

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LUTEOLİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE VE YAŞLANMA İLE
İLİŞKİLİ SALGI FENOTİPİNE KARŞI PARAKRİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İklima KIZILTOPRAK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2023

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LUTEOLİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE VE YAŞLANMA İLE
İLİŞKİLİ SALGI FENOTİPİNE KARŞI PARAKRİN ETKİLERİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İklima KIZILTOPRAK
(215309004)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 215309004 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi İklima KIZILTOPRAK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “LUTEOLİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE VE YAŞLANMA İLE İLİŞKİLİ SALGI FENOTİPİNE KARŞI PARAKRİN ETKİLERİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Deniz CEYLAN TUNABOYLU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN
İstanbul Cerrahapaşa Üniversitesi

Teslim Tarihi : **14 Temmuz 2023**
Savunma Tarihi : **14 Haziran 2023**



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitim ve tez sürecinde değerli tecrübeleri ile bilgileriyle bana yol gösteren ve destek olan, daima hoşgörü ile özverisini paylaşan, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirmem için her türlü imkanı sunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Fahri AKBAŞ'a;

Eğitim hayatım ve çalışmalarım boyunca değerli bilgi birikimini ve emeklerini esirgemeyen, akademi yolunda ilerlemem için deneyimi ile yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz CEYLAN TUNCABOYLU'na saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince laboratuvar olanaklarına erişim imkanı tanıyan Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL'e saygı veteşekkürlerimi sunarım.

Hem oda arkadaşım hem de tez sürecimdeki hep yanımdaki destekcim Uzm. Biy. Alime SARIKAYA' ya yanımda olduğu ve bana her daim destek olduğu için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana güvenen, inanan ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bu günlere gelmemde büyük emek veren, hayatımın her anında maddi ve manevi zor günlerimde yanımda olan biricik ailemden babam ve annem OĞUZ ve ZEYNEP KIZILTOPRAK'a, canım kardeşimlerim Aleyna ve Yiğit KIZILTOPRAK' a saygı ve sevgilerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimine başlamamda ve çalışma konuma olan ilgisiyle beni destekleyen ve dinleyen canım dayım Halil İbrahim ÇULHACIOĞLU'na sevgilerimi sunarım.

Bu tez Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi 20221012 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Haziran 2023

İklima KIZILTOPRAK
(Moleküler Biyolog)

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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İklima KIZILTOPRAK

İmza

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
BEYAN	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
SEMBOLLER	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER	19
2.1 Kanser	19
2.2 Kanserin 10 Temel Özelliği	19
2.2.1 Meme kanseri	20
2.2.2 Tümör mikroçevresi	22
2.3 Hüresel Yaşlanma.....	24
2.3.1 Hüresel yaşlanma ve fibroblast arasındaki bağlantı	29
2.4 Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipi (SASP).....	30
2.4.1 Yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipinin (SASP) etki mekanizması	30
2.4.2 Yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipinin (SASP) parakrin etkisi	32
2.5 Flavonoidler	34
2.5.1 Flavonoidlerin sınıflandırılması	35
2.5.2 Flavonoidler ve kanser	37
2.6 Luteolin ve Moleküler Yapısı	39
2.7 Luteoli'nin Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1 Malzemeler.....	44
3.2 Kullanılan Cihazlar	44
3.3 Deneysel Kısım	44
3.3.1 Hücre kültürü ve hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) kaynaklı hüresel yaşlanma	44
3.3.2 Yaşlanma ile ilişkili Beta-galaktosidaz (SA-B-gal) aktivitesinin incelenmesi.....	45
3.3.3 Real-time PCR (qPCR) analizi	46
3.3.4 Çizik deneyi	46
3.3.5 Hücre canlılığı testi (MTT)	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1 Hidrojen Peroksitin Konsantrasyonuna Bağlı Yaşlandırma Modelinin Oluşması.....	48
4.2 Yaşlanan Fibroblastların Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisi	49

4.3 Yaşlanan Fibroblastlar ve Luteolinle Muamele Edilen Fibroblastlardaki Beta-Galaktozidaz Aktivitesi.....	51
4.4 Yaşlanma Fenotipinin Parakrin Etki Ekspresyonları	52
4.5 Yaşlanmış Fibroblastların Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisi	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ.....	76



KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Bovin Serum Albumin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
RNA	: Ribonükleik Asit
ATCC	: American Type Culture Collection
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FBS	: Fetal Bovin Serum
IL-6	: İnterlökin 6
IL-1	: İnterlökin 1
IL-8	: İnterlökin 8
CXCL-1	: Kemokin 1
CXCL-2	: Kemokin 2
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
PARP	: Poli ADP Riboz Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü alfa
TNF-B	: Tümör Nekroz Faktörü beta
SASP	: Yaşlanmayla İlişkili Salgı Fenotipi
TME	: Tümör Mikroçevresi
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
ER	: Östrojen Reseptörü
PR	: Progesteron Reseptörü
EMT	: Epitel-Mezenkimal Geçiş
SNAIL	: SNAIL Geni Tarafından Kodlanan Protein
TWIST	: Transkripsiyon Faktörü
ZEB	: Çinko Parmak E-kutu Bağlayıcı Homeobox 1
ZEB2	: Çinko Parmak E-kutu Bağlayıcı Homeobox 2
GATA3	: Transkripsiyon Faktörü
G9A	: Ökromatik Histon-lizin N-metiltransferaz 2 Enzimi
MTA	: Metastik Tümör Antijeni
ER-a	: Östrojen Reseptörü Alfa
TAM	: Tümörle İlişkili Makrofaj
M2	: Makrofaj Alt Tipi
CD4+	: Yardımcı T Hücreleri
ECM	: Ekstraselüler matriks
MDR	: Çoklu İlaç Direnci

CTC	: Dolaşımdaki Tümör Hücreleri
cfDNA	: Hüresiz DNA
RNA	: Ribonükleik asit
HGT	: Yatay Gen Transferi
CSC	: Tümör Kök Hücreleri
MC	: Mast Hücreleri
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
DC	: Dendritik Hücreler
MDS	: Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler
Treg	: Düzenleyici T Hücreleri
SA-B-Gal	: Yaşlanmayla İlişkili Hidrolaz Enzimi
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CKI	: CDK İnhibitörleri
p27KIP1	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1B
CDKN1A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1
CDKN2A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2
p16NK4A	: Tümör Baskılayıcı Protein
E2F	: Hücre Döngüsü Düzenleyen Protein
OIS	: Onkogen Kaynaklı Stres
DSB	: DNA Çift İplik Kırıkları
SIPS	: Stres Kaynaklı Erken Yaşlanma
DDR	: DNA Çift İplik Kırıkları
TIF	: Tümör İnterstiyel Sıvı
H2AX	: Histon Proteini
H3K9me3	: Modifiye Edilmiş Histon Proteini
MMPs	: Matriks Metalloproteinazlar
mTOR	: Rapamisin Hedefli Kinaz
GMP	: İyi Üretim Uygulamaları
AMP	: AMP ile aktive olan protein kinaz
HMGB1	: Yüksek mobilite grup kutusu 1
p53	: Tümör Süpressör
PDH	: Piruvat Dehidrogenaz
PDK1	: Fosfoinositide bağımlı kinaz-1
p16	: Tümör Baskılayıcı Protein
CAF	: Kansere İlişkili Fibroblastlar
H2O2	: Hidrojen Peroksit
RB	: Retinablastoma Proteini
TP53	: Transkripsiyon Faktörü
myc	: Myc Proto-onkogen Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
AD	: Alzheimer Hastalığı
COX-2	: Siklo-oksijenaz-2
PERK	: PRKR Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz
ATF-4	: Transkripsiyon Faktörü
Akt	: Protein kinaz B
Bax	: P53 Kofaktörü
XIAP	: X'e Bağlı Apoptoz Protein İnhibitörü
hTERT	: İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz
RT-PCR	: Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SEMBOLLER

g : Gram
uM : Mikromolar
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
C° : Derece
L : Litre
mM : Minimolar



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Flavonoidlerin Kansere Hücreleri Üzerindeki Aktiviteleri [205].	39
Tablo 2.2 : Luteolin'in meme kanseri hücre hatlarında hedef moleküler mekanizması	43
Tablo 3.1 : GAPDH primerleri.....	45
Tablo 3.2 : Real-time PCR amplifikasyonu için kullanılacak primerler.	46

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Kanserin 10 temel özelliği [31].	20
Şekil 2.2 : Tümör mikroçevresi [64].	23
Şekil 2.3 : Hüresel Yaşlanmanın Ayırt Edici Özellikleri.	26
Şekil 2.4 : SASP Faktörlerinin Hücelere Etkisi [146].	30
Şekil 2.5 : Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipi Aktivasyon Mekanizması[23]	32
Şekil 2.6 : SASP Faktörleri ve Yaşlanma Sinyali [168].	33
Şekil 2.7 : Flavonoidlerin Sınıflandırması [179].	35
Şekil 2.8 : Luteolin'in Molekül Yapısı [211].	40
Şekil 2.9 : Luteolin Anti-Kanser Etki Mekanizması ve Sinyal Yolakları [214].	41
Şekil 4.1 : Normal 3T3 fibroblast ile yaşlanmış 3T3 fibroblast karşılaştırması.	48
Şekil 4.2 : Hidrojen peroksitin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı.	49
Şekil 4.3 : Yaşlanmış fibroblastların MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisi.	50
Şekil 4.4 : Luteolin ile muamele edilmiş yaşlanmış fibroblastların MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisi.	50
Şekil 4.5 : Yaşlanmış ortam ile luteolinli ortamın kanser hücrelerinde yara açıklıkları	50
Şekil 4.6 : Beta-galaktozidaz aktivitesinin ölçümü.	52
Şekil 4.7 : Real-time PCR ile yaşlanmış ortamdaki sitokinlerin ve proteinlerin ekspresyon analizleri	53
Şekil 4.8 : H ₂ O ₂ konsantrasyonlarıyla yaşlanan hücrelerin, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi	54
Şekil 4.9 : H ₂ O ₂ konsantrasyonlarıyla yaşlanan hücrelerin, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi	55

LUTEOLİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE ve YAŞLANMA ile İLİŞKİLİ SALGI FENOTİPİNE KARŞI PARAKRİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Yaşlanma, genetik bir program tarafından düzenlenen ve organizmada çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen yapısal, işlevsel ve psikolojik değişmelerin toplamıdır. İlerleyen kronolojik yaşla bağlı bir dizi hastalık için en büyük risk faktörüdür. Yaşlanmanın kanser hastalığıyla olan ilişkisine dair yapılan çalışmalarda görüş, yaşlanan hücrelerin dokularda biriktiği ve yaşlanmayla birlikte dejenerasyona yol açtığı yönündedir. Dolayısıyla temel yaşlanma sürecine yapılan müdahaleler kanser hastalığı başta olmak üzere yaşa bağlı birçok hastalığı iyileştirme konusunda umut vaat etmektedir.

Temel yaşlanma sürecinin ayırt edici özelliklerinden biri hücresel yaşlanmadır. Hücresel yaşlanma, bölünebilen hücreler tarafından benimsenen çok yönlü bir stres tepkisidir. Yapılan in vivo çalışmalarda, çeşitli sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteaz içeren karmaşık bir mekanizma ile yaşlanmayla ilişkili salgılama fenotipinin (SAPS) oluştuğu ve buna bağlı olarak hücre proliferasyonunun geri döndürülemez bir şekilde durdurulduğu gösterilmiştir. Salgılama fenotipini (SAPS) baskılayabilen düzenleyici molekülleri belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, önemli bir SAPS bileşeni olan IL-6 üzerinden bazı flavonoidler salgı fenotipi (SAPS) inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Bu flavonoid grubunun yaşlanma sürecini baskılayabileceği ve sinyal iletim yollarını düzenleyebileceği fikrini desteklemektedir.

Luteolin, birçok bitki türünde yaygın olarak bulunmaktadır. Hücre üzerinde metastaz, apoptoz ve anjiyogenez dahil olmak üzere karsinogenezin ilerlemesindeki bir çok noktayı bloke edebilen bir flavonoid olduğu gösterilmiştir. Literatür bilgileri dahilinde luteolinin yapısı, etkilediği hücresel yollar ve tümör gelişimi

üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, SAPS fenotipi ile ilişkili olması hipotezini gündeme getirmiştir.

Proje kapsamında luteolin flavonoidinin, meme kanseri hücreleri üzerinde, proliferasyonu ve yaşlanmayla ilişkili stres yanıtı olan salgı fenotipini (SAPS) hangi ölçüde baskıladığını göstermek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada yaşlandırılmış fibroblast hücre modeli oluşturulacaktır. Daha sonra bu hücrelerin meme kanseri hücreleri üzerindeki parakrin etkileri incelenecektir. Luteolin uygulanan bu hücrelerde, IL-6/NF-κB sinyal iletim yolağını düzenleyerek salgı fenotipinin baskılması ve kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon özelliklerinin engellenebildiğini göstermek hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Luteolin, SASP, Hüresel Yaşlanma, IL-6.

INVESTIGATION OF THE PARACRINE EFFECTS OF LUTEOLIN AGAINST BREAST CANCER CELLS AND AGING-RELATED SECRETORY PHENOTYPE

SUMMARY

Aging is the sum of structural, functional and psychological changes in the organism, regulated by a genetic program and influenced by environmental factors. It is the major risk factor for a number of diseases associated with advancing chronological age. Studies on the relationship between aging and cancer suggest that aging cells accumulate in tissues and lead to degeneration with aging. Therefore, interventions in the basic aging process hold promise for curing many age-related diseases, especially cancer.

One of the hallmarks of the basic aging process is cellular senescence. Cellular senescence is a multifaceted stress response adopted by dividing cells. In vivo studies have shown that a complex mechanism involving a variety of cytokines, chemokines, growth factors and proteases leads to the formation of an aging-associated secretory phenotype (SAPS), which results in an irreversible arrest of cell proliferation. In studies conducted to identify regulatory molecules that can suppress the secretory phenotype (SAPS), some flavonoids have been identified as secretory phenotype (SAPS) inhibitors through IL-6, an important SAPS component. This supports the idea that this flavonoid group may suppress the aging process and regulate signal transduction pathways.

Luteolin is widely found in many plant species. It has been shown to be a flavonoid that can block many points in the progression of carcinogenesis, including metastasis, apoptosis and angiogenesis on the cell. Considering the structure of luteolin in the literature, the cellular pathways it affects and its effects on tumor development, the hypothesis that it is associated with the SAPS phenotype has been raised.

Within the scope of the project, it was aimed to show the extent to which luteolin flavonoid suppresses the secretory phenotype (SAPS), which is a stress response associated with proliferation and aging, on breast cancer cells. For this purpose, an aged fibroblast cell model will be established in the study. Then, the paracrine effects of these cells on breast cancer cells will be examined. In these cells treated with luteolin, it is aimed to show that by regulating the IL-6/NF- κ B signal transduction pathway, the secretory phenotype can be suppressed and the proliferation and migration characteristics of cancer cells can be inhibited.

Keywords: Luteolin, SASP, Cell Senescence, IL-6.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünya genelinde hastalıklara bağlı ölümlerin en yaygın sebeplerinden biridir ve 2020 yılında yaklaşık 10 milyon ölümden sorumludur [1]. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve yüksek ölüm insidansına sahiptir. GLOBOCAN tarafından edinilen bilgilere göre, kadın meme kanseri 2020 yılında dünya genelinde en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır [2, 3]. Elde edinilen bilgiler ve istatistikler, meme kanseri insidansının ve buna bağlı ölüm oranının daha da artacağını göstermektedir [4]. Aynı zamanda ilerleyen yaş, hücresel yaşlanma, genetik mutasyonlar, aile öyküsü, obezite ve yeme alışkanlıkları gibi birçok risk faktörünün meme kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde etkili olduğu da belirlenmiştir. Bir tümör hücresinin gelişimi yalnızca tümörü başlatan hücrelerde değil, aynı zamanda diğer hücreler ve salgılanan biyomoleküllerden oluşan, tümör mikroçevresindeki değişiklikleri içeren karmaşık ve evrimsel bir süreçtir [5, 6]. Yapılan araştırmalarda, diyet kaynaklarından elde edilen doğal bileşiklerin, meme kanseri ile ilgili bir dizi yolu hedefleyebileceği, bu da malignitelere karşı koruyucu etki sağlayabileceği öne sürülmektedir [7]. Erken dönemde kanseri baskılayan bir stres tepkisi yanıtı hücresel yaşlanmadır [8]. Hücresel yaşlanma, bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak işlev görmektedir [9]. Yaşlanma, hem dejeneratif hem de hiperplastik olmak üzere yaşa bağlı bir dizi hastalık için en büyük risk faktörüdür. Temel yaşlanma sürecinde yapılan müdahalelerin kanser başta olmak üzere yaşa bağlı birçok hastalığı iyileştirmede umut vaat etmektedir [10]. Dokuz temel yaşlanma süreci veya yaşlanmanın ayırt edici özelliği, memeli organizmaların sağlıklı yaşlanmasını ve yaşama sürelerini uzatmaya yönelik müdahaleler için uygun hedefler olarak tanımlanmıştır [11]. Bu ayırt edici özelliklerden biri de hücresel yaşlanmadır. Hücresel yaşlanma, hücre bölünmesine sahip olan hücreler tarafından benimsenen çok yönlü bir stres tepkisidir [8]. Yaşlanma yanıtı, sayısız sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteaz içeren karmaşık bir yaşlanmayla ilişkili salgılama fenotipine (SASP) bağlı hücre proliferasyonunun esasen geri döndürülemez bir şekilde durdurulma sürecini kontrol eder [12].

Hücresel yaşlanma, hücrelerde hasar veya stres ile dönüşüme yol açabilecek kalıcı bir büyüme durmasıdır. Bazı tümör hücreleri de kemoterapiye yanıt olarak yaşlanmaya uğramaktadır [13]. Yaşlanma yanıtı, DNA hasarı gibi streslere yanıt olarak kalıcı bir hücre döngüsü durmasıdır. Bu yanıt tümör baskılayıcı olarak kabul edilir, çünkü hücreler artık bölünmez. Yaşlanan hücreler, SASP içeren çeşitli sitokinleri salgılamaktadırlar [12]. Hasarlı veya onkogenleri eksprese eden hücreleri, bağışıklık hücreleri organizmadan uzaklaştırır. SASP bu bağışıklık hücrelerini kontrol ederek tümör baskılanmasına katkıda bulunur [13]. SASP faktörleri, şekil 1’de gösterildiği gibi çok sayıda sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve matris metalloproteinazları (MMP’ler) içermektedir. Daha önce tanımlanmış SASP sitokinleri, kemokinleri, büyüme faktörleri ve MMP’lerin, yaşlanan hücrelerdeki kansere bağlı etkilerinden sorumlu olduğu bulunmuştur ve tümör hücrelerinin gelişimini teşvik ettiği bulunmuştur [14]. Örneğin, SASP ile ilişkili bir büyüme faktörünün (vasküler endotelial büyüme faktörü [VEGF]), nakledilen kanser hücreleri yüksek seviyelerde VEGF salgılayan yaşlanmış fibroblastlarla birlikte enjekte edildiğinde daha fazla kan damarı oluşturduğu için anjiyogenezi desteklediği bildirilmiştir [15]. Başka bir SASP faktörü yaşlanan hücrelerden salgılanan MMP’lerdir. Nakledilen kanser hücrelerinin, MMP’ye bağımlı bir şekilde yaşlanan fibroblastlarla birlikte enjekte edildiğinde daha büyük tümörler geliştirdiği, kanser hücresi invazivliğini arttırdığı gösterilmiştir [16]. Ayrıca, IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin, yaşlanan fibroblastlardan salgılanması, meme kanseri hücrelerinde epitel–mezenkimal geçişini (EMT) teşvik ettiği bildirilmiş olup, iyi karakterize edilmiş SASP faktörleridir [12].

SASP'nin otokrin ve parakrin yollarla, hücre çoğalmasını engelleyerek, hasarlı yaşlanan hücreleri ortadan kaldırmak için bağışıklık hücrelerini aktive ederek ilk anti-tümöral etkileri gösterdiği bildirilmiştir [17-19]. Anti-tümör aktivitesinin aksine ise SASP; tümör başlangıcını, metastazı, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT), kanser köklülüğünü ve tümör direncini desteklediği için uzun vadeli pro-tümöral etkilere de sahip olabilir [14, 18, 19]. SASP; sitokinler ve kemokinler (IL1 α , IL1 β , IL6, IL8, CXCL1, CXCL2), büyüme faktörleri (amphiregulin, EGF, BMP’ler, FGF’ler, VEGF, WNT’ler), hücre dışı matris (ECM) bileşenleri (fibronektin) ve proteazlar (MMP’ler, plazminojen aktivatörleri) dahil olmak üzere sayısız faktörün salgılanması yoluyla yaşlanan hücrelerin parakrin faaliyetlerine aracılık eder [20-22]. Son araştırmalar, SASP parakrin sinyalinin, malin fenotipleri arttırmak ve tümör başlangıcını teşvik etmek gibi çeşitli pro-tümörijenik etkilere aracılık edebileceğini göstermiştir [23]. Bu

bağlamda, yaşlanan hücrelerde SASP'nin hedeflenmesi, tümör ilerlemesini durdurmak veya yavaşlatmak için potansiyel bir stratejiyi temsil eder, çünkü yaşlanan hücrelerin birçok aktivitesi tümör büyümesini ve malin ilerlemeyi teşvik eder. Dolayısıyla, SASP'nin kanser ve yaşlanma biyolojisindeki yaygın etkilerine ilişkin yaklaşımı daha da aydınlatılmayı gerektirmektedir. SASP'yi ve olumsuz etkilerini modüle edebilecek, maliniteyi hedefleyen bir aday molekül kanser tedavisinde umut verici olabilir.

Salgılaşma fenotipini (SASP) baskılayabilen yeni düzenleyicileri belirlemek amacıyla (SASP) bileşeni olan IL-6'nın salgılanmasını baskılayıcı etkisi açısından FDA onaylı ilaçlardan oluşan kitaplık taranmıştır [12]. Bu tarama sonuçlarına göre bazı glukokortikoidler salgı fenotipi (SASP) inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Kitaplıktaki adaylar arasında flavonoidler de yer almaktadır. Bu adaylardan olan apigeninin ve dahil olduğu flavonoid grubunun bleomisin tarafından yaşlanmaya neden olan bir insan fibroblast süşunun salgı fenotipini (SASP) azalttığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmada apigeninin, IRAK1 ve IRAK4, p38-MAPK ve NF- κ B aracılığıyla IL-1 α sinyalinin baskılayarak SASP'yi kısmen baskıladığı ve hücre proliferasyonu, hücre dışı matris invazyonu ve epitelyal mezankimal geçiş üzerinden insan meme kanseri hücrelerinin agresif fenotipini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [24]. Yapılan çalışmalara göre flavonoid grubu adaylarının SASP hedeflenmesi, tümörögeneze karşı hedef adaylar olabileceğini fikrini desteklemektedir.

Luteolin, 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon, meyveler, sebzeler ve şifalı otlar dahil olmak üzere birçok bitki türünde yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir. Luteolin açısından zengin olan bitkiler, geleneksel Çin tıbbında hipertansiyon, inflamatuvar bozukluklar ve kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda flavonoidlerin kanser önleyici olabileceği fark edilmiştir [25]. Ayrıca flavonoidler, kinazları inhibe ederek, hücre döngüsünü düzenler, apoptotik hücre ölümünü indükler, metastaz ve anjiyogenez dahil olmak üzere karsinogenezin ilerlemesindeki bir çok noktayı bloke edebilir [26]. Luteolinin, meme kanserinin yeni başlayan kolonizasyonunu önleyebilen reseptör tirozin-kinaz aktivitesini ve apoptozu baskılayarak çoğalmasını engelleyici etkisi olduğu görülmüştür [25]. STAT3'ü inhibe ederek meme kanseri hücre apoptozunu indüklemeye etkili olan ve terapötik olarak kullanılan paklitakselin etkinliğinin, luteolin tarafından artırabileceği de gösterilmiştir [27]. Şekil 2' de gösterildiği gibi luteolin ile yapılan başka bir çalışmada COX-2, NO, IL-6, IL-1 β , TNF- α baskılanmasını ve NF- κ B, AP-1, JAK-STAT dahil olmak üzere

çeşitli sinyal iletim yollarını düzenlediği ve engelleyebildiği gösterilmiştir [24]. Aynı zamanda luteolin VEGF üretimini, MMP'leri ve endotelial göçü azaltır, bunların hepsi tümör ilerlemesini teşvik eder. Meme kanserinde, sitokinler, kanser hücreleri ve mikroçevre arasındaki iletişimi koordine eder.

Luteolin ile beslenen farelerde, kontrol grubu farelere göre meme kanseri tümör hacminin daha düşük olduğu gösterilmiştir ancak tümör büyümesinin ideal terapötik doza karşı etkisi incelenmemiştir [25]. Sui vd [28] meme kanserinde luteolinin doza bağlı apoptotik etkisini gösterebilmiştir, ancak çalışmada kontrol olarak normal meme hücreleri kullanılmamıştır. Lin vd [29] luteolinin hücre döngüsü durmasını, hücre apoptozunu teşvik ederek Hs578T, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını da engellediğini göstermiş lakin bu etkileri FOXO3a aktivasyonu ile ilişkilendirmiştir. Oysa hücre yaşlanmanın tümör baskılayıcı mekanizmada görev aldığı bildirilmiş olup, kanserin erken döneminde bir stres yanıtı (yaşlanma) tepkisiyle baskılayabilir bu durumda yaşlanma yanıtı SASP'a bağlı hücre proliferasyonunun esasen geri döndürülemez bir şekilde durdurulmasıyla ilişkilendirilebilir. Kevin vd [24] luteolin ile aynı flavonoid grubunda yer alan apigenin maddesinin, meme kanseri hücrelerindeki SASP fenotipiyle ilişkisi ve parakrin etkileriyle sinyal yollarının düzenlenmesini, hücre proliferasyonuna etkisini araştırmışlardır. Aynı grupta bulunan apigenin maddesinin SASP fenotipini ve parakrin etkilerini baskılaması, sinyal yollarının düzenlenmesi sonucunda meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskılanması durumu, luteolinin de SASP fenotipine etkisinin araştırılması konusunu gündeme getirmiştir. Kanser tedavisi bağlamında, hem normal yaşlanmamış hücreleri hem de tümör kaynaklı yaşlanan hücreleri ortadan kaldırmayı amaçlayan destekleyici luteolin tedavisinin dikkate alınması önemli olabilir. Luteolinin, salgı fenotipini (SASP) ve parakrin etkilerini ne ölçüde baskıladığını belirlemek için insan fibroblast hücreleri (3T3 fibroblastları), yaşlanma indükleyicileri ile birlikte kullanılarak etkileri analiz edilecektir. Yüksek lisans tez çalışmamın kapsamında, 3 farklı konsantrasyondaki (10uM, 25 uM ve 50 uM) luteolinin SASP ile ilişkisi incelenip, meme kanseri hücreleri üzerine parakrin etkisi araştırılacak ve literatürde bulunan eksiklik giderilecektir. Tezin çalışma hedefi meme kanserinde luteolin maddesinin, SASP'la ilişkili parakrin etkilerinin tümörögenез ve mikroçevresindeki potansiyel etkisini araştırmak, aday bir tedavi yaklaşımını ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

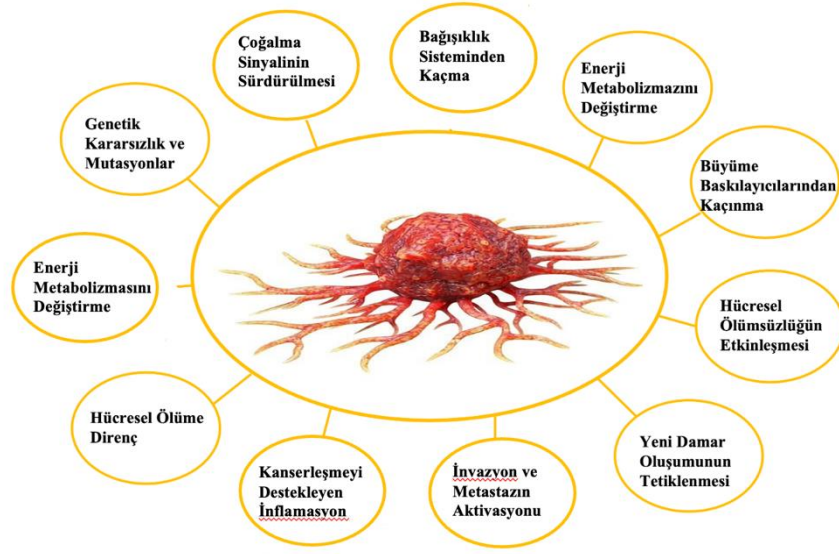
2.1 Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve proliferasyonu ile karakterize edilen bir hastalıktır. Kanserin, artan mortalitesi göz önüne alındığında küresel bir sağlık sorunu haline geldi. 2020' de dünya çapında yaklaşık 18,1 milyon yeni kanser vakası olduğu belirlendi [3]. Çok sık karşılaşılan kanser türleri meme kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanseri, mide kanseri ve prostat kanseridir [30]. Hücrenin anormal büyümesi, ve kontrolsüz proliferasyonu, sıklıkla maligniteye dönüşebilen tümör gelişimiyle sonuçlanır. Normal hücreler aldıkları hayatta kalma taraflı ve karşıtlı sinyallerin dengesini denetleyerek canlılıklarını düzenli olarak değerlendirmektedir. Normal hücrelerde, genotoksik olaylardan kaynaklanan veya replikasyon sırasında oluşan DNA hasarı, DNA tamir edilirken proliferasyonda, hücre döngüsü durmasına yol açmaktadır. Hasarın boyutu tamir edilemezse, hayatta kalım taraflı ve karşıtlı sinyallerin denge pozisyonu bozular, böylelikle programlanmış hücre ölümü (apoptoz) veya otofajiye maruz kalmaktadır. Bu mekanizma tümör oluşumunu engellemede önemli bir bariyerdir [31].

2.2 Kanserin 10 Temel Özelliği

Normal bir hücrenin neoplazmaya dönüşümü karmaşık bir süreçtir. Hanahan ve arkadaşları kanserin 6 temel ayırt edici özelliğini özetlemiştir [32]. Bir kanser hücrenin, tümör mikroçevresi (TME) ve makro çevre arasındaki geri bildirim mekanizması, kanser hücrenin büyüüp gelişmesine ve metastazına yardımcı olan bir tümör destekleyici ortam ve premetastatik niş oluşturur [33]. Son on yılda, kanserin ayırt edici özelliklerini anlamaya yönelik araştırmalarda ilerlemeler kaydedilmiştir. Hanahan ve arkadaşları, apoptozdan bağımsız olarak veya apoptozla birlikte otofaji, kanserin hücre ölümüne direnme özelliğinin bir parçası olarak kabul edilmiştir. Bu

özelliik yeterli tümör gelişimi için kanser hücrelerinin kaçınması gereken bir bariyer olarak önemini vurgulamışlardır [32].



Şekil 2.1 : Kanser'in 10 temel özelliği [31].

2.2.1 Meme kanseri

Dünya genelinde sıklıkla rastlanan kanser türlerinden biri meme kanseridir ve ölüm insidansı yüksektir. Amerika ve Avrupa başta olmak üzere ölüm oranı ikinci sırada yer almaktadır [34]. Meme kanseri hastadan hastaya göre değişiklik gösterdiği için heterojen bir tümördür [35]. Meme kanseri, kırklı ve ellili yaşlardaki kadınlar arasında sık görülen bir durumdur. %20 mortalite oranı ve %30 morbidite oranı vardır. Ayrıca, gelişen insan fizyolojik dengesi ve mevcut beslenme alışkanlıkları nedeniyle kanser insidans oranı her geçen gün daha da artmaktadır [36]. Örneğin, erken regl veya gecikmiş menopoza meme kanseri riskini artırır [37]. Meme kanserinin başlıca yan etkileri halsizlik, iştahsızlık, mide bulantısı, vücut ağrısı ve kilo kaybıdır [38]. Meme dokusunun fiziksel olarak insanın hayatta sağ kalımı için hayati bir tehlikeye sahip organ olmaması hastalarda diğer ölümcül kanserlere kıyasla daha iyi bir sağkalım sürecine sahiptir. Lakin yine de büyük ameliyatların yol açtığı psikolojik rahatsızlıklar ile metastaz veya nüksetmesi sonucu olan ölümler, kadın sağlığını ciddi şekilde tehlikeye atmaktadır. Özellikle son yıllarda hastalıkla mücadelede önemli adımlar atılmıştır. Mastektomi ve kemoterapi, meme kanseri hastalarının sağkalımını büyük ölçüde iyileştirmiştir ve tedavi sonrası psikolojik etkiyi en aza indirmek için artık daha zarif cerrahi prosedürler uygulanmaktadır [39-41].

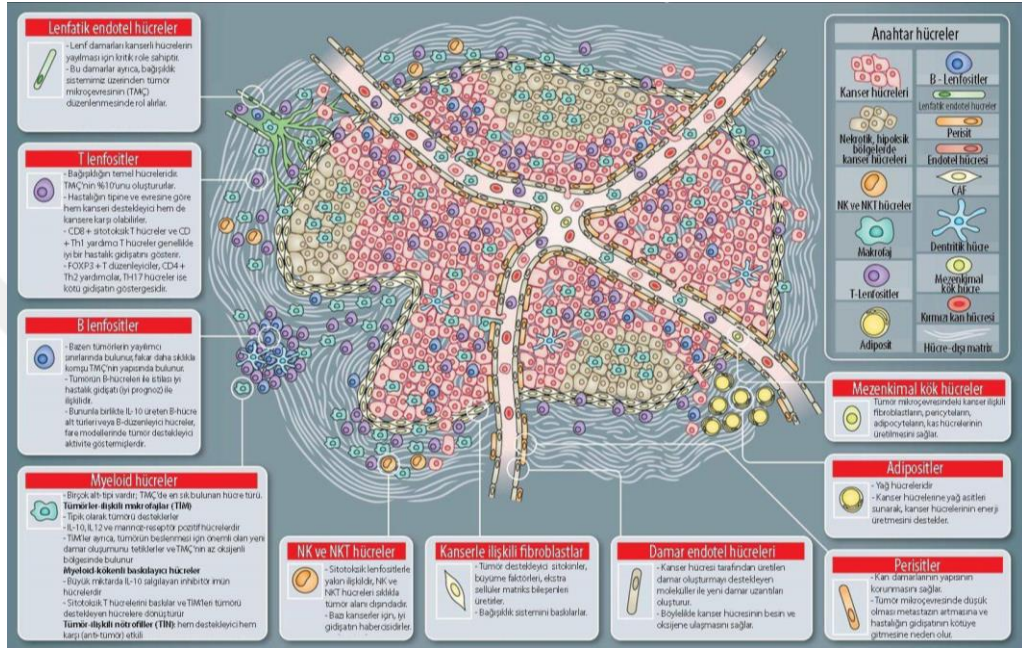
Meme kanseri, meme lobüllerinde, tüplerinde veya bağ dokusunda tümör yapısı oluşturur. Birkaç sınıflandırması mevcuttur ama en temsili meme kanseri türleri, moleküler alt tiplere dayalı olarak dört türe ayrılabilir: lümen A, lümen B, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Her2) pozitif ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC). Bu alt tiplerin farklı bölgelere metastazları, prognozları ve tedavi yöntemleri vardır [42]. Meme kanserine yönelik moleküler hedefleme yaklaşımları açısından, tirozin reseptör kinazı olan Her2'yi hedefleme, Her2-pozitif meme kanseri hastaları için başarılı bir şekilde tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır [43-45]. Her2, meme kanserlerinin %20-25'inde aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir ve bu durum kanser hücresinin agresifliği ile ilişkilendirilir [46-48]. En agresif meme kanseri olan TNBC ise, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve Her2'yi ifade edemez. TNBC, meme kanserlerinin sadece %15-20'sini oluşturur. Bununla birlikte, genellikle tanı anında ileri bir aşamada tanımlanır, bu da yüksek nüks oranı ve düşük sağkalım oranı ile sonuçlanır [49, 50]. Ayrıca TNBC'nin etkili bir hedefe yönelik henüz tedavisi yoktur ve genel beyin, kemikler, akciğerler ve karaciğere metastaz yapar [51]. Metastaz, orijinal bir primer tümörün distal bir sekonder tümöre dönüştüğü çoklu bir süreçtir. Kanser temsili bir özelliğidir ve tedavi başarısızlığına yol açarak birçok hastanın ölümüne neden olur [52]. Bu nedenle, hastanın prognozu metastaz ile yakından ilişkilidir. Metastatik kanser tanısı, çoğu kanser türünde son aşama olarak kabul edilir. Metastaz oldukça karmaşıktır ve primer tümörden bölünme, invazyon, immün gözetimden kaçınma ve doku mikroçevresinin düzenlenmesi gibi çok sayıda hücrel mekanizmayı içerir. Özellikle epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) çoğu kanserde metastaz için gereklidir [53]. SNAIL, TWIST ve çinko parmak E-kutu bağlama (ZEB) dahil olmak üzere pleiotropik transkripsiyon faktörleri, EMT'nin düzenlenmesinde önemli moleküllerdir. Son araştırmalar, GATA3'ün ekspresyon kaybının veya işlev bozukluğunun, ZEB2 tarafından alınan G9A ve metastatik tümör antijeni (MTA) ailesi proteinlerini düzenleyerek meme kanseri metastazını desteklediğini göstermiştir [54]. İnterlökin-6 (IL-6) dahil olmak üzere inflamatuvar sitokinler, meme kanseri metastazında önemli rolü vardır. IL-6, IL6R/gp130 kompleksine bağlanır ve sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon aktivatörlerini 3 (STAT3) etkinleştirmek için Janus kinaz (JAK) sinyallerinin aşağı akışını aktive eder [55]. Buna karşılık, IL-6/STAT3 sinyali, meme kanseri metastazı için gerekli olan östrojen reseptörü α 'yı (ER α) düzenleyerek EMT'yi teşvik eder. Ayrıca, hücre yüzeyi proteinleri meme kanseri metastazında önemli bir rol oynamaktadır [55].

Kanser hücreleri ve hücre yüzeyi arasındaki etkileşimler, metastazı başlatmak için hücre yapışmasına ve invazyonuna aracılık eder [56]. Bağışıklık hücreleri ve tümör mikroçevresi (TME) de meme kanseri metastazına katkıda bulunabilir. Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) çeşitli mikroçevresel sinyallerde farklı roller oynamaktadır. Meme kanserinde, bir makrofaj alt tipi olan M2 (TAM), genellikle CD4+ T hücreleri tarafından salgılanan IL-4 tarafından aktive edilir [57]. Kemokinler, enflamatuar faktörler ve büyüme faktörlerini içeren TAM salgılayan sitokinler, ekstraselüler matris (ECM) yapışmayı artırarak metastaz ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [57]. Bu nedenle, bu bağışıklık hücreleri ve salgılanan faktörler metastatik meme kanserinin tedavisi için hedef olabilir.

2.2.2 Tümör mikroçevresi

Tümör oluşumu ve ilerlemesi süreci, tümör hücrelerindeki genetik/epigenetik değişiklikler ve tümör mikroçevresinin (TME) bileşenlerinin karşılıklı ve dinamik çapraz etkileşim yoluyla yeniden düzenlenmesi olmak üzere iki faktörden etkilenmektedir [58]. TME, tümör hücreleri, stromal fibroblastlar, endotel hücreleri ve mikrogliya, makrofajlar ve lenfositler gibi immün hücreler dahil olmak üzere tümör stromal hücreleri ve kolajen, fibronektin, hiyalüronan, laminin gibi hücre dışı matris bileşenlerinden oluşur [59, 60]. TME'nin kalbi olan tümör hücreleri, malign olmayan hücreleri kendi tarafına kullanmak üzere, karmaşık sinyal ağ yolları aracılığıyla hücreler ve hücreler olmayan bileşenlerin işlevini kontrol eder. Bu tür çapraz bağlantıların sonucu ise tümör oluşumu ve devamlılığının yanı sıra tedaviye yetersiz yanıt ve çoklu ilaç direnci (MDR) olarak yansımaktadır. TME'deki malign olmayan hücrelerin kanser gelişimi ve metastazın tüm aşamalarında tümör oluşumunu desteklediği bilinmektedir [61, 62]. Hücreler arası iletişimin kaynağı sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, enflamatuar araçlar ve matris yeniden şekillendirme enzimlerinden oluşan karmaşık bir ağıdır, ancak artık yeni etkileşim mekanizmaları da ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler), eksozomlar, hücre dışı DNA (cfDNA) ve tümör hücrelerinden türetilen, dokular gibi uzaktaki hedef hücrelere bilgi ileten yatay gen transferi (HGT) araçları olarak apoptotik yapılarda yer almaktadır [63, 64]. Tümör biyolojisindeki son gelişmeler, tümör büyümesi ve metastazın altında yatan farklı mekanizmaları anlamak için tümör hücreleri ve komşu mikro çevreleri arasındaki çoklu değişimlerin kapsamlı bir analizinin gerekli olduğunu göstermiştir [65]. Doku bütünlüğünün kaybı, karsinogenez

ve ilerleme, tümör hücreleri ile ECM ve hücresel bileşenleri arasındaki karşılıklı etkileşimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar [58, 66]. Bu bağlamda, reaktif neoplastik olmayan hücreler, genetik olarak değiştirilmiş tümör hücreleri ve ECM'deki etkileşimler, klonal evrim, kanser heterojenliği, EMT, migrasyon, invazyon, metastaz gelişimi, neovaskülarizasyon, apoptoz ve kemoterapötik ilaç direnci dahil olmak üzere tümör oluşum aşamalarının çoğunu etkili bir şekilde kontrol eder [67-70].



Şekil 2.2 : Tümör mikroçevresi [64].

Tümör mikroçevresinde çok sayıda bağışıklık hücresi bulunmaktadır. İmmün hücreleri-tümör hücreleri arasındaki etkileşim ve immün hücreleri- immün hücreleri arasındaki etkileşim, tümör mikroçevresi ve hücre yüzeyi immün kontrol noktaları tarafından düzenlenir. Tümör kök hücreleri (CSC'ler) tümör büyümesini yönlendirir ve tümörlerin içsel heterojenliğini etkiler [54]. Mast hücreleri (MC), tümörigenez sırasında tümörlerin yakınında toplanır ve çeşitli sitokinleri, kemokinleri salgılar [71]. Doğal öldürücü hücreler (NK), sitotoksiktir ayrıca tümör hücrelerini öldürmek için tümör nekroz faktörü ve perforin salgılar [72]. Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), tümör hücrelerinin etrafına sıızan makrofajlardır ve temel olarak iki kategoriye ayrılır: klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar (M1 tipi) ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar (M2 tipi). M2 tipi makrofajlar, tümörlerin immün sistemden kaçmasını teşvik edebilir [73]. Dendritik hücreler (DC), antijen sunan hücrelerdir ve immün yanıtları indükleyebilir ancak TME'de genellikle işlevsiz ve apoptoza neden olmaz [74]. Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC) immüno-supresif etkilere sahiptir,

immünoterapiyi engelleyebilir ve tümörün korunması ve ilerlemesinde rol oynar [75]. T hücrelerinin bir alt popülasyonu olan düzenleyici T hücrelerinin de (Treg), bağışıklık sisteminin baskılanmasında rolü vardır. Treg, T hücresi indüksiyonunu ve proliferasyonunu azaltabilir ve TME'deki çok sayıda Treg genellikle kötü prognozu öngörür [76]. Normal fibroblastlar, TME'de kanserle ilişkili fibroblastlara (CAF) aktive olabilir ve CAF'ler tümör hücreleri için elverişli bir mikroçevre sağlayarak tümör büyümesini ve metastazı teşvik edebilir [77].

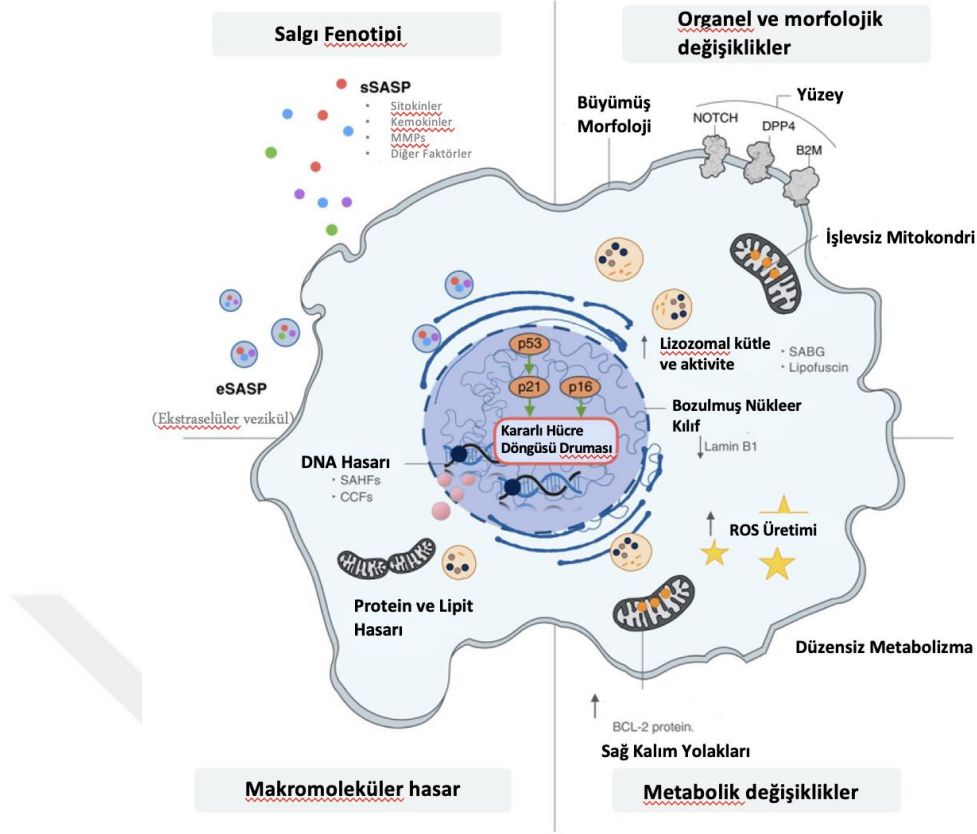
2.3 Hücresel Yaşlanma

Yaşlılık terimi etimolojik olarak Latince yaşlı anlamına gelen “senex” kelimesinden türemiştir. 1961 yılında Hayflick ve Moorhead “yaşlanma” terimini ilk olarak, embriyonik dokulardan türetilen kültürde seri pasajlamalardan sonra insan diploid hücre suşlarının geri dönüşü olmayan büyüme durması olgusunu tanımlamak için kullanmıştır [78]. Daha sonra, bu özel yaşlanma türü (replikatif yaşlanma), kromozomal instabiliteye yol açan ve tümörigenezi destekleyen bir süreç olan telomer yıpranmasıyla nedensel olarak ilişkilendirilmiş ve yaşlanmanın hasarlı hücrelerin sınırsız büyümesine karşı koruma sağladığı yönündeki orijinal hipotezi desteklemiştir [79]. Daha sonraki çalışmalar, kansere karşı bir koruma olarak hücresel yaşlanmanın önemini pekiştirmiştir [80]. Ortaya çıkan kanıtlar, hücresel yaşlanmanın fizyolojik öneminin tümör baskılamanın ötesinde embriyonik gelişim [81-83], yara iyileşmesi [84], doku onarımı [85] ve organizmanın yaşlanması [86, 87] gibi biyolojik süreçlere kadar uzandığını göstermektedir. Günümüzde hücresel yaşlanma terimi genellikle hücre morfolojisi, salgı profili ve epigenetik değişikliklerle ilişkili geri dönüşü olmayan bir hücre döngüsü durmasını ifade etmek için kullanılmaktadır [88, 89]. Hücrelerin sürekli olarak çoğalmaya (çoğalmaya) teşvik edildiği uzun süreli birincil hücre kültürleri bağlamında, bir hücre kültürünün ulaşabileceği maksimum nüfus ikiye katlanma sayısı "Hayflick limiti" olarak adlandırılır, bunu izleyen geri dönüşü olmayan hücre döngüsü durması ve bu tüm süreç "replikatif yaşlanma" olarak adlandırılır [90].

Hücresel yaşlanma, yanıt verdiği farklı uyaranlara ve hücresel bağlamlara bağlı olarak değişen çok heterojen bir programdır. Hücresel yaşlanma, onkojenik aktivasyon, oksidatif ve genotoksik stres, mitokondriyal disfonksiyon, ışınlama veya kemoterapötik ajanlar dahil olmak üzere çok çeşitli içsel ve dışsal hasarlarla

indüklenebilen bir stres tepkisidir. Yaşlanmaya maruz kalan hücreler mitojenler tarafından uyarılsalar bile bölünemezler, ancak metabolik ve sentetik olarak aktif kalırlar ve morfolojide genişlemiş ve düzleşmiş hücre şekli ve artmış granülarite gibi karakteristik değişiklikler gösterirler [91]. Yaşlanan hücrelere önemli ölçüde özgülüğü olan ve en yaygın kullanılan belirteç, pH 6.0'da X-gal boyama ile tespit edilebilen SA- β -gal'dir [92]. SA- β -gal, yaşlanan hücrelerin artmış lizozomal kütlelerini yansıtır gibi görünmektedir [93]. Yaşlanan hücreler ayrıca komşu hücrelerin büyümesini ve doku organizasyonunu etkileyen birçok ECM bileşeni ve salgılanan faktör üretir. Özellikle, yaşlanan hücreler tarafından üretilen parakrin faktörler, in vitro ve in vivo olarak tümör hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması üzerinde önemli etkilere sahiptir [94, 95]. Bu nedenle, yaşlanma sadece bir hücrenin yaşam döngüsündeki bir son nokta olarak değil, çok hücreli bir organizmanın homeostatik programları tarafından belirlenen fizyolojik bir durum olarak görülmelidir.

Yaşlanan hücreler genellikle stres kaynaklı sinyal iletim aşamalarının bir sonucu olarak düzleşmiş, genişlemiş ve değiştirilmiş sitoplazmik bileşimlerle anormal morfolojiler de dahil olmak üzere bazı yapısal değişiklikler edinir. Bununla birlikte, yaşlanan hücrelerin bazı özellikleri (örneğin, hücre döngüsünden kararlı bir şekilde çekilme ve spesifik morfolojik değişiklikler) hücreler arası durumlarla paylaşılır. Uluslararası Hücre Yaşlanma Derneği, aşağıdaki dört özelliğe dayalı olarak yaşlanma fenotiplerinin tanımlayıcı özelliklerine ilişkin bir fikir birliği seti önermiştir: (a) hücre döngüsünün geri çekilmesi; (b) makromoleküler hasar; (c) salgı fenotipi ve (d) düzensiz metabolizma [89] (Şekil 2.3). Bunlar farklı hücreler arası özellikler olmakla birlikte, karmaşık etkileşimlere ve karşılıklı bağımlılığa sahiptirler.



Şekil 2.3 : Hücresel Yaşlanmanın Ayırt Edici Özellikleri.

Hücre Döngüsünden Çekilme: Memelilerin hücre döngüsü ilerlemesi, doğru faz geçişini sağlayan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) tarafından yönlendirilir. Siklin D/CDK4-6 kompleksleri hücre döngüsünün G1'e ilerlemesini teşvik eder, bunu G1/S faz geçişini ortaya çıkaran siklin E/CDK2 kompleksleri izler; S fazına ilerleme ve ardından S/G2 fazına geçiş yetkisini de siklin A/CDK2 kompleksi gerektirir ve siklin B/CDK1 G2/M faz geçişini kolaylaştırır [96, 97]. Siklin/CDK'ların aktivitesinin çeşitli CDK inhibitörleri (CKI'ler) tarafından dikkatli bir şekilde modüle edilmesi, hücre durgunluk ve yaşlanmada olduğu gibi, hücre döngüsünün sonuca bağlı olarak etkili bir şekilde kontrol edilmesini sağlar [98]. Artan p27KIP1 seviyeleri, durgun hücrelerde G0'da hücre döngüsünün durmasına aracılık ederken [99, 100], mitojenik uyarım üzerine p27KIP1 seviyelerindeki düşüş olması bu durmayı tersine çevirir ve hücre döngüsüne yeniden girmesine yol açar [101]. Buna karşın, p21WAF1/CIP1 (CDKN1A) ve p16INK4A'nın (CDKN2A) yukarı regülasyonu genellikle hücre proliferasyonunu durdurarak hücre yaşlanmaya yol açar. p21WAF1/CIP1 ve p16INK4A birikimi ilk olarak retinoblastoma proteininin (RB) hipo-fosforilasyonuna yol açar, ardından nükleotid metabolizması ve DNA sentezinde

yer alan E2F genlerinin transaktivasyonunu inhibe ederek [102, 103] kararlı bir hücre döngüsü durmasına neden olur [104].

Makromoleküler Hasar: DNA ve protein hasarı gibi makromoleküler hasarın önemli ölçüde birikmesi, hücre yaşlanmayı hücre farklılaşmasından ayıran bir diğer ayırt edici özelliktir. Ardışık hücre bölünmeleri nedeniyle ilerleyen telomer kısalması, sonunda DNA hasarı yanıtı (DDR) mekanizması tarafından DNA hasarı olarak tanınır ve işlenir. Çözülmeden bırakıldığında, bu hücre yaşlanmayı indükler [105]. Onkogen kaynaklı stres (OIS) durumunda, onkogen kaynaklı hiperproliferasyon, replikasyon çatallarının çarpışmasına ve ardından çökmesine yol açarak DNA çift iplik kırıkları (DSB'ler) oluşturur [106, 107] ve yaşlanmanın indüklenmesine yol açar. Yaşlanan hücreler metabolik olarak aktiftir ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi, telomerik G-zengin tekrarlarında oksidatif DNA hasarına katkıda bulunarak DDR yanıtının bir parçası olan telomer disfonksiyonu ile indüklenen odaklar (TIF'ler) oluşturur [108-110]. DDR süreçleri H2AX (γ H2AX) ve H3K9me3 histonlarının fosforilasyonuna yol açarak DNA onarım mekanizmalarının veya DDR sinyalizasyon kaskadında yer alan proteinlerin bağlanmasını ve bir araya gelmesini kolaylaştırır. Bu modifikasyonların tespiti, DNA hasarına bağlı yaşlanmayı tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır [111, 112].

Salgı Fenotipi: SASP, yaşlanma fenotiplerinin güçlendirilmesi ve yayılmasında önemli bir rol oynar [113], doku homeostazına katkıda bulunur [114]. Bununla birlikte, uyarının şekline, spesifik hücre tiplerine ve yaşlanan hücrelerin dokularda kalıp kalmadığına bağlı olarak zararlı etkileri de olabilir [115]. SASP çeşitli pro-enflamatuar sitokinlerden, kemokinlerden, büyüme faktörlerinden ve matris metaloproteinazlardan (MMPs) oluşur ve hücre-otonom (otokrin) veya hücre-otonom olmayan (parakrin) şekillerde işlev görebilir, bağlama bağlı olarak belirli fizyolojik veya patolojik etkiler gösterebilir [17, 116]. SASP'nin düzenlenmesi, aktif B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir arttırıcısı (NF- κ B) [117], CCAAT/ arttırıcı bağlayıcı protein beta (C/EBP β) [118], rapamisininin memeli hedefi (mTOR) [119, 120] ve NOTCH1 [121] dahil olmak üzere farklı etkenleri içeren karmaşık bir süreçtir. Sitoplazmik kromatin fragmanları (CCF'ler), pro-enflamatuar yanıtların ve SASP düzenlemesinin yönlendirilmesine katılan, doğuştan gelen bağışıklığa önemli bir katkıda bulunan interferon genlerinin, sitozolik DNA algılayıcı GMP-AMP sentaz uyarıcısı (cGAS-STING) yolunu da aktive eder [122, 123]. Yaşlanmayla ilişkili belirtecin yüksek

hareketlilik grubu kutusu 1 (HMGB1) proteini de SASP düzenlemesine dahil edilmiştir. HMGB1, p53'e bağımlı bir şekilde yaşlanan hücrelerin çekirdeğinden hücre dışı ortama ihraç edilir. HMGB1'in yok edilmesi, kanonik SASP faktörü interlökin-6'nın (IL-6) salgılanmasını zayıflatır [122].

Düzensiz Metabolizma: Yaşlanan sekretomun üretimi oldukça enerji gerektirir ve yaşlanan hücreler ATP ihtiyaçlarını karşılamak için büyük ölçüde artmış mitokondriyal metabolizmaya ve glikolize güvenirler [124]. Onkogen BRAFV600E ile indüklenen yaşlanan hücreler, mitokondriyal denetçi piruvat dehidrojenaza (PDH) bağımlı metabolik yeni bir programlamaya tabi tutulur. Bu süreçte PDH inhibitör enzim piruvat dehidrojenaz kinaz 1'in (PDK1) eş zamanlı olarak baskılanması ve trikarboksilik asit döngüsünde piruvat kullanımını teşvik etmek için PDH aktive edici enzim piruvat dehidrojenaz fosfataz 2'nin (PDP2) üretiminde bir artış eşlik ederek, yaşlanan hücrelerin daha yüksek enerji gereksinimlerini karşılamalarına yardımcı olunur[125]. Bozulmuş mitokondriyal metabolizma ve buna eşlik eden proteotoksik stres durumu göz önüne alındığında, yaşlanan hücrelerin anabolizma ve katabolizma arasındaki dengeyi korumaları çok önemlidir. Bunu, Golgi organelinin trans tarafında bulunan TOR-otofaji uzamsal bağlanma kompartmanı olarak bilinen farklı bir hücresel bölmede mTOR'u otolizozomlara bağlayan bir süreçle yaparlar [126]. Günümüzde artmış lizozomal β -galaktosidaz aktivitesi gösteren yüksek sayıda lizozom, yaşlanmanın tespiti için en yaygın ve yoğun olarak kullanılan belirteçtir. Bu, β -galaktosidaz aktivitesinin kısıtlayıcı bir pH'da (pH 6) kromojenik bir reaktif kullanılarak değerlendirilebildiği (hem in vitro hem de in vivo) yaşlanmayla ilişkili β -galaktosidaz (SA β G) deneyi kullanılarak tespit edilebilir [92]. Yaşlanan hücrelerdeki lizozomlar ayrıca lizozomal sindirimin çözünmeyen lipid içeren agregatlarından oluşan daha yüksek lipofusin seviyelerine sahiptir. Boyalar kullanılarak bu agregatlar da yaşlanmanın bir göstergesi olarak görselleştirilebilir [127].

Hücresel yaşlanma temel olarak üç tipte sınıflandırılır. Birinci hücre yaşlanması türü, telomer yıpranması ve erken aşamada p53/p21 yolunun aktivasyonu olarak ortaya çıkan replikatif yaşlanmadır (RS) [128, 129]. İkinci hücre yaşlanma türü, oksidatif stres ve ultraviyole ışınları gibi çeşitli stres faktörleri tarafından indüklenen stres kaynaklı erken yaşlanma meydana gelmesidir (SIPS) [57, 77, 130, 131]. Üçüncü hücre yaşlanma türü ise onkogen kaynaklı yaşlanma (OIS) olup belirli onkogenlerin, özellikle de ras geninin aşırı aktivasyonu ile tetiklenmesidir [132-134]. Genel olarak,

SIPS ve OIS önemli bir telomer yıpranmasına sahip değildir, ancak p16/p38 yolağının aktivasyonunda telomer yıpranması ortaya çıkmaktadır [135, 136].

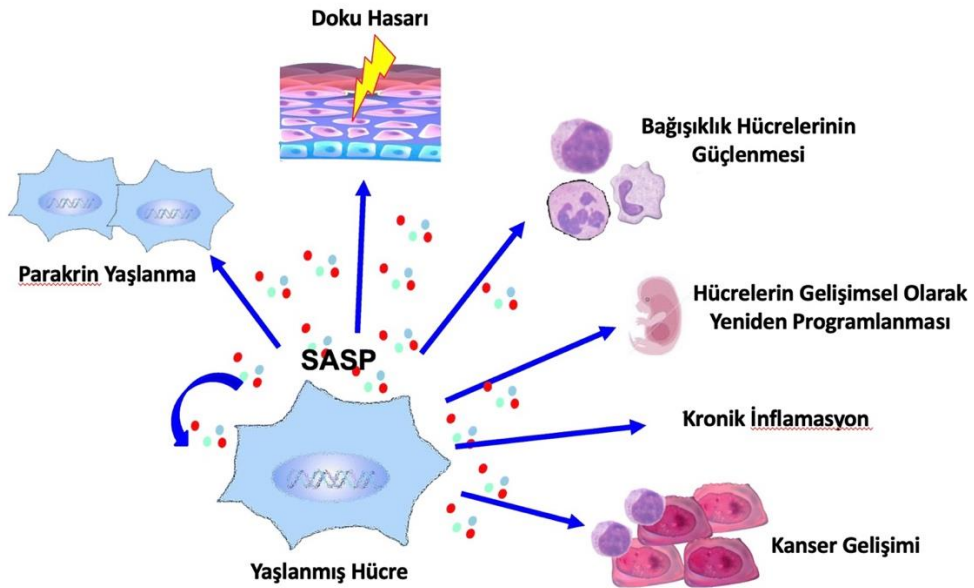
2.3.1 Hücresel yaşlanma ve fibroblast arasındaki bağlantı

Fibroblastlar doku homeostazında, kanser progresyonunda, inflamasyonda ve fibroziste kritik bir rol oynar. Fibroblastlar ECM'nin çoğunu sentezler ve kanser hücrelerinin ve normal epitel hücrelerinin büyümesini etkileyen parakrin büyüme faktörlerini salgılar [137]. Tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olan kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), tedavi direnci ve tümör modülasyonunda rol oynayan kalıcı olarak aktive olmuş fibroblastlardır [138, 139]. İnsan göğüs stromal fibroblastlarında erken yaşlanmayı indüklemek için iyonlaştırıcı radyasyon kullanan bir in vitro çalışma, bu erken yaşlanan fibroblastların, meme kanseri için olumsuz prognostik faktörleri artıran küçük lösin açısından zengin proteoglikan decorin'in aşağı regüle edilmiş bir ekspresyonuna sahip olduğunu bulmuştur [140]. Farklı hücre tipleri, yaşlanmaya neden olan maddelere farklı tepki verir. Aynı koşullar altında, meme lümen hücreleri H₂O₂ veya gama ışınları tarafından indüklenen erken yaşlanmaya komşu stromadaki fibroblastlardan daha duyarlıdır. Yaşlanmış lümen hücreleri (SLC'ler), meme stromal fibroblastlarını birincil olarak IL-8'in aracılık ettiği parakrin bir şekilde JAK2/STAT3 yolu aracılığıyla aktive eder. Aktive edilmiş fibroblastlar, hem in vivo hem de in vitro olarak meme kanseri hücrelerinde EMT'yi ve gövdeyi geliştirebilir [141].

Kültürde yaşlanan fibroblastlarda, in vivo epitel hücrelerinde ve DNA'ya zarar veren terapötik ajanlara maruz kalan tümör hücrelerinde gelişen genotoksik strese karşı oldukça korunmuş yanıtı yaşlanmayla ilişkili salgı fenotipi (SASP) neden olmaktadır [14]. Yaşlanan hücreler gen ifadesinde kapsamlı değişikliklere uğrar [142], bu değişiklikler sadece hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan genlerle sınırlı kalmaz, aynı zamanda salgılanan proteinlerin bir spektrumunun artan ifadesini de içerir [113, 143]. Spesifik olarak, yaşlanan hücrelerin parakrin tümör uyarıcı etkileri olan bir dizi pro-inflamatuar kemokin ve sitokin salgıladığı bildirilmiştir [113] ve bu durum genç kanserden kurtulana bile metastatik ilerlemeye ve yaşa bağlı hastalıklara katkıda bulunmaktadır [14]. Bununla birlikte, kemoterapi tarafından indüklenen SASP'nin hücre-otonom olmayan etkilerinin yanı sıra tümör mikroçevresi üzerindeki hücre-otonom etkileri tam olarak aydınlatılmayı beklemektedir.

2.4 Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipi (SASP)

Hücrel yaşlanma, bir salgı fenotipinin gelişmesi yoluyla doku mikroçevresini etkiler. Hücrel yaşlanmaya; çeşitli salgılanan proteinler, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar üreten farklı bir salgı fenotipi olan SASP eşlik eder [113, 144]. SASP faktörleri otokrin ve parakrin olmak üzere iki farklı şekilde etki eder [12]. Otokrin bir şekilde, SASP faktörleri yaşlanan hücrelerin hücrel yaşlanmasını yeniden güçlendirir. Ayrıca SASP, parakrin bir şekilde hareket ederek çevredeki hücrelerin yaşlanmasını indükleyebilir ve bu parakrin yaşlanma olarak adlandırılır [145]. SASP faktörleri olarak yaşlanan hücrelerden salınan kemokinlerin, yaşlanan hücreleri temizleyebilen NK hücreleri ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir [85]. Son zamanlarda, memelilerde organ gelişimi sırasında yaşlanan hücrelerin geçici olarak ortaya çıktığı ve SASP faktörlerinin çevredeki hücrelerin farklılaşmasına ve gelişim sırasında gereksiz hücrelerin uzaklaştırılmasına katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Dolayısıyla, SASP faktörleri hücre kaderini yeniden programlama yeteneğine de sahiptir [82, 83].



Şekil 2.4 : SASP Faktörlerinin Hücelere Etkisi [146].

2.4.1 Yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipinin (SASP) etki mekanizması

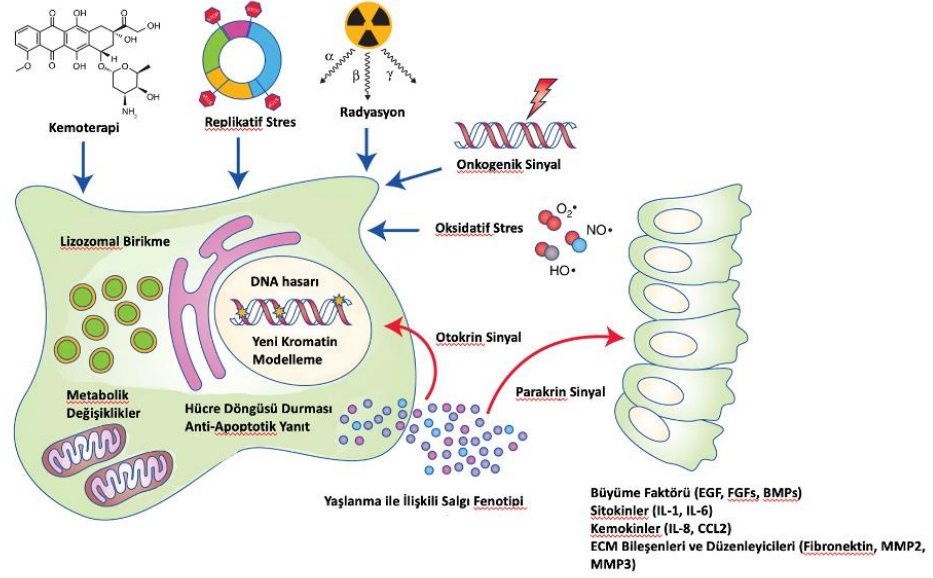
Yaşlanan hücreler hücre döngüsüne yeniden girmek için mitotik uyarılara yanıt vermezler [78]. Hasarlı veya stres altındaki hücreler, durmuş halde iken tümör oluşturmak üzere bölünemezler; dolayısıyla hücrel yaşlanma tümör baskılayıcıdır

[133]. Bu fikiri destekleyecek şekilde, çeşitli kanserlerde mutasyona uğrayan veya inaktive olan birçok tümör baskılayıcı da TP53, CDKN2A (p16'yı kodlayan) ve RB dahil olmak üzere doğrudan yaşlanma programında yer almaktadır [91, 147].

Bu tümör baskılayıcı yollar, aksi takdirde normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünü teşvik edebilecek stresler tarafından aktive edilir. Bu streslerden bazıları telomer kısalması, DNA hasarı ve mutant Ras'ın neden olduğu gibi uygunsuz onkojenik sinyalleri içerir [148]. Tümör baskılanması yaşlanmanın birincil işlevi gibi görünse de, yaşlanan hücrelerin birikimi yaşlanma fenotiplerine katkıda bulunabilir [149]. Yaşlı bireylerde, yaşlanmış hücrelerin varlığında ve yaşa bağlı hastalıklarda bir artış vardır [150]. Fare modellerinde yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılması bazı yaşlanma fenotiplerini iyileştirebilir [87, 151].

Normal hücrelere benzer şekilde, birçok kanser hücresi kemoterapi veya radyasyon tedavilerinin neden olduğu DNA hasarı gibi streslere maruz kaldıktan sonra yaşlanma benzeri bir duraklama geçirme yeteneğini korur [152, 153]. Kalıcı olarak tutuklanan bir kanser hücresi varsayımsal olarak artık nüksetme tehdidi oluşturmazken, aslında yaşlanmaya uğrayabilen tümörler genellikle hücre ölümüne uğrayanlardan daha erken nüksetmektedir [147].

Yaşlanma strese karşı bir yanıt olarak etki eder, kemoterapötik, radyasyon ve oksidatif stres gibi çeşitli uyarıcılar tanımlanmıştır (Şekil 2.5). Yaşlanma mekanizmasının aktivasyonu, proliferasyonun durması, kromatinin yeniden şekillenmesi, hücre döngüsü inhibitörlerinin (p16INK4A veya p21CIP1 gibi) artan ekspresyonu, DNA hasar yanıtının aktivasyonu, lizozomal kompartmanın büyümesi ve yaşlanmayla ilişkili salgı fenotipinin (SASP) aktivasyonu gibi hücrel ve moleküler değişikliklere yol açar [88, 154]. SASP, sitokinler ve kemokinler (örneğin IL1 α , IL1 β , IL6, IL8, CXCL1, CXCL2), büyüme faktörleri (örneğin amphiregulin, EGF, BMP'ler, FGF'ler, VEGF, WNT'ler) dahil olmak üzere sayısız faktörün salgılanması yoluyla yaşlanan hücrelerin parakrin faaliyetlerine aracılık eder. SASP yanıtının kompozisyonu ve yoğunluğu, senesens indükleyici mekanizma, hücre tipi ve senesensin başlamasından bu yana geçen süre gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir ve bu da SASP'nin tek olmadığını gösterir [12, 155-157].



Şekil 2.5 : Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipi Aktivasyon Mekanizması[23].

SASP, doku onarımını teşvik etmesi [85, 114], embriyonik yapıların gelişimine ilişkin hassas düzenleyici etki etmesi [82, 83, 158], ve bağışıklık sistemini uyarması gibi bazı fizyolojik süreçlerde yer almaktadır [145, 159]. Bununla birlikte, yaşlanan hücrelerin etkisiz bir şekilde ortadan kaldırılması, dokularda aşırı birikiminden kaynaklanan zararlı sonuçlar, yaşa bağlı hastalıkları ve kanseri teşvik edebilir [8, 95, 144, 160, 161]. Bu bağlamda dokulardaki yaşlanan hücrelerin etkisi farelerde, primatlarda ve insanlarda yaşla birlikte önemli ölçüde artmaktadır[8] ve bu hücreler hem benign hem de malign tümörlerde bulunabilmektedir. [162-164] Ayrıca farede yaşlanan hücrelerin genetik veya kimyasal olarak yok edilmesi, kanser de dahil olmak üzere yaşa bağlı hastalıkların başlangıcını geciktirmekte, yaşam süresinin uzamasına yol açmakta ve yaşamın son dönemlerinde doku gençleşmesini teşvik etmektedir[151, 165].

2.4.2 Yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipinin (SASP) parakrin etkisi

SASP faktörlerinin çoğu salgılandığında, otokrin ve parakrin bir şekilde hareket edebilirler. Örneğin, insan fibroblastlarında replikatif yaşlanmanın indüklenmesi üzerine, SASP faktörleri IL-1 α , IL-6, CXCL1 ve CXCL2'nin salgılanması, NF- κ B yolunun otokrin veya parakrin bir şekilde sürekli aktivasyonu yoluyla yaşlanmayı desteklemek için pozitif geri bildirim döngüsünde hareket edebilir[17, 144, 166]. Bleomisin ile muamele edilerek yaşlanmaya teşvik edilen fibroblastlarda, yüzeye bağlı IL-1 α 'nın ekspresyonu, otokrin bir şekilde yaşlanmayı desteklemiştir [166]. IL-1 α 'nın

hücrelerinin interferon γ ve tümör nekroz faktörü (TNF) salgılayarak, pankreas ve meme kanseri hücrelerinde yaşlanmaya yol açtığı gösterilmiştir [171]. Dolayısıyla, çeşitli hücre tipleri ve SASP faktörleri komşu hücrelerde yaşlanmayı ve SASP'yi indükleyebilir dolayısıyla tümörün baskılanmasına yol açabilir. Parakrin sinyalleşmenin ve yaşlanmanın indüklenmesinin bir başka avantajı da, birçok SASP faktörünün yapısı gereği enflamatuvar olması nedeniyle, yaşlanma sinyalinin artmasına ve bağışıklık sistemini, temizlenmesi gereken işlevsiz hücrelerin varlığı konusunda uyarması olabilir.

2.5 Flavonoidler

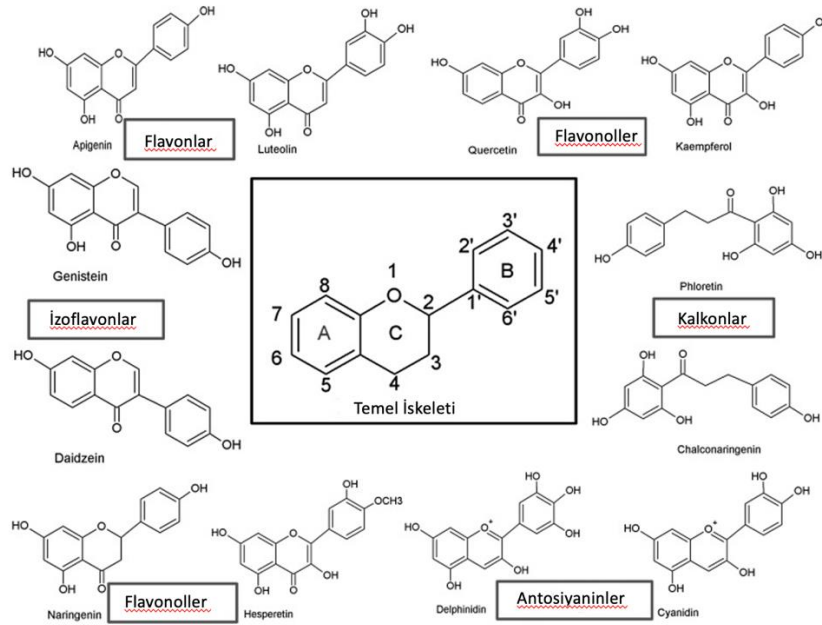
Flavonoidler önemli bir doğal ürün sınıfıdır; özellikle meyve, sebze ve bazı içeceklerde yaygın olarak bulunan polifenolik yapıya sahip bir bitki ikincil metabolitleri sınıfına aittirler. Kanser, Alzheimer hastalığı (AD), ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili çeşitli olumlu biyokimyasal ve antioksidan etkilere sahiptirler. Flavonoidlerin, insan sağlığını düzenleyici etkileri olduğu gözlemlenmiş ve çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda sıklıkla bir bileşendir. Bunun nedeni antioksidatif, anti-inflamatuvar, anti-mutajenik ve anti-kanserojenik özelliklerinin yanı sıra temel hücresel enzim fonksiyonlarını modüle etme kapasiteleridir. Ayrıca ksantin oksidaz (XO), siklo-oksijenaz (COX), lipoksijenaz ve fosfoinozid 3-kinaz gibi çeşitli enzimler için güçlü inhibitörler oldukları bilinmektedir [172-174].

Doğada flavonoid bileşikler bitkilerden elde edilen ürünlerdir ve bitkinin çeşitli kısımlarında bulunurlar. Flavonoidler sebzeler tarafından büyümeleri ve plak oluşumuna karşı savunmaları için kullanılır [174]. Bitkiler aleminde yaygın olarak dağılmış olan, düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerin bir sınıfına aittirler. Birçok flavonoid, çoğu angiosperm familyasında çiçek pigmentleri olarak kolayca tanınır. Ayrıca oluşumları çiçeklerle sınırlı değildir, bitkilerin tüm kısımlarında bulunurlar [175]. Flavonoidler ayrıca meyve, sebze, çay, kakao ve şarap gibi bitki kökenli yiyecek ve içeceklerde de bol miktarda bulunur; bu nedenle diyet flavonoidleri olarak adlandırılırlar. Flavonoidler, kalkonlar, flavonlar, flavonoller ve izoflavonları içeren çeşitli alt gruplara sahiptir. Bu alt grupların kendine özgü temel kaynakları vardır. Örneğin, soğan ve çay, flavonol ve flavonların başlıca diyet kaynaklarıdır.

Flavonoidler bitkilerde, hayvanlarda ve bakterilerde çeşitli biyolojik faaliyetlerde bulunur [176]. Flavonoidler bitkileri farklı biyotik ve abiyotik streslerden korur [177], sinyal molekülleri, allopatik bileşikler, fitoaleksinler, detoksifiye edici ajanlar ve antimikrobiyal savunma bileşikleri olarak işlev görür. Flavonoidler dona karşı dayanıklılık, kuraklığa karşı direnç ve bitkinin ısıya alışması ve donmaya karşı toleransında işlevsel bir rol oynayabilir [178]. İnsan sağlığı üzerine yapılan araştırmalarda ise, flavonoidlerin moleküler işlevlerinin, hastalığın aktivitesinin modüle edilmesi, antibiyotik direncinin azaltılması ve iltihaplanmanın azaltılması dahil olmak üzere birçok sağlık yararı sağlayabileceği öne sürülmüştür [179]. Bu tür araştırmaların bir konusu da flavonoidlerin kanser oluşumu riski üzerindeki potansiyel etkisidir.

2.5.1 Flavonoidlerin sınıflandırılması

Tüm flavonoidler, bir heterosiklik piran halkası (C) ile birbirine bağlanan iki aromatik halka (A ve B) oluşturan 15 karbonlu fenilpropanoid zincir (C₆-C₃-C₆ sistemi) olan temel flavan iskeletine sahiptir (Şekil 2.7). Kimyasal yapılarına, oksidasyon derecelerine ve zincir doymamışlığına bağlı olarak flavonoidler 6 ana grupta sınıflandırılabilir: izoflavonoidler, flavanonlar, flavanoller, flavonoller, flavonlar ve antosiyanidinler [180, 181].



Şekil 2.7 : Flavonoidlerin Sınıflandırması [179].

Flavonlar: Flavonlar, flavonoidlerin önemli alt gruplarından biridir. Flavonlar yapraklarda, çiçeklerde ve meyvelerde glukozitler halinde yaygın olarak bulunur. Kereviz, maydanoz, kırmızı biber, papatya, nane ve karahindiba başlıca flavon kaynakları arasındadır. Luteolin, apigenin ve tangeritin flavonoidlerin bu alt sınıfına aittir. Bu flavonların 2. ve 3. pozisyonları arasında bir çift bağ ve C halkasının 4. pozisyonunda bir keton bulunur. Sebze ve meyvelerdeki flavonların çoğunda A halkasının 5. pozisyonunda bir hidroksil grubu bulunurken, diğer pozisyonlardaki hidroksilasyon, çoğunlukla A halkasının 7. pozisyonunda veya B halkasının 3' ve 4' pozisyonlarında, belirli sebze veya meyvenin taksonomik sınıflandırmasına göre değişebilir [179].

Flavonoller: Keton grubuna sahip flavonoidlerdir. Proantosiyeninlerin yapı taşlarıdır. Flavonoller çeşitli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur. En çok çalışılan flavonoller kaempferol, kuersetin, mirisetin ve fisetindir. Soğan, lahana, marul, domates, elma, üzüm ve çilek zengin flavonol kaynaklarıdır. Meyve ve sebzelerin yanı sıra çay ve kırmızı şarap da flavonol kaynağıdır. Flavonol alımının, antioksidan potansiyeli ve vasküler hastalık riskini azalttığına dair çalışmalarda sağlığa yararlı olduğu bulunmuştur. Flavonlarla karşılaştırıldığında, flavonoller C halkasının 3. pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahiptir ve bu grup da glikozillenmiş olabilir. Flavonlar gibi flavonoller de metilasyon ve hidroksilasyon modellerinde çok çeşitlidir ve farklı glikosilasyon modelleri göz önüne alındığında, belki de meyve ve sebzelerdeki en yaygın ve en büyük flavonoid alt grubudur [179].

Flavanonlar: Genellikle portakal, limon ve üzüm gibi tüm turuncgillerde bulunan bir diğer önemli sınıftır. Hesperitin, naringenin ve eriodictyol bu flavonoid sınıfının örnekleridir. Flavanonlar, serbest radikal tutucu özellikleri nedeniyle yararlıdır. Bu bileşikler, turuncgillerin suyunun ve kabuğunun acı tadından sorumludur. Narenciye flavonoidleri antioksidan, anti-enflamatuar, kan lipit düşürücü ve kolesterol düşürücü ajanlar olarak ilginç farmakolojik etkiler gösterir. Dihidroflavanonlar olarak da adlandırılan flavanonların C halkası doymuştur; bu nedenle flavonlardan farklı olarak 2. ve 3. pozisyonlar arasındaki çift bağ doymuştur. Son 15 yılda flavanonların sayısı önemli ölçüde artmıştır [182].

İzoflavonoidler: Flavonoidlerin büyük ve çok farklı bir alt grubudur. İzoflavonoidler bitkiler aleminde sadece sınırlı bir dağılıma sahiptir ve ağırlıklı olarak soya fasulyesi, diğer baklagil bitkilerinde bulunur. Bazı izoflavonoidlerin mikroplarda da bulunduğu

bildirilmiştir [183]. Ayrıca bitki mikrop etkileşimleri sırasında fitoaleksinlerin gelişimi için öncü olarak önemli bir rol oynadıkları bulunmuştur [180]. İzoflavonoidler bir grup hastalıkla savaşmak için etkili bir potansiyel göstermektedir. Genistein ve daidzein gibi izoflavonlar, belirli hayvan modellerinde östrojenik aktiviteleri nedeniyle yaygın olarak fito-östrojenler olarak kabul edilmektedir. Szkudelska & Nogowski, genisteinin, hormonal ve metabolik değişikliklere yol açarak çeşitli hastalık yollarını etkileyebilme etkisi olduğunu göstermiştir [184].

Kalkonlar: Flavonoidlerin bir alt sınıfıdır. Temel flavonoid iskelet yapısının 'C halkasının' bulunmaması ile karakterize edilirler. Bu nedenle, açık zincirli flavonoidler olarak da adlandırılabilirler. Kalkonların başlıca örnekleri arasında phloridzin, arbutin, phloretin ve chalconaringenin bulunur [181]. Kalkonlar domates, armut, çilek, ayı üzümü ve bazı buğday ürünlerinde önemli miktarlarda bulunur. Kalkonlar ve türevleri, sayısız besinsel ve biyolojik faydaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Gıda kaynakları yoluyla flavonoid alımı, hastalıklarla mücadele etmenin yanı sıra aktiviteleri modüle etmenin en basit ve en güvenli yolu olabilir [185].

Antosiyaninler: Bitkiler, çiçekler ve meyvelerdeki renklere sorumlu pigmentlerdir. Siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin ve peonidin en yaygın olarak çalışılan antosiyaninlerdir. Bunlar ağırlıklı olarak kıvılcık, siyah kuş üzümü, kırmızı üzüm, merlot üzümü, ahududu, çilek, yaban mersini, bilberries ve böğürtlen gibi çeşitli meyvelerin dış hücre katmanlarında bulunur. Bu bileşiklerin sağlık yararları ile stabilitesi, gıda endüstrisinde çeşitli uygulamalarda kullanılmasını kolaylaştırmaktadır [179]. Antosiyaninin rengi pH'a, A ve B halkalarındaki hidroksil gruplarındaki metilasyon veya asilasyona bağlıdır [182].

2.5.2 Flavonoidler ve kanser

Flavonoidlerin serbest radikalleri yok etme, hücrel metabolizmayı düzenleme ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkları engelleme özelliği çok sayıda çalışmada gösterilmiştir [186, 187]. Birçok flavonoidin antikanser aktivite gösterdiğine dair kanıtlar biriktirmektedir, ancak bu etkiden sorumlu moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Kanser, anormal hücrelerin büyümesine yol açan kontrolsüz çoğalma ve bozulmuş hücre döngüsü ile karakterize edilen heterojen bir hastalıktır [188, 189]. Oksidatif stres, hipoksi, genetik mutasyonlar ve apoptotik fonksiyon eksikliği kanserin başlıca iç nedenleriyken, dış nedenleri ise stres, çevre

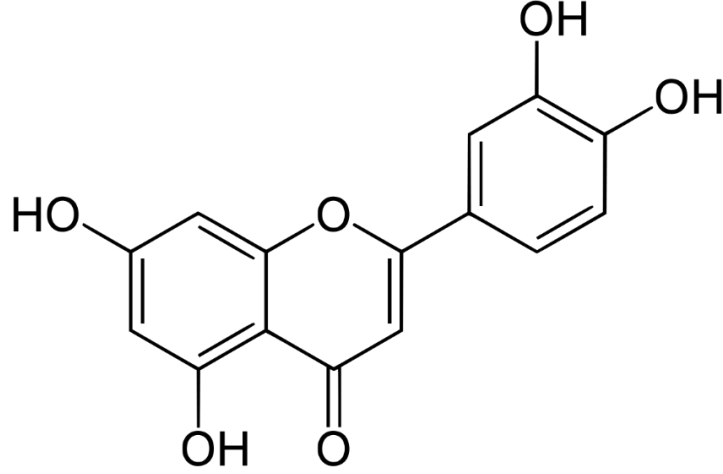
kirliliği, sigara, radyasyon ve ultraviyole ışınlarına uzun süre maruz kalmaktır [190]. Kanserin çeşitli düzeylerde mitokondriyal işlev bozuklukları ve metabolik değişiklikler tarafından belirlenen metabolik bir hastalık olduğuna dair yeni kanıtlar ortaya çıkmaktadır [188, 189, 191]. Mitokondri, hücreesel enerji kaynağı, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre ölümü sinyali ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde önemli roller oynamaktadır. Tümör hücrelerinin başlıca metabolik değişiklikleri arasında artan aerobik glikoliz [192], düzensiz pH [191], bozulmuş lipid metabolizması [193], artan ROS üretimi [194] ve bozulmuş enzim aktiviteleri yer almaktadır [191, 192]. Dolayısıyla hücre dışı ortam asidik hale gelir ve inflamasyona daha yatkın hale gelir [195], glutamin kaynaklı lipid biyosentezi artar ve tümör gelişimi başlar ve metastazda rol oynayan yolları düzenler [196], membranlarda kardiyolipin seviyeleri düşerek enzim aktivitelerinin bozulmasına neden olur [197, 198], mitokondri hiperpolarize olur [188] ve bu durum kanser hücrelerinin malignitesi ve invazivliği ile ilişkilidir [188]. Flavonoidler çok çeşitli antikanser etkiler gösterirler. ROS giderici enzim aktivitelerini modüle ederler, hücre döngüsünü durdurmaya yardımcı olurlar, apoptozu ve otofajiyi indüklerler, kanser hücresi proliferasyonunu ve invazivliğini baskırlarlar [187, 199, 200]. Fenolik hidroksil gruplarının varlığından dolayı serbest radikalleri stabilize etme özellikleri bulunur, flavonoidler doğrudan ROS'u temizleyebilir ve metal iyonlarını şelatlayabilir [201, 202]. Antioksidan enzimlerin aktive edilmesi, pro-oksidan enzimlerin baskılanması, antioksidan enzimlerin ve faz 2 detoksifikasyon enzimlerinin uyarılması flavonoidlerin dolaylı antioksidan etkileridir [203]. Flavonoidlerin antikanser etkileri, hem antioksidan hem de pro-oksidan aktiviteyi içerir [204].

Tablo 2.1 : Flavonoidlerin Kanser Hücreleri Üzerindeki Aktiviteleri [205].

Flavonoidler	Anti-Kanser Aktiviteleri	Kanser Türü
İsorhamnetin, Genkwanin ve Asasetin	Hücre proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozu ve otofajiyi indükler(43)	Meme kanseri
Silimarın	Apoptozu indükleyen proliferasyonu baskılar(55)	Yumurtaalık kanseri
Kaempferol	Proliferasyonu indükleyin ve hücre döngüsü durmasını, apoptozu ve DNA hasarını indükleyin(38)	Meme kanseri
Eriositrin	Hücre büyümesini inhibe etti ve ölümü teşvik etti(5)	Meme kanseri
Luteolin ve Apigenin	Proliferasyonu engelle(20)	Meme kanseri
İcariin	Apoptoz ve anti-tümör bağışıklığını iyileştirme(48)	Meme kanseri
Silibinin	Otofaji, ROS'a bağlı mitokondriyal başarısızlık tarafından tetiklenir.(49)	Meme kanseri

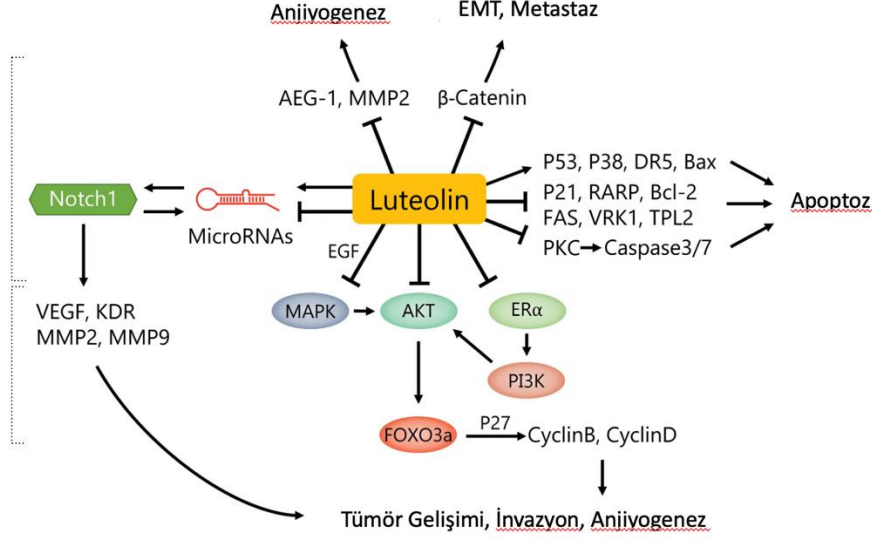
2.6 Luteolin ve Moleküler Yapısı

Luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon), meyveler, sebzeler ve şifalı otlar dahil olmak üzere birçok bitki türünde yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir. Luteolin açısından zengin olan bitkiler, geleneksel Çin tıbbında hipertansiyon, inflamatuvar bozukluklar ve kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Luteolin ayrıca 3', 4', 5' ve 7' karbon pozisyonlarında hidroksil gruplarına sahiptir [206]. Hidroksil grupları ve 2-3 çift bağının, luteolinin biyokimyasal ve biyolojik aktiviteleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [207]. Diğer flavonoidlerde olduğu gibi, luteolin bitkilerde genellikle glikozillenir ve glikozit emilim sırasında serbest luteoline hidrolize olur [208]. Luteolinin yapısının bir kısmı bağırsak mukozasından geçerken glukuronidlere dönüşür [209]. Luteolin ısıya dayanıklıdır ve sıcaklığa bağlı kayıplar nispeten azdır [210].



Şekil 2.8 : Luteolin'in Molekül Yapısı [211].

Luteolin, apoptozun indüklenmesini, hücre döngüsünün durdurulmasının aktivasyonunu, anjiyogenezin azaltılmasını, metastaz ve hücre proliferasyonu yoluyla karsinogenezin tedavisinde kullanılan, önemli bir terapötik potansiyele sahip flavonoidlerin flavon sınıfına ait fenolik bir fitokimyasaldır [212]. Luteolinin antikanser etkileri, tümör oluşumunu göstermek için birlikte çalışan çok yönlü onkolojik yolların ekspresyonunu etkili bir şekilde modüle ettiği malignitelere gözlemlenmiştir. Luteolin mitokondriyal disfonksiyonu indükler ve glioblastoma hücrelerinde endoplazmik retikulum stres yanıtını aktive ederek hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu tetikler [213]. Bu olaylar PERK, ATF4, eIF2 α ve kesilmiş kaspaz 12'nin fosforilasyonuna aracılık ederek stresle ilişkili proteinlerin ekspresyonunu daha da aktive eder. Luteolinin, kanser hücresinin gelişmesi ve metastazı ile ilişkili olan EMT'yi tersine çevirdiği bilinmektedir. Bu olaylara hücre iskeletinin azalması ve biyobelirteç olan E-cadherinin ifadesinin yukarı regüle edilmesi, ardından N-cadherin ve vimentin ifadesinin önemli ölçüde aşağı regülasyonu neden olmaktadır [206]. Ayrıca, luteolin kusursuz nöroprotektif özellikleri nedeniyle 1-metil-4-fenilpiridinyumun neden olduğu spinal hasarı ve beyin travmasını iyileştirme potansiyeline sahiptir. Kanser hücrelerinin luteolin aracılı hassaslaştırılması, nükleer faktör kapp B (NF-kB), fosfatidilinositol 3'-kinaz (PI3K)/Akt ve X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü (XIAP) gibi hücre yolaklarının aşağı regülasyonu ve baskılanması nedeniyle kemoterapinin neden olduğu sitotoksiteyi iyileştirir [207]. Etkili antikanser profili nedeniyle luteolin, yaklaşan antikanser ilaçların geliştirilmesi için hedef bir molekül olarak hizmet etmektedir.



Şekil 2.9 : Luteolin Anti-Kanser Etki Mekanizması ve Sinyal Yolakları [214].

2.7 Luteolin'in Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi

Luteolin'in kansere karşı etkilerinin üzerine yapılan araştırmaların büyük bir çoğunluğu meme kanseridir. Luteolinin meme kanserine karşı özellikler gösterdiğini tespit eden mekanizmalar, farklı sinyal yolakları aracılığıyla oluşan apoptoz ve anjiyogenezin modülasyonudur. Luteolinin meme kanseri için umut verici bir terapötik ajan olduğu gösterilmiştir [215], Luteolin'in kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde EGF'nin indüklediğini, p-STAT3, p-EGFR, p-Akt ve p-Erk1/2 ekspresyonlarında baskılanmaya neden olduğu bir çalışmada gösterilmiştir [216]. Luteolin'in insan meme kanseri hücre hatlarında EGFR sinyalinin EGF ile indüklenen aktivitelerini baskılayabildiğini göstermiş olup STAT3, MAPK/ERK1/2 ve PI3K/Akt sinyal yolaklarının da Luteolin'in EGFR sinyaline karşı etkilerini düzenlediği ana yollara dahil olduğunu fikri öne sürülmüştür [216]. Ayrıca, Luteolin'in insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile uyarılmış MCF-7 hücrelerinde proliferasyonu büyük oranda inhibe ettiği, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir [193]. Erk1/2 fosforilasyonuna müdahale etmeden IGF-1'e bağlı, IGF-1R fosforilasyonunda ve fosforile-Akt seviyelerinde çarpıcı bir şekilde azalmaya neden olmuştur [193]. Luteolin'in ERα ekspresyonunu büyük ölçüde azaltan, hücre büyümesi üzerindeki IGF-1 kaynaklı inhibitör aktivitelerine östrojen reseptörü alfa'nın (ERα) doğrudan dahil olduğu vurgulanmıştır. Bu bağlamda da Luteolin'in inhibitör aktivitesini ERα ekspresyonuna bağlı olan, IGF-1 aracılı PI3K/Akt yolunu inhibe ederek başardığı

düşünülmektedir [193]. Luteolin'in MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü indüklediği, bu etkilerinin HIF-1 aktivasyonu ile bozulmadığı bulunmuştur [217]. Luteolinin bu hücrelerde otofajiyi uyardığı, ancak sitotoksik olarak etkisinin bulunmadığını gösterilmiştir. Luteolin, HIF-1'in transkripsiyonel aktivitesinde azalmaya, tümörün köklenmesini engelleme, invazyon ve metastazı baskılama gibi bazı etkiler göstermiştir.

Luteolin'in MDA-MB-231 ER-negatif meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini ve bunu G2/M ve S aşamalarında hücre döngüsünü durdurması, apoptoza indüklenmesiyle ilişkilendirmişlerdir [218]. Luteolin tarafından hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz indüksiyonunu, Luteolin'in; Akt, polo benzeri kinaz 1 (PLK1), siklin B1, siklin A, CDC2, sikline bağımlı kinaz 2 (CDK2) ve Bcl-xL'yi azaltma ve p21 ve Bax ekspresyonlarını artırmayla bağlantılı olduğunu ve bu durumun Luteolin'in EGFR yolu üzerindeki inhibitör etkisi ile açıklandığını ortaya koymuştur [218]. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, Luteolin'in sub-G1 ve G1 fazlarında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu ve DR5 gibi ölüm reseptörlerinin ekspresyonlarını indüklediği ve kaspaz-8/-9/-3 aktivitelerini ve PARP'ın bölünmesini teşvik ettiği tespit edilmiş olup, kaspaz sinyal yollarını aktive ettiği belirlenmiştir [205]. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yollarında Kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un indüklerken, Kaspaz-3 aktivasyonunu sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca, Luteolin'in mitokondriyal membran potansiyeli kaybına neden olduğu, sitokrom c salınımını indüklediği ve Bcl-2 ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla Bax ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur [218]. Yapılan bir çalışmada, Luteolin'in MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı şekilde siklin D1 ve Survivin ekspresyonlarını aşağı regüle ederek proliferasyonu baskıladığı ve S fazında hücre döngüsünün durmasına sebep olduğu belirtilmiştir [190]. Luteolinin meme kanseri hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını ve Kaspaz-3 seviyelerini artırdığını, böylece apoptozu indüklediği bulunmuştur. Çalışmada ekstra Luteolin'in telomeraz seviyelerini doza bağlı olarak inhibe ettiği ve telomerazın katalitik alt birimini kodladığı bilinen insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) ekspresyonunu baskılamak için NF- κ B ve NF- κ B'nin hedef geni c-Myc'nin fosforilasyonuna neden olduğu bulunmuştur [190].

Luteolin'in meme kanseri hücrelerindeki metastazı ve anjiyogenezindeki rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmış olup, proliferasyonun baskılanmasına neden olmuş ve astrosit yükseltilmiş gen-1 (AEG-1) ve MMP-2 seviyelerinin ifade düzeylerini azaltarak MCF-

7 hücrelerinin metastazını engellemiştir [197]. Luteolin tedavisinin meme kanseri hücrelerinin canlılığında, meme kanseri hücrelerinden progesterine bağlı VEGF salgılanmasında ve sentetik progesterin olan medroksiprogesteron asetatı bağlı insan meme kanseri ksenograft modelinde tümör büyümesinde azalmaya neden olduğunu gösterilmiştir [219]. Ayrıca, Luteolin ksenograft tümör VEGF ekspresyonunda ve kan damarı yoğunluğunda bir azalmaya neden olmuş ve meme kanseri hücreleri tarafından kök hücre benzeri özelliklerini, medroksiprogesteron asetat ile indüklenen kazanımını inhibe etmiştir. [215].

Tablo 2.2 : Luteolinin meme kanseri hücre hatlarında hedef moleküler mekanizması.

Hücre Hattı	Temel Moleküler Hedefler veya Sinyal Yolları	Etkisi
MCF-7	↓ PI3K/Akt, MAPK/Erk1/2 ve STAT3 sinyal yollarının aracılığı ile EGFR sinyali	EGF tarafından indüklenen hücre proliferasyonunun inhibisyonu
MDA-MB-231	↓ EGFR sinyali	G2/M ve S evrelerinde hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun uyarılması
MCF-7	Kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un uyardığı kaspaz-3 aktivitesinin aktivasyonu, ↓ Bcl-2 ekspresyonu ile ↑ Bax ekspresyonu	Ekstrinsik ve intrinsik yolları aktive ederek apoptozun indüklenmesi
MDA-MB-231	↓ İnsan telomerazı ters transkriptaz (hTERT) ifadesi	S fazında hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun uyarılması
Tamoksifene Dirençli MCF-7	↑ MLL3 ifadesi	H3K4 monometilasyonu yoluyla apoptozun uyarılması ve PI3K/AKT/mTOR yolunun baskılanması
MDA-MB-231	↓ β-katenin ifadesi	EMT'yi tersine çevirerek metastazın inhibisyonu
4T1 ve MDA-MB-231	↓ YAP/TAZ etkinliği	EMT'nin inhibisyonu ve migrasyon Tümör büyümesinin inhibisyonu
BT20-MDA-MB-231	↓ AKT/mTOR-indükleyici H3K27Ac ve H3K56Ac aracılığıyla ↓ MMP-9 ekspresyonu	İnvazyon ve metastazın engellenmesi
MCF-7 ve MDA-MB-453	↑ miR-203 seviyeleri ve ↓ Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı	Meme kanseri hücre proliferasyonu ve EMT ilerlemesinin inhibisyonu

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Dimetilsulfoksit (DMSO, Merck), DMEM medyumunu (Gibco), Fetal Bovin Serum (FBS, Capricorn Scientific), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, Sangen Biotech), Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific), saf etanol (Sigma-Aldrich), tripsin-EDTA (Multicell), primocin (Invivogen), BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (ABM Scientific), DNase/ RNase Free Su (ZYMO Research), hidrojen peroksit (H₂O₂, Merck), luteolin (Sigma), izopropil alkol (Sigma), Kloroform (Merck), etil alkol (EtOH, Sigma) alındığı gibi kullanıldı.

3.2 Kullanılan Cihazlar

3T3 fibroblast ve MCF-7, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri CO² Nuve inkübatöründe kültürlendi. Hücrelerin morfolojik yapıları invert mikroskopta gözlemlendi. Hücrelerin polimeraz zincir reaksiyonları SAGEM PCR cihazında yapıldı. Hücrelerin RNA izolasyonunda Biocute Vorteks ve RNA'nın ölçümü için Thermo Scientific Multiskan Spektrofotometre kullanıldı. Gen ekspresyonlarını incelemek için Bio-Rad Real-Time PCR cihazı kullanılarak ekspresyon seviyeleri incelendi.

3.3 Deneysel Kısım

3.3.1 Hücre kültürü ve hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynaklı hücresel yaşlanma

Çalışmada fare embryonik fibroblastı 3T3 ve insan meme kanseri hücreleri (MCF7, MDA-MB-231- ATCC) kullanıldı. Hücreler, 1.0 g/L glukoz (5.5mM) ve HEPES (25mM) içeren DMEM (Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle) ortamında, %10 FBS (Hyclone), %1 oranında Penisilin/Streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) ve 1/1000 oranında primocin eklenerek kültürlendi. İnkübasyon 37 °C'de ve %5 CO₂ atmosferinde gerçekleştirildi.

H₂O₂ kaynaklı hücre yaşlandırma deneylerinde, hücrelerin yarısını (3T3) 4 saat boyunca H₂O₂ (100uM) ile muamele edilip, sonra PBS ile yıkandı ve 92 saat boyunca H₂O₂ içermeyen hazırlanmış DMEM medyumunda inkübasyona bırakıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve yaşlanmış hücre modeli elde edildi [220-222].

Fibroblastlar H₂O₂ içermeyen medyumda 92 saat inkübe olduktan sonra hücrelerin yarısı hidrojen peroksit ile yaşlanarak ve 10 uM, 25 uM ve 50 uM konsantrasyonlarında luteolin içeren serumsuz (FBS) ortama verilerek inkübe edildi. Hücrelerin yarısı da yaşlandırılıp luteolin içermeyen ortama verilerek inkübe edildi. 24 saat sonra yaşlandırılmış luteolinsiz ortamdaki, hücreler yaşlandırılmış ortamdan kaldırıldı. H₂O₂ ile yaşlanan hücrelerin ise her 48 saatte bir ortamı değiştirilerek inkübasyona bırakılıp, 9. günde bu hücrelerde luteolin içermeyen DMEM ortama verilip, 24 saat sonra kaldırıldı. [222].

3.3.2 Yaşlanma ile ilişkili Beta-galaktosidaz (SA-B-gal) aktivitesinin incelenmesi

Beta-Galaktozidazın (SA-B-gal) mRNA ifadeleri, Real-time PCR ile ölçülecektir. Fibroblast kültürü hücrelerinden total RNA, üreticinin talimatlarına göre TRIzol reaktifi (Invitrogen, ABD) kullanılarak izole edilir. RNA konsantrasyonu, MultiscanGO Spektrofotometre (Thermo Scientific) ile ölçüldü ve RNA kalitesi, OD 260/280 oranı ile kontrol edilir. Total RNA, cDNA revers transkripsiyon kiti (Invitrogen) kullanılarak komplementer DNA üretilir. Aday genler için mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu, CFX Connect Real-Time PCR Tespit Sistemi (Biorad) kullanılarak qPCR ile gerçekleştirilecektir. Real-time PCR her bir gen için spesifik primerler ile Sybr Green içeren Real-time PCR Mastermix (Biorad, ABD) ve cDNA kullanılarak gerçekleştirilecektir. Her reaksiyon 2 dakika boyunca 95°C ve ardından 15 saniye 95°C, 20 saniye 60°C ve 60 saniye 72°C 40 döngüden oluşacaktır. Göreceli gen ekspresyon seviyeleri, Beta-Aktin ekspresyonuna göre normalize edilir.

Tablo 3.1 : GAPDH primerleri.

Primer	Sekans	bp
B-Gal-FW	ATGGTACGCAACCATCTCTG	21
B-Gal-RW	AGTATCGGCCGAGGTTAAAG	21

3.3.3 Real-time PCR (qPCR) analizi

TNF- α , IL-6, Bax, Bcl-2'nin mRNA ifadeleri, Real-time PCR ile ölçülecektir. Fibroblast kültürü hücrelerinden total RNA, üreticinin talimatlarına göre TRIzol reaktifi (Invitrogen, ABD) kullanılarak izole edilir. RNA konsantrasyonu, MultiscanGO Spektrofotometre (Thermo Scientific) ile ölçüldü ve RNA kalitesi, OD 260/280 oranı ile kontrol edilir. Total RNA, cDNA revers transkripsiyon kiti (Invitrogen) kullanılarak komplementer DNA üretilir. Aday genler için mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu, CFX Connect Real-Time PCR Tespit Sistemi (Biorad) kullanılarak qPCR ile gerçekleştirilecektir. Real-time PCR her bir gen için spesifik primerler ile Sybr Green içeren Real-time PCR Mastermix (Biorad, ABD) ve cDNA kullanılarak gerçekleştirilecektir. Her reaksiyon 2 dakika boyunca 95°C ve ardından 15 saniye 95°C, 20 saniye 60°C ve 60 saniye 72°C 40 döngüden oluşacaktır. Göreceli gen ekspresyon seviyeleri, Beta-Aktin ekspresyonuna göre normalize edilir.

Tablo 3.2 : Real-time PCR amplifikasyonu için kullanılacak primerler.

Primer	Sekans	bp
IL-6-FW	AACGATGATGCACTTTGGCAGA	23
IL-6-RW	TGTGACTCCAGCTTATCTCT	21
TNF- α -FW	CTCAGCCTCTTCTCATTCC	20
TNF- α -RW	TTGGTGGGTTTTGTGAGTGTGA	22
Bcl-2FW	GAACTGGACAGCCAATATGGA	22
Bcl-2-RW	TCTGGATCCAGACAAGCAG	22
Bax-FW	GAACTGGACAGCAATATGGA	22
Bax-RW	TCTGGATCCAGACAAGCAG	21
B-Aktin-FW	GGCTGTATCCCCTCCATCG	222
B-Aktin-RW	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	23

3.3.4 Çizik deneyi

Luteolinle şartlandırılmış yaşlanmış fibroblastların, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki proliferasyonu gözlemlemek için ayrıca yara iyileşme deneyi yapılacaktır. Pozitif (luteolinle şartlandırılmış yaşlanmış fibroblastların bulunduğu

ortam) ve negatif kontrol (yaşlanmış fibroblastların bulunduğu ortam) olarak iki adet grup oluşturulacaktır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 48 oyuklu plakelere ekildi ve iki farklı ortamla dolduruldu (Pozitif ve negatif kontrol). Pipet ucuyla kuyunun ortasından dikine bir çizik atıldı. 37 C°'de , 5 CO2'de 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. Üç saat diliminde de invert mikroskopta yara açıklığı ölçüldü.

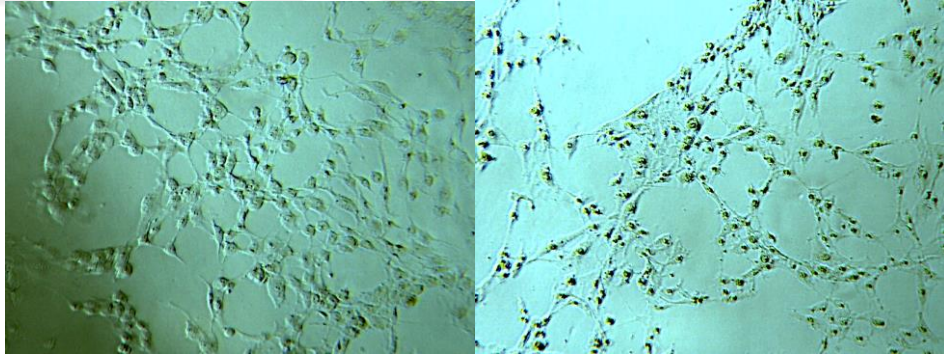
3.3.5 Hücre canlılığı testi (MTT)

Luteolinle şartlandırılmış yaşlanmış fibroblastların, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki canlı hücre sayısını nasıl etkilediğini gözlemek için hücre canlılığı testi yapılacaktır. Pozitif ve negatif kontrol olarak oluşturulan gruplar 96 oyuklu plakelere ekilecektir. Oyukların her birine 10 ul MTT reaktifi eklenip 4 saat inkübe edilecektir. İnkübasyondan sonra kuyulardaki medyum aspire edilip, kuyu üzerine 100 ul DMSO eklenecek, 15 dakika inkübe edilecektir ve 570 nm' absorbansı ölçülecektir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hidrojen Peroksitin Konsantrasyonuna Bağlı Yaşlandırma Modelinin Oluşması

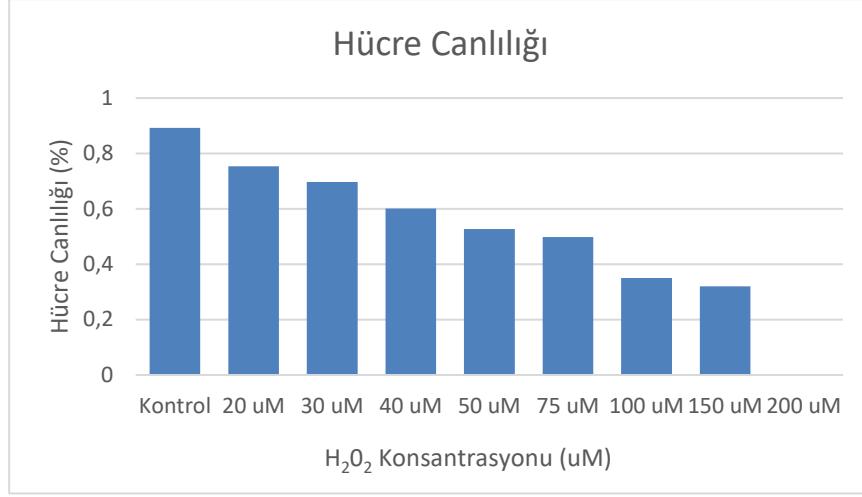
3T3 fibroblastları, hidrojen peroksitin 20 uM, 30 uM, 40 uM, 50 uM, 75 uM, 100 uM, 150 uM ve 200 uM konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Hücrelerin hidrojen peroksitle 2 saat muamele edilmesi, 200 uM konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonlarda yaşlandırma modeli oluşumu için yeterli olmuştur. Lakin 200 uM konsantrasyonu hücrelerin %98 ini öldürmüştür. Yaşlanan hücrelerin ise morfolojik olarak değişiklikleri mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. Normal 3T3 fibroblastları ile karşılaştırıldığında yaşlanan hücreler düzensiz, düzleştirilmiş bir morfoloji dönüşmesi ve artan sitoplazmik artış görülmüştür.



Normal 3T3 Fibroblast

Yaşlanmış 3T3 Fibroblast

Şekil 4.1 : Normal 3T3 fibroblast ile yaşlanmış 3T3 fibroblast karşılaştırması.



Şekil 4.2 : Hidrojen peroksitin konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı.

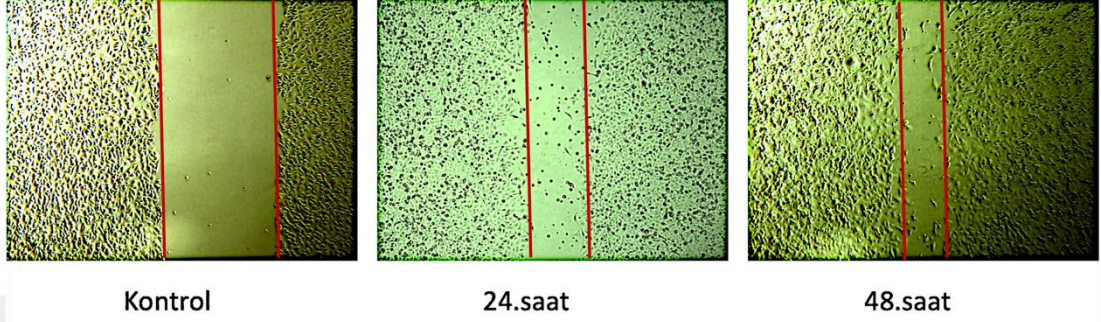
Bu çalışmada elde edilen bulgular kapsamında literatürdeki çalışmalarda hidrojen peroksit konsantrasyonu ile benzerlik ve farklılıklar bulunmuştur. Literatürde bir çalışmada hidrojen peroksit 20 uM konsantrasyonunun hücre canlılığına etki etmediği gözlemlenmiş, 50 uM konsantrasyonun az etki ederken diğer 100 uM ve 150 uM konsantrasyonun hücrelerde önemli ölçüde azalmaya etki ettiği belirlenmiştir [223]. Çalışmadaki hidrojen peroksit konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkileri (Şekil 4.2) literatürü desteklemektedir.

Başka bir çalışmada peroksit kaynaklı yaşlanma modeli oluşturmak için MRC-5 ve H8F2p25LM hücre hatları kullanılmış olup, iki hücre hattı için kullanılan konsantrasyonlar farklıdır. MRC-5 hücre hattında 500 uM hidrojen peroksit konsantrasyonu hücrelerde kontrole kıyasla hücre sayısını azaltırken, H8F2p25LM hücre hattında 100 uM konsantrasyonun sitotoksik etkiye neden olduğu belirtilmiştir [224]. Çalışmada kullanılan 3T3 fibroblastlarında ise 200 uM konsantrasyonu ciddi sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Elde edilen bulguların verilerine göre yaşlanma modeli için belirlenecek hidrojen peroksit konsantrasyonu hücre tipine göre farklılık gösterdiği düşünülebilir.

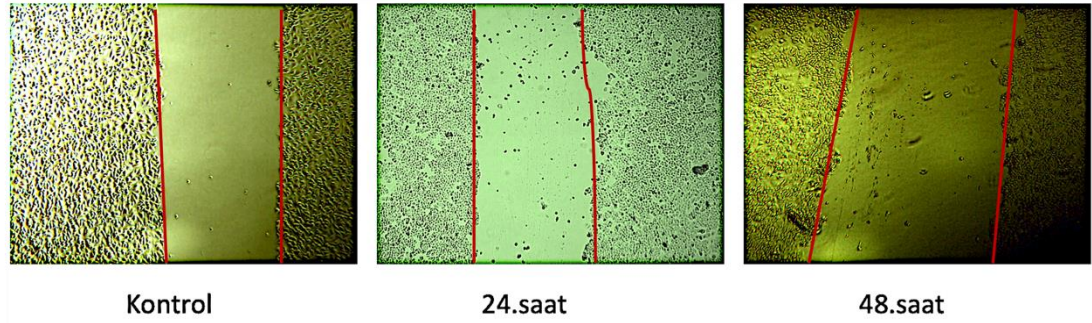
4.2 Yaşlanan Fibroblastların Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisi

24 oyuklu plate ekilmiş MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri plate oyuğunun tam ortasından çizilerek yara açıklığı oluşturulmuştur. Bu yara açıklığına Luteolin ile muamele edilmiş yaşlanmış fibroblastların müdahalesi ile yaşlanmış fibroblastların müdahalesi karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre yara açıklığına MDA-MB-231

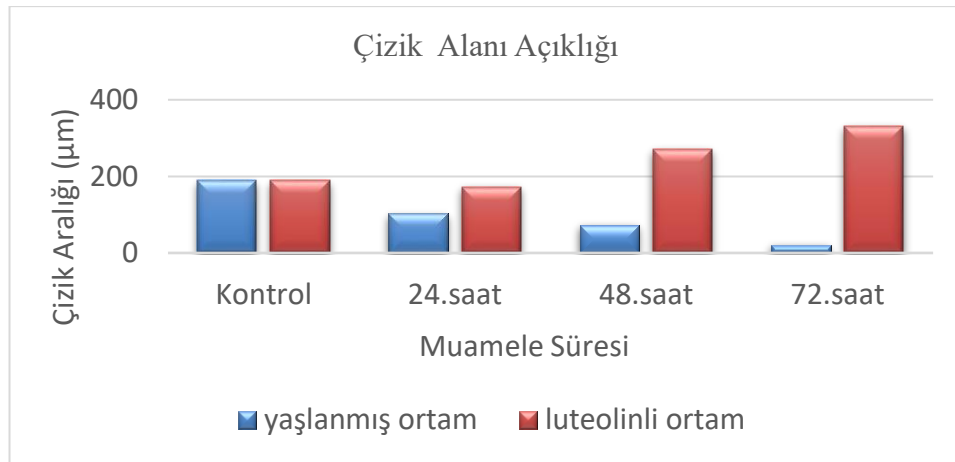
hücreleri üzerinde daha iyi ettiği gözlemlendiği için sonuçlar bu hücreler üzerinden değerlendirilmiştir. Luteolin ile muamele edilmiş fibroblastların bulunduğu oyuklardaki, kanser hücrelerinin yara açıklığı kapanmamış ve 48 saat sonunda yara açıklığı genişlemiştir, yaşlanmış fibroblastların bulunduğu oyuklar ise 72 saat sonunda tamamen kapanmıştır.



Şekil 4.3 : Yaşlanmış fibroblastların MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisi.



Şekil 4.4 : Luteolin ile muamele edilmiş yaşlanmış fibroblastların MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisi.



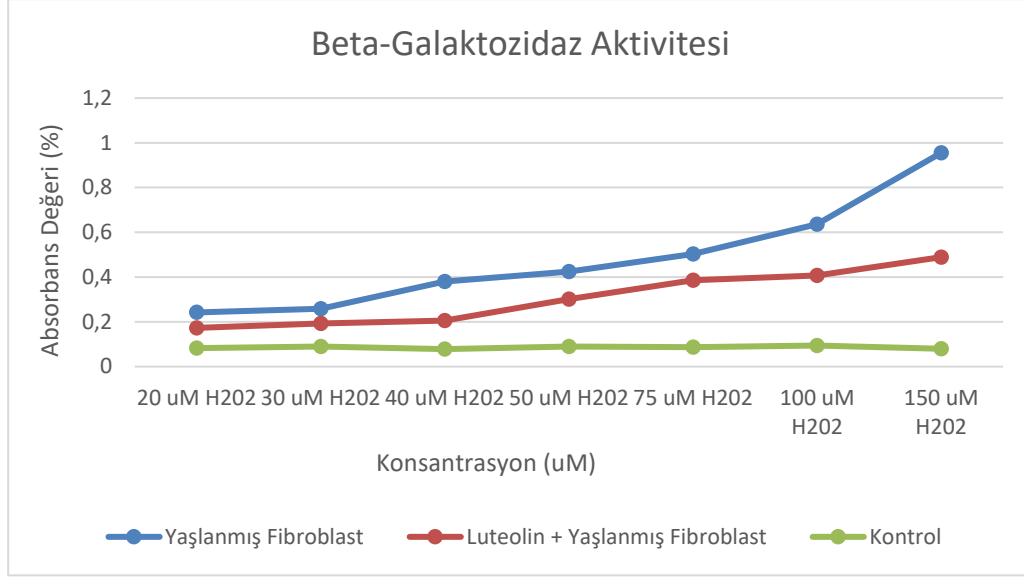
Şekil 4.5 : Yaşlanmış ortam ile luteolinli ortamın kanser hücrelerinde yara açıklıkları.

Yaşlanmış hücrelerin kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu arttırdığı literatürdeki çalışmalarla gösterilmiştir. Yayınlanan bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tamoksifen kaynaklı oluşturulan yaşlanma modelinde yapılan çizik deneyinde yaşlanan hücrelerin bulunduğu ortamda kanser hücrelerinin proliferasyonun arttırdığı ve çizik açıklığını kapattığı gösterilmiştir [225]. Çalışmada yaşlanmış hücrelerin çizik açıklığını kapattığını ve proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiş ve literatürü desteklemiştir.

Yapılan bir çalışmada luteolinin konsantrasyonuna bağlı meme kanseri hücreleri üzerindeki proliferasyonu baskılayıcı etki ettiği belirlenmiştir [216]. Ayrıca luteolinin yaşlanmış hücreler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir yayında luteolinin 2 uM konsantrasyonu HEI-OC1 hücre hattında proliferasyonu baskıladığı belirtilmiştir [226]. Oysa çalışmada luteolin 10 uM konsantrasyonu önemli ölçüde proliferasyonu baskılayıcı etki göstermeyip, 25 uM konsantrasyonu proliferasyonu baskılamış ve çizik açıklığının kapanmasını engellemiştir. Luteolin konsantrasyon etkilerinin farklılıklarının hücre hattının karakteristik özelliklerinden faydalandığı düşünülmektedir.

4.3 Yaşlanan Fibroblastlar ve Luteolinle Muamele Edilen Fibroblastlardaki Beta-Galaktozidaz Aktivitesi

Yaşlanan hücreler beta-gal aktivitesi artma gözlemlenmiştir. DNA hasarı sonucu kendini yaşlanma modeline sürükleyen hücreler hasara bağlı bir aktivite artışı göstermiştir. Beta-galaktozidaz artışı aktivitesi en çok 150 uM H₂O₂ iken en az Luteolin ile muamele edilen 20 uM H₂O₂ gözlemlenmiştir.

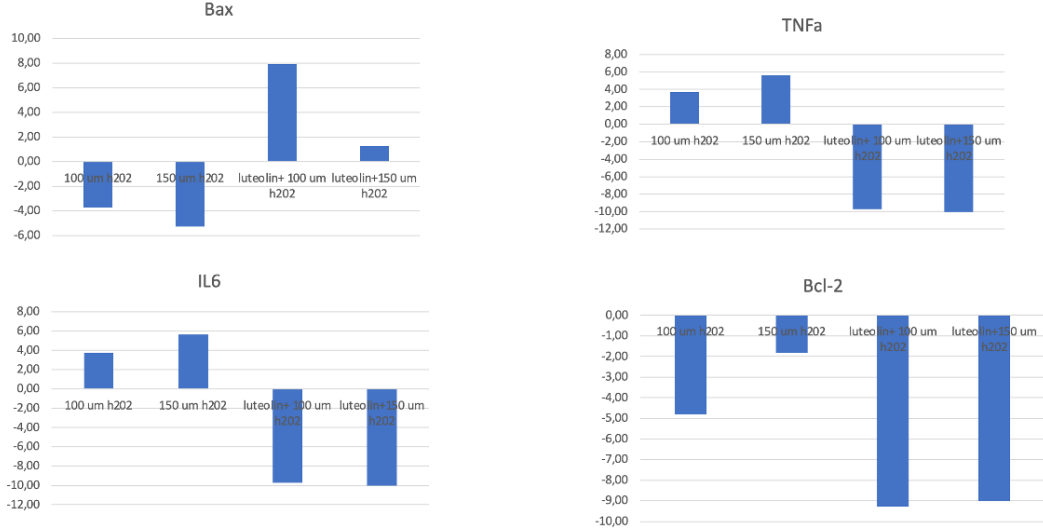


Şekil 4.6 : Beta-galaktozidaz aktivitesinin ölçümü.

Literatür araştırıldığında yaşlanmayla ilişkili beta-galaktosidaz (SA- β -gal) sadece yaşlanan hücrelerde β -galaktosidlerin monosakkaridlere hidrolizini katalize eden bir hidrolaz enzimidir. Bundan dolayı da yaşlanan hücrelerin belirteci olarak kabul edilmektedir [227]. Ayrıca yapılan çalışmada luteolinin yaşlanmış hücrelerin aktivitesini baskıladığı gösterildiği için beta-galaktozidaz aktivitesini de baskılayacağı fikrini desteklemiştir. Çalışmada yaşlanmış hücrelerde beta-galaktozidaz aktivitesinin artması gözlemlenmiş ve luteolinin yaşlanmış hücrelerin aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir.

4.4 Yaşlanma Fenotipinin Parakrin Etki Ekspresyonları

Hidrojen peroksitin farklı konsantrasyonlarda yaşlandırılması, SASP'ın parakrin etkisinin yayılmasından etkili olan önemli bir sitokin IL-6 ekspresyonunu artırmıştır. Konsantrasyona bağlı olarak IL-6 sitokin seviyesi en yüksek 150 uM H₂O₂ ve sırasıyla diğer konsantrasyonlar da takip etmiştir. TNF-a, Bcl-2 hücre yaşlanması ilerledikçe ekspresyon seviyesinde bir artış gösterirken, Bax seviyesinde azalma gözlemlenmektedir. Luteolinle muamele edilmiş hücrelerde ise IL-6 sitokini azalma gözlemlenirken. Bax ekspresyonu artış göstermiştir. Ayrıca luteolinle muamele edilen hücrelerde Bax baskılanmıştır.



Şekil 4.7 : Real-time PCR ile yaşlanmış ortamdaki sitokinlerin ve proteinlerin ekspresyon analizleri.

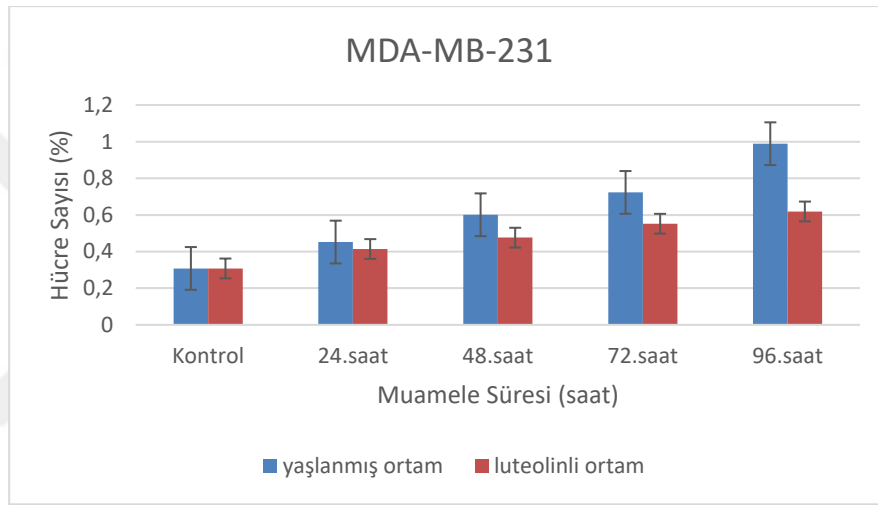
IL-6 sitokinin hücrel yaşlanmaya etkisinin incelendiği çalışmalarda yaşlanmış hücrelerde ekspresyonun arttırdığı belirtilmiştir [14, 116]. Ayrıca pleiotropik özelliğinden dolayı kanser hücreleri üzerinde yaşlanma aktivitesi, metastazı ve protümörojeniteyi desteklediği gösterilmiştir [228]. Yapılan çalışmada IL-6 aktiviteyi literatürü destekler sonuç vermiştir.

Yaşlanmış hücrelerdeki proinflamatuvar sitokin olan TNF- α ' nın ekspresyon etkisinin araştırıldığı bir çalışmada hem beta-galaktozidaz aktivitesinde hemde proliferasyonunda artış olduğu belirtilmiş hemde sitokinin arttığı gösterilmiştir [229]. Bu bulgu çalışmada elde edilen artan TNF- α ekspresyonunu desteklemiştir. Ayrıca anti-inflamatuvar özelliğe sahip luteolinin de bu sitokini baskılaması fikri de bulgular sonucunda desteklenmiştir.

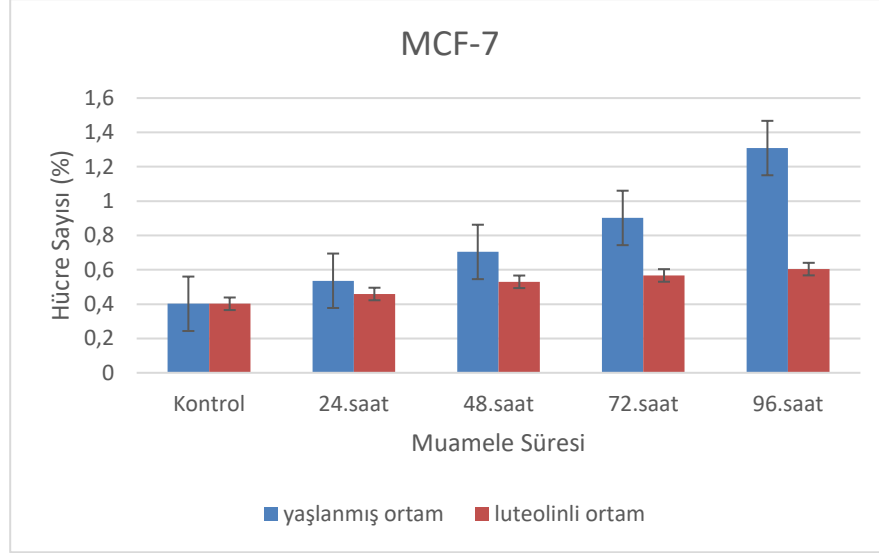
Bcl-2 ve Bax literatürde kanserle ilişkili bir protein aileleridir. Bcl-2 kanserli hücrelerin apoptozdan kaçmasına imkan sağlayarak tümörögenezi destekleyici etki gösterirken, Bax aktivitesi arttığında hücreyi apoptoza teşvik ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmada yaşlanmış hücreler aracılığıyla desteklenen tümörögenezde Bcl-2 ekspresyonu artmış ve luteolin bu ortamı baskılaması sonucu ekspresyonu azalması fikri desteklenmiştir. Ayrıca luteolinli ortamda Bax ekspresyonunda aşırı ekspresyonu artması da hem luteolinin apoptoza indüklemesi hemde Bax'ın apoptoza teşvik etmesi kanser hücrelerinde belirgin bir artışı literatürde desteklemiştir.

4.5 Yaşlanmış Fibroblastların Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisi

50 uM, 75 uM, 100 uM ve 150 uM H₂O₂ konsantrasyonlarının, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki hücre proliferasyonuna etkisini incelenmiştir. 100 uM ve 150 uM H₂O₂ 24.saat 48.saat 72.saat ve 96.saatte kültüre bırakıldığında hücre proliferasyonunu baskılanmıştır. 50 uM ve 75 uM H₂O₂ konsantrasyonları ise 100 uM ve 150 uM H₂O₂ konsantrasyonlarına göre daha düşük hücre proliferasyonu baskılama gözlemlenmiştir. 20 uM, 30 uM ve 40 uM konsantrasyonlarında ise anlamlı bir fark gözlemlenmedi.



Şekil 4.8 : H₂O₂ konsantrasyonlarıyla yaşlanan hücrelerin, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.



Şekil 4.9 : H₂O₂ konsantrasyonlarıyla yaşlanan hücrelerin, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.

Literatürde yapılan çalışmalarda yaşlanmış ortamın tümörögenezi destekleyici etkisi olduğu belirtilmiştir[8]. Luteolinin ise anti-tümörojenik özelliği olduğu belirtilmiştir[190]. Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında yaşlanmış hücrelerin bulunduğu ortamda proliferasyon artışı gözlemlenirken, luteolinin bulunduğu ortam proliferasyonu baskılamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak H₂O₂ konsantrasyonu yaşlanma modelinde kullanılacak DNA hasarı için önemlidir. Bu nedenle 200 uM konsantrasyonu DNA hasarını ileri boyuta taşımış ve hücre döngüsünü durdurarak hücre ölümüne yol açmıştır. Ayrıca 20 uM, 30 uM, 40 uM, 50 uM, 75 uM, 100 uM ve 150 uM konsantrasyonlarında da hücre morfolojik görünümü de etkili olduğu belirlenmiş olup 75 uM, 100 uM ve 150 uM yaşlanan hücrelerin sitoplazması daha yoğun artış ve hücreler düzleşmiş formdadır. Luteolin ile muamele edilen yaşlanmış hücreler morfolojik bozukluklarına rağmen yapılarında kısmi bir düzelmeye yol açmıştır. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde yaşlanmış fibroblastlar yara açıklığını daha hızlı sürede kapattığı için kanser hücrelerinde metastaz yapma yetkinliğini desteklemiştir. Luteolin ile muamele edilen yaşlanmış hücreler ise MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde metastaz yapma yetkinlikleri baskılanmıştır ve Luteolin'in yara açıklığına en etkili olan konsantrasyonu 25 uM olarak belirlenmiştir.

Hücre canlılıkları karşılaştırıldığında kontrole göre luteolin ile muamele edilen yaşlanmış hücreler, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda belirgin azalmaya neden olmuştur. Yaşlanmış fibroblastlarda beta-galaktozidaz aktivitesi artmaktadır. Artan beta-galaktozidaz aktivitesi hücreye verilen ajan hidrojen peroksitin konsantrasyonu ile bağlantılıdır. Luteolin ile muamele edilmiş fibroblastlarda artan beta-galaktozidaz baskılanmıştır. Luteolin yaşlanma belirteci olan beta-galaktozidaz ekspresyonunu aşağı regüle etmiştir. Yaşlanmış fibroblastlar IL-6 seviyesinde ekspresyon artışına neden olurken, luteolin bu artışı baskılamaktadır.

Sonuç olarak yaşlanmış fibroblastlar tümör genez oluşumunu desteklemektedir. Yaşlanma fenotipi olan SASP parakrin etkileriyle metastazı destekleyip hücre proliferasyonunu artırır. Luteolin yaşlanmış fibroblastlardaki morfolojik değişimleri baskıladı ve beta-galaktozidaz aktivitesini baskıladı. SASP'ın parakrin etkilerinden IL-6 ekspresyonunu baskıladı. İlerideki aşamalarda sitokin ve kemokinlerin detaylı

ekspresyonlarının araştırılması ve SASP'ın parakrin etki mekanizmasının in vivo ortamda luteolinle muamelesinin incelenmesi öngörülür.



6. KAYNAKLAR

- [1] Ferlay, J., et al., Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*, 2021.
- [2] Harbeck, N., et al., Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. 5(1): p. 66.
- [3] Sung, H., et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021. 71(3): p. 209-249.
- [4] Lima, S.M., R.D. Kehm, and M.B. Terry, Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. *EClinicalMedicine*, 2021. 38: p. 100985.
- [5] Soysal, S.D., A. Tzankov, and S.E. Muenst, Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 2015. 82(3-4): p. 142-52.
- [6] Mittal, S., N.J. Brown, and I. Holen, The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018. 18(3): p. 227-243.
- [7] Amatori, S., et al., Polyphenol-rich strawberry extract (PRSE) shows in vitro and in vivo biological activity against invasive breast cancer cells. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 30917.
- [8] Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. *Annu Rev Physiol*, 2013. 75: p. 685-705
- [9] Hornsby, P.J., *Cellular aging and cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011. 79(2): p. 189-95.
- [10] Kennedy, B.K., et al., *Geroscience: linking aging to chronic disease*. *Cell*, 2014. 159(4): p. 709-13.
- [11] Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. *Cell*, 2013. 153(6): p. 1194-217.

- [12] Coppe, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
- [13] Rao, S.G. and J.G. Jackson, *SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes!* Trends Cancer, 2016. **2**(11): p. 676-687.
- [14] Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
- [15] Coppe, J.P., et al., *Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29568-74.
- [16] Liu, D. and P.J. Hornsby, *Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3117-26.
- [17] Acosta, J.C., et al., *Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1006-18.
- [18] Raynard, C., et al., *NF-kappaB-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells*. Aging Cell, 2022. **21**(7): p. e13632.
- [19] Kang, T.W., et al., *Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 547-51.
- [20] He, S. and N.E. Sharpless, *Senescence in Health and Disease*. Cell, 2017. **169**(6): p. 1000-1011.
- [21] Kirkland, J.L. and T. Tchkonina, *Cellular Senescence: A Translational Perspective*. EBioMedicine, 2017. **21**: p. 21-28.
- [22] Hernandez-Segura, A., et al., *Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells*. Curr Biol, 2017. **27**(17): p. 2652-2660 e4.
- [23] Gonzalez-Meljem, J.M., et al., *Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis*. Br J Cancer, 2018. **118**(10): p. 1283-1288.
- [24] Perrott, K.M., et al., *Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells*. Geroscience, 2017. **39**(2): p. 161-173.
- [25] Cook, M.T., *Mechanism of metastasis suppression by luteolin in breast cancer*. Breast Cancer (Dove Med Press), 2018. **10**: p. 89-100.

- [26] Tuorkey, M.J., *Molecular targets of luteolin in cancer*. Eur J Cancer Prev, 2016. **25**(1): p. 65-76.
- [27] Yang, M.Y., et al., *Luteolin enhances paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells by blocking STAT3*. Chem Biol Interact, 2014. **213**: p. 60-8.
- [28] Sui, J.Q., K.P. Xie, and M.J. Xie, *Inhibitory effect of luteolin on the proliferation of human breast cancer cell lines induced by epidermal growth factor*. Sheng Li Xue Bao, 2016. **68**(1): p. 27-34.
- [29] Lin, C.H., et al., *Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 958.
- [30] Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. CA Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
- [31] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
- [32] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
- [33] Rutkowski, M.R., et al., *The Tumor Microenvironment: Cancer-Promoting Networks Beyond Tumor Beds*. Adv Cancer Res, 2015. **128**: p. 235-62.
- [34] Medina, M.A., et al., *Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(6).
- [35] Ünçel, M., et al., *Evaluation Of Clinicopathological Features Of Breast Cancer According To The Molecular Subtypes*. Tepecik Eğit Hast Derg, 2015. **25**(3): p. 151-156.
- [36] Petroni, G., et al., *Immunomodulation by targeted anticancer agents*. Cancer Cell, 2021. **39**(3): p. 310-345.
- [37] Yuan, C., et al., *Eriocitrin, a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells*. J Biochem Mol Toxicol, 2022. **36**(1): p. e22943.
- [38] Britt, K.L., J. Cuzick, and K.A. Phillips, *Key steps for effective breast cancer prevention*. Nat Rev Cancer, 2020. **20**(8): p. 417-436.

- [39] Mathews, F.S., *The Ten-Year Survivors of Radical Mastectomy*. Ann Surg, 1933. **98**(4): p. 635-43.
- [40] Clifton, E.E. and L.E. Young, *Carcinoma of the breast; five to twenty-year follow-up following radical mastectomy*. Am J Surg, 1951. **82**(2): p. 185-90.
- [41] Figueiredo, M.I., et al., *Breast cancer treatment in older women: does getting what you want improve your long-term body image and mental health?* J Clin Oncol, 2004. **22**(19): p. 4002-9.
- [42] Jin, X. and P. Mu, *Targeting Breast Cancer Metastasis*. Breast Cancer (Auckl), 2015. **9**(Suppl 1): p. 23-34.
- [43] Higgins, M.J. and J. Baselga, *Targeted therapies for breast cancer*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3797-803.
- [44] Arteaga, C.L., et al., *Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **9**(1): p. 16-32.
- [45] Hicks, D.G. and S. Kulkarni, *HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools*. Am J Clin Pathol, 2008. **129**(2): p. 263-73.
- [46] Wang, J. and B. Xu, *Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2019. **4**: p. 34.
- [47] Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
- [48] Yu, D., *Mechanisms of ErbB2-mediated paclitaxel resistance and trastuzumab-mediated paclitaxel sensitization in ErbB2-overexpressing breast cancers*. Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 12-7.
- [49] Garrido-Castro, A.C., N.U. Lin, and K. Polyak, *Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment*. Cancer Discov, 2019. **9**(2): p. 176-198.
- [50] Elsayaf, Z. and H.P. Sinn, *Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations*. Breast Care (Basel), 2011. **6**(4): p. 273-278.
- [51] Andre, F. and C.C. Zielinski, *Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents*. Ann Oncol, 2012. **23** Suppl 6: p. vi46-51.

- [52] van Denderen, B.J. and E.W. Thompson, *Cancer: The to and fro of tumour spread*. Nature, 2013. **493**(7433): p. 487-8.
- [53] Williams, E.D., et al., *Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(12): p. 716-732.
- [54] Prasetyanti, P.R. and J.P. Medema, *Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 41.
- [55] Siersbaek, R., et al., *IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor alpha Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis*. Cancer Cell, 2020. **38**(3): p. 412-423 e9.
- [56] Brown, D.M. and E. Ruoslahti, *Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis*. Cancer Cell, 2004. **5**(4): p. 365-74.
- [57] Chen, J., et al., *CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3*. Cancer Cell, 2011. **19**(4): p. 541-55.
- [58] Jahanban-Esfahlan, R., et al., *Tumor Cell Dormancy: Threat or Opportunity in the Fight against Cancer*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8).
- [59] Jahanban-Esfahlan, R., et al., *Combination of nanotechnology with vascular targeting agents for effective cancer therapy*. J Cell Physiol, 2018. **233**(4): p. 2982-2992.
- [60] Jahanban-Esfahlan, R., K. Seidi, and N. Zarghami, *Tumor vascular infarction: prospects and challenges*. Int J Hematol, 2017. **105**(3): p. 244-256.
- [61] Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
- [62] Frisch, J., et al., *STIM-Orai Channels and Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
- [63] Denisenko, T.V., I.N. Budkevich, and B. Zhivotovsky, *Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma*. Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 117.
- [64] Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
- [65] Jahanban-Esfahlan, R., et al., *Modulating tumor hypoxia by nanomedicine for effective cancer therapy*. J Cell Physiol, 2018. **233**(3): p. 2019-2031.

- [66] Seidi, K., et al., *Tumor target amplification: Implications for nano drug delivery systems*. J Control Release, 2018. **275**: p. 142-161.
- [67] Ungefroren, H., et al., *Interaction of tumor cells with the microenvironment*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 18.
- [68] Li, W., et al., *Molecular alterations of cancer cell and tumour microenvironment in metastatic gastric cancer*. Oncogene, 2018. **37**(36): p. 4903-4920.
- [69] Tsao, A.S., et al., *Scientific Advances in Lung Cancer 2015*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(5): p. 613-638.
- [70] Cova, T., D.J. Bento, and S.C.C. Nunes, *Computational Approaches in Theranostics: Mining and Predicting Cancer Data*. Pharmaceutics, 2019. **11**(3).
- [71] da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, *Mast cell function: a new vision of an old cell*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(10): p. 698-738.
- [72] Shimasaki, N., A. Jain, and D. Campana, *NK cells for cancer immunotherapy*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(3): p. 200-218.
- [73] Ngambenjawong, C., H.H. Gustafson, and S.H. Pun, *Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2017. **114**: p. 206-221.
- [74] Wculek, S.K., et al., *Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(1): p. 7-24.
- [75] Ostrand-Rosenberg, S., *Myeloid derived-suppressor cells: their role in cancer and obesity*. Curr Opin Immunol, 2018. **51**: p. 68-75.
- [76] Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, *Natural and induced T regulatory cells in cancer*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 190.
- [77] Chen, Y., K.M. McAndrews, and R. Kalluri, *Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts*. Nat Rev Clin Oncol, 2021. **18**(12): p. 792-804.
- [78] Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
- [79] Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.

- [80] Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
- [81] Rajagopalan, S. and E.O. Long, *Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(50): p. 20596-601.
- [82] Munoz-Espin, D., et al., *Programmed cell senescence during mammalian embryonic development*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1104-18.
- [83] Storer, M., et al., *Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1119-30.
- [84] Jun, J.I. and L.F. Lau, *The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(7): p. 676-85.
- [85] Krizhanovsky, V., et al., *Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis*. Cell, 2008. **134**(4): p. 657-67.
- [86] Baker, D.J., et al., *Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(7): p. 825-36.
- [87] Baker, D.J., et al., *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 232-6.
- [88] van Deursen, J.M., *The role of senescent cells in ageing*. Nature, 2014. **509**(7501): p. 439-46.
- [89] Gorgoulis, V., et al., *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. Cell, 2019. **179**(4): p. 813-827.
- [90] Liu, J., et al., *Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing*. Cells, 2019. **8**(1).
- [91] Campisi, J., *Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. S27-31.
- [92] Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.

- [93] Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 20): p. 3613-22.
- [94] Chang, B.D., et al., *Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4291-6.
- [95] Krtofica, A., et al., *Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12072-7.
- [96] Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. **36**(3): p. 131-49.
- [97] Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
- [98] Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
- [99] Toyoshima, H. and T. Hunter, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*. Cell, 1994. **78**(1): p. 67-74.
- [100] Polyak, K., et al., *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
- [101] Coats, S., et al., *Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle*. Science, 1996. **272**(5263): p. 877-80.
- [102] Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
- [103] Nevins, J.R., *Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families*. Cell Growth Differ, 1998. **9**(8): p. 585-93.
- [104] Salama, R., et al., *Cellular senescence and its effector programs*. Genes Dev, 2014. **28**(2): p. 99-114.
- [105] d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(7): p. 512-22.

- [106] Gorgoulis, V.G. and T.D. Halazonetis, *Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(6): p. 816-27.
- [107] Halazonetis, T.D., V.G. Gorgoulis, and J. Bartek, *An oncogene-induced DNA damage model for cancer development*. *Science*, 2008. **319**(5868): p. 1352-5.
- [108] Passos, J.F., et al., *Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(5): p. e110.
- [109] de Lange, T., *Shelterin-Mediated Telomere Protection*. *Annu Rev Genet*, 2018. **52**: p. 223-247.
- [110] Shay, J.W. and W.E. Wright, *Telomeres and telomerase: three decades of progress*. *Nat Rev Genet*, 2019. **20**(5): p. 299-309.
- [111] Celeste, A., et al., *Genomic instability in mice lacking histone H2AX*. *Science*, 2002. **296**(5569): p. 922-7.
- [112] Ayrapetov, M.K., et al., *DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(25): p. 9169-74.
- [113] Acosta, J.C., et al., *A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(8): p. 978-90.
- [114] Demaria, M., et al., *An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA*. *Dev Cell*, 2014. **31**(6): p. 722-33.
- [115] Faget, D.V., Q. Ren, and S.A. Stewart, *Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2019. **19**(8): p. 439-453.
- [116] Kuilman, T. and D.S. Peeper, *Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(2): p. 81-94.
- [117] Chien, Y., et al., *Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity*. *Genes Dev*, 2011. **25**(20): p. 2125-36.
- [118] Sebastian, T., et al., *C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence*. *EMBO J*, 2005. **24**(18): p. 3301-12.

- [119] Garbers, C., et al., *Cellular senescence or EGFR signaling induces Interleukin 6 (IL-6) receptor expression controlled by mammalian target of rapamycin (mTOR)*. Cell Cycle, 2013. **12**(21): p. 3421-32.
- [120] Laberge, R.M., et al., *MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(8): p. 1049-61.
- [121] Hoare, M., et al., *NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(9): p. 979-92.
- [122] Davalos, A.R., et al., *p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes*. J Cell Biol, 2013. **201**(4): p. 613-29.
- [123] Dou, Z., et al., *Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer*. Nature, 2017. **550**(7676): p. 402-406.
- [124] Dorr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 421-5.
- [125] Kaplon, J., et al., *A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence*. Nature, 2013. **498**(7452): p. 109-12.
- [126] Narita, M., et al., *Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes*. Science, 2011. **332**(6032): p. 966-70.
- [127] Evangelou, K., et al., *Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens*. Aging Cell, 2017. **16**(1): p. 192-197.
- [128] Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
- [129] Shawi, M. and C. Autexier, *Telomerase, senescence and ageing*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(1-2): p. 3-10.
- [130] Toussaint, O., E.E. Medrano, and T. von Zglinicki, *Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes*. Exp Gerontol, 2000. **35**(8): p. 927-45.
- [131] Duan, J., et al., *Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(7): p. 1407-20.

- [132] Mallette, F.A., M.F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre, *The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence*. Genes Dev, 2007. **21**(1): p. 43-8.
- [133] Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan, *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 307-15.
- [134] Ferbeyre, G., et al., *Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3497-508.
- [135] Davis, T. and D. Kipling, *Assessing the role of stress signalling via p38 MAP kinase in the premature senescence of ataxia telangiectasia and Werner syndrome fibroblasts*. Biogerontology, 2009. **10**(3): p. 253-66.
- [136] Fripiat, C., et al., *Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(10): p. 1334-46.
- [137] Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
- [138] Nurmik, M., et al., *In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers*. Int J Cancer, 2020. **146**(4): p. 895-905.
- [139] Biffi, G. and D.A. Tuveson, *Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts*. Physiol Rev, 2021. **101**(1): p. 147-176.
- [140] Mavrogonatou, E., et al., *Down-Regulation of the Proteoglycan Decorin Fills in the Tumor-Promoting Phenotype of Ionizing Radiation-Induced Senescent Human Breast Stromal Fibroblasts*. Cancers (Basel), 2021. **13**(8).
- [141] Al-Khalaf, H.H., et al., *Senescent Breast Luminal Cells Promote Carcinogenesis through Interleukin-8-Dependent Activation of Stromal Fibroblasts*. Mol Cell Biol, 2019. **39**(2).
- [142] Zhang, H., K.H. Pan, and S.N. Cohen, *Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3251-6.
- [143] Shelton, D.N., et al., *Microarray analysis of replicative senescence*. Curr Biol, 1999. **9**(17): p. 939-45.
- [144] Kuilman, T., et al., *Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1019-31.

- [145] Lujambio, A., et al., *Non-cell-autonomous tumor suppression by p53*. Cell, 2013. **153**(2): p. 449-60.
- [146] Ohtani, N., *The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis?* Inflamm Regen, 2022. **42**(1): p. 11.
- [147] Tonnessen-Murray, C.A., G. Lozano, and J.G. Jackson, *The Regulation of Cellular Functions by the p53 Protein: Cellular Senescence*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(2).
- [148] Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. Genes Dev, 2010. **24**(22): p. 2463-79.
- [149] Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.
- [150] Hornsby, P.J., *Cellular senescence and tissue aging in vivo*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2002. **57**(7): p. B251-6.
- [151] Baker, D.J., et al., *Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan*. Nature, 2016. **530**(7589): p. 184-9.
- [152] 152. Chang, B.D., et al., *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3761-7.
- [153] 153. Shay, J.W. and I.B. Roninson, *Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2919-33.
- [154] Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence*. J Cell Biol, 2011. **192**(4): p. 547-56.
- [155] Maciel-Baron, L.A., et al., *Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli*. Age (Dordr), 2016. **38**(1): p. 26.
- [156] Kipling, D., et al., *A transcriptomic analysis of the EK1.Br strain of human fibroblastoid keratocytes: the effects of growth, quiescence and senescence*. Exp Eye Res, 2009. **88**(2): p. 277-85.
- [157] Tchkonja, T., et al., *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 966-72.

- [158] Davaapil, H., J.P. Brockes, and M.H. Yun, *Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development*. Development, 2017. **144**(1): p. 106-114.
- [159] Xue, W., et al., *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 656-60.
- [160] Lecot, P., et al., *Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development*. Br J Cancer, 2016. **114**(11): p. 1180-4.
- [161] Perez-Mancera, P.A., A.R. Young, and M. Narita, *Inside and out: the activities of senescence in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 547-58.
- [162] Collado, M., et al., *Tumour biology: senescence in premalignant tumours*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 642.
- [163] Haugstetter, A.M., et al., *Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer*. Br J Cancer, 2010. **103**(4): p. 505-9.
- [164] Vizioli, M.G., et al., *Evidence of oncogene-induced senescence in thyroid carcinogenesis*. Endocr Relat Cancer, 2011. **18**(6): p. 743-57.
- [165] Chang, J., et al., *Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice*. Nat Med, 2016. **22**(1): p. 78-83.
- [166] Orjalo, A.V., et al., *Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 17031-6.
- [167] Gardner, S.E., et al., *Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1alpha-Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(9): p. 1963-74.
- [168] Munoz-Espin, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 482-96.
- [169] Nelson, G., et al., *The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF-kappaB signalling*. Mech Ageing Dev, 2018. **170**: p. 30-36.
- [170] Rakhra, K., et al., *CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation*. Cancer Cell, 2010. **18**(5): p. 485-98.
- [171] Braumuller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. Nature, 2013. **494**(7437): p. 361-5.

- [172] Koosha, S., et al., *An Association Map on the Effect of Flavonoids on the Signaling Pathways in Colorectal Cancer*. Int J Med Sci, 2016. **13**(5): p. 374-85.
- [173] Ye, Q., et al., *Reversal of Multidrug Resistance in Cancer by Multi-Functional Flavonoids*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 487.
- [174] Hui, C., et al., *Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54318.
- [175] Hua, X., et al., *Association among Dietary Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Ovarian Cancer Risk: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151134.
- [176] Cui, L., et al., *Flavonoids, Flavonoid Subclasses, and Esophageal Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies*. Nutrients, 2016. **8**(6).
- [177] Chang, H., et al., *Dietary Flavonoids and the Risk of Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies*. Nutrients, 2018. **10**(7).
- [178] Bo, Y., et al., *Dietary flavonoid intake and the risk of digestive tract cancers: a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24836.
- [179] Panche, A.N., A.D. Diwan, and S.R. Chandra, *Flavonoids: an overview*. J Nutr Sci, 2016. **5**: p. e47.
- [180] Dixon, R.A. and D. Ferreira, *Genistein*. Phytochemistry, 2002. **60**(3): p. 205-11.
- [181] Nishimura, S., et al., *Structures of 4-aryl-coumarin (neoflavone) dimers isolated from Pistacia chinensis BUNGE and their estrogen-like activity*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2000. **48**(4): p. 505-8.
- [182] Kokuritsu Kagaku, H., *Bulletin of the National Museum of Nature and Science*. 2007, National Museum of Nature and Science: Tokyo. p. v. : ill. (some col.).
- [183] Nihon Shokubutsu, G., *Abstracts from the 65th annual meeting of the Botanical Society of Japan, University of Tokyo 27-29 September 2001*, in *Journal of plant research vol.114 supplement*. 2001, Botanical Society of Japan: Tokyo. p. 200p.

- [184] Szkudelska, K. and L. Nogowski, *Genistein--a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **105**(1-5): p. 37-45.
- [185] Liu, R.H., *Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet*. Adv Nutr, 2013. **4**(3): p. 384S-92S.
- [186] Ji, Y. and W. Zhang, *Th17 cells: positive or negative role in tumor?* Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(7): p. 979-87.
- [187] Kumar, S. and A.K. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 162750.
- [188] Zhu, L. and L. Xue, *Kaempferol Suppresses Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Breast Cancer Cells*. Oncol Res, 2019. **27**(6): p. 629-634.
- [189] Androutsopoulos, V.P., et al., *Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation*. Oncol Rep, 2009. **21**(6): p. 1525-8.
- [190] Huang, L., K. Jin, and H. Lan, *Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase*. Oncol Lett, 2019. **17**(4): p. 3842-3850.
- [191] Zhang, X., et al., *Beyond a chemopreventive reagent, aspirin is a master regulator of the hallmarks of cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2019. **145**(6): p. 1387-1403.
- [192] Pham, T.H., et al., *Apigenin, a Partial Antagonist of the Estrogen Receptor (ER), Inhibits ER-Positive Breast Cancer Cell Proliferation through Akt/FOXMI Signaling*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(1).
- [193] Wang, W., et al., *Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 27016-23.
- [194] Jin, H., et al., *Morin, a flavonoid from Moraceae, suppresses growth and invasion of the highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 partly through suppression of the Akt pathway*. Int J Oncol, 2014. **45**(4): p. 1629-37.
- [195] Seufi, A.M., et al., *Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**(1): p. 80.

- [196] Song, L., et al., *Icariin-induced inhibition of SIRT6/NF-kappaB triggers redox mediated apoptosis and enhances anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer*. *Cancer Sci*, 2020. **111**(11): p. 4242-4256.
- [197] Jiang, Y., et al., *Inhibitory effect of luteolin on the angiogenesis of chick chorioallantoic membrane and invasion of breast cancer cells via downregulation of AEG-1 and MMP-2*. *Sheng Li Xue Bao:[Acta Physiologica Sinica]*, 2013. **65**(5): p. 513-518.
- [198] Naif, H.M., et al., *Association of Cytochrome CYP1A1 Gene Polymorphisms and Tobacco Smoking With the Risk of Breast Cancer in Women From Iraq*. *Front Public Health*, 2018. **6**: p. 96.
- [199] Warren, C.F.A., M.W. Wong-Brown, and N.A. Bowden, *BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(3): p. 177.
- [200] Chipuk, J.E., et al., *The BCL-2 family reunion*. *Mol Cell*, 2010. **37**(3): p. 299-310.
- [201] Youn, H.S., et al., *Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(7): p. 850-9.
- [202] Fraga, C.G., et al., *Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols*. *Mol Aspects Med*, 2010. **31**(6): p. 435-45.
- [203] Kopustinskiene, D.M., et al., *Flavonoids as Anticancer Agents*. *Nutrients*, 2020. **12**(2).
- [204] Raffa, D., et al., *Recent discoveries of anticancer flavonoids*. *Eur J Med Chem*, 2017. **142**: p. 213-228.
- [205] Park, M.Y., et al., *Function and Application of Flavonoids in the Breast Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(14).
- [206] Ross, J.A. and C.M. Kasum, *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*. *Annu Rev Nutr*, 2002. **22**: p. 19-34.
- [207] Chan, T.S., et al., *Simultaneous detection of the antioxidant and pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system*. *Free Radic Res*, 2003. **37**(7): p. 787-94.
- [208] Hempel, J., et al., *Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats*. *Nahrung*, 1999. **43**(3): p. 201-4.

- [209] Shimoi, K., et al., *Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans*. FEBS Lett, 1998. **438**(3): p. 220-4.
- [210] Le Marchand, L., *Cancer preventive effects of flavonoids--a review*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**(6): p. 296-301.
- [211] Lin, Y., et al., *Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(7): p. 634-46.
- [212] Knekt, P., et al., *Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms*. Am J Epidemiol, 1997. **146**(3): p. 223-30.
- [213] Neuhouser, M.L., *Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies*. Nutr Cancer, 2004. **50**(1): p. 1-7.
- [214] Gao, G., et al., *Luteolin exhibits anti-breast cancer property through up-regulating miR-203*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019. **47**(1): p. 3265-3271.
- [215] Ahmed, S., et al., *Apoptosis induced by luteolin in breast cancer: Mechanistic and therapeutic perspectives*. Phytomedicine, 2019. **59**: p. 152883.
- [216] Sui, J.-Q., K.-P. Xie, and M.-J. Xie, *Inhibitory effect of luteolin on the proliferation of human breast cancer cell lines induced by epidermal growth factor*. Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica], 2016. **68**(1): p. 27-34.
- [217] Monti, E., et al., *Luteolin impairs hypoxia adaptation and progression in human breast and colon cancer cells*. Eur J Pharmacol, 2020. **881**: p. 173210.
- [218] Lee, E.J., S.Y. Oh, and M.K. Sung, *Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(11): p. 4136-43.
- [219] Cook, M.T., et al., *Luteolin inhibits progesterin-dependent angiogenesis, stem cell-like characteristics, and growth of human breast cancer xenografts*. Springerplus, 2015. **4**: p. 444.
- [220] Chung, Y.M., et al., *Replicative senescence induced by Romo1-derived reactive oxygen species*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33763-71.

- [221] Chen, Q. and B.N. Ames, *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4130-4.
- [222] Gerasymchuk, M., et al., *Modeling of the Senescence-Associated Phenotype in Human Skin Fibroblasts*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(13).



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : İklima KIZILTOPRAK

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2021, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Yüksek lisans** : 2023, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

2022-2023 Bap Projesi, Luteolinin Meme Kanseri Hücrelerine ve Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipine Karşı Parakrin Etkilerinin Araştırılması

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Kızıltoprak İ., Akbaş F. “Luteolinin Meme Kanseri Hücrelerine ve Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipine Karşı Parakrin Etkilerinin Araştırılması” 8.Uluslararası Akademik Çalışmalar ve Öğrenci Kongresi, İstanbul, Türkiye, 27-28 Mayıs 2023, ss 41-51