



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MCL-1 İNHİBİTÖRÜ AZD5991 İLE GENİSTEİNİN
KOMBİNASYON TERAPİSİNİN MCF-7 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE SİNERJİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melike BÜGÜL KILINÇARSLAN

**Haziran 2025
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MCL-1 İNHİBİTÖRÜ AZD5991 İLE GENİSTEİNİN
KOMBİNASYON TERAPİSİNİN MCF-7 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE SİNERJİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Melike BÜGÜL KILINÇARSLAN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Derya KARAER

Denizli, 2025

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının 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 : Melike B g l Kılınçarslan

İmza :

ÖZET

MCL-1 İNHİBİTÖRÜ AZD5991 İLE GENİSTEİNİN KOMBİNASYON TERAPİSİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE SİNERJİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Melike B g l Kılınçarslan

Yüksek Lisans Kanser Moleküler Biyolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Dr.  gr. Üyesi Derya KARAER

Haziran 2025, 69 Sayfa

Meme kanseri, dünyada oldukça yaygın görülen ve kadınlarda en yüksek mortaliteye sahip kanserdir. Erken teŖhis sayesinde ölüm oranları azalırken, çoğu hasta için hayatta kalma oranları artmaktadır. Ancak tedavi maliyetleri, yan etkiler ve direnç gibi sorunlar nedeniyle alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

AZD5991, hücrelerin yaŖam döngüsü ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerinde rol oynayan önemli bir gen olan Mcl-1 proteinini inhibe ederek apoptozu tetikler. Bazı kurubaklagillerde bulunan ve bir izoflavon olan genistein de kanser hücrelerinde benzer süreçleri kontrol edebilen potansiyel kemoterapötik bir ajandır. Literatürde bu iki ajanın birlikte kullanımıyla ilgili bir  alıŖma bulunmamaktadır.

Bu doğrultuda  alıŖmamızda, Mcl-1 inhibitörü AZD5991 ile genistein izoflavonunun kombinasyon terapisinin insan meme kanseri MCF-7 hücre hattında sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri ile protein düzeyleri üzerine olan etkileri kontrol gruplarıyla karŖılaŖtırılmalı olarak incelenmiŖtir. Elde edilen veriler, Graphpad prism ve ImageJ programlarında analiz edilmiŖtir.

Hücre canlılığı, SRB testiyle belirlenmiŖ; optimum etkinlik 48 saatlik inkübasyon sonrasında sırasıyla 100  M Genistein, 30  M AZD5991 ve 73  M Genistein + 10  M AZD5991 kombinasyon dozlarında elde edilmiŖtir. Genistein ve AZD5991'in tekli uygulamalarında hücre canlılığı sırasıyla %63 ve %61 olarak belirlenirken, kombinasyon uygulamasında bu oran %43'e d Ŗm Ŗt r. Hücre g  , yara iyileŖme testi ile analiz edilmiŖ; Genistein ve AZD5991'in migrasyonu anlamlı derecede inhibe ettiği g zlemlenmiŖtir ($p < 0.0001$). Apoptoz, JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyeli üzerinden deėerlendirilmiŖtir. Genistein, AZD5991 ve Kombine tedavilerinin MCF-7 hücrelerinde hedeflenen genlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri deėerlendirilmiŖtir. *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21* ve *Caspase-8* genlerine ait $\Delta\Delta Ct$ ve kat deėiŖimi (fold change) analizleri, Genistein tedavisinin *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21* ve *Caspase-8* genlerinin ekspresyonunda anlamlı farklılıklara yol açtığını g stermiŖtir.

Apoptotik hücre ölümü ile iliŖkili Mcl-1, Bax, P21, P53 ve Parp-1 proteinlerinin ifadeleri western blot yöntemiyle incelenmiŖtir. MCF-7 hücrelerinde tek baŖına AZD5991 ve Genistein uygulamaları ile kombinasyon tedavisinde Mcl-1 protein ifadesinin azaldığı, Bax ifadesinin ise arttığı g zlemlenmiŖtir.

 alıŖmamızdan elde ettiğimiz veriler, meme kanseri tedavisinde, Genistein ve AZD5991'in kullanımı üzerine yapılacak ileri  alıŖmalar için  n veri oluŖturması açısından değerlidir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri; MCF-7; Apoptoz; AZD5991; Genistein; Mcl-

Bu alışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2023SABE012)

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF COMBINATION THERAPY OF MCL-1 INHIBITOR AZD5991 AND GENISTEIN ON MCF-7 BREAST CANCER CELLS

BÜGÜL KILINÇARSLAN, Melike

Master Thesis, Department of Cancer Molecular Biology

Supervisor: Assistant Professor Derya KARAER

June 2025, 69 Pages

Breast cancer is one of the most commonly diagnosed cancers worldwide and has the highest mortality rate among women. While early diagnosis has led to a reduction in mortality rates and increased survival rates for many patients, issues such as treatment costs, side effects, and resistance necessitate the exploration of alternative therapies.

AZD5991 is an Mcl-1 protein inhibitor that induces apoptosis by targeting a gene involved in critical biological processes such as cell cycle regulation and apoptosis. Genistein, an isoflavone found in certain legumes, is also a potential chemotherapeutic agent known to regulate similar cellular processes in cancer cells. To date, there are no studies in the literature investigating the combined use of these two agents.

In this context, our study comparatively investigates the cytotoxic, antiproliferative, and apoptotic effects of the combination therapy of the Mcl-1 inhibitor AZD5991 and the isoflavone genistein on the human breast cancer cell line MCF-7, including their effects on protein expression levels, compared to control groups. The data were analyzed using GraphPad Prism and ImageJ software.

Cell viability was assessed using the SRB assay, and optimal efficacy was observed after 48 hours of incubation with 100 μ M Genistein, 30 μ M AZD5991, and a combination dose of 73 μ M Genistein + 10 μ M AZD5991. In single-agent treatments, cell viability was determined to be 63% for Genistein and 61% for AZD5991, whereas combination treatment reduced this rate to 43%.

Cell migration was analyzed using the wound healing assay, and both Genistein and AZD5991 significantly inhibited migration ($p < 0.0001$). Apoptosis was evaluated based on mitochondrial membrane potential using the JC-1 dye. The effects of Genistein, AZD5991, and their combination on the expression levels of target genes in MCF-7 cells were also assessed. $\Delta\Delta$ Ct and fold change analyses of genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21* and *Caspase-8* revealed that Genistein treatment caused significant changes in the expression of *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21* and *Caspase-8*.

The expression levels of apoptosis-related proteins Mcl-1, Bax, P21, P53 and Parp-1 were examined using western blot analysis. In MCF-7 cells, both monotherapies and the combination therapy led to a decrease in Mcl-1 expression and an increase in Bax expression.

The data obtained from our study are valuable in terms of creating preliminary data for further studies on the use of Genistein and AZD5991 in the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer; MCF-7; Apoptosis; AZD5991; Genistein; Mcl-1

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through Project number: 2023SABE012**

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerini tez çalışmam süresince esirgemeyerek tezimin aşamalarında beni yönlendiren ve bu çalışmayı gerçekleştirmeme imkan sağlayan değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Derya KARAER'e teşekkür ederim.

Tezimi yürütebilmem için gerekli laboratuvar ortamı ve imkanları sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Hakan AKÇA ve Doç. Dr. Onur TOKGÜN'e teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca sabırla ve içtenlikle yardımlarını esirgemeyen Dr. Elvan TOKGÜN ve sevgili arkadaşlarım Büşra ÇELİKKAYA, Kubilay İNCİ ve Esra ELVER'e teşekkür ederim.

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne 2023SABE012 Numaralı bilimsel araştırma projesinin gerçekleştirilmesi için mali desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim hayatım boyunca bana cesaret veren, maddi-manevi hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen canım annem ve canım babama teşekkür ederim.

Desteğini ve sevgisini her zaman hissettiren hayat arkadaşım sevgili eşim Halil KILINÇARSLAN'a ve bu süreçte yaşamımın ilk anlarında bana umut ve mutluluk kaynağı olan biricik oğlum Ege KILINÇARSLAN'a yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Amaçlar	2
2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Meme kanserinin epidemiyolojisi	3
2.1.2. Meme kanseri risk faktörleri	4
2.1.3. Meme kanseri sınıflandırması	5
2.1.4. Meme kanseri evrelemesi.....	8
2.1.5. Meme kanserinin moleküler mekanizması.....	10
2.1.6. Meme kanseri tanı ve tedavi	13
2.1.6.1. Hormon tedavisi/ Endokrin tedavisi:	14
2.1.6.2. Hedefli terapiler:	15
2.1.6.3. İmmünoterapiler:.....	15
2.1.7. Genistein	16
2.1.8. AZD5991	17
2.2. Apoptoz.....	17
2.2.1. Apoptozun moleküler mekanizması.....	18
2.2.1.1 Ekstrinsik (hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile apoptotik) yolak:	19
2.2.1.2. İntrensik (mitokondriyal apoptotik) yolak:.....	20
2.2.1.3. Perforin/Granzim yolu	21
2.2.2. Antiapoptotik ve apoptotik genler.....	22
2.2.3. MCF-7 hücre hattı	24
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1.Kullanılan cihazlar	25

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	26
3.1.3. Kullanılan kimyasallar ve kitler	27
3.1.4. Çalışmada kullanılan kitler, ilaçlar ve inhibitörler.....	28
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Primerler	29
3.1.5. Çalışmada kullanılan antikorlar	29
3.1.6. Çalışmada kullanılan stok solüsyonlar ve tamponlar.....	30
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. İnsan meme kanseri hücre hattının (MCF-7) hücre kültürü.....	33
3.2.2. Genistein ve AZD5991' in <i>in vitro</i> biyolojik etkinliğinin araştırılması.....	35
3.2.3. JC-1 mitokondiyal membran potansiyeli analizi ile apoptozun değerlendirilmesi.....	37
3.2.4. Apoptotik gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi	38
3.2.5. İmmünblotlama yöntemi	40
3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin <i>In Vitro</i> Ortamda Büyütülmesi	43
4.2. Genistein ve AZD5991'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında <i>In Vitro</i> Sitotoksitesinin Ölçülmesi.....	43
4.3. Genistein ve AZD5991'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi.....	45
4.4. Yara İyileşme Analizi (Wound Healing)	47
4.5. JC-1 Mitokondiyal Membran Potansiyeli Analizi ile Apoptozun Değerlendirilmesi	49
4.6. Apoptotik Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	51
4.7. İmmünblotlama Yöntemi	52
5. TARTIŞMA	55
6.SONUÇ	62
7. KAYNAKLAR	64
8. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. GLOBOCAN 2022 verilerine göre meme kanserinin dünya çapında görülme sıklığı.....	4
Şekil 2.2. Meme kanseri alt tipleri (Dai ve ark., 2015 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).....	7
Şekil 2.3. Meme kanseri evreleri (Tungsukruthai ve ark.,2018 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).....	9
Şekil 2.4. HER2 aşağı akış yolu aktivasyonu ve anti-HER2 hedefli ajanlar (Marchiò ve ark.,2021 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).	12
Şekil 2.5. Meme kanserinde kullanılan tedaviler (Wang ve ark.,2022 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).	14
Şekil 2.6. Genisteinin kimyasal yapısı (Spagnuolo ve ark. 2015).	16
Şekil 2.7. Apoptozisin ekstrinsik ve intrinsik yollarına genel bakış (Pistritto ve ark.,2016).	20
Şekil 2.8. MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüsü.	24
Şekil 4.1. Çalışmamızda kullandığımız MCF-7 hücrelerine ait morfolojik görüntü.	43
Şekil 4.2. Genistein SRB testi sonuçları (IC50 değeri 100µM).....	44
Şekil 4.3. AZD5991 SRB testi sonuçları (IC50 değeri 30µM).....	44
Şekil 4.4. Genistein ve AZD5991 SRB testi sonuçları (IC50 değeri 73µM genistein+ 10µM AZD5991).	45
Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerinin bağıl hücre canlılığı zamana bağlı grafiği (****P<0,0001)	46
Şekil 4.6. Migrasyon analizinde 0, 24, 48 ve 72 saatlere ait hücre görüntüleri.	48
Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerinin Genistein, AZD5991 ve Genistein-AZD5991 kombinasyonu muamelesi sonrasında 24, 48 ve 72 saatlere ait yara genişlikleri.	48
Şekil 4.8. Genistein, AZD5991 ve Genistein-AZD5991 kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin JC-1 floresan boyası ile değerlendirilmesi. (A: Floresan mikroskopik görüntüler B: R/G oranlarına ilişkin kantitatif veriler).....	50
Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinde Bax, Bcl-2, Caspase-9, P21, ve Caspase-8 genlerine ait $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon değişiklikleri.	52
Şekil 4.10. Genistein ve AZD5991 uygulamasının protein seviyeleri üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında incelenmesi. (A1: AZD59951 ve kombine tedavisinde Mcl-1 ifadesi, A2 Genistein tedavisinde Mcl-1ifadesi. B1: AZD59951 ve kombine tedavisinde Bax ifadesi, B2 Genistein tedavisinde Bax ifadesi. C1: AZD59951 ve kombine tedavisinde P53 ifadesi, C2: Genistein tedavisinde P53 ifadesi. D: Genistein AZD59951 ve kombine tedavisinde P21 ifadesi, E: Genistein AZD59951 ve kombine tedavisinde Parp1 ifadesi.).....	54

TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. Meme kanserinin değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri.....	5
Tablo 3.1. Laboratuvarında kullanılan cihazlar.....	25
Tablo 3.2. Laboratuvarında kullanılan sarf malzemeler.....	26
Tablo 3.3. Hücre Kültürü için Kullanılan Kimyasal Malzemeler	27
Tablo 3.4. Western Blot için Kullanılan Kimyasal Malzemeler	27
Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan kitler, ilaçlar ve inhibitörler.....	28
Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan primerler	29
Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan antikorlar	30
Tablo 3.8. MCF-7 Hücre Hattı Özellikleri	33
Tablo 4.1. Tripan mavisi canlılık testi ile 48 saat sonucunda hücre sayıları ve canlılık yüzdesi.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	:Santigrat Derece
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar
AKT	:Protein Kinaz B
AMPK	:AMP-aktive protein kinaz
ANOVA	:Tek Yönlü Varyans Analizi
APAF1	:Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
APS	:Amonyum persülfat
ATM	:ATM serin/treonin kinaz
Bad	:Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü
Bak	:Bcl-2-Antagonisti/Öldürücü
Bax	:Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	:B hücresi lenfoma 2
Bcl-w	:Bcl-2 benzeri 2
Bcl-xL	:Bcl-2 benzeri 1
BFL-1/A1	:Bcl-2 ailesi proteinleri
BH	:Bcl-2 homoloji alanı
BH3	:Bcl-2 homoloji 3
Bid	:BH3 İle Etkileşime Giren Domain Ölüm Agonisti
Bim	:Bcl-2 etkileşimli mediatör
Bmf	:Bcl-2 modifiye faktör
BRCA1	:Meme kanseri 1
BRCA2	:Meme kanseri 2
BSA	:Sığır Serum Albumin
CD8+	:Sitotoksik T lenfositleri
CDK4/6	:Siklin bağımlı kinaz 4 ve 6
CHEK2	:Kontrol Noktası Kinaz 2
CO ₂	:Karbondioksit
cPARP	:Parçalanmış poli(ADP-riboz) polimeraz
CTL	:Sitotoksik T lenfosit
dH ₂ O	:Deiyonize Su
DISC	:Ölüm indükleyici sinyalleme kompleksi

DMSO	:Dimetilsülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit,
ECL	:Güçlendirilmiş Kemilüminesans
ECM	:Hücre dışı matriks
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri
ER	:Östrojen Reseptör
ERBB2	:Reseptör Protein Tirozin Kinaz 2
ERK	:Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyen Kinaz
Er α	:Östrojen Reseptör α
Er β	:Östrojen Reseptör β
FADD	:FAS Adaptör Proteini İle İlişkili Ölüm Alanı
FasL/FasR	:Fas Ligand / Fas Receptor
FBS	:Fetal Sığır Serum
FGFR	:Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri
g	:Gram
Gapdh	:Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GLOBOCAN	:Uluslararası Kanser Ajansı
HCl	:Hidroklorik Asit
HER-2	:İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2
IC50	:Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon
ICAD	:Kaspaz-Aktive DNaz İnhibitörü
IGFR1	:İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri
JC-1	:5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
KCl	:Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	:Potasyum Dihidrojen Fosfat
Ki67	:Proliferasyon hücre nükleer antijeni
LH-RH	:Luteinize Edici Hormon Salgılatıcı Hormon
MAPK	:Mitojen Aktive Protein Kinaz
MCF-7	:Michigian Kanser Vakfı -7
Mcl-1	:Myeloid Hücre Lösemi 1
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
ML-1	:Myeloid Lösemi 1

mM	:Milimolar
MOMP	:Mitokondri Dış Membran Geçirgenliği
MRI	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
mtDNA	:Mitokondriyal DNA
mTOR	:Rapamisinin Memeli Hedefi
Na ₂ HPO ₄	:Disodyum Fosfat
NaCl	:Sodyum Klorür
NAD ⁺ 7ATP	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid / Adenozin Trifosfat
NF1	:Nörofibromin 1
NF-κB	:Nükleer Faktör Kappa B
NLS	:Nükleer Lokalizasyon Sinyali
nM	:Nanomolar
NOS	:Nitrik Oksit Sentaz
Noxa	:Bcl-2 Etkileşimli Ölüm İnhibitörü
P21	:Hücre Döngüsü İnhibitörü
p53	:Tümör Baskılayıcı Protein
PALB2	:BRCA2 ile Etkileşimli Protein
pan-PI3K	:PI3K İzomerlerini Hedefleyen
PARP1	:Poli(Adenozin Fosfat-Riboz) Polimeraz-1
PBS	:Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PI3K	:Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIK3CA	:Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Ünitesi Alfa
PR	:Progesteron Reseptör
PTEN	:Fosfataz Ve Tensin Homologu
Puma	:p53 ile Düzenlenen Apoptoz Protein
PVDF	:Poliviniliden Florid
QTL	:Kantitatif Özellik Lokusu
RAS	:Rat Sarkoma Viral Onkogeni
RIPA	:Radyo İmmünopresipitasyon Assay
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	:Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI-1640	:Roswell Park Memorial Institute
RTK	:Reseptör Tirozin Kinazlar
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SERD	:Selektif Östrojen Reseptör Downregülatörleri

SERM	:Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri
sit-c	:Sitoplazmik Fraksiyon
SRB	:Sülforodamin B
t-Bid	:Kırılmış Bid
TBS:	:Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBS-T	:Tween 20 İçeren Tris- Tamponlu Tuz Çözeltisi
TEMED	:N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TMD	:Transmembran Domain
TNBC	:Triple Negatif Meme Kanseri
TNF	:Tümör Nekroz Faktörü
TNM	:Tümör, Nodül, Metastaz
TPA	:2-O-Tetradekanoylphorbol-13-Asetat
TRADD	:TNF reseptör-ilişkili ölüm domain protein

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünyada ikinci en sık görülen ve kadınlarda en yüksek mortaliteye sahip olan kanser türüdür. Türkiye'de kanser tanısı konulan her 10 kadından neredeyse 5'i meme kanseridir. Meme kanserinde erken teşhis ve iyileştirilmiş tedaviler sayesinde meme kanseri ölüm oranı azalmakta ve çoğu hasta için hayatta kalma oranı yükselmektedir. Fakat tedavide kullanılan ilaçların yüksek maliyeti, olumsuz yan etkileri ve ilaca karşı direnç oluşması gibi nedenlerden dolayı alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücre ölümünden kaçış, tümör hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biridir ve Bcl-2 (B hücresi lenfoma 2) protein ailesinin üyelerinin düzensizliği ile yakından ilişkilidir. Bcl-2 gen ailesi üyesi olan Mcl-1(Miyeloid Hücreli Lösemi-1) hücrelerin yaşam döngüsü ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerinde rol oynayan önemli bir genidir. AZD5991 bir Mcl-1 inhibitörüdür, doğrudan Mcl-1'e bağlanır ve Bak'a (Bcl-2-Antagonisti) bağımlı mitokondriyal apoptotik yolu aktive eder. Kanser hücrelerinde özellikle de miyelom ve akut miyeloid lösemilerde hızlı apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bazı kurubaklagillerde bulunan ve bir izoflavon olan Genistein ise, farklı kanser tiplerinde, hücre bölünmesinin kontrolü, apoptotik hücre ölümü, hücre göçü, invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi hücresel olayları kontrol eden potansiyel kemoterapötik bir ajandır. Östrojene yapısal benzerliğinden dolayı östrojenik reseptörleri bağlama yeteneğine sahiptir.

Literatürde meme kanserinde Mcl-1 inhibitörü AZD5991 için yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar da östrojen bağımlı meme kanseri hücre hatlarında AZD5991 ile benzer yollaklarda etki gösteren genisteinin de hücre ölümü gibi süreçleri kontrol ettiği bildirilmiştir. Mcl-1 inhibitörü AZD5991 ile genisteinin kombinasyon terapisinin sinerjik etki gösterebileceğini düşünmekteyiz. Bu doğrultuda çalışmamızda insan meme kanseri MCF-7 (Michigan Kanser Vakfı -7) hücre hattında Mcl-1 inhibitörü AZD5991 ile genisteinin kombinasyon terapisinin hücresel süreçler, apoptoz ve protein düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasını hedefledik. MCF-7 hücrelerinde AZD5991 ile genisteinin sitotoksik etkisi ve kombinasyon terapisinin sitotoksik etkisi

apoptoz üzerine olan etkileri ve protein seviyesindeki etkileri kontrol gruplarıyla karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Literatürde meme kanseri hücre hatlarında Mcl-1 inhibitörü AZD5991'in kullanılmasına yönelik ve genistein ile kombinasyon terapisinin sonuçlarını içeren bildirilmiş bir çalışma olmaması bu çalışmayı özgün kılmaktadır.

1.1. Amaçlar

Bu tez çalışmasının amacı, Mcl-1 inhibitörü AZD5991 ile potansiyel kemoterapötik bir ajan olan genisteinin kombinasyon terapisinin insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kanserler arasında dünyada en sık görülen ikinci kanserdir (Kolak ve ark., 2017).

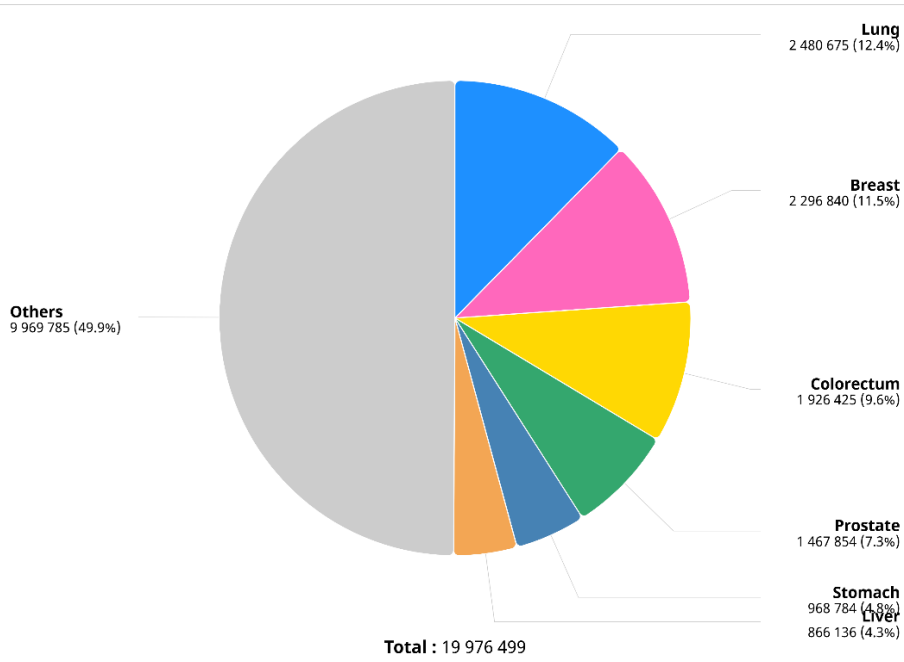
Meme kanseri, çeşitli iç ve dış faktörlerin bir sonucu olarak gelişir ve ortaya çıkar. Kötü yaşam tarzı, çevresel faktörler ve sosyal-psikolojik faktörlerin hepsi meme kanseri oluşumunda etkilidir. Meme kanserlerinin %5-10'unun genetik mutasyonlara ve aile öyküsüne, %20-30'unun ise değiştirilebilir faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir (Obeagu EI ve ark., 2024).

2.1.1. Meme kanserinin epidemiyolojisi

Meme kanseri, 2020'de 2,26 milyon yeni vaka ile dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir (Lukasiewicz ve ark.,2021).

Dünya sağlık örgütünün GLOBOCAN (Uluslararası Kanser Ajansı) 2022 verilerine göre 19976499 yeni vakanın %11,5'i meme kanseri vakasıdır (Şekil 2.1). Türkiye'de ise meme kanseri, Sağlık Bakanlığı'nın 2022 yılı istatistiklerine göre, görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 48,6 oranı ile kadınlarda ilk sıradadır (Türkiye Sağlık Bakanlığı 2022 kanser istatistikleri).

Dünya genelinde meme kanseri insidansı yıllar içinde artmasına karşın; sevindirici bir gelişme olarak, 1990'lı yıllardan sonra meme kanserine bağlı ölümlerde azalma gözlemlenmektedir (Garbiec ve ark.,2022). Bu olumlu gelişmenin, erken teşhis yöntemlerinin ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi, kanser tarama programlarının yaygınlaştırılması ve toplumda kanser konusunda bilincin artması gibi faktörlere bağlı olarak ortaya çıktığı söylenebilmektedir (Ekimci Deniz ve ark.,2023).



Şekil 2.1. GLOBOCAN 2022 verilerine göre meme kanserinin dünya çapında görülme sıklığı.

2.1.2. Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanseri insidansı, diğer malignitelerle kıyaslandığında daha erken yaşlarda artış gösterir. Bu yaşa özgü insidans oranlarındaki erken yükseliş, meme dokusunun ergenlikten menopoza kadar aktif olan over kaynaklı hormonlara duyarlılığıyla ilişkilendirilmektedir (Sancho ve ark., 2022). Bunun yanı sıra, meme kanserine ilişkin iyi tanımlanmış pek çok risk faktörü bulunmaktadır.

Meme kanserinin oluşumunda hormonal, genetik, biyokimyasal, psikolojik ve çevresel olmak üzere pek çok değiştirilebilir ya da değiştirilemeyen risk faktörü etkilidir. Değiştirilemeyen risk faktörlerinin, vakaların %30-40'ından sorumlu olduğu söylenebilir. Değiştirilebilir çevresel faktörlerin ise, %60-70'lik orana sahip olduğu görülmektedir. Diyet, bu faktörler arasında en önemlilerindedir. Diyetel faktörlerin meme kanseri riskini azaltıcı etkisinin %30-35'lere ulaştığı kabul edilmektedir.

Meme kanserinin değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri Tablo 2.1.'de verilmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021 ve Açıkgöz ve ark., 2017).

Tablo 2.1. Meme kanserinin değiştirilebilir ve değiştirilemeyen risk faktörleri.

Değiştirilemeyen Faktörler	Değiştirilebilir Faktörler
Kadın cinsiyeti	Hormon replasman tedavisi
Yaşlılık	Dietilstilbestrol
Aile öyküsü (meme veya yumurtalık kanseri)	Fiziksel aktivite
Genetik mutasyonlar	Aşırı kilo/obezite
İrk/etnik köken	Alkol alımı
Hamilelik ve emzirme	Sigara içmek
Adet dönemi ve menopoz	Yetersiz vitamin takviyesi
Meme dokusunun yoğunluğu	Yapay ışığa aşırı maruz kalma
Daha önce meme kanseri öyküsü	İşlenmiş gıda alımı
Kanserli olmayan meme hastalıkları	Kimyasallara maruz kalma
Önceki radyasyon tedavisi	Diğer ilaçlar

2.1.3. Meme kanseri sınıflandırması

Meme kanseri, geleneksel olarak mikroskopik değerlendirme ile sınıflandırılmakta olup bu yöntem, hücrelerin morfolojik özelliklerine (boyut, şekil, dizilim) dayanır. Ayrıca tümörün geliştiği anatomik bölge de sınıflandırmada önemli bir ölçüttür. Bu bağlamda, tümörün yalnızca epitel dokuyla mı sınırlı olduğu yoksa çevre dokulara mı yayıldığı ve kaynağının süt kanalı mı yoksa süt bezi mi olduğu sorularının yanıtlanması tanı açaşından kritik öneme sahiptir (Makki ve ark.,2015).

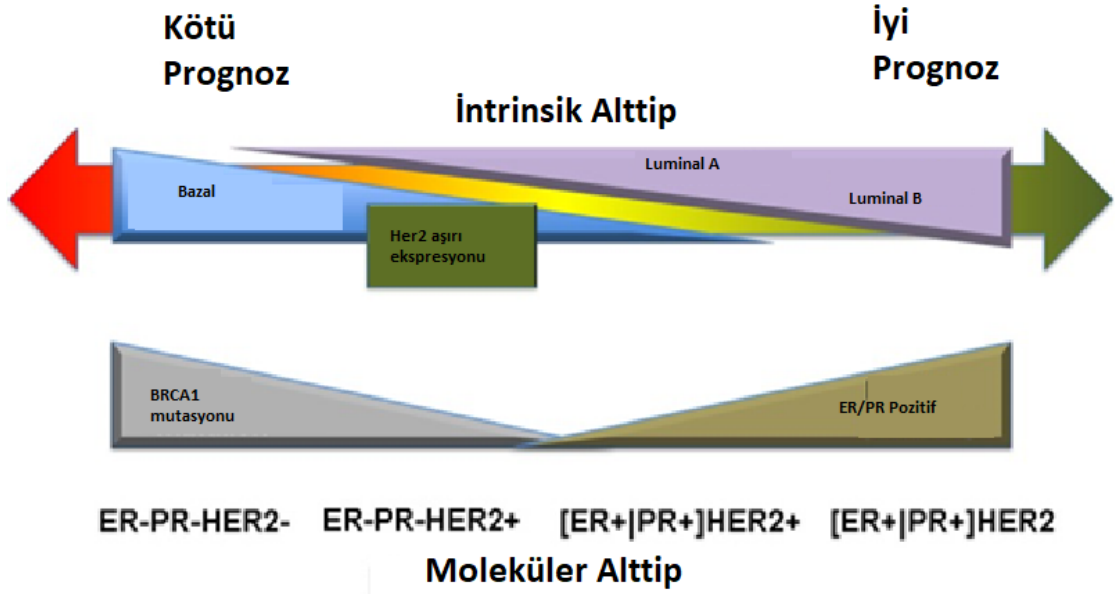
Tümör süt kanallarından kaynaklanıyorsa “duktal”, süt bezlerinden gelişmişse “lobüler” olarak adlandırılır. Nadir durumlarda bağ dokusunda da tümör oluşumu gözlenebilir (Nascimento ve ark., 2020).

Yayılım durumuna göre meme kanseri iki gruba ayrılır:

- In situ meme kanseri, sınırlı kalmış ve çevre dokulara yayılmamış formdur.
- İnvaziv meme kanseri ise çevre meme dokusuna yayılım gösteren türdür.

Meme kanseri tipleri arasında en yaygın olanı, yaklaşık %70 oranla invaziv duktal karsinom, NOS (özel tip tanımlanmamış) olup; onu yaklaşık %10 sıklıkla invaziv lobüler karsinom izlemektedir. Daha nadir görülen özel histolojik alt tipler arasında tübüler, müsinöz, kribriform ve papiller karsinomlar yer almakta olup, bu alt tipler genellikle daha iyi prognozla ilişkilidir. Medüller ve müsinöz karsinom yaklaşık %5 oranında görülürken, tübüler karsinom %1–5 aralığında değişen sıklıkla rapor edilmektedir. Diğer mikroskopik alt tipler ise oldukça nadirdir (DeSantis ve ark.,2019).

Meme kanseri gen ekspresyon profillerine göre de 5 alt gruba ayrılır. Sınıflandırma yapılırken, ER (Östrojen reseptör), ER düzenleyici genleri ve normal lüminal epitel hücrelerinde ifade edilen genlerin ifadesi, ErbB2 (Reseptör Protein Tirozin Kinaz 2) / HER-2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2) amplifikasyonunu ve aşırı ifadesi, ER, PR (Progesteron Reseptör) ve HER-2 negatif ve normal meme bazal ve / miyoepitelyal hücrelerinde ifade edilen genlerin ifadesi değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda Meme kanseri luminal, insan epidermal büyüme faktörü pozitif (HER2 +), bazal-benzeri, kludin düşük ve normal benzeri olmak üzere alttiplere ayrılmıştır (Şekil 2.2) (Eliyatkin ve ark., 2015). Bu tür sınıflandırmanın altında yatan mantık, kanser alt tipleri arasındaki gen ekspresyon modellerinin altında yatan farklılıkların, tümörlerin moleküler düzeydeki temel farklılıklarını yansıtmasıdır (Dai ve ark., 2015)



Şekil 2.2. Meme kanseri alt tipleri (Dai ve ark., 2015 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).

Meme kanserlerinin yaklaşık %75’inde ER ve/veya PR pozitifdir. Lümen epitel hücrelerinin tipik proteinlerini kodlayan çeşitli genleri eksprese eder, bu nedenle bu alt tip lümen grubu olarak adlandırılır. Bu grup meme kanserleri luminal A ve luminal B olmak üzere ikiye ayrılır.

Luminal A: Tüm meme kanserlerinin %50-60’ını oluşturan en yaygın alt tiptir. Bu tümörler sıklıkla düşük histolojik dereceye sahiptirler, iyi prognozludur ve nüks oranı diğer alt tiplere göre düşüktür. Negatif HER2 ve düşük Ki67 (proliferasyon hücre nükleer antijeni) indeksine sahip ER-pozitif ve/veya PR-pozitif tümörler olarak tanımlanır. Luminal tümörler hormon tedavisine iyi yanıt verirken geleneksel kemoterapiye zayıf yanıt verir (Sert ve ark., 2022 Ve Dai ve ark.,2015)

Luminal B: Meme kanserlerinin %10-20’sini oluşturur. İmmünohistokimyasal açıdan ER+, HER2- ve Ki-67 yüksek veya ER+ ve HER2+ tümörlerdir. Luminal A alt tipine kıyasla daha yüksek bir nüks oranına, relaps sonrası daha düşük hayatta kalma oranlarına, agresif bir fenotipe, daha yüksek histolojik dereceye, proliferatif indekse ve daha kötü prognoza sahiptir. Tedavi yaklaşımında kemoterapi ve hormonal tedavi yer almaktadır (Sert ve ark., 2022)

HER2-pozitif meme kanseri: Meme kanserinin %15-20’sini oluşturur. ER ve PR ifadesi yoktur, HER2 ifadesi ise yüksektir. Anti-HER2 tedavisine yanıt verdiği için başarı oranı yüksektir (Sert ve ark., 2022)

Bazal benzeri: Vücudun diğer bölgelerindeki bazal epitel hücrelerinin ve normal meme miyoepitelyal hücrelerinin ifade profillerini taklit eden ifade profillerine sahip ER-PR-HER2- (üçlü negatif) tümörlerden oluşur. Tüm meme kanserlerinin %15-20'sini üçlü negatif vakaların ise %60 ila %90'ını oluşturur. BRCA1 (Meme kanseri 1) gen mutasyonu olan kadınlarda daha sık görülmektedir. Bu grup tümörler en agresif gruplardandır ve kötü prognoza sahiptir. Bu alt tip kemoterapiye iyi yanıt vermektedir (Sert ve ark., 2022 Ve Dai ve ark.,2015)

Klaudin düşük: Meme kanserlerinin %12- 14'ünü oluşturmaktadır. Klaudin-3, -4, -7, Okcludin ve E-kaderin gibi hücreler arası yapışmada rol oynayan genlerin düşük ekspresyonu ile karakterizedir. Kötü bir prognoza sahiptir (Sert ve ark., 2022)

Normal meme benzeri: Bu tümörler meme karsinomlarının %5-10'unu oluşturmaktadır ancak bu alt grubu tanımlamanın önemi ve sonuçları açık değildir, çünkü düşük tümör hücresi içeriğine ve daha normal doku bileşenlerine sahip örnekleri temsil ediyor gibi görünmektedir. Bu tür moleküler alt tipler, çok sayıda içsel genin farklılaştırılması ve hastaların transkripsiyon açısından farklı gruplara ayrılmak üzere hiyerarşik bir düzende kümelenmesiyle oluşturulmuştur (Eliyatkin ve ark., 2015 ve Sert, ve ark., 2022)

2.1.4. Meme kanseri evrelemesi

Meme tümörlerinin sınıflandırılmasında kullanılan TNM (Tümör, Nodül, Metastaz) evreleme sistemi, ilk olarak 1942 yılında Pierre Denoix tarafından geliştirilmiştir. Bu evreleme, hastalığın yaygınlığını değerlendirmenin yanı sıra uygun tedavi stratejilerinin belirlenmesine, hastaların prognozlarının öngörülmesine ve tedavi yöntemlerinin karşılaştırılmasına olanak sağlar. Bu sistem, tümörün üç ana morfolojik özelliğine dayanır:

- T (Primer tümör boyutu):

Tümörün invaziv kısmı temel alınarak milimetre cinsinden ölçülür. Ölçümde fizik muayene, mamografi, ultrason, MRI gibi klinik yöntemler ve patolojik değerlendirmeler kullanılır.

- N (Bölgesel lenf nodu tutulumu):

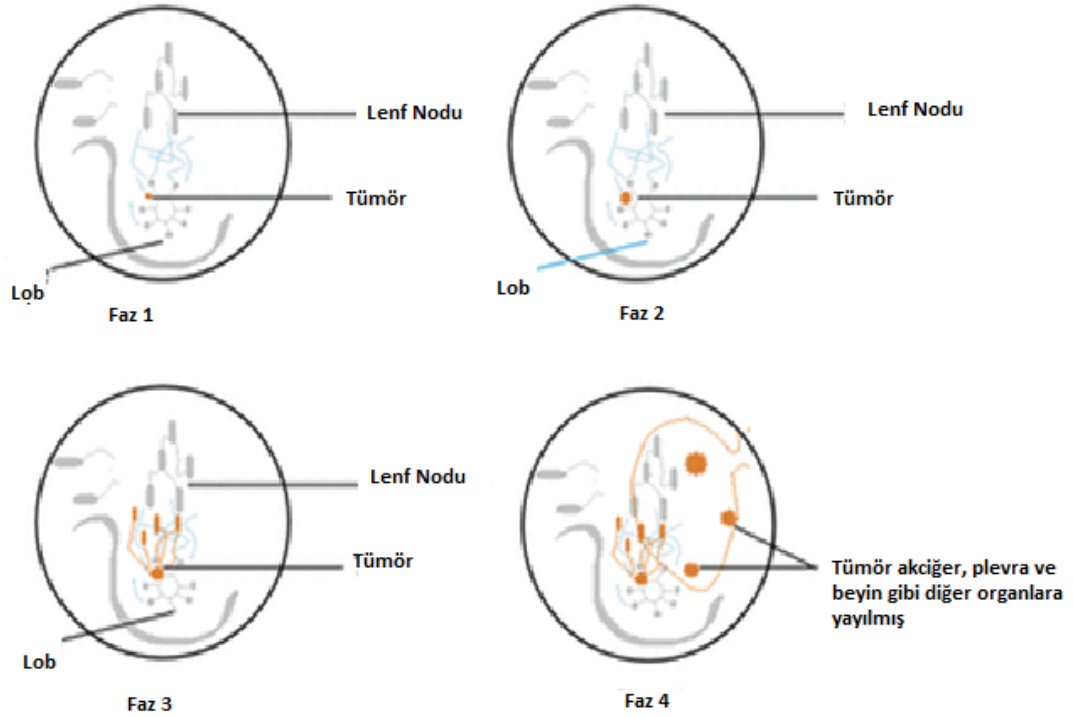
Lenf nodu tutulumu klinik ve patolojik verilerle değerlendirilir. Klinik sınıflandırmada görüntüleme, fizik muayene ve gerekirse iğne biyopsileri kullanılır. Makrometastaz saptanması N pozitifliği için belirleyicidir.

- M (Uzak metastaz varlığı):

M evresi; hastanın öyküsü, fizik muayenesi ve görüntüleme bulgularıyla değerlendirilir. Eğer hasta neoadjuvan tedavi alıyorsa, metastaz durumu tedavi öncesi belirlenen klinik verilerle esas alınır (Memişoğlu ve ark.,2020).

Meme kanseri tanısı konulduktan sonra hasta klinik olarak evrelendirilir. Tümör çapı, aksiller lenf nodları ve uzak organ metastazı yönünden değerlendirilir. Tedavi hastalığın evresine göre planlanır (Utkan ve ark.,2018)

Meme kanserinin evreleri tümörün boyutuna ve türüne ve tümör hücrelerinin meme dokularına ne kadar nüfuz ettiğine bağlıdır



Şekil 2.3. Meme kanseri evreleri (Tungsukruthai ve ark.,2018 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).

Evre 0: Tümörün büyümeye başladığı meme bölümünün sınırları içerisinde hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelerin bulunduğunu ve bu bölümün çevre dokularında invazyonlarına dair hiçbir kanıt bulunmadığını gösteren, tümörün invaziv olmayan aşamasıdır. Duktal ve lobüler karsinoma in-situ tümörler bu evrede değerlendirilir.

Evre 1: Bu evre invaziv meme karsinomu olarak tanımlanır ve bu evrede mikroskopik invazyon mümkündür. 1A ve 1B evresi olmak üzere iki kategorisi vardır. 1A kategorisi, 2 cm'ye kadar ölçülen ve lenf düğümlerinin hiçbirinin dahil olmadığı tümörü tanımlarken, 1B evresi, lenf düğümünde bulunan 0,2 mm'den büyük küçük kanser hücresi grubunu tanımlar.

Evre 2: 2A ve 2B olmak üzere iki kategorisi vardır. Kanser çapı 2 cm'den küçüktür ve bazı aksiller lenf düğümlerinde de bulunabilir.

Evre 3: Üç alt kategoriye ayrılmıştır, bunlar 3A, 3B ve 3C'dir. Bunlar arasında evre 3A, memede tümör bulunmadığını ancak 4-9 aksiller lenf düğümünde veya sentinel lenf düğümlerinde bulunabildiğini belirtirken, evre 3B, tümörün herhangi bir boyutta olabileceğini ancak memenin derisinde şişlik veya ülser oluşturabileceğini ve 9 aksiller lenf düğümüne veya sentinel lenf düğümlerine yayılabileceğini belirtir. Evre 3B, memenin kırmızı, sıcak ve şişmiş derisini içeren inflamatuvar meme kanseri olarak düşünülebilir. Bununla birlikte, evre 3C, tümörün 10'a kadar veya 10'dan fazla aksiller lenf düğümüne yayıldığını ve ayrıca köprücük kemiğinin üstündeki ve altındaki lenf düğümlerini de içerdiğini belirtir.

Evre 4: Bu, kanser hastalığının ileri ve metastatik aşamasıdır ve bu aşama, akciğerler, kemikler, karaciğer, beyin vb. gibi vücudun diğer organlarına yayılmayı ifade eder (Akram ve ark.,2017).

2.1.5. Meme kanserinin moleküler mekanizması

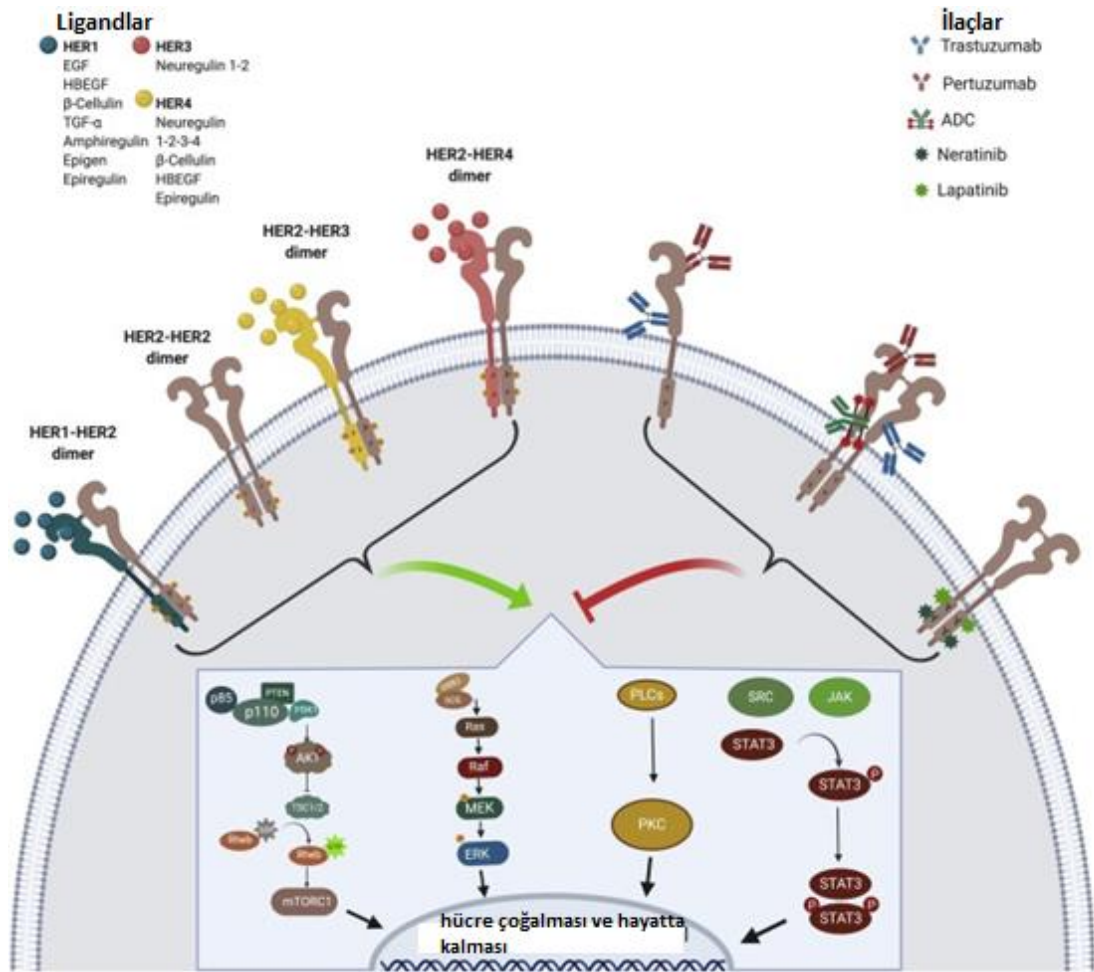
Kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını, bölünmesini, hücre ölümünü, hücre farklılaşmasını, göç mekanizmasını kontrol eden sinyal yollarında epigenetik ve genetik değişiklikler meydana gelmektedir. Normal meme bezi gelişimi ve meme kanseri kök hücre fonksiyonlarını düzenleyen çeşitli sinyal yollarında, HER2 sinyalizasyonunda ve östrojen reseptör sinyalizasyonunda meydana gelen mutasyonlarının da meme kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Sert ve ark.,2022)

Normalden kanserli fenotiplere ve birincil meme kanserinden metastatik meme kanserine dönüşüm, somatik mutasyonlar olarak bilinen genetik değişikliklerin birikimiyle gerçekleşir (Nathanson ve ark.,2022) Meme kanseri 1, 2 (BRCA1, BRCA2), kontrol noktası kinaz 2 (CHEK2), ATM serin/treonin kinaz (ATM) ve BRCA2'nin

partneri ve lokalizatörü (PALB2) gibi genlerin mutasyonu meme kanseri riskini artırır (Tungsukruthai ve ark.,2018). Kanser hücrelerinin metastaz yapma yeteneği ise, birden fazla genin koordineli ifadesini gerektirir ve metastazın verimliliği, bir özelliği etkileyen birden fazla niceliksel özellik lokusu (QTL) aleli ve çevresel faktörlerle birlikte katkıda bulunur. Kanser bağlamında, mitokondriler, ilk olarak Warburg tarafından metabolizmadaki rolleriyle ilgili olarak tanımlanan temel oyunculardır ancak mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) kanser fenotiplerine katkıda bulunduğu kesin mekanizmalar yeterince incelenmemiştir. mtDNA QTL, kanser şiddetini ve metastazı düzenlemek için nükleer ve mitokondriyal olarak kodlanmış genleri birleştirir (Nathanson ve ark.,2022).

Kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ından sorumlu olan kanserin ayırt edici özelliklerinden biri metastazdır. Metastaz, kanser hücrelerinin orijinal tümörlerinden yakındaki dokulara veya diğer organlara yayılmasını tanımlar. Meme kanseri olan tüm hastaların %10-15'inde, birincil tümörün gelişmesinden sonraki 3 yıl içinde tümörün diğer organlara yayılmasına yol açan agresif bir hastalık vardır Metastaz, integrinler gibi hücrel yapışma proteinleri aracılığıyla hücrenin ECM'ye (Hücre dışı matriks) olan bağlantısının bozulmasıyla başlar ve kanser hücrelerinin bitişik hücrelerden ve bazal membrandan ayrılmasına yol açar. Bu gelişmiş invaziv yeteneğe sahip hücreler, ECM'yi parçalamak ve bir invazyon yolu sağlamak için salgılanan proteolitik enzimlerin yardımıyla çevredeki dokuyu istila etmeye başlar (Tungsukruthai ve ark.,2018).

HER2, meme karsinomlarının yaklaşık %15'inde HER2 aşırı ekspresyonuna yol açarak çoğalır. Bu mekanizma bir yandan kötü bir prognoz sağlarken (hücre çoğalması, göçü, invazyonu ve sağkalımı üzerindeki etkisi nedeniyle, hepsi kanser belirtileridir), diğer yandan monoklonal antikor trastuzumab ile hedefli bir tedavi yaklaşımı kullanma olanağı sunar; bu antikor HER2'nin hücre dışı alanını hedef alarak normal tirozin kinaz sinyallemesini değiştirir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. HER2 aşağı akış yolu aktivasyonu ve anti-HER2 hedefli ajanlar (Marchiò ve ark.,2021 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).

PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz) yolu, katalitik alt birimler p110 α (PIK3CA) ve p110 β (PIK3CB) (Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Ünitesi Alfa, Beta) ile düzenleyici alt birim PI3K, p85 α (PIK3R1) kodlayan genlerin mutasyonları veya amplifikasyonları nedeniyle meme kanserinde birçok değişikliğe uğrar. İnsan neoplazmalarında, PIK3CA, PI3K yolunun p110 α katalitik alt birimini kodlayan sıklıkla mutasyona uğrayan genlerdir ve baş ve boyun, servikal, gastrik, akciğer ve meme kanserlerinde çoğaldığı bulunmuştur. Prostat, meme, endometrium ve kolon kanserlerinde, en yüksek PIK3CA mutasyon insidansı tespit edilmiştir (Miricescu ve ark.,2021)

Somatik mutasyonlar (yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar, PTEN (Fosfataz Ve Tensin Homologu) geninde monoallelik veya biallelik delesyon), epigenetik değişiklikler (metilasyon promotörü), PTEN protein degradasyonu ve PTEN proteininin translyasyon sonrası modifikasyonu PTEN inaktivasyonuna yol açacaktır. Meme

tümörlerinde, PTEN lokusunda heterozigotluğun kaybı vakaların %40-50'sinde tespit edilmiştir. PTEN mutasyonları nedeniyle PTEN fonksiyonunun kaybı meme kanserlerinin %5-10'unda bulunmuştur (Miricescu ve ark.,2021).

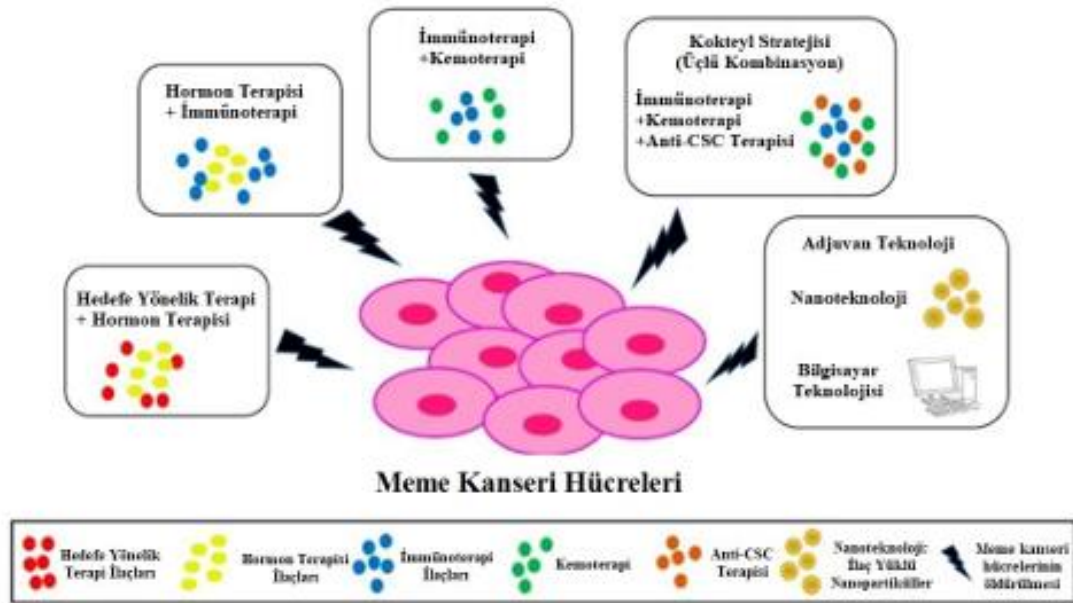
Meme kanseri vakalarının yaklaşık %70'i ER pozitifdir ve endokrin tedavisi ile tedavi edilir. Mutasyonlar veya amplifikasyonlar yoluyla RTK'lerin (Reseptör Tirozin Kinazlar) (HER2, IGFR1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri), FGFR (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri), EGFR(Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri)) anormal aktivasyonu, PI3K ve MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinaz) sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. NF1 (Nörofibromin 1) fonksiyon kaybı mutasyonları, hem PI3K hem de MAPK yollarının aşağı akış aktivasyonuna yol açan sürekli olarak aktif RAS (Rat Sarkoma Viral Onkogeni) ile sonuçlanır. PI3K ve MAPK yollarının aktivasyonu, ER fosforilasyonunu ve ligandan bağımsız aktivasyonu indükler ve bu da endokrin tedaviyle östrojen blokajına rağmen ER tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonuna yol açar. RTK'lerin yukarı akış aktivasyonunu (FGFR inhibisyonu) veya PI3K yolunun (AKT inhibisyonu) ve MAPK yolunun (ERK (Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyen Kinaz) inhibisyonu) aşağı akış onkojenik proteinlerini hedeflemek, antiöstrojen tedavisiyle birleştirildiğinde sekonder endokrin direncin üstesinden gelme potansiyeline sahip terapötik seçenekler sunar (Raheem ve ark.,2023).

2.1.6. Meme kanseri tanı ve tedavi

Meme kanseri hastalarında klinik öykü, kanser riskini değerlendirmek ve meme hastalığına işaret eden belirtilerin varlığını ya da yokluğunu ortaya koymak amacıyla incelenir.

Meme kanseri genellikle tarama veya tanı muayenesini gerektiren bir semptom (örneğin, ağrı veya elle tutulabilen bir kitle) yoluyla teşhis edilir. Sağlıklı kadınların taranması, daha küçük, daha düşük metastaz olasılığı olan, meme koruyucu ve sınırlı aksiller cerrahiye daha uygun olan ve kemoterapi gerektirme olasılığı daha düşük olan tümörlerin tespiti ile ilişkilidir. Meme kanserine özgü ölüm oranını azalttığı kanıtlanmış tek tarama yöntemi mamografidir. Tarama mamografisi meme kanseri ölüm oranında %19'luk bir genel azalmaya yol açar. Mamografi 40'lı yaşlardaki kadınlar için daha az fayda sağlarken (%15) 60'lı yaşlardaki kadınlar için daha fazla fayda sağladığı bilinmektedir (%32) (McDonald ve ark.,2016).

Meme kanserinin tedavisinde, radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavisi ve immünoterapi gibi çeşitli tedavi yaklaşımları mevcuttur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Meme kanserinde kullanılan tedaviler (Wang ve ark.,2022 makalesinden alıntılanıp Türkçeleştirilmiştir).

Günümüzde meme kanserini tedavi etmek için endokrin tedaviler, sitotoksik kemoterapiler ve hedefli tedaviler dahil olmak üzere çeşitli tedaviler kullanılmaktadır. Şekil 2.5'te farklı meme kanseri tedavi tiplerinin şematik bir gösterimi verilmiştir. Çok çeşitli tedaviler geliştirilmiş olsa da genel sağ kalım oranı düşük kalmaya devam etmektedir ve üçlü negatif meme kanseri gibi bazı meme kanseri tiplerinin tedavisi özellikle zordur. Monoterapiler (hedefli tedavi, hormon tedavisi, immünoterapi veya kemoterapi gibi) bazı meme kanseri hastalarını tedavi etmede iyi bir etkinliğe sahip olmasına rağmen, bazen etkinlikleri zamanla zayıflayabilir ve bazı hastalar tedaviye direnç geliştirebilir. Monoterapilerin kullanıldığı bazı hastalar, özellikle metastatik meme kanseri olanlar, tedaviye iyi yanıt vermemektedir (Wang ve ark.,2022)

2.1.6.1. Hormon tedavisi/ Endokrin tedavisi:

Hormonal tedavinin amacı östrojenler ile neoplastik hücreleri uyaran östrojene bağlı yollar arasındaki etkileşimi önlemektir. Bu östrojen üretimini engelleyerek (cerrahi (ooferektomi), radyolojik, kimyasal (LH-RH analogları), aromataz inhibitörleri) veya östrojenlerin tümör hücreleri üzerindeki etkisini engelleyerek (SERM'ler (Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri) ve SERD'ler (Selektif Östrojen Reseptör Downregülatörleri)

(örneğin, Tamoksifen, Toremifen, Raloksifen, Fulvestrant)) gerçekleştirilebilir (Drăgănescu ve ark.,2017).

2.1.6.2. Hedefli terapiler:

Hedefli tedaviler içinde, PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri ve AMPK (AMP-aktive protein kinaz) aktivatörleri (mTOR yolunu inhibe edenler), PARP (Poli(Adenozin Fosfat-Riboz) Polimeraz-1) inhibitörleri (Olaparib, Talazoparib, Veliparib, Iniparib), mTOR (Rapamisinin Memeli Hedefi) inhibitörleri (Everolimus), pan-PI3K (PI3K İzomerlerini Hedefleyen) inhibitörleri (örn. Buparlisib, Alpelisib, Pictilisib, Taselisib), CDK4/6 (Siklin bağımlı kinaz 4 ve 6) inhibitörleri (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib) ve diğer tümör spesifik moleküler hedef ilaçlar (örn. Deubiquitinazlar) ve mikroRNA'lar yer alır (Wang ve ark.,2022). Meme kanserlerinin yaklaşık %15 ila %20'si ERBB2'nin aşırı ekspresyonunu içerir. Bu kanserlerin prognozu zayıftır; ancak, bir yıl boyunca her üç haftada bir uygulanan trastuzumab ile birlikte kemoterapi ile sonuçlar iyileştirilir. Bir yıldan uzun süreli tedavi ile uzun vadeli, hastalıksız sağ kalımda artış olmaz (Trayes ve ark.,2021).

2.1.6.3. İmmünoterapiler:

İmmünoterapi hastanın kendi bağışıklık sistemi yoluyla anormal hücreleri yok etmek için bir stratejidir ve tümör büyümesinin baskılanmasına yol açar. İmmünoterapiler arasında bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, T hücresi transfer tedavisi, monoklonal antikolar, tedavi aşılı ve bağışıklık sistemi modülatörleri bulunur. Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, kontrol noktası proteinlerinin ortak proteinlerine bağlanmasını engellemek için deneylerde kullanılmış ve bunun sonucunda T hücresi yanıtının aktive olması ve ardından kanser hücrelerinin öldürülmesi sağlanmıştır (Wang ve ark.,2022).

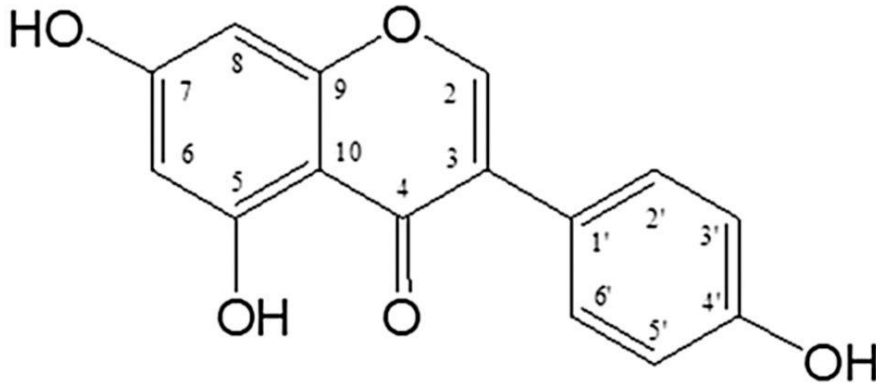
Hastalığı tedavi etmek için iki veya daha fazla etkenin kullanıldığı tedavilere kombinasyon terapisi adı verilmektedir. Şu anda klinikte ve klinik çalışmalarda çeşitli kombinasyon terapisi türleri kullanılmaktadır. Ayrıca, nanoteknoloji, DNA dizileme teknolojileri ve hesaplamalı analiz gibi destekleyici veriler, farklı kombinasyon yaklaşımlarını optimize etmek için kullanılabilir. Amaç, birden fazla yolu hedefleyerek hasta sonuçlarını iyileştirmek ve yan etkileri ve direnç gelişimini azaltmaktır (Wang ve ark.,2022).

Endokrin tedavi etkili olsa da bazı hastalarda direnç gelişebilir. Bu nedenle, endokrin tedaviyle birlikte moleküler hedefli tedavinin kullanımı araştırılmaktadır.

Bitki özlerinin antikanser aktivitesinin taranması 1961 yılında ABD'deki Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından başlatılmıştır. 1981 yılına kadar yaklaşık 1.14.045 bitki taranmış olup, bunlardan sadece %3,4'ünün (yaklaşık 3400 farklı türü temsil etmektedir) bir veya daha fazla biyolojik sistemde aktif olduğu gözlemlenmişti (Akram ve ark.,2017).

2.1.7. Genistein

Genistein (5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil) kromen-4-on), özellikle soya fasulyesi ve soya proteininde bulunan bir izoflavondur. Genistein aynı zamanda fitoöstrojen olarak da bilinir çünkü yapısı insan östrojenine çok benzer. İnsan vücudunda iki ana östrojen reseptörü bulunur: ER α (östrojen reseptörü alfa) ve ER β (östrojen reseptörü beta). Normal östrojenler, daha baskın olarak ER α üzerinden etkilerini gösterirler. Genistein ise, doğal östrojenlere göre daha düşük bağlanma gücüne sahiptir ve ER β 'ya bağlanmaktadır. Bu durumdan dolayı da genistein, doğal SERM olarak düşünülmektedir. Dahası genisteinin, SERM olarak kullanılan ilaçlardan biri olan raloksifen ile ER'ye neredeyse aynı şekilde bağlandığı gösterilmiştir (Garbiec ve ark.,2022 ve Selvakumar ve ark.,2020).



Şekil 2.6. Genisteinin kimyasal yapısı (Spagnuolo ve ark. 2015).

Genistein'in meme, akciğer, karaciğer, prostat, pankreas, deri, servikal, kemik, uterin, kolon, böbrek, mesane, nöroblastom, mide, yemek borusu, hipofiz, tükürük bezi, testis gibi çeşitli insan kanseri türlerine karşı prelinik etkili olduğu kanıtlanmıştır (Sharifi-Rad ve ark.,2021).

Genistein'in ana moleküler hedefleri arasında Bcl-2, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax), nükleer faktör- κ B (NF- κ B), NF- κ B inhibitörü, fosfoinositid 3, -kinaz/Akt (PI3K/Akt), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK 1/2), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve inflamasyon ve hücre ölümü gibi süreçleri kontrol eden kaspazlar gibi sinyal yolları da bulunur (H. S. Tuli ve ark.,2019). Bunun yanı sıra meme kanserinin oluşumunda etkisi olan östrojen reseptörlerine karşı antagonistik aktivite de göstermektedir. Aynı zamanda diğer kemoterapötiklerle karşılaştırıldığında düşük toksisiteye de sahip olduğu için antikanser tedavisi için umut vadeden önemli bir aday haline gelmiştir. Fakat genistein çeşitli dezavantajlara da sahiptir. Bunlar arasında oral uygulamada çok yetersiz kalması, hızlı şekilde metabolizmadan atılması, kanser hücrelerini hedeflemede yetersiz kalması ve suda düşük çözünme oranının bulunması gelmektedir (Garbiec ve ark.,2022).

Genistein, östrojen reseptörleri ile olan inhibitör ya da stimülatör etkileşimler süresince hücre büyümesini düzenler. MCF-7 hücrelerinde Genisteinin bifazik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir: Genistein hücre büyümesi üzerinde, doza bağımlı agonistik ve antagonistik etki göstermektedir; düşük konsantrasyonlarda östrojen benzeri proliferatif etki gösterirken (nanomolar düzeyinde), daha yüksek konsantrasyonlarda (mikromolar düzeyinde) hücre döngüsünü G2/M fazında bloke ederek hücre büyümesini durdurarak anti-proliferatif etki göstermektedir (Shim ve ark.,2007).

2.1.8. AZD5991

AZD5991, Mcl-1 için seçici olan, yüksek derecede güçlü aktiviteye sahip bir makrosiklik moleküldür ve mitokondriye bağımlı bir şekilde hareket ettiği rapor edilmiştir, yüksek oranda Mcl-1'e özgüdür. AZD5991, ligand bağlama cebinde doğrudan Mcl-1'e bağlanır ve Bak'a bağlı bir mekanizma aracılığıyla kaspaz-3/7 aktivasyonunu ve hücre ölümünü indükler ve hücrelerde Mcl-1 seviyelerini azaltır (Wei ve ark.,2020).

2.2. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, yaşam boyunca hücresel homeostazın korunmasında kilit bir rol oynayan, yaşlanan, aşırı veya erken dönüştürülmüş hücrelerin kontrollü olarak ortadan kaldırılmasını ve hayati hücrelerin hayatta kalmasını düzenleyen,

evrimsel olarak korunan ve sıkı bir şekilde düzenlenen bir süreçtir (Wei ve ark.,2020). Bcl-2 protein ailesinin üyelerinin düzensizliği tümör hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biri olan hücre ölümünden kaçış ile yakından bağlantılıdır (Bolomsky ve ark.,2020). En az bir Bcl-2 homoloji (BH) alanını paylaşan Bcl-2 protein ailesinin üyeleri, apoptozu düzenler (Wei ve ark.,2020). Bcl-2 proteinleri, homeostazisin kontrolü için gerekli olan programlanmış hücre ölümünün bir formu olan apoptozu modüle eder ve çoğu üyede mevcut olan Bcl-2 homoloji alanlarının ve bir karboksi- terminal transmembran alanının (TMD) varlığı ile karakterize edilir. Protein homoloji çalışmaları, Bcl-2 protein ailesinin hücre ölümünün düzenlenmesinde ve özellikle mitokondriyal dış membran geçirgenliğinde (MOMP) birincil işlevine dair kanıt sağlamıştır. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Mcl-1, ilk olarak forbol ester (TPA) maruziyeti sonrasında insan miyeloblastik lösemi (ML-1) hücrelerinde ekspresyonu artan erken yanıt genlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Bu durumda Mcl-1 artışı, ML-1 hücrelerinin monositlere veya makrofajlara farklılaşmasını tetiklemiştir ancak Mcl-1 aşağı regülasyonu apoptozu indüklemiştir. Böylece Mcl-1'in hücrenin hayatta kalmasında rol oynadığı ortaya konulmuştur (Sancho ve ark.,2022). Mcl-1'in aşırı ekspresyonu, tedavi direnci ve kötü prognoz ile ilişkilidir; bu nedenle, Mcl-1 inhibitörleri, Mcl-1'e bağlı maligniteler için rasyonel terapötik seçeneklerdir (Wei ve ark.,2020). Klinik öncesi çalışmalar Mcl-1'i meme kanserinde ilgili bir hedef olarak doğrulamış olsa da, birçok normal hücre tipinde Mcl-1'in gerekliliği, Mcl-1 hedefleyen ilaçların dikkatli bir şekilde uygulanmasını gerektirebilir. Tümöre özgü hücre ölümüne ulaşmak için Mcl-1 inhibisyonu, geleneksel sitotoksik ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının etkisini artırmak için kullanılacak bir kombinasyon terapisi olarak çalışabilir (Winder ve ark.,2022).

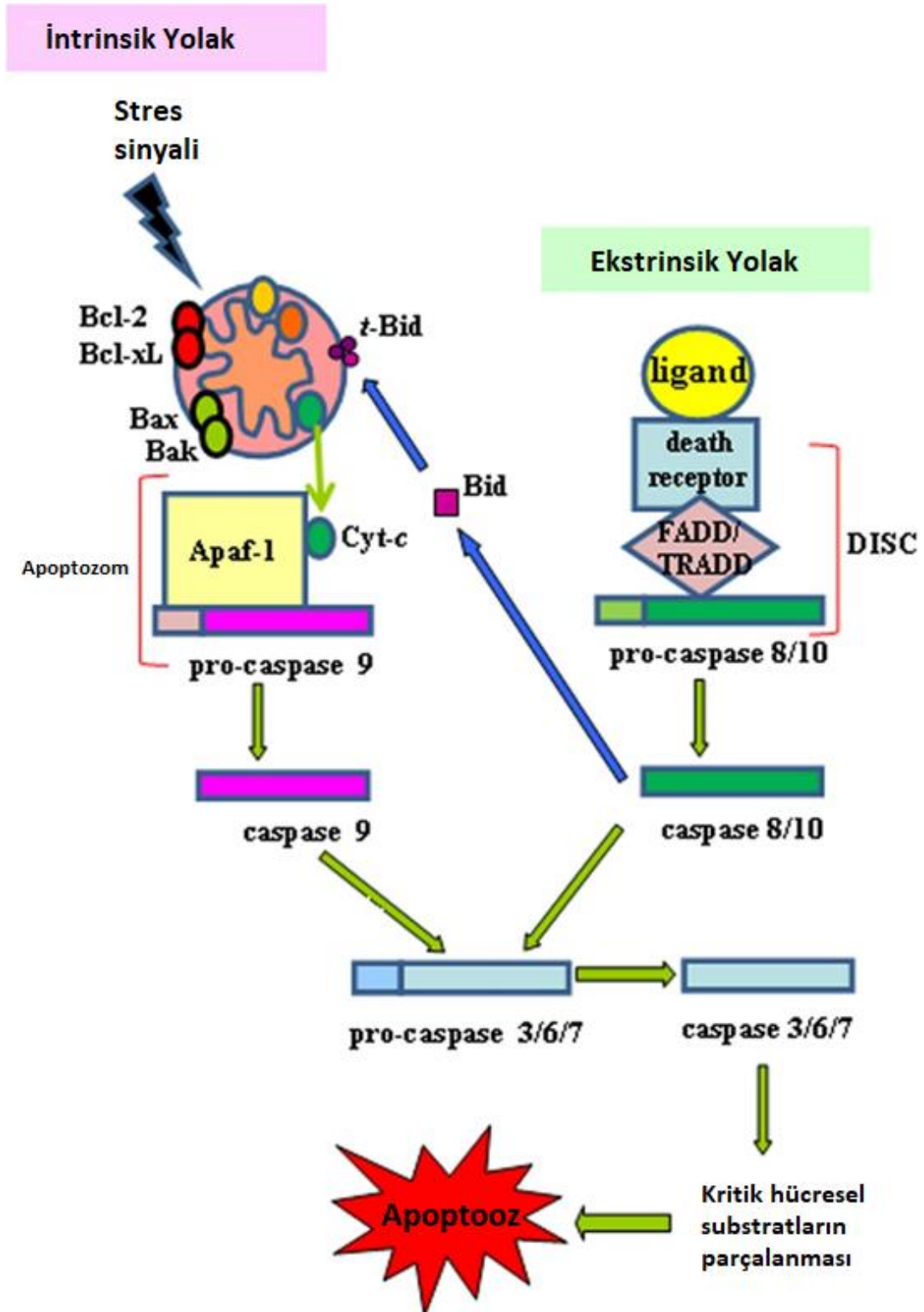
2.2.1. Apoptozun moleküler mekanizması

Apoptozis mekanizmaları son derece karmaşık ve gelişmiştir ve enerji bağımlı bir moleküler olaylar dizisini içerir. Apoptozun uyarılmasında ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı yolak) ve intrinsik yolak (mitokondri aracılı yolak) olmak üzere iki ana yolak bulunmaktadır (Elmore ve ark.,2007). Ancak artık bu iki yolun bağlantılı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Ayrıca T hücreleri aracılı sitotoksikite ve perforin-granzim bağımlı hücre öldürülmesini içeren ek bir yol daha vardır. Perforin/granzim yolu, granzim B veya granzim A yoluyla apoptozu

indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzyme B aracılı apoptoz yolları, ortak bir terminal yolakta birleşerek hücre ölümünü sağlar. Bu yol, kaspaz-3'ün kesilmesiyle başlatılır ve DNA parçalanması, sitoskeletal ve nükleer proteinlerin parçalanması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alınmasıyla sonuçlanır. Granzim A yolu, tek zincirli DNA hasarı yoluyla paralel, kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm yolunu aktive eder (Elmore ve ark.,2007).

2.2.1.1 Ekstrinsik (hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile apoptotik) yolak:

Ekstrinsik apoptotik yol (ölüm reseptörü aracılı), hücre yüzeyindeki TNF (Tümör Nekroz Faktörü) reseptör süper ailesine ait ölüm reseptörlerinin, ilgili ligandlarla etkileşimi sonucu aktive olur. Bu reseptörler, hücre içi “ölüm alanı” içerir ve ligand bağlanması sonrası konformasyonel değişiklik geçirerek adaptör proteinler (FADD (FAS Adaptör Proteini İle İlişkili Ölüm Alanı), TRADD (TNF reseptör-ilişkili ölüm domain protein)) aracılığıyla DISC (ölüm indükleyici sinyalleme kompleksi) oluşumuna yol açar. DISC, başlatıcı kaspaz-8 ve/veya -10'un oto-aktivasyonunu sağlar. Aktive olan bu kaspazlar, yürütücü kaspazlar olan kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive ederek apoptozu başlatır. Bazı hücrelerde ise kaspaz-8, t-Bid (kırpılmış Bid) aracılığıyla mitokondriyal geçirgenliği değiştirerek içsel yola da katkı sağlar; bu durum, ekstrinsik ve intrinsik yolların birleştiği önemli bir noktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Apoptozisin ekstrinsik ve intrinsik yollarına genel bakış (Pistritto ve ark.,2016).

2.2.1.2. İntrinsik (mitokondriyal apoptotik) yolak:

Hücre içi stres faktörlerine—örneğin DNA hasarı, hipoksi, kemoterapi, yüksek sitozolik kalsiyum düzeyleri ve oksidatif stres—yanıt olarak aktive edilir. Bu süreçte,

proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bax ve Bak'ın aktivasyonu, antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) inhibisyonuna neden olur. Bu durum, mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin artmasına ve sitokrom c gibi apoptojenik proteinlerin sitozole salınmasına yol açar. Sitokrom c, Apaf-1 (Apoptozis proteaz aktivasyon faktörü-1) ile kompleks oluşturarak apoptozomun meydana gelmesini sağlar. Bu yapı, başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu tetikler ve akabinde yürütücü kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) aktive edilerek hücrenin programlı ölüm süreci tamamlanır (Pistritto ve ark.,2016).

Mitokondriyal apoptotik yol, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Bu aile, hücrenel yaşam ve ölüm arasındaki dengeyi kontrol eden hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyelerden oluşur. Anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w ve BFL-1/A1 (Bcl-2 ailesi proteinleri)), dış mitokondriyal membranın geçirgenliğini engelleyerek hücreyi apoptozdan korurken; pro-apoptotik üyeler (Bax, Bak ve BH3-only proteinler: Bid (BH3 İle Etkileşime Giren Domain Ölüm Agonisti), Bim (Bcl-2 etkileşimli mediatör), Bad (Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü), Puma (p53 ile Düzenlenen Apoptoz Protein), Bmf (Bcl-2 modifiye faktör)) mitokondriyal dış membran geçirgenliğini artırarak apoptozun başlatılmasında rol oynar.

Bcl-2 ailesinin yalnızca proapoptotik BH3 üyelerinin (Bax, Bak) aktivasyonu, antiapoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'i nötralize ederek, mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin bozulmasına yol açar ve sitokrom c gibi apoptojenik faktörlerin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Sitokrom c, sitozolik Apaf-1 ile bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur. Bu kompleks, başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar ve ardından yürütücü kaspazlar-3, -6 ve -7'nin aktive olmasıyla hücrenel yapıların yıkımı ve apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Bcl-2 ailesi bu süreçte bir "apoptotik anahtar" olarak görev yapar ve mitokondri aracılı hücre ölümünün önemli düzenleyicilerindendir (Pistritto ve ark.,2016, Letai ve ark.,2017, Ouyang ve ark.,2012 ve Kari ve ark., 2022)

2.2.1.3. Perforin/Granzim yolu

T hücresi aracılı sitotoksikite, duyarlılaştırılmış CD8+ (Sitotoksik T lenfositleri) hücrelerinin antijen taşıyan hücreleri öldürdüğü tip IV aşırı duyarlılığın bir çeşididir. Bu sitotoksik T lenfositler, dışsal yol aracılığıyla hedef hücreleri öldürebilir ve FasL/FasR (Fas Ligand / Fas Receptor) etkileşimi, CTL (sitotoksik T lenfositler) ile uyarılan apoptozisin baskın yöntemidir. Bununla birlikte, sitotoksik etkilerini, transmembran

gözenek oluşturan molekül perforinin salgılanmasını ve ardından gözenek yoluyla hedef hücreye sitoplazmik granüllerin ekzofitik salınmasını içeren yeni bir yol aracılığıyla tümör hücreleri ve virüsle enfekte hücreler üzerinde de uygulayabilirler. Serin proteazlar granzim A ve granzim B, granüller içindeki en önemli bileşendir.

Granzim B, aspartat kalıntılarındaki proteinleri kesecek ve dolayısıyla prokaspaz-10'u aktive edecek ve ICAD (Kaspaz Aktifleştirilmiş DNAz İnhibitörü) gibi faktörleri kesebilecektir. Ayrıca raporlar, granzim B'nin Bid'in spesifik kesilmesi ve sitokrom c salınımının indüklenmesi yoluyla ölüm sinyalinin amplifikasyonu için mitokondriyal yolu kullanabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, granzim B doğrudan kaspaz-3'ü de aktive edebilir. Bu şekilde, yukarı akış sinyal yolları atlatılır ve apoptozis yürütme fazının doğrudan indüklenmesi sağlanır (Elmore ve ark.,2007)

2.2.2. Antiapoptotik ve apoptotik genler

Mcl-1'in meme kanseri oluşumuna ve terapötik yanıtta katkısı hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, diğer Bcl-2 aile üyelerinin aksine, Mcl-1 kısa bir yarı ömre sahiptir ve çeşitli onkojenik sinyal yolları tarafından transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası, translasyonel ve translasyon sonrası düzeylerde yüksek oranda düzenlenir. Mitogen aktive protein kinaz yolu, mTOR yolu ve PI3K yolu dahil bu onkojenik sinyal yolları, hücre sağ kalımını desteklemek için Mcl-1'i hızla artırır ve Mcl-1'in meme kanserleri de dahil olmak üzere birçok kanserde apoptotik kaçış ve terapötik direncin önemli bir aracı olabileceğini düşündürmektedir.

Mcl-1, insan meme kanseri hücre hatlarının % 28'inde genetik veya mRNA yukarı düzenlemesine sahiptir. Ek olarak, insan meme kanseri örneklerinde Mcl-1 ekspresyonu, alt tipten bağımsız olarak yüksek tümör derecesi ve hasta sağ kalımında dramatik bir azalma ile ilişkilidir. Mcl-1 ayrıca, lüminal B meme kanserlerinin %9'unda ve neoadjuvan kemoterapilerle tedaviden sonra TNBC'lerin (Triple Negatif Meme Kanseri) % 54'ünde genetik olarak çoğaltılır, bu da Mcl-1'in bazı meme kanserlerinde Bcl-2/Bcl-xL'ye göre daha arzu edilen bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Mcl-1'i hedeflemenin meme kanseri hastalarının, özellikle Mcl-1 amplifikasyonu olanların sonuçlarını iyileştirmede faydalı olabileceğini ileri sürülmektedir (Williams ve ark., 2015)

Bax, programlanmış hücre ölümünü düzenleyen Bcl-2 gen ailesinin proapoptotik bir üyesidir. Bax proteini, bazıları Bax-Bcl-2 heterodimerlerinin oluşumu için gerekli olan Bcl-2 ile oldukça korunmuş alanları paylaşır. Bax ekspresyonu, apoptotik

uyarılarından sonra belirli dokularda yükselir ve doğrudan p53 (Tümör Baskılayıcı Protein) tarafından düzenlenebilir (Brady ve ark.,1998). Ölüm sinyali mitokondrideki inaktif Bax'ın aktivite kazanmasına yol açar ve Bax mitokondri dış membranına girer. Böylece mitokondri dış membranı geçirgen bir yapı kazanır. Bu geçirgenlik sit-c'yi de kapsayan diğer intermembran boşluk proteinlerinin salınmasına ve ayrıca ROS (Reaktif Oksijen Türleri) üretimine yol açar. Bax proteininin aşırı üretimine bağlı olarak, Bax dimerleri kendi aralarında dimerize olurlar ve Bax/Bax homodimerleri meydana getirirler. Bax'ın aktifleşmesiyle beraber apoptotik yolaklar uyarılır (Perego ve ark., 1996)

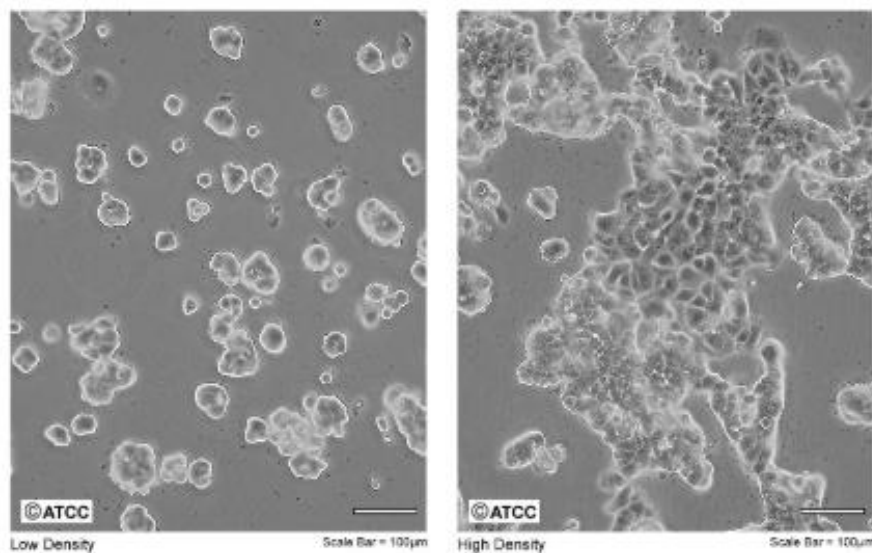
p53 hem pro-sağkalım hem de pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini modüle ettiği için önemli bir rol oynar. Bcl-2 ailesi genlerinin önemli bir alt kümesi olan Bax, Noxa, Puma ve Bid dahil olmak üzere p53 hedefleridir. p53, proapoptotik Bcl-xL'nin yanı sıra proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleriyle etkileşime girerek sitokrom-c salınımını ve prokaspaz-3 aktivasyonunu ortaya çıkaran proapoptotik efektörler Bax/Bak'ın salınmasına neden olur doğrudan mitokondriye etki ederek transkripsiyondan bağımsız bir şekilde apoptoz indüksiyonuna da katılır (Pistritto ve ark.,2016). Tümör hücreleri, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu yoluyla veya Bax gibi pro-apoptotik proteinleri azaltarak veya mutasyona uğratarak apoptoza direnç geliştirebilir. Hem Bcl-2 hem de Bax ekspresyonunun düzenlenmesinin p53 tümör baskılayıcı geni tarafından kontrol edildiği görülmektedir, çünkü bu gen sitokrom c ve diğer apoptojenik proteinlerin salınımı için gerekli olan mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişiklikleri baskılayabilir veya destekleyebilir (Calaf ve ark.,2024).

Hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki dengenin bozulması, tümör oluşumunun temel nedenlerinden biridir. Siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinden biri olan p21, hücre döngüsü düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. p21'in, başta beyin, akciğer ve kolon tümörlerinde olmak üzere, tümör baskılayıcı bir protein olarak görev yaptığı ve p53 aracılığıyla tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bazı kanser türlerinde p21 ekspresyonundaki değişikliklerin tümör gelişimiyle ilişkisiz olduğu, bazı tümörlerde ise bunun aksine bir rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, p21'in yalnızca p53'e bağımlı olarak değil, p53'ten bağımsız yollarla da uyarılabildiği ve TGF- β gibi büyüme faktörlerine yanıt vererek apoptoz ve hücre döngüsü durması gibi süreçlerde rol aldığı saptanmıştır. Bu bağlamda p21, hem tümör baskılanmasında hem de kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmektedir (Shamloo ve ark., 2019).

Apoptoz, nükleer büzülme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir. Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c içerir. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol oynar. PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren bölgesinden, kaspaz-3 tarafından yarıklanması sonucunda 24 ve 89 kDa'luk iki adet parça oluşur ve bu nedenle cPARP (Parçalanmış poli(ADP-riboz) polimeraz) apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Ordueri ve ark.,2018). PARP-1, apoptoz ve nekroz dahil olmak üzere hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. PARP-1'in aşırı aktivitesi, apoptoz süreci için gerekli olan NAD⁺ (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) ve ATP tedarikini azaltır. PARP-1 inhibisyonu, apoptoz ile hücre ölümüne yol açar (Beauchamp ve ark.,2009).

2.2.3. MCF-7 hücre hattı

MCF-7 hücre soyu, 1970 yılında 69 yaşında Frances Mallon adlı bir hastanın metastatik dokusundan elde edilen meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücreleri adherent özellikler göstermektedir. Bu hücrelerin östrojen ve progesteron reseptörleri vardır. Ayrıca luminal epitel fenotipi gösterir ve invaziv meme duktal karsinomu özelliğindedir (Soule ve ark.,1973). Çalışmamızda, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücreleri kullanılacaktır.



Şekil 2.8. MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüsü.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda verilen Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Laboratuvarında kullanılan cihazlar.

Cihazlar	Model/marka
CO2'li İnkübatör	Nuaire
İnvert mikroskop	Olympus EP50
Dikey elektroforez sistemi ve transfer sistemi	Biorad Mini-Protean Wetern Blot sistemi
Florasan özellikli mikroskop	Olympus CKX-41
Biyo güvenlik kabini	Laboard Class II Biological safety Cabinet
Mikroplaka okuyucu	Glomax Multi Detection System (Promega)
Mikrosantrifüj cihazı	Hettich Zentrifugen Micro 200R
Spektrofotometre	Thermo
Ultrasantrifüj cihazı	Beckman Coulter Optima MAX-XP Ultracentrifuge
Su banyosu	Nuve NB-20 cihazı
Hassas terazi	Precisa
Vorteks	Biosan

Tablo 3.1. Laboratuvarında kullanılan cihazlar (Devam).

Cihazlar	Model/marka
Çalkalayıcı	Thermo Scientific
Hücre sayım cihazı	RWD C100-SE
PH metre	İnolab - PH 7110
Termal ısı bloğu	Boeco
Real time PCR cihazı	Labcycler
Termal cyler PCR cihazı	Sensequest

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemeler aşağıda verilen Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Laboratuvarında kullanılan sarf malzemeler.

Malzemeler	Model/Marka
Hücre üreme flaskları (T25 ve T75)	SPL
1000 µl pipet ucu	Isolab
200 µl pipet ucu	Isolab
10 µl pipet ucu	Isolab
Hücre kryo (dondurma) tüpleri	Biosharp
1,5 ml'lik steril eppendorf	Isolab
15 ml'lik steril falkon tüpler	SPL
96 kuyulu mikrolaka	Nest-701001
6 kuyucuklu plak	SPL
5ml ve 10 ml serolojik pipet	Axycell 326-001
PVDF Membran	Ecotech
96 kuyulu PCR mikrolaka	Nest-701001

3.1.3. Kullanılan kimyasallar ve kitler

Bu çalışmada hücre kültüründe kullanılan kimyasallar Tablo 3.3.' de ve Western Blot için Kullanılan Kimyasallar Tablo 3.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Hücre kültürü için kullanılan kimyasal malzemeler.

Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Malzemeler	
Malzeme	Marka
Besiyeri (RPMI-1640)	Gibco
Trypsin-EDTA	Capricorn
Penisilin/Streptomisin	Gibco
FBS	Capricorn
Trypan Blue Solüsyonu	Gibco
DMSO	Bio Basic

Tablo 3.4. Western Blot için Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Western Blotta Kullanılan Kimyasal Malzemeler	
Malzeme	Marka
Proteaz İnhibitörü	Roche
RIPA Buffer	ClearBand
BSA	Carlo Erba
Bradford Reagent	BioShop
4X Laemmli Tamponu	Ecotech
protein marker	Genaxxon
%5'lik yağsız süt tozu	BioShop
APS	Serva
TEMED	BioShop

Tablo 3.4. Western Blot için Kullanılan Kimyasal Malzemeler (Devam)

Western Blotta Kullanılan Kimyasal Malzemeler	Marka
Akrilamid/ Bisakrilamid	Bio Basic
2- Propanol	Merc Millopore
Metanol	Supelco
Ponceau Red	Eco tech
Tris	Amresco
Glisin	BioShop
SDS	Bio Basic
NaCl	Supelco
ECL	BioRad
Tween-20	BBI

3.1.4. Çalışmada kullanılan kitler, ilaçlar ve inhibitörler

Bu çalışmada kullanılan kitler, ilaçlar ve inhibitörler aşağıda verilen Tablo3.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan kitler, ilaçlar ve inhibitörler.

Kit Adı/İlaç Adı	Marka
SRB kit	Canvax CA050
JC-1 mitokondri membran potansiyel kiti	ThermoFisher, Cat.No: T3168
cDNA Sentez Kiti	Biorad
Realtime PCR kiti	Biorad
AZD5991	CAYMAN/28926/1MG
Genistein	CAYMAN/ 446-72-0

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler aşağıda verilen Tablo 3.6.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılan primerler.

Oligonükleotit Adı	Baz Dizisi (5'-3')
<i>GAPDH</i> Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
<i>GAPDH</i> Reverse	GGGGTCGTTGATGGCAACA
<i>Bax</i> Forward	CGGCGAATTGGAGATGAACTGG
<i>Bax</i> Reverse	CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC
<i>Bcl2</i> Forward	ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC
<i>Bcl2</i> Reverse	AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC
<i>Cas9</i> Forward	GTTTGAGGACCTTCGACCAG
<i>Cas9</i> Reverse	CAACGTACCAGGAGCCACTC
<i>Cas8</i> Forward	AGAAGAGGGTCATCCTGGGA
<i>Cas8</i> Reverse	TCAGGACTTCCTTCAAGGCT
<i>P21</i> Forward	AGTATGCCGTCGTCTGTTCG
<i>P21</i> Reverse	GAGTGCAAGACAGCGACAAG

3.1.5. Çalışmada kullanılan antikorlar

Bu çalışmada kullanılan antikorlar aşağıda verilen Tablo 3.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan antikorlar.

Antikor adı	Marka
Mcl1	ProteinTECH PTG 66026
Bax	ProteinTECH PTG 60267
Parp1	Cloud-Clone Corp. PAA279Mu01
P21	Agilent Dako
P53	Agilent Dako
Gapdh	ProteinTECH PTG 60004
Mouse Secondary Antibody	ProteinTECH SA00001
Rabbit Secondary Antibody	Cell Signalling Technology

3.1.6. Çalışmada kullanılan stok solüsyonlar ve tamponlar

1X PBS tamponu

Aşağıda miktarları ile verilen kimyasallar 800 ml dH₂O içerisinde çözdürüldükten sonra pH:7,4'e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav ile sterilizasyonu sağlanan tampon gerektiğinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na₂HPO₄	1,44 g
KH₂PO₄	0,24

Hücre dondurma ortamı

MCF-7 hücrelerinin daha sonra kullanılmak amacıyla dondurulması işlemi için dondurma solüsyonu %90 FBS (Fetal Sığır Serum) ile %10 DMSO (Dimetilsülfoksit) kullanılarak hazırlanmış ve hazırlanan solüsyon -20 °C'de saklanmıştır.

1,5 M Tris-HCl

9,08 g Tris 30 ml distile su ile çözülmüş, pH 8,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 50 ml'ye tamamlanmıştır.

0,5 M Tris-HCl

3,02 g Tris 30 ml distile su ile çözülmüş, pH 6,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 50 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 APS

0,1 g APS (Amonyum persülfat) 1 ml distile su ile çözdürülmüştür.

SDS poliakrilamid jel

Aşağıda verilen bileşenlerden belirtilen miktarda tartılarak 2 adet jel hazırlanmıştır.

	%10'luk Seperating (ayırma) jel	%4'lük Stacking (yükleme) Jel
Su	6,15 ml	3,05 ml
Tris-HCl	3,75 ml (pH: 8.8 – 1,5 M)	1,25 ml (pH: 6.8 – 0,5 M)
SDS	150 µl (%10'luk)	50 µl (%10'luk)
APS	75 µl (%10'luk)	25 µl (%10'luk)
TEMED	7,5 µl	5 µl
Akrilamid/ Bisakrilamid	5 ml (%30'luk)	850 µl (%30'luk)

1X Tris-Glisin-SDS yürütme tamponu

Aşağıda verilen bileşenlerden belirtilen miktarlarda tartılarak hazırlanmıştır.

Tris (25 mM)	3,028 g
Glisin (190 mM)	14,26 g
SDS (%0,1)	1 g
dH₂O	1 L

1X transfer tamponu

Aşağıda verilen bileşenlerden belirtilen miktarda tartılarak hazırlanmıştır.

Tris (25 mM)	3,028 g
Glisin (190 mM)	14,26 g
dH₂O	1 L
Metanol	250 ml

%5 Süt

5 g yağsız süt, 100 ml TBS-Tween 20 (Tween 20 İçeren Tris- Tamponlu Tuz Çözeltisi) tamponu ile çözülmüştür.

20X TBS tamponu

22,115 g Tris-Baz ve 43,83 g NaCl (Sodyum Klorür) tartılarak 200 ml distile su ile çözüldükten sonra pH 7,6'ya ayarlanmış ve hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır.

1X TBS tamponu

20X TBS (Tamponlu Tuz Çözeltisi) tamponundan 50 ml alınıp, 950 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1X TBS-Tween 20 tamponu

20X TBS tamponundan 50 ml alınıp, 950 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır, 1 ml tween20 eklenmiştir.

SRB solüsyonu

SRB (Sülforodamin B) boyası 100 ml 1X yıkama solüsyonu ile çözülmüştür.

Genistein çözeltisi

1 mM ana stok için 1 mg genistein etken maddesi tartılmış ve 3,701 ml DMSO ile çözülmüştür.

AZD5991 çözeltisi

1 mM ana stok için 1 mg AZD5991 etken maddesi tartılmış ve 1,4874 µl DMSO ile çözülmüştür.

3.2. Yöntemler

3. 2. 1. İnsan meme kanseri hücre hattının (MCF-7) hücre kültürü

Tez kapsamında MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı özellikleri Tablo: 3.8’de özetlenmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmaları laminer hava akış steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücrelerinin büyütülmesi 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin içinde tutulduğu besiyeri olarak %10 FBS içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri kullanılmıştır.

Tablo 3.8. MCF-7 hücre hattı özellikleri.

Organizma	İnsan
Doku	Meme
Morfoloji	Epitel
Büyüme Özellikleri	Adherent
Hastalık	Adenokarsinom
Yaş	69
Cinsiyet	Kadın
Ürün formatı	Dondurulmuş

Hücre hattının (MCF-7) açılması

- Cryotüpteki hücreler -80°C’den alınarak elde ısıtılmış ve hızlıca çözülmesi sağlanmıştır.
- Çözülen hücreler, hücrelerin içinde bulunduğu DMSO’dan zarar görmesini engellemek adına hızlı bir şekilde üzerlerine besiyeri eklenerek falkon tüp içine alınmış ve sonrasında 5 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Bu işlem ile oluşan süpernatant kısım atılırken, pellet kısmına bir miktar tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır.

- Buradaki hücrelerin, hücre sayımı sonrası hücre yoğunlukları dikkate alınarak uygun boyutta görülen T25 ve T75'lik flasklara ekimleri yapılmış ve ardından hücreler gün gün hücre tutunma oranları mikroskop ile izlenerek, 2 ile 3 gün arası süre ile 37 °C'deki %5 CO₂'li nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
- Gözlem sonucu gerekli görüldüğünde besiyeri değiştirilmiştir.
- Hücre büyümesi ve tutunması %70 ile %80 arası yoğunluğa ulaştığı gözlemlendiğinde hücreler pasajlanmıştır

Hücrelerin pasajlanması

MCF-7 hücreleri 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde T-25 ve T-75 flasklarda, 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI besiyerinde çoğaltılmıştır.

- Hücre sayılarının artması sonucunda hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkayıp tripsin-EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit) (%0,25) ile CO₂ içeren etüvde 3 dakika bekletilmiştir.
- Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için flaska eşit miktarda besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve flask yüzeyinden ayrılan hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır.
- 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir.
- İyice pipetaj yapılarak homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu yeni flasklara ekilerek pasajlama işlemi tamamlanmıştır.

Hücre sayımı

Pasajı yapılan hücrelerin ekiminin yapılabilmesi için mililitrede bulunan hücre sayısının belirlenmesi, hücre kültürü ve sitotoksikite çalışmaları için önem arz etmektedir. Bu amaçla hücre sayımı için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

- Hücrelerin flask yüzeyinden tripsin ile kaldırma işlemi sonunda yapılan santrifüjden sonra süpernatant atılarak hücre yoğunluğuna göre 1-2 ml besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapılmıştır.
- Hücre süspansiyonundan 50 µl alınıp 50 µl trypan blue boyasıyla karıştırılmıştır.

- Thoma lamı üzerine lamel yerleştirildikten sonra lam üzerindeki çukurlara hücre ve trypan blue karışımından 10 µl aktararak inverted mikroskopta hücre sayımı yapılmıştır.

- Canlı hücre sayısının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Canlı hücre sayısı} = \text{Bir karedeki hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

Hücrelerin dondurulması

MCF-7 hücre hattının bir kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stok oluşturmak amacıyla dondurulmuştur.

- Hücrelerin dondurulması için %10 DMSO içeren RPMI1640 besiyeri hazırlanmıştır.

- Hücreler 15 ml' lik falkona alınmış ve 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine 1 ml hazırlanan besiyerinden (%90 RPMI + %10 DMSO) eklenerek cryotüpe alınmış ve -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2. Genistein ve AZD5991' in *in vitro* biyolojik etkinliğinin araştırılması

Sitotoksiste çalışmaları

Sitotoksitenin belirlenmesinde SRB yöntemi kullanılmıştır. SRB testi; ilaçlarla indüklenen sitotoksiste ve hücre proliferasyonunun belirlenmesi için geliştirilmiş bir testtir. Testin prensibi bir protein boyası olan SRB'nin, trikloroasetik asit veya asetik asit ile fikse edilen hücrelerde amino asit kalıntılarına elektrostatik ve pH-bağımlı olarak bağlanmasına dayanır.

SRB testi

- Hücreler büyüme ortamında 24h, 48h ve 72h boyunca ilaçlı olarak kültüre edilmiştir.

- Her kuyucuğa 100µl fiksatif reaktif eklenmiş,

- 1 saat boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir.

- 4 defa 200 µl distile veya de iyonize suyla hücreler yıkanmış, (Bu aşamada kağıt havlu ile fazla su giderilmiştir.)

- 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.

- Her kuyucu 100 µl sulphorhodamin B solüsyonu eklenmiş,
- Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika beklenmiştir.
- 4 defa 1X wash solution ile yıkanmıştır. (1 hacim 10X wash solution + 9 hacim distile su)
- Plate karanlıkta havada kurutulmuş,
- Her kuyucuğa 200 µl SRB solubilize tampon eklenmiştir.
- 5 dakika çalkalanmış,
- Mikroplaka okuyucuyla 550-580 nm'de OD okunmuştur.

Etkin dozun (IC50) belirlenmesi

- Literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda Genistein için 20 µM, 50 µM, 80 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM, 187 µM ve 220 µM dozları, AZD5991 için 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM ve 45 µM dozları SRB testi ile denenmiştir.
- Hücreler, 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Optimum sonuçlara 48 saatte ulaşılmıştır.
- Bileşiklerin uygulanan farklı konsantrasyonlarındaki etkileri değerlendirilerek test bileşiklerinin hücreler üzerine inhibe edici konsantrasyon 50 (IC50) değerleri hesaplanmıştır.

Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi için Tripın Mavisı Canlılık Testi uygulanarak hücre sağkalım deneyleri gerçekleştirilmiştir. 6- kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücreler yüzeye yapıştıktan sonra, genistein, AZD5991 ve bu iki maddenin kombinasyonu SRB testi ile belirlenen IC₅₀ değerlerinde uygulanmıştır. Ayrıca kontrol ve çözücü etkisini değerlendirmek amacıyla %1 DMSO içeren uygulamalar da deney gruplarına dahil edilmiştir. Bir kuyucuk kontrol grubu olarak bırakılmış ve besiyeri değiştirilmiştir. 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelere tripan blue canlılık testi yapılmıştır. Testin protokolüne göre boyayı içine almış mavi renkli hücreler ölü, boyayı içine almayan beyaz ve parlak görünen hücreler ise canlı hücreler olarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı canlı hücre sayısının total hücre sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Çalışma 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Canlı hücre sayısı=Bir karedeki hücre sayısı x Dilüsyon faktörü x 10⁴

Yara iyileşme (Wound healing) deneyi

Genistein ve AZD5991'in ve bunların kombine uygulamalarının MCF-7 hücrelerinde migrasyon üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmiştir.

- 6- kuyucuklu platelere 5x10⁵ hücre/ml hücre olacak şekilde ekimleri yapılan hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 24 saat sonunda hücre yoğunluğu yaklaşık olarak %80'e ulaşıncaya 200 µl'lik steril pipet ucuyla mikropalakalarda bulunan her bir kuyunun orta kısmına üstten başlanarak aşağı yöne doğru ince ve düz bir çizgi çekilerek hücrelerin arasında ince bir boşluk oluşturulmuştur.
- 0, 24, 48 ve 72 saatte yara genişlikleri Olympus EP50 mikroskopla ölçülmüş 0. Saat değerleri (Wo) ve ölçüm yapılan saat değerleri (Wt) kaydedilmiştir.
- Aşağıdaki formülle hücrelerin migrasyon yetenekleri hesaplanarak ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir.
- Ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$Wt \text{ migrasyon yeteneği} = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100$$

3.2.3. JC-1 mitokondiyal membran potansiyeli analizi ile apoptozun değerlendirilmesi

Mitokondri membran potansiyeli apoptozda önemli bir fonksiyona sahiptir. Mitokondri membran potansiyelinin azalması sonucunda mitokondri içerisinde bulunan sitokrom-c sitoplazmaya salınır ve kaspaz enzimlerini aktifleştirir. Bu durumda hücre ölümü gerçekleşir. JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine) mitokondriyal membran deneyi hücrelerin apoptotik durumlarının floresan-bazlı olarak takip edebilme imkanı sunar. Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerine AZD5991, genistein ve kombine uygulamalarından sonra apoptozun değerlendirilmesi JC-1 mitokondiyal membran potansiyeli analizi ile yapılmıştır.

- Bunun için öncelikle 5 mg/ml JC-1 boyasından 1µl alınıp 5ml PBS içerisinde çözdürülmüş ve üzerine 5 ml besiyeri eklenerek JC-1 çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
- 6'lık well platelere 3×10^4 hücre/well olarak ekilmiş ve AZD5991 ve genisteinin belirlenen dozlarıyla 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında besiyeri atılıp kuyulara 2,5 ml hazırlanan JC-1 solüsyonu eklenmiştir.
- 25 dk 37°C 'de inkübe edilmiştir.
- Sonrasında JC-1 solüsyonu atılıp kuyular 1 ml PBS ile yıkanmıştır.
- Kuyulara 1ml PBS eklenip floresan görüntü alınmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.4. Apoptotik gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi

Total RNA izolasyonu

- MCF-7 hücrelerine, genistein, AZD5991 ve Genistein+AZD5991 uygulanması sonucunda, *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21*, ve *Caspase-8* genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimleri incelemek için hücrelerden total RNA örnekleri trizol ile toplanmıştır.
- Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 500 µl trizol eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Ardından 200 µl kloroform eklenerek 15 sn vortex yapılmış ve 30°C 'de 2-3 dk inkübe edilmiştir.
- $+4^\circ\text{C}$ 'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazda oluşan RNA, ayrı bir ependorf tüpe alınmıştır.
- RNA örneklerinin üzerine 500 µl izopropanol eklenerek alt üst edilmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Daha sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de 12000 rpm de 10dk santrifüj yapılmıştır.
- Supernatant atılıp pellet 1ml %75 etanol ile yıkanmıştır.

- 7500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant atılmış ve alkol oda ısısında uçurulmuştur.
- Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz free su ile çözülerek RNA elde edilmiştir.
- 60 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra RNA'ların saflık seviyelerini tespit etmek için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Total RNA'nın cDNA'ya dönüşümü

- 8 µl 5X reaksiyon buffer, 2 µl iScript RT, 20 µl su bir tüpte karıştırılmıştır.
- 4 adet PCR tüpüne 7,5 µl olarak dağıtılıp üzerine 2,5 µl RNA örneklerinden ilave edilmiştir.
- Thermal cycler cihazında 25 °C'de 5 dk, 46 °C'de 20 dk ve 95 °C'de 1 dk olacak şekilde reaksiyona bırakılmıştır.
- cDNA'ya dönüşümü tamamlanan örnekler - 20 °C'de saklanmıştır.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Genistein, AZD5991 ve kombine ilaç uygulanan MCF-7 hücrelerinden izolasyonu yapılan RNA örnekleri Revers transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülmüş ve spesifik primerlerin varlığında her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile çoğaltılmıştır. *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21*, ve *Caspase-8* genlerinin ekspresyonları belirlenmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı her bir örnek için aşağıda verilen şekilde hazırlanmıştır.

SYBR Green Master Mix	5 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
cDNA örneği	1 µl
Nükleazsız su	3 µl

Reaksiyon döngüsü aşağıda verilen basamaklardan oluşmaktadır.

Aşama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dakika
40 döngü:		
Denatürasyon	95°C	15 saniye
Primer bağlanması ve uzaması	60°C	60 saniye

3.2.5. İmmünblotlama yöntemi

Protein izolasyonu

- Belirlenen IC50 değerlerinde konsantrasyonlarda AZD5991, genistein ve kombine dozu uygulanmış hücreler 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Kontrol grubu olarak uygulanacak flaska ilaç uygulanmamıştır.
- İnkübasyondan sonra flasklardan besiyerleri toplama tüpüne toplanıp santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır.
- Santrifüjle çöktürülen hücrelere RIPA (Radyo İmmünopresipitasyon Assay) lizis tamponu eklenerek 2 dk maksimum hızda vorteks yapıp, 10 dk buzda inkübe edilmiştir.
- Üç kez 2 dk maksimum hızda vorteks yapıp, 10 dk buzda inkübe edildikten sonra 1000'lik pipetle 30 kez pipetaj yapıp 15 dk buzda inkübe edilmiştir.
- İki kez 1000'lik pipetle 30 kez pipetaj yapıp 15 dk buzda inkübe edildikten sonra 200'lük pipetle 30 kez pipetaj yapıp 15 dk buzda inkübe edilmiştir.
- 2 dk maksimum hızda vorteks yapıp 10 dk buzda bekletildikten sonra +4 °C'de maksimum devirde 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası supernatant ayrı bir eppendorfa alınarak miktar tayini yapılmıştır.

Bradford protein miktar tayini

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu 250, 125, 50, 25 ve 10 µg/ ml olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur.

- RIPA lizis solüsyonu ile elde edilen protein örnekleri 1/1000 oranda dilüe edilmiş ve Bradford solüsyonu ile 1/5 oranında karıştırıldıktan sonra 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun sonunda 96 kuyulu well plate'e 3 tekrarlı olarak 200 µL dağıtılmıştır.
- 595 nm dalga boyunda Promega marka GLOMAX Multi detection sistemde ölçülerek BSA standart grafiğine bağlı olarak örneklerin mg/ml konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Western blot analizi

Western blot çalışmamızın aşamaları Biorad (Mini Protean) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- İzole edilen protein örneklerinden 50 µg olacak şekilde alınıp 4x laemmlı tamponu ile 3:1 oranında karıştırılarak 95 °C' de 5 dakika denatüre edilmiştir.
- %4 yükleme ve %10' luk ayırma jelleri hazırlanarak, proteinler bu jel sistemine yüklenerek 90 voltta 1,5 saat Tris-Glisin-SDS yürütme tamponunda yürütülmüştür.
- Elektroforez işleminin ardından ayrılan protein örnekleri daha önce belirtilen şekilde hazırlanan transfer tamponu içinde 4 °C'te 85 mAmp'de bir gece boyunca ıslak transfer yöntemi ile PVDF (Poliviniliden Florid) membrana transfer edilmiştir.
- PVDF membrana transfer olan protein örnekleri %5'lik yağsız süt tozu içeren TBS-T çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır.
- Bloking işleminin ardından protein örnekleri primer antikolar ile işaretlenmiş ve bir gece boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir.
- Gece boyunca primer antikorda bekletilen membranlar TBS-T ile yıkandıktan sonra seconder antikolarla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresi sonunda membranlar TBS-T ile yıkanmış ve ECL (Güçlendirilmiş Kemilüminesans) solüsyonu ile muamele edilerek aranan proteine ait ışımalar görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi

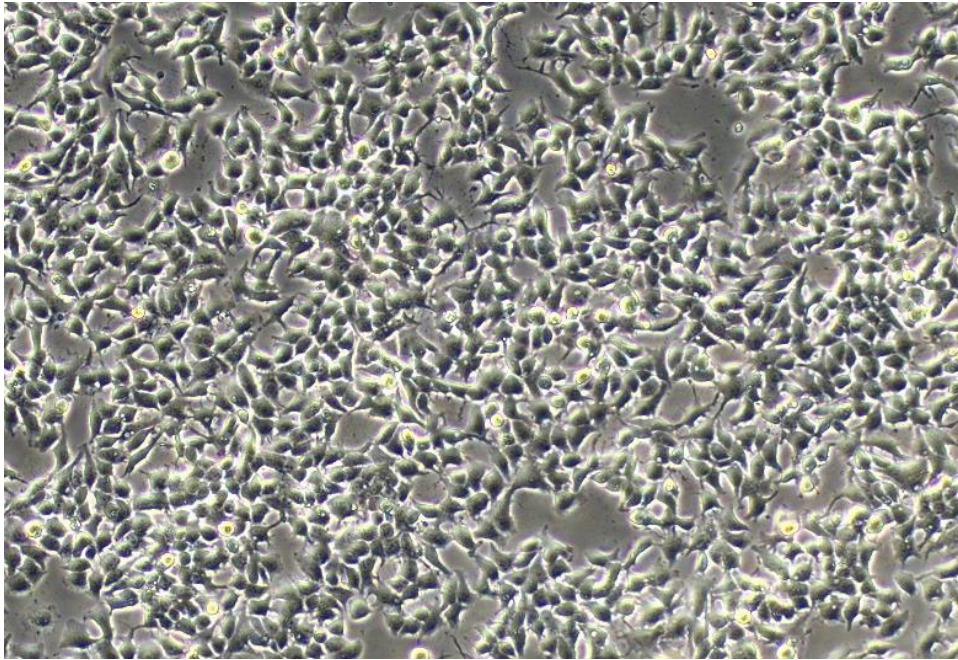
Proliferasyon ve migrasyon çalışmalarımızda istatistiksel analiz, GraphPad Prism 8.0.2. programı kullanılarak Two-way ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Standart sapma değerleri, grafiklerdeki hata çubuklarını belirlemek için kullanılmıştır ve en az üç tekrarlı üç bağımsız deneyi göstermektedir. JC-1 Mitokondiyal membran potansiyeli analizinde floresan görüntüler ImageJ ve GraphPad Prism 8.0.2. programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Apoptotik gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için real-time PCR yönteminde verilerin istatistiksel analizi için One-Way ANOVA kullanılmıştır. Western blot analizi ile elde edilen protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak ölçülmüştür. Her proteinin ifade seviyelerinin hesaplanması için, her değer Gapdh (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) değerine bölünmüştür.

İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen P değerleri * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ şeklindedir.

4. BULGULAR

4.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin *In Vitro* Ortamda Büyütülmesi

MCF-7 hücreleri 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde T-25 ve T-75 flasklarda, 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI besiyerinde çoğaltılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız MCF-7 hücrelerine ait morfolojik görüntü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



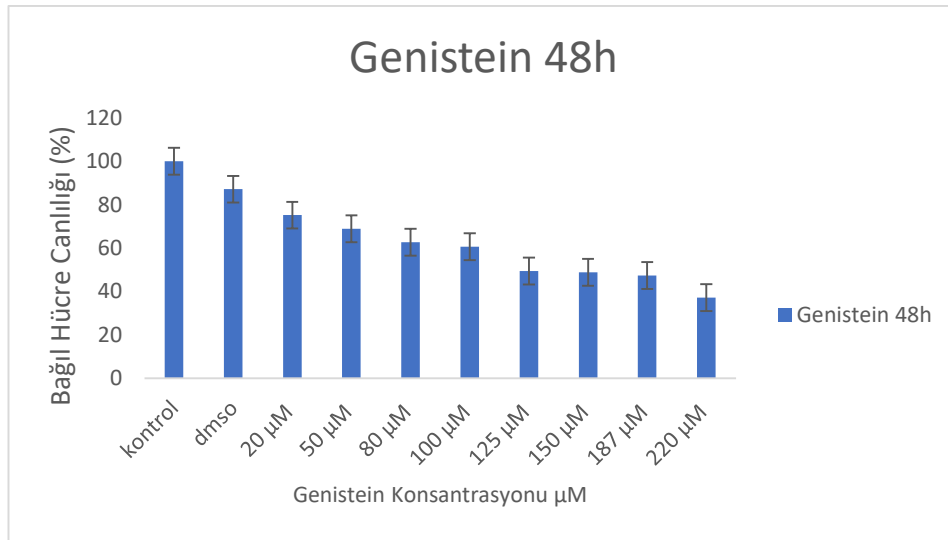
Şekil 4.1. Çalışmamızda kullandığımız MCF-7 hücrelerine ait morfolojik görüntü.

4.2. Genistein ve AZD5991'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında *In Vitro* Sitotoksitesinin Ölçülmesi

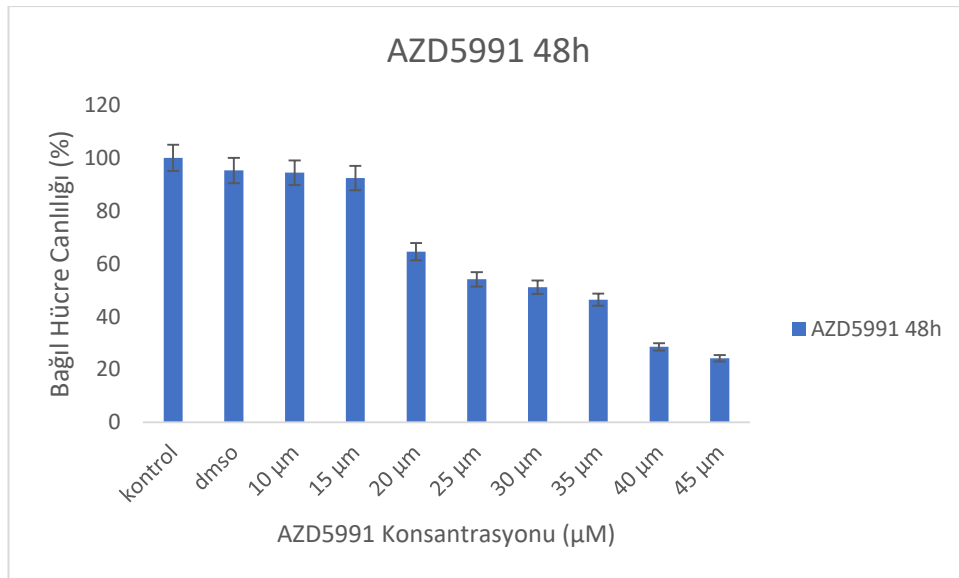
Farklı konsantrasyonlarda Genistein (10 - 500 µM) ve AZD5991 (10 - 45 µM) ile muamele edilmeleri sonucunda MCF-7 Meme kanseri hücre hattında Genistein ve

AZD5991'in hücre canlılığı üzerine etkisini belirleyebilmek için Sülförhodamin B hücre canlılığı testi uygulanmıştır.

Literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda Genistein ve AZD5991'in farklı konsantrasyonları uygulanmış ve hücreler, 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik Genistein ve AZD5991 uygulamasının etkili olmadığı, 72 saatlik inkübasyon sonucunda, her iki ajanın da hücreler üzerinde belirgin toksik etkiler oluşturduğu gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamalarda Genistein ve AZD5991 için sırasıyla 100 μM ve 30 μM IC50 değerleri belirlenmiştir (Şekil:4.2 ve Şekil:4.3).

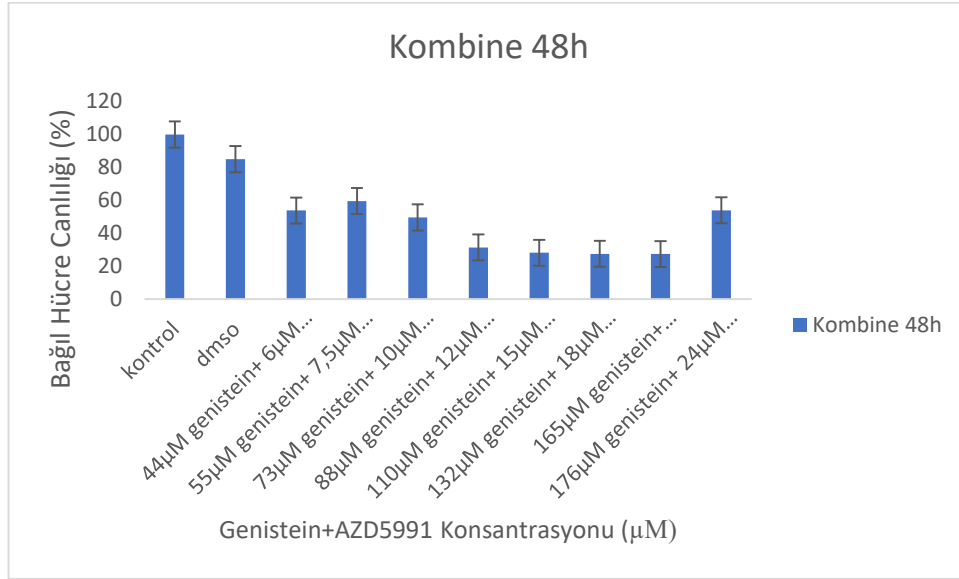


Şekil 4.2. Genistein SRB testi sonuçları (IC50 değeri 100 μM).



Şekil 4.3. AZD5991 SRB testi sonuçları (IC50 değeri 30 μM).

Belirlenen IC₅₀ değerlerine göre kombine dozları belirlenmiştir. Optimum sonuca 48 saate 73µM genistein+ 10µM AZD5991 dozları ile ulaşılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Genistein ve AZD5991 SRB testi sonuçları (IC₅₀ değeri 73µM genistein+ 10µM AZD5991).

4.3. Genistein ve AZD5991'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığına Etkisi

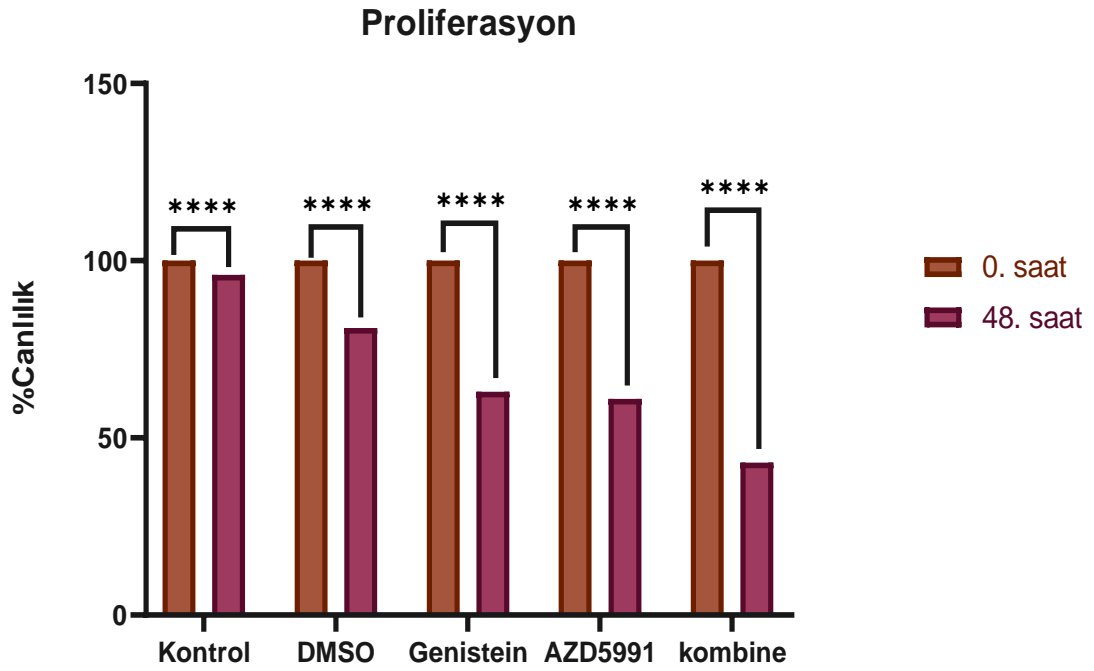
MCF-7 meme kanseri hücre hattında 100 µM Genistein, 30 µM AZD5991 ve 73µM genistein+ 10µM AZD5991 kombine terapinin zamana bağlı olarak hücre sağkalım üzerindeki etkisini belirleyebilmek için hücre sağkalım testi yapılmıştır.

6- kuyucuklu petrilere ekim yapılan hücreler yapıştıktan sonra SRB testi ile belirlenen IC₅₀ değerlerinde Genistein, AZD5991 ve Kombine uygulamaları yapılmıştır. Bir kuyucuk kontrol grubu olarak bırakılmış ve besiyeri değiştirilmiştir. Bir kuyucuğa ise %1 DMSO uygulanmıştır. 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelere tripan blue canlılık testi yapılmıştır ve hemositometre yardımıyla hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda, kontrol ve tedavi gruplarındaki hücre canlılık oranları sırasıyla: %96 (kontrol), %81 (DMSO), %63 (Genistein), %61 (AZD5991) ve %43 (kombinasyon) olarak hesaplanmıştır. Uygulama sonrası, kontrol grubuna kıyasla canlılık yüzdesi ise zamana bağlı olarak azalmıştır.

Çalışmamız 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tripan mavisi canlılık testi sonucunda canlı hücre sayıları, ölü hücre sayıları ile canlılık yüzdesi Tablo 4.1'de, bu verilere ait grafik ise Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Tripan mavisi canlılık testi ile 48 saat sonucunda hücre sayıları ve canlılık yüzdesi.

	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı	Total hücre sayısı	Canlılık (%)
Kontrol	970000	40000	1010000	96
DMSO	490000	110000	600000	81
Genistein	70000	40000	110000	63
AZD5991	110000	70000	180000	61
Kombine	100000	130000	230000	43

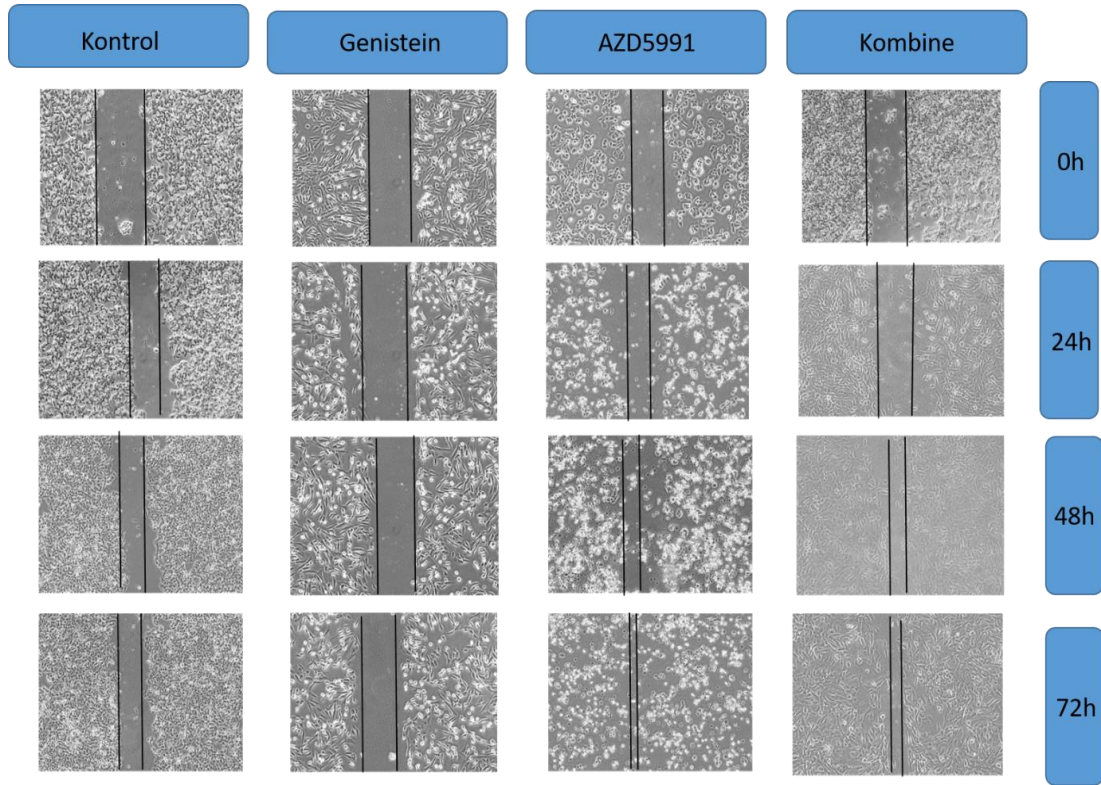


Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerinin bağıl hücre canlılığı zamana bağlı grafiği (****P<0,0001)

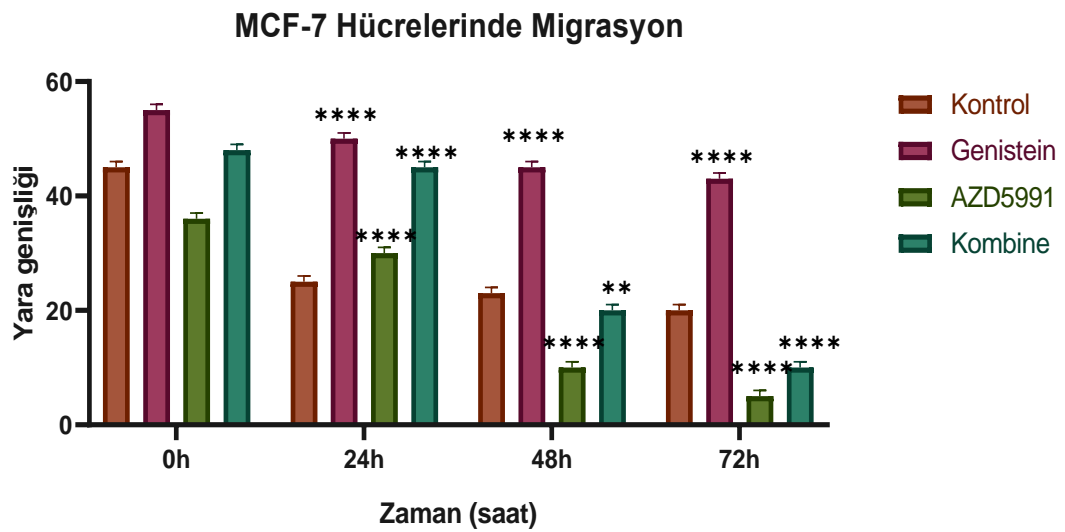
4.4. Yara İyileşme Analizi (Wound Healing)

Genistein, AZD5991 ve bunların kombine uygulamalarının MCF-7 hücrelerinde migrasyon üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmiştir. 6- kuyucuklu petrilere 1 ml besiyerinde 200000 hücre olacak şekilde ekim yapılan hücreler yapıştıktan sonra yöntem bölümünde belirtildiği şekilde hücrelerde yara oluşturulmuştur. 0, 24, 48 ve 72 saatte yara genişlikleri ölçülmüştür. 0. Saat değerleri (Wo) ve ölçüm yapılan saat değerleri (Wt) not edilmiştir. 0, 24, 48 ve 72 saatlere ait hücre görüntüleri Şekil:4.6'da, yara genişliklerine ait grafik Şekil: 4.7 'de gösterilmiştir. Genistein ve AZD5991'in ve bunların kombine uygulamalarının MCF-7 hücrelerinde oluşturulan yara genişlikleri arasındaki istatistiksel analizler Graphpad Prism 8.0.2 programında Two-way ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yara iyileşme testi sonuçlarına göre, hücre migrasyonu üzerindeki etkiler zamanla belirginleşmiştir. Başlangıçta (0. saat) her grupta yara genişliği farklılık gösterse de, 24. saatte kontrol grubunda yara genişliğinde %44,4 oranında azalma gözlenirken, Genistein grubunda bu oran %9,1, AZD5991 grubunda %16,7 ve kombine tedavi grubunda ise %6,3 olarak hesaplanmıştır. Önceki sitotoksosite analizlerinde de anlamlı etkinin belirlendiği 48. saatte ise AZD5991 grubunda %72,2 ve kombine tedavi grubunda %58,3'lük kapanma oranlarıyla migrasyonun belirgin şekilde hızlandığı gözlenmiştir. AZD5991 uygulamasının 48. saate kadar hücrelerin migrasyonunu durdurduğu 48. saatte ise hücreleri plaka yüzeyinden kaldırarak hücreler üzerine sitotoksik etki yaptığı mikroskopik olarak gözlenmiştir. Bu dönemde kontrol grubunda %48,9 ve genistein grubunda %18,2 ile daha düşük kapanma oranları saptanmıştır. 72. saatte ise AZD5991 grubunda %86,1, kombine grupta %79,2 oranında yara kapanması gerçekleşmiş, bu oranlar kontrol (%55,6) ve genistein (%21,8) gruplarının oldukça üzerindedir.



Şekil 4.6. Migrasyon analizinde 0, 24, 48 ve 72 saatlere ait hücre görüntüleri.

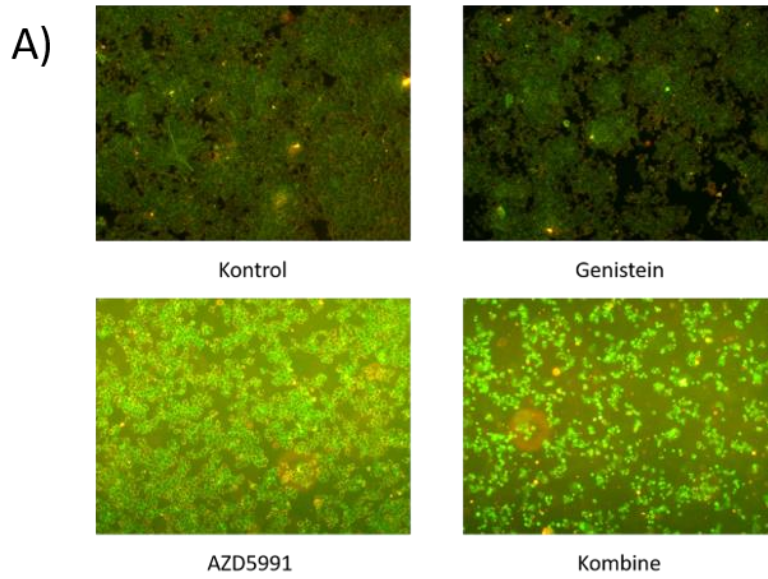


Şekil 4.7. MCF-7 hücrelerinin Genistein, AZD5991 ve Genistein-AZD5991 kombinasyonu muamelesi sonrasında 24, 48 ve 72 saatlere ait yara genişlikleri.

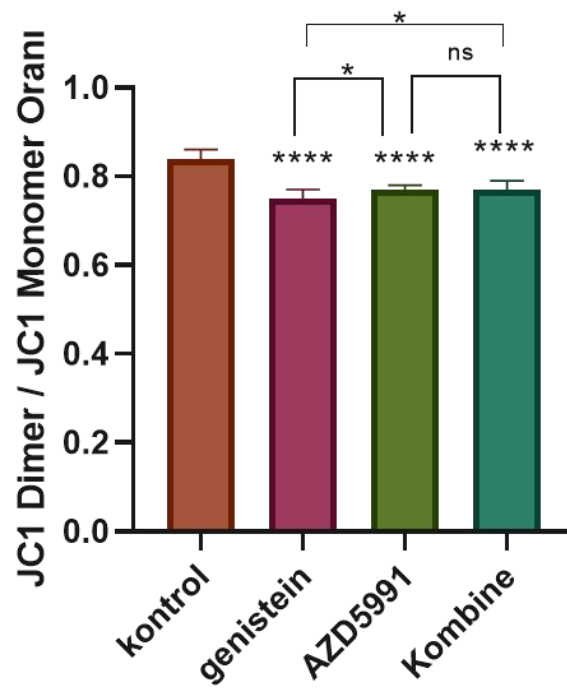
4.5. JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Analizi ile Apoptozun Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini değerlendirmek amacıyla JC-1 floresan boyama analizi gerçekleştirilmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu petrilere ekildikten sonra yapışmaları sağlanmış, ardından belirlenen IC50 dozlarında Genistein, AZD5991 ve bu iki ajanın kombinasyonu uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mitokondri zar potansiyelinde meydana gelen değişiklikler, JC-1 boyasının sağlıklı hücrelerde dimerize olarak kırmızı (590 nm), apoptotik hücrelerde ise monomerik formda yeşil (529 nm) floresan yayması esasına göre değerlendirilmiştir.

Elde edilen kırmızı/yeşil (R/G) floresan oranları, ImageJ ve GraphPad Prism 8.0.2 programları ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, kontrol grubu ile Genistein, AZD5991 ve kombinasyon grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (ANOVA, ****p<0.0001). Floresan mikroskopi analizinde kontrol grubunda kırmızı floresans baskın iken, tedavi uygulanan gruplarda kırmızı sinyalin azaldığı ve yeşil floresansın arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, tedavi gruplarında mitokondriyal zar potansiyelinin azaldığını ve apoptoz sürecinin aktive olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Genistein grubu ile diğer tedavi grupları arasında da anlamlı farklar bulunurken, AZD5991 ile kombinasyon grubu arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu bulgulara ait floresan mikroskopik görüntüler ve R/G oranlarına ilişkin kantitatif veriler Şekil 4.8'de verilmiştir.



B) **JC-1 Analizi – R/G Oranı**



Şekil 4.8. Genistein, AZD5991 ve Genistein-AZD5991 kombinasyonunun MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin JC-1 floresan boyası ile değerlendirilmesi. (A: Floresan mikroskopik görüntüler B: R/G oranlarına ilişkin kantitatif veriler).

4.6. Apoptotik Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

Çalışmada, Genistein, AZD5991 ve kombine uygulamaların MCF-7 hücrelerindeki gen ekspresyon düzeyleri, real-time PCR yöntemiyle incelenmiştir. *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21*, ve *Caspase-8* genlerine ait $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon değişiklikleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Kat değişimi ise $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ formülüyle hesaplanarak gen ifadesindeki değişimi kat cinsinden göstermektedir. $\Delta\Delta Ct$ azaldıkça, kat değişimi artmaktadır. Verilerin istatistiksel analizi için One-Way ANOVA kullanılmıştır.

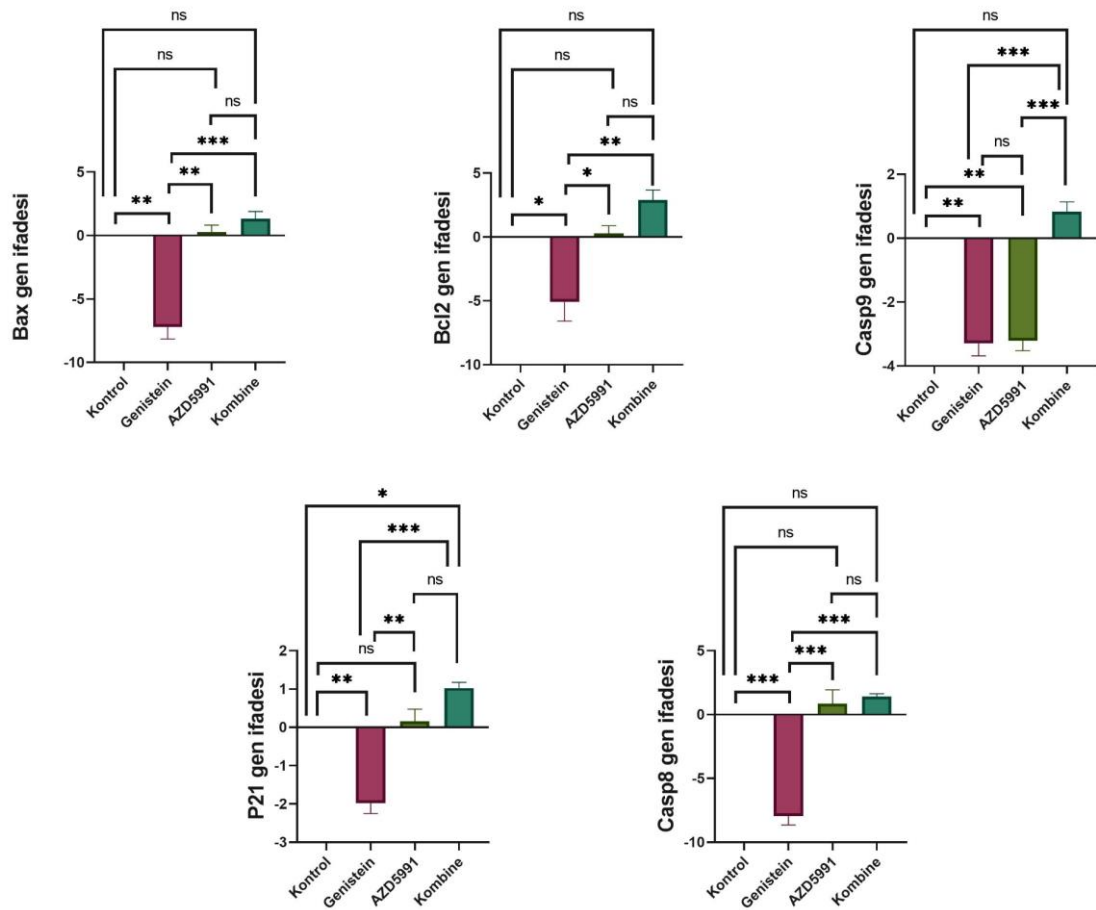
$\Delta\Delta Ct$ değerlerine göre yapılan analizde, *Bax* gen ekspresyonu Genistein grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede artmıştır (** $p < 0.01$). AZD5991 ve Kombine gruplarında ise *Bax* gen ekspresyonu, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan değişiklikler gözlenmiştir. Kat değişimi değerleri incelendiğinde, Genistein grubunda 27,30 kat artış gözlenirken; AZD5991 grubunda ifadenin 0,81 katına, kombine grubunda ise 0,52 katına düştüğü belirlenmiştir.

Bcl-2 gen ekspresyonu, Genistein grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır (* $p < 0.05$). AZD5991 ve Kombine gruplarında ise *Bcl-2* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kat değişimi değerleri incelendiğinde, Genistein grubunda 16,88 kat artış gözlenirken; AZD5991 grubunda ifadenin 0,78 katına, Kombine grubunda ise 0,11 katına düştüğü belirlenmiştir.

Caspase-9 gen ekspresyonu, Genistein ve AZD5991 gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır (** $p < 0.01$). Kombine grubunda ise *Caspase-9* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kat değişimi değerleri incelendiğinde, Genistein grubunda 3,09 kat artış, AZD5991 grubunda 12,91 kat artış gözlenirken; Kombine grubunda ise ifadenin 0,53 katına düştüğü gözlenmiştir.

P21 gen ekspresyonu, Genistein grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır (** $p < 0.01$). Kombine grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır (* $p < 0.05$). AZD5991 grubunda ise *P21* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kat değişimi değerlerine bakıldığında, Genistein grubunda 1,38 kat artış gözlenirken; AZD5991 grubunda ifadenin 0,74 katına ve Kombine grubunda ise 0,59 katına düştüğü gözlenmiştir.

Caspase-8 gen ekspresyonu, Genistein grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır (** $p < 0.001$). AZD5991 ve Kombine gruplarında ise *Caspase-8* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kat değişimi değerlerine bakıldığında, Genistein grubunda 115,6 kat artış gözlenirken; AZD5991 grubunda ifadenin 0,47 katına ve Kombine grubunda ise 0,29 katına düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinde *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-9*, *P21*, ve *Caspase-8* genlerine ait $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon değişiklikleri.

4.7. İmmünblotlama Yöntemi

Apoptozun düzenlenmesinde pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge önemli bir role sahiptir. Genistein ve AZD5991'in neden olduğu apoptozun görsel olarak belirlenmesinin ardından, Genistein ve AZD5991 ile indüklenen MCF-7 hücrelerinde, apoptotik yolaktaki etkilerinin tam olarak belirlenmesi için

apoptotik hücre ölümü yolağı ile ilişkili Mcl-1, Bax, Parp-1, P21 ve P53 proteinlerinin ifadelerindeki değişimler western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Western blot çalışmamızın aşamaları Biorad (Mini Protean) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizlerde tedavi gruplarının Mcl-1, Bax, Parp1, P53 ve P21 protein ekspresyon düzeyleri, her değer Gapdh değerine bölünerek kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır.

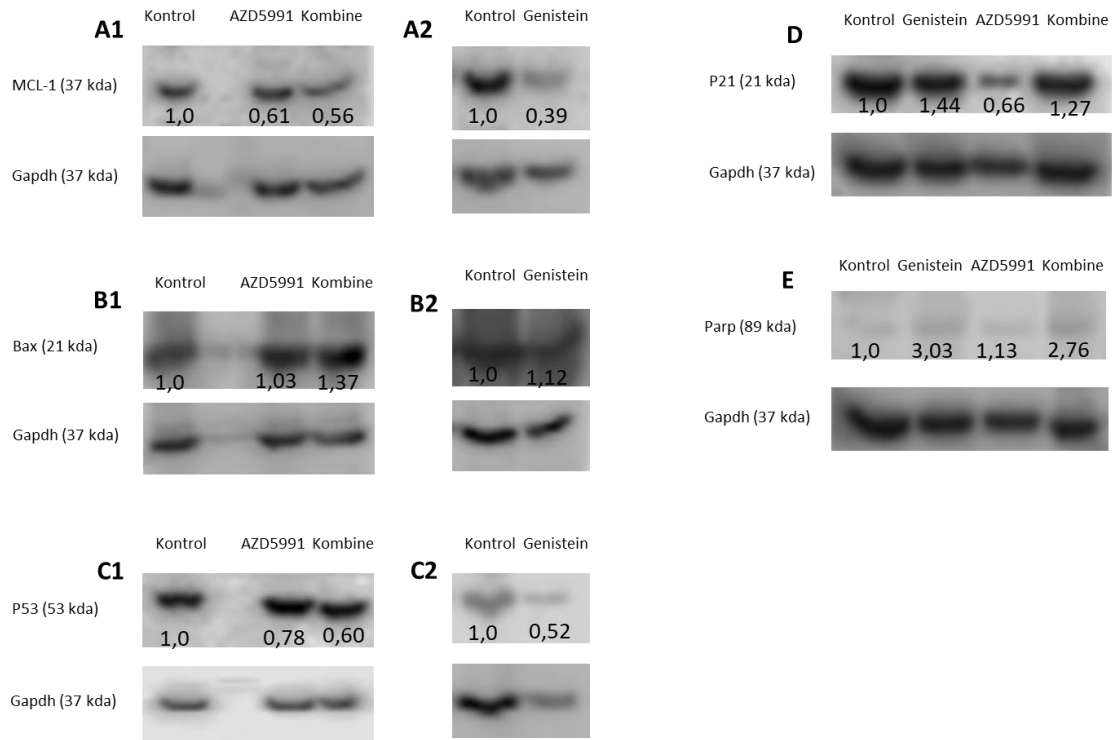
Mcl-1 protein düzeyleri, tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre azalmış olup, en belirgin düşüş genistein uygulamasında gözlemlenmiştir.

Pro-apoptotik bir protein olan Bax'ın ekspresyon düzeyleri, tüm tedavi gruplarında artış göstermiştir. En yüksek artış, genistein ve AZD5991'in kombinasyon halinde uygulandığı grupta (1,37 kat) tespit edilmiştir.

Parp1 protein ekspresyonu, genistein ve kombine tedavi gruplarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla yaklaşık 3,03 ve 2,76 kat artış göstermiştir. Bu artışlar, Parp1'in aktivitesinin arttığını ve apoptozun aktive olduğunu göstermektedir. Buna karşın, AZD5991 grubunda bu artış oldukça sınırlı kalmış ve yaklaşık 1,13 kat olarak hesaplanmıştır.

P53 protein seviyeleri genistein, AZD5991 ve Genistein-AZD5991 kombinasyonu tedavilerinde kontrol grubuna göre azalmıştır. En fazla azalma genistein uygulamasında gözlemlenmiştir.

P21 düzeyleri ise genistein ve kombine gruplarında kontrol grubuna göre artarken (sırasıyla 1.45 ve 1.27), AZD5991 grubunda düşmüştür. MCF-7 hücrelerinin western blot görüntüleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Genistein ve AZD5991 uygulamasının protein seviyeleri üzerine etkilerinin immunoblotlama yöntemi ile MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında incelenmesi. (A1: AZD59951 ve kombine tedavisinde Mcl-1 ifadesi, A2 Genistein tedavisinde Mcl-1 ifadesi. B1: AZD59951 ve kombine tedavisinde Bax ifadesi, B2 Genistein tedavisinde Bax ifadesi. C1: AZD59951 ve kombine tedavisinde P53 ifadesi, C2: Genistein tedavisinde P53 ifadesi. D: Genistein AZD59951 ve kombine tedavisinde P21 ifadesi, E: Genistein AZD59951 ve kombine tedavisinde Parp1 ifadesi.)

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignite olup, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bcl-2 protein ailesi üyelerinin düzensiz ekspresyonu, tümör hücrelerinin en karakteristik özelliklerinden biri olan hücre ölümünden kaçış ile yakından ilişkilidir (Bolomsky ve ark., 2020). En az bir Bcl-2 homoloji bölgesi içeren bu protein ailesi, apoptoz sürecinin düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Wei ve ark., 2020). Meme kanseri, hastalığın heterojen yapısını yansıtan farklı alt tiplere sahiptir ve bu alt tipler, prognoz ile tedaviye verilen yanıt açısından önemli farklılıklar gösterir. Hormon reseptörü (HR) pozitif tümörler, hormonal tedavilere yüksek düzeyde yanıt verirken; insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif tümörler, HER2'yi hedefleyen antikolar ve tirozin kinaz inhibitörleri ile etkili şekilde tedavi edilebilmektedir. Ancak, üçlü negatif meme kanseri alt tipinde hedefe yönelik tedavi seçenekleri sınırlı olup, bu alt tipe sahip hastalarda klinik sonuçlar genellikle daha kötü seyretmektedir (Youness RA ve ark., 2020).

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın kanser türü olmasının yanı sıra, dünya genelinde yüksek mortalite oranlarına da sahiptir. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada, doğal bir izoflavon olan genistein ile Mcl-1 inhibitörü AZD5991'in insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki sitotoksik, proliferatif ve apoptotik etkileri incelenmiştir.

Hücre canlılığı üzerine yapılan SRB testi sonucunda, Genistein ve AZD5991'in tekli uygulamalarında hücre canlılığı sırasıyla %63 ve %61 olarak belirlenirken, kombinasyon uygulamasında bu oran %43'e düşmüştür. Bu bulgular, genistein ve AZD5991'in birlikte kullanımının sinerjik bir etki oluşturarak hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermektedir. Genistein'in farklı kanser türlerinde antiproliferatif etkiler gösterdiği daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Phuah ve ark., 2014).

AZD5991, Mcl-1proteinini hedef alarak apoptozu indükleyen bir inhibitördür. Prelinik çalışmalarda akut myeloid lösemi ve multipl miyelom gibi kanser modellerinde

güçlü apoptotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Wei ve ark., 2020). Bu çalışmada da, AZD5991'in MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği ancak genistein ile kombine olarak yapılan tedavinin bu etkinliği artırmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç, genistein ile yapılan kombine tedavinin, AZD5991'in apoptoz üzerindeki etkisini güçlendirmede göstermektedir.

Yara iyileşme testi sonuçlarına göre, genistein ve AZD5991'in hücre migrasyonunu anlamlı düzeyde inhibe ettiği tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Literatürde de Genistein'in anti-metastatik özellikleri belirtilmiştir (Banerjee et al., 2008). Yapılan analizlerde kontrol grubunda ilk 24 saatte yara kapanması daha hızlı gerçekleşirken, tedavi gruplarında bu oranlar daha düşük kalmıştır. Bu durum, tedavi uygulamalarının erken dönemde hücre migrasyonunu ve yara kapanmasını baskılayıcı etkiler gösterdiğini düşündürmektedir. Ancak 48. saatte özellikle AZD5991 grubunda (%72,2) ve kombine tedavi grubunda (%58,3) belirgin yara kapanmaları gözlenmiş, bu da tedavi etkilerinin zamanla azaldığını ve hücre hareketliliğinin yeniden arttığını göstermektedir. Mikroskopik analizler, AZD5991'in bu süreçte migrasyonu artırmasının yanı sıra sitotoksik etkiler gösterdiğini ve hücre ölümünü başlattığını ortaya koymuştur. 72. saatte ise AZD5991 (%86,1) ve kombine tedavi (%79,2) gruplarında yara kapanması oranları, kontrol (%55,6) ve Genistein (%21,8) gruplarının oldukça üzerine çıkmıştır. Bu bulgular, geç dönemde AZD5991'in ve kombine tedavilerin hücre migrasyonunu yeniden uyararak istenmeyen yara kapanmasına neden olabileceğini göstermektedir. Genistein'in ise migrasyonu baskılayıcı etkisi geç dönemde de devam etmiş, böylece yara genişliğinin korunmasına katkı sağlamıştır. Sonuç olarak, AZD5991 ve kombine tedaviler erken dönemde etkili olmakla birlikte, geç dönemde yara iyileşmesini teşvik edici etkileri nedeniyle dikkatle değerlendirilmelidir.

MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini değerlendirmek amacıyla JC-1 floresan boyama analizi gerçekleştirilmiştir. JC-1 floresan boyama yöntemiyle elde edilen bulgular, Genistein ve AZD5991'in MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini düşürerek apoptozu indüklediğini göstermektedir. Tedavi gruplarında kırmızı/yeşil floresan oranında gözlenen anlamlı azalma, mitokondriyal zar potansiyelinin bozulduğuna ve intrinsik apoptoz yolunun aktive olduğuna işaret etmektedir. Bu durum, mitokondriyal disfonksiyonun apoptotik sürecin erken bir belirteci olduğunu ortaya koyan literatürle de uyumludur (Liu ve ark. 2021). Genistein'in mitokondri zar potansiyelinde belirgin bir azalma oluşturması, Bax/Bcl-2

oranını artırarak ve survivin ekspresyonunu azaltarak hücre ölümünü teşvik ettiğini bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir (Prietsch ve ark. 2014). Mcl-1 inhibitörü olan AZD5991'in benzer şekilde mitokondriyal disfonksiyona yol açarak apoptozu tetiklemesi, bu ajanın etkisini doğrulamaktadır (Liu ve ark. 2021). Ayrıca, kombinasyon grubunda gözlenen etkinin tekli tedavilere kıyasla anlamlı fark oluşturmaması, her iki ajanın benzer mekanizmalar üzerinden etki etmesinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada Genistein, AZD5991 ve kombine uygulamaların MCF-7 hücrelerindeki gen ekspresyon düzeyleri, real-time PCR yöntemiyle incelenmiştir. *Bax* gen ekspresyonunun özellikle Genistein uygulaması ile anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir. *Bax*, apoptotik süreçlerde görev alan pro-apoptotik bir genidir ve artan ekspresyonu hücre ölümünü destekleyen mekanizmaların aktive olduğunu göstermektedir. (Peña-Blanco ve ark. 2018) Genistein'in *Bax* ekspresyonunu artırması, bu bileşiğin apoptotik yolları uyararak antitümöral etki gösterebileceğini desteklemektedir. Benzer şekilde, literatürde de Genistein'in farklı kanser hücre hatlarında *Bax* ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Spagnuolo, C ve ark. 2015). AZD5991 grubunda *Bax* gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir azalma gözlenmiş olsa da, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, AZD5991'in *Bax* üzerinden apoptozu belirgin şekilde etkilemediğini, apoptotik etkisinin *Bax* dışındaki başka yollarla ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Kombine tedavi grubunda da *Bax* ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, kombinasyonun pro-apoptotik etkilerde Genistein kadar güçlü olmadığını ya da etkileşimli mekanizmalar nedeniyle *Bax* üzerinden farklı bir düzenlenmenin söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

Bcl-2 geninin ekspresyonundaki artış, hücrelerin apoptoza direnç göstermesine ve böylece tümör hücrelerinin yaşamını sürdürmesine neden olabilir (Pistritto ve ark.,2016). Bu çalışmada, Genistein grubunda *Bcl-2* ifadesinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiş, bu da Genistein'in *Bcl-2* üzerinden anti-apoptotik bir etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, Genistein'in düşük konsantrasyonlarda *Bcl-2* ekspresyonunu artırabildiği, ancak yüksek konsantrasyonlarda bu proteini baskılayarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Constantinou, A. I. Ve ark., 1998). Öte yandan, AZD5991 ve kombine gruplarda *Bcl-2* ekspresyonunda azalma eğilimi izlenmiş, ancak

bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, bu ajanların *Bcl-2* regülasyonu üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğini göstermektedir.

Caspase-9, mitokondriyel yolak üzerinden apoptozun başlatılmasında kritik rol oynayan başlatıcı bir kaspazdır (Li, P. Ve ark., 2017). Bu çalışmada Genistein ve AZD5991 uygulamaları ile *Caspase-9* gen ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmesi, her iki ajanın da mitokondriyel yolak aracılığıyla apoptozu aktive ettiğini göstermektedir. Genistein'in bu etkisi, fitoöstrojenlerin mitokondriyel yolağı hedef alan apoptotik mekanizmaları modüle edebildiğini ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur (Mas-Bargues ve ark. 2022). Kombine grubunda gözlenen ekspresyon düşüşü ise iki ajanın birlikte kullanımında *Caspase-9* üzerinden sinerjik bir etki yerine potansiyel bir etkileşim veya geri besleme mekanizmasının devreye girebileceğini düşündürmektedir.

p21, hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak hücre çoğalmasını kontrol eden tümör baskılayıcı bir gendir (El-Deiry W. S., 2016). Çalışmada, Genistein grubunda *p21* gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda da fitoöstrojenlerin *p21* ekspresyonunu artırabileceği ve bu durumun artan apoptoz ve azalan proliferasyonla sonuçlanacağı gösterilmiştir (Bilal, I. Ve ark., 2014) Genistein'in *p21* gen ekspresyonunu artırarak hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayabileceğini düşündürmektedir. Kombine tedavi grubunda ise *p21* ekspresyonu anlamlı şekilde azalmıştır. Bu durum, iki ilacın birlikte kullanımının *p21* üzerinden hücre döngüsünü baskılamak yerine, hücre döngüsünün ilerlemesine izin verecek yönde etkileyebileceğini göstermektedir. AZD5991 grubundaki değişiklik ise istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu sonuç, AZD5991'in *p21* üzerinden hücre döngüsüne yönelik belirgin bir düzenleyici etki göstermediğini düşündürmektedir.

Caspase-8, apoptozun ekstrinsik yolakta önemli bir rol oynayan bir başlatıcı kaspazdır (Contadini, C. ve ark., 2023). Çalışmada, Genistein grubunda *Caspase-8* gen ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu sonuçlar, Genistein'in *Caspase-8* üzerinden güçlü bir apoptoz indükleyici etki gösterdiğini düşündürmektedir. AZD5991 ve Kombine gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu tedavi gruplarının bu gen üzerinde belirgin bir etki göstermediğini düşündürmektedir.

Çalışmada, Genistein, AZD5991 ve Kombine tedavilerinin MCF-7 hücrelerinde hedeflenen genlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. *Bax*,

Bcl-2, *Caspase-9*, *P21*, ve *Caspase-8* genlerine ait $\Delta\Delta Ct$ ve kat değişimi (fold change) analizleri, Genistein tedavisinin çoğu genin ekspresyonunda anlamlı farklılıklara yol açtığını göstermiştir. Bu durum Genistein'in hücresele ölüm yolağına etkisini işaret etmektedir. AZD5991 ve Kombine gruplarında ise çoğu genin ekspresyonunda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Genel olarak, Genistein'in hücresele süreçlere olan etkisi belirgin bir şekilde öne çıkmış, AZD5991 ve Kombine tedavilerinin ise daha sınırlı etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgular, Genistein'in potansiyel tedavi stratejileri arasına dahil edilebileceğini ve özellikle kanser tedavisinde apoptoz mekanizmalarını modüle etme potansiyeline sahip olabileceğini düşündürür.

Mcl-1 proteini, diğer anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine kıyasla meme kanserlerinde daha az araştırılmıştır. Ancak literatürde, bu protein ailesinin meme kanseri gelişimi, progresyonu ve tedaviye yanıt üzerindeki etkileri açıkça ortaya konmuştur. Mcl-1'in onkogenik etkilerini engelleyebilmek adına, bu proteinin ekspresyonunu ve stabilitesini düzenleyen çeşitli hücresele yolların hedeflenmesi önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Mcl-1 inhibitörleri, bu proteinin meme kanserindeki aktivitesini sınırlamak için uygulanabilir ve hızlı, geri dönüşümlü bir tedavi yaklaşımı sunabilir (Williams ve ark., 2015).

Bu çalışmada, Genistein ve AZD5991'in MCF-7 hücrelerinde apoptotik yollar üzerindeki etkileri western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu iki ajanla yapılan tedavilerin hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişikliklere neden olduğunu göstermektedir.

Mcl-1 protein düzeylerinin özellikle Genistein tedavisiyle belirgin şekilde azalması, bu bileşiğin anti-apoptotik mekanizmaları baskılayarak hücre ölümünü desteklediğini ortaya koymaktadır. Literatürde Mcl-1'in çeşitli kanser hücrelerinde hayatta kalma sinyallerini destekleyen kritik bir faktör olduğu ve kemoterapiye dirençle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Babacan, 2023). Bu bağlamda, Genistein'in Mcl-1 düzeyini düşürmesi, tedaviye duyarlılığı artırabilecek potansiyel bir mekanizma olarak değerlendirilebilir. Kombine tedavide Mcl-1 düzeylerinde orta düzeyde bir azalma gözlenmiş, bu da Genistein'in AZD5991 ile birlikte kullanımında da etkisini sürdürdüğünü düşündürmektedir. AZD5991 tedavisinde ise Mcl-1 düzeyinde daha sınırlı bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Mcl-1'in baskılanmasında Genistein'in daha etkili olduğunu ve bu etkisinin kombinasyon tedavisine de katkı sağladığını göstermektedir.

Çalışmada Bax düzeylerinde gözlemlenen artış, özellikle Genistein-AZD5991 kombinasyonunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden Mcl-1 mitokondriyal geçirgenliği önlerken, Bax'ın mitokondriyal dış zar geçirgenliğini artırarak sitokrom c salınımını tetiklediği ve böylece intrinsik apoptotik yolda kilit rol oynadığı bilinmektedir (Ouyang ve ark., 2012). Bu nedenle bu artış, kombinasyon tedavisinin sinerjik bir pro-apoptotik etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak real-time PCR analizlerinde Bax gen ekspresyonu kombinasyon grubunda anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Bu durum, gen düzeyindeki ifade ile protein seviyesinin her zaman birebir örtüşmeyebileceğini göstermektedir. mRNA düzeyinden proteine geçiş sürecinde transkripsiyon sonrası düzenlemeler, mRNA stabilitesi ve translasyon etkinliği gibi faktörler etkili olabilir. Bu nedenle, elde edilen verilerin hem gen hem de protein düzeyinde birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Genistein'in daha önceki çalışmalarda P21 ve P53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonunu modüle ettiği, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptoz mekanizmalarını aktive ettiği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2000, Zhang ve ark., 2013). Bu çalışmada, p53 protein düzeylerinde en yüksek artış AZD5991 grubunda gözlenmiş, bunu kombinasyon ve Genistein grupları takip etmiştir. P53 düzeylerinde gözlemlenen düşüş, beklenmedik bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Genistein'in bazı çalışmalarda P53 aktivitesini artırdığı bildirilmiştir. Bu aktivasyon, DNA hasarı yanıtı, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun başlatılmasıyla ilişkilidir. P53'ün artışı genellikle kaspaz aktivasyonu, Bcl-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesi ve mitokondriyal yolun aktive edilmesi gibi etkilerle sonuçlanır (Sharifi-Rad, J. ve ark., 2021). Protein düzeyinin azalması ise, translasyon sonrası modifikasyonlar, protein stabilitesi ya da hücre dışı sinyallere bağlı olarak farklı şekillerde düzenlenebileceğini göstermektedir. Buna karşın, p21 protein düzeyleri Genistein grubunda daha belirgin şekilde artarken, kombine ve AZD5991 gruplarında bu artış daha sınırlı kalmıştır. Bu farklılıklar, p53 ve p21'in hücre içi düzenleyici mekanizmalarının uygulanan ajanlara farklı yanıtlar verebildiğini ve kombinasyon tedavisinin bu yanıtları orta düzeyde dengeleyebileceğini göstermektedir.

P21 proteinindeki artış ise özellikle Genistein tedavisi ile belirginleşmiş olup, bu durum Genistein'in hücre döngüsünü durdurucu etkisiyle uyumludur. P21, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak hücre döngüsünün G1/S geçişini engelleyerek proliferasyonu baskılar (Aslan ve ark., 2008). Bu bağlamda, hem P21 artışı hem de Mcl-1 azalması, Genistein'in sadece apoptotik süreçleri değil, aynı zamanda hücre büyümesini

düzenleyen yolları da etkilediğini göstermektedir. Kombine uygulamada da Western blot analizlerinde P21 protein düzeylerinin artmış olması, Genistein'in AZD5991 ile birlikte hücre döngüsü durdurucu etkisini desteklediğini göstermektedir. Ancak RT-PCR analizlerinde aynı grupta p21 mRNA düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu durum, mRNA düzeyindeki azalmanın protein seviyelerine doğrudan yansımayaabileceğini, post-transkripsiyonel düzenleme ve protein stabilitesi gibi mekanizmaların devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Parp1 protein düzeyleri, özellikle genistein ve genistein-AZD5991 kombinasyonu uygulanan MCF-7 hücrelerinde belirgin şekilde artış göstermiştir. Parp1'in apoptozda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. DNA hasarı sonrası onarım sürecine katılan bu enzim, hasarın şiddetli olduğu durumlarda ise apoptozun başlatılmasında görev alır (Mashimo ve ark., 2021). Genistein ve kombinasyon tedavisinin Parp1 ekspresyonunu yaklaşık 3 kat artırması, bu tedavilerin apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Bu bulgu, daha önce genisteinin DNA hasarına neden olan ve Parp1 aktivitesini artıran bir ajan olduğunu ortaya koyan çalışmalarla da örtüşmektedir (Andreeva ve ark., 2024).

Bu sonuçlar, genisteinin hem DNA hasarı kaynaklı hem de mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu indükleyebileceğini, AZD5991'in ise esas olarak anti-apoptotik Mcl-1 proteinini baskılayarak mitokondriyal disfonksiyon üzerinden hücre ölümüne yol açtığını ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, doğal bir izoflavon olan genistein ile selektif bir Mcl-1 inhibitörü olan AZD5991'in insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, her iki ajanın da ayrı ayrı uygulandığında hücre canlılığı üzerinde belirgin sitotoksik etkiler oluşturduğu, ancak kombinasyon halinde uygulandığında bu etkinin daha güçlü bir şekilde ortaya çıktığı belirlenmiştir. Genistein ve AZD5991'in birlikte uygulanması, hücre proliferasyonunu baskılamış, apoptotik mekanizmaları aktive etmiş ve hücre migrasyonunu anlamlı düzeyde inhibe etmiştir.

Real-time PCR analizleri ile elde edilen bulgular, Genistein'in MCF-7 hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak apoptoz sürecini aktive ettiğini göstermektedir. AZD5991 ile yapılan uygulamalarda ve kombine tedavi grubunda ise, pro-apoptotik genlerin ekspresyonundaki artış sınırlı kalmış ve anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durum, Genistein'in tek başına apoptozu daha belirgin şekilde tetiklediğini düşündürmektedir.

Western blot analizleri ile elde edilen bulgular Genistein'in MCF-7 hücrelerinde anti-apoptotik proteinleri baskılayıp, pro-apoptotik sinyalleri artırarak apoptozu indüklediğini göstermektedir. AZD5991 ile kombinasyonu ile de sinerjik bir yanıt oluşturmuştur. Bu bulgular, aynı zamanda Mcl-1'in meme kanseri hücrelerinde apoptozun engellenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini ve bu proteinin inhibitörler aracılığıyla hedeflenmesinin tedavi açısından önemli bir potansiyel taşıyabileceğini de göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma genistein ile Mcl-1 inhibitörü AZD5991'in birlikte kullanımının sinerjik bir etki oluşturarak meme kanseri hücreleri üzerinde güçlü antiproliferatif, apoptotik ve anti-migrasyon etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, özellikle tedaviye dirençli meme kanseri alt tiplerinde yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından değerli olup, genistein gibi doğal bileşiklerin hedefe

yönelik ajanlarla kombine edilmesinin ileri prelinik ve klinik çalışmalarda değerlendirilmesinin yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

Açıköz, A., & Yıldız, E. A. (2017). Meme kanseri etiyolojisi ve risk faktörleri. *Ergoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi*, 5(1), 45-56.

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>

Andreeva, T. V., Efremenko, A. V., Feofanov, A. V., Lyubitelev, A. V., Korovina, A. N., Studitsky, V. M., & Maluchenko, N. V. (2024). The Effect of Genistein on the Structure of Nucleosomes and the Formation of Complexes with PARP1. *Biophysics*, 69(3), 359-369.

Aslan, C. (2008). Hormonların endometriyum hücrelerinde hücre proliferasyonunu düzenleyen mekanizmalar üzerine etkileri (Master's thesis, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.).

Atagün, G., Eren, Z., & Gürkanlı, İ. (2011). Apoptoziste mitokondrinin rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(2), 49-53.

Babacan, D. (2023). Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 49(1), 1-10.

Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., & Sarkar, F. H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*, 269(2), 226–242.

Beauchamp, M. C., Knafo, A., Yasmeen, A., Carboni, J. M., Gottardis, M. M., Pollak, M. N., Gotlieb, W.H., 2009, BMS 536924 sensitizes human epithelial ovarian cancer cells to the PARP inhibitor, 3-aminobenzamide, *Gynecol Oncol*, 115, 193 198.

Bilal, I., Chowdhury, A., Davidson, J., & Whitehead, S. (2014). Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. *World journal of clinical oncology*, 5(4), 705–712. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.705>

Bolomsky, A., Vogler, M., Köse, M.C. et al. MCL-1 inhibitors, fast-lane development of a new class of anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 13, 173 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01007-9>

Brady, H. J., & Gil-Gómez, G. (1998). Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(6), 647-650.

Calaf, G. M., Crispin, L. A., & Quisbert-Valenzuela, E. O. (2024). Noscapine and Apoptosis in Breast and Other Cancers. *International journal of molecular sciences*, 25(6), 3536. <https://doi.org/10.3390/ijms25063536>

Chen, S. S., Michael, A., & Butler-Manuel, S. A. (2012). Advances in the treatment of ovarian cancer: a potential role of antiinflammatory phytochemicals. *Discovery medicine*, 13(68), 7–17.

Choi, Y. H., Lee, W. H., Park, K. Y., & Zhang, L. (2000). p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91(2), 164-173.

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929–2943.

DeSantis, C.E. et al, (2019), Breast Cancer Statistics, 2019 CA CANCER J CLIN 2019;69:43845, <https://doi.org/10.3322/caac.21583>

Drăgănescu, M., & Carmocan, C. (2017). Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, 112(4), 413–417. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.112.4.413>

Ekinci Deniz, F. (2023). Meme kanseri. Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Ana Bilim Dalı.

Eliyatkın N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*. 2015 Apr 1;11(2):59-66. doi: 10.5152/tjbh.2015.1669. PMID: 28331693; PMCID: PMC5351488.

El-Deiry W. S. (2016). p21(WAF1) Mediates Cell-Cycle Inhibition, Relevant to Cancer Suppression and Therapy. *Cancer research*, 76(18), 5189–5191. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2055>

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Garbiec, E., Cielecka-Piontek, J., Kowalówka, M., Hołubiec, M., & Zalewski, P. (2022). Genistein-Opportunities Related to an Interesting Molecule of Natural Origin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 815. <https://doi.org/10.3390/molecules27030815>

H. S. Tuli vd., "Molecular mechanisms of action of genistein in cancer: Recent advances", *Frontiers in Pharmacology*, c. 10. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fphar.2019.01336.

Karabekir, G., Demircan, G., & Özdaş, Ş. (2017). Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 3(1), 27-34.

Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. (2022). Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 27(7-8), 482–508. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y>

Kolak, A., Kamińska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukielka-Budny, B., Burdan, F. (2017). Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med.*, 24(4), 549-553. <https://doi.org/10.26444/aaem/75943>

Letai, A. (2017). Apoptosis and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 275–294.

Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., Zheng, X., & Li, Q. (2017). Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, 8(14), 23996–24008. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15098>

Liu, T., Lam, V., Thieme, E., Sun, D., Wang, X., Xu, F., Wang, L., Danilova, O. V., Xia, Z., Tyner, J. W., Kurtz, S. E., & Danilov, A. V. (2021). Pharmacologic Targeting of Mcl-1 Induces Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in B-Cell Lymphoma Cells in a TP53- and BAX-Dependent Manner. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 27(17), 4910–4922. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0464>

Lukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 25;13(17):4287. doi: 10.3390/cancers13174287. PMID: 34503097; PMCID: PMC8428369.

Makki J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights. Pathology*, 8, 23–31. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>

Marchiò, C., Annaratone, L., Marques, A., Casorzo, L., Berrino, E., & Sapino, A. (2021). Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Seminars in cancer biology*, 72, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.016>

Mas-Bargues, C., Borrás, C., & Viña, J. (2022). Genistein, a tool for geroscience. *Mechanisms of ageing and development*, 204, 111665. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2022.111665>

Mashimo, M., Onishi, M., Uno, A., Tanimichi, A., Nobeyama, A., Mori, M., Yamada, S., Negi, S., Bu, X., Kato, J., Moss, J., Sanada, N., Kizu, R., & Fujii, T. (2021). The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100046. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014479>

McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P., & Freedman, G. M. (2016). Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 57 Suppl 1, 9S–16S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>

MEMİŞOĞLU, E. (2020). MEME KANSERİNDE TANI VE KLİNİK EVRELEME.

Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Badoiu, S. C., Stefani, C., & Greabu, M. (2021). PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 173. <https://doi.org/10.3390/ijms22010173>

Nascimento RG, Otoni KM, (2020), Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?, 2020, *Mastology* 2020;30:e20200024, <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>

Nathanson, S. D., Detmar, M., Padera, T. P., Yates, L. R., Welch, D. R., Beadnell, T. C., Scheid, A. D., Wrenn, E. D., & Cheung, K. (2022). Mechanisms of breast cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 39(1), 117–137. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10090-2>

Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore)*. 2024 Jan 19;103(3):e36905. doi: 10.1097/MD.00000000000036905. PMID: 38241592; PMCID: PMC10798762.

Ordueri, N. E. G., Elgün, T., Şahin, P., Kuşcu, N., & Özenci, Ç. Ç. (2018). Postnatal fare testis gelişiminde kaspaz-bağımlı ve kaspaz-bağımsız apoptozun değerlendirilmesi.

Ouyang vd., 2012: 48 Ouyang, L., vd. (2012). Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498. 8).

Ouyang, L., vd. (2012). Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.

Peña-Blanco, A., & García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), 416–431. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>

Perego, P., Giarola, M., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M. A., Miyashita, T., Reed, J. C., & Zunino, F. (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer research*, 56(3), 556--562.

Phuah, N. H., & Nagoor, N. H. (2014). Regulation of microRNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies. *BioMed research international*, 2014, 804510. <https://doi.org/10.1155/2014/804510>

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Prietsch, R. F., Monte, L. G., da Silva, F. A., Beira, F. T., Del Pino, F. A., Campos, V. F., Collares, T., Pinto, L. S., Spanevello, R. M., Gamaro, G. D., & Braganhol, E. (2014). Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. *Molecular and cellular biochemistry*, 390(1-2), 235–242. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-1974-x>

Raheem, F., Karikalan, S. A., Batalini, F., El Masry, A., & Mina, L. (2023). Metastatic ER+ Breast Cancer: Mechanisms of Resistance and Future Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences*, 24(22), 16198. <https://doi.org/10.3390/ijms242216198>

Sancho, M., Leiva, D., Lucendo, E., & Orzáez, M. (2022). Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *The FEBS Journal*, 289(20), 6209-6234.

Sancho, M., Leiva, D., Lucendo, E., & Orzáez, M. (2022). Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *The FEBS Journal*, 289(20), 6209-6234

Selvakumar, P., Badgeley, A., Murphy, P., Anwar, H., Sharma, U., Lawrence, K., & Lakshmikuttyamma, A. (2020). Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Nutrients*, 12(3), 761. <https://doi.org/10.3390/nu12030761>

Sert, P. İ., & Küçükkılınç, T. T. (2022). Current Approaches in Breast Cancer Treatment. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 42(1), 46–59.

Shamloo, B., & Usluer, S. (2019). p21 in Cancer Research. *Cancers*, 11(8), 1178. <https://doi.org/10.3390/cancers11081178>

Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Imran, M., Rauf, A., Nadeem, M., Gondal, T. A., Ahmad, B., Atif, M., Mubarak, M. S., Sytar, O., Zhilina, O. M., Garsiya, E. R., Smeriglio, A., Trombetta, D., Pons, D. G., Martorell, M., Cardoso, S. M., Razis, A. F. A., Sunusi, U., Kamal, R. M., ... Calina, D. (2021). Genistein: An Integrative Overview of Its Mode of Action, Pharmacological Properties, and Health Benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 3268136. <https://doi.org/10.1155/2021/3268136>

Shim, H. Y., Park, J. H., Paik, H. D., Nah, S. Y., Kim, D. S., & Han, Y. S. (2007). Genistein-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves calpain-caspase and apoptosis signaling kinase 1-p38 mitogen-activated protein kinase activation cascades. *Anti-cancer drugs*, 18(6), 649--657. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3280825573>

Spagnuolo, C., Russo, G. L., Orhan, I. E., Habtemariam, S., Daglia, M., Sureda, A., Nabavi, S. F., Devi, K. P., Loizzo, M. R., Tundis, R., & Nabavi, S. M. (2015). Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 6(4), 408–419. <https://doi.org/10.3945/an.114.008052>

Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409--1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>

Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast Cancer Treatment. *American family physician*, 104(2), 171–178.

Tungsukruthai, S., Petpiroon, N., & Chanvorachote, P. (2018). Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis and Potential Anti-metastatic Compounds. *Anticancer research*, 38(5), 2607–2618. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12502>

Wang, Yiling, & Minden, A. (2022). Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11046

Wei, A. H., Roberts, A. W., Spencer, A., Rosenberg, A. S., Siegel, D., Walter, R. B., Caenepeel, S., Hughes, P., McIver, Z., Mezzi, K., Morrow, P. K., & Stein, A. (2020). Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. *Blood reviews*, 44, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100672>

Williams, M. M., & Cook, R. S. (2015). Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance?. *Oncotarget*, 6(6), 3519–3530. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2792>

Williams, M. M., & Cook, R. S. (2015). Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance?. *Oncotarget*, 6(6), 3519–3530. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2792>

Winder, M. L., & Campbell, K. J. (2022). MCL-1 is a clinically targetable vulnerability in breast cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 21(14), 1439--1455. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2054096>

Youness RA, Gad AZ, Sanber K, Ahn YJ, Lee GJ, Khallaf E, Hafez HM, Motaal AA, Ahmed N, Gad MZ. Targeting hydrogen sulphide signaling in breast cancer. *J Adv Res.* 2020 Jul 16;27:177-190. doi: 10.1016/j.jare.2020.07.006. PMID: 33318876; PMCID: PMC7728592.

Zhang, Z., Wang, C. Z., Du, G. J., Qi, L. W., Calway, T., He, T. C., ... & Yuan, C. S. (2013). Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53-dependent pathway in human colon cancer cells. *International journal of oncology*, 43(1), 289-296.

