

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE SOMATOSTATİN VE
VİTAMİN C'NİN HÜCRE MEMBRAN LİPİD PROFİLİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Ayşegül HANİKOĞLU

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE SOMATOSTATİN VE
VİTAMİN C’NİN HÜCRE MEMBRAN LİPİD PROFİLİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Ayşegül HANİKOĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tomris ÖZBEN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-2096 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca bu tez TÜBİTAK ve Avrupa Birliği COST-STSM-CM1201 Programı ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

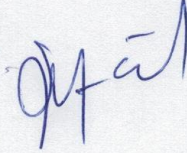
24.06.2019

İmza

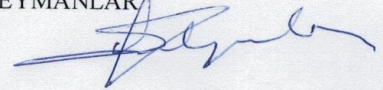
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi.



Üye : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi



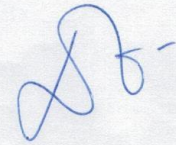
Üye : Prof. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ayşegöl ÇÖRT
Pamukkale Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ayşenur YEĞİN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

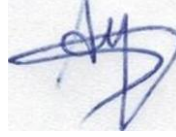
Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Ayşegül HANİKOĞLU



Danışman

Prof. Dr. Tomris ÖZBEN



TEŐEKKÜR

Bu araştırmanın alt yapısının kurulması amacı ile, projenin İtalya'da yürütölen kısmı için STSM-COST desteğini sağlayan, çalışmanın planlanması, yürütölmesi ve sonuçlandırılmasında çok önemli katkılar sağlayan, ayrıca eğitimim süresince bana her aşamada destek sağlayan değerli akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Tomris ÖZBEN'e, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve laboratuvarının kapılarını aan Sayın Prof. Dr. Carla Ferreri'ye,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum bölüm hocalarım, ekip arkadaşlarıma

Doktora eğitimim boyunca benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm personeline,

Öğrenim hayatım boyunca desteğini, ilgisini ve fedakarlıklarını hep hissettiğim, bana her koşulda destek olan ve benim bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan Aileme,

Eşimin yıllarca verdiği destek için ve bu yıl doğan ikiz kızlarımız Deniz & Duru hayatımızda var olduğunuz için

Sonsuz Teőekkür Ederim

Ayşegöl Hanikoğlu

ÖZET

Amaç: Yaptığımız literatür taramasında Somatostatin (SST) ve Vitamin C'nin (Vit C) meme kanserinde membran lipid profili üzerindeki etkisi ile alakalı bilgi bulamadık. Gaz-likid kromatografisi, yağ asitlerinin tayini için uzun zamandır kullanılan son derece gelişmiş bir tekniktir. Çalışmamızda meme kanseri hücre soylarına ait MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinin membran lipid profilini bu teknik ile belirlemeyi amaçladık.

Yöntemler: SST ve Vit C'nin inkübasyonlarda kullanılacak dozları, MTT testi ile belirlendi. Yağ asidi analizi için 24 saat SST, Vit C veya SST+Vit C ile inkübe edilmiş iki meme kanser hücrelerinde membran lipid izolasyonu, ekstraksiyon, metil esterlerine türevlendirme ve gaz kromatografi aracılığı ile karakterizasyon basamakları sırası ile uygulandı. Ayrıca bu hücrelerin, hücre sinyal iletiminde önemli rol oynayan MAPK ve EGFR üzerindeki etkileri araştırıldı.

Bulgular: MCF-7 meme kanser hücrelerinde; Somatostatin ve Vitamin C kombini omega-3, dekosapentaenoik asit, araşidonik asit mono-trans ve MUFA seviyelerini arttırırken, omega-6 linoleik asit seviyesinin azalmasına neden oldu. MDA-MB231 meme kanser hücrelerinde; Vit C, membranın yeniden şekillenmesinde önemli olan stearik asit ve trans-linoleik asit seviyelerinin artmasına; araşidonik asit, DPA, dokosahekzaenoik asid ve omega-6 linoleik asit seviyelerinin azalmasına yol açtı. MCF-7 meme kanser hücrelerinde; SST, Vit C ve SST+Vit C MAPK ve EGFR düzeylerini azalttı. MDA-MB231 meme kanser hücrelerinde ise p-P44/42 MAPK düzeyinde azalış, EGFR düzeyinde artış bulundu.

Sonuç: Bulgularımıza dayanarak meme kanser hücrelerinde lipid izomerizasyonu ve sinyal yollarına sitostatik ve antioksidanın birlikte etki ettiği gösterilmektedir. Lipidom analizi sonuçları SST+Vit C'nin indüklediği yağ asidi yeniden düzenlenmesinin rolünü ve membranın önemini ortaya koyarken hücre cevabının ve meme hücre tümörleri gibi hastalıkların etkilenmesine yönelik lipid-tabanlı stratejilerin potansiyelini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Somatostatin, Vitamin C, Antioksidanlar

ABSTRACT

Objective: There is no information about the effect of Somatostatin (SST) and Vitamin C (Vit C) on the membrane lipid profile in breast cancer. Gas-liquid chromatography is a highly developed technique for the determination of fatty acids. In our study, we aimed to determine the membrane lipid profile of MCF-7 and MDA-MB231 cells from breast cancer cell lines by this method.

Methods: The doses of SST and Vit C to be used in incubations were determined by MTT test. For fatty acid analysis, membrane lipid isolation, extraction, derivatization to methyl esters and characterization steps in two breast cancer cells incubated with SST, Vit C or SST+Vit C for 24 hours were used respectively. In addition, their effects on MAPK and EGFR which play an important role in cell signal transduction were investigated.

Results: MCF-7 breast cancer cells: SST and Vit C combination increased omega-3, decosapentaenoic acid, arachidonic acid mono-trans and MUFA levels, while decreased omega-6 linoleic acid levels. MDA-MB231 breast cancer cells: Vitamin C increased the levels of stearic acid and trans-linoleic acid, which are important in reshaping the membrane; in contrast, arachidonic acid, decosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and omega-6 linoleic acid levels decreased. We investigated the effect of these compounds on two different signalling pathways in these cell lines. In MCF-7 breast cancer cells; SST, Vit C and SST + Vit C reduced MAPK and EGFR levels. In MDA-MB231 breast cancer cells; SST+Vit C decreased p-P44/42 MAPK and increased EGFR levels.

Conclusion: Based on our findings, lipid isomerization and signaling pathways in breast cancer cells have been shown to change in response to somatostatin, Vit C and their combinations. The results of lipidome analysis highlighted the role of the SST+Vit C induced fatty acid membrane remodeling, and suggest the potential of lipid-based strategies for influencing cell response in breast cancer cells.

Key words: Breast cancer, Somatostatin, Vitamin C, Antioxidants

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme kanseri	3
2.2. Somatostatin	5
2.3. Somatostatin Reseptörleri	6
2.4. Vitamin C	7
2.5. Membran Lipidleri	9
2.6. Yağ asitleri	11
2.7. Trans yağ asitlerinin Tanımlanması	14
2.8. Serbest Radikaller	16
2.9. MAPK ve EGFR Sinyal Kaskadları	17
2.10. Gaz Kromatografik Analiz	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Hücre Kültürü ve kullanılan Çözeltiler	20
3.2. Hücrelerin Çoğaltılması	20
3.3. Hücrelerin Dondurulması	21
3.4. Hücrelerin Çözülmesi	21
3.5. Deney grupları	21
3.6. Sitotoksite Ölçümleri	23

3.7. Membran İzalasyonu, Lipidlerin Saflaştırılması ve Metil Ester Türevlerine Çevrilmesi	24
3.8. Gaz Kromatografik Analiz	24
3.9. EGFR ve MAPK Sinyal Kaskad Analizleri	25
3.11. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. MCF-7 ve MDA-MB231 Hücrelerinde Somatostatin ve Vitamin C'nin Sitotoksitesisi	29
4.2. MCF-7 Hücrelerinin Membran Fosfolipidlerindeki Yağ Asitleri	30
4.3. MDA-MB231 Hücrelerinin Membran Fosfolipidlerindeki Yağ Asitleri	34
4.4. MAPK Proteinlerinin Ekspresyonları	37
4.4.1. MCF-7 Hücrelerine ait MAPK Proteinlerinin Ekspresyonları	37
4.4.2. MDA-MB231 Hücrelerine ait MAPK Proteinlerinin Ekspresyonları	38
4.5. EGFR Proteinlerinin Ekspresyonları	39
4.5.1. MCF-7 Hücrelerine ait EGFR Proteinlerinin Ekspresyonları	39
4.5.2. MDA-MB231 Hücrelerine ait EGFR Proteinlerinin Ekspresyonları	40
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Bazı Doymuş Yağ Asidi Örnekleri	12
Tablo 2.2.	Bazı Doymamış Yağ Asidi Örnekleri	12
Tablo 2.3.	Doymuş, Tekli Doymamış ve Çoklu Doymamış Yağ Asidi Örnekleri	13
Tablo 3.1.	EGFR Standart Stok Solüsyon Hazırlanması	25
Tablo 4.1.	MCF-7 ve MDA-MB231 Hücrelerinin Somatostatin ve Vitamin C EC ₅₀ Değerleri	30
Tablo 4.2	MCF-7 Hücreleri Membran Yağ Asidlerinin % Alan Verileri	31
Tablo 4.3.	MDA-MB231 Hücreleri Membran Yağ Asidlerinin %Alan Verileri	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Cis ve Trans Yağ Asidi Zincirleri	13
Şekil 2.2.	Oleik asid (<i>aka</i> cis- Δ 9-Oktadekenoik asid, C ₁₈ H ₃₄ O ₂ ya da 18:1-9c) izomerleri.	15
Şekil 3.1.	EGFR Standart Konsantrasyonun Tüpte Hazırlanışı	26
Şekil 3.2.	MAPK proteinlerin Şematik Görünümü	27
Şekil 4.1.	Farklı dozlardaki Somatostatin ve Vitamin C ile 24 saat inkübe edilen MCF7 ve MDA-MB231 hücrelerinde % maksimum. n=6; ortalama \pm SD	29
Şekil 4.2.	Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücre membranlarının Palmitik asid (16:0), Stearik asid (18:0), Oleik asid (9c-18:1) ve Araşidonik asid düzeyleri.	33
Şekil 4.3.	Somatostatin, VitaminC ve Somatostatin+VitaminC inkübasyonundan sonra, MUFA, PUFA, SFA, Total Trans, Total ω 3, Total ω 6 yağ asidleri düzeylerindeki değişimler	34
Şekil 4.4.	Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücre membranlarının Palmitik asid (16:0), Stearik asid (18:0), Oleik asid (9c-18:1) ve Araşidonik asid düzeyleri.	36
Şekil 4.5.	Somatostatin, VitaminC ve Somatostatin+VitaminC inkübasyonundan sonra, MUFA, PUFA, SFA, Total Trans, Total ω 3, Total ω 6 yağ asidleri düzeylerindeki değişimler.	37
Şekil 4.6.	Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde; MAPK sinyal ileti yolundaki AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204),	

	S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) proteinlerin ekspresyonları	38
Şekil 4.7.	Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinde; MAPK sinyal ileti yolundaki AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) proteinlerin ekspresyonları	39
Şekil 4.8.	Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde; EGFR protein ekspresyonu	40
Şekil 4.9.	Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinde; EGFR protein ekspresyonu	40

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMPK	:	AMP-aktive Protein Kinaz
CH₂-	:	Metilen
cAMP	:	Siklik Adenozin Monofosfat
-COOH	:	Karboksil grubu
CH₃	:	Metil
DGLA w6	:	Dihomo-Gamma Linoleik Asit
DHA	:	Dokosaheksaenoik Asit
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DPA	:	Dekosapentaenoik Asit
ERK	:	Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz
EPA	:	Eikasopentaenoik Asit
E2	:	Östrojen
EGFR	:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FA	:	Yağ asidi
FBS	:	Fetal Sığır Serumumu
FAME	:	Serbest Yağ Asidi Metil Esteri
GLC	:	Gaz-Likid Kromatografisi
GHRH	:	Hipotalamustan Salgılanan Büyüme Hormonu
JNK	:	c-jun NH ₂ - terminal kinaz

MAPKKK	:	MAP kinaz kinaz kinaz
MAPKK	:	MAP kinaz kinaz
MAPK	:	Mitojen-aktive protein kinaz
MUFA	:	Tekli Doymamış Yağ Asidi
MTT	:	3 (4,5-dimetiltiyazol-2-yl) 2,5 difenil tetrasodyum bromid
MCF7	:	ER+/PR+ Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB231	:	ER-/PR- Meme kanseri hücre hattı
PBS	:	Fosfat Tamponu
PUFA	:	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
SST	:	Somatostatin
SSTR	:	Somatostatin Reseptörleri
SST-28	:	Somatostatin-28
SST-14	:	Somatostatin-14
SFA	:	Doymuş Yağ Asidi
TFA	:	Trans Yağ Asidi
Vit C	:	Vitamin C

1. GİRİŞ

Son yirmi yılda lipid araştırmaları artış göstermektedir. Biyolojik alışmalar, kimyasal analitik; lipid metabolizması ve beslenme ile alakalı sağlık durumu arasında ciddi ilişkiler kurmuştur. Doku, organizma veya hücrede toplam lipid profili olarak 'lipidom'un önemli oranda çalışılması için kullanılan lipidomik analizi, son yıllarda araştırmalarda sıklıkla başvurulan teknolojidir. Fosfolipidler, trigliseritler gibi yağ asidi içeren yapılar önemli fonksiyonlara ve biyolojik-yapısal aktiVit Elere sahiptir. Lipidler tranformasyonları ve reaktiVit Eleri açısından biyolojik-sağlık anlamında kritik role sahip moleküllerdir (Lepionka ve ark., 2019).

Yağ asitlerinin eşitleri çok fazladır. Yağın türüne göre, yağ asitlerinin miktarı ve türü değişmektedir. Yağ asitlerinin genelinde 4-24 arasında karbon atomu bulunur. 16 ve 18 karbonlu yağ asitleri, yağlarda yaygın olarak bulunur. Bu moleküllerdeki karbon atomları birbirine tek veya çift bağla bağlanır. Doymamış yağ asitlerinin yapısında çift bağ, doymuş yağ asitlerinde tek bağ bulunur. Bu ift bağlar genellikle cis konfigürasyonundadır. Homeoviskoz adaptasyonda, cis geometri kilit özelliktir. Çünkü membran homeostazisi cis doymamış ve doymuş yapılar arasındaki denge ile devam eder. Esansiyel oluşundan dolayı cis geometri çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) ve tekli doymamış yağ asidi (MUFA) biyosentezi sırasında bölge stereo-selektif enzimatik aktiVit E ile kontrol edilir (Sellem ve ark., 2018). Doymamış yağ asitleri sinyal aktiVit Esi ve metabolik fonksiyonlar sırasında meydana gelen oksidatif stres ile bağlantılıdır. MUFA ve PUFA'lar biyokimyasal açıdan etkilenir ve sağlık problemlerine sebep olur (He ve ark., 2018). Uzun yıllardır, MUFA ve PUFA cis çift bağ geometrisi dikkat çekmiştir. Termodinamik olarak stabilliği az olan cis izomer yapı, doğal lipidlerde sık görülmektedir (Chatgialıoglu ve Ferreri, 2005; Ferreri ve Chatgialıoglu, 2005). Hidrojenasyon sırasında bazı çift bağlar konfigürasyon değiştirerek "Trans" şekle dönüşür. Trans yağlar (endüstriyel olarak üretilen) sağlıksızdırlar, çünkü metabolizmada trans yağları yıkan uygun enzimler olmadığı için parçalanamazlar. Biyolojik membranlar büyük oranda protein, ve lipidden, düşük miktarda karbohidratlardan oluşur. Biyofiziksel zelliklerinin biyolojik cevap ile alakalı olması nedeni ile kritik öneme sahiptirler. Membranların biyolojik fonksiyonları temel fizik prensiplerine göre

kontrol edilmektedir. Hücre membranının görevini yapabilmesi için çift bağların cis konfigürasyonlarında olması önemlidir. Kanser tedavisinde kullanılan bazı radyasyon ve kemoterapötiklerin reaktif oksijen türleri meydana getirdiği bilinmektedir. Dokularda meydana gelen serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS); karbonhidrat, protein, DNA ve lipidler vs. biyolojik açıdan önem arzeden moleküllere zarar verebilmektedir (Bergandi ve ark., 2019).

SST önemli bir nöropeptiddir, farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptir. En önemli fonksiyonu, hücre proliferasyonunu inhibe etmesidir. SST analogları hepatosellüler karsinomlarda çok yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca, SST'nin gastrointestinal kanal üzerinde güçlü inhibitör etkisi vardır (Ulaner ve Bodei, 2019). Vitamin alımının da kanser oluşumunu engellediği farklı çalışmalarda ifade edilmektedir. Vit C oksidan molekülleri ortamdan uzaklaştırır. Serbest oksijen radikalleri DNA'da kırıklar oluşturarak kanser gelişimini hızlandırır. Bu nedenle antioksidan maddeler kanserden korunma mekanizmasında önem arz eder (Rubis ve ark., 2019). Çalışmamızda SST ve Vit C'nin meme kanseri hücreleri membran lipid profili üzerine olan etkisi karşılaştırıldı ve SST+Vit C kombinasyonunun uygulanmasıyla sonuçlar araştırıldı. Lipid profilinin tayininde en etkili metod gaz kromatografisidir. Gaz kromatografisiyle, yağ asitleri metil ester türevlerine dönüştürülmektedir. Çalışmamızda meme kanseri hücrelerine ait membran lipid profili bu metod ile belirlendi ve analiz sonucunda membranda bulunan yağ asitlerinin profilleri tanımlandı ve cis-trans izomerleri yüzdeleri ile birlikte gösterildi. Literatürde SST ve Vit C'nin membran lipid profili üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma yoktur. Bu sebepten, çalışmamız literatüre ışık tutacaktır. Ayrıca belirlenen dozlarda SST, Vit C veya SST+Vit C kombinasyonu ile inkübe edilen hücrelerde MAPK ve EGFR proteinlerinin ekspresyon tayinleri yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kanser; kontrolsüz hücre çoğalması-invazyon-metastaz ile karakterizedir. Süreç genellikle hücrenin genetik mutasyonu ile başlar. Sırayla hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması, dokulara invazyonu ve başka dokulara metastaz aşamaları izler (Steinfors ve ark., 2016). Meme hastalıklarıyla alakalı ilk yazılı kayıtlar Mısır'da bulunmuştur. Meme kanserinin oranı Çin'de, Afrika'da, Doğu Asya ülkelerinde düşüktür. Güney Amerika'nın bazı kısımlarında, Kuzey Amerika'da Brezilya-Arjantin dahil yüksek oranlarda meme kanseri görülmektedir. Kadınlarda bu oran menopoza sürecine kadar yaş ile artış göstermektedir. Over sikluslarının toplam sayısının artmasıyla meme kanseri riski artmaktadır (Bhikoo ve ark., 2011). Meme kanserlerinin meydana gelmesi ve gelişmesinde östrojen (E2) olmak üzere birkaç hormonun da rol oynadığı bildirilmektedir. Bu sebepten dolayı erkeklere oranla kadınlarda meme kanseri yüz kat daha sık görülmektedir (Ji ve ark., 2016). Geçmiş yıllarda birçok baskılayıcı genin ve onkogenin keşfedilmesi ile hastalığın steroid düzenleyici yollarla ilişkisi ve progresyonuyla büyüme faktörlerinin etkileriyle aydınlatılmaya başlanmıştır (Holst-Hansen ve ark., 2001). Ama günümüzde hala meme kanserinin oluşma nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde meme kanseri kronik bir hastalık olarak görülmektedir. Meme kanseri hastaları arasında tanıdan sonraki doğal seyir farklılıkları teşkil etmektedir. Örneğin aynı ebatta tümöre sahip takip grubundaki hastaların bazılarında tümör nüksü kısa sürede tespit edilirken, diğer hastaların sağlıklı yaşamaya devam ettiği görülmektedir. Meme kanseri olan hastalar arasındaki biyolojik davranış ve klinik farklılıklarını, hastalığın hızla ilerleyebileceği yüksek riskli grubu tespit etmek için kullanılan prognostik faktörler vardır (Miyama ve ark., 2016; Parsa ve ark., 2016). Meme kanserleri histolojik olarak iki ana gruba ayrılır; invaziv ve in situ karsinomlar. Neoplastik hücreler invaziv karsinomda, bazal membranı geçerek stromaya invazyon göstermektedir. Fakat malign epitelyal hücreler, in situ karsinomda bazal membranla çevrilidir ve asinus-ductus içinde sınırlı bir şekildedir. İn-vitro olarak, meme kanseri hücre soyları ile meme kanseri araştırmaları yapılmaktadır. Bunlara örnek; T47D, MDA-MB231 ve MCF-7 hücre soyları mevcuttur. Bu hücre soyları; östrojen-progesterona

pozitifdir ve negatifliği ile invazyon özellikleri sebebiyle farklılık göstermektedir. T47D hücresi duktal karsinoma kaynaklı östrojen ve progesteron pozitif, invazif değildir. MCF-7 hücresi, insan adenokarsinomu kaynaklı, östrojen pozitif, invazif değildir. MDA-MB231 hücresi, insan adenokarsinomu kaynaklı, östrojen negatif, invazif bir hücre soyudur. Meme kanserinin sebepleri; ailesel %15, genetik %5-10 ve sporadik %70-80 olarak gösterilmektedir. Kadınlarda otuz yaş üzeri risk artmaktadır. Menopoza giriş devresi olduğu için 45-55 yaşları arasında artış oranında azalma, 55 yaşından sonraki dönemde görülme oranı hızlı bir şekilde artmaktadır. Meme kanseri olan kadınların %50'sinin 65 yaşını geçmiş olduğu görülmektedir ve bu da yaşam boyu senelik taramanın önemini göstermektedir (Scharl ve Salterberg, 2016). Meme fonksiyonu ve gelişmesi birden fazla hormonun etkisiyle meydana gelmektedir. Tiroid hormonları, oksitosin, büyüme hormonu, kortizol, progesteron, östrojen ve prolaktin bu hormonların en önemlileridir. Bu hormonların salgılanması hipotalamus, overların nörohumoral ve hipofiz kontrolündedir. İn-vitro olarak meme üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Fakat insanda in-vivo olarak bazı hormonların etkileri net olarak bilinmemektedir (Quenel-Tueux ve ark., 2015). Meme kanser hücrelerinde; progesteron ve östrojen hormonları promotor ve mutajenik etki göstermektedir. Östrojen hormonunun, mutajenik etkisi östrojen reseptörler ile düzenlenmektedir. Fonksiyonel östrojen reseptörüne sahip olan meme kanser hücresinde östrojenin mutajenik etkisi, hücre kültür çalışmalarında ispatlanmıştır. Başta meme kanseri olmak üzere, bir grup neoplastik hastalıkta progesteron ve östrojen reseptörlerinin prognostik önemi belirlenmiştir (Giri ve ark., 1989). Meme kanseri erken teşhis ile tedavi edilebilir bir hastalıktır. Meme kanserinin bugün de bilinen en etkin tedavisi, tümörün ve tümörden kopan hücrelerin yayıldığı lenf nodlarının cerrahi olarak çıkarılması işlemidir. Radyoterapi ve kemoterapi diğer tedavi şekilleridir. Radyoterapi; kanser hücrelerini çoğalmalarını önlemek- öldürmek için yüksek enerjili x ışınları veya diğer türde radyasyonun kullanıldığı bir tedavidir. Kemoterapi ise anti-kanser ilaçlarının kullanılmasıyla tümör hücrelerinin büyümesinin kontrol altına alınması veya önlenmesidir (White ve ark., 2016). Tedavi şekli olarak, meme kanseri kemoterapiye duyarlıdır. Eğer metastatik hastalıkta şifa sağlanamazsa, kemoterapi ve eğer hormon reseptörleri pozitifse aromataz inhibitörü veya tamoksifen ilaçları ile uzun süreli yaşam sunabilmektedir. Genelde kullanılan kemoterapötikler

taksan ve antrasiklin grubu ilaçlarıdır (Rau ve ark., 2015). Meme kanserinde uygulanan hormonal tedavi ile östrojen hormonu bloke edilir ve hormonun aktif duruma geçmesi engellenir, böylece meme kanseri hücrelerinin çoğalması durdurulur. Bu tedavinin amacı ise, cerrahi, kemoterapi yada radyoterapiden sonra vücudun herhangi bir yerinde kalmış olabilecek kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesidir. Meme kanseri tedavisinde, rutin kanser tedavilerinde kullanılan hormon ve hormon antagonisti ilaçlar önemli yer tutar. Meme sintigrafisi; meme kanserinin teşhis etmede farklı radyonüklidler kullanılan invaziv olmayan bir görüntüleme metodudur. Galyum 67 işaretli somatostatin analogları ve meme sintigrafisi meme kanserinde rutinde kullanılmaktadır. Bu tetkik palpe edilebilir meme kitlesi taşıyan hastalarda benign patolojilerin malign patolojilerinden ayırt etmekte ek bilgi sağlamaktadır (Brem ve ark., 2005). Meme kanserinin tedavisi; tümörün evresi, büyüklüğü, büyüme hızı ve moleküler karakteristiklerine göre değişir. Meme kanserinde uygun tedavinin seçimi için temel gereklilik, öncelikle tümörün yayılımı ve mikroskopik özelliklerinin tam olarak ortaya konulmasıdır. Kullanılan tanı araçlarının ve edinilen bilgilerin tümü; hastalığın doğru evrelendirilmesine, nüks risklerinin belirlenmesine ve tedaviye alınacak yanıtın önceden saptanabilmesine yöneliktir. Son yıllarda meme kanserinin tedavi edilebilir olması, tedavi edilememiş olgularla ilgili detaylı serilere sahip olmayı engellemektedir. Uzun zamanlı takipler, istatistik olarak küratif tedavi uygulanan olguların normal populasyonla karşılaştığımızda daha yüksek mortalite riski taşıdıklarını ortaya koymaktadır. Tedaviden yirmibeş yıl sonra bile meme kanseri sebebiyle gözlenen mortalite oranı, normal populasyona göre onbeş kat daha fazladır. Son yıllara bakıldığı zaman meme kanseri oranında artış olmasına rağmen hastalığın mortalitesinde azalış vardır (Lundqvist ve ark., 2016). Hastalığın tedavisinde erken evrelerinde radyoterapi ve cerrahiyle beraber adjuvan amaçlı uygulanan kemoterapi ve ya hormonal tedavi hastaların sağkalımında önemli iyileştirmeler göstermiştir. Meme kanseri halen gelişmelerin yaşandığı ve yeni bilgilerin ortaya çıktığı araştırma alanıdır.

2.2. Somatostatin

Somatostatin hormonu, pankreasın Langerhans adacıklarının D-hücrelerinden ve hipotalamustan salınan 14 aminoasitli bir peptittir. Hipotalamustan büyüme hormonu salınmasını inhibe eden endojen bir maddedir. Hipotalamus ekstresinden büyüme

hormonu salgılayan hormonun (GHRH) izolasyonu sırasında tesadüf olarak keşfedilmiştir. Pankreas β hücrelerinden insülin salgılatan her uyarı, somatostatin'i D hücrelerinden hemen salgılatır. Somatostatin; inflamatuvar ve nöroendokrin bir hormondur (Eigler ve Ben-Shlomo, 2014). Birçok büyüme faktörlerinin ve hormonların salınımını inhibe eder ve antiproliferatif etkisiyle hücre döngüsü üzerinde etkisi vardır. Damar kasılmasını da inhibe eder (Lauder ve ark., 1997). Vasküler yeni model oluşumunu (remodeling) engeller (Bruns ve ark., 2000). Hücre çoğalmasını ve anjiyogenezi baskılar. Somatostatin'nin iki alt tipi vardır, bunlar somatostatin-14 (SST-14) ve sekretuvar bir ürün olan somatostatin-28 (SST-28)'dir. Somatostatin'in her iki formu da ortak bir pro-hormonun, prohormon konvertazıyla değiştirilmesinden sonra meydana gelir. Bu iki peptid, dokularda farklı miktarlarda bulunup, nörotransmitter olarak ya da otokrin- parakrin etki ile salgılanma, nöromodulasyon, hücre büyümesi, düz kas kasılması ve besin absorpsiyonu gibi farklı fizyolojik etkiler oluştururlar (Ding ve ark., 2014). SST-14 hipotalamus, beyin ve retinada yoğun olarak bulunur, gastrointestinal sistemde bulunan formu SST-28'dir (Stengel ve ark., 2011).

2.3. Somatostatin Reseptörleri

Anatomik olarak SST dağılımı çok geniştir. Birçok hedef organdaki biyolojik etkilerini beş farklı reseptör ailesiyle meydana getirir (Franck ve ark., 2017). SST reseptörlerinin (SSTR) beş farklı alt tipi, gen klonlama tekniği ile tanımlanmıştır. Bu reseptörlerin farklı alt tipleri değişik kromozomlar üzerindeki ayrı genleriyle farklı hedef organda tek başına veya birlikte eksprese olur. Bu moleküller farklı ikincil mesajcılara bağlandığı için hücre içi etki mekanizmaları da farklıdır. Bu reseptör alt grupların SST analoglarına bağlanma afiniteleri çeşitlidir. Bu çeşitlilik SST analoglarının farklı tanı-tedavi alanlarında kullanılmasına sebep olur (Y. C. Patel, 1997; Martin-Grace ve Tamagno, 2015; Dalm ve ark., 2016).

İnsandaki SST reseptörleri, kemirgendeki SST reseptörleriyle homoloji göstermektedir. Bu oran SSTR1'de % 99 iken; SSTR3, SSTR4, SSTR5 daha az korunmuştur, ayrıca %81-83 homoloji gösterir (Franck ve ark., 2017). Tüm SSTR reseptör alt tipleri G proteinleri ile eşleşmiş ve SST-28-SST-14'e yüksek affiniteyle bağlanırlar. SST-28, SSTR-5'e yüksek affinite göstermesi diğerlerinden farkı ortaya çıkarır. SSTR-2 ve

SSTR-1 beyinde fazla bulunan iki alt tipidir. SSTR4 hipokampüste en yoğun bulunur. SST'nin reseptörüyle bağlanması plazma zarında bulunan inhibitör G-proteinlerinin aktivasyonuna, hemen sonra adenil siklaz aktiVit Esini düşürerek hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) miktarında azalmaya sebep olur. SSTR'nin G-proteinine bağlı diğer ortak yolları, vanadat-duyarlı fosfotirozin fosfataz enziminin aktivasyonu ile mitojen-aktive protein kinazların (MAPK) modülasyonudur. SSTR'nin başka grupları, aynı zamanda voltaj bağımlı K⁺ kanallarına, Na⁺/H⁺ kanallarına, Ca⁺ kanallarına, glutamat reseptörlerine, fosfolipaz C ve fosfolipaz A'ya bağlıdır. Hücre içi Ca²⁺ ve cAMP seviyesinin azalmasıyla, hormon sekresyonunun azalması önemli mekanizmadır. SST, fosfotirozin fosfataz ve MAPK proteini üzerindeki etkileriyle, tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir (Theodoropoulou ve Stalla, 2013).

SST analogları olan, Octreotid asetat (SMS 201-995), ve Vapreotid'in (RC 160) civciv embriyo koryallantoik zar gelişim sırasında oluşan neovaskülarizasyonu inhibe ettikleri gösterilmiştir (Woltering ve ark., 1991). Güçlü bir SST analogu olan Octreotid asetatın koryoallantoik zar modelinde SSTR-2 ile bağlanıp anjiyogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkisini G proteinlerinin inhibitör alt tipleri, Ca ve c-AMP aracılığıyla meydana getirir (P. C. Patel ve ark., 1994). Günümüzde konservatif tedaviye cevapsız vakalarda, SST'nin sentetik analogu oktreotid sıklıkla kullanılmaktadır (Das ve Shah, 2010). SST analoglarının inhibitör etkileri farelerde proliferatif retinopati modelinde gözlenmiştir (Lutty ve ark., 2006). İnsan gözü retina pigment epitel hücrelerinde immunhistokimya ile SSTR gösterilmiş ve SSTR ekspresyonu insan retina pigment epitel hücre kültüründe reverse transkriptaz-PCR yöntemiyle doğrulanmıştır (Sall ve ark., 2004). İnsan retina endotel hücre kültüründe de, SSTR'nin varlığı gösterilmiştir (Grant ve ark., 1993).

2.4. Vitamin C

Canlılarda hücre içi savunma sisteminin parçası olan ve ROS'un meydana gelmesini engelleyen ya da etkilerini nötralize ederek oluşturdukları hasarı düşüren antioksidan diye isimlendirilen birçok savunma mekanizmaları vardır (Kurutas, 2016). Antioksidanlar direkt olarak serbest radikalleri/ROS'ları temizlerler ya da indirekt olarak serbest radikalleri veya onların ara ürünlerini metabolize edip zararsız ürünlere

dönüştürürler (Lushchak, 2015). Antioksidanlar iki sınıfa ayrılır; endojen ve ekzojen. Ekzojen antioksidanlar arasında ise Vit C, asetilsistein, allopürinol, trolox-C, folik asit, adenozin, mannitol sayılabilir.

İlk defa Albert Szent Györgyi Vit C'yi izole etmiştir ve "antiskorbüt öz" olarak adlandırmıştır. Yetmiş yakın yıldır askorbik asidin etkileri araştırılmaktadır. Vit C önemli bir antioksidandır, oksidan molekülleri ortamdan kaldırır ayrıca nitritleri redükte ederek nitrozaminlerin meydana gelmesini engeller. Okside Vit E'yi tekrar eski haline getirerek böylece bu vitaminin antioksidan etkileri artar. E ve C vitaminiyle, glutasyon'un serbest radikallere karşı savaşmada ciddi bir görevi vardır. Birkaç araştırma sonuçları ışığında bilim adamları doku glutasyon seviyesini arttırmak için, yüksek maliyeti olan "super oksidanlar" yerine, Vit C 'yi kullanmışlardır (Uetaki ve ark., 2015). Vit C'nin hücrel elemanları (DNA gibi) koruma özelliği ve antioksidan aktiVit Esine sahip olmasından dolayı kansere karşı koruyucudur. Vit C'nin kanser tedavisindeki yararlı etkilerinin vurgulandığı yayınlar bulunmaktadır. Fakat Vit C ile yapılan çeşitli araştırmalarda, Vit C'nin meme kanseri oluşumundaki koruyucu etkisi konusunda çeşitli ve çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada olumlu etki bildirilirken (Hunter ve ark., 1993), ABD'de yapılan diğer bir çalışmada uzun süre Vit C temin edenlerin ondört yıllık takibi neticesinde kanser riskinin azalması gözlenmemiştir (Graham ve ark., 1991). Epidemiyolojik çalışmalar son yıllarda VitD'nin meme kanserine karşı koruyucu rolü olduğunu göstermiştir (Tao ve ark., 2016). Fakat beta-karoten ve Vit E,C gibi antioksidanların meme kanseri riskine etkisi yönünde net-güçlü bir kanıt yoktur.

Akciğer kanserlerinde, serum Vit C düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Comstock ve ark., 2008). Bir çalışmada sigara içen grubun lenfositlerindeki mikronukleus sayısıyla Vit C'nin koruyucu etkisini göstermişlerdir (Schneider ve ark., 2001). Farklı bir çalışma da sigara içicilerde ve içmeyenlerde, Vit C'nin akciğer kanseri riskini tüm histopatolojik tipler için ve her iki cinsiyette düşmüş olduğu gösterilmiştir (Jacob, 2000). Meme kanseri tanısından sonraki ilk altı ayda vitamin desteğinin etkisine bakıldığında, antioksidan (Vitamin C, E) kullanımı ile nüksün %22, mortalitenin %18 azalmış olduğu gösterilmiştir (Kleshchina Iu ve Eliseev,

2011; Nechuta ve ark., 2011). Erken evre meme kanseri tanısı almış olan hastaların, tanıdan itibaren Vit C-Vit E antioksidan takviye kullanımını oranı %83 olanlarda nüksün azalmış olduğu gözlenmiştir (Greenlee ve ark., 2012). Bir meta analize göre meme kanserinde diyetin etkisi, Vit C alımı tutarlı-anlamlı şekilde meme kanseri ile ters orantılıdır. Vit C seviyesi; doymuş yağ, Vit E ve beta-karoten alımından daha önemli olduğu ispatlanmıştır. Kanseri tedavi etmeden daha etkili özelliği olarak Vit C'nin kanseri önlediği söylenebilir. Yine de kanser hastalarına Vit C desteği önemlidir, çünkü bu hastaların genelinde Vit C-eksikliği gözlenmektedir. Birde Vit C'nin immün fonksiyonları kuvvetlendirici etkisi de vardır (Bozonet ve ark., 2015). Kanser tedavisi sırasında antioksidan Vit C takviye kullanımını destekleyen bulgular tam olarak olgunlaşmamıştır.

2.5. Membran Lipidleri

Lipidler; benzen, kloroform, eter ve aseton gibi organik çözücülerde eriyen suda erimeyen organik biyomoleküllerdir. Lipidlerin bir kısmı doğrudan organizmada yapılırlar, büyük kısmı ise organizmaya dışarıdan alınır. Esansiyel yağ asitleri ve buna benzer önemli lipidlerin mutlaka bu yağ asitlerini ihtiva eden gıdalarla dışarıdan takviye olarak alınması gereklidir (Nguyen ve ark., 2019). Lipidler makromoleküller arasında bir polimerleri olmaması nedeni ile ayrıcalıklıdır. Lipidlerin, yapı ve fonksiyonları açısından birbirlerinden farklı sınıfları vardır (Andersson ve Koper, 2016). Biyolojik membranların yapısının keşfi, membranlardaki lipidlerin suyla nasıl etkileştiğinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Pliny the Elder yağların sudaki etkilerinden ilk bahseden kişidir (Vane, 2000). Biyolojik sistemlerde kompartmanlaşma yolu ile biyolojik olayların düzenlenmesi membranların görevi arasındadır. Biyolojik membranlar protein, lipid ve az miktarda karbonhidrattan meydana gelir (Kim ve Akoh, 2015; Reimhult, 2015). Membran lipidleri amfipatiktir; molekülün bir ucu hidrofilik, diğer ucu hidrofobiktir. Membranın esas yapısal elemanı lipidlerdir. Fosfolipidler membranın sınırlayıcı yapısını meydana getirir. Yaşayan organizmalarda lipidlerin dinamik olduklarının gözlenmesi, sadece yapısal ve fonksiyonel rolleri olmadığını, aynı zamanda in vivo transformasyonlar ve modifikasyonlara uğradıklarını ve bunun biyolojik sonuçları olduğunu da göstermektedir (Schmitz ve ark., 2006). Yağ asitleri doymuş (sature, SFA) ve doymamış (unsature) yağ asitleri diye iki sınıfa ayrılır. Doymamış yağ

asitleri geometrik izomerizme sahip olabilirler. Geometrik izomerizm genelde 'cis' şeklinde görülmektedir. Çift bağlar etrafındaki -C atomlarına bağlı -H atomlarının konfigürasyonuna bağlı olarak şekillenen trans-cis şeklinde iki izoform bulunmaktadır (de Jong ve ark., 2014; Sieber ve Jehle, 2014). Ökaryot organizmalarda doymamış yağ asitleri cis formundadır. Çift bağa göre, cis formların zincirindeki radikaller kırılma gösterdiğinden, trans formlara göre moleküllerin boşlukta kapladığı hacim daha fazladır. Trans yağ asitlerinin açılı zinciri daha doğrusal ve çift bağ açısı daha küçüktür. Trans yağ asitleri aynı zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesine sahip cis formlarına göre yüksek ergime derecesine sahiptirler. Çift bağ eksenine etrafındaki radikallerin konumuna ve çift bağın yerine göre farklı izomerler oluşur. Çift bağların serbest radikallere karşı olan reaktivitesi çok iyi bilinmektedir. Serbest radikaller, cis-trans çift bağ izomerizasyonuna sebep olmaktadır (Beld ve ark., 2015). Oksijen, sıcaklık, ışık ve bazı katalitik maddeler ortamda olduğu zaman doymamış yağ asitlerini içeren yağlar otooksidasyona uğrarlar. Lipid peroksidasyonu; doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olup membran lipidin yapısını değiştirir ve hücre yapı-fonksiyonunu olumsuz etki eden reaksiyondur. Araştırmalar, radikal stres sonucunda trans izomer oluşumunun gerçekleşebildiğini göstermiştir. Serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonu, zincir-tepkimesi şeklinde başlar ve ileri peroksidasyonlara kesinti olmadan devam eder. Başladıktan sonra kendi kendine devam eden bu zincir reaksiyonların hücre membranında oluşturduğu hasar geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonunun başlangıcında reaktif bir bileşik tarafından poliansatüre yağ asitinin metilen grubundaki (-CH₂) H[•] atomu koparılır (Kwiecien ve ark., 2014). Yağ asidindeki çift bağın varlığı, yanındaki C-H bağını zayıflattığından buradan H[•] atomunun koparılması daha basittir. Bu sebepten poliansatüre yağ asitlerine sahip membran lipitleri, özellikle peroksidasyona duyarlıdır. Reaktif radikallerin bu saldırısı sonucu, yağ asit zincirinde bir çiftleşmemiş elektron meydana gelir. Bu da lipid radikalidir. Prensipte olarak lipit peroksidasyonu, oksijen veya lipit substratların tüketilmesiyle sonlanır. Birçok çalışmada, serbest radikaller tarafından membran yağ asitlerinin izomerizasyonu, liposomlar kullanılarak yapılan model çalışmalarıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Biyolojik membranlarda meydana gelecek lipit peroksidasyonu; membran potansiyelinin düşmesine, membran akışkanlığının kaybına, iyonlara karşı geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücrenin bütünlüğünün

bozularak ölümüne sebep olur (Erejuwa ve ark., 2013; Pizzimenti ve ark., 2013). Serbest radikal türleri, yağ asidi kompozisyonunca en zengin hücre kompartmanı olan hücre membranını direkt olarak etki eder. Fosfolipitler, biyolojik membranların yapısal üniteleridir ve ayrıca membran fonksiyonunda anahtar role sahiptirler. Fosfolipitlerin temel bileşeni doymamış yağ asitleridir. Hücre membranının fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için çift bağların cis konfigürasyonunda olması şarttır. Trans konfigürasyonuna sahip lipitler doğal değildir. Çünkü ökaryot organizmalar tarafından sentezlenemezler. Fakat yalnız bazı bakteriler cis-trans izomerizasyonunu enzimatik olarak yapabilmektedir. Trans izomerler hücre membranına zarar verebilir. Trans yağlar en az bir trans konfigürasyonuna sahip çift bağ içeren doymamış yağ asitleridir. Doymamış yağ asitlerinin –C atomları arasındaki çift bağlara -H eklenerek, doymamış yağ asitleri doymuş yağ asitlerine çevrilmesi ile doymamış yağ asitlerinin oksidasyona duyarlılığı azaltılır. Fakat bu işlem esnasında yağ asidi daha doğrusal (cis formlara göre), termodinamik stabilitesi-erime noktası yüksek trans yağ asitleri meydana gelmektedir. İnsanlarda bulunan trans yağ asidi izomerleri, besin olarak tüketilen hidrojenlenmiş yağlardan kaynaklanır (Heipieper ve ark., 2003). Trans yağ asitlerinin sağlık üzerine zararlı etkileri, kalp damar hastalıkları ve kanser için risk faktörü oluşları ve lipit metabolik yollarının inhibisyonuna yol açmaları ile alakalı birden fazla araştırma yapılmıştır. Yağ asitlerinin ve trans izomerlerinin tayini için çok uzun zamandır kullanılan en iyi teknik Gaz-Sıvı Kromatografisidri (GLC). Yağ asitleri ucucu metil ester türevlerine çevrilip GLC ile belirlenmektedir. Çalışmamızda meme kanseri hücre soylarına ait MDA-MB231 ve MCF-7 hücrelerinin membran lipit profilini GLC yöntemi ile belirlemeyi amaçladık. Bu analiz sonucunda iki meme kanser hücresinin membranlarında bulunan yağ asitlerinin profilleri belirlendi ve cis-trans izomerlerinin yüzdeleri gösterildi.

2.6. Yağ Asitleri

Yağ asitleri (Fatty asid, FA); hücre sinyalizasyonu, gen ekspresyonu-regülasyonu, membran yapısı, enerji üretimi ve immün hücre regülasyonu gibi birçok yönlü rollere sahiptir (Lou ve ark., 2019). Doymuş yağ asitleri içerisinde çift bağ bulunmaz ve 4-24 karbona (C) sahiptirler. Doğada bulunan yağ asitleri çift karbon atom sayısına sahip ve düz zincirlidir. Örneğin; kaproik asit 6, kaprilik asit 8, lignoserik asit 24, kaprik asit 10,

bütirik asit 4, miristik asit 14, stearik asit 18, laurik asit 12, palmitik asit 16, karbon atomuna sahiptir. Sekiz karbonluya kadar olan doymuş yağ asitleri sıvı haldedir. Bazı doymuş yağ asitlerinin ad ve yapısı tablo 2.1’de gösterilmiştir. Doğal şekilde Doku ve hücrelerden elde edilen yağ asitlerinin sayısı yetmiş’i geçmektedir. Genel yağ asitlerinin formülü $CH_3 (CH_2)_n COOH$ ’dür.

Tablo 2.1. Bazı Doymuş Yağ Asidi Örnekleri

Adı	Yapısı
Laurik asit	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
Miristik asit	$CH_3(CH_2)_{12}COO$
Palmitik asit	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
Stearik asit	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
Araıidik asit	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
Behenik asit	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
Butirik asit	$CH_3CH_2CH_2COOH$

Oleik asit, nervonik asit ve palmitoleik asit doymamış yağ asitlerine örnektir ve birer çift bağa sahiptirler. Oleik asit genelde tüm yağlarda bulunur, 18 karbon atomludur ve 9-10C karbon atomları arasında bir çifte bağ bulunur. Palmitoleik asit 16 karbon atomludur ve aynı şekilde 9-10C atomları arasında bir çifte bağ ihtiva ederler. Nervonik asit 24C sahiptir ve çifte bağı 15-16C atomları arasındadır. Linoleik asit iki çift bağa, linolenik asit ise üç çifte bağa sahiptir. Linolenik asit keten tohumu yağında bulunur. Linoleik asit yer fıstığı yağı, soya fasülyesi, pamuk yağı ve mısır yağı gibi tohum yağlarında bulunur. Her iki yağ asidi 18 karbon atomludur. Bazı doymamış yağ asitleri örnekleri Tablo 2.2’de gösterildi.

Tablo 2.2. Bazı Doymamış Yağ Asidi Örnekleri

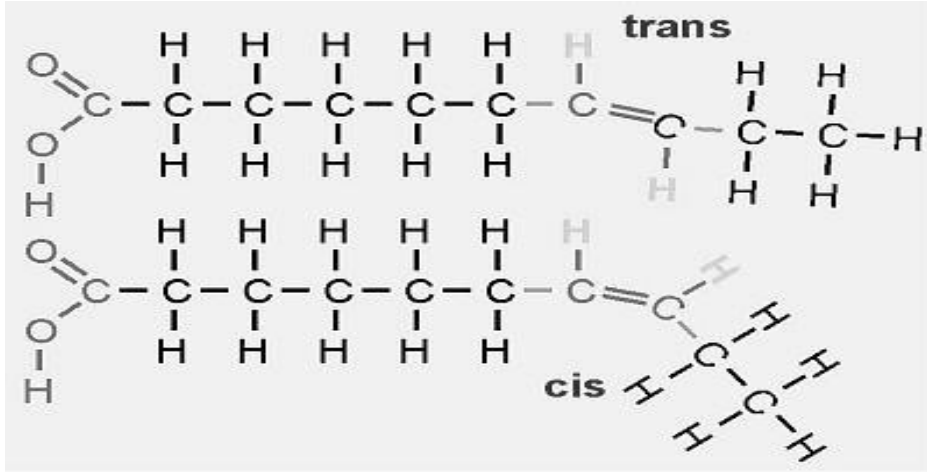
Adı	Yapısı
Oleik asit	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
Linoleik asit	$CH_3(CH_2)_4CH=CH(CH_2)_2(CH_2)_6COOH$
Linolenik asit	$CH_3CH_2CH=CH(CH_2)_3(CH_2)_6COOH$
Araıidonik asit	$CH_3(CH_2)_4CH=CH(CH_2)_4(CH_2)_2COOH$

Esansiyel yağ asitlerine örnek linolenik, linoleik ve arakidonik yağ asitleridir. Bunlar hayvan organizması tarafından sentez edilmezler, diyet yiyeceklerinde bulunurlar. Bu esansiyel yağ asitlerinin yoksunluğunda cilt lezyonu görülme ihtimali yüksektir. Mesela ciltte kanama ve kurumaya neden olur. Zincirde bir çift bağ bulunursa MUFA, birden

fazla çift bağ bulunursa PUFA olarak isimlendirilir. MUFA ve PUFA örneklerinin çift bağın pozisyon-geometrisi (cis veya trans) kısaltmaları ile karbon zincirinin uzunluğu ve bağların toplam sayısı (örneğin C18:1) yağ asidi Tablo 2.3’de gösterildi.

Tablo 2.3. Doymuş, Tekli Doymamış ve Çoklu Doymamış Yağ Asidi Örnekleri

Adı	Yapısı
Oleik asit	9cis-C18:1
Palmitik asit	C16:0
Elaidik asit	9trans-C18:1
Linoleik asit	9cis, 12cis-C18:2
Araşidonik asit	5cis, 8cis, 11cis, 14cis-C20:4



Şekil 2.1. Cis ve trans yağ asidi zincirleri (Subramanian ve ark., 2019)

MUFA birçok bitki ve hayvan yağlarında bulunmaktadır ve SFA biyotransformasyonu ile elde edilebilir (Wolters ve ark., 2018). MUFA grubu omega 9 (ω 9 veya n-9) ailesinden oleik asit ile temsil edilir. PUFA grubu ise iki ana gruba ayrılır.

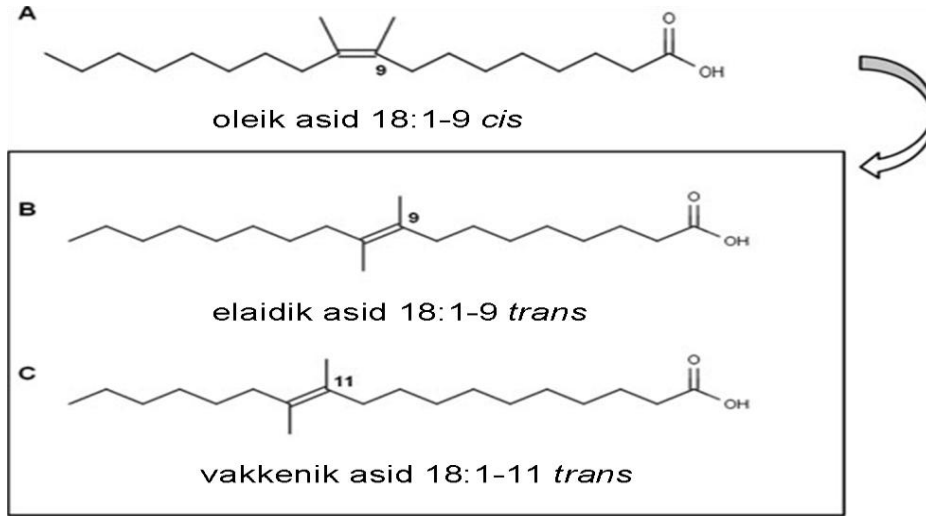
- 1) Omega-3: linolenik asit 18:3, EPA 20:5 ve ya DHA 22:6
- 2) Omega-6: linoleik asit 18:2 ve ya araşidonik asit 20:4.

Zincir uzama (elongasyon) ve desatürasyonlar ile PUFA’lar uzun doymamış yağ asidi zincirlerine çevrilebilir (EPA’dan DHA’ya, linolenik asitten EPA çevrilebilir). Doymamış bir yağ asidini yazmak için kimya, biyokimya ve fizyolojiye adapte birçok yol bulunur (Holman, 1998). Kimya terminolojisinde karbon atomları karboksil

grubundan (-COOH) itibaren sayılır. Karboksil grubuna yakın çift bağ vurgulanır (gösterim şekli-Δ). Fakat 1964 yılında Holman RT tarafından doymamış yağ asitlerinin biyokimya ve fizyoloji terminolojisinde yeni bir sistem (omega nomenklatur) öne sürülmüştür. Bu sisteme göre karbon atomları metil karbonundan (-CH₃) itibaren sayılır (Holman, 1964; Ratnayake ve Galli, 2009).

2.7. Trans Yağ Asitlerinin Tanımlanması

Doymamış yağ asitlerinin biyohidrojenasyonu, ruminantların tükettiği yağlardaki ester bağların lipazlar ile katalizlenme reaksiyonuyla hidrolize edilerek gerçekleşmektedir. Yağ asitlerinin çift bağları oksijensiz ortamda metabolik aktivite esnasında üretilen hidrojen için akseptör olarak rumende ki bakteriler tarafından kullanılmaktadır. Bu işlem ile; trans yağ asitlerinin oluşmasına ve doymamış yağ asitlerinin doymasına neden olur. Yağ asitleri genelde cis konfigürasyonundadırlar. Cis konfigürasyonunda iki hidrojen atomu çift bağın bulunduğu karbon zincirinin aynı tarafındadır. Trans konfigürasyonunda ise iki hidrojen atomu birbirlerine diagonal olarak ters taraftadırlar ve karbon zincirinin düzleşmesine neden olup Şekil.2.1.'de ayrıntılı olarak verildi. Örneğin; Oleik asid hem geometrik trans izomeri elaidik asid ya da pozisyonel trans izomeri vakkenik asid olarak bulunabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Oleik asid (aka cis- Δ^9 -Oktadekenoik asid, $C_{18}H_{34}O_2$ ya da 18:1-9c) izomerleri (Tardy ve ark., 2011).

Tükettiğimiz hayvansal yağlarda ve süt ürünlerinde olan trans yağ asitleri daha çok konjuge linoleik asit ve vaksenik asit formdadır (Sanders, 1988). Trans yağ asit oluşumun da en etkili olan, doymamış yağların dayanıklılığını arttırmak için kullanılan hidrojenasyon işlemidir. Bu işlem ile yağların fiziksel, kimyasal özellikleri değiştirilmektedir. Böylece çeşitli gıdaların üretiminde kullanılmaları sağlanırken, oksidasyona dayanıklılıklarıda arttırılmaktadır (Ginter ve Simko, 2016). Hidrojenasyon işleminde; sıvı fazı doymamış yağ asitleri, katı fazı katalizör, gaz fazını ise hidrojen oluşturmaktadır. Yüksek basınç ve sıcaklıkta karıştırılarak sertleştirilecek yağ ile onunla katılma tepkimesi verecek olan hidrojenin, katı katalizör fazı üzerine transfer olmaları esastır (Lichtenstein, 2014). Geometrik izomerizasyon ile işlem koşulları ve katalizöre bağlı olarak değişen oranlarda cis trans dönüşümü sonucu trans yağ asitleri oluşmaktadır. Trans yağ asitlerinin oluşum derecesini; ortamın sıcaklığı-hidrojen sağlığı, gazın basıncı-dağılım derecesi, katalizörün çeşidi-miktarı ve aktifliği etkilemektedir (Kummerow, 2009). Bitkisel sıvı yağların rafinasyonunda, deodorizasyon-buhar distilasyonu aşaması sonrasında da trans yağ asitleri oluşmaktadır. Bitkilerin yaprak ve tohumlarında özellikle oleik asit, palmitoleik asit ve çoklu doymamış yağ asitlerinin trans izomerleri saptanmıştır. Yapılan araştırmalarda rafinasyon sonrasında sıvı yağlarda %3.5'ten fazla trans izomer olduğu tespit edilmiştir (Aranda-Cano ve ark., 2019). Doymamış yağ asitlerinin trans izomerleri materyal diyetinde var ise anne sütünde geçmektedir. Anne sütündeki yağ asitlerinin süt ile beslenen bebeklerde gelişme ve

büyümeye etkisi dikkate alındığında annenin diyetindeki dolayısıyla sütündeki trans yağ asitleri büyük önem taşır (Innis, 2006). Ülkemizde son on yılda kahvaltılık ve yemeklik margarin azalmıştır (MacDermott, 2007). Almanya’da yapılan araştırmada, en yüksek trans yağ asit oranı yağda kızartılmış ürünlerde bulunmuştur (Schafers ve ark., 2018). Fransa’da yapılan çalışmada ortalama trans yağ asit tüketim seviyesi erkeklerde en fazla, daha sonra çocuklar da saptanmıştır (Ferlay ve ark., 2017).

Doymuş yağ asitlerine benzer şekilde sindirilen trans yağ asitleri, hızla absorbe olup mitokondrial β oksidasyon yolu ile katabolize olmaktadır. Trans yağ asitleri cis yağ asitlerinin oksidasyonunu engellemektedir (Lundsgaard ve ark., 2018). Trans asitler enzim sisteminde oksijenaz desaturaz ve prostoglandin sentetazların aktivitelerini baskılayarak sağlık açısından önemli olan metabolitlerin sentezini engellediği belirtilmektedir (Bendsen ve ark., 2011). Trans yağ asit alımı ile esansiyel yağ asitlerinde desaturasyon ve zincir uzaması tepkimelerinin baskılanması, doku lipidlerindeki araşidonik asit düzeyinin ve siklooksijenaz aktivitesinin azalmasına sebep olmaktadır. Sonuç olarak, linoleik ve gama-linoleik gibi esansiyel yağ asitlerinin uzun zincirli ve doymamış metabolitlerine dönüşümü önlenmektedir (Grossen-Rosti ve ark., 2018).

2.8. Serbest Radikaller

Kanser hücreleri, kontrolsüz hücre gelişimi-farklılaşmasını devam ettirebilmek için yüksek düzeyde ATP’ye gereksinimi vardır. Bu yüksek enerji gereksinimi, mitokondrial solunum zincirinin ROS oluşumunu arttırmasına neden olur. Malnutrisyona bağlı enerji metabolizmasının değişmesi ve birçok diğer mekanizma, kanser hastalarında oksidatif strese yol açar (Liao ve ark., 2019; Payen ve ark., 2019). Dokularda meydana gelen ROS ve serbest radikaller DNA, karbonhidrat, lipid ve proteinler gibi önemli materyallere zarar vermektedir. Serbest radikaller vücut dışından ve insan metabolizmasının doğal sonucu olarak ta meydana gelmektedir. Serbest radikallerin endojen üretimi farklı yollarla olmaktadır. Canlı organizmalar serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. ROS, lipidlerde peroksidasyonu indükler ve reaktif aldehytleri oluşturur. Çoklu doymamış yağ asitlerinde bulunan çift bağlar lipid peroksidasyonuna karşı hassastırlar (İto ve ark., 2019). Çift

bağların serbest radikallere karşı olan reaktivitesi iyi bilinmektedir. Serbest radikaller cis-trans çift bağ izomerizasyonuna sebep olmaktadır. Araştırmalar radikal stres sonucunda trans izomer oluşumunun gerçekleşebildiğini göstermiştir (Nowak, 2013). Yapılan birçok çalışmada serbest radikaller tarafından membran yağ asitlerinin izomerizasyonu, liposomlar kullanılarak yapılan model çalışmaları ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (Alche, 2019). Ayrıca kanser hücrelerinde oksidatif stresin, mutasyonların, hücre proliferasyonunun stimülasyonunun artışı antikanser ilaçlarına karşı hücre sel duyarlılığın değişmesi gibi sonuçları olabilir. Diğer taraftan bakılacak olursa, oksidatif stresin artışı kanser hücrelerini öldürmek için bir fırsat sağlayabilir (Silva ve ark., 2018; Rezatabar ve ark., 2019).

2.9. MAPK ve EGFR Sinyal Kaskadları

Hücre dışından gelen uyarıların hücre tarafından algılanması ve siyalin hücre içine iletilerek cevap oluşturulmasında sinyal moleküllerinin ciddi görevi vardır. Kanser meydana gelmesinde; sinyal iletim yollarını da içeren temel özellik, hücrenin kontrolsüz çoğalma-büyümesidir. Buna göre büyümeyi uyaran sinyallerin yokluğunda ve-veya büyümeyi inhibe edici uyarıların alınması halinde bile, hücrenin çoğalma ve büyüme yeteneği devam eder. Etmenler olarak; onkogenlerin fonksiyonlarını arttıran değişiklikler ve-veya tümör baskılayıcı genler ile ilgili farklılıklar olabilir (Stecca ve Rovida, 2019). Sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlar kanser hücrelerinde gerçekleşmektedir. Sinyal iletiminde oluşan bu değişimler hücrenin hayatta kalma ve çoğalma işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Sonuçta onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ve metastaz sürecinde önemli görev almaktadır (Chen ve ark., 2019; Rodriguez ve ark., 2019).

EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü), 170 kDa ağırlığında, membrana bağlı bir glikoproteindir. Hücre yüzey reseptörü ve tirozin kinaz aktivitesine sahip EGFR ekstrasellüler protein ligandlarından olan epidermal büyüme faktörü ailesi üyelerindedir (Russo ve ark., 2019). EGF'nin reseptörüne bağlanmasıyla EGF hücre içine alınır, aynı anda EGFR'nin otoposforilasyonu ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonu gerçekleşir. Böylece, nükleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar ve hücre bölünmesi uyarılır (Liu ve Zhong, 2018). Bu yolak boyunca ortaya çıkan

onkogenik mutasyonlar sürekli mitozu aktifleyen sinyallerin taşınmasında görev alırlar (Q. R. Lu ve ark., 2019). EGF reseptör fonksiyonunu etkileyen genetik değişimler ya da reseptör ve ligandın aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. EGFR ailesi; HER2, HER3 ve HER4 olmak üzere üç grubu vardır. Glikozillenmiş hücre dışı domain ligandın bağlanması için 2 sisteinden zengin cep bölgesi içerir. Kısa transmembran kısım ise ligand bağlanma domainine ve intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre içi domaine katılır. Aminoasit ve DNA sekans analizi EGFR'nin 1186 amino asit kalıntısı içerdiğini göstermiştir.

MAP kinazlar (MAPK), ‘Mitogen-activated protein kinases’ süper ailesinde yer alırlar (Liem ve ark., 2002). Ökaryotik hücrelerde bulunan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önem arz eder. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis-yaşama-çoğalma-diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde görev alırlar. MAP kinazlar üç gruba ayrılır (Platanias, 2003); Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz (ERK) ailesi, p38 MAP kinaz ailesi, c-jun NH₂-terminal kinaz (JNK) ailesi. MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak görev yapar. Kaskad sistemi, sinyalin amplifikasyonu ve düzenleyici etkileşimler açısından önemlidir. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu ile başlar ve MAPKKK (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırayla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını ve-veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Kolch, 2000).

2.10. Gaz Kromatografik Analiz

Nötral yağların hidrolizleri ile elde edilmiş yağ asitleri karışımından yağ asitlerinin ayrı ayrı elde edilmeleri yeni kimyasal teknikler ile daha kolay olabilmektedir. Bu sebeple yetersiz olsa da yağ asitlerinin ayırt edilmelerinde kağıt ve ince tabaka kromatografilerinden yararlanılabilir. Fakat Gaz-likid kromatografisi (GLC), yağ asitlerinin ayırt edilmesinde mükemmel bir tekniktir. Gaz-likid kromatografisi (GLC) tekniği kısaca şöyledir: Gaz-likid kromatografi cihazının bu amaç için kullanılan 1-2 M uzunluğunda ve 0.2-2 cm çapındaki cam veya metalden yapılmış kolonu, çok ince olarak öğütülmüş ateş tuğlası veya diatomasöz toprak ile doldurulmuş ve yağlama gresleri,

silikon yağları, yüksek molekül ağırlığındaki alkollerin poliesterleri ve dibazik asitler gibi uçucu olmayan likidlerden birisi ile doyurulmuş haldedir. Kolonun bir ucundan uygulanan değişik yağ asitlerinin metil esterleri, 170-225°C dereceye kadar ısıtılmış bulunan kolon içerisinde inert bir gaz ile diğer uca doğru gönderilirler. Karışım içerisinde bulunan yağ asitlerinden her biri kendine özel gaz fazı-likid faz arasındaki dağılım koefisiyanına uygun olarak farklı hızlarda kolonun öbür ucundan dışarı çıkarlar. Çıkan inert gaz içerisinde yer alan yağ asitlerinin metil esterleri kimyasal veya fiziksel metodlarla ayırd edilirler. Örneğin, β ışınlarına maruz bırakılan gaz fazının iyonizasyon özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin bir kağıt üzerine kaydedilmesi şeklinde uygulanır. Değişik zirveler şeklinde kağıt üzerinde görülen grafiksel çizgilerden herbiri farklı bir yağ asidinin varlığını gösterir. Meydana gelen eğrilerin alanı ile yağ asidinin miktarı doğru orantılıdır. Özellikle yanıtıcı piklerin oluşması kompleks karışımlarda olasıdır. GLC analizi yağ asidi içeren lipidlerin yağ asid metil ester (FAME) veya diğer ester türevleri gibi daha uçucu türevlerine çevrilmesini gerektirir (Ferreri ve ark., 2002). FAME'lerin üretimi basittir ve farklı reaksiyon koşulları rapor edilmiştir (Western ve ark., 2002). Trigliseritler, fosfolipidler, ve kolesterol esterlerinin baz-katalizli koşullarda FAME'lere dönüşümü için etkili metodlar bulunmaktadır. Kütle spektrometrik analizde en fazla kullanılan yağ asidi türevleri FAME'ler ve nitrojen içeren esterlerdir (Castro-Perez ve ark., 2010). Karışımdaki bütün FAME komponentlerini ayırmak için kromatografik kolonun ve taşıyıcı gazın seçimi ciddi rol oynar. C20–C22 PUFA'lar dışında trans izomerler cis izomerlerden önce elüe edilir. Aksine nonpolar ya da daha az polar faz ile kaplı GLC kolonlar tamamen farklı bir ayırım trendi gösterir (Ferreri ve ark., 2002; Zghibeh ve ark., 2004). PUFA izomer tanımlaması için referans kütüphane kullanılması önerilmektedir. Hidrojen ve helyum gaz kromatografide taşıyıcı gaz olarak kullanılmaktadır. Cis-trans izomerlerinin ve farklı yağ asidlerinin ayırımında benzer performansa sahip olmasına rağmen hidrojen bazı avantajlar sunmaktadır. Helyuma göre GLC ölçüm zamanı daha kısadır ve pikler daha keskindir. Özellikle geometrik izomerlerin elde edilmesi için trans PUFA ve MUFA yağ asidi standartlarının hazırlanması serbest radikal sentetik metodlarıyla gerçekleştirilmektedir (Abshirini ve ark., 2019).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Yapılan bu araştırmanın bir kısmı STSM-COST desteği ile Bologna-İtalya'da Ulusal Araştırma Merkezi (National Research Center; CNR) gerçekleştirildi.

3.1. Hücre Kültürü ve Kullanılan Çözeltiler

a) Meme kanser hücreleri: MDA-MB231 ve MCF-7 hücreleri ATCC firmasından temin edildi

b) DMEM ve RPMI: Invitrogen'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş Fetal sığır serumu ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi ve +4°C'de saklandı.

c) FBS (Fetal Sığır Serumu): 500 ml Nanolab'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 10'şer ml'lik tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

d) Penisilin streptomisin: Nanolab'dan 100 ml alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C'de saklandı.

e) DMSO (Dimetil Sülfoksit): Sigma'dan 100 ml alındı. Oda ısısında saklandı.

f) Hücre dondurma çözeltisi: % 5 dimetil sülfoksit içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solusyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.

g) Tripsin-EDTA: Biological Industries'den hazır olarak alındı. Çözülerek kısımlara ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

3.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Meme kanser hücreleri (MCF-7 ve MDA-MB231) %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren, steril besiyerinde, +37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek, DMEM ve RPMI medyumlarında çoğaltıldı. Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. Pasajlama işleminde kazıyıcı (scraper) kullanıldı. İlk olarak medyum flaskdan uzaklaştırılarak ve atıldı, taze medyum eklenerek ve hücreler kazıyıcı yardımıyla flasktan kazınarak kaldırılıp yeni flasklara dağıtıldı.

3.3. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler uygun şekilde donduruldu. Hücreler, flasktan kazınarak kaldırıldı ve medyum eklenerek 150 x g'de 5-7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet, %95 tam hücre medyumunu ve %5 DMSO'dan oluşan dondurma medyumunu içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonları, cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80 °C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.4. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde yapıldı. (Yaklaşık 2 dakika). İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırıldı ve %70'lik alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla medyum eklendi. 150 x g'de 7 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet medyumla tekrar süspansiyon edildi ve kültür flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de ve %5'lik CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edilerek üretildi.

3.5. Deney Grupları

A) Sitotoksosite Analizi Deney Grupları

Grup 1. Kontrol grubu: Sadece medyum ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinin canlılığı %100 olarak kabul edildi.

Grup 2. Somatostatin grubu: Somatostatin ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde, Somatostatin'nin neden olduğu sitotoksosite kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi.

Grup 3. Vitamin C grubu: Vitamin C ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde, Vitamin C'nin neden olduğu sitotoksosite kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi.

Grup 4. Somatostatin ve Vitamin C grubu: Somatostatin ve Vitamin C ile kombine inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde, Somatostatin ve Vitamin C'nin neden olduğu sitotoksosite kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlendi.

B) Gaz kromatografik Analiz Deney Grupları

Grup 1. Kontrol grubu: Sadece medyum ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

Grup 2. Somatostatin grubu: Somatostatin ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

Grup 3. Vitamin C grubu: Vitamin C ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

Grup 4. Somatostatin ve Vitamin C grubu: Somatostatin ve Vitamin C ile kombine inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinin membran lipidlerinin izolasyonu, saflaştırılması ve metil ester türevlerine çevrilmesi ve gaz kromatografik analizi yapıldı.

C) MAPK Sinyal Yolağı Analiz Deney Grupları

Grup 1. Kontrol grubu: Sadece medyum ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde MAPK proteinlerinin ekspresyon ölçümü yapıldı.

Grup 2. Somatostatin grubu: Somatostatin ile inkübe edilmiş meme kanseri MAPK proteinlerinin ekspresyon ölçümü yapıldı.

Grup 3. Vitamin C grubu: Vitamin C ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde MAPK proteinlerinin ekspresyon ölçümü yapıldı.

Grup 4. Somatostatin ve Vitamin C grubu: Somatostatin ve Vitamin C ile kombine inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde MAPK proteinlerinin ekspresyon ölçümü yapıldı

D) EGFR Sinyal Yolağı Analiz Deney Grupları

Grup 1. Kontrol grubu: Sadece medyum ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde EGFR protein ekspresyon ölçümü yapıldı.

Grup 2. Somatostatin grubu: Somatostatin ile inkübe edilmiş meme kanseri EGFR protein ekspresyon ölçümü yapıldı.

Grup 3. Vitamin C grubu: Vitamin C ile inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde EGFR protein ekspresyo ölçümü yapıldı.

Grup 4. Somatostatin ve Vitamin C grubu: Somatostatin ve Vitamin C ile kombine inkübe edilmiş meme kanseri hücrelerinde EGFR protein ekspresyon ölçümü yapıldı.

3.6. Sitotoksisite Ölçümleri

SST ve Vit C'nin hücrelerin %50'sine sitotoksik olan konsantrasyonu (EC_{50} dozu) MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirlendi. MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan kristaline dönüştürülür. Oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür. Sitotoksisite deneyleri 5 gün sürmektedir. Deneylerin birinci günü hücreler kazıyıcı ile kaldırıldı, medyum eklenerek $150 \times g$ 'de 7 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml medyum ile tekrar süspanse edildi. Hücre süspanسیونundan $10\mu l$ alınarak hücreler inverted mikroskop altında hemasitometrede sayıldı. 50 000 hücre/kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara $100\mu L$ ekildi. 5 mg SST ve Vit C 1 ml Fosfat tamponu (PBS) ile çözüldü, Vit C 500-25000 μM , SST ise 10-320 μM dozlarında hesaplandı. Hücrelerin kuyulara ekilmesinden 24 saat sonra medyum atılarak, belirlenen dozlardaki SST ve Vit C içeren medyum kuyulara uygulandı. Hücreler inkübasyon süresince $+37^{\circ}C$ 'de, %5 CO_2 ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi ve süre sonunda her kuyucuğa 0.01 mL MTT eklenerek 4 saat inkübasyon sürecinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda MTT'den oluşan MTT formazan, kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görüldü. 0.1 mL 0.04 N HCl içeren isopropanol her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Absorbans ölçümü 570 nm'de ELISA plak okuyucusunda yapıldı. Kontrol grubunun absorbans değerlerinin ilaçla inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla yaşayan hücre yüzdesi hesaplanarak sonuçlar % canlılık olarak verildi.

3.7. Membran İzolasyonu, Lipidlerin Saflaştırılması ve Metil Ester Türevlerine Çevrilmesi

Bir gün süre ile yapışmaları beklenen hücreler 24 saat süresince SST, Vit C veya Somatostatin+Vit C kombinasyonu ile inkübe edildiler. Bunu takiben hücreler kazındı ve 1 ml PBS içerisinde toplanıp resüspanse edildi. Bir ml PBS içerisinde resüspanse halde bulunan hücreler 1 ml saf su eklenerek vorteks aracılığı ile karıştırıldı ve 14,000×g de 15 dak +4°C de santrifüj edilerek membran peletleri elde edildi. Fosfolipid saflaştırılması ise Bligh ve Dyer metoduna (Bligh ve Dyer, 1959) uygun olarak gerçekleştirildi. Cam tüplerdeki numunelere 2:1 kloroform-metanol (1 ml) eklenerek vortex yardımı ile iyice karışmaları sağlandı. Bunun ardından karışıma 500µl distile su eklenerek altta kalan kloroform metanol kısmı cam pastör pipeti aracılığı ile temiz tüpe aktarıldı. Numunelere sodyum sülfat tuzunun eklendi ve pamuk yardımı ile filtrasyon yapıldı. Cam pastör pipeti kullanılarak aktarılan numune nitrojen gazı eşliğinde kapaklı 4 ml'lik viallere aktarıldı ve evaporatöre alındı. Oda ısısında 10 dakikalık evaporasyonla tüm sıvı faz uzaklaştırıldı. Elde edilen fosfolipid rezidüsü 1 ml 0.5 M KOH/MeOH eklenerek 10 dak çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Böylelikle yağ asidi metil esterleri meydana getirildi. FAME ekstraksiyonu için 2 ml *n*-heksan ve 500µl su eklendi. Altta kalan su kısmı uzaklaştırıldı. Heksan kısmı üzerine sodyum sülfat tuzu eklenerek pamuk yardımı ile süzme işlemi gerçekleştirildi. Alınan süzüntü 4 ml'lik viallere aktarılarak 5 dakikalık evaporasyon aracılığı sıvı faz uçuruldu. Gaz kromatografik ölçüm aşamasına geçmek amacı ile 30 µl heksan eklenerek tüp çeperleri ve tabanının iyice teması sağlandı ve numuneler gaz kromatografi cihazında analiz edildi.

3.8. Gaz Kromatografik Analiz

GC analiz için Varian CP-3800 kullanıldı. Cihaz alev iyonizasyon dedektörü ve a Rtx-2330 kolon (90% biscyanopropyl-10% phenylcyanopropyl polysiloxane kapiller kolon; 60 m, 0.25 mm i.d., 0.20-mm film kalınlığı) ekipmanlarına sahiptir. Isı uygulamasına 160 C° 55 dak ile başlandı, dakikada 5 C° artış ile 195 C°'de 10 dak tutuldu ve dakikada 10 C° artışla 250 C°'ye getirildi. Sabit basınç 29 psi olarak uygulandı. Araşidonik asid izomerleri için ise alev iyonizasyon dedektörü ve HP-5 kolon (çapraz bağlı 5% phenylsilicone kapiller kolon; 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25-mm film kalınlığı) ekipmanlarına sahip Agilent 5860 GC cihazı kullanıldı. Isı 150 C°'den başlatıldı 1 dak

sonra dakikada 8°C artışla 250°C'ye kadar ısıtıldı. Sabit basınç modu 13 psi olarak seçildi (Ferreri ve ark., 2004). Bütün yağ asitleri ve izomerleri Gaz Kromatografi analizi ile belirlenmiş ve referanslar ile karşılaştırma yapılarak doğrulama yapıldı. Tiylil-radikal katalizli reaksiyon sonucu elde edilen MUFA ve PUFA trans izomerler referans olarak kullanıldı (Ferreri ve ark., 2005). Hücre membranlarına ait herbir yağ asidi içeriği total yağ asidine yüzde oranı şeklinde verildi.

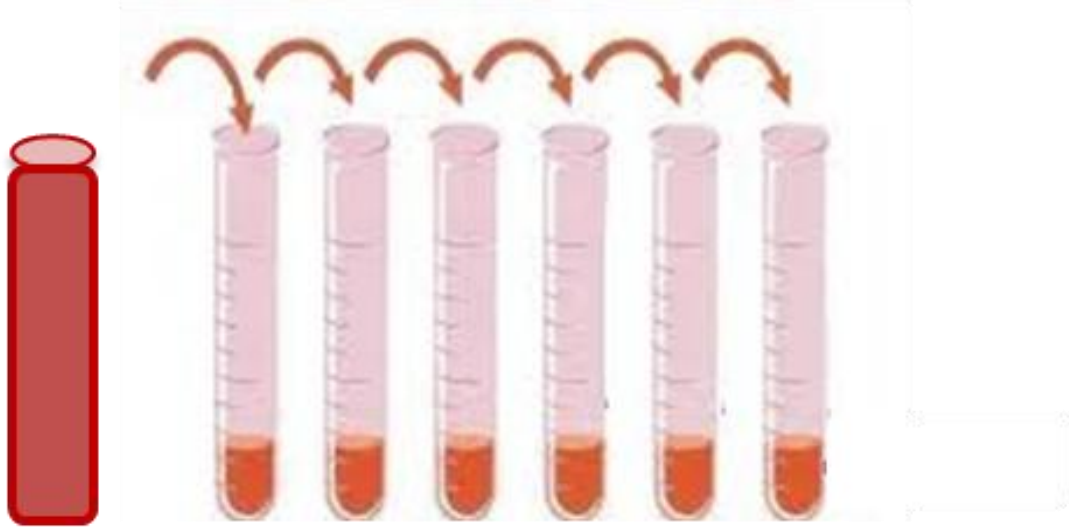
3.9. EGFR VE MAPK Sinyal Kaskad Analizleri

3.9.1. EGFR Ölçümü

EGFR ölçüm metodu; insan EGFR proteinine spesifik monoklonal bir antikorun kaplı olduğu yüzeye numunelerin eklenmesi ve inkübasyon sürecinde numune içerisindeki mevcut EGFR'nin antikora bağlanması esasına dayanır. Hücreler SST, Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilmelerinin ardından üzerlerindeki medyum atılarak PBS ile yıkanır ve kazıyıcı aracılığı ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Liziz tamponunu eklemeyen önce petride PBS kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra 1 ml'de 4×10^7 hücre olacak şekilde 1x liziz tamponu hücrelere eklendi. Hücre lizatı oluşturmak için hücreleri içeren tampon aşağı ve yukarı pipetlenerek homojen hale getirildi. Daha sonra, lizatlar 20 dakika boyunca 2.000-3.000 rpm'de santrifüj edildiler ve süpernatlar temiz test tüplerine aktarıldılar. Elde edilen lizatlar ile deneyler yapıldı.

Tablo 3.1. EGFR Standart Stok Solüsyon Hazırlanması

80ng/ml	Standart no:5	120µl orijinal standart+120µl standart diluent
40ng/ml	Standart no:4	120µl standart no:5+120µl standart diluent
20ng/ml	Standart no:3	120µl standart no:4+120µl standart diluent
10ng/ml	Standart no:2	120µl standart no:3+120µl standart diluent
5ng/ml	Standart no:1	120µl standart no:2+120µl standart diluent



Stok Standart

Tüp	Standart	Standart 5	Standart 4	Standart 3	Standart 2	Standart 1
ng/ml	160	80	40	20	10	5

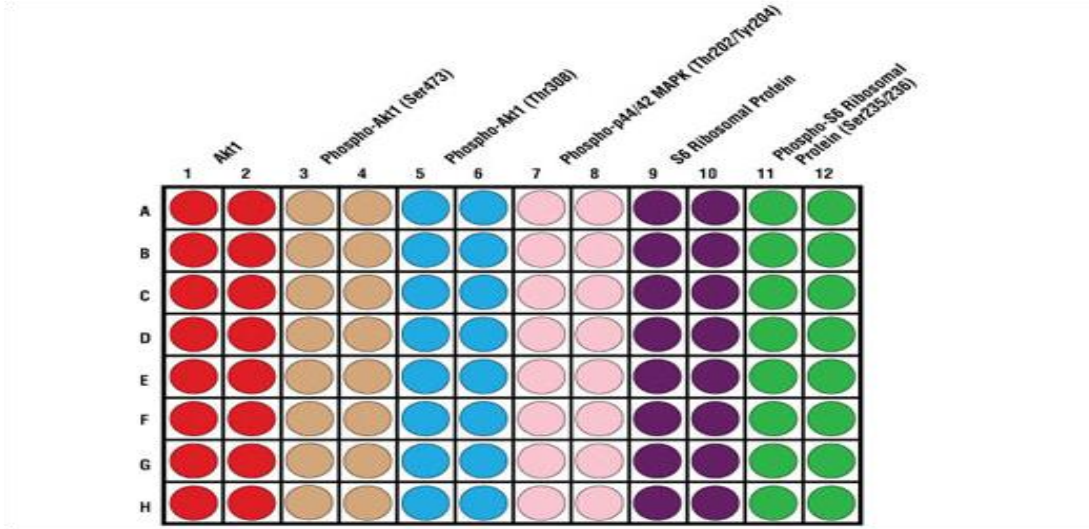
Şekil 3.1. EGFR Standart konsantrasyonunun tüpte hazırlanışı

96 kuyulu plak üzerinde kuyular belli sayıda kör, standart ve numune örnekleri için ayrıldı. Hücre lizatları insan EGFR proteinine spesifik monoklonal bir antikorun kaplı olduğu kuyucuklara eklenerek inkübasyona bırakıldı. Yıkamalar ile bağlı olmayan materyal uzaklaştırılır ve biyotinlenmiş dedeksiyon antikorunu eklenerek 1 saat inkübasyona bırakıldı. Dedeksiyon antikorunu insan EGFR'e spesifiktir. Dedeksiyon antikorunu streptavidin bağlı HRP'ye bağlandı. Hem yüzeye bağlı antikor hem de dedeksiyon antikorunu EGFR'yi hücre dışı domaininden tanıyarak. HRP, kromojenik substratı olan TMB'nin öncelikle maviye dönmesini sağladı. Durdurma solüsyonunun eklenmesi ile mavi renk sarıya dönüştü. Bu renkli reaksiyon ürünü spektrofotometre ile plak

okuyucuda 450 nm’de okuma yapıldı. EGFR konsantrasyonu standart eğri kullanılarak hesaplanır ve sonuç pg cinsinden verildi.

3.9.2. MAPK Ölçümü

Kullanılan metod ile 6 farklı protein olan takiben MAPK sinyal ileti yolağında bulunan AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) miktarları belirlendi. Hücreler SST, Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilmelerinin ardından üzerlerindeki medyum atıldı ve PBS ile yıkanarak hücre lizis tamponu ile 5 dak inkübe edildi. Sonikasyonun ardından süpernatant hücre lizatı olarak saklandı. Hücre lizatları kuyucuklara eklenerek 1 gece karanlıkta inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.2. MAPK proteinlerin şematik görünümü (96-well plate)

İşaretli antikor ile kaplı olan yüzeylere hücre lizatlarının aplike edilmesi ve inkübasyonunun ardından hedef protein, yüzeye bağlı olarak bulunan antikor ile bağlandı. Yıkama basamaklarının ardından antikora bağlı protein üzerine horse radish peroksidaz (HRP)’a bağlı sekonder antikor ve HRP’nin substratı olan tetramethyl benzidine (TMB) eklenerek 1 saat inkübasyona bırakıldı. Durdurma solüsyonunun eklenmesi ile oluşan renk plak okuyucuda 450 nm’de okuma yapıldı.

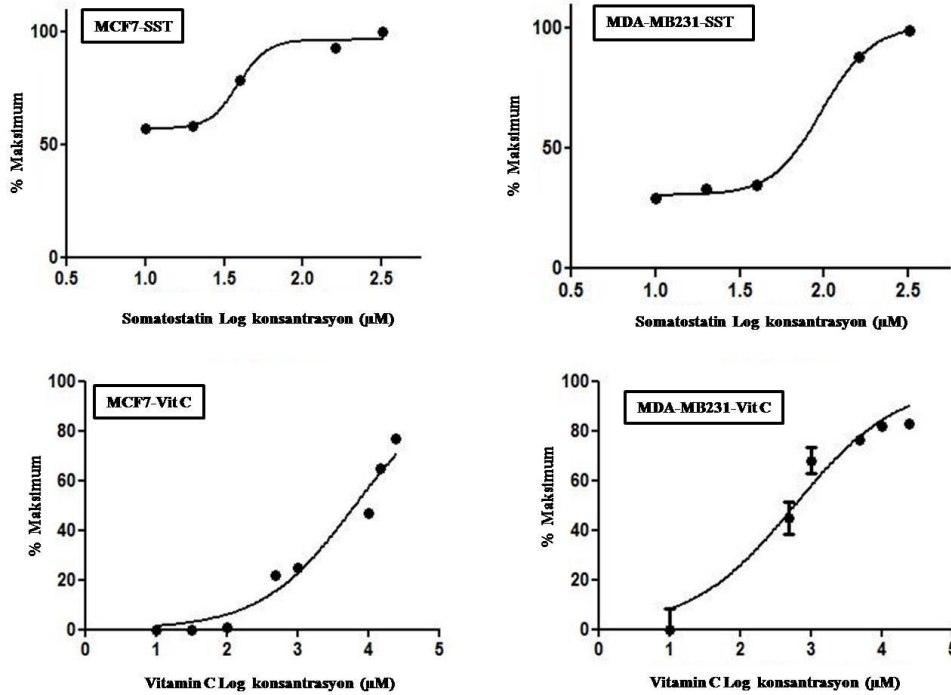
3.11. İstatistiksel Analiz

Elde Sonuçlar ortalama \pm Standart sapma (Mean \pm SD) Şeklinde verildi İstatistiksel analiz SPSS Version 10 paket programı kullanılarak yapıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyler her grup için 6 tekrarlı olarak yapıldı. Gruplar arasında non-parametrik verilerin karŐılaŐtırılması Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. MCF-7 ve MDA-MB231 Hücrelerinde Somatostatin ve Vitamin C'nin Sitotoksitesi

MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde SST 10-320 μ M arasında, Vit C 500-25000 μ M değişen dozları ile 24 saat inkübe edildi. Hücrelerin canlılığı MTT deneyi ile saptandı. MCF-7 ve MDA231 hücrelerinde 6 bağımsız MTT deneyi yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı (Şekil 4.1). Elde edilen değerlerle çizilen grafikten EC₅₀ değerleri hesaplandı. 24 saat SST ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde EC₅₀ değeri 38.58 μ M, MDA-MB231 hücrelerinde 96.75 μ M bulundu. 24 saat Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde EC₅₀ değeri 6506 μ M, MDA-MB231 hücrelerinde 591.2 μ M bulundu (Tablo 4.1).



Şekil 4.1: Farklı dozlardaki Somatostatin ve Vitamin C ile 24 saat inkübe edilen MCF7 ve MDA-MB231 hücrelerinde % maksimum. n=6; ortalama \pm SD

Tablo 4.1. MCF7 ve MDA-MB231 hücrelerinin Somatostatin ve Vitamin C EC₅₀ değerleri

EC ₅₀	Somatostatin	Vitamin C
MCF-7	38.58 µM	6506 µM
MDA-MB231	96.75 µM	591.2 µM

4.2. MCF-7 Hücrelerinin Membran Fosfolipidlerindeki Yağ Asidleri

SST, Vit C veya SST+Vit C ile 24 saat süresince inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin membran fosfolipid yağ asidleri ilaç inkübasyonu olmaksızın aynı koşullarda büyütülen kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. Kontrol olarak 24 saat medyum içinde kültüre edilen hücrelerin her bir yağ asidi için %Alan verilerinin ortalaması verildi. Değerler GC analizinde belirlenen total yağ asidi pik alanının %'si olarak verildi. n örnek sayısını gösterirken, değerler ortalama± SD olarak belirtildi. ^aFAME total lipid ekstraksiyonu, metil ester türevlendirmesi ve GC analizi sonucu elde edildi. ^bHer bir gruba ait numunelerin yağ asidi piklerinin tanımlanması standartlar aracılığı ile yapıldı. Tanımlanan pikler total piklerin %98'ine tekabül etmekteydi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. MCF-7 Hücreleri Memran Yağ Asidlerinin %Alan Verileri

	Kontrol^b	Somatostatin^b	Vitamin C^b	SST+Vit C^b
FAME^a	n=6	n=6	n=6	n=6
14:0	1.92±0.73	2.51±0.24	2.46 ± 0.53	2.58±0.24
16:0	26.23±4.26	23.35±2.37	24.06 ± 4.07	21.13±1.20**
16:1 6 c	1.25±0.45	1.52±0.02	1.31 ± 0.28	1.83±0.12**
16:1 9 c	3.81±1.18	4.76±0.32	6.29 ± 1.26**	6.61±0.32**
18:0	10.40±2.50	11.93±0.43	11.62 ± 1.86	11.96±0.51
18:1 9 trans	0.04±0.09	tr	tr	0.03±0.08
18:1 9 c	27.89±2.96	26.89±1.21	26.57 ± 1.57	25.64±0.55*
18:1 11 c	6.49±1.98	7.84±0.58	8.53 ± 0.85*	8.14±0.21**
18:2 trans	0.30±0.14	0.31±0.14	0.56 ± 0.47	0.41±0.38
18:2 ω6	5.70±3.39	3.44±0.06**	3.82 ± 0.40**	4.53±0.21**
18:3 ω6	0.11±0.05	0.11±0.06	0.39 ± 0.041**	0.37±0.03**
18:3 ω3	0.30±0.09	0.37±0.05	0.22 ± 0.06	0.25±0.04
20:0	0.41±0.22	0.37±0.14	0.37 ± 0.09	0.42±0.04
20:1 11c	0.91±0.35	0.95±0.07	1.13 ± 0.26	1.30±0.11
20:2 ω6	1.01±0.38	0.98±0.40	0.48 ± 0.06**	0.49±0.03*
DGLA ω6	0.97±0.26	1.0±0.05	1.11 ± 0.13	1.47±0.11*
20:4 trans ω6	0.03±0.02	0.02±0.03	0.32 ± 0.28**	0.24±0.03**
20:4 ω6	5.48±1.01	5.96±0.28	5.26 ± 0.93	6.22±0.48
EPA	1.22±0.37	1.52±0.08	1.05 ± 0.19	1.12±0.08
22:0	0.74±0.87	0.69±0.50	0.45 ± 0.16	0.55±0.06
DPA	1.65±0.50	2.15±0.08**	1.75 ± 0.29	2.13±0.14**
DHA	2.47±0.51	2.81±0.08	2.25 ± 0.57	2.57±0.20
tot SFA	39.70±2.55	38.85±3.10	38.96 ± 4.05	36.65±1.42
tot MUFA	40.53±1.00	42.13±2.11	43.83 ± 2.98	43.55±0.69**
tot PUFA	19.77±3.18	19.02±1.00	17.22 ± 1.98	19.80±1.16
Tot ω6	12.63±3.45	10.81±0.82	10.84 ± 1.46	12.26±0.69#
Tot ω3	6.86±1.41	7.85±0.17*	6.38 ± 1.04	7.54±0.49#,&
tot trans	0.77±0.31	0.52±0.15	0.88 ± 0.73	0.68±0.38

*İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı.

**İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.01 anlamlı düzeyde farklı

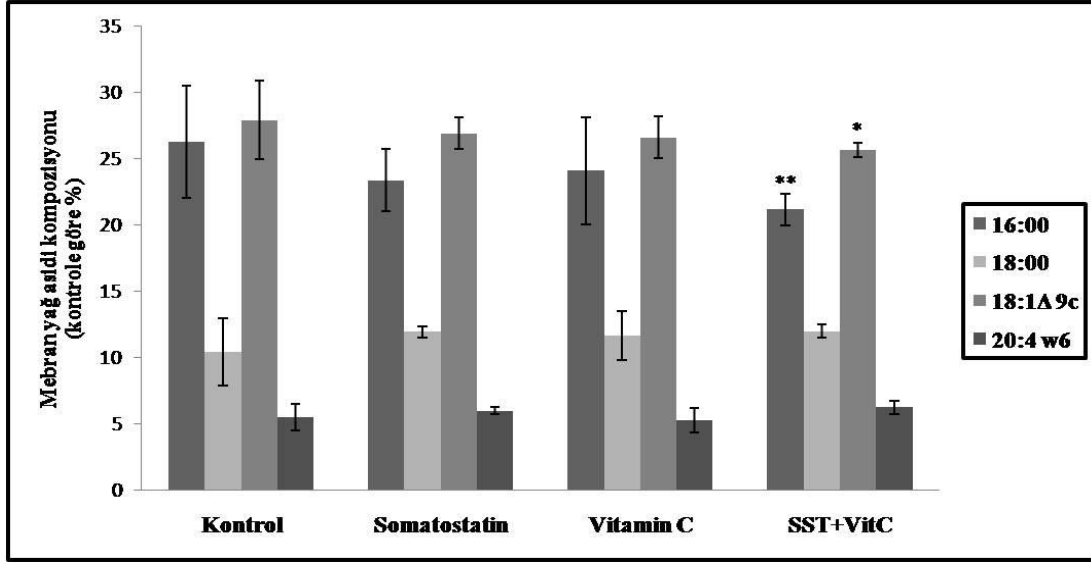
#İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı

&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı

24 saat SST, Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin membran yağ asidi kompozisyonu Tablo 4.2’de gösterildi. Omega-6 yolağında araşidonik asit prekürsörleri olan linoleik (18:2 ω6) asit seviyesi kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı azalma oldu. Vit C ve SST+Vit C ile inkübasyon Gama linoleik asit (18:3 ω6) seviyesinde ise artış gösterdi. Omega-3 ailesinden linolenik asit (18:3 ω3) seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadı. Vit C ve onun SST kombinasyonu palmitoleik asit (9cis-16:1) ve vakkenik asit (11c-18:1) seviyelerini kontrol ile karşılaştırıldığında

anlamli düzeyde yükseltti. Sapienik asit (6cis-16:1) seviyeleri ise kontrol ile karşılaştırıldığında, SST+Vit C inkübasyonu ile anlamli düzeyde arttı. 20:4 araşidonik asid mono-trans seviyeleri Vit C ve onun SST kombinasyonunda artış gösterdi. Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde artan 20:4 araşidonik asid mono-trans direk olarak lipid remodeling ile ilişkili doğal cis içeriğinin geometrik transformasyonunu gösterdi. MCF-7 hücre membranları yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen değişimlerin çoğunluğu, Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilen hücre gruplarında meydana geldi. Vit C ve SST+Vit C gruplarında Eikosadienoik asit (20:2 ω6) seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamli azalma gösterdi. Dokosanoik asit (22:00) seviyeleri tüm gruplarda benzer düzeydeydi. Dekosapentaenoik asit (DPA) seviyeleri SST ve SST+Vit C etkisi ile anlamli artış gösterdi ($p<0.01$) (Tablo 4.2'de).

MCF-7 hücrelerinde 24 saat süresince SST, Vit C ve SST+Vit C inkübasyonu total doymuş yağ asidi miktarında (14:0, 18:0 ve 20:0) anlamli bir değişikliğe yol açmadı. Fakat palmitik asid (16:0)'in seviyesi SST+Vit C inkübasyonu ile azalma gösterdi. SST+Vit C inkübasyonu, tekli doymamış yağ asidlerinden sadece 9c-18:1 (oleik) seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında anlamli azalışa yol açtı ($p<0.05$). Araşidonik asid (20:4 w-6) seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında anlamli bir değişikliğe yol açmadı. (Şekil 4.2).

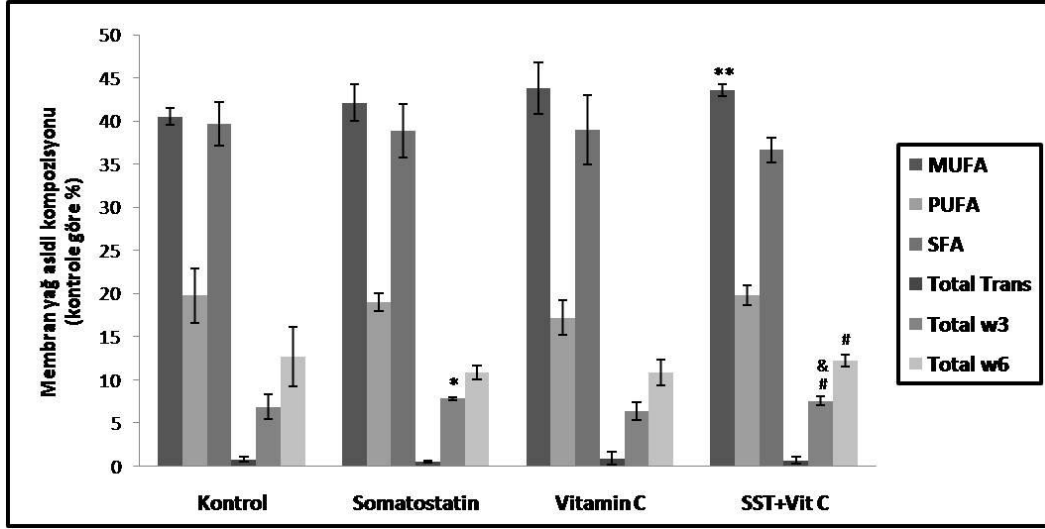


Şekil 4.2. Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücre membranlarının Palmitik asid (16:0), Stearik asid (18:0), Oleik asid (9c-18:1) ve Araşidonik asid düzeyleri.

*İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.05$ anlamlı düzeyde farklı.

**İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

SST+Vit C MCF-7 meme kanseri hücre membranlarında total MUFA konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış vardır. Tek başına SST, total w3 konsantrasyonunda önemli bir artışa, Vit C kombinasyonu ile gözle görülür bir azalışa neden oldu. Total SFA, total PUFA, total trans konsantrasyonlarında ise anlamlı bir fark gözlenmedi. SST+Vit C total w3 ve total w6 üzerinde büyük değişimlere sebep olurken, tek başına Vit C anlamlı bir değişikliğe yol açmadı (Şekil 4.3). MCF-7 hücre membranları yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen ana değişimler tek başına Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilen hücre gruplarında meydana geldi.



Şekil 4.3 Somatostatin, Vitamin C ve Somatostatin+Vitamin C inkübasyonundan sonra, MUFA, PUFA, SFA, Total Trans, Total ω3, Total ω6 yağ asidleri düzeylerindeki değişimler.

*İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.05, p<0.01 anlamlı düzeyde farklı.

#İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı

&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı

4.3. MDA-MB231 Hücrelerinin Membran Fosfolipidlerindeki Yağ Asidleri

SST, Vit C veya SST+Vit C ile 24 saat süresince inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinin membran fosfolipid yağ asidleri ilaç inkübasyonu olmaksızın aynı koşullarda büyütülen kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. Kontrol olarak 24 saat medyum içinde kültüre edilen hücrelerin her bir yağ asidi için % Alan verilerinin ortalaması verildi. Değerler GC analizinde belirlenen total yağ asidi pik alanının %'si olarak verildi. n örnek sayısını gösterirken, değerler ortalama±SD olarak belirtildi. ^aFAME total lipid ekstraksiyonu, türevlendirmesi ve GC analizi sonucu elde edildi. ^bHer bir gruba ait numunelerin yağ asidi piklerinin tanımlanması standartlar aracılığı ile yapıldı. Tanımlanan pikler total piklerin %98'ine tekabül etmekteydi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. MDA-MB231 Hücreleri Membran Yağ Asidlerinin %Alan Verileri

FAME^a	Kontrol^b	Somatostatin^b	Vitamin C^b	SST+Vit C^b
	n=6	n=6	n=6	n=6
14:0	1.18 ± 0.43	1.23 ± 0.12	1.13 ± 0.28	1.53 ± 0.34
16:0	17.93 ± 5.46	18.84 ± 3.09	18.78 ± 4.02	23.72 ± 6.94
16:1 6 c	1.93 ± 0.50	2.03 ± 0.38	1.93 ± 0.16	1.81 ± 0.31
16:1 9 c	1.74 ± 0.52	1.75 ± 0.39	1.61 ± 0.12	1.54 ± 0.28
18:0	18.99 ± 1.31	19.04 ± 1.40	20.06 ± 0.72	21.78 ± 3.74*
18:1 9 trans	0.09 ± 0.10	0.14 ± 0.14	0.12 ± 0.09	0.10 ± 0.07
18:1 9 c	22.27 ± 0.96	22.26 ± 0.56	21.88 ± 1.71	19.09 ± 4.01
18:1 11 c	6.28 ± 0.24	6.42 ± 0.08	6.56 ± 0.65	5.82 ± 1.23
18:2 trans	0.24 ± 0.21	0.35 ± 0.20	0.72 ± 0.09**	0.61 ± 0.21*
18:2 ω6	4.75 ± 0.87	4.61 ± 0.36	5.05 ± 0.45	3.87 ± 1.93*
18:3 ω6	0.30 ± 0.13	0.26 ± 0.10	0.42 ± 0.06	1.07 ± 1.65
18:3 ω3	0.37 ± 0.15	0.31 ± 0.10	0.32 ± 0.08	0.40 ± 0.13
20:0	0.62 ± 0.17	0.41 ± 0.22*	0.61 ± 0.12	0.51 ± 0.14
20:1 11c	0.59 ± 0.15	0.54 ± 0.12	0.70 ± 0.08	0.63 ± 0.20
20:2 ω6	0.73 ± 0.18	0.64 ± 0.24	0.77 ± 0.04	0.70 ± 0.19
DGLA ω6	1.92 ± 0.47	1.88 ± 0.22	2.05 ± 0.20	1.69 ± 0.61
20:4 trans ω6	0.08 ± 0.13	0.32 ± 0.08*	0.30 ± 0.06*	0.32 ± 0.61*
20:4 ω6	8.50 ± 1.68	8.40 ± 0.96	7.63 ± 0.63	6.75 ± 1.46
EPA	1.80 ± 0.62	1.75 ± 0.44	1.59 ± 0.23	1.46 ± 0.26
22:0	0.58 ± 0.49	0.53 ± 0.12	0.63 ± 0.32	0.48 ± 0.17
DPA	4.29 ± 0.88	3.29 ± 0.80	3.49 ± 0.27	2.94 ± 0.56*,&
DHA	4.51 ± 0.72	4.16 ± 0.66	3.85 ± 0.36*	3.32 ± 0.67*#
tot SFA	39.29 ± 5.42	40.06 ± 2.11	41.02 ± 4.64#	48.02 ± 10.52
tot MUFA	33.06 ± 0.90	33.29 ± 0.67	32.66 ± 2.47	28.88 ± 5.95
tot PUFA	27.65 ± 4.80	26.65 ± 2.73	26.18 ± 2.05	22.80 ± 4.68
Tot ω6	14.62 ± 2.46	14.42 ± 1.39	14.88 ± 1.03	12.99 ± 2.67
Tot ω3	12.93 ± 2.56	12.02 ± 1.69	11.29 ± 1.04	9.81 ± 2.04*#
tot trans	0.60 ± 0.36	0.80 ± 0.26	1.02 ± 0.13**	1.04 ± 0.13&&

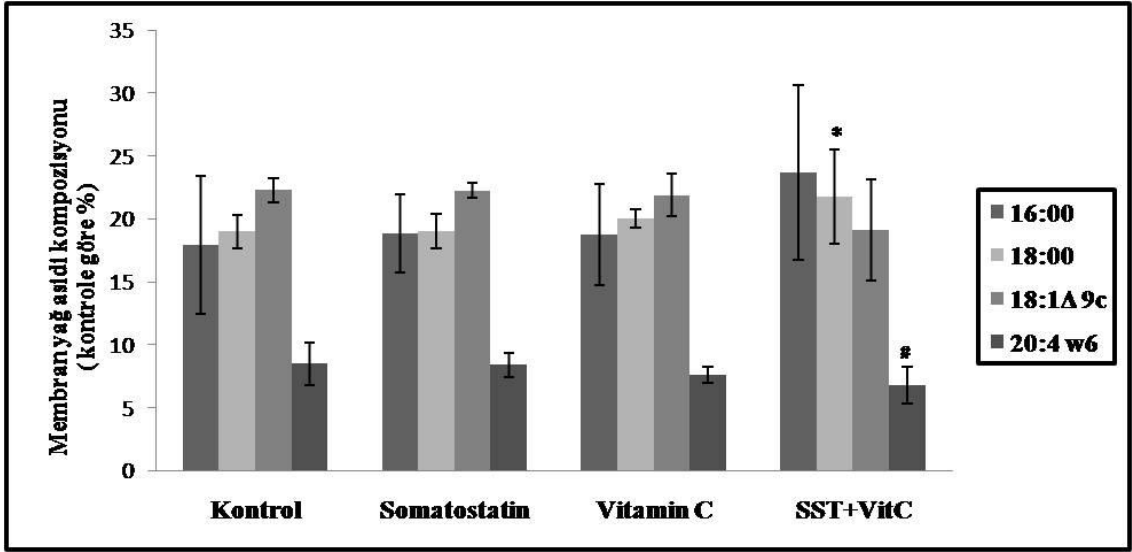
* ** İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan p<0.05, p<0.01 anlamlı düzeyde farklı.

İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan p<0.05 anlamlı düzeyde farklı

&& İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan p<0.01 anlamlı düzeyde farklı

24 saat SST, Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinin membran yağ asidi kompozisyonu Tablo 4.3'de gösterildi. Trans-linolelaidik asit (18:2 trans) seviyeleri kontrol grubuna göre Vit C ve SST+Vit C gruplarında anlamlı artışa neden oldu. SST+Vit C ile inkübasyonda 18:2 ω6 seviyesi azalış gösterdi. 18:3 ω3, 18:3 ω6 seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadı. SST, Vit C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinde 20:4 araşidonik asid mono-trans seviyelerinde anlamlı düzeyde artış gözlemlendi. DPA ve DHA seviyelerinde kontrol grubuna göre Vit C ve SST ile kombinasyonunda anlamlı azalış vardır (Tablo 4.3).

MDA-MB231 hücrelerinde 24 saat süresince SST, Vit C ve SST+Vit C inkübasyonu total doymuş yağ asidi miktarında (14:0 ve 16:0) anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. Ancak 18:0'in seviyesi SST+Vit C kombinasyonu ile artış gösterdi. SST inkübasyonu Araşidik asit (20:0) yağ asidi seviyelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı azalışa yol açtı ($p<0.05$). 20:4 w6, yalnız SST grubuna göre SST+Vit C inkübasyonu ile anlamlı düzeyde azaldı. 9c-18:1 seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. (Şekil 4.4).

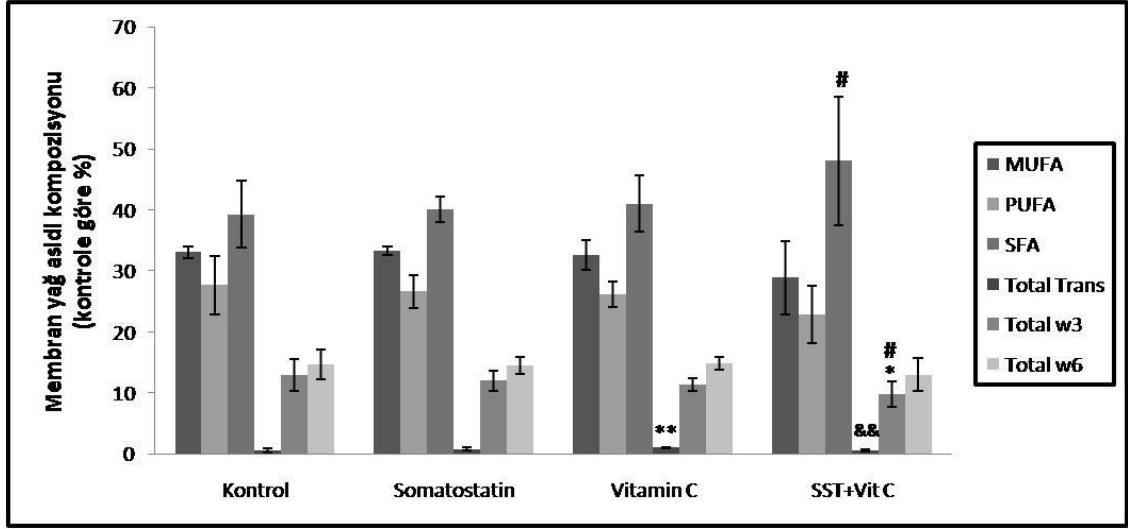


Şekil 4.4. Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücre membranlarının Palmitik asit (16:0), Stearik asit (18:0), Oleik asit (9c-18:1) ve Araşidonik asit düzeyleri.

*İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p<0.05$ anlamlı düzeyde farklı

#İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan $p<0.05$ anlamlı düzeyde farklı

Sadece Vit C ve SST ile kombinasyonu, MDA-MB231 meme kanseri hücre membranlarında total trans konsantrasyonunda anlamlı artış gösterdi. SST+Vit C inkübasyonu Total w3 konsantrasyonunda gözle görülür bir azalışa sebep oldu. Total SFA, Total PUFA, Total MUFA konsantrasyonlarında ise anlamlı bir fark gözlenmedi. SST grubuna göre, Vit C ile inkübasyonda Total SFA konsantrasyonunda az da olsa anlamlı azalış vardır. Total trans konsantrasyonu SST+Vit C grubunda Vit C grubuna göre anlamlı arttı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Somatostatin, Vitamin C ve Somatostatin+Vitamin C inkübasyonundan sonra, MUFA, PUFA, SFA, Total Trans, Total ω3, Total ω6 yağ asidleri düzeylerindeki değişimler.

***İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.05$, $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı.

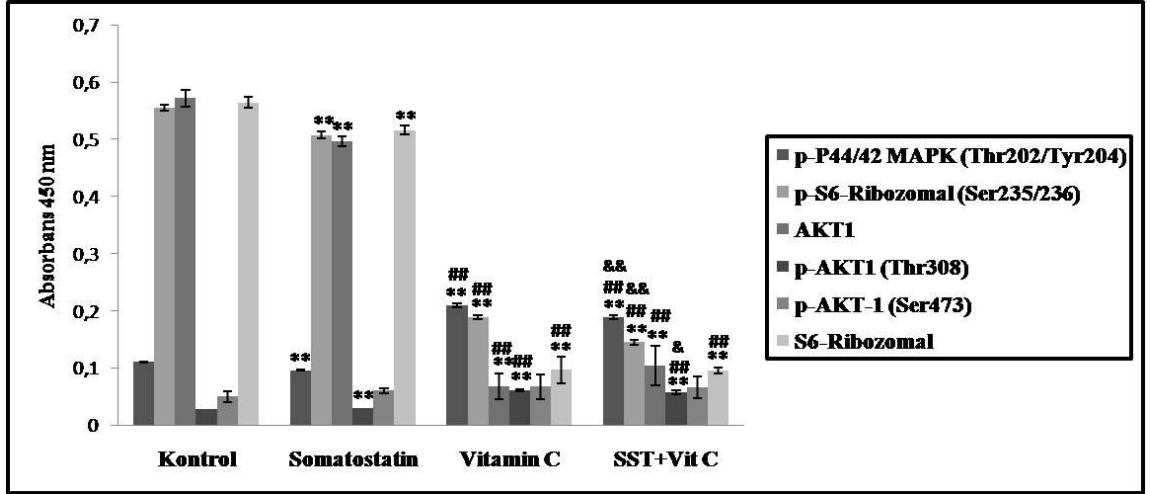
#İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan $p < 0.05$ anlamlı düzeyde farklı

&&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan $p < 0.05$, $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

4.4. MAPK Proteinlerinin Ekspresyonları

4.4.1. MCF-7 Hücrelerine ait MAPK Proteinlerinin Ekspresyonları

MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde membran yağ asidi profili takiben MAPK sinyal ileti yolağında bulunan AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) proteinlerin ekspresyonları ölçüldü. Vit C ve SST+Vit C, p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) ekspresyonunu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttırdı. p-S6-Ribozomal (Ser235/236), AKT1 ve S6-Ribozomal ekspresyonları Vit C ve SST+Vit C inkübasyonlarında gözle görülür şekilde azalış gösterdi. Tam tersine Vit C ve SST+Vit C inkübasyonları p-AKT-1 (Thr308) ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırdı. p-AKT-1(Ser473) ekspresyonunda hiçbir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde; MAPK sinyal ileti yolundaki AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) proteinlerin ekspresyonları

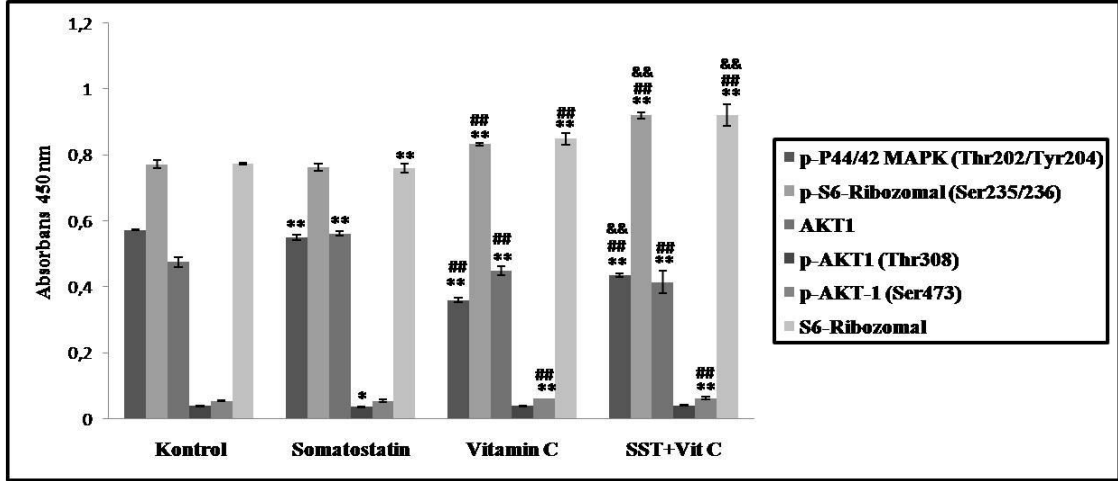
**İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

##İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

&,&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan $p < 0.05$, $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

4.4.2. MDA-MB231 Hücrelerine ait MAPK Proteinlerinin Ekspresyonları

MDA-MB231 hücrelerinde ise, p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı azalış gösterdi. Vit C inkübasyonu, p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) ekspresyonunu önemli düzeyde azalttı. Vit C ve SST ile kombinasyonu p-S6-Ribozomal (Ser235/236) ekspresyonunu kontrole göre anlamlı düzeyde arttırdı. AKT1 ekspresyonunun SST inkübasyonu anlamlı şekilde artmasına, Vit C ve SST+Vit C inkübasyonları ise anlamlı şekilde azalmasına neden oldu. p-AKT-1 (Thr308) ekspresyonu yalnızca SST ile inkübe edilen grupta anlamlı olarak azaldı. Vit C ve SST kombinasyonu ile p-AKT-1(Ser473) ve S6-Ribozomal ekspresyonlarında anlamlı artış gözlemlendi. (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinde; MAPK sinyal ileti yolundaki AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) proteinlerin ekspresyonları

***İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.05$, $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı.

##İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

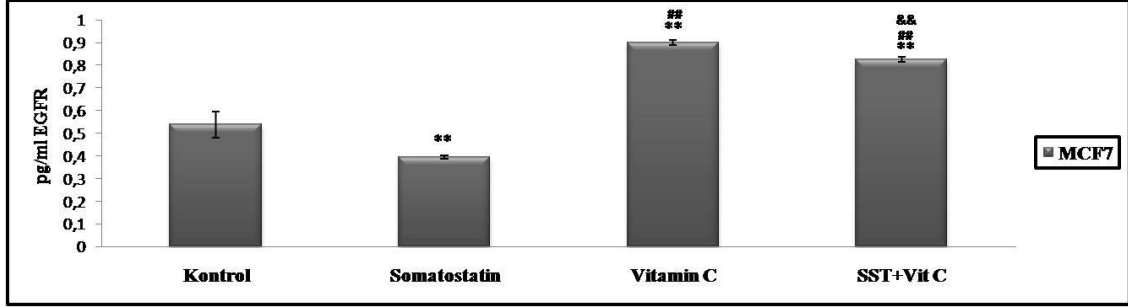
&&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

4.5. EGFR Protein Ekspresyonu

MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde membran yağ asidi profili takiben EGFR ekspresyonları belirlendi.

4.5.1. MCF-7 Hücrelerine ait EGFR Protein Ekspresyonu

MCF-7 hücrelerinde SST ile inkübasyon EGFR ekspresyonunu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalttı. Vit C ve SST+Vit C ile inkübasyon EGFR ekspresyonunda artışa neden oldu. Vit C grubuna kıyasla, SST+Vit C grubunda EGFR ekspresyonu anlamlı azalış gösterdi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde; EGFR protein ekspresyonu

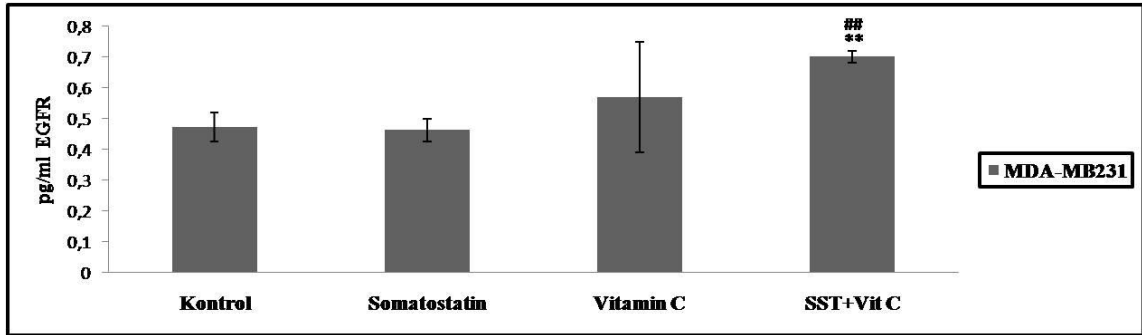
**İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı.

##İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

&&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

4.5.2. MDA-MB231 Hücrelerine ait EGFR Protein Ekspresyonu

MDA-MB231 hücrelerinde ise; yalnızca SST+Vit C inkübasyonu ile EGFR ekspresyonu anlamlı artış gösterdi. Diğer gruplarda anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Somatostatin, Vitamin C ve SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerinde; EGFR protein ekspresyonu

**İlaç ile inkübe edilmemiş kontrol grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı.

##İlaç ile inkübe edilmiş SST grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

&&İlaç ile inkübe edilmiş Vit C grubundan $p < 0.01$ anlamlı düzeyde farklı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda SST'nin meme hücre membranlarında lipidler açısından yol açabileceği değişimleri ve bu değişim üzerinde güçlü bir antioksidan olan Vit C'nin etkilerini analiz etmeyi hedefledik. Bu amaçla SST ve Vit C, SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde membran yağ asidi kompozisyonunu ve sinyal yollarıyla ilişkili belirteçler olan MAPK ve EGFR protein ekspresyonlarını belirledik. Hücre membran lipid profilinin tanımlanması, kanser hücrelerinin hayatta kalabilme mekanizmalarının belirlenebilmesinde de önemi büyüktür. Yağ asidlerinin geometrik trans izomerleri çift bağa göre aynı yönde iki zincire sahiptir. Trans izomerler; hücre, hayvan ve insan modellerinde stres sırasında serbest radikal türleri tarafından meydana getirilir (Ferrerri ve ark., 2005). Trans yağ asidleri kanser tedavisinde yeni hedef olarak gösterilmektedir. Trans yağ asidlerinin fonksiyonlarının ve yapılarının tanımlanmasının yanında cis ve trans lipid geometrisinin biyokimyasal önemini araştıran multidisipliner çalışmalar devam etmektedir. Yağ asidlerinin cis-trans geometrisinin değişmesi, membran fonksiyonu ve sinyalizasyonunda değişiklikler yaparak hücrel cevabı uyarır ve biyolojik sisteme zarar verebilir. SST ve Vit C etkisi sonucu ortaya çıkan membran lipid profili değişiklikleri daha önce çalışılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda SST ve Vit C'nin meydana getirebileceği membran değişikliklerini analiz etmeyi hedefledik.

Kanser, son yıllarda önemli sağlık sorunlarından biridir. Meme kanseri kadınlarda sık görülen kanser kaynaklı ölüm nedeni olduğu tespit edilmiştir (Evans ve ark., 2019). Meme kanserlerinin meydana gelmesinde E2'nin rolü büyüktür. 17 β -östradiolün östrojen reseptör (ER) pozitif meme tümör hücrelerinde çoğalmayı tetiklediği, apoptozu engellediği bilinmektedir (Semmler ve ark., 2019). ER pozitif meme kanseri hücrelerinde, östrojenin ER'yi aktive etmesiyle hücre siklusundaki G1 fazı kısalmış ve hücrenin daha sık şekilde bölünmesine neden olduğu bildirilmiştir (Osborne, 1998). Çeşitli biyolojik karakteristikler ile (hasta yaşı, hücre tipi, tümör evresi ve proliferasyon hızı) meme kanserinde hastalığın prognozu belirlenir. Kanser gelişim sürecinin karmaşıklığından dolayı hala aydınlatılması gereken noktaları vardır. Kanser tedavisi için farklı birçok tedavi modaliteleri kullanılır. Bunlara örnek: radyoterapi, cerrahi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden ise immunoterapi, gen

tedavisi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri ve anjiyogenez inhibitörleri diye sıralanabilir. Bu tedavilerin amacı mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmaktır. En sık kullanılan kemoterapötikler doksorubisin, dozetaksel-paklitaksel ilaçlardır. Son yıllarda meme kanserinde antianjiyojenik ilaçların da etkili olduğu gösterilmiş, bu ilaçlara örnek bevacizumab ve sorafenib verilmiştir (Motono ve ark., 2019) .

Farklı organ tümörlerin genelinde, tümör hücrelerinin SSTR eksprese ettiği bilinmektedir. Bu farklı tümör hücrelerinde SSTR'nin bulunması yeni tedavi stratejilerine olanak sağlar. Antineoplastik etkileri sebebiyle SST analogları birden fazla organ kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bir çalışmada östrojen pozitif meme kanseri hücrelerinde farklı dozlarda SST uygulaması sonucunda total oksidan madde miktarında azalma, hücresel total antioksidan madde miktarında artış görüldü (Drastikova ve ark., 2016). SSTR'nin ve analoglarının biyolojik aktiVit Esi, hedef hücrelerde bulunan SSTR'e olan affinitelerine bağlıdır. SST ve analogları reseptör subtiplerini stimüle ederek fonksiyonlarını regüle ederler (Blaker ve ark., 2004; Dasgupta, 2004). Bu reseptörlerin bulunması ile yeni tedavi fırsatlarının ortaya çıkmış ve SSTR'nin biyolojik etkileri daha iyi anlaşılmıştır. Metastatik ve primer tümörlerde, tümör hücreleri yoğun şekilde birden fazla reseptör subtiplerini aynı sürede eksprese ederler (Bousquet ve ark., 2004; Dasgupta, 2004). Son çalışmalar; diğer fonksiyonlarına nazaran SST-SST analoglarının tümör hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir (Jia ve ark., 2003; Lasfer ve ark., 2005). İn-vitro hücre kültürlerinin araştırılmasından, reseptörlerin tümör hücre proliferasyonundaki fonksiyonel-potansiyel rolü öğrenilmiştir. Bu çalışmalar ile SSTR'nin hücre içi sinyal yollarını düzenlediğini, sonucunda apoptoz ve hücre siklus arrestiyle sonuçlandığı gösterilmiştir. SSTR, belki de hücre büyümesini olumsuz kontrol eden sinyal kaskadını durdurarak tümör hücre büyümesini inhibe eder. Bu konu ile ilgili araştırmalar ne kadar fazla olsada, hala mekanizma tam olarak açığa kavuşmamıştır. SST analoglarının tedavi potansiyeli ve farmakolojisi çok hızla gelişmeye devam etmektedir. Birçok yeni molekül üzerinde çalışılmaktadır. Bu moleküller reseptörlere karşı farklı afinite göstermektedir (Pawlikowski ve Melen-Mucha, 2004).

Vitaminler son yıllarda kanserden korunmada en çok umut bağlanan besin maddeleridir. Özellikle batı toplumlarında normal diyetle ek olarak vitamin hapları bol miktarda tüketilmektedir. Ancak bu vitamin haplarının kanserden korunmada gerçekten etkili olup olmadıkları tam olarak anlaşılamamıştır. Vitaminlerin hangi mekanizmalarda kanser gelişiminde etkili olabildikleri tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte bazı farklı özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Tüm vitaminlerin immün sistem üzerinde önemli etkileri vardır. Bu nedenle antioksidan maddeler kanserden korunmada önem kazanmaktadır. Bir çalışmada teşhisi konmuş akciğer kanseri olgularında serum Vit C düzeyleri çalışılmış olup sağlıklı kontrol grubuna oranla anlamlı olarak düşük bulunmuştur, bir başka çalışmada Vit C'nin akciğer kanserlerinde kemoterapötik ajanlara karşı kazanılmış direnci değiştirebildiği bildirilmiştir (Chiang ve ark., 1994; Rodrigues da Silva ve ark., 2018).

Çalışmamızda hücre kültürü için standart bir protokol izledik. Tüm hücre grupları aynı koşullarda hazırlandı. Membran fosfolipid yapısında, iki yağ asidi kuyruğunun bulunmasından dolayı bir yağ asidi seviyesindeki değişim diğer yağ asidi rezidüsü ile korelasyon gösterebilir. Hücre membranlarının yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen değişimler membran akışkanlığı ve geçirgenliğinde değişimlere neden olur. Vit C ve SST+Vit C inkübasyonundan sonra membran yağ asidi kompozisyonunda önemli modifikasyonlar gözlemlendi. Çalışmamızda membran yağ asidi kompozisyonu analizi ile

SST+Vit C'nin MCF-7 hücre membranlarında 16:0 ve tekli doymamış yağ asitlerinden sadece 9c-18:1 seviyelerini kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı azalışa yol açtığını belirledik. Araşidonik asid hücrelerin lipid yapımı ve fonksiyonuna katkıda bulunan, membran lipidomundaki en temel bileşendir (Kullenberg ve ark., 2012). Fakat MCF-7 hücresinde 20:4 w-6 seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.1). MDA-MB231 hücresinde ise 20:4 w6, SST grubuna göre SST+Vit C inkübasyonu ile anlamlı düzeyde azalması Vit C'nin etki etmediği düşünülebilir (Şekil 4.3). Araşidonik asidin öncülleri olan linoleik asit seviyesi iki hücre hattında da SST+Vit C inkübasyonu sonucunda azalış gösterdi. Aynı şekilde iki hücre hattında Vit C ve SST+Vit C ile araşidonik asid mono-trans izomeri seviyesi arttı. Elaidik asid seviyesi iki hücre hattında da anlamlı bir değişiklik göstermedi. Fakat MC-7

hücresinde, SST+Vit C oleik asit seviyesinin anlamlı azalışına neden oldu (Şekil 4.1). Bunun nedeni, SST+Vit C'nin membranda oleik asid'den zengin bir bölgeye yerleşmesinden kaynaklanabilir. Başka bir çalışmada meme kanser hücrelerinde SFA olan palmitatın apoptozisi arttırdığı, MUFA sınıfı oleik asidin ise proliferasyonu arttırdığı ve palmitat aracılı apoptozise karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Hardy ve ark., 2000). Eksojen olarak alınan yağların aksine kanser hücrelerince endojen olarak üretilen yağ asidlerinin malign ve agresif fenotip ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Nomura ve ark., 2010). Çalışmamızda SST'e maruz kalan hücrelerin membran yağ asidi kompozisyonunda meydana gelen ana etkileri; iki hücre hattında artan trans yağ asidi üretimi, MDA-MB231 hücresindeki Vit C ile inkübasyonda yüksek SFA ve MCF-7 hücresinde SST+Vit C inkübasyonunda yüksek MUFA içeriği olarak bulduk. SST'nin Vit C ile birlikte kullanımı trans yağ asidi seviyelerini kontrol düzeyine çekemedi. Vit C ve SST+Vit C SFA ve MUFA üzerinde büyük değişimlere sebep olurken, tek başına SST anlamlı bir değişikliğe yol açmadı. SST ve/veya Vit C inkübasyonları sonrası yapılan lipidom analizleri MDA-MB231 hücre membranlarında araşidonik asidin kritik rolünü ortaya koydu. SST'nin Vit C ile inkübasyonu, yalnız SST grubuna göre karşılaştırıldığında membran araşidonik asid seviyelerinin azalmasına neden oldu. Vit C'nin bu etkileri onun antioksidatif ve antiapoptotik etkileri ile ilişkili olabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar SST ve Vit C'nin insan meme kanser hücrelerinde membran lipid profilinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu gösterdi. Daha önce yapılan hiçbir çalışmada meme kanser hücrelerinde meydana gelen yağ asidi değişimleri GC tekniği ile araştırılmamıştır.

Membran lipidom profilinin belirlenmesi hücre biyolojisi deneylerinde hücrelerin karakterizasyonunun belirlenmesi ve membran yağ asidi organizasyonunun yenilendiği durumların belirlenmesinde güçlü bir araçtır. Çalışmamızın sonuçları MDA-MB231 hücre hattında SST ve SST+Vit C'nin trans lipid izomerlerinin oluşum yollarına aracılık ettiğini ve kemoterapötiklerin bu yollar aracılığı ile hücre ölümünü uyarabileceğine düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamız sonucu bulduğumuz, hücre membranı fosfolipidlerindeki trans lipid oluşumu ileriki çalışmalar için ilham kaynağı olabilir. Çalışmamızın sonuçları daha etkili kanser tedavi stratejilerinin tasarlanmasında da kullanılabilir.

SST ve Vit C'nin yol açtığı membran lipid kompozisyonundaki değişikliğe bağlı oluşan sinyal ileti mekanizmalarındaki (MAPK, EGFR) değişiklikler açığa kavuşturuldu. SST ve Vit C'nin hücre membran lipid kompozisyonunda oluşturduğu bu değişikliğin, hücre yüzeyindeki reseptör ve hücre içi sinyal iletim mekanizmaları üzerindeki etkilerini araştırdık. Bu nedenle hücre yüzeyinde EGF reseptörünün ve hücre içerisinde MAPK proteinlerinin aktivasyon durumları (fosforilasyon/defosforilasyon) tespit edildi. Literatürde bu konuda bir bilgi mevcut değildir. Bu amaçla meme kanseri hücrelerinde takiben MAPK sinyal ileti yolağında bulunan AKT1, p-AKT-1(Ser473), p-AKT-1 (Thr308), p-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), S6-Ribozomal and p-S6-Ribozomal (Ser235/236) düzeylerini belirledik. MAPK sinyal yolu, normal hücrelerde olduğu gibi birçok kanser hücresinde de proliferasyon için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler büyüme, farklılaşma, stres ve inflamasyon gibi hücrel olayları kontrol eden sinyal yollarındaki anahtar düzenleyicilerdir. Hem p44 hem de p42 MAP kinazlar (Erk1 ve Erk2) protein kinaz kaskadında kritik role sahiptir ve hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenlerler (Cowley ve ark., 1994; Pearson ve ark., 2001; McKay ve Morrison, 2007). ERK; hücre çoğalması, farklılaşma ve sağkalım gibi önemli hücrel prosesleri düzenleyen karmaşık bir sinyal ağının merkezi bir bileşenidir. MAPK ailesinin bir üyesi olan ERK1/2'nin hücre çoğalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Metabolizmayı modüle edebilen klinik terapilerin araştırılması ve geliştirilmesi kritik bir öneme sahiptir. MAP kinazlar; büyüme ve nörotrofik faktörler, sitokinler, hormonlar, nörotransmitterler ve ilaçlar gibi birçok farklı hücre dışı sinyal tarafından aktive edilebilirler. Bir çalışmada özellikle serbest radikal yakalama özelliğiyle dikkat çeken kuersetinin, karsinogenezde önemli bir rol oynayan metabolik yollarda, protein kinaz C, MAPK gibi çeşitli tip kinazlara doğrudan etki ettiği vurgulanmaktadır (Borska ve ark., 2010). Bu bileşiklerin; meme (Choi ve ark., 2008), akciğer (Granado-Serrano ve ark., 2006), mide (Wang ve ark., 2012) kanseri hücrelerini doz ve zamana bağlı olarak, hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozisi indükleyerek inhibe ettiği, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmamızda SST, Vit C ve SST+Vit C inkübasyonları MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde, genel MAPK proteinlerini anlamlı düzeyde azalttı. Literatürde meme kanser hücrelerinde SST ve Vit C'nin membran lipid kompozisyonu üzerine olan etkisinin tanımlandığı hiçbir çalışma

bulunmadığı gibi, MAPK aktivasyonundaki rolü ile ilgili de herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Farklı bir çalışmada, MAPK1 sinyal yolu aktiVit Esinin, servikal kanser hücresi metastazının indüksiyonunda rol oynayan önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir (Du ve ark., 2013). Normal MAPK/ERK fonksiyonu, hücre döngüsü aktiVit Esi için gerekli olan proteinlerin degradasyonu ile tümör baskılanmasında önemlidir (Burotto ve ark., 2014). Buna rağmen, MAPK'ların anormal aktivasyonu, prostat benign tümörleri modelindeki normal fibroblastlarda gösterildiği gibi, hücre döngüsü sırasında progresyon için gerekli olan proteinlerin parçalanmasıyla sonuçlanır. MAPK'lerin bu ikili etkilerinden hangisinin, sinyalin yoğunluğuna ve sinyalin anormal olarak aktive edildiği bağlam veya dokuya bağlı olduğu bilinmemektedir (Derynck ve ark., 2014). MAPK / ERK'in kanserin başlangıcında ve ilerlemesinde ilişkili olduğu birçok farklı yolak vardır. Erk 1/2, MAPK ailesinin alt grubundan biridir (Z. Lu ve Xu, 2006). Erk 1/2 ifadesi normalde hücre takibini artırır, bu nedenle karsinogenez, metastaz ve fibrozisin indüksiyonuna neden olabilir.

İnsan epidermoid karsinoma hücreleri 50 ile 100 kat fazla EGFR eksprese eder. Meme, skuamoz baş ve boyun, glioma, akciğer, mide, pankreas ovaryum ve prostat kanserlerinde, EGFR'nin aşırı eksprese edildiğine dair birçok çalışma rapor edilmiştir (Koenders ve ark., 1991; Tolaney ve ark., 2019). Bazı çalışmalar, meme kanser hastalarında tümördeki artmış EGFR'nin, hastalığın ilerlemesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Literatürde meme kanser hücrelerinde SST ve Vit C'nin membran yüzey reseptörü üzerine olan etkisinin tanımlandığı hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Projemizde, meme kanser hücrelerinde SST ve Vit C'nin EGFR ekspresyonu üzerine etkisini saptadık. Tümör hücresinin yaşamını sürdürebilmesi için hücre içinde her biri ile sıkı bir işbirliği içinde çalışan çok sayıda sinyal ileti yoluna ve bu yolları aktive eden uyarılara ihtiyacı vardır. Meme kanseri gelişmesi ve ilerlemesinde rol oynadığı anlaşılan büyüme faktör ailelerinden birisi de EGFR ailesi ve bu reseptörler aracılığı ile uyarılan sinyal ileti yoludur. EGFR ailesine mensup Her-2 molekülünün kötü bir prognostik faktör olduğu ve bu reseptör üzerinden başlayan sinyal ileti sisteminin Her-2'e karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikor ile bloke edilmesinin metastatik meme kanseri hastalarında sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (Bewick ve ark., 1999; Esteva ve ark., 2002). EGF reseptör ailesinin meme karsinogenezisi ve progresyonunda rolü

olduğu düşünölen diğer bir üyesi ise Her-1(EGFR)'dır (Stern, 2000; Yarden ve Sliwowski, 2001). EGFR sinyal ileti yolu diğer birçok epitelyal tümörlerde olduğu gibi meme kanserinde de normalden fazla çalıştığında hücre proliferasyonunu, anjiogenezi ve invazyon/metastaz potansiyelini arttırarak meme tümörü hücrelerinin habis karakterler kazanmasını ve oluşan tümörlerin progresyonunu sağlamaktadır (Salomon ve ark., 1995). Bu mekanizmalra ek olarak EGFR sinyal ileti yolunun meme kanseri etyolojisinde önemli rol oynayan östrojen reseptörünün sinyal ileti yolu ile olan karşılıklı ilişkisinin uygulanan endokrin tedavilere (antiöstrojen) karşı direnç gelişmesinde rol oynadığı düşünölmektedir (Schiff ve ark., 2003). Pek çok epitelyal tümörde (meme kanseri dahil) artmış EGFR ekspresyonunun kötü bir klinik seyirle ilişkili bulunması ve daha da önemlisi EGFR sinyal iletimini bloke eden ajanların kanser hücreleri üzerinde anti-tümör göstermesi EGFR sinyal ileti yolunun en çok araştırılan büyüme faktörü yolu olmasına neden olmuştur (Prenzel ve ark., 2001; Arteaga, 2002). EGFR sinyal ileti yolunun meme kanserinde endokrin ajanlara karşı direnç gelişiminde rolü olduğu düşünölen metabolik yollardan birisidir. Bir çalışmada ki veriler EGFR sinyal ileti yolunun çeşitli basamaklarda bloke edilmesinin meme kanseri hücrelerinde endokrin direnç gelişmesini geciktirmesi ile de desteklenmiştir (Johnston ve ark., 2003; Kurokawa ve Arteaga, 2003). Çalışmamızda SST ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EGFR seviyelerinin azaldığını, fakat MDA-MB231 hücrelerinde SST+Vit C ile inkübasyonda ise EGFR seviyesinin arttığını gözlemledik. EGF reseptörleri aracılığıyla nükleusa iletilen sinyallerin net etkisi bu reseptörlere hangi ligandın bağlandığına, reseptörlerin hangi reseptörle dimerizasyon yaptığına, buna bağlı olarak hangi hücre içi alt yolların aktive olduğuna ve EGFR sinyal ileti yolunun diğer hangi sinyal ileti yolları ile kesiştiğine bağlıdır (Yarden ve Sliwowski, 2001). Dolayısı ile bu sinyal ileti yolunu oluşturan proteinlerin meme tümörlerindeki ekspresyon biçimlerinin belirlenmesi ve bu ekspresyon biçiminin uygulanan tedavileri ne yönde etkilediğinin bilinmesi EGFR sinyal ileti yolunu hedefleyen biyolojik ajanlardan maksimum yararlanacak hasta gruplarının saptanmasında önemli olacaktır.

Tümör hücresinde çalışan sinyal ileti yollarının sayıca çokluğu ve birbirleri ile olan yakın ilişkileri, bir sinyal ileti yolu bloke edildiğinde diğerlerinin devreye girmesini sağlamakta ve böylece tümör yaşamını sürdürebilmek için kolayca başka kaçış yolları

bulabilmektedir. Bu da yıllardır karşılaştığımız önemli bir soruna yani uygulanan tedaviye direnç gelişmesine neden olmaktadır.

Bulgularımıza dayanarak Vit C'nin SST ile birlikte kullanımının meme kanser hastalarının tedavisi sırasında dikkatle takip edilmelerinin gerektiği sonucu çıkarılabilir. Antioksidan takviyesi yararlı, zararlı ya da nötral olması antioksidanın özelliklerine ve dozuna, kullanılan kemoterapi ilacına, tedavi edilen kanser tipine ve hastanın tükettiği diyetle bağlıdır. Bu alanda yapılan klinik randomize çalışmalar az sayıdadır. Tek bir antioksidanın ve antioksidan kombinasyonlarının geleneksel kanser tedavisindeki etkilerinin tamamen açıklanması için iyi düzenlenmiş randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca hücre yüzey reseptör ve sinyal ileti yollarında SST ve Vit C'e bağlı etkilerin ve değişikliklerin aydınlatılması, meme kanser tedavisinde bugüne kadar araştırılmamış olan sinyal ileti yollarının ve mekanizmalarının belirlenerek meme kanser tedavisindeki olası rollerini ve kanser hücrelerinin selektif eliminasyonuna katkı sağlayacak yeni bir tedavi stratejisi olarak potansiyelini ortaya çıkarmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmanın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 meme kanser hücre membranlarında tekli doymamış yağ asit (MUFA) düzeyi artış gösterdi.
2. SST, Vit C ve SST+Vit C, MCF-7 meme kanser hücre membranlarında omega-6 yağ asidi türevi olan linoleik asit düzeyinin azalmasına neden oldu.
3. SST, SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 meme kanser hücre membranlarında dekosapentaenoik asit düzeyi artış gösterdi.
4. Vit C ve SST+Vit C, MCF-7 meme kanser hücre membranlarında araşidonik asit mono-trans izomerlerinin artmasına neden oldu.
5. SST+Vit C ile inkübe edilen MDA-MB231 meme kanser hücre membranlarında stearik asit düzeyi artış gösterdi.
6. Vit C ve SST+Vit C, MDA-MB231 meme kanser hücre membranlarında omega-6 yağ asidi türevi olan linoleik asit düzeyi artış gösterdi.
7. SST+Vit C, MDA-MB231 meme kanser hücre membranlarında total trans izomerlerinin artmasına neden oldu.
8. SST+Vit C, MDA-MB231 meme kanser hücre membranlarında dekosapentaenoik asit ve dokosahekzaenoik asit (DHA) düzeylerin azalmasına neden oldu.
9. SST, Vit C, SST+Vit C ile inkübe edilen MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde genel MAPK proteinlerin düzeyleri düşük bulundu.
10. SST ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde EGFR seviyelerinin azaldığı, MDA-MB231 hücrelerinde ise SST+Vit C ile inkübasyon EGFR seviyesinin arttığı bulundu.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre önerilerimiz:

1. Bulgularımıza dayanarak meme kanser hücrelerinde lipid izomerizasyonu ve sinyal yolaklarına somatostatin ve antioksidanın birlikte etki ettiği gösterilmektedir. Lipidom analizi sonuçları SST+Vit C'nin indüklediği yağ asidi yeniden düzenlenmesinin rolü ve membranın önemini ortaya koyarken hücre cevabının ve meme hücre tümörleri gibi hastalıkların etkilenmesine yönelik lipid-tabanlı stratejilerin potansiyelini göstermektedir.
2. Kanser hücrelerinde SST ve Vit C'nin tüm sinyal mekanizmalarının ve etkilerinin aydınlatılması gerekmektedir. Metabolizmayı modüle edebilen klinik terapilerin araştırılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.
3. Hücre yüzey reseptör ve sinyal ileti yollarında SST ve Vit C'e bağlı etkilerin ve değişikliklerin aydınlatılması, meme kanser tedavisinde bugüne kadar araştırılmamış olan sinyal ileti yollarının ve mekanizmalarının belirlenerek meme kanser tedavisindeki olası rollerini ve kanser hücrelerinin selektif eliminasyonuna katkı sağlayacak yeni bir tedavi stratejisi olarak potansiyelini ortaya çıkarmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abshirini, M., Siassi, F., Koohdani, F., Qorbani, M., Khosravi, S., Aslani, Z. Higher intake of dietary n-3 pufa and lower mufa are associated with fewer menopausal symptoms. *Climacteric*. 2019; 22 (2): 195-201.
- Alche, J. D. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox Biol*. 2019: 101136.
- Andersson, J., & Koper, I. Tethered and polymer supported bilayer lipid membranes: Structure and function. *Membranes (Basel)*. 2016; 6 (2).
- Aranda-Cano, L., Sanchez-Calvo, B., Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Mata-Perez, C., Padilla, M. N. Post-translational modification of proteins mediated by nitro-fatty acids in plants: Nitroalkylation. *Plants (Basel)*. 2019; 8 (4).
- Arteaga, C. L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: More than just expression? *Oncologist*. 2002; 7 Suppl 4: 31-39.
- Beld, J., Lee, D. J., & Burkart, M. D. Fatty acid biosynthesis revisited: Structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Biosyst*. 2015; 11 (1): 38-59.
- Bendsen, N. T., Stender, S., Szecsi, P. B., Pedersen, S. B., Basu, S., Hellgren, L. I. Effect of industrially produced trans fat on markers of systemic inflammation: Evidence from a randomized trial in women. *J Lipid Res*. 2011; 52 (10): 1821-1828.
- Bergandi, L., Canosa, S., Pittatore, G., Silvagno, F., Doublier, S., Gennarelli, G. Human recombinant fsh induces chemoresistance in human breast cancer cells via hif-1alpha activation. *Biol Reprod*. 2019.
- Bewick, M., Chadderton, T., Conlon, M., Lafrenie, R., Morris, D., Stewart, D. Expression of c-erbb-2/her-2 in patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell support. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24 (4): 377-384.
- Bhikoo, R., Srinivasa, S., Yu, T. C., Moss, D., & Hill, A. G. Systematic review of breast cancer biology in developing countries (part 1): Africa, the middle east, eastern europe, mexico, the caribbean and south america. *Cancers (Basel)*. 2011; 3 (2): 2358-2381.
- Blaker, M., Schmitz, M., Gocht, A., Burghardt, S., Schulz, M., Broring, D. C. Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol*. 2004; 41 (1): 112-118.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37 (8): 911-917.

- Borska, S., Drag-Zalesinska, M., Wysocka, T., Sopel, M., Dumanska, M., Zabel, M. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of quercetin on human pancreatic carcinoma cell lines epp85-181p and epp85-181rdb. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010; 48 (2): 222-229.
- Bousquet, C., Guillermet, J., Vernejoul, F., Lahlou, H., Buscail, L., & Susini, C. Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation. *Dig Liver Dis.* 2004; 36 Suppl 1: S2-7.
- Bozonet, S. M., Carr, A. C., Pullar, J. M., & Vissers, M. C. Enhanced human neutrophil vitamin c status, chemotaxis and oxidant generation following dietary supplementation with vitamin c-rich sungold kiwifruit. *Nutrients.* 2015; 7 (4): 2574-2588.
- Brem, R. F., Rapelyea, J. A., Zisman, G., Mohtashemi, K., Raub, J., Teal, C. B. Occult breast cancer: Scintimammography with high-resolution breast-specific gamma camera in women at high risk for breast cancer. *Radiology.* 2005; 237 (1): 274-280.
- Bruns, C., Shi, V., Hoyer, D., Schuurman, H., & Weckbecker, G. Somatostatin receptors and the potential use of sandostatin to interfere with vascular remodelling. *Eur J Endocrinol.* 2000; 143 Suppl 1: S3-7.
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., & Kohn, E. C. The mapk pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer.* 2014; 120 (22): 3446-3456.
- Castro-Perez, J. M., Kamphorst, J., DeGroot, J., Lafeber, F., Goshawk, J., Yu, K. Comprehensive lc-ms e lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. *J Proteome Res.* 2010; 9 (5): 2377-2389.
- Chatgililoglu, C., & Ferreri, C. Trans lipids: The free radical path. *Acc Chem Res.* 2005; 38 (6): 441-448.
- Chen, F., Chen, L., Qin, Q., & Sun, X. Salt-inducible kinase 2: An oncogenic signal transmitter and potential target for cancer therapy. *Front Oncol.* 2019; 9: 18.
- Chiang, C. D., Song, E. J., Yang, V. C., & Chao, C. C. Ascorbic acid increases drug accumulation and reverses vincristine resistance of human non-small-cell lung-cancer cells. *Biochem J.* 1994; 301 (Pt 3): 759-764.
- Choi, E. J., Bae, S. M., & Ahn, W. S. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer mda-mb-453 cells. *Arch Pharm Res.* 2008; 31 (10): 1281-1285.
- Comstock, G. W., Alberg, A. J., Huang, H. Y., Wu, K., Burke, A. E., Hoffman, S. C. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: Ascorbic acids, carotenoids, alpha-tocopherol, selenium, and total peroxy radical absorbing capacity. *Am J Epidemiol.* 2008; 168 (7): 831-840.

Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., & Marshall, C. J. Activation of map kinase kinase is necessary and sufficient for pc12 differentiation and for transformation of nih 3t3 cells. *Cell*. 1994; 77 (6): 841-852.

Dalm, S. U., Melis, M., Emmering, J., Kwekkeboom, D. J., & de Jong, M. Breast cancer imaging using radiolabelled somatostatin analogues. *Nucl Med Biol*. 2016; 43 (9): 559-565.

Das, A., & Shah, P. S. Octreotide for the treatment of chylothorax in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; (9): CD006388.

Dasgupta, P. Somatostatin analogues: Multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther*. 2004; 102 (1): 61-85.

de Jong, A. J., Kloppenburg, M., Toes, R. E., & Ioan-Facsinay, A. Fatty acids, lipid mediators, and t-cell function. *Front Immunol*. 2014; 5: 483.

Derynck, R., Muthusamy, B. P., & Saeteurn, K. Y. Signaling pathway cooperation in tgf-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. 2014; 31: 56-66.

Ding, Y., Fan, J., Li, W., Peng, Y., Yang, R., Deng, L. The effect of albumin fusion structure on the production and bioactivity of the somatostatin-28 fusion protein in *pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014; 41 (6): 997-1006.

Drastikova, M., Beranek, M., Gabalec, F., Netuka, D., Masopust, V., Cesak, T. Expression profiles of somatostatin, dopamine, and estrogen receptors in pituitary adenomas determined by means of synthetic multilocus calibrators. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2016; 160 (2): 238-243.

Du, L., Rao, G., Wang, H., Li, B., Tian, W., Cui, J. Cd44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2013; 73 (8): 2682-2694.

Eigler, T., & Ben-Shlomo, A. Somatostatin system: Molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *J Mol Endocrinol*. 2014; 53 (1): R1-19.

Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 931251.

Esteva, F. J., Valero, V., Booser, D., Guerra, I. T., Murray, J. L., Pusztai, L. Phase ii study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with her-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20 (7): 1800-1808.

Evans, D. G. R., Harkness, E. F., Brentnall, A. R., van Veen, E. M., Astley, S. M., Byers, H. Breast cancer pathology and stage are better predicted by risk stratification

models that include mammographic density and common genetic variants. *Breast Cancer Res Treat.* 2019.

Ferlay, A., Bernard, L., Meynadier, A., & Malpuech-Brugere, C. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie.* 2017; 141: 107-120.

Ferreri, C., & Chatgililoglu, C. Geometrical trans lipid isomers: A new target for lipidomics. *Chembiochem.* 2005; 6 (10): 1722-1734.

Ferreri, C., Faraone Mennella, M. R., Formisano, C., Landi, L., & Chatgililoglu, C. Arachidonate geometrical isomers generated by thiyl radicals: The relationship with trans lipids detected in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33 (11): 1516-1526.

Ferreri, C., Kratzsch, S., Brede, O., Marciniak, B., & Chatgililoglu, C. Trans lipid formation induced by thiols in human monocytic leukemia cells. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38 (9): 1180-1187.

Ferreri, C., Samadi, A., Sassatelli, F., Landi, L., & Chatgililoglu, C. Regioselective cis-trans isomerization of arachidonic double bonds by thiyl radicals: The influence of phospholipid supramolecular organization. *J Am Chem Soc.* 2004; 126 (4): 1063-1072.

Franck, S. E., Gatto, F., van der Lely, A. J., Janssen, J., Dallenga, A. H. G., Nagtegaal, A. P. Somatostatin receptor expression in gh-secreting pituitary adenomas treated with long-acting somatostatin analogues in combination with pegvisomant. *Neuroendocrinology.* 2017; 105 (1): 44-53.

Ginter, E., & Simko, V. New data on harmful effects of trans-fatty acids. *Bratisl Lek Listy.* 2016; 117 (5): 251-253.

Giri, D. D., Dundas, S. A., Nottingham, J. F., & Underwood, J. C. Oestrogen receptors in benign epithelial lesions and intraduct carcinomas of the breast: An immunohistological study. *Histopathology.* 1989; 15 (6): 575-584.

Graham, S., Hellmann, R., Marshall, J., Freudenheim, J., Vena, J., Swanson, M. Nutritional epidemiology of postmenopausal breast cancer in western new york. *Am J Epidemiol.* 1991; 134 (6): 552-566.

Granado-Serrano, A. B., Martin, M. A., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of bcl-2, and inhibition of pi-3-kinase/akt and erk pathways in a human hepatoma cell line (hepg2). *J Nutr.* 2006; 136 (11): 2715-2721.

Grant, M. B., Caballero, S., & Millard, W. J. Inhibition of igf-i and b-fgf stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: A potential treatment for ocular neovascularization. *Regul Pept.* 1993; 48 (1-2): 267-278.

Greenlee, H., Kwan, M. L., Kushi, L. H., Song, J., Castillo, A., Weltzien, E. Antioxidant supplement use after breast cancer diagnosis and mortality in the life after cancer epidemiology (lace) cohort. *Cancer*. 2012; 118 (8): 2048-2058.

Grossen-Rosti, L., Kessler, E. C., Troscher, A., Bruckmaier, R. M., & Gross, J. J. Hyperglycaemia in transition dairy cows: Effects of lactational stage and conjugated linoleic acid supplementation on glucose metabolism and turnover. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018; 102 (2): 483-494.

Hardy, S., Langelier, Y., & Prentki, M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of mda-mb-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res*. 2000; 60 (22): 6353-6358.

He, D., Mustafi, D., Fan, X., Fernandez, S., Markiewicz, E., Zamora, M. Magnetic resonance spectroscopy detects differential lipid composition in mammary glands on low fat, high animal fat versus high fructose diets. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0190929.

Heipieper, H. J., Meinhardt, F., & Segura, A. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in pseudomonas and vibrio: Biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 229 (1): 1-7.

Holman, R. T. Nutritional and metabolic interrelationships between fatty acids. *Fed Proc*. 1964; 23: 1062-1067.

Holman, R. T. The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr*. 1998; 128 (2 Suppl): 427S-433S.

Holst-Hansen, C., Low, J. A., Stephens, R. W., Johnson, M. D., Carmeliet, P., Frandsen, T. L. Increased stromal expression of murine urokinase plasminogen activator in a human breast cancer xenograft model following treatment with the matrix metalloprotease inhibitor, batimastat. *Breast Cancer Res Treat*. 2001; 68 (3): 225-237.

Hunter, D. J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Rosner, B., Hennekens, C. H. A prospective study of the intake of vitamins c, e, and a and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 1993; 329 (4): 234-240.

Innis, S. M. Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood. *Atheroscler Suppl*. 2006; 7 (2): 17-20.

Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8 (3).

Jacob, R. A. Passive smoking induces oxidant damage preventable by vitamin c. *Nutr Rev*. 2000; 58 (8): 239-241.

Ji, Y., Han, Z., Shao, L., & Zhao, Y. Evaluation of in vivo antitumor effects of low-frequency ultrasound-mediated mirna-133a microbubble delivery in breast cancer. *Cancer Med.* 2016; 5 (9): 2534-2543.

Jia, W. D., Xu, G. L., Sun, H. C., Wang, L., Xu, R. N., & Xue, Q. Effect of octreotide on angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma in vivo. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003; 2 (3): 404-409.

Johnston, S. R., Head, J., Pancholi, S., Detre, S., Martin, L. A., Smith, I. E. Integration of signal transduction inhibitors with endocrine therapy: An approach to overcoming hormone resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (1 Pt 2): 524S-532S.

Kim, B. H., & Akoh, C. C. Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids. *J Food Sci.* 2015; 80 (8): C1713-1724.

Kleshchina Iu, V., & Eliseev, I. [characteristics of nutrition and vitamin supply in girls with metabolic syndrome]. *Gig Sanit.* 2011; (1): 68-70.

Koenders, P. G., Beex, L. V., Geurts-Moespot, A., Heuvel, J. J., Kienhuis, C. B., & Benraad, T. J. Epidermal growth factor receptor-negative tumors are predominantly confined to the subgroup of estradiol receptor-positive human primary breast cancers. *Cancer Res.* 1991; 51 (17): 4544-4548.

Kolch, W. Meaningful relationships: The regulation of the ras/raf/mek/erk pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000; 351 Pt 2: 289-305.

Kullenberg, D., Taylor, L. A., Schneider, M., & Massing, U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 3.

Kummerow, F. A. The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. *Atherosclerosis.* 2009; 205 (2): 458-465.

Kurokawa, H., & Arteaga, C. L. ErbB (her) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (1 Pt 2): 511S-515S.

Kurutas, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr J.* 2016; 15 (1): 71.

Kwiecien, S., Jasnos, K., Magierowski, M., Sliwowski, Z., Pajdo, R., Brzozowski, B. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *J Physiol Pharmacol.* 2014; 65 (5): 613-622.

Lasfer, M., Vadrot, N., Schally, A. V., Nagy, A., Halmos, G., Pessayre, D. Potent induction of apoptosis in human hepatoma cell lines by targeted cytotoxic somatostatin analogue an-238. *J Hepatol.* 2005; 42 (2): 230-237.

- Lauder, H., Sellers, L. A., Fan, T. P., Feniuk, W., & Humphrey, P. P. Somatostatin sst5 inhibition of receptor mediated regeneration of rat aortic vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1997; 122 (4): 663-670.
- Lepionka, T., Bialek, A., Bialek, M., Czauderna, M., Stawarska, A., Wrzesien, R. Mammary cancer risk and serum lipid profile of rats supplemented with pomegranate seed oil and bitter melon extract. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2019.
- Liao, Z., Chua, D., & Tan, N. S. Reactive oxygen species: A volatile driver of field cancerization and metastasis. *Mol Cancer.* 2019; 18 (1): 65.
- Lichtenstein, A. H. Dietary trans fatty acids and cardiovascular disease risk: Past and present. *Curr Atheroscler Rep.* 2014; 16 (8): 433.
- Liem, A. A., Chamberlain, M. P., Wolf, C. R., & Thompson, A. M. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *Eur J Surg Oncol.* 2002; 28 (6): 679-684.
- Liu, X., & Zhong, D. [research progress of targeted therapy for braf mutation in advanced non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2018; 21 (8): 635-640.
- Lou, Y., Liu, Y., Wang, H., Li, N., Liu, Q., & Zhao, X. Effects of co2 restriction on growth of nitzschia closterium: Evidence from stable isotopes and fatty acids. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019; 177: 7-17.
- Lu, Q. R., Qian, L., & Zhou, X. Developmental origins and oncogenic pathways in malignant brain tumors. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2019: e342.
- Lu, Z., & Xu, S. Erk1/2 map kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* 2006; 58 (11): 621-631.
- Lundqvist, A., Andersson, E., Ahlberg, I., Nilbert, M., & Gerdtham, U. Socioeconomic inequalities in breast cancer incidence and mortality in europe-a systematic review and meta-analysis. *Eur J Public Health.* 2016; 26 (5): 804-813.
- Lundsgaard, A. M., Fritzen, A. M., & Kiens, B. Molecular regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle during aerobic exercise. *Trends Endocrinol Metab.* 2018; 29 (1): 18-30.
- Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *Ukr Biochem J.* 2015; 87 (6): 11-18.
- Lutty, G. A., Chan-Ling, T., Phelps, D. L., Adamis, A. P., Berns, K. I., Chan, C. K. Proceedings of the third international symposium on retinopathy of prematurity: An update on rop from the lab to the nursery (november 2003, anaheim, california). *Mol Vis.* 2006; 12: 532-580.

MacDermott, R. P. Treatment of irritable bowel syndrome in outpatients with inflammatory bowel disease using a food and beverage intolerance, food and beverage avoidance diet. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13 (1): 91-96.

Martin-Grace, J., & Tamagno, G. Somatostatin analogs in the medical management of occult bleeding of the lower digestive tract. *Gastroenterol Res Pract*. 2015; 2015: 702921.

McKay, M. M., & Morrison, D. K. Integrating signals from rtk to erk/mapk. *Oncogene*. 2007; 26 (22): 3113-3121.

Miyan, M., Schmidt-Mende, J., Kiessling, R., Poschke, I., & de Boniface, J. Differential tumor infiltration by t-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med*. 2016; 14 (1): 227.

Motono, N., Shimada, K., Kamata, T., & Uramoto, H. Sternal resection and reconstruction for metastasis due to breast cancer: The marlex sandwich technique and implantation of a pedicled latissimus dorsi musculocutaneous flap. *J Cardiothorac Surg*. 2019; 14 (1): 79.

Nechuta, S., Lu, W., Chen, Z., Zheng, Y., Gu, K., Cai, H. Vitamin supplement use during breast cancer treatment and survival: A prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20 (2): 262-271.

Nguyen, Q. V., Malau-Aduli, B. S., Cavalieri, J., Malau-Aduli, A. E. O., & Nichols, P. D. Enhancing omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content of dairy-derived foods for human consumption. *Nutrients*. 2019; 11 (4).

Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S. W., & Cravatt, B. F. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell*. 2010; 140 (1): 49-61.

Nowak, J. Z. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of cns diseases: Focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol Rep*. 2013; 65 (2): 288-304.

Osborne, C. K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1998; 339 (22): 1609-1618.

Parsa, Y., Mirmalek, S. A., Kani, F. E., Aidun, A., Salimi-Tabatabaee, S. A., Yadollah-Damavandi, S. A review of the clinical implications of breast cancer biology. *Electron Physician*. 2016; 8 (5): 2416-2424.

Patel, P. C., Barrie, R., Hill, N., Landeck, S., Kurozawa, D., & Woltering, E. A. Postreceptor signal transduction mechanisms involved in octreotide-induced inhibition of angiogenesis. *Surgery*. 1994; 116 (6): 1148-1152.

- Patel, Y. C. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest.* 1997; 20 (6): 348-367.
- Pawlikowski, M., & Melen-Mucha, G. Somatostatin analogs - from new molecules to new applications. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4 (6): 608-613.
- Payen, V. L., Zampieri, L. X., Porporato, P. E., & Sonveaux, P. Pro- and antitumor effects of mitochondrial reactive oxygen species. *Cancer Metastasis Rev.* 2019.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. Mitogen-activated protein (map) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22 (2): 153-183.
- Pizzimenti, S., Ciamporcero, E., Daga, M., Pettazzoni, P., Arcaro, A., Cetrangolo, G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol.* 2013; 4: 242.
- Platanias, L. C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood.* 2003; 101 (12): 4667-4679.
- Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S., & Ullrich, A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer.* 2001; 8 (1): 11-31.
- Quenel-Tueux, N., Debled, M., Rudewicz, J., MacGrogan, G., Pulido, M., Mauriac, L. Clinical and genomic analysis of a randomised phase ii study evaluating anastrozole and fulvestrant in postmenopausal patients treated for large operable or locally advanced hormone-receptor-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2015; 113 (4): 585-594.
- Ratnayake, W. M., & Galli, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Ann Nutr Metab.* 2009; 55 (1-3): 8-43.
- Rau, K. M., Lin, Y. C., Chen, Y. Y., Chen, J. S., Lee, K. D., Wang, C. H. Pegylated liposomal doxorubicin (lipo-dox(r)) combined with cyclophosphamide and 5-fluorouracil is effective and safe as salvage chemotherapy in taxane-treated metastatic breast cancer: An open-label, multi-center, non-comparative phase ii study. *BMC Cancer.* 2015; 15: 423.
- Reimhult, E. Nanoparticle-triggered release from lipid membrane vesicles. *N Biotechnol.* 2015; 32 (6): 665-672.
- Rezatabar, S., Karimian, A., Rameshknia, V., Parsian, H., Majidinia, M., Kopi, T. A. Ras/mapk signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol.* 2019.

Rodrigues da Silva, M., Schapochnik, A., Peres Leal, M., Esteves, J., Bichels Hebeda, C., Sandri, S. Beneficial effects of ascorbic acid to treat lung fibrosis induced by paraquat. *PLoS One*. 2018; 13 (11): e0205535.

Rodriguez, A. C., Blanchard, Z., Maurer, K. A., & Gertz, J. Estrogen signaling in endometrial cancer: A key oncogenic pathway with several open questions. *Horm Cancer*. 2019.

Rubis, B., Luczak, M. W., Krawic, C., & Zhitkovich, A. Vitamin c increases DNA breaks and suppresses DNA damage-independent activation of atm by bleomycin. *Free Radic Biol Med*. 2019; 136: 12-21.

Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G., Battaglia, A., Picciotto, M., & Adamo, V. Heterogeneous responses to epidermal growth factor receptor (egfr) tyrosine kinase inhibitors (tkis) in patients with uncommon egfr mutations: New insights and future perspectives in this complex clinical scenario. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (6).

Sall, J. W., Klisovic, D. D., O'Dorisio, M. S., & Katz, S. E. Somatostatin inhibits igf-1 mediated induction of vegf in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2004; 79 (4): 465-476.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995; 19 (3): 183-232.

Sanders, T. A. Essential and trans-fatty acids in nutrition. *Nutr Res Rev*. 1988; 1 (1): 57-78.

Schafers, S., Meyer, U., von Soosten, D., Huther, L., Drong, C., Eder, K. Influence of conjugated linoleic acids and vitamin e on milk fatty acid composition and concentrations of vitamin a and alpha-tocopherol in blood and milk of dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018; 102 (1): e431-e441.

Scharl, A., & Salterberg, A. Significance of ovarian function suppression in endocrine therapy for breast cancer in pre-menopausal women. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2016; 76 (5): 516-524.

Schiff, R., Massarweh, S., Shou, J., & Osborne, C. K. Breast cancer endocrine resistance: How growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res*. 2003; 9 (1 Pt 2): 447S-454S.

Schmitz, G., Liebisch, G., & Langmann, T. Lipidomic strategies to study structural and functional defects of abc-transporters in cellular lipid trafficking. *FEBS Lett*. 2006; 580 (23): 5597-5610.

Schneider, M., Diemer, K., Engelhart, K., Zankl, H., Trommer, W. E., & Biesalski, H. K. Protective effects of vitamins c and e on the number of micronuclei in lymphocytes in

smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res.* 2001; 34 (3): 209-219.

Sellem, L., Srour, B., Gueraud, F., Pierre, F., Kesse-Guyot, E., Fiolet, T. Saturated, mono- and polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk: Results from the french prospective cohort nutrinet-sante. *Eur J Nutr.* 2018.

Semmler, L., Reiter-Brennan, C., & Klein, A. Brca1 and breast cancer: A review of the underlying mechanisms resulting in the tissue-specific tumorigenesis in mutation carriers. *J Breast Cancer.* 2019; 22 (1): 1-14.

Sieber, J., & Jehle, A. W. Free fatty acids and their metabolism affect function and survival of podocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014; 5: 186.

Silva, G. A. F., Nunes, R. A. L., Morale, M. G., Boccardo, E., Aguayo, F., & Termini, L. Oxidative stress: Therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics (Sao Paulo).* 2018; 73 (suppl 1): e548s.

Stecca, B., & Rovida, E. Impact of erk5 on the hallmarks of cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (6).

Steinfort, D. P., Siva, S., Leong, T. L., Rose, M., Herath, D., Antippa, P. Systematic endobronchial ultrasound-guided mediastinal staging versus positron emission tomography for comprehensive mediastinal staging in nsccl before radical radiotherapy of non-small cell lung cancer: A pilot study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95 (8): e2488.

Stengel, A., Goebel-Stengel, M., Wang, L., Larauche, M., Rivier, J., & Tache, Y. Central somatostatin receptor 1 activation reverses acute stress-related alterations of gastric and colonic motor function in mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23 (6): e223-236.

Stern, D. F. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res.* 2000; 2 (3): 176-183.

Subramanian, C., Frank, M. W., Batte, J. L., Whaley, S. G., & Rock, C. O. Oleate hydratase from staphylococcus aureus protects against palmitoleic acid, the major antimicrobial fatty acid produced by mammalian skin. *J Biol Chem.* 2019.

Tao, M. H., Dai, Q., Millen, A. E., Nie, J., Edge, S. B., Trevisan, M. Associations of intakes of magnesium and calcium and survival among women with breast cancer: Results from western new york exposures and breast cancer (web) study. *Am J Cancer Res.* 2016; 6 (1): 105-113.

Tardy, A. L., Morio, B., Chardigny, J. M., & Malpuech-Brugere, C. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. *Nutr Res Rev.* 2011; 24 (1): 111-117.

Theodoropoulou, M., & Stalla, G. K. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol.* 2013; 34 (3): 228-252.

Tolaney, S. M., Guo, H., Pernas, S., Barry, W. T., Dillon, D. A., Ritterhouse, L. Seven-year follow-up analysis of adjuvant paclitaxel and trastuzumab trial for node-negative, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2019: JCO1900066.

Uetaki, M., Tabata, S., Nakasuka, F., Soga, T., & Tomita, M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin c-induced oxidative stress. *Sci Rep.* 2015; 5: 13896.

Ulaner, G. A., & Bodei, L. Hepatocellular carcinoma mimicking neuroendocrine tumor metastasis on 68ga-dotatate pet/ct. *Clin Nucl Med.* 2019; 44 (4): 330-331.

Vane, J. R. The fight against rheumatism: From willow bark to cox-1 sparing drugs. *J Physiol Pharmacol.* 2000; 51 (4 Pt 1): 573-586.

Wang, P., Zhang, K., Zhang, Q., Mei, J., Chen, C. J., Feng, Z. Z. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2012; 26 (2): 221-228.

Western, R. J., Lau, S. S., Marriott, P. J., & Nichols, P. D. Positional and geometric isomer separation of fame by comprehensive 2-d gc. *Lipids.* 2002; 37 (7): 715-724.

White, R., Dinneen, T., & Makris, A. Local radiotherapy alone following neoadjuvant chemotherapy and surgery in combined clinical stage ii and iii breast cancer. *Radiat Oncol.* 2016; 11: 93.

Woltering, E. A., Barrie, R., O'Dorisio, T. M., Arce, D., Ure, T., Cramer, A. Somatostatin analogues inhibit angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Surg Res.* 1991; 50 (3): 245-251.

Wolters, M., Ahrens, J., Romani-Perez, M., Watkins, C., Sanz, Y., Benitez-Paez, A. Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health - a systematic review conducted within the mynewgut project. *Clin Nutr.* 2018.

Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. Untangling the erbb signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2 (2): 127-137.

Zghibeh, C. M., Raj Gopal, V., Poff, C. D., Falck, J. R., & Balazy, M. Determination of trans-arachidonic acid isomers in human blood plasma. *Anal Biochem.* 2004; 332 (1): 137-144.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşegül	Uyruğu	TC
Soyadı	Hanikoğlu	Tel no	05074034354
Doğum tarihi	17.01.1984	e-posta	aysegulhanikoglu@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Aldemir Atilla Anadolu Lisesi	2002
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2014
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2019

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2014-2019

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	IELTS	5.5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
BÜYÜME GERİLİĞİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA ADİPONEKTİNİN PLASENTAL GELİŞİMDEKİ ROLÜ	Akdeniz Üniversitesi BAP	2012-2014
Nanopartikül İçerisine Kapsüle Edilen Doksorubisin ve Epoksomisin Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücrelerine Olan Sitotoksik Etkileri	Akdeniz Üniversitesi BAP	2015-2017

Yayınlar ve Bildiriler:

1. **Hanikoglu A**, Ozben H, Hanikoglu F, Ozben T. Hybrid Compounds & Oxidative Stress Induced Apoptosis In Cancer Therapy. *Curr Med Chem*. 2018 Jul 19.
2. **Hanikoglu A**, Hanikoglu F, Ozben T. Natural Product Inhibitors of Histone Deacetylases as New Anticancer Agents. *Curr Protein Pept Sci*. 2018; 19(3):333-340.
3. Hanikoglu F, **Hanikoglu A**, Kucuksayan E, Alisik M, Gocener AA, Erel O, Baykara M, Cuoghi A, Tomasi A, Ozben T. Dynamic thiol/disulphide homeostasis before and after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *Free Radic Res*. 2016 Nov; 50 (sup1):S79-S84. Epub 2016 Oct 25.
4. **Hanikoglu A**, Kucuksayan E, Akduman RC, Ozben T. A Review on Melatonin's Effects in Cancer: Potential Mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018; 18(7):985-992.
5. Hanikoglu F, Cort A, Ozben H, **Hanikoglu A**, Ozben T. Epoxomicin Sensitizes Resistant Osteosarcoma Cells to TRAIL Induced Apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015; 15(4):527-33.
6. Özdemir ED, **Hanikoglu A**, Cort A, Ozben B, Suleymanlar G, Ozben T. Effects of long- and short-term darbepoetin- α treatment on oxidative stress, inflammation and endothelial injury in ApoE knockout mice. *Adv Clin Exp Med*. 2017 Jul; 26(4):635-643.
7. Topaloglu Tuac S, Ozben S, Koseoglu Bitnel M, Koksall A, Kucuksayan E, **Hanikoğlu A**, Ozben T. Plasma copeptin levels in patients with restless legs syndrome. *Acta Neurol Scand*. 2018 Mar; 137(3):316-320.

Bildiriler:

1. Lipid Profiles of Human Breast Cancer Cell Membranes: Effects of Somatostatin. **Hanikoglu Aysegul**, Kucuksayan Ertan, Hanikoglu Ferhat, Chatgialoglu Chrys, Ferreri Carla, Ozben Tomris. *Recherches Scientifiques Luxembourg asbl for COST Action 16112*. 25 - 27 March, 2019, Luxembourg.

2. Plasma thiol levels in patients with prostate cancer. **A. Hanikoglu**, F. Hanikoglu, E. Kucuksayan, M. Alisik, A. A. Gocener, O. Erel, M. Baykara, G. Ponti, A. Tomasi, T. Ozben. 41st FEBS Congress, 3-8 September 2016. Kusadası, Turkey.
3. MG-63 ve SAOS-2 hücrelerinde Gambogic asidin sitotoksitesinin belirlenmesi. **Hanikoglu Aysegul**, Ferhat Hanikoglu, Aysegul Cort, Tomris Ozben. XXVII. Ulusal Biyokimya kongresi. 3-6 Kasım 2015, Belek, Antalya.
4. Trail ve Epoksomisin'in osteosarkom hücreleri üzerindeki pro-apoptotik etkileri Ferhat Hanikoglu, **Hanikoglu Aysegul**, Aysegul Cort, Tomris Ozben. XXVII. Ulusal Biyokimya kongresi. 3-6 Kasım 2015, Belek, Antalya.
5. Cytotoxicity of Gambogic acid on Ntera-2 and NCCIT testicular cancer cells. **Hanikoglu Aysegul**, Hanikoglu Ferhat, Çört Aysegül, Özben Tomris. SANKO University Innovation in Medicine Summit-3. 11-13 Mayıs 2017, Gaziantep, Türkiye.
6. Total antioxidant and thiol levels in prostate cancer patients. T.Ozben, F. Hanikoglu, **A. Hanikoglu**, E. Kucuksayan, M.Alısık, A.Gocener, O.Erel, M.Baykara. 70th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo. 29 July-2 August 2018, Chicago, IL USA.
7. Effects of Erythropoiesis Stimulation on the Biomarkers of Endothelial Injury and Atherosclerosis Development in Apo E Knockout Mice. T. Ozben, E. Dursun, **A.Hanikoglu**, A.Cort, B. Ozben, G. Suleymanlar. 70th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo. 29 July-2 August 2018, Chicago, IL USA.
8. Cell-free DNA: The search of prognostic biomarkers in prostate cancer. T. Ozben, G. Ponti, **A. Hanikoglu**, E. Kucuksayan, M. Baykara, M. Maccaferri, M. Mandrioli, A. Tomasi. 24th Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting. 5th-7th October 2016, Tirana, Albania.
9. Lipid Profiles of Human Cancer Cell Membranes Effects of Different Agents. Ozben T., **Hanikoglu A.**, Cort A., Kucuksayan E., Melchiorre M., Chatgialiloglu C., Ferreri C. 26th Meeting of the Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF)

and 6th National Congress of the Macedonian Association of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. 3-5 October 2018, Skopje, Macedonia

10. Effects of TRAIL and epoxomicin on pro-apoptotic protein levels and caspase activities in different types of osteosarcoma cells. F. Hanikoglu, H. Ozben, A. Cort, **A. Hanikoglu**, T. Ozben. 21. IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Euromedlab. 21-25 June 2015, PARİS.
11. Effects of long- and short- term Darbepoetin treatment on oxidative stress, inflammation and endothelial injury in atherosclerosis. E. Dursun Ozdemir, **A. Hanikoglu**, A. Cort, B. Ozben, G. Suleymanlar, T. Ozben. 22nd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Lab Med., 11-15 June 2017. Berlin, Boston.
12. Proteasome inhibition sensitizes osteosarcoma cells to Trail mediated apoptosis. Hanikoglu Ferhat, Cort Aysegul, Ozben Hakan, **Hanikoglu Aysegul**, Ozben Tomris. Cost Action CM1201: Biomimetic Radical Chemistry & ClicGene. 25-28 April 2016. Grenoble, France.
13. Prostat kanserli hastalarda prognostik belirteç olarak dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA). Tomris Ozben, Giovanni Ponti, **Aysegul Hanikoglu**, Monia Maccaferri, Ertan Kucuksayan, Aldo Tomasi. TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018, 29. Ulusal Biyokimya Kongresi. 26-30 Ekim 2018, Bodrum, Muğla.
14. New combination strategy of doxorubicin and epoxomicin in biocompatibility: Biodegradable polymeric nanoparticles increase apoptosis in breast cancer cells. Küçüksayan Ertan, Bozkurt Fatih, Ozben Tomris, Çiçek Perihan Kübra, **Hanikoglu Aysegul**, Yılmaz Mustafa Tahsin. European Biotechnology Congress. 25-27 May 2017 in Dubrovnik, Croatia.