



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN
METASTATİK KARAKTERİNE SILYMARİN'İN ETKİSİNİN 2 BOYUTLU
VE 3 BOYUTLU KÜLTÜR YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuğçe ALADAĞ

**Eylül 2024
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN
METASTATİK KARAKTERİNE SILYMARİN'İN ETKİSİNİN 2
BOYUTLU VE 3 BOYUTLU KÜLTÜR YÖNTEMLERİYLE
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

Tuğçe ALADAĞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya Çetin

İkinci Danışman: Doç Dr. Fatma FIRAT

Denizli, 2024

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.

Öğrenci Adı Soyadı : Tuğçe ALADAĞ

İmza :

YAYIN BEYAN SAYFASI

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Özet metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1. Ekici Ö, Aslan E, **Aladağ T**, Güzel H, Korkmaz ÖA, Bostancı A, Sadi G, Pektaş MB. Masseter muscle and gingival tissue inflammatory response following treatment with high-fructose corn syrup in rats: Anti-inflammatory and antioxidant effects of kefir. *J Food Biochem*. 2022 Mar;46(3):e13732. doi: 10.1111/jfbc.13732. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33864286.

Ek-2. **Aladağ, T.**, & Fırat, F. (2022). Comparative Effects Of Boric Acid And Resveratrol On Mcf-7 Breast Cancer Cells Metastatic Behaviour. *International Journal Of Research-Granthaalayah*, 10(1), 34–46. <https://doi.org/10.29121/Granthaalayah.V10.I1.2022.4460>

Ek-3. Gurel A, Gurel G, Fırat F, Ozgul E, Turkoglu IND, **Aladag T**, Duran IB, Baylan B. Effect of systemic isotretinoin therapy on semen parameters. *Ann Med*. 2023 Dec;55(1):2207038. doi: 10.1080/07853890.2023.2207038. PMID: 37162375; PMCID: PMC10173790.

Ek-4. Fırat F, **Aladağ T** (September 1, 2022) In Vitro Effects of Boric Acid and Bevacizumab in Non-Small Cell Lung Cancer. *New Trends in Medicine Sciences* 3 2 61–69.

Ek-5. Tosun, M., **Aladağ, T.**, Gökalp, E., Gökçe, G. (2018). Boraks Kullanımına Bağlı Kan-Testis Bariyerinde Görülen Değişikliklerin Histolojik Değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 19(4), 139-144. <https://doi.org/10.18229/Kocatepetip.475003>

Ek-6. Aslan, E., Sadi, G., Guzel, H., Karaca, C., Korkmaz, O. A., Pektas, M. K., Celegen, M., **Aladag, T.**, Oncu, S., and Pektas, M. B. (2023). Kefir Prevents Adipose Tissue Growth Through the Induction of Apoptotic Elements in High-Fructose Corn Syrup-Fed Rats. *Polish*

Journal of Food and Nutrition Sciences, 73(2), pp.120-129.
<https://doi.org/10.31883/pjfns/162710>

Ek-7. Becit-Kizilkaya M, Oncu S, Bilir A, Atay E, Soylemez ESA, Firat F, **Aladag T**. Effect of post-gastrulation exposure to acrylamide on chick embryonic development. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2024 Aug;489:117011. doi: 10.1016/j.taap.2024.117011. Epub 2024 Jun 19. PMID: 38906510.

Ek- 8. Esra Aslan, Hasan Hüseyin Demirel, Hilal Güzel, Yasemin Yüksel, **Tuğçe Aladağ** et al. Silymarin promotes wound healing through regulating epithelial-mesenchymal transition in rat model: Histopathological and immunohistochemical evidences, 14 February 2024, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3950829/v1>]

ÖZET

MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN METASTATİK KARAKTERİNE SILYMARIN'IN ETKİSİNİN 2 BOYUTLU VE 3 BOYUTLU KÜLTÜR YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğçe ALADAĞ

Doktora Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hülya Çetin

Eylül 2024, 126 Sayfa

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın kanser türlerinden biridir ve metastaz, kanserin ölümcül hale gelmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Silymarin'in iki farklı meme kanseri hücre hattı (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücreler, hem iki boyutlu (2D) hem de üç boyutlu (3D) kültürlerde yetiştirilmiş ve Silymarin ile tedavi edilmiştir. Araştırmada, Silymarin'in hücrelerin yayılmasını ve metastazla ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyonunu nasıl etkilediğini belirlemek için çeşitli analizler yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB-231'de, silymarin'in metastatik özellikler üzerindeki etkilerini araştırmak ve bu etkilerin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültür modellerinde nasıl farklılaştığını değerlendirmektir. Çalışmada silymarin'in etkin dozunu belirlemek amacıyla MTT hücre canlılığı analizi hem 2D hemde 3D kültür metodları kullanılarak tayin edildi. Belirlenen dozlar ile 2D kültür metodları olan yara iyileşme deneyi, PCR, Western Blot ve immünohistokimyasal analizler kullanılarak epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) proteinlerinin ifadeleri değerlendirildi. Eş zamanlı olarak 3D kültür yöntemiyle sferoid oluşturularak transwell hücre göçü, PCR, Western blot ve immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildi. Genetik analizleri ve histokimyasal analizler için hücrelere uygulamalar yapıldı. Sonuç olarak, silymarin'in hem 2D hem de 3D hücre kültür modellerinde meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve EMT sürecini etkili bir şekilde modüle edebildiği bulunmuştur. 3D kültürler, silymarin'in anti-kanser etkilerini kapsamlı bir şekilde yansıtmakta ve in vivo ortamı daha iyi taklit ederek gerçekçi sonuçlar elde etmektedir. Çalışmamızın bulguları, silymarin'in meme kanseri tedavisinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: EMT; Meme Kanseri; Metastaz; Silymarin; 2D ve 3D hücre kültürü

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE008)

ABSTRACT**COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECT OF SILYMARIN ON THE METASTATIC CHARACTER OF MCF-7 AND MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS WITH 2D AND 3D CULTURE METHODS**

ALADAG, Tuğçe

PhD Thesis in Histology and Embryology

Advisor: Prof. Hülya ÇETİN (PhD)

September 2024, 126 Pages

Breast cancer is one of the most common cancers among women worldwide and metastasis plays a critical role in the lethality of cancer. In this study, the effects of Silymarin on two different breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) were investigated. Cells were grown in both two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultures and treated with silymarin. In the study, various analyses were performed to determine how Silymarin affects the spread of cells and the expression of genes and proteins associated with metastasis. The aim of this study was to investigate the effects of Silymarin on metastatic properties in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and to evaluate how these effects differ in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culture models. In order to determine the effective dose of silymarin in the study, MTT cell viability was determined using both 2D and 3D culture methods. The expressions of epithelial mesenchymal transition (EMT) proteins were evaluated using 2D culture methods such as wound healing assay, PCR, Western blot and immunohistochemical analyses with the determined doses. Simultaneously, spheroids were formed with the 3D culture method and transwell cell migration, PCR, Western blot and immunohistochemical analyses were performed. Applications were made to the cells for genetic and histochemical analyses. As a result, it was found that silymarin can effectively modulate the proliferation, migration and EMT process of breast cancer cells in both 2D and 3D cell culture models. 3D cultures comprehensively reflect the anti-cancer effects of silymarin and obtain realistic results by better mimicking the in vivo environment. The findings of our study support that silymarin can be evaluated as a potential agent in the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer; EMT; Metastasis; Silymarin; 2D and 3D cell culture

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number 2022SABE008.

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmamızı gerçekleştirebilmemiz için gerekli desteği sağlayan Pamukkale Üniversitesi ‘Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne,

Doktora eğitimim boyunca ve çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan, deneyimlerini paylaşıp yardımcı olan, bana inanan ve her daim arkamda olduğunu hissettiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hülya ÇETİN’e,

Doktora tez sürecimde ve kişisel gelişimimde bana sağladığı katkıları için müteşekkir olduğum, ilk günden beri, bana her zaman güler yüzlü, anlayışlı davranan her zaman yanımda olan, tecrübeleriyle bana gerek ablalık gerek ikinci danışmanım olarak yaratıcılığı ve yenilikçi fikirleriyle tez sürem boyunca çözüm odaklı bir insan olarak bana sağladığı imkânlar ve destekleri için, bunların yanı sıra bilime ve hayata karşı farklı perspektiflerden bakmayı, düşünmeyi göstererek ufkumu genişleterek beni iyi bir bilim insanı olarak yetiştirdiği için Doç. Dr. Fatma FIRAT’a

Her zaman biz genç, idealist bilim insanları için örnek olup yol gösterdiği ve destek olduğu için değerli hocalarım, Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve Prof. Dr. Tolga ERTEKİN’e,

Lisansüstü öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji bölümünün sayın hocaları Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE, Doç. Dr. Nazan KESKİN, Doç. Dr. Nazlı ÇİL ve Dr. Öğr. Üyesi M. Serkant Ünal’a,

Tez çalışmamın istatistiksel analiz sürecinde göstermiş olduğu ilgi, sabır ve fedakârlık için, kıymetli hocam Prof. Dr. İsmet DOĞAN’a,

Tez sürecim boyunca deneysel aşamalarında özveri ile yardımda bulunan kıymetli zamanını benimle paylaştığı ve desteklerini esirgemediği için değerli hocalarım Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Doç. Dr. Evrim Suna ARIKAN SÖYLEMEZ’e,

Tez çalışmam boyunca her zaman sorularıma cevap verip bana yardımcı olan hem abilik hem de arkadaşlık ederek yol gösteren, bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mahmud M. Özkut'a

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesinde ki ailem olan Histoloji-Embriyoloji bölümünde geçirdiğim deney süresi boyunca benden güler yüz ve anlayışlarını ve yardımlarını esirgemeyen her daim yanımda, bana yardımcı olmak için bekleyen çalışma arkadaşlarım olan yüksek lisans öğrencilerimiz Tuğçe SANCAR ve Esra ÖREN'e

Kariyerimde ve hayatta her zaman, her koşulda beni destekleyen bugünlere getiren, doğru ve iyi bir insan olmam için yol gösteren, bu süreçte hep yanımda ve yardımcı olan ve bütün heyecanları ve sevgi dolu kalpleri ile arkamdaki en büyük desteğim olan Çekirdek ailem, Babam Hasan ALADAĞ, Annem Nihal ALADAĞ'a ve Geniş Ailemdeki Herkese,

Yanımda olmasa da her zaman kalbimde olan Can Bağım Abim Doğukan Hazar ALADAĞ'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.2. Metastaz	10
2.2.1. İnvazyon	11
2.2.2. İntravazasyon	13
2.2.3. Ekstravazasyon	15
2.2.4. Kolonizasyon	16
2.3. Epitelial Mezenkimal Geçiş	17
2.3.1. EMT ve Kanser İlişkisi	18
2.3.2. EMT Belirteçleri	20
2.3.2.1. E-Kaderin	21
2.3.2.2. N-Kaderin	22
2.3.2.3. Fibronektin	23
2.3.2.4. Matriks Metalloproteazlar (MMP-9)	24
2.3.2.5. Vimentin	25
2.4. Silymarin (Silybum marianum)	27
2.4.1. Silymarin Tarihçesi ve Kullanım Alanları	27
2.4.2. Silymarin Farmokinetiği	29
2.4.3. Silymarin'in Anti-kanserojenik Etkisi.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Grupların belirlenmesi	32
3.2. Kimyasallar	33
3.3. Hücre Kültürü	33
3.4. 2D Hücre kültürü Uygulamaları	34
3.4.1. 2D Hücre kültüründe MTT Metodu ile hücre canlılığı tayini	34
3.4.2. 2D Hücre kültüründe Yara Yeri Metodu	35
3.4.3. 2D Hücre kültüründe İmmünohistokimya Metodu	36
3.5. 3D Hücre kültürü Uygulamaları.....	37
3.5.1. Hanging Drop Metodu ile Sferoid oluşturma aşaması	37
3.5.2. 3D Hücre Kültüründe İmmünohistokimya Boyaması	38

3.5.3. 3D Hücre Kültüründe İnsertler kullanılarak Hücre Göçü Metodu .	40
3.6. 2D ve 3D Hücre Kültüründe Real-Time PCR analizi	41
3.6.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu	41
3.6.2. cDNA Sentezi	41
3.6.3. CDH1, CDH2, VIM ve MMP9 Gen Ekspresyonlarının Real-Time PCR ile Ölçümü	42
3.7. 2D ve 3D Hücre Kültüründe Western Blot analizi	44
3.7.1. Protein izolasyonu	44
3.7.2. Western Analizi	45
3.7.3. Görüntüleme	46
3.8. İstatiksel analiz	48
4. BULGULAR	49
4.1. 2D Hücre Kültüründe MTT sonuçları	49
4.2. 3D Hücre Kültüründe MTT sonuçları	50
4.3. Silymarin'in MDA-MB-231 Hücrelerinde Migrasyon Üzerine Etkisi ..	51
4.4. Silymarin'in MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Üzerine Etkisi	53
4.5. Silymarin'in MCF-7 Hücrelerinde Hücre göçüne etkisi	55
4.6. Silymarin'in MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre göçüne etkisi	56
4.7. 2D İmmunohistokimyasal boyama ekspresyonlarının değerlendirilmesi	58
4.8. 3D İmmunohistokimyasal boyama ekspresyonlarının değerlendirilmesi	62
4.9. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	67
4.10. Western Blot Analizinin Değerlendirilmesi	70
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ	83
7. KAYNAKLAR	85
8. ÖZGEÇMİŞ	102
EKLER	
Ek-1 Yayın özet metni	
Ek-2 Yayın özet metni	
Ek-3 Yayın özet metni	
Ek-4 Yayın özet metni	
Ek-5 Yayın özet metni	
Ek-6 Yayın özet metni	
Ek-7 Yayın özet metni	
Ek-8 Yayın özet metni	

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Tümörlerin Gelişim Aşamaları.....	5
Şekil 2.2. Dünya çapında 2020 Yılında 36 Kanser ve Tüm Kanserlerde Yeni Vaka ve Ölümler.....	6
Şekil 2.3. Meme kanseri sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.4. Üçlü negatif meme kanserinde sinyal iletimi ve tümör oluşumunun temel mekanizmaları	9
Şekil 2.5. Metastaz Aşamaları	11
Şekil 2.6. İnvazyon	13
Şekil 2.7. İnvazasyon	14
Şekil 2.8. Ekstravazasyon mekanizması.....	16
Şekil 2.9. EMT Molekülleri.....	18
Şekil 2.10. EMT tipleri	20
Şekil 2.11. EMT Biyobelirteçleri	21
Şekil 2.12. Vimentin etki mekanizması.....	27
Şekil 2.13. Silymarin bileşenleri	28
Şekil 2.14. Silybin kimyasal yapısı	29
Şekil 3.1. MTT deneyi şeması.....	35
Şekil 3.2. Yara yeri deneyi	36
Şekil 3.3. Asılı damla sferoid modeli ile oluşturulan sferoidler.....	37
Şekil 3.4. Petri kapağı üzerinden mikropipet yardımıyla toplanan sferoidler.....	39
Şekil 3.5. Transwell invazyon deneyi.....	40
Şekil 3.6. Protein izolasyonunda protein miktarlarının iki ayrı test ile ölçümü	45
Şekil 3.7. Proteinlerin jel'e yüklenmesi	46
Şekil 3.8. Elektroforezi tamamlanan jel'in PVDF membrana aktırılması.....	47
Şekil 3.9. Membran üzerine first ve seconder antikor uygulaması ve inkübasyonu	47
Şekil 4.1. 2D hücre kültüründe MTT testi sonuçları	50
Şekil 4.2. 3D hücre kültüründe MTT testi sonuçları	51
Şekil 4.3. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 0. ile 24. saat arasındaki her 6 saat aralıktaki yara alanı görüntüleri	52
Şekil 4.4. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 0. ile 24. saat arasındaki her 6 saat aralıktaki yara alanı görüntüleri.	54
Şekil 4.5. 2D kültürde E-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	60
Şekil 4.6. 2D kültürde N-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	60
Şekil 4.7. 2D kültürde vimentin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	61
Şekil 4.8. 2D kültürde fibronektin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	61

Şekil 4.9.	2D kültürde MMP-9 protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	62
Şekil 4.10.	3D kültürde E-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	65
Şekil 4.11.	3D kültürde N-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.....	65
Şekil 4.12.	3D kültürde vimentin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	66
Şekil 4.13.	3D kültürde fibronektin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri	66
Şekil 4.14.	3D kültürde MMP-9 protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.....	67
Şekil 4.15.	Silymarin uygulamasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 2D ve 3D kültür ortamlarında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).....	68
Şekil 4.16.	Silymarin uygulamasında MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin 2D ve 3D kültür ortamlarında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).....	69
Şekil 4.17.	Silymarin uygulamasında MCF-7 ve MDA-MB-231 2D kültür ortamında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).....	69
Şekil 4.18.	Silymarin uygulamasında MCF-7 ve MDA-MB-231 3D kültür ortamında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).....	70

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Meme kanseri risk faktörleri.....	8
Tablo 2.2. Matriks metalloproteaz tipleri.....	24
Tablo 3.1. Deney Çalışma grupları.....	32
Tablo 3.2. Deneyde kullanılan kimyasallar	33
Tablo 3.3. cDNA reaksiyon karışımı.....	41
Tablo 3.4. cDNA sentezi reaksiyon protokolü.....	41
Tablo 3.5. Genlere ait baz dizileri.....	42
Tablo 3.6. Real-Time PCR tepkime karışımı.....	43
Tablo 3.7. CDH1, CDH2, MMP9 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.....	43
Tablo 3.8. VIM ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.....	43
Tablo 3.9. Protein ölçüm miktarları ve hesaplanması	45
Tablo 4.1. MDA-MB-231 hücrelerinde yara iyileşme deneyinde istatistiksel analiz sonuçları	53
Tablo 4.2. MCF-7 hücrelerinde yara iyileşme deneyinde istatistiksel analiz sonuçları	55
Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerinde transwell invazyon deneyi sonuçları.....	56
Tablo 4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde transwell invazyon deneyi sonuçları.....	57
Tablo 4.5. 2D kültür yöntemiyle elde edilen MCF-7 hücrelerinde immünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları	59
Tablo 4.6. 2D kültür yöntemiyle elde edilen MDA-MB-231 hücrelerinde immünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları	59
Tablo 4.7. 3D kültür yöntemiyle elde edilen MCF-7 sferoidlerinde immünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları	63
Tablo 4.8. 3D kültür yöntemiyle elde edilen MDA-MB-231 sferoidlerinde immünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

AkT	: Protein Kinaz B
BRCA1	: Meme kanseri A1 geni
BRCA2	: Meme kanseri A2 Geni
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CSC	: Kanser Kök Hücresi
DMBA	: Dimetilbenzilamin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EMT-TF	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş Transkripsiyon Faktörleri
ER	: Östrojen
ERK ½	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
HER2	: Epidermal Büyüme Faktörü
HIF-1	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
İNOS	: İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentaz
LOX	: Lizil oksidaz
MAPK	: Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MCSC	: Metastatik Kanser Kök Hücresi
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-231	: M.D. Anderson - Metastatic Breast - 231
MET	: Mezenkimal Epitelyal Geçiş
MMP	: Matriks Metalloproteazlar
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
MUC1	: Transmembran glikoprotein mucin-1
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz
PI3KCA	: Fosfoinositid-3-Kinaz Katalitik Alfa Polipeptit
PKC	: Protein Kinaz C
PR	: Progesteron
RhoA/ROCK	: Rho-ilişkili protein kinaz
SLY	: Silybum Marianum
STAT3	: Transkripsiyonun Sinyal İleticileri Ve Aktivatörler
TEM	: Trans Endotelyal Migrasyon
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TME	: Tümör Mikro Ortamı
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
TNFα	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TP53	: Tümör Protein 53
TPA	: Doku Plazminojen Aktivatörü
uPA/uPAR	: Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatör Reseptörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WNT	: Wingless ile ilişkili entegrasyon alanı

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir ve bu nedenle önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir. Kanserın mortalite oranını artıran en önemli faktörlerden biri, tümör hücrelerinin vücudun farklı bölgelerine yayılması olarak tanımlanan metastazdır. Metastatik meme kanseri, tedavisi daha zor ve prognozu daha kötü olan bir hastalıktır. Bu nedenle, metastazı önleyebilecek veya yavaşlatabilecek yeni terapötik yaklaşımlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Son yıllarda, bitkisel kökenli bileşikler kanser tedavisinde potansiyel birer ajan olarak büyük ilgi görmektedir. Bu bileşiklerden biri olan silymarin, süt devedikeni ya da meryemana dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden elde edilen bir flavonoid kompleksidir. Silymarin, antioksidan, anti-enflamatuar, anti-fibrotik ve antikanserojenik etkileri ile bilinmektedir. Literatürde, silymarin'in çeşitli kanser türlerinde hücre çoğalmasını inhibe edici etkileri rapor edilmiştir. Ancak, silymarin'in meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasında, silymarin'in meme kanseri hücrelerinin metastatik özelliklerine etkileri 2 ve 3 boyutlu hücre kültürü yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları kullanılarak 2D ve 3D hücre kültür modelleri oluşturulmuştur. MCF-7, östrojen reseptörü pozitif, düşük metastatik potansiyele sahip bir hücre hattıdır, MDA-MB-231 ise östrojen reseptörü negatif, yüksek metastatik potansiyele sahip bir hücre hattıdır. Bu iki hücre hattının kullanımı, silymarin'in farklı meme kanseri hücre tiplerindeki etkilerinin karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır. 2D ve 3D hücre kültür yöntemleri arasında önemli hücresel farklılıklar bulunmaktadır. 2D kültürler, hücrelerin düz bir yüzeyde büyüdüğü klasik bir modeldir ve hücrelerin doğal mikroyapısından uzak kalmasına neden olabilir. 3D hücre kültürleri ise hücrelerin doğal ortamına yakın, üç boyutlu bir yapıda

büyümesi ve çoğalmasına olanak tanır ve bu sayede hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri daha gerçekçi bir şekilde simüle edilebilir. Metastaz, kanser hücrelerinin ana tümörden ayrılarak kan veya lenf yolu ile vücutta farklı organlara yayılması sürecidir. Bu süreç, hücrelerin çevresel dokulara invazyonunu ve yeni yerleşim alanlarına göçünü içerir. E-kaderin ve N-kaderin, hücreler arası yapısal bağlantıları düzenleyerek metastatik hücrelerin ayrılmasını ve yayılmasını etkilerken, vimentin ve fibronektin hücrelerin matriksten ayrılmasını ve çevresel dokulara invazyonunu kolaylaştırır. MMP-9 proteaz enzimi ise ekstraselüler matriksi parçalayarak hücre göçünü destekler. Bu proteinlerin etkileşimleri, metastazın invazyon basamağında yani hücre göçü aşamasında kritik bir rol oynar, bu da metastatik tümörlerin vücutta yayılma ve yerleşme yeteneğini belirler.

Bu çalışmada, silymarin'in 2D ve 3D kültürlerdeki etkileri karşılaştırılarak, bu bileşiğin metastatik proteinlerin özellikleri üzerindeki olası etkileri, rtPCR, immunohistokimyasal boyama ve Western Blot yöntemleri kullanılarak, ayrıca hücrelerin göç ve metastaz kabiliyetlerine olası etkileri ise yara yeri yöntemi ve insert göç yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

1.1. Amaç

Çalışmamızda, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 2D ve 3D hücre kültürü yöntemleri kullanarak 24 saat silymarin uygulaması sonrasında, silymarin'in meme kanseri hücreleri üzerinde epitelyal-mezenkimal karaktere olan etkilerini ve hücre göçüne olan etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Amaçlar doğrultusunda belirlediğimiz hedefler;

1. Silymarin'in 2 ve 3 boyutlu hücre kültüründe meme kanseri hücrelerine öldürücü etkiye sahip dozunu MTT yöntemi kullanarak belirlemek ve karşılaştırmak.
2. Belirlenen silymarin dozlarının 24 saat uygulanması sonrasında, 2D hücrelerde yara yeri modeli ile ve 3D hücrelerde insert transwell yöntemleri ile hücrelerin invazyon yani göç kabiliyetini değerlendirmek.
3. 24 saat silymarin uygulanması sonrasında 2D ve 3D hücrelerde metastatik karakterde etkili olduğu bilinen E-kaderin, N-Kaderin, vimentin ve fibronektin

proteinlerindeki değişimleri rtPCR, immunohistokimyasal boyama ve Western-Blot yöntemleri ile değerlendirmek.

4. 24 saat silymarin uygulanması sonrasında 2D ve 3D hücrelerde, hücre invazyonu ve göçünde etkili olan MMP-9 proteinindeki değişimleri rtPCR, İmmunohistokimyasal boyama ve Western-Blot yöntemleri ile değerlendirmektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

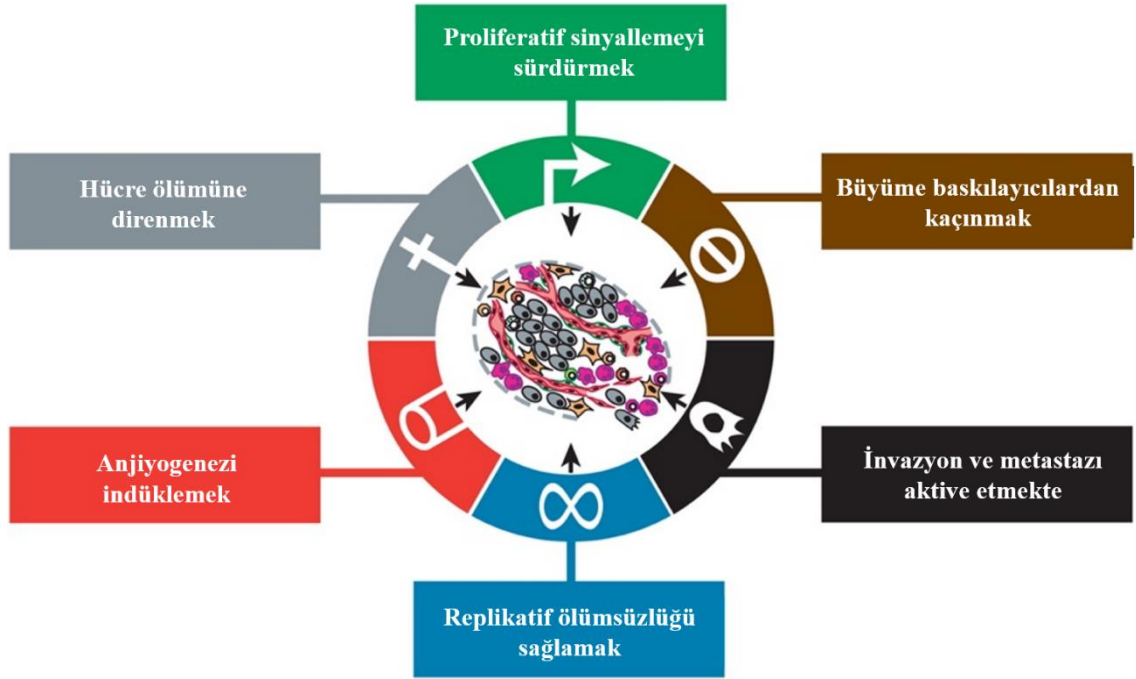
2.1. Meme Kanseri

Kanser, bir hücrenin veya hücre grubunun, normalde var olan kontrol mekanizmalarının dışına çıkarak kontrolsüz bir şekilde çoğalmasdır. Bu mekanizmaların düzgün çalışmaması durumunda, normal hücreler yapı ve işlevlerinde değişiklikler yaşayarak tümör hücrelerine dönüşebilirler (Hanahan & Weinberg, 2011a). Bu nedenle kanser, hücrelerde meydana gelen genetik veya epigenetik değişikliklerin birikmesi sonucunda gelişen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Ponder, 2001).

Kanser hücrelerinin temel özelliği, sürekli olarak çoğalma yeteneğine sahip olmalarıdır. Kanser belirgin özellikleri, insan tümörlerinin evrimi sırasında elde edilen altı temel biyolojik yeteneği kapsar (Şekil 2.1.).

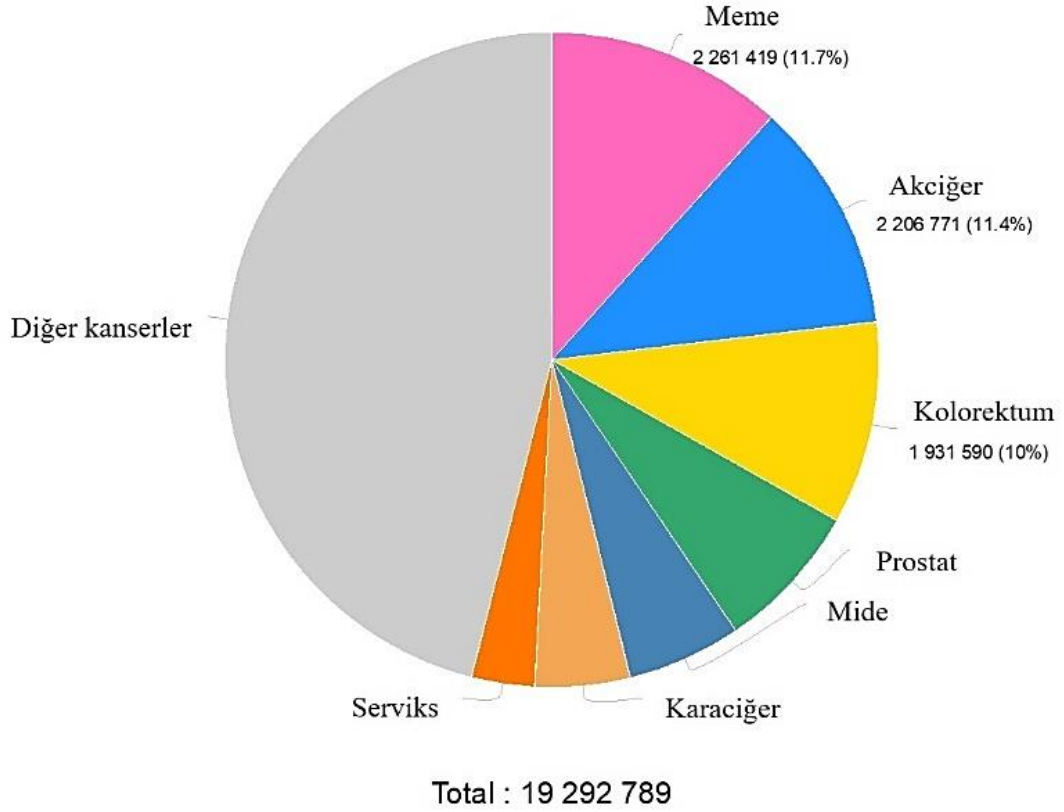
Bunlar;

1. Proliferatif sinyalleme sürdürmek,
2. Büyüme baskılayıcılardan kaçınmak,
3. Hücre ölümüne direnmek,
4. Replikatif ölümsüzlüğü sağlamak,
5. Anjyogenezi indüklemek,
6. İnvazyon ve metastazı aktive etmektedir (Hanahan & Weinberg, 2011a).



Şekil 2.1. Tümörlerin Gelişim Aşamaları (Modifiye edilmiştir.) (Hanahan & Weinberg, 2011a).

Meme kanseri, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak öne çıkmaktadır. Akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümler arasında ikinci sıradadır (Saip et al., 2011). Bu hastalık, epitel kökenli hücrelerin kanserleşmesi sonucu meydana gelir ve kadınlarda en sık rastlanan malign tümör olarak bilinir. ABD ve Kanada gibi ülkelerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alırken, diğer ülkelerde en çok ölüme yol açan kanser türü olarak kabul edilmektedir (H. Sung et al., 2021). Meme kanseri, yılda yaklaşık 400.000 ölüme neden olmaktadır. Bu ölümlerin %55'i gelişmiş ülkelerde, %45'i ise gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir ve meme kanserinden kaynaklanan ölümler, tüm kanser ölümlerinin %6'sını oluşturur. Dünya genelinde her yıl ortalama 10 milyon yeni kanser vakası bildirilmektedir ve bu vakaların bir milyonu (%10) meme kanseridir (Eser, 2003).



Şekil 2.2. Dünya çapında 2020 Yılında 36 Kanser ve Tüm Kanserlerde Yeni Vaka ve Ölümler (Modifiye edilmiştir.) (H. Sung et al., 2021).

Meme kanseri oluşumunda birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bu faktörler; yaş ve cinsiyet, ırk ve etnik köken, iyi huylu meme hastalıkları, meme kanseri öyküsü, yaşam şekli ve beslenme alışkanlığı, reproduktif ve hormonal faktörler, iyonize radyasyona maruz kalmak, sigara içmek ve çevresel faktörler gibi çoğaltılarak sıralanabilir. Meme kanserine yakalanma riski yaşın ilerlemesine bağlı olarak artmaktadır ancak bu artış menopoz sonrasında yavaşlamaktadır. Bu durum, meme kanserinin hormon bağımlı bir hastalık olduğunu ve post-menopoz evresindeki kadınlarda östrojen ve özellikle progesteron oranlarında azalma olduğunda ortaya çıkmaktadır (Libson & Lippman, 2014). Ülkemizde de bu durum genel tablodan farklı değildir (Şekil 2.2.). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın son kanser raporuna göre yetişkin Türk kadınlarında meme kanseri oranı %24,9'dur (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2021).

Meme kanseri riskini artıran genetik faktörler arasında A1 geni (BRCA1), A2 geni (BRCA2) ve tümör protein 53 (TP53) gibi DNA onarımıyla ilişkili genlerdeki

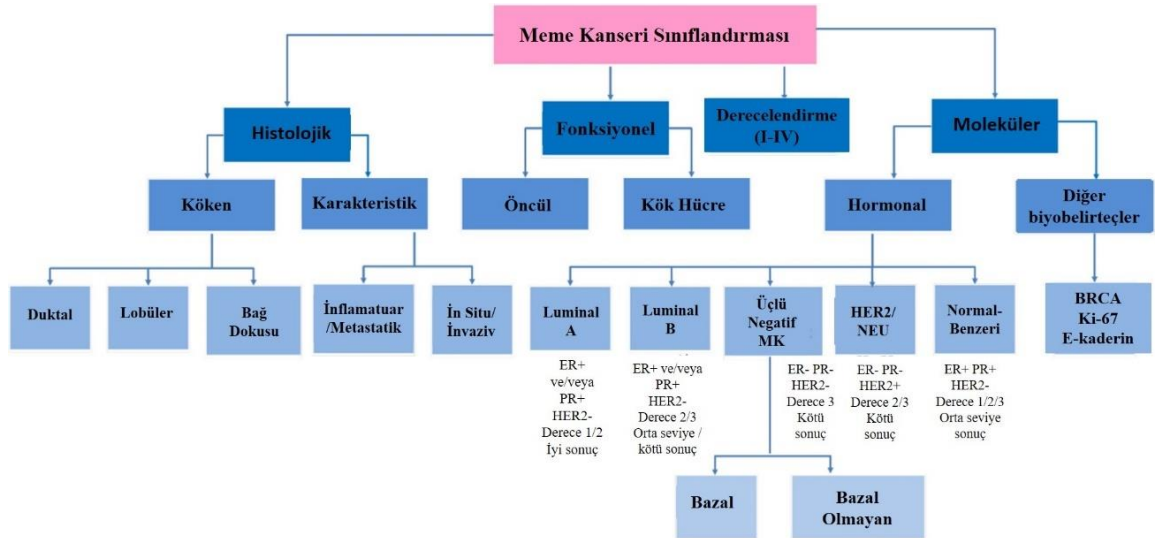
mutasyonlar bulunmaktadır. Bu genlerin anormallikleri genetik olabilir ve bu genlerdeki değişikliklere sahip bireyler, meme kanseri riskine maruz kalır ve düzenli tarama testlerine ihtiyaç duyarlar (Kamel & Al-Amodi, 2017). BRCA1, çok işlevli bir proteindir ve BRCA1 mutasyonları sırasında ortaya çıkan önemli etkilerden biri, DNA onarımının kaybıdır. DNA onarımı fonksiyonunun yanı sıra, BRCA1 son zamanlarda meme kanseri hücrelerinin invazyonunu düzenleyen bir molekül olarak da tanımlanmıştır. Bu molekül, DNA çift zincirli kırıklarının onarımı, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre döngüsünün kontrolü, apoptoz ve kemoterapiye direnç gibi süreçlerle ilişkilidir (Concolino et al., 2018). İnvazyon, hücrelerin birincil bölgeden ikincil bir bölgeye yayılmasını ifade eder ve hastalığın ne kadar agresif olduğunu ve derecesini belirleyen önemli bir olaydır. Bu bağlamda, BRCA1'in kanserli hücrelerde ekspresyonu yapılan ve metastazı artırdığı bilinen membran protein kompleksi olan Ezrin, Radiksin ve Moesin'in düzenlenmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Sengodan et al., 2018). BRCA2 geni de BRCA1 gibi, homolog rekombinasyon yoluyla çift iplikli DNA hasarlarının onarımı için gerekli olan tümör baskılayıcı bir genidir (Narod & Salmena, 2011). BRCA2 geni, kalıtsal kanser vakalarının %35-40'ından sorumlu tutulmaktadır (Kumar et al., 2013). Araştırmalar hem BRCA1 hem de BRCA2 genlerinde mutasyon tespit edilen ve 70 yaşın altında olan kadınlarda meme kanseri riski yaklaşık %80 olarak belirlenmiştir. Sadece BRCA1 geninde mutasyon taşıyan kadınlarda ise meme kanseri gelişme riski %60 olarak belirtilmiştir. TP53, DNA hasarı oluştuğunda seviyeleri artan ve apoptozu veya hücre döngüsünün durmasını tetikleyen bir proteindir (Haydaroglu & Ozyigit, 2013). TP53 geni, tümör baskılayıcı protein olan p53'ü kodlar ve meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. Bu gen, invaziv erken evre meme kanserlerinin %30-35'inde mutasyona uğramaktadır (Duffy et al., 2018). TP53 genindeki yapısal mutasyonlar, tüm meme kanseri vakalarının %30'unda ve üçlü negatif meme kanseri vakalarının %80'inde görülmektedir (Yamaguchi et al., 2018).

Ailede meme kanseri öyküsü, meme kanseri gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Özellikle annenin veya kız kardeşin meme kanseri öyküsü olan bir kadının meme kanseri geliştirme riski yüksektir (Tablo 2.1.). Hormonal faktörler de meme kanseri riskini artırır. Östrojen hormonu, meme hücresinin üremesini ve çoğalmasını sağlayan bir hormondur (Treeck et al., 2020).

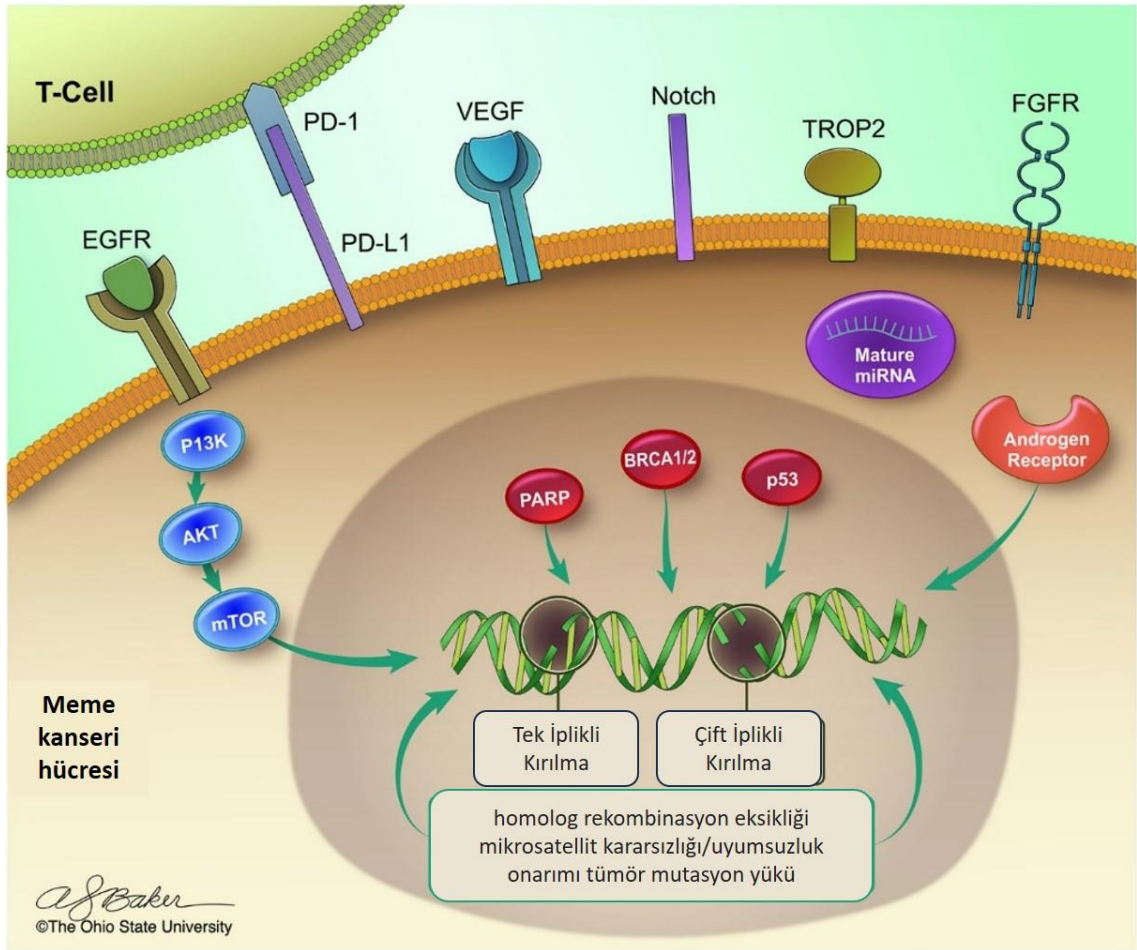
Tablo 2.1. Meme kanseri risk faktörleri.

Risk Faktörleri	
1	Cinsiyet
2	Irk
3	Genetik Etkenler
4	Aile Öyküsü
5	Beslenme
6	Alkol
7	Laktasyon
8	Erken Menarş
9	Geç Menapoz
10	Östrojen Replasmanı
11	Hormon Tedavisi
12	Sosyoekonomik durum
13	Radyasyon

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'nin (HER2) negatif ekspresyonuna sahip bir meme kanseri türü olarak tanımlanır (Şekil 2.3.) (Treeck et al., 2020; Wolff et al., 2013).

**Şekil 2.3.** Meme kanseri sınıflandırılması (Modifiye edilmiştir.) (Durrani et al., 2021).

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %15'i üçlü negatif meme kanserleridir (TNBC'ler), meme kanseri ölümlerinin %50'sinden fazlasından sorumludurlar (Morris et al., 2007; Yin et al., 2020). TNBC'ler genç hastalarda daha sık görülür ve tümörlerin boyutu genellikle daha büyüktür (Dent et al., 2007). Üstelik, TNBC'ler diğer meme kanseri türlerine göre daha agresif bir klinik gidişata sahiptir ve tanı anında genellikle daha yüksek dereceli olup, sık lenf nodu tutulumu vardır (Şekil 2.4.) (Dent et al., 2007; Haffty et al., 2006; Morris et al., 2007; Treeck et al., 2020). Metastatik TNBC'li kadınların üçte birinden azı 5 yıl hayatta kalabilmekte ve adjuvan kemoterapiye rağmen hemen hemen hepsi hastalıkları sebebi ile ölmektedir (Dent et al., 2007; Treeck et al., 2020).



Şekil 2.4. Üçlü negatif meme kanserinde sinyal iletimi ve tümör oluşumunun temel mekanizmaları (Modifiye edilmiştir.) (Sukumar et al., 2021).

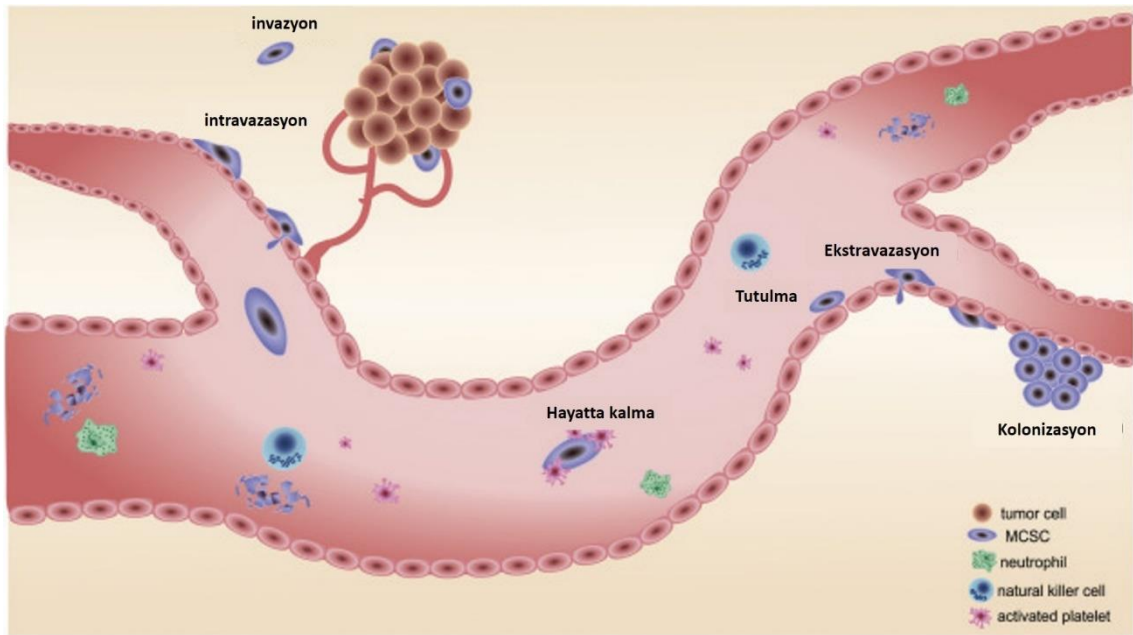
2.2. Metastaz

Metastaz, tümör hücrelerinin birincil bölgeden vücut içindeki yeni bir ikincil bölgeye tanımlanmış birkaç aşamayı içeren bir süreçle yayılmasıdır (N. Singh et al., 2019). Primer tümörden dökülen milyonlarca hücreden kanser hücrelerinin yaklaşık %90'ı metastazın erken aşamalarından birini veya birkaçını tamamlama kapasitesine sahiptir ve bu hücrelerin yaklaşık %2'si mikro-metastatik büyüme oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, bu hücrelerin yalnızca %0,01'inin tam makro-metastatik tümörler üretmek için tüm metastatik döngü boyunca hayatta kalabildiği gösterilmiştir, bu durum bu karmaşık hastalığın verimsiz doğasını ortaya koymaktadır (M. Singh et al., 2018) Bu nadir metastatik hücre popülasyonunun, kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) bir alt grubu olduğu teorize edilmiştir (Babaei et al., 2021; Pachmayr et al., 2017). Metastaz süreci, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) aracılığıyla, tümör hücrelerinin epitelyal özelliklerini kaybedip mezenkimal özellikler kazanarak vücutta daha kolay hareket etmelerini ve yeni organlara yayılmalarını sağlar. Metastatik hücreler, bitişik kan veya lenfatik damarlara intravaze olmak için lokal neoanjyogenezi başlatır ve hücrelerin trans endotelyal migrasyonda (TEM) kolayca geçebileceği zayıf endotelyal hücre bağlantılarına sahip damarların oluşumuna izin verir. Tümör hücrelerinin yalnızca küçük bir kısmı dolaşım sisteminde hayatta kalıp metastaz yapabilir. Çoğu tümör hücresi, hemodinamik kuvvetler, anoikis ve sitotoksik bağışıklık hücrelerinin saldırısı nedeniyle dolaşımdan temizlenir. Metastatik hücreler, hedef organların damar sistemine ulaştıklarında, damar lümeninde büyüyerek mikro koloniler oluştururlar ve sonunda damar duvarını aşarak parankimal dokuya geçerler. Bu noktada MET (mezenkimal-epitelyal geçiş) süreci başlar ve hücreler dokuda kolonileşir (Reymond et al., 2013; M. Singh et al., 2018). Metastatik kaskad; invazyon, intravazasyon ve ekstrasvazasyon dahil olmak üzere ikincil bir bölgede büyümeye yol açan bir dizi basamaklardan oluşur. Tümör hücreleri normal dokuya, genellikle lenfatik veya kan damarları yoluyla invaze olur. Damara ulaştıktan sonra bu hücrelerin endotel bariyerini geçmeleri ve dolaşıma girmeleri gerekir (Chiang et al., 2016).

Metastatik ilerlemede EMT'nin indüksiyonu, metastatik kanser kök hücrelerin (MCSC) birincil bölgeden vücuda yayılarak hayatta kalmaları için sayısız özellik kazandırabilen bir süreçtir ve MET'in ters süreci, hücrelerin ikincil ortamı kolonileştirmesini sağlayabilir. Bu geçişler, metastatik bir fenotipi teşvik etme nihai

hedefi ile morfoloji, hücre iskeleti, yapışma ve hareketlilikteki çeşitli dinamik değişiklikleri takip eder (M. Singh et al., 2018).

EMT'nin indüksiyonunun ardından MCSC'ler metastatik kaskadı başlatarak, hücre-hücre ve ekstrasellüler matriks (ECM) bağlantısında bozulma meydana gelir aynı zamanda bunların tümör kitlesinden kopmasına çevredeki dokuya göç etmesine olanak tanıyacaktır (Şekil 2.5.).

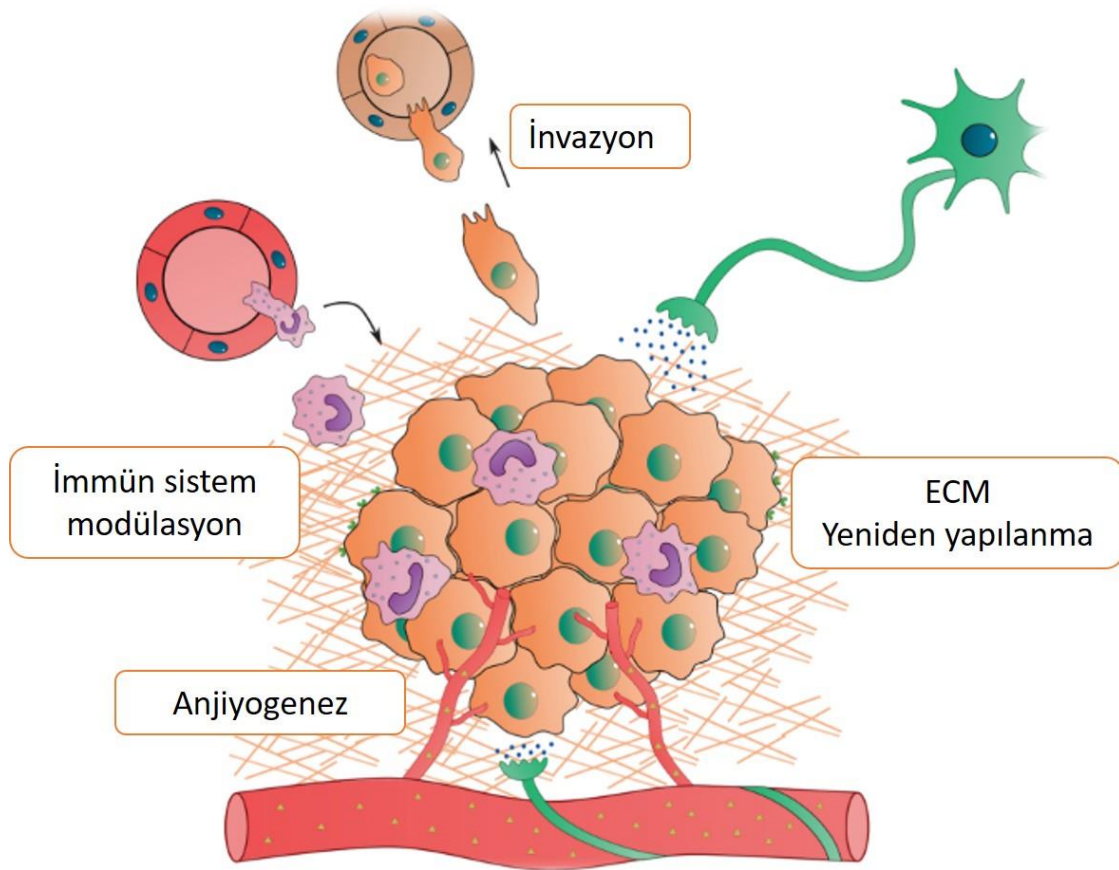


Şekil 2.5. Metastaz Aşamaları (Modifiye edilmiştir.) (M. Singh et al., 2018).

2.2.1. İnvazyon

EMT sürecinde, hücre yüzeyinde belirgin değişiklikler meydana gelir; hücreler arasındaki adezyon, hücrelerin ekstrasellüler matrikse (ECM) bağlılığı çözülür ve hücrelerin polaritesi kaybolur. Bu durum, komşu hücrelerle olan temasın zayıflamasına ve hücrelerin bazal membranı ve lamina propria'yı aşarak bağ dokusuna sızmasına yol açar (Şekil 2.6.)(Shankar & Nabi, 2015). Bazal membran, integrin aracılı hücre-matriks adezyonlarının sinyal iletiminde önemli bir rol oynar ve bu nedenle invazyon sürecinde kritik bir öneme sahiptir(Valastyan & Weinberg, 2011). EMT sürecinde, protein kinaz C (PKC) yolunun aktivasyonu veya belirli onkojenik mutasyonlar, okludin ve claudin proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olabilir; bu da sıkı bağlantıların geçirgenleşmesine yol açar (Kyuno et al., 2021; Lamouille et al., 2014). Kanser

hücrelerinde EMT'nin merkezi bir özelliği, geçiş sürecinde E-kaderin ekspresyonu kaybolurken, N-kaderin ekspresyonunda artış görülür. E-kaderin ekspresyonundaki kaybolma epitel hücreleri arasındaki bağlantıların, apiko-bazal hücre polaritesinin ve epitel doku yapısının bozulmasına neden olurken, N-kaderin ekspresyonundaki artış ise kanser hücrelerinin primer dokudan serbestleşmesini, invaziv kapasite kazanmasını kolaylaştırır. Bu olaya ise literatürde 'kaderin anahtarı' veya 'kaderin değişimi' olarak adlandırılmış ve tümörün invazivliği ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Özkara et al., 2020). Meme, pankreas, akciğer ve mesane gibi kanser hücre hatlarında yapılan araştırmalar, normal E-kaderin ekspresyonu gösteren hücrelerin epiteloid bir fenotip sergileyip invaziv olmadığını, buna karşın düşük E-kaderin ekspresyonu gösteren hücrelerin ise fibroblast benzeri bir fenotip gösterdiğini ve invaziv olduğunu ortaya koymuştur (Farahani et al., 2014; Gheldof & Berx, 2013). Ayrıca, ECM (ekstraselüler matriks) degradasyonunu sağlayan Matriks Metalloproteinaz (MMP) proteinlerinin, tümör hücreleri tarafından salgılanarak ECM'i aşmalarına ve stroma içine geçmelerine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Burada tümör hücreleri çoğalmaya devam eder (Farahani et al., 2014; Gheldof & Berx, 2013; Özkara et al., 2020; Sökeland & Schumacher, 2019).

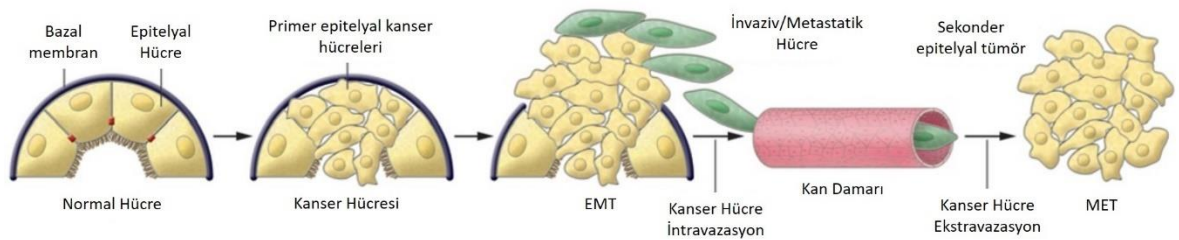


Şekil 2.6. İnvazyon (Modifiye edilmiştir.) (Conceição et al., 2021).

2.2.2. İnvazyon

Metastatik kaskaddaki bir sonraki adım, kanser hücrelerinin kan veya lenfatik dolaşıma girmesidir (Şekil 2.7.). Tümör hücrelerinin salgıladığı MMP-1, -2 ve -9 ile birlikte proteolitik ürokinaz-tip plazminojen aktivatör sisteminin (uPA/uPAR) aktivasyonu sayesinde, hücrelerin kan ve lenf damarlarına girmesi sürecine “invazyon” denir (Pachmayr et al., 2017). Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör (uPA) sistemi, bir serin proteaz olan uPA ve bunun yüzey reseptörü uPAR'dan oluşur. Serpin plazminojen inhibitörleri PA-1 ve PA-2, uPA aktivitesini sıkı bir şekilde inhibe etmek için uPAR'ı geri döndürülemez şekilde bağlar. Metastazda uPA'nın aşırı üretimi, inhibitörlerin üstesinden gelebilir ve uPA'nın proteoliz, hücre sinyali, hayatta kalma ve anjiyogenez yoluyla ECM'nin yeniden şekillenmesine aracılık etmesine olanak tanır (Brooks et al., 2010). İnvazyon sırasında kanser hücreleri endoteli geçer ve birincil bölgeyi terk ederek kan dolaşımına girer. Tümör hücreleri bu süreçte tek başına hareket

edemez, bunun yerine ECM ve tümör mikro ortamını (TME) oluşturan çevredeki normal hücrelerle etkileşime girmek zorundadır (Tomasik et al., 2023). Tümör kaynaklı anjiyogenez ve lenfanjiyogenez, tümör büyümesinin ve metastazın desteklenmesinde önemli bir rol oynar (Sundar & Ganesan, 2007). Devam eden tümör büyümesi sıklıkla neovaskülarizasyonla ilişkilidir. İntratümöral hipoksi, anjiyogenezi indükleyen vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunu artırır, hücre yayılması için gerekli yolları sunar, vasküler bütünlüğü ve geçirgenliği değiştirir ve intravazasyon ve ekstravazasyonu teşvik eder (Gilkes & Semenza, 2013). İntravazasyon, tümör hücrelerinin perisit ve endotel bariyerlerini aşmasını kolaylaştıran TGF- β ve VEGF gibi moleküller tarafından hızlandırılır (Reymond et al., 2013; Sökeland & Schumacher, 2019). VEGF gibi moleküller, anjiyogenez sürecini başlatarak yeni damarların oluşmasını sağlar ve bu sayede tümör hücrelerinin daha fazla besin ve oksijen almasına olanak tanır (Hanahan & Weinberg, 2011c). Hipoksi, anjiyogenez ile ilgili moleküler yolları tetikleyen bir faktördür. Hipoksik koşullarda aktive olan hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1), anjiyogenez uyarıcı faktörleri, anaerobik metabolizmayı, hücre hareketliliğini ve apoptoza karşı direnç sağlayan faktörleri aktive eder. Ayrıca HIF-1, tümör hücrelerinin organ spesifik yayılımını destekleyen bir kemokin reseptörü olan CXCR4 gen ekspresyonunu artırır ve kollajen metabolizmasında önemli rol oynayan lizil oksidaz (LOX) enzimi ile etkileşir (Erler et al., 2006; Kozłowski et al., 2015).



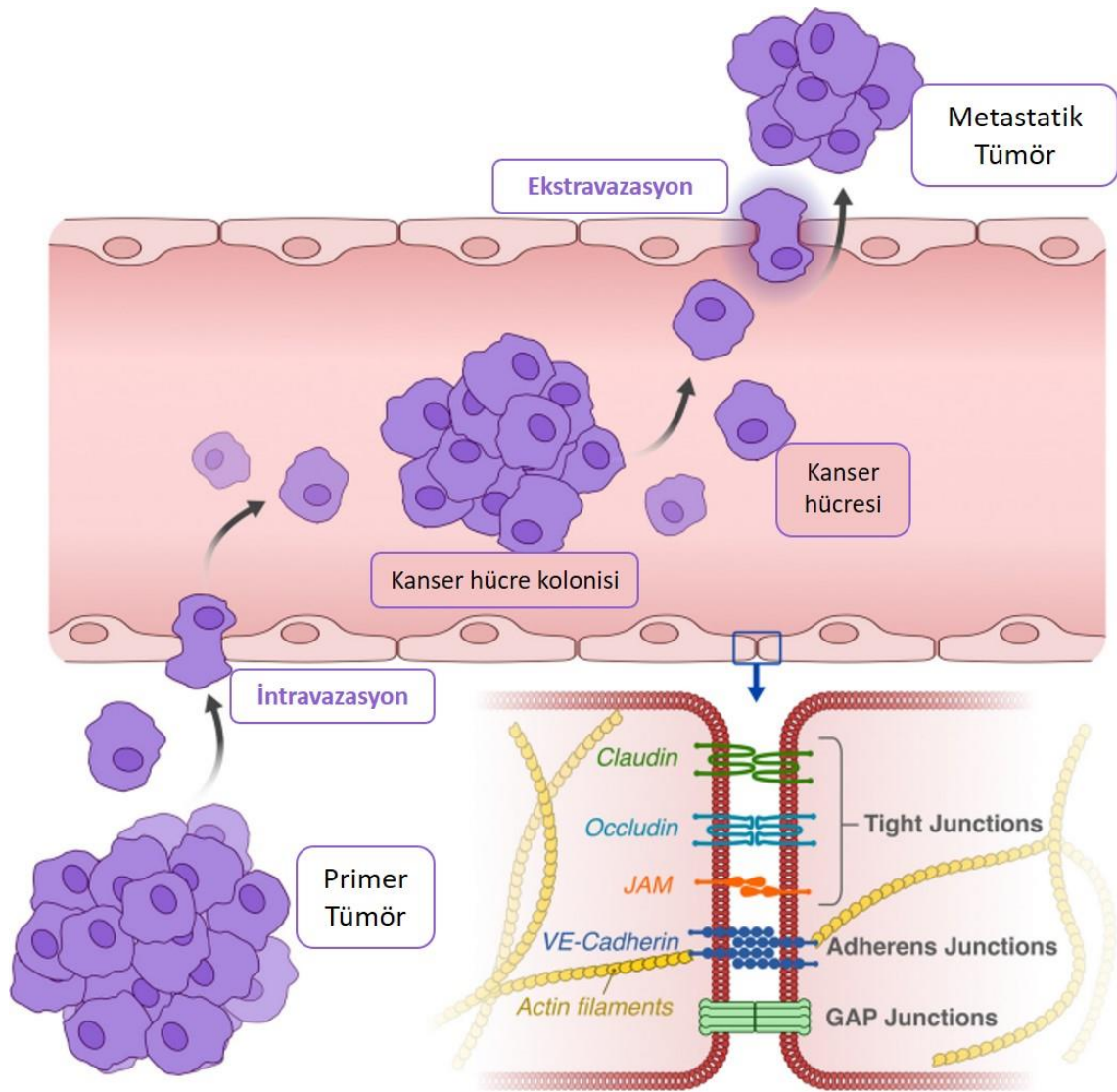
Şekil 2.7. İntravazasyon (Modifiye edilmiştir.) (Kalluri & Weinberg, 2009).

Endotel bariyerinden geçiş aktif veya pasif göç ile sağlanır. Aktif göç sırasında, TEM'i ve intravazasyonu teşvik etmek için metastatik hücre veya çevresindeki stromal hücreler tarafından çeşitli enzimler salgılanır (Brooks et al., 2010). Pasif göç, hücrelerin proteolitik aktivite olmadan bariyerlerden kayabildiği ameboid istilasının tipik bir örneğidir. Kasılma aktin-miyozin çekirdek ağları, hareketli kuvvetlerin üretilmesi için hayati öneme sahiptir. Yüksek RhoA/ROCK aktivitesi, hücresel kontraktiletiyi, büyük

hücre deforme edilebilirliği üretecek bir dereceye kadar korur ve hücrenin hücre iskeletini, hücreler arası boşlukların arasına ve çevresine sıkıştırarak şekilde kökten ayarlamasına olanak tanır (Friedl & Wolf, 2003). Katepsinler, tek başına bazal membran (BM) ve ECM bileşenlerini bozabilen ve aynı zamanda uPA'yı aktive edebilen matriks proteazlardır. Bunların endojen inhibitörleri olan sistatinlerle etkileşimleri katepsinlerin proteolitik aktivitesini düzenler, ancak ekspresyon veya dağılıma bağlı olarak inhibitör-katepsin oranlarındaki değişiklik, katepsinlerin EMT'deki fonksiyonel rollerini destekler (Brooks et al., 2010).

2.2.3. Ekstravazasyon

Ekstravazasyon, CSC'lerin dolaşımdan çıkıp distal dokuya girdiği süreçtir. CSC'ler, hedef belirleme mekanizmaları ve dolaşım yollarının bir kombinasyonu yoluyla uzak organların damar yapısında lokalize olacaktır (Strilic & Offermanns, 2017). Ekstravazasyon sırasında, CSC'ler mikrokapillerler içinde tutulur ve transendotelial göçe maruz kalabilecekleri vasküler endotelial hücrelerle birleşir (Şekil 2.8.). CSC'ler ya küçük çapları nedeniyle kılcal yatakta fiziksel olarak sıkışık kalabilirler ya da CSC'ler, endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve trombositler üzerindeki transmembran reseptörleri yoluyla endotele aktif olarak yapışabilirler (Kai et al., 2019). Araştırmalar, dolaşımdaki metastatik hücrelerin, kendilerine benzer boyuttaki kılcal damarlarda yavaşladığını ve genellikle endotel boyunca yuvarlandığını göstermiştir. E-selektin ve ilgili ligandların, kök hücre benzeri kanser hücreleri (CSC'ler) üzerindeki ekspresyonu, endotel boyunca göç etmelerine katkıda bulunur. CSC'lerin endotele bağlanması, metastatik hücrede ifade edilen integrinler, CD44 ve MUC1'in endotel hücrelerinde bulunan selektinlere, hücreler arası yapışma molekülü (ICAM1) ve galektin 3'e bağlanması ile sağlanır (Stoletov et al., 2010). CSC'ler, endotel hücre bağlantılarının açılmasını tetiklemek amacıyla sinyal yollarını aktive eden faktörler salgılar ve bu süreç, epitelyal-mezenkimal geçiş sürecini başlatır. Örneğin, erken EMT aşamasında görüldüğü gibi, metastatik hücrelerin VEGF veya TGF- β 1 salgılaması, endotel hücreleri arasındaki E-kaderin- β -katenin kompleksini bozar (Miles et al., 2008). Bu durum, ECM'yi işgal etmek için intravazasyon benzeri hücre iskeleti yeniden düzenlemelerine yol açar (Reymond et al., 2013).



Şekil 2.8. Ekstravazasyon mekanizması (Modifiye edilmiştir.) (Di Russo, 2024).

2.2.4. Kolonizasyon

Metastatik süreçte, daha önce gerçekleşmiş olan EMT'nin tersine dönmesiyle MET süreci başlar ve tümör hücreleri, organda makro koloniler oluşturarak çoğalır (Sökeland & Schumacher, 2019). MET, metastatik hücrenin epitelyal özelliklerini yeniden kazanarak yeni ikincil ortama uyum sağlaması ve bu ortamda yerleşip yayılmasını ifade eder (M. Singh et al., 2018). Kanser hastalarının %50'sinde makroskopik metastazlar gelişir. Bu mikrometastazlar, farklı dokulara yayılabilir ve zamanla makroskopik metastazlara dönüşebilir (Pachmayr et al., 2017).

2.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş

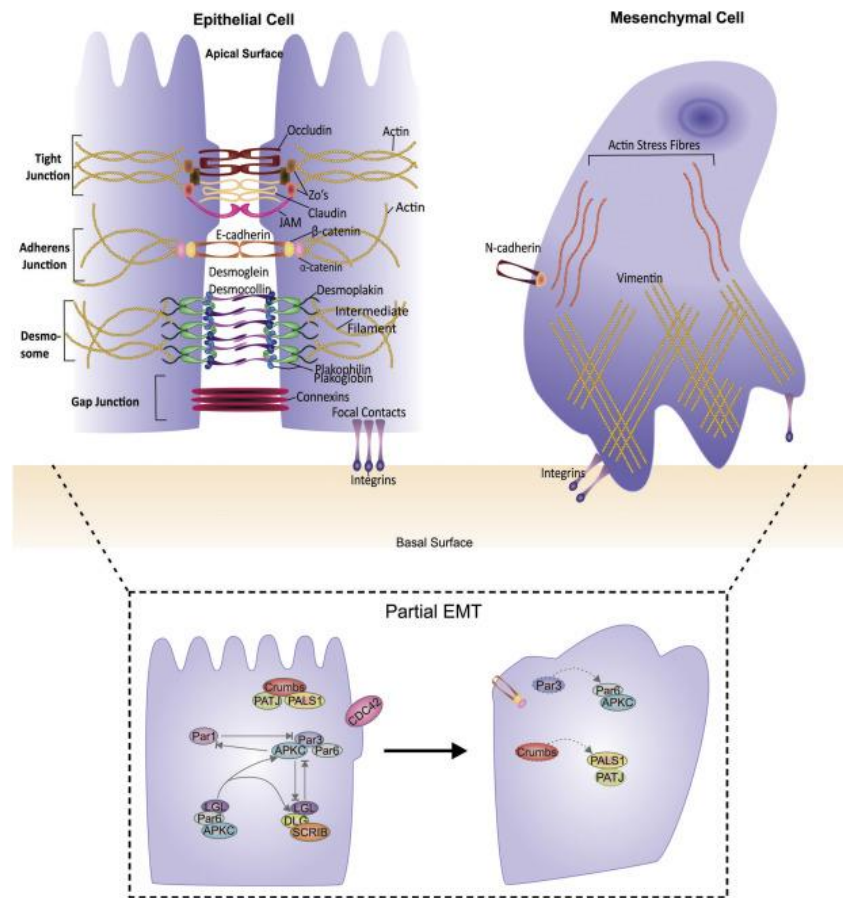
Epitelyal-mezenkimal geçiş, epitelyal karakterdeki hücrelerin epitelyal fenotiplerini kaybettiği ve mezenkimal karakterdeki hücrelerin özelliklerini kazandığı geri dönüşümlü bir süreçtir (Sha et al., 2019). EMT'nin kökeni, epitel hücrelerinde apikal-bazal polaritenin kaybıyla ilişkilidir. EMT embriyonik gelişim, doku onarımı ve hücre sel temel yapının korunmasında gerekli bir fizyolojik süreçtir. Bununla birlikte, patolojik bir süreçte, uygunsuz şekilde düzenlenen EMT, kanser hücreleri tarafından ele geçirilir ve karsinogenez ve fibrozda önemli bir rol oynar (Basu & Ghosh, 2022; Liu et al., 2023; Marconi et al., 2021). EMT sürecinde epitel hücreleri, hücre bağlantılarının parçalanması ve yapısının bozulması nedeniyle yavaş yavaş hücre-hücre bağlantılarını kaybeder ve zamanla mezenkimal hücrelerin belirli özelliklerini kazanırlar (Illam et al., 2017). Bu mezenkimal hücreler, gelişmiş göç kabiliyeti ve hücre ölümü sinyallerine karşı direnç gösterir. EMT gerçekleşen kanser hücrelerinin hem morfolojisi hem de hareketi değişir, buna artan istila ve metastaz potansiyelinin yanı sıra tedavi direnci de eşlik eder (Xu et al., 2022). Bu nedenle EMT son yıllarda kanser tedavisinde ileriye yönelik bir hedef olarak ortaya çıkmıştır. Kanser hücrelerinin EMT sürecini önlemek, kanser tedavisinde çekici bir strateji haline gelmiştir.

Klasik EMT, epitel hücrelerinin hücre-hücre bağlantılarını kaybettiği ve mezenkimal özellikler kazandığı moleküler bir süreç olsa da EMT sırasında hücre proliferasyonu, apoptoz ve immün baskılama dahil olmak üzere EMT ile ilişkili çeşitli değişiklikler meydana gelir (Pastushenko & Blanpain, 2019). Bu değişiklikler çoğunlukla, EMT'nin yürütülmesinde önemli roller oynayan Akt2 ve TWIST1 dahil olmak üzere EMT transkripsiyon faktörleri (EMT-TF) tarafından tetiklenir ve düzenlenir (Taki et al., 2021). Hücre dışı sinyaller (TGF β , EGF, PDGF, VEGF, WNT ve Notch), çevresel faktörler (UV ışığı veya alkol) ve tümör mikroçevresindeki hipoksi gibi patolojik durumlar EMT-TF'leri aktive edebilir. EMT-TF'ler, klasik EMT'de açıklandığı gibi hücre-hücre adezyonunu, hücre göçünü ve hücre dışı bozulmayı düzenler; üstelik, bu TF'leri aynı zamanda hücre proliferasyonu, apoptoz, canlılık ve immüno supresyon gibi diğer hücre sel fonksiyonlarda yer alır; bu, EMT-TF'lerin kanser başlangıcında, metastazda ve terapi direncinde pleiotropik roller oynadığını ve hem epitelyal hem de

epitelyal olmayan tümörlerde kötü prognosis ile ilişkili olduğunu gösterir (Taki et al., 2021).

2.3.1. EMT ve kanser ilişkisi

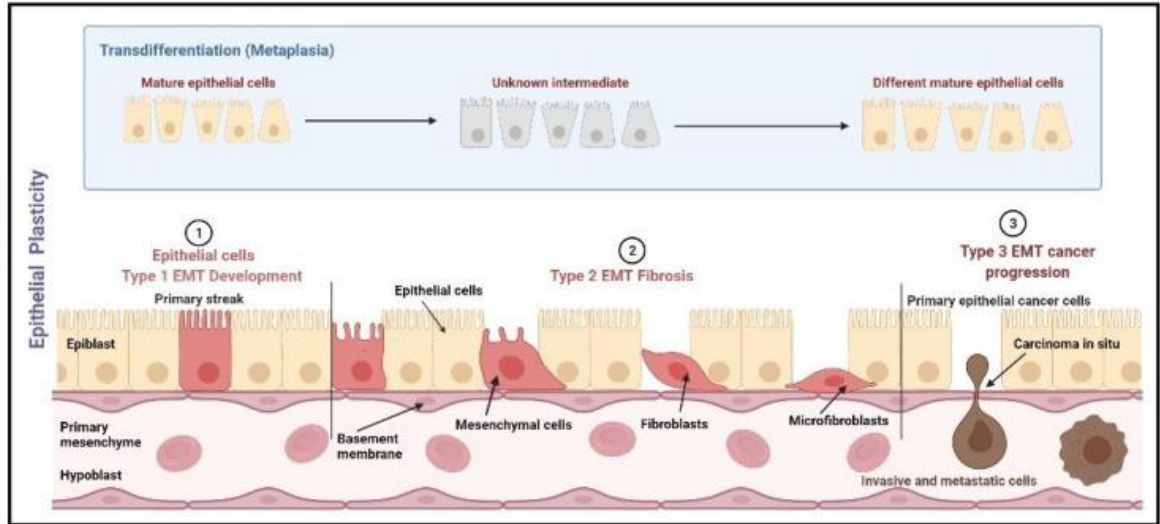
EMT programının kanserdeki rolü tartışmalıdır. Tümör mikroçevresi, kanserle ilişkili fibroblastlardan, endotelial hücrelerden ve çeşitli tipte bağışıklık hücrelerinden oluşur. Primer tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazında EMT ve mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) gibi geçiş durumlarında kanser hücresi kimliği ve plastisitesi gereklidir. EMT, MET ve kısmi durumun fonksiyonel rolleri, tümörün tipine, yayılma durumuna ve metastatik kolonizasyon derecesine göre değişebilir (Şekil 2.9.). Bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere hücrelerin çoğu, tümörün ilerlemesi için EMT'yi düzenlemek üzere sitokinler ve kemokinler salgılar. EMT gerçekleşen tümör hücreleri, tümör mikroçevresinin immünoşüpresif durumunu baskılamak için immünoşüpresif sitokinler veya kemokinler de üretebilir, bu da kanser gelişimine katkıda bulunur (Bakir et al., 2020; Taki et al., 2021).



Şekil 2.9. EMT Molekülleri (M. Singh et al., 2018).

EMT sürecinde hücreler epitelyal karakterlerini kaybederek mezenkimal karakter kazanmaya başlarlar. Epitel hücrelerinin genel şekli düz ve çokgendir. Hücresel yapı, aktin hücre iskeleti, bir mikrotübül ağı ve yapıyı sağlamak ve hücre şeklini şekillendirmek için sinerjistik olarak çalışan ara filamentlerden oluşur (Axelrod et al., 2006). Aktin filamentleri, uzun ve ince lifler şeklinde polimerize olan, hücreye hem mekanik hem de kasılma gücü sağlayan ve transmembran proteinleriyle bağlantı kuran globüler aktin monomerlerinden oluşur. Mezenkimal hücreler, epitelyal hücrelerin aksine, göç etme ve dokuları istila etme yeteneklerine sahip özellikler gösterir. Bu hücreler, homojen bir bileşime veya hücresel yapışmaya sahip değildir ve önden arkaya doğru polarite sergilerler. Morfolojik olarak düzensiz olan mezenkimal hücreler, uzun, iğ benzeri bir şekil alarak daha az katı topolojik işlevselliğe olanak tanır (Pasquier et al., 2015). Aktin filamentleri, stres lifleri halinde düzenlenir ve çeşitli hareket türlerini destekleyen, aktin açısından zengin yeni membran projeksiyonları oluşturur. Ayrıca, hücre iskeletinin dayanıklılığını artırmak amacıyla, keratinler aşağıya doğru ve vimentinler yukarıya doğru düzenlenir; bu düzenleme, hücre iskeletini daha esnek hale getirir ve göç sırasında hasara karşı direncini artırır (M. Singh et al., 2018).

Farklı işlevlerden sorumlu olan üç tip EMT tanımlanmaktadır. Tip 1 EMT; implantasyon, embriyogenez ve organogenez sırasında, Tip 2 EMT; yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve organ gelişimi sırasında ve Tip 3 EMT ise tümör metastazı sırasında gerçekleşir (Şekil 2.10.). Diğer EMT türlerinde gözlemlenen hafif ve düzenli hareketlerin aksine, tümör oluşumunda EMT genellikle agresif ve kontrolsüz bir şekilde gerçekleşir. Kanserin ilerlemesinde hem EMT'nin hem de ters MET'in kazanılması, metastatik yayılım gösteren tümör hücrelerinin belirgin bir özelliğidir ve bu süreçler kanserin ilerleyişinde kritik bir rol oynar (Babaei et al., 2021). EMT, metastatik hücrelerin vücudun ikincil bölgelerine sızmasını ve göç etmesini sağlamak için metastatik ilerleme sırasında erken bir aşamada başlar. Daha sonra, hücrelerin epitel hücre özelliklerine geri dönmesi için MET süreci aktive edilir (Pasquier et al., 2015). Kanseri hücrelerinin metastazının, CSC'ler olarak adlandırılan, kök hücrelerin en karakteristik özelliklerine sahip hücrelerden başladığını gösteren önemli kanıtlar vardır (Babaei et al., 2021; Tang et al., 2016).

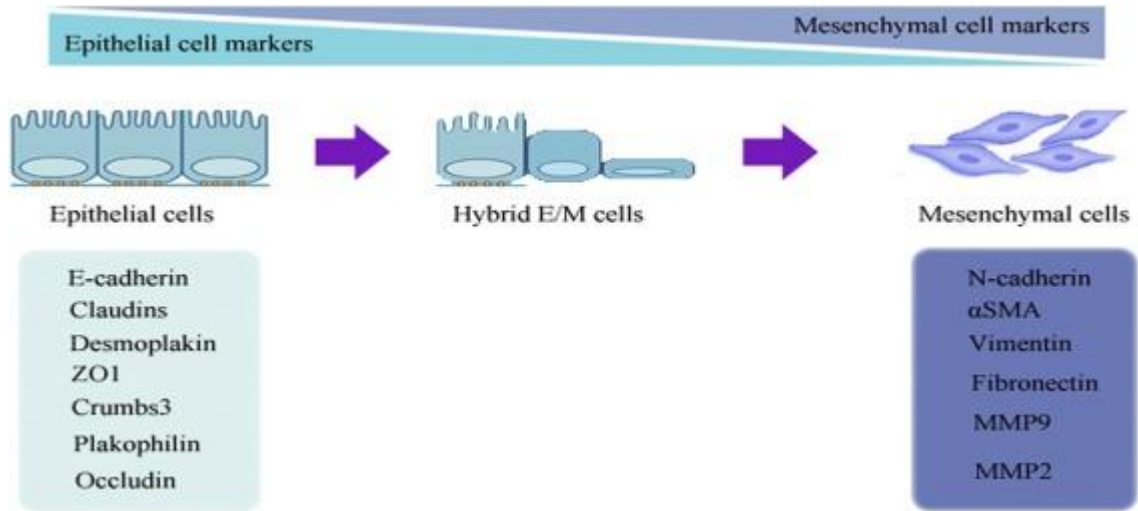


Şekil 2.10. EMT tipleri (Kalluri & Weinberg, 2009).

2.3.2. EMT belirteçleri

Epitelyal hücre-hücre bağlantıları doku bütünlüğünü sağlar ve hücre polaritesini destekler (Pérez-Moreno et al., 2001). Bağlantı kompleksi sıkı bağlantılardan, yapışkan bağlantılardan ve desmozomlardan oluşur (Şekil 2.11.) (Tsukita et al., 2001; Wheelock & Johnson, 2003). Yapışkan bağlantı noktaları, tüm bağlantı kompleksinin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve yapışkan bağlantı noktalarındaki ana yapışma molekülleri kaderinlerdir. Epitel hücreleri bir doku içindeki göreceli pozisyonlarını değiştirdiğinde hareketli hücreler haline gelirler, hücre-hücre bağlantıları bozulur ve aktin hücre iskeleti yeniden düzenlenir (Boyer et al., 2000; Gumbiner, 2005; Keller, 2002).

EMT süreci, epitel hücrelerinin polarizasyonu ve mezenkimal özellikler elde etmek için epitel belirteçlerinin (α -katenin, E-kaderin ve γ -katenin) düşük ekspresyonu ile sıkı bağlantının gevşemesi, mezenkimal belirteçlerin, fibronektin, N-kaderin (CDH2) ve vimentinin yüksek ekspresyonu yani yüksek hareketlilik, invazivlik ve programlanmış hücre ölümü direnç ile başlar (Kalluri & Weinberg, 2009).



Şekil 2.11. EMT biyobelirteçleri (Babaei et al., 2021).

2.3.2.1. E-Kaderin

Kaderinler, Ca^{2+} ya bağımlı bir şekilde spesifik hücre-hücre yapışmasına aracılık eden, çeşitli organların morfogenezinde anahtar moleküller olarak işlev gören geniş bir transmembran veya membranla ilişkili glikoprotein ailesini içerir. Kaderin ailesi en az beş ana alt aileden oluşur. Bunlar, tip I klasik kaderinleri, yakından ilişkili tip II kaderinler, dezmozomal kaderinler (desmokollinler ve desmogleinler), protokaderinler ve kaderinle ilgili çeşitli moleküllerdir (Hulpiau & van Roy, 2009; Redies et al., 2005; Van Roy & Berx, 2008). Bir tip-I kaderin olan E-kaderin, erken dönem yapısı nedeniyle genel olarak tüm kaderinlerin prototipi olarak kabul edilir. E-kaderin (E-CAD), morfogenez, dokunun yeniden şekillenmesi ve doku bariyerlerinin korunması için vazgeçilmezdir. Bu molekül bir invazyon baskılayıcı olarak kabul edilir (Corso et al., 2018). Kaderinler, hücre dışı alanları aracılığıyla hücre-hücre yapışmasına aracılık eder ve sitozolik alanları aracılığıyla kateninlerle birleşerek aktin hücre iskeletine bağlanır. Epitel hücreleri tipik olarak E-kaderini eksprese ederken mezenkimal hücreler, N-kaderin, R-kaderin ve kaderin-11 dahil olmak üzere çeşitli kaderinleri eksprese eder (Na et al., 2020).

Kaderinler, embriyonik gelişim sırasında hücre polaritesinin ve hücre sınıflandırmasının oluşturulmasında önemlidir (Wheelock et al., 2008). E-kaderin proteini, tümör metastazında önemli bir role sahip olan bir tümör baskılayıcıdır (Bracke et al., 1996), ancak karmaşık rolü nedeniyle bunu terapötik müdahale için hedeflemek

zordur (Na et al., 2020). EMT sırasında E-kaderin ekspresyonu kaybının sıklıkla kanser hücrelerinin ayrışmasına ve invazyonuna izin vererek metastazı teşvik ettiği düşünülmektedir (Hanahan & Weinberg, 2011b; Kang & Massagué, 2004; Valastyan & Weinberg, 2011). Bununla birlikte, epitelyal mezenkimal geçiş sadece E-kaderin ekspresyonunun kaybı ile aşırı basitleştirilmiştir çünkü birçok metastatik hücre hala yüksek düzeyde E-kaderin içerir ve E-kaderin eksprese eden epitel hücreleri, mezenkimal karakterin azalmasıyla, kanserlerde tam bir EMT'ye girmeden invaziv hale gelebilir ve metastaz yapabilir (Bukholm et al., 2000; Hollestelle et al., 2013; Lou et al., 2008; Querzoli et al., 2010). Ayrıca, dolaşımdaki meme tümör hücrelerinin yapışık kümeleri, tek tek tümör hücrelerinden daha metastatiktir ve E-kaderin, istilayı ve metastazı kolaylaştıran kolektif hücre göçü davranışlarında rol oynar (Cheung et al., 2013; Cheung & Ewald, 2016). E-kaderinin, hücre hayatta kalmasının artırılmasından kaynaklanan metastazdaki pozitif rolü de yakın zamanda rapor edilmiştir (Padmanaban et al., 2019).

2.3.2.2. N-Kaderin

Kaderin ailesi, esas olarak çeşitli epitelyal dokularda bulunan ve heterotipik hücreler arasındaki yapışmaya aracılık eden, hücreler arası yapışma moleküllerinin bir sınıfıdır. Bu aile, vücut gelişimi, doku ve organ oluşumu süreçleriyle yakından ilişkili olan çok sayıda yapışma molekülünden oluşur. CDH2 olarak da bilinen N-kaderin, embriyolarda yaygın olarak eksprese edilir. Diğer klasik kaderinlere benzer şekilde N-kaderin, hidrofobik bir transmembran bölgesi, bir hücre dışı bölge ve yüksek oranda korunmuş bir C-terminal hücre içi bölgeden oluşur. Hücre içi alan genellikle p120-katenin, α -katenin ve β -katenin yoluyla hücre iskeleti ile ilişkilidir (Angst et al., 2001). N-kaderin sinir sisteminde geniş çapta eksprese edilir ve nöronal hücrelerin hücreler arası yapışmasına aracılık ederken, diğer normal hücrelerde düşük seviyelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, son yıllarda N-kaderinin meme kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve ürotelyal kanser gibi çeşitli insan malignitelerinde anormal bir şekilde eksprese edildiği bulunmuştur (Drivalos et al., 2016; Hui et al., 2013; Muramaki et al., 2011; Saadatmand et al., 2013; Seo et al., 2008). Kanser hücrelerinde N-kaderinin ekspresyonu, tümör oluşumu ve metastaz ile yakından ilişkilidir (Cao et al., 2019; Sánchez-Tilló et al., 2011). EMT'nin ortak özelliği, N-kaderin ifadesinin yukarı regülasyonunun eşlik ettiği epitelyal kalmodulin (E-kaderin) ifadesinin kaybıdır. Kaderin ekspresyonundaki bu değişiklik, tümör hücrelerinin uzak bölgeleri istila etme ve metastaz

yapma yeteneğini artırır, bu da kötü prognozu öngörür. Anormal N-kaderin ekspresyonunun prognostik etkilerinin ötesinde, N-kaderinin tümör metastazındaki rolü yalnızca ilişkisel değildir. Aslında, çeşitli çalışmalar artan N-kaderin ekspresyonunun, çoklu epitelyal kanser hücre tiplerinin in vitro göç ve invaziv kapasitelerini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, N-kaderin ekspresyonu ile tümörün uzak metastazının kolaylaştırılması, meme kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri ve melanom gibi malignitelerin fare tümör modellerinde in vivo olarak doğrulanmıştır (Hazan et al., 2000; Islam et al., 1996; Klymenko et al., 2017; G. Li et al., 2001; Nieman et al., 1999; Shintani et al., 2006; Tanaka et al., 2010). Bu nedenle N-kaderin, kanser metastazı için önemli bir biyobelirteç görevi görebilir.

2.3.2.3. Fibronektin

Fibronektin, integrinlere ve diğer ECM proteinlerine bağlanan bir hücre dışı matriks (ECM) proteindir (Lieverse et al., 2020). 230-250 kDa ağırlığında iki küçük monomerden oluşan, 440 kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir. Embriyogenez sürecinde fibronektin, yapısal bir iskele olarak hayati bir rol oynar (de Almeida et al., 2016; Pulina et al., 2011). Fetal gelişimin erken döneminde, fibronektin birikimi oldukça dinamiktir ve farklı kaynaklar bu molekülü salgılayıp uzaklaştırır (Pulina et al., 2011). Kanser sürecinde fibronektinin yönelimi ve tümör yanlısı bir şekilde iskele görevi görüp göremeyeceği Erdoğan ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır (Erdogan et al., 2017). Çalışmanın sonucunda tümör invazyon bölgelerinde fibronektinin anizotropik lifler halinde organize olduğunu göstermişlerdir. Bu lifler birçok farklı yönde tümör dışına doğru uzanır ve hücreleri birincil tümör bölgesi dışına çekmesi için gerilme desteği sağladığını görmüşlerdir (Erdogan et al., 2017). Fibronektin, hücre-matriks ve hücre-hücre yapışması, hücre göçü, morfogenez, farklılaşma ve onkogenik transformasyonda önemli roller oynar (Ioachim et al., 2002). Meme ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde PI3K/Akt yolunu, integrin reseptörü $\alpha 5\beta 1$ 'e bağlanarak aktive ettiği bilinmektedir (Han et al., 2006; Korah et al., 2004). Epitelyal kanser hücrelerinde EMT süreci sırasında yukarı regüle edilen fibronektin, kanserin EMT fenotipinin saptanması için mezenkimal bir belirteç olarak kullanılmıştır (Feroni et al., 2012; C. O. Sung et al., 2011).

2.3.2.4. Matriks metalloproteazlar (MMP-9)

Matriks metalloproteazlar (MMP), tüm BM ve ECM moleküllerini parçalayabilen çinko ve kalsiyuma bağımlı endopeptidazlardır (Murphy & Nagase, 2009). Omurgalılarda meydana gelen 28 MMP'den 24'ü insanlarda bulunur (Cui et al., 2017; Jackson et al., 2010; Mittal et al., 2016). Dizi benzerliklerine, alan organizasyonuna ve substrat spesifikliğine göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, transmembran tip I, transmembran tip II, glikosilfosfatidilinositol bağlantılı (GPI bağlantılı) ve diğer MMP'ler olarak sınıflandırılabilirler (Cui et al., 2017; Gonzalez-Avila et al., 2019; Jackson et al., 2010; Mittal et al., 2016; Murphy & Nagase, 2009).

Tümör mikro ortamında, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11 ve MMP-14 dahil olmak üzere çeşitli MMP'lerin aktivitesi, yukarı regüle edilir (Tablo 2.2). Bu MMP'ler tümör çoğalmasına, hayatta kalmasına ve anjiyogeneze katılarak replikasyonun sürekliliğini, invazyon/hücre göçü, bağışıklıktan kaçmayı ve diğer süreçleri mümkün kılar (Cabral-Pacheco et al., 2020; Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2020). Aynı zamanda bu tipteki MMP'ler büyüme faktörünün ektodomainlerini serbest bırakarak, büyüme faktörlerinin biyoyararlanımını düzenler. Bu durum ise hücre çoğalmasıyla ilgili sinyal yollarını düzenleyerek tümör hücresi büyümesini kontrol eder (Peschon et al., 1998).

Tablo 2.2. Matriks metalloproteaz tipleri (Niland et al., 2022).

Kollajenazlar	MMP-1,-8,-13,-18
Jelatinazlar	MMP-2, -9
Stromelisinler	MMP-3, -10, -11
Matrilisinler	MMP-7, -26
Transmembran Tip I	MMP-14, -15, -16, 24
Transmembran Tip II	MMP-23
GPI Bağlantılı	MMP-17, -25
Diğer MMP'ler	MMP-12, -19, -20, 27

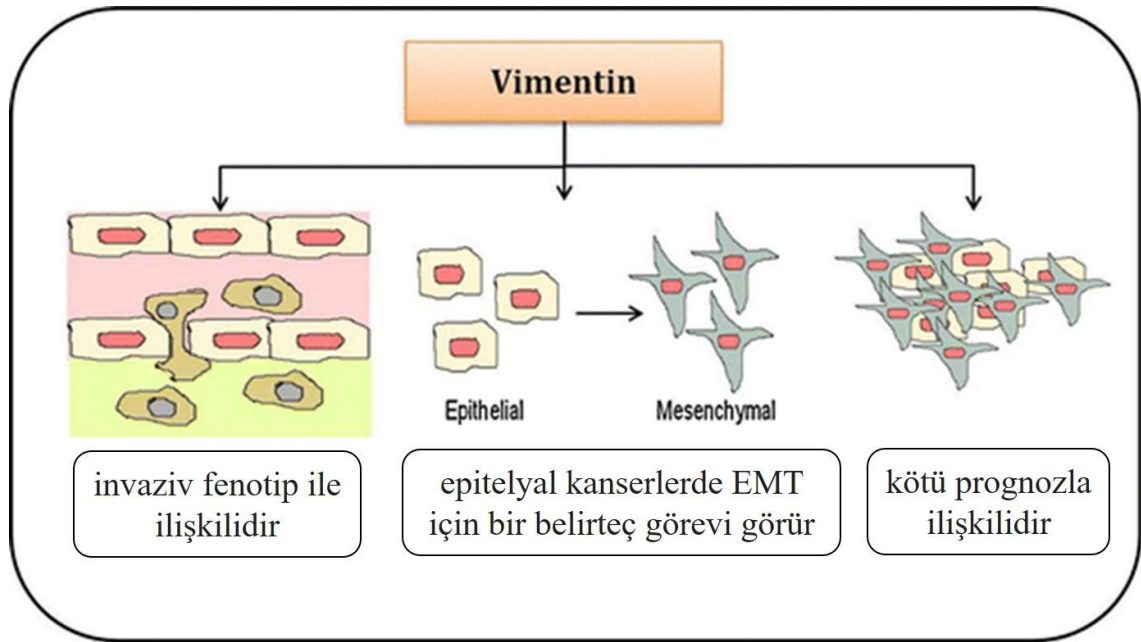
MMP'ler, kanser hücrelerinin vasküler ve lenfatik sistemleri istila etmesi için bir kanal sağlayan ve aynı zamanda metastazı teşvik eden ECM'nin ve bazal membranların protein bileşenlerini bozar (He et al., 2023; Peschon et al., 1998). Artan matriks bozulması ise MMP aktivitesi ile birlikte sıkı bağlantıların ve yapışkan bağlantıların kaybına ve böylece metastaz için temel bir gereklilik olan hücrelerin göç etme ve invazyon yeteneğini artırır (Antony et al., 2019; Quintero-Fabián et al., 2019; Thiery & Sleeman, 2006). EMT'de kanıtlanmış rolü olan MMP'ler; MMP'ler -1, -2, -3, -7, -9, -14 ve -28'dir (Niland et al., 2022). Tümör büyümesi sürecinde MMP'ler yukarı regülasyonu vasküler endotel hücrelerinin geçirgenliğini güçlendirir, böylece hücre çoğalmasını, göçünü ve anjiyogenezi artırır (Setia et al., 2014). Meme kanserinde rol oynadığı en kapsamlı şekilde çalışılan MMP'lerden biri MMP-9'dur. 270 negatif meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada, IHC ile MMP-2 ve -9 boyaması değerlendirildi ve her ikisinin de öncelikle tümör hücreleri tarafından eksprese edildiği ve her ikisinin de daha kısa nüksüz sağkalım için prognostik olduğu bulunmuştur (H. C. Li et al., 2004). MMP-9 en yüksek düzeyde meme kanserinin bazal benzeri moleküler alt tipindeki tümörlerde eksprese edilir; bunların çoğu östrojen, progesteron ve HER2 reseptörü için üçlü negatiftir (Mehner et al., 2014; Yousef et al., 2014). Özellikle, yüksek MMP-9 ekspresyonunun (MMP-11 ile birlikte) üçlü negatif meme kanserinde uzak metastaz ilerlemesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu görülmüştür (Zhao et al., 2013).

2.3.2.5. Vimentin

57 kDa'lık bir protein olan Vimentin, tip III ara filaman (IF) protein ailesinin en yaygın şekilde eksprese edilen ve yüksek oranda korunan proteinlerinden biridir (Şekil 2.12). EMT'nin kanonik bir belirteci olarak büyük önem kazanmıştır (Larsson et al., 2004). Mezenkimal belirteçler arasında, gelişim süreçleri sırasında birçok doku türünde mevcut olan ve hücre-doku bütünlüğünü koruyan tip III ara filaman olan vimentin bulunmaktadır (Coulombe & Wong, 2004). EMT'nin ters süreci sırasında, hücreler epitelyal fenotip edinmeye başlar ve daha düşük motilite oranlarıyla birlikte azalmış bir vimentin ekspresyonu gösterir (Chaffer et al., 2006). Vimentin ekspresyonu, tümör farklılaşmasının nihai aşamalarını ve yüksek tümör invazyon olasılığını ortaya koyan EMT'nin bir göstergesi olarak kabul edilir (Thiery & Sleeman, 2006). Prostat kanseri, meme kanseri, endometrial kanser, merkezi sinir sistemi tümörleri, malign melanom, pankreas, kolorektal ve hepatik kanserler, gastrointestinal tümörler dahil olmak üzere

çeşitli tümör hücre dizileri ve dokularında vimentin ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (Satelli & Li, 2011). Vimentin, hücre iskeletinin bir yapısal proteini olarak genellikle hücrenin sitozolik kısmında bulunması beklenir; ancak, vimentinin hem hücre dışı bir protein olarak hem de nükleer bölgede bulunduğu gösterilmiştir. Traub ve ark. yaptığı bir çalışmada, ara filaman (IF) proteinlerinin sadece sitozolik fonksiyonlara katılmakla kalmayıp aynı zamanda çekirdekdeki belirli DNA, RNA ve histonlar gibi nükleer bileşenler için önemli in vitro afiniteler sergilerler ve yapısal olarak nükleer matriks proteinleri ve transkripsiyon faktörleriyle ilişkilidirler, bu da onların DNA-bazlı nükleer olaylara katıldıklarını düşündürür (Traub & Shoeman, 1994). Daha sonra yapılan bir çalışmada vimentini çekirdeğe taşıyabilen taşıyıcıların araştırılmasında, çeşitli DNA'lara sahip FITC-vimentin kompleksleri, kültürlenmiş hücrelerin sitoplazmasına enjekte edilmiş ve proteinin hücre içi dağılımı, eş odaklı lazer tarama mikroskobu ile takip edilmiş. FITC-vimentin kompleksi olarak tek sarmallı oligodeoksiribonükleotidler oligo (dG) 25 fibroblastlara önceden enjekte edildiğinde ve endojen vimentin filaman sistemi içerisinde birleşmesi sağlanınca, az düzeyde de olsa enjeksiyon sonrası çekirdeğe aktarıldığını göstermişlerdir (Hartig et al., 1998).

Vimentin ekspresyonunun çeşitli agresif meme kanseri hücre dizilerinde yükseldiği gösterilmiştir ve bu aşırı ekspresyon, meme kanseri hücrelerinin artan migrasyonu ve invazyonu ile iyi bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Gilles et al., 2003; Korsching et al., 2005). Ayrıca, vimentinin aşırı ekspresyonu üzerine invaziv olmayan MCF-7 hücreleri, artan hareketlilik ve istilacılık sergilediği ve bu özelliklerle, vimentini yapısal olarak eksprese eden MDA-MB-231 hücrelerindeki vimentin aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Korsching et al., 2005). Son çalışmalar, vimentinin meme kanserlerinin EMT sürecinde önemli bir rol oynadığını bildirmektedir.

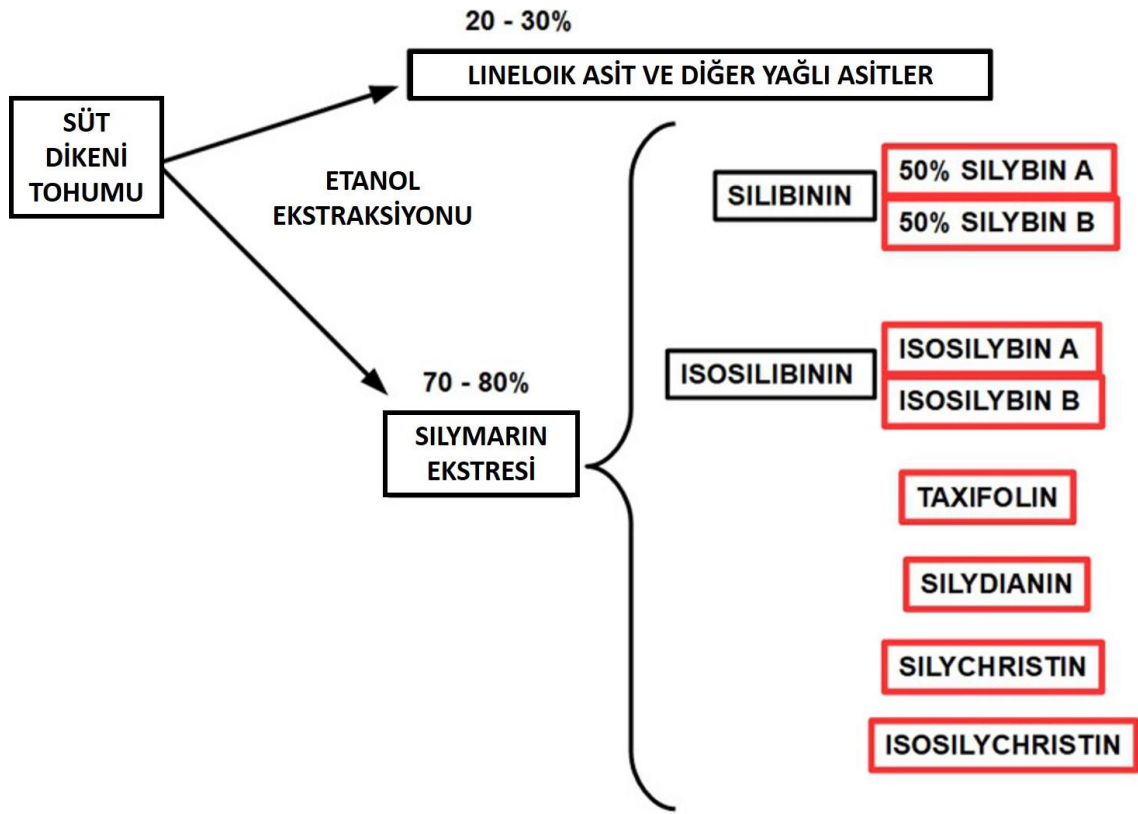


Şekil 2.12. Vimentin etki mekanizması (Modifiye edilmiştir.) (Satelli & Li, 2011).

2.4. Silymarin (*Silybum marianum*)

2.4.1. Silymarin tarihçesi ve kullanım alanları

Deve dikeni bitkisi olarak bilinen Silymarin, bu bitkinin tohumlarından elde edilen bir bitkisel ekstrakt olup, karmaşık bir flavonolignan karışımını içerir. İçindeki aktif bileşenler arasında en önemlileri silybinin diastereomerleri (silybin A ve silybin B), izosilybinin, silydianin, silykristin ve silymarin bulunur (Şekil 2.13.) (Fallah et al., 2021). 1970'lerde silymarin, Dünya Sağlık Örgütü tarafından hepatoprotektif etkileri olan resmi bir ilaç olarak sınıflandırıldı (Wesołowska et al., 2007). *Silybum marianum* (SM), yaygın olarak bilinen adları "devedikeni, meryemana dikeni, gengel, çoban çantası" veya "süt dikeni" olarak bilinir ve Asteraceae (Compositae) familyasına ait tıbbi bir bitkidir. Bitkinin yapraklarında kırılma durumunda süt benzeri bir özsuyu açığa çıkaran süt beyazı damarların varlığı nedeniyle genellikle 'süt dededikeni' olarak adlandırılır (Soleimani et al., 2019). Devedikeni otunun standartlaştırılmış tohum ekstraktı olan silymarin, çok uzun bir süredir geniş spektrumlu bir şifalı bitki olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Saller et al., 2001). Etnofarmakolojik açıdan bakıldığında silymarin, karaciğeri çeşitli toksik maddelerden korumak, hepatik hasarı tedavi etmek ve hepatitin yanı sıra sirozun tedavisi için bitkisel bir tedavi olarak iki yüzyıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır (Nawaz et al., 2023; Vargas-Mendoza et al., 2014).

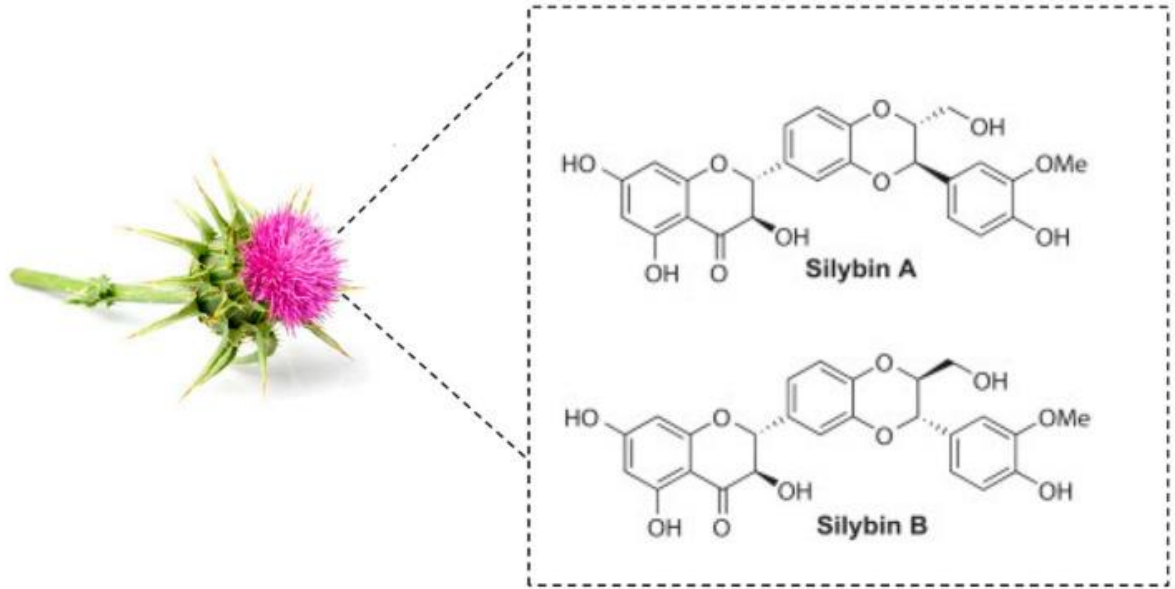


Şekil 2.13. Silymarin bileşenleri (Modifiye edilmiştir.) (Koltai & Fliegel, 2022).

Hayvanlarda ve insanlarda gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar, silymarin ve genellikle çalışmalarda kullanılan ve aktif bileşeni olan silybin'in, serbest radikal temizleme ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu nedeniyle belirgin antioksidan etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Mayer et al., 2005; Saller et al., 2001). Lipid peroksidasyonunu inhibe eder ve hepatik hastalıkların deneysel modellerinde karaciğeri yenileyebilmesinin yanı sıra antioksidan, anti-inflamatuar, anti-fibrotik, immünomodülatör ve membran stabilize edici etkiler gösterdiği görülmüştür (Ladas & Kelly, 2003). Güvenilirliği, koruyucu etkileri ve iyi farmakokinetik özellikleri nedeniyle silymarin, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, sepsis, osteoporoz, yanıklar, diyabet, kolestaz, ülseratif kolit, çeşitli kanser türleri, hiperkolesterolemi, nefrotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, Amanita phalloides zehirlenmesi, akciğer ve karaciğer hastalıkları, prostat sorunları, depresyon ve tüp bebek (IVF) gibi geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Silymarin'in karaciğer koruyucu etkileri klinik çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Gazak et al., 2007; Kandemir et al., 2017; Kaveh Baghbahadorani & Miraj, 2017; Stolf et al., 2017).

2.4.2. Silymarin farmokinetiği

Yapılan farmokinetik çalışmalar bitkinin ana bileşeni olan silybin (silybin A, silybin B) üzerinde yoğunlaşmaktadır (Şekil 2.14.). Günümüzde bilim insanları silymarindeki silybin ve diğer flavonoliganların oral içeriği, çözünmeleri ve oral biyoyararlanımdaki ortak kaynaklarına rağmen silymarin'in belirgin yararlı etkilerine katkıda bulunabilecek ve dahası bunlardan sorumlu olabilecek varyasyonlarının kayıt altına alınması gerekmektedir. Bu yüzden çalışmalar arasındaki karşılaştırmalar dikkatle yapılmalıdır çünkü silymarinde birden fazla bileşik bulunur ve aynı bulunmayan bu bileşenler, çalışmadaki biyoyararlanım açısından büyük öneme sahip olabilirler (Chambers et al., 2017; Choi et al., 2011).



Şekil 2.14. Silybin kimyasal yapısı (Delmas et al., 2020).

2.4.3. Silymarin'in anti-kanserojenik etkisi

Silymarin'in kanserdeki olası faydalarına ilişkin ilk çalışma Mehta ve Moon tarafından 1991 yılında yapılan yayındır. DMBA (dimetilbenzantrasen) ve TPA (tetradekanoilforbol asetat) uygulanan fare meme bezlerinde silymarin'in kanserin önleyici (antipromoter) olarak hareket edebildiğini göstermişlerdir (Mehta & Moon, 1991). Sonrasında silymarin'in anti-kanserojenik etkisi ile ilgili olarak hayvanlarda ve

insanlarda yapılan birçok *in vitro* çalışma bildirilmiştir ve özellikle hepatokarsinomda etki mekanizmalarının, antioksidan aktiviteleri vasıtası ile oksidatif stres tarafından indüklenmiş reaktif türlerin rahatlatılmasını ve prostoglandini modüle ederek sürekli olarak hepatik inflamasyonun baskılanmasını sağladığı görülmüştür (Federico et al., 2017; Feher & Lengyel, 2011; Won et al., 2018). Silymarin; kolorektal kanser, mesane kanseri, meme kanseri, mide kanseri, prostat kanseri, cilt kanseri, akciğer kanseri, hepatoselüler karsinom, laringeal karsinom, glioblastoma ve lösemi dahil olmak üzere birçok *in vitro* ve hayvan kanseri çalışmalarında görüldüğü üzere etkili anti-neoplastik, anti-inflamatuar, anti-kanser gibi birçok etki mekanizmasına sahip oldukları rapor edilmiştir (F. Li et al., 2015; Post-White et al., 2007; Wadhwa et al., 2022; Zeng et al., 2011). Farklı hücresel değişiklikler aracılığıyla, silymarin'in fibröz doku oluşumu, inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz ve ilaç taşıyıcılarının düzenlenmesi gibi alanlarda yararlı etkileri olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Federico et al., 2017). Silymarin'in kanser karşıtı etkileri üzerine yapılan *in vitro* çalışmalar ve hayvan denemelerinde, hepatokarsinomda silymarin'in antioksidan aktiviteleri aracılığıyla oksidatif stres tarafından tetiklenen reaktif türleri nötralize ettiği ve prostaglandin modülasyonu ile hepatik inflamasyonu sürekli olarak baskıladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, silymarin'in anti-tümör etkilerinin kaynağı, anormal hücre proliferasyonunun engellenmesi, içsel ve dışsal mitokondriyal yollar üzerindeki etkiler ve hücre döngüsü bozuklukları yoluyla apoptozun tetiklenmesi olabilir (Mastron et al., 2015). Silybin ve silymarin'in mesane, meme, mide, prostat, cilt ve akciğer kanseri gibi çeşitli *in vitro* ve hayvan modeli kanser çalışmalarında etkili antineoplastik bileşikler olduğu rapor edilmiştir (Deep & Agarwal, 2010; Feher & Lengyel, 2011; Khorsandi et al., 2017; Ramasamy & Agarwal, 2008; Won et al., 2018). Bu araştırmalar, silymarin'in siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21, p15 ve p27'yi artırarak G1/S fazında hücre döngüsünü durdurabildiğini göstermiştir. Ayrıca, silymarin proapoptotik protein Bax'ı yukarı regüle eder, anti-apoptotik protein Bcl-2'yi aşağı regüle eder ve hücre kinazlarını (PKC, AKT ve MAPK) ve inflamatuvar transkripsiyon faktörleri, örneğin NF- κ B'yi inhibe eder. Silymarin ayrıca, ERK1/2 ve STAT3 sinyal yollarını baskılayarak hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, onkogenezi ve iNOS gen ekspresyonunu engelleyebilir ve malign hücrelerde kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptotik hücre ölümünü teşvik edebilir (Agarwal et al., 2007; Gharagozloo et al., 2013). Bu nedenle, silymarin'in anti-kanserojenik etkileri, NF- κ B'ye bağlı gen ekspresyonunun baskılanması, NF- κ B'nin TNF- α ile aktive edilmesinin engellenmesi ve STAT3 sinyalinin inhibe edilmesi yoluyla

ortaya çıkabilir (Gharagozloo et al., 2013). Silymarin'in kemopreventif özellikleri genellikle, apoptoz ve hücre sağ kalımı arasındaki dengesizliği düzenleyerek apoptoza dahil olan proteinler ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin ekspresyonunu etkileyen anti-metastatik ve anti-inflamatuar aktiviteleri ile iliŐkildir (Ramasamy & Agarwal, 2008). Araştırmalar, silymarin'in kemoterapi ve radyasyona bağlı toksisiteyi azaltma ve nleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Silymarin ve içerdiği biyoaktif bileşenler, G1/S fazında hücre döngüsünü durdurarak, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin aktivasyonunu sağlayarak, anti-apoptotik gen ürünlerinin üretimini azaltarak, hücre sağ kalım kinazlarını baskılayarak ve inflamatuvar transkripsiyon faktörlerini aşağı regüle ederek Őitli tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilir. Ayrıca silymarin, farklı tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu, metastazı ve anjiyogenezi ile ilişkili gen ürünlerinin ekspresyonunu da deėiŐtirebilir (Hosseinabadi et al., 2019; Ramasamy & Agarwal, 2008).

3.2 Kimyasallar

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan kimyasallar.

Silymarin	S2358, Selleckchem
RPMI 1640	11875093, Gibco
Streptomycin	PS-3, Capricorn
Fetal bovine serum	FBS-HI-11A, Capricorn
L-glutamin	GLN-B, Capricorn
Tripsin EDTA	325-043-EL, Multicell
DMSO	190046, Serva
MTT	A015B, ABP Biosciences
%4 Paraformaldehit	Sc-281692, Chemcruz - Santa
Hidrojen Peroksit	K48739200714, Merck
PBS	P3A82970, Biobasic
Mayers Hematoksilen	HX14931949, Sigma
IHC Sekonder Antikor	PHL129127, Thermo
Matrigel	Corning, REF:356234
Beta Actin	AC026 , Abclonal
E-Kaderin	sc-8426, Santa Cruz Biotechnology
MMP-9	sc-393859, Santa Cruz Biotechnology
Fibronektin	sc-8422, Santa Cruz Biotechnology
Western Sekonder Antikor	HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Catalog No.: AS014, ABclonal
Western Sekonder Antikor	HRP Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Catalog No.: AS071, ABclonal

3.3. Hücre Kültürü

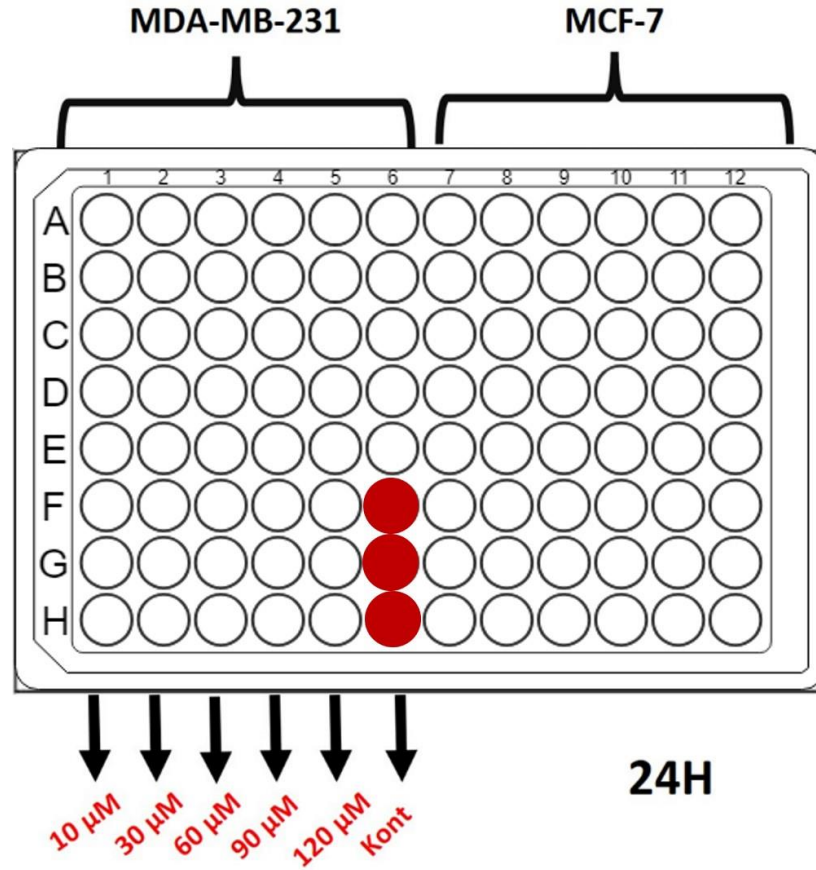
Çalışmamızda kullanılan hücreler Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Biyoloji anabilim dalında daha önceki çalışmalardan temin edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında çalışıldı. Hücreleri RPMI 1640 besi yerine, %10 Fetal

bovine serum (FBS), %1 L-Glutamin ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) eklenerek hazırlanmış medyum ile %5 CO₂ içeren, 37°C nemli inkübatörde inkübe edildi. %80 konfluensi oranına ulaşıldığında hücreler iki gruba ayrıldı. Bu gruplar 2D ve 3D boyutlu hücre kültürü aşamalarında kullanıldı.

3.4. 2D Hücre Kültürü Uygulamaları

3.4.1. 2D hücre kültüründe MTT metodu ile hücre canlılığı tayini

2D hücre kültürlerinde Silymarin'in farklı dozlarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek ve IC₅₀ dozunu belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diaphenyltetrazolium-bromide) testi kullanıldı (Şekil 3.1.). Hücreler, 96 kuyucuklu kültür plakasına her bir kuyucuğa 5×10^3 ile 4×10^4 hücre gelecek şekilde dağıtıldı. Hücreler yapıştıktan sonra, silymarin'in 10, 30, 60, 90 ve 120 µM dozları 24 saat süreyle uygulandı. Uygulama süresinin ardından, her kuyucuğa üreticinin talimatlarına göre hazırlanmış MTT (Sigma-Aldrich) solüsyonu 20 µL eklenerek 4 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, MTT çözeltisi uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 200 µL dimetilsülfoksit eklendi. Dimetilsülfoksit ile karıştırma işlemi karanlık ortamda 5 dakika boyunca bir çalkalayıcı üzerinde yapıldı. Absorbans değerleri 570-690 nm dalga boyu aralığında mikropłaka okuyucuda (Shimadzu UV-1601) ölçüldü. Her bir konsantrasyon için üçer kuyucuk kullanılarak deney üç kez tekrarlandı. Kontrol hücrelerinin canlılığı, tedavi uygulanmayan durumda %100 olarak kabul edildi ve deney hücrelerinin canlılık oranları bu referansa göre yüzde olarak ifade edildi. Bu deneyler, IC₅₀ dozunu belirlemek amacıyla uygulandı ve çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılacak olan doz bu şekilde belirlendi.



Şekil 3.1. MTT deneyi şeması.

3.4.2. 2D hücre kültüründe yara yeri metodu

Yara yeri deneyinde hücreler 24 gözlü kültür kabına ekildi ve tam bir konfluent görünüm sağlanana kadar beklendi. Kuyucukların orta hattından 10 µm'lik pipet ucuyla yara yeri açılarak yara bölgesi oluşturuldu (Şekil 3.2.). Bu hücreler iki gruba ayrılıp uygulama yapılmayan kontrol grubuyla birlikte silymarın uygulanan grup 24 saat süreyle inkübe edildi. Hücrelerin yara alanına doğru göç ederek yara bölgesini kapatma eğilimleri ve bu göç sırasındaki hızlarını karşılaştırmak için gruplardan 6'şar saat aralıklarla faz kontrast mikroskop ile fotoğrafları çekildi ve karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Yara bölgelerinden alınan fotoğraflardan yara alanı hesaplanması yapıldı. Elde edilen veriler SPSS analiz programında değerlendirildi.



Şekil 3.2. Yara yeri deneyi.

3.4.3. 2D hücre kültüründe immünohistokimya metodu

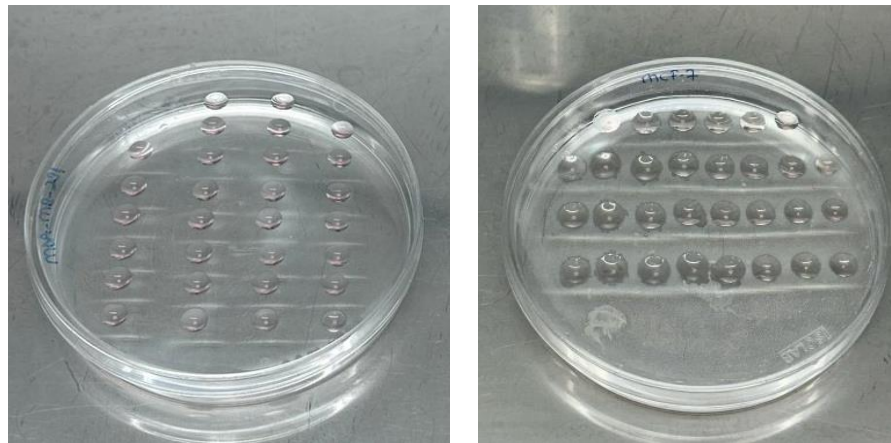
12 gözlü kültür kaplarına ekilen hücreler iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu ve uygulama yapılan silymarin grupları 24 saat süreyle inkübe edildi. Uygulaması tamamlanan hücre grupları %4'lük Paraformaldehit solüsyonunda 30 dk fikse olduktan sonra PBS ile 3x5 dk olacak şekilde yıkandı. Permeabilizasyon için %0,1'lik Triton-X 100 ile 15 dk inkübe edilip ve tekrardan PBS ile yıkandıktan sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) uygulaması yapıldı (5 dk). Yıkama yapıp 10 dk protein blok işleminin ardından da hücre metastazını ve invazyonunu değerlendirmek için anti-MMP9, anti- E-Kaderin, anti- N-Kaderin, anti-fibronektin ve anti-Vimentin antikoları ile 1 gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sekonder antikolar uygulanıp DAB kromojeniyle immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı ve kapatma mediumu ile kaplanarak

kapatılıp ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Işık mikroskobu altında rastgele belirlenen 10 alanda 500 hücre sayılarak H-Score değerlendirmesi yapıldı. Elde edilen veriler SPSS veri analizi programında değerlendirildi.

3.5. 3D Hücre Kültürü Uygulamaları

3.5.1. Hanging drop metodu ile sferoid oluşturma aşaması

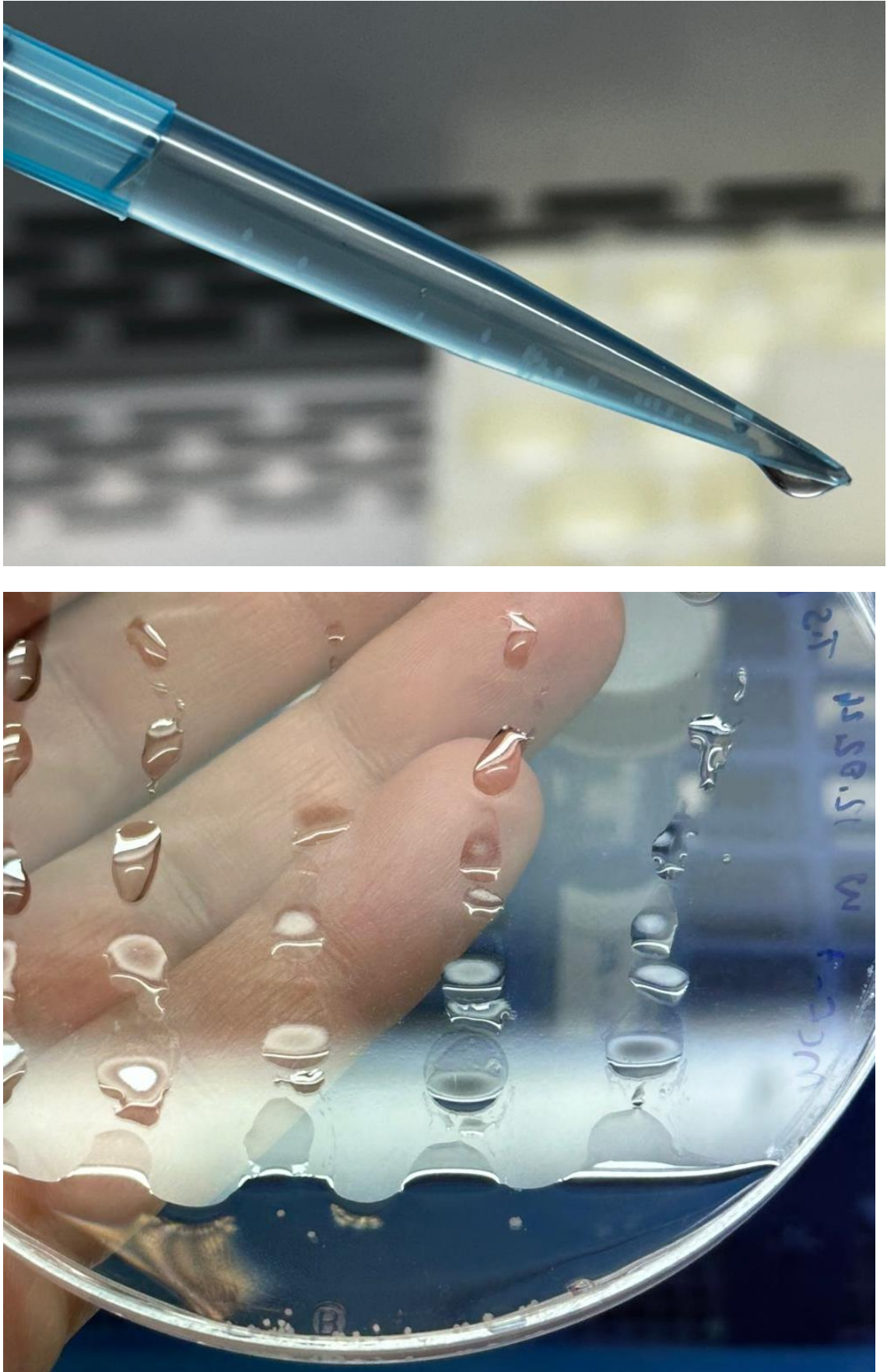
Petri kabının kapağına RPMI-1640 besiyeri içerisinde süspansiyon edilmiş hücreler birbirlerine temas etmemesi için belirli mesafe aralıklarında 20 μ l'lik damlalar halinde ve her bir damla içinde 1×10^6 hücre olacak şekilde gruplar içerisinde ortalama 30 adet asılı damlalar oluşturuldu (Şekil 3.3.). Petri kabının alt kısmına ise hidrasyon odası görevi görmesi amacıyla steril PBS konuldu. Petri kapağı steril PBS eklenmiş alt bölmeye temas etmeyecek şekilde, besi yeri damlacığının uç kısmında hücrelerin kümelenerek yığın oluşturması amacıyla ters çevrildi ve 37°C, %5 CO₂, %95 nemde 20 gün inkübe edildi. Damlalar günlük olarak izlendi ve hücre kümelerinin oluşumu, Faz-kontrast mikroskop kullanılarak değerlendirildi. 20. gün sonunda oluşan hücre kümelerine 10, 30, 60, 90 ve 120 μ M dozlarında silymarin uygulaması yapıldı ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılacak olan IC50 dozu MTT canlılık testi ile belirlendi.



Şekil 3.3. Asılı damla sferoid modeli ile oluşturulan sferoidler.

3.5.2. 3D hücre kültüründe immünohistokimya boyaması

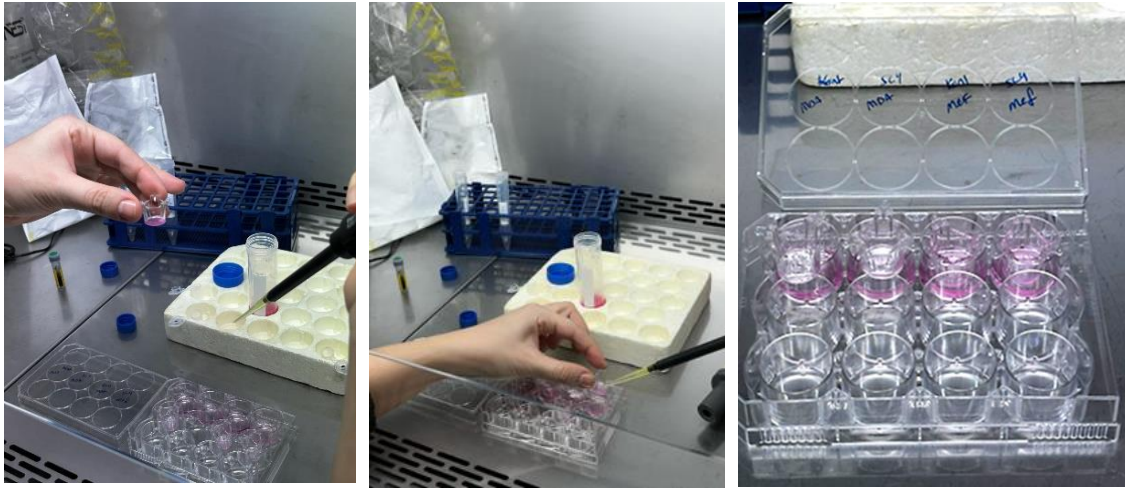
Doz belirlendikten sonra sferoidler kontrol (KONT) ve silymarin (SLY) grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Her bir damla içerisindeki sferoid pipet yardımı ile toplandı ve polilizinli lam üzerine alındı (Şekil 3.4). Her antikor için en az 6 sferoid bir kuyucuğa yerleştirildi ve %4'lük paraformaldehit ile fiksasyonu sağlandı. Permeabilizasyon için TritonX 100'de buz üzerinde 15 dk bekletildi. 2 kez 2'şer dk PBS ile yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂ ile endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. 2 kez 2'şer dk PBS ile yıkayıp Blocking solüsyonunda 10 dk bekletildi. Primer antikorlar 1/250 oranında olacak şekilde anti E-kaderin, anti-MMP-9, anti-Vimentin, anti- Fibronektin ve anti- N-kaderin antikorları ile 37°C'de 1 saat inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra kesitler 2 kez 2'şer dk PBS ile yıkandı. Sekonder antikor aşamasında 30 dk Biotin uygulandı. 2 kez 2'şer dk PBS ile yıkandıktan sonra Sekonder antikor aşamasının ikinci aşaması olan 30 dk avidin ile muamele edildi. 2 kez 2'şer dk PBS ile yıkandı. Kromojen olarak DAB Substrat kullanılarak renklendirme yapıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve musluk suyu ile yıkayıp ardından su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Işık mikroskobu altında rastgele belirlenen 10 alanda 500 hücre sayılarak H-Score değerlendirmesi yapıldı. Elde edilen veriler SPSS veri analizi programında değerlendirildi.



Şekil 3.4. Petri kapağı üzerinden mikropipet yardımıyla toplanan sferoidler.

3.5.3. 3D hücre kültüründe insertler kullanılarak hücre göçü metodu

Her bir hücre hattı için ayrı ayrı olacak şekilde deney planlandı. -20 °C’de bulunan matrigel, bir gece öncesinde +4°C’de bekletildi ve sıvılaşması sağlandı. Serumsuz besi yeri içerisinde 1:1 oranında seyreltildi. 0,8 µm por çapına sahip insertlerin tabanı her kuyucukta 100 µl olacak şekilde kaplandı ve 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. 1 saat 37°C’de inkübe edilip jelleşmesi sağlandı. Süre sonunda kontrol grubu için alt kuyucuklara 1000 µl serum içeren besi yeri, silymarin grubuna ise 1000 µl serum ve etken madde içeren besi yeri eklendi. Üst kuyucuklara ise 100 µl içerisinde bulunan hücre sayılarak 1×10^6 hücre bırakıldı. Daha sonra içerisinde matrigel bulunan 24 kuyucuklu kültür kaplarının üzerlerine içerisinde meme kanseri hücreleri bulunan insertler yerleştirilerek hücreler 37°C, %5 CO₂ koşullarına sahip nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.5.). Hücreler kontrol ve silymarin grubu olacak şekilde iki gruba ayrıldı ve silymarin grubuna IC50 dozu uygulandı. 24. saatin sonunda besi yerinde kalan hücreler sayılarak göç eden hücre sayısı belirlendi (Stoellinger & Alexanian, 2022). Hücre sayımı TC20™ otomatik hücre sayım cihazı kullanılarak teyit edildi. Elde edilen veriler SPSS veri analizinde değerlendirildi.



Şekil 3.5. Transwell invazyon deneyi.

3.6. 2D ve 3D Hücre Kültüründe Real-Time PCR Analizi

3.6.1. Hücrelerden RNA izolasyonu

2D ve 3D hücre kültürü örneklerinden RNA izolasyon kiti TRIzol Reagent (A.B.P. Biosciences, Cat No: FP312) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.6.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lar NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazında ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. cDNA'lar, cDNA sentez kiti (A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit, Cat no: C03-01-20) kullanılarak total RNA'dan elde edilmiştir. Reaksiyon karışımı Tablo 3.3'te, reaksiyon protokolü Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.3. cDNA reaksiyon karışımı.

10X reaksiyon karışımı	2 µl
RdNTP mix (2.5 mM each)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse transkriptaz (200 u/µl)	1 µl
RNase inhibitor	0.5 µl
RNase free water	3.5 µl
RNA Template (1µg)	10 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.4. cDNA sentezi reaksiyon protokolü.

Priming	10 dakika 25°C
Reverse Trankripsiyon	120 dakika 37°C
RT inaktivasyon	5 dakika 85°C
Hold	∞ 4°C

Elde edilen cDNA'lar Real-Time PCR'da kullanılmaya kadar -20°C 'lik derin dondurucuda saklandı.

3.6.3. *CDH1*, *CDH2*, *VIM* ve *MMP9* gen ekspresyonlarının real-time PCR ile ölçümü

İlgili hücre örneklerinde eksprese olan *CDH1*, *CDH2*, *VIM* ve *MMP9* genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Step-One-Plus Thermocycler (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 20 μL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler (Oligomer, Ankara) (Tablo 3.5), iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, USA, Kat. No: 1725122) ve nuklease free su kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.6.).

Tablo 3.5. Genlere ait baz dizileri.

<i>Gen ismi</i>	Baz dizisi 5'→3'
<i>CDH1-Forward</i>	CCCTTCCTCAAAACACACTCC
<i>CDH1-Reverse</i>	TGGCAGTGTCTCTCCAAATC
<i>CDH2- Forward</i>	TTTTGCCCCCAATCCTAAGA
<i>CDH2-Reverse</i>	CAGCGTTCCTGTTCCACTCAT
<i>VIM- Forward</i>	CTCTGGCACGTCTTGACCTT
<i>VIM-Reverse</i>	TTGCGCTCCTGAAAACTGC
<i>MMP9-Forward</i>	TCTATGGTCCTCGCCCTGAA
<i>MMP9-Reverse</i>	TTGTATCCGGCAAACCTGGCT
<i>GAPDH-Forward</i>	CATTGCCCTCAACGACCACTTT
<i>GAPDH-Reverse</i>	GGTGGTCCAGGGGTCTTACTCC

Tablo 3.6. Real-Time PCR tepkime karışımı.

İçerik	Hacim
iTaq Universal SYBR Green Supermix	10 µl
cDNA	2 µl
Forward ve Reverse primerler (250-500nm her bir primer)	1+1 toplam 2 µl
Nuclease free water	6µl
Total Hacim	20 µl

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 0.1 ml'lik 8'li strip PCR tüplerine dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 3.7. ve Tablo 3.8.'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda, genlerin mRNA düzeylerini gösteren treshold Cycle (Ct) değerleri belirlendi. Genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 3.7. *CDH1*, *CDH2*, *MMP9* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Döngü	Zaman	Sıcaklık
1	30 saniye	98°C
40	5 saniye	98°C
	30 saniye	60°C
+ Melting Curve		

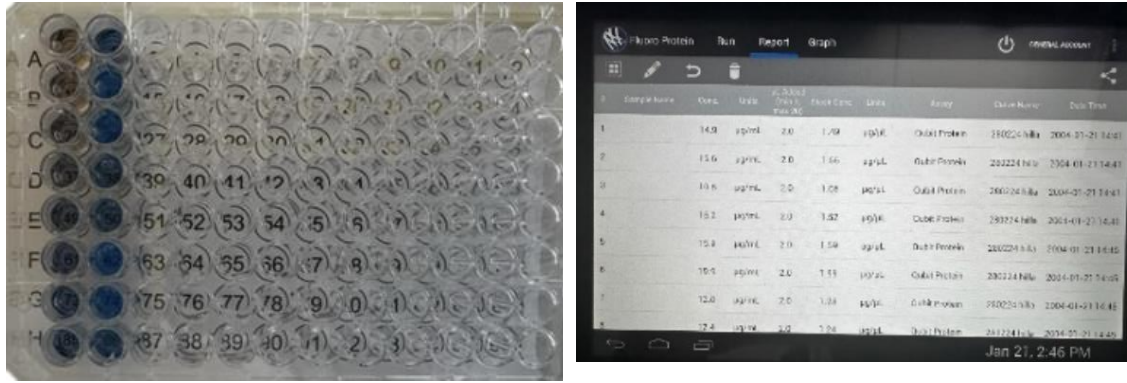
Tablo 3.8. *VIM* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Döngü	Zaman	Sıcaklık
1	30 saniye	98°C
40	5 saniye	98°C
	30 saniye	58°C
+ Melting Curve		

3.7. 2D ve 3D Hücre Kültüründe Western Blot analizi

3.7.1. Protein izolasyonu

Uygulama yapılan ve yapılmayan hücre grupları soğuk PBS kullanılarak flasklardan kazıma metodu ile kaldırıldı. Ependorf tüpleri içerisine alınan hücrelerden santrifüj edildi. Sonraki aşamalarda her zaman buz üzerinde çalışıldı. Santrifüj sonrası üzerinde kalan PBS çekildi ve lizasyon için üzerine 100 µl RIPA mix (100 µl RIPA + 1 µl + Protease inhibitör coctail) eklendi. Buzun üzerinde 30 dk inkübasyon sağlandı. Karışım buz üzerinde bekletildikten sonra üzerine 1,4 mm zirkonyum boncuklar eklenerek doku homojenizatöründe 10. seviyede 10-15 sn kadar parçalama işlemi yapıldı. Parçalama işlemi bittikten sonra örnekler soğutmalı santrifüjde 14.000 g devirde +4°C' de 15 dk. süre boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra karışım yeni bir tüpe alınarak tekrar santrifüj işlemine tabi tutuldu. Elde edilen lizatlardaki protein yoğunluğunun ölçülmesinde Qubit 2.0 Fluorometre cihazı ile Qubit protein assay kit kullanıldı. Protein miktarı ölçümü için Qubit Buffer mix hazırlandı. 199 µl Qubit buffer + 1 µl protein reagent eklendi ve çok hafif vortex yapıldı. Örnekler dH₂O ile 1/10 oranında dilue edildi. Ölçüm için 0,5'lik Qubit ölçüm ependorfuna 198 µl Qubit Buffer mixi + 2 µl protein eklendi ve çok hafif bir vortex yapıldı. Örnekler 2 dk inkübe edildi ve ölçüm yapıldı. Değerler dilüsyon katsayısı ile çarpılarak protein miktarı tespit edildi. Protein varlığını teyit etmek için Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Testi de yapıldı. Kit içerisinde bulunan BSA kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda kontrol kuyucukları oluşturuldu. Bunlar 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml ve 0 µg/ml (blank) olacak şekilde uygulandı. Her bir örnekten 5 µl alınarak toplamda 155 µl'lik total örnekten ölçüm yapıldı. Absorbans değeri 595 nm olacak şekilde okuma yapıldı.



Bradford Testi

Qubit Analizi

Şekil 3.6. Protein izolasyonunda protein miktarlarının iki ayrı test ile ölçümü.

3.7.2. Western Analizi

Yükleme işlemi yaparken kuyucuklara eşit miktarda protein yüklemesi yapılabilmesi için örneklerden alınması gereken hacimler hesaplanıp her örnek için toplamda 50 µg/ml hacimde karışım kuyucuklara yüklendi (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Protein ölçüm miktarları ve hesaplanması.

GRUPLAR	QUBİT (µg/ml)	BRADFORD (µg/ml)	ORT (µg/ml)	50 µg	dH ₂ O	R.A	S.B
MDA-MB-231, 2D SLY	14,9	5,6	10,25	4,9	1,6	1	2,5
MDA-MB-231, 2D KONT	15,6	5,6	10,6	4,7	1,8	1	2,5
MDA-MB-231, 3D SLY	10,8	1,8	6,3	7,9	5,1	2	5
MDA-MB-231, 3D KONT	15,2	2,3	8,75	5,7	0,8	1	2,5
MCF-7, 2D SLY	15,9	6,0	10,95	4,6	1,9	1	2,5
MCF-7, 2D KONT	19,9	6,7	13,3	3,75	2,75	1	2,5
MCF-7, 3D SLY	12,8	3,5	8,15	6,1	0,4	1	2,5
MCF-7, 3D KONT	12,4	3,3	7,85	6,37	0,13	1	2,5

Ort: Ortalama, KONT: Kontrol, SLY: silymarin uygulama grubu, 3D: 3 boyutlu kültür, 2D: 2 boyutlu kültür, dH₂O : distile su, R.A: Reducing agent, S.B: sample buffer

200 voltta yaklaşık olarak 20-25 dk yürütme işlemi yapıldı. Örnekler İnvitrogen Mini Gel Tank kullanılarak, hazır olarak temin edilen Bolt™ %4 -12 Bis-Tris Plus Jel kullanıldı. Yürütme işlemi Running Buffer 1X solüsyonu ile gerçekleştirildi ve birinci kuyucuğa marker konuldu (Şekil 3.7.). İlk olarak 100 voltta 10 dk süreyle yürütüldü. 10. dk'dan sonra 200 voltta yaklaşık 25-30 dk kadar yürütme işlemi yapıldı. Sürenin sonunda jeller uygun şekilde çıkarılarak blotlama cihazına yerleştirildi.



Şekil 3.7. Proteinlerin jele yüklenmesi.

3.7.3. Görüntüleme

Elektroforezi tamamlanan jeli haznesinden çıkarmak için içi saf su dolu küvette sudan geçirildi. Köşelerinden spatula ile kaldırılarak yavaşça üst kapak çıkarıldı ve dikkatlice ayrıldı. PVDF membrana (IBlot™ 2 Transfer Stacks) aktarımı IBlot 2 cihazının kendine ait sandviç şeklindeki membran aktarım sistemi (IBlot™ 2 Transfer Stacks) kullanılarak 20 voltta 7 dk da jelden membrana aktarım işlemi gerçekleştirildi. iBind™ Flex Solution Kitinden Blocking solüsyonu hazırlamak için; 40 ml saf su + 10 ml 5X Buffer + 500 µl 100X Additive Solüsyonu kullanılarak hazırlandı. Transfer işlemi bittikten sonra jel atıldı. Transfer kağıdındaki jel görüntüsü kesilerek alındı ve hazırlanan Blocking solüsyonu içerisine koyuldu. 5 dk bekletildi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Elektroforezi tamamlanan jel'in PVDF membrana aktırılması.

Antikor uygulama işlemi Invitrogen™ iBind™ Flex Western cihazında gerçekleştirildi. Bunun için cihaza uygun solüsyonlar kullanıldı. Antikor, yıkama ve Blocking solüsyonları bu kimyasallardan hazırlandı. iBind™ Flex' e özel olan kart üzerinde first ve seconder antikorlar 2,5 saat gibi kısa bir süre içerisinde bağlama işlemi gerçekleştirilerek bağlama işlemi sona erdirildi. Yıkama işleminden sonra membran, primer antikorlar olan anti E-Kaderin, anti-MMP-9 ve anti Fibronektin hazırlanarak uygulama yapıldı. iBind™ Flex kartı Blocking solüsyonu ile (10 ml) ıslatıldı. Membranı yerleştireceğimiz yere aynı solüsyondan 1ml daha eklendi. Membran karta yerleştirilirken bekletildi (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Membran üzerine primer ve sekonder antikor uygulaması ve inkübasyonu.

Görüntüleme işlemi için kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanıldı. Bu görüntüleme sisteminin temeli kimyasal luminol olduğu için seconder antikora özgü substrat (ECL) kullanıldı. ECL solüsyonu 1 ml Luminol/Enhancer solüsyonu + 1 ml Peroksidaz solüsyonu eklenerek hazırlandı. iBind™ Flex'den çıkarılan membran solüsyona yatırıldı ve karanlık ortamda membran ile 5 dk muamele edilip sonrasında membran, görüntüleme sistemine alınarak bant görüntüleri alındı.

3.8. İstatistiksel analiz

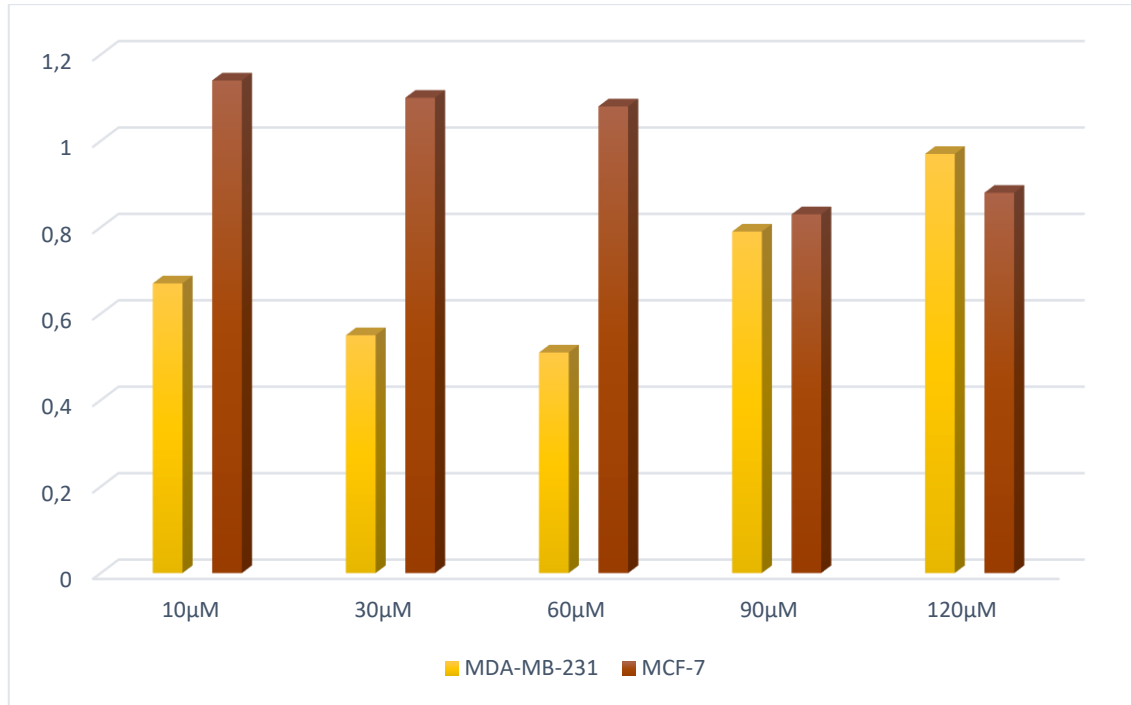
DeneySEL çalışmalarından elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) istatistiksel veri analiz programında Nicel veriler için Kruskal-wallis analizi ile Nitel verilerin analizi için ise Ki-Kare Testi yapılarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. 2D Hücre Kültüründe MTT sonuçları

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde farklı dozlarda SLY verilerek ilacın konsantrasyonunu hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir. Yapılan MTT testinde, Her iki hücre hattı için de SLY çeşitli konsantrasyonlarda (10µM, 30µM, 60µM, 90µM, 120µM) 24 saat süreyle uygulanmıştır. MDA-MB- 231 hücrelerinde SLY'nin IC₅₀ değeri 24. saatte 60 µM olarak saptandı. MCF-7 hücrelerinde ise SLY'nin IC₅₀ değeri 24. saatte 90 µM olarak saptandı. SLY uygulamasında doza bağlı olarak her iki hücre hattı için hücrelerin sayısında konsantrasyona bağlı azalma gözlenmiştir. Hücre proliferasyonunun yarıya düştüğü değer aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Her iki hücre hattında silymarin'in değişen doz aralıkları etkisi Şekil 4.1'de görülmektedir.

$IC_{50} = 100 - [(kontrol - ilaçlı grup) / kontrol * 100]$ (kontrol, ilaç verilmeyen gruptaki hücre sayısıdır, ilaçlı grup, farklı konsantrasyonlarda silymarin'in uygulanan gruptaki hücre sayısıdır).

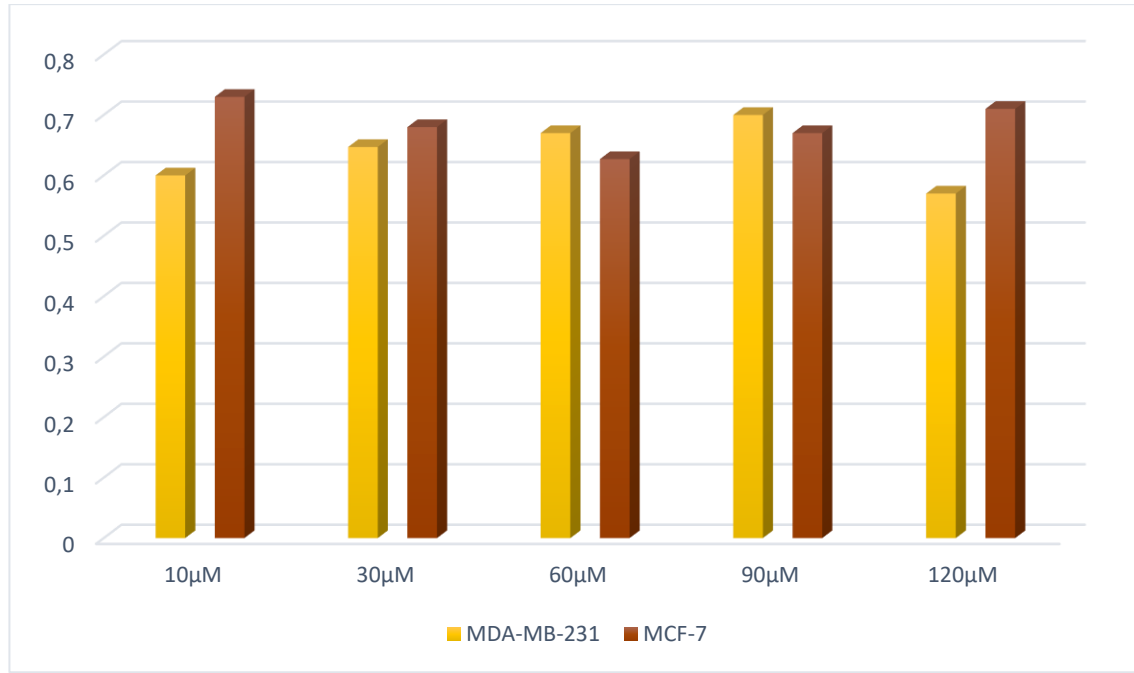


Şekil 4.1. 2D hücre kültüründe MTT testi sonuçları.

4.2. 3D Hücre Kültüründe MTT sonuçları

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde, hanging drop yöntemiyle oluşturulan sferoidlere farklı dozlarda SLY verilerek ilacın konsantrasyonu hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir. Yapılan MTT testinde, her iki hücre hattı için de SLY çeşitli konsantrasyonlarda (10µM, 30µM, 60µM, 90µM, 120µM) 24 saat süreyle uygulanmıştır. MDA-MB- 231 hücrelerinde SLY'nin IC₅₀ değeri 24. saatte 120 µM olarak saptandı. MCF-7 hücrelerinde ise SLY'nin IC₅₀ değeri 24. saatte 60 µM olarak saptandı. SLY uygulamasında doza bağlı olarak her iki hücre hattı için hücrelerin sayısında konsantrasyona bağlı azalma gözlenmiştir. Hücre proliferasyonunun yarıya düştüğü değer aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Silymarin'in değişen doz aralıkları etkisi Şekil 4.2'de görülmektedir.

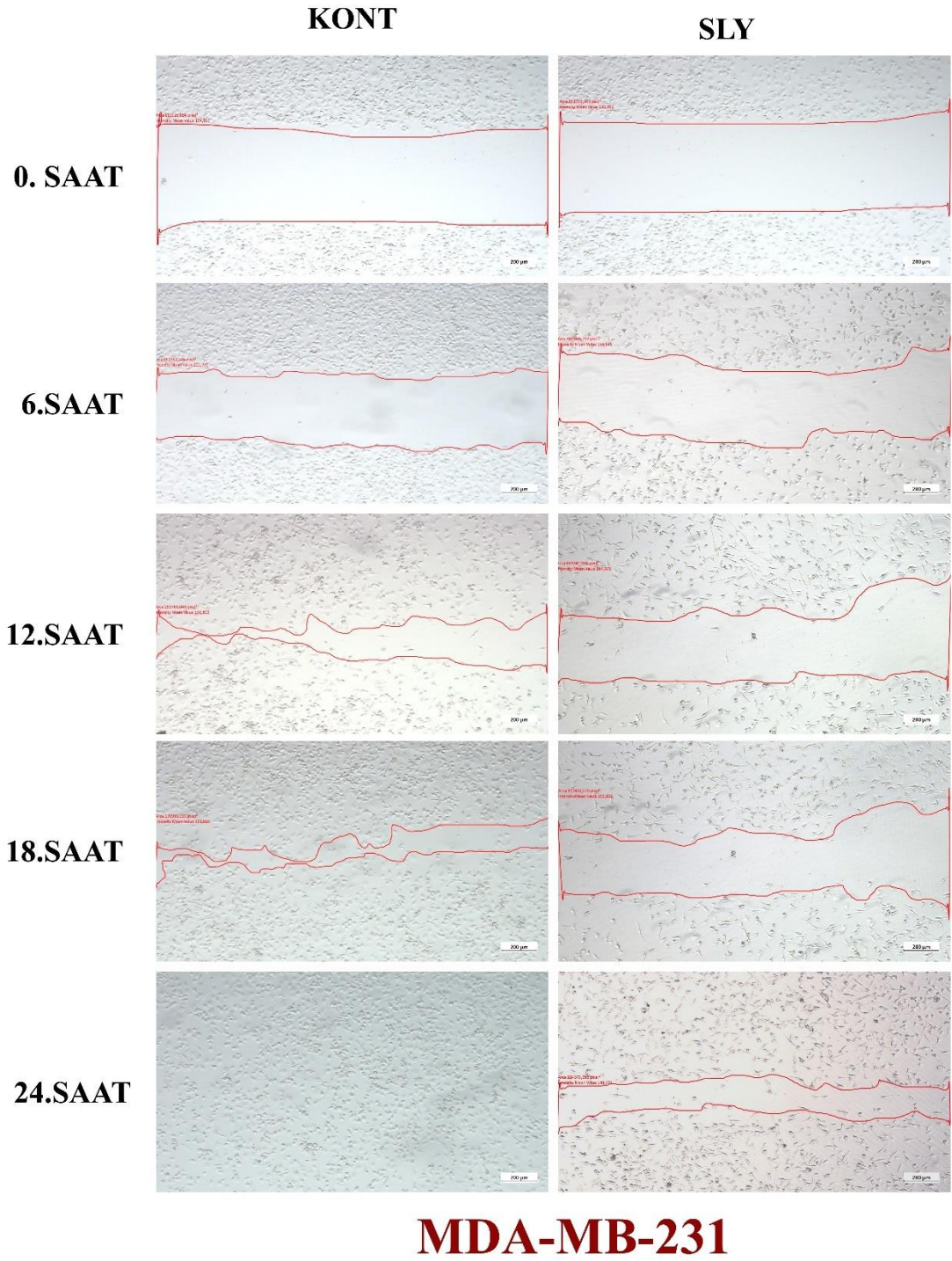
$IC_{50} = 100 - [(kontrol - ilaçlı grup) / kontrol * 100]$ (kontrol, ilaç verilmeyen gruptaki hücre sayısıdır, ilaçlı grup, farklı konsantrasyonlarda silymarin uygulanan gruptaki hücre sayısıdır.



Şekil 4.2. 3D hücre kültüründe MTT testi sonuçları.

4.3. Silymarin'in MDA-MB-231 Hücrelerinde Migrasyon Üzerine Etkisi

MDA-MB-231 hücrelerine 60 µM Silymarin uygulanmasının ardından migrasyon üzerindeki etkisini gözlemledik. Yara iyileşme deneyi ile oluşturulan yara alanları 6'şar saat aralıklarla kameralı invert mikroskop ile fotoğraflandı. Kontrol grubundaki yara alanı 24. saat sonunda tam bir kapanmanın gerçekleştiği görüldü. Silymarin verilen grupta hücre göçünün engellendiği ve oluşturulan yara alanının kapanmadığı görüldü. Bu veriler SPSS 20.0 analiz programında Mann-Whitney U testi yapılarak değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucunda yara alanının oluşturulmasından sonra geçen 12. saat sonunda veriler kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 4.1). Yara bölgesinin alanı ZEN 0.3 görüntüleme cihazı kullanılarak ölçüldü ve zamana bağlı olarak yara alanında ki anlamlı değişim şekil 4.3 ile gösterildi. Sonuç olarak silymarin'in hücrelerin migrasyonunu engellediği görülmüştür.



Şekil 4.3. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 0. ile 24. saat arasındaki her 6 saat aralıktaki yara alan görüntüleri.

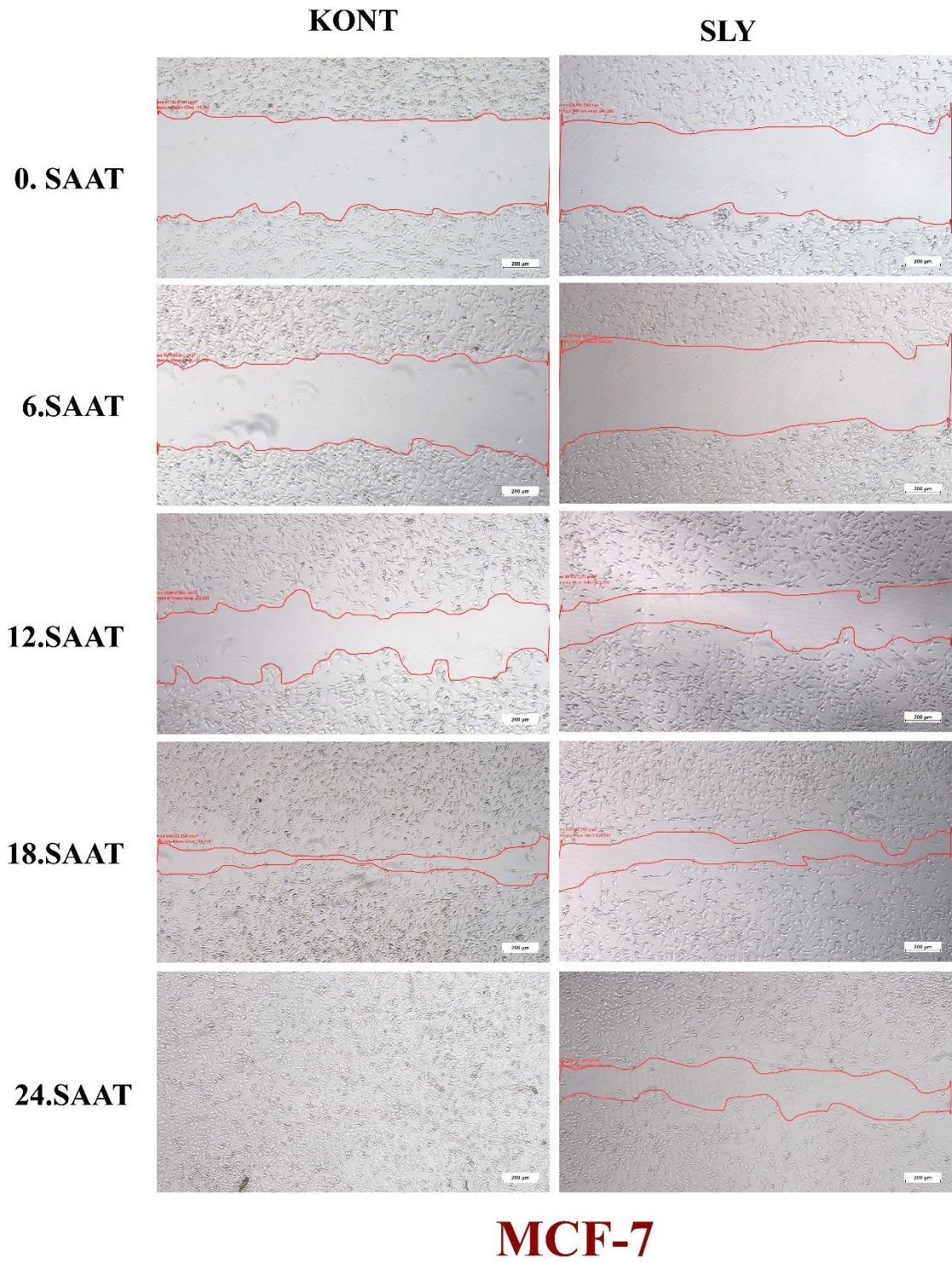
Tablo 4.1. MDA-MB-231 hücrelerinde yara iyileşme deneyinde istatistiksel analiz sonuçları.

MDA-MB-231		
SAAT	GRUP	Ort. \pm SS
0.SAAT	KONT	794174,77 \pm 91914,26*
	SLY	742814,14 \pm 81376,01*
6.SAAT	KONT	668351,57 \pm 117593,57
	SLY	653708,29 \pm 121491,34
12.SAAT	KONT	285624,16 \pm 203763,23
	SLY	536492,20 \pm 169782,10*
18.SAAT	KONT	288921,13 \pm 195758,02
	SLY	523889,12 \pm 206245,02*
24.SAAT	KONT	0 \pm 0
	SLY	466100,23 \pm 219570,48*

Ort: Ortalama, SS: standart sapma, p değeri: istatistiksel anlamlılık, *p<0.05 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır, KONT: Kontrol, SLY: silymarin uygulama grubu

4.4. Silymarin'in MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Üzerine Etkisi

MCF-7 hücrelerine 90 μ M silymarin uygulanmasının ardından migrasyon üzerindeki etkisini gözlemledik. Yara alanı 6'şar saat aralıklarla kameralı invert mikroskop ile fotoğraflandı. Silymarin uygulanmayan kontrol grubundan 24. saat sonunda yara alanının kapandığı görüldü. Silymarin verilen grupta hücre göçünün engellendiği oluşturulan yara alanında bir miktar daha açıklık olduğu görüldü (Şekil 4.4.). 12. saat sonrasında yara alanları arasında kontrol grubuna kıyasla silymarin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (p<0,05) (Tablo 4.2.). Yara bölgesinin alanı ZEN 0.3 görüntüleme cihazı kullanılarak ölçüldü ve zamana bağlı olarak yara alanındaki anlamlı değişim grafik ile gösterilmiştir.



Şekil 4.4. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 0. ile 24. saat arasındaki her 6 saat aralıktaki yara alan görüntüleri.

Tablo 4.2. MCF-7 hücrelerinde yara iyileşme deneyinde istatistiksel analiz sonuçları.**MCF-7**

SAAT	GRUP	Ort. \bar{x} SS
0.SAAT	KONT	961797,62 \bar{x} 135860,06
	SLY	823804,81 \bar{x} 96885,77*
6.SAAT	KONT	896299,53 \bar{x} 96642,33
	SLY	792504,54 \bar{x} 118756,48
12.SAAT	KONT	521545,67 \bar{x} 261111,50
	SLY	457482,58 \bar{x} 181276,78*
18.SAAT	KONT	434022,20 \bar{x} 283222,73
	SLY	391273,93 \bar{x} 229293,14*
24.SAAT	KONT	0 \bar{x} 0
	SLY	338220,07 \bar{x} 166953,02*

Ort: Ortalama, SS: standart sapma, p değeri: istatistiksel anlamlılık, *p<0.05 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır, KONT: Kontrol, SLY: silymarin uygulama grubu

4.5. Silymarin'in MCF-7 Hücrelerinde Hücre göçüne etkisi

Transwell migrasyon deneyinde iki grup için ayrı ayrı olacak şekilde kuyucuk içerisine 0,8 μ m çapındaki insertler eklendi ve üzerine serumsuz besi yeri içerisinde $1,32 \times 10^6$ MCF-7 hücresi 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubunda 24. saatin sonunda üst kuyucukta bulunan hücrenin %28'inin göç ettiği görüldü. SLY grubunda ise uygulama sonunda %4 hücrenin alt kuyucuğa göç ettiği belirlendi. Sonuçlara bakıldığında 24 saat silymarin uygulamasının hücrelerin invazyon yeteneğini inhibe ettiğini göstermektedir (Tablo 4.3.) (Stoellinger & Alexanian, 2022).

Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerinde transwell invazyon deneyi sonuçları.

MCF-7		
Tekrarlanan deney sayısı	0.saat (üst kuyucuğa bırakılan toplam hücre sayısı)	24.saat (göç eden canlı hücre sayısı)
Kontrol 1	$1,32 \times 10^6$	$3,80 \times 10^4$
Kontrol 2	$1,32 \times 10^6$	$3,92 \times 10^4$
Kontrol 3	$1,32 \times 10^6$	$4,01 \times 10^4$
Kontrol 4	$1,32 \times 10^6$	$3,74 \times 10^4$
Kontrol 5	$1,32 \times 10^6$	$3,91 \times 10^4$
Kontrol 6	$1,32 \times 10^6$	$3,84 \times 10^4$
SLY 1	$1,32 \times 10^6$	$5,43 \times 10^3$
SLY 2	$1,32 \times 10^6$	$5,56 \times 10^3$
SLY 3	$1,32 \times 10^6$	$6,14 \times 10^3$
SLY 4	$1,32 \times 10^6$	$5,37 \times 10^3$
SLY 5	$1,32 \times 10^6$	$5,81 \times 10^3$
SLY 6	$1,32 \times 10^6$	$5,69 \times 10^3$

4.6. Silymarin'in MDA-MB-231 Hücrelerinde Hücre göçüne etkisi

Transwell migrasyon deneyinde iki grup için ayrı ayrı olacak şekilde kuyucuk içerisine $0,8 \mu\text{m}$ çapındaki insertler eklendi ve üzerine serumsuz besi yeri içerisinde $1,32 \times 10^6$ MDA-MB-231 hücresi 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubunda 24. saatin sonunda üst kuyucukta bulunan hücrenin %55'inin göç ettiği görüldü. SLY grubunda ise uygulama sonunda %32 hücrenin alt kuyucuğa göç ettiği belirlendi. Sonuçlara bakıldığında 24 saat silymarin uygulamasının hücrelerin invazyon yeteneğini inhibe ettiğini göstermektedir (Tablo 4.4.) (Stoellinger & Alexanian, 2022).

Tablo 4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde transwell invazyon deneyi sonuçları.

MDA-MB-231		
Tekrarlanan deney sayısı	0.saat (üst kuyucuğa bırakılan toplam hücre sayısı)	24.saat (göç eden canlı hücre sayısı)
Kontrol 1	$1,17 \times 10^6$	$6,52 \times 10^4$
Kontrol 2	$1,17 \times 10^6$	$5,86 \times 10^4$
Kontrol 3	$1,17 \times 10^6$	$6,16 \times 10^4$
Kontrol 4	$1,17 \times 10^6$	$6,03 \times 10^4$
Kontrol 5	$1,17 \times 10^6$	$5,93 \times 10^4$
Kontrol 6	$1,17 \times 10^6$	$6,44 \times 10^4$
SLY 1	$1,17 \times 10^6$	$3,80 \times 10^4$
SLY 2	$1,17 \times 10^6$	$3,72 \times 10^4$
SLY 3	$1,17 \times 10^6$	$3,01 \times 10^4$
SLY 4	$1,17 \times 10^6$	$3,65 \times 10^4$
SLY 5	$1,17 \times 10^6$	$3,97 \times 10^4$
SLY 6	$1,17 \times 10^6$	$3,86 \times 10^4$

4.7. 2D İmmunohistokimyasal boyama ekspresyonlarının değerlendirilmesi

Meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde 24 saat silymarin uygulaması sonrasında EMT proteinlerine etkisi değerlendirmek için immünohistokimya metodu ile boyama gerçekleştirdik. Boyama sonucunda MMP-9 ve vimentin protein ekspresyonlarında 2D yöntemle elde edilen MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna göre SLY grubunda anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Epitelyaleliyal protein olan E-kaderin protein ekspresyonunda SLY grubunda görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşın N-kaderin ve fibronektin protein ekspresyonlarında MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla SLY grubuna anlamlı bir artış olduğu görüldü (Tablo 4.5.) ($p<0,05$). MDA-MB-231 hücrelerinde ise 2D yöntemle elde edilen hücrelerde E-kaderin, N-kaderin ve MMP-9 protein ekspresyonlarındaki artış anlamlı olarak görüldü. 24 saatlik silymarin uygulamasında MDA-MB-231 hücrelerinde fibronektin protein seviyesinde bir değişiklik kaydedilmedi. Bununla birlikte vimentin protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre SLY grubunda anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). 2D kültür metoduyla uygulama yapılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde EMT proteinleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. Bu proteinler kontrol grubunda N-kaderin, fibronektin ve MMP-9 immüno pozitif hücre değişimleri iki hücre hattı arasında istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p<0,05$). SLY grubuna baktığımızda ise iki hücre hattı arasında MMP-9 protein'i haricinde tüm proteinlerde anlamlı farklılık görüldü (Tablo 4.6.) ($p=0,004$).

Tablo 4.5. 2D kültür yöntemiyle elde edilen MCF-7 hücrelerinde İmmünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları.

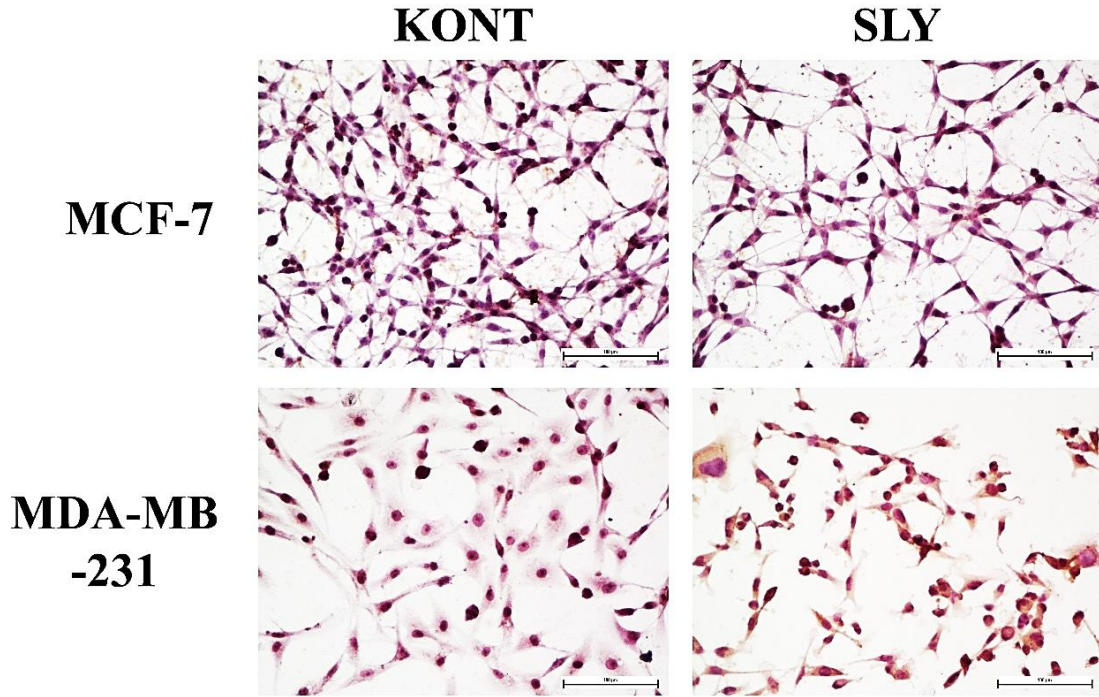
2D - MCF-7			
ANTİKOR	GRUP	Ort. \bar{x} SS	P Değeri
E-CAD	KONT	242,38 \bar{x} 14,83	p= 0,631
	SLY	239,66 \bar{x} 3,17	
N-CAD	KONT	281,96 \bar{x} 9,61	p= 0,04
	SLY	330,91 \bar{x} 3,27	
FİBRO	KONT	172,76 \bar{x} 5,24	p= 0,04
	SLY	197,06 \bar{x} 3,05	
VİM	KONT	307,73 \bar{x} 4,12	p= 0,04
	SLY	281,55 \bar{x} 4,30	
MMP-9	KONT	259,21 \bar{x} 4,46	p= 0,04
	SLY	209,00 \bar{x} 2,61	

Ort: Ortalama, SS: standart sapma, p değeri: istatistiksel anlamlılık, *p<0.05 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır, KONT: Kontrol, SLY: silymarin uygulama grubu

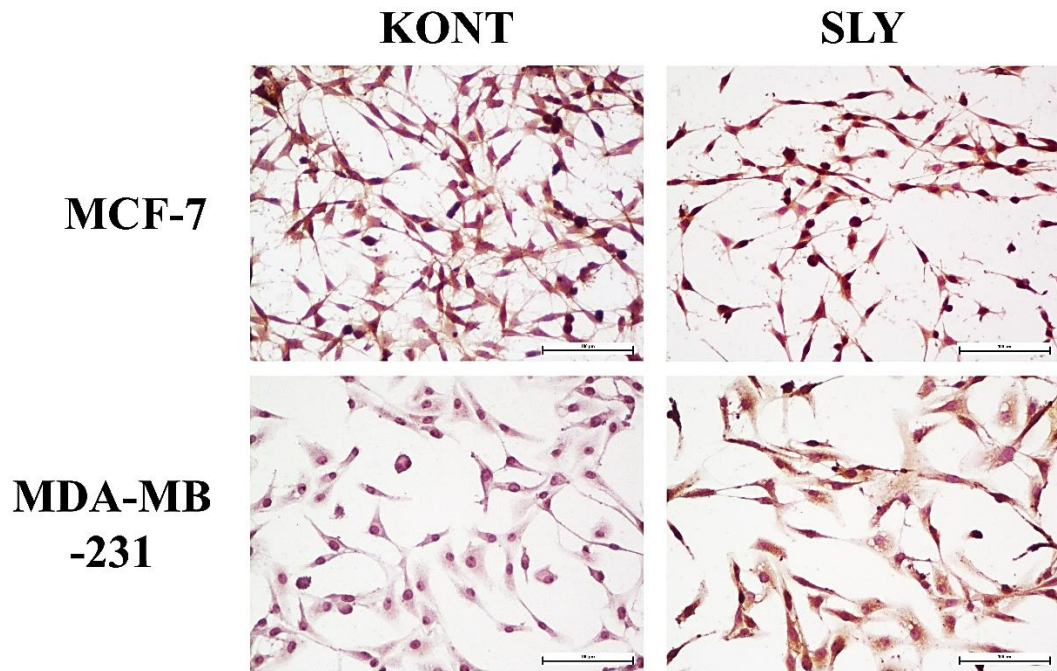
Tablo 4.6. 2D kültür yöntemiyle elde edilen MDA-MB-231 hücrelerinde İmmünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları.

2D – MDA-MB-231			
ANTİKOR	GRUP	Ort. \bar{x} SS	P Değeri
E-CAD	KONT	250,90 \bar{x} 3,50	p= 0,04
	SLY	265,41 \bar{x} 2,55	
N-CAD	KONT	266,83 \bar{x} 2,95	p= 0,04
	SLY	276,53 \bar{x} 2,74	
FİBRO	KONT	278,60 \bar{x} 3,28	p= 7,49
	SLY	278,80 \bar{x} 2,14	
VİM	KONT	306,23 \bar{x} 7,46	p= 0,04
	SLY	173,00 \bar{x} 4,62	
MMP-9	KONT	148,41 \bar{x} 2,36	p= 0,04
	SLY	204,03 \bar{x} 3,13	

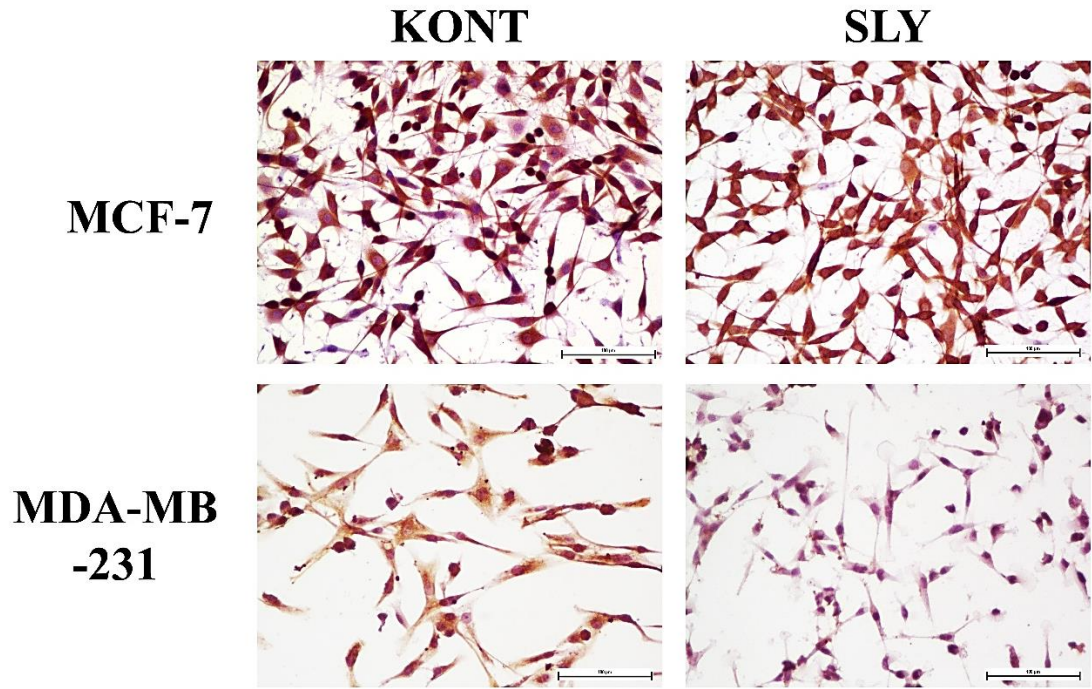
Ort: Ortalama, SS: standart sapma, p değeri: istatistiksel anlamlılık, p<0.05 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır, KONT: Kontrol, SLY: silymarin uygulama grubu



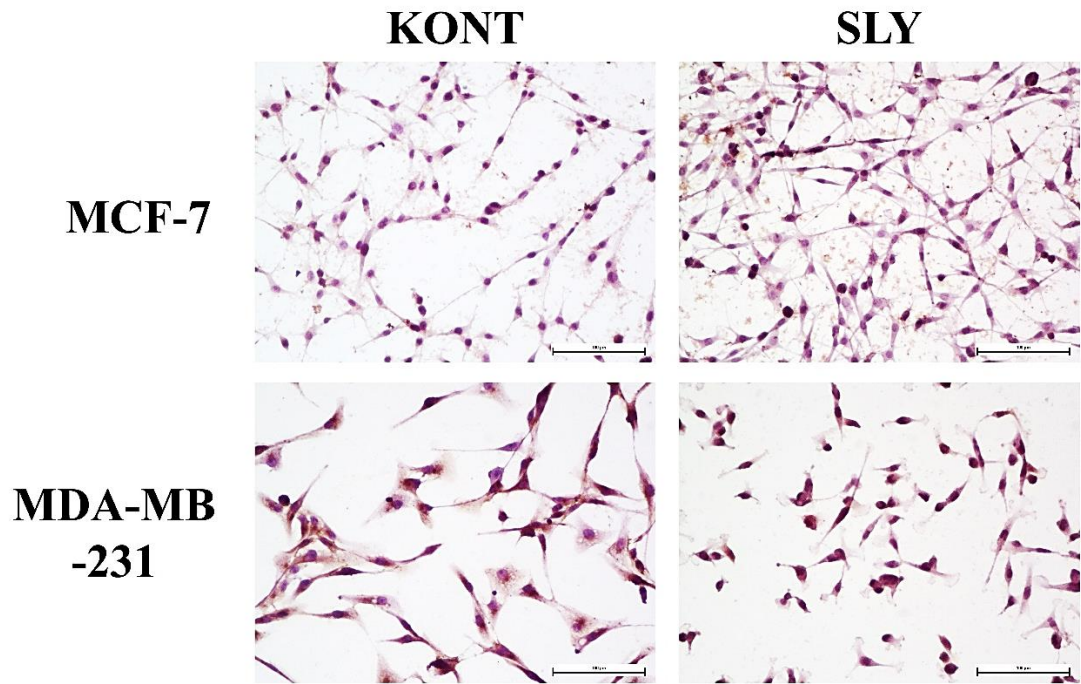
Şekil 4.5. E-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



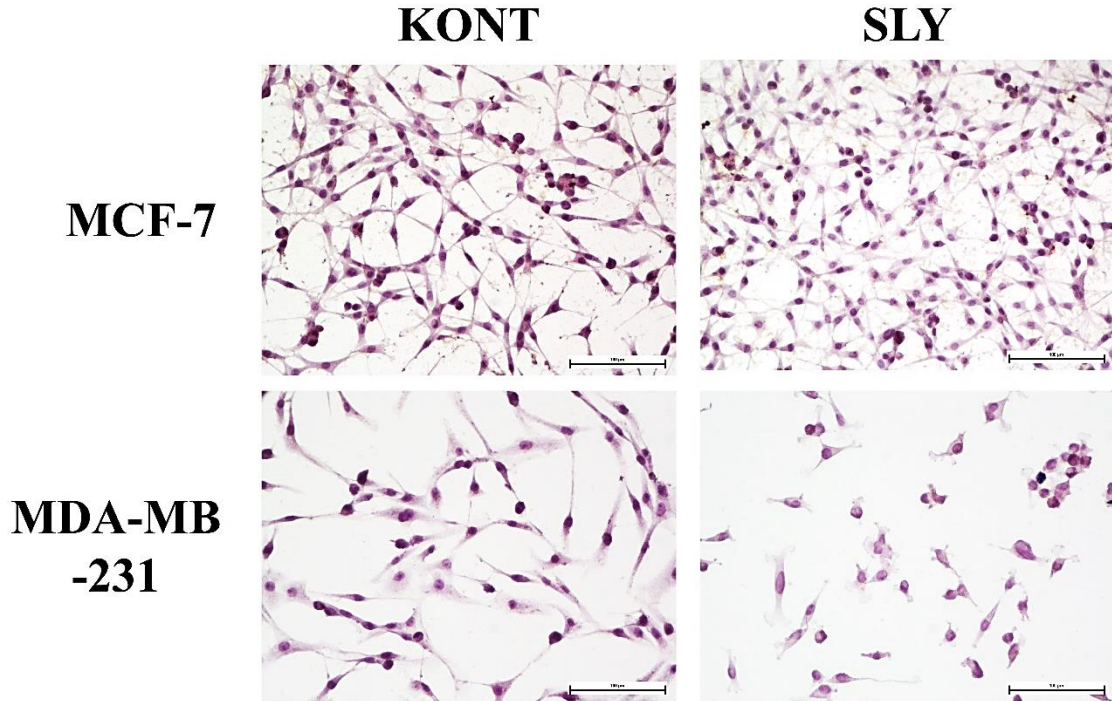
Şekil 4.6. N-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



Şekil 4.7. Vimentin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



Şekil 4.8. Fibronektin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



Şekil 4.9. MMP-9 protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.

4.8. 3D İmmunohistokimyasal boyama ekspresyonlarının değerlendirilmesi

Çalışmamızda oluşturulan MDA-MB-231 ve MCF-7 sferoidlerinde EMT proteinleri olan E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, MMP9 ve fibronektin ekspresyonları, immünohistokimyasal boyama yöntemiyle semi-kantitatif olarak belirlendi. Sferoidlerin boyama işlemleri için başka bir ortama transfer edilmesi gerekmektedir. Bu aktarım sırasında sferoidlerin görünür şekilde alınması ve zarar görmeden taşınması, deney sırasında karşılaşılan zorluklardan biridir. Fiksasyon işleminden sonra sferoidler genellikle transfer edildikleri kuyucuklarda yüzeyde kalmaktadır. Bu durum, boyama sırasında sferoidlerin pipet ucuna kaçmasına veya kuyucuğun duvarlarına yapışmasına yol açabilmektedir. Bu sebeple birçok sferoidin kaybolması, deneyin tekrarlanmasını zorunlu kılmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra, görüntüleme için sferoidler lamın üzerindeki lamel ile kapatılmıştır. Yapılan boyama sonucunda MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla SLY grubunda E-kaderin (Şekil 4.10), fibronektin (Şekil 4.12), vimentin (Şekil 4.13) ve MMP-9 (Şekil 4.14) protein ekspresyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (Tablo 4.7.) ($p < 0,05$). Mezenkimal biyobelirteç olan N-kaderin protein

ekspresyonunda artış istatistiksel olarak anlamlı görülmedi (Şekil 4.11) ($p=0,522$). MDA-MB-231 hücrelerinde ise kontrol grubuna göre SLY grubunda E-kaderin ve vimentin immünoaktivitesinde azalma istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p<0,05$). N-kaderin, MMP-9 ve fibronektin immünoaktivitelerinde ise kontrol grubuna göre SLY grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (Tablo 4.8.) ($p<0,05$). 3D yöntemde iki hücre hattı arasında kontrol grubunda E-kaderin, fibronektin, vimentin ve MMP-9 proteinlerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı görülürken ($p= 0,004$) N-kaderin immün pozitif hücrelerde değişim istatistiksel olarak anlamlı görülmedi ($p=0,055$). SLY grubunda ise iki hücre hattı arasında E-kaderin, N-kaderin, fibronektin ve MMP-9 protein ekspresyonlarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p=0,004$).

Tablo 4.7. 3D kültür yöntemiyle elde edilen MCF-7 sferoidlerinde İmmünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları.

3D - MCF-7

ANTİKOR	GRUP	Ort. \bar{x} SS	P Değeri
E-CAD	KONT	258,86 \bar{x} 1,80	p= 0,04
	SLY	248,50 \bar{x} 2,48	
N-CAD	KONT	225,65 \bar{x} 8,98	p= 0,522
	SLY	256,75 \bar{x} 3,04	
FİBRO	KONT	277,30 \bar{x} 3,31	p= 0,04
	SLY	260,76 \bar{x} 4,54	
VİM	KONT	289,03 \bar{x} 2,06	p= 0,04
	SLY	265,40 \bar{x} 4,04	
MMP-9	KONT	259,21 \bar{x} 4,46	p= 0,04
	SLY	266,86 \bar{x} 3,91	

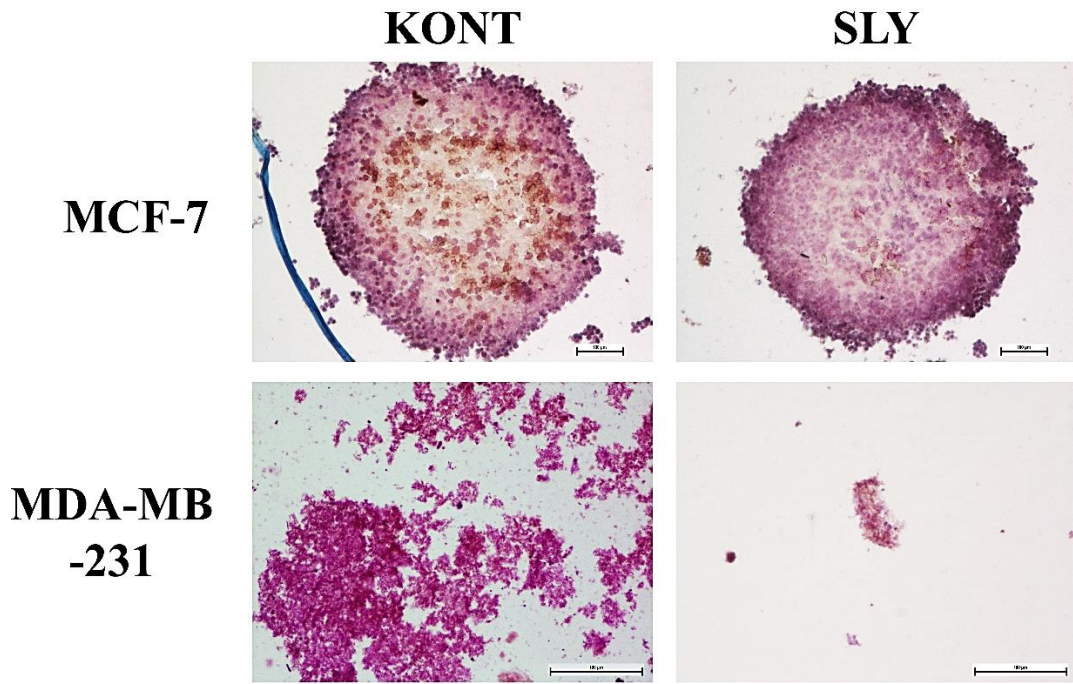
Ort: Ortalama, SS: standart sapma, p değeri: istatistiksel anlamlılık, * $p<0.05$ gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır, KONT: Kontrol, SLY: silymarın uygulama grubu

Tablo 4.8. 3D kültür yöntemiyle elde edilen MDA-MB-231 sferoidlerinde İmmünohistokimyasal parametrelerin istatistiksel analiz sonuçları.

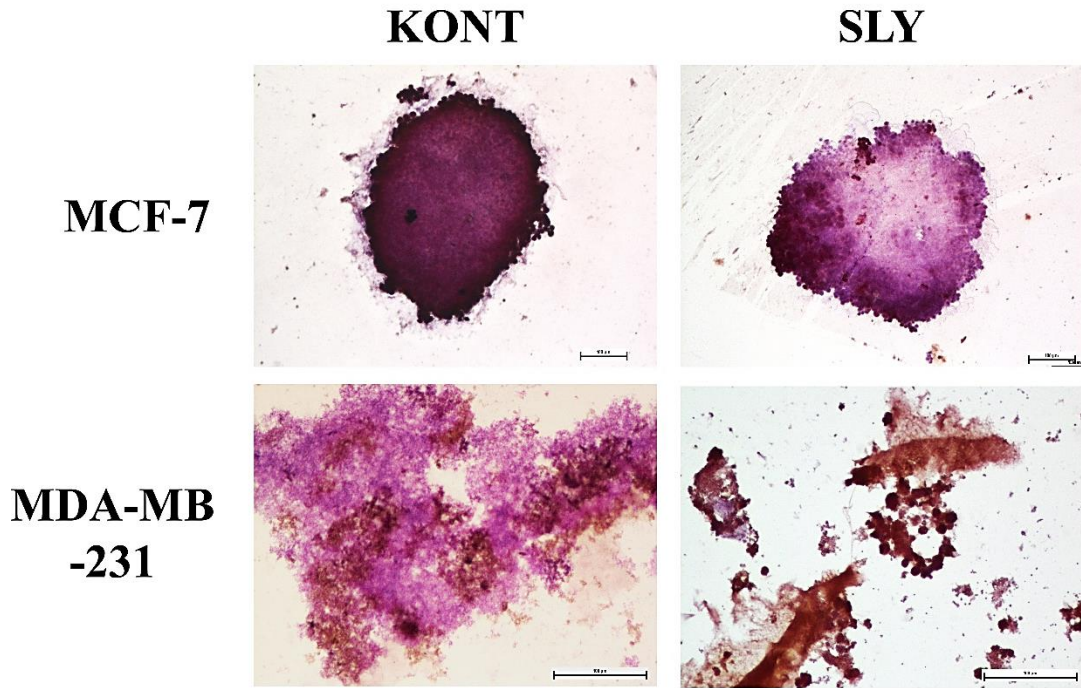
3D – MDA-MB-231

ANTİKOR	GRUP	Ort. \bar{x} SS	P Değeri
E-CAD	KONT	268,66 \bar{x} 3,14	p= 0,04
	SLY	235,80 \bar{x} 3,90	
N-CAD	KONT	247,25 \bar{x} 3,14	p= 0,04
	SLY	268,25 \bar{x} 2,54	
FİBRO	KONT	197,28 \bar{x} 2,67	p= 0,04
	SLY	239,35 \bar{x} 3,87	
VİM	KONT	310,41 \bar{x} 2,44	p= 0,04
	SLY	267,63 \bar{x} 3,65	
MMP-9	KONT	198,70 \bar{x} 2,15	p= 0,04
	SLY	236,65 \bar{x} 3,11	

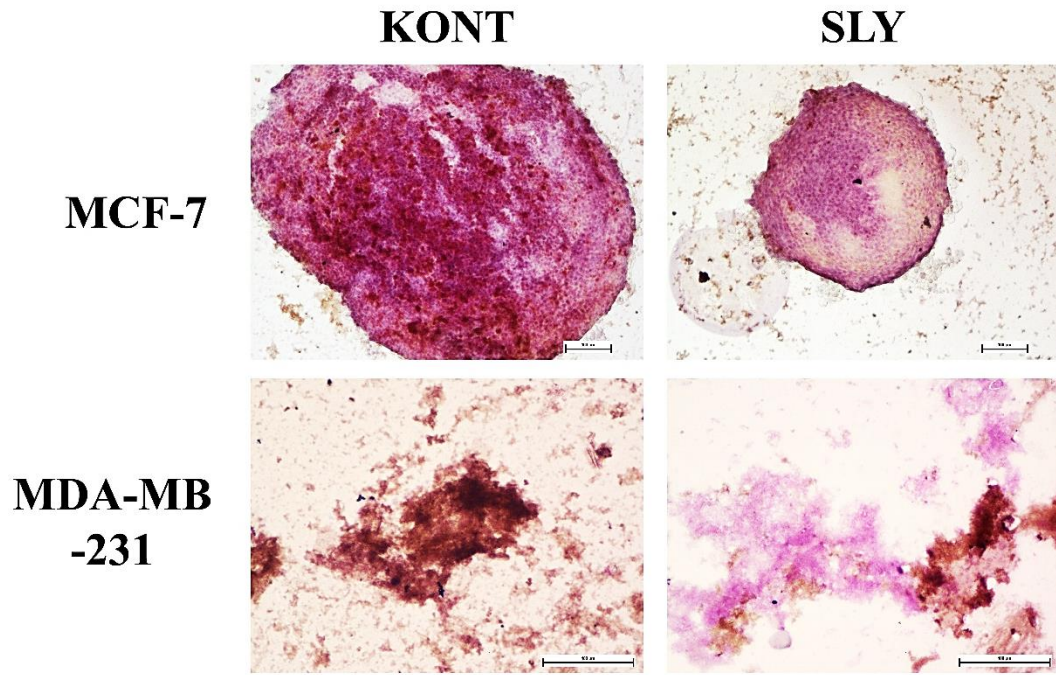
Ort: Ortalama, SS: standart sapma, p değeri: istatistiksel anlamlılık, *p<0.05 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır, KONT: Kontrol, SLY: silymarın uygulama grubu



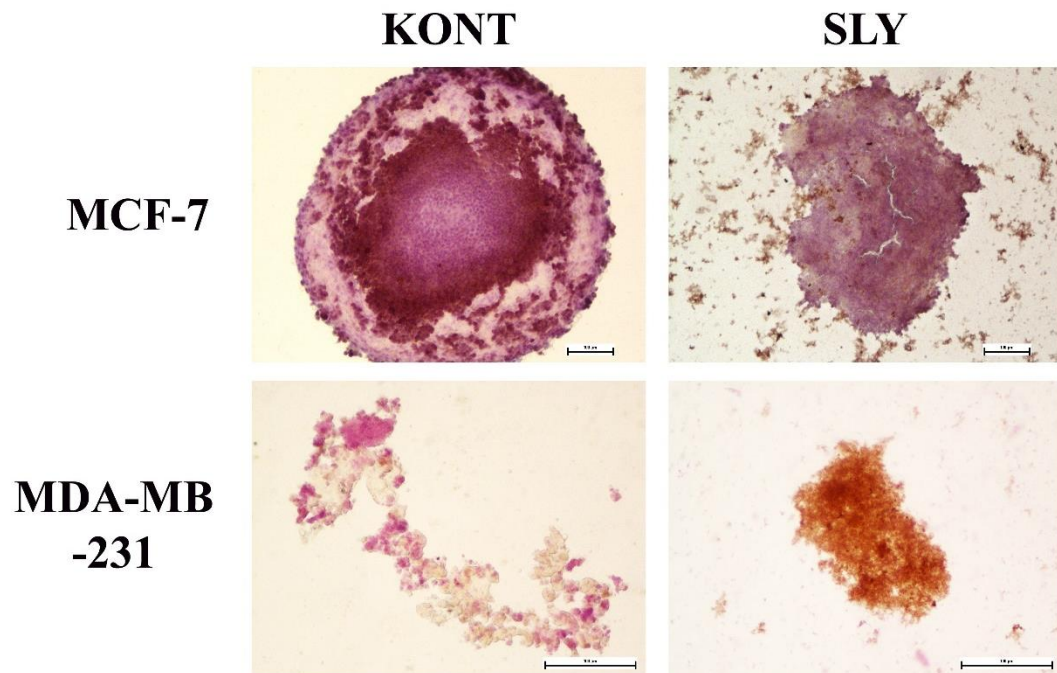
Şekil 4.10. 3D kültürde E-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



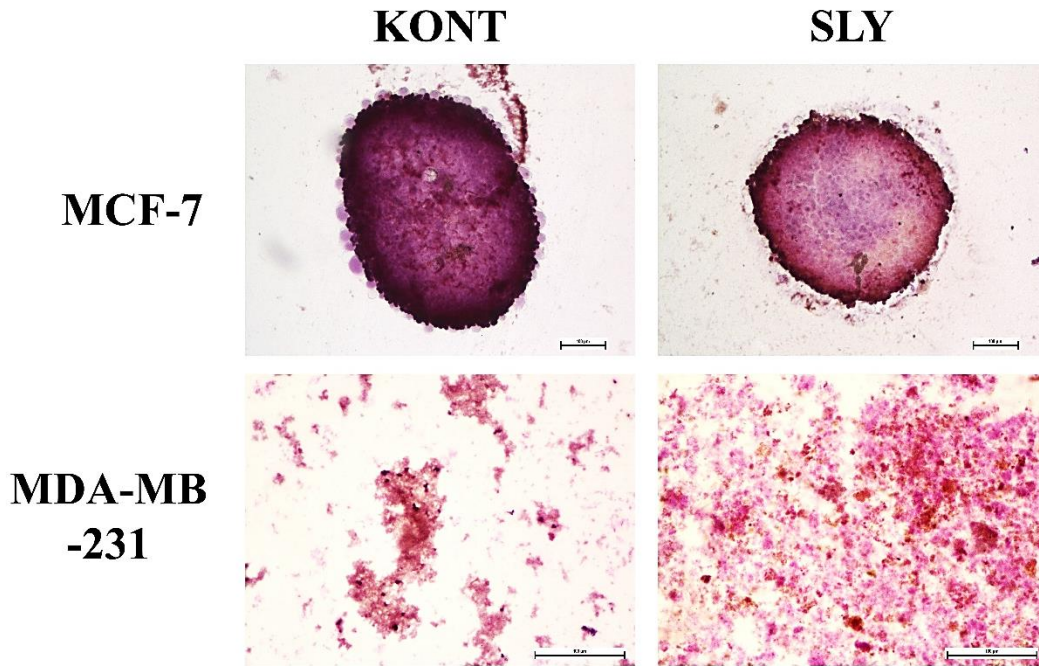
Şekil 4.11. 3D kültürde N-kaderin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



Şekil 4.12. 3D kültürde vimentin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



Şekil 4.13. 3D kültürde fibronektin protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.



Şekil 4.14. 3D kültürde MMP-9 protein ekspresyonu immünohistokimyasal boyama görüntüleri.

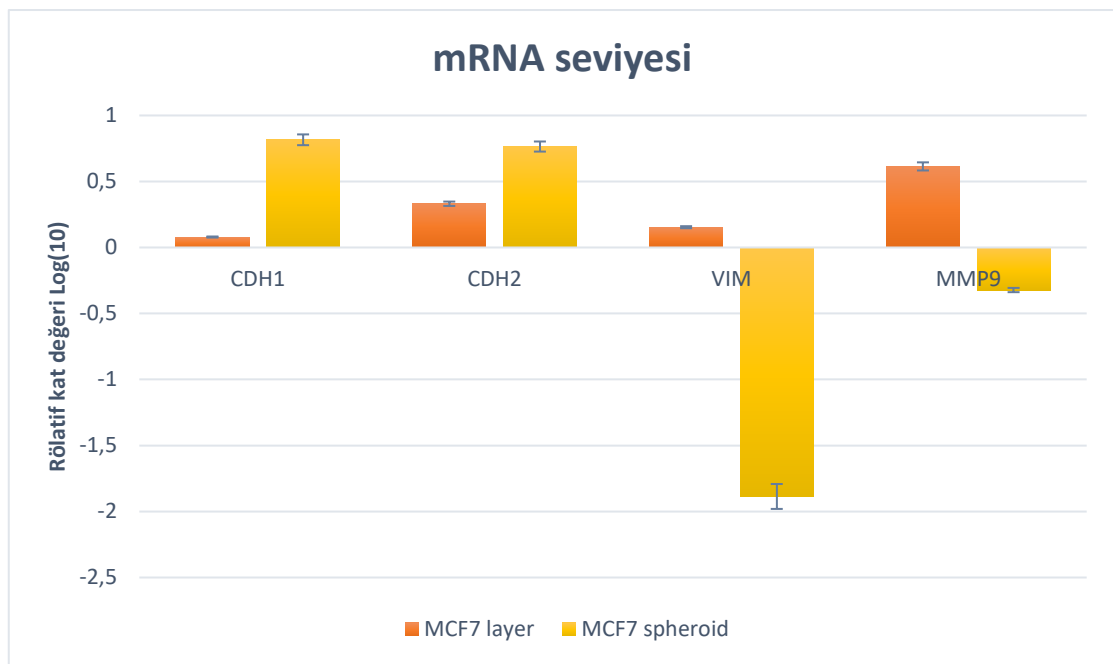
4.9. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Hücrelerde eksprese olan ilgili genlerin mRNA düzeyleri, housekeeping gen olan *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temelinde normalize edilerek Real-Time PCR ile değerlendirilmiştir. Rölatif gen ifadesi her bir uygulamaya göre değerlendirildiğinde;

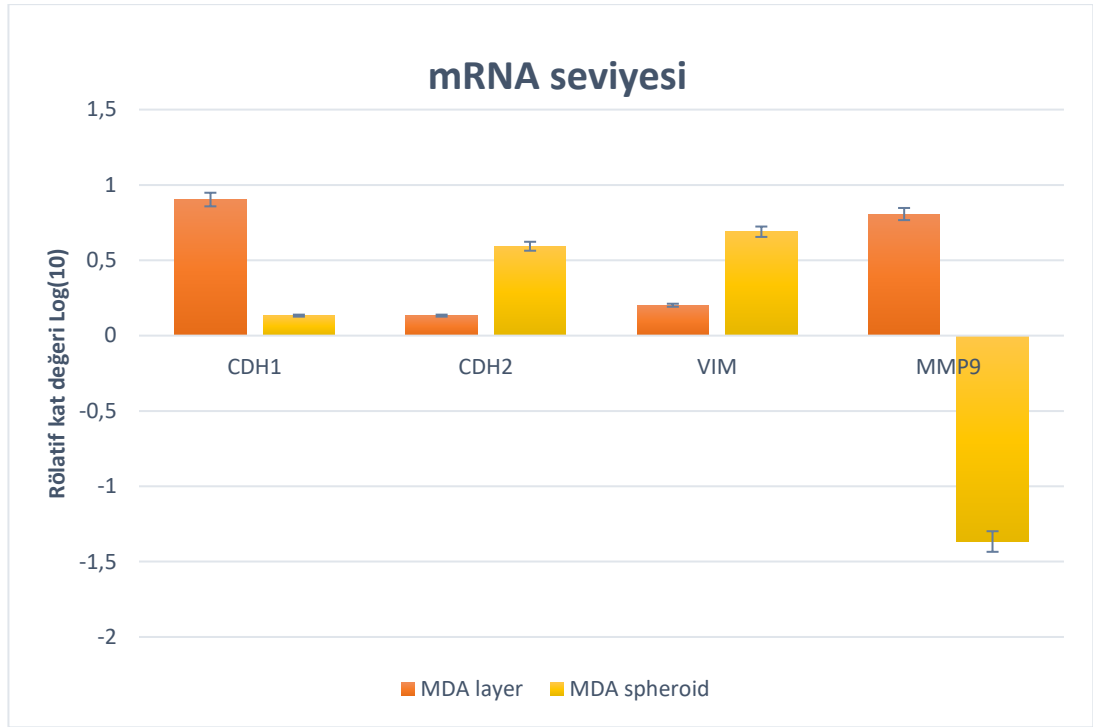
MCF-7 2D kültür ortamında silymarin uygulamasında *CDH1*, *CDH2*, *Vimentin* ve *MMP9* mRNA seviyeleri ilgili kontrole göre analiz edilmiştir. *CDH1* mRNA'sı 1.2 kat, *CDH2* mRNA'sı 2.14 kat ($p < 0.001$), *Vimentin* mRNA'sı 1.42 kat, *MMP9* mRNA'sı 4.11 kat ($p < 0.001$) kontrole göre artmıştır. MCF-7 3D kültür ortamında ise silymarin uygulamasında *CDH1*, *CDH2*, *Vimentin* ve *MMP9* mRNA seviyeleri ilgili kontrole göre analiz edilmiştir. *CDH1* mRNA'sı 6.5 kat ($p < 0.001$) ve *CDH2* mRNA'sı 5.81 kat artarken ($p < 0.001$), *Vimentin* mRNA'sı 0.013 kat ($p < 0.001$) ve *MMP9* mRNA'sı 0.48 kat kontrole göre azalmıştır (Şekil 4.15).

MDA-MB-231 2D kültür ortamında silymarin uygulamasında *CDH1*, *CDH2*, *Vimentin* ve *MMP9* mRNA seviyeleri ilgili kontrole göre analiz edilmiştir. *CDH1* mRNA'sı 8 kat ($p<0.001$), *CDH2* mRNA'sı 1.36 kat, *Vimentin* mRNA'sı 1.59 kat, *MMP9* mRNA'sı 6.41 kat ($p<0.001$) kontrole göre artmıştır. MDA-MB-231 3D kültür ortamında oluşturulan sferoidlere silymarin uygulamasında *CDH1*, *CDH2*, *Vimentin* ve *MMP9* mRNA seviyeleri ilgili kontrole analiz edilmiştir. *CDH1* mRNA'sı 1.36 kat, *CDH2* mRNA'sı 3.92 kat ($p<0.001$), *Vimentin* mRNA'sı 4.9 kat ($p<0.001$) artarken ve *MMP9* mRNA'sı 0.043 kat ($p<0.001$) kontrole göre azalmıştır ($p<0.001$) (şekil 4.16).

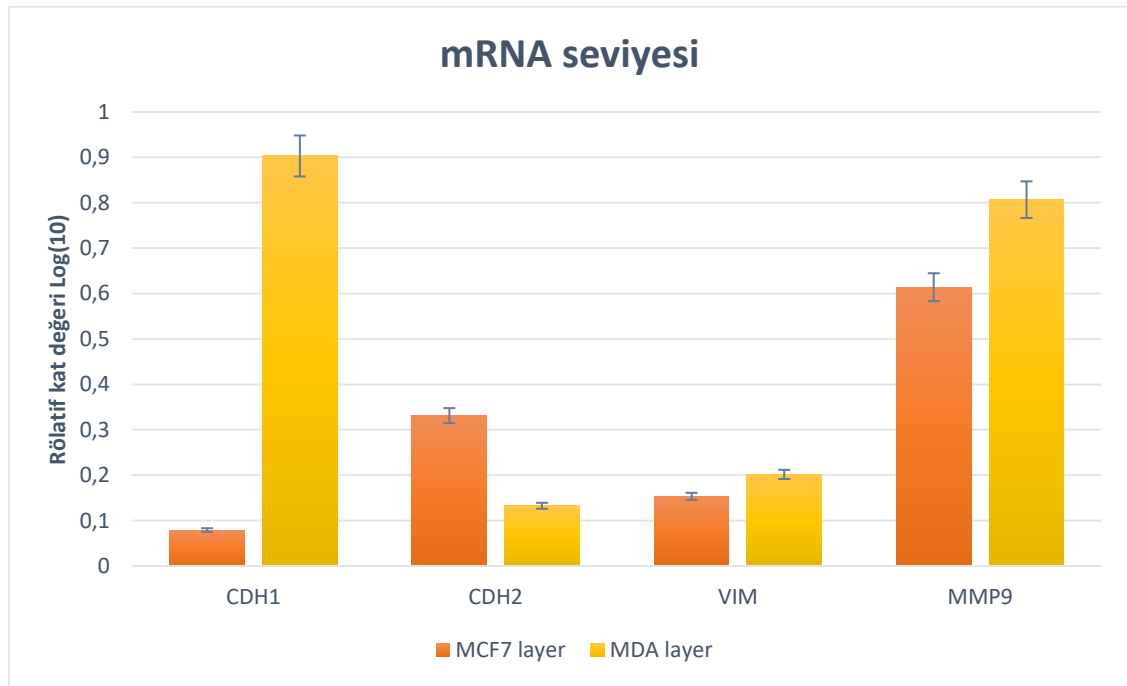
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hem 2D hem de 3D kültür ortamlarındaki gen ekspresyon değişimleri kontrole göre kıyaslamalı olarak Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.



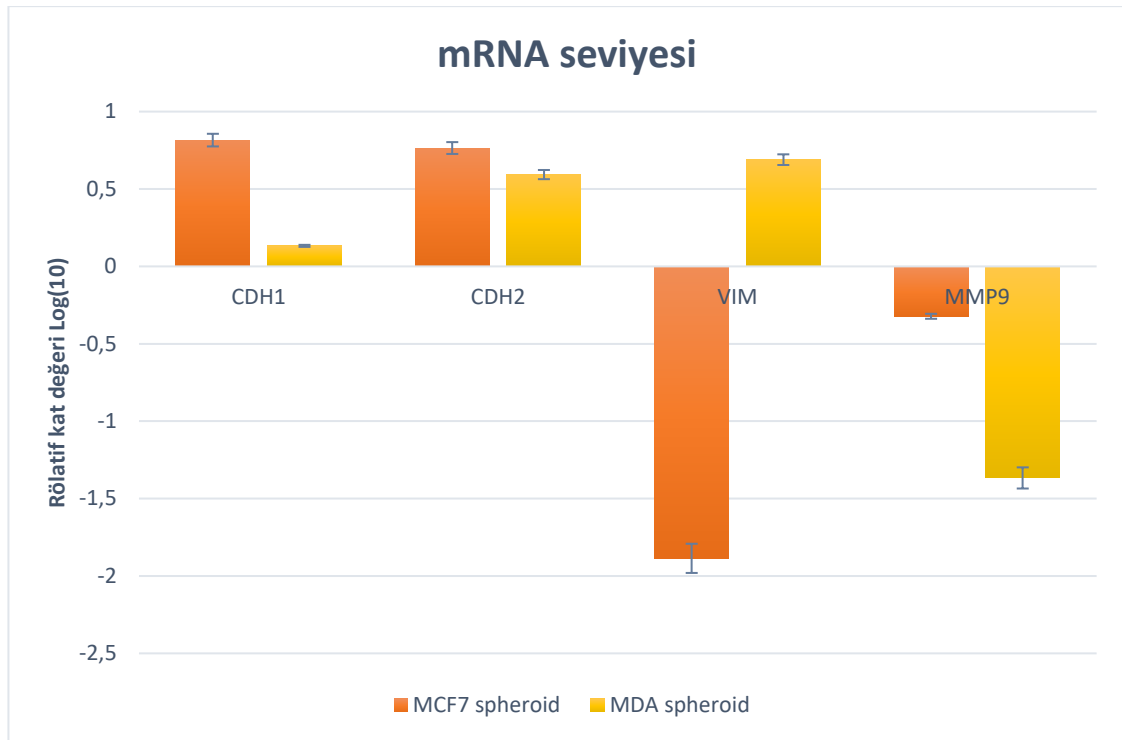
Şekil 4.15. Silymarin uygulamasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 2D ve 3D kültür ortamlarında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p<0.001$).



Şekil 4.16. Silymarin uygulamasında MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin 2D ve 3D kültür ortamlarında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).



Şekil 4.17. Silymarin uygulamasında MCF-7 ve MDA-MB-231 2D kültür ortamında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).



Şekil 4.18. Silymarin uygulamasında MCF-7 ve MDA-MB-231 3D kültür ortamında kontrole göre mRNA kat değişimlerinin logaritmik olarak gösterilmesi ($p < 0.001$).

4.10. Western Blot Analizinin Değerlendirilmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri örneklerinde yapılan western blot analizi sonucunda hem 2D hem de 3D yöntemlerinde kontrol ve silymarin gruplarında EMT biyobelirteçleri olan E-kaderin, MMP-9 ve Fibronektin proteinlerinin düzeylerde eksprese edildiği konfirme edildi. İmmunohistokimyasal incelemelerimizde bu proteinlerin ekspresyon alanları incelendi ve kontrol ile silymarin grupları arasındaki farklılıklar göz önünde bulunduruldu. Western blot analizimiz sonucunda da bu proteinlerin çeşitli düzeylerde, her iki grupta yer alan hücrelerde hem 2D hem de 3D ortamlarında eksprese olduğu gözlemlendi.

MCF-7 hücrelerinde 2D kültür ortamında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında E-kaderin, MMP-9 ve fibronektin birbirlerine benzer oranda bant kalınlığında azalma sonucuna ulaşıldı. Ancak 3D kültür metodu ile oluşturulan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla E-kaderin protein ekspresyon düzeyinin bant kalınlığında artış olduğu fibronektin

protein seviyesindeki bant kalınlığında azalma görüldü. Bunlardan farklı olarak ise 3D hücrelerde MMP-9 protein seviyesi kontrol grubuyla kıyaslandığında bantlaşmanın görülmediği sonucuna ulaşıldı.

MDA-MB-231 hücrelerinde 2D kültür ortamında kontrol ile uygulama grubu arasında E-kaderin ve MMP-9 protein seviyelerinde bant kalınlığında bir değişiklik görülmedi. Fibronektin protein seviyesinde ise kontrol grubuna göre uygulama grubunda bant kalınlığında azalma olduğu görüldü. 3D kültür metodu ile oluşturulan sferoidlere baktığımızda kontrol grubuna kıyasla E-kaderin protein seviyesinde belirgin bir değişiklik görülmezken, MMP-9 ve fibronektin protein seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarında bant seviyelerinde artış olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin çeşitli nedenlerle anormal biçimde çoğalmaları ile karakterize global bir hastalıktır. Meme kanseri, kadınlarda farklı şekillerde ortaya çıkan bir kanser türüdür (Nagarajan & McArdle, 2018). Moleküler kanıtlara göre, meme kanseri üç gruba ayrılır. Bunlar; östrojen reseptörü (ER +) veya progesteron reseptörü (PR +) eksprese eden meme kanseri, hormon reseptörü olan insan epidermal reseptörü 2 (HER2 +) eksprese eden ve üçlü negatif meme kanseridir (TNBC) (ER-, PR-, HER2-) (Lehmann et al., 2011; Liedtke et al., 2008). Metastatik karakteri fazla olan üçlü negatif meme kanserinde beş yıllık sağkalım oranı, adjuvan kemoterapiyle desteklense dahi %30'dan az olduğu bildirilmiştir (Riggio et al., 2021). Meme kanseri tedavisi için cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere çok sayıda tedavi mevcuttur (Nounou et al., 2015; Sharma et al., 2010). Bu tedavilerin varlığına rağmen meme kanseri insidansı ve mortalitesi yüksek olmaya devam etmektedir (Kashyap et al., 2022). Son yıllarda doğal kemopreventif ve kemoterapötik ajan olarak gösterilen silymarin'in, sağlıklı hücrelere karşı daha az yan etki ve toksisite göstermesi nedeniyle kanser tedavisi çalışmalarının ilgi odağı haline gelmiştir (Ramasamy & Agarwal, 2008; Tuli et al., 2021). Çalışmamızda MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde silymarin'in etkin dozunu belirlemek için MTT testi kullanıldı. Sitotoksititeyi belirlerken iki farklı hücre kültürü tekniği kullanıldı. Her hücre grubu için hem 2D hem de 3D asılı damla metodu ile etkin doz belirlemesi yaptık. Hücre kültür çalışmaları, günümüzde sıklıkla kullanılan 2D yöntemle, kültür kabı yüzeyine yapışık halde besi yerleri ile başlamıştır. 2D kültür, uygun maliyetli bir analiz yöntemi sunmasına karşın, vücuttaki 3D ortamın aksine hücrelerin morfolojilerini değiştirerek düz bir yüzeye yapışmaya zorlamaktadır. Bu nedenle 2D kültürler, vücut içindeki ortamı taklit etmede ve hücrelerin mikroçevreleri ile olan etkileşimlerini açıklamada yetersiz kalmaktadır (Souza et al., 2018). 3D kültürdeki hücrelerle yapılan analizler 2D ile kültürlenmiş çalışmalara oranla daha sağlıklı sonuçlar

sağlamaktadır (Habanjar et al., 2021; Ryu et al., 2019). 3D kültürlerde yaygın olarak kullanılan teknikler arasında sferoid veya organoid sistemleri, mikroakışkanlar, hidrojeller ve 3B biyobaskı (3D Bioprinting) bulunmaktadır (Habanjar et al., 2021). Çalışmamızda sferoid tekniğini kullanıldı ve sferoid oluşturmak için düşük maliyetli olan asılı damla metodonu tercih edildi.

Literatür incelendiğinde genellikle 2D kültür metodu kullanılarak sitotoksitite belirleme çalışmalarının olduğunu görüldü. 2015 yılında F. Li ve ark. 2D hücre kültüründe CCL-228-SW 480 Kolon Kanseri hücrelerinde 24., 48. ve 72. saat silymarin uygulaması gerçekleştirmiş ve hemasitometri yöntemi ile hücreleri sayarak silymarin için ID50 (İnhibisyon dozu %50) dozunu 100 μ M olarak saptanmıştır (F. Li et al., 2015). 2021 yılında Rugamba ve ark. ise yaptıkları çalışmada, 2D hücre kültüründe NSCLC küçük hücreli akciğer dışı kanser hücrelerinde (A549, H292, H460) 48 saat süreyle 50-400 μ M doz aralığında silymarin uygulaması yapmış ve IC50 değeri 100 μ M olarak belirlemiştir (Rugamba et al., 2021). Eş zamanlı olarak yapılan 2D ve 3D kültür ortamlarında etkin doz belirleme çalışmaları ise 2014 yılında Abdollahi ve ark. MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde silymarin etkisini belirli zaman aralıkları ile uygulamışlardır. 2D kültürler için 1. günde ve 3D sferoidler için 4. günde tamamlanmış. Uygulama sonunda, 3D kültürdeki IC50 dozu (1500 μ mol/l), 2D kültürdeki değerden (500 μ mol/l) üç kat daha yüksek olduğu görülmüş (Abdollahi et al., 2014). 2018'de yapılan bir çalışmada 2D ve 3D hücre kültüründe T47D meme kanseri hücrelerinde silymarin etkisi farklı zaman aralıkları ile 2D kültürde uygulamanın 1. gününde ve 3D'de ise sferoid oluşumuna takiben 4. günde uygulamaları yapılmıştır. Süre sonunda yapılan uygulamada 3D'nin IC50'si 2D kültürdekinden daha büyük olduğu ve bu da sferoidlerin 3D modelde ilaca karşı daha fazla dirence sahip olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir (Yazdi Rouholamini et al., 2018).

Çalışmamızdaki sitotoksitite testinde, 2D hücre kültür ortamında hücre ekiminden sonraki 1. günde, 3D hücre kültüründe ise asılı damla yöntemiyle sferoid oluşumunun başladığı 5. günde silymarin uygulaması yapıldı. MDA-MB-231 hücrelerinde 24. saat sonunda 2D kültürde etkin doz 60 μ M, 3D kültürde ise 120 μ M doz belirlenirken, MCF-7 hücrelerinde 2D kültürde belirlenen doz 90 μ M, 3D kültürde ise doz miktarının azalarak 60 μ M olarak etki ettiği görüldü. MDA-MB-231 hücrelerinde gördüğümüz 3D kültür metodundaki doz etkinliğinin 2 kat artması abdollahi ve ark. yaptığı çalışma verileri ile

uyumlu olarak görüldü (Abdollahi et al., 2014). Boo ve ark. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Karboplatin ve Doksorubisin ile tedaviden sonra 2 boyutlu kültürlerdeki IC50 değerleri 3 boyutlu kültürlerdekilere göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir (Boo et al., 2017). Biz de çalışmamızda literatürdeki bu bilgelerin de yer aldığı doz aralıklarını MTT yöntemi ile uyguladık ve IC50 değerlerini belirledik. Boo ve ark. yaptığı çalışma verisi ile uyumlu olarak biz de MCF-7 hücrelerinde 2D kültürdeki IC50 dozunu 3D kültüre göre daha yüksek olduğu görüldü.

Metastaz, kanser kaynaklı ölümlerin ilk sırada yer almasının sebebidir (Park et al., 2022). Katı tümörlerden ölümlerin %90'ı metastatik yayılma kaynaklıdır (Kramer et al., 2013). Metastaz sürecinde ilk adım, kanser epitel hücrelerinin tipik özelliklerinin göç eden ve istilacı hücrelere geçici dönüşümüdür; bu süreç aynı zamanda EMT olarak da adlandırılır (Huang et al., 2020). Hücre göçü, tümör hücrelerinin hücre-hücre yapışma proteinlerinin kaybıyla başlar ve genellikle hücrelerin hücre dışı matriksi aşmasını ve çevreleyen dokulara yayılması ile gerçekleşen istila ve göç süreçlerini başlatır. Çalışmamızda metastazın invazyon basamağını 2D kültürde yara iyileşme modeli oluşturarak 3D kültürde ise transwell deneyi ile değerlendirdik. 2D kültürler için kullanılan yara iyileşmesi modeli hücre göç kabiliyetini zaman-alan karşılaştırması yaparak değerlendiren bir yöntemdir (Martinotti & Ranzato, 2020). Tekniğe adını veren 'yara iyileşmesi' süreci beş aşamaya ayrılır; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, migrasyon ve yeniden yapılanmadır. Yara iyileşmesi sırasında hücrelerin yara alanına doğru çoğalması ve göç etmesi gerekir. Bu aşamada yara iyileşmesinde hücrelerin yara alanına göçünde hız değerlendirilir (Martinotti & Ranzato, 2020). 3D kültür ortamında hücre göçünü taklit etmek için yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri transwell analizidir (Falasca et al., 2011). Bu yöntemde belli bir por çapına sahip membran üzerine ECM'i taklit etmek için matrigel uygulaması yapılır. Hücrelerin hem matrigel içinden hem de membran porlarında diğer tarafa geçmelerine izin verilir. Bu teknik kemotaksiyi kullanarak araştırmacıların hücre göç hızını değerlendirmesine izin verir (Gau & Roy, 2020). Çalışmamızda 2D kültür için 0., 6., 12., 18. ve 24. saatlerde ışık mikroskopi ile alan ölçümü yapılarak hücre göçü yara iyileşmesi tekniği ile değerlendirildi. Çalışmalara bakıldığında benzer olarak Lingling ve ark. 2D kültürde MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine 12 ve 24 saat silymarin uygulamışlar ve doza bağlı olarak göç karşıtı etkilerinin 30 ila 90 μ M arasında olduğunu belirtmişlerdir (Si et al., 2020). 2021 yılında Sung Hung Kim ve ark. yaptığı çalışmada, Silymarin uygulamasının (MDA-MB-231

hücreleri, 100 ve 200 µg/ml ve MCF-7 hücreleri 50 ve 100 µg/ml), her iki meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği ve 24. saat sonunda yara alanının halen açık olduğunu yani hücre göç hızını yavaşlattığını söylemişlerdir (S. H. Kim et al., 2021). Başka bir çalışmada Sun ve ark. 24 saat 50 µg/mL silybinin uygulaması yapılan 4T1 meme kanseri hücrelerinde kontrol grubunda yara alanında tamamen kapanma olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşılık, silybinin ile tedavi edilen hücrelerde hala belirgin bir yara alanı olduğu görülmüştür (Sun et al., 2016). 2020 yılında MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan yara yeri deneyinde 24. saat sonunda kontrol grubunda tam bir kapanma görülürken 40 µM, 80 µM ve 160 µM dozlarda uygulanan silymarin gruplarında yara alanlarında doza bağlı olarak en az kapanma yüksek dozda olduğu görülmüştür (Lashgarian et al., 2020). Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak 2D hücre kültüründe biz de, silymarin'in MDA-MB-231 hücrelerin 60 uM MCF-7 hücrelerinde 90 uM dozda hücre göçünü kontrol grubuna göre anlamlı derecede engellediğini gördük. Ekstrasellüler matriks alanından geçiş, kanser hücrelerinin primer tümörün uzak alanlarına yayılması yani metastası için kritik bir basamağıdır. Hücrelerin göç kabiliyetini kazanması, birincil bölgeden hedef organa göç için anahtar özelliğidir. Bu özellikte herhangi bir değişiklik metastatik kaskadı kesintiye uğratacaktır (Chen & Thompson, 2003). Göç, EMT ve ilaç direnci, in vivo TNBC'nin agresif ve metastatik fenotiplerinin ayırt edici özellikleridir. 2020 yılında yapılan çalışmada, MDA-MB-231 sferoidlerinin EMT'ye ve toksikolojik tepkiye karşı yüksek dirence sahip olduğu gösterilmiştir (Huang et al., 2020). Çalışmamızda silymarin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri sferoidlerinde, metastatik yeteneği değerlendirmek için transwell migrasyon tahlili yapıldı. Deneyimizin sonuçlarına göre MCF-7'de hücrelerin %4'ünün, MDA-MB-231'de ise hücrelerin %55'inin göç ettiği görülmüştür. 3D yöntemde, 2D ile kıyaslandığında silymarin'in uygulanan dozunun hücre göçünün MDA-MB-231 hücre sferoidlerinde ancak %45'ini engellediği, MCF-7 hücre sferoidlerinde ise bu oranın %96'ya çıktığı görülmüştür. Bilimsel literatüre baktığımızda benzer şekilde Lashgarian ve ark. MDA-MB-231 hücrelerinde 40, 80 ve 160 uM silymarin uygulamasının 3D kültür yönteminde sırasıyla %36,2, %64,6 ve %87,3 oranlarında hücre göçünü engellediğini göstermişlerdir (Lashgarian et al., 2020). Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak silybin B'nin 2D yöntemlerde agresif karakterli kanser hücrelerinde düşük dozlarda daha etkili olurken epitelyal karakterli kanser hücrelerinde daha yüksek dozlarda etkili olduğu görülmüş ve bu farklılığın silybinin B'nin hücre yapışma proteinleri üzerinde potansiyel etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. 3D kültür yönteminde kullanılan düşük dozda bile hücre

göç kabiliyetinin yüksek oranlarda etkilenmesi silybin B'nin yapışma proteinleri üzerinden anti metastatik etki ettiğinin kanıtı olarak kabul edilebilir.

EMT birden fazla hücresel aktivitenin olduğu bir süreçtir. Hücre fenotipinin ve polaritesinin kaybı, E-kaderin ekspresyonunun aşağı regülasyonu, N-kaderin ekspresyonunun yukarı regülasyonu ve invaziv kapasitenin artırılması dahil olmak üzere epitelyal durumdan mezenkimal duruma geçtiği süreci ifade eder (Bakir et al., 2020; Huang et al., 2020; Marconi et al., 2021; M. Singh et al., 2018). EMT'nin aşamalı ilerlemesi ve tersine çevrilebilirliği; parsiyel (Kısmi) EMT, tam EMT ve MET durumların görülmesi ile sonuçlanır (Saitoh, 2018). Kısmi EMT ya da Parsiyel EMT olarak da isimlendirilen EMT sürecinde hem epitelyal hem de mezenkimal özellikte hücreler görülür (Pastushenko & Blanpain, 2019b; Saitoh, 2018). İntravazasyondan sonra, EMT geçiren hücreler kan dolaşımında dolaşan tümör hücreleri (CTC'ler) olarak bulunurlar ve uzak organlara doğru ekstrasvaze olur (Jie et al., 2017). Hücreler, kaderin anahtarıyla temsil edilen embriyogenez sırasında tam EMT geçirmesine rağmen, kanser hücreleri kısmi EMT olarak adlandırılan şekilde epitel ve mezenkimal belirteçleri (epitelyal/mezenkimal (E/M) fenotipi) eş zamanlı olarak ifade eder (Shibue & Weinberg, 2017). Kanda yaşayan CTC'ler E/M fenotipleri sergiler, anoikise dirençli hale gelir ve kan dolaşımından bir şekilde çıkarlar (Yu et al., 2013). Ek olarak, etkili metastaz, epitel morfolojisini tamamen kaybetmeyen ve mezenkimal morfolojiyi tamamen edinmeyen kanser hücreleri tarafından meydana gelir. Bu nedenle, kısmi EMT edindikten sonra, E/M fenotiplerine sahip kanser hücreleri kalan epitel karakterleri aracılığıyla kolektif hücre göçüne uğrayabilir ve mezenkimal karaktere ulaşarak ECM'ye bağlanmayı artırabilir. Bu nedenle, yakın zamanda kanser hücrelerinin tam EMT yerine kısmi EMT'ye (E/M fenotipi) uğrama yeteneğinin daha yüksek bir metastatik risk oluşturduğu fark edilmiştir (Saitoh, 2018).

2D kültürlerle karşılaştırıldığında, 3D hücre kültürü modelleri birincil tümörlerdeki mikro ortamı daha iyi taklit edebilir. Çünkü 3D kültür şartlarında mikro ortamın, hipoksi, proliferasyon, yaşayabilirlik, göç, farklılaşma (EMT) ve ilaç duyarlılığı dahil olmak üzere çok sayıda hücresel ve fonksiyonel aktiviteyi değiştirdiği kanıtlanmıştır (Friedrich et al., 2009; Huang et al., 2020; Lovitt et al., 2013; M. Singh et al., 2015; Wang et al., 2014; Wenzel et al., 2014). 2D hücre kültürleri, klinik öncesi çalışmalarda kullanılan yüksek verimli tarama yaklaşımına uyarlanabilir ve ilaç taraması için hızlı,

nispeten düşük maliyetli bir yaklaşım sunar. Bunun aksine, tümör ilerlemesini düzenleyen temel bir bileşen olan hücre dışı matriks ve üç boyutlu düzenlenme gibi iki temel faktörden yoksun oldukları için bazı sınırlamaları bulunmaktadır (Villasante & Vunjak-Novakovic, 2015). Katı tümörler *in vivo* olarak üç boyutlu yapılarda büyürler. Sferoidler, hücre-hücre etkileşiminin hücre-substrat etkileşimlerine baskın olduğu bir ortamda kültürlenmiş, birkaç bin hücreden oluşan kendi kendine bir araya gelmiş hücre kümelere benzerler. İçlerinde bulunan oksijen ve besin derişimleri ile avasküler tümörleri taklit ederler. Bu tür sferoidler şekil, hücre morfolojisi, büyüme kinetiği, gen ekspresyonu ve ilaç tepkisi açısından *in vivo* tümörlere benzerler (Sokolova et al., 2019). Buna karşın, 3D sferoid kültürlerinde hücreler, çapı yüzlerce mikronu bulan küresel yapılar içerisinde çok daha sıkışık halde konumlanmaktadır. Bu durum hücrelerin şeklini etkilediği kadar immün boyama sürecini de etkilemektedir. Sferoid, *in vivo* tümör mimarisini özetlediği için en yaygın kullanılan ve çok yönlü 3 boyutlu kanser modellerinden biridir (Weiswald et al., 2015). Çeşitli çalışmalar, küresel modelin basitliğini ve yüksek tekrarlanabilirliğini ortaya koymuş olup, bu da ilaç tarama testleri için uygun kılmaktadır (LaBarbera et al., 2012; Lal-Nag et al., 2017). Üç boyutlu hücre kültürü sistemlerinde geliştirilen kanser modelleri, özellikle metastaz ve anjiyogenezi incelemek için iyi tanımlanmış hastalık modellerinin bulunmaması nedeniyle ilgi görmektedir (Yildiz-Ozturk et al., 2017).

Adezyon molekülleri sadece hücreler ve çevreleri arasındaki fiziksel bağlantıyı değil aynı zamanda çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu da içeren bir role sahiptir. Hem hücre-hücre hem de hücre-matriks yapışmasındaki değişiklikler, kanser ilerlemesinin çok aşamalı kademesi boyunca meydana gelir (Sousa et al., 2019). Her hücrenin yapışması dört ana yapışma molekülü ailesinin üyeleri tarafından gerçekleştirilir. Bunlar; kaderinler, immünoglobulin süper ailesi (IgSF), selektinler ve integrinlerdir. (Ghasemi et al., 2019; Stockmann et al., 2014; von Lersner et al., 2019). Hücrenin lateral kısmında yer alan desmozomlar ve zonula bağlantıları kaderin proteinleri içerir. Kaderinler, doku bütünlüğünün korunması, hücre-hücre tanıma ve sinyalleme, hücreler arası iletişim, gelişim ve anjiyogenezi ile ilişkilidir (Schmidt et al., 2016). Çalışmaların sonucuna bakıldığında kanser sferoid modelini oluştururken hücrelerin ilk temas ettikleri alanda kaderin ekspresyonunun arttığı görülmektedir (X. Cui et al., 2017; Santini et al., 2000; Takebe et al., 2011). Yapılan bir çalışmada E-kaderin ekspresyon seviyelerinin küresel form oluşturma eğilimine paralel olduğu gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonu susturulduğunda sferoid oluşmadığı, ancak

normalde sferoid oluşturmeyen bir hücre hattı olan SKBR3 hücrelerinde E-kaderinin aşırı ekspresyonun sferoid oluşumunu desteklediği görülmüştür (Manuel Iglesias et al., 2013). 2017 yılında Boo ve ark. yaptığı çalışmada MDA-MB-231 sferoidlerinin oluşumuna E-kaderinden ziyade N-kaderinin katkı sağladığını göstermişlerdir. İlaç direnci, kötü huylu tümörün fenotiplerinden biridir ve tümör hücreleri, geleneksel 2D kültürde ilaç direncini ve işlevini kolayca kaybedebilir. Bu çalışmada da 3D kültür yöntemiyle oluşturulan MCF-7 ve MDA-MB-231 sferoidlerinde ilaça karşı direncin arttığını görmüşlerdir (Boo et al., 2017). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, 2D kültürle karşılaştırıldığında sferoidlerde E-kaderin kaybını ve N-kaderin kazanımını olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalardaki sonuçlar ise, MDA-MB-231 hücrelerinin sferoid oluşumundan sonra agresif fenotip kazandığını desteklemektedir (X. Cui et al., 2017; Huang et al., 2020; Pastushenko & Blanpain, 2019b; Takebe et al., 2011; Wenzel et al., 2014). Çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin silymarin uygulaması yapılan ve yapılmayan 2D ve 3D modellerde immünohistokimyasal olarak, Western blot yöntemiyle ve rtPCR yöntemiyle E-kaderin ve N-kaderin proteinlerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Yukarıda sunulan literatür çalışmaları ile uyumlu olarak kontrol gruplarında ve 3D yöntemle gelişen sferoid formasyonu ile birlikte E-kaderin ve N-kaderin ifadelerinin arttığı immünohistokimya ve western blot yöntemiyle gösterilmiştir ve bu artışın anlamlı olduğu kanıtlanmıştır. Ancak rtPCR sonuçları detaylı incelendiğinde kontrol gruplarında E-kaderin proteini kodlayan CDH1 geninin ekspresyon kat sayısı yüksek seyrederken, silymarin uygulamasının ardından MDA-MB-231 3D sferoidlerinde kontrole göre ekspresyon kat sayısının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Aynı azalışın MCF-7 hücrelerinde görülmeişinin sebebi doğal olarak ifade edilen E-kaderin seviyelerinin zaten MDA-MB-231'den daha yüksek seyretmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Silymarin'in MDA-MB-231 hücrelerinde E-kaderin protein azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür.

Vimentin, fibronektin ve integrin gibi hücre iskeleti proteinleri 2D olarak kültürlenmiş hücrelerde 3D kültürlenmiş hücrelerden daha fazla ifade vermektedir. Hücre iskelet proteinleri canlı dokudaki doğal morfolojik yapılarında genellikle ince iplikler halinde görülmektedir. Bu sayede hücrenin esnekliğini sağlayarak deformasyonlara karşı korumaktadır. Ancak 2D olarak kültürlenmiş hücrelerde hücrelerin tek düzlemde tutunmaları dolayısıyla hücreler yüzey alanını artırmaktadır. Bu da hücre iskelet proteinlerinin ekspresyonlarının artmasına filamentlerin kalınlaşmasına ve esnekliği

kaybetmesine neden olmaktadır (Burrige & Guilluy, 2016; Cesarz & Tamama, 2016; Pasztorek et al., 2019; Yeh et al., 2012). Si ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmalarında MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde EMT proteinlerinin ifadesine silibin'in etkisi incelemiştirler. 24 saatlik uygulama sonunda mezenkimal karakter olan N-Kaderin, vimentin ve fibronektin ekspresyon seviyelerinde azalma görmüşlerdir. Sameri ve ark. 2021 yılında yaptıkları çalışmada ise silibin'in E-kaderin/beta katenin yolunu düzenlemesi ile kolorektal kanseri üzerine kemopreventif etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmaya göre silibinin N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarında azalma ve E-kaderin ekspresyonunun artması yoluyla EMT'yi inhibe ettiğini bulmuşlardır (Sameri et al., 2021). 2022 yılında yapılan başka bir çalışmada ise silibin'in tedavisinden sonra, çeşitli kanser hücre hatlarında E-kaderin ekspresyonunu indükleyerek ve N-kaderin ve vimentin ekspresyonunu azaltarak EMT mekanizmasını tersine çevirdiğini göstermişlerdir (Maleki et al., 2022). S. Kim ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 kanser hücrelerinde fibronektin ekspresyonunu STAT3 fosforilasyonunu inhibe ederek azalttığını göstermişlerdir (S. Kim et al., 2014). Literatürdeki son verilere baktığımızda silybinin, papiller tiroid kanseri (PTC) hücrelerinde FN1/AKT sinyal yolunu düzenleyerek, EMT sürecini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. PTC hücreleri silybin ile tedavi edildiğinde mezenkimal belirteçlerden olan CDH2, vimentin, Snail, Slug ve PD-L1 ekspresyonlarını önemli ölçüde azaltırken E-kaderin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir (Xie et al., 2023). Literatür taramasında mezenkimal karakteri yorumlamak için kullanılan vimentin proteini ile 3D çalışmaların sınırlı olduğu ve silybinin uygulaması ile 3D çalışmanın henüz yapılmadığı görülmüştür. Çalışmamız bu yönüyle de özgünlük taşıırken silymarin 3D kültür yöntemiyle ifadesindeki değişikliklerin tartışmasını sınırlandırmıştır. Silymarin uygulamasından sonra vimentin proteinin ifadesindeki azalışın immünohistokimyasal yöntem ile anlamlı olduğu gösterilmiştir. rtPCR sonuçlarımız değerlendirildiğinde 2D kültür yöntemiyle uygulama ve kontrol grupları karşılaştırıldığında silymarin uygulamasının her iki hücre için de vimentin mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür. MDA-MB-213 hücrelerinin 3D yönteminde silymarin uygulaması sonrasında vimentin mRNA seviyesinin kontrole göre anlamlı derecede arttığı, MCF-7'nin 3D sferoid modelinde ise vimentin mRNA seviyesinin anlamlı derecede azaldığı görüldü. Sferoid formasyonu sırasında MCF-7 hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin daha düzenli küre benzeri yapılar olması ve E-kaderin protein miktarının daha yüksek olması sebebiyle hücrelerin zaten epitelyal karaktere sahip oldukları ve daha

az agresif eğilim göstermeleri nedeniyle silibin'in uygulamasının mezenkimal karaktere vimentin üzerinden etkili olmadığını düşündürdü. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinde silibinin uygulamasının 3D yöntemde vimentin proteinin ifadesinde azalışa sebep olurken mRNA seviyesinde artışa yol açması, MDA-MB-231 hücrelerinin sferoid formunda mezenkimal karakterini etkileyebileceğini göstermiştir. mRNA seviyelerindeki artış henüz proteinin ifadesinde artışa yeterince zaman olmaması yani 24 saat silymarin uygulamasının vimentin proteinini arttırmada yeterli gelmeyişinden kaynaklı olabilir. Literatürde 3D yöntemle silibin'in uygulaması sonrasında vimentin proteini değişimlerini tartışan çalışma sınırlıdır. Fibronektin proteini ile ilgili yapılan literatür çalışmaları değerlendirildiğinde silymarin uygulaması sonrasında çelişkili sonuçlardan bahsedilmektedir. 2020 yılında Si ve ark. (Si et al., 2020) silymarin uygulaması sonrasında fibronektin protein ifadesindeki azalışı göstermişlerdir. Çalışmalarımızda MCF-7 hücrelerinde silymarin uygulamasından sonra 2D kültür yöntemiyle fibronektin miktarının benzer şekilde azaldığı MDA-MB-231 hücrelerinde ise değişmediği görülmüştür. 3D kültür yöntemiyle yaptığımız çalışmalarda ise fibronektin miktarının silymarin uygulaması sonrasında arttığı görülmüş ve bu artışın sferoid yapısındaki kanser hücrelerinde gelişen artmış mezenkimal karakter ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Literatür çalışmalarına bakıldığında 2D kültür yöntemlerinde bahsedilenden farklı olarak, 3D kültür yöntemleriyle elde edilen sferoid modellerde kısmi EMT'nin gelişmesi mezenkimal ve epitelyal proteinlerin kodlanması ve ifade edilmesinde değişkenlik olduğu görülmektedir. Kısmi EMT olarak ifade edilen aşamada hücrelerin hem epitelyal hem mezenkimal proteinleri yüksek derecede eksprese ettikleri ve bu süreçte metastatik eğilimlerinin daha fazla olduğu bilinmektedir (Saitoh, 2018; Shibue & Weinberg, 2017). Mezenkimal ya da epitelyal proteinlerin eş zamanlı ifadesindeki oluşturulacak dengesizliğin EMT sürecini yavaşlatmak ya da engellemek açısından avantaj oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Silymarin uygulaması sonrası hücrenin E-kaderin proteinindeki artış, epitelyal karakteri desteklerken, N-kaderin ifadesindeki artışta mezenkimal karakteri desteklemektedir. Silymarin kısmi EMT için gerekli epitelyal mezenkimal karakter dengesindeki tek yönlü artış ya da azalışı sağlamakta E-kaderin, N-kaderin, vimentin ve fibronektin proteinleri bakımından değerlendirildiğinde tek başına yeterli görülmemektedir.

ECM'nin aracılık ettiği sinyalleşme, hem bağımsız olarak hem de bir dizi sinyal kaskadı ile epitelyal hücre kaderinin kritik bir düzenleyicisidir. Epitelyal hücrelerin belirli

matriks elemanlarına bağlanması sadece hücre içi sinyalleşme basamaklarını başlatmakla kalmaz, aynı zamanda göç fenotipine katkıda bulunan ek sinyalleşme yollarını aktive etmek için matriksin yeniden şekillenmesiyle de sonuçlanır (Kalluri & Weinberg, 2009). EMT sırasında mezankimal hücreler tip IV kollajen ve lamininin bazal laminasını keserek kendi tip I kollajen ve fibronektin matriksini bırakırlar. Hücre yüzeyinde lamellipodia oluşumu ve filopodanın çıkması, hücreye yönel hareketlilik sağlar ve MMP'lerin salınması, hücre istilasını kolaylaştırmak için matriksi bozar (McNiven, 2013; Ridley, 2011). Epitelyal bağlantıların çözünmesi, aktin stres liflerinin oluşumuna ve MMP'lerin salındığı hücrenin göç eden ön kısmında integrinlerin kümelenmesine neden olur (Nelson, 2009). EMT sinyal yollarının, altta yatan dokuların EMT sonrası istilasını teşvik etmek için bazal laminadaki tip IV kollajeni parçalayan MMP-2 ve MMP-9'u kodlayan genlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Kalluri & Weinberg, 2009; Potenta et al., 2008). Ek olarak MMP'ler, hücre zarındaki E-kaderini parçalama, yapışık bağlantıları bozma ve epitel tabakasını zayıflatma kapasitesine sahiptir (Nisticò et al., 2012). Bu süreç hücrelerin mezankimal fenotip kazanmasını ve matrikse göç etmesini sağlar. 2020 yılında yapılan çalışmada ise MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde EMT proteinlerinin ifadesine silibin'in etkisi incelemiştir. 24 saatlik uygulama sonunda hücre matriks proteini olan MMP-9 ekspresyon seviyesinde de kontrol grubuna kıyasla azalma olduğunu görmüşlerdir (Si et al., 2020). Meme kanseri hücre hattı üzerine yapılan bir çalışmada, MCF-7 hücrelerinde çözünür E-kaderinin biyobelirteç olarak uygunluğu ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Çalışma sonucunda çözünür E-kaderinin artması ile, adherens bağlantılara müdahale sonucu metaloproteaz (ADAM) ve MMP'lerin aktivitesinin arttığı ve birkaç sinyal yolunun manipülasyonu ile kanser hücrelerinin göçünün, proliferasyonunun ve hücre sağ kalımının arttığı belirtilmiştir (Hu et al., 2016). Başka bir çalışmada silibin'in, meme kanseri hücreleri olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde COX-2 ekspresyonunu inhibe ederek TPA kaynaklı MMP-9 ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (S. Kim et al., 2009). 2017 yılında yapılan çalışmada ise silibin'in 24 saat'lik 50 µM dozdaki uygulamasında MDA-MB-21 hücrelerinde MEK/ERK sinyal yolağı üzerinde rtPCR analizinde MMP-9'un ekspresyonunu aşağı düzenlediği bildirilmiştir (Byun et al., 2017). MMP-9 proteinindeki değişimlere bakıldığında rtPCR sonuçlarına göre MMP-9 ifadesi 2D yöntemle her iki hücre tipi için artış gösterirken 3D yöntemle yapılan incelemeler sonucunda MMP-9 protein ekspresyonunda azalış görülmüştür. Bu azalışın silymarin'in çözülmüş E-kaderin miktarını 2D hücrelerde artırma yönündeki eğiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Silymarin 24 saat boyunca 3D yöntemle uygulandığında çözülmüş E-kaderin miktarındaki artışı, 2D yönteme göre yaklaşık 8/1'i kadar azaltmış olduğu ve MMP-9 ifadesindeki azalışın da buna bağlı geliştiği düşünülmektedir. Silymarin tek başına MMP-9 ifadesinde 3D hücre sferoidlerinde bir artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlara göre silymarin'in anti-metastatik bir ajan olarak tek başına kullanılması uygun olmamakla birlikte MMP-9 ifadesinde azalışa sebep olması nedeniyle destekleyici ajanlar ile matriks metalloproteinazları inhibe etmek suretiyle anti metastatik olarak etki edebileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Silymarin'in, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde anti-kanser etkilerini 2D ve 3D hücre kültür modellerinde değerlendirdik. Elde edilen bulgular, silymarin'in her iki hücre tipi üzerindeki etkisinin hücre kültürü modeline bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur. 2D kültürlerde, MDA-MB-231 hücrelerinde silymarin'in etkin dozunun 60 μ M, MCF-7 hücrelerinde ise 90 μ M olduğu görülmüştür. 3D kültürlerde ise, MDA-MB-231 hücrelerinde etkin doz 120 μ M, MCF-7 hücrelerinde ise 60 μ M olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, silymarin'in 3D kültürlerde MDA-MB-231 agresif tipteki meme kanseri hücrelerinde daha yüksek dozlarda etkili olduğu, 3D kültürde doz etkinliğinin 2 kat arttığını gösterilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ise kültür yöntemi 3D olduğunda etkin dozun 90 μ M'dan 60 μ M'a azaldığı görülmüştür.

Silymarin'in 2D kültürlerde hücre göçünü her iki hücre tipinde de anlamlı derecede azalttığı gösterildi. 3D kültürlerde ise silymarin, kontrollere göre MDA-MB-231 hücre sferoidlerinde %45 oranında, MCF-7 hücre sferoidlerinde ise %96 oranında hücre göçünü engellediği tespit edildi. Buna göre silymarin 3D kültür yönteminde hücre göç eğilimini azaltmada daha etkilidir.

Her iki hücre tipinde silymarin uygulamasının ardından, E-kaderin ve N-kaderin proteinlerindeki değişimler rtPCR, Western ve immünohistokimyasal analizler ile değerlendirildi. Bu yöntemlerin sonuçlarına göre silymarin, mezenkimal proteinler olan N-kaderin, vimentin, fibronektin ve epitelyal protein olan E-kaderini protein ve mRNA seviyelerinde eş zamanlı ve aynı yönde değişikliğe sebep olmuştur. Ancak bu değişiklik epitelyal-mezenkimal karakter özellikleri arasındaki dengeye etki etmeyerek metastatik özellikleri değiştirmemiştir. Ancak silymarin uygulaması MMP-9 proteini üzerinde azaltıcı etkiye sahip olarak hücrelerin metastatik göç karakteri ya da epitelyal mezenkimal geçiş sürecini engelleyici yönde etkilemiştir.

Sonuç olarak; silymarin, meme kanseri hücreleri MD-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde, 2D ve 3D yöntemlerle 24 saat uygulama sonrasında, EMT sürecinde epitelyal-mezenkimal karakter dengesinde değişikliğe sebep olmamış ancak hücre göçünde ve metastatik karakterinde MMP-9 proteini üzerinden engelleyici etkide bulunmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Abdollahi, P., Ebrahimi, M., Motamed, N., & Samani, F. S. (2014). Silibinin affects tumor cell growth because of reduction of stemness properties and induction of apoptosis in 2D and 3D models of MDA-MB-468. *Anti-Cancer Drugs*, *26*(5). <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000205>
- Angst, B. D., Marozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: Diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, *114*(4). <https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.629>
- Antony, J., Thiery, J. P., & Huang, R. Y. J. (2019). Epithelial-to-mesenchymal transition: Lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention. In *Physical Biology* (Vol. 16, Issue 4). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/ab157a>
- Axelrod, R., Axelrod, D. E., & Pienta, K. J. (2006). Evolution of cooperation among tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(36). <https://doi.org/10.1073/pnas.0606053103>
- Babaei, G., Aziz, S. G. G., & Jaghi, N. Z. Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 133). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110909>
- Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., & Rustgi, A. K. (2020). EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 30, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.003>
- Basu, B., & Ghosh, M. K. (2022). Ubiquitination and deubiquitination in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer: Shifting gears at the molecular level. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1869, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119261>
- Boo, L., Ho, W. Y., Ali, N. M., Yeap, S. K., Ky, H., Chan, K. G., Yin, W. F., Satharasinghe, D. A., Liew, W. C., Tan, S. W., Cheong, S. K., & Ong, H. K. (2017). Phenotypic and microRNA transcriptomic profiling of the MDA-MB-231 spheroid-enriched CSCs with comparison of MCF-7 microRNA profiling dataset. *PeerJ*, *2017*(7). <https://doi.org/10.7717/peerj.3551>
- Boyer, B., Vallés, A. M., & Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochemical Pharmacology*, *60*(8). [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00427-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00427-5)
- Bracke, M. E., Van Roy, F. M., & Mareel, M. M. (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology: Vol. 213 I*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61107-0_9
- Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E., & Hall, D. M. S. (2010). Molecular interactions in cancer cell metastasis. In *Acta Histochemica* (Vol. 112, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.11.022>

- Bukholm, I. K., Nesland, J. M., & Børresen-Dale, A. L. (2000). Re-expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin, but not of γ -catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *Journal of Pathology*, *190*(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200001\)190:1<15::AID-PATH489>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200001)190:1<15::AID-PATH489>3.0.CO;2-L)
- Burridge, K., & Guilluy, C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. In *Experimental Cell Research* (Vol. 343, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>
- Byun, H. J., Darvin, P., Kang, D. Y., Sp, N., Joung, Y. H., Park, J. H., Kim, S. J., & Yang, Y. M. (2017). Silibinin downregulates MMP2 expression via Jak2/STAT3 pathway and inhibits the migration and invasive potential in MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports*, *37*(6). <https://doi.org/10.3892/or.2017.5588>
- Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Rosa, C. C. D. La, Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., & Martinez-Fierro, M. L. (2020). The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>
- Cao, Z. Q., Wang, Z., & Leng, P. (2019). Aberrant N-cadherin expression in cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 118). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109320>
- Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. In *Stem Cells International* (Vol. 2016). <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>
- Chaffer, C. L., Brennan, J. P., Slavin, J. L., Blick, T., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2006). Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Research*, *66*(23). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2044>
- Chambers, C. S., Holečková, V., Petrásková, L., Biedermann, D., Valentová, K., Buchta, M., & Křen, V. (2017). The silymarin composition... and why does it matter???. *Food Research International*, *100*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.017>
- Chen, J., & Thompson, L. U. (2003). Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro. *Breast Cancer Research and Treatment*, *80*(2). <https://doi.org/10.1023/A:1024513815374>
- Cheung, K. J., & Ewald, A. J. (2016). A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. In *Science* (Vol. 352, Issue 6282). <https://doi.org/10.1126/science.aaf6546>
- Cheung, K. J., Gabrielson, E., Werb, Z., & Ewald, A. J. (2013). Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*, *155*(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.029>
- Chiang, S. P. H., Cabrera, R. M., & Segall, J. E. (2016). Tumor cell intravasation. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 311, Issue 1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00238.2015>
- Choi, Y. H., Chin, Y. W., & Kim, Y. G. (2011). Herb-drug interactions: Focus on metabolic enzymes and transporters. In *Archives of Pharmacal Research* (Vol. 34, Issue 11). <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1106-z>
- Conceição, F., Sousa, D. M., Paredes, J., & Lamghari, M. (2021). Sympathetic activity in breast cancer and metastasis: partners in crime. In *Bone Research* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00137-1>
- Concolino, A., Olivo, E., Tammè, L., Fiumara, C. V., De Angelis, M. T., Quaresima, B., Agosti, V., Costanzo, F. S., Cuda, G., & Scumaci, D. (2018). Proteomics analysis to

- assess the role of mitochondria in BRCA1-mediated breast tumorigenesis. *Proteomes*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/proteomes6020016>
- Corso, G., Figueiredo, J., La Vecchia, C., Veronesi, P., Pravettoni, G., Macis, D., Karam, R., Lo Gullo, R., Provenzano, E., Toesca, A., Mazzocco, K., Carneiro, F., Seruca, R., Melo, S., Schmitt, F., Roviello, F., De Scalzi, A. M., Intra, M., Feroce, I., ... Galimberti, V. (2018). Hereditary lobular breast cancer with an emphasis on E-cadherin genetic defect. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 55, Issue 7). <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105337>
- Coulombe, P. A., & Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nature Cell Biology*, 6(8), 699–706. <https://doi.org/10.1038/ncb0804-699>
- Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 147). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
- Cui, X., Hartanto, Y., & Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroids formation. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 14, Issue 127). <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>
- de Almeida, P. G., Pinheiro, G. G., Nunes, A. M., Gonçalves, A. B., & Thorsteinsdóttir, S. (2016). Fibronectin assembly during early embryo development: A versatile communication system between cells and tissues. *Developmental Dynamics*, 245(4). <https://doi.org/10.1002/dvdy.24391>
- Delmas, D., Xiao, J., Vejux, A., & Aires, V. (2020). Silymarin and cancer: A dual strategy in both in chemoprevention and chemosensitivity. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092009>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Di Russo, S. , L. F. R. , R. A. et al. (2024). Beyond the barrier: the immune-inspired pathways of tumor extravasation. *Cell Commun Signal* , 22(104).
- Drivalos, A., Chrisofos, M., Efstathiou, E., Kapranou, A., Kollaitis, G., Koutlis, G., Antoniou, N., Karanastasis, D., Dimopoulos, M. A., & Bamias, A. (2016). Expression of $\alpha 5$ -integrin, $\alpha 7$ -integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 34(4). <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.10.016>
- Duffy, M. J., Synnott, N. C., & Crown, J. (2018). Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Vol. 170, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4753-7>
- Durrani, I. A., Bhatti, A., & John, P. (2021). The prognostic outcome of ‘type 2 diabetes mellitus and breast cancer’ association pivots on hypoxia-hyperglycemia axis. In *Cancer Cell International* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02040-5>
- Erdogan, B., Ao, M., White, L. M., Means, A. L., Brewer, B. M., Yang, L., Washington, M. K., Shi, C., Franco, O. E., Weaver, A. M., Hayward, S. W., Li, D., & Webb, D. J. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *Journal of Cell Biology*, 216(11). <https://doi.org/10.1083/jcb.201704053>
- Eser, A. (2003). MEME KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLERİN HASTALIK TEKRARI VE HASTALIKSIZ SÜRESİNE ETKİSİ. *Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı*.

- Falasca, M., Raimondi, C., & Maffucci, T. (2011). Boyden Chamber. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 769). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_7
- Farahani, E., Patra, H. K., Jangamreddy, J. R., Rashedi, I., Kawalec, M., Rao Pariti, R. K., Batakis, P., & Wiechec, E. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. In *Carcinogenesis* (Vol. 35, Issue 4). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu045>
- Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>
- Feher, J., & Lengyel, G. (2011). Silymarin in the Prevention and Treatment of Liver Diseases and Primary Liver Cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(1). <https://doi.org/10.2174/138920112798868818>
- Foroni, C., Broggin, M., Generali, D., & Damia, G. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 38, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.001>
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nature Protocols*, 4(3). <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
- Gau, D. M., & Roy, P. (2020). Single Cell Migration Assay Using Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line. *Bio-Protocol*, 10(8). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3586>
- Ghasemi, A., Saeidi, J., Azimi-Nejad, M., & Hashemy, S. I. (2019). Leptin-induced signaling pathways in cancer cell migration and invasion. In *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00428-0>
- Gheldof, A., & Berx, G. (2013). Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 116). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5>
- Gilkes, D. M., & Semenza, G. L. (2013). Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. In *Future Oncology* (Vol. 9, Issue 11). <https://doi.org/10.2217/fon.13.92>
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P., & Foidart, J. M. (2003). Transactivation of vimentin by β -catenin in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 63(10). <https://doi.org/10.1136/ijgc-00009577-200303001-00219>
- Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., Mendoza-Posada, D. A., Ramos, C., Garcia-Hernandez, A. A., & Falfan-Valencia, R. (2019). Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 137). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.02.010>
- Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrm1699>
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D cell culture systems: Tumor application, advantages, and disadvantages. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>

- Haffty, B. G., Yang, Q., Reiss, M., Kearney, T., Higgins, S. A., Weidhaas, J., Harris, L., Hait, W., & Toppmeyer, D. (2006). Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(36). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.5664>
- Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2021). Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. *T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü*, 1–52.
- Han, S. W., Khuri, F. R., & Roman, J. (2006). Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Research*, *66*(1). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2367>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011a). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011b). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartig, R., Shoeman, R. L., Janetzko, A., Tolstonog, G., & Traub, P. (1998). DNA-mediated transport of the intermediate filament protein vimentin into the nucleus of cultured cells. *Journal of Cell Science*, *111*(24). <https://doi.org/10.1242/jcs.111.24.3573>
- Haydaroglu, A., & Ozyigit, G. (2013). Principles and practice of modern radiotherapy techniques in breast cancer. In *Principles and Practice of Modern Radiotherapy Techniques in Breast Cancer*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5116-7>
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., & Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *Journal of Cell Biology*, *148*(4), 779–790. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.779>
- He, L., Kang, Q., Chan, K. I., Zhang, Y., Zhong, Z., & Tan, W. (2023). The immunomodulatory role of matrix metalloproteinases in colitis-associated cancer. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1093990>
- Hollestelle, A., Peeters, J. K., Smid, M., Timmermans, M., Verhoog, L. C., Westenend, P. J., Heine, A. A. J., Chan, A., Sieuwerts, A. M., Wiemer, E. A. C., Klijn, J. G. M., Van Der Spek, P. J., Foekens, J. A., Schutte, M., Den Bakker, M. A., & Martens, J. W. M. (2013). Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *138*(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2415-3>
- Hosseinabadi, T., Lorigooini, Z., Tabar zad, M., Salehi, B., Rodrigues, C. F., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). Silymarin antiproliferative and apoptotic effects: Insights into its clinical impact in various types of cancer. In *Phytotherapy Research* (Vol. 33, Issue 11). <https://doi.org/10.1002/ptr.6470>
- Hu, Q. P., Kuang, J. Y., Yang, Q. K., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2016). Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. In *International Journal of Cancer* (Vol. 138, Issue 12). <https://doi.org/10.1002/ijc.29982>
- Huang, Z., Yu, P., & Tang, J. (2020). Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. *OncoTargets and Therapy*, *13*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>
- Hui, L., Zhang, S., Dong, X., Tian, D., Cui, Z., & Qiu, X. (2013). Prognostic Significance of Twist and N-Cadherin Expression in NSCLC. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062171>
- Hulpiau, P., & van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 41, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.027>

- Illam, S. P., Narayanankutty, A., Mathew, S. E., Valsalakumari, R., Jacob, R. M., & Raghavamenon, A. C. (2017). Epithelial Mesenchymal Transition in Cancer Progression: Preventive Phytochemicals. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 12(3). <https://doi.org/10.2174/1574892812666170424150407>
- Ioachim, E., Charchanti, A., Briasoulis, E., Karavasilis, V., Tsanou, H., Arvanitis, D. L., Agnantis, N. J., & Pavlidis, N. (2002). Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: Their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *European Journal of Cancer*, 38(18). [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00210-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00210-1)
- Islam, S., Carey, T. E., Wolf, G. T., Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (1996). Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *Journal of Cell Biology*, 135(6), 1643–1654. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1643>
- Jackson, B. C., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2010). Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Human Genomics*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-3-194>
- Jie, X. X., Zhang, X. Y., & Xu, C. J. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 46). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18277>
- Kai, F. B., Drain, A. P., & Weaver, V. M. (2019). The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. In *Developmental Cell* (Vol. 49, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.03.026>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 119, Issue 6). <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kamel, H. F. M., & Al-Amodi, H. S. A. B. (2017). Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 15, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.11.005>
- Kang, Y., & Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. In *Cell* (Vol. 118, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.011>
- Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., Zaguia, A., Koundal, S., & Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. In *BioMed Research International* (Vol. 2022). <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>
- Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. In *Science* (Vol. 298, Issue 5600). <https://doi.org/10.1126/science.1079478>
- Kim, S. H., Choo, G. S., Yoo, E. S., Woo, J. S., Lee, J. H., Han, S. H., Jung, S. H., Kim, H. J., & Jung, J. Y. (2021). Silymarin inhibits proliferation of human breast cancer cells via regulation of the MAPK signaling pathway and induction of apoptosis. *Oncology Letters*, 21(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12753>
- Kim, S., Jeon, M., Lee, J., Han, J., Oh, S. J., Jung, T., Nam, S. J., Kil, W. H., & Lee, J. E. (2014). Induction of fibronectin in response to epidermal growth factor is suppressed by silibinin through the inhibition of STAT3 in triple negative breast cancer cells. *Oncology Reports*, 32(5). <https://doi.org/10.3892/or.2014.3450>
- Kim, S., Kim, S. H., Hur, S. M., Lee, S. K., Kim, W. W., Kim, J. S., Kim, J. H., Choe, J. H., Nam, S. J., Lee, J. E., & Yang, J. H. (2009). Silibinin prevents TPA-induced

- MMP-9 expression by down-regulation of COX-2 in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.032>
- Klymenko, Y., Kim, O., Loughran, E., Yang, J., Lombard, R., Alber, M., & Stack, M. S. (2017). Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis. *Oncogene*, 36(42), 5840–5851. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.171>
- Koltai, T., & Fliegel, L. (2022). Role of Silymarin in Cancer Treatment: Facts, Hypotheses, and Questions. In *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1177/2515690X211068826>
- Korah, R., Boots, M., & Wieder, R. (2004). Integrin $\alpha 5\beta 1$ promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: An in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Research*, 64(13). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3853>
- Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P. J., Brandt, B., Boecker, W., & Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: Epithelial- mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *Journal of Pathology*, 206(4). <https://doi.org/10.1002/path.1797>
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 752, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001>
- Kumar, Vi., Abbas, A. I K., Aster, J. C., & Robbins, S. L. (2013). Robbins Temel Patoloji. In *Hücre Hasarı, Hücre Ölümü ve Adaptasyonlar*.
- Kyuno, D., Takasawa, A., Kikuchi, S., Takemasa, I., Osanai, M., & Kojima, T. (2021). Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1863, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183503>
- LaBarbera, D. V., Reid, B. G., & Yoo, B. H. (2012). The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 7, Issue 9). <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.708334>
- Ladas, E. J., & Kelly, K. M. (2003). Milk thistle: Is there a role for its use as an adjunct therapy in patients with cancer? In *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1089/107555303765551633>
- Lal-Nag, M., McGee, L., Guha, R., Lengyel, E., Kenny, H. A., & Ferrer, M. (2017). A High-Throughput Screening Model of the Tumor Microenvironment for Ovarian Cancer Cell Growth. *SLAS Discovery*, 22(5). <https://doi.org/10.1177/2472555216687082>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Larsson, Å., Wilhelmsson, U., Pekna, M., & Pekny, M. (2004). Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP $-/-$ Vim $-/-$ mice. *Neurochemical Research*, 29(11 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1007/s11064-004-6880-2>
- Lashgarian, H. E., Adamii, V., Ghorbanzadeh, V., Chodari, L., Kamali, F., Akbari, S., & Dariushnejad, H. (2020). Silibinin Inhibit Cell Migration through Downregulation of RAC1 Gene Expression in Highly Metastatic Breast Cancer Cell Line. *Drug Research*, 70(10). <https://doi.org/10.1055/a-1223-1734>

- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(7). <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Li, F., Ma, Z., Guan, Z., Chen, Y., Wu, K., Guo, P., Wang, X., He, D., & Zeng, J. (2015). Autophagy induction by silibinin positively contributes to its anti-metastatic capacity via AMPK/mTOR pathway in renal cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms16048415>
- Li, G., Satyamoorthy, K., & Herlyn, M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Research*, *61*(9), 3819–3825.
- Li, H. C., Cao, D. C., Liu, Y., Hou, Y. F., Wu, J., Lu, J. S., Di, G. H., Liu, G., Li, F. M., Ou, Z. L., Jie, C., Shen, Z. Z., & Shao, Z. M. (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, *88*(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-004-1200-8>
- Libson, S., & Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. In *International Review of Psychiatry* (Vol. 26, Issue 1). <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.852971>
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(8). <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
- Lieverse, R. I. Y., Marcus, D., van der Wiel, A. M. A., Van Limbergen, E. J., Theys, J., Yaromina, A., Lambin, P., & Dubois, L. J. (2020). Human fibronectin extra domain B as a biomarker for targeted therapy in cancer. In *Molecular Oncology* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12705>
- Liu, S., Li, L., & Ren, D. (2023). Anti-Cancer Potential of Phytochemicals: The Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/molecules28135069>
- Lou, Y., Preobrazhenska, O., Auf Dem Keller, U., Sutcliffe, M., Barclay, L., McDonald, P. C., Roskelley, C., Overall, C. M., & Dedhar, S. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Developmental Dynamics*, *237*(10). <https://doi.org/10.1002/dvdy.21658>
- Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2013). Miniaturized three-dimensional cancer model for drug evaluation. *Assay and Drug Development Technologies*, *11*(7). <https://doi.org/10.1089/adt.2012.483>
- Maleki, N., Yavari, N., Ebrahimi, M., Faisal Faiz, A., Khosh Ravesh, R., Sharbati, A., Panji, M., Lorian, K., Gravand, A., Abbasi, M., Abazari, O., Shafiee Mehr, M., & Eskandari, Y. (2022). Silibinin exerts anti-cancer activity on human ovarian cancer cells by increasing apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Gene*, *823*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146275>
- Manuel Iglesias, J., Beloqui, I., Garcia-Garcia, F., Leis, O., Vazquez-Martin, A., Eguiara, A., Cufi, S., Pavon, A., Menendez, J. A., Dopazo, J., & Martin, A. G. (2013). Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell Lines Depends upon Expression of E-cadherin. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077281>
- Marconi, G. D., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Pierdomenico, S. D., Trubiani, O., Pizzicannella, J., & Diomedede, F. (2021). Epithelial-mesenchymal transition (Emt):

- The type-2 emt in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. In *Cells* (Vol. 10, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/cells10071587>
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2020). Scratch wound healing assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2109). https://doi.org/10.1007/7651_2019_259
- Mayer, K. É., Myers, R. P., & Lee, S. S. (2005). Silymarin treatment of viral hepatitis: A systematic review. In *Journal of Viral Hepatitis* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00636.x>
- McNiven, M. A. (2013). Breaking away: Matrix remodeling from the leading edge. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 23, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.009>
- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D. C., & Radisky, E. S. (2014). Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(9). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1932>
- Mehta, R. G., & Moon, R. C. (1991). Characterization of effective chemopreventive agents in mammary gland in vitro using an initiation-promotion protocol. *Anticancer Research*, 11(2).
- Mittal, R., Patel, A. P., Debs, L. H., Nguyen, D., Patel, K., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Chapagain, P., & Liu, X. Z. (2016). Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 231, Issue 12). <https://doi.org/10.1002/jcp.25430>
- Morris, G. J., Naidu, S., Topham, A. K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G. F., Park, P. K., Rosenberg, A. L., Brill, K., & Mitchell, E. P. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: A single-institution compilation compared with the national cancer institute's surveillance, epidemiology, and end results database. *Cancer*, 110(4). <https://doi.org/10.1002/cncr.22836>
- Muramaki, M., Miyake, H., Terakawa, T., Kusuda, Y., & Fujisawa, M. (2011). Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. *Urology*, 78(6). <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.07.1388>
- Murphy, G., & Nagase, H. (2009). Progress in matrix metalloproteinase research. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 29, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
- Na, T. Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M., & Gumbiner, B. M. (2020). The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.1918167117>
- Nagarajan, D., & McArdle, S. E. B. (2018). Immune landscape of breast cancers. In *Biomedicines* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010020>
- Narod, S. A., & Salmena, L. (2011). BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discovery Medicine*, 12(66).
- Nawaz, A., Zaib, S., Khan, I., Ahmed, A., Shahzadi, K., & Riaz, H. (2023). Silybum marianum: An Overview of its Phytochemistry and Pharmacological Activities with Emphasis on Potential Anticancer Properties. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 23(13). <https://doi.org/10.2174/1871520623666230412111152>
- Nelson, W. J. (2009). Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000513>

- Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *Journal of Cell Biology*, *147*(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.631>
- Niland, S., Riscanevo, A. X., & Eble, J. A. (2022). Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010146>
- Nisticò, P., Bissell, M. J., & Radisky, D. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011908>
- Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., & Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, *9*s2. <https://doi.org/10.4137/bcbcr.s29420>
- Özkara, G., Öztürk, O., & Yılmaz Aydoğan, H. (2020). Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. *Experimed*, *10*(1), 38–48. <https://doi.org/10.26650/experimed.2020.0003>
- Pachmayr, E., Treese, C., & Stein, U. (2017). Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. In *Visceral Medicine* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1159/000454696>
- Padmanaban, V., Krol, I., Suhail, Y., Szczerba, B. M., Aceto, N., Bader, J. S., & Ewald, A. J. (2019). E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, *573*(7774). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1526-3>
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126806>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019a). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 29, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019b). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, *29*(3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2018.12.001>
- Pasztorek, M., Rossmanith, E., Mayr, C., Hauser, F., Jacak, J., Ebner, A., Weber, V., & Fischer, M. B. (2019). Influence of Platelet Lysate on 2D and 3D Amniotic Mesenchymal Stem Cell Cultures. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00338>
- Pérez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., & Cano, A. (2001). A New Role for E12/E47 in the Repression of E-cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(29). <https://doi.org/10.1074/jbc.M100827200>
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., & Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, *282*(5392). <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1281>
- Post-White, J., Ladas, E. J., & Kelly, K. M. (2007). Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). In *Integrative Cancer Therapies* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.1177/1534735407301632>

- Potenta, S., Zeisberg, E., & Kalluri, R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. In *British Journal of Cancer* (Vol. 99, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604662>
- Pulina, M. V., Hou, S. Y., Mittal, A., Julich, D., Whittaker, C. A., Holley, S. A., Hynes, R. O., & Astrof, S. (2011). Essential roles of fibronectin in the development of the left-right embryonic body plan. *Developmental Biology*, 354(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.026>
- Querzoli, P., Coradini, D., Pedriali, M., Boracchi, P., Ambrogi, F., Raimondi, E., La Sorda, R., Lattanzio, R., Rinaldi, R., Lunardi, M., Frasson, C., Modesti, F., Ferretti, S., Piantelli, M., Iacobelli, S., Biganzoli, E., Nenci, I., & Alberti, S. (2010). An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 103(12). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605991>
- Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J. C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J., Ramírez-Camacho, M. A., & Alvarez-Sánchez, M. E. (2019). Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01370>
- Raezadeh-Sarmazdeh, M., Do, L. D., & Hritz, B. G. (2020). Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/cells9051313>
- Ramasamy, K., & Agarwal, R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. In *Cancer Letters* (Vol. 269, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.053>
- Redies, C., Vanhalst, K., & Van Roy, F. (2005). δ -Protocadherins: Unique structures and functions. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 62, Issue 23). <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5320-z>
- Reymond, N., D'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 13, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nrc3628>
- Ridley, A. J. (2011). Life at the leading edge. In *Cell* (Vol. 145, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.010>
- Riggio, A. I., Varley, K. E., & Welm, A. L. (2021). The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. In *British Journal of Cancer* (Vol. 124, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01161-4>
- Rugamba, A., Kang, D. Y., Sp, N., Jo, E. S., Lee, J. M., Bae, S. W., & Jang, K. J. (2021). Silibinin regulates tumor progression and tumorsphere formation by suppressing pd-11 expression in non-small cell lung cancer (Nslc) cells. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071632>
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. In *Cells* (Vol. 8, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/cells8121620>
- Saadatmand, S., De Kruijf, E. M., Sajet, A., Dekker-Ensink, N. G., Van Nes, J. G. H., Putter, H., Smit, V. T. H. B. M., Van De Velde, C. J. H., Liefers, G. J., & Kuppen, P. J. K. (2013). Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer. *British Journal of Surgery*, 100(2). <https://doi.org/10.1002/bjs.8980>
- Saip, P., Keskin, S., Ozkan, M., Kaplan, M. A., Aydogan, F., Gonullu Demirag, G., Uzunoglu, S., Engin, H., Basaran, G., Guler, N., Uygun, K., Demirkan, B., Ozdemir, F., Cubukcu, E., Salepci, T., & Cicin, I. (2011). The access rate to diagnosis and treatment modalities in breast cancer patients in Turkey; multicenter observational study. *Journal of B.U.ON.*, 16(4).

- Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry*, 164(4). <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>
- Saller, R., Meier, R., & Brignoli, R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. In *Drugs* (Vol. 61, Issue 14). <https://doi.org/10.2165/00003495-200161140-00003>
- Sameri, S., Saidijam, M., Bahreini, F., & Najafi, R. (2021). Cancer Chemopreventive Activities of Silibinin on Colorectal Cancer through Regulation of E-Cadherin/ β -Catenin Pathway. *Nutrition and Cancer*, 73(8). <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1800764>
- Sánchez-Tilló, E., De Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., & Postigo, A. (2011). β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.1108977108>
- Santini, M. T., Rainaldi, G., & Indovina, P. L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 36, Issues 2–3). [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(00\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(00)00078-0)
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 18). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>
- Schmidt, E. P., Kuebler, W. M., Lee, W. L., & Downey, G. P. (2016). Adhesion molecules: Master controllers of the circulatory system. *Comprehensive Physiology*, 6(2). <https://doi.org/10.1002/cphy.c150020>
- Sengodan, S. K., Sreelatha, K. H., Nadhan, R., & Srinivas, P. (2018). Regulation of epithelial to mesenchymal transition by BRCA1 in breast cancer. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 123). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.008>
- Seo, D. D., Lee, H. C., Kim, H. J., Min, H. J., Kim, K. M., Lim, Y. S., Chung, Y. H., Lee, Y. S., Suh, D. J., Yu, E., & Chun, S. Y. (2008). Neural cadherin overexpression is a predictive marker for early postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 23(7 PT1). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05182.x>
- Setia, S., Nehru, B., & Sanyal, S. N. (2014). The PI3K/Akt pathway in colitis associated colon cancer and its chemoprevention with celecoxib, a Cox-2 selective inhibitor. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68(6). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.07.006>
- Sha, Y., Haensel, D., Gutierrez, G., Du, H., Dai, X., & Nie, Q. (2019). Intermediate cell states in epithelial-to-mesenchymal transition. In *Physical Biology* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aaf928>
- Shankar, J., & Nabi, I. R. (2015). Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119954>
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: An overview. In *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* (Vol. 1, Issue 2).
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>

- Shintani, Y., Hollingsworth, M. A., Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2006). Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Research*, *66*(24), 11745–11753. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2322>
- Si, L., Fu, J., Liu, W., Hayashi, T., Nie, Y., Mizuno, K., Hattori, S., Fujisaki, H., Onodera, S., & Ikejima, T. (2020). Silibinin inhibits migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells through induction of mitochondrial fusion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *463*(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03640-6>
- Singh, M., Close, D. A., Mukundan, S., Johnston, P. A., & Sant, S. (2015). Production of Uniform 3D Microtumors in Hydrogel Microwell Arrays for Measurement of Viability, Morphology, and Signaling Pathway Activation. *ASSAY and Drug Development Technologies*, *13*(9). <https://doi.org/10.1089/adt.2015.662>
- Singh, M., Yelle, N., Venugopal, C., & Singh, S. K. (2018). EMT: Mechanisms and therapeutic implications. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 182). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.009>
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J., Patil, P., Thakkannavar, S., & Pujari, V. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, *18*(3). https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18
- Sökeland, G., & Schumacher, U. (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. In *Molecular Cancer* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0937-3>
- Sokolova, V., Rojas-Sánchez, L., Białas, N., Schulze, N., & Epple, M. (2019). Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono- and co-culture cell models. *Acta Biomaterialia*, *84*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.051>
- Soleimani, V., Delghandi, P. S., Moallem, S. A., & Karimi, G. (2019). Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. In *Phytotherapy Research* (Vol. 33, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/ptr.6361>
- Sousa, B., Pereira, J., & Paredes, J. (2019). The crosstalk between cell adhesion and cancer metabolism. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081933>
- Souza, A. G., Silva, I. B. B., Campos-Fernandez, E., Barcelos, L. S., Souza, J. B., Marangoni, K., Goulart, L. R., & Alonso-Goulart, V. (2018). Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(15). <https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304>
- Stockmann, C., Schadendorf, D., Klose, R., & Helfrich, I. (2014). The impact of the immune system on tumor: Angiogenesis and vascular remodeling. In *Frontiers in Oncology: Vol. 4 APR*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00069>
- Stoellinger, H. M., & Alexanian, A. R. (2022). Modifications to the Transwell Migration/Invasion Assay Method That Eases Assay Performance and Improves the Accuracy. *Assay and Drug Development Technologies*, *20*(2). <https://doi.org/10.1089/adt.2021.140>
- Strilic, B., & Offermanns, S. (2017). Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. In *Cancer Cell* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.001>
- Sukumar, J., Gast, K., Quiroga, D., Lustberg, M., & Williams, N. (2021). Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 21, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1840984>
- Sun, H. P., Su, J. H., Meng, Q. S., Yin, Q., Zhang, Z. W., Yu, H. J., Zhang, P. C., Wang, S. L., & Li, Y. P. (2016). Silibinin and indocyanine green-loaded nanoparticles

- inhibit the growth and metastasis of mammalian breast cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(7). <https://doi.org/10.1038/aps.2016.20>
- Sundar, S. S., & Ganesan, T. S. (2007). Role of lymphangiogenesis in cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(27). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.1092>
- Sung, C. O., Park, C. K., & Kim, S. H. (2011). Classification of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma is strongly associated with patient prognosis. *Modern Pathology*, 24(8). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.59>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takebe, N., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Breast cancer growth and metastasis: Interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. In *Breast Cancer Research* (Vol. 13, Issue 3). <https://doi.org/10.1186/bcr2876>
- Taki, M., Abiko, K., Ukita, M., Murakami, R., Yamanoi, K., Yamaguchi, K., Hamanishi, J., Baba, T., Matsumura, N., & Mandai, M. (2021). Tumor immune microenvironment during epithelial- mesenchymal transition. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 27, Issue 17). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4459>
- Tanaka, H., Kono, E., Tran, C. P., Miyazaki, H., Yamashiro, J., Shimomura, T., Fazli, L., Wada, R., Huang, J., Vessella, R. L., An, J., Horvath, S., Gleave, M., Rettig, M. B., Wainberg, Z. A., & Reiter, R. E. (2010). Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nature Medicine*, 16(12). <https://doi.org/10.1038/nm.2236>
- Tang, K. D., Holzapfel, B. M., Liu, J., Lee, T. K. W., Ma, S., Jovanovic, L., An, J., Russell, P. J., Clements, J. A., Hutmacher, D. W., & Ling, M. T. (2016). Tie-2 regulates the stemness and metastatic properties of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 7(3). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3950>
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Tomasik, B., Bieńkowski, M., Górska, Z., Gutowska, K., Kumięga, P., Jassem, J., & Duchnowska, R. (2023). Molecular aspects of brain metastases in breast cancer. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 114). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102521>
- Traub, P., & Shoeman, R. L. (1994). Intermediate Filament Proteins: Cytoskeletal Elements with Gene-Regulatory Function? *International Review of Cytology*, 154(C). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62198-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62198-1)
- Treeck, O., Schüler-Toprak, S., & Ortmann, O. (2020). Estrogen actions in triple-negative breast cancer. In *Cells* (Vol. 9, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/cells9112358>
- Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 2, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/35067088>
- Tuli, H. S., Mittal, S., Aggarwal, D., Parashar, G., Parashar, N. C., Upadhyay, S. K., Barwal, T. S., Jain, A., Kaur, G., Savla, R., Sak, K., Kumar, M., Varol, M., Iqbal, A., & Sharma, A. K. (2021). Path of Silibinin from diet to medicine: A dietary polyphenolic flavonoid having potential anti-cancer therapeutic significance. *Seminars in Cancer Biology*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.09.014>

- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.09.024>
- Van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 65, Issue 23). <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- Vargas-Mendoza, N., Madrigal-Santillán, E., Morales-González, Á., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., García-Luna y González-Rubio, M. G., Gayosso-de-Lucio, J. A., & Morales-González, J. A. (2014). Hepatoprotective effect of silymarin. In *World Journal of Hepatology* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>
- Villasante, A., & Vunjak-Novakovic, G. (2015). Tissue-engineered models of human tumors for cancer research. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1009442>
- von Lersner, A., Drogen, L., & Zijlstra, A. (2019). Modulation of cell adhesion and migration through regulation of the immunoglobulin superfamily member ALCAM/CD166. In *Clinical and Experimental Metastasis* (Vol. 36, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09957-2>
- Wadhwa, K., Pahwa, R., Kumar, M., Kumar, S., Sharma, P. C., Singh, G., Verma, R., Mittal, V., Singh, I., Kaushik, D., & Jeandet, P. (2022). Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 16). <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>
- Wang, C., Tang, Z., Zhao, Y., Yao, R., Li, L., & Sun, W. (2014). Three-dimensional in vitro cancer models: A short review. In *Biofabrication* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/2/022001>
- Weiswald, L. B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. In *Neoplasia (United States)* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>
- Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., Christian, S., Prinz, F., Osterland, M., Golfier, S., Räse, S., Ansari, N., Esner, M., Bickle, M., Pampaloni, F., Mattheyer, C., Stelzer, E. H., Parczyk, K., Pechtl, S., & Steigemann, P. (2014). 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experimental Cell Research*, 323(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.017>
- Wesołowska, O., Łania-Pietrzak, B., Kuzdzał, M., Stańczak, K., Mosiądz, D., Dobryszycycki, P., Ozyhar, A., Komorowska, M., Hendrich, A. B., & Michalak, K. (2007). Influence of silybin on biophysical properties of phospholipid bilayers. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(2). <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00487.x>
- Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherins as Modulators of Cellular Phenotype. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135>
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. In *Journal of Cell Science* (Vol. 121, Issue 6). <https://doi.org/10.1242/jcs.000455>
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., & Hayes, D. F. (2013). Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline

- Update. *Journal of Clinical Oncology*, 31(31).
<https://doi.org/10.1200/jco.2013.50.9984>
- Won, D. H., Kim, L. H., Jang, B., Yang, I. H., Kwon, H. J., Jin, B., Oh, S. H., Kang, J. H., Hong, S. D., Shin, J. A., & Cho, S. D. (2018). In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumor Biology*, 40(5).
<https://doi.org/10.1177/1010428318776170>
- Xie, W., Li, H., Lin, Q., & Ke, N. (2023). Network Pharmacological Analysis and Experimental Validation of the Effects of Silybin on Proliferation, Migration, and Immunotherapy of Papillary Thyroid Cancer. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 24(6).
<https://doi.org/10.2174/0118715303248000230922185110>
- Xu, Z., Zhang, Y., Dai, H., & Han, B. (2022). Epithelial–Mesenchymal Transition-Mediated Tumor Therapeutic Resistance. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 15).
<https://doi.org/10.3390/molecules27154750>
- Yamaguchi, S., Takahashi, S., Mogushi, K., Izumi, Y., Nozaki, Y., Nomizu, T., Kakugawa, Y., Ishida, T., Ohuchi, N., Ishioka, C., & Kato, S. (2018). Molecular and clinical features of the TP53 signature gene expression profile in early-stage breast cancer. *Oncotarget*, 9(18). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24447>
- Yazdi Rouholamini, S. E., Moghassemi, S., Maharat, Z., Hakamivala, A., Kashanian, S., & Omidfar, K. (2018). Effect of silibinin-loaded nano-niosomal coated with trimethyl chitosan on miRNAs expression in 2D and 3D models of T47D breast cancer cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(3).
<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1326928>
- Yeh, H. Y., Liu, B. H., & Hsu, S. H. (2012). The calcium-dependent regulation of spheroid formation and cardiomyogenic differentiation for MSCs on chitosan membranes. *Biomaterials*, 33(35).
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.069>
- Yildiz-Ozturk, E., Gulce-Iz, S., Anil, M., & Yesil-Celiktas, O. (2017). Cytotoxic responses of carnosic acid and doxorubicin on breast cancer cells in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture. *Cytotechnology*, 69(2).
<https://doi.org/10.1007/s10616-016-0062-3>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. In *Breast Cancer Research* (Vol. 22, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, 14(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-609>
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., Isakoff, S. J., Ciciliano, J. C., Wells, M. N., Shah, A. M., Concannon, K. F., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 339(6119).
<https://doi.org/10.1126/science.1228522>
- Zeng, J., Sun, Y., Wu, K., Li, L., Zhang, G., Yang, Z., Wang, Z., Zhang, D., Xue, Y., Chen, Y., Zhu, G., Wang, X., & He, D. (2011). Chemopreventive and chemotherapeutic effects of intravesical silibinin against bladder cancer by acting on mitochondria. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(1). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0577>
- Zhao, S., Ma, W., Zhang, M., Tang, D., Shi, Q., Xu, S., Zhang, X., Liu, Y., Song, Y., Liu, L., & Zhang, Q. (2013). High expression of CD147 and MMP-9 is correlated with

poor prognosis of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. *Medical Oncology*, 30(1). <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0335-4>

Masseter muscle and gingival tissue inflammatory response following treatment with high-fructose corn syrup in rats: Anti-inflammatory and antioxidant effects of kefir

Ömer Ekici¹ | Esra Aslan² | Tuğçe Aladağ² | Hilal Güzel³ |
Ömer Adil Korkmaz⁴ | Aykut Bostancı⁵ | Gökhan Sadi⁵ |
Mehmet Bilgehan Pektaş⁶

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyonkarahisar, Turkey

²Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyonkarahisar, Turkey

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyonkarahisar, Turkey

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Yildiz Technical University, Istanbul, Turkey

⁵Department of Biology, K.O. Science Faculty, Karamanoglu Mehmetbey University, Karaman, Turkey

⁶Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyonkarahisar, Turkey

Correspondence

Mehmet Bilgehan Pektaş, Department of Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03200, Afyonkarahisar, Turkey.
Email: mbpektas@gmail.com

Funding information

Afyonkarahisar Health Sciences University Research Foundation, Grant/Award Number: 19.Kariyer.016

Abstract

The aim of the study was to evaluate whether high-fructose corn syrup (HFCS) intake (20% beverages) impacts antioxidative structures and inflammation in the gingival tissue and masseter muscle of rats. Kefir was tested for its potential utility on changes induced by HFCS. Animals were randomly divided into four groups as control, kefir, HFCS, and HFCS plus kefir. HFCS was given as 20% solutions in drinking water while kefir supplementations were given by gastric gavage for 8 weeks. It has been clearly determined that the HFCS diet increased expressions of interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α proinflammatory structures via lymphocyte infiltration by suppressing antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in both tissues. Kefir improved these undesirable changes in rats fed with HFCS. The results of this current study, the first investigation to examine the effects of kefir on masseter muscle and gingival tissue, may provide new access to the restorative effects of kefir consumption on oral health disorders caused by high fructose in the diet.

Practical applications

In this study, at an early age, the effects of kefir on improving inflammation via antioxidant in the masseter muscle and gingival tissue were investigated for the first time. We showed that kefir feeding ameliorates lymphocyte infiltration on the high-fructose corn syrup (HFCS)-induced masseter muscle and gingival tissue inflammation in rats. The mRNA expressions of inflammatory parameters measured in the study were supported by protein measurements via ELISA or immunohistochemistry. In the present study, kefir may play an important role in the antioxidant and inflammation process on the masseter muscle and gingival tissue against HFCS.

KEYWORDS

antioxidants, gingiva, HFCS, inflammation, kefir, masseter muscle

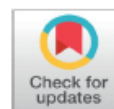
Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate aminotransferase; CYP3A1, cytochrome 3A1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GPx, glutathione peroxidase; GST, glutathione S-transferase; HE, hematoxylin-eosin; HFCS, high-fructose corn syrup; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; IL-1 β , 6, 11, interleukin-1 β , 6, 11; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MDA, malondialdehyde; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; SOD, superoxide dismutase; T3, 4, thyroxine 3, 4; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VLDL, very low-density lipoprotein.



COMPARATIVE EFFECTS OF BORIC ACID AND RESVERATROL ON MCF-7 BREAST CANCER CELLS METASTATIC BEHAVIOUR

Fatma Firat ¹, Tuğçe Aladağ ²

^{1,2} Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University Afyonkarahisar, Turkey.



ABSTRACT

Motivation/Background: The metastasis of tumor cells consists of steps such as epithelial-mesenchymal transition, transendothelial migration and the formation of metastatic colonization. E-Cadherin and vimentin are main proteins associated with EMT, whereas MMP-9 is associated with migration.

Method: We aimed to investigate effects boric acid and resveratrol comparatively on metastatic behaviors on MCF-7. 30µM boric acid and 50µM resveratrol were administered to BA, BA+RES, and RES groups 48hours. Cells stained immunocytochemically by Anti-E-Cadherin, Anti-Vimentin, and Anti-MMP-9 antibodies and H-Score analysis carried out and migration analyzed by woundhealing, morphologically.

Results and Conclusions: It's been observed that boric acid doesn't affect the EMT capability of the MCF-7 cells in terms of E-Cadherin and vimentin expression; whereas it's affected migration both by decreasing the MMP-9 expression and also by inhibiting migration.

Keywords: Boric Acid, MCF-7 Breast Cancer, Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis, Resveratrol.

Received 01 December 2021
Accepted 26 December 2021
Published 31 January 2022

Corresponding Author

Tuğçe Aladağ,
tugcealadag@hotmail.com

DOI
10.29121/granthaalayah.v10.i1.2022.4460

Funding: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.









Copyright: © 2022 The Author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



1. INTRODUCTION

Breast cancer is a type of cancer which has the highest mortality rates and is the most common cancer in women [Global Cancer Observatory \(2021\)](#). There are novel therapeutic approaches being developed in breast cancer treatment nowadays [Mahjoubin-Tehran et al. \(2020\)](#). Despite this, there is still need for effective methods in terms of cancer treatment. In general, deaths based on cancer is mainly caused by metastasis [Dillekås et al. \(2019\)](#). [Banfalvi \(2012\)](#) believes that the development of breast cancer is mainly metastasis rather than the primary tumor and states that the main reason of death caused by breast cancer is tumor invasion and metastasis [Banfalvi \(2012\)](#). 10-15% of patients usually have metastasis during the three years following the first treatment. Metastasis includes stages such as local invasion (Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)), intravasation, survival in the circulation, extravasation (transendothelial migration (TEM/diapedesis)), the development of micrometastasis and the development of metastatic colonization [Reymond et al. \(2013\)](#). Metastasis in cancer cells is a complex process directed by a great number of biochemical and molecular factors. Although this process and the mechanisms of action are not completely enlightened, the chance to eliminate the disease will arise if the cancer cells can be stopped in the invasion stage.

Effect of systemic isotretinoin therapy on semen parameters

Abdullah Gurel^a , Gulhan Gurel^b , Fatma Firat^c , Esra Ozgul^d ,
Irem Nur Durusu Turkoglu^b , Tugce Aladag^c , Ibrahim Baran Duran^d  and Burhan Baylan^a 

^aDepartment of Urology, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyon, Turkey; ^bDepartment of Dermatology, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyon, Turkey; ^cDepartment of Histology & Embryology, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyon, Turkey; ^dDepartment of Radiology, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyon, Turkey

ABSTRACT

Purpose: Vitamin A has multiple functions in the human body, being involved in growth, epithelial differentiation, vision, immune function and reproduction. While normal spermatogenesis is influenced by several factors, it requires vitamin A. Systemic isotretinoin is a vitamin A derivative that is used in the treatment of many dermatological diseases, especially acne vulgaris (AV). There is limited research on the changes in semen parameters after systemic isotretinoin therapy in humans. Our study investigates the presence of varicoceles in patients undergoing systemic isotretinoin therapy for AV and examines whether there were any changes in the semen parameters before and after treatment.

Methods: Included in the study were 46 men patients who were scheduled for systemic isotretinoin therapy for AV. Before treatment, the patients underwent a physical examination and ultrasonography for varicoceles assessment. The patients underwent spermogram before treatment and after 6 months of treatment. The spermogram assessments included semen volume, sperm concentration, total sperm count, progressive motility, viability and sperm morphology.

Results: After treatment, there was an increase in semen volume, sperm concentration, total sperm count, progressive motility and vitality from the pre-treatment values, but a deterioration in the sperm morphology ($p < .05$). Comparing patients with and without varicoceles revealed more changes in semen parameters after treatment in those with varicoceles. There was a statistically significant difference in sperm concentration ($p < .001$).

Conclusions: Systemic isotretinoin therapy negatively affects sperm morphology, but has positive effect on other semen parameters, and these changes in semen parameters occur more frequently in patients with varicoceles.

KEY MESSAGES

- Acne vulgaris is a very common disease and systemic isotretinoin is used as the most effective agent in its treatment.
- Systemic isotretinoin positively affects semen parameters except sperm morphology.
- Changes in semen parameters are more common in patients with varicocele.

ARTICLE HISTORY

Received 23 October
2022
Revised 4 January 2023
Accepted 20 April 2023

KEYWORDS



Acne vulgaris;
isotretinoin; semen
parameters; varicocele

Introduction

Vitamin A has multiple functions in the human body, being involved in growth, epithelial differentiation, vision, immune function and reproduction [1]. Retinoic acid (RA), a vitamin A metabolite, is critical for oocyte and sperm production in mammals. The germ cells in the foetal ovary initiate meiosis when exposed to RA, while those in the foetal testis are protected from RA and do not initiate meiosis. After birth, spermatogonial stem cells initiate spermatogenesis through periodic RA [2], and so males need dietary retinoids or vitamin

A for spermatogenesis [3]. It is known that blood–testis barrier connections and RA signals play an important role in the spermatogenesis process [4]. There are limited studies investigating the effect of retinoids and vitamin A on spermatogenesis in humans. Most studies are conducted on rats due to their similarities to humans [5].

Acne vulgaris (AV) is a chronic skin condition of pilosebaceous follicles that is most common in adolescents, affecting approximately 85% of young people [6]. The pathogenesis of acne involves excessive sebum

CONTACT Abdullah Gurel  abdullahgurel@hotmail.com  Department of Urology, Afyonkarahisar Health Sciences University, Afyon, Turkey

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

In Vitro Effects of Boric Acid and Bevacizumab in Non-Small Cell Lung Cancer

Fatma Fırat¹, Tuğçe Aladağ^{1*}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Science University Afyon, Turkey.

Article History

Received 23 July 2022

Accepted 06 Aug 2022

Published Online 16 Sep 2022

*Corresponding Author

Tuğçe Aladağ

Department of Histology and Embryology

Faculty of Medicine,

Afyonkarahisar Health Science University,

Afyon, Turkey

Phone: +90 272 246 3301/5143

E-mail: tugcealadag@hotmail.com

DOI: 10.56766/ntms.1147628

Authors' ORCIDs

Fatma Fırat

<http://orcid.org/0000-0003-0027-5138>

Tuğçe Aladağ

<http://orcid.org/0000-0003-3250-6113>

Abstract: Lung cancer is one of the most common types of cancer worldwide and is responsible for the loss of more than 1 million people each year. It has been reported that the 5-year survival rate of lung cancer is approximately 15 % or less due to cell metastasis. Therefore, there is a need to develop adjuvant therapies to prevent death from lung cancer cell metastasis. The aim of this study is to evaluate the effects of boric acid and bevacizumab on the vascularization, apoptotic, and metastasis steps of A549 lung cancer cells, such as invasion, migration, and epithelial mesenchymal transition (EMT) abilities, either alone or in combination. The study was divided into 4 groups as control(CONT) and boric acid (BA), Boric acid+altuzan (BA+ALT) and altuzan (ALT). The IC50 dose of boric acid was determined by the MTT method. 30µM boric acid and 7 µM Altuzan were applied to BA, BA+ALT and ALT groups for 24 hours. Anti-VEGF for vascularization, Anti-Vimentin for EMT, Anti-MMP-9 for invasion, and Anti-Bax, Anti-Bcl-2 and Anti-Caspase-3 antibodies for apoptosis were stained immunocytochemically and H-Score analysis was performed. Cell migration was evaluated by the wound healing assay. It was observed that MMP-9 immunoreactivity and apoptotic markers increased in the direction of Cas-3 in the BA group, while the immunoreactivity of Vim and VEGF did not change significantly (p<0,05). When the migration was evaluated, it was observed that the cells did not migrate in the BA and BA+ALT groups at the end of the 24th hour, and the wound areas were closed in the other groups. It was observed that while BA affected the migration, invasion and apoptotic characters of A549 cells independently of bevacizumab, it had no effect on their vascularization properties © 2022 NTMS.

Keywords: A549; Apoptosis; Bevacizumab; Boric Acid; EMT.

1. Introduction

Because lung cancer is an aggressive type of carcinoma, it is in the first place of cancer-related deaths (1, 2). An estimated 1.1 million deaths due to lung cancer occur worldwide each year (3). Although

different treatment options such as antiangiogenic, immunotherapy and radiation therapy are applied for lung cancer, survival rates are quite low. Because of metastases, the survival rate of lung cancer remains

BORAKS KULLANIMINA BAĞLI KAN-TESTİS BARIYERİNDE GÖRÜLEN DEĞİŞİKLİKLERİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

HISTOLOGICAL EVALUATION OF THE CHANGES IN THE BLOOD-TESTIS BARRIER FOR BORAKS USE

Murat TOSUN¹, Tuğçe ALADAĞ², Esra GÖKALP², Gökçen GÖKÇE²

¹Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

²Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Öğrencisi

ÖZ

AMAÇ: Günlük yaşamda yaygın olarak kullanılan bor bileşiklerinin uzun süreli kullanımında değişik organlarda doza bağımlı toksik etki olabileceği yönünde bulgular mevcuttur. Bu amaçla çalışmamızda değişik dozlarda boraks kullanılan ratların testislerinde kan-testis bariyeri yapısında ve Leydig hücre sayısında görülebilecek değişimi belirlemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada her grupta 6'şar erkek rat bulunan toplam 4 grup oluşturuldu. Her gruptaki ratlara boraksın farklı dozları oral yoldan uygulandı. Deney sonrası alınan sol testisler histolojik olarak takip edilerek immunohistokimyasal olarak Claudin-1, Pan Cadherin ve Calretinin ile boyandı ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

BULGULAR: Testis örneklerinde Cadherin ekspresyonunun artan doza bağımlı azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte Claudin 1 ekspresyonunun gruplar arasında çok değişiklik göstermediği gözlemlendi. Leydig hücre sayısının ise bir kez LD50x2 doz boraks uygulanan ratlarda azalma gösterdiği gözlemlendi.

SONUÇ: Elde edilen bulgular boraks kullanımının doza bağımlı olarak testislerde kan-testis bariyeri bileşenleri üzerine zararlı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bu etkiler uzun dönemde infertilite sorunlarına neden olabilme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle bilhassa bor bileşenleri üretim merkezleri çevresinde olmak üzere çevre kirliliği yönünden önemli korunma tedbirleri alınmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELER: Boraks, Infertilite, Kan-Testis bariyeri, Claudin, Leydig hücresi

ABSTRACT

OBJECTIVE: The long-term use of boron compounds commonly used in daily life has some dose-dependent toxic effects on different organs. For this purpose, in our study, we aimed to determine the change in blood-testis barrier structure and the number of Leydig cells in the testis of rats in which were given borax at different doses.

MATERIAL AND METHODS: In our study, 4 groups, in each have 6 male rats were made. Different doses of borax were given orally to rats in each groups. After the experiment, the left testis was excised, histologically processed and stained with Claudin-1, Pan cadherin and Calretinin immunohistochemically and evaluated under light microscopy.

RESULTS: In testis slides, it was determined that Cadherin expression decreased parallel to borax doses. However, it was observed that the expression of Claudin 1 did not change much between the groups. The number of Leydig cells was observed to decrease in rats administered once with an LD50x2 dose.

CONCLUSIONS: The findings suggest that the use of borax may be deleterious to the blood-testis barrier components in the testes. These effects have the potential to cause long term infertility problems. For this reason, we consider that it is necessary to take important preventive measures in terms of environmental pollution, especially around boron components production centers.

KEYWORDS: Borax, Infertility, Blood-Testis Barrier, Claudin, Leydig cell

Geliş Tarihi / Received: 19.02.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 11.05.2018

Yazışma Adresi / Correspondence: Prof. Dr. Murat TOSUN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Kefir Prevents Adipose Tissue Growth Through the Induction of Apoptotic Elements in High-Fructose Corn Syrup-Fed Rats

Esra Aslan¹, Gökhan Sadi², Hilal Guzel³, Cigdem Karaca¹, Omer A. Korkmaz⁴, Mine K. Pektas⁵, Mehmet Celegen⁶, Tugce Aladag⁷, Seyma Oncu⁴, Mehmet B. Pektas^{7*}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03200, Afyonkarahisar, Turkey
²Department of Biology, K.O. Science Faculty, Karamanoglu Mehmetbey University, 70100, Karaman, Turkey

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Yıldız Technical University, 34220, Istanbul, Turkey

⁵Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

⁷Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

Consumption of high-fructose corn syrup (HFCS) in the diet is a causal factor in the development of abdominal obesity; however, the molecular mechanism behind this association is still up for debate. This study evaluated the metabolic disturbances that are caused by HFCS on adipose tissue as well as the possibility of kefir as a therapy to prevent these metabolic disturbances. Male *Wistar* rats were divided into four groups: control, kefir, HFCS, and HFCS+kefir. HFCS (20%, w/v) was given in drinking water and kefir (1 mL/100 g body weight) by gastric gavage daily for 8 weeks. Levels of insulin signaling, inflammation, and apoptosis-associated proteins of adipose tissues were determined with Western blot and immunohistochemical techniques. Gene expressions were evaluated with semi-quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The indirect terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) method was used to assess changes in apoptotic cells, and hematoxylin/eosin staining to determine adipocyte number and diameter. Accordingly, HFCS boosted protein kinase B (Akt) and p-Akt while reducing nuclear factor κ B (NF- κ B), and tumor necrosis factor alpha (TNF α) levels and kefir treatment restored Akt induction in HFCS-treated rats despite raising NF- κ B, and TNF α . Increased expression of Akt and B-cell lymphoma-2 gene (*Bcl2*) was contrasted with decreased expression of *Nfkb*, *Tnfa*, tumor protein 53 gene (*p53*), and caspase-8 gene (*Casp8*). Furthermore, while there was a marked reduction in TUNEL-positive cells in the HFCS group, the number of such cells was greater in the HFCS+kefir group. These results show that HFCS intake suppresses apoptosis in adipose tissues, which may be responsible for tissue development and abdominal obesity and may be reversed with kefir administration due to the activation of apoptosis-associated genes and proteins.

Key words: adipose tissue, fructose, kefir, apoptosis, inflammation

INTRODUCTION

Obesity is a form of chronic disease that is experiencing a rise in incidence and is now being recognized on a worldwide scale as an epidemic [Hill *et al.*, 2022]. Recent research suggests that differences in lifestyle and eating habits are the most significant

contributors [Khorshidian *et al.*, 2021], and carbohydrate consumption, especially from refined sources, might lead to the development of chronic diseases including obesity, insulin resistance, metabolic syndrome, and diabetes [Stanhope, 2016]. Research evaluating the negative impacts of various forms of carbohydrates,

*Corresponding Author:

tel: +90 532 253 39 40; e-mail: mbpektas@gmail.com (M.B. Pektas)

Submitted: 7 January 2023

Accepted: 27 March 2023

Published on-line: 5 May 2023



© Copyright by Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences 2023 Author(s). This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Effect of post-gastrulation exposure to acrylamide on chick embryonic development

Merve Becit-Kizilkaya^{a,*}, Seyma Oncu^b, Abdulkadir Bilir^c, Emre Atay^c, Evrim Suna Arikan Soylemez^d, Fatma Firat^e, Tugce Aladag^e

^a Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03030 Afyonkarahisar, Turkey

^b Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03030 Afyonkarahisar, Turkey

^c Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03030 Afyonkarahisar, Turkey

^d Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03030 Afyonkarahisar, Turkey

^e Department of Histology and Embryology, Medicine Faculty, Afyonkarahisar Health Sciences University, 03030 Afyonkarahisar, Turkey

ARTICLE INFO

Editor: Lawrence Lash

Keywords:

Acrylamide
Teratogenesis
Neural Tube
Chick Embryo
Caspase 3
Proliferating Cell Nuclear Antigen

ABSTRACT

The critical developmental stages of the embryo are strongly influenced by the dietary composition of the mother. Acrylamide is a food contaminant that can form in carbohydrate-rich foods that are heat-treated. The aim of this study was to investigate the toxicity of a relatively low dose of acrylamide on the development of the neural tube in the early stage chick embryos. Specific pathogen-free fertilized eggs ($n = 100$) were treated with acrylamide (0.1, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg) between 28–30th hours of incubation and dissected at 48th hours. In addition to morphological and histopathological examinations, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and caspase 3 were analyzed immunohistochemically. The brain and reproductive expression gene (BRE) was analyzed by RT-PCR. Acrylamide exposure had a negative effect on neural tube status even at a very low dose (0.1 mg/kg) ($p < 0.05$). Doses of 0.5 mg/kg and above caused a delay in neural tube development ($p < 0.05$). Crown-rump length and somite count decreased dose-dependently, while this decrease was not significant in the very low dose group ($p > 0.05$), which was most pronounced at doses of 2.5 and 12.5 mg/kg ($p < 0.001$). Acrylamide exposure dose-dependently decreased PCNA and increased caspase 3, with this change being significant at doses of 0.5 mg/kg and above ($p < 0.001$). BRE was downregulated at all acrylamide exposures except in the very low dose group (0.1 mg/kg). In conclusion, we find that acrylamide exposure (at 0.5 mg/kg and above) in post-gastrulation delays neural tube closure in chicken embryos by suppressing proliferation and apoptosis induction and downregulating BRE gene expression.

1. Introduction

The mother's dietary habits during periconception can affect embryonic development and increase the risk of congenital malformations such as neural tube defects (Çobanoğullari et al., 2022; Montagnoli et al., 2022). Neural tube defects can lead to lifelong disabilities, high care costs and perinatal and infant deaths (Kancherla, 2023). Therefore, it is important to understand the relationship between preventable risk factors such as nutrition and the development of neural tube defects.

Understanding this relationship allows maternal nutrition to be assessed with appropriate strategies to reduce the risk of teratogenicity and can help reduce the costs that may be incurred in the healthcare system (Berhane and Belachew, 2022).

Neural tube defects are one of the most common congenital malformations worldwide. They develop around day 28 of pregnancy due to defects in neurulation and changes in the morphogenesis or histogenesis of neural tissue (Kancherla, 2023). A community-based study in Norway in 2024 showed a high prevalence of neural tube defects of 17%. This

Abbreviations: BRE, Brain and reproductive expression gene; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IARC, International Agency for Research on Cancer; JECFA, Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives; NOAEL, No observed adverse effect level; PCNA, Proliferating cell nuclear antigen.

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Toxicology, Afyonkarahisar Health Sciences University, Faculty of Pharmacy, Afyonkarahisar 03030, Turkey.

E-mail address: mervebecit@hotmail.com (M. Becit-Kizilkaya).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.117011>




Received 8 April 2024; Received in revised form 29 May 2024; Accepted 17 June 2024

Available online 19 June 2024

0041-008X/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

ORIGINAL ARTICLE

Silymarin promotes wound healing through regulating epithelial-mesenchymal transition in rat model: Histopathological and immunohistochemical evidences

Esra Aslan¹ Hasan Hüseyin Demirel² Tuğçe Aladağ¹ Mehmet Bilgehan Pektaş³ ¹ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University. Afyonkarahisar / Türkiye² Bayat Vocational School, Afyon Kocatepe University. Afyonkarahisar / Türkiye³ Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Afyonkarahisar Health Sciences University. Afyonkarahisar / Türkiye**Abstract**

The wound is the disruption of the normal structure, integrity, and function of the skin and subcutaneous tissue. It is known that current wound management strategies applied in the treatment of acute and chronic wounds both cause an increase in health costs and do not achieve the desired level of success. Therefore, more effective and easily applicable treatment methods are needed. SM is an agent known to have hepatoprotective, anticancer, antidiabetic, cardioprotective, neuroprotective, antimicrobial and antioxidant effects. And it is also used in dermatological applications. However, the therapeutic effects of Silymarin (SM) on wound healing are still unknown. In this study, the effects of SM were investigated by comparing it with dexpanthenol (Dxp), whose favorable effects on wound healing are known. Sham, Dxp, and SM groups were formed. 18 animals were used for each group. Two circular full-thickness skin wounds were taken from the nape of the neck (1.5 cm) using a six-mm punch biopsy tool. SM and Dxp was applied once daily for 15 days, in sufficient amounts to cover the entire wound and the effects of the drugs were investigated immunohistochemically on the 5th, 10th, and 15th days in rats. Inflammation, collagenization and epithelialization were evaluated in histochemical H-E and Masson trichrome staining. E-cadherin, N-cadherin, Occludin, Vimentin, FGF-1 and MMP-9 expression levels were examined immunohistochemically. Based on histological and immunohistochemical results, SM and Dxp enhanced epithelialization and reduced inflammation more than the sham group. Furthermore, there was no significant difference in the effects on the epithelial-mesenchymal transition between SM and Dxp. Results indicated that SM is a useful therapeutic agent at least as much as Dxp in wound healing. The wound re-epithelization and anti-inflammatory effects of SM may be a new approach to the treatment of wound healing.

Keywords: Silymarin, wound healing, epithelial-mesenchymal transition, cadherin, NfκB

Citation: Aslan E, Demirel HH, Aladağ T, Pektaş MB. Silymarin promotes wound healing through regulating epithelial-mesenchymal transition in rat model: Histopathological and immunohistochemical evidences. Health Sci Q. 2024;4(3):195-205. <https://doi.org/10.26900/hsq.2364>

Corresponding Author:
Mehmet Bilgehan Pektaş
Email: mbpektas@gmail.com



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.