ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Ezgi ÖZTECİK

OMEGA-3 VE OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN İNSAN MEME KANSERİ MCF7 HÜCRE HATTINDAKİ APOPTOZ İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE ETKİSİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OMEGA-3 VE OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN İNSAN MEME KANSERİ MCF7 HÜCRE HATTINDAKİ APOPTOZ İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE ETKİSİ

Fatma Ezgi ÖZTECİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 25/10/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…

……...	…….....	……
Doç. Dr. Makbule BAYLAN DANIŞMAN	Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ 2. DANIŞMAN	Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN ÜYE
……..……	……..…….....	
Dr. Öğr. Üyesi Fatmagün AYDIN ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Dilek TEKDAL ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2017-9563

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OMEGA-3 VE OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN İNSAN MEME KANSERİ MCF7 HÜCRE HATTINDAKİ APOPTOZ İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE ETKİSİ

Fatma Ezgi ÖZTECİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Makbule BAYLAN
Yıl: 2019, Sayfa: 47
2.Danışman : Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Jüri : Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
: Dr. Öğr. Üyesi Fatmagün AYDIN
: Dr. Öğr. Üyesi Dilek TEKDAL

Bu çalışmada, insan meme kanseri, MCF7 hücre hattında omega-3 (EPA, DHA) ve omega-6 (LA) yağ asitlerinin çeşitli dozları ve kombinasyonları, 24 saat süresince uygulanmıştır. Yapılan bu uygulamalar sonucunda MCF7 hücre hattında, MTT yöntemi uygulanarak hücrelerin canlılığı kontrol edilmiştir. Sonraki aşamalarda ise muamele edilen hücrelerden protein izolasyonu yapılarak, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile apoptoz ilişkili genler olan fosfo-p53 (Ser15), p53, Bad, fosfo-Bad (Ser112), bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175) ve bölünmüş PARP (Asp214) protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Muamele edilen tüm dozlar fosfo-p53 (Ser15) ve p53 ifadelerinde anlamlı farklılıklara yol açmamış ancak diğer proteinlerin ifadelerini anlamlı ölçüde arttırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Omega-3, Omega-6, MCF7, Apoptoz, Protein ekspresyonu

ABSTRACT

MSc THESIS

THE EFFECT OF OMEGA-3 AND OMEGA-6 FATTY ACIDS ON APOPTOSIS RELATED GENES IN HUMAN BREAST CANCER MCF7 CELL LINE

Fatma Ezgi ÖZTECİK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisors : Assoc. Prof. Dr. Makbule BAYLAN
Assoc. Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Year: 2019, Pages: 47
Jury : Assoc. Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
: Assist. Prof. Dr. Fatmagün AYDIN
: Assist. Prof. Dr. Dilek TEKDAL

In this study, various doses and combinations of omega-3 (EPA, DHA) and omega-6 (LA) fatty acids in human breast cancer, MCF7 cell line were administered for 24 hours. As a result of these applications, viability of the cells was controlled by applying MTT method in MCF7 cell line. In the subsequent stages, protein isolation was performed from the treated cells. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the expression levels of apoptosis-related genes, phospho-p53 (Ser15), p53, Bad, phospho-Bad (Ser112), cleaved Caspase-3 (Asp175), and cleaved PARP (Asp214) protein. Not all doses treated resulted in significant differences in phospho-p53 (Ser15) and p53 expressions, but significantly increased expression of other proteins.

Keywords: Omega-3, Omega-6, MCF7, Apoptosis, Protein expression

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Yağ asitlerinin, özellikle omega-3 (n-3) ve omega-6 (n-6) çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) kanser üzerine olumlu veya olumsuz etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir. Ancak n-3 ve n-6 çoklu doymamış yağ asitlerince zengin bir diyetin meme kanseri gelişimindeki rolü tam olarak anlaşılmamış olup karmaşık etki mekanizmaları nedeni ile hala tartışmalıdır. Bununla birlikte, birçok çalışma, n-6/n-3 yağ asitlerinin (YA) oranları ile meme kanseri gelişme riski arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiştir (Liu ve ark, 2014, Maillard ve ark, 2002, Goodstine ve ark, 2003). n-6 PUFA'ların tüketimi son zamanlarda önemli ölçüde artmıştır. Mevcut batı diyetinin atalarımızın diyetinde yaygın olan 1/1 oranına göre 20-2/1 arasında değişen n-6/n-3 oranı vardır (Simopoulos, 2008a). Yüksek n-6/n-3 oranları, linoleik asitten (LA) (Harnack ve ark, 2009) proinflamatuar eikozanoidlerin oluşumunu desteklemektedir, bu da kanser dahil çeşitli bozuklukların gelişmesine yol açar (Simopoulos, 2008b). Çünkü n-6 yağ asitlerinin proinflamatuar etkileri vardır ve n-3 yağ asitleri ile denge içinde alınmazlarsa, proinflamatuar etkileri, inflamasyona yol açabilecek inflamatuar etkiye dönüşür.

Uzama ve desatürasyon reaksiyonları için, iki tip yağ asidi arasında aynı enzimler için bir rekabet vardır. Yüksek n-6 ÇDYA seviyeleri, n-3 ÇDYA'ların uzamasını ve desatürasyonunu inhibe eder (Simopoulos 2008a, Negi ve ark, 2016). n-3 ve n-6 ÇDYA'lar arasındaki bu rekabet, n-3/n-6 oranlarının insanda ki bireysel yağ asidi konsantrasyonlarının önemini ortaya koymaktadır (Mansara ve ark, 2015, Zheng ve ark, 2013).

Yağ asidi yönünden zengin bir diyetin meme kanseri ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar olsa da kanserin gelişimi ve ilerlemesindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve özellikle insan çalışmalarından elde edilen bilgiler sınırlı olduğu için zorlayıcıdır.

İn vitro hücre kültürü araştırmaları veya in vivo hayvan modelleri, eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) tümör baskılayıcı

rolünü göstermiştir; ancak, n-3 ÇDYA'ların kanserdeki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır ve daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir (Bougnoux ve ark, 2010, Serini ve ark, 2011, Merendino ve ark, 2013).

Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin (UZÇDYA) sağlık ve hastalıktaki rolü hakkında birçok bilgi elde edilmiştir (German ve ark, 2003, Calder, 2005). Alfa linolenik asit (ALA) (Deshpande, 2013), EPA (Ewaschuk ve ark, 2012) ve DHA (Merendino ve ark, 2013) gibi n-3 YA'nin anti-kanser aktivitesi gösterdiği ancak linoleik asit (LA) ve araşidonik asit (AA) (Brown ve ark, 2006, Abou-el-Ela ve ark, 1989) gibi n-6 YA'ların kanser gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. EPA ve DHA, insan vücudunun sentezleyemediği ve bu nedenle diyetten elde edilmesi gereken esansiyel yağ asitleridir. LA, EPA ve DHA hayvansal doku lipitlerinde diyette ortaya çıkar (Friesen ve ark, 2009). Balık yağı EPA ve DHA açısından oldukça zengindir ve sağlık yararları nedeniyle önerilmiştir. EPA ve DHA birlikte koroner, kardiyovasküler hastalıklar, koroner kalp hastalığı, Alzheimer, doğum sonrası depresyon ve bipolar bozukluk, romatoid artrit, gebelik, emzirme, bebeklik ve hatta kanser gibi çeşitli durumlarda önerilmiştir (Kris-Etherton ve ark, 2009).

Bu çalışmada, farklı n-6/n-3 (LA/EPA+DHA) oranlarının, kanser hücrelerinin canlılık düzeyleri, toplam protein tayini ve tümör apoptotik genlerinin protein ifadelerinin meme kanserini modüle edip edemeyeceği, MCF7 hücre hattında belirlenmiştir.

Düşük ve yüksek n-6/n-3 (1:2.5, 1:4, 1:5, 1:10) yağ asidi oranlarının, MCF7'nin sağkalım ve büyümesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu sonuçlara göre belirlenen en etkin YA oranları kullanılarak; fosfo-p53 (Ser15), p53, Bad (BCL2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti), fosfo-Bad (Ser112), bölünmüş Kaspaz-3 (sisteinil aspartat proteaz-3) (Asp175) ve bölünmüş PARP (Asp214) ekspresyonlarına bakılmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yardımlarını, zamanlarını ve hoşgörülerini eksik etmeyen, saygı değer hocalarım Sayın Doç. Dr. Makbule BAYLAN'a ve Sayın Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ'a, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen hocam Arş. Gör. Gamze MAZI'ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü desteği gösteren değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Nermin Seda ILGAZ'a, tezimin tüm aşamalarında yanımda olan ve her türlü yardımı gösteren sevgili arkadaşım Hale ÖKSÜZ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, sonsuz sevgi ve desteklerini her daim hissettiren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
İÇİNDEKİLER VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VIII
1. GİRİŞ 1
1.1. Kanser 2
1.1.1. Meme Kanseri 2
1.1.1.1. Meme Kanseri Evreleri 3
1.1.1.2. Meme Kanseri Türleri 4
1.2. MCF7 Hücre Soyu Özellikleri 6
1.3. Yağ Asitleri 7
1.3.1. Doymuş Yağ Asitleri 7
1.3.2. Doymamış Yağ Asitleri 7
1.3.3. Yağ Asitlerinin Besinsel Kaynakları 9
1.3.3.1. Omega-3 Kaynakları 9
1.3.3.2. Omega-6 Kaynakları 10
1.3.3.3. n-6/n-3 Yağ Asitleri Oranı 10
1.4. Apoptoz 11
1.4.1. Kaspazlar 12
1.4.2. Tumor Protein P53 13
1.4.3. BAD (BCL2 İlişkili Agonist Hücre Ölümü) 14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 15
3. MATERYAL VE METOD 19
3.1. Materyal 19
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 19
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler 19

3.2. Metod 19
3.2.1. Hücre Kültürü 19
3.2.1.1. Hücrelerin Gelişimi ve Kültür Ortamı 19
3.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması 20
3.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması 21
3.2.1.4. Hücrelerin Sayımı 21
3.2.1.5. Hücrelerin Platelere Ekimi 21
3.2.2. Hücre Canlılık Testi (MTT Assay) 21
3.2.3. Protein İzolasyonu 22
3.2.4. Toplam Protein Tayini 23
3.2.5. PathScan Apoptoz ELISA Uygulaması 24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 27
4.1. Bulgular 27
4.1.1. n-6 ve n-3 Yağ Asitlerinin MCF7 Hücrelerinin Canlılıkları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular 27
4.1.2. Yağ Asitlerinin MCF7 Hücreleri Üzerinde ki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular 28
4.2. Tartışma 31
5. SONUÇ VE ÖNERİ 37
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 47

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Bütirik Asit 7
Şekil 1.2. Tekli doymamış yağ asidi (Oleik asit). 8
Şekil 1.3. Çoklu doymamış yağ asidi (Linoleik asit). 9
Şekil 3.1. Tetrazolium halkasından formazan oluşumu 22
Şekil 3.2. 24 saatin sonunda DMSO eklenen örnekler..... 22
Şekil 3.3. .a.) BSA ile hazırlanan standartlar, b.) Toplam protein tayini 23
Şekil 3.4. PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA Kiti plate düzeni .. 24
Şekil 3.5. ELISA protokolünde (a). Kuyucukların yıkanması, (b). Antikorların eklenmesi 25
Şekil 3.6. (a). HRP bağlı sekonder antikor eklenen, (b). TMB solüsyonu eklenen ve (c). Stop solüsyonu eklenen plate görüntüleri 26
Şekil 4.1. 280 µM toplam yağ asidi konsantrasyonunda farklı oranlarda kullanılan n-6 (LA) ve n-3 (EPA, DHA) yağ asitlerinin konsantrasyonları..... 27
Şekil 4.2. 24 saatlik inkübasyon sanunda a.) EPA b.) DHA c.) LA d.) LA/EPA+DHA konsantrasyonlarının MCF7 hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi..... 28
Şekil 4.3. ELISA sonucu fosfo-p53, P53, bölünmüş Kaspaz-3, bölünmüş PARP, fosfo-Bad ve BAD proteinlerinin ifade düzeyleri 29
Şekil 4.4. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda P53 ve fosfo-p53 düzeyleri..... 29
Şekil 4.5. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda Cleaved Caspase 3 (bölünmüş Kaspaz-3) protein ifade düzeyi..... 30
Şekil 4.6. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda Cleaved PARP (Bölünmüş PARP) proteininin ifade düzeyinde meydana gelen değişimler 31
Şekil 4.7. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda Fosfo-Bad ve BAD ifade seviyeleri 31

SİMGELER VE KISALTMALAR

MCF7	: Michigan Cancer Foundation-7 (Mammary cell line)
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor (İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2)
HR	: Hormon Reseptörleri
ER	: Estrogen receptor (Östrojen Reseptörü)
PR	: Progesterone receptor (Progesteron Reseptörü)
n-6(ω-6)	: Omega 6
n-3(ω-3)	: Omega 3
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
DHA	: Dekosahegzaenoik Asit
LA	: Linoleik Asit
AA	: Araşidonik Asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	: Phosphate Buffered Saline
MTT	: Metiltiazol difenil tetrazolyum
WHO	: World Health Organization (Dünya sağlık örgütü)
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
TDYA	: Tekli Doymamış Yağ Asidi
EYA	: Esansiyel Yağ Asitleri
YA	: Yağ Asidi
DKİS	: Duktal Karsinom İn Situ
LKİS	: Lobüler Karsinom İn Situ
LDL	: Low Density Lipoprotein (Düşük yoğunluklu lipoprotein)
GLA	: Gamma-Linolenik Asit
PA	: Palmitoleik Asit
CO_2	: Karbondioksit

L	: Litre
µl	: Mikrolitre (1/1000ml)
M	: Molar
µM	: Mikromolar
gr	: Gram
mg	: Miligram (1/1000g)
ml	: Mililitre (1/1000 l)
mM	: Milimolar (1/1000 M)
UV	: Ultra Viole (mor ötesi)
µg	: Mikrogram (1/1000mg)
µmol	: Mikromol
dk	: Dakika
Caspase-3	: Ssisteinil aspartat proteaz 3
PARP	: (Poli (ADP-riboz) polimeraz)
ICAD	: DNA fragmantasyon faktörü alt birim alfa
CAD	: Karbamoil-fosfat sentetaz2, aspartat transkarbamilaz ve dihidroorotaz

1. GİRİŞ

Gelişen dünya, sanayileşme ve artan nüfusla beraber toplumda bazı hastalıkların görülme sıklığı artmış dolayısıyla bu hastalıklardan etkilenen insan sayısı da artmıştır. Bu hastalıkların en başında kanser gelmektedir. Kanser, çok hızlı büyüyüp gelişen, kontrolsüz bölünen, vücudun normal işleyiş mekanizmasına uyum göstermeyen doku topluluğu olarak tanımlanmaktadır (Greenlee ve ark, 2001). Kanser hücresinin oluşumu sağlıklı hücrelerin DNA'sında meydana gelen mutasyonla olur. Bu mutasyonlar kanserojenik mutajenik ajanlara, ışınlara maruziyet, serbest radikallerin bulunması ve enfeksiyonlar sonucu oluşur. Bunların yanı sıra genetik yatkınlık ve hücre bölünme esnasında oluşabilecek DNA'nın kendini eşlerken ki hatalarda mutasyona neden olabilir (Hyndman, 2016). Bu doku toplulukları birleşerek tümörleri oluştururlar, bu tümörler sağlıklı dokuları sıkıştırabilir, tahrip edebilirler. Hatta kan damarları aracılığıyla vücudun başka bölgelerine yayılım (metastaz) gösterebilirler. Kanser dünyada her yıl milyonlarca kişinin ölümüne sebebiyet veren yüzyılın en ölümcül hastalıklardan biri sayılmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO-Globocan) verilerine göre 2018 yılında 18 milyondan fazla vaka ve 10 milyondan fazla ölüm rapor edilmiştir. Vaka görülme sıklığı böyle devam ederse 2030 yılında tüm kanser türlerinde; 24 milyondan fazla yeni vakanın ortaya çıkması ve 13 milyondan fazla ölüm olması beklenirken, meme kanserinde ki vaka sayısının yaklaşık 2.7 milyon, ölümlerin ise 800 binden fazla olması beklenmektedir.

Meme kanseri %24.2 oran ile kadınlarda en sık tanı alan (dünya çapındaki kadınlarda teşhis edilen tüm yeni kanser vakalarının dörtte biri) kanser türlerinden biridir. Genel olarak akciğer kanserinden sonra en yaygın görülen ikinci kanser türüdür. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı verilerine göre; 2018 yılında 2.1 milyondan fazla yeni meme kanseri vakası bildirilmiştir ve akciğer kanseri ile beraber, yeni vaka sayıları açısından dünya çapında lider tiplerdir.

Meme kanseri bu vaka oranları ile toplam kanser insidansı yükünün yaklaşık %11.6'sını karşılamaktadır. Kadınlarda, meme kanseri için insidans oranları (%24.2) ile hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki diğer kanserlerin oranlarını aşmaktadır. Her iki cinsiyet için beşinci önde gelen ölüm nedeni (%6.6) iken kadınlarda ölüm nedeni (%15) olarak ilk sırada yer almaktadır. Son 5 yılda ki verilere göre ise kadın meme kanseri yaklaşık 7 milyon vaka sayısı ile en yayın kanser türü olmuştur ve kadınlarda görülen tüm kanser türlerinin %30.1'ini oluşturmaktadır.

1.1. Kanser

Kanser, vücut dokularında ki hücrelerin kontrol mekanizmalarının çeşitli faktörler ile bozulması ya da devre dışı kalması sonucunda, farklılaşarak kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile oluşmaktadır. Bu kontrolsüz çoğalmalar sonucunda meydana gelen hücre kitleleri "tümör" olarak adlandırılırlar. Tümör hücreleri, oluştukları dokularda kalabilir ya da dokuyu tahrip ederek kan veya lenf aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Vücut dolaşımına katılan bu kanser hücreleri gittikleri bölgelerde büyüyüp çoğalmaya devam ederek "metastaz" adı verilen yayılımı meydana getirirler.

1.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusu hücrelerinde meydana gelen; hücre büyümesi, sağlıklı kalması ve bölünmesinin kontrolünden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar ve anormal değişimler sonucu oluşmaktadır. Meme kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır ve kalıtsal ya da çevresel faktörler etkilidir. Meme kanserlerinin çoğu, ya süt üretimi için loblar denilen bezlerden oluşan meme dokusunda ya da lobülleri meme ucuna bağlayan kanallarda başlar.

1.1.1.1. Meme Kanseri Evreleri

İnvaziv meme kanserinin prognozu, hastalığın evresinden yani, ilk tanı konduğunda kanserin kapsamı ya da yayılmasından etkilenir. Kanser için; TNM sınıflandırması ve Sürveyans, Epidemiyoloji ve Nihai Sonuçlar Özet Aşama sistemi olarak iki ana evreleme sistemi vardır.

Tümörlerin TNM sınıflandırması; tümörün boyutu ile memeye ve komşu dokulara ne kadar yayıldığı (T), yakındaki lenf düğümlerine yayılma derecesi (N) ve uzak metastazların varlığı veya yokluğuna (uzak organlara yayılım) (M) ilişkin bilgileri kullanır (Edge ve ark. 2010).

T, N ve M belirlendikten sonra, evrelendirmesi 0, I, II, III veya IV şeklinde yapılır. Evre "0" yerinde (anormal hücreler, kökenlerinden aldıkları kanallara veya bezlere nüfuz etmemişlerdir), aşama "I" erken evre invaziv kanser olarak nitelendirilir, evrelerin gelişimi aşama ''II'', aşama ''III'' olarak ilerler ve aşama "IV" en gelişmiş hastalık evresidir.

Sürveyans, Epidemiyoloji ve Nihai Sonuçlar (The Surveillance, Epidemiology, and End Results) (SEER) Özet Aşama sistemi daha basitleştirilmiştir ve kanser kayıt defteri verilerinin rapor edilmesinde ve halk sağlığı araştırması ve planlamasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Giuliano ve ark, 2018).

SEER Özet Aşama sistemine göre sınıflandırılması:

- İn situ evre, yakındaki dokuları istila etmemiş anormal hücrelerin varlığını ifade eder (TNM evreleme sisteminde evre 0'a karşılık gelir).
- Yerel evre memeye sınırlı kanserleri (evre I ve bazı evre II kanserlerine karşılık gelir) ifade eder.
- Bölgesel evre, çevredeki dokuya ya da yakındaki lenf düğümlerine yayılmış tümörleri ifade eder (genellikle boyut ve

lenf düğümü tutulumuna bağlı olarak evre II veya III kanserlerine karşılık gelir).

- Uzak evre, uzak organlara veya lenf düğümlerine metastaz yapan kanserleri (bazı evre III ve tüm evre IV kanserlerine karşılık gelir) anlamına gelir.

1.1.1.2. Meme Kanseri Türleri

2 temel grup ve 6 alt tipi mevcuttur.

In Situ Meme Kanserleri:	Duktal karsinoma in situ (DKİS)
	Lobüler karsinom in situ (LKİS)
İnvaziv Meme Kanserleri:	Luminal A (HR+/ HER2-)
	Üçlü negatif (HR-/HER2-)
	Luminal B (HR+/HER2+)
	HER2 ile zenginleştirilmiş (HER2+/ HER2-)

In Situ Meme Kanserleri

İki ana in situ meme kanseri türü vardır: duktal karsinom in situ (DKİS) ve lobüler karsinom in situ (LKİS), ayrıca lobüler neoplazi olarak da bilinir. Diğer in situ meme kanserleri hem duktal hem de lobüler karsinomların özelliklerine veya bilinmeyen kökenlere sahiptir.

a) Duktal karsinoma in situ (DKİS);

Duktal karsinoma in situ (2010-2014 döneminde teşhis edilen in situ vakaların % 83'ü), anormal hücrelerin meme kanallarını kaplayan normal epitel hücrelerini değiştirdiği ve kanallar ile lobülleri büyük ölçüde genişletebildiği, memenin non-invaziv bir tümörüdür. Tarama amaçlı mamografinin yaygınlaşması ile insidansında artış görülmüştür. Tümörün doğal davranışı tümörün derecesine ve

histolojik tipine göre değişmekle beraber tedavi edilmediğinde, düşük dereceli tümörlerin üçte biri yaklaşık 30 yıl sonra invaziv kansere dönüşmekte, yüksek dereceli tümörlerde ise bu süre beş yıla kadar inmektedir (Gül ve ark, 2013).

b) Lobüler karsinom in situ (LKİS);

LKİS (in situ vakaların %13'ü), memenin bazı lobüllerinde büyüyen ve genişleyen anormal hücreleri belirtir. LKİS'in genellikle invaziv kanserin öncüsü olduğu düşünülmesede güçlü bir risk faktörüdür.

İnvaziv Meme Kanserleri

Çoğu meme kanseri (%80), istilacı veya infiltrasyonludur; bu, kökenleri veya etrafındaki meme dokusunda büyüdükleri bezlerin veya kanalların duvarlarından geçtikleri anlamına gelir.

Meme kanseri genellikle tek bir hastalık olarak adlandırılsa da, 21 ayrı histolojik alt tip ve risk faktörleri ile tedaviye yanıt verme ve sonuçları açısından farklılık gösteren en az dört farklı moleküler alt tipi vardır (Dieci ve ark, 2014).
Moleküler alt tiplerin yaklaşımları, hormon (östrojen-ER veya progesteron-PR) reseptörlerinin (HR+/HR-) varlığı veya yokluğu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2; büyümeyi teşvik eden protein) aşırı seviyeleri ve/veya HER2 geninin ekstra kopyaları (HER2+/HER2-) olmak üzere rutin olarak değerlendirilmiş biyolojik işaretleyiciler kullanılarak tanımlanmıştır (Cheang ve ark. 2015).

Dört ana moleküler alt tip ve bunların dağılımı burada açıklanmaktadır.

a) Luminal A (HR+/ HER2-) (%71);

Bu kanserler türleri ER ve PR pozitif özellikte, yavaş büyüyen ve diğer alt tiplerden daha az agresif olma eğilimindedir. Luminal A tümörleri, özellikle kısa vadede, anti-hormon tedavisine daha duyarlı olduklarından prognoz için en uygun olan türlerdir (Blows ve ark, 2010, Haque ve ark, 2012).

b) Üçlü negatif (HR-/HER2-) (%12)

İnvaziv meme kanserlerinde %10-15 oranında görülür. Bu kanser türleri; ER, PR ve HER2 negatif tiplerdir ve hedefli tedaviler olmadığı için, diğer alt tiplerden daha kötü ve kısa süreli prognoza sahiptir (Perou ve Borresen, 2011).

c) Luminal B (HR+/HER2+) (%12)

Luminal A kanserleri gibi, luminal B kanserleri de ER+ ve/veya PR+ ve Ki67 (aktif olarak bölünen hücrelerin büyük bir kısmının göstergesi) veya HER2 için oldukça pozitif olarak tanımlanır. Luminal B meme kanserleri, luminal A kanserlerine göre daha kötü hayatta kalma ile ilişkilidir (Haque ve ark, 2012).

d) HER2 ile zenginleştirilmiş (HR- / HER2 +) (%5).

HER2 ile zenginleştirilmiş kanserler, diğer alt tiplerden daha agresif bir şekilde büyüme ve yayılma eğilimindedir ve HR+ meme kanserlerine kıyasla daha kısa süreli prognoz ile ilişkilidir (Haque ve ark, 2012). Bununla birlikte, HER2 + kanserleri için hedefli tedavilerin yaygın olarak kullanılması bu hastalar için sonuçları iyileştirmiştir.

1.2. MCF7 Hücre Soyu Özellikleri

MCF7 hücreleri; 1970 yılında, metastatik meme kanseri olan 69 yaşında beyaz bir kadının plevral efüzyonundan Dr. Soule tarafından çoğaltılmıştır. Hücre hattına, Dr. Soule ve arkadaşları tarafından 1973 yılında Detroit'te kurulan Michigan Cancer Foundation'a atıfta bulunarak MCF7 adı verilmiştir.

MCF7 insan meme kanseri hücre hattı östrojen reseptörü (ER) pozitif, HER-2 negatif özelliktedir. Östrojen reseptörlerinin varlığı sayesinde östrojen/östradiol formunu kullanabilirler.

1.3. Yağ Asitleri

Yağlar; hidrojen, karbon ve oksijenden meydana gelen, insanlar için gerekli olan en önemli organik maddelerden biridir. Bu organik maddeler yüksek enerji kaynağı olmalarının yanında, hem yağda çözünen vitaminleri bulundururlar, hem de proteinlerle birleşerek lipoproteinleri oluşturur ve metabolik aktivitelerde görev alırlar (Mol, 2008).

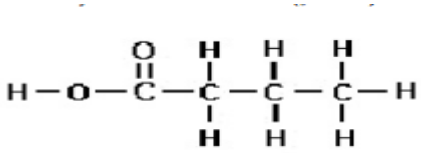
Yağların temel yapı bileşenlerine yağ asitleri denilmektedir ve içerdikleri bu yağ asitleri ile birbirinden farklılaşırlar. Yağ asitleri karbon atomu sayılarına, karbon atomları arasında çift bağ içerip içermemelerine ve karbon atomlarına bağlı hidrojenlerin pozisyonuna göre adlandırılmaktadırlar.

Karbon (C) sayılarına göre; kısa (C2-4), orta (C6-10), uzun (C12-20) ve çok uzun zincirli (C>22) olarak isimlendirilirler.

Yapılarında ki çift bağlara göre; çift bağ içermiyorlar ise doymuş (satüre), çift bağ içeriyorlar ise doymamış (ansatüre) yağ asitleri olarak tanımlanırlar.

1.3.1. Doymuş Yağ Asitleri

Doymuş yağ asitlerinin yapısında çift bağ yoktur. Büyük çoğunluğu oda sıcaklığında katıdır. Bu yağ asitleri insan vücudunda sentezlenebilmektedir. Bu tip yağ asitlerine örnek olarak bütirük asit verilebilir (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Bütirik Asit

1.3.2. Doymamış Yağ Asitleri

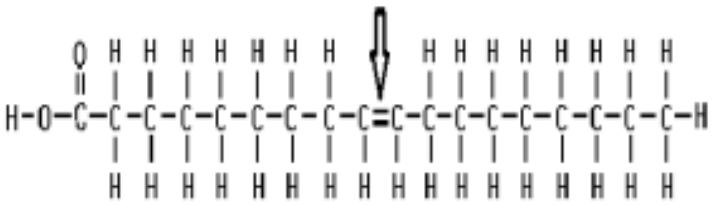
Doymamış yağ asitleri zincir üzerinde en az bir çift bağ içeren moleküllerdir. Yağ asidi molekülünün biri karboksil ve diğeri metil karbon içeren iki sonlanma bölgesi bulunur. Metil karbonuna omega "ω-n'' karbonu denir ve

doymamış yağ asitleri ilk çift bağın bulunduğu n karbonuna göre de n-3, n-6, n-7 veya n-9 gibi isimler alır.

Doymamış yağ asitleri çift bağlarının sayısına göre tekli (monoansatüre) ve çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitleri olarak sınıflandırılır.

Tekli Doymamış Yağ Asitleri

Tekli doymamış yağ asitleri yapılarında bir çift bağ içeren yağ asitleridir (Şekil 1.2.). Doymuş yağ asitleri gibi insan vücudu tarafından sentezlenebilirler.



Şekil 1.2. Tekli doymamış yağ asidi (Oleik asit).

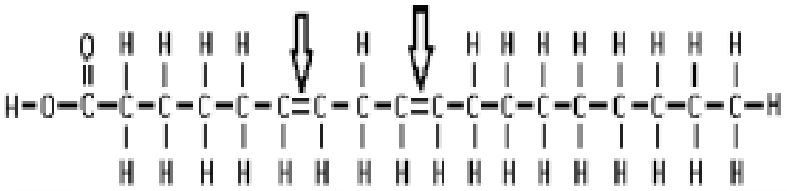
Bunlar n-9 yağ asitleri olarak bilinir. Tekli doymamış yağ asitleri'nin LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol üzerindeki etkileri nötral olmasına karşın, HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) artırıcı etkisi vardır. Bu nedenle, kandaki HDL miktarı halk arasında iyi kolesterol olarak bilinmektedir (Gogus ve Smith, 2010).

Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

Yapılarında en az iki çift bağ içeren yağ asitleridir (Şekil 1.3.). Bu yağ asitleri metil (CH_3) kökünden başlamak üzere çift bağın bulunduğu ilk karbona göre n-3 veya n-6 yağ asitleri olarak 2 alt kategoriye ayrılmaktadır.

Omega-3 yağ asitlerinin kaynağını alfa-linolenik asit oluşturur. İlk çift bağ metil grubuna en yakın üçüncü karbonda bulunur. Bu nedenle n-3 adı verilir.

Omega-6 yağ asitlerinde ise ilk çift bağ metil grubuna en yakın altıncı karbondadır. Dolayısıyla bunlara n-6 adı verilir (Zatsick ve Mayket, 2006). n-3 ve n-6 yağ asitleri insan vücudunda sentezlenemedikleri için temel yağ asitleri olarak adlandırılır.



Şekil 1.3. Çoklu doymamış yağ asidi (Linoleik asit).

Vücudun üretemediği ve mutlaka besinler yoluyla alınması gereken yağ asitlerine esansiyel yağ asitleri (EYA) denir. EYA, insan ve diğer memeliler için mutlak gerekli olup çoklu doymamış yağ asitleridir.

Vücutta n-3 ve n-6 olmak üzere iki tip EYA bulunur. n-3 serisi 18 karbonlu ve üç çift bağ içeren alfa-linoleik asitten (ALA, 18:3), n-6 serisi ise 18 karbonlu ve iki çift bağ içeren cis-linoleik asit (LA, 18:2)'ten oluşur. n-9 serisinden olan oleik asit (OA, 18:1) ve n-7 serisinden kaynaklanan palmitoleik asit (PA, 16:1) organizmada yaygın şekilde kullanılan ancak esansiyel olmayan yağ asitleridir. EYA, organizmada eikozanoid ve ürünlerinin (prostaglandin: PG, tromboksan: TX ve lökotrienler: LT) öncüsüdür. Eikozanoidler sindirim, üreme ve bağışıklık sistemlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Ayrıca EYA'nin doğrudan biyolojik aktiviteleri de bulunmaktadır (Harris ve ark, 2007).

1.3.3. Yağ Asitlerinin Besinsel Kaynakları

1.3.3.1. Omega-3 Kaynakları

Hayvansal kaynak olarak balık (ringa, uskumru, sardalye, alabalık ve somon) ve az miktarda yumurtada bulunur. Bitkisel olarak; keten tohumu yağı, kanola yağı, soya fasulyesi yağı, ceviz, balkabağı çekirdeği, kenevir tohumu yağı ve semizotu gibi yeşil yapraklı sebzeler, kuru baklagiller ve kolza tohumu

ALA'dan zengindir. İnsan sütünde n-3 yağ asitleri önemli miktarda bulunur. EPA ve DHA'nın ana kaynağı deniz balıklarıdır.

1.3.3.2. Omega-6 Kaynakları

Mısır yağı, soya fasulyesi yağı, ayçiçek yağı, aspir (yalancı safran) yağı, ceviz, balkabağı çekirdeği ve keten tohumu yağı n-6 yağ asitlerinin önemli kaynaklarıdır. Yumurta, kümes hayvanlarının eti, tam buğday unundan yapılmış ekmek, fırınlanmış besinler, bitkisel yağlar ve margarin yağı LA içerir.

Anne sütünün gamma-linolenik asit (GLA) içeriği oldukça zengindir. Çuha çiçeği yağı, siyah kuş üzümü, kenevir tohumu yağı, bazı mantar türleri önemli miktarda GLA içerir. Anne sütü sınırlı miktarda AA içerirken inek sütünde miktar ise çok düşüktür. Et, yumurta sarısı, bazı deniz yosunları ve bazı karides türleri yoğun miktarda AA içerir.

1.3.3.3. n-6/n-3 Yağ Asitleri Oranı

n-6 ve n-3 yağ asitlerinin hangi oranda alınması gerektiği konusunda tam bir birlik sağlanamamıştır. Çeşitli bilgi kaynakları, insanların omega-6 ve omega-3 oranlarının ~1 olduğu diyetle geliştiğini göstermekte iken günümüz batı diyetlerinde oran 10:1-30:1 arasındadır. Dünya Sağlık Örgütü bu oranın 5:1-10:1 arasında tutulmasını önermektedir. Ancak gerçekte en sağlıklı oran 1:1-4:1 arasındadır. n-3 yağ asidi olarak günde 650 gr EPA + DHA ve 2.22 gr ALA ve n-6 olarak 4.44 gr LA alındığında n-6/n-3 oranı 1.5:1'dir (Simopoulos ve ark, 2000). Bu oranlar n-3 ve n-6 yağ asitlerinin farklı miktarları ile de sağlanabileceğinden günlük gereksinim olarak farklı miktarlar da bildirilmektedir. İdeal günlük miktarının 1.5-2 gr olması benimsenmiştir.

Ancak, kronik hastalıkların multijenik ve multifaktöriyel olması gerçeğiyle, optimal oranın söz konusu hastalığa göre değişebilmektedir. Meme kanserli kadınlarda düşük omega-6/omega-3 oranının düşük riskle ilişkili olduğunu gösteren çalışmaların yanısıra, romatoid artritli hastalarda 2–3/1 oranının

inflamasyonu baskıladığını ve 5/1 oranının astımlı hastalar üzerinde olumlu bir etkiye sahipken, 10/1 oranının ters sonuç verdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle, omega-3 yağ asitlerinin terapötik dozunun, genetik yatkınlıktan kaynaklanan hastalığın ciddiyet derecesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Omega-6 ve omega-3 yağ asitleri arasındaki denge, gen ekspresyonu, eikosanoid metabolizması ve sitokin üretimi açısından daha fizyolojik bir durumdur (Simopoulos, 1996). Hem normal sıçan kardiyomiyositlerinin hem de insan meme kanseri hücrelerinin, yuvarlak kurt *C. elegans*'tan elde edilen omega-3 yağ asidi desatürazını kodlayan cDNA'yı beslediklerinde omega-3 yağ asitlerini oluşturan tüm omega-3'leri oluşturma kabiliyetini açıkça göstermiştir (Kang ve ark, 2001, Ge ve ark, 2002).

Omega-3 verimli ve hızlı bir şekilde desatüraz kültüründe kardiyomiyositlere beslenen omega-6 yağ asitlerini karşılık gelen omega-3 yağ asitlerine dönüştürmüştür. Böylece, linoleik asit ALA'ya ve araşidonik asit ise EPA'ya dönüştürülerek, omega-6'nın omega-3'e oranı 1/1 dengelenmiş olur (Kang ve ark, 2001). Diğer çalışmalar ise omega-3 desatürazı eksprese eden kanser hücrelerinin apoptotik ölüm geçirdiğini, yüksek omega-6/omega-3 oranına sahip kontrol kanseri hücrelerinin çoğalmaya devam ettiğini göstermiştir (Ge ve ark, 2002).

Omega yağ asitlerinin kanser hücrelerine etkisi birçok çalışmada gösterilmesine rağmen etki mekanizmaları, hangi apoptotik yolaklar üzerinden etkinlik gösterdikleri ve hangi genlerin kontrolünde oldukları hala tam olarak açıklanamamıştır.

1.4. Apoptoz

Apoptoz, programlanmış hücre ölüm mekanizmalarından biridir. Apoptoz mekanizmasının, hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ve inflamasyon oluşturmadan yok edilmelerini sağlayan bir hücre ölümü tipi olması canlılar için büyük öneme sahiptir. Apoptoza girmiş bir hücre; önce büzüşmeye başlar, bunu

kromatinlerin yoğunlaşması takip eder ve piknozis gibi morfolojik değişiklikler ile beraber kaspaz aktivasyonu başlar, sonucunda ise hücre iskeleti ve DNA'nın parçalanması gibi biyokimyasal olaylar gerçekleşir. Apoptoza uğrayan hücreler apoptotik cisimcik adı verilen küçük parçacıklara ayrılır ve fagositoz özelliği bulunan hücreler tarafından yok edilirler.

Çok hücreli yaşamın sürdürülmesinde kilit noktalardan kabul edilen programlı ölüm mekanizmaları evrimsel açıdan oldukça önemlidir. Ölüm mekanizmasının ilk izlerine, proteaz enziminin kullanıldığı bazı siyanobakteri kolonilerinde rastlanmıştır. Bu kolonilerin çok hücreliliğe geçiş aşamasında olduğu ve kullanılan proteazın da kaspaz benzeri özellikte olduğu düşünülmektedir. Kaspazlar aracılığı ile gerçekleştrilen bu ölüm mekanizmalarına hayvanlar aleminde her canlıda rastlanmaktadır ve bu mekanizma hayvanlar aleminde ki sınıflar arasında büyük benzerlikler göstermektedir (Ameisen, 2002, Berman-Frank ve ark, 2004, Zmasek ve ark, 2013, Green ve Fitzgerald, 2016).

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda embriyonik dönemden ölüme kadar aktif bir şekilde çalışan bir mekanizmadır ve embriyoda doku bütünlüğü ile fenotipin kontrolünü sağlar. Bunun en tipik örneği ise el ve ayak parmaklarının ayrılmasıdır.

Apoptozun metabolik yolaklarında oluşan hatalar sebebiyle fazla ya da az çalışması, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserin oluşumunda büyük rol oynamaktadır.

1.4.1. Kaspazlar

Apoptozun başlangıcından sonuna kadar kilit rol oynayan Kaspazlar (sisteinil aspartat proteazlar), apoptozu diğer hücre ölüm mekanizmalardan ayrı bir yere koymaktadır. Kaspazlar, sistein proteaz enzim ailesine ait endoproteazlardır. Aktif bölgelerindeki sistein ile substratlarının aspartata bağlı peptit bağlarını hidrolize ederler. Bu enzimler substratlarına karşı oldukça yüksek bir özgüllük gösterirler.

Kaspazlar, apoptozda (kaspaz-2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10) ve inflamasyonda (kaspaz-1, 4, 5 ve 12) görev almalarına göre iki gruba ayrılır. Apoptozda görev alan kaspazlar ayrıca başlatıcı (kaspaz-2, 8, 9 ve 10) ve sonlandırıcı (kaspaz-3, 6 ve 7) kaspazlar olarak alt gruplara ayrılır.

Başlatıcı kaspazlar, apoptozun ilk evrelerinde aktif hale geçerler ve enzimatik aktiviteleri ile sonlandırıcı kaspazların aktivasyonundan sorumlu iken, sonlandırıcı kaspazlar ise sitokeratinler, PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz), hücre iskeleti proteinleri gibi yapıların enzimatik yıkımlarından sorumludurlar (Slee ve ark, 2001, Behzadi ve Ranjbar, 2015).

Sonlandırıcı kaspazlardan en önemlisi olarak bilinen ve apoptozdaki rollerinden biri de endonükleaz enzim olan CAD'ın (karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz ve dihidroorotaz) aktivasyonunu sağlayan Kaspaz-3'tür. Sağlıklı hücrelerde, inhibitörü ICAD (DNA fragmantasyon faktörü alt birim alfa) ile bağlanmış bir şekilde inaktif halde bulunan CAD, Kaspaz-3'ün proteolitik aktivitesi ile ICAD'dan ayrılarak DNA yıkımı ve kromatin yoğunlaşmasını başlatır. Kaspaz-3'ün diğer bir substratıda jelsolindir. Jelsolin, aktin polimerleşmesini başlatarak hücre iskeletinin oluşmasını sağlar ve fosfatidilinositol ile beraber aktin organizasyonu için gereken sinyal iletimini gerçekleştirir. Kaspaz-3 tarafından parçalara ayrılan jelsolin, aktin flamentlerinin proteolitik yıkımını sağlar ve hücrenin iskelet sistemi, taşıma sistemi, bölünme ve sinyal iletimi gibi yapı ve faaliyetlerine zarar verir (Behzadi ve Ranjbar, 2015).

1.4.2. Tumor Protein P53

Bu gen, transkripsiyonel aktivasyon, DNA bağlama ve oligomerizasyon alanlarını içeren bir tümör baskılayıcı proteini kodlar. Kodlanmış protein, hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için çeşitli hücresel streslere tepki verir, böylece hücre döngüsü durması, apoptoz, yaşlanma, DNA onarımı veya metabolizma değişikliklerine neden olur. Bu gendeki mutasyonlar, Li-Fraumeni sendromu gibi kalıtsal kanserler dahil olmak üzere çeşitli insan kanserleri ile

ilişkilidir. Bu genin alternatif birleştirilmesi ve alternatif promotörlerin kullanılması, çoklu transkript varyantları ve izoformları ile sonuçlanır.

TP53 mutasyonları kanser türleri arasında evrenseldir. Bir tümör baskılayıcının kaybı, genellikle çerçeve kaydırma mutasyonları veya erken stop kodonları gibi büyük zararlı olaylardan kaynaklanır. Bununla birlikte, TP53'de, kanserde gözlenen mutasyonların çoğunun, tek nükleotid hatalı varyantları olduğu bulunmuştur. Bu varyantlar gen boyunca geniş çapta dağılmıştır, fakat çoğunluğu DNA bağlanma bölgesinde lokalizedir.

Birçok tümör tipinde bir tümör baskılayıcı görevi görür; fizyolojik koşullara ve hücre tipine bağlı olarak büyüme durması veya apoptozu tetikler. Hücre döngüsü düzenlemesinde, bu işlem için gerekli olan bir dizi genin kontrol edilmesiyle hücre bölünmesini negatif olarak düzenlemeye yarayan bir trans-aktifleştirici olarak bulunur.

1.4.3. BAD (BCL2 İlişkili Agonist Hücre Ölümü)

BAD protein, BCL-2 ailesinin bir üyesidir ve BCL-2 aile üyelerinin, programlanmış hücre ölümünün düzenleyicileri olduğu bilinmektedir. Bu protein, BCL-xL ve BCL-2 ile heterodimerler oluşturarak ve bunların ölüm baskılayıcı aktivitelerini tersine çevirerek hücre apoptozisini pozitif olarak düzenler. Bu proteinin proapoptotik aktivitesi, fosforilasyonu ile düzenlenir. Protein kinazları AKT ve MAP kinazın yanı sıra protein fosfataz kalsinörinin de bu proteinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu genin alternatif eklenmesi, aynı izoformu kodlayan iki transkript varyantı ile sonuçlanır.

Hücre ölümünü teşvik eder ve Bcl-X (L), Bcl-2 ve Bcl-W'ye bağlanma için rekabet eder, böylece bu proteinlerin BAX ile heterodimerizasyon seviyesini etkiler. Bcl-X'in (L) ölüm bastırıcı aktivitesini tersine çevirebilir, ancak Bcl-2'nin aktivitesini tersine çeviremez. Büyüme faktörü reseptörü sinyalleşmesi ile apoptotik yollar arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kachhap ve ark (2000), n-6 çoklu doymamış yağ asidinin (linoleik asit) MCF7 hücre dizisinde, östradiol tarafından düzenlendiği bilinen BRCA1 gen ekspresyonu üzerine etkisini proliferasyon tahlili, yumuşak agar testi ve RT-PCR ile incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda hem linoleik asit hem östradiol ile tedavi edilen hücreler, tek başına linoleik asit veya östradiol ile muamele edilen hücrelere kıyasla, kolonilerin sayısını, proliferasyon endeksini ve BRCA1 mRNA ekspresyonunu belirgin olarak düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu gözlemleri ile endojen östrojen ve linoleik asit gibi n-6 çoklu doymamış yağ asidince zengin diyetin meme kanserini teşvik ederek BRCA1 gen ekspresyonunu modüle ettiğini göstermişlerdir.

Chiu ve ark (2004), kültürlenmiş bir mikroalgden (Crypthecodinium cohnii) elde edilen algal dokosaheksaenoik asit'in (aDHA), insan meme karsinomu MCF7 hücrelerindeki hücre büyümesine ve apoptoza etkisini, BAX ve BCL-2 genlerinin ifadelerini inceleyerek araştırmışlardır. aDHA'nın MCF7 üzerine etkilerini MTT, DNA flow sitometri ve Western blot yöntemlerini kullanarak belirlemişlerdir. Çalışmalarında, aDHA'nın hücre büyümesini kontrol edebildiğini ve insan meme karsinom hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirlmişlerdir.

Barascu ve ark (2005), dokosaheksaenoik ve eikosapentaenoik asitlerin MDA-MB-231 insan meme epitel hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında MTT, Western blot, hücre döngüsü senkronizasyonu, hücre döngüsü analizi, yağ asitleri analizi, apoptotik hücrelerin kantifikasyonu analizlerini uygulamışlardır. Çalışmalarının sonucunda uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinin, hücre döngüsünün G2 ila M progresyonunu yavaşlatmasıyla MDA-MB-231 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini ve bu hücrelerde anti-proliferatif özelliklere sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca DHA ve EPA'nın konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin sayısını azalttığını ve DHA'nın en büyük etkiyi gösterdiğini bulmuşlardır.

Hammamieh ve ark (2007), MDA-MB-231, MDA-MB-435s, MCF7 ve HCC2218 hücre hatlarında omega-3 (EPA, DHA) ve omega-6 (AA, LA) yağ asitlerinin etkisini Real Time ve Microarray yöntemlerini kullanarak incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda elde ettikleri verilere ve istatistiksel analizlere göre n-3 ve n-6 yağ asitleri ile tedavi edilen meme kanseri hücreleri arasında farklı şekilde ifade edilen genleri tanımlamışlardır.

Wu ve ark (2015), MCF7 hücre hattında yaptıkları çalışma ile omega3 yağ asitlerinin apoptozu indükleyerek hücre çoğalmasını baskıladığını gözlemlemişlerdir. Ancak omega3 yağ asitlerini, meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen ile tedavi edilen hücrelere uyguladıklarında, Erk1/2 ve Akt fosforilasyon seviyelerini doza ve zamana bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttırdığını ve tamoksifenin indüklediği hücre apoptozunu azalttığı sonucuna varmışlardır.

Mansara ve ark (2015), meme kanseri hücre hatları olan MCF7 ve MDA-MB-231 üzerinde omega yağ asitlerinin (AA/EPA+DHA) farklı oranlarını kullanarak büyümeyi, lipid peroksidasyonunu ve tümör düzenleyici MARBP'lerin (Matris bağlanma bölgesi (MAR) bağlayıcı protein) ekspresyonunu incelemişlerdir. Omega yağ asitlerinin SMAR1 (nükleer matriks proteini) ve Cux/CDP gibi MARBP'lerin ekspresyonunu modüle ettiğini ilk kez göstermişlerdir ve elde ettikleri sonuçlar ile n-6/n-3 yağ asitlerinin farklı oranlarının meme kanseri hücrelerinin büyüme kinetiğini önemli ölçüde etkileyebileceğini ve kromatin modülatör proteinleri düzenlediğini göstermişlerdir. Ayrıca diyetimizdeki n-3 yağ asitlerinde ki az miktarda artışın bile hücresel mekanizmaları düzenleyerek sağlıklı hale gelebileceği sonucuna varmışlardır

Chen ve ark (2016), MCF7, MDA-MB-231, CAMA-1 ve SKBR3 hücre hatlarında, omega-3 yağ asidi etil esterlerinin etkilerini araştırmışlardır. Çeşitli genler üzerine etkilerini hücre canlılık testi, immünfloresan ve western blot yöntemleri ile incelemişlerdir. Omega-3 yağ asidi etil esterlerinin meme kanseri hücresi koloni oluşumunu, NF-kB translokasyonunu, transkripsiyonel aktivitesini

ve COX-2, survivin, siklin D1 ve bcl-2'nin ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Zheng ve ark (2017), *Euphausia superba*'dan (Antarktika krili) türetilen EPA ve DHA'nın E-konfigürasyon yapılarının insan kanser hücre hatları olan U937, K562, SMMC-7721, PC-3, MDA-MB-231, HL60 ve MCF7 üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Antarktik krillden elde edilen EPA ve DHA'nın diğer kaynaklardan elde edilen omega yağ asitlerinden daha iyi bir büyüme önleyici etki gösterdiğini kanıtlamışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar akımlı kabin, CO_2 inkübatör, ışık mikroskobu, invert mikroskop, otoklav, santrifüj, vorteks, sıcak su banyosu, buzdolabı-derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi hücre kültür laboratuvarında ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Çalışmamızda; PathScan® Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling), Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), Phosphate Buffered Saline (PBS), Linoleic acid (LA) (Sigma-Aldrich), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich), Dokozahekzaenoik Asit (DHA) (Cayman), Eikozapentaenoik asit (EPA) (Cayman), M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Sci.), Penicillin-Streptomycin Solution (Bio İnd.) TRYPSIN 1:250 TISSUE CULTURE GRADE (Anresco), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest) kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücrelerin Gelişimi ve Kültür Ortamı

MCF7 hücre hattı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. öğretim üyesi Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ'dan temin edilmiştir ve hücre kültürü yöntemleri ATCC (The American Type Culture Collection) tarafından belirlenen standartlar doğrultusunda uygulanmıştır. Östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücre dizisi MCF7, 37°C, % 95 nem ve % 5 CO_2'li ortamda, % 10 FBS ve % 1 penisilin-

streptomisin içeren DMEM içeren besiyerinde kültürlenmiştir. Hücreler yaklaşık % 70 ve üzeri yoğunluğa ulaşana kadar 2 günde bir laminer akımlı kabin içerisinde steril koşullarda besiyeri değiştirilmiştir. Flask içerisindeki medyum boşaltılmış ve hücreler PBS ile iki kere yıkanarak ve yeni besiyeri eklenmiştir. % 70 üzeri yayılma sağlayan hücrelerin pasajlanarak çoğalmaları sağlanmıştır.

3.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler % 70 ve üzeri yayılım gösterdiğinde, hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için tripsin kullanılmıştır. 75 cm^2'lik flaskta kültürlenen hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmış ve iki defa 7-8 ml PBS ile yıkama yapılarak 3-4 ml tripsin eklenmiştir. Tripsinin etkinliği sıcaklık ile arttığından, hücreler ~3 dk, 37°C'de inkübe edilmştir. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıkları anda, tripsinin en az 2 katı kadar medium eklenerek seyreltme işlemi yapılmıştır ve bu sayede tripsinin hücre membranlarına zarar vermesi engellenmiştir (Yılmaz ve ark, 2009).

Hücreler yüzeyden ayrıldıktan hemen sonra ortamdan alınarak ve 15 ml'lik falkon tüpünde 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edilip dibe çökmeleri sağlanmıştır. Pellet halindeki hücrelere ~3 ml medium eklenerek homojenize olmaları için pipetaj yapılmıştır ve içerisinde medium bulunan 75cm^2'lik flaska yeniden ekimleri yapılmıştır.

Flasklar % 5 CO2'li inkübatörde, 37^{o}C'de ve % 95 nemli ortamda yeniden inkübasyona bırakılmıştır. Ekimden bir gün sonra flask yüzeyine yapışmayan hücrelerin ve tripsin kalıntılarının ortamdan uzaklaştırılması amacı ile yıkama yapılarak yeni besiyeri eklenmiştir. Deney için uygun hücre yoğunluğuna ulaşana kadar bu işlem devam ettirilmiştir.

3.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması

Dondurma işlemi hücrelerin stoklanması amacı ile yapılmaktadır. Dondurma mediumu % 10 DMSO ve % 90 FBS ile 1 ml olarak hazırlanmış ve tripsin ile toplanan hücreler cryo vial tüpler içerisinde -80^{o} C'de stoklanmıştır (Yılmaz ve ark, 2009).

3.2.1.4. Hücrelerin Sayımı

Tripsin ile flask yüzeyinden toplanan hücreler, medium ile 1/10 oranında seyreltilerek homejenize olmaları sağlanmış ve Thoma lamında sayılmıştır. Sayım sonucu A x SF x 10 formülü ile hesaplanmıştır. A; Thoma lamında sayılan hücre sayısı, SF; seyreltme faktörü, 10 ise standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (Yılmaz ve ark, 2009).

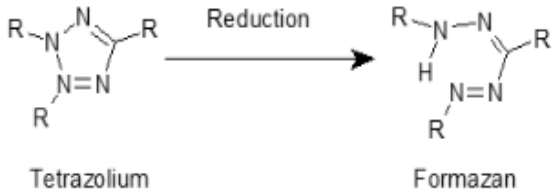
3.2.1.5. Hücrelerin Platelere Ekimi

Sayımı yapılan hücreler; MTT testi için 96 kuyucuklu platelere, 100 µl besiyeri içerisine 10.000 hücre olacak şekilde ekilirken, ELISA testi için 6 kuyucuklu platelere, 3 ml besiyeri içerisine 300.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir (Yılmaz ve ark, 2009).

3.2.2. Hücre Canlılık Testi (MTT Assay)

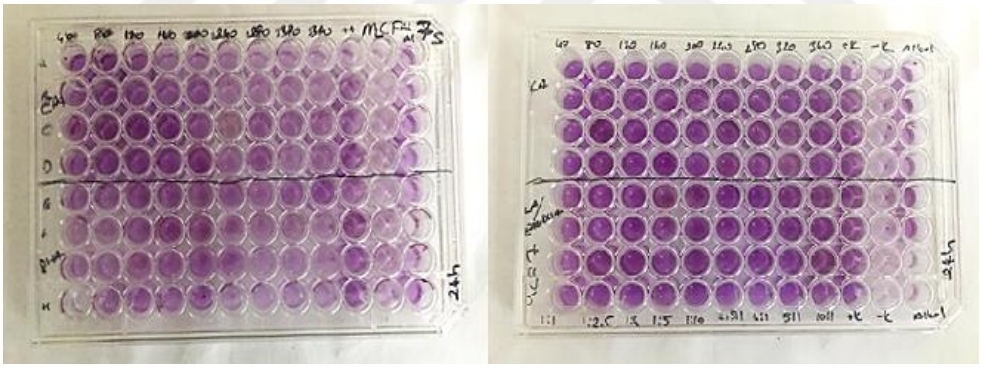
Sayımı yapılarak 96 kuyucuklu platelere ekilen hücreler; 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında; 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 ve 320 µM'lık konsantrasyonlarda ki EPA, DHA, LA ve bunların farklı oranlardaki kombinasyonları (LA:EPA+DHA) (1:1, 1:2,5, 1:4, 1:5, 1:10, 2,5:1, 4:1, 5:1 ve 10:1) ile muamele edilmişlerdir. İnkübasyonun 20. saatinde, her bir kuyucuğa 10µl sarı renkli tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler % 5'lik CO_2 inkübatöründe 37°C'de 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında metabolik olarak aktif

hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazlar, tetrazolium halkasını parçalayarak mor renkli MTT formazan kristalleri oluşturmuşlardır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Tetrazolium halkasından formazan oluşumu

4 saatin sonunda, kuyular dikkatli bir şekilde boşaltılmış ve formazan kristallerinin çözülmesini sağlamak için 100 µl DMSO eklenerek 15-30 dk arası bekletilmiştir (Şekil 3.2.). Sonuçlar mikroplate okuyucu kullanılarak 570 nm'de, 630 nm referans alınarak okutulmuştur (Yılmaz ve ark, 2009).



Şekil 3.2. 24 saatin sonunda DMSO eklenen örnekler

3.2.3. Protein İzolasyonu

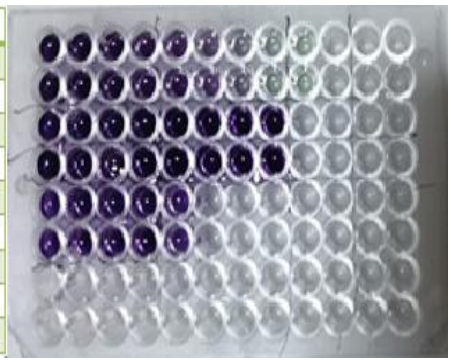
6 kuyucuklu platelere ekimi yapılan MCF7 hücrelerine, MTT sonuçlarına göre belirlediğimiz DHA 40 µM ve 280 µM, EPA 80 µM ve 240 µM, LA 80 µM ve 320 µM ile LA/EPA+DHA 1:1 ve 10:1 oranları ile muamele yapılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, besiyerleri uzaklaştırılarak ve kuyucuklar 500'er µl PBS ile dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Ardından her kuyucuğa 200µl

M-PER eklenerek, hücrelerin plate yüzeyinden tamamen ayrılıp parçalanmaları için 5 dk oda ısısında bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden hücre kazıyıcı ile iyice sıyrılıp ependorf tüplere aktarılmış ve 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir (Yılmaz ve ark, 2009). Santrifüj sonunda tüpün en altında hücre parçaları pellet oluştururken, proteinler süpernatant kısmında kalmışlardır. Pelete temas etmeden dikkatli bir şekilde çekilen süpernatant yeni tüplere aktarılmış ve izole edilen proteinler çalışmanın sonraki aşamaları için -20°C'de depolanmıştır.

3.2.4. Toplam Protein Tayini

İzolasyonu yapılan proteinlerin Thermo Fisher Protein Assay kit protokolü takip edilerek tayini yapılmıştır. Öncelikle BSA (Bovine serum albumin) ile 9 adet standart (Şekil 3.3.a.) ile BCA Reagent A ve BCA Reagent B 50:1 oranında karıştırılarak Working Reagent hazırlanmıştır. Standartlar sırasıyla A'dan I'ya olacak şekilde her kuyucuğa 25 µl ve protein örnekleri de belirlenen kuyucuklara 25 µl olarak eklenmiş ve tüm kuyucuklara 200'er µl WR ilave edilmiştir. 37°C'de 30 dk inkübe edilerek ve 562 nm'de ölçülmüştür (Şekil 3.3.b.).

Tüp	Seyreltme Hacmi	BSA Hacmi	Son BSA Hacmi
A	0	300µl	2000µl
B	125µl	375µl	1500µl
C	325µl	325µl	1000µl
D	175µl	175µl B sol.	750µl
E	325µl	325µl C sol.	500µl
F	325µl	325µl E sol.	250µl
G	325µl	325µl F sol.	125µl
H	400µl	100µl G sol.	25µl
I	400µl	0	0(Blank)

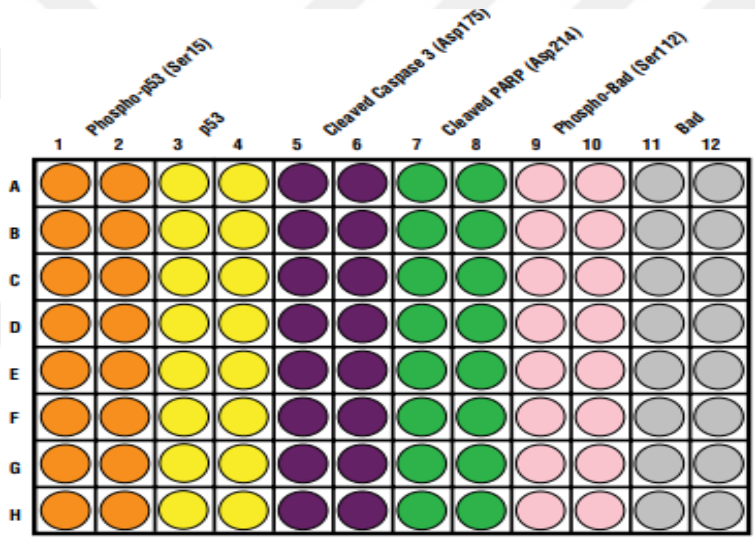


a. **b.**

Şekil 3.3. .a.) BSA ile hazırlanan standartlar, b.) Toplam protein tayini

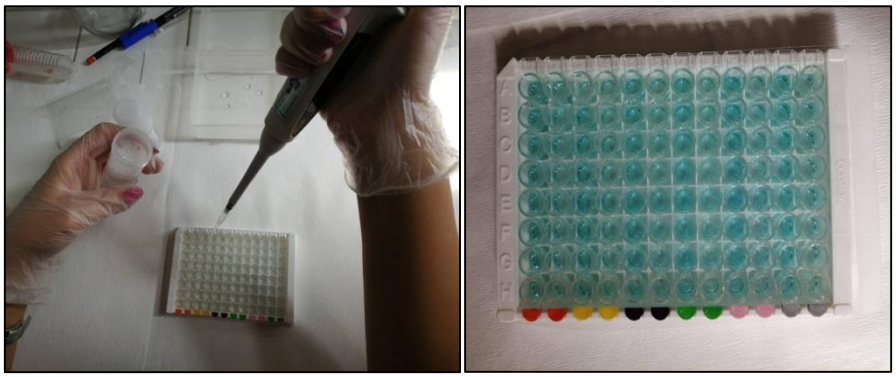
3.2.5. PathScan Apoptoz ELISA Uygulaması

Elde edilen hücresel proteinlerin, PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA Kit protokolü ile Phospho-p53 (Ser15), p53, Cleaved Caspase-3 (Asp175), Cleaved PARP (Asp214), Phospho-Bad (SER112) ve BAD genlerinin (Şekil 3.4.) protein ifade seviyeleri belirlenmiştir. Öncelikle miktarları bilinen proteinlerden, toplam protein tayini ile elde edilen ölçüm sonuçlarına göre eşit miktarlarda alınarak plate üzerinde belirlenen kuyucuklara eklenerek ve +4°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.4. PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA Kiti plate düzeni

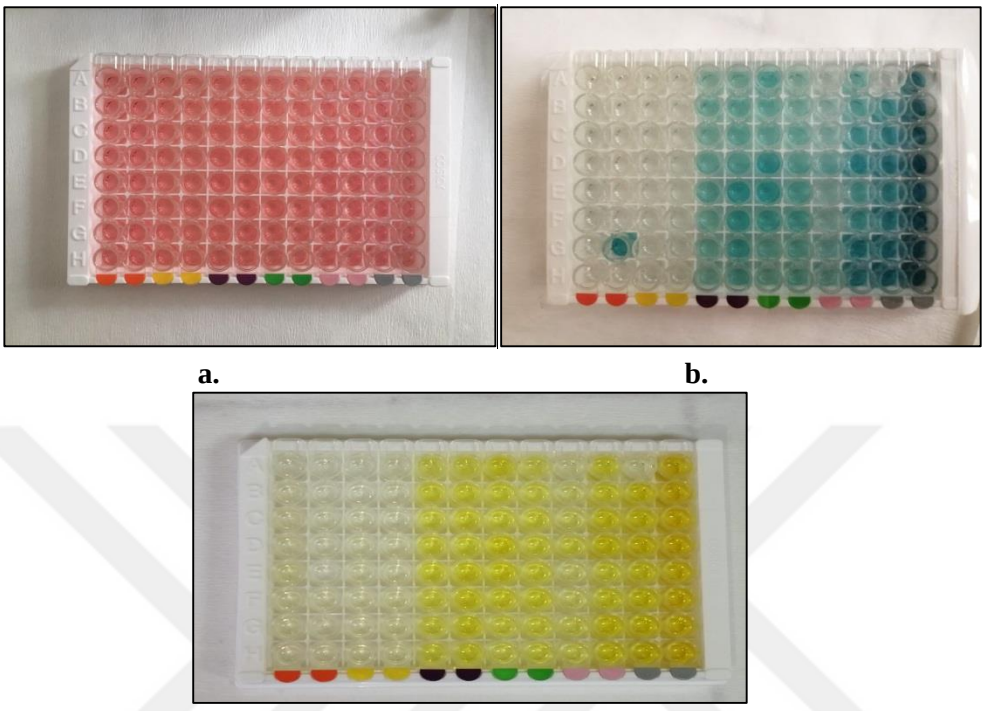
İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar dikkatli bir şekilde boşaltılarak ve kit içeriğindeki 1X yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkama yapılmıştır (Şekil 3.5.a.). Yıkama işleminin ardından kuyucuklara 100'er µl antikor eklenmiş (Şekil 3.5.b.) ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılarak yıkama işlemi 4 defa daha tekrarlanmıştır.



a. **b.**

Şekil 3.5. ELISA protokolünde (a). Kuyucukların yıkanması, (b). Antikorların eklenmesi

Her kuyucuğa 100 µl HRP bağlı sekonder antikor eklenerek (Şekil 3.6.a.) 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda yıkama işlemi 4 kez daha tekrarlanmıştır. Ardından TMB (3,3',5,5"-tetrametilbenzidin) substratı kuyucuklara eklenerek 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmış (Şekil 3.6.b.) ve inkübasyonun hemen ardından, Stop solüsyonu her kuyucuğa 100 µl olarak eklenerek (Şekil 3.6.c.) ilk 30 dk içerisinde mikroplate okuyucuda 450 nm'de okuma alınmıştır.



a. **b.**

c.

Şekil 3.6. (a). HRP bağlı sekonder antikor eklenen, (b). TMB solüsyonu eklenen ve (c). Stop solüsyonu eklenen plate görüntüleri

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. n-6 ve n-3 Yağ Asitlerinin MCF7 Hücrelerinin Canlılıkları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

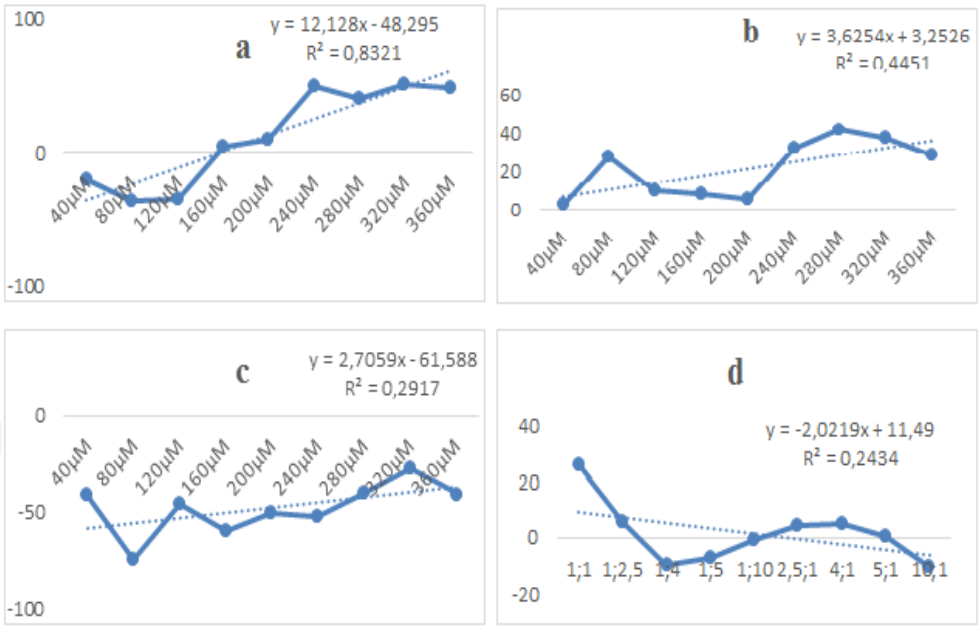
EPA, DHA, LA'nın 40 µM, 80 µM, 120 µM, 160 µM, 200 µM, 240 µM, 280 µM, 320 µM, 360 µM'lık konsantrasyonları ve bu üç yağ asitinin kombinasyonları (Şekil 4.1.) MCF7 hücrelerine uygulandı ve MTT yöntemi ile sonuçlar alındı.

		Düşük n-6/n-3 Oranları				Yüksek n-6/n-3 Oranları			
YA	1:1	1:2,5	1:4	1:5	1:10	2,5:1	4:1	5:1	10:1
LA	140	80	56	46.67	25.45	200	224	233.33	254.55
EPA	84	120	134.4	140	152.73	48	33.6	28	15.27
DHA	56	80	89.6	93.33	101.82	32	22.4	18.67	10.18

Şekil 4.1. 280 µM toplam yağ asidi konsantrasyonunda farklı oranlarda kullanılan n-6 (LA) ve n-3 (EPA, DHA) yağ asitlerinin konsantrasyonları

24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen veriler hücre canlılığının ve ölümünün, her yağ asitinin farklı konsantrasyonlarında minimum ve maksimum değerleri verdiği saptanmıştır.

Maksimum canlılık ve ölüm değerlerinin alındığı konsantrasyonlar sırasıyla, EPA için 80-240 µM (Şekil 4.2.a.), DHA için 40-280 µM (Şekil 4.2.b.), LA için 80-320 µM (Şekil 4.2.c.) ve LA/EPA+DHA (Şekil 4.2.d.) için 10:1-1:1 oranları tayin edilmiştir.



Şekil 4.2. 24 saatlik inkübasyon sanunda a.) EPA b.) DHA c.) LA d.) LA/EPA+DHA konsantrasyonlarının MCF7 hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi

Belirlenen bu konsantrasyonlar çalışmanın devamı için referans oluşturmuştur ve bu oranlar kullanılarak ELISA testinde hücre muameleleri yapılmıştır.

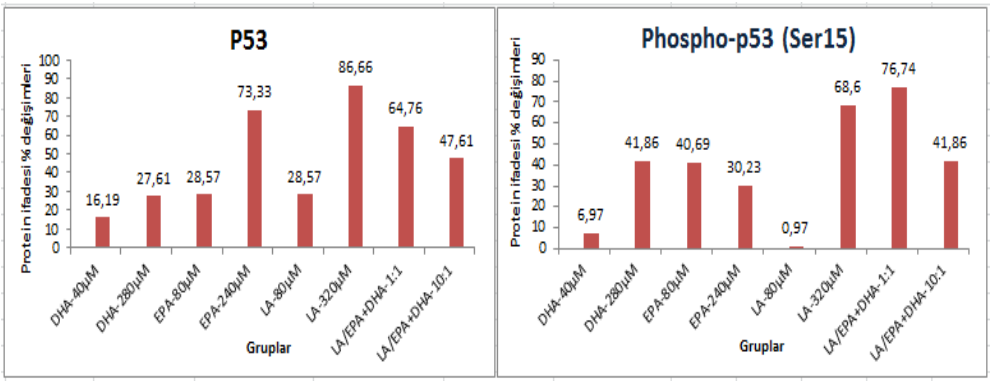
4.1.2. Yağ Asitlerinin MCF7 Hücreleri Üzerinde ki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

Canlılık testlerinden elde edilen veriler ışığında, en etkili dozlar EPA için 80-240 µM, DHA için 40-280 µM, LA için 80-320 µM ve LA/EPA+DHA için 10:1-1:1 oranları tayin edilerek ELISA çalışması yapılmış ve fosfo-p53 (Ser15), p53, bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175), bölünmüş PARP (Asp214), fosfo-Bad (SER112) ve BAD protein ekspresiyonları belirlenmiştir (Şekil 4.3.).

	MUAMELE SİZ	DHA-40µM	DHA-280µM	EPA-80µM	EPA-240µM	LA-80µM	LA-320µM	1:1	10:1
Fosfo-p53 (Ser15)	0.086	0.092	0.122	0.121	0.112	0.084	0.145	0.152	0.122
p53	0.105	0.122	0.134	0.135	0.182	0.165	0.196	0.173	0.155
Bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175)	0.625	0.710	0.886	0.895	0.850	1.143	1.159	1.087	0.889
Bölünmüş PARP (Asp214)	1.181	0.582	0.656	0.793	0.812	0.842	0.961	0.754	0.684
Fosfo-Bad (SER112)	0.205	0.964	0.994	1.429	1.908	0.834	1.035	1.735	1.512
BAD	0.175	2.352	2.654	2.918	2.871	2.194	2.628	2.335	2.698

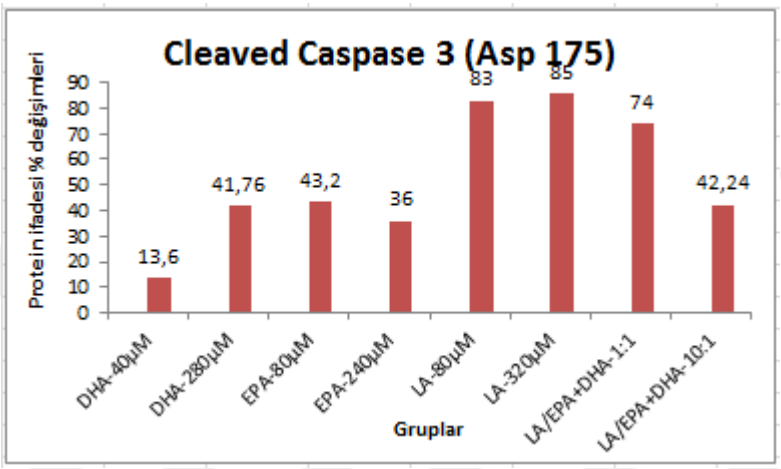
Şekil 4.3. ELISA sonucu fosfo-p53, P53, bölünmüş Kaspaz-3, bölünmüş PARP, fosfo-Bad ve BAD proteinlerinin ifade düzeyleri

Bu verilere göre; fosfo-p53 ekspresyonu DHA 40 µM ve LA 80 µM'lık konsantrasyonlarında hiçbir farklılığa yol açmamış ve diğer dozlardaki hafif artışlar ise anlamlı bir farklılık yaratmamıştır. P53 ifdesinde meydana gelen oldukça küçük artışlar yine bizim için anlamlı farklılıklar olarak kabul görmemiştir (Şekil 4.4.).



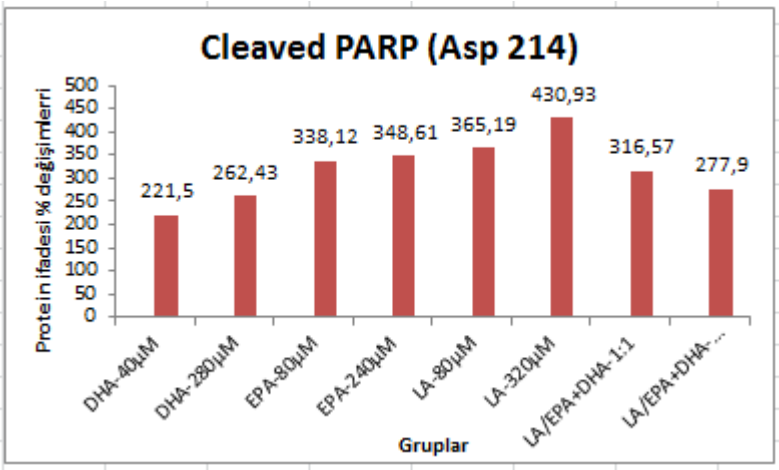
Şekil 4.4. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda P53 ve fosfo-p53 düzeyleri

Bölünmüş Kaspaz-3'ün ifadesinde tüm dozlar için belirgin bir artış olmasına rağmen LA 80 µM, LA 320 µM ve LA/EPA+DHA 1:1 uygulamalarında diğer dozların üzerinde bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.5.). Bu üç doz bölünmüş Kaspaz-3'ün ifadesini önemli ölçüde artırmıştır.



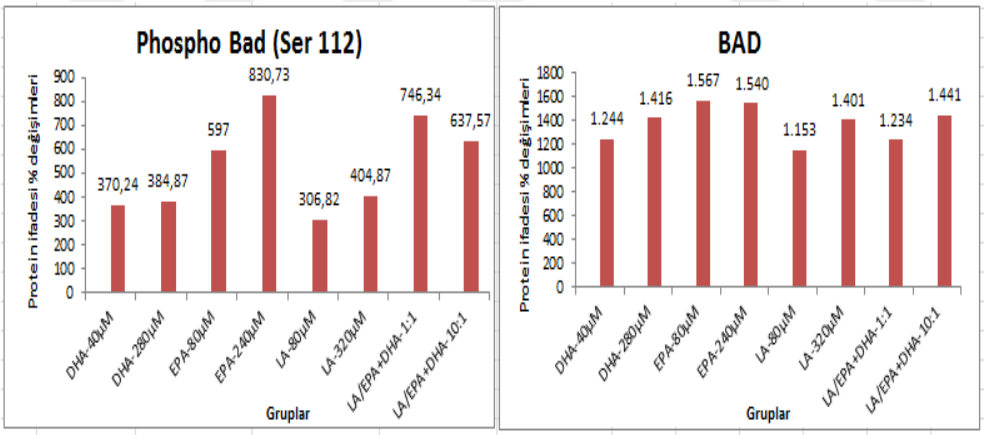
Şekil 4.5. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda Cleaved Caspase 3 (bölünmüş Kaspaz-3) protein ifade düzeyi

PARP proteini, DNA'daki kırıkların onarılmasında görev almaktadır. Bölünmüş PARP (Asp214) ise PARP'ın aktif formudur. Hücrede bölünmüş PARP düzeyinde meydana gelen artış, hücrenin apoptoza uğradığının göstergesidir. Çalışmamızda bölünmüş PARP ifadesindeki artış, uygulamasını yapmış olduğumuz omega yağ asitlerinin hücrelerin apoptozuna neden olduklarını göstermiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda Cleaved PARP (Bölünmüş PARP) proteininin ifade düzeyinde meydana gelen değişimler

Fosfo-Bad (SER112) ve BAD ifadeleri her uygulama için oldukça belirgin bir şekilde artış göstermiştir. BAD'ın ifadesinde ki artış oranı ise fosfo-Bad düzeyine göre daha ayırt edici olmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 24 saatlik YA uygulamaları sonucunda Fosfo-Bad ve BAD ifade seviyeleri

4.2. Tartışma

Hücrelerin apoptoz fonksiyonlarını kaybederek kontrolsüz çoğalmaları kanser oluşumuna neden olur. Günümüz sanayi ve teknoloji dünyasında, en yaygın

ve en ölümcül hastalıkların başında gelen kanser tedavilerinde, geleneksel sitotoksik ilaç geliştirme çalışmaları devam etmekte ancak oldukça önemli adımlar atılmasına rağmen hala kesin çözümler elde edilememektedir. Bununla beraber son yıllarda kanser tedavisine ve önlenmesine yönelik alternatif yöntemler üzerinde durulmaktadır. Meme kanserinin de dahil olduğu birçok kanser türünün multifaktöriyel özellikleri, diyet faktörlerini kanser tedavilerine alternatif olarak öne çıkarmıştır. Meme kanseri için, diyet faktörleri arasında omega yağ asitleri oldukça ilgi çekici hale gelmiştir. Çalışmamızda n-3 yağ asitlerinden eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit, n-6 yağ asitlerinden ise linoleik asit kullanılmıştır. Bu yağ asitlerinin seçilmesinin temel nedeni; soğuk su balıklarında doğal olarak bulunan, eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asitin, karsinojenezi önlemede ve meme kanseri riskini azaltmada (Zheng ve ark, 2013) oldukça umut verici olmalarıdır. Omega-6 yağ asitlerinin kanser gelişimi dahil olmak üzere birçok patolojik süreçte oynadığı roller büyük ölçüde araşidonik aside atfedilmiştir. Linoleik asitten üretilen gamma linolenik asitin (GLA) ve dihomo-gamma-linolenik asidin (DGLA), anti-kanser aktivitelerine sahip olduğu gösterilmesine rağmen (Xu ve Qian, 2014) linoleik asitin aktivitesi ile ilgili yeterli veri mevcut değildir. Meme kanserinin dünya genelinde en yaygın ikinci kanser türü olması ve östrojen reseptörlerini (ER) ve/veya progesteron reseptörlerini (PR) eksprese etmeleri nedeni çalışmamızda MCF7 hücre hattı kullanılmıştır.

Çalışmamızda, hayatta kalma ve apoptozu kontrol eden yolaklardaki anahtar sinyal proteinleri olan, fosfo-p53 (Ser15), p53, bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175), bölünmüş PARP (Asp214), fosfo-Bad (SER112) ve BAD proteinleri kullanıldı. Her yağ asitinin ve üçlü kombinasyonlarının bu altı proteinin ifadeleri üzerindeki etkileri kontrol örnek ile karşılaştırılarak belirlendi.

Meme kanserinin beslenme etiyolojisinde, balık kaynaklı n-3 yağ asitlerinin koruyucu faktörler olarak önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Zheng ve ark, 2013, Iyengar ve ark, 2013).

Eikosapentaenoik asitin hücrelerin canlılıkları üzerine etkisini incelediğimizde; 24 saatlik tedaviler sonucunda, 40, 80 ve 120 µM'larda canlılık üzerinde küçük bir artışa neden oluşmuşken, 160, 200, 240, 280, 320 ve 360 µM'lık konsantrasyonlar giderek artan bir toksisiteye neden olmuştur. EPA için elde ettiğimiz canlılık testi sonuçlarımız yapılan diğer çalışmalar ile tutarlılık göstermiştir (Mansara ve ark, 2015). EPA'nın hücre toksisitesi üzerine en az etkili olduğu doz 80 µM, en fazla etkili olduğu doz ise 240 µM olarak belirlenmiştir.

Dokosaheksaenoik asitin canlılık testi sonuçlarında ise 40, 120, 160 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarda hemen hemen aynı düşük seviyelerde toksisite gözlenirken, 80 µM'da ki toksisitede oldukça göze çarpan bir artış mevcuttur. DHA konsantrasyonu 240 µM ve 280 µM'a çıkarıldığında ise toksisite oranı giderek artmış ve 320 µM ile 360 µM'lık dozlarda düşüşe geçmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, farelerde ve insanlarda diyet çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları ile DHA'nın meme kanserinin önlenmesindeki rolü kanıtlanmıştır (Larsson ve ark, 2004) ve çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar da bu veriler ile tutarlılık göstermektedir. Burada da yine canlılık üzerine en az etkili olan 40 µM ve en çok etkili olan 280 µM'lık konsantrasyonlar belirlenmiştir.

Linoleik asitin tüm dozlarının hücre canlılığı üzerine olumlu etkilerinin olduğu ve bunun doza bağımlı şekilde artıp azaldığı saptanmıştır. Hücrelere en az etki eden 320 µM ve en çok etki eden 80 µM olarak belirlenmiştir. Linoleik asitin MCF7 hücrelerinin canlılıkları üzerine benzer bir çalışmaya rastlanmadığından elde ettiğimiz verilerimiz kaynak niteliği taşımaktadır.

LA/EPA+DHA'nın çeşitli kombinasyonlarının uygulanmasında; yüksek LA/EPA+DHA oranlarının hücrelerin canlılıkları üzerine olumlu etkilerinin olması ve düşük LA/EPA+DHA oranlarının ise toksik etkilerinin fazla olması beklenirken, sonuçlarımıza göre böyle bir genelleme yapılamamaktadır. 1:1 muamele oranı diğer dozlara göre belirgin bir farkla ve oldukça yüksek seviyede hücreler için toksisite göstermiştir. 10:1 muamele oranının ise hücre canlılığına

olumlu bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Tüm yağ asitlerinin MCF7 hücrelerinin canlılıklarına en çok ve en az etkili olan dozları fosfo-p53 (Ser15), p53, bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175), bölünmüş PARP (Asp214), fosfo-Bad (SER112) ve BAD proteinlerinin ifadelerinin belirlenmesi için referans seçilmiştir.

Tümör baskılayıcı protein p53, hücre uyarımlarına cevap olarak hücre döngüsünün durdurulmasında, DNA'nın onarımında ve hücre apoptozunun indüklenmesinde anahtar bir faktördür. Bu protein, DNA hasar onarımı sırasında veya apoptozu indüklemek için; serin 15, serin 20 ya da serin 46'da fosforile edilir. ELISA çalışmamız ile elde ettiğimiz verilerde; P53 ve fosfo-P53'ün tüm gruplarını hem kendi aralarında hem de muamelesiz sonuçlar ile karşılaştırdık ancak anlamlı bir ifade değişimi gözlemlemedik. Bu sonuçlar doğrultusunda EPA, DHA ve LA'in MCF7 hücre apoptozunu p53 yolağı üzerinden düzenlemediği sonucuna vardık.

Bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175) proteininin artışı apoptoz göstergelerinden biridir. Bölünmüş Kaspaz-3 aktivitesi nükleazları etkileyip apoptozu tetiklemektedir. Asp175'in ifade düzeyinin artması hücre apoptozunun indüklendiğinin göstergesidir. Çalışmamızda Asp175'in ifadesi, muamelesiz gruplar ile karşılaştırılmış ve tüm yağ asitleri dozları ile artmıştır. En belirgin artış % 85 oran ile linoleik asit dozlarında meydana gelmiştir ve her iki dozda kendi arasında orantılı bir artışa neden olmuştur. EPA'da ki Asp175 ifadesinin artış miktarı 80 µM'lık konsantrasyonda 240 µM'a göre biraz daha fazladır yani EPA'nın 80 µM dozu hücreleri Asp175 üzerinden 240 µM'a göre daha çok apoptoza yönlendirmiştir. DHA'nın 280 µM muamelesi Asp175 ifadesinin ~% 42 oranında artışını sağlarken, 40 µM ~% 14 oranında artmasını sağlamıştır. LA/EPA+DHA 1:1 ve 10:1 oranları ise Asp175'in ifadesini yine anlamlı bir şekilde arttırmış ve hücreleri apoptoza yönlendirmiştir.

PARP proteini, DNA'daki kırıkların onarılmasında görev almaktadır ve bölünmüş PARP (Asp214) formunda aktive olarak hücreleri apoptoza götürür. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlardan Asp214 ifadesinde oldukça yüksek

seviyelerde artış meydana gelmiştir ve bu artış yağ asitlerinin tüm dozları için gözlenmiştir.

BAD proteini apoptozu indüklemede görev alan aktif formda işlev gören bir proteindir. Hücre içerisinde normal koşullarda inaktif fosfo-Bad (Ser112) formunda bulunur ve herhangi bir apoptotik sinyal ile defosforilsayona uğrayarak aktif BAD formuna geçer. Yağ asitleri ile muameleler sonucunda BAD ifadesinde meydana gelen artış diğer proteinlerin ifadelerinde meydana gelen artıştan çok daha yüksek düzeyde olmuştur. Burada ilginç olan ise; muameleler sonucunda aktif BAD ifadesi yükselirken, inaktif form olan fosfo-Bad ifadesi de yükselmiştir. Bu durum; hücrelerin fosfo-Bad ifadesini arttırarak BAD proteininin yönlendirdiği apoptozdan kurtulmaya çalıştıklarını, hücrelerin canlılıklarını devam ettirmeye programlanmış olduklarını göstermiştir. BAD ifadesinde gözlenen bu artış oranları; EPA, DHA, LA ve kombinasyonlarının MCF7 hücrelerinde ki en etkili apoptoz yolunun BAD üzerinden meydana geldiğini göstermiştir.

Bütün bu bulgular ışığında bu tez çalışması, EPA, DHA ve LA ile bu üç yağ asitinin kombinasyonlarının, MCF7 insan meme kanseri hücre hattında fosfo-p53 (Ser15), p53, bölünmüş Kaspaz-3 (Asp175), bölünmüş PARP (Asp214), fosfo-Bad (SER112) ve BAD proteinlerinin ifade düzeylerine olan etkilerinin incelenmesi ile literatürde bir ilk olup, gerek özgünlüğü gerekse meme kanserinin tedavisi için gerçekleştirilecek çalışmalara katkı sağlayacak olması nedeniyle büyük bir önem arz etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİ

Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin, MCF7 hücrelerinin canlılıkları üzerine etkili oldukları ve apoptozda görevli genlerin protein ifadelerinde oldukça anlamlı değişimlere neden oldukları gösterilmiştir.

Omega yağ asitlerinin MCF7 meme kanseri hücrelerinin apoptoz mekanizması üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve daha net sonuçlar elde edebilmek için, apoptoz yolağındaki aracı diğer genler ile ilgili çalışmalarımızın devam etmesi ve ilave analiz yöntemleri kullanılarak sonuçların desteklenmesi sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

Abou-el-Ela, S.H., Prasse, K.W., Farrell, R.L., Carroll, R.W., Wade, A.E., Bunce, O.R., 1989. Effects of D,L-2-difluoromethylornithine and indomethacin on mammary tumor promotion in rats fed high n-3 and/or n-6 fat diets. Cancer research., 49(6), 1434–1440.

Ameisen, J.C., 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. Cell Death and Differentiation., 9 (4), 367–393.

Barascu A., Besson P., Le Floch O., Bougnoux P., Jourdan ML., 2005. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. Int J Biochem Cell Biol., 38(2), 196-208.

Behzadi, P., Ranjbar, R., 2015. Caspases and Apoptosis. IMedPub Journals, 1, 22-30.

Berman-Frank, I., Bidle, K.D., Haramaty, L., Falkowski, P.G., 2004. The demise of the marine cyanobacterium, Trichodesmium spp., via an autocatalyzed cell death pathway. Limnology and Oceanography, 49 (4), 997–1005.

Blows, F.M., Driver, K.E., Schmidt, M.K., Broeks, A., van Leeuwe, F.E., Wesseling, J., Cheang, M.C., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., 2010. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Med., 7(5).

Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo ,K., Couet, C., and Chevalier, S., 2010. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. Prog Lipid Res., 49, 76-86.

Brown, M.D., Hart, C.A., Gazi, E., Bagley, S., Clarke, N.W., 2006. Promotion of prostatic metastatic migration towards human bone marrow stoma by

Omega 6 and its inhibition by Omega 3 PUFAs. British Journal of Cancer, 94(6), 842–853.

Calder, P.C., 2005. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. Biochemical Society transactions, 33 (2),423–427.

Cancer Genome Atlas Network,2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, 490, 61-70.

Cheang, MC., Martin, M., Nielsen, TO., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., Ruiz, A., Chia, S., Shepherd, L., Ruiz-Borrego, M., et al., 2015. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. Oncologist, 20(5):474-82.

Chen CH., Fabian C., Hursting S., deGraffenried LA., 2016, Breast cancer genetic and molecular subtype ımpacts response to omega-3 fatty acid ethyl esters. Nutr Cancer., 68(6), 1021-1033.

Chiu, LC., Wong, EY., Ooi, VE., 2004. Docosahexaenoic acid modulates different genes in cell cycle and apoptosis to control growth of human leukemia HL-60 cells. Int. J. Oncol., 25(3):737-44.

Deshpande, R., Mansara, P., Suryavansh, S., Kail-Ghanekar, R., 2013. Alpha-linolenic acid regulates the growth of breast and cervical cancer cell lines through regulation of NO release and induction of lipid peroxidation. J Mol Biochem., 2, 26–37.

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

Edge, SB., Compton CC., 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol., 17(6):1471-4.

Ewaschuk, J.B., Newell, M., Field, C.J., 2012. Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER(-) breast cancer cells. Lipids, 47(11), 1019–1030.

Friesen, R.W., Innis, S. M., 2009. Dietary arachidonic acid to EPA and DHA balance is increased among Canadian pregnant women with low fish intake. The Journal of nutrition, 139(12),2344–2350.

Ge, Y., Chen, Z., Kang, ZB., Cluette-Brown, J., Laposata, M., Kang, JX., 2002. Effects of adenoviral gene transfer of C. elegans n-3 fatty acid desaturase on the lipid profile and growth of human breast cancer cells. Anticancer Res., 22(2A):537-43.

German, J. B., Roberts, M. A., Watkins, S. M., 2003. Genomics and metabolomics as markers for the interaction of diet and health: lessons from lipids. The Journal of nutrition, 133(6),2078–2083.

Goodstine, S. L., Zheng, T., Holford, T.R., Ward, B. A., Carter, D., Owens, P. H., Mayne, S. T., 2003. Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. The Journal of nutrition, 133(5):1409–1414.

Gül, Ş. K., Oruç, A. F., Mayadağlı, A., 2013. Duktal Karsinoma In Situ. J Kartal TR, 24(2):130-135.

Giuliano, K., Ejaz, A., Reames, BN., Choi, W., Sham, J., Gage, M., Johnston, FM., Ahuja, N., 2018. Comparing the long-term outcomes among patients with stomach and small intestine gastrointestinal stromal tumors: An analysis of the National Cancer Database. J Surg Oncol., 118(3):486-492.

Gogus, U., Smith, C., 2010. n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. International Journal of Food Science Technology, 45(3):417-436.

Green, DR., Fitzgerald, P., 2016. Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. Curr Biol., 26(13): R620–R627.

Greenlee, R., Harmon, M., Murray, T., Thun, M., 2001. Cancer Statistics. A Cancer Journal for Clinicians, 51(6), 373-373.

Hammamieh, R., Chakraborty, N., Miller, SA., Waddy, E., Barmada, M., Das, R., Peel, SA., Day, AA., Jett, M., 2007. Differential effects of omega-3 and

omega-6 Fatty acids on gene expression in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat., 101(1):7-16.

Haque, R., Ahmed, S. A , Inzhakova, G., Shi, J., Avila, C., Polikoff, J., Bernstein, L., Enger, S.M., Press, M.F., 2012. Impact of breast cancernsubtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 21, 1848-1855.

Harnack, K., Andersen, G., Somoza, V., 2009. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. Nutrition & metabolism, 19, 6:8.

Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H., Schaefer, E. J., 2007. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. Atherosclerosis, 197, 12-24.

Hyndman, IJ., 2016. The Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. Cancer Microenviron, 9 (1), 63-69.

Iyengar NM., Hudis, CA., Gucalp, A., 2013. Omega-3 fatty acids for prevention of breast cancer: An update and the state of the science. Curr Breast Cancer Rep., 5: 247-254.

Kachhap, SK., Dange, P., Nath Ghosh, S., 2000. Effect of omega-6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. Cancer Lett., 154(2), 115-200.

Kang, Z.B., Ge, Y., Chen, Z., Brown, J., Lapasota, M., Leaf, A., Kang, J.X., 2001. Adenoviral transfer of Caenorhabditis elegans n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian heart cells Proc Natl Acad Sci USA, 98.4050-4054

Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A., Etherton, T.D., 2009. Dietary reference intakes for DHA and EPA. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 81(2–3), 99–104.

Larsson, SC., Kumlin, M., Sundberg, M., Wolk A., 2004. Dietary long-chain n−3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. The American Journal of Clinical Nutrition, 79(6), 935–945.

Liu, J., Ma D.W., 2014. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. Nutrients, 6(11), 5184–5223.

Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., Jourdan, M.L., Pinault, M., Lavillonniere, F., Body, G., Le Floch, O., Chajès, V., 2002. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours. International journal of cancer, 98(1), 78–83.

Mansara P.P., Deshpande R.A., Vaidya M.M., Kaul-Ghanekar R., 2015. Differential ratios of omega fatty acids (AA/EPA+DHA) modulate growth, lipid peroxidation and expression of tumor regulatory MARBPs in breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231. PLoS One., 1, 109-142.

Merendino, N., Costantini, L., Manzi, L., Molinari, R., D'Eliseo, D., Velotti, F., 2013. Dietary omega -3 polyunsaturated fatty acid DHA: a potential adjuvant in the treatment of cancer. BioMed research international.

Mol, S., 2008. Consumption of fish oil and its effects on human health. Journal of Fisheries Sciences.Com. ,2(4), 601-607.

Negi, A.K., Bhatnagar, A. and Agnihotri, N., 2016. Fish oil augments celecoxib mediated alteration in apoptotic pathway in the initiation phase of 7,12-dimethylbenz(α) anthracene-induced mammary carcinogenesis. Biomed Pharmacother, 79, 9-16.

Perou, CM., Børresen-Dale, AL., 2011. Systems biology and genomics of breast cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol., 1;3(2).

Serini, S., Fasano, E., Piccioni, E., Cittadini, A.R., and Calviello, G., 2011. Differential anti-cancer effects of purifed EPA and DHA and possible mechanisms involved. Curr Med. Chem., 18,4065-4075.

Simopoulos, A.P., 1996. The role of fatty acids in gene expression: health implications. Ann Nutr. Metab., 40.303-311.

Simopoulos, A.P., 2008 (a). The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 17(1), 131–134.

Simopoulos, A.P., 2008 (b). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Experimental Biology and Medicine, 233(6),674–688.

Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J., 2001. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. Journal of Biological Chemistry, 276 (10), 7320–7326.

Wu, S., Guo, Y., Wu, Y., Zhu, S., He, Z., Chen, Y.Q., 2015. Omega-3 free fatty acids inhibit tamoxifen-induced cell apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 459, 294-299.

Xu, Y., Qian, SY., 2014. Anti-cancer Activities of ω-6 Polyunsaturated Fatty Acids. Biomed J., 37(3): 112–119.

Yilmaz, MB., Wolfe, A., Cheng, YH., Kenney, CG., Jameson, JL., Bulun, SE., 2009. Aromatase Promoter I.f is Regulated by Estrogen Receptor Alpha (ESR1) in Mouse Hypothalamic Neuronal Cell Lines. Biol Reprod., 81(5): 956–965.

Zatsick, NM., Mayket, P., 2006. Fish Oil: Getting to the Heart of It. The Journal for Nurse Practitioners, 3(2):104-109.

Zheng W., Wang X., Cao W., Yang B., Mu Y., Dong Y., Xiu Z., 2017. E-configuration structures of EPA and DHA derived from Euphausia superba and their significant inhibitive effects on growth of human cancer cell lines in vitro. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid, 117, 47-53.

Zheng, J.S., Hu, X.J., Zhao, Y.M., Yang, J., and Li, D., 2013. Intake of fsh and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: Meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies.

Zmasek, C.M., Godzik, A., Silke, J., Meier, P., & Chan, F.K., 2013. Evolution of the Animal Apoptosis Network, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5 (3), 1–12.

ÖZGEÇMİŞ

27 Nisan 1990 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2008 yılında başladığı Mersin Üniversitesi Biyoloji bölümünden 2013 yılında mezun oldu. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.