



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERLER HÜCRE HATLARINDA NEAT1
EKSPRESYON SEVİYESİNİN DOXORUBİCİN DİRENCİ
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Zahra AZİZİ

Ocak 2022
DENİZLİ

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

**MEME KANSERLER HÜCRE HATLARINDA NEAT1
EKSPRESYON SEVİYESİNİN DOXORUBİCİN DİRENCİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Zahra AZİZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Denizli, 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı : Zahra AZİZİ

ÖZET

MEME KANSERLER HÜCRE HATLARINDA NEAT1 EKSPRESYON SEVİYESİNİN DOKSORUBİSİN DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Zahra Azizi
Yüksek lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Ocak 2022, 63 Sayfa

Meme kanseri kadınlar arasında dünyada en sık görülen kanserdir ve kansere bağlı ölüm sebebinde en başta yer almaktadır. Bir antrasiklin türevi olan doksorubisin, meme kanseri için en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. En güçlü kemoterapötik ilaçlardan biri olarak kabul edilir ve metastatik lezyonlar için yanıt oranı yaklaşık %25-40 olmaktadır. Doksorubisin kullanımında ilaca direnç ve kanserli olmayan hücreler üzerinde toksisite gibi problemler görülmektedir. Kemoterapi ilaçlarına karşı geliştirilen direnç, kanser kemoterapisinin başarısını engelleyen en önemli etkidir. Yapılan çalışmalarda NEAT1'in doksorubisin direncinde rolü olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma ile, MCF-7 ve MDA-MB231 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10a sağlıklı meme epitel hücre hattında NEAT1'in doksorubisin direncinde miR410 ile ilişkisi incelendi. NEAT1 ekspresyon seviyesinin değişimleri qRT-PCR analizleri ile belirlendi. NEAT1 ekspresyonu doksorubisin muamelesi sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında, anlamlı bir şekilde azaldı. Sağlıklı meme epitel hücresi olan MCF-10A hücre hattında ise, beklediğimiz gibi, ekspresyon kanser hücre hatlarına göre, daha yüksek gözlemlendi. Aynı zamanda miR410 ekspresyonu ise hem hücre hatları hem de doz uygulaması düzeylerinde bir değişim olmadığı gözlemlendi.

Biz bu çalışma ile meme kanserinde doksorubisin dirençliliği ile NEAT1'in ilişkili olabileceği fakat miR410'un bu yolda etkili olmadığını gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Doksorubisin, NEAT-1, miR-410, İlaç Direnci

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon (Proje No: 2020SABE029) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN NEAT1 EXPRESSION LEVEL AND DOXORUBICIN RESISTANCE IN BREAST CANCER CELL LINES**

AZİZİ, Zahra

M.Sc. Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

January 2022, 63 pages

Breast cancer is the most common cancer among women in the world and is the leading cause of cancer-related death. Doxorubicin, an anthracycline derivative, is one of the most commonly used chemotherapeutic agents for breast cancer. It is regarded as one of the most potent chemotherapeutic drugs and its response rate for metastatic lesions is approximately 25–40%. Despite its therapeutic effects, there are limitations to its use; one of them is drug resistance, and another is toxicity to non-cancerous cells. Resistance to chemotherapy drugs is the most important factor preventing the success of cancer chemotherapy. Studies have shown that NEAT1 contributes to doxorubicin resistance.

This study investigated the relationship of NEAT1 with miR410 regulation in doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cell lines and MCF-10a healthy breast epithelial cell line. Changes in NEAT1 expression level were determined by qRT-PCR analyses.

NEAT1 expression was significantly decreased in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines after doxorubicin treatment. In the MCF-10A cell line, which is a healthy mammary epithelial cell, more expression than cancer cell lines was observed, as we expected. At the same time, it was observed that there was no change in miR410 expression in both cell lines and dose administration levels.

In this study, we showed that NEAT1 may be associated with doxorubicin resistance in breast cancer, but miR410 is not effective in this pathway.

Keywords: Breast Cancer, Doxorubicin, NEAT-1, miR-410, Drug Resistance

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2020SABE029.

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bana tezimin yürütülmesinde her türlü bilimsel desteği sağlayan ve akademik eğitimime katkı sunan Tıbbi Biyoloji AD başkanı ve çok değerli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ'a,

Yüksek lisansım boyunca bilgilerini benden esirgemeyen değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR'a, Prof. Dr. Yavuz DODURGA'ya ve Doç. Dr. Selda ŞİMŞEK'e,

Tez çalışmam sırasında her türlü desteği sağlayan Arş. Gör. Dr. Ayşen Buket ER URGANCI'ya ve Cihangir DOĞAN'a,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan sevgili aileme ve canım kocama, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç.....	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Meme Kanseri.....	4
2.1.1. Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Etiyoloji	5
2.1.2.1. Çevresel Faktörler.....	5
2.1.2.2. Sigara.....	6
2.1.2.3. Alkol.....	6
2.1.2.4. Beslenme.....	7
2.1.2.5. Obezite.....	7
2.1.2.6. Hormon Replasman Tedavisi.....	8
2.1.2.7. Aile Öyküsü ve Genetik Yatkınlık.....	8
2.2. Meme Kanseri Evrelendirmesi.....	9
2.3. Meme Kanseri Tipleri.....	11
2.3.1. in situ.....	11
2.3.2. İnvaziv.....	11
2.4. Kodlamayan RNA'lar.....	12
2.4.1. Uzun kodlamayan RNA'lar.....	13
2.4.2. Uzun kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması.....	14
2.4.3. LncRNA'ların Lokalizasyonu.....	16
2.4.4. Meme Kanserinde Uzun Kodlamayan RNA'lar.....	17

2.4.5. Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (NEAT-1).....	18
2.5. MikroRNA'lar	19
2.5.1. miR-410-3p.....	20
2.6. Çoklu İlaç Direnci.....	20
2.7. Çoklu İlaç Direnç Mekanizmaları.....	21
2.7.1. İlaç Atış Sistemi.....	21
2.7.2. Genetik Faktörler.....	22
2.7.3. Büyüme Faktörleri.....	22
2.7.4. DNA Onarımını Geliştirmek.....	23
2.7.5. İlaç Metabolizmasını Değiştirmek.....	23
2.8. Doksorubisin.....	23
2.9. Hipotez.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
3.1. Hücre Kültürü.....	26
3.1.2. Hücrelerin Pasajı.....	27
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	27
3.2. Sitotoksosite Tayini (MTT Testi).....	27
3.3. Total RNA İzolasyonu.....	28
3.4. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi.....	28
3.5. Real-Time qPCR ile RNA (lncRNA ve miRNA) Ekspresyon Analizi.....	29
3.6. İstatistiksel Analizler.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarında DOX İçin IC50 Değerlerinin Tayini.....	31
4.2. Hücre Hatlarında NEAT1 ve miR410 Ekspresyon Sonuçları.....	33
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇLAR.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
8. ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. 2020'de Kadın Meme Kanseri İçin Bölgeye Özgü İnsidans ve Mortalite.....	5
Şekil 2.1. Meme kanseri ile ilişkili risk faktörlerine genel bakış.....	9
Şekil 2.2. A. Lobüler karsinoma in situ (LCİS). B. Duktal karsinom in situ (DCİS).....	11
Şekil 2.3. LncRNA'lar, genomik yapılarına ve gendeki konumlarına göre sınıflandırmaları.....	15
Şekil.2.4. NEAT1'in etki alanı mimarisi ve şematik parabenek yapısı.....	19
Şekil 2.5. Kansere hücrelerinde ilaç direnci mekanizmaları.....	21
Şekil 2.6. Doksorubisin (DOX) kimyasal yapısı.....	24
Şekil.2.7. Kansere hücrelerinin DOX direncinde rol oynayan moleküler yollar ve mekanizmalar.....	25
Şekil 5.1. Kansere hücrelerinin doksorubisin direncinde uzun kodlamayan RNA'lar.....	37
Şekil 5.2. DOX'a dirençli UBC dokularında ve hücrelerinde NEAT1 yukarı regüle edildi ve miR-214-3p aşağı regüle edildi	38

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Meme kanseri evre grupları.....	10
Tablo 3.1. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	29
Tablo 3.2. Real-Time PCR reaksiyon karışımı.....	30
Tablo 4.1. MCF-7 Yüzde canlılık grafiği.....	31
Tablo 4.2. MDA-MB231 Yüzde canlılık grafiği.....	32
Tablo 4.3. MCF-10A Yüzde canlılık grafiği.....	32
Tablo 4.4. Kansere hücre hatlarında NEAT1 ve miR410 ekspresyon kat değişimleri.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC.....	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
ATP.....	Adenozin trifosfat
BMI.....	Yüksek vücut kitlesi
BRCA1.....	Meme kanseri 1
BRCA2.....	Meme kanseri 2
CCND1.....	Siklin D1
cDNA.....	Komplementer DNA
CHEK2.....	Kontrol noktası kinaz 2
CRT.....	Kalretikülinin
DC.....	Dendritik hücreler
D.C.I.S.....	Duktal karsinoma in situ
DMSO.....	Dimetil sülfoksit
DNA.....	Deoksiribonükleik asit
DNR.....	Daunorubisin
DOX.....	Doksorubisin
ER.....	Östrojen reseptörü
EZH2.....	Zest homolog 2
FBS.....	Fetal Dana Serumumu
FUS.....	Sarkomda kaynaşma
HER2.....	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2
HIF-2.....	Hipoksi ile indüklenebilir faktör 2
HOTAİR.....	HOX antisens intergenik RNA
HR.....	Hormon reseptörleri
HRT.....	Hormon Replasman Tedavisi
İARC.....	Uluslararası Kanser Araştırma Derneğinin
İCD.....	İmmünojenik hücre ölümü
İC50.....	Yüzde canlılık değeri
İHC.....	İmmünohistokimya
L.C.I.S.....	Lobuler karsinoma in situ
LDHA.....	Laktat dehidrojenaz
LincRNA.....	İntergenik uzun kodlamayan RNAlar
MALAT-1.....	Metastaz-ilişkili Akciğer Adenokarsinoma1
MDR.....	Çoklu ilaç direnci
MDR-1.....	Çoklu ilaca dirençli protein-1
miRNA.....	Mikro RNA
ncRNA.....	Kodlamayan RNA
NEAT-1.....	Nükleer Zenginleştirilmiş Bol Transkript 1
ORF.....	Açık okuma çerçevesi
PBS.....	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PCA3.....	Prostat kanseri antijen 3
P-GP.....	P-glikoprotein
PiRNA.....	Piwi etkileşimli RNA
POL II.....	Polimeraz 2
PRC2.....	Polycomb baskıcı kompleks 2

PR.....	Progesteron reseptör
PTEN.....	Fosfataz ve Tensin homolog
qRT-PCR.....	Kantitatif Eş Zamanlı Pcr
siRNA.....	Kısa interferans yapan RNA
sncRNA.....	Kısa kodlamayan RNA
snRNA.....	Küçük nükleer RNA
SNP.....	Tek nükleotid polimorfizm
TF.....	Transkripsiyon faktörü
tiRNA.....	tRNA yarıları
TLS.....	Liposarkomda yer değiştirmiş
TNBC.....	Üçlü negatif meme kanseri
TP53.....	Tümör protein p53
TRF.....	tRNA'dan türetilen parçalar
UBC.....	Ürotelyal mesane kanseri
WHO.....	Dünya sağlık örgütü
XİST.....	X-inaktif spesifik transkript
ZEB-1.....	Çinko Parmak E-Box Bağlama Homeobox 1
µl.....	Mikrolit
µg.....	Mikrogram
µM.....	Mikromolar

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp ve damar hastalıklarından sonra, dünyada en çok ölüme neden olan hastalıklar listesinde yer alan kanser, çağın hastalığı olarak tanımlanan ve oldukça zorlu bir tedaviye sahip olan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2020 yılında yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser ölümü olmuştur. Her 5 erkekten 1'i, her 6 kadından 1'i hayatı boyunca kanser hastalığı ile karşılaşmakta ve her 8 erkekten 1'i, her 11 kadından 1'i kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Derneğinin (IARC) yaptığı yeni araştırmaların sonuçlarına göre, kadın meme kanseri, en sık görülen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmış (vaka oranı %11,7) (toplam kanser ölümlerinin %6,9'ü), akciğer kanseri ise ikinci sıklıkla görülen kanser (vaka oranı %11,6) (toplam kanser ölümlerinin 18%), olmuştur. 2020'de dünya çapında meme kanseri teşhisi konan 2,3 milyon kadın ve 627,000 ölüm olmuştur. 2020'nin sonu itibariyle, son 5 yılda meme kanseri teşhisi konan 7,8 milyon kadın hayatta kalmıştır. Dünyada her yıl 2 milyon, ülkemizde ise 30 bin kadın meme kanserinden etkilenmektedir. Yeni doğmuş bir kız çocuğunun hayatı boyunca meme kanserine yakalanma riski yaklaşık %12 olmaktadır. Erkeklerde ise %1 oranında görülmektedir (Web1, Web2, Web3, Sung vd, 2021).

Meme kanseri için en önemli risk, kadın olmaktır. Bunun dışında bazı faktörler bu riski daha da artırmaktadır: 50 yaş üzeri olmak, 12 yaşın altında menarş olmak, 55 yaş sonrasında menopoza girmek, hiç doğum yapmamış olmak yada 35 yaş üzeri doğum yapmak, emzirmemiş olmak, fazla kilo, alkol tüketimi ve fiziksel egzersiz eksikliği gibi yaşam tarzı faktörleri dahil olmak üzere birçok risk faktörü arz etmektedir. Radyasyon ve çeşitli kimyasalları mevcut yüksek meme kanseri insidansına bağlayan bazı durumlarda mevcuttur; Örneğin; çocukluk çağında toraks bölgesine radyoterapi almak, menopoz sonrası uzun süreli hormon tedavileri, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı ve ayrıca ailesel ve genetik faktörler meme kanseri riskini artırmaktadır. Genetik risk faktörleri arasında en sık rastlanana, BRCA 1 ve BRCA 2 mutasyonlarıdır (Feigelson, 2004; Henderson, 2010; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012; Ban vd, 2014).

Histolojik olarak, meme kanseri iki tipe ayrılmaktadır: insitu ve invaziv. Moleküler sınıflaması ise: 1. Östrojen ve progesteron hormon reseptör pozitifliği (en çok sayıda ve çeşitli olan grup), 2. HER-2 pozitifliği (en çok başarılı tedavisi olan grup), 3. Üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) (sadece kemoterapi seçenekleri olan ve hastalarda insidansı artan bir grup). Moleküler alt tipleri ise: Luminal A, Luminal B, HER2, bazal benzeri ve normal benzeri olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır. Bu alttiplerden en sık görülen ve prognozu en iyi olan Luminal A ve en az görülen ve en kötü prognozu olan bazal benzeridir (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Feng vd, 2018).

Son dönemde, RNA dünyasının meme kanserinin oluşumunda önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkmıştır. RNA tipleri arasında, uzun kodlamayan RNA'ların daha önemli ve etkili rolü olduğu bilinmektedir. Son çalışmalar, bu RNA'ların onkojenik veya tümör baskılayıcı fonksiyonu olabileceğini ve kanser gelişiminde ve ilerlemesinde etkili olduğunu göstermektedir. Kodlamayan RNA'lar uzunluklarına bağlı olarak iki guruba ayrılmaktadır: 1. kısa kodlamayan RNA'lar (sncRNA), 200nükleotidden daha kısadır ve mikroRNA'lar(miRNA) ve küçük nükleolar RNA'ları (snRNA) içermektedir. 2. Uzun kodlamayan RNA'lar (Long Non-coding RNA: lncRNA), 200 nükleotidden daha uzundur ve kodlama potansiyeli olmayan farklı RNA'ları içermektedir. İnsan genomu tarafından kodlanan 15,000 farklı lncRNA keşf edilmiştir (Deniz vd, 2017; Turgut Coşan vd, 2018).

lncRNA'lar ve Kanser genleri bazı genel biyolojik işlevlerde rol aldıkları görülmektedir. Örneğin; gelişim ve transkripsiyonel düzenlemeye katılım. Bu da kanser ve lncRNA'lar arasında önemli ilişki olduğunu göstermektedir. Çok sayıda lncRNA'ların anormal ifadelerinin ve mutasyonlarının bulunması kansere neden olabileceklerini göstermektedir. lncRNA'lar, protein kodlayan genler gibi, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak tümörjenezini etkilemektedir. Kanserle ilişkili iki önemli ve incelenmiş lncRNA, hox transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) ve MALAT1'dir (Metastaz-ilişkili Akciğer Adenokarsinoma1). Meme kanseri epitelyal hücrelerinde HOTAIR'in sistematik düzensizliğinde, gen ekspresyonunda PRC2'nin yeniden hedeflenmesine neden olur ve embriyonik fibroblastlara daha çok benzeyen yeni bir gen ifadesi kalıbı oluşturmaktadır (Gupta vd, 2010; Cogill vd, 2014; Zhang vd, 2014; Arun vd, 2018).

Kemoterapinin asıl amacı, kemoterapötik ajanlar kullanarak, kanser hücrelerini öldürmesidir. Sitotoksik anti-neoplastik ajanlar bu tedavinin başrolündedir. Ama kemoterapinin başarısının en büyük engeli olan, çoklu ilaç direnci (MDR), kanser hastalarının yaklaşık %90'ında kanser tedavisinde başarısızlığa neden olmaktadır. MDR, kemoterapötik ilaçları kullanılmadan önce kanser hücrelerinde doğal olarak mevcut olabilir ve direnci yavru hücrelere kalıtılabilir, yada kemoterapi ilaçlarına maruz kaldıktan sonrada edinilebilir (Mian vd, 2016; Liu vd, 2020; Barth vd, 2020).

Doksorubisin bir antrasiklin türevidir, en güçlü kemoterapötik ilaçlardan biri olarak meme kanseri için en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Doksorubisin, bazı durumlarda tedavi sağlarken, kullanımının sınırlamaları vardır; bunlardan biri ilaca direnç, diğeri ise kanserli olmayan hücreler üzerindeki toksisitesidir. Doksorubisinin etkinliği, P-glikoprotein (Pgp) nedeni ile sınırlıdır. Pgp, doksorubisinin hücre içi birikimini ve ilacın pleiotropik sitotoksik etkilerini ortaya çıkarma yeteneğini sınırlamaktadır. Yüksek bir ifadenin yanı sıra, yüksek bir Pgp aktivitesi de doksorubisin direncini belirlemektedir (Carvalho vd, 2009; Thorn vd, 2011; Alrushaid vd, 2017).

1.1. Amaç

Çoklu ilaç dirençliliği mekanizmalarının belirlenmesi, kişiye bağlı kemoterapi yöntemlerinin geliştirilerek kanser kemoterapisinde başarının artırılması açısından önem taşımaktadır.

Son 10 yılda, kodlamayan RNA'lar, özellikle lncRNA'ların, kanser hücrelerinde karsinogeneze ve ilaç direncine aracılık edebileceği bildirilmiştir (Liu vd, 2020; Barth vd, 2020; Guo vd, 2018).

Bu çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB231 hücre hatlarında, lncRNA NEAT1 ve miR-410-3p ekspresyon seviyelerini, meme kanseri tedavisinde sıkça kullanılan doksorubisin direnci ile ilişkisinin araştırılmasını amaçladık.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Meme Kanseri

Dünya'da kadınlarda görülen tüm kanserler arasında $\frac{1}{4}$ oranı ile meme kanseri ilk sırada; hatta kadın ve erkek birlikte değerlendirildiğinde ise; meme kanseri akciğer kanserini geride bırakmakta ve birinci sırada yer almaktadır. Kanserden ölüm nedenleri arasında ise, beşinci sırada olduğu görülmektedir (Espie vd, 2013; Youlden vd, 2012).

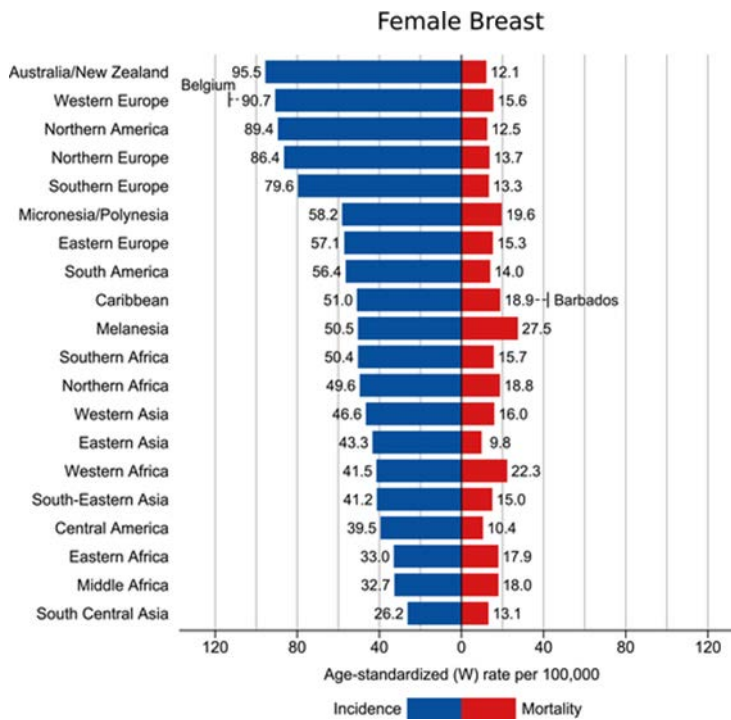
2.1.1. Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadın kanserlerinin %25'ini, kadınların kanserden ölümlerinin ise %15'ini teşkil etmektedir. WHO verilerine göre, 2020 de dünyada yaklaşık yeni tanı konulan hasta sayısı 2,3 milyon ve mortalitesi ise 627 bin olduğu belirtilmektedir. Kanser dünyanın herhangi bir yerinde var olmasına rağmen, insidansı, mortalitesi ve sağkalım oranları dünyanın farklı bölgelerinde önemli ölçüde farklılık göstermektedir ve bu durum nüfus yapısı, yaşam tarzı, genetik faktörler ve çevre gibi birçok faktöre bağlı olmaktadır (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019; Sung vd, 2021).

Gelişmiş ülkelerde her 8 kadından biri hayatı boyunca meme kanseri riski ile karşılaşmaktadır. Ama görülme sıklığındaki artışa rağmen, mortalitede azalma dikkat çekmektedir. Bunun aksine gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri sıklığındaki artış mortalitedeki artış ile birlikte. Orta Afrika ve Doğu Asya'da 100.000'de 27'den, Kuzey Amerika'da 100.000'de 92'ye kadar değişmektedir. Meme kanserine rastlanma oranının 2050 yılında 3.2 milyona ulaşması tahmin edilmektedir (Hortobagyi, 2005; Ferlay vd, 2012; Desantis vd, 2014;).

Türkiye 2017 kanser verileri; dünya, Batı Asya, Orta ve Doğu Avrupa ve ABD'de en son kanser verileri olan 2020 yılı GLOBOCAN verileri ile karşılaştırıldığında; Türkiye kanser insidansı dünya insidansının bir miktar üzerinde seyretmektedir. 2017 yılında yaşa standardize kanser hızı erkeklerde 259,2/100,000 kadınlarda ise 187,0/100,000 dir. Toplamda kanser insidansı 223,1/100,000 dir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2018

yılında kadınlarda meme kanseri sıklığı 45.6/100.000 kadardır. Meme kanseri evreleri incelendiğinde vakaların %11'i ileri evre olmaktadır (Web5).



Şekil 1.1. 2020'de Kadın Meme Kanseri İçin Bölgeye Özgü İnsidans ve Mortalite (Sung vd, 2021).

2.1.2. Etiyoloji

Meme kanserinin etiyojisi tam olarak anlaşılammakla birlikte, multifaktöriyeldir ve başlıca genetik, epigenetik ve endokrin faktörler yer almaktadır ve bir çoğu değiştirilemeyen faktörlerdir. Ayrıca çevresel faktörlerde, obezite, sigara ve alkol kullanımı vb faktörlerinde kanser gelişiminde rol aldığı bilinmektedir (Şekil 2.1.).

2.1.2.1. Çevresel faktörler

Çevresel faktörlerin meme kanseri insidansının büyük bir bölümünü açıkladığına inanılmaktadır. ABD'de bilinen çevresel faktörler, genelde %60-70'lik oranda ve meme kanserinin sadece %25-47'sini açıklamaktadır. Ayrıca 1% de tanısız radyografiye atfedilmektedir (Şen ve Aygin, 2014).

Çevresel kimyasallar, viral enfeksiyonlar, radyasyon ve elektromanyetik alanlar meme kanserinin etiyojisinde bilinen çevresel faktörlerinde yer almaktadır. Çevresel kimyasallar; DNA'da hasar oluşturarak, tümör gelişimini tetikler veya meme bezinin

gelişimini değiştirmekle duyarlılığını artırır, bu şekilde meme kanserinin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Etiyolojisi açısından, meme kanserinde en çok ilgi çeken çevresel kimyasallar, östrojen takliti yapanlardır (östrojenik). Örneğin, kadmiyum, hatta çok az dozlarda, östrojene duyarlı meme kanseri hücre dizilerinde östradiyolün etkilerini taklit eden çevresel bir faktör olduğu düşünülmektedir (Brody vd, 2003; Coyle, 2004).

Meme kanseri için iyi bilinen bir çevresel risk faktörü, medikal prosedürler de dahil olmak üzere, iyonize radyasyon maruziyetinde kalmaktır. Radyasyon maruziyetinde kalmakta, yaşın önemli bir rolü bilinmektedir. 20 yaşın altında radyasyona maruz kalmak (örneğin Hodgkin hastalığı tedavisi nedeniyle), meme kanserinin riskini daha fazla artırmaktadır. Ayrıca, göğüs bölgesine düşük dozda uygulanan radyografi veya mamografinin de meme kanseri riskin arttığını bilinmektedir (Brenner vd, 2003; Ma vd, 2008).

2.1.2.2. Sigara

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın değerlendirmelerine göre; sigara dumanında, deney hayvanlar için kanserojen olduğu ispatlanmış 60'tan fazla madde bulunmaktadır. Aktif sigara kullanan kadınların meme dokularında, DNA hasarları ve P-53 gen mutasyonlarının, sigara içmeyen kadınlara göre daha yüksek olduğunu bildiren çok sayıda çalışma vardır. Sigara içmek, özellikle ergenlik döneminde veya menarş öncesi yaşlarda başlayan kadınlar arasında orta düzeyde, ancak önemli ölçüde meme kanseri riskini artırmaktadır. Ayrıca ailesinde hastalık öyküsü olan kadınlarda sigara içmeye bağlı meme kanseri riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Perera vd, 1995; Li vd, 2002; Şen ve Aygin, 2014).

2.1.2.3. Alkol

Alkolün meme kanseri için en tutarlı diyet risk faktörü olduğu bilinmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından, alkol meme kanseri riskiyle ilişkili olarak kabul edilmektedir. Alkol kullanımı, hem menopoz öncesi hem de sonrası, östradiyol seviyesinde ve meme yapısının yoğunluğunda artış yapmakla, meme kanseri riski ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, alkol kullanımının büyük ölçüde östrojen reseptör pozitif (ER+) ve östrojen reseptör negatif (ER-) meme kanseri riski ile pozitif ilişkili olduğu saptanmaktadır. Yetişkin kadınların günlük tükettiği her 10 g (~1 bardak) alkol, meme kanserin riskini %7-10 artırmaktadır. Diğer organlarla kıyaslandığında, meme, alkolün kanserojen etkilerine daha duyarlı görülmektedir. Hatta hafif alkol tüketimi (≤ 1 içecek/gün

veya ≤ 12.5 g/gün), meme kanseri riski %4-15 oranında önemli ölçüde artmaktadır (Liu vd, 2015; Jung vd, 2016; Lofterod vd, 2020; Freudenheim, 2020).

2.1.2.4. Beslenme

Son yıllarda diyet faktörleri ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Mevcut literatürdeki genel kanıtların tutarsız ve sonuçsuz olması nedeniyle, meme kanseri etiyolojisinde diyetin potansiyel rolü belirsizliğini korumaktadır. Bazı çalışmalarda ise genel olarak yağdan zengin ve şeker oranı fazla gıdalar ve özellikle kızarmış yiyecekler ile meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Ayda bir kereden fazla kızarmış yiyeceklerin tüketimi, meme kanserin riskini %4,5 arttırmaktadır. Sebze, meyve ve balıktan zengin diyetlerin antikanserojenik etkileri oldukları düşünüldüğü için ve fitokimyasal içeriği nedeniyle meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (Lof vd, 2009; Edefont vd, 2009; Marzbani vd, 2019; Heath vd, 2020).

2.1.2.5. Obezite

Obezite, meme kanseri ilerlemesi için en önemli risk faktörlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Obezitenin meme kanseri riski üzerindeki etkisi yaşam evresine göre değişmektedir. Menopoz öncesi yüksek vücut kitle indeksi (BMI) meme kanseri riski ile ters orantılıyken, menopoz sonrası yıllarda risk ile pozitif ilişkilidir (Schoemaker vd, 2020). Premenopozal kadınlarda obezite, daha düşük ER pozitif meme kanseri riski ve daha yüksek üçlü negatif meme kanseri (TNBC) riski ile ilişkilidir. Postmenopozal kadınlarda ise obezite, belirgin şekilde daha yüksek ER pozitif meme kanseri riski ve mortalitesi ile ilişkilidir. Prospektif gözlemsel çalışmalardan oluşan bir meta-analizde ise, BMI'deki her 5 kg/m²'lik artışın postmenopozal meme kanseri riskinde %12 artışa neden olduğu bildirilmiştir (Renehan vd, 2008; Picon-Ruiz vd, 2017; Kasiappan vd, 2017; Schoemaker vd, 2020).

2.1.2.6. Hormon replasman tedavisi

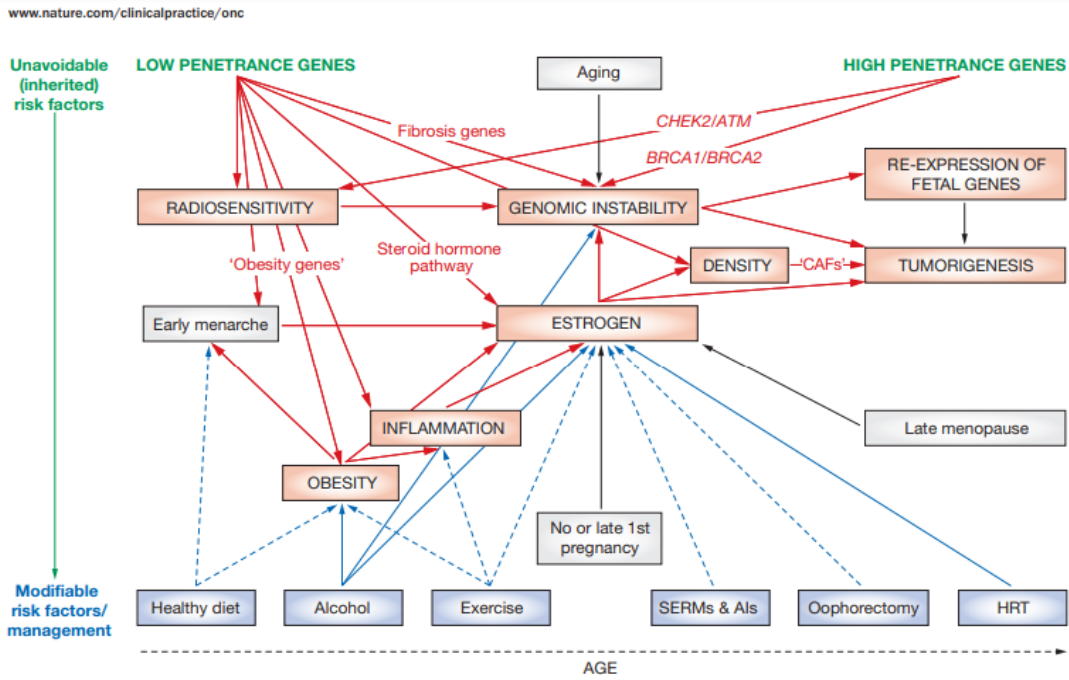
Hormon Replasman Tedavisi (HRT) genellikle ciddi menopozal semptomlarını hafifletmek için kullanılmaktadır. Ayrıca osteoporoz ve diğer kronik bazı sorunlarda olumlu katkısı olduğu için kullanılmaktadır. Ama bu etkilerine rağmen, uzun süre kullanımında meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir (Azam vd, 2018). Sadece östrojen içeren tedavi ve kombine östrojen ve progesteron tedavisinin, uzun süreli

kullanımı ile meme kanseri risklerinin arttığı bilinmektedir (Marjoribanks vd, 2017; Azam vd, 2018; Vinogradova vd, 2020).

2.1.2.7. Aile öyküsü ve genetik yatkınlık

Aile öyküsü meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden birisidir. Meme kanserinin yaklaşık %10-30'u ailesel kümelenme gösterir, ancak vakaların yalnızca %5-10'unun kalıtsal olduğu tahmin edilmektedir. Birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü olan kadınlarda, aile öyküsü olmayan bireylerle karşılaştırıldığında iki kat daha fazla meme kanseri görülmektedir. Ayrıca, birden fazla birey bulunması halinde, meme kanseri 3-4 kat daha fazla olarak görülmektedir (Gage vd, 2012; Angeli vd, 2020; Coignard vd, 2021).

Meme kanserinin otozomal dominant kalıtım yoluyla geçiş yapabildiği ilk defa 1988 yılında bildirilmiş olup, hastaların %5-10'unda patolojik gen saptanmaktadır. Günümüzde kalıtsal meme kanseri ile ilişkili çok sayıda gen tanımlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, meme ve yumurtalık kanserinde çok önemli bir risk faktörü olarak bilinmektedir (meme kanserinin riskinin yaklaşık %15-20'si). Ayrıca yeni çalışmalarda, meme ve yumurtalık kanseri yatkınlıkla ilgili birçok yeni gen tanımlanmıştır. TP53/P53; tamir yolağındaki genler, PTEN, Fosfataz ve Tensin homolog geni ve kontrol noktası kinaz 2 (CHEK2) geni daha düşük risk faktörü olarak tanımlanmıştır (%5) (Newman vd, 1988; Hamdi vd, 2016; Angeli vd, 2020; Coignard vd, 2021).



Şekil 2.1. Meme kanseri ile ilişkili risk faktörlerine genel bakış (Howell vd, 2014).

2.2. Meme Kanseri Evrelendirmesi

1977'den beri Meme kanserli hastaların olası prognozunu tahmin etmek için temel araç, derecelendirmeyi, immünohistokimya biyobelirteçlerini ve hastalığın anatomik ilerlemesini içeren ve uluslararası kabul görmüş, Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) evreleme sistemidir. Bu sistemde, Primer tümör boyutu (T), lenf nodu durumu (N) ve metastazların varlığına/yokluğuna (M) dayalı bilgiler kullanılır. TNM evrelemesi klinikte en yaygın kullanılan sistemdir (Vuong vd, 2014; Ding vd, 2019; Łukasiewicz vd, 2021).

Ayrıca bu sistem, sayısal aşamalarada ayrılır: (Tablo 2.1)

Özetle:

T. Tümör size

TX : Primer tümör değerlendirilemedi.

T0 : Tümör kanıtı yok.

T1 : Tümör çapı 2 cm veya daha az.

T2 : Tümör çapı 2 ile 5 cm arasında.

T3 : Tümör çapı 5 cm'den fazla.

T4 : Tümör her boyutta, göğüs duvarına yapışmış ve pektoral (göğüs) lenf bezlerine yayılmış.

N. Hissedilebilir nodlar

NX : Lenf nodları değerlendirilemez (lenf nodları önceden alınmış vs.).

N0 : Kanser lenf bezlerine yayılmamış.

N1 : Kanser hareketli ipsilateral aksiller lenf nodlarına yayılmıştır (meme kanserinin aynı tarafındaki koltuk altı lenf nodları).

N2 : Kanser ipsilaterale (göğüs kanseri ile vücudun aynı tarafına) yayılmış lenf düğümlerine veya kol altındaki diğer yapılara fikse.

N3 : Kanser ipsilateral meme lenf nodlarına veya ipsilaterale (vücudun meme kanseri ile aynı tarafı) supraklaviküler lenf nodlarına yayılmıştır.

M. Metastaz

MX : Uzak metastaz varlığı değerlendirilemedi.

M0 : Diğer organlara uzak metastaz yok.

M1 : Diğer organlara uzak metastaz var (Web 4)

Tablo 2.1. Meme kanseri evre grupları (www.imaginis.com/breasthealth/staging.asp.)

Evre	Tümör (T)	Nod (N)	Metastaz (M)
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Evre IIIB	T4	Herhangi bir N	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

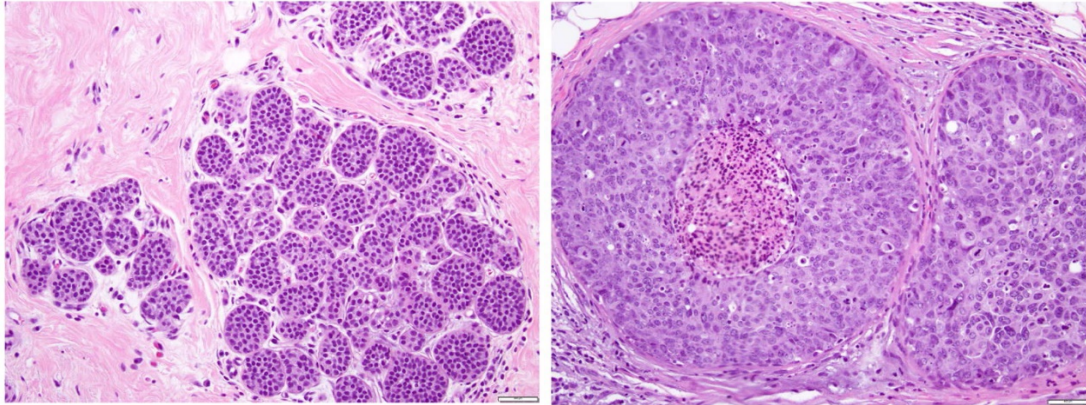
2.3. Meme Kanseri Tipleri

Meme kanseri, mikroskopik görünüm ve biyolojik davranışlarına göre, iki ana gruba ayrılmaktadır; in situ ve invaziv.

2.3.1. İn situ

İn situ meme kanserinde, tümör hücreleri duktus veya lobüle sınırlı olup ışık mikroskopunda stromaya invazyon görülmez. İn situ meme kanseri iki gruba ayrılmaktadır: duktal karsinoma in situ (DCİS) (Evre 0 meme karsinomu olarak da bilinen) ve lobüler karsinoma in situ (LCİS). DCİS ile kanser hücreleri, memedeki süt kanallarıyla sınırlıdır ve yağlı meme dokusuna veya vücudun herhangi bir yerine (lenf düğümleri gibi) yayılmamaktadır. Ayrıca tümör hücreleri, duktus veya lobüle sınırlı olduğu için, ışık mikroskopunda stromaya invazyon görülmemektedir (Rosen ve Maia, 1998; Mukama vd, 2020).

LCİS, lobülün en iç tabakası olan epitelde başlamış ancak lobülün dışına (bazal membran) çıkmamıştır. İnvaziv meme karsinomunun hem bir risk faktörü hem de zorunlu olmayan bir öncüsü olmaktadır. LCİS tanısından sonra, meme invaziv karsinom riski, genel popülasyonuna kıyasla, 9-10 kat artmaktadır (Fabbri vd, 2008; Wen ve Brogi, 2018).



A

B

Şekil 2.2. A. Lobüler karsinoma in situ (LCİS). B. Duktal karsinom in situ (DCİS) (Wen ve Brogi, 2018).

2.3.2. İnvaziv

Meme kanserlerin, 50%-80%'i invaziv tiplerdir. İnvaziv meme kanser hücreleri, kanal ve lobüler duvarı geçerek memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularına yayılmaktadır. Hücre morfolojisi, büyümesi ve yapısal desenin temeline göre, meme kanserinde yaklaşık 21 tane histolojik alt tipi ve en az 4 farklı moleküler alt tipi bulunmaktadır (Sharma vd, 2010; Dieci vd, 2014).

Mikrodizi tabanlı çalışmalar sayesinde, gen ekspresyon profiline dayalı, meme kanserinin moleküler alt tipleri daha iyi anlaşılabilir. Meme kanserinin 4 moleküler alt tipi; hormon reseptörleri (HR+/HR-) varlığı/yokluğuna ve HER2 seviyesine ve/veya HER2 geninin ekstra kopyasını içeren bazal benzeri, normal benzeri ve luminal (Fragomeni vd, 2018; Xia vd, 2019).

Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve dağılımları aşağıdaki şekildedir:

Luminal A: 70% oranla en yaygın ve en iyi prognoza sahip olan tiptir. Bu alt tipde, östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, HER2 negatiftir ve Ki-67 düşük seviyeye sahip olmaktadır. Diğer alt tiplere göre yavaş büyürler ve tedavi olarak anti-hormon tedaviyi içermektedirler (Kimberly ve Allison, 2012; Feng vd, 2018).

Luminal B: Tüm meme kanserlerin < %20 oluşturmaktadır. Bu alt tipte de luminal A gibi, ER ve/veya PR pozitif ama HER2 pozitif veya negatif olabilir, ayrıca Ki-67 seviyeside yüksektir. Luminal A kanserlerine kıyasla biraz daha hızlı büyür ve prognozları biraz daha kötü prognoza sahip olmaktadır (Kimberly ve Allison, 2012; Feng vd, 2018).

Üçlü negatif/bazal benzeri meme kanseri (TNBC): Tüm meme kanserlerinin %20'sini oluşturmaktadır. Bu alt tipte ER, PR ve HER2 negatiftir ve bu nedenle hedefe yönelik veya anti-hormon tedavisine yanıt vermez o yüzden sitotoksik ilaçlar TNBC tedavisi için tek seçenek olmaktadır. TNBC meme kanseri, BRCA1 geninde mutasyon olan kadınlar, 40 yaşından küçük kadınlar ve Afrikalı-Amerikalı kadınlar arasında daha çok yaygındır. Bununla birlikte, tüm TNBC'lerin bazal benzeri meme kanseri olduğu bilinmemektedir (%70-80'ni bazal benzeri) ve bunun tersi de geçerli olmaktadır. TNBC genellikle diğer meme kanseri türlerinden daha kötü ve kısa bir prognoza sahip olmaktadır. (Prat vd, 2010; Feng vd, 2018; Dass vd, 2021).

HER2 ile zenginleştirilmiş: %10-15 oranında gözlenmektedir. Bu alt tipte, ER ve PR negatif ancak HER2 pozitifdir. Diğer alt tiplerine göre, daha hızlı büyüme ve daha kötü prognoza sahip olduğu bilinmektedir. Genellikle Trastuzumab ile başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir (Feng vd, 2018; Dass vd, 2021).

2.4. Kodlamayan RNA'lar

İnsan genomunun dizilimi, genlerimizin yalnızca yaklaşık %2'sinin nihai olarak proteinleri kodladığını gösterdi ve bilim camiasındaki pek çok kişi, kalan %98'in basitçe işlevsel olmayan "çöp" olduğuna inanmaktaydı. Ancak ENCODE projesi, genomun protein kodlamayan kısmının binlerce RNA molekülüne eksprese olduğunu ortaya çıkardı. Son zamanlara kadar, genomun geri kalanı önemsiz olduğu düşünülmekteydi. Ancak küçük RNA'ların keşfinden sonra, bu düşünce değersiz kalmıştır (Cabili vd, 2011; Slack ve Chinnaiyan, 2019).

RNA'lar, protein kodlayan yada kodlamayan (ncRNA) olarak, iki geniş sınıfa ayrılmaktadırlar. Kodlamayan RNA'lar, insan hücrelerindeki RNA transkriptlerinin en az 80.000 ve muhtemelen daha fazlasını içermektedir. Kodlamayan RNA'lar, diğer kodlamayan veya kodlayan RNA'lar üzerinde hareket eden ve nihayetinde insan hücresindeki çoğu biyolojik süreci düzenleyen, hala büyüyen, heterojen bir gen grubudur (Sponer vd, 2018; Crudele vd, 2020).

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA) boyutlarına göre, iki ana gruba ayrılmaktadırlar:

1. Kısa kodlamayan RNA'lar (sncRNA); 200 nükleotidden kısa ve 30 bp'den azdır ve mikroRNA'ları (miRNA), kısa interferans yapan RNA'lar (siRNA), piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA), tRNA'dan türetilen parçalar (tRF'ler) ve tRNA yarılarını (tiRNA'lar) içermektedir.
2. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA); 200 nükleotidden fazla ve bazen 10 kb kadar uzundur (Romano vd, 2020).

2.4.1. Uzun kodlamayan RNA'lar

LncRNA'lar, mRNA'lara benzer bir yapıya sahipler. Onlar gibi, RNA polimeraz II (Pol II) tarafından eklenme, kep ucu eklenme, poliadenile olma ve ekspresyon işlemleri yapılmaktadır ama açık okuma çerçeveleri (ORF) eksik olmaktadır. 1989 da, H19, ilk memeli lncRNA'sı olarak keşf edilmiştir. Bundan kısa bir süre sonra, antisense of IGF2R non-protein coding RNA (AIRN) ve X kromozomun inaktivasyonunda önemli rolü olan, Xist lncRNA tespit edilmiştir (Brannan vd, 1990; Andergassen ve Rinn, 2021).

LncRNA'lar, 1990'larda mRNA transkriptlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi araştırılırken keşf edildi. Önceden transkripsiyonun yan ürünlerinden oldukları düşünülüyordu. İşlevleri ise, hücre içi lokalizasyonuna bağlıdır; spesifik olarak DNA, RNA ve proteinlerle etkileşime girerler ve kromatin fonksiyonunu değiştirirler, çeşitli aşamalarda transkripsiyonu düzenlerler, nükleer yoğunlaştırma cisimleri ve nükleolar organizasyon oluştururlar. LncRNA'lar ayrıca sitoplazmik mRNA'ların stabilitesini ve translasyonunu değiştirebilir ve sinyal yollarını engelleyebilmektedir. Böylece, lncRNA'lar

fizyopatolojik durumları etkiler ve çeşitli bozuklukların, bağışıklık tepkilerinin ve kanserin gelişmesine yol açmaktadır. Ayrıca lncRNA'ların kanser dahil olmak üzere, bir çok hastalık patogeneğinde yer aldığı kabul edilmektedir. lncRNA'lar genomdaki konumlarına göre, 6 alttıpe ayrılmaktadır: sense lncRNA, antisense lncRNA, iki yönlü lncRNA, intron lncRNA, intergenic lncRNA, and enhancer lncRNA (Hu vd, 2018; Chi vd, 2019; Singh 2021).

2.4.2. Uzun kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması

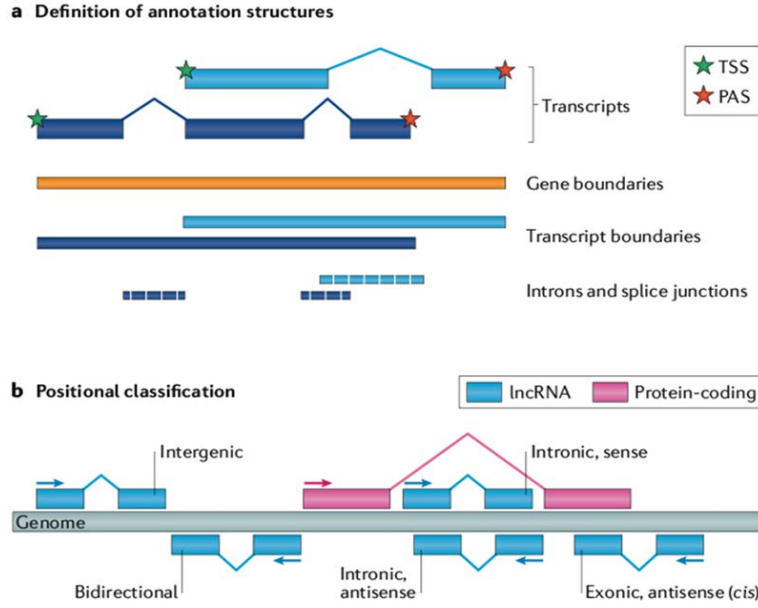
lncRNA'lar, genomik yapılarına ve gendeki konumlarına göre bir kaç farklı tipte sınıflandırılabilir:

Örtüşen lncRNA'lar; bu tip lncRNA'lar tamamen yada kısmen kodlayan genlerle örtüşmektedirler. lncRNA'ların yaklaşık %20'sini bu gruptan oluştuğu tahmin edilmektedir.

Dört ana kategoride incelenebilir:

- Sense lncRNA: bir genin bir veya daha fazla eksonu ile örtüşür ve aynı yönde eksprese olurlar.
- Antisense lncRNA: bir genin bir yada daha fazla eksonu ile örtüşür ve zıt yönde eksprese olurlar.
- Intronic lncRNA: protein kodlayan genlerin intronlarında bulunur ve eksprese olur.
- Enhancer lncRNA: transkripsiyon faktörleri (TF'ler) tarafından sınırlanan ve gen ekspresyonunu artırmak için promotör ile etkileşime geçebilen genomik bölgelerdir.
- Örtüşmeyen lncRNA'lar; iki ana kategoriye ayrılabilir:
- İki yönlü lncRNA: protein kodlayan genlerin yakınında ama karşıt DNA ipliğinde bulunurlar.
- Intergenic ncRNAs (lincRNAs): iki farklı protein kodlayan genin arasındaki bir genomik diziden türev almıştır.

lncRNA'larının çoğunun, antisense ve intergenik RNA'lardan oluştuğu bildirilmektedir (Şekil 2.3.) (Kim vd, 2015; Hou vd, 2019; Yousefi vd, 2020).



Şekil 2.3. LncRNA'lar, genomik yapılarına ve gendeki konumlarına göre sınıflandırmaları. **A.** Bir gen sınırı içinde, transkriptlerinin eksonları veya intronları tarafından örtüşen birden fazla lncRNA olabilir. **B.** LncRNA'lar, en yakın konumunda bulunan protein kodlayan genlere göre sınıflandırılır (Usczyńska-Ratajczak , 2018).

2.4.2. LncRNA'ların lokalizasyonu

LncRNA'ların çoğu çekirdekte ve bazıları ise sitoplazmada lokalize olduğu bilinmektedir. Ayrıca bazı lncRNA'lar eksozom yoluyla komşu hücrelere yada seruma geçebilmektedir (Chi vd, 2019).

2.4.3. Kanserde uzun kodlamayan RNA'lar

LncRNA'ların, hücresel süreçlerde ve genomdaki ekspresyonların düzenlenmesinde önemli rolleri bilinmektedir. Onların çoğu, hastalığın başlangıcında ve gelişimindeki düzensizliği, metabolizma, hücre ölümü, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkili genlerin regülasyonunu etkilemektedir. LncRNA'ların işlevlerinin araştırmasının sonucunda, kanser ile ilişkili rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. Son yıllarda kanserin biyolojik süreçlerinde rol alan çok sayıda lncRNA tesbit edilmiştir. LncRNA'ların mutasyonlarının, disregülasyonlarının, anormal ifadelerinin ve promotörlerinin hipometilasyonunun kansere yol açabileceğini düşündürmektedir. Farklı kanser türlerinde genom çapındaki çalışmalar sayesinde, kanserle ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) %80'den fazlasının genomun kodlamayan bölgelerinde, yani intergenik veya intronik bölgelerde bulunduğu ve buradaki kodlamayan dizilerin karsinogenezde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Hindorff vd, 2009; Cerik vd, 2016; Hu vd. 2018; Yousefi vd, 2020).

LncRNA'ların anormal ekspresyonu, tümörjenez ile ilişkilidir. Kanserde lncRNA'ların düzensiz ekspresyonu, hastalık ilerlemesine işaret eder ve hasta sonuçları için, bağımsız bir öngörücü olarak hizmet edebilir. Mekanik olarak, bugüne kadar iyi karakterize edilmiş lncRNA'ların çoğu, gen ekspresyonu düzenlemesinde, transkripsiyon sonrası düzenlemeden ziyade tipik olarak transkripsiyoneldir. Bu, genomik olarak lokal (cis-regülasyon) veya uzak (trans-regülasyon) genleri hedefleyerek gerçekleşmektedir. Böylece bazı lncRNA'lar onkogenik olarak ve bazıları tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Onkogenik lncRNA'lar, tümörjenez ile ilişkilidir ve kanser gelişimini ve ilerlemesini destekler. Tümör baskılayıcı lncRNA'lar ise, hücre ölümünü ve apoptozu teşvik etmektedir. Ayrıca transkripsiyon faktörlerine ya da represörlerine bağlanarak aktivasyona ya da gen susturmaya sebep olabilmektedir. Bunun yanı sıra, sinyal molekülleri olarak etki edebilir ya da protein kompleksleri ve kofaktörlerin bağlanması için yönlendirilmiş merkezi bir iskele olarak da işlev görebilir. Bunlara ek olarak, lncRNA'lar miRNA'lara bağlanır ve onların hücrede gen ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkilerini inhibe etmektedir. Ayrıca lncRNA'lar, farklı mekanizmalar kullanarak, mikroRNA'ları ve diğer sinyal yollarını, metastaz ve hücre döngüsü ilerlemesinde teşvik etmektedir (Prensner ve Chinnaiyan, 2011; Cerik vd, 2016; Yousefi vd, 2020; Yurtsever ve Tiftik, 2021).

2.4.4. Meme kanserinde uzun kodlamayan RNA'lar

Kanserle ilişkili ilk tanımlanan ve iyi çalışılmış lncRNA'lar, HOX antisens intergenik RNA (HOTAIR), H19, XIST, prostat kanseri antijen 3 (PCA3) ve metastazla ilişkili akciğer adenokarsinom transkript 1 (MALAT1)'dir. H19, 2.3 kb'lik intergenik ve anne tarafından eksprese edilen, kromozom 11p15.5 üzerinde yer alan bir lncRNA'dır. H19 ilk olarak ER+ meme tümörlerinde ve hücre dizilerinde yüksek oranda eksprese edilen, fetal lncRNA olarak tanımlandı. H19, meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu teşvik eder ve apoptozu azaltır, bu şekilde kendi rolünü tümörjenez ve tümör büyümesinde belirlemektedir. Ayrıca H19, farklı mekanizmalar yoluyla bir onkogen olarak çalışır. Meme kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde tümör oluşumunu güçlendirmek için Myc tarafından yukarı regüle edilmiş bir gen olarak da işlev görebilir. H19'un, let-7 miRNA ailesinin üyelerini düzenlemek için moleküler bir sünger görevi gördüğü bildirilmiştir (Cerik vd, 2016; Hu vd, 2018; Chi vd, 2019).

X-inaktif spesifik transkript (XIST), X kromozomunun uzun kolunda bulunur ve RNA'sı 17 Kb uzunluğundadır. Xist, dişi somatik hücrelerde X kromozomu inaktivasyonunun başlatılmasından ve yayılmasından sorumludur. XIST, XCI lokuslarından eksprese olur ve PRC2'nin yüklenmesini kolaylaştırmak ve DNA

metilasyonunu ve ardından kromozom çapında susturmayı başlatmak için, YY1 transkripsiyon faktörü ve aynı lokustan diğer birkaç lncRNA ile uyum içinde hareket etmektedir. XIST meme tümörü örneklerinde ve diğer kanser hücre dizilerinde, tümör baskılayıcı ve aşağı regüle edilmiş bir lncRNA olarak işlev almaktadır. XIST, miR-155'in doğrudan hedeflenmesi yoluyla meme kanseri invazyonunu baskılamaktadır (Sun ve Kraus, 2015; Hu vd, 2018; Yousefi vd, 2020).

MALAT1, kromozom 11q13 üzerinde yer alan, 8.7 kb'lık ve normal dokularda en fazla eksprese edilen lncRNA'lardan birisidir. MALAT1, gen ekspresyonunun ve transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynamaktadır. MALAT1'in, aşırı ekspresyonu meme karsinomları ile ilişkilidir ve meme kanserinde, özellikle ER+ ve HER2+ tümörlerinde önemli ölçüde yukarı regüle edilmektedir. MALAT1 meme hücresi çoğalması, göçü ve invazivi için gereklidir. Bu nedenle, MALAT1'in yıkılması, tümör büyümesi ve metastazda bir azalma ile sonuçlanmaktadır (Hu vd, 2018; Chi vd, 2019).

2007 yılında HOXC lokusunda 12q13.13 kromozomu üzerinde yer alan HOX antisense transcript intergenic RNA'sı (HOTAIR) tanımlanmıştır. 2,2 kb uzunluğunda ve bir onkogen olarak kabul edilen trans-etkili, eklenmiş ve poliadenile edilmiş bir lncRNA'dır. HOTAIR çoğu insan kanserinde aşırı eksprese edilir ve tümör invazyonu, ilerlemesi, metastazı ve kötü prognozu ile ilişkilidir. HOTAIR, metastatik meme karsinomlarında aşırı eksprese edilir ve histon metilasyon durumunu ve kromatin modifikasyonunu düzenlediği bilinen PRC2 ve LSD1'in alımı için bir iskele olarak tanımlanmaktadır. HOTAIR, PRC2'yi kullanarak ve epigenetik modifikasyonları teşvik ederek metastazı ve invazivasyonu destekleyen onkojenik bir lncRNA'dır (Cerk vd, 2016; Yousefi vd, 2020).

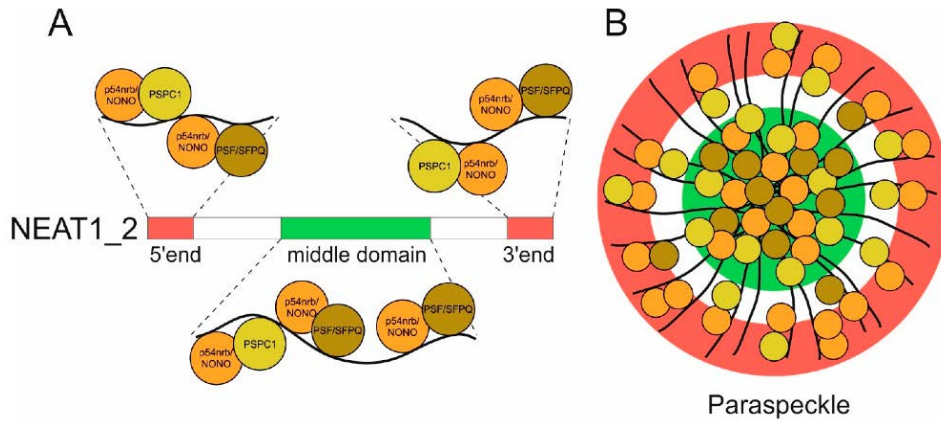
2.4.5. Nuclear enriched abundant transcript 1 (NEAT-1)

NEAT1, kromozom 11q13.1 üzerindeki ailesel tümör sendromu çoklu endokrin neoplazisi (MEN) tip 1 lokusundan eksprese edilmektedir. NEAT1_1 (3.7 kb) ve NEAT1_2 (23 kb) olarak adlandırılan iki transkripsiyon varyantına sahiptir. NEAT1_2, RNA ve proteinlerin ayırım yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen, ribonükleoprotein gövdelerinin oluşumu için gereklidir. NEAT1_1, parabeneklerde daha boldur, aynı zamanda, parabenek bağımsız fonksiyonlarda NEAT1_1'i gösteren çekirdekteki parabenek olmayan odaklarda da bulunmaktadır. Her ikisi de nükleer parabeneklerde bulunur ve parabeneklerin önemli bir yapısını oluşturmaktadır (şekil, 2.4). NEAT1, çekirdekte daha fazladır, ancak sitoplazmada da bulunmaktadır (Bond ve Fox, 2009; Heesch vd, 2014; Dong vd, 2018).

Yapılan bir çalışmada NEAT1'i olmayan farelerin, normal gelişmediği gözlenmiştir, bu da NEAT1'in normal embriyonik gelişim ve yetişkin yaşamı için gerekli

olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, başka bir çalışmada, NEAT1'in susturulması anormal meme bezi morfogenezi ve laktasyon hataları ile sonuçlandığı bilinmiştir (Nakagawa vd, 2011; Standaert vd, 2014).

NEAT1 tümörün başlamasından ve ilerlemesinden sorumludur ve kanserlerdeki sık düzensizliği, metastaz, nüks oranı ve hasta sağ kalımı gibi klinik özelliklerle ilişkili olmaktadır. Bu yüzden, meme tümörlerinde, endometriyal karsinomda ve insan osteosarkom hücrelerinde bir onkogen olduğu rapor edilmektedir. NEAT1'in aşırı ekspresyonu, meme kanserinde tümör boyutu ve metastazı ile ilişkili olmaktadır. NEAT1_2, (HER2+) meme kanserlerinde yüksek oranda ifade edilirken, NEAT1_1, (ER+) alt tiplerinde daha yüksek oranda ifade edilmektedir. NEAT1'in ekspresyonunun inhibisyonu, metastazı azaltmaktadır. Mekanik olarak, β -katenin ve N-kadherin ekspresyonu, NEAT1 supresyonunun bir sonucu olarak azalırken, E-cadherin ekspresyonu artmaktadır. Ayrıca, NEAT1'in susturulması kök hücre popülasyonunu azaltır ve TNBC hücrelerinde TNBC hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını artırır (Shin vd, 2019; Yousefi vd, 2020; Edwards ve French, 2020).



Şekil.2.4. NEAT1'in etki alanı mimarisi ve şematik parabenek yapısı(Lin vd, 2018).

2.5. MikroRNA'lar

İlk başta, *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilen MikroRNA (miRNA), insanlar dahil çoğu ökaryotta bulunmaktadır. miRNA'lar, 18-22 nükleotit uzunluğunda, tek sarmallı, kodlamayan, yüksek oranda korunmuş ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan küçük, kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA'lar, RNA polimerazlar II ve III tarafından eksprese olur ve olgun miRNA'yı oluşturmak için bir dizi bölünme olayından geçen öncülleri üretmektedir (Macfarlane ve Murphy, 2010; Rahman vd, 2019).

miRNA'lar, memelilerdeki tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını kontrol ederek, gelişme, farklılaşma, çoğalma, apoptoz, metabolizma ve dokunun yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyolojik süreçleri düzenlenmektedirler (Siddeek vd, 2019).

Yeni yapılan analizlerde, insan genomunda yaklaşık 2300 gerçek olgun miRNA olduğu tahmin edilmektedir. miRNA'ların genomik dağılımı, sıklıkla intronlarda ve çok nadiren eksonlarda bulunmaktadır. miRNA'nın biyogenezi büyük ölçüde miRNA'ların genomik organizasyonuna bağlıdır. Örneğin konak gen ile bir promotörü paylaşabilir veya bağımsız bir promotöre sahip olabilir ve genler arası bölgelere yerleştirildiğinde, bağımsız halde transkripsiyonel olarak düzenlenebilir (Rahman vd, 2019; Fridrichova ve Zmetakova, 2019).

Çok sayıda çalışma, kanserli hücre proliferasyonu ve büyümesinde, hücre ölümü inhibisyonunda, immün invazyonda, metastazda ve neoanjiyogenezde miRNA'ların düzensizliğini bildirmektedir. Ayrıca miRNA'ların kanser kök hücrelerinin kaderini düzenlediğide bilinmektedir. İnsan kanserlerindeki miRNA'lar, sağlıklı hücrelerdekilere kıyasla farklı şekilde eksprese edilmektedir. miRNA ekspresyonu ile kanser gelişimi arasındaki ilişki ilk olarak kronik lenfositik lösemide tanımlanmıştır. Bu hastalarda kromozom 13q14 bölgesi ve miR-15a/16a kümesi sıklıkla silinmektedir (Wu vd, 2018; Fridrichova ve Zmetakova, 2019).

2.5.1. miR-410-3p

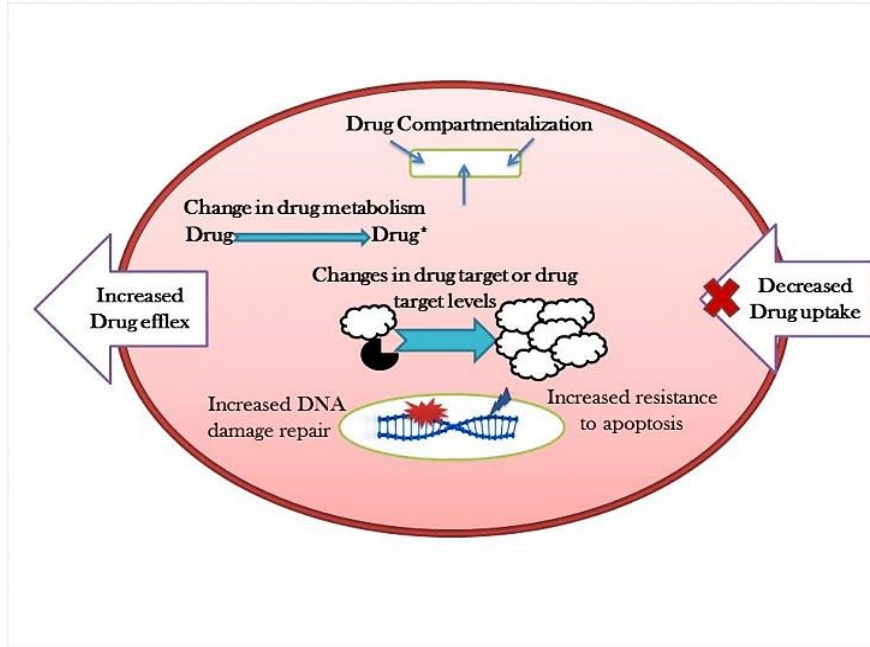
Yakın zamanda miR-410'un embriyonik kök hücrelerin gelişimi ve farklılaşması için çok önemli olduğu bilinmektedir. miR-410'un anormal ekspresyonu çeşitli kanserlerde yaygındır, bu da miR-410'un kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. miR-410, çeşitli kanser türlerinde bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen görevi görmektedir. miR-410'nın mide kanseri ve glioma hücrelerinin göçünü ve invazyonunu baskıladığı bildirilmektedir. Diğer çalışmalar, miR-410'nin küçük hücreli dışı akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve kolorektal kanserde bir onkogen olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Bu veriler, miR-410 düzensizliğinin farklı kanser türlerinde dokuya özgü bir şekilde meydana gelebileceğini göstermektedir. Ancak meme kanserinde miR-410'nin ve hatta NEAT1 'in rolüyle ilgili olarak tek yayın bulunmakta ve etkisi hala bilinmemektedir (Zhang vd, 2016; Ke vd, 2017; Liu vd 2020).

2.6. Çoklu İlaç Direnci

Son birkaç on yılda kanserin önlenmesi, tespiti ve tedavisinde çok iyi ilerleme olmasına rağmen, tümörlerin kemoterapiye direnç kazanma riski, kan, meme, yumurtalık, akciğer ve alt gastrointestinal sistem kanserleri dahil çeşitli kanser türlerinin başarılı tedavisinin önünde büyük bir engel olmaya devam etmektedir. Çoklu ilaç direnci (MDR), kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanların gücünü ve etkinliğini azaltma yeteneği olarak tanımlanabilir. Kemoterapideki başarısızlıkların ve kansere bağlı ölümlerin %90'ı MDR gelişiminden kaynaklıdır ki kanserlerin invazyonu ve metastazı sırasında gerçekleşmektedir (Baguley, 2010; Mansoori vd, 2017; Bukowski vd, 2020; Talib vd, 2021).

MDR doğasına ilişkin ilk fikirler güçlü bir şekilde bakterilerde çoklu ilaç direnci üzerine yapılan çalışmalardan etkilenmiştir (Baguley, 2010).

Kanser hücreleri, antikanser ilaçlarının terapötik etkilerini azaltmak için birden fazla mekanizmayı kullanır ve böylece kemoterapi başarısızlığına neden olur. Örneğin; hücre ölümünün engellenmesi (apoptoz baskılanması), ilaç metabolizmasındaki değişiklikler, epigenetik ve ilaç hedefleri, DNA onarımının artırılması ve gen amplifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalar kullanılmaktadır (Mansoori vd, 2019; Talib vd, 2021).



Şekil 2.5. Kanser hücrelerinde ilaç direnci mekanizmaları (Mansoori vd, 2019).

Direnç ikiye ayrılır:

- 1-Kemoterapi ilaçları kullanılmadan önce meydana gelen birincil direnç.
- 2-Kemoterapi ilaçlarına maruz kaldıktan sonra ortaya çıkan edinilmiş direnç.

Çalışmalar, MDR'nin çeşitli mekanizması olduğunu göstermektedir: ilaç atış sistemi, genetik faktörler (gen mutasyonları, amplifikasyonlar ve epigenetik değişiklikler), büyüme faktörleri, DNA onarımını geliştirmek ve İlaç metabolizmasını değiştirmek dahil olmak üzere farklı mekanizmalar içermektedir (Bukowski vd, 2020).

2.7. Çoklu İlaç Direnç Mekanizmaları

2.7.1. İlaç atış sistemi

Meme kanseri hücrelerindeki ilaç konsantrasyonu, transmembran proteinlerle yakından ilişkilidir. Neoadjuvan kemoterapi ilaçları, transmembran proteinler yoluyla meme kanseri hücrelerinin dışına taşınabilir, böylece ilaç konsantrasyonunu azaltır ve dirence yol açar. P-glikoprotein (P-gp), insan vücudunda ABCB1 geni tarafından kodlanan bir ABC taşıyıcı ailesinin alt üyesi, çoklu ilaca dirençli protein-1 (MDR-1) olarak da bilinen bir ilaç atış pompasıdır (An vd, 2021; Talib vd, 2021).

P-gp'nin normal işlevi, hücreleri ksenobiyotiklere ve hücresele toksik maddelere karşı korumaktır ve bu nedenle fizyolojik homeostazın korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. P-gp ekspresyonu, çeşitli kanser türlerinde değişiklik göstermektedir. Meme, yumurtalık, akciğer ve özofagus kanserleri başlangıçta düşük P-gp seviyeleri gösterir, ancak kanser kemoterapötik tedaviye direnç gösterdikten sonra, P-gp atış taşıyıcılarının seviyeleri artmaktadır. P-gp, hücre içi ilaç konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır. P-gp'nin aşırı ekspresyonu her zaman MDR ile ilişkilendirilmektedir. P-gp'nin neden olduğu MDR'nin ana mekanizması, neoadjuvan kemoterapi ilaçlarını hücre dışına pompalamak için ATP hidrolizi tarafından salınan enerjinin kullanılmasıyla ilişkilidir. Böylece ilaç konsantrasyonu etkin konsantrasyondan daha düşüktür. Ayrıca P-gp ile aynı ABC taşıyıcı ailesine ait olan çoklu ilaç direnç proteini (MRP) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP) de bir "ilaç pompası" işlevi görebilir. Neoadjuvan kemoterapi ilaçları uzun süre kullanıldığında, yukarıda bahsedilen proteinleri kodlayan genleri aşırı eksprese edilmektedir. Bu da ilaç atışını arttırmakta ve neoadjuvan kemoterapiye direnç oluşturmaktadır (Bukowski vd, 2020; Talib vd, 2021; An vd, 2021).

2.7.2. Genetik faktörler

Kanser hücrelerinin antikanser ajanlara karşı direnci, özellikle tümöral somatik hücrelerde, bireyin genetik farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Gen mutasyonları, amplifikasyonları ve epigenetik değişiklikler dahil olmak üzere, üç yol ile MDR gerçekleştirilmektedir (Mansoori vd, 2017; Bukowski vd, 2020).

2.7.3. Büyüme faktörleri

DeneySEL ve klinik veriler, iltihaplanma ile kanser gelişimi ve ilerlemesi arasında önemli ilişkiler olduğunu göstermektedir. Akut inflamasyon, tümörün yok edilmesinde ve kronik immün yanıt ise tümör büyümesi ve invazyonunu desteklemektedir. İnterlökinler dahil olmak üzere, büyüme faktörlerinin artan otokrin üretimi, MDR kanser hücrelerinde gözlenmektedir (Bukowski vd, 2020).

2.7.4. DNA onarımını geliştirmek

DNA onarımı, kanser alanında ilaç direncinin iyi bilinen mekanizmalarından biridir. Platin bazlı ilaçlar, alkilleyici ajanlar ve antrasiklinler gibi çok sayıda kemoterapötik ilaç, ana etki mekanizması olarak kanserli hücrelerinin DNA'sına doğrudan ve/veya dolaylı olarak zarar vermektedir. Bununla birlikte, bu aktivite, ilaç etkinliğini azaltan ve direnci güçlendiren kanser hücresi, DNA onarım yanıtı ile savunulmaktadır (Helleday vd, 2008; Talib vd, 2021).

2.7.5. İlaç metabolizmasını değiştirmek

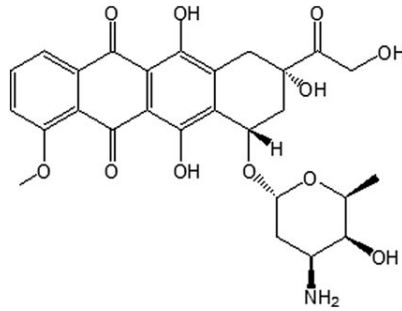
İlaç detoksifikasyonu, kemoterapi tedavisine karşı, önde gelen mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir. Kemoterapötik ajan metabolizmaları enzimler aracılığıyla gerçekleşebilir. Enzimler, hücrelerin içinde ve dışında ajan konsantrasyonunu belirleyen en önemli faktörlerdir (Mansoori vd, 2017; Talib vd, 2021).

2.8. Doksorubisin

Bir antrasiklin türevidir olan doksorubisin (DOX), klinikte, meme, endometriyal ve mide kanserleri, çocukluk çağı solid organ tümörleri, yumuşak doku sarkomları ve agresif lenfoblastik veya miyeloblastik lösemi tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi

ilacıdır. En güçlü kemoterapötik ilaçlardan biri olarak kabul edilir ve metastatik lezyonlar için yanıt oranı yaklaşık %25-40'tır (Angulo vd, 2007; Katsuta vd, 2017; Wu vd, 2020).

İlk iki antrasiklin, 1960'ların başlarında pigment üreten *Streptomyces peucetius*'tan izole edildi ve doksorubisin (DOX) ve daunorubisin (DNR) olarak adlandırılmıştır. Her iki ilaç aglikonik ve şeker parçaları içermektedir. Aglikon tetrasiklik bir halka ile bitişik kinon-hidrokinon grupları, bir metoksi ve bir karbonil grubu ile kısa bir yan zincirden oluşur. DOX'un kimyasal yapısı şekil 2.6 da gösterilmiştir (Carvalho vd, 2009).



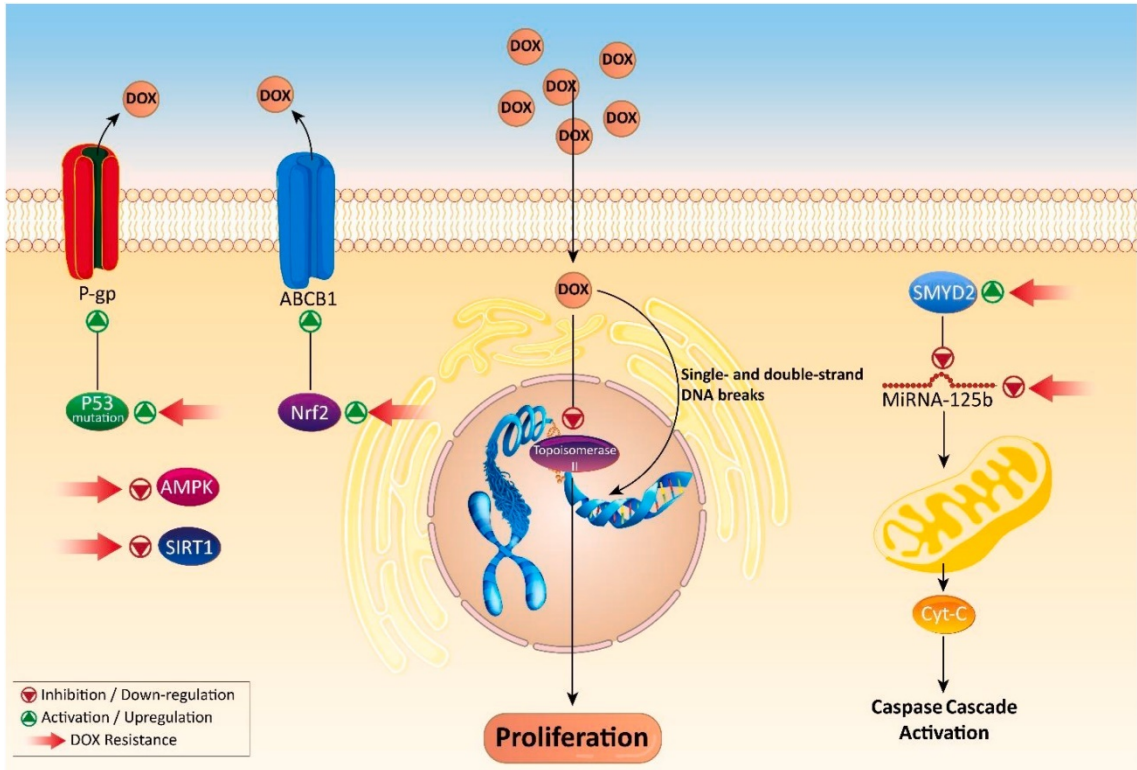
Şekil 2.6. Doksorubisin (DOX) kimyasal yapısı (Carvalho vd, 2009).

DOX'un tümör gelişimini önleyen etkisinin altında yatan ana mekanizmalardan birisi, topoizomerez aktivitesi ve DNA sarmalına karışma ve/veya DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda yer alan proteinlere kovalent olarak bağlanma yeteneği ile ilgilidir. DOX basit difüzyonla kanser hücrelerine girer ve sitoplazmada proteazoma yüksek afinite ile bağlanır. Daha sonra DOX, 20S proteazomal alt birimine bağlanır ve nükleer gözenekler yoluyla çekirdeğe girer ve bir DOX proteazom kompleksi oluşturur. Son olarak, DOX proteazomdan ayrılır ve DNA'ya proteazomdan daha yüksek afinitesi nedeniyle, bağlanır. Bir diğer tümör gelişimini önleyen mekanizması ise, DNA hasarını indükleyerek, nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerini artırarak, mitokondriyal metabolizmayı bozarak, endoplazmik retikulum (ER) stresini ve immünojenik hücre ölümünü (ICD) indükleyerek, tümör hücrelerini öldürmektir. DOX kaynaklı ICD'nin ana mekanizması, kalretikülinin (CRT) kalsiyum sensörü ve şaperon olarak çalıştığı ER'den plazma zarına yer değiştirmesini tetikleyen ER stresinin uyarılmasıdır. Burada CRT, dendritik hücreler (DC) tarafından tümör hücrelerinin fagositozunu ve CD8+T-lenfositler tarafından kalıcı bir anti-tümör tepkisinin aktivasyonunu desteklemektedir (Carvalho vd, 2009; Salaroglio, 2018).

DOX, bazı durumlarda bir tedavi sağlarken, kullanımının sınırlamaları vardır; bunlardan biri ilaca direnç, diğeri ise kanserli olmayan hücreler üzerinde toksisitesidir.

Önemli bir toksisite, antrasikline özgü yan etki olan kardiyotoksisitedir. Kümülatif antrasiklin dozu, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisite ile sonuçlanabilmektedir (Thorn vd, 2011).

Direnç mekanizması, ABCB1 (MDR1, Pgp) ve ABCC1 (MRP1) ve diğer taşıyıcıları (ABCC2, ABCC3, ABCG2 ve RALBP1) içermektedir. DOX, P-gp ve sitokrom P450'nin bir substratıdır. Her ikisi de zayıf oral emilimine ve düşük oral biyoyararlanımına sebep olmaktadır. P-gp ise doksorubisin hücre içi birikimini ve ilacın pleiotropik sitotoksik etkilerini ortaya çıkarma yeteneğini sınırlamaktadır. Yüksek bir ifadenin yanı sıra, yüksek bir P-gp aktivitesi de doksorubisin direncini belirlemektedir. Bu nedenle doksorubisin, yalnızca bir hidroklorür tuzu formülasyonu olarak damar yolu ile uygulanan parenteral bir tedavi olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.7), (Thorn vd, 2011; Alrushaid vd, 2018).



Şekil.2.7. Kanser hücrelerinin DOX direncinde rol oynayan moleküler yollar ve mekanizmalar. (Ashrafizade vd, 2021).

2.9. Hipotez

Bu çalışmadaki hipotezimiz NEAT1'in ekspresyonunun doxorubisin direnci ile artması ve miR410-3p'nin ifadesinin buna bağlı olarak azalmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

MCF-7: İnvaziv duktal karsinoma, non-metastatik, östrojen reseptör pozitif, Luminal A hücre hattı

Hücrelere ısı ile inaktive edilmiş %10 Fetal Dana Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100U/ml penisilin/streptomisin) ilave edildi, RPMI 1640 besiyerinde, %5 CO₂ içeren 37°C ve % 95 nemli hava içeren etüvde T25 flasklarda, kültüre edilerek çoğaltıldı.

MDA-MB-231: İnvaziv duktal karsinoma, metastatik, östrojen reseptör negatif, Claudin-low, triple-negatif hücre hattı

Hücrelere ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100U/ml penisilin/streptomisin) ilave edildi, RPMI 1640 besiyerinde, %5 CO₂ içeren 37°C ve % 95 nemli hava içeren etüvde T25 flasklarda, kültüre edilerek çoğaltıldı.

MCF-10A: İmmortal insan meme epitel hücre hattı. İnsan fibrokistik meme dokusundan türevlenmiştir

Bu hücreler normal meme epitel hücreleri olarak tanımlanmaktadır ve proliferasyonları için ekzojen büyüme faktörleri gereklidir. MCF-10A hücre hattı %1 Penisilin-Streptomisin, L-glutamin, 5% ısıyla inaktive edilmiş at serum, 10ug/ml insülin, 20ng/ml EGF, 0.5ug/ml hidrokortizon içeren DMEM/F12 besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli etüvde inkübe edildi.

3.1.2. Hücrelerin pasajı

Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Besiyeri uzaklaştırılan hücreler 8-10 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 2-3 ml Tripsin/EDTA ilave edildi. Yeni flasklara 1×10^6 hücre ekim gerçekleştirildi.

3.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi

Hücreleri dondurmak amacıyla %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyeri hazırlandı. MCF10A hücrelerinde dondurma medyumunu, diğer hücrelerden farklı olarak %70 besiyeri, %20 at serum ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı. Diğer hücrelerde ise %10 DMSO içeren 2ml besiyeri ile cryo tüplerle -80°C derecede saklandı.

-80°C'de muhafaza edilen hücreler çıkartıldı ve 37°C su banyosunda kısa süre inkübasyon işlemiyle çözüldü. Falkon tüp içerisinde 5 ml besiyerinde homojen edildikten sonra 100xg santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant vakum aracılığıyla aspire edildi. Pelet besiyerinde homojen hale getirildikten sonra flaslara aktarıldı.

3.2. Sitotoksisite Tayini (MTT Testi)

Doksorubisin' in IC50 (The half maximal inhibitory concentration) değerinin belirlenmesi için MTT testi yapıldı .İlk olarak 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 µm konsantrasyonda PBS ile sulandırılan doksorubisin triplike olarak 24, 48 ve 72. saat uygulandı. Bunun için 96-well platelerin her kuyusuna 10.000 hücre ekimi gerçekleşti. 24 saat inkübasyon sonrası doksorubisin eklenerek hücreler muamele edildi. Daha sonra 24, 48 ve 72. saatlerde okumalar yapıldı.

Hücrelerin işaretlenmesi için;

- Besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl taze besiyeri ile değiştirildi.
- 10 µL MTT stok solüsyonu her kuyuya eklendi. Negatif kontrol olarak sadece 100 µL medium içeren kuyuya 10 µL MTT stok solüsyonu eklendi.
- 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.
- 200 µL DMSO solüsyonu her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 570 nm de ve arka plan için 630 nm de absorbans ölçümü gerçekleştirildi.

3.3. Total RNA İzolasyonu

MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen RNA izolasyonu TRIZOL reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. Protokol aşağıdaki şekildedir:

1. T25 Flaskda kültüre edilen hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 750 µl lysis Reagent ile kaldırılıp ve 1,5 ml'lik ependorflara aktarıldı.
2. Oda sıcaklığında (15-25°C'de) 5 dakika bekletildikten sonra 150 µl kloroform eklenerek vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.

3. 12000 rpm de 15dk 4°C' de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan, RNA içeren beyaz ara faz yeni bir tüpe alındı. Üzerine üst faz kadar (yaklaşık 500 µl) buffer RBI ilave edildi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
5. Elute spin kolonlarına 700 µl örnek koyulup, 10,000 x g'de oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası kolona 700 µl örnek eklendi ve 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
7. Sonrasında 500 µl buffer SWI eklendi 10,000 x g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası, 500 µl buffer RNW eklendi ve 10,000 x g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
9. Bu işlemten sonra, RNeasy min elute spin kolonlar, 10,000 x g'de oda sıcaklığında 60 saniye santrifüj edildi ve spin kolonlar 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve 50 µl RNase-free water spin kolonun ortasına koyulup ve 1dk bekletip daha sonra 1dk 10,000 xg'de santrifüj yapıldı.
10. kolonda bulunan miRNA 1,5 ml'lik yeni eppendorfa toplandı.

3.4. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi:

RT-PCR ile RNA düzeyindeki ekspresyon değişimlerini tespit etmek amacıyla hem lncRNA için hem de mikro RNA için revers transkriptaz enzimi ile ticari kitler yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi:

cDNA sentezi, üretici firmanın belirtmiş olduğu prosedür doğrultusunda 96 well plakalar kullanılarak Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA sentez karışım prosedürü total RNA son konsantrasyon 2 µg olacak şekilde ayarlandı. Karışım hazırlandıktan sonra kit protokolü doğrultusunda, cDNA sentezi için 25°C' de 10 dakika, 37°C' de 120 dakika inkübe edildi ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, serumda RNA ekspresyon değişimini tespit etmek amacıyla Real-Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

lncRNA ve miRNA ekspresyon analizi için cDNA dönüşümü gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı Tablo 3.1 da verilen miktarlarla hazırlandı:

Tablo 3.1. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Madde	Miktar
5x HiFlex Buffer	4 µl
10x MiScript Nucleics Mix,	2 µl
MiScript Reverse Transkriptaz Mix	2 µl
RNA	1 µl
dH2O	11 µl
Toplam	20 µl

3.5. Real-Time qPCR ile RNA (lncRNA ve miRNA) Ekspresyon Analizi:

Reaksiyon koşulları;

Her bir kuyucukta 5 µl SYBR Green mix, 2 µl nükleaz içermeyen su, 1 µl primer ve 2 µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu plakada kuruldu ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kapatıldı. Gerçek-zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, NEAT1 için, 40 döngü olacak şekilde, 95 C'de 10 dk, 95 C'de 10 sn, 62 C'de 45 sn ve 72°C 30 sn olarak ve miR-410 için 45 döngü olacak şekilde 95 C'de 15 dk, 94 C'de 15 sn, 55 C'de 30 sn ve 70°C 30 sn olarak amplifiye edildi (Tablo 3.2).

Kullanılan primer dizileri:

NEAT1 FORWARD: 5'- GTACGCGGGCAGATAACAC-3'

REVERSE : 5'- TCGTCTAGACACCACAACC-3'

miR-410 FORWARD: 5'-CCG CAC GAT ATA ACA CAG ATG-3'

REVERSE. 5'-GTG CAG GGT CCG AGG TAT TC-3'

Tablo 3.2. Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Madde	Miktar
SYBR green PCR mastermix	5
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
cDNA	2
dH ₂ O	2
Toplam	10

NEAT1 reaksiyon koşulları;

95°C 10 dakika

95°C 10 saniye,

62°C 45 saniye,

72°C 30 saniye

}
}

40 döngü

miR410 reaksiyon koşulları;

95°C 15 dakika

94°C 15 saniye,

55°C 30 saniye,

70°C 30 saniye

}
}

45 döngü

3.6. İstatistiksel Analizler

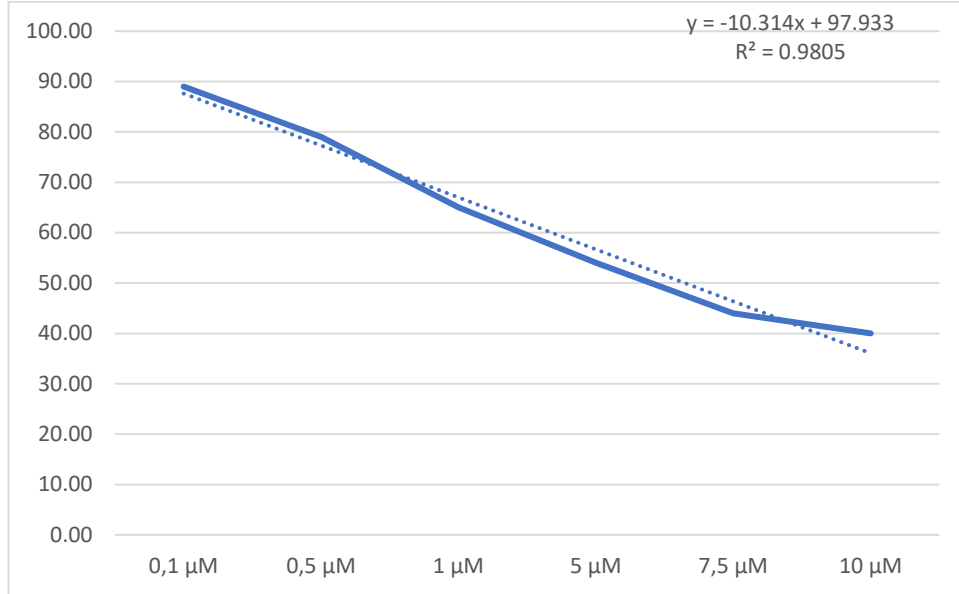
Elde edilen IC₅₀ verileri için Excel programında lineer grafik elde edilerek sonuçlar bulundu. Ekspresyon değişimleri 2- $\Delta\Delta$ CT metodu ile web tabanlı olarak RT² IncRNA PCR data analiz (Qiagen) kullanılarak belirlendi. Bu web tabanlı analiz student-t test prensibine dayanmaktadır.

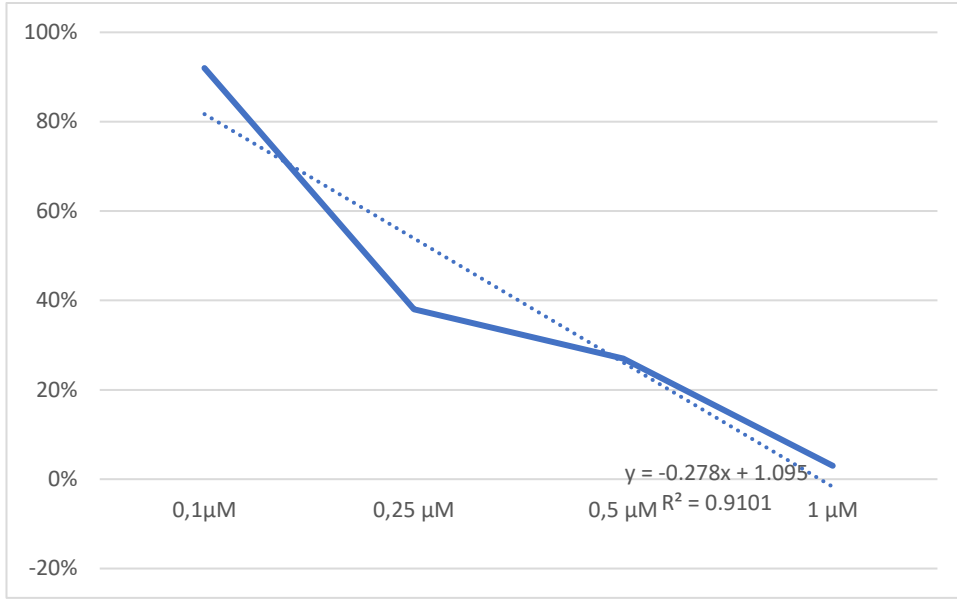
4. Bulgular

4.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarında DOX İçin IC50 Değerlerinin Tayini

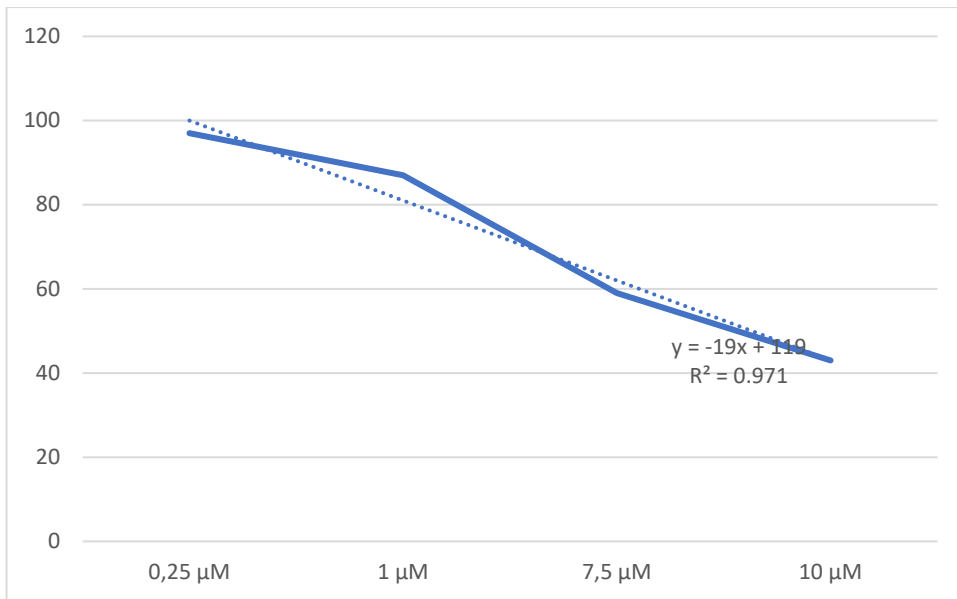
Yapılan tez çalışmasında kullanılan MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre hatlarında doksorubisin için %50 sağ kalım oranı hesaplama işlemi gerçekleştirildi. Uygun yoğunluğa gelen hücre dizileri tripsin edildikten sonra 96-well plakelere 10.000 hücre ekildi. MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre dizileri için DOX'un IC50 değerleri tayin edildi. MCF-7 hücre hattı için DOX'un IC50 değeri; 48. Saatte 6,14 μ M, MDA-MB231 hücre hattı için ise DOX'un IC50 değeri; 72. Saatte 1,28 μ M bulundu (Tablo 4.1.), (Tablo 4.2.).

Tablo 4.1: MCF-7 Yüzde canlılık grafiği



Tablo 4.2: MDA-MB231 Yüzde canlılık grafiği

MCF-10A kontrol hücre hattında doksorubisin muamelesi sonrası 24. Saatte IC50 değeri 8,3 µM bulundu (Şekil 4.3).

Tablo 4.3: MCF-10A Yüzde canlılık grafiği

4.2. Hücre Hatlarında NEAT1 ve miR410 Ekspresyon Sonuçları

Hücre hatlarına doksorubisin muamelesi sonrasında kantitatif gerçek zamanlı PCR ile NEAT1 ve miR410 ekspresyonları belirlendi. NEAT1 ekspresyonu, doksorubisin uygulanmayan hücrelere göre MCF-7 hücre hattında -155.42 kat azalırken, MDA-MB-231 hücre hattında -69.55 kat azaldı. MCF-10a hücre hattında ise -7.78 kat azalma görüldü. miR-410 ekspresyonu ise MCF-7 hücre hattında 1.21 kat artarken, MDA-MB-231 hücre hattında 1.83 kat arttı, MCF-10a hücre hattında ise 1.40 kat artış görüldü (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. kanser hücre hatlarında NEAT1 ve miR410 ekspresyon kat değişimleri.

	MCF-7	MDA-MB231	MCF-10A
NEAT-1	-155.42	-69.55	-7.78
p	0.000016	0.000000	0.000000
miR410	1.21	1.83	1.40
p	0.006058	0.00003	0.000000

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, meme hücrelerinde başlayan ve kontrol dışı büyüyen bir grup kanser hücresidir. Meme kanseri, tüm dünyada en sık teşhis edilen kanserdir ve kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Küresel olarak, meme kanseri insidans oranı son birkaç on yılda hızla artmaktadır. Hem genetik hem de yaşam tarzı faktörleri özellikle diyet, meme kanseri etiolojisinde rol oynamaktadır. Tüm meme kanseri tümör teşhisi, meme kanseri tipini ayırt etmek için immünohistokimya (IHC) kullanılarak, östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) reseptörlerinin saptanmasıyla başlamaktadır (Xiao vd, 2019; Dass vd, 2021).

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) genomda yaygın olarak kodlanır ve gen düzenlemesinde, transkripsiyon sonrası ve epigenetik mekanizmalarındaki çeşitli işlevlerinden dolayı tümörjenezde yeni oyuncular olarak ortaya çıkmaktadır. LncRNA'lar bir dizi kanserde düzensizdir, hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı rolleri gösterir, bu nedenle anormal ekspresyonlarının kanser gelişimine önemli bir katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. NEAT-1, 2007 yılında Hutchinson ve arkadaşları tarafından metastazla ilişkili MALAT1'e paralel olarak ekspresyon dizisi deneylerinde keşfedildi. Parabenekler içinde lokalize olan çekirdekte zenginleştirilmiş bir lncRNA olarak ve parabenek bütünlüğü için esasen gerekli olduğu bulunmuştur. Meta-analizler, NEAT1'in çeşitli kanser türlerinde yukarı regüle edildiğini ve bunun olumsuz bir prognoz ve genel olarak kötü bir sağkalım ile sonuçlandığını açıkça göstermektedir. NEAT1'in meme kanseri biyolojisinde çok önemli bir rol oynadığına dair ilk kanıt, NEAT1, kanserde aktive olduğu, hipoksi ile indüklenebilir faktör 2'nin (HIF-2) doğrudan hedefi olduğundan, Choudhry ve arkadaşları tarafından sunuldu. HIF-2'nin NEAT1'i transkripsiyonel olarak düzenlediği göstermektedir. HIF-2 aktivasyonuna yol açan hipoksi altında, NEAT1 yukarı regüle edilir ve sonuç olarak parabenek oluşumu indüklenir, bu da daha önce hipoksik koşullar altında çekirdekte tutulduğu gösterilen bir faktör olan F11R'nin nükleer retansiyonu ile sonuçlanır. F11R tutulmasının hipoksi kaynaklı NEAT1 yukarı regülasyonuna bağlı olduğunu kanıtlayabilmektedir. Artan hücresele proliferasyon ve klonojenik hayatta kalmanın yanı sıra meme kanseri hücrelerinin azalmış apoptozisi,

hipoksiye baęlı NEAT1 yukarı regülasyonunun sonucudur (Hutchinson vd, 2007 ;Hauptman ve Glavač, 2013; Choudhry vd, 2015; Klec vd, 2018).

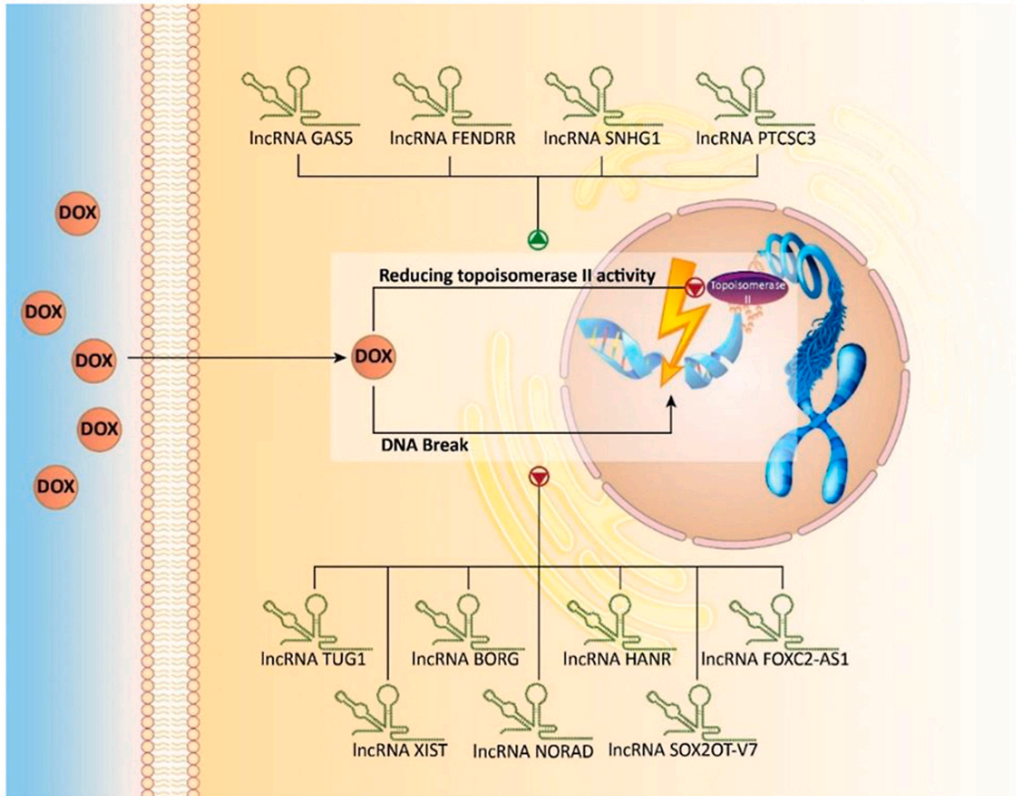
2016'dan bu yana, NEAT1'in meme kanseri ilerlemesine katkısı konusunda birçok araştırma yapıldı ve birkaç çalışma, bu lncRNA'nın farklı miRNA ile bağlantısını gösterdi. Ke ve arkadaşları, sarkomda kaynaşmış/liposarkomda yer değiştirmiş (FUS/TLS) ile NEAT1 ve mir-548ar-3p arasında bir ilişki bulmuşlar. FUS ve NEAT1 doğrudan etkileşime girer ve ayrıca FUS'un inhibe edilmesi, artan apoptoz ile sonuçlanmaktadır. miR-548'in NEAT1 ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir, çünkü miR-548'in aşırı ekspresyonu, NEAT1 ekspresyonunun azalmasına yol açarak sonuçta apoptozu indüklemektedir. Aynı zamanda NEAT-1, kalıtsal meme kanseri vakalarında, BRCA1'in bir hedefidir. BRCA1 eksikliği, NEAT1 ekspresyonunu arttırmakla, in vitro ve in vivo olarak tümörjenisiteyi arttırmaktadır. NEAT1, miR-129-5p genindeki CpG adalarının DNA metilasyonunu artırarak, miR-129-5p'yi negatif olarak düzenlemektedir. Azaltılmış miR-129-5p seviyeleri, onkojenik WNT sinyalini aktive eden artırılmış WNT4 ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Yazarlar, BRCA1/NEAT1/miR-129-5p sinyal ekseninin meme kanseri tümör oluşumuna katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca yukarı regüle edilmiş NEAT1 ekspresyonu, NEAT1 ekspresyon seviyeleri ile negatif ilişki gösteren miR-101'i hedefleyerek, meme kanseri hücre büyümesini arttırmaktadır. miR-101, agresif meme kanseri için bir belirteç olan zest homolog 2'nin (EZH2) arttırıcısını hedefler ve miR-101'in yukarı regülasyonu, EZH2 seviyelerinin düşmesine neden olur. Bu nedenle araştırmacılar, NEAT1 yıkımının miR-101'e bağlı EZH2 düzenlemesi yoluyla kanser hücresi büyümesini baskılayabileceğini öne sürmektedir. NEAT1'in yukarı regülasyonu, 5-florourasil (5-FU) direncini tetikleyen EMT'yi desteklemektedir. Li ve arkadaşları, NEAT1 kaynaklı EMT'nin yanı sıra, meme kanseri hücrelerinin kemo direnci, miR-211/HMGA2 eksenini düzenlediğini gösterdiler. Kanser hücresi göçünü ve invazyonunu inhibe ettiği bilinen miR-211, yukarı regüle edilmiş NEAT1 tarafından bastırılır ve sonuç olarak EMT indükleyici yüksek mobilite grubu AT-hook 2'nin yukarı regülasyonuna yol açmaktadır. Yazarlar, NEAT1, miR-211'i süngerlediğini ve böylece HMGA2'deki baskılayıcı işlevini engellediğini bildirmektedir (Klee vd, 2003; Ke vd, 2016; Li vd, 2017; Qian vd, 2017; Klec vd, 2019).

Jiang ve arkadaşları, MCF-10A hücrelerine kıyasla, çeşitli meme kanseri hücre dizilerinde NEAT1 seviyelerinin arttığını tespit etmiştir. NEAT1'in yukarı regülasyonu, kanser hücresi büyümesinin bilinen bir inhibitörü olan miR-448 ekspresyonu ile negatif ilişki göstermektedir. NEAT-1 ile indüklenen miR-448'in ortaklığı, bu miRNA'nın ZEB1 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır, böylece EMT'yi teşvik ederek kanser ilerlemesinden sorumlu bu transkripsiyon faktörünü yukarı doğru düzenlemektedir. Tüm bu ilgili miRNA ve farklı düzenleyici yolların nedeni, Zhou ve arkadaşları'nın yakın tarihli

çalışmasında açıklanabilmektedir: Meme kanserinin dört alt tipinde lncRNA'ların (NEAT-1, OPI5-AS1 ve AC008124.1) etkisini gösterdiler. NEAT-1, OPI5-AS1 ve AC008124.1 lncRNAlar, çeşitli miRNA ile rekabet ederek ceRNA ağında belirli roller uygular ve anormal bir ifade, ağ yapısını bozabilmektedir. NEAT1'in dört meme kanseri alt tipinde farklı RNA ile rekabet ettiği ve dolayısıyla hücre aktiviteleri üzerinde çeşitli düzenleyici işlevler uyguladığı gösterilmiştir. Örneğin bazal tipte NEAT1 tipi, tümörigenezin temeli olan vaskülogenezi etkileyen TGFB1 ile rekabet eder. HER2+ tipinde, NEAT1, kanser hücreleri içindeki glikolitik süreçleri düzenleyen LDHA ile rekabet etmektedir (Jiang vd, 2018; Zhou vd, 2018; Klec vd, 2018).

Kemoterapi, sistemik veya lokal tedavi dahil olmak üzere tümör tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Malesef, birçok kanser türünde kemoterapi yavaş yavaş duyarsızlaşmaktadır. Birçok çalışma, ilaç direncinin lncRNA'lar anormal ifadeleriyle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Klinik ilaç direnci, direncin bir veya birden fazla ilaçla sınırlı olduğu tekli ve çoklu ilaç direnci (MDR) olmak üzere iki farklı tipte karakterize edilebilmektedir. MDR, geniş bir antikanser ilaç yelpazesine karşı direnci yansıtmaktadır (Deng vd, 2016; He vd, 2021).

Doksorubisin (DOX), kanser hücrelerinde proliferasyonu baskılayabilen ve topoizomeraz II aktivitesini inhibe eden ve DNA kırılmaları üreterek apoptozu tetikleyebilen iyi bilinen bir kemoterapötik ajandır. DOX'un bu aktivitesi mitoz ve hücre döngüsü ilerlemesini sınırlar. Ancak DOX'un sık uygulanması kanser hücrelerinde direncin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Genetik ve epigenetik faktörlerin, kanser hücrelerinin DOX direncini sağlayabildiği görülmektedir. lncRNA düzensizliği, kemorezistans ile ilişkilendirilmiştir ve bu profil, kanserin DOX tedavisi üzerine ortaya çıkmaktadır. lncRNA'lar, NF- κ B, PI3K/Akt, Wnt ve FOXC2 gibi yolları aktive ederek DOX direncini sürdürebilir. Bazı lncRNA'lar, dirence aracılık eden DOX'un neden olduğu strese, yanıt olarak koruyucu otofajiyi etkinleştirebilir (Şekil 5.1). Tersine, PTCSC3 ve FENDRR, Polidatin gibi bazı anti-tümör ajanları, lncRNA'ların ekspresyonunu düzenleyerek DOX duyarlılığını arttırabilir. Genel olarak, lncRNA'lar DOX direncinde potansiyel oyuncular ve bunların tanımlanması ve hedeflenmesi kemosenitivite açısından önemlidir (Ashrafizade vd, 2021).

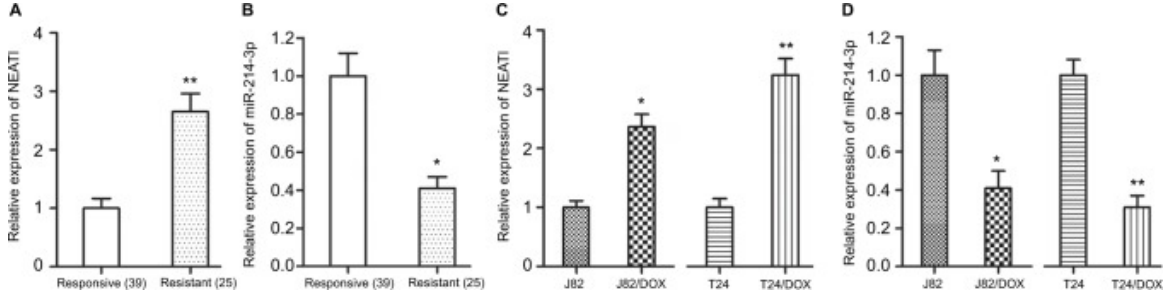


Şekil 5.1. Kanser hücresinin doksorubisin direncinde uzun kodlamayan RNA'lar (Ashrafizade vd, 2021).

Liu ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, meme kanserinde NEAT1 ve Cyclin D1'in (CCND1) regülasyonları, miR-410-3p'nin regülasyonu ile ilişkili olduğunu belirlenmiştir. NEAT1 ve CCND1 yukarı doğru düzenlenirken miR-410-3p meme kanseri doku ve hücrelerinde aşağı doğru regüle edilmektedir. Daha yüksek NEAT1 ekspresyon seviyesi, meme kanseri hastalarının daha düşük hayatta kalma oranı ile ilişkilendirildi. MiR-410-3p'nin yıkılması, geri yüklenen susturulmuş NEAT1 aracılı, meme kanseri hücrelerinin proliferasyon, göç, invazyon ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'sinin inhibisyonuna aracılık etmektedir. Ek olarak, NEAT1, meme kanseri hücrelerinde miR-410-3p'yi süngerleyerek CCND1 ekspresyonunu düzenlemektedir. NEAT1 yıkımı, in vivo olarak tümör büyümesini bloke etmektedir (Liu vd, 2020).

Guo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, DOX'e dirençli ürotelyal mesane kanserinde (UBC) dokularında ve hücrelerinde NEAT1'in yukarı regüle edildiğini ve miR-214-3p'nin aşağı regüle edildiğini belirlenmektedir. Ayrıca, mekanizma analizi, NEAT1 yıkımının negatif olarak düzenlenmiş miR-214-3p ekspresyonunu ve NEAT1/miR-214-3p'nin, Wnt/ β -katenin yolağı ile UBC ön çalışmasında DOX direncine katkıda bulunduğunu ortaya koydu (Şekil 5.2). Bu çalışma, UBC'de NEAT1/miR-214-3p kaynaklı

bir DOX direnci düzenleyici ağı kuran ilk çalışmadır ve DOX direncine sahip UBC için umut verici bir terapötik stratejiye işaret etmektedir (Guo vd, 2018).



Şekil 5.2. DOX'a dirençli UBC dokularında ve hücrelerinde NEAT1 yukarı regüle edildi ve miR-214-3p aşağı regüle edildi (Guo vd, 2018).

Bu çalışmada yaptığımız analizlerde; doksorubisinin etkisinin NEAT1'in üzerinden miR410 regülasyonu ile katkıda bulunduğunu göstermeyi amaçladık.

NEAT1 ekspresyonunun doksorubisin muamelesi sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında sırası ile -155.42 ve -69.55 kat azalmaktadır. Sağlıklı meme epitel hücresi olan MCF-10A hücre hattında ise -7.78 kat ekspresyon azalması gözlenmektedir.

miR410 ekspresyonu ise hem hücre hatları hem de doz uygulaması ile ilişkili bulunmamıştır. Biz bu çalışma ile meme kanserinde doksorubisin direnci ile NEAT1'in ilişkili olabileceği fakat miR410'un bu yolda etkili olmadığını gösterdik.

6. SONUÇLAR

NEAT1 ekspresyonu, meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB231 hücre hatlarında düşük düzeyde ekspresyon gösterirken, MCF-10A sağlıklı meme hücre hattında kanser hücre hatlarına göre daha yüksek düzeyde ekspresyon göstermektedir. Bu da doksorubisinin meme kanseri hücre hatlarında etkisinin NEAT1 üzerinden olabileceğini düşündürmektedir. Sağlıklı hücrelerdeki ekspresyon seviyesinin kanser hücrelerine göre farklılık göstermesi, NEAT1 ekspresyonunun ilaç dirençliliği için bir belirteç olabileceğini ortaya çıkartmaktadır.

miR-410 ekspresyon kat değişimi ise, hücre hatları arasında anlamlı fark göstermemiştir. Bu da bize miR-410'nun doksorubisin etki mekanizmasında görev almadığını düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

Alrushaid S, Zhao Y, Sayre CL, et al. Mechanistically elucidating the in vitro safety and efficacy of a novel doxorubicin derivative [published correction appears in *Drug Deliv Transl Res*. 2018 Oct;8(5):1592]. *Drug Deliv Transl Res*. 2017;7(4):582-597.

Andergassen, D., Rinn, J.L. From genotype to phenotype: genetics of mammalian long non-coding RNAs in vivo. *Nat Rev Genet* (2021).

Angeli D, Salvi S, Tedaldi G. Genetic Predisposition to Breast and Ovarian Cancers: How Many and Which Genes to Test?. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1128.

An J, Peng C, Tang H, Liu X, Peng F. New Advances in the Research of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9644.

Arun G, Diermeier SD, Spector DL. Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Trends Mol Med*. 2018;24(3):257-277.

Ashrafizaveh S, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Husmandi K, Zabolian A, Shahinozzaman M, Aref A.R, Hamblin M.R, Nabavi N, Crea F, Wang Y, Ahn K.S. Long non-coding RNAs in the doxorubicin resistance of cancer cells. *Cancer Lett*. (2021)

Azam, S., Lange, T., Huynh, S. et al. Hormone replacement therapy, mammographic density, and breast cancer risk: a cohort study. *Cancer Causes Control* 29, 495–505 (2018).

Baguley B.C. (2010) Multidrug Resistance in Cancer. In: Zhou J. (eds) Multi-Drug Resistance in Cancer. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 596. *Humana Press*.

Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014 Jul;23(3):409-22

Barth DA, Juracek J, Slaby O, Pichler M, Calin GA. lncRNA and Mechanisms of Drug Resistance in Cancers of the Genitourinary System. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2148.

Brannan, C. I., Dees, E. C., Ingram, R. S. & Tilghman, S. M. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* 10, 28–36 (1990).

Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, Ron E, Sachs RK, Samet JM, Setlow RB, Zaider M. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):13761-6.

Brody JG, Rudel RA. Environmental Pollutants and Breast Cancer. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111(8): 1007-1019.

Bond CS, Fox AH. Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J Cell Biol.* 2009;186(5):637-644.

Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(9):3233.

Cabili MN, Trapnell C, Goff L, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011;25(18):1915-1927.

Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-85.

Cerk S, Schwarzenbacher D, Adiprasito JB, et al. Current Status of Long Non-Coding RNAs in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1485.

Cheang, M. C. U. et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist* 20, 474–482 (2015).

Chi Y, Wang D, Wang J, Yu W, Yang J. Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. **Cells**. 2019;8(9):1015.

Choudhry H, Albukhari A, Morotti M, Haider S, Moralli D, Smythies J, Schödel J, Green CM, Camps C, Buffa F, Ratcliffe P, Ragoussis J, Harris AL, Mole DR. Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2 α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. **Oncogene**. 2015 Aug 20;34(34):4482-90.

Cogill SB, Wang L. Co-expression Network Analysis of Human lncRNAs and Cancer Genes. **Cancer Inform**. 2014;13(Suppl 5):49-59.

Coignard J, Lush M, Beesley J, et al. A case-only study to identify genetic modifiers of breast cancer risk for BRCA1/BRCA2 mutation carriers [published correction appears in Nat Commun. 2021 May 14;12(1):2986]. **Nat Commun**. 2021;12(1):1078.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **Lancet Oncol**. 2012 Nov;13(11):1141-51.

Coyle YM. The effect of environment on breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**. 2004 Apr;84(3):273-88.

Crudele, F., Bianchi, N., Reali, E. et al. The network of non-coding RNAs and their molecular targets in breast cancer. **Mol Cancer** 19, 61 (2020).

Dass SA, Tan KL, Selva Rajan R, et al. Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. **Medicina (Kaunas)**. 2021;57(1):62.

Deng, H., Zhang, J., Shi, J. et al. Role of long non-coding RNA in tumor drug resistance. **Tumor Biol**. 37, 11623–11631 (2016).

Deniz, E., Erman, B. Long noncoding RNA (lincRNA), a new paradigm in gene expression control. **Funct Integr Genomics** 17, 135–143 (2017).

DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Jul-Aug;64(4):252-71

Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. 2014;19(8):805-813.

Ding S, Wu J, Lin C, et al. Evaluation of the Incorporation of Recurrence Score into the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Staging System in Patients with T1-2N0M0, Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Receptor 2-Negative Invasive Breast Cancer: A Population-Based Analysis. *Oncologist*. 2019;24(11):e1014-e1023.

Dong P, Xiong Y, Yue J, et al. Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors. *Front Genet*. 2018;9:471.

Edefonti V, Randi G, La Vecchia C, et al. Dietary patterns and breast cancer: a review with focus on methodological issues. *Nutr Rev* 2009; 67: 297-314.

Espie M, Lalloum M, Coussy F. Epidemiology and risk factors of breast cancer. *Soins; la revue de reference infirmiere* 2013; 776:22-4.

Edwards SL, French JD. NEAT1 isoform expression in breast cancer. *Non-coding RNA Investig* 2020;4:4.

Fabbri A, Carcangiu ML, Carbone A. Histological classification of breast cancer. *Breast Cancer: Springer*, 2008. p. 3-14.

Farmakoloji, Anabilim & Yurtsever, A. & Tiftik, R. (2021). KEMOTERAPİYE DİRENÇLİ MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE YENİ UFUKLARA DOĞRU: UZUN KODLAMAYAN RNA'LAR.

Feigelson HS, Jonas CR, Teras LR, Thun MJ, Calle EE. Weight gain, body mass index, hormone replacement therapy, and postmenopausal breast cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Feb;13(2):220-4.

Feng Y, Spezia M, Huang S, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes Dis.** 2018;5(2):77-106.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer.** 2013 Apr;49(6):1374-403.

Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surg Oncol Clin N Am.** 2018;27(1):95-120.

Freudenheim JL. Alcohol's Effects on Breast Cancer in Women. **Alcohol Res.** 2020;40(2):11.

Fridrichova I, Zmetakova I. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. **Cells.** 2019;8(11):1361.

Gage M, Wattendorf D, Henry LR. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. **J Surg Oncol.** 2012 Apr 1;105(5):444-51.

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.

Gullerova M. Long Non-coding RNA. Genomic Elements in Health, **Disease and Evolution.** 2015;83-108.

Guo Y, Zhang H, Xie D, Hu X, Song R, Zhu L. Non-coding RNA NEAT1/miR-214-3p contribute to doxorubicin resistance of urothelial bladder cancer preliminary through the Wnt/ β -catenin pathway. **Cancer Manag Res.** 2018;10:4371-4380.

Gupta, R., Shah, N., Wang, K. et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature** 464, 1071–1076 (2010).

Hamdi Y, Soucy P, Adoue V, et al. Association of breast cancer risk with genetic variants showing differential allelic expression: Identification of a novel breast cancer susceptibility locus at 4q21. **Oncotarget.** 2016;7(49):80140-80163.

Hauptman N, Glavač D. Long Non-Coding RNA in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(3):4655-4669.

He, J., Zhu, S., Liang, X. et al. LncRNA as a multifunctional regulator in cancer multi-drug resistance. *Mol Biol Rep* 48, 1–15 (2021).

Heath AK, Muller DC, van den Brandt PA, et al. Nutrient-wide association study of 92 foods and nutrients and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):5.

Heesch S, Itersson M, Jacobi J, et al. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome Biol*. 2014;15(1):R6.

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C. et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 193–204 (2008).

Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, Hudson MM, Meadows AT, Neglia JP, Diller LR, Constine LS, Smith RA, Mahoney MC, Morris EA, Montgomery LL, Landier W, Smith SM, Robison LL, Oeffinger KC. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med*. 2010 Apr 6;152(7):444-55; W144-54.

Hindorff, L.A., et al., Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(23): 9362-9367.

Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS; ABREAST Investigators. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*. 2005. Dec;6(5):391-401.

Hou Y, Zhang R and Sun X (2019) Enhancer LncRNAs Influence Chromatin Interactions in Different Ways. *Front. Genet*. 10:936.

Howell A, Anderson AS, Clarke RB, et al. Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(5):446.

Hu G, Niu F, Humburg BA, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis. *Oncotarget*. 2018;9(26):18648-18663.

Hutchinson, J.N., Ensminger, A.W., Clemson, C.M. et al. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* 8, 39 (2007).

Jiang X, Zhou Y, Sun AJ, Xue JL. NEAT1 contributes to breast cancer progression through modulating miR-448 and ZEB1. *J Cell Physiol*. 2018 Nov;233(11):8558-8566.

Jung S, Wang M, Anderson K, et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *Int J Epidemiol*. 2016;45(3):916-928.

Kasiappan R, Rajarajan D. Role of MicroRNA Regulation in Obesity-Associated Breast Cancer: Nutritional Perspectives. *Adv Nutr*. 2017;8(6):868-888.

Katsuta E, Yan L, Nagahashi M, et al. Doxorubicin effect is enhanced by sphingosine-1-phosphate signaling antagonist in breast cancer. *J Surg Res*. 2017;219:202-213.

Ke H, Zhao L, Feng X, et al. NEAT1 is Required for Survival of Breast Cancer Cells Through FUS and miR-548. *Gene Regul Syst Bio*. 2016;10(Suppl 1):11-17.

Kimberly H. Allison, MD, Molecular Pathology of Breast Cancer: What a Pathologist Needs to Know, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 138, Issue 6, December 2012, Pages 770–780.

Kim TK, Hemberg M, Gray JM. Enhancer RNAs: a class of long noncoding RNAs synthesized at enhancers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1):a018622.

Klec, C., Prinz, F. and Pichler, M. (2019), Involvement of the long noncoding RNA NEAT1 in carcinogenesis. *Mol Oncol*, 13: 46-60.

Li, M.D., Cheng, R., Ma, J.Z. and Swan, G.E. (2003), A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction*, 98: 23-31.

Lin Y, Schmidt BF, Bruchez MP, McManus CJ. Structural analyses of NEAT1 lncRNAs suggest long-range RNA interactions that may contribute to paraspeckle architecture. ***Nucleic Acids Res.*** 2018 Apr 20;46(7):3742-3752.

Liu K, Gao L, Ma X, et al. Long non-coding RNAs regulate drug resistance in cancer. ***Mol Cancer.*** 2020;19(1):54.

Liu X, Yao W, Xiong H, Li Q, Li Y. LncRNA NEAT1 accelerates breast cancer progression through regulating miR-410-3p/ CCND1 axis. ***Cancer Biomark.*** 2020;29(2):277-290.

Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. ***Womens Health (Lond).*** 2015;11(1):65-77.

Lof M, Weiderpass E. Impact of diet on breast cancer risk. ***Curr Opin Obstet Gynecol*** 2009; 21: 80-85.

Lofterød T, Frydenberg H, Flote V, et al. Exploring the effects of lifestyle on breast cancer risk, age at diagnosis, and survival: the EBBA-Life study. ***Breast Cancer Res Treat.*** 2020;182(1):215-227.

Łukasiewicz S, Czeczeliwski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer- Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. ***Cancers (Basel).*** 2021;13(17):4287.

Ma H, Hill CK, Bernstein L, Ursin G. Low-dose medical radiation exposure and breast cancer risk in women under age 50 years overall and by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and a case-case comparison. ***Breast Cancer Res Treat.*** 2008 May;109(1):77-90. 9

Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. ***Curr Genomics.*** 2010;11(7):537-561.

Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. ***Adv Pharm Bull.*** 2017;7(3):339-348.

Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H, Lethaby A, Lee J. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev.** 2017 Jan 17;1(1):CD004143.

Marzbani B, Nazari J, Najafi F, et al. Dietary patterns, nutrition, and risk of breast cancer: a case-control study in the west of Iran. **Epidemiol Health.** 2019;41:e2019003.

Mian M, Tinelli M, DE March E, Turri G, Meneghini V, Pescosta N, Berno T ve ark. Bortezomib, Thalidomide and Lenalidomide: Have They Really Changed the Outcome of Multiple Myeloma? **Anticancer Res.** 2016;36(3):1059-65

Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer (Dove Med Press).** 2019;11:151-164.

Mukama T, Fallah M, Brenner H, et al. Risk of invasive breast cancer in relatives of patients with breast carcinoma in situ: a prospective cohort study. **BMC Med.** 2020;18(1):295.

Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. **J Cell Biol.** 2011 Apr 4;193(1):31-9.

Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1988 May;85(9):3044-8.

F P Perera, A Estabrook, A Hewer, K Channing, A Rundle, L A Mooney, R Whyatt and D H Phillips, Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** April 1 1995 (4) (3) 233-238;

Petri BJ, Klinge CM. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. **Cancer Metastasis Rev.** 2020;39(3):837-886.

Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA Cancer J Clin.** 2017;67(5):378-397.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res.** 2010;12(5):R68.

Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. **Cancer Discov.** 2011;1(5):391-407.

Rahman MM, Brane AC, Tollefsbol TO. MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer. **Cells.** 2019;8(10):1214.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet.** 2008 Feb 16;371(9612):569-78

Romano G, Saviana M, Le P, et al. Non-Coding RNA Editing in Cancer Pathogenesis. **Cancers (Basel).** 2020;12(7):1845.

Rosen PP, Maia DM. Rosen's breast pathology. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine.** 1998;122(5):480.

Salaroglio IC, Gazzano E, Abdullrahman A, et al. Increasing intratumor C/EBP- β LIP and nitric oxide levels overcome resistance to doxorubicin in triple negative breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res.** 2018;37(1):286.

Schoemaker MJ, Nichols HB, Wright LB, et al. Adult weight change and premenopausal breast cancer risk: A prospective pooled analysis of data from 628,463 women. **Int J Cancer.** 2020;147(5):1306-1314.

Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. **J Adv Pharm Technol Res.** 2010;1(2):109-126.

Shin VY, Chen J, Cheuk IW, et al. Long non-coding RNA NEAT1 confers oncogenic role in triple-negative breast cancer through modulating chemoresistance and cancer stemness. **Cell Death Dis.** 2019;10(4):270.

Siddeek B, Mauduit C, Chehade H, et al. Long-term impact of maternal high-fat diet on offspring cardiac health: role of micro-RNA biogenesis. **Cell Death Discov.** 2019;5:71.

Singh, N. Role of mammalian long non-coding RNAs in normal and neuro oncological disorders. **Elsevier.** 113, 5, (2021).

Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. **Cell.** 2019;179(5):1033-1055.

Sponer J, Bussi G, Krepl M, Banáš P, Bottaro S, Cunha RA, Gil-Ley A, Pinamonti G, Poblete S, Jurečka P, Walter NG, Otyepka M. RNA Structural Dynamics As Captured by Molecular Simulations: A Comprehensive Overview. **Chem Rev.** 2018 Apr 25;118(8):4177-4338.

Standaert L, Adriaens C, Radaelli E, Van Keymeulen A, Blanpain C, Hirose T, Nakagawa S, Marine JC. The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation. **RNA.** 2014 Dec;20(12):1844-9

Sun M, Kraus WL. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease. **Endocr Rev.** 2015;36(1):25-64.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin.** 2021 May;71(3):209-249

Şen, S. , Aygin, D. "Meme Kanserinin Etiyolojisinde Çevresel Karsinojenlerin Rolü". **Sakarya Tıp Dergisi** 4 (2014): 109-114

Talib WH, Alsayed AR, Barakat M, Abu-Taha MI, Mahmud AI. Targeting Drug Chemo-Resistance in Cancer Using Natural Products. **Biomedicines.** 2021;9(10):1353.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 490, 61–70 (2012).

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics.** 2011;21(7):440-446.

Turgut Cosan D, Yagcı E, Kurt H. 2018, Extending Lines from Epigenetic to Cancer: Long Non-coding RNAs, **Osmangazi Journal of Medicine**, 40(3):114-121.

Uszczynska-Ratajczak B, Lagarde J, Frankish A, Guigó R, Johnson R. Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. **Nat Rev Genet**. 2018;19(9):535-548.

Vinogradova Y, Coupland C, Hippisley-Cox J. Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. **BMJ**. 2020;371:m3873.

Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Arch** 465, 1–14 (2014)

Wen HY, Brogi E. Lobular Carcinoma In Situ. **Surg Pathol Clin**. 2018;11(1):123-145.

Web_1 The World Health Organization internet sitesi. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. (Erişim Tarihi: 23.11.2021).

Web_2 Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018), Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 394-424. Erişim adresi: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>. (Son güncelleme tarihi: 2021, Erişim Tarihi: 23.11.2021).

Web_3 Türkiye Kanser İstatistikleri, 2020. <https://www.saglikaktuel.com/d/file/38131,memekanskr20200720pdf.pdf> (Erişim Tarihi: 23.11.2021).

Web_4 İmaginis internet sitesi, <https://www.imaginis.com/breast-cancer-diagnosis/staging-and-survival-rates-of-breast-cancer-3?r> (Erişim Tarihi: 23.11.2021).

Web_5 Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf (Erişim Tarihi: 23.11.2021).

Wu H, Li J, Guo E, Luo S, Wang G. miR-410 acts as a tumor suppressor in estrogen receptor-positive breast cancer cells by directly targeting ERLIN2 via the ERS pathway. **Cell Physiol Biochem**. 2018;48:461–474.

Xia, Y., Fan, C., Hoadley, K.A. et al. Genetic determinants of the molecular portraits of epithelial cancers. **Nat Commun** 10, 5666 (2019).

Xiao Y, Xia J, Li L, et al. Associations between dietary patterns and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Breast Cancer Res**. 2019;21(1):16.

Youliden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. **Cancer Epidemiology** 2012;36(3):237-48.

Yousefi, H., Maheronnaghsh, M., Molaei, F. et al. Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance. **Oncogene** 39, 953–974 (2020).

Zhang A, Xu M, Mo YY. Role of the lncRNA-p53 regulatory network in cancer. **J Mol Cell Biol**. 2014;6(3):181-191.

Zhang M, Weng W, Zhang Q, et al. The lncRNA NEAT1 activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes colorectal cancer progression via interacting with DDX5. **J Hematol Oncol**. 2018;11(1):113..

Zhang YF, Yu Y, Song WZ. miR-410-3p suppresses breast cancer progression by targeting Snail. **Oncol Rep**. 2016;36:480–486.

Zhou, S., Wang, L., Yang, Q. et al. Systematical analysis of lncRNA–mRNA competing endogenous RNA network in breast cancer subtypes. **Breast Cancer Res Treat** 169, 267–275 (2018).