiye görülen kanserler arasında 4. sıradayken kadınlarda 1. sıradadır. İnsidansı 35-47/100.000' dir (Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı 2005). Meme kanseri ölüm hızı ve indisansı yaşlanmayla birlikte artış göstermektedir. 2004-2008 yılları arasında kanser teşhisi konulan hastaların % 95'i, meme kanserine bağlı ölümlerin % 97'si 40 yaşından büyük kadınlarda saptanmıştır (Gonzalez-Angulo AM 2007).

1.1.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

A- Yüksek risk faktörleri (3 kat ya da daha fazla risk artışına yol açarlar)

a. Cinsiyet: Kadın

b. Yaş: 40 yaş üstünde risk artmaktadır. Ancak, anne veya kız kardeşte erken yaşta kanser teşhis edilmişse, bu kişide daha erken yaşta meme kanseri oluşabilmektedir (Claus EB ve ark 1994).

c. Genetik mutasyon olması: (BRCA-1 ve/veya BRCA-2 genlerinde ki mutasyonlar örnek verilebilir.

d. Ailede meme kanseri öyküsü olması: Menopoz öncesi, bilateral ya da unilateral meme kanseri gelişen kadınların, kız çocuklarında, kardeşlerinde, annelerinde görülme sıklığı artmaktadır.

e. Daha önce bir memede kanser öyküsü olması: Menopozdan önce oluşan tümörler önemlidir. Daha önce meme kanseri hikayesi olan veteriner alan kadınların, diğer memelerinde kanser olasılığının meme kanseri olmamış olanlara göre 3-4 kat daha fazladır (Campbell J.B. ve ark 2002).

f. Atipi ile birlikte hiperplazi: Benign meme hastalarının büyük bir bölümü meme kanseri için predispozan faktör olarak görülmez. Çoğunlukla fibrokistik hastalık için bu surum geçerli olur. Memenin Atipik hiperplazili, proliferatif hastalığında 5 katı daha risklidir. Atipinin oluşturduğu risk, kanser öyküsü ailesinde bulunanlarda 11 kat artmaktadır (Manavoğlu 2004).

g. Yüksek meme dokusu yoğunluğu (Boyd NF ve ark 2007).

h. Parite: 30 yaşından sonra ilk doğumunu gerçekleştiren kadınlarda, 18 yaşından önce ilk gebeliği olan göre risk 3-4 kez artmaktadır.

i. Lobuler karsinoma insitu: İnvaziv kanser %30 daha risklidir.

j. Erkeklerdeki risk faktörleri: Jinekomasti, Klinefelter sendromu, ve ailede önceki nesillerde görülmesi riski artırır (Manavoğlu 2004).

1.1.2. Meme Kanserin Sınıflandırılması

Farklı özellikler gösterebilen meme kanseri homojen olmayan bir hastalıktır. Lobüler karsinoma ve duktal karsinoma meme kanserlerinin en büyük bir kısmını oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Meme Tümörlerinin Histopatolojik tipine göre meme kanserini yirminin üzerinde sınıflandırmıştır. Meme kanseri sınıflandırılması, meme kanserini müsinöz, medüller, tübüler ve lobüler karsinomlar gibi fazlaca özel tümör tipine ve duktal karsinoma ayrılmaktadır (Ellis ve ark 1992). Çevresindeki bazal hücrelerin dışına çıkan kanser hücreleri invaziv, dışına çıkmadığında in situ olarak isimlendirilirler. İnvaziv duktal karsinom en yaygın görülen meme kanseri tipidir. Meme kanserinde en çok invaziv ve duktal tipine rastlanmaktadır ve bunlar meme kanserinin yüzde 75' ini oluşturmaktadır (Frykberg ve ark 1999).

1.1.3. Meme Kanserin Evrelemesi

Meme kanserli hastalar, doktora gittiklerinde kanser evresi ve tipi açısından farklılık gösterirler. Tanı konulduğunda sağ kalınan süre hastalığın hangi evrede olduğu ile ilgilidir. Tümörün hangi evrede oluşu yalnız hayatta kalma süresini belirlemek için değil, hastaya uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesi için de çok büyük öneme sahiptir. TNM (tümör-nod-metastaz) parametreleri yaşama süresini önceden tayin etmede en güçlü prognostik faktörlerdir. Günümüzde UICC (Union International Contre Cancere) ve American Joint Committee On Cancer'in (AJCC) biçimlendirdiği "tumor-nodemetastasis (TNM) staging" sistemi kullanılır (Silverstein ve ark, 1998 Singletary

ve ark 2002). AJCC periyodik olarak evreleme standartlarını yeniler. 2010 yılında da, meme kanseri evrelemesine yeni güncellemeler yapılmıştır (American Joint Committee on Cancer 2010).

1.1.4. Meme Kanseri Tedavisi

Cerrahi

Erken evrelerde meme tümörlerinin küratif tedavisi cerrahi rezeksiyondur. En sık kullanılan teknik modifiye radikal mastektomidir. Son yıllarda meme koruyucu cerrahi artış göstermektedir. Yaşam süreleri bakımından mastektomi ve radyoterapi ile meme koruyucu cerrahi uygulanan erken evre meme karsinomlu bulguları arasında anlamlı bir fark göstermez (Fisher ve ark1995, Veronesi ve ark 1998). Metastatik evrede ise yaklaşım palyatiftir. Uzak organ metastazı yapmış meme kanserinde, günümüzde uygulanan tedavi ile kür elde etme şansı yoktur. Meme kanserinin soliter organ metastazlarında seçilmiş bulgular için ilk tedavi yaklaşımı bu günlerde metastazektomi yönünde gittikçe artan taraftar kazanmaktadır (Hortobagyi ve ark 1998).

Radyoterapi

Radyoterapi meme kanserinde bölgesel kontrolü artırmaktadır. Multidisipliner yaklaşımda önemli bir disiplini hem meme koruyucu hem de bölgesel ileri tümörlere oluşturmaktadır (Hortobagyi ve ark 1998). Mastektomili hastalarda kemoterapinin tamamlanmasının ardından radyoterapi uygulanması önerilmektedir. Lokal tekrar oranının bu yaklaşımla negatif etki oluşturmayacağı bildirilmektedir (Recth ve ark 1995, Fisher ve ark 1990).

Hormonal Tedavi

Hormonal reseptör pozitifliği olan hastalarda %60 cevap elde edilebilen tedavi yöntemidir. Adjuvan, palyatif ve neoadjuvan tedavide kullanılmaktadır. Tamoksifen (TAM), Lüteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH) analogları, aromataz inhibitörleri (Aİ) büyük oranda kullanılan ajanlardır. Dört çalışmada yapılan metaanalizde, premenapozal hastalarda TAM+LHRH analoglarının beraber kullanımının tek başına TAM kullanımına göre tüm parametrelerde avantaj sağladığı bildirilmiştir (Klijn ve ark 2001). Menepoz sonrası kadınlarda Aİ kullanımı, menepoz

öncesi kadınlarda ise tamoksifen ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları kullanımı endokrin cevaplı hastalarda günümüzde sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleridir. Menepoz öncesi kadınlarda GnRH analoglarıyla AI kombinasyonları araştırılması devam edilmektedir.

Kemoterapi

Kemoterapi, meme kanserinde farklı evrelerde farklı hedefler için kullanılmaktadır. Adjuvan olarak kullanıldığında sağkalımı artırdığı tespit edilmiştir. Tekrar riskini %25 oranında, ölüm riskini ise %15 oranında azalttığı bilinmektedir (Early Breast Cancer Trialsists 1998). Meme kanseri, antrasiklinler, antimetabolitler, taksanlar ve alkilleyici ajanlar gibi farklı kemoterapötiklere yanıt verirler (Sausville ve ark 2009). En etkili kemoterapi rejimi antrasiklinleri içerir ve etkisi kemoterapi sonrası tamoksifen verildiğinde artar (Early Breast Cancer Trialists2005). Yalnız kullanılan sitotoksik ajanların çoğu ile vakaların % 20-35'ine yakınında kısmi yanıt alınır. Remisyon çoğunlukla 4-6 ay sürer. En çok etki gösteren tekli ajanlar doksorubisin ve taksanlardır. Meme kanserinin tedavisinde Dosetaksol (taksotere) en önemli sitotoksik ajanlardandır (Vaclavikova ve ark 2003). Dosetaksol büyük ölçüde karaciğere metastaz yapmış hastalarda etkilidir. Çoklu kemoterapinin tekli kemoterapiden yararlı olduğu bildirilmiştir (Sayek ve ark 2004). Özellikle klasik versiyonu başlangıç tedavisi için CMF(Siklofosfamidmetotreksat-5-Florourasil) protokolü, prednizon ile birleştirildiğinde daha başarılı bir tedavidir. Bu tedavi ile bir yıl veya daha uzun sürede % 60 oranla cevap beklenebilir. Doksorubisinin, CA (siklofosfamid-Doksorubisin) ve FAC (5-Florourasil-Doksorubisin-Siklofosfamid) kombinasyonlarının da tedavi sürecinde etkili olduğu görülmüştür. CMF (Siklofosfamid-Metotreksat-5-florourasil) veya CA (siklofosfamid-Doksorubisin) etkisiz olunca ardışık tek ajanlar kullanılır. Son evre hastalarda paklitaksel, dosetaksol, 5- florourasil, metotreksat, vinorelbin, mitomisin C ve prednizon kullanılan ajanlardır. Randomize çalışmalar değerlendirildiğinde, kemoterapinin kombinasyon olarak uygulanması tek ajan olarak uygulanmasına göre daha pozitif cevap alınması, daha uzun bir sağkalım ve genel hayatta kalım avantajı sağladığı bulunmuştur(Carrick ve ark 2005). Ancak kombinasyon rejimleri tek ajanlara göre daha fazla toksiktir (Sledge ve ark).

1.2. *MCF-7* Hücre Hattı

1.2.1. *MCF-7* Hücre Hattının Kökeni

1970 yılında 69 yaşındaki Kafkas bir kadının meme dokusundan alınan bir hücre hattıdır. Alınan iki mastektomiden birincisi, çıkarılan dokunun iyi huylu olduğu tespit edildi. Beş yıl sonra, ikinci bir ameliyat sonrası *MCF-7* hücre hattına yol açacak bir doku alındığı plevral efüzyonda malign bir adenokarsinom bulundu. Hasta meme kanseri için radyoterapi ve hormonoterapi ile tedavi edildi. Yaygın olarak incelenen, meme adenokarsinomundan türevlendirilmiş bir epitel kanser hücre olan *MCF-7*, başkalaşmış meme epitelinin özelliklerine sahiptir. *MCF7* hücreleri, PI3K ve MAPK tutulmasını belirlemek için ve ERK ve Akt fosforilasyonunun kolay tespiti için kullanılabilir. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörleri ile bu hücrelerin östradiolü işleme yeteneği vardır (Ourique F ve ark 2015).

1.2.2. *MCF-7* Hücre Hattı İçin Kullanım Alanları

MCF-7 hücreleri, meme epiteline özel çeşitli ideal özellikleri koruyan hücre hattı olarak meme kanseri laboratuvar çalışmaları için yararlıdır.

MCF-7 hücrelerinin, hücre sitoplazmasındaki östrojen reseptörleri aracılığıyla östradiol formundaki östrojeni işleme yeteneği vardır. Bu, *MCF-7* hücre çizgisinin bir östrojen reseptörü (ER) pozitif hücre çizgisi olmasına neden olur. *MCF-7* ayrıca progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir.

1.2.3. *MCF-7* Hücre Hattının Özellikleri

MCF-7 hücreleri östrojen duyarlılığının korunmasına ve sitokeratin'e karşı duyarlıdır. Endotelin, desmin, GAP ve vimentin'e karşı duyarlı değildirler. İn vitro büyüdüğünde, hücre hattı kubbeli yapı oluşturabilir. Ayrıca epitelyal hücreler tek katmanlarda büyüme gösterir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa) kullanılarak büyüme inhibe edilebilir. *MCF-7* kanser hücrelerinin anti-östrojenlerle tedavisi, hücre büyümesinde azaltıcı etkisi olan insülin benzeri büyüme faktörü proteinlerini aktifleştirebilir. Bilim adamları, *MCF-7* hücrelerinin çoğaltılmasının kolay olmasına

rağmen, genellikle yavaş büyüyen bir popülasyon olduğu gözlemlenmiştir. *MCF-7* nin iki katına çıkması karakteristik olarak 30-40 saat sürmektedir.

MCF-7 hücreleri, hücre büyüklüğü 20-25 mikron olan oldukça büyük yapışık hücrelerdir. Önerilen ortam, 2 mM L-glutamin, 0.01 mg / mL sığır insülini (% 90), fetal sığır serumu (% 10) ve 1.5 g / L sodyum bikarbonat, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler ve EarleS BSS içeren EMEM'dir. (Ourique F ve ark 2015).

1.2.4. *MCF-7* Hücre Hattının Kararlılığı

Genetik olarak, *MCF-7* çizgisi intial izole kopyası ile tam olarak aynı değildir. Başlangıçta, 16 kromozomla indirgenmiş 85 kromozom içeren bir karyotip olmasına rağmen bugün ise *MCF-7* hücre hattında 69 kromozom içeren bir karyotip bulunmaktadır. Ayrıca, *MCF-7* hücre hattının, Michigan Kanseri Vakfı ve ATCC hücre hattı arasında genetik farklılıklar vardır. Bu, ATCC hücre hattının, diğer *MCF-7* hücre hattından farklı bir kaynaktan elde edildiğini gösterir.

1.3. *MDA-MB-231* Hücre Hattı

1.3.1. *MDA-MB-231* Hücre Hattının Kökeni

MDA-MB-231 hücre hattı, metastatik bir meme adenokarsinoması olan 51 yaşında beyaz bir dişinin plevral efüzyonundan oluşturulan ve insanda en sık kullanılan epitelyal meme kanseri hücre hattıdır.

1.3.2. *MDA-MB-231* Hücre Hattının Temel Özellikleri

MDA-MB-231 östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonundan ve HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptöründen) yoksun olduğu için saldırgan, invaziv ve zayıf farklılaştırılmış üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Farklı istilacı kanser hücre hatlarına benzer şekilde, *MDA-MB-231* hücrelerinin invazivliğine, hücre dışı matrisin proteolitik bozunmasına aracılık eder. ER ve PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun eksikliğinden dolayı, hücre hattı başlangıçta bir "bazal" meme kanseri hücre hattı olarak sınıflandırıldı. Ayrıca, claudin düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilen ve CD44 + CD24- / düşük fenotip

gibi meme kanseri kök hücreleriyle (CSC'ler) ile ilişkili özelliklerin ifadesi olan claudin-3 ve claudin-4'ün down regülasyonunu, Ki-67 proliferasyon markörünün düşük ekspresyonunu, epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkili markerleri desteklemektedir. 3B kültüründe, hücre hattı endotel benzeri morfoloji gösterir ve sıklıkla çoklu hücre kolonilerini köprüleyen yıldız çıkıntılarına sahip olan invaziv fenotipiyle ayırt edilir.

1.3.3. *MDA-MB-231* Hücre Hattı Uygulamaları

Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçenekleriyle agresif bir meme kanseri şeklidir. Üçlü negatif meme kanserinin moleküler temelini anlamak bu nedenle çok önemlidir. Etkili yeni ilaç gelişiminde aktif ajanlar kullanılarak, kemik metastazı araştırması gibi bu tip birçok meme kanseri çalışması, *MDA-MB-231* hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Buna ilaveten farelerde intraventriküler enjeksiyondan sonra farelerin kemiklerine, beynine ve akciğerlerine metastaz yapan *MDA-MB-231* hücrelerinin alt klonları da izole edilmiştir, bu nedenle bu hücre hattının, metastaz oluşumuna sebep olan genlerin ve yolakların tanımlanmasına aracı olmuştur.

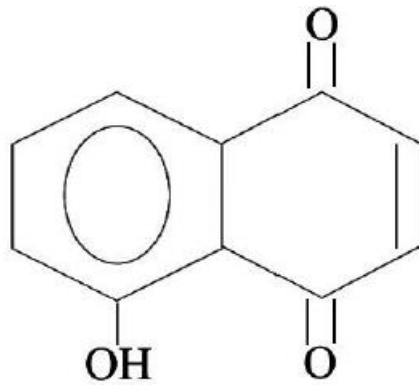
1.4. Juglon

Kanser alanında kullanılan birçok ilacın doğal ürünlerden ve türevlerinden elde edildiği bilinmektedir ve bu kapsamda bitkisel ürünler (fitokimyasallar) daha etkili kanser önleyicilerin ve kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesindeki çalışmaların önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Kitagawa ve ark 2011). Fitokimyasalların, moleküler mekanizmaları kesin olarak açık olmamakla birlikte insan kanser deneysel modellerinde, antikanser aktiviteleri gösterilmiştir (Edderkaoui ve ark 2013).

Diğer kanserlerin yanı sıra, birçok çalışmada resveratrol, kurkumin, apigenin, baikalein gibi çeşitli bitki kaynaklı bileşiklerin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki apoptoz uyarıcı ve hücre çoğalmasını engelleyici etkileri incelenmiştir (Wang ve ark 2006; Takahashi ve ark 2011; Zhou ve ark 2011; Donald ve ark 2012; Johnson ve de Mejia 2013a; Johnson ve de Mejia 2013b). Benzokinon, naftakinon, fenantren kinon ve antrakinin olmak üzere 4 tipe ayrılan bitki sekonder metaboliti kinonlar, antikanser etkileri belirlenmiş önemli bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerdir (Lu ve ark 2013). Metabolik yolakta elektron taşıma zincirindeki yaşamsal bağları sağlayarak çoklu biyolojik oksidatif süreçlere katılan naftakinonların, antiinflamatuvar, antifertilite,

antibakterial, antifungal, hipolipidemik, antiaterosklerotik, antilayşmaniyal ve antimalaryal'den oluşan çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Pinto ve de Castro 2009; Seshadri ve ark 2011; Lu ve ark 2013). Bu özelliklerin yanı sıra diğer kinon tiplerinde olduğu gibi naftakinonların antikanser özellik gösterdiği belirtilmiştir (Lu ve ark 2013). Antikanser özelliği yaygın olarak çalışılan naftakinon bileşiği plumbaginın meme kanseri, prostat kanseri, servikal kanser, ovaryum kanseri, akciğer kanseri ve bunların yanı sıra pankreas kanseri hücreleri üzerindeki antikanser özellikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Srivinas ve ark 2004; Srivinas ve ark 2004; Ahmad ve ark 2008; Gomathinayagam ve ark 2008; Powolny ve Singh 2008).

Önemli bir bitkisel kaynak olan juglon (5-hidroksihidroksi-1,4-naftakinon) (Şekil 1), Çin, Hint ve Kore geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan Juglans (ceviz) cinsindeki ağaçların kök, yaprak, meyve perikarpı, ağaç kabuğu ve ağaç gövdesinde bulunan doğal oluşumlu naftakinon türevi bir bileşiktir ve plumbaginın yapısal analogudur (Ji ve ark 2011; Xu ve ark 2012; Xu ve ark 2013). Doğal ortamında çok etkili bir allelopatik bileşik olarak rol gösteren juglon, bitki rekabetinde önemli bir işleve sahiptir (Kwiecinski ve ark 2012).



Şekil1: . Juglonun yapısal formülü (Thakur 2011).

Juglonun hücreler üzerinde etkilerine bakıldığında, DNA hasarını uyardığı, p53 protein seviyesininin transkripsiyonel olarak baskılanmasını önlediği ve hücre ölümünü uyardığı görülmüştür (Xu ve ark 2012). Juglonun; gastrik kanser, lösemi, prostat kanseri olmak üzere farklı kanser hücrelerinde etkilerine bakıldığında Bcl2/Bax oranında bir azalmaya yol açtığı ve ROS oluşumuna aracılık ederek mitokondriyal yolakla apoptozu uyardığı ve juglonla uyarılan apoptozda ROS' un önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Xu ve ark 2010; Ji ve ark 2011; Xu ve ark 2012).

1.5. Kurkumin

Zingiberaceae familyasının önemli üyelerindendir. “Zerdeçal” olarak bilinen *Curcuma longa L.* sarı çiçekli, büyük yapraklı, çok yıllık otsu bir bitkidir ve diğer bir adı da hint safranıdır.

Curcuma cinsi yer altında kök, sap ve rizomlara sahiptir. Aromatik bitkiler arasında yer alan *Curcuma longa L.* rizomları (zerdeçal, turmerik) köri baharatının en etkili üyesidir, ayrıca içeriğindeki maddeler baharatın uzun süre saklanmasını sağlar ve lezzetini artırır. Zerdeçal Endonezya, Çin, Hindistan, Tayland ve Afrika'nın tropikal bölgelerinde yetişmektedir (Rhizoma *Curcumae Longae* 1999). Bitkinin toprak altındaki ana kökleri (rizom) yumurtaya benzer, yan kökleri ise parmak şeklinde çıkıntılıdır. Rizomların üst yüzü sarımsı, iç yüzü ise sarı renklidir. Nepal'de evlerde ilaç yapımında kullanılmaktadır (Eigner ve ark 1999).

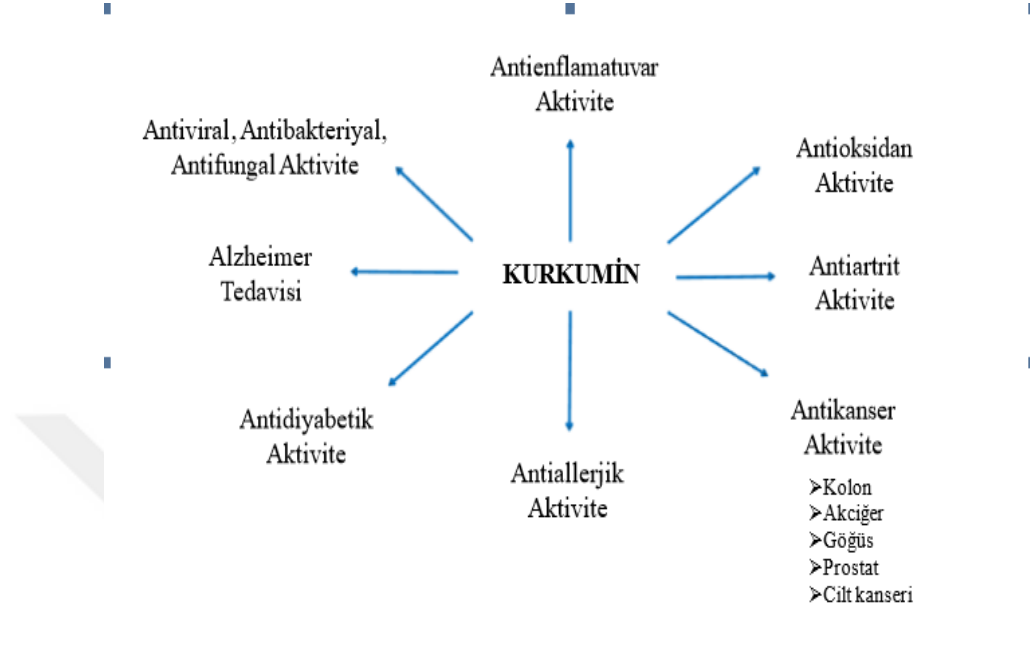
Ayurveda tıbbında zerdeçal; mide hastalıklarında, kan temizleyici ve harici olarak cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Jagan ve ark 2005). Geleneksel Hint Tıbbında ise safra hastalıklarının tedavisinde, anoreksi, grip, soğuk algınlığı, diyabetik yaralar, romatizma, hepatik rahatsızlıklar ve sinüzitte yararlı olduğu bildirilmektedir (Ammon ve ark 1992).

Geleneksel kullanımlarına bakılarak uçucu yağın kimyasal içeriği, kurkuminoitlerin izolasyonu, tanımlanması ve çeşitli biyolojik aktiviteleri hakkında araştırmalar yapılmıştır. Antiinflamatuar, antiseptik, koku ve tat düzeltici, antibakteriyel etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır, gıda ve kozmetik alanının dışında da kullanılmaktadır (Ammon ve ark 1991 Sarvalkar ve ark 2011).

Kurkuminin, yara tedavisinde ve artritte antibakteriyel ve antiinflamatuar olarak, safra salgısını kontrol ederek yağların hazmedilmesine yardımcı, kolesterol düşürücü özelliği ile kalp krizlerinde önleyici, karaciğer koruyucu, lenfomatik tümör hücrelerinin büyümesini önleyici ve tümör gelişimini durdurucu özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Antikanserojen ve antimutajenik özellikleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Jayaprakasha ve ark 2006).

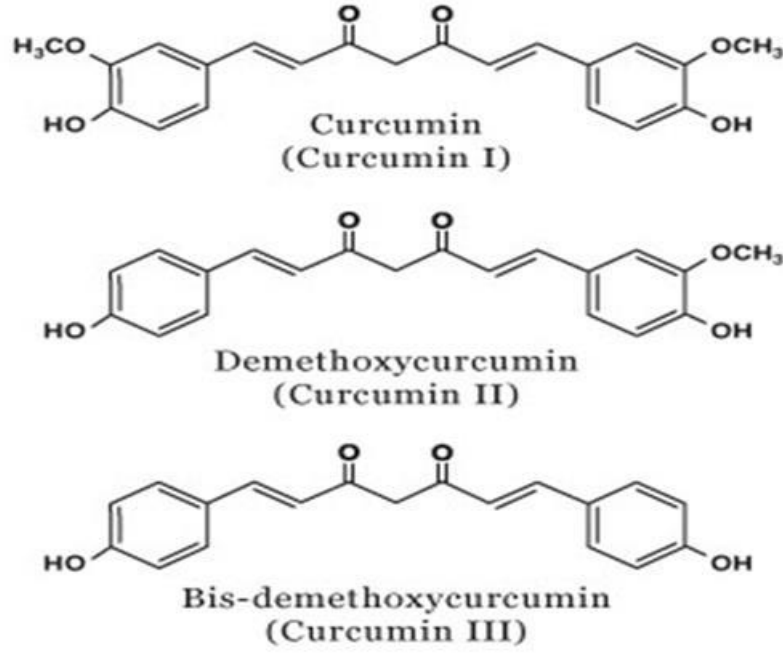
Rizomlardan, tüketme işlemleri sonucu kurkuminoitler adı verilen fenilpropan yapısındaki maddeler ayrıştırılmıştır. Kurkuminoitler ve ana madde kurkumin üzerinde

yapılan çalışma sayısı son yıllarda artış göstermektedir. Etkileri üzerinde yapılan çalışmalar aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir (Şekil 2).



Şekil2: Kurkuminin Biyolojik Etkileri

Zerdeçal (Turmerik) köklerinde bulunan etken maddeleri kurkuminoidler oluşturur. Bu grubun en önemlisi ve en güçlüsü ise kurkumin'dir. Kurkumin 184 °C'lik bir erime noktasına sahiptir. $C_{21}H_{20}O_6$ moleküler formülü ve 368,37 g/mol molekül ağırlığı olan fenolik bir bileşiktir. Ancak etanol, dimetilsülfoksit ve asetonda çözünebilir.



Şekil 3: Kurkumin kimyasal yapısı

1.6.Sitokrom P450

Sitokrom P450 (CYP), NADPH'ye bağlı elektron taşıma yollarında terminal oksidazlar olarak monoksijenaz reaksiyonlarını katalize eden büyük miktarda hem içeren proteinlerdir. “P450” adı 1960'lı yılların başında, karbon monoksit bağliyken, 450 nm'de absorpsiyon zirvesine sahip bir pigmentin keşfedilmesi ile verildi (Klingenberg 1958, Omura ve Sato 1964). CYP'ler, kolesterol, safra asidi, steroid, araşidonik asit, eikosanoidler ve D vitamini dahil olmak üzere ilaçların, kimyasalların ve endojen substratların metabolizmasında rol oynar (Hafner ve ark 2011).

CYP'ler zara bağlı olarak bulunur ve lokalizasyonlarına göre mikrozomal veya mitokondriyal CYP'ler olarak kategorize edilir. Her ikisi de NADPH ve elektron transfer zincirini gerektirir. Mikrozomal CYP sitokrom P450 ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz içerirken, mitokondriyal sitokrom P450 ise, sitokrom P450, ferredoksin ve ferredoksin redüktaz içerir (Peterson ve Prough, 1986). Mikrozomal veya mitokondriyal olarak, döngü sitokrom P450'nin okside edilmiş formuna (Fe^3) sübstratın bağlanması ile başlar. Daha sonra, mikrozomal sistemdeyken, NADPH sitokrom P450 redüktaz, elektronun NADPH'den sitokrom P450-substrat kompleksine aktarılmasını sağlar; Mitokondriyal sistemde, ferredoksin redüktaz ve ferredoksin, bu elektron transferini indükler, böylece her iki şekilde de Fe^3 , Fe^2 'ye (demir) indirgenir.

Bir sonraki adımda, moleküler oksijen bu indirgenmiş komplekse bağlanır ve kararsız Fe_3O_2 oluşur, bu daha sonra Fe_2O_3 'ye dönüştürülür. Bundan sonra, elektronun NADPH'den mikrozomal veya mitokondriyal elektron transfer bileşenleri vasıtasıyla transferi ile ikinci bir indirgeme aşaması meydana gelir ve moleküler oksijen azalır. O-O bağı kopmuş ve bir alt-tabaka oksijen molekülü yerleştirilmiştir.

Su oluşur ve hidroksile substrat üretilir. Bu nedenle, okside olmuş duruma geri döner (Guengerich ve ark 1991; Norlin, 2000).

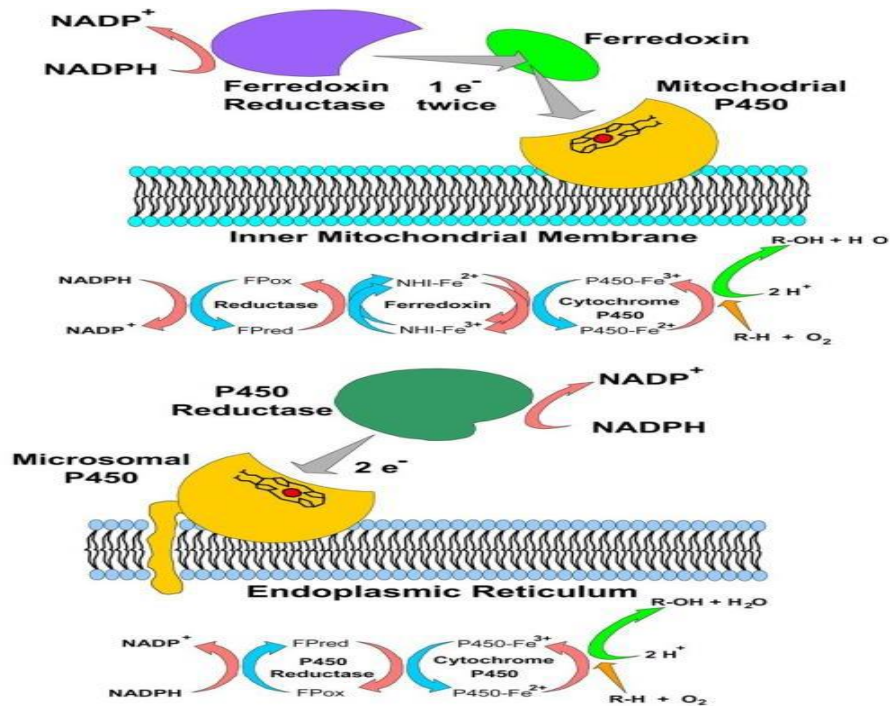
D vitamini metabolizmasında rol oynayan CYP'ler hem mikrozomal hem mitokondriyaldır ve hem bağlı, oksijenlenmiş demir (Fe-O) ara maddesi kullanarak, D vitamini substratının belirli karbonları üzerinde hidroksilasyon reaksiyonlarını katalize eder (Jones ve ark 2014). Bu enzimlerin polisiklik aromatikler, ilaçlar ve yiyecekler dahil çeşitli substratlardan etkilendiği bilinmektedir.

1.6.1.CYP3A4

CYP enzimleri, kanserde geniş bir işlev yelpazesine sahiptir. Bir yandan, bu enzimler kanserojenlere karşı koruma sağlayabilir ve hatta antikanser ajanlarının aktivasyonunda rol oynayabilir. Örneğin, siklofosfamid, bir tümör aralığı için bağışıklık bastırıcı ve kemoterapötik olarak kullanılan bir alkilleme ön ilacı, aktif metabolitlere *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C18*, ve *CYP2C19*, 4-hidroksi-siklofosfamid ve aldofosfamid metabolize edilir (De Jonge M ve ark 2005). Öte yandan, CYP enzimleri kanserojenlerin aktivasyonunda ve antikanser ilaçların metabolizmasında rol oynayabilir. Örneğin, *CYP1B1* normal dokuya kıyasla birçok tümör tipinde aşırı eksprese edilir ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), heterosiklik aminler, aromatik aminler ve nitropolisiklik hidrokarbonlar gibi çeşitli kanserojenleri aktive etme kabiliyeti ile bilinir. Ayrıca, birçok antikanser ajanı CYP enzim sistemi tarafından inaktif formlarına metabolize edilir (Bruno RD ve ark; Rendic S. Ve ark; Zanger UM ve ark). En fazla eksprese edilen CYP enzimlerinden biri, pazarlanan tüm ilaçların % 60'ından fazlasının bozulmasından sorumlu olan *CYP3A4*'tür (Traunecker HCL ve ark 1999).

İnsan pregnan X reseptörü veya steroid ksenobiyotik reseptörü (SXR), *CYP3A4* ekspresyonunun kontrolü için en sık çalışılan reseptördür (Bertilsson G ve ark 1998; Blumberg B ve ark 1998; Kliwer SA. Ve ark 1998; Lehmann JM ve ark 1998). Bu

reseptörün aktivasyonu, rifampisin gibi CYP indükleyicileriyle bağlandıktan sonra ve ayrıca estradiol gibi endojen steroidlere yanıt olarak ortaya çıkar (Banerjee M ve ark; Goodwin B ve ark 1999). Ligandın reseptöre bağlanması, SXR'nin 9-cis-retinoid X reseptörü (RXRa) ile dimerizasyonu ile sonuçlanır. Bu heterodimer daha sonra, CYP enzimlerinin transkripsiyonel aktivasyonu ile sonuçlanan CYP genleri üzerindeki tepki elemanına bağlanır (Huss JM. Ve ark 1996) Ek olarak, SXR, P-gp'nin indüksiyonu yoluyla ilaç akışını artırabilir (Synold T ve ark 2001). Meme ve endometriyal kanser gibi steroid bağımlı neoplazmaların, neoplastik dokularda normal dokulardan daha yüksek seviyelerde SXR ifade ettiği bilinmektedir (Masuyama H. Ve ark 2003, Miki Y.ve ark 2006). Paclitaxel, SXR yoluyla *CYP3A4* ve *CYP2C8* ve P-gp ekspresyonunu belirgin şekilde indükler, böylece düzenli alındığında kendi metabolizmasını ve atılımını artırır (Synold T ve ark 2001; Nallani SC ve ark 2004; Harmsen S ve ark 2009). Tersine, docetaxel, insan hepatositlerinde SXR ve *CYP3A4* mRNA'nın transkripsiyonel aktivasyonunu aktive etmesine rağmen, *CYP3A4*'ün aktivitesini arttırmadığı görülmektedir (Nallani SC ve ark 2004; Harmsen S ve ark 2009). Mekanizmalardan biri benzer şekilde tümör dokusunda mevcutsa, bu hücrelerde kemoterapiye karşı direnç ya da tepkisizliğin gelişmesine katkıda bulunabilir.



Şekil 4: Mitokondrial ve mikrozomal P450 katalitik çevrimleri (Jones ve diğ., 2014)

1.7.MT-ATP6

MT-ATP6 geni, normal mitokondriyal fonksiyon için gerekli olan bir protein sentezi için bilgi sağlar. Mitokondri, besinden hücrelerin kullanabileceği bir forma dönüştüren yapılardır. Bu hücresel yapılar, oksijen ve basit şekerler kullanan oksidatif fosforilasyon adı verilen bir işlemle hücrenin enerji kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP) oluşturur.

MT-ATP6 proteini, ATP sentaz adı verilen büyük bir enzimin bir parçasını (alt ünite) oluşturur. Aynı zamanda kompleks V olarak da bilinen bu enzim, oksidatif fosforilasyonun son basamağından sorumludur. Spesifik olarak, ATP sentazın bir kesimi, proton adı verilen pozitif yüklü parçacıkların mitokondri membranı boyunca akmasına izin verir. Enzimin bir başka kısmı, adenosin difosfat (ADP) adlı bir molekülü ATP'ye dönüştürmek için bu proton akışı tarafından oluşturulan enerjiyi kullanır.

Mitokondrinin karsinogenezdeki rolü, özellikle oksidatif fosforilasyonda, çoğunlukla serbest radikallerin ve ATP' nin üretimine ve apoptozis sürecine katılımlarıyla ilgilidir.

Mitokondriyal genler günümüzde yoğun olarak çalışılmıştır ve insan popülasyonlarının (maternal) genetik geçişini araştırmak için güçlü ve verimli bir moleküler genetik araç olduğu kanıtlanmıştır (Cann RL ve ark 2005). Mitokondri, ATP'nin oluşumu için oksidatif fosforilasyonda yüksek öneme sahip organeller DNA ile karşılaştırıldığında, insan mtDNA'sı, solunum zincirinin dört enzim kompleksini (Kompleks I, III, IV, ve ATP sentaz, yani Kompleks V) ve 22 transfer RNA'yı ve 2 ribozomalini belirten genleri içeren 13 proteini kodlayan ve 16569 bp uzunluğundan oluşur (Anderson S. ve ark 1981). Bazı raporlar, somatik mtDNA mutasyonları ile kanserin gelişimi, ilerlemesi veya metastazına yol açan faktörler arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Czarnecka AM ve ark 2006; Czarnecka AM ve ark 2008).

Mitokondrinin patogenezdaki rolü, özellikle oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile bağlantılı olan rolü temel olarak apoptoz, serbest radikal ve ATP üretimi sürecinde rol oynar (Wallace DC).

Yüksek mitokondriyal replikasyonun kontrol altına alındığı zaman fonksiyonel olarak değiştirilmiş mitokondrilerden kaynaklanan sinyallemede iyileşme olduğuna

inanılmaktadır (Grzybowska-Szatkowska L ve Slaska B. 2014). Bu, mtDNA'daki her mutasyonun fonksiyonlarını etkilediğini göstermektedir. Bununla birlikte, sessiz mutasyonların mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkilerini belirlemek zordur.

Shidara ve arkadaşları ATPaz6 geninin varyantlarının, apoptoz yollarını inhibe ederek kanserin ilerlemesini artırabileceğini bildirmiştir (Shidara YYK. ve ark 2005; Kirches E. 2009).

Ludmila ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda meme kanseri hücre numunesinde *ATP6* geninde 8 ve *ATP8* geninde 5 sessiz mutasyon tespit etmişlerdir (Ludmila Gr. ve ark 2014).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan insan meme kanseri hücre hatları olan *MCF-7* ve *MDA-MB-231* ATCC (American type culture collection)'den temin edilerek %10 fetal sığır serumu(FBS) ve 100 IU/ mL penisilin ve 100 mg/ml streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 besiyerinde, kendileri için uygun kültür ortamı olan 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Farklı dozlarda hazırlanmış kurkumin ve juglon *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5- dimetiltiazolil-2-)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) testi ile belirlendikten 24 saat sonra kurkumin ve juglon IC50 dozları belirlenerek hücrelere verilecek olan dozlar tespit edilmiştir. Bu gruplar, kontrol grubu olarak hiç madde vermediğimiz *MCF-7* ve *MDA-MB-231* grupları ile kıyaslanmıştır. Ayrıca belirlenen dozlardan her iki hücre hattında hücre lizatları *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ekspresyon düzeyleri Roche Light Cyler 1.2 cihazı kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemi ve western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Bunlardan toplanan veriler SPSS 21.0 programı kullanılarak gruplar arası farklılıklar değerlendirilmiştir.

2.1. MTT

MTT testi: Kolorimetrik MTT (3-(4,5dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) testi sitotoksisite değerlendirmelerinde sıklıkla kullanılır. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisiyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görölmektedir. Formazan oluşumu ise, spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesi veya test örneğinin etrafındaki formazan ışığın elektron mikroskopuyla belirlenmesi yöntemleriyle saptanmaktadır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
Güvenlik Kabini Sınıf II	Metisafe
Karbondioksitli İnkübatör	Thermo Scientific
Işık Mikroskobu	Olympus
Inverted Mikroskop	Nikon Eclipse TS100
Su Banyosu	WiseBath
Multiplate Okuyucu	Biotech
Thermal Cyclor	Bio-Rad
Vorteks	Heidolph
Real-time PCR	Roche
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj (Soğutmalı)	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı (Isıtcılı)	Stuart
Çalkalayıcı	WiseShake
Hassas Terazi	Kern
Otomatik Pipet	Thermo Scientific
Nanodrop Spektrofotometri	Thermo Scientific
-80 Derin Dondurucu	Haier
-20 Derin Dondurucu	Arçelik
+4 Buzdolabı	Uğur

Çizelge 2.1. çalışmada kullanılan cihaz ve markaları

2.3. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücre hatları ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edildi. *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücreleri %10 fetal sığır serum (FBS) ve uygun miktarda antibiyotik (penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/ml) eklenmiş RPMI-1640 besiyerinde 37 °C'de %5'li CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılarak kültür edildi.

2.4. Hücrelerin Dondurulması

Yapışık haldeki hücreleri kaldırmak için 1-2 ml %0,05 Trypsin/EDTA uygulandı. Hücrelerin flasktan ayrılması için 37 °C'de %5'li CO₂'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası flaska bir miktar taze hücre besiyeri ilave edildi. Hücreler bir falkon tüpe alındıktan sonra, 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1-2 ml 1/9 oranında DMSO ve besiyerinden oluşan dondurma solüsyonu ilave edildi. Hücreler kriyotüpe alındı ve -20°C'de dondurulduktan sonra, -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi.

2.5. Hücrelerin Çözdürülmesi

Dondurulmuş hücreleri içeren kriyotüpler kapaklarından tutularak 37°C'deki su banyosunda eritildi. Çözülen hücreler, içerisinde 10 ml taze besiyeri bulunan falkon tüplerine yavaşça aktarıldıktan sonra 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti, uygun miktarda taze besiyeri ile çözdürüldükten sonra uygun büyüklükteki kültür flaskına alındı ve 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İki günde bir flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ilave edildi.

2.6. Hücrelerin Pasajlanması

Flask içerisindeki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştıktan sonra kültürün devamı için hücreler pasajlandı. Flask içerisindeki eski besiyeri, uzaklaştırılıp, flaska ilave edilen 1-2 ml 1X DPBS ile hücreler yıkandı. Flaska yapışık haldeki hücrelere 1-2 ml %0,05 Trypsin/EDTA uygulandı ve hücrelerin flasktan ayrılması için 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin kalktığından emin olmak için inverted mikroskop altında inceleme yapıldı. Hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra, uygun miktarda taze besiyeri ilave edildi. Hücreler pipetaj

yapılarak homojen hale getirildikten sonra bir falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti yaklaşık 10 ml taze besiyeri ile yavaşça pipetaj yapılarak çözdürüldü. Tripan mavisi boyası ile hücre sayım lamın kullanılarak inverted mikroskopu altında hücre sayımı yapıp, belirlenen hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü. Hücre gelişimi için hücreler 37 °C'de %5CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.7. Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Katı kimyasal madde şeklinde alınan juglon (MA: 174,15, Sigma H47003) konsantrasyonu 40 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözünmesi sağlandı. Hazırlanan bu stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C' de saklandı. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki solüsyonlar stok solüsyondan RPMI-1640 besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

2.8. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Juglonun *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlemek için, hücrelerin metabolik aktiviteleri ile formazan tuzlarının indirgenmeleri sonucu formazan kristallerinin kolorometrik yöntemle ölçülerek hücre canlılığının belirlenmesi esasına dayanan MTT (3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolym bromid) testi uygulandı. 96 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta 100µl besiyeri içerisinde yaklaşık 6×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası eski besiyeri uzaklaştırıldı. Juglon konsantrasyonları *MCF-7* hücre hattında 1, 5, 10, 20, 40 µM olacak şekilde ve *MDA-MB-231* hücre hattında 1, 5, 10, 15 µM olacak şekilde hazırlanan besiyerlerinden kuyucuklara 100µl ilave edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100µl MTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT solüsyonu uzaklaştırılarak yerine 100µl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan kristallerinin sarı renge dönüşümü mikropate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

Juglon uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı.

2.9. Kurkumin Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Katı kimyasal madde şeklinde ticarisatın alınan kurkumin (MA: 368,38 g/mol, Merck C7727) konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözünmesi sağlandı. Hazırlanan bu stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm' lik steril filtrelerden geçirildi ve -20°C' de saklandı. Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyondaki solüsyonlar stok solüsyondan RPMI-1640 besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

2.10. Kurkuminin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Kurkuminin *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlemek için, hücrelerin metabolik aktiviteleri ile formazan tuzlarının indirgenmeleri sonucu formazan kristallerinin kolorometrik yöntemle ölçülerek hücre canlılığının belirlenmesi esasına dayanan MTT (3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolym bromid) testi uygulandı. 96 kuyucuklu plate'eher bir kuyucukta 100µl besiyeri içerisinde yaklaşık 6×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası eski besiyeri uzaklaştırıldı. Kurkumin konsantrasyonları *MCF-7* hücre hattında 0,1, 1, 5, 10,15, 20, 25 ve 40 µM olacak şekilde ve *MDA-MB-231* hücre hattında 1, 5, 10, 15 ve 20 µM olacak şekilde hazırlanan besiyerlerinden kuyucuklara 100µl eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100µl MTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT solüsyonu uzaklaştırılarak yerine 100µl DMSO eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mor renkli formazan kristallerinin sarı renge dönüşümü mikropate okuyucuda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Juglon uygulanmış grupların absorbans değerlerinin kontrol grubu absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması ile yüzde hücre canlılığı hesaplandı.

2.11. Gen İfadeleri Analizleri

Farklı konsantrasyonlarında juglon ve kurkumin uygulamalarının *MCF-7* ve *MDA-MB-231* hücrelerinde *CYP3A4* ve *mt-ATP6* genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Roche Light Cycler 1.2 cihazı kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) çalışması yapıldı.

2.12. Total RNA izolasyonu

6 kuyucuklu plateler bir kuyucukta 3 ml besiyeri içerisinde yaklaşık 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara *MCF-7* hücre hattı için 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında juglon ve *MDA-MB-231* hücre hattında 1, 2 ve 3 μM uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kurkumin için ise *MCF-7* hücre hattında 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında ve *MDA-MB-231* hücre hattında 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında uygulamalar yapıldı. RNA izolasyonu TRidity G solüsyonu (Applichem, A4051) kullanılarak gerçekleştirildi.

Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 1 ml TRidity G solüsyonu eklenip pipetaj yapılarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Hücre TRidity G süspansiyonu 1,5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 200 μl kloroform eklendi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında karışım 12000 g'de 15dk $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.

Karışım üzerine 250 μl 2-propanol ilave edilmiş 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım, 12000 g'de 10dk $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve pellete 1 ml%70'lik etanol eklendikten sonra 12000 g'de 5 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de tekrar santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan RNA pelleti kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra RNA pelleti 50 μl nukleaz içermeyen dH₂O ile çözdürüldü.

Nanodrop spektrofotometrede RNA konsantrasyonu belirlendi.

RNA'lar -80°C 'de muhafaza edildi.

2.13. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi, 2-adımlı RT-PCR Kiti (Vivantis, RTPL12) kullanılarak, kitin mevcut protokolüne göre gerçekleştirildi. Bir tüp içerisine 1 μg RNA, 1 μl 40 μM oligod(T) primer, 1 μl 10mM Dntp miks ve 10 μl 'ye tamamlayacak miktarda nukleaz içermeyen dH₂O eklenerek denatürasyon için 65°C 'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 2 dk buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda karışım içerisine 10 μl cDNA sentez miksi (2 μl 10X Buffer M-MuLV, 100 üniteM-MuLV Reverse Transcriptase enzimi, 10 μl 'ye tamamlayacak miktarda nukleaz içermeyen dH₂O) ilave edildikten sonra sentez için 42°C 'de 60 dk inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu

sonlandırmak amacıyla karışım 85°C’de 5 dk inkübe edildi ve elde edilen cDNA sonrasında PCR için kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

2.14. PCR

qPCR, SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo scientific, K0251) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada ifadesi araştırılan hedef genler ve referans olarak kullanılan *β-actin*’e özgü primerler aşağıda gösterilmiştir.

β-actin

Fw: 5’-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3’

Rw: 5’-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3’

Homo sapiens cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4 (*CYP3A4*)

Fw: 5’ -GAGCTGAGATTGCACCACTG-3’

Rw: 5’- TCGAGACAGTTGGGTGTTGA-3’

Homo sapiens mitochondrial *mt-ATP6* gene

Fw: 5’CCCCTCTATTGATCCCCACC-3’

Rw: 5’-AATGAGTGAGGCAGGAGTCC-3’

Hazırlanan reaksiyon karışımı Roche Light Cycler 1.2 cihazına uygun kapiler tüplere aktarılarak cihaz içerisine yerleştirildi. Hedef genlerin ve referans genin amplifikasyonu Çizelge 2.3.’de belirtilen protokole göre gerçekleştirildi.

Denatürasyon	95°C’de 10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	94°C’de 30 sn
	60°C’de 30 sn
	72°C’de 30 sn
Soğuma	40°C’de 30 sn

Çizelge 2.3. Genler için uygulanan qPCR protokolü.

2.15. Western Blot İle Protein Kantitasyon Analizi

Hücrelerin hazırlanması için öncelikle 6 kuyucuklu plate'e her bir kuyucukta yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara *MCF-7* hücre hattı için 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında juglon ve *MDA-MB-231* hücre hattında 1, 2 ve 3 μM uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kurkumin için ise *MCF-7* hücre hattında 5, 10 ve 15 μM konsantrasyonlarında ve *MDA-MB-231* hücre hattında 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında uygulamalar yapıldı. 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası juglonlu ve kurkuminli besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra tripsinizasyon işlemiyle hücreler kuyucuk yüzeyinden kaldırılarak bir falkon tüpe alındı ve kit protokolüne geçildi. Hücreler, 500g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücreler iki kez PBS ile muamele edildi. 500 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti $2 \times 10^7/\text{ml}$ oranına uygun miktarda "Ripa Buffer" ile çözdürüldü. Süspansiyon, 20dk buz üzerinde inkübe edildi ve sonrasında 16,000 g'de 20 dk 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra hücre lizatını oluşturan süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Protein miktar tayini tahlili yapmak için küçük bir lizat hacmi çıkarıldı. Her hücre lizatı için protein konsantrasyonunu belirlendi ve -80°C'de muhafaza edildi. Moleküler ağırlık belirteci ile birlikte SDS-PAGE jeli oyuklarına 30 μg eşit miktarda protein yüklendi ve jel 100 V'de 1 saat çalıştı.

Membran nitroselüloz veya PVDF olabilir. PVDF'yi 1 dakika metanol ile aktive edildi ve yüklemmeden önce transfer tamponu ile çalkalandı. Proteinlerin membrana transferi, bloke etme aşamasından önce Ponceau S boyaması kullanılarak kontrol edildi.

Membran bir gece boyunca 4°C'de blokaj tamponu kullanarak bloke edildi. Zarı bloke edici tamponda primer antikorun(Anti *mt-ATP6* antibody ab219825- Abcam, *CYP3A4* sc53850- Santa Cruze) uygun dilüsyonları ile inkübe edildi. Membran her biri 5 dakikalık olmak üzere üç TBST yıkamasında yıkandı. Diyaframı, konjuge sekonder antikorun(sc516102- Santa Cruze) önerilen seyreltilmesiyle, 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloke edici tamponda inkübe edildi. Membranı her biri 5 dakikalık olmak üzere üç TBST yıkamasında yıkandı. Fazla reaktif çıkarılır ve membran şeffaf plastik ambalajla kaplandı. Kemilüminesans için karanlık oda geliştirme tekniklerini kullanarak görüntü elde edildi.

2.16. İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistiksel analizi için SPSS 21.0 (SPSS Inc. , Chicago, IL, USA) programı kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Farklı konsantrasyonda juglon ve kurkumin uygulanmış gruplar ile negatif kontrol olarak juglon uygulanmamış grup arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapmak için nonparametrik- kruskal wallis analizi uygulandı.

2.17. Hücrelerin Protein Analizleri

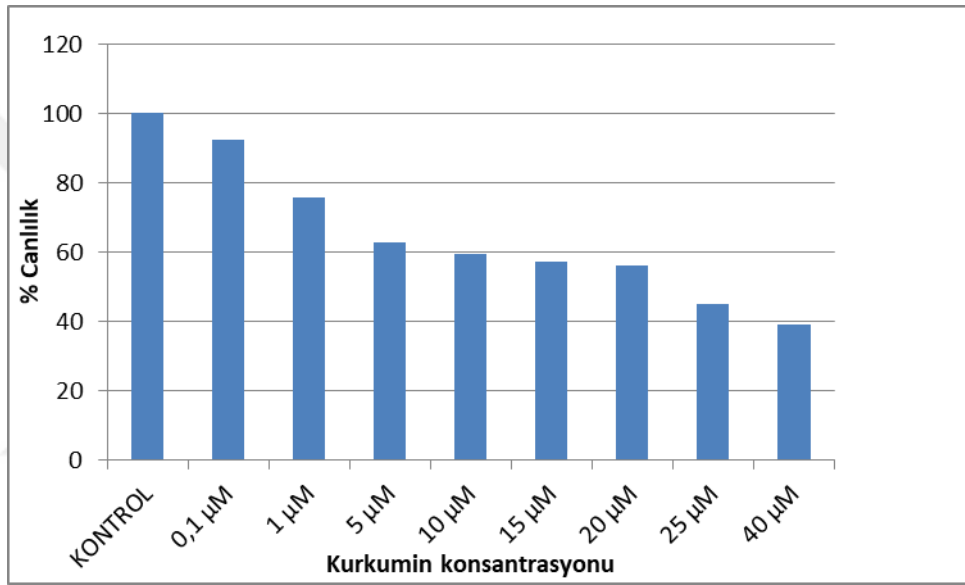
Elektroforez işlemlerine başlamadan önce jele yüklenecek protein miktarlarının analizi için bisinkoninik asit (BCA) protein kiti (Thermo, 23225) kullanıldı. Önce kalibrasyon grafiği çizilerek, hücrelerin protein sonuçlarını hesaplabilmek için albumin standartları (125, 250, 500, 750, 1000, 1500 μ g/ml), ardından da çalışmada kullanılacak protein reaktifi 50 birim (A reaktifi) + 1 birim (B reaktifi) olacak şekilde hazırlandı. İlk olarak 96 kuyucuklu plakalara her grup 3' erli olacak şekilde 10 μ l standart veya hücrelerden eklenerek üzerlerine 200 μ l hazırlanmış olan protein reaktifi pipetlendi. 37 °C' de inkübatörde ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda 562 nm dıga boyunda ELISA okuyucusunda absorbansı ölçülerek ortalamaları alındı. Albumin standartlarının sonuçlarına göre kalibrasyon grafiği çizilerek jele yüklemek için her numunenin protein hesaplamaları grafik denklemine göre yapıldı ve eşitlemeleri (30 μ g) yapıldı.

3. BULGULAR

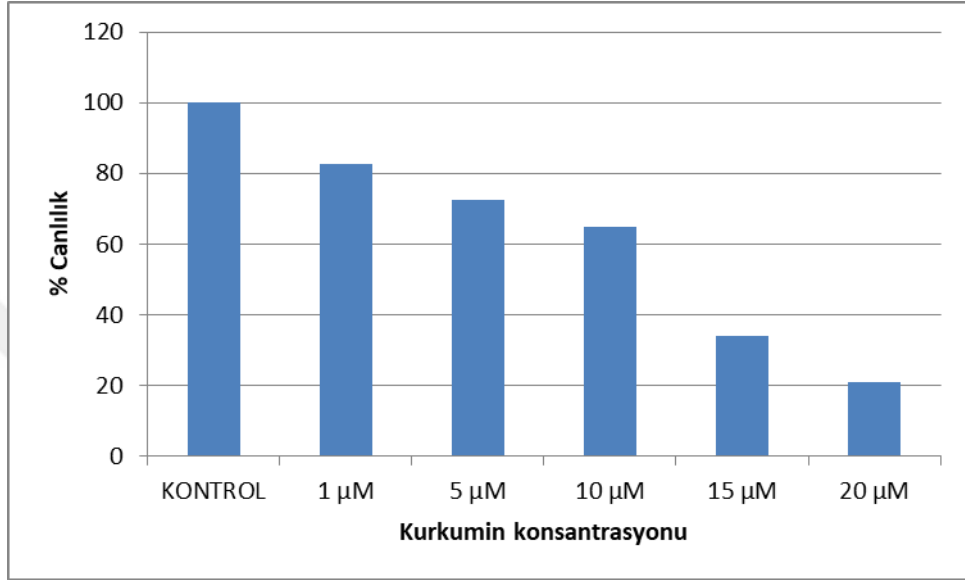
3.1. Juglonun ve Kurkuminin Sitotoksik Etkileri

MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik kurkumin uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı yüzdeleri 0,1 μM için % 92,32, 1 μM için % 75,55, 5 μM için % 62,8, 10 μM için % 59,3, 15 μM için 57,11, 20 μM için 56,11 ve 25 μM için 45,11 ve 40 μM için % 39,18 olarak tespit edildi. IC_{50} dozu 22,41 olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 3.1.).



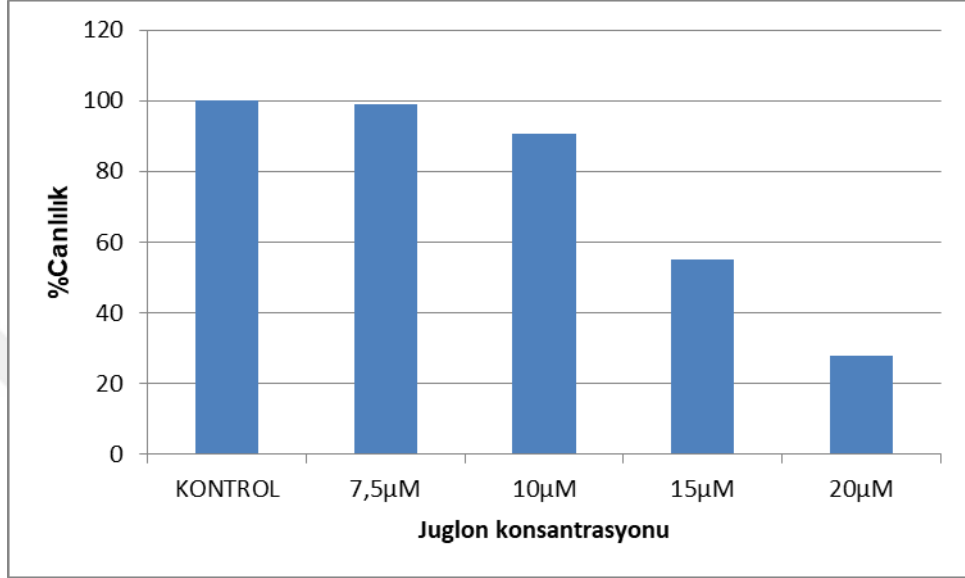
Şekil 3.1. Kurkuminin *MCF-7* hücre canlılığına etkisi

MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saatlik kurkumin uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarında hücre canlılığı yüzdeleri 1 μM için % 82,56, 5 μM için % 72,36, 10 μM için % 64,73, 15 μM için % 33,85, 20 μM için 20,8 olarak tespit edildi. IC_{50} dozu 10,43 olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 3.2.).



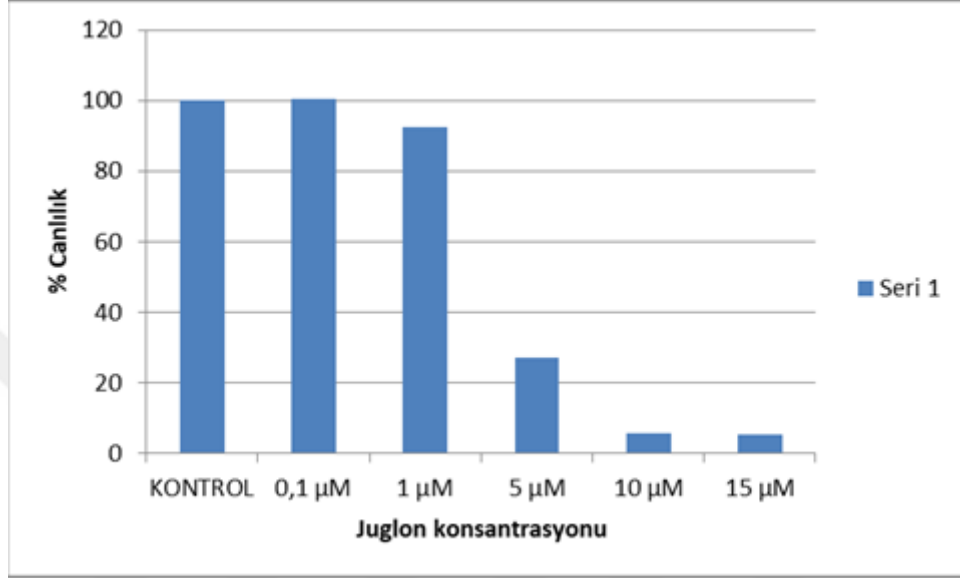
Şekil 3.2. Kurkuminin *MDA-MB-231* hücre canlılığına etkisi

MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik juglon uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarında hücre canlılığı yüzdeleri 7,5 μM için % 98,97, 10 μM için % 90,6, 15 μM için % 54,95, 20 μM için % 27,89 olarak tespit edildi. IC_{50} dozu 16,27 olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Juglonun *MCF-7* hücre canlılığına etkisi

MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saatlik juglon uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarında hücre canlılığı yüzdeleri 0,1 μM için % 100,45, 1 μM için % 92,28, 5 μM için % 27,2 10 μM için % 5,78, 15 μM için % 5,26 olarak tespit edildi. IC_{50} dozu 3,38 olarak hesaplandı ($p < 0.05$) (Şekil 3.4.).

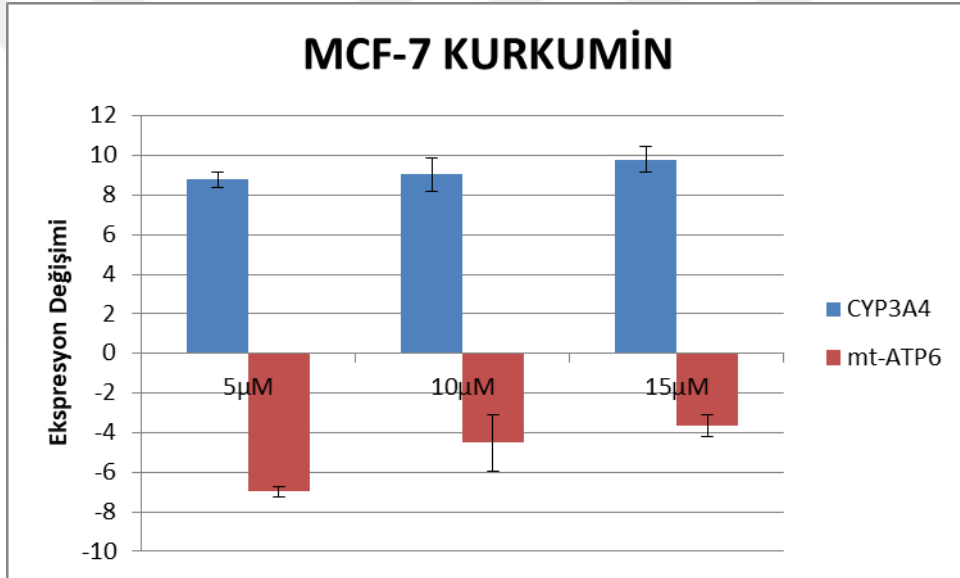


Şekil 3.4. Juglonun *MDA-MB-231* hücre canlılığına etkisi

3.2. MCF-7 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

MCF-7 hücre hattında 24 saatlik kurkumin uygulamaları yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi yapıldı.

Buna göre; *MCF-7* hücre hattında 24 saatlik kurkumin uygulamaları yapılan gruplardaki *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M'lik konsantrasyonlarda *CYP3A4* gen ifadesi sırasıyla 8.79; 9.03; 9.80 kat artış tespit edildi ve *mt-ATP6* gen ifadesinde ise sırasıyla -6.98; -4.52; -3.67 kat azalış tespit edildi, her iki gen için de gruplar arası anlamlı fark yoktur (Şekil 3.5).

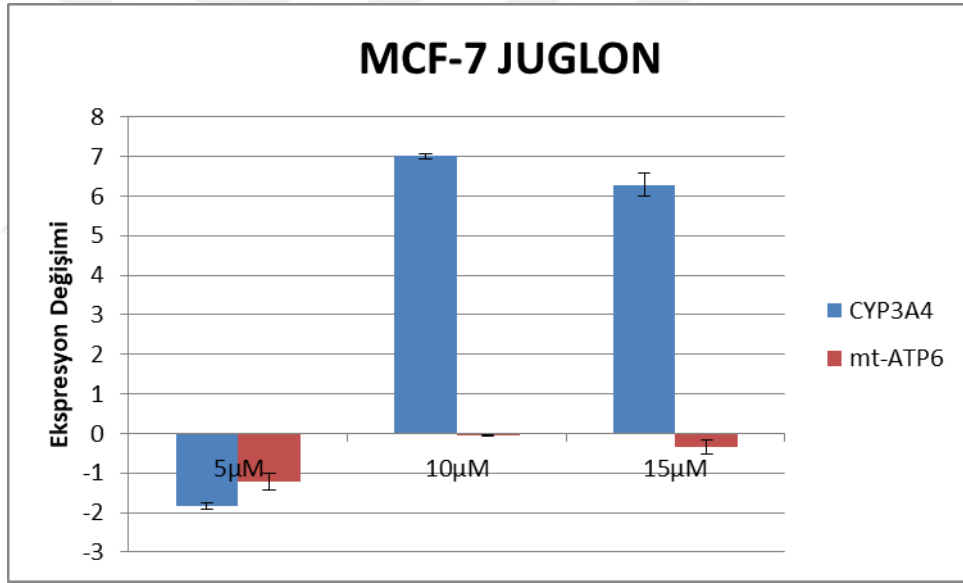


Şekil 3.5. *MCF-7* hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerinin kontrol grubuna göre etkisi

3.3.MCF-7 Hücrelerinde Juglon Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

MCF-7 hücre hattında 24 saatlik juglon uygulamaları yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi yapıldı.

Buna göre; *MCF-7* hücre hattında 24 saatlik juglon uygulamaları yapılan gruplardaki *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M'lik konsantrasyonlarda *CYP3A4* gen ifadesi sırasıyla -1.83; 7; 6.28 kat artış tespit edildi ve 5 μ M kıyasla 10 μ M konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi(p=0.007). *mt-ATP6* gen ifadesinde ise sırasıyla -1.27; -0.06; -0.34 kat azalış tespit edildi ve 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi(p=0.007) (Şekil 3.6.).

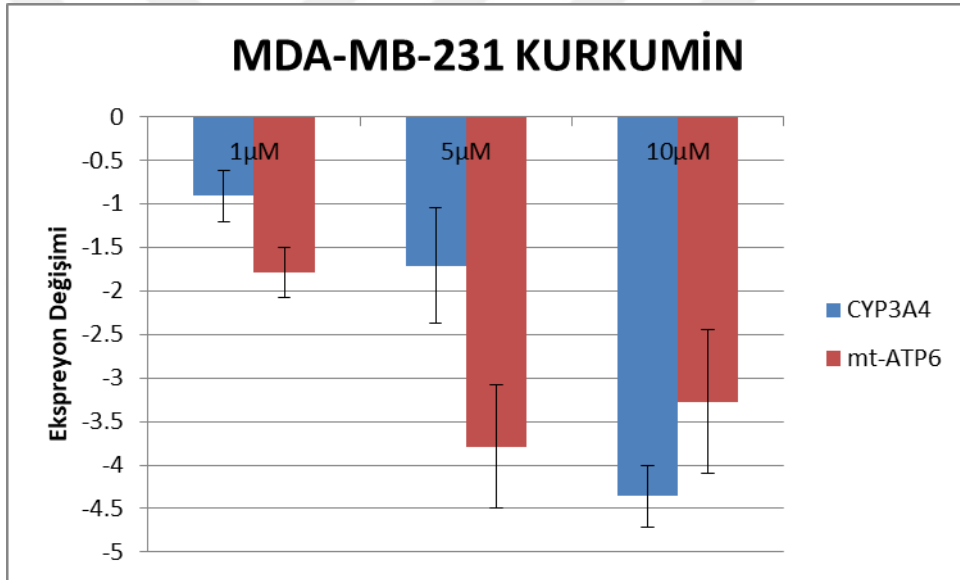


Şekil 3.6. *MCF-7* hücre hattında juglon uygulama dozlarının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerinin kontrol grubuna göre etkisi

3.4.MDA-MB 231 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

MDA-MB-231 hücre hattında 24 saatlik kurkumin uygulamaları yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi yapıldı.

Buna göre; *MDA-MB-231* hücre hattında 24 saatlik kurkumin uygulamaları yapılan gruplardaki *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M'lik konsantrasyonlarda *CYP3A4* gen ifadesi sırasıyla -0.91; -1.71; -4.36 kat azalış tespit edildi, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p=0.009). *mt-ATP6* gen ifadesinde ise sırasıyla -1.79; -3.78; -3.27 kat azalış tespit edildi gruplar arası anlamlı fark tespit edilmedi (Şekil 3.7.).

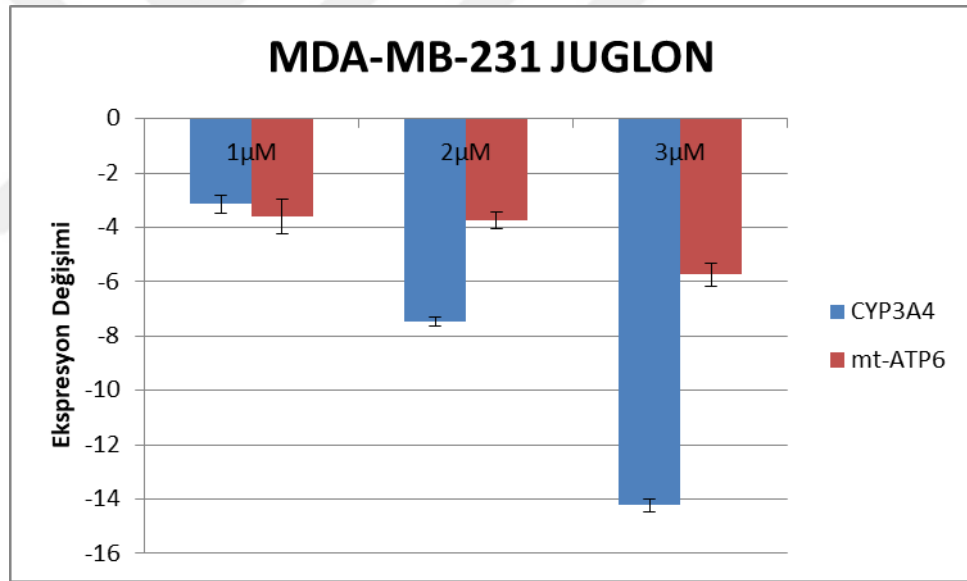


Şekil 3.7.MDA-MB-231 hücre hattında kurkumin uygulama dozlarının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerine etkisi

3.5. MDA-MB 231 Hücrelerinde juglon Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

MDA-MB-231 hücre hattında 24 saatlik juglon uygulamaları yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kruskal wallis tek yön varyans analizi yapıldı.

Buna göre; MDA-MB-231 hücre hattında 24 saatlik juglon uygulamaları yapılan gruplardaki *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre kıyasla 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M'lik konsantrasyonlarda *CYP3A4* gen ifadesi sırasıyla -3.14 ; -7.46; -14.23 kat azalış tespit edildi, 1 μ M ve 3 μ M konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p=0.007). *mt-ATP6* gen ifadesinde ise sırasıyla -3.6; -3.74; -5.73 kat azalış tespit edildi ve uygulanan doz grupları arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (Şekil 3.8.).

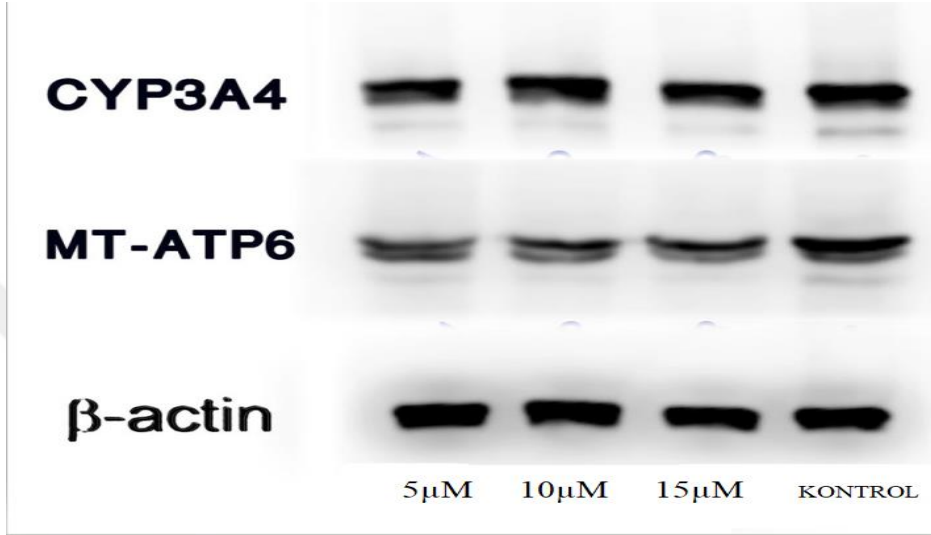


Şekil 3.8.MDA-MB-231 hücre hattında juglon uygulama dozlarının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* gen ifadelerine etkisi

3.6. MCF-7 Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6*

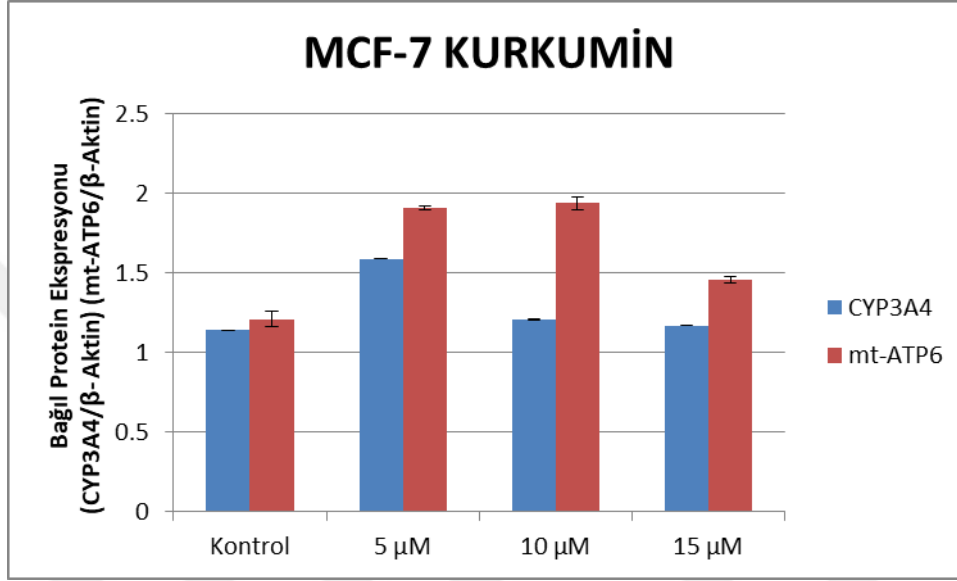
Protein Ekspresyonlarına Etkisi

MCF-7 hücre hattında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarının analizi için, belirlenen dört grubun maddeyi verdikten 24 saat sonraki deneylerinden elde edilen hücre lizatları kullanılmıştır.



Şekil 3.9. *MCF-7* hücrelerinde kurkumin uygulamasının Western Blot yöntemiyle *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarına etkisi.

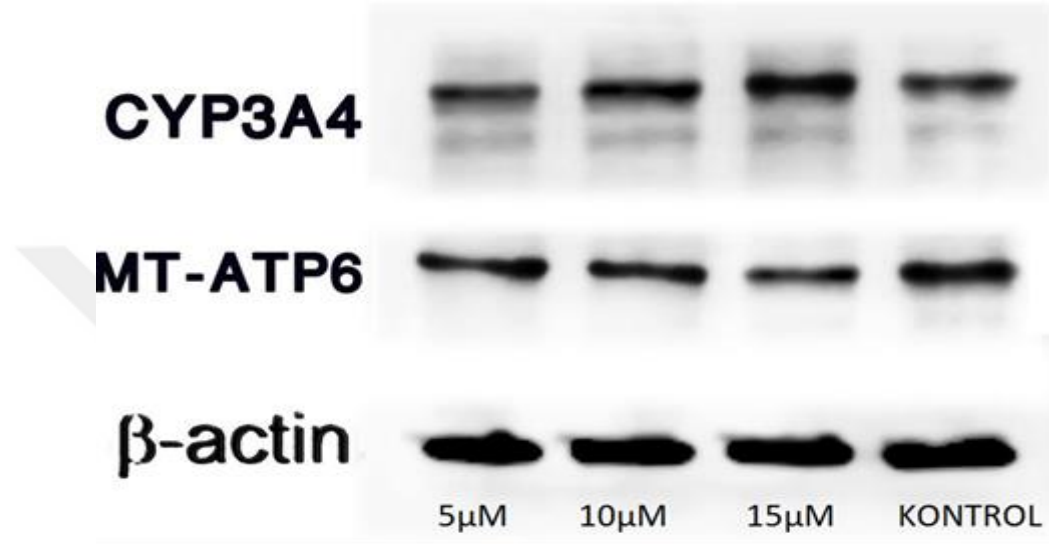
Elde edilen verilere göre *MCF-7* hücrelerinde *CYP3A4* protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre kurkumin uygulanan 5 μ M doz grubunda anlamlı artış gözlemlenmiştir.($p=0.002$)
MCF-7 hücrelerinde *mt-ATP6* protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre kurkumin uygulanan 5 μ M doz grubunda anlamlı artış belirlenmiştir ($p=0.011$) (Şekil 3.10).



Şekil3.10.*MCF-7* hücrelerinde kurkumin uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonları

3.7. MCF-7 Hücrelerinde Juglon Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Protein Ekspresyonlarına Etkisi

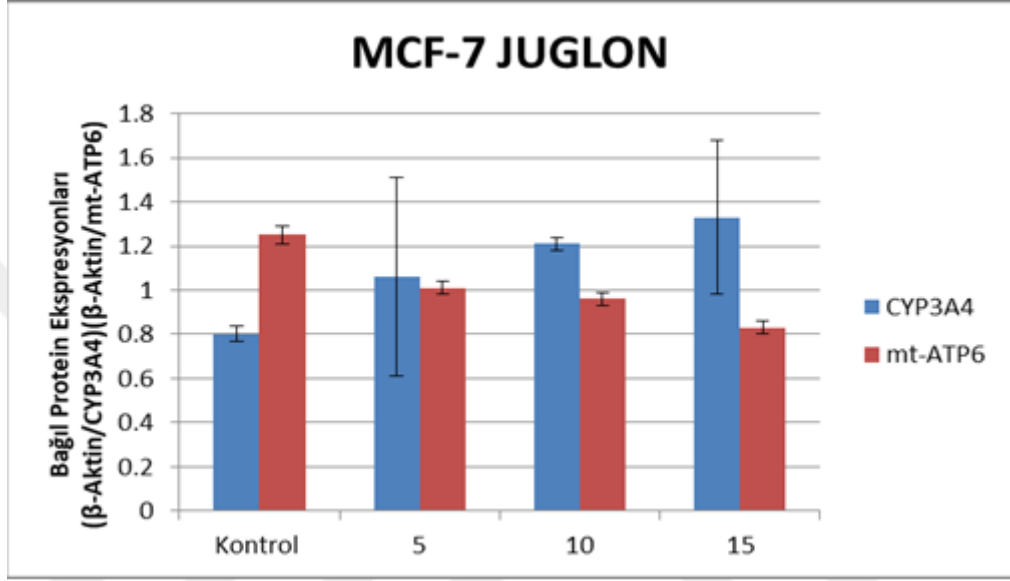
MCF-7 hücre hattında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarının analizi için, belirlenen dört grubun maddeyi verdikten 24 saat sonraki deneylerinden elde edilen hücre lizatları kullanılmıştır.



Şekil 3.11. *MCF-7* hücrelerinde juglon uygulamasının Western Blot yöntemiyle *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarına etkisi.

Elde edilen verilere göre *MCF-7* hücrelerinde *CYP3A4* protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre kurkumin uygulanan 15 μ M doz grubunda anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p=0.002$).

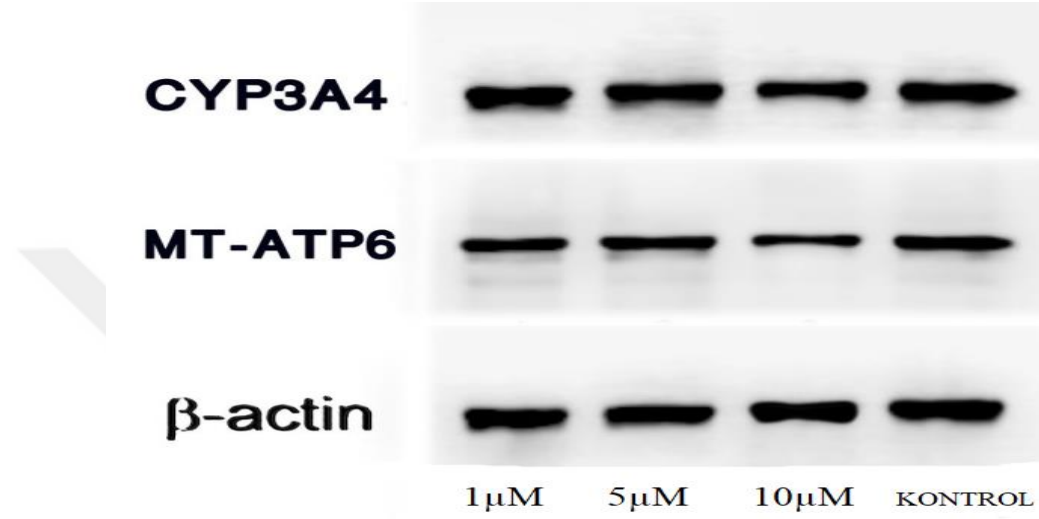
MCF-7 hücrelerinde *mt-ATP6* protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre kurkumin uygulanan 15 μ M doz grubunda anlamlı azalış belirlenmiştir ($p=0.002$) (Şekil 3.12).



Şekil3.12. *MCF-7* hücrelerinde juglon uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonları

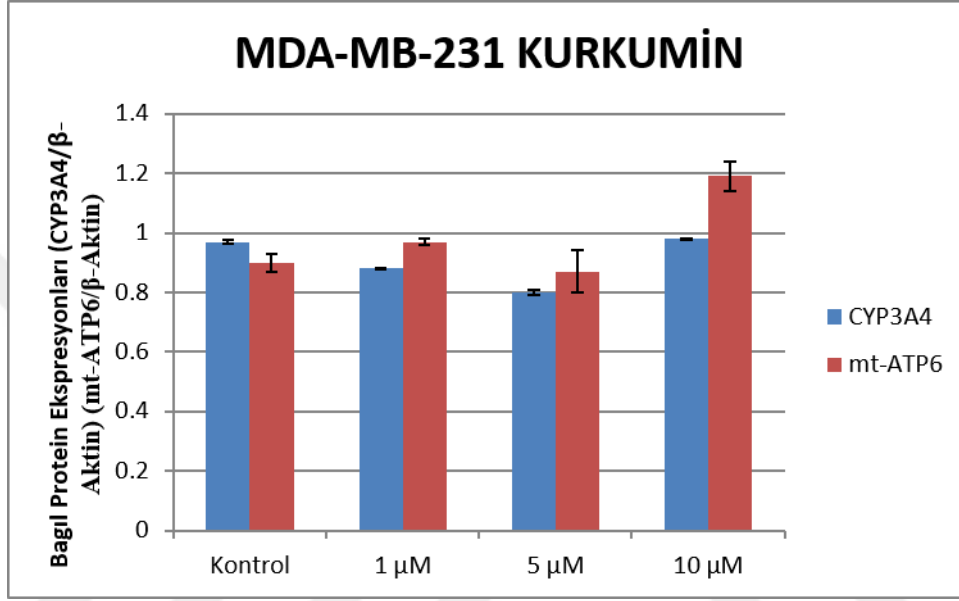
3.8. *MDA-MB 231* Hücrelerinde Kurkumin Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Protein Ekspresyonlarına Etkisi

MDA-MB-231 hücre hattında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarının analizi için, belirlenen dört grubun maddeyi verdikten 24 saat sonraki deneylerinden elde edilen hücre lizatları kullanılmıştır.



Şekil 3.13. *MDA-MB 231* hücrelerinde kurkumin uygulamasının Western Blot yöntemiyle *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarına etkisi.

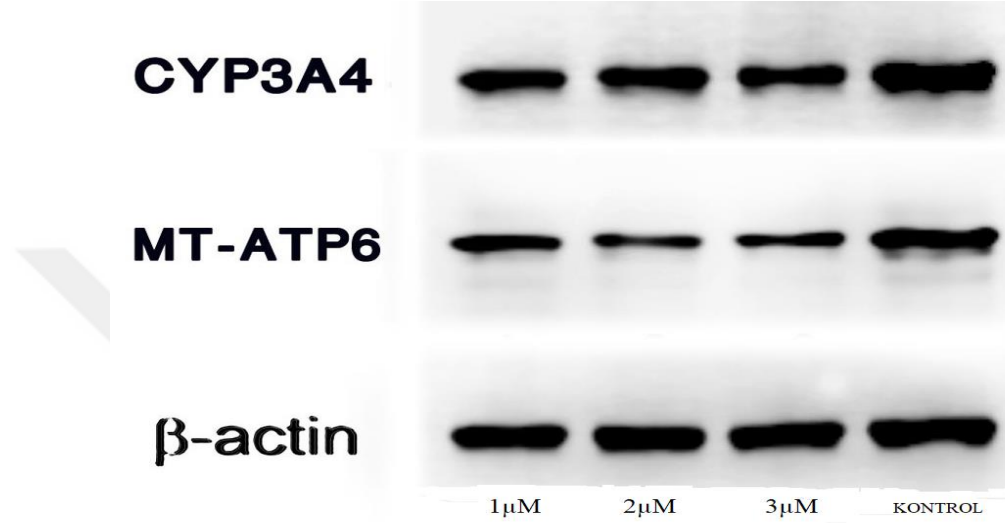
Elde edilen verilere göre *MDA-MB-231* hücrelerinde *CYP3A4* protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre kurkumin uygulanan $1\mu\text{M}$ doz grubunda anlamlı azalış belirlenmiştir ($p=0.007$). *MT-ATP6* protein ekspresyonunda kurkumin uygulanan $5\mu\text{M}$ doz grubuna göre $10\mu\text{M}$ doz grubunda anlamlı artış belirlenmiştir ($p=0.002$) (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. *MDA-MB-231* hücrelerinde *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonları.

3.9.MDA-MB 231 Hücrelerinde juglon Uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* Gen Ekspresyonlarına Etkisi

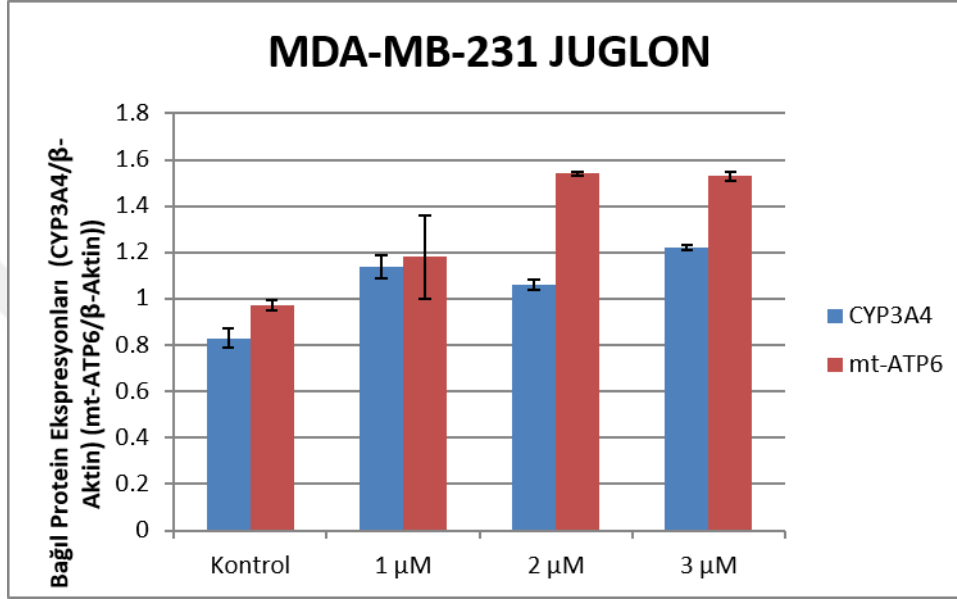
MDA-MB-231 hücre hattında *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarının analizi için, belirlenen dört grubun maddeyi verdikten 24 saat sonraki deneylerinden elde edilen hücre lizatları kullanılmıştır.



Şekil3.15.MDA-MB 231 hücrelerinde juglon uygulamasının Western Blot yöntemiyle *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonlarına etkisi.

Elde edilen verilere göre *MDA-MB-231* hücrelerinde *CYP3A4* protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre juglon uygulanan 3 μ M doz grubunda anlamlı artış belirlenmiştir (p=0.002).

MT-ATP6 protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre juglon uygulanan 2 μ M doz grubunda anlamlı artış belirlenmiştir (p=0.009) (Şekil3.16.).



Şekil3.16. Juglon uygulanmış *MDA-MB-231* hücrelerinde *CYP3A4* ve *mt-ATP6* protein ekspresyonları

4. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin temel sebeplerinden biridir ve dünya çapında en sık teşhis edilen malignitelerden biridir (Ferlay ve ark 2015). Kanseri için mevcut uygulanan kemoterapinin etkinliği ve güvenilirliği sınırlıdır. Kemoterapi, yan etkilere neden olur ve tümör hücreleri dirençli hale gelir (Gottesman 2002). Çalışmalar, kanser tedavisi için yeni ajanların gelişimine adanmış ve bunların tedavide uygulamalarına teşvik edilmektedir

Kinoid bileşikler potansiyel kanser tedavileri için geniş çapta çalışılmıştır (Kwiecinski ve ark 2012; Felipe ve ark 2013). Naftokinonlar çeşitli tıbbi ve biyolojik uygulamalarda kullanımları nedeniyle çalışma konusu olmuştur. Bazı kinoid bileşiklerinin, kanser hücrelerini öldürücü olan oksidatif stresi indüklediği bilinmektedir. Bazı kinoid bileşikler ise elektrik yükleri sayesinde DNA'ya bağlanabilir. Doksorubisin buna bir örnektir: Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırabilir ve DNA'ya bağlanabilir (Thorn ve ark 2011).

Ourique ve ark'nın yaptıkları bir çalışmada Juglon ve Q7 artı askorbat, ROS ve DNA hasarının artmasına neden olduğu gösterilmiş ve Ehrlich karsinom hücrelerinde de pAkt'yi inhibe ettiği bildirilmiştir (Ourique ve ark 2015).

Curcuma longa'nın aktif bileşeni olan Kurkumin, antimikrobiyal, antiviral özellikleri ve antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan ve antimutajenik ajan gibi farmako- terapötik etkiye sahip doğal bir pigmenttir. Bununla birlikte, terapötik etkinliği, ağızdan tüketildiğinde düşük sistemik konsantrasyonlar veren, su ile çözünürlüğü düşük olduğundan dolayı sınırlıdır. Ek olarak, kurkumin, gastrointestinal sistemde kimyasal stabilitesizlikten dolayı, etkinliği için uygun rezervuar içine kapsüllemesi gerekir (Martins ve ark 2013).

Bununla birlikte, kurkumin, diyabetik nefropati yanı sıra metotreksat, gentamisin ve sisplatin indüklü böbrek toksisiteleri durumlarında terapötik moleküllere karşı koruyucu etki göstermiştir (Morsy ve ark 2013). Kurkumin'in ayrıca folat pozitif kanser hücrelerinde folat reseptörünün FR (FR β) up regüle edilmesiyle metotreksat alımını arttırdığı bildirilmektedir (Dhanasekaran ve ark 2013).

Kurkumin, hem *MCF-7* hem de *MDA-MB-231* hücre hatlarında anti-proliferatif ve koloni oluşumu önleyici aktiviteler sergilemiş ayrıca *MDA-MB-231* hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Hu ve ark 2019). Çalışmamızda

hem *MCF-7* hem de *MDA-MB-231* hücrelerinde kurkuminin hücre sağkalımını azalttığını ve kanser hücrelerinin yayılmasını önlediğini belirledik.

Sitokrom P450'ler, birçok anti-kanser ajanlar dahil olmak üzere, ilaçların metabolizmasında rol oynar ve birçok prokarsinojenlerin metabolizmasına katkıda bulunur. P450'ler kanser tedavisine yanıt olarak ve tümörigenezin başlangıcında ve desteklenmesinde rol oynar (Guengerich ve Shimada 1991, Gonzalez ve Gelboin 1994).

CYP3A4 genellikle insan karaciğerinde en bol bulunan P450'dir ve ksenobiyotik metabolizmasında rol alan başlıca enzimdir (Zhou 2008). *CYP3A4*, polisiklik aromatik hidrokarbonlar dahil olmak üzere birçok prokarsinojeni aktive eder ve ayrıca çeşitli anti-kanser ilaçlarının metabolizmasında kritik rollere sahiptir (Shimada ve ark 1994; Windmill ve ark 1997).

Tamoksifen gibi bazı anti-kanser ilaçlar, kanser hücrelerinin ilaç direnci kazanabileceği mekanizmayla *CYP3A4* ekspresyonunu indükler. Bu nedenle, *CYP3A4*'ün seviyesi hem tümör gelişimi için hem de tümörlerin kemoterapi yanıtında önemlidir (Dhaini ve ark 2003). *CYP3A*'nın ekspresyonu, meme, hepatik, akciğer ve mide kanserleri dahil olmak üzere birçok tümörlerde tespit edilmiştir. *CYP3A* seviyeleri, meme tümörlerinde normal dokulardan daha yüksektir, bu da *CYP3A*'nın tümör ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Murray ve ark 1998, Kapucuoglu ve ark 2003; Keshava ve ark 2004). Çalışmamızda benzer şekilde *MCF-7* hücrelerinde *CYP3A4*'ün yüksek ekspresyonunu tespit edilmiştir.

CYP3A4 gen polimorfizmlerinin de prostat veya meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Genel olarak, P450'lerin prokarsinojenleri aktive ederek karsinojene katkıda bulunduğu, ancak prostat ve meme kanserinde, *CYP3A* ile steroid hormonlarının metabolizmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Keshava ve ark 2004).

CYP3A4 ayrıca *MCF-7* (meme), *Caco-2* (kolon) ve *HepG2* (karaciğer) gibi birçok kanser hücre hattında da eksprese edilir. *CYP3A4*'ün, pregnan X reseptörü PXR ile indüklendiği bulundu, çünkü bu hücre hatlarında PXR'nin aşırı ekspresyonu, ilaçlar ile *CYP3A4* indüksiyonunu önemli ölçüde arttırmıştır (Pfrunder ve ark 2003; Yasuda ve ark 2008; Chen ve ark 2009).

Oguro ve ark tarafından yapılan bir çalışmada, *CYP3A4*'ün aşırı ekspresyonu, HRE promoter aktivitesini artırarak ve *Hep3B* hücrelerinin çoğalmasını artırarak

hipoksi altında EPO ve *VEGF* mRNA seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir. Bu etkiler ketokonazol ile azalmıştır. Sonuçlar, *CYP3A4*'ün hipoksik yanıtı ve hücre büyümesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. *CYP3A4*'ün aşırı ekspresyonu, hücre içi ROS seviyelerini arttırmış, ancak hücre büyümesi üzerindeki etkisi, ROS oluşumundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (Oguro ve ark 2011).

CYP3A4, karaciğerde hidroksilasyonunu katalize eden, östrojenlerin metabolizmasında kilit rol oynayan *CYP3A4* geni tarafından kodlanan sitokrom P450 ailesinin bir enzimidir; Hem intrahepatik hem de ekstrahepatik olarak bu sürece katılan diğer enzimlerle de katkıda bulunur. Bu enzimler tarafından katalize edilen hidroksilasyon işleminde, estradiol, düşük kanserojen potansiyele sahip bir hormon metaboliti olan 2-hidroksioestradiol'e dönüştürülür (Tsuchiya Y. ve ark 2005).

Bazı çalışmalar östrojene maruz kalmanın meme kanseri etiolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Feigelson HS. 2003; Thomas HV.1997). Östrojenler ve metabolitleri, tümör büyümesinin indükleyicileri ve promotörleri olarak bilindiğinden, metabolizmalarına dahil olan enzimleri kodlayan genler, bu neoplazmanın patogenezinde hipotetik olarak yer alır (Hefler LA. Ve ark 2011; Service RF. 1998).

Son zamanlarda, çok sayıda araştırmacı çalışmalarını östrojen metabolizmasının bazı gen polimorfizmleri üzerinde yoğunlaştırmıştır ve görünüme göre, bu değişikliklerin meme kanseri gelişme riski üzerindeki etkisi düşüktür. Bununla birlikte, bunlar yaygın değişiklikler olduğundan, çok sayıda hastalık vakasından sorumlu olmaları olasıdır (Le Marchand L. Ve ark. 2005).

CYP3A4 geninde tanımlanmış olan birçok tek nükleotid polimorfizminden (SNP'ler), *CYP3A4 1B* varyantı en yaygın polimorfizmlerden biridir ve meme kanseri de dahil olmak üzere spesifik kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir (Zhou LP. Ve ark. 2013) *CYP3A4 1B* polimorfizmi (rs2740574), gen promotörünün -290 pozisyonunda bir A ile G ikamesine karşılık gelir; bu, *CYP3A4*'ün daha düşük ekspresyonuna veya enzimin katalitik aktivitesinde bir azalmaya neden olur (Dally H. Ve ark. 2003). Bazı çalışmalar, meme kanserine yatkınlıkla ilgili olarak, söz konusu polimorfizmi, açıkça bir ilişki kurmadan değerlendirmiştir (Johnson N.ve ark. 2012; Rebbeck TR. Ve ark 2007; MARIE-GENICA 2010; Kato I. Ve ark 2009; Spurdle AB. Ve ark.2002).

CYP enzimleri östrojenin faz I metabolizmasından sorumludur ve bu nedenle meme kanserinin patogenezinde belirgin bir rol oynamaktadır. Ekstrahepatik dokularda,

CYP1B1, β -estradiolün (E2) 4-hidroksiestradioya dönüştürülmesinden sorumludur, diğer yandan *CYP1A1* ve *CYP3A4*, diğer yandan EY'yi kanserojen olmayan 2-hidroksi metabolitine metabolize eder (Yager JD ve ark 2006; Tsuchiya Y ve ark 2005). Bu ekstrahepatik enzim ifadesinin, taksanlarla muamele için etkileri de olabilir. *CYP3A4* mRNA'sını saptamak için RT-PCR kullanan çalışmalar, gerçekten de ilgili *CYP3A4* ifadesini (Huang Z ve ark 1996; Hellmold H ve ark 1998). Ve bazılarında ise hiçbir *CYP3A* ifadesi bulamayan bazı çalışmalarla değişken sonuçlar vermiştir (Iscan M ve ark 2001; Vaclavikova R ve ark 2007).

CYP3A protein ekspresyonunu saptamak için IHC veya western blot kullanan diğer deneyler de farklı sonuçlar vermiştir (Hellmold H ve ark1998; Murray GI ve ark 2010; Yokose T ve ark 1999; Albin N ve ark 1993). Malign ve sağlıklı dokudaki ekspresyon seviyelerini karşılaştırırken, sonuçlar komşu morfolojik olarak normal dokuya göre daha düşük bir *CYP3A4* ekspresyonu bulma konusundaki bazı çalışmalarla benzer şekilde belirsizdir ve tümörlerde *CYP3A4* ekspresyonunun artmasını öneren diğer çalışmalar (Kapucuoglu N ve ark 2003; Floriano-Sanchez E ve ark 2014). Meme tümörlerinde CYP ekspresyonunu araştıran daha büyük denemelerden birinde, Haas ve arkadaşları IHC kullanan 393 meme kanseri hastasının dokusunu analizlerinde, *CYP3A4* / 5 için taranan meme tümörü örneklerinin% 25'inde ekspresyon göstermiştir. Ayrıca, bu *CYP3A4* / 5 ekspresyonu, hastalarda pozitif nodal durum ile anlamlı bir ilişki göstermiştir (P = 0.018). 2010 yılında, Murray ve arkadaşları, *CYP3A4* ifadesi ile hayatta kalma arasında bir ilişki bulmuşlardır (Murray GI ve ark 1998). Fark marjinal olmasına rağmen, düşük / negatif *CYP3A4* immünoreaktivitesi gösteren tümörleri olan hastalarda ortalama sağkalım 79 ay (% 95 güven aralığı (CI) (77, 81), orta / güçlü *CYP3A4* immünoreaktivitesi gösteren tümörler vardı. Ortalama 86 aylık sağkalım süresi (% 95 CI 79, 93) (Murray GI ve ark 1998). Bazı çalışmalar, *CYP2C* alt ailesinin enzimlerinin mRNA'sını ve protein ekspresyonunu benzer çelişkili sonuçlara sahip meme kanseri tümörlerinde araştırmıştır (Huang Z. ve ark 1996; Vaclavikova R. ve ark2007; Yokose T. ve ark 1999; Albin N ve ark 1993; Schmidt R ve ark 2004; Knüpfer H. ve ark 2004). Schmidt ve arkadaşları, meme kanseri mikrozomlarında *CYP3A4* ve *CYP2C9*'u tespit etmenin yanı sıra, bu mikrozomların ifosfamid'i metabolize etme yeteneklerini de araştırdılar. LC / MS kullanılarak, ölçülen dört meme kanseri mikrozomunun hepsinde minimal bir in vitro ifosfamid N-dikloroetilasyon (0.12 ± 0.07

pmol dak-1 mg protein-1) saptanabildi. Buna karşılık, kadın hastalardan alınan karaciğer örneklerinde yapılan önceki araştırma çalışmaları ifosfamid N-dikloroetilasyon için 132 ± 57 pmol dak -1 mg protein aktivitesi olduğunu göstermiştir (Schmidt R ve ark 2004). Çok az olmasına rağmen, bu, *CYP3A4* aracılı ifosfamid metabolizmasının mekanizmasının meme kanseri mikrozomlarında mevcut olduğunu göstermektedir.

Tümör örneklerinde *CYP3A* protein ekspresyonunu araştıran çalışmalar, hem tümör hem de tümör dokusunda hem *CYP3A4* hem de *CYP3A5*'in göreceli olarak yüksek ifadesini bulmuşlardır (Murray GI ve ark 2010; Di Paolo OA ve ark 2005; Fujimura T. Ve ark 2009). Çalışmamızda, benzer şekilde *MCF-7* meme kanseri hücrelerinde *CYP3A4* ün yüksek ekspresyonunu gözlemledik.

Fujitaka ve meslektaşları, periferik mononükleer hücrelerde, daha önce tedavi edilmemiş akciğer kanserli hastalardan, docetaxel ile tedavi edildikten sonra, *CYP3A4* mRNA ekspresyonunda bir artış gözlemledi (Fujitaka K ve ark2001). Çalışmamızda *MCF-7* hücrelerine kurkumin muamelesi sonucu ve *MDA-MB-231* hücrelerine juglon muamelesi sonucu *CYP3A4*' ün protein ekspresyonu artışı belirledik.

CYP3A4-negatif tümörleri olan 19 hasta, doketaksel tedavisine *CYP3A4*-pozitif tümörleri olan 23 hastadan anlamlı olarak daha yüksek bir yanıt göstermiştir (% 63.2 ve% 26.1, P <0.01). Ayrıca, *CYP3A4* negatif tümörlerde (% 73.7 ve% 26.1, P <0.01) daha yüksek bir klinik fayda oranı ve ilerlemeye daha uzun bir süre (8.9 ± 5.8 ay vs. 5.2 ± 4.4 ay, P <0.05) gözlemlendi. . Bu sonuçlar, meme kanserinde *CYP3A4* ekspresyonunun değerlendirilmesinin, tümörün doketaksel tedavisine yanıtını tahmin etmede ilgili bir araç olabileceğini düşündürmektedir (Sakurai K ve ark 2011).

Tan ve diğerleri, akciğer tümörlerinin somatik mutasyonlarının varlığını araştırmış, oksidatif fosforilasyon sistemine genetik olarak somatik mutasyonlar ve polimorfizmler bulmuşlardır. Bu raporda, *ATP6*'nın A8860G polimorfizmi, incelenen vaka sayısının% 50'sinde mevcuttu (Tan DJ. Ve ark 2002). Ayrıca, Ghaffarpour ve arkadaşları, İran'da meme kanseri teşhisi konan kadınların 49 tümör dokusunda *ATP6* genin tamamlandığını analiz etmişlerdir (Ghaffarpour M. Ve ark 2014).

Aynı şekilde, Grzybowska-Szatkowska ve ark. Meme kanseri bulunan 50 Polonyalı kadında kanda *ATP6* geni, tümör dokusu ve kanserli olmayan doku dizilimini

karşılaştıran bir çalışma yapılmıştır. A8660G polimorfizminin % 66'lık sıklığı olan sekiz farklı varyantı belirlediler (Grzybowska-Szatowska L. ve ark 2014).

ATP6 geninin meme kanseri hastalarında *ATP8* geniyle karşılaştırıldığında, Eş anlamlı olmayan aminoasit varyantlarının oluşum sayısı, *ATPaz8* genine kıyasla *ATPaz6* geninde daha sık görülmüştür. *ATPaz6* genindeki G8584A, T8602C ve G8701A, sırasıyla A20T, F26L ve T59A amino asit ikamelerine yol açar. 8 meme kanseri örneğinden en sık iki tanesinin *ATP6* geninde mutasyona uğradığı bulundu (Sunaina Thapa ve ark 2016).

Mitokondrinin karsinogenez sürecindeki rolü, yakın zamanda yayınlanan çalışmaların sonuçlarıyla vurgulanmaktadır. Bu çalışmalar, parazyolomda ve solunum zincirinin kompleks II'sine ait süksinik dehidrojenazın 3/4 alt birimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların yanı sıra, miyom ve böbrek kanserinde fumarat hidrataz geni üzerindeki nükleer DNA'da (nDNA) bir mutasyon ortaya çıkardı. (Czarnecka A. ve Bartnik E. 2011).

Zhu ve arkadaşları, 14/15 meme kanseri vakasında mtDNA'da en az bir somatik mutasyon keşfetti. Bugüne kadar bu genlerin süreçte önemli bir rol oynadığı görülmesine rağmen, hangi işlevlerin mtDNA ve özellikle de OXPHOS'a dahil olan proteinleri kodlayan genleri, kanser bağlamında yerine getirdiği açık değildir. Bu çalışmanın amacı, ATP sentazının 6 ve 8 alt birimlerini kodlayan dizilerdeki mutasyonları ve bunların enzimin biyokimyasal özellikleri, yapıları ve işlevleri üzerindeki etkilerini analiz etmektir (Zhu W. ve ark 2005).

Çalışmamızda *MCF-7* hücrelerinde hem kurkumin hem de juglon uygulaması sonucu *mt-ATP6* geninin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *MCF-7* ve *MDA-MB-231* insan meme kanseri hücre hatlarında naftakinonlardan juglon ve kurkumin uygulaması sonucu hücre canlılığına etkileri ve *CYP3A4* ve *mt-ATP6* genlerinin ifade analizleri araştırılmıştır. Her iki hücre hattında da hem kurkumin hem de juglon uygulamasının kanser hücrelerinde invazyon ve migrasyonu baskıladığı tespit edilmiştir.

Çalışma sonunda, *MCF-7* meme kanseri hücre hattında 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda kurkumin uygulaması sonucunda, *CYP3A4*'ün ve *mt-ATP6*'nın ekspresyonlarının arttığı, fakat istatksel olarak gruplar arası anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda juglon uygulaması sonucu *CYP3A4*'ün ekspresyonunun arttığı 5µM ve 10µM konsantrasyonları arasında istatksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiş ayrıca *mt-ATP6* gen ifadelerinde azalış elde edilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında, farklı konsantrasyonlarda kurkumin uygulaması sonucunda *CYP3A4*'ün ekspresyonunun 1µM ve 10µM konsantrasyonları arasında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir, *mt-ATP6* gen ifadelerinde ise azalma görülmekle birlikte istatksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

MDA-MB-231 hücre hattında, farklı konsantrasyonlarda juglon uygulaması sonucunda, *CYP3A4* gen ekspresyonunda azalış belirlenmiş 1µM ve 3µM doz grupları arası fark istatksel olarak anlamlı bulunmuştur. *mt-ATP6* gen ekspresyonlarında ise azalış belirlenmiş fakat gruplar arası anlamlı fark bulunamamıştır.

İfade analizleri yapıldıktan sonra, bu moleküllere ait özgün antikolarlar kullanılarak Western blot çalışmaları yapılmıştır.

MCF-7 hücrelerinde kurkumin uygulamasının *CYP3A4* ve *mt-ATP6* proteinlerinin 5 µM konsantrasyonda kontrol grubuna göre ifadesini arttırdığı belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde juglon uygulamasının *CYP3A4* protein ifadesini kontrol grubuna göre tüm konsantrasyonlarında arttırdığı, *mt-ATP6* protein ifadesini tüm konsantrasyonlarında azalttığı gözlemlenmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde kurkumin uygulaması sonucu *CYP3A4* proteininin ifadesinde kontrol grubuna göre 1 μ M konsantrasyonunda azalış, *mt-ATP6* protein ifadesinde ise 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları arasında artış tespit edilmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde juglon uygulaması sonucu *CYP3A4* proteininin ifadesinde kontrol grubuna göre 3 μ M konsantrasyonunda artış, *mt-ATP6* protein ifadesinde ise kontrol grubuna göre 2 μ M konsantrasyonunda artış belirlenmiştir.

Bu çalışmalar immunohistokimya gibi teknikle de doğrulanabilir. Bu çalışma hücre kültür çalışmalarının devamı olarak in vivo ve faz çalışmalarına katkıda bulunabilir, yol gösterici olabilir. *CYP3A4* ve *mt-ATP6* genleri meme kanserinde yeni bir metabolik hedef olarak değerlendirilebilir.

Yeni yapılacak çalışmalarda kurkumin ve juglon antikanserojenik etkilerinin daha kapsamlı analizi yapılarak yeni bir ilaç ya da mevcut ilaçlarla birlikte kullanılması ile terapötik potansiyelleri açıklanabilir ve antikanser, antimetastatik ve antiangiyojenik etkileri hayvan deneyleri ile desteklenebilir.

Kanser metabolizmasını daha iyi anlamak için yeni yapılacak çalışmalarda, *CYP3A4* enziminin aktivitesine bakılabilir, ATP sentaz enziminin diğer izoformları ile bağlantı kurulabilir ve enerji üreten metabolik yollarla ilişkisi açıklanabilir. CYP enzimleri kanserde, antikanser ajanların klinik yararının araştırıldığı çalışmalarda marker olarak kullanılıp çalışmalara destek verebilir.

Çalışma sonuçlarımız, literatürdeki diğer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, kurkumin ve juglon meme kanseri tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesi için umut vericidir.

KAYNAKLAR

- Ahmad A, Banerjee S, Wang Z, Kong D, Sarkar FH, 2008. Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF- κ B and Bcl-2. *J Cell Biochem*, 105, 1461-71.
- Albin N, Mathieu MC, Massaad L et al (1993) Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res* 53:3541–3546
- American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2011 2012. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-030975.pdf>. 16.10.2011.
- AmericanCancerSociety.CancerFacts&Figures2010.<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>. 16.10.2011.
- Ammon, H.P., Anazodo, M.I., Safayhi, H., Dhawan, B.N.,Srimal, R.C. (1992) Curcumin: a potent inhibitor of leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Med*, 58 (2), 226.
- Ammon, H.P.,Wahl, M.A. (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*, 57 (1), 1-7.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MH, Coulson AR,Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mito-chondrial genome. *Nature*. 1981;290:457–65.
- Banerjee M, Robbins D, Chen T (2013) Modulation of xenobiotic receptors by steroids. *Molecules* 18:7389–7406.
- Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G, for the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83,000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet* 2004; 363: 1007–16.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K et al (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12208–12213.
- Biglia N, Defabiani E, Ponzone R, Mariani L, Marengo D, Sismondi P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 69–83.
- Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H et al (1998) SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 12:3195–3205.
- Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007; 356: 227–36.
- Bruno RD, Njar VCO (2007) Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg Med Chem* 15:5047–5060.
- Cann RL, Stokening M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 1987;325:32–6.
- Carrick S, Parker S, Wilcken N et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD003372.
- Chen Y, Tang Y, Chen S, Nie D, 2009. Regulation of drug resistance by human pregnane X receptor in breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 8, 13, 1265-72.

- Chen Y, Tang Y, Chen S, Nie D, 2009. Regulation of drug resistance by human pregnane X receptor in breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 8, 13, 1265-72.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiologic studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 1047–59.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360:187–95.
- Czarnecka A and Bartnik E: The role of the mitochondrial genome in ageing and carcinogenesis. *J Aging Res*. 2011:1364352011
- Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet*. 2006;47:67–78.
- Czarnecka AM, Krawczyk T, Czarnecki JS, et al. Methodology for mitochondrial DNA research in oncology: goals and pitfalls. *ARS Medica Tomitana*. 2008;14:48–64.
- Dally H, Edler L, Jäger B. , et al. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics* 2003; 13 (10) 607-618 Doi: 10.1097/01.fpc.0000054128.14659.a6
- De Jonge M, Huitema A, Rodenhuis S, Beijnen JH (2005) Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* 44:1135–1164
- Dhaini HR, Thomas DG, Giordano TJ, Johnson TD, Biermann JS, Leu K, Hollenberg PF, Baker LH, 2003. Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 21, 13, 2481-5.
- Dhaini HR, Thomas DG, Giordano TJ, Johnson TD, Biermann JS, Leu K, Hollenberg PF, Baker LH, 2003. Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 21, 13, 2481-5.
- Dhanasekaran S, Biswal BK, Sumantran VN, Verma RS, 2013. Augmented sensitivity to methotrexate by curcumin induced overexpression of folate receptor in KG-1 cells. *Biochimie*, 95, 8, 1567-73.
- Dhanasekaran S, Biswal BK, Sumantran VN, Verma RS, 2013. Augmented sensitivity to methotrexate by curcumin induced overexpression of folate receptor in KG-1 cells. *Biochimie*, 95, 8, 1567-73.
- Di Paolo OA, Teitel CH, Nowell S et al (2005) Expression of cytochromes P450 and glutathione S-transferases in human prostate, and the potential for activation of heterocyclic amine carcinogens via acetyl-CoA-, PAPS- and ATP-dependent pathways. *Int J Cancer* 117:8–13.
- Donald G, Hertzner K, Eibl G, 2012. Baicalein –an intriguing therapeutic phytochemical in pancreatic cancer. *Curr Drug Targets*, 13, 1772-6.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687–717.

- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 352: 930-42.
- Eigner, D., Scholz, D. (1999) *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J Ethnopharmacol*, 67 (1), 1-6.
- Eisen A, Lubinski J, Klijn J, et al. Breast cancer following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7491-6. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 1994; 330: 81-7.
- Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long term follow up. *Histopathology* 1992; 20: 479-89.
- Feigelson HS. Breast cancer: epidemiology and molecular endocrinology. In: Henderson BE, Ponder B, Ross RK. , eds. *Hormones, Genes, and Cancer*. New York, NY: Oxford University Press; 2003: 120-138
- Felipe KB, Benites J, Glorieux C, Sid B, Valenzuela M, Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Valderrama JA, Leveque P, Gallez B, Verrax J, Buc Calderon P, 2013. Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 433, 4, 573-8.
- Felipe KB, Benites J, Glorieux C, Sid B, Valenzuela M, Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Valderrama JA, Leveque P, Gallez B, Verrax J, Buc Calderon P, 2013. Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 433, 4, 573-8.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, 5, E359-86.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, 5, E359-86.
- Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J Med* 1995; 333:1456-61.
- Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, et al. Two months of doxorubicin cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen nonresponsive tumors:

- results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1483-96.
- Floriano-Sanchez E, Rodriguez NC, Bandala C, Coballase-Urrutia E (2014) CYP3A4 expression in breast cancer and its association with risk factors in Mexican women. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:3805–3809.
- Frykberg ER. Lobular carcinoma in situ of the breast. *The breast journal* 1999; 5: 296-300.
- Fujimura T, Takahashi S, Urano T et al (2009) Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* 74:391–397.
- Fujitaka K, Oguri T, Isobe T et al (2001) Induction of cytochrome P450 3A4 by docetaxel in peripheral mononuclear cells and its expression in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 48:42–46.
- Ghaffarpour M, Mahdian R, Fereidooni F, Kamalidehghan B, Moazami N, Houshmand M. The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. *Cancer Cell Int* 2014;14:21.
- Gomathinayagam R, Sowmyalakshmi S, Mardhatillah F, Kumar R, Akbarsha MA, Damodaran C, 2008. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res*, 28, 785-92.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV, 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug metabolism reviews*, 26, 1-2, 165-83.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV, 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug metabolism reviews*, 26, 1-2, 165-83.
- Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 608: 1-22.
- Goodwin B, Hodgson E, Liddle C (1999) The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* 56:1329–1339.
- Gottesman MM, 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 53, 615-27.
- Gottesman MM, 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 53, 615-27.
- Grzybowska-Szatkowska L and Slaska B: Mitochondrial DNA and carcinogenesis (review). *Mol Med Rep*. 6:923–930. 2012.
- Grzybowska-Szatkowska L, Slaska B, Rzymowska J, Brzozowska A, Floriańczyk B. Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 genes in patients with breast cancer. *Mol Med Rep* 2014;10:1772–8.
- Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 1: 149-61.
- Guengerich FP, Shimada T, 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chemical research in toxicology*, 4, 4, 391-407.
- Guengerich FP, Shimada T, 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chemical research in toxicology*, 4, 4, 391-407.

- Guengerich, F. P., Kim, D. H., & Iwasaki, M. (1991). Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), 168–79.
- Haas S, Pierl C, Harth V et al (2006) Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 119:1785–1791.
- Hafner, M., Rezen, T., & Rozman, D. (2011). Regulation of hepatic cytochromes p450 by lipids and cholesterol. *Current Drug Metabolism*, 12(2), 173–85.
- Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al., for the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breastcancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002; 87: 1234–45.
- Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM (2009) Nuclear receptor-mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:35–
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353: 229–37.
- Hefler LA, Tempfer CB, Grimm C. , et al. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms in the assessment of breast carcinoma risk and fibroadenoma risk in Caucasian women. *Cancer* 2004; 101 (02) 264-269 Doi: 10.1002/cncr.20361
- Hellmold H, Rylander T, Magnusson M et al (1998) Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties. *J Clin Endocrinol Metab* 83:886–895.
- Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Eng J Med* 1998; 339:974-84.100.Recth A. The return of postmastectomy radiotherapi. *J Clin Oncol* 1995;13: 2861-84.
- Hu C, Li M, Guo T, Wang S, Huang W, Yang K, Liao Z, Wang J, Zhang F, Wang H, 2019. Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 58, 152740.
- Hu C, Li M, Guo T, Wang S, Huang W, Yang K, Liao Z, Wang J, Zhang F, Wang H, 2019. Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 58, 152740.
- Huang Z, Fasco MJ, Figge HL et al (1996) Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos* 24:899–905
- Huss JM, Wang SI, Astrom A et al (1996) Dexamethasone responsiveness of a major glucocorticoid-inducible CYP3A gene is mediated by elements unrelated to a glucocorticoid receptor binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4666–4670.
- Induced abortion does not increase breast cancer risk. WHO InformationFact Sheets. No:240.

- Iscan M, Klaubuniemi T, Coban T et al (2001) The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 70:47–54.
- Jayaprakasha, G.K., Jagan, L., Rao, M., Sakariah, K.K. (2005) Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (12), 533-548.
- Jayaprakasha, G.K., Rao, L.J., Sakariah, K.K. (2006) Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*, 98 (4), 720-724.
- Ji YB, Qua ZY, Zou X, 2011. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Exp Toxicol Pathol*, 63, 69-78.
- Johnson JL, de Mejia EG, 2013a. Flavonoid apigenin modified gene expression associated with inflammation and cancer and induced apoptosis in human pancreatic cancer cells through inhibition of GSK-3 β /NF- κ B signaling cascade. *Mol Nutr Food Res*, 57, 2112-27.
- Johnson N, Walker K, Gibson LJ, et al. CYP3A variation, premenopausal estrone levels, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104 (09) 657-669 Doi: 10.1093/jnci/djs156
- Jones, G., Prosser, D. E., & Kaufmann, M. (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *Journal of Lipid Research*, 55(1), 13–31.
- Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H et al (2003) Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett* 202:17–23.
- Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Iscan M, 2003. Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett*, 202, 1, 17-23.
- Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Iscan M, 2003. Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett*, 202, 1, 17-23.
- Kato I, Cichon M, Yee CL, Land S, Korczak JF. African American-preponderant single nucleotide polymorphisms (SNPs) and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol* 2009; 33 (01) 24-30 Doi: 10.1016/j.canep.2009.04.009
- Kaye JA, Jick H. Antibiotics and the risk of breast cancer. *Epidemiology* 2005; 16: 688–90.
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 36–47.
- Keshava C, McCanlies EC, Weston A, 2004. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 160, 9, 825-41.
- Keshava C, McCanlies EC, Weston A, 2004. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 160, 9, 825-41.
- Kirches E. Mitochondrial and nuclear genes of mitochondrial components in cancer. *Curr Genomics*. 2009;10(4):281–92.
- Kitagawa RR, Vilegas W, Carlos IZ, Raddi MSG, 2011. Antitumor and immunomodulatory effects of the naphthoquinone 5-methoxy-3, 4-dehydroxanthonegnin. *Rev bras farmacogn*, 21, 1084-88.
- Kliwer SA, Moore JT, Wade L et al (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92:73–82.

- Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F et al. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a metaanalysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 2001; 19: 343–53.
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 376-386.
- Knüpfer H, Schmidt R, Stanitz D et al (2004) CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast* 13:28–34.
- Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Felipe KB, Farias MS, Glorieux C, Valenzuela M, Sid M, Benites J, Valderrama JA, Verrax J, Buc Calderon P. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 421, 268-73.
- Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Felipe KB, Farias MS, Glorieux C, Valenzuela M, Sid B, Benites J, Valderrama JA, Verrax J, Buc Calderon P, 2012. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 421, 2, 268-73.
- Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Felipe KB, Farias MS, Glorieux C, Valenzuela M, Sid B, Benites J, Valderrama JA, Verrax J, Buc Calderon P, 2012. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 421, 2, 268-73.
- Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekbom A, Pavia M, Adami HO. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med*. 1994; 331: 5–9.
- Le Marchand L, Donlon T, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR. Estrogen metabolism-related genes and breast cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (08) 1998-2003 Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0076
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA et al (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Investig* 102:1016–1023.
- Lu JJ, Bao JL, Wu GS, Xu WS, Huang MQ, Chen Xp, Wang YT, 2013. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem*, 13, 456-63.
- Ludmiła Grzybowska-Szatkowska, Brygida Ślaska, Jolanta Rzymowska, Anna Brzozowska, Bolesław Floriańczyk Published online on: August 8, 2014
- Manavoğlu O (ed). *Klinik Onkoloji El Kitabı*. 1. Baskı. Ankara: PalmeYayıncılık; 2004. 218-29
- MARIE-GENICA Consortium on Genetic Susceptibility for Menopausal Hormone Therapy Related Breast Cancer Risk. Genetic polymorphisms in phase I and phase II enzymes and breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119 (02) 463-474 Doi: 10.1007/s10549-009-0407-0

- Martins AF, Bueno PV, Almeida EA, Rodrigues FH, Rubira AF, Muniz EC, 2013. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International journal of biological macromolecules*, 57, 174-84.
- Martins AF, Bueno PV, Almeida EA, Rodrigues FH, Rubira AF, Muniz EC, 2013. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International journal of biological macromolecules*, 57, 174-84.
- Massoud G, Reza M, Forouzandeh F, Behnam K, Nasrin M, Massoud H. The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. *Cancer cell international*. 2014;14:21.
- Masuyama H, Hiramatsu Y, Kodama JI, Kudo T (2003) Expression and potential roles of progesterone X receptor in endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4446–4454.
- McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. For the Women's Health Initiative Cohort Study. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *JAMA* 2003; 290: 1331–6.
- McTiernan A. Physical activity and the prevention of breast cancer. *Medscape Womens Health* 2000; 5: E1.
- Michels KB, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *Ann Epidemiol*. 2002; 12: 21–6.
- Miki Y, Suzuki T, Kitada K et al (2006) Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. *Cancer Res* 66:535–542.
- Moilanen AM, Hakkola J, Vaarala MH et al (2007) Characterization of androgen-regulated expression of CYP3A5 in human prostate. *Carcinogenesis* 28:916–921.
- Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Rifaai RA, Hassan MK, 2013. Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Advances in pharmacological sciences*, 2013, 387071.
- Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Rifaai RA, Hassan MK, 2013. Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Advances in pharmacological sciences*, 2013, 387071.
- Murray GI, Patimalla S, Stewart KN et al (2010) Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer. *Histopathology* 57:202–211
- Murray GI, Taylor MC, Burke MD, Melvin WT, 1998. Enhanced expression of cytochrome P450 in stomach cancer. *British journal of cancer*, 77, 7, 1040-4.
- Murray GI, Taylor MC, Burke MD, Melvin WT, 1998. Enhanced expression of cytochrome P450 in stomach cancer. *British journal of cancer*, 77, 7, 1040-4.
- Murray GI, Weaver RJ, Paterson PJ et al (1993) Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer. *J Pathol* 169:347–353.

- Nallani SC, Goodwin B, Buckley AR et al (2004) Differences in the induction of cytochrome P450 3A4 by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. *Cancer Chemother Pharmacol* 54:219–229.
- Norlin, M. (2000). *Cytochrome P450 Enzymes in the Metabolism of Cholesterol and Cholesterol Derivatives*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy, 241.
- Oguro A, Sakamoto K, Funae Y, Imaoka S, 2011. Overexpression of CYP3A4, but not of CYP2D6, promotes hypoxic response and cell growth of Hep3B cells. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 26, 4, 407-15.
- Oguro A, Sakamoto K, Funae Y, Imaoka S, 2011. Overexpression of CYP3A4, but not of CYP2D6, promotes hypoxic response and cell growth of Hep3B cells. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 26, 4, 407-15.
- Olson JE, Sellers TA, Iturria SJ, Hartmann LC. Bilateral oophorectomy and breast cancer risk reduction among women with a family history. *Cancer Detect Prev*. 2004; 28: 357–60.
- Omura, Tsuneo; Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2370–2378.
- Ourique F, Kwiecinski MR, Felipe KB, Correia JF, Farias MS, Castro LS, Grinevicius VM, Valderrama J, Rios D, Benites J, Calderon PB, Pedrosa RC, 2015. DNA damage and inhibition of akt pathway in mcf-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 495305.
- Pandol S, Gukovskaya A, Edderkaoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A, 2012. Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol*, 2, 127-34.
- Peeters PH, Keinan-Boker L, Van Der Schouw YT, Grobbee DE. Phytoestrogens and breast cancer risk: review of the epidemiological evidence. *IARC Sci Publ*. 2002; 156: 331–6.
- Peterson, J.A. & Prough R.A., (1986). Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b, in cytochrome P-450 catalysis. In: *Cytochrome P-450. Structure. mechanism and biochemistry*. edited by P.R. Ortiz de Montellano. Plenum Press, New York, 89-117
- Pfrunder A, Gutmann H, Beglinger C, Drewe J, 2003. Gene expression of CYP3A4, ABC-transporters (MDR1 and MRP1-MRP5) and hPXR in three different human colon carcinoma cell lines. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 55, 1, 59-66.
- Pinto AV, de Castro SL, 2009. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*, 14, 4570-90
- Powolny AA, Singh SV, 2008. Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. *Pharm Res*, 25, 2171-80.
- Rebbeck TR, Troxel AB, Shatalova EG. , et al. Lack of effect modification between estrogen metabolism genotypes and combined hormone replacement therapy in postmenopausal breast cancer risk.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16 (06) 1318-1320 Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0084
- Rendic S, Guengerich FP (2012) Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol* 25:1316–1383.
- Rhizoma Curcumae Longae, WHO monographs on selected medicinal plants (c. Vol 1). (1999). World Health Organisation.
- Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı(Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü) 2005 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. ketem.org/istatistik.php. 15.06.2010.
- Sakurai K, Enomoto K, Matsuo S et al (2011) CYP3A4 expression to predict treatment response to docetaxel for metastasis and recurrence of primary breast cancer. *Surg Today* 41:674–679.
- Sarvalkar, P.P., Walvekar, M.V., Bhopale, L.P. (2011) Antioxidative effect of curcumin (*Curcuma longa*) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in submandibular gland of D-galactose-induced aging male mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (20), 5191-5193.
- Sausville, E.A. Longo, D.A. Principles of cancer treatment: surgery, chemotherapy and biological treatment. In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th edition. Spain: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
- Scartezzini, P., Speroni, E. (2000) Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol*, 71 (1-2), 23-43.
- Schmidt R, Baumann F, Hanschmann H et al (2001) Gender difference in ifosfamide metabolism by human liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 26:193–200.
- Schmidt R, Baumann F, Knüpfer H et al (2004) CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 expression and ifosfamide turnover in breast cancer tissue microsomes. *Br J Cancer* 90:911–916.
- Service RF. New role for estrogen in cancer?. *Science* 1998; 279 (5357): 1631-1633 Doi: 10.1126/science.279.5357.1631
- Seshadri P, Rajaram A, Rajaram R, 2011. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med*, 51, 2090-107.
- Shidara YYK, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, Oda H, Ohta S. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res*. 2005;65(5):1655–63.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP, 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 270, 1, 414-23.
- Sledge GW, Neuberger D, Bernardo P et al. Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). *J Clin Oncol* 2003; 21: 588–92.

- Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E. , et al. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 2002; 12 (05) 355-366
- Srimal, R.C. (1997) Turmeric: A brief review of medicinal properties. *Fitoterapia*, LXVIII, 483-499
- Srinivas G, Annab LA, Gopinath G, Banerji A, Srinivas P, 2004b. Antisense blocking of BRCA1 enhances sensitivity to Plumbagin but not tamoxifen in BG-1 ovarian cancer cells. *Mol Carcinog*, 39, 15-25.
- Srinivas P, Gopinath G, Banerji A, Dinakar A, Srinivas G, 2004a. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Mol Carcinog*, 40, 201-11.
- Sunaina Thapa¹•Freda Lalrohlui¹•Souvik Ghatak¹•John Zohmingthanga²•Doris Lallawmzuali³•Jeremy L. Pautu³•Nachimuthu Senthil Kumar
- Synold T, Dussault I, Forman B (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 7:1–7.
- Takahashi H, Chen MC, Pham H, Angst E, KingJC, Park J, Brovman EY, Ishiguro H, Harris DM, Reber HA, Hines OJ, Gukovskaya AS, Go VLW, Eibl G, 2011. Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1465-74.
- Takahashi H, Chen MC, Pham H, Angst E, KingJC, Park J, Brovman EY, Ishiguro H, Harris DM, Reber HA, Hines OJ, Gukovskaya AS, Go VLW, Eibl G, 2011. Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1465-74.
- Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:972–6.
- Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, et al. Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk. *JAMA* 2004; 291: 2433–40.
- Thomas HV, Reeves GK, Key TJ. Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control* 1997; 8 (06) 922-928
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB, 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21, 7, 440-6.
- Traunecker HCL, Stevens MCG, Kerr DJ, Ferry DR (1999) The acridone carboxamide GF120918 potently reverses P-glycoprotein-mediated resistance in human sarcoma MES-Dx5 cells. *Br J Cancer* 81:942–951.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T (2005) Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 227:115–124
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* 2005; 227 (02) 115-124 Doi: 10.1016/j.canlet.2004.10.007 PubMed

- Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, Gut I. The paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioksidants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2003; 368: 200-9.107. Sayek İ (editör). *Temel Cerrahi*. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd.Şti.2004. 989
- Vaclavikova R, Hubackova M, Stribrna-Sarmanova J et al (2007) RNA expression of cytochrome P450 in breast cancer patients. *Anticancer Res* 27:4443–4450
- Veronesi U. Conservation surgery and irradiation in stages 1 and 2 disease. European experience. In: Bland KI, Copeland EM, (eds). *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant diseases*. 2nd edition. Philadelphia: W:B Saunders; 1998. 1191-6.
- Wallace DC: Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368:2012.02672013.
- Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH, 2006. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer*, 106, 2503-13.
- Windmill KF, McKinnon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME, 1997. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutation research*, 376, 1-2, 153-60.
- Xu H, Yu X, Qu S, Sui D, 2013. Juglone, isolated from *Juglans mandshurica* Maxim induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 3631-34.
- Xu HL, Yu XF, Qu SC, Qu XR, Jiang YF, Sui DY, 2012. Juglone, from *Juglans mandshurica* Maxim, inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Food Chem Toxicol*, 50, 590-96.
- Xu HL, Yu XF, Qu SC, Zhang R, Qu XR, Chen YP, Ma XY, Sui DY, 2010. Anti-proliferative effect of Juglone from *Juglans mandshurica* Maxim on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway. *Eur J Pharmacol*, 645, 14-22.
- Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354:270–282.
- Yasuda K, Ranade A, Venkataramanan R, Strom S, Chupka J, Ekins S, Schuetz E, Bachmann K, 2008. A comprehensive in vitro and in silico analysis of antibiotics that activate pregnane X receptor and induce CYP3A4 in liver and intestine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 36, 8, 1689-97.
- Yokose T, Doy M, Taniguchi T et al (1999) Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch* 434:401–411.
- Zanger UM, Schwab M (2008) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138:103–141.
- Zhou JH, Cheng HY, Yu ZQ, He DW, Pan Z, Yang DT, 2011. Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chin Med J (Engl)*, 124, 1695-9.

- Zhou LP, Yao F, Luan H. , et al. CYP3A4*1B polymorphism and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2013; 34 (02) 649-660 Doi: 10.1007/s13277-012-0592-z
- Zhou SF, 2008. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current drug metabolism*, 9, 4, 310-22
- Zhu W, Qin W, Bradley P, Wessel A, Puckett CL and Sauter ER: Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid. *Carcinogenesis*. 26:145–152. 2005.



EKLER

EK 1.Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Kararı

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

Toplantı Sayısı:81

Toplantı Tarihi: 18 Ocak 2019

Karar Sayısı:2019/1667;N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nun "Mcf-7 ve mda-mb231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon ve Kurkumin Uygulamasının mt-ATP6 ve Sitokrom P450 Moleküllerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 14.01.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Saliha AYDEMİR' in yüksek lisans tez çalışmasının N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nun sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

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

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Yardımcı Araştırmacılar: Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE, Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA, Saliha AYDEMİR

ASLI GİBİDİR
18.01.2019

Prof. Dr. Saim AÇIKGOZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Saliha AYDEMİR
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Meram/20.09.1991
Telefon : 05543230629
e-mail : atalay.saliha@outlook.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	Osman Nuri Hekimoğlu Anadolu Lisesi Selçuklu/KONYA	2011
Üniversite	Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram/KONYA	2016

