



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**GLUTAMİNOLİZ VE GLİKOLİZİN
İNHİBİSYONLARININ MEME KANSERİ HÜCRE
MODELİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Zeynep ÖZİLERİ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**GLUTAMİNOLİZ VE GLİKOLİZİN
İNHİBİSYONLARININ MEME KANSERİ HÜCRE
MODELİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep ÖZİLERİ

Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ
İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Besra ÖZMEN
YELKEN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ

(Danışman)

Üye : Dr.Öğr. Üyesi Ayşegöl

DALMIZRAK

Üye : Doç.Dr. Çığır BİRAY AVCI

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Yüksek lisans öğrenimim maalesef ki COVID-19 pandemisi ile başladı ve yaklaşık bir sene uzaktan eğitim ile öğrenim sürecime devam ettim. Tez aşamasının başlangıcında yüz yüze eğitime geçilmesiyle aktif olarak laboratuvarlarımızda görev almaya ve hücre kültürü ve moleküler tekniklerin olduğu çalışmalara katılmaya başladım. Tez konumu belirleme aşamasında ilgi duyduğum ve çalışmak istediğim konu olan kanser alanında araştırmalar ve literatür taramaları yapmaya başladım. Yaptığım literatür taramalarında ise ileri evre kanser hücrelerinin glutamin bağımlılığını gösteren çalışmalar ve kanser metabolizmasında glutaminaz inhibitörlerinin uygulamasının umut veren çalışmaları oldukça dikkatimi çekti. Metabolik bir yolağın çoğu kanser türüne de katkıda bulunabileceği ve bu yolağın inhibisyonunun etkili olabileceğini öngörerek hücre kültürü ve moleküler tekniklerin uygulanabilirliğini danışanıma sundum. Glutaminaz inhibitörlerinin uygulanabilirliğinin olması için öncelikle seçtiğimiz kanser türü olan meme kanseri hücre hatlarında glutaminaz ekspresyonlarının olup olmadığını görmek için ekspresyon analizi yaparak bir ön çalışma yaptım. Glutaminaz ekspresyonunun meme kanseri hücre hatlarında bulunmasının ardından tez konusunu biraz daha genişletip başka bir metabolik yolağın daha inhibisyonunun uygulanabilirliğini araştırdım. Danışmanım ile yaptığımız çalışmalar sonucunda meme kanserinde glutaminoliz ve glikoliz mekanizmalarının eş zamanlı inhibisyonunu araştırabileceğimiz bir deney tasarımı için uygun inhibitörler, uygun hücre hatları ve uygun teknikler araştırdım. Tez çalışmamın onayından sonra hücre kültürü çalışmalarına başladım ve deney tasarımına göre kademe kademe ilerleyerek tez çalışmamı tamamladım.

İzmir, 14.09.2022

Zeynep ÖZİLERİ

Özet

Glutaminoliz ve Glikolizin İnhibisyonlarının Meme Kanseri Hücre Modelinde

Antikanser Etkilerinin Araştırılması

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve proliferasyon ile karakterize, karmaşık ve heterojen özellikler gösteren çok aşamalı bir hastalıktır. Kanser türleri köken aldıkları organ veya dokuya göre farklılıklar göstermekte ve bu farklılıklar da hücre tipine göre farklı prognoz, terapötik hedef ve tedavi çeşitlerini gerektirmektedir. Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerden farklı metabolik gereksinimler gösterirler ve metabolizmalarındaki değişiklikler proliferasyona ve makro moleküllerin biyosentezine katkıda bulunmaktadır.

Kanser hücrelerinin büyüme ve sağkalım için pek çok bileşene ihtiyaç duymasına rağmen temelde iki ana besin maddesi olmazsa olmazdır: glikoz ve glutamin. Kanser hücrelerinin değişen metabolizmalarında yüksek seviyelerde glutamin tüketimi gözlemlenmektedir. Kanser tedavisinde glutamin metabolizmasını hedefleyen çalışmalarda Glutaminaz 1 ile ilgili farklı kanser türlerinde pek çok çalışma yapılmış ve GLS1'in sağkalım ve büyümeyi desteklediği öne sürülmüştür. Ancak, glutaminaz izoformu Glutaminaz 2'nin (GLS2) kanser hücrelerindeki rolü hala belirsizdir. Glutaminazın inhibisyonunda kullanılan en etkili bileşen BPTES çeşitli kanser türlerinde diğer inhibitörlere kıyasla üstün performans göstermektedir.

Glutamin metabolizmasının yanı sıra glikoliz metabolizması da kanser hücrelerinde oldukça önemlidir. Glikolizin anahtar regülatör enzimlerinden birisi olan 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bifosfataz (PFKFB), fruktoz-2, 6-bifosfatın (F26BP) hem sentezinden hem de degradasyonundan sorumludur. PFKFB'nin dört adet izoformu bulunmakta ve bunlar içinden en çok öne çıkan PFKFB3'tür ve birçok insan tümörlerinde aşırı ifade edilmektedir. Ayrıca PFKFB3'ün diğer izoformlara göre yüksek kinaz aktivitesi bulunmakta ve özellikle kanser tedavisinde glikolizi hedef almakta oldukça öne çıkmaktadır. PFKFB3'ün kinaz aktivitesinin küçük inhibitör moleküller ile inhibisyonu kanser tedavilerinin çalışmaları için gelecek vaat etmektedir. PFKFB3'ün spesifik inhibitörlerinden biri olan PFK15 çeşitli kanser türlerinde antitümör etkiler göstermiştir ve kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel hedef olabilmektedir.

Meme kanseri, meme epitel hücrelerindeki genetik farklılaşmalar sonucunda ortaya çıkan ve oldukça heterojen özellikler sergileyen bir hastalıktır. Tedavi genellikle cerrahi müdahale, radyasyon terapisi ve ilaç tedavilerinin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır. Terapilerde, çoğu kanser çeşidinde değişkenlik gösteren hücresel metabolizma ara ürünlerini hedef alan çalışmalar son zamanlarda artmaktadır.

Kanser hücrelerinin metabolizmasında anahtar rolü olan glikoliz ve glutaminolizin, BPTES ve PFK15 ajanlarının kombinasyonu aracılı baskılanmasıyla, meme kanseri hücre modelinde proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda; meme kanseri hücre modelinde BPTES ve PFK15'in sitotoksitesi belirlenecek, BPTES+PFK15 kombinasyonunun apoptoz üzerine etkileri araştırılacaktır. Ayrıca, GLS2 transkripsiyon faktörü GATA3 ve aktivatörü MYCN'nin ekspresyon seviyeleri mRNA düzeyinde belirlenecektir. Son aşamada BPTES+PFK15 kombinasyonunun meme kanseri hücre hatlarında glikoliz ve glutaminoliz mekanizmaları üzerine etkisi değerlendirilecektir. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun meme kanseri ve daha sonrasında diğer solid kanser türlerinde de mevcut tedavilere katkıda bulunması hususunda ileri araştırmaların yapılmasına olarak sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler; Meme Kanseri, Kanser Metabolizması, Glikoliz, Glutaminoliz, BPTES, PFK15

Abstract

Investigation of Anticancer Effects of Inhibitions of Glutaminolysis and Glycolysis in a Breast Cancer Cell Model

Cancer is a multistage disease characterized by uncontrolled cell growth and proliferation, with complex and heterogeneous features. Cancer types differ according to the organ or tissue they originate from, and these differences require different prognosis, therapeutic targets and treatment types according to the cell type. Cancer cells show different metabolic requirements than healthy cells, and changes in their metabolism contribute to proliferation and biosynthesis of macromolecules.

Although cancer cells require many components for growth and survival, two main nutrients are essential: glucose and glutamine. High levels of glutamine consumption are observed in the altered metabolism of cancer cells. In studies targeting glutamine metabolism in cancer treatment, many studies have been conducted on Glutaminase 1 in different cancer types and it has been suggested that GLS1 supports survival and growth. However, the role of the glutaminase isoform Glutaminase 2 (GLS2) in cancer cells is still unclear. BPTES, the most effective ingredient used in the inhibition of glutaminase, shows superior performance in various cancer types compared to other inhibitors.

In addition to glutamine metabolism, glycolysis metabolism is also very important in cancer cells. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase (PFKFB), one of the key regulatory enzymes of glycolysis, is responsible for both the synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate (F26BP). There are four isoforms of PFKFB, the most prominent of which is PFKFB3, which is overexpressed in many human tumors. In addition, PFKFB3 has higher kinase activity compared to other isoforms and is particularly prominent in targeting glycolysis in cancer treatment. Inhibition of the kinase activity of PFKFB3 with small inhibitor molecules is promising for studies of cancer treatments. PFK15, one of the specific inhibitors of PFKFB3, has shown antitumor effects in various cancer types and may be a potential target that can be used in cancer therapy.

Breast cancer is a disease that occurs as a result of genetic differentiation in breast epithelial cells and exhibits highly heterogeneous features. Treatment is usually a combination of surgery, radiation therapy, and drug treatments. In therapies, studies

targeting cellular metabolism intermediates, which vary in most cancer types, have been increasing recently.

It is aimed to inhibit proliferation and induce apoptosis in a breast cancer cell model by suppressing glycolysis and glutaminolysis, which have key roles in the metabolism of cancer cells, by the combination of BPTES and PFK15 agents. In accordance with this purpose; The cytotoxicity of BPTES and PFK15 in breast cancer cell model will be determined, and the effects of BPTES+PFK15 combination on apoptosis will be investigated. In addition, the expression levels of the GLS2 transcription factor GATA3 and its activator MYCN will be determined at the mRNA level. In the final stage, the effect of BPTES+PFK15 combination on glycolysis and glutaminolysis mechanisms in breast cancer cell lines will be evaluated. The combination of BPTES and PFK15 will enable further research to be conducted on the contribution of the existing treatments in breast cancer and later in other types of solid cancer.

Keywords; Breast Cancer, Cancer Metabolism, Glycolysis, Glutaminolysis, BPTES, PFK15

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Kısaltma Listesi	XII
Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	1
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
Genel Bilgiler	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	3
2.3. Kanser Metabolizması	4
2.4. Glikoz Metabolizması ve Kanser	6
2.5. Glutamin Metabolizması ve Kanser	7
2.6. Meme Kanseri Metabolizması	8
2.7. Glutaminaz İnhibitörleri	9
2.8. Glikoliz İnhibitörleri.....	10
Gereç ve Yöntem	12
3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem	12
3.2. Araştırmanın Değişkenleri	12
3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	12
3.4. Veri Toplama Araçları ve Uygulamaları	12
3.5. Veri Analizi	12
3.6. Araştırma Etiği.....	13
3.7. Hücre Kültürü	13
3.8. Dondurulan Hücre Hatlarının Çözdürülmesi	15

3.9. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi	16
3.10. Hücre Hatlarının Pasaj İşlemleri.....	17
3.11. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması.....	18
3.12. Etken maddenin hazırlanması	20
3.13. Sitotoksikite testleri- Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi-xCELLigence (RTCA-SP).....	20
3.14. Meme Kanseri Hücre Hatlarında BPTES PFK15 IC₅₀ Değerlerinin ve BPTES+PFK15 Kombinasyonunun Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi.....	25
3.15. Ekspresyon Analizi	28
Bulgular.....	34
4.1. Etken Maddelerin Hücre Hatlarının Canlılığı Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	34
4.1.1. BPTES'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri	34
4.1.2. BPTES'in MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri.....	35
4.1.3. PFK15'in MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri	35
4.1.4. PFK15'in MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri.....	36
4.2. İzobologram Analizi.....	38
4.3. BPTES ve PFK15 Etken Maddelerinin ve BPTES+PFK15 Kombinasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatları Üzerinde Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	45
4.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında BPTES IC₅₀, PFK15 IC₅₀ değerlerinin ve BPTES+PFK15 Kombinasyonunun Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	49
Tartışma	51
Sonuç ve Öneriler.....	62
Kaynaklar	63
Teşekkür	68
Özgeçmiş	69

Tablolar Dizini

Tablo 1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ortam ve eklerin isim ve oranları	15
Tablo 2. Sitotoksosite deneylerinde MDA-MB-231 hücre hattına kullanılan etken madde dozları	23
Tablo 3. Sitotoksosite deneylerinde MDA-MB-231 hücre hattına kullanılan etken madde dozları	23
Tablo 4. Kombinasyon analizi için MCF-7 hücre hattına uygulanan etken madde konsantrasyonları	24
Tablo 5. Kombinasyon analizi için MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan etken madde konsantrasyonları.....	24
Tablo 6. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına ekspresyon analizi için uygulanan etken madde dozları	28
Tablo 7. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına ekspresyon analizi için uygulanan etken madde dozları	30
Tablo 8. BPTES ve PFK15 etken maddelerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği	37
Tablo 9. PFKFB3, GATA3, MYC, MYCN ve GLS2 ekspresyonlarının MCF-7 hücre modelinde kat değişimleri	49
Tablo 10. PFKFB3, GATA3, MYC, MYCN ve GLS2 ekspresyonlarının MDA-MB-231 hücre modelinde kat değişimleri	50

Şekiller Dizini

Şekil 1. BPTES etken maddesinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği.....	34
Şekil 2. BPTES etken maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği.....	35
Şekil 3. PFK15 etken maddesinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği.....	36
Şekil 4. PFK15 etken maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği.....	37
Şekil 5. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 24. saat normalize izobologram analizi.....	39
Şekil 6. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 24. saat doz-etki eğrisi.....	39
Şekil 7. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 48. saat normalize izobologram analizi.....	40
Şekil 8. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 48. saat doz-etki eğrisi.....	40
Şekil 9. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 72. saat normalize izobologram analizi.....	41
Şekil 10. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 72. saat doz-etki eğrisi.....	41
Şekil 11. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 24. saat normalize izobologram analizi.....	42
Şekil 12. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 24. saat doz-etki eğrisi.....	42
Şekil 13. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 48. saat normalize izobologram analizi.....	43
Şekil 14. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 48. saat doz-etki eğrisi.....	43
Şekil 15. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 72. saat normalize izobologram analizi.....	44
Şekil 16. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 72. saat doz-etki eğrisi.....	44

Şekil 17. MCF-7 hücre hattında apoptotik etkilerin incelenmesi 46

Şekil 18. MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik etkilerin incelenmesi..... 48



Kısaltma Listesi

α -KG	: α -Ketoglutarat
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
BPTES	: Bis-2-(5-fenilasetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sülfür
ER	: Östrojen reseptörü
F1,6BP	: Fruktoz-1,6-bisfosfat
F26BP	: Fruktoz-2, 6-bifosfat
F6P	: Fruktoz-6-fostat
FDG-PET	: F-deoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi
G6P	: Glikoz-6-fosfat
GAC	: Glutaminaz C
GLS	: Glutaminaz
GLS1	: Glutaminaz 1
GLS2	: Glutaminaz 2
HER2	: İnsan epitel büyüme faktörü
KGA	: Böbrek tipi glutaminaz
PEP	: Fosfofenol-pirüvat
PFK-1	: Fosfofruktokinaz-1
PFK15	: 1-(4-Pyridinyl)-3-(2-quinolinyl)-2-propen-1-one
PFKFB	: 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bifosfataz
PR	: Progesteron reseptörü
ROS	: Reaktif oksijen türlerinin
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Kanser çok aşamalı bir hastalık olup, kanser hücreleri kontrolsüz ve hızlı bir şekilde proliferasyona uğramaktadır ve bu nedenle kanser hücrelerinde metabolik süreçlerde de farklılıklar bulunmaktadır. Çoğu kanser hücresinde artan glikoliz ve anabolik yollar yönünden anormal metabolizma özellikleri gözlemlenmektedir. Kanser hücrelerinin anormal metabolizması hem genetik mutasyonların fenotipi olarak ortaya çıkmakta hem de tümör sinyal iletim yollarını ve hücrel reaksiyonlarını doğrudan etkilemektedir. Kanser hücreleri ATP üretimi ve biyosentez mekanizmalarını yeniden düzenlerler ve bu hücrelerin metabolizmalarındaki değişiklikleri hedefleyen moleküller potansiyel terapötik ilaç adaylarıdır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Kanser hücrelerinin değişen metabolizmasında önemli rol oynayan glikoliz ve glutaminoliz mekanizmalarının BPTES ve PFK15 etken maddelerinin uygulanması ile eş zamanlı inhibisyonunun meme kanseri hücre modelinde antikanser etkileri incelenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda inhibitörlerin kombinasyonunun kanser hücrelerinin canlılığını ne ölçüde etkileyeceği ve ilgili gen ekspresyonlarındaki farklılıklar araştırılacaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

BPTES ve PFK15 etken maddelerinin kombinasyonunun meme kanseri hücre hatlarında glikoliz ve glutaminoliz mekanizmalarını inhibe ederek antiproliferatif etkilerin bulunması beklenmektedir. Bu doğrultuda, BPTES ve PFK15 etken maddelerinin ve bu iki etken maddenin kombinasyonunun meme kanseri hücre modelinde çeşitli uygulamalarda hücre ölümüne yol açması beklenmektedir. Ayrıca glikoliz ve glutaminoliz mekanizmaları ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinde değişiklikleri analiz ederek, yeni metabolizma bazlı antikanser ilaçları için potansiyel terapötik hedefler oluşturmayı amaçlıyoruz.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Kanser hücrelerinin değişen metabolizma özelliklerine dayalı olarak, birçok çalışmada ve klinik deneylerde incelenen yeni nesil antikanser terapötikleri, kansere

özgü metabolik fenotipleri hedef almaktadır. Glutaminoliz inhibitörü BPTES'in meme kanseri de dahil olmak üzere çoğu kanser türlerinde anti-kanser etkileri bulunmaktadır. Benzer şekilde, glikoliz inhibitörü olan PFK15'in da çoğu kanser çeşidinde anti-proliferatif etkisi kanıtlanmıştır. Bu doğrultuda araştırılacak olan bu iki etken maddenin kombinasyonunun meme kanseri hücre hatlarında da benzer etkilere sahip olması beklenmekte ancak meme kanserinin farklı alt tiplerinde farklı sonuçlar elde edilmesi beklenmektedir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Meme kanserinin farklı alt tiplerinde farklı etkiler göstermesi beklenen BPTES ve PFK15 etken maddeleri ve bu iki etken maddenin kombinasyonunun genel olarak sinerjik etki göstermesi beklenmektedir. Ancak, sinerjik etki gözlemlenmediği takdirde önerilen doz aralıkları uygulanarak additif doz bulunmaya çalışılacaktır. Kombinasyon dozunun beklenenden çok hücre ölümüne sebep olması durumunda ise doz azaltma seçeneği uygulanacaktır. Gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir sonuç elde edilememesi durumunda ise alt yollar araştırılacaktır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Tez çalışmamızda kanser hücrelerinin metabolizmasında anahtar rolü olan glikoliz ve glutaminolizin, BPTES ve PFK15 etken maddelerinin kombinasyonu aracılı baskılanmasıyla, meme kanseri hücre modelinde proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi amaçlanmaktadır.

Genel Bilgiler

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir ve moleküler düzeyde heterojen özellikler gösteren bir hastalıktır (Harbeck vd., 2019). Erken tanı, önlem ve tedavi olanaklarının gelişmesine rağmen, meme kanseri vakalarının oranı her geçen gün artmakta ve kadınlarda ölüm nedenleri arasında başta gelmektedir. Erken evre (metastatik olmayan, memede bulunan veya yalnızca koltuk altı lenf düğümlerine yayılmış kanser) meme kanseri vakaları %70-80 oranında tedavi edilebilir kabul edilmekte ancak uzak organ metastazları olan ileri meme kanseri vakalarında tedavi olanakları oldukça zordur. Ancak ilerlemiş meme kanseri tedavisinde ana hedef, yaşam kalitesini sürdürmek veya iyileştirmek için sağkalımı uzatmak ve tedavi kaynaklı semptomları kontrol altına almaktır (Harbeck vd., 2019).

Diğer bir yandan, meme kanseri hormon reseptörlerinin durumuna veya belirli mutasyonların varlığına göre kategorize edilmekte ve buna göre de tedavi olanakları çeşitlilik göstermektedir. Ancak, genellikle kanser vakalarında tek bir hedeflenebilir mutasyon gözlemlenmemekte ve tümörün heterojen özellikler göstermesi sebebiyle uygulanan tedavilerde bütün kanser hücreleri yok edilememektedir. Böylelikle çoğu meme kanseri alt tipinde biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kanser ve metabolizma arasındaki ilişkiye yönelik araştırmalar ilgi çekmektedir (Geck & Toker, 2016).

2.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Dünya genelinde kadınlar arasında en çok gözlemlenen meme kanserleri ilerleme aşaması, tümör invazifliği ve hormonal reseptör durumuna göre birçok alt tipe kategorize olmuştur. Meme kanserlerinde öne çıkan üç tane hormon reseptörü genellikle aşırı ifade edilmekte ve oldukça düzensizlik göstermektedir. Bu hormon reseptörleri: östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epitel büyüme faktörü 2 (HER2)'dir. Bu hormon reseptörlerinin ifade edilmesine göre ise tedavi seçenekleri değişkenlik göstermektedir. ER+/PR+ meme kanserlerinde genellikle endokrin tedavileri uygulanırken, HER2+ meme kanserlerinde HER2 hedefli tedaviler uygulanmakta ve ER-/PR-/HER2- olarak sınıflandırılan üçlü negatif meme kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapiden faydalanan tedaviler tercih edilmektedir. Ayrıca meme kanserlerinin alt tipine ve aşamasına göre cerrahi

müdahale, cerrahi müdahale öncesi veya sonrası kemoterapi, radyoterapi veya endokrin terapisi uygulanan tedavi stratejileri olarak kullanılabilir. Radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarında DNA hasarı, hücre döngüsünün tutulması ve apoptozun indüklenmesi sağlanabilmektedir. Endokrin terapilerinde ise Tamoxifen ve Fulvestrant gibi ajanların kullanılmasıyla östrojen reseptörü bloke edilmekte ve anormal östrojen sinyallenmesi baskılanmaktadır. Benzer şekilde, Trastuzumab ajanının kullanılmasıyla HER2'nin aşırı ifadesi baskılanmaktadır (Moulder vd., 2018).

2.3. Kanser Metabolizması

Proliferatif kanser hücreleri, çoğu normal farklılaşmış hücreden önemli ölçüde farklı metabolik gereksinimler sergiler. Örneğin, kanser hücreleri yüksek çoğalma hızlarını desteklemek için ek besinleri tüketir ve bu besinleri makromoleküler sentez yollarına yönlendirir. Bu nedenle metabolik yollar, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını desteklemek için biyosentetik süreçleri yeterli ATP üretimi ile dengeleyecek şekilde yeniden düzenlenmelidir. Tüm kanser hücreleri metabolizmadaki bu değişikliğe bağlı olduğundan, bu değiştirilmiş yollar çekici terapötik hedefleri temsil eder. Ancak, normal çoğalan hücreler kanser hücreleriyle aynı metabolik gereksinimlere sahip olduklarından, çoğalan kanser hücreleri ile çoğalan normal hücreler arasında terapötik bir pencere bulmak, metabolik yolları hedefleyen başarılı kanser tedavilerinin geliştirilmesinde büyük bir zorluk olarak görülmektedir (Vander Heiden, 2011).

Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerin aksine düzensiz metabolizma sergilemektedir ve değişen enerji metabolizması normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümü için gerekli olmasının yanı sıra, kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Malign hücreler, oksijenin varlığına rağmen oksidatif fosforilasyon yerine adenosin trifosfat (ATP) üretmek için anaerobik glikoliz kullanır. Gelişmiş yağ asidi sentezi ve glutaminoliz de kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmayı destekleyen temel değişiklikleridir (Vander Heiden, 2011).

Hücresel süreçler için gerekli enerjiyi üretmek için öncelikle mitokondriyal oksidatif fosforilasyona dayanan normal farklılaşmış hücrelerin aksine, çoğu kanser hücresi bunun yerine “Warburg etkisi” olarak adlandırılan bir fenomen olan anaerobik glikolize yönelir. Anaerobik glikoliz, ATP üretiminin verimsiz bir yoludur ve kanser hücrelerine sağladığı avantaj belirsizdir. Kanser hücreleri ve aslında tüm çoğalan

hücreler metabolizmalarını, yeni bir hücre üretmek için gerekli olan besin maddelerinin (örneğin, nükleotidler, amino asitler ve lipitler) alınmasını ve biyokütleyle dahil edilmesini kolaylaştıracak şekilde uyarlamaktadır. Kansere ilişkili bazı mutasyonlar da verimli bir şekilde ATP üretimi yerine, hücre proliferasyonunu destekleyen bazı metabolik yolları aktive eder ve hücrenin çoğalmaya elverişli bir şekilde besinlerin metabolize edilmesine neden olurlar. Hücresel metabolizma ve büyüme kontrolü arasındaki mekanik bağlantıların daha iyi anlaşılması, nihayetinde insan kanseri için daha iyi tedavi olanaklarının sağlanmasını kolaylaştıracaktır (Liberti & Locasale, 2016).

Tek hücreli organizmalar için, besinler mevcut olduğunda mümkün olduğunca çabuk üremek için evrimsel bir baskı vardır. Metabolik kontrol sistemleri, yeterli bir besin kaynağı algılayacak ve gerekli karbon, nitrojen ve serbest enerjiyi yeni bir hücre üretmek için gerekli yapı taşlarını oluşturmaya yönlendirecek şekilde evrimleşmiştir. Besinler yetersiz olduğunda, hücreler biyokütle üretimini durdurur ve açlık döneminde hayatta kalmak için mevcut kaynaklardan maksimum serbest enerjiyi çıkarmak için metabolizmayı uyarırlar. Metabolik ihtiyaçlardaki bu temel farklılıkları yansıtan farklı düzenleyici mekanizmalar, çoğalan ve çoğalmayan hücrelerde hücresel metabolizmayı kontrol etmek için gelişmiştir (Liberti & Locasale, 2016) (Vander Heiden, Cantley & Thompson, 2009).

Çok hücreli organizmalarda, çoğu hücre sürekli bir besin kaynağına maruz kalır. Aşırı besin kaynağına maruz kaldığı durumlarda organizmanın hayatta kalması için anormal hücre çoğalmasını önleyen kontrol sistemleri gerektirir. Bu kontrol mekanizmaları sayesinde memeli hücreleri büyüme faktörleri tarafından uyarılmadıkça kontrolsüz çoğalma engellenir ve böylelikle çevrelerinden besin alamazlar. Kanser hücreleri ise, reseptör tarafından başlatılan sinyal yollarını işlevsel olarak değiştiren genetik mutasyonlar edinerek bu büyüme faktörü bağımlılığının üstesinden gelir. Bu yollardan bazılarının hem hücrenin hayatta kalmasını hem de hücre büyümesini destekleyen besinlerin alımını hızlandırarak metabolizmayı yapısal olarak aktive etmektedirler. Onkojenik mutasyonlar, hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli biyoenerjetik ihtiyaçları karşılayabilmek için özellikle glikoz gibi besinlerin hücre içi alımına sebep olabilmektedir (Vander Heiden, Cantley & Thompson, 2009).

2.4. Glikoz Metabolizması ve Kanser

Ana makromoleküllerden glikoz metabolizmasında, enerjinin karbon bağlarının oksidasyonu yoluyla Adenozin Tri Fosfat (ATP) biçiminde kullanılmasına izin verir. Bu süreç, tüm memeli yaşamını sürdürmek için gereklidir. Memelilerde, son ürün laktat veya mitokondride solunum yoluyla glikozun tam oksidasyonu üzerine karbondioksit olabilmektedir (Liberti & Locasale, 2016). Oksijen varlığında, sağlıklı doku hücreleri glikozu glikoliz yoluyla pirüvata metabolize eder ve daha sonra üretilen pirüvatin büyük bir kısmını oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondride karbondioksite metabolize eder. Anaerobik koşullar altında ise sağlıklı hücreler pirüvati mitokondride oksidatif fosforilasyona yönlendirmek yerine oksidasyona uğratarak laktata indirger (Cantor & Sabatini, 2012). Kanser hücreleri ise sağlıklı hücrelerden farklı olarak oksijen varlığında bile ATP sentezi için oksidatif fosforilasyon yerine anaerobik glikoliz yolunu tercih etmektedirler (Feng, Yu & Zhang, 2022). “Warburg Etkisi” olarak da bilinen bu fenomende hücreler oksijenden bağımsız olarak artmış glikoliz ve laktat üretimi ile karakterizedir (Vander Heiden, 2011). Otto Warburg’un 20.yüzyılın ilk yarısında gerçekleştirdiği çalışmalarından kaynaklanan temel paradigma, normal hücrelerin aksine proliferatif hücrelerin ATP üretimi açısından oksidatif fosforilasyona göre daha az verimli olmasına rağmen (~18 kat) oksijen varlığında bile glikozun laktata dönüştürüldüğü anaerobik glikolize yönelmelerine dayanmaktadır (Cantor & Sabatini, 2012). Birim glikoz başına, anaerobik glikoliz, mitokondriyal solunumla elde edilen miktarla karşılaştırıldığında ATP üretiminin verimsiz bir yoldur. Ancak, anaerobik glikoliz yoluyla glikoz metabolizmasının hızı, glikozdan laktat üretimi, mitokondride glikozun tam oksidasyonundan çok daha hızlı gerçekleşecek şekilde daha yüksektir. (Feng, Yu & Zhang, 2022). Warburg Etkisi 90 yılı aşkın bir süredir belgelenmiş ve son yıllarda nedenlerini veya işlevlerini belirlediğini bildiren binlerce makale ile kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ancak Warburg Etkisinin işlevi hala belirsizliğini korumaktadır (Liberti & Locasale, 2016).

Kanser hücreleri artan glikoliz gereksinimlerini karşılamak için artan glikoz alımına ve glikolizle ilişkili enzimlere ihtiyaç duyar (Feng, Yu & Zhang, 2022). Anaerobik glikolize sıklıkla artan glukoz alımı eşlik eder ve bu fenomen hastaların tümörlerinde F-deoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (FDG-PET) görüntüleme kullanılarak görüntülenebilir. FDG-PET, klinik olarak çeşitli kanser türleri için bir evreleme aracı

olarak kullanılır ve deneysel PET izleyicileri, kanser hücrelerini, kanser metabolizmasının diğer yönlerine dayalı olarak normal hücrelerden ayırt edebilir (Vander Heiden, 2011).

Ayrıca, artan yağ asitleri sentezi ve glutaminoliz kanser hücrelerinin limitsiz proliferasyonunu destekleyen önemli faktörlerdendir (Feng, Yu & Zhang, 2022). Tümörlerde gözlenen metabolik heterojenliğin bir kısmı, tümör mikro çevresinden etkilenmektedir. Anormal tümör damar yapısı, besin, oksijen ve pH gradyanlarına neden olabilir. Glikoz, amino asitler ve lipitler, metabolik yolları aktive etmek için substratları sağlar ve bu nedenle metabolizma, bu besinlerin hücrel mevcudiyetine bağlı olarak değişir. Ek olarak, hücrelerin sinyal mekanizmaları, amino asit mevcudiyeti ve oksijen seviyeleri gibi koşulları algılayan büyüme kontrol yollarıyla bağlantılıdır; bu sinyal mekanizmaları metabolizmayı da etkiler. Kanserle ilişkili genetik değişiklikler genellikle bu aynı sinyal yollarında meydana gelir, bu da hem çevresel hem de genetik faktörlerin tümörler arasında mevcut olan metabolik heterojenliği etkilediğini göstermektedir (Vander Heiden, 2011).

2.5. Glutamin Metabolizması ve Kanser

Sağlıklı hücrelerin metabolik programı, ATP üretimiyle homeostatik süreçleri sürdürmeye ve enerjik gereksinimlerini karşılamaya dayanır. Buna karşılık, kanser hücreleri yalnızca hücre replikasyonunu desteklemek için yeterli enerjiyi üretmemeli, aynı zamanda makromoleküler biyosentezin anabolik taleplerini karşılamalı ve artan toksik reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yanıt olarak hücrel redoks homeostazını sağlamalıdır. Tümör hücrelerinin büyümesi ve kalıcılığı da temel olarak bu gereksinimlerin toplamını karşılayan metabolik bir çözüm üretilmesine bağlıdır.

Glutamin, insan serumunda en çok bulunan serbest amino asittir. Proliferatif hücreler, nükleotidlerin, esansiyel olmayan amino asitlerin ve heksozaminlerin biyosentezi için nitrojen donörü olarak glutamin kullanır (Cantor & Sabatini, 2012). Glutaminin hücrelere alımı, bazı durumlarda tümörjenez için gerekli olan plazma membran taşıyıcıları tarafından kolaylaştırılır (Lukey vd., 2019). Bununla birlikte, proliferatif birçok hücre, bu nitrojen gereksinimlerinin ötesine geçen bir glutamin bağımlılığı sergiler. Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ayrıca çeşitli biyosentetik ve NADPH üreten yollarda substrat olarak hareket edebilen ara maddeler içerir. Kanser hücreleri, bu tükenmiş ara maddeleri anaplerosis adı verilen bir süreçle yenileyerek

TCA döngüsünü sürdürebilir. Glutaminin, glutamata deamidasyonu ve ardından glutamatın α -ketoglutarata (α -KG) dönüştürülmesi üzerine TCA döngüsüne girmesi yoluyla, çoğalan birçok hücrede metabolik olaylarda önemli bir karbon kaynağı olduğu bilinmektedir (Cantor & Sabatini, 2012).

Artan glutamin metabolizması (glutaminoliz), kanserin bir özelliğidir ve kanser hücrelerinde önemli bir metabolik değişiklik olarak kabul edilmektedir. Glutaminaz izoenzimleri (GLS ve GLS2), glutamin metabolizması için anahtar enzimlerdir (Masisi vd., 2020).

Memeli hücrelerinde glutaminazı kodlayan iki gen bulunmaktadır: GLS1 ve GLS2. Kanser tedavisinde glutamin metabolizmasını hedefleyen çalışmalarda Glutaminaz 1 (GLS1) ile ilgili farklı kanser türlerinde pek çok çalışma yapılmış ve GLS1'in sağkalım ve büyümeyi desteklediği öne sürülmüştür (Dias vd., 2019). GLS1'in böbrek tipi glutaminaz (KGA) ve glutaminaz C (GAC) olmak üzere iki ayrı varyantı bulunmakta ve yapılan çalışmalarda izoform değişiminin bazı kanser türlerinde terapi direncine katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (Xu vd., 2020). Ancak, glutaminaz izoformu Glutaminaz 2'nin (GLS2) kanser hücrelerindeki rolü hala belirsizdir (Lukey vd., 2019). GLS1'in ekspresyonu onkojenik transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir ve kanserdeki rolü iyi karakterize edilir ve tümörjenezini destekler (Masisi vd., 2020).

GLS2'nin karaciğer tipi glutaminaz (LGA) ve glutaminaz B (GAB) olmak üzere iki ayrı varyantı bulunmakta ve kanser progresyonundaki rolü tam olarak bilinmemektedir (Panina vd., 2021). GLS2 geni, p53'ün transkripsiyonel bir hedefidir ve glioblastoma ve karaciğer kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. Ancak, GLS2 ekspresyonu N-myc gibi onkoproteinler tarafından da düzenlenmektedir ve tümörjenezde görevli metabolik genlerden biri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda GLS2'nin meme kanserinde onko-destekleyici rolü olduğu ortaya konulmuş, ekspresyonunun GATA3 tarafından düzenlenerek gen ürününün, bazı meme kanseri alt tiplerinde hücre proliferasyonunu ve tümörjenezini desteklediği bildirilmiştir (Masisi vd., 2020).

2.6. Meme Kanseri Metabolizması

Meme kanseri hücreleri düzensiz metabolizma sergiler. Oksidatif fosforilasyon yerine anaerobik glikoliz ile adenosin trifosfat üretmek için artan glikoz alımı ve glikolizle ilişkili enzimler gerektirirler. Glutamin metabolizması ve yağ asidi sentezi

de hızlı ve sürekli hücre büyümesini karşılamak için geliştirilmiştir. Üçlü negatif meme kanseri ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2-pozitif meme kanserleri, artan glikoz ve glutamin metabolizması seviyeleri ile önemli metabolik yeniden programlama gösterir. Artan kanıtlar, mikro-ribonükleik asitlerin, meme kanseri hücrelerinin metabolik enzimlerinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli roller oynadığını da göstermektedir. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 ve östrojen reseptörü sinyal yolları, metabolik düzenleme ağında mikro-ribonükleik asitlerle çapraz etkileşime sahip olabilir (Feng, Yu & Zhang, 2022).

Meme kanseri, farklı morfolojik ve moleküler alt tipleri ve tedaviye yanıtları olan heterojen bir hastalıktır ve meme kanseri hücrelerinin, hayatta kalma ve çoğalmayı desteklemek için glutamin metabolizmasını yeniden düzenlediği bilinmektedir (Masisi vd., 2020).

2.7. Glutaminaz İnhibitörleri

Kanser hücrelerinin büyüme ve sağkalım için pek çok bileşene ihtiyaç duymasına rağmen temelde iki ana besin maddesi olmazsa olmazdır: glikoz ve glutamin. Kanser hücrelerinin değişen metabolizmalarında yüksek seviyelerde glutamin tüketimi gözlemlenmektedir. Bu metabolik değişikliklerle artmış mitokondriyal glutaminaz aktivitesi, glutaminin hızla glutamata dönüştürüldüğü biyoenerjetik ve biyosentetik proseslerde oldukça önemlidir (Ferreira vd., 2021). Glutamat biyosentetik süreçlerde glutatyon ve proline dönüşebilir veya deaminasyon sonucunda bir trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ara ürünü olan α -ketoglutarata (α -KG) dönüşebilir. Bu yolak kanser hücrelerinde yüksek oranda regüle edilmektedir ve glutaminin trikarboksilik asit döngüsünde oldukça önemli rolü bulunmaktadır (Panina vd., 2021) (Masisi vd., 2020).

Son zamanlarda, GLS ve GLS2'yi inhibe eden moleküller bulunmuştur. Bis-2-(5-fenilasetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil sülfür (BPTES) ve dibenzofenantridin-968 glutaminaz inhibitörlerine örnek olarak gösterilen küçük moleküllerdir. BPTES, minimum toksisiteye sahip güçlü bir glutaminaz inhibitörüdür. İnhibitör, glutamat veya glutamin ile yapısal benzerliklere sahip değildir ancak, GLS ile etkileştiği bölgede inaktif bir tetramer kompleksi oluşturur. Etkileşim olan bölge glutaminin katalize olduğu bölge değildir. Bu nedenle, GLS inhibisyonunda moleküler rekabet söz konusu değildir. Yapılan çalışmalara göre, BPTES çeşitli kanser türlerinde GLS

aktivitesini inhibe ederek glutamat ve α -KG seviyelerini azaltmış, TCA döngüsü ara ürünlerinin ve bunların aşağı akış ürünlerinin seviyelerinde azalmaya ve tümör büyümesinin yavaşlamasına neden olmuştur. Ayrıca BPTES'in, yüksek GLS aktivitesi ile bağlantılı bazı kanser çeşitlerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Masisi vd., 2020).

2.8. Glikoliz İnhibitörleri

Temel glikoliz basamakları glikozun oksijenden bağımsız bir şekilde iki pirüvat molekülüne dönüştürülmesine ve iki molekül ATP sentezlenmesine dayanmaktadır. Glikolizin alt basamaklarında oldukça önemli geri dönüşümsüz enzimatik reaksiyonlar gerçekleşir. Bu enzimatik reaksiyonlar 1) glikozun hekzokinaz tarafından glikoz-6-fosfata (G6P) dönüştürülmesi, 2) Fruktoz-6-fosfatın (F6P) PFK-1 tarafından fruktoz-1,6-bisfosfata (F1,6BP) dönüştürülmesi ve 3) fosfofenol-pirüvatın (PEP) pirüvat kinaz tarafından pirüvata dönüştürülmesi basamaklarıdır. Hekzokinaz reaksiyonu sonucunda oluşan G6P fruktoz-6-fosfat (F6P) veya glikojene dönüştürülebilir ve sonrasında NADPH ile enerji sağlanabilir ve pirüvat kinaz reaksiyonu sonucunda oluşan pirüvat laktata dönüştürülebilir veya direkt olarak mitokondride trikarboksilik asit döngüsünde katılabilir. Bu iki reaksiyon glikoliz için oldukça önem arz etmesine rağmen hız sınırlayıcı basamaklar değildir. PFK-1 reaksiyonu hem glikolizin birincil hız sınırlayıcı basamağı hem de kontrol noktası olma niteliğindedir ve kanser çalışmalarında hedef olarak kullanılabilir. PFK-1 allosterik olarak fruktoz-2, 6-bisfosfat (F26BP) tarafından aktive edilmekte ve artmış biyosentez ve glikoz tüketimine sebep olmaktadır (Wang, Qu, Liu & Wang, 2020). Artmış glikoz tüketimi ve metabolizması da neoplastik hücrelerin sağkalımını ve proliferasyonunu desteklemektedir (Clem vd., 2013). Glikolizin anahtar regülatör enzimlerinden birisi olan 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB), F26BP'nin hem sentezinden hem de degradasyonundan sorumludur (Lu vd., 2017). Bifonksiyonel PFKFB'nin iki farklı regülatör bölgesi bulunmakta ve ters etki göstermektedir; 2-Kase bölgesi kinaz aktivitesine sahip ve F6P'nin fosforilasyonundan sorumluyken, 2-Pase bölgesi fosfataz aktivitesine sahip ve F2,6BP'nin F6P'ye defosforilasyonundan sorumludur ve bu iki regülatör bölgenin çalışma oranlarına göre hücresel PFK-1 aktivitesi de belirlenebilmektedir. PFKFB belirli genler tarafından kodlanmakta ve dört ana izoformu bulunmaktadır (PFKFB1 – 4). İzofomlar arasında yüksek homoloji olmasına rağmen, her izoformun regülatör

ve kinetik özellikleri değişkenlik göstermektedir. Dört izoform içinden en çok öne çıkan PFKFB3'tür ve akciğer, meme, kolon, pankreas, yumurtalık, tiroit ve daha birçok insan tümörlerinde aşırı ifade edilmektedir. Ayrıca PFKFB3'ün diğer izoformlara göre yüksek kinaz aktivitesi bulunmakta ve özellikle kanser tedavisinde glikolizi hedef almakta oldukça öne çıkmaktadır (Wang, Qu, Liu & Wang, 2020). Küçük moleküler bir PFKFB3 inhibitörü olan PFK15, çeşitli hayvan modellerinde PFKFB3'e karşı güçlü ve seçici aktivitesi ve antitümör kapasitesi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda PFK15'in bazı kanser türlerinde hedefe yönelik metabolik etkilerinin varlığı ve antitümör etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Zhu vd., 2016).



Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırma Evreni ve Örneklem

Meme kanseri, kadınlarda en çok görülen kanser türlerinden biridir. Heterojen karakteristikte bir hastalık olması potansiyel tedavi çeşitliliğini arttırmakta ve her geçen gün yeni tedavi olanakları bulunmaktadır. Yapılacak olan çalışmada, meme kanserini metabolik yollardan hedefleyen BPTES ve PFK15 ajanlarının kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik analizleri değerlendirilecektir.

3.2. Araştırmanın Değişkenleri

BPTES ve PFK15 kombinasyonunun meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik değerleri bağımlı değişkenlerdir.

24, 48 ve 72 saatlik farklı süreler ve bu saatlerde uygulanacak BPTES'in konsantrasyonu aynı zamanda PFK15'in konsantrasyonu bağımsız değişkenlerdir.

3.3. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma 01.08.2021 - 01.08.2022 tarihlerinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Moleküler Analiz Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.4. Veri Toplama Araçları ve Uygulamaları

Tez çalışmasında MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılacaktır. Etken madde olarak BPTES ve PFK15 kemoterapötik ajan kullanılacaktır.

3.5. Veri Analizi

Sitotoksosite deneylerinde elde edilen absorbans verileri ile % hücre canlılığı ve % sitotoksosite değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanacaktır:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Etken madde uygulanmış kuyucuklardaki hücre canlılığı ortalaması}}{\text{Kontrol(etken madde uygulanmayan)kuyucuklardaki hücre canlılığı ortalaması}} \right) \times 100 \right]$$

Maddenin hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanan IC₅₀ değeri ve kombinasyon indeksi (CI) değeri CalcuSyn v.2.0 yazılımı ile belirlenecektir. Zaman ve konsantrasyona bağlı doz etki değerleri için sitotoksosite grafikleri Graphpad v.8.0 programı ile çizilecektir. Kontrol ve deney grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar Graphpad v.8.0 programında tek-yönlü ANOVA, ardından Dunnett's t-testi ile analiz edilecektir ve p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilecektir.

Etken maddelerin hücreler üzerindeki apoptotik etkisi Annexsin V-FITC yöntemi ile belirlenecektir. Sonuçlar için bölümümüzde bulunan Flow Sitometri cihazı BD Accuri C6 ve cihaza ait yazılım kullanılacaktır. Hücrelerin apoptoza girip girmediği, apoptoza girdiyse hangi boyutta etkilendiği ölçülecektir.

Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilecektir.

3.6. Araştırma Etiği

Yapılacak çalışma, meme kanseri hücre hatlarında ve sağlıklı meme epiteli hücre hattında in vitro ortamda gerçekleştirilecek olduğundan etik kurul onayı gerekmemektedir.

3.7. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, fizyolojik koşullarda ökaryotik veya prokaryotik hücrelerin büyümesini sağlayan laboratuvar yöntemlerini ifade eder. Hücre kültürü çalışmaları doku büyümesi ve olgunlaşması, virüs biyolojisi, aşı geliştirme, hastalıklara neden olan mekanizmaların anlaşılması ve biyofarmasötik maddelerin üretimi için büyük ölçekli hibrit hücre hatlarının kullanımı gibi pek çok amacı kapsamaktadır. Hücre kültürü deneysel uygulamaları in vitro olarak büyütülebilen hücre tipleri kadar çeşitlidir. Bununla birlikte, klinik bir bağlamda, hücre kültürü en yaygın olarak temel hücre biyolojisini inceleyen, hastalık mekanizmalarını kopyalayan veya yeni ilaç bileşiklerinin toksisitesini araştıran model sistemlerin oluşturulmasıyla bağlantılıdır. Bu uygulamalar için hücre kültürü kullanmanın avantajlarından biri, genleri ve moleküler yolları manipüle etme fizibilitesidir. Ayrıca, klonal hücre popülasyonlarının veya spesifik hücre tiplerinin ve iyi tanımlanmış kültür sistemlerinin homojenliği, müdahale eden genetik veya çevresel değişkenleri ortadan kaldırır ve bu nedenle, tüm organ sistemleri çalışılırken garanti edilemeyen yüksek tekrarlanabilirlik ve tutarlılık veri üretimine izin verir (Segeritz vd., 2017). Hücre

kültürü çalışmalarının etik kurul izni almadan araştırma olanağı sağlaması da diğer avantajlarından biridir. Bilimsel araştırma deneyleri kapsamında hücre kültürü teknikleri araştırarak konu ile ilgili temel birinci basamak bilgi edinmekte olanak sağlamaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında kullanılan luminal A meme kanser hücre hattı MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri hücre hattı-MDA-MB-231 Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ortamlar ve takviyeler L-Glutamin (Biological Industries Cat. No: 03-020-1B), Penisilin/Streptomisin (Biological industries Cat. No: 03-031 -1B), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries Cat. No: 04-127-1A), DMEM-High Glucose (Biological industries Cat. No: 01 -104-1A), L-15 (Biological industries Cat. No:01-115-1A) ve Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MEGM) (Promocell, Cat.No: 21010) Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Tez çalışmamızda kullanılan monolayer hücre hatları 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik filtreli kapaklı hücre kültürü flasklara aseptik koşullar altında ekilmiş ve yatay şekilde üretilmiştir. Hücrelerin bulunduğu flasklar %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde tüm deneylere yetecek sayıya ulaşana kadar kontaminasyondan uzak bir şekilde inkübe edilmiştir. Hücrelerin sayı ve canlılık takipleri inverted ve ışık mikroskoplarıyla gerçekleştirilmiştir. Tüm hücrelerin ortam değişimi, pasajlama, dondurma ve çözme işlemleri laminar akım kabininde aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamızda kullanılan hücrelerin ortamlar ve ortamlara eklenen takviyelerin oranları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ortam ve eklerin isim ve oranları

Hücre Hattı	Kullanılan Ortam	L-Glutamin	FBS	Penisilin/Streptomisin
MCF-7	DMEM-High Glucose	2 mM	%10	%1
MDA-MB- 231	L-15	2 mM	%10	%1

3.8. Dondurulan Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

Tez çalışmamızdaki hücre hatları Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda -86°C'de stoklanan hücre hatlarından çözdürülmüştür. Hücre çözdürme aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- -86°C'de bulunan kriyotüplerdeki hücreler -20°C'ye konulmuştur.
- 15 ml'lik falconlara ~ 7-10 ml kadar taze ortam eklenmiştir.
- 15 ml'lik falconlar içerisinde alınan taze ortam -20°C'den çıkarılan kriyotüpteki donmuş hücre üzerine eklenmiş ve pipetaj yapılarak çözdürülmüştür.
- Kriyotüp içerisindeki hücrelerin tamamı hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra taze ortam içeren 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.
- Hücreleri içeren 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, DMSO, FBS ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Dondurma aşamasında kullanılan DMSO'nun olabildiğince uzaklaştırılabilmesi için hücrelerin bulunduğu pellet kısmına tekrardan taze ortam eklenmiş ve santrifüj aşaması tekrar edilmiştir.

- Santrifüj sonrasında supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmış ve hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.
- 50 µl hücre ve 50 µl Tripan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin canlılığı kontrol edilmiştir.
- Canlılığı kontrol edilen hücreler aseptik koşullar altında 25 cm²'lik flasklara ~ 5 ml serumlu ortam, 75 cm²'lik flasklara ~ 10-15 ml serumlu ortam eklenerek ekilmiştir.
- Flasklara ekilen hücreler %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.

3.9. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi

Hücrelerin yeterli sayıda ve canlılıkta olup olmadığını kontrol etmek için Tripan Blue boyası kullanılmıştır. Hücre canlılığının kontrolü aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücelere 1 ml serumsuz ortam eklenmiş ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Serumsuz ortam hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu flaskların boyutuna göre 1 ml (25 cm²'lik flask) – 2 ml (75 cm²'lik) oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu flasklar 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flasklara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar 2 ml (25 cm²'lik flask) – 4 ml (75 cm²'lik) serumlu ortam eklenmiştir.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.

- Hücrelerin bulunduğu 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.
- 50 µl Tripan Blue boyası ve 50 µl hücre karışımı Neubauer lamında ışık mikroskobu ile sayılmıştır (Membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücreler boyayı içine aldığı için maviyken, canlı hücreler şeffaf olarak gözükmetedirler.)
- Sayım aşamasında lamin 4 × 4'lük karelerden oluşan 4 adet alanında bulunan hücreler sayılarak ortalamaları alınmış ve dilüsyon faktörü 20.000 ile çarpılarak 1 ml içerisinde bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.
- Canlılık yüzdesi hesaplaması için canlı hücrelerin sayısı / toplam hücre sayısı x 100 işlemi şeklinde yapılmıştır.
- Deney kurabilmek için en az %70-80 arası canlılık olması gerekmektedir.

3.10. Hücre Hatlarının Pasaj İşlemleri

Aseptik koşullar altında flasklara ekilen hücrelerin inkübasyonu %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde optimum koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Hücreler hücre hatlarının iki katına çıkma süresine bağlı olarak çoğalmaktadırlar ve bu aşama kontrol gerektirmektedir. Hücreler yatay bir şekilde büyütüldükleri flask yüzeyinin %80'ini kapladığı zaman hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılıp bölünmesi gerekmektedir. Hücre pasajlama deney kurma aşamasından önce de gerçekleştirilmektedir. Hücre pasajlama aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelere 1 ml serumsuz ortam eklenmiş ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Serumsuz ortam hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.

- Hücrelerin bulunduğu flaskların boyutuna göre 1 ml (25 cm²'lik flask) – 2 ml (75 cm²'lik) oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu flasklar 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flasklara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar 2 ml (25 cm²'lik flask) – 4 ml (75 cm²'lik) serumlu ortam eklenmiştir.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.
- 50 µl hücre ve 50 µl Tripan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin canlılığı kontrol edilen hücrelerin sayısı belirlenmiştir.
- Canlılığı ve sayıları kontrol edilen hücreler aseptik koşullar altında 2'ye bölünerek 25 cm²'lik flasklara ~ 5 ml serumlu ortam, 75 cm²'lik flasklara ~ 10-15 ml serumlu ortam eklenerek ekilmiştir.
- Flasklara ekilen hücreler %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.

3.11. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması

Hücrelerin çoğaltılma aşamasında hücrelerin sayısının deneylerde kullanılacak hücre sayısından fazla olduğu durumlarda aynı pasaj sayısından devam edebilmek için hücreler kriyoprotektanlar kullanılarak dondurulabilmektedir. Hücre dondurulması aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelere 1 ml serumsuz ortam eklenmiş ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Serumsuz ortam hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu flaskların boyutuna göre 1 ml (25 cm²'lik flask) – 2 ml (75 cm²'lik) oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu flasklar 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flasklara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar 2 ml (25 cm²'lik flask) – 4 ml (75 cm²'lik) serumlu ortam eklenmiştir.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.
- 50 µl hücre ve 50 µl Tripan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin canlılığı kontrol edilen hücrelerin sayısı belirlenmiştir.
- Hücrelerin resüspanse ediliği ortamın uzaklaştırılabilmesi için hücreler tekrardan 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj aşamasından sonra supernatant kısım aseptik koşullar altında tamamen uzaklaştırılmıştır.

- Pellet kısmındaki hücreler oda sıcaklığında tamamen çözünmüş ve homojen FBS ile resüspanse edilmiştir.
- FBS ile çözünmüş hücreden 900 µl alınıp buz üzerindeki kriyotüp içine aktarılmış ve sonrasında 100 µl DMSO (Dimetilsülfoksit) eklenerek buz üzerinde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. (Hücreler kriyotüp başına maksimum 1.000.000 hücre olacak şekilde bölünerek dondurulmuştur.)
- 1:9 oranında DMSO: FBS içeren hücreler -86°C’de muhafaza edilmiştir.

3.12. Etken maddenin hazırlanması

Moleküler ağırlığı 524,68 olan BPTES (Selleckchem, Cat No. S7753) etken maddesi ana stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde sulandırılmıştır.

Moleküler ağırlığı 260,29 olan PFK15 (Selleckchem, Cat No. S7289) etken maddesi ana stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde sulandırılmıştır.

3.13. Sitotoksosite testleri- Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi-xCELLigence (RTCA-SP)

Hücre sitotoksosite testlerinde xCELLigence (RTCA-SP) gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, hücre sağlığını, davranışını ve işlevini yüksek doğruluk, hassasiyet ve tekrarlanabilirlikle sürekli olarak izlemek için etiketsiz hücresel empedans kullanır. SP modeli, hücre sağlığı karakterizasyonu, immün hücre aracılı öldürme, viral sitopatik etkiler, sitotoksosite, hücre yapışması, hücre bariyer işlevi, hücre sinyali testleri ve daha pek çok uygulama için ideal olan 96 kuyulu bir elektronik mikropilaka (E-Plaka 96) çalıştırabilir. Cihaz standart hücre kültürü inkübatöründe çalışır ve kontrol ünitesi inkübatörün dışında bulunur. Saniyelerden günlere uzanan tahlil pencereleri için gerçek zamanlı kinetik veriler elde etmek için hücreler plakaya ekilir ve hücre davranışları izlenir. Oldukça hassas gerçek zamanlı hücresel empedans tahlili, bir E-Plakasının alt yüzeyine kaynaştırılmış altın mikro elektrotları kullanarak hücre özelliklerini noninvaziv olarak ölçer. Elektrot-çözelti arayüzünde yapışık hücrelerin varlığı elektron akışını engeller. Bu empedansın büyüklüğü, hücre sayısına, hücrelerin boyutuna ve şekline, hücre bariyer fonksiyonu oluşumuna ve hücre-substrat bağlanma kalitesine bağlıdır. Ne altın mikroeletrot

yüzeyleri ne de uygulanan elektrik potansiyeli (22 mV), hücre sağlığı veya davranışı üzerinde bir etkiye sahip değildir. xCELLigence RTCA ışık akışı, minimum işleme süresi ile son derece hassas, nicel ve tekrarlanabilir veriler elde etme imkanı sağlar. Yapışkan hücrelerin neden olduğu elektron akışının hücresel empedansı, Hücre İndeksi (CI) adı verilen birimsiz bir parametre kullanılarak rapor edilir. Kısacası, elektrotlarda ölçülen empedans değeri ve rapor edilen Hücre İndeksi değeri ortamda bulunan hücre sayısı ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Bu durumda çeşitli kimyasalların sitotoksik etkilerinin belirli zaman aralığında hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin araştırılması için oldukça elverişli bir uygulamadır. RTCA Software Pro kullanılarak çevrimiçi veri toplama ve çevrimdışı veri analizinin gerçekleştirilmesine olanak sağlanmaktadır (Hamidi, Lilja & Ivaska, 2017).

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi tez çalışmasında kullanılacak olan BPTES ve PFK15'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve BPTES+PFK15 kombinasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi aşamalarında kullanılmıştır. Her iki aşamada deney protokolü aynı olup, uygulanan inhibitörlerin konsantrasyonları ve ekilen hücre miktarları farklılık göstermektedir. Etken madde konsantrasyonları her aşamada üçlü tekrar olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Deney protokolünde aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelere 1 ml serumsuz ortam eklenmiş ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Serumsuz ortam hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu flaskların boyutuna göre 1 ml (25 cm²'lik flask) – 2 ml (75 cm²'lik) oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu flasklar 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)

- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flasklara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar 2 ml (25 cm²'lik flask) – 4 ml (75 cm²'lik) serumlu ortam eklenmiştir.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.
- 50 µl hücre ve 50 µl Tripan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin canlılığı kontrol edilen hücrelerin sayısı belirlenmiştir.
- Hücre tipine göre kuyucuk başına ekilecek hücre sayısı hesaplandıktan sonra öncelikle E-plate'in her kuyucuğuna 100 µl ortam eklenmiştir.
- Kuyucukların çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla E-plate cihaza yerleştirilip boş okutma yapılmıştır.
- Daha sonrasında E-plate cihazdan çıkarılıp 100 µl hesaplanan hücre sayısına göre hücreler çalışılacak olan kuyucuklara eklenmiştir.
- 10-30 dakika hücreler oda sıcaklığında E-plate içinde inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra tekrar cihaza yerleştirilmiş okutma başlatılmıştır.
- Hücrelerin tutunup proliferatif faza geçtikleri zaman işlem durdurulup inhibitör verilecek olan kuyucuklardan 100 µl ortam çekilmiştir.
- BPTES ve PFK15 inhibitörlerin 100 µl için gereken hacimleri hesaplanıp başka bir steril 96-well plate içine dağıtılmıştır.
- 96-well plate içinde bulunan belirli inhibitör konsantrasyonları belirli kuyucuklara dağıtılmıştır.
- E-plate cihaza tekrar yerleştirilmiştir ve 24., 48., 72. Saat dilimlerindeki sitotoksiste değerlerini elde edebilmek amacıyla 100 saat boyunca her 15 dakikada bir okuma işlemine devam ettirilmiştir.

Tablo 2. Sitotoksosite deneylerinde MDA-MB-231 hücre hattına kullanılan etken madde dozları

150 µM BPTES	150 µM BPTES	150 µM BPTES	100 µM PFK15	100 µM PFK15	100 µM PFK15
100 µM BPTES	100 µM BPTES	100 µM BPTES	50 µM PFK15	50 µM PFK15	50 µM PFK15
50 µM BPTES	50 µM BPTES	50 µM BPTES	25 µM PFK15	25 µM PFK15	25 µM PFK15
25 µM BPTES	25 µM BPTES	25 µM BPTES	12,5 µM PFK15	12,5 µM PFK15	12,5 µM PFK15
12,5 µM BPTES	12,5 µM BPTES	12,5 µM BPTES	6,25 µM PFK15	6,25 µM PFK15	6,25 µM PFK15
6,25 µM BPTES	6,25 µM BPTES	6,25 µM BPTES	3,125 µM PFK15	3,125 µM PFK15	3,125 µM PFK15

Tablo 3. Sitotoksosite deneylerinde MDA-MB-231 hücre hattına kullanılan etken madde dozları

150 µM BPTES	150 µM BPTES	150 µM BPTES	10 µM PFK15	10 µM PFK15	10 µM PFK15
100 µM BPTES	100 µM BPTES	100 µM BPTES	5 µM PFK15	5 µM PFK15	5 µM PFK15
50 µM BPTES	50 µM BPTES	50 µM BPTES	2,5 µM PFK15	2,5 µM PFK15	2,5 µM PFK15
25 µM BPTES	25 µM BPTES	25 µM BPTES	1,25 µM PFK15	1,25 µM PFK15	1,25 µM PFK15
12,5 µM BPTES	12,5 µM BPTES	12,5 µM BPTES	0,625 µM PFK15	0,625 µM PFK15	0,625 µM PFK15
6,25 µM BPTES	6,25 µM BPTES	6,25 µM BPTES	0,3125 µM PFK15	0,3125 µM PFK15	0,3125 µM PFK15

Tablo 4. Kombinasyon analizi için MCF-7 hücre hattına uygulanan etken madde konsantrasyonları

150 µM BPTES	100 µM PFK15	46 µM BPTES10 + 36 µM PFK15
100 µM BPTES	50 µM PFK15	34,5 µM BPTES + 27 µM PFK15
50 µM BPTES	25 µM PFK15	23 µM BPTES + 18 µM PFK15
25 µM BPTES	12,5 µM PFK15	17,5 µM BPTES + 13,5 µM PFK15
12,5 µM BPTES	6,25 µM PFK15	11,5 µM BPTES + 9 µM PFK15
6,25 µM BPTES	3,125 µM PFK15	

Tablo 5. Kombinasyon analizi için MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan etken madde konsantrasyonları

150 µM BPTES	10 µM PFK15	30 µM BPTES10 + 7 µM PFK15
100 µM BPTES	5 µM PFK15	22,5 µM BPTES + 5,5 µM PFK15
50 µM BPTES	2,5 µM PFK15	15 µM BPTES + 3,5 µM PFK15
25 µM BPTES	1,25 µM PFK15	11,5 µM BPTES + 2,5 µM PFK15
12,5 µM BPTES	0,625 µM PFK15	7,5 µM BPTES + 2 µM PFK15
6,25 µM BPTES	0,3125 µM PFK15	

3.14. Meme Kanseri Hücre Hatlarında BPTES PFK15 IC₅₀ Değerlerinin ve BPTES+PFK15 Kombinasyonunun Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

Apoptoz, embriyonik gelişim sırasında ve doku homeostazının korunmasında ortaya çıkan normal bir fizyolojik süreçtir. Apoptotik program, plazma zarı asimetrisi ve bağlanma kaybı, sitoplazma ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA'nın internükleozomal bölünmesi gibi belirli morfolojik özelliklerle karakterize edilir. Plazma zarı kaybı en erken özelliklerden biridir. Apoptotik hücrelerde, membran fosfolipidi fosfatidilserin (PS), plazma zarının iç kısmından dış kısma translokasyona uğrar ve böylece PS'ler dış hücresel ortama maruz kalır (Biosciences, B. D., 2011).

Annexin V, 35-36 kDa büyüklüğünde Ca²⁺ bağımlı fosfolipid bağlayıcı bir proteindir. Annexin V'in fosfatidilserinlere yüksek afinitesi bulunmaktadır ve fosfatidilserinlere maruz kalmış hücrelere bağlanır. Annexin V, FITC de dahil olmak üzere florokromlarla da konjuge olabilir. Bu format, fosfatidilserinlerin yüksek afinitesini korur ve bu nedenle apoptoz geçiren hücrelerin akış sitometrisi analizi için hassas bir prob görevi görür. Fosfatidilserinlerin hücre dışına translokasyonu apoptozun erken evrelerinde gerçekleştiğinden, FITC Annexin V boyaması, DNA fragmentasyonu gibi nükleer değişikliklere dayanan analizlerden daha erken bir aşamada apoptozu tanımlayabilir.

FITC Annexin V boyaması, apoptotik veya nekrotik süreçlerden kaynaklanan hücre ölümünün son aşamalarına eşlik eden membran bütünlüğü kaybından önce gelir. Bu nedenle, FITC Annexin V ile boyama, erken apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlamak için genellikle propidium iyodür (PI) gibi vital bir boya ile birlikte kullanılır. (Biosciences, B. D., 2011). PI'nin bir hücreye girme yeteneği, zarın geçirgenliğine bağlıdır; PI, sağlam bir plazma zarının varlığı nedeniyle canlı veya erken apoptotik hücreleri boyamaz (Rieger, Nelson, Konowalchuk & Barreda, 2011). Apoptotik hücreleri incelemek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım olan Annexin V/PI protokolüne göre;

- Erken apoptotik → PI negatif- FITC Annexin V pozitif,
- Canlı hücreler → PI negatif- FITC Annexin V negatif,
- Geç apoptotik ve ölü hücreler → PI pozitif- FITC Annexin V pozitifdir.

Tez çalışmamızda BPTES ve PFK15'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 48. saat IC₅₀ etki dozları ve kombinasyon dozları uygulanarak hücrelerin apoptoz oranları ölçülmüştür. Apoptoz aşamasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelere 1 ml serumsuz ortam eklenmiş ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Serumsuz ortam hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu flaskların boyutuna göre 1 ml (25 cm²'lik flask) – 2 ml (75 cm²'lik) oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu flasklar 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flaslara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar 2 ml (25 cm²'lik flask) – 4 ml (75 cm²'lik) serumlu ortam eklenmiştir.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.
- 50 µl hücre ve 50 µl Tripan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin canlılığı kontrol edilen hücrelerin sayısı belirlenmiştir.
- Canlılığı ve sayıları kontrol edilen hücreler aseptik koşullar altında 6 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 500.000 hücre olacak şekilde 3 ml %10 FBS içeren ortam ile ekilmiştir.
- 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

- 24 saat sonrasında hücrelerin üzerinde bulunan ortam uzaklaştırılmış, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için hesaplanan BPTES, PFK15 ve BPTES+PFK15 IC₅₀ dozları ve belirlenen azaltılmış/arttırılmış dozlar 3 ml %10 FBS içeren ortam ile birlikte hücrelere uygulanmıştır.
- İlaç dozları uygulanan hücreler 48 saat boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- 48 saat sonrasında hücrelerin üzerinde bulunan ortam uzaklaştırılmış, 500 µl oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiş ve 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu plakalara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar (1 ml) %10 FBS içeren ortam eklenmiştir.
- Plakalarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 2 ml'lik santifüj tüplerine aktarılmış ve santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 2000 rpm'de 10 boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, üzerine 1 ml PBS eklenmiş ve santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 2000 rpm'de 10 boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında supernatant kısım uzaklaştırılmış, pellet kısım 100 µl 10X Annexin V Bağlama Tamponu, 1 µl FITC Annexin V ve 1 µl Propidium İyodür Boyama Solüsyonu karanlık ortamda eklenmiş ve 10-15 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında BD Accuri Akış Sitometri cihazı ile ölçüm yapılmış, sonuçlar cihazın analiz programı ile değerlendirilmiştir.

Tablo 6. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına ekspresyon analizi için uygulanan etken madde dozları

MCF-7	MDA-MB-231
%10 FBS DMEM	%10 FBS L15
23 µM BPTES	15 µM BPTES
18 µM PFK15	3,5 µM PFK15
23 µM BPTES + 18 µM PFK15	15 µM BPTES + 3,5 µM PFK15
11,5 µM BPTES + 9 µM PFK15	30 µM BPTES + 7 µM PFK15

3.15. Ekspresyon Analizi

mRNA düzeyinde ekspresyon analizi, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 25 cm²'lik flasklara ekimi, BPTES ve PFK15 etken maddelerinin belirlenen IC₅₀ dozları ve BPTES ve PFK15 kombinasyonunun belirlenen EC₅₀ dozlarının üçlü tekrarlı olarak ekilmesi, QIAamp RNA Blood Mini Kit ile total RNA izolasyonu, EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit ile cDNA sentezi ve SYBR Green PCR SuperMix kullanılarak qRT-PCR LightCycler 480 II cihazında ölçümü ve analizinden oluşmaktadır. Ekspresyon analizi aşamasında kullanılan primer çiftleri biyoinformatik araçlardan yararlanılarak tasarlanmıştır.

GATA3

5' CTGTGGCGGCGAGATGGC 3'

3' GGCATTCCTCCTCCAGAGTGTG 5'

MYCN

5' CTCGCTACAGCCCTGCTTCTAC 3'

3'TCTTGGGACGCACAGTGATGG 5'

PFKFB3

5' AGCCGCATCGTGTACTACCTG 3'

3' GCCGTCTGGATGGTGCTCTTC 5'

ACTB

5' GGCACCACACCTTCTACAATGAG 3'

3' CCAGAGGGCGTACAGGGATAGC 5'

Deney aşamaları aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir:

Hücre Hatlarının Ekimi, Etken Madde Verilmesi ve Total RNA İzolasyonu:

- Hücrelerin inkübe edildiği ortam, hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelere 1 ml serumsuz ortam eklenmiş ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Serumsuz ortam hücrelerin bulunduğu flasklardan aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu flaskların boyutuna göre 1 ml (25 cm²'lik flask) – 2 ml (75 cm²'lik) oda sıcaklığında Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu flasklar 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flasklara eklenen Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar 2 ml (25 cm²'lik flask) – 4 ml (75 cm²'lik) serumlu ortam eklenmiştir.
- Flasklarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu 15 ml'lik falconlar santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında hücreler pellet kısmında bulunmakta, Tripsin-EDTA ve ortam içeren sıvı kısım ise supernatant kısmında bulunmaktadır. Bu aşamada supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, 1 ml serumlu ortam ile resüspanse edilmiştir.

- 50 µl hücre ve 50 µl Tripan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin canlılığı kontrol edilen hücrelerin sayısı belirlenmiştir.
- Canlılığı ve sayıları kontrol edilen hücreler (MCF-7 ve MDA-MB-231) aseptik koşullar altında 25 cm²'lik flasklara, 1.000.000 hücre olacak şekilde 4 ml %10 FBS içeren ortam ile ekilmiştir.
- 25 cm²'lik flasklara ekilen hücreler %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- 24 saat sonrasında hücrelerin üzerinde bulunan ortam uzaklaştırılmış, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için hesaplanan BPTES, PFK15 ve BPTES+PFK15 IC₅₀ dozları ve belirlenen azaltılmış/arttırılmış dozlar 4 ml %10 FBS içeren ortam ile hücrelere uygulanmıştır.

Tablo 7. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına ekspresyon analizi için uygulanan etken madde dozları

MCF-7	MDA-MB-231
%10 FBS DMEM	%10 FBS L15
23 µM BPTES	15 µM BPTES
18 µM PFK15	3,5 µM PFK15
23 µM BPTES + 18 µM PFK15	15 µM BPTES + 3,5 µM PFK15
11.5 µM BPTES + 9 µM PFK15	

- İlaç dozları uygulanan hücreler 48 saat boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.

- 48 saat sonrasında hücrelerin üzerinde bulunan ortam uzaklaştırılmış, 1 ml oda sıcaklığında Tripsin-EDTA ile yıkama yapılmış ve 5 dakika boyunca %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sabit sıcaklığa sahip etüvlerde inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. (Hücrelerin yüzeyden ayrılmaması durumunda hücreler maksimum 10 dakika Tripsin-EDTA'ya maruz bırakılmıştır veya hücre kazıyıcı kullanılmıştır.)
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücrelerin bulunduğu flasklara 1 ml %10 FBS içeren ortam eklenmiştir.
- Plakalarda bulunan ortam ve hücrelerin hepsi aseptik koşullar altında 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 25 µl hücre ve 25 µl Tripkan Blue boyası karıştırılarak hücrelerin sayısı belirlenmiştir.
- Hücrelerin bulunduğu santrifüj tüpleri santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 2000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu pellet, üzerine 1 ml PBS eklenmiş ve santrifüj cihazında dengeleri tam karşılıklarında konumlanmış şekilde 2000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında supernatant kısım aseptik koşullar altında uzaklaştırılmış ve QIAamp RNA Blood Mini Kit içeriğindeki RLT Buffer'a 35 µl β-Merkaptoetanol eklenerek 350 µl RLT Buffer santrifüj tüplerinde bulunan hücrelerin üzerine eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- Santrifüj tüplerinde bulunan hücreler RLT Buffer ile QIAshredder spin kolonuna aktarılmış ve maksimum hızda 2 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonrasında QIAshredder spin kolonu atılmış, kolondan geçen lizat kısım üzerine 350 µl %70 Etanol eklenerek pipetaj yapılmış, QIAamp spin kolona aktararak 15 saniye boyunca 8000 g (10000 rpm)'de santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrasında altta kalan lizat kısım atılmış, 700 µl RW1 Buffer eklenmiş ve 15 saniye boyunca 8000 g (10000 rpm)'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında altta kalan lizat kısım atılmış, 500 µl RPE Buffer eklenmiş ve 15 saniye boyunca 8000 g (10000 rpm)'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında altta kalan lizat kısım atılmış, tekrar 500 µl RPE Buffer eklenmiş ve 15 saniye boyunca 8000 g (10000 rpm)'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında QIAamp spin kolonun altında bulunan tüp değiştirilerek maksimum hızda 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra lizat kısım uzaklaştırılıp tekrar maksimum hızda 1 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonrasında kolonun altına steril eppendorf tübü yerleştiriliş ve 50 µl RNaz içermeyen su eklenerek maksimum hızda 1 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.
- RNA ölçümleri NanoDrop cihazında yapılp, total RNA örnekleri sonraki deney aşamaları için -80°C'de muhafaza edilmiştir.

cDNA Sentezi ve qRT-PCR:

- Ölçümü yapılan RNA örnekleri cDNA sentezi için 100 ng/µl olacak şekilde kullanılmak üzere hesaplanmıştır.
- EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit manuele göre 1 total RNA örneği için 2 µl 5x gDNA Eraser Buffer, 1 µl gDNA Eraser, 100 ng için gereken hacimde total RNA örneği ve RNaz içermeyen su total 10 µl olacak şekilde soğuk blok üzerinde PCR tüplerine hazırlanmıştır.
- PCR tüpleri 2 dakika boyunca 42°C'de termal ısı döngüleyicide inkübe edilmiştir.
- Daha sonrasında PCR tüplerine soğuk blok üzerinde her bir örneğe 2 µl RT Primer Mix, 1 µl dNTPs ve 2 µl RNaz içermeyen su eklenmiştir.
- PCR tüpleri 5 dakika boyunca 70°C'de termal ısı döngüleyicide inkübe edilmiş ve sonrasında kısa bir santrifüj uygulanmıştır.
- Santrifüj sonrasında PCR tüplerine soğuk blok üzerinde her bir örneğe 4 µl 5x RT Buffer ve 1 µl EntiLink™ Reverse Transcriptase eklenmiştir.
- Total hacmi 20 µl olan PCR tüpleri 60 dakika boyunca 37°C'de termal ısı döngüleyicide inkübe edilmiştir.

- cDNA ölçümleri NanoDrop cihazında yapıp, cDNA örnekleri sonraki deney aşamaları için -20°C’de muhafaza edilmiştir.
- Ölçümü yapılan cDNA örnekleri ekspresyon analizi için 100 ng/μl olacak şekilde kullanılmak üzere hesaplanmıştır.
- 1 cDNA örneği için 10 μl 2x SYBR Green PCR Primer Mix, önceden 5 nM’a sulandırılmış olan GATA3, PFKFB3, MYCN, GLS2, MYC ve ACTB primer çiftlerinden 1’er μl, 100 ng için gereken hacimde cDNA örneği ve RNaz içermeyen su total 20 μl olacak şekilde soğuk blok üzerinde hazırlanmıştır.
- cDNA örneklerinin ölçümü qRT-PCR LightCycler 480 II cihazında gerçekleştirilmiş ve mRNA ekspresyonları LightCycler 480 yazılımında template standartları kullanılarak kopya sayısına dönüştürülecek ve rölatif kantitasyon ile BPTES IC₅₀, PFK15 IC₅₀ ve BPTES ve PFK15 kombinasyon dozlarının etken madde verilmeyen kontrol gruplarına göre PFKFB3, GATA3, MYCN, MYC ve GLS2 mRNA ekspresyon kat değişimleri belirlenmiştir. (Bedewy vd., 2017).

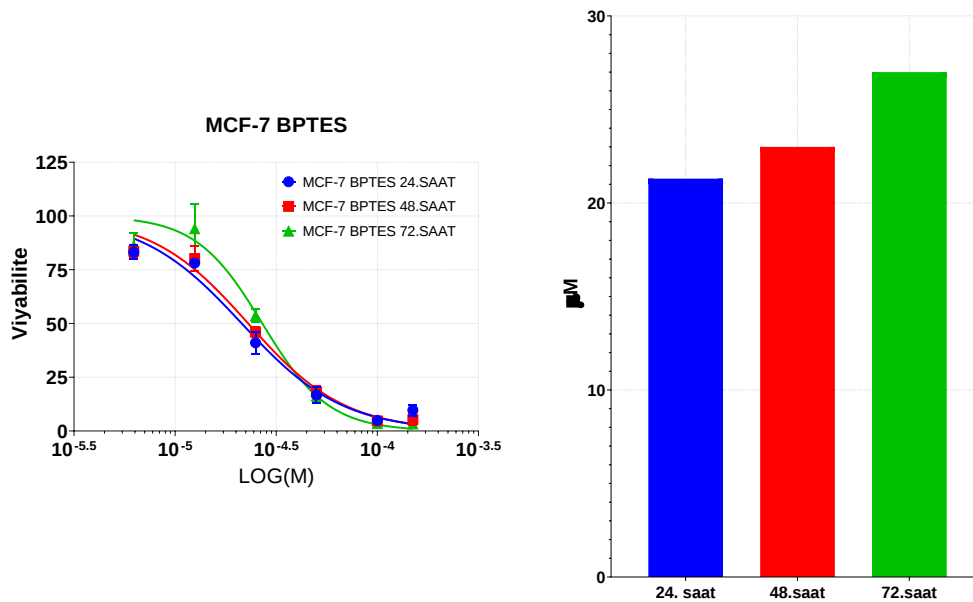
Bulgular

4.1. Etken Maddelerin Hücre Hatlarının Canlılığı Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Etken maddelerin MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında canlılığı üzerine etkileri RTCA-SP cihazı ile gerçek zamanlı olarak belirlenmiştir. Bunun için tüm hücre hatlarına etken maddenin belirli dilüsyonları üçlü tekrarlı olmak üzere hücre hatlarına uygulanmış (Tablo 2. ve Tablo 3.), ilaç uygulaması yapılmayan kuyucuklardaki hücreler kontrol grubu olarak alınmıştır. 100 saatin sonunda her hücre hattı için hücrelerin %50'sini öldüren sitotoksik dozlar (IC_{50}) elde edilmiştir.

4.1.1. BPTES'in MCF-7 Meme Kanser Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri

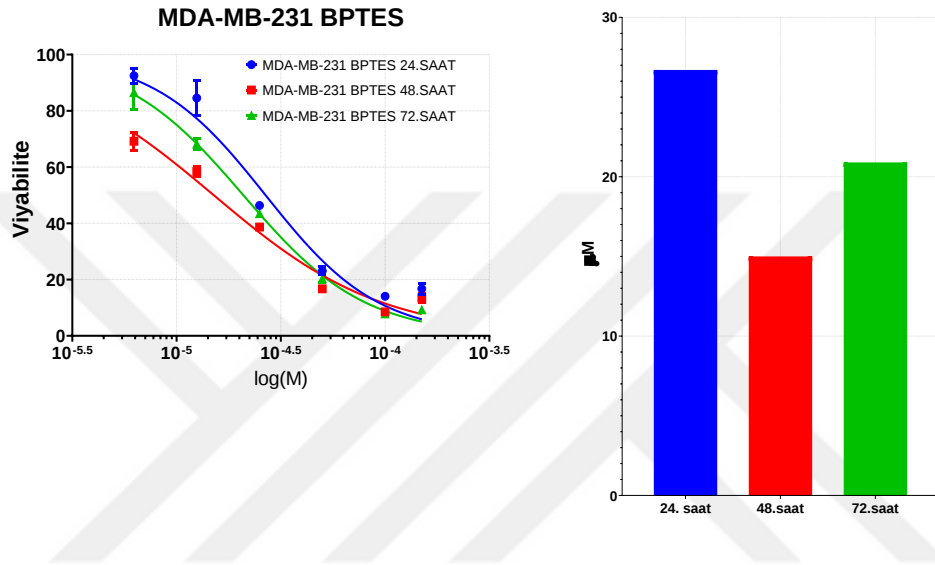
MCF-7 meme kanser hücre hattı için 11×10^4 hücre / ml sayıda hücre 3'lü tekrar olacak şekilde yukarıda belirtilen dilüsyon oranlarına maruz bırakıldı. 100 saat'lik okuma sonunda BPTES'in 24., 48. ve 72. saatlerdeki dozları karşılaştırıldı. Bu hücre hattı üzerinde 48.saat için IC_{50} dozu $23,0 \mu M$ olarak bulundu ve ileri tüm deneyler için bu doz kullanıldı.



Şekil 1. BPTES etken maddesinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği

4.1.2. BPTES'in MDA-MB-231 Meme Kanser Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri

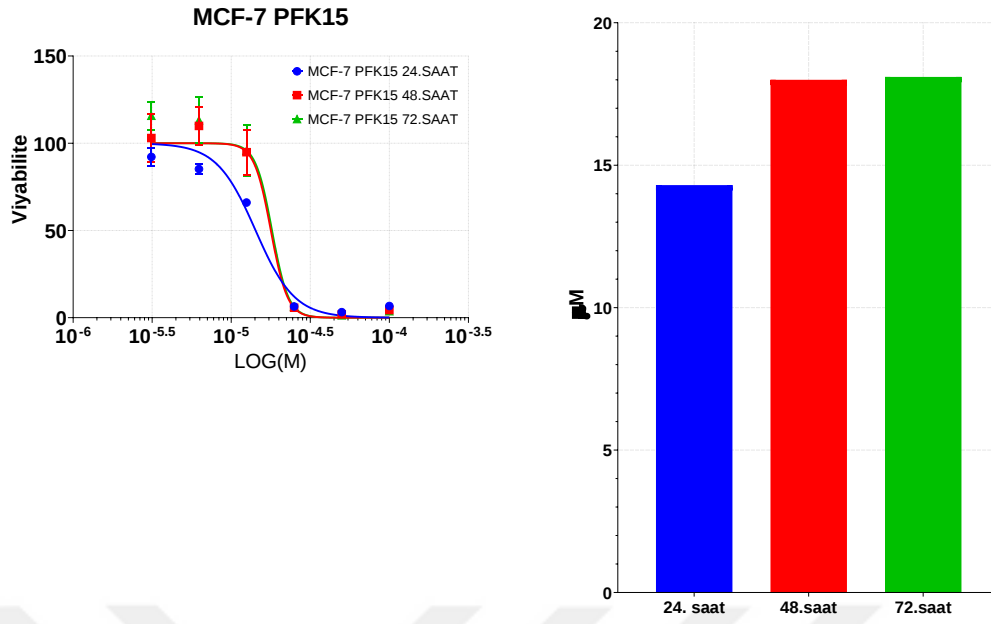
MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı için 9×10^4 hücre / ml sayıda hücre 3'lü tekrar olacak şekilde yukarıda belirtilen dilüsyon oranlarına maruz bırakıldı. 100 saat'lik okuma sonunda BPTES'in 24., 48. ve 72. saatlerdeki dozları karşılaştırıldı. Bu hücre hattı üzerinde 48.saat için IC_{50} dozu $15,0 \mu M$ olarak bulundu ve ileri tüm deneyler için bu doz kullanıldı.



Şekil 2. BPTES etken maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği

4.1.3. PFK15'in MCF-7 Meme Kanser Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri

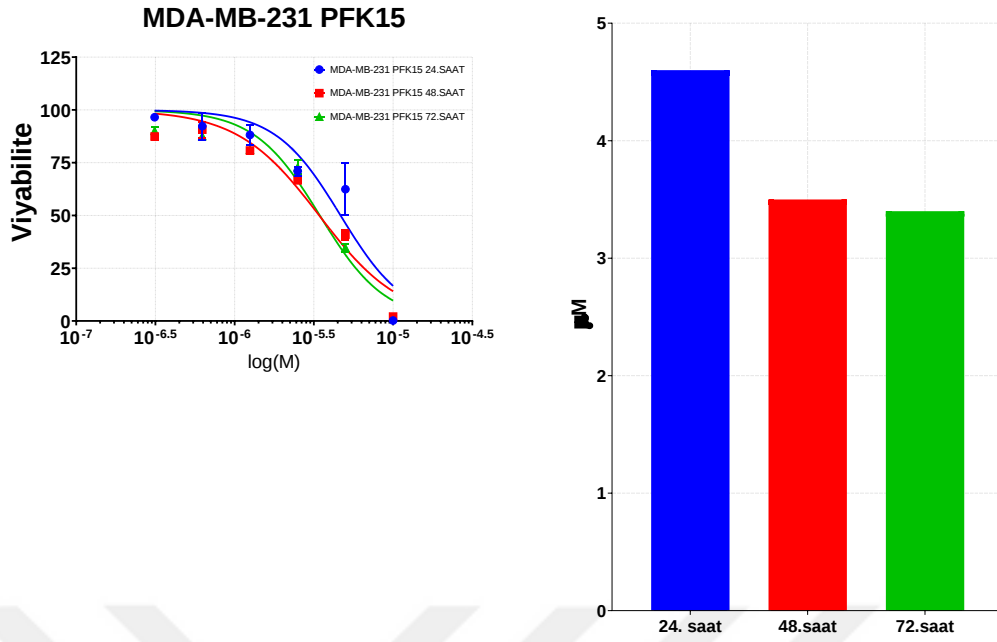
MCF-7 meme kanser hücre hattı için 11×10^4 hücre / ml sayıda hücre 3'lü tekrar olacak şekilde yukarıda belirtilen dilüsyon oranlarına maruz bırakıldı. 100 saat'lik okuma sonunda PFK15'in 24., 48. ve 72. saatlerdeki dozları karşılaştırıldı. Bu hücre hattı üzerinde 48.saat için IC_{50} dozu $18,0 \mu M$ olarak bulundu ve ileri tüm deneyler için bu doz kullanıldı.



Şekil 3. PFK15 etken maddesinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği

4.1.4. PFK15'in MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkileri

MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı için 9×10^4 hücre / ml sayıda hücre 3'lü tekrar olacak şekilde yukarıda belirtilen dilüsyon oranlarına maruz bırakıldı. 100 saat'lik okuma sonunda PFK15'in 24., 48. ve 72. saatlerdeki dozları karşılaştırıldı. Bu hücre hattı üzerinde 48.saat için IC_{50} dozu $3,5 \mu M$ olarak bulundu ve ileri tüm deneyler için bu doz kullanıldı.



Şekil 4. PFK15 etken maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği

Tablo 8. BPTES ve PFK15 etken maddelerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24., 48. ve 72. saat doz-etki grafiği

	24. Saat	48. Saat	72. Saat
<i>BPTES – MCF-7</i>	21,3 µM	23,0 µM	27,0 µM
<i>BPTES – MDA-MB-231</i>	26,7 µM	15,0 µM	20,9 µM
<i>PFK15 – MCF-7</i>	14,3 µM	18,0 µM	18,1 µM
<i>PFK15 – MDA-MB-231</i>	4,6 µM	3,5 µM	3,4 µM

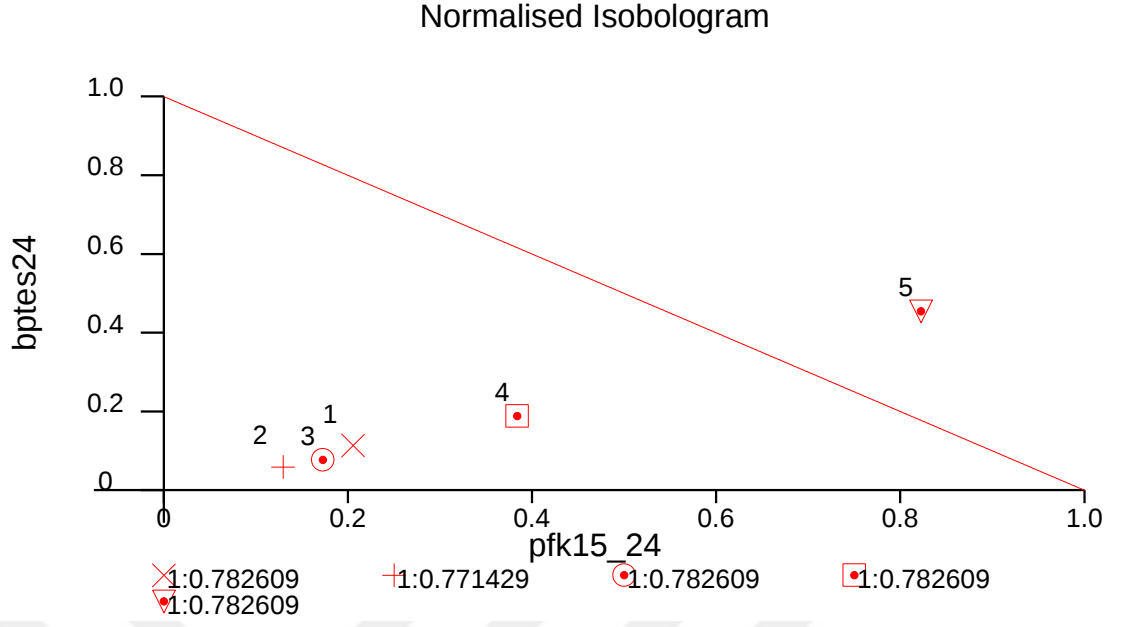
- GLS inhibitörü BPTES'in MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki değerleri 24.Saat için IC₅₀: 21,3 µM, 48.Saat için IC₅₀: 23,0 µM, 72.Saat için IC₅₀: 27,0 µM olarak hesaplanmıştır.

- GLS inhibitörü BPTES'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki değerleri 24.Saat için IC₅₀: 26,7 µM, 48.Saat için IC₅₀: 15,0 µM, 72.Saat için IC₅₀: 20,9 µM olarak hesaplanmıştır.
- Glikoliz inhibitörü PFK15'in MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki değerleri 24.Saat için IC₅₀: 14,3 µM, 48.Saat için IC₅₀: 17,8 µM, 72.Saat için IC₅₀: 18,1 µM olarak hesaplanmıştır.
- Glikoliz inhibitörü PFK15'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki değerleri 24.Saat için IC₅₀: 4,6 µM, 48.Saat için IC₅₀: 3,4 µM, 72.Saat için IC₅₀: 3,4 µM olarak hesaplanmıştır.

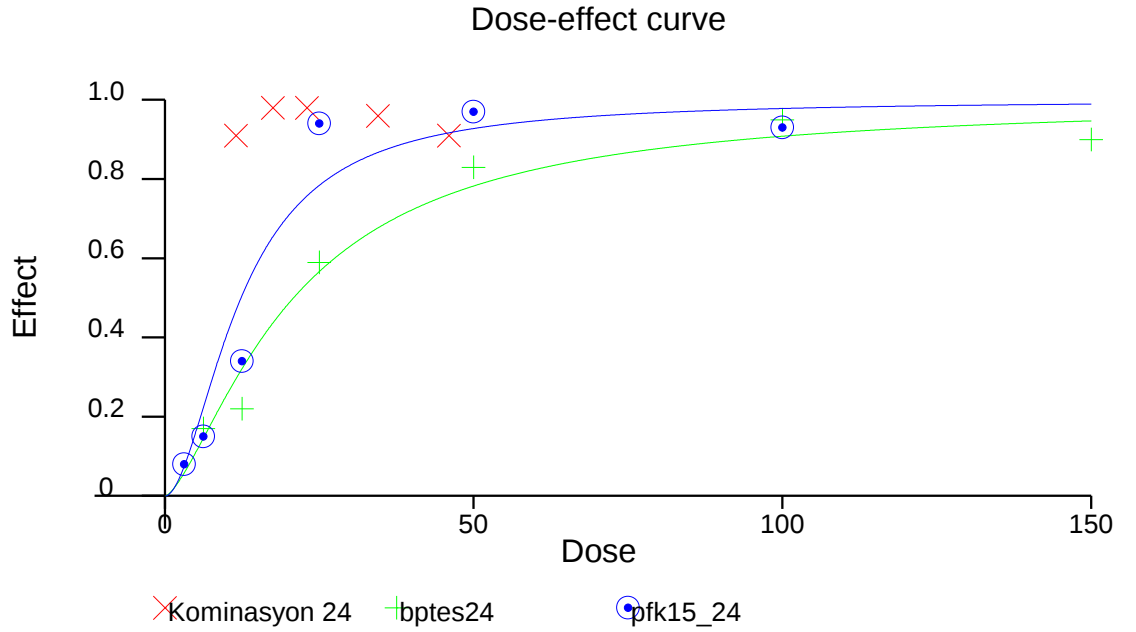
4.2. İzobologram Analizi

BPTES ve PFK15 etken maddelerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri belirlendikten sonra bu iki maddenin kombinasyon analizi için belirli dozları üç tekrarlı olacak şekilde uygulanmış (Tablo 4. ve Tablo5.) ve 24., 48. ve 72. saatlerdeki sitotoksisiteleri xCELLigence RTCA SP cihazının yazılımı ile yapılmıştır. Etken madde verilmeyen grup, kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

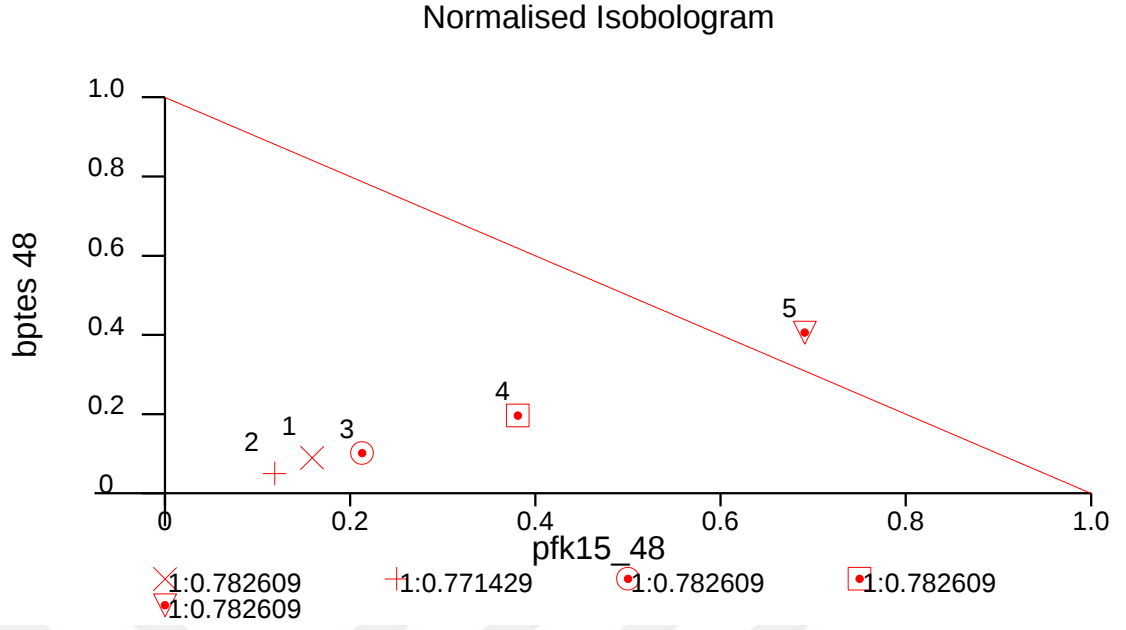
Elde edilen sitotoksosite sonuçlarından CalcuSyn v2.0 yazılımında izobologram analizi ile Kİ ve doz-etki eğrileri elde edilmiştir.



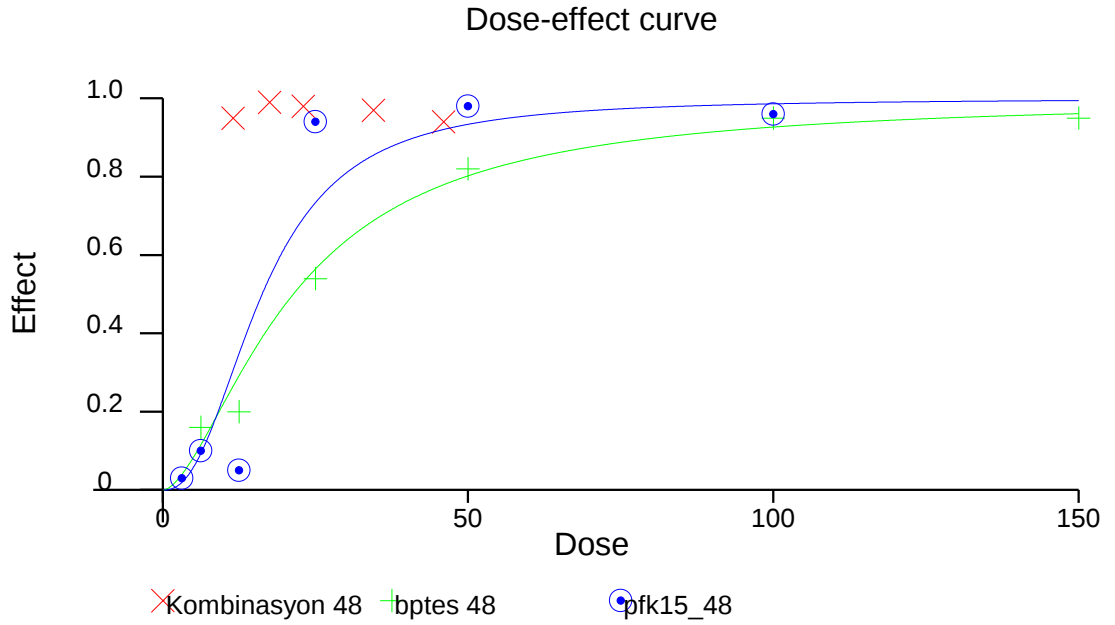
Şekil 5. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 24. saat normalize izobologram analizi



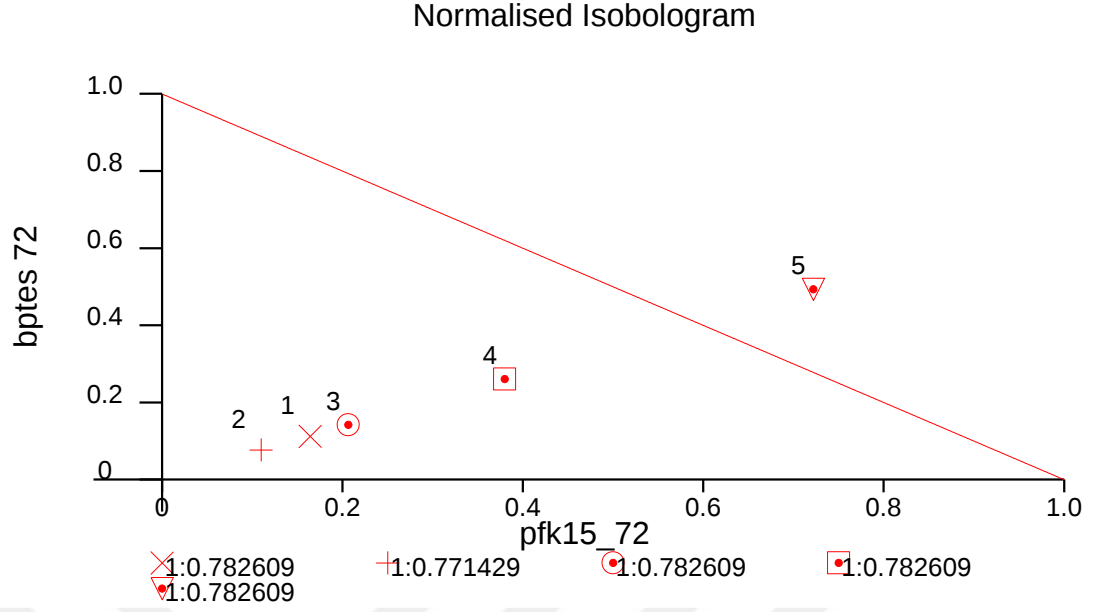
Şekil 6. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 24. saat doz-etki eğrisi



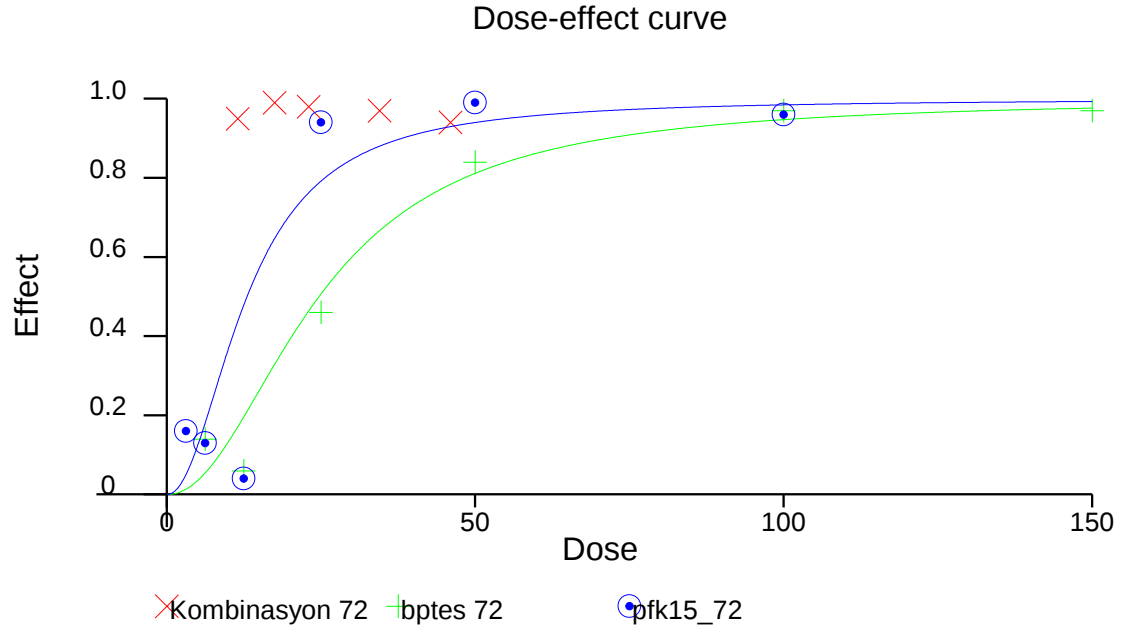
Şekil 7. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 48. saat normalize izobologram analizi



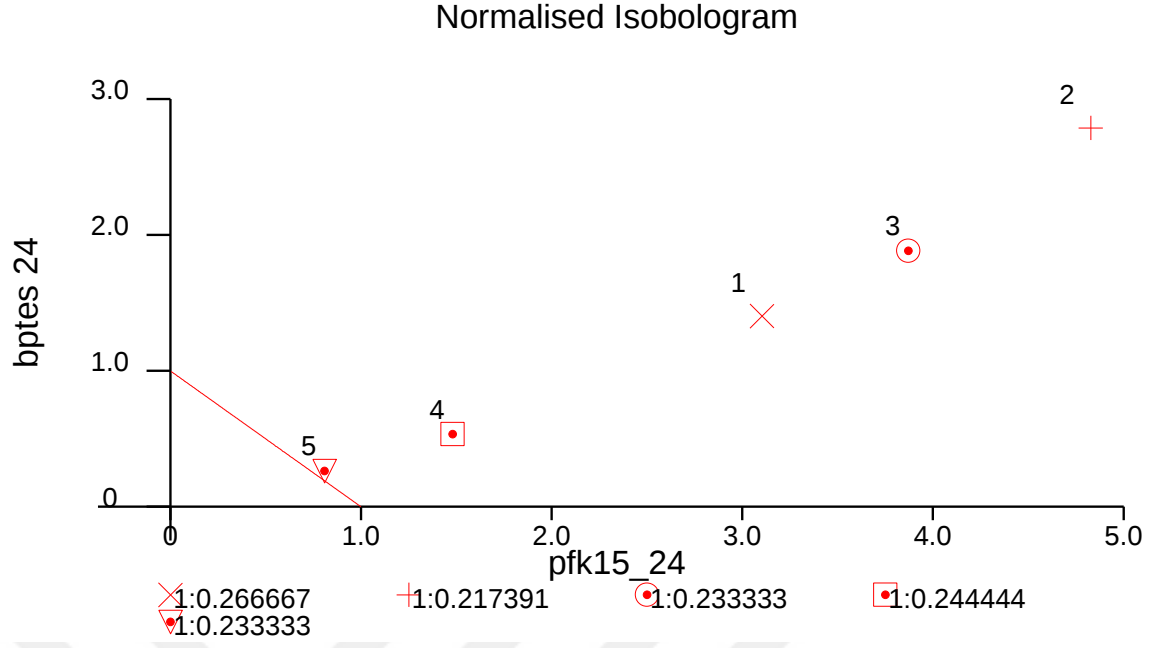
Şekil 8. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 48. saat doz-etki eğrisi



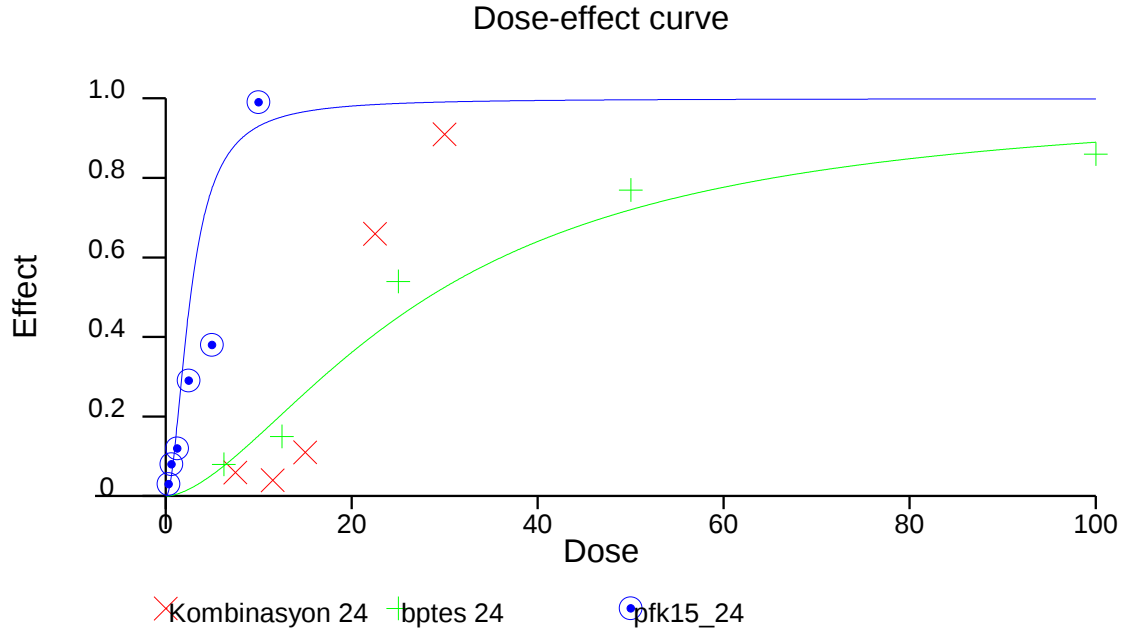
Şekil 9. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 72. saat normalize izobologram analizi



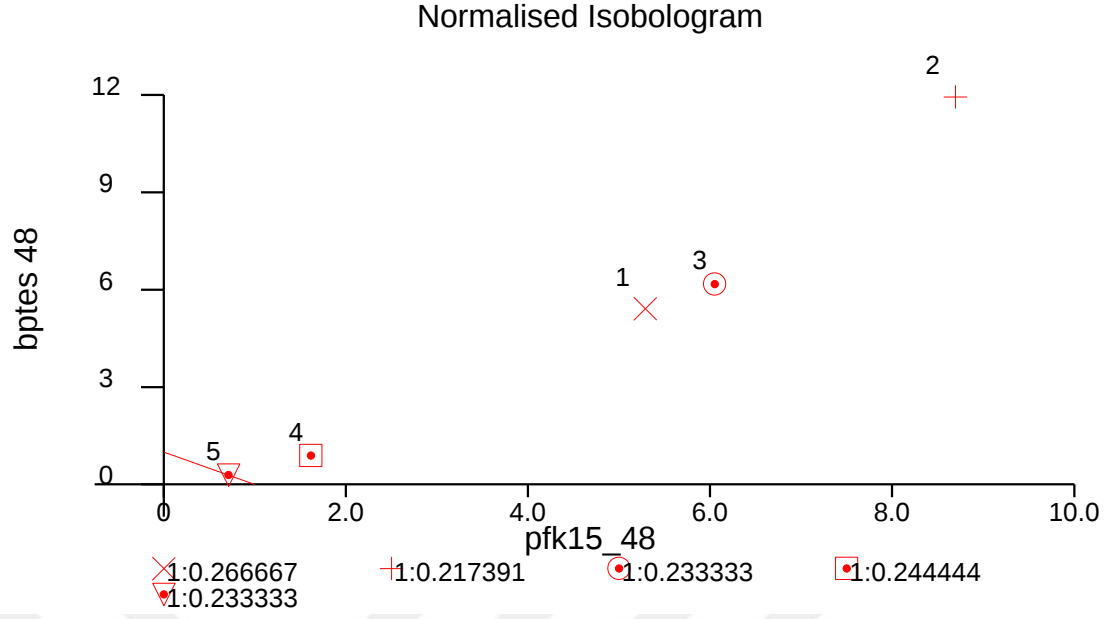
Şekil 10. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 72. saat doz-etki eğrisi



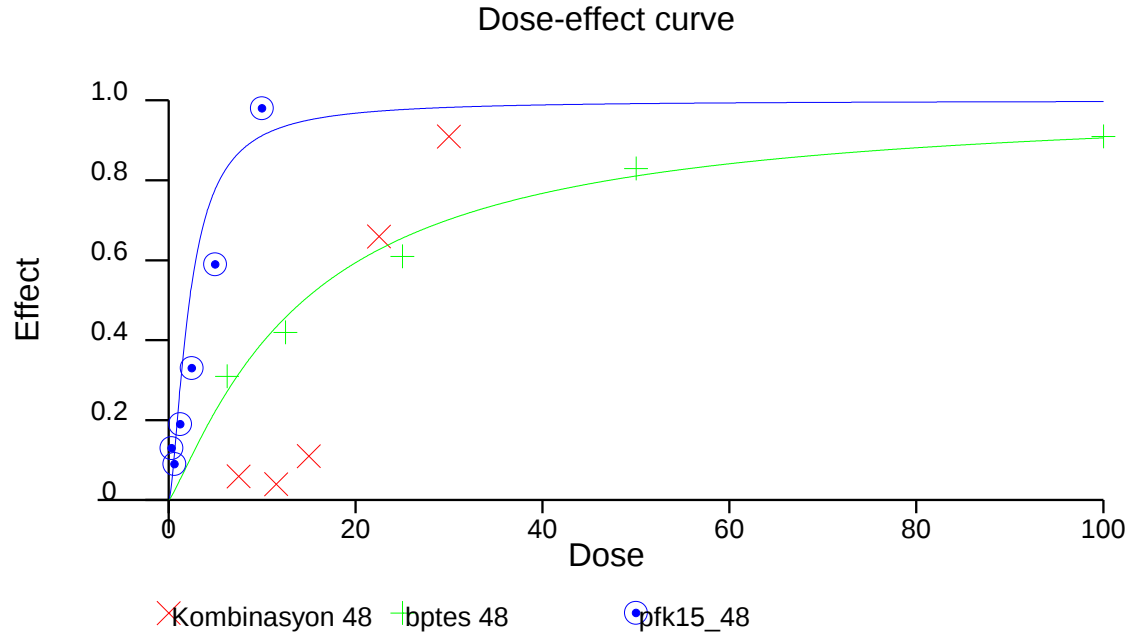
Şekil 11. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre hattında 24. saat normalize izobologram analizi



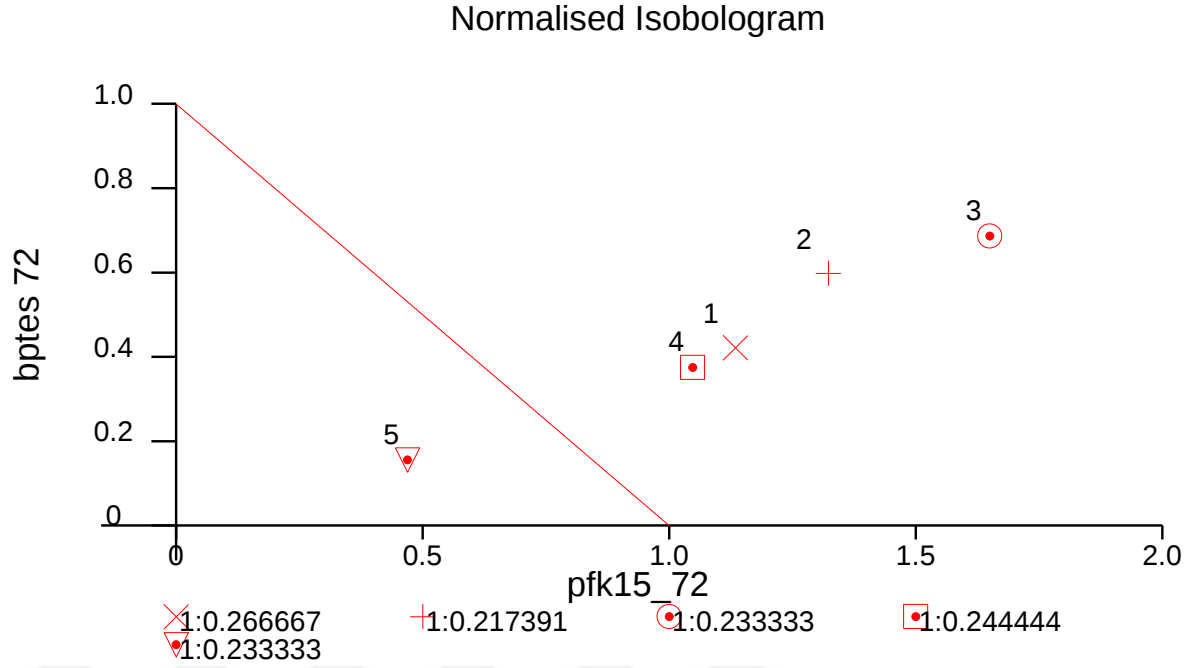
Şekil 12. BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre hattında 24. saat doz-etki eğrisi



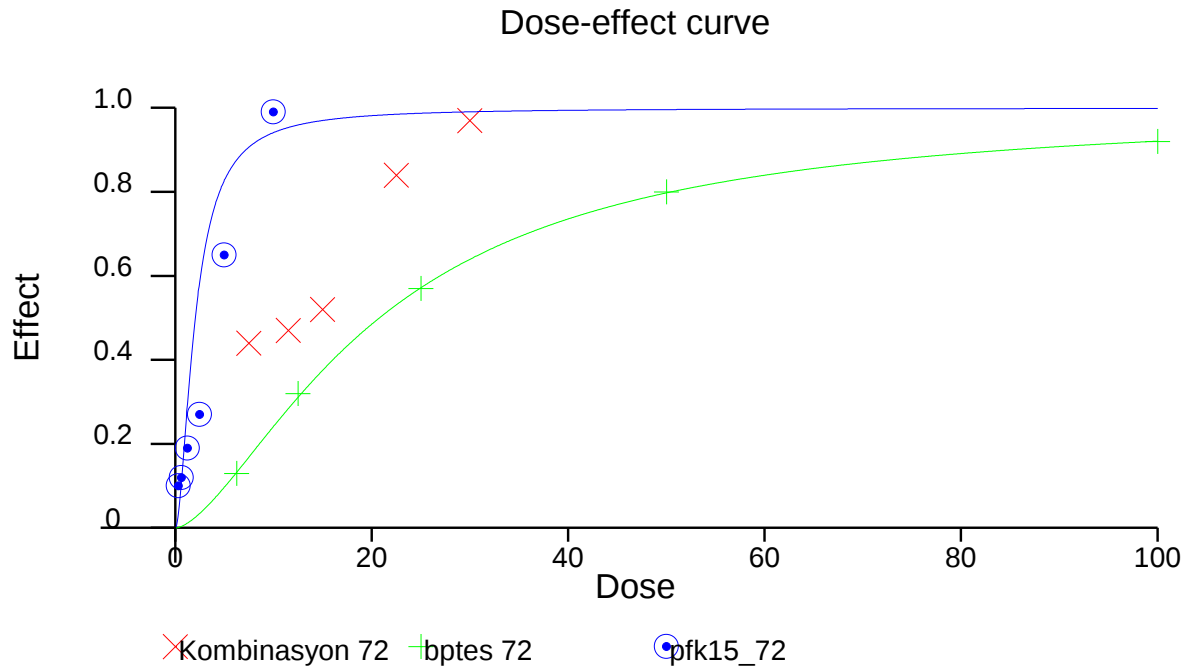
Şekil 13. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 48. saat normalize izobologram analizi



Şekil 14. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 48. saat doz-etki eğrisi



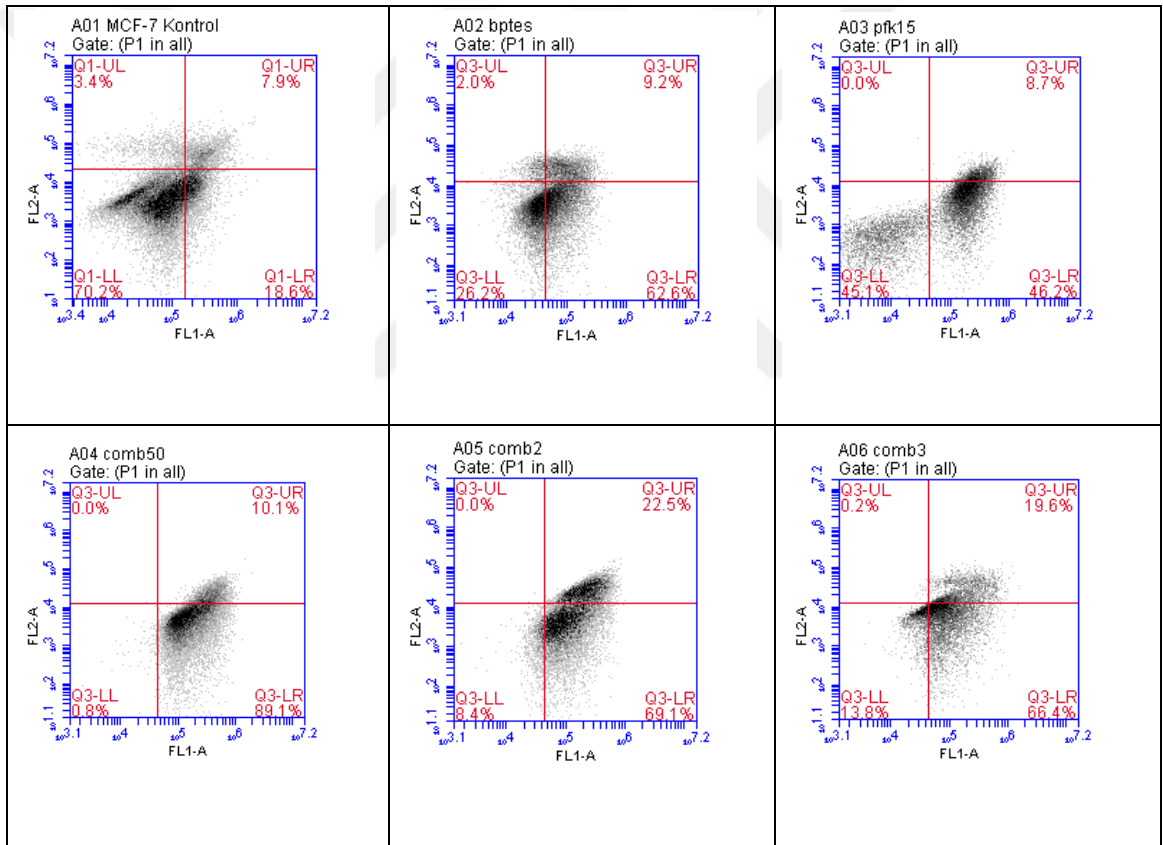
Şekil 15. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 72. saat normalize izobologram analizi

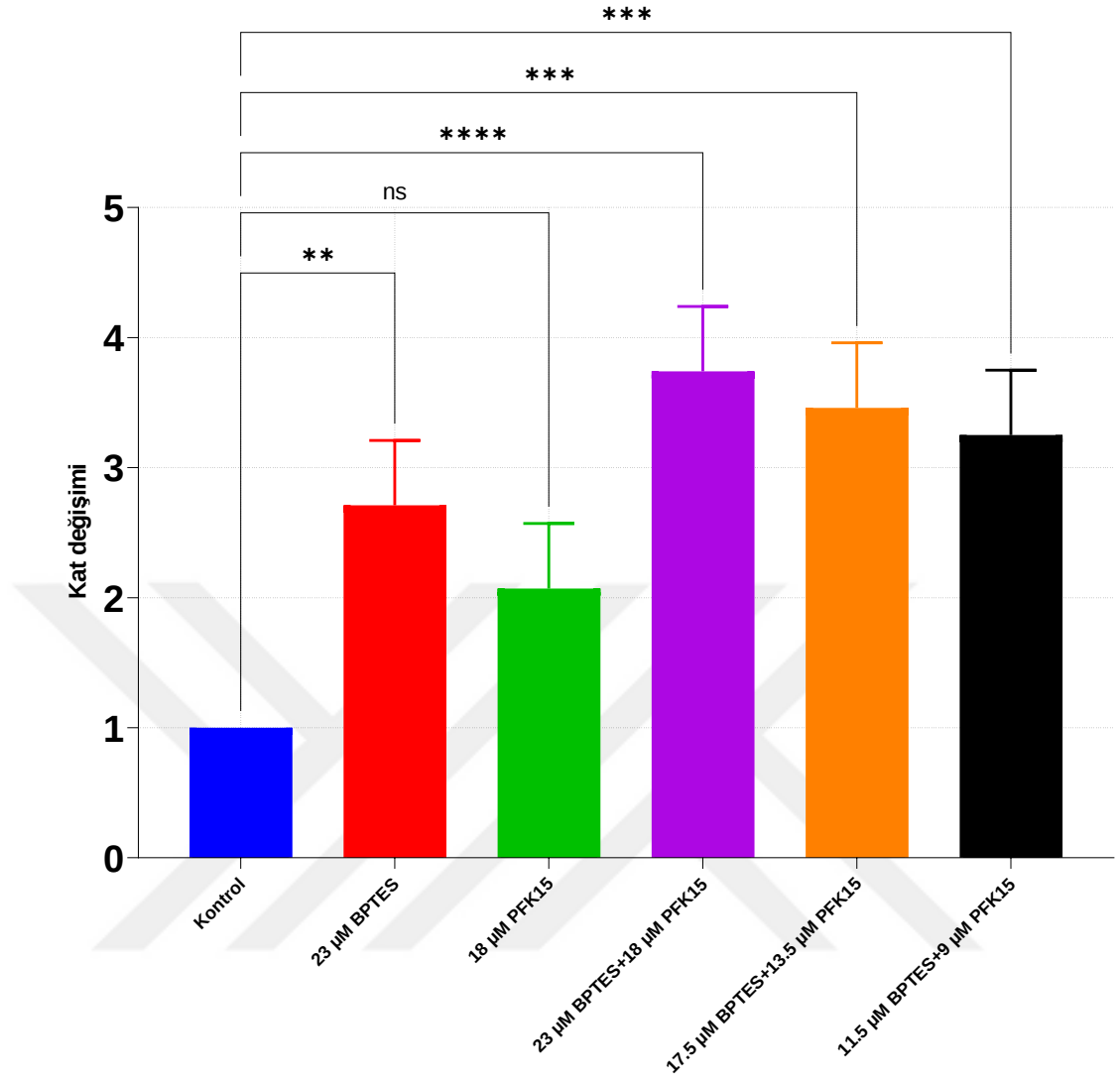


Şekil 16. BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 72. saat doz-etki eğrisi

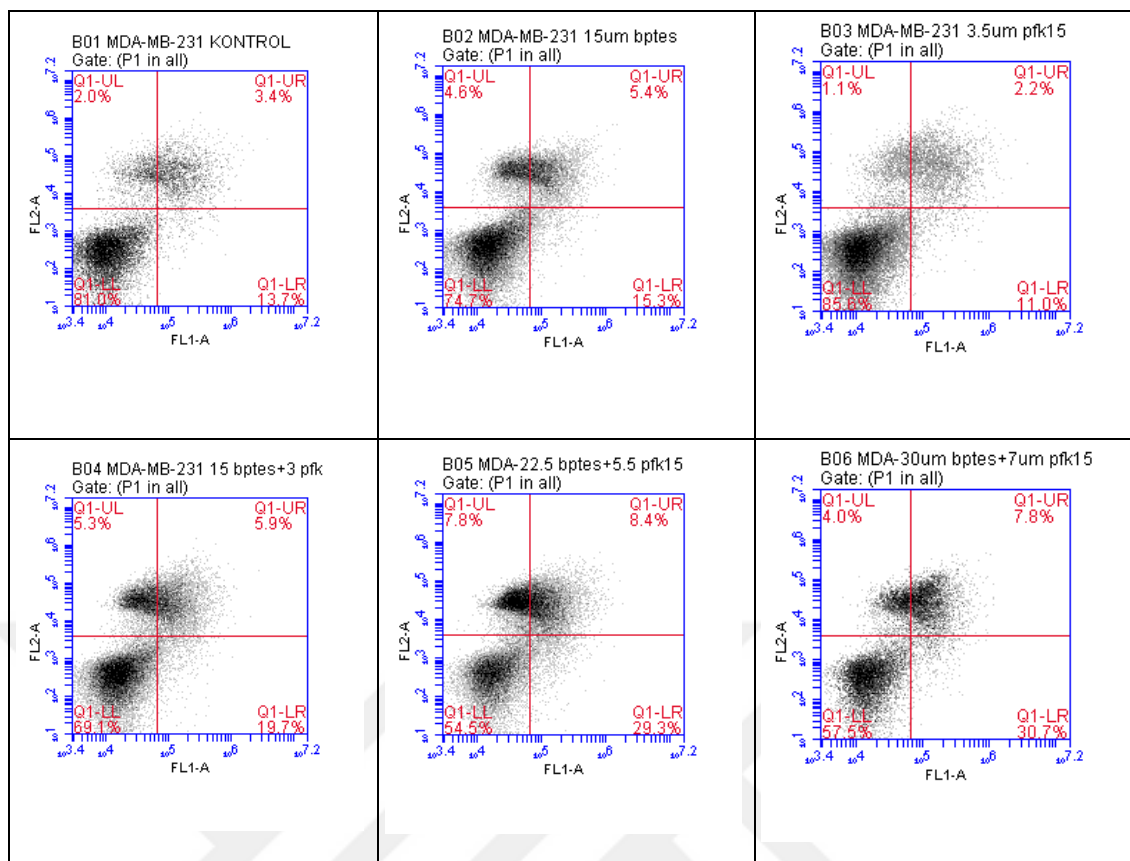
4.3. BPTES ve PFK15 Etken Maddelerinin ve BPTES+PFK15 Kombinasyonunun MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatları Üzerinde Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

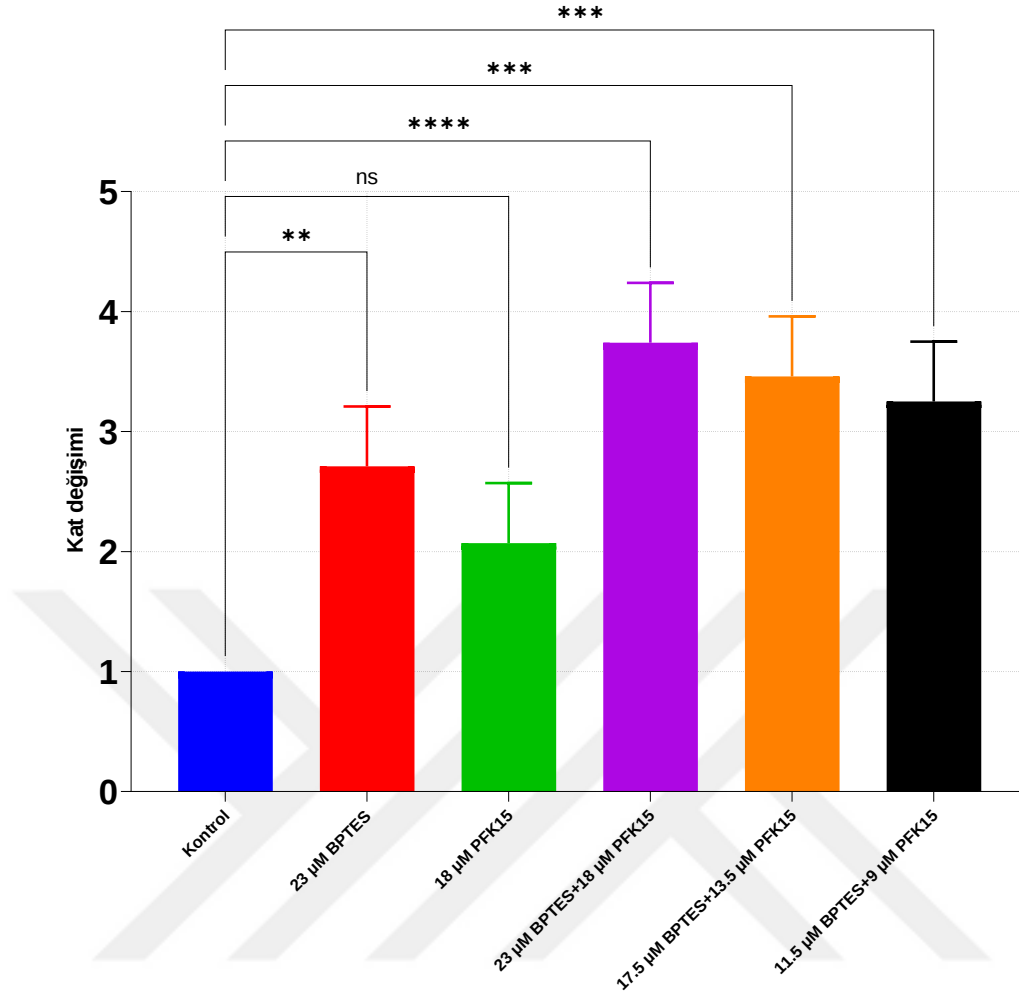
Apoptoz deneyi olan Annexin-V için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücreler yüzeye tutunup üremeye başladığı zaman etken maddelerin hesaplanan IC_{50} dozları teker teker ve kombinasyon dozları uygulanmıştır (Tablo 7.). Herhangi bir uygulama yapılmayan hücre grubu kontrol olarak alındı. 48 saat sonrasında toplanan örnekler arasındaki apoptotik indüklenme farkı BD Accuri akım sitometrisi cihazı ile analiz edilmiştir.





Şekil 17. MCF-7 hücre hattında apoptotik etkilerin incelenmesi





Şekil 18. MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik etkilerin incelenmesi

4.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında BPTES IC₅₀, PFK15 IC₅₀ değerlerinin ve BPTES+PFK15 Kombinasyonunun Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Glutaminoliz ve glikoliz inhibitörleri olan BPTES ve PFK15 etken maddelerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında belirlenen dozları uygulanarak (Tablo 8.) bu iki metabolik yolakla ilişkilendirilen PFKFB3, GATA3, MYC, MYCN ve GLS2 ekspresyonları incelenmiştir.

RT-PCR LightCycler 480 II cihazında gerçekleştirilen ekspresyon analizi sonucunda elde edilen Ct değerleri kullanılarak kopya sayısına dönüştürülmüş ve rölatif kantitasyon analizi yapılmıştır. Bu aşamada qPCR deneylerinde sıklıkla tercih edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 9. PFKFB3, GATA3, MYC, MYCN ve GLS2 ekspresyonlarının MCF-7 hücre modelinde kat değişimleri

	PFKFB3	GATA3	MYC	MYCN	GLS2
Kontrol Grubu	1,00	1,00	1,00	ES	ES
BPTES	-1,09	1,61	ES	ES	ES
PFK15	9,32	25,28	18,90	ES	ES
BPTES+PFK15 IC ₅₀	-1,72	4,35	4,41	ES	ES
BPTES+PFK15 DRI	-25,00	1,22	ES	ES	ES

*ES: Ekspresyon Saptanamadı.

Tablo 10. PFKFB3, GATA3, MYC, MYCN ve GLS2 ekspresyonlarının MDA-MB-231 hücre modelinde kat değışimleri

	PFKFB3	GATA3	MYC	MYCN	GLS2
Kontrol Grubu	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
BPTES	2,38	1,16	ES	ES	2,51
PFK15	3,68	-1,10	ES	ES	2,10
BPTES + PFK15 IC₅₀	-4,16	1,27	ES	ES	2,10

*ES: Ekspresyon Saptanamadı.

Tartışma

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en çok görülen kanser türüdür ve geliştirilen yeni tedavi olanaklarına rağmen ölüm oranlarında az miktarda azalma elde edilebilmiştir (Geck, R. & Toker, A., 2016). Kanser hücreleri düzensiz metabolizma özellikleri sergilemektedirler ve bu değişen enerji metabolizması kanserin başlamasında ve ilerlemesinde oldukça önemli bir role sahiptir (Feng, Yu & Zhang, 2022).

Araştırmamızda değişen metabolizma yollarına odaklanılarak, meme kanseri hücre hatları üzerinde glikoliz ve glutaminoliz mekanizmalarının eş zamanlı baskılanması hedeflenmiş ve bu amaç doğrultusunda bu hücre hatlarında antikanser özellikler araştırılmıştır. Glikoliz mekanizmasının inhibisyonunda glikolizin önemli enzimlerinden biri olan PFKFB3'ün inhibitörlerinden PFK15, glutaminoliz mekanizmasının inhibisyonunda ise GLS inhibitörü BPTES kullanılmıştır. Araştırmamızda meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MCF-7 kullanılmıştır. MDA-MB-231 oldukça agresif, invaziv ve kötü farklılaşmış, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 eksprese olmayan üçlü negatif bir meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücre hattı ise östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü eksprese olan luminal A meme kanserine örnektir. (Moon vd., 2020).

İki hücre hattının farklı karakteristik özelliklerinin bulunmasından dolayı araştırmamızın her aşamasında farklı sonuçlar elde edileceği ön görülmüştür. Daha invaziv hücre hattı olan MDA-MB-231'in etken madde/kombinasyon uygulamalarına daha dirençli olması beklenmekte, luminal A meme kanseri MCF-7 hücre hattında ise bu uygulamaların daha etkili olması beklenmektedir.

Geleneksel olarak, antikanser ilaçlarının etkinliğinin ilk değerlendirmesi için tek katmanlı (iki boyutlu) hücre kültürleri kullanılır. Hücre kültürü çalışmalarında ilaca maruz kalmadan büyütülen hücrelere kıyasla, tümör kolonisinin büyümesini %50 oranında engelleyebilen ilaç konsantrasyonunu belirleyen IC₅₀ eğrileri sağlanır. Düşük IC₅₀ değeri, ilacın düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu ve dolayısıyla hastaya verildiğinde daha düşük sistemik toksisite göstereceği anlamına gelir (Berrouet, C., Dorilas, N., Rejniak, K. & Tuncer, N., 2020).

Araştırmamızın ilk aşamasında GLS inhibitörü BPTES ve glikoliz inhibitörü PFK15'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin

belirlenmiştir. BPTES ve PFK15 inhibitörlerinin daha önce yapılan çalışmalarda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için mevcut IC₅₀ değeri bulunmamaktadır. Sitotoksik etkilerin belirlenme aşaması Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi-xCELLigence (RTCA-SP) cihazında gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 7 programında normalize edilerek uygulanan ilaçların hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. GLS inhibitörü BPTES'in MCF-7 hücre hattı üzerindeki belirlenen sitotoksik etki değeri 48.Saat için IC₅₀: 23,0 µM ve MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki belirlenen sitotoksik etki değeri 48.Saat için IC₅₀: 15,0 µM'dır. Diğer taraftan, glikoliz inhibitörü PFK15'in MCF-7 hücre hattı üzerindeki belirlenen sitotoksik etki değeri 48.Saat için IC₅₀: 18,0 µM ve MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki belirlenen sitotoksik etki değeri 48.Saat için IC₅₀: 3.5 µM'dır.

Sitotoksikite deney sonuçları ele alındığında, en düşük IC₅₀ etki değeri PFK15'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde bulunurken, en yüksek IC₅₀ etki değeri BPTES'in MCF-7 hücre hattı üzerinde bulunmuştur. Ayrıca glikoliz inhibitörü PFK15'in her iki hücre hattında da glutaminaz inhibitörü BPTES'e oranla daha düşük konsantrasyonlarda IC₅₀ etki değeri olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla glikoliz inhibitörü PFK15'in glutaminaz inhibitörü BPTES'e oranla daha düşük sistematik toksisite göstermesi beklenmektedir.

Sitotoksikite deney sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değerleri baz alınarak glutaminaz inhibitörü BPTES'in ve glikoliz inhibitörü PFK15'in belirli kombinasyon dozlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

Kombinasyon analizi, iki veya daha fazla terapötik ajanın bir ilacın uygulamasına katkıda bulunmak amacıyla yapılır ve genellikle kombinasyon analizinde ajanların daha düşük dozlarda kullanılarak toksisiteyi azaltmak amaçlanmaktadır. Etki dozu (EC) hesaplamasında Loewe ilkesine göre izobol oluşturulup, daha sonrasında kombinasyon dozunun ajanların yalnız olarak kullanıldıkları dozlara oranla daha etkili çıkmasıyla sinerjik, additif ve antagonist etkiye sahip olup olmadıkları kombinasyon indeksi (Kİ) ile belirlenmiştir (Tallarida, 2010). Kİ <1 sinerjik etki, Kİ = 1 additif etki Kİ > 1 antagonist etki olarak değerlendirilmektedir. Her bir hücre hattında BPTES ve PFK15 IC₅₀ dozlarının (BPTES: PFK15 IC₅₀) farklı oranlardaki konsantrasyonları sitotoksikite analizinde anlatıldığı şekilde üç tekrarlı uygulanmış

(Tablo 4. ve Tablo 5.) ve 24., 48. ve 72. saatlerdeki sitotoksiteleri xCELLigence RTCA SP cihazının yazılımı ile etken madde verilmeyen kontrol grubuna göre belirlenmiştir (Samal vd., 2013). Elde edilecek sitotoksitelerden CalcuSyn v2.0 yazılımında izobologram analizi ile KI hesaplanmıştır. Her bir hücre hattında BPTES ve PFK15 kombinasyonunun $KI < 1$ veya $KI = 1$ olması durumunda yazılım tarafından hesaplanan her etken için kaç katının doz düşürülmesine izin verildiğini belirleyen doz azaltma indeksinin (DRI) EC_{50} için belirlediği dozlar ile kombinasyona devam edilmiştir. Böylelikle doz azaltma ile istenen etkinlik korunurken daha az toksisiteye neden olunması beklenmektedir.

BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında 24., 48. ve 72. saat normalize izobologram analizine göre (Şekil 5., Şekil 7. ve Şekil 9.) uygulanan dozlar 11.5 μM BPTES+9 μM PFK15, 17.5 μM BPTES+13.5 μM PFK15, 23 μM BPTES+18 μM PFK15, 34.5 μM BPTES+27 μM PFK15 ve 46 μM BPTES+36 μM PFK15 şeklindedir.

Etken maddeler teker teker uygulandığında ise BPTES için MCF-7 hücre hattında %16'lık inhibisyon için 6,25 μM , %20'lik inhibisyon için 12,5 μM , %54'lük inhibisyon için 25,0 μM , %82'lik inhibisyon için 50,0 μM , %95'lik inhibisyon için 100,0 μM veya 150,0 μM BPTES uygulanması gerektiği hesaplanmıştır.

Etken maddeler teker teker uygulandığında ise PFK15 için MCF-7 hücre hattında %3'lük inhibisyon için 3,125 μM , %10'luk inhibisyon için 6,25 μM , %5'lik inhibisyon için 12,5 μM , %94'lük inhibisyon için 25,0 μM , %98'lik inhibisyon için 50,0 μM ve %96'lık inhibisyon için 100,0 μM PFK15 uygulanması gerektiği hesaplanmıştır.

İki etken maddenin kombinasyon uygulamasının 48. Saat sonuçlarına göre ise MCF-7 hücre hattında:

- 11,5 μM BPTES+9 μM PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %95,
- 17,5 μM BPTES+13,5 μM PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %99,
- IC_{50} dozları olan 23,0 μM BPTES+18,0 μM PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %98,
- 34,5 μM BPTES+27,0 μM PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %97 ve
- 46,0 μM BPTES+36,0 μM PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %94 olarak hesaplanmıştır.

Bu dozlara göre hesaplanan 48. Saat Kİ değerleri ise sırasıyla 0,249, 0,169, 0,314, 0,577 ve 1,096'dır. İzobologram analizine göre 24. ve 72. Saat sonuçları da benzer şekildedir. Bu sonuçlara göre BPTES ve PFK15 etken maddelerinin kombinasyon dozları içerisinde en yüksek doz hariç bütün dozlar sinerjik etkiye sahip, en yüksek uygulanan doz ise additif etkiye sahiptir. MCF-7 hücre hattı için BPTES IC₅₀ ve PFK15 IC₅₀ dozlarının kombinasyonunun uygulanması %98'lik bir etkiye sahip olmasına rağmen, hesaplanan doz etkileri daha az sistematik toksisite istenilen durumlarda doz azaltma seçeneklerine başvurmak için elverişli durumdadır.

Doz etki eğrilerine göre de (Şekil 6., Şekil 8. ve Şekil 10.) BPTES ve PFK15 kombinasyonun MCF-7 hücre hattında 24., 48. ve 72. saat uygulamalarında kombinasyon uygulamalarının ilaçların teker teker uygulandığı gruplara göre çok daha fazla etkili olduğu gözlemlenmektedir. 24., 48. ve 72. saat uygulamaları karşılaştırıldığında benzer sitotoksitelere ulaşılmıştır. Ayrıca uygulanan kombinasyon dozlarının da aşağı yukarı benzer etkilere sahip olduğu, BPTES+PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında oldukça sitotoksik olduğu gözlemlenmektedir.

BPTES ve PFK15 kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında 24., 48. ve 72. saat normalize izobologram analizine göre (Şekil 5., Şekil 7. ve Şekil 9.) uygulanan dozlar 7,5 µM BPTES+2,0 µM PFK15, 11,5 µM BPTES+2,5 µM PFK15, 15,0 µM BPTES+3,5 µM PFK15, 22,5 µM BPTES+5,5 µM PFK15 ve 30,0 µM BPTES+7,0 µM PFK15 şeklindedir.

Etken maddeler teker teker uygulandığında ise BPTES için MDA-MB-231 hücre hattında %31'lik inhibisyon için 6,25 µM, %42'lik inhibisyon için 12,5 µM, %61'lik inhibisyon için 25,0 µM, %83'lük inhibisyon için 50,0 µM ve %91'lik inhibisyon için 100,0 µM BPTES uygulanması gerektiği hesaplanmıştır.

Etken maddeler teker teker uygulandığında ise PFK15 için MDA-MB-231 hücre hattında %13'lük inhibisyon için 0,3125 µM, %9'luk inhibisyon için 0,625 µM, %19'luk inhibisyon için 1,25 µM, %33'lük inhibisyon için 2,5 µM, %59'luk inhibisyon için 5,0 µM ve %98'lik inhibisyon için 10,0 µM PFK15 uygulanması gerektiği hesaplanmıştır.

İki etken maddenin kombinasyon uygulamasının 48. Saat sonuçlarına göre ise MDA-MB-231 hücre hattında:

- 7,5 µM BPTES+2,0 µM PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %6,

- 11,5 μ M BPTES+2,5 μ M PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %4,
- IC₅₀ dozları olan 15,0 μ M BPTES+3,5 μ M PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %11,
- 22,5 μ M BPTES+5,5 μ M PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %66 ve
- 30,0 μ M BPTES+7,0 μ M PFK15 uygulanan grupta etkilenen kısım %91 olarak hesaplanmıştır.

Bu dozlara göre hesaplanan 48. Saat Kİ değerleri ise sırasıyla 10,705, 20,640, 12,221, 2,505 ve 1,003'tür. İzobologram analizine göre 24. ve 72. Saat sonuçları da benzer şekildedir. Bu sonuçlara göre BPTES ve PFK15 etken maddelerinin kombinasyon dozları içerisinde en yüksek doz hariç bütün dozlar agonist etkiye sahip, en yüksek uygulanan doz ise additif etkiye sahiptir. MDA-MB-231, üçlü negatif meme kanserine örnek bir hücre hattıdır ve oldukça agresif karakteristiğe sahiptir ve etkili tedavi yöntemleri yeteri kadar bulunmamaktadır. Anti-östrojen ve anti-HER-2 ajanları gibi hedefli tedaviler de spesifik reseptör bölgelerinin bulunmamasından dolayı yetersiz gelmektedir. Tedavi olanakları ise güncel olarak sistematik kemoterapi ajanları ile olsa da başarı oranı oldukça düşüktür (Maughan, Lutterbie & Ham, 2010). Bu bilgiler ve deney sonuçları ele alındığında ise MDA-MB-231 hücre hattı için doz arttırma seçeneğine başvurulabilir.

Doz etki eğrilerine göre de (Şekil 12., Şekil 14. ve Şekil 16.) BPTES ve PFK15 kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre hattında 24., 48. ve 72. saat uygulamalarında kombinasyon dozunun ile sitotoksosite arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmakta, ancak uygulanan ilk üç kombinasyon dozunun herhangi bir sinerjik veya additif etkiye sahip olmadığı, doz arttırımıyla kombinasyonunun additif etkiye sahip olabileceği bulunmuştur. Ayrıca 24., 48. ve 72. saat uygulamaları karşılaştırıldığında 72. saat uygulamasının en yüksek sitotoksositeye sahip olduğu ve etken maddelerin MDA-MB-231 hücre hattında daha uzun süreli olarak uygulanabileceği düşünülmüştür. Uygulanan etken maddelerin ve bu etken maddelerin kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre hattında daha az sitotoksik etkilere neden olması MDA-MB-231 hücre hattının daha dirençli üçlü negatif meme kanseri hücre hattına örnek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücrel apoptoz çalışmaları, akış sitometrisi tabanlı yöntemlerin tanıtılmasından bu yana önemli ölçüde etkilenmiştir. Propidium iyodür (PI), hücrelerin canlı, apoptotik veya nekrotik olup olmadığını belirlemek için Annexin V ile birlikte, plazma

membran bütünlüğü ve geçirgenliği farklılıklar aracılığıyla yaygın olarak kullanılır. Annexin V/PI protokolü, apoptotik hücreleri incelemek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. PI'nin bir hücreye girme yeteneği, zarın geçirgenliğine bağlıdır; PI, sağlam bir plazma zarının varlığı nedeniyle canlı veya erken apoptotik hücreleri boyamaz. Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde, plazma ve nükleer membranların bütünlüğü azalır, PI'nin zarlardan geçmesine, nükleik asitlerin arasına girmesine ve kırmızı floresan göstermesine izin verir (Rieger, Nelson, Konowalchuk & Barreda, 2011).

Kombinasyon deneyinin sonuçlarını dikkate alarak, apoptoz deneyinde uygulanacak olan dozlar her iki hücre hattı için farklılık göstermektedir. Luminal A meme kanserine örnek olan MCF-7 hücre hattında BPTES+PFK15 kombinasyonu oldukça etkili sonuçlar vermiş olup, her iki etken madde için doz azaltma seçeneği uygulanıp hücrelerin apoptoza gitme oranları araştırılabilir durumdadır. Üçlü negatif meme kanserine örnek olan MDA-MB-231 hücre hattında ise BPTES+PFK15 kombinasyonu çok etkili olmayıp, her iki etken madde için doz arttırma seçeneği uygulanıp hücrelerin apoptoza gitme oranları araştırılmalıdır.

MCF-7 hücre hattında apoptotik oranların araştırılmasında uygulanan etken madde dozları 23,0 μ M BPTES, 18,0 μ M PFK15, 23,0 μ M BPTES+18,0 μ M PFK15, 17,5 μ M BPTES+13,5 μ M PFK15 ve 11,5 μ M BPTES+9,0 μ M PFK15 şeklindedir.

MCF-7 hücre hattı apoptoz verilerine göre etken madde uygulanmayan kontrol grubunda %70,2 oranında canlı hücre bulunmakta, erken apoptoz oranı %18,6, geç apoptoz oranı ise %7,9'dır. Sadece 23,0 μ M BPTES etken maddesi uygulanan grupta %26,2 oranında canlı hücre bulunmakta, erken apoptoz oranı %62,6, geç apoptoz oranı ise %9,2'dir. Sadece 18,0 μ M PFK15 etken maddesi uygulanan grupta %45,1 oranında canlı hücre bulunmakta, erken apoptoz oranı %46,2, geç apoptoz oranı ise %8,7'dir. 23,0 μ M BPTES+18,0 μ M PFK15 uygulanan grupta canlılık oranı %0,8, erken apoptoz oranı %89,1, geç apoptoz oranı ise %10,1'dir. 17,5 μ M BPTES+13,5 μ M PFK15 uygulanan grupta canlılık oranı %8,4, erken apoptoz oranı %69,1, geç apoptoz oranı ise %22,5'tir. En düşük uygulanan doz olan 11,5 μ M BPTES+9,0 μ M PFK15 uygulanan grupta ise canlılık oranı %13,8, erken apoptoz oranı %66,4, geç apoptoz oranı ise %19,6'dır.

Apoptoz analizine göre BPTES etken maddesinin IC₅₀ dozu uygulamasının MCF-7 hücre hattında yaklaşık 2,7 kat, PFK15 etken maddesinin IC₅₀ dozu uygulamasının

MCF-7 hücre hattında 2 kat, kombinasyonun IC₅₀ dozunun uygulamasının MCF-7 hücre hattında 3,7 kat, daha düşük kombinasyon dozunun uygulamasının MCF-7 hücre hattında 3,4 kat ve en düşük kombinasyon dozunun uygulamasının MCF-7 hücre hattında 3,2 kat apoptozu indüklediğini bulduk.

Elde edilen veriler kombinasyon analizi ile de orantılı olup bu iki etken maddenin MCF-7 hücre hattında sinerjik etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattında ise apoptotik oranların araştırılmasında uygulanan etken maddelerin dozları 15,0 µM BPTES, 3,5 µM PFK15, 15,0 µM BPTES+3,5 µM PFK15, 22,5 µM BPTES+5,5 µM PFK15 ve 30,0 µM BPTES+7,0 µM PFK15 şeklindedir.

MDA-MB-231 hücre hattı apoptoz verilerine göre etken madde uygulanmayan kontrol grubunda %81,0 oranında canlı hücre bulunmakta, erken apoptoz oranı %13,7, geç apoptoz oranı ise %3,4'tür. Sadece 15,0 µM BPTES etken maddesi uygulanan grupta %74,7 oranında canlı hücre bulunmakta, erken apoptoz oranı %15,3, geç apoptoz oranı ise %5,4'tür. Sadece 3,5 µM PFK15 etken maddesi uygulanan grupta %85,6 oranında canlı hücre bulunmakta, erken apoptoz oranı %11,0, geç apoptoz oranı ise %2,2'dir. 15,0 µM BPTES+3,5 µM PFK15 uygulanan grupta canlılık oranı %69,1, erken apoptoz oranı %19,7, geç apoptoz oranı ise %5,9'dur. 22,5 µM BPTES+5,5 µM PFK15 uygulanan grupta canlılık oranı %54,5, erken apoptoz oranı %29,3, geç apoptoz oranı ise %8,4'tür. En yüksek uygulanan doz olan 30,0 µM BPTES+7,0 µM PFK15 uygulanan grupta ise canlılık oranı %57,5, erken apoptoz oranı %30,7, geç apoptoz oranı ise %7,8'dir.

Apoptoz analizine göre BPTES uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında yaklaşık 1,2 kat, PFK15 uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında 0,7 kat, kombinasyonun IC₅₀ dozunun 1,5 kat, daha yüksek kombinasyon dozunun MDA-MB-231 hücre hattında 2,2 kat ve en yüksek kombinasyon dozunun MDA-MB-231 hücre hattında 2,25 kat apoptozu indüklediğini bulduk.

Elde edilen veriler kombinasyon analizi ile de orantılı olup bu iki etken maddenin MDA-MB-231 hücre hattında sinerjik etkiye sahip olmadığı, kombinasyon uygulamasının yüksek konsantrasyonlarda additif veya sinerjik etkiye sahip olabileceğine ulaşılmıştır.

BPTES ve PFK15 etken maddelerinin ve kombinasyonunun meme kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser etkilerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda hem sitotoksikite hem de apoptoz sonuçları ele alındığında tutarlı sonuçlar elde edilmiş olup, glikoliz ve glutaminoliz mekanizmalarının eş zamanlı inhibisyonu ile proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozu indüklenmesi gözlemlenmiştir. Bu sonuçların temelinde yatan alt mekanizmaları aydınlatmak amacı ile de ekspresyon analizi aşamasına geçilmiştir.

Kanser hücrelerinin artmış glutamin metabolizmasıyla hem hücre içine glutamin alımı hem de glutamin tüketimi artmaktadır ve çoğu kanser türünde artan glutamin metabolizması kanser tedavileri için terapötik hedef haline gelmiştir (Dias vd., 2019). BPTES ve PFK15 kombinasyonunun glutaminoliz ve glikoliz yolları üzerine etkilerini aydınlatmak amacıyla mRNA düzeyinde ekspresyon analizi yapılmıştır. GLS2 ekspresyonu GATA3 transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilmektedir ve gen ürünü proliferasyon ve tümörigenez ile ilişkilendirilmiştir (Lukey vd., 2019). Ayrıca, MYC ailesi üyelerinden MYCN'in GLS2'yi direkt olarak aktive etmesiyle glutaminin glutamata dönüşümü yani glutaminoliz oranı oldukça artmaktadır (Xiao vd., 2015). PFKFB3, ökaryotlarda glikolizi kontrol eden düzenleyici bir molekül olan fruktoz-2,6-bisfosfatın hem sentezinde hem de parçalanmasında rol oynayan iki işlevli bir protein ailesine aittir (Pilkis vd., 1995).

$2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi, qPCR deneyleri için popüler yazılım paketlerinde en sık bulunan bağıl nicelme yöntemidir. Eşik döngüsü (CT), floresan seviyesinin belirli bir miktara (eşik) ulaştığı döngüdür. Bu yöntem, normalleştirici olarak bir referans geni kullanarak, hedef ve referans numunelerdeki nispi gen ekspresyonunu hesaplamak için bir qPCR sisteminden üretilen CT bilgilerini doğrudan kullanır (Rao, Lai & Huang, 2013). Tez çalışmasında kullanılan primer çiftleri biyoinformatik araçlar kullanılarak özel olarak üretildi ve analiz aşamasında normalleştirici gen olarak beta-aktin geni kullanıldı.

Ekspresyon analizi sonuçlarına göre (Tablo 9.) MCF-7 hücre hattında glikoliz ve glutaminoliz mekanizmaları incelenmiştir.

Glikoliz ile ilişkilendirilen PFKFB3 ekspresyonu glutaminaz inhibitörü BPTES'in IC₅₀ dozunun uygulamasında 1,09 kat azalmış durumda, PFK15'in IC₅₀ dozunun uygulamasında yaklaşık 9 kat artmış durumda, kombinasyonun IC₅₀ dozunun

uygulamasında 1,7 kat azalmış durumda ve kombinasyonun doz azaltma indeksinin uygulamasında 25 kat azalmış durumdadır.

GATA3 ekspresyonu BPTES'in IC₅₀ dozunun uygulamasında 1,6 kat artmış durumda, PFK15'in IC₅₀ dozunun uygulamasında yaklaşık 25 kat artmış durumda, kombinasyonun IC₅₀ dozunun uygulamasında 4 kat artmış durumda ve kombinasyonun doz azaltma indeksinin uygulamasında 1,2 kat artmış durumdadır.

MYC ekspresyonuna BPTES'in IC₅₀ dozunun uygulamasında saptanmamış, PFK15'in IC₅₀ dozunun uygulamasında yaklaşık 18 kat artmış durumda, kombinasyonun IC₅₀ dozunun uygulamasında 4,4 kat artmış durumda ve kombinasyonun doz azaltma indeksinin uygulamasında ekspresyon saptanmamıştır.

MYCN ve GLS2 ekspresyonlarına ise MCF-7 hücre hattında saptanmamıştır.

Glikoliz inhibitörü PFK15'in IC₅₀ dozunun uygulamasında ~ 9 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumun PFKFB3 proteininin inhibisyonunun PFKFB3 geninde aşırı ekspresyona sebep olabileceği düşünülmüştür. Kombinasyon dozlarının uygulamasından sonra ise PFKFB3 ekspresyonu kayda değer derecede düşüşe uğramıştır. BPTES+PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında sinerjik etki gösterdiği ve oldukça öldürücü olduğu önceki deney aşamaları olan sitotoksikite ve apoptoz aşamalarında gösterilmiştir. Bu aşamada ekspresyon seviyelerindeki düşüşün hücre sayısındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.

Glutaminoliz ile ilişkilendirilen GATA3, MYC ailesi üyeleri ve GLS2 ekspresyonları glutaminaz inhibitörü BPTES'in IC₅₀ dozunun uygulamasında sadece GATA3 ekspresyonunda artış gözlemlenmektedir. MYC ailesi üyeleri ve GLS2 ekspresyonunun Luminal A meme kanseri hücre hattında ekspresyonları olmadığı düşünülmektedir. GLS2 ekspresyonu GATA3 transkripsiyon faktörü GLS2 ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyona ve tümörigeneze neden olmaktadır (Lukey vd., 2019). Ancak MCF-7 hücre hattında GLS2 ekspresyonu gözlemlenmemektedir. Glikoliz inhibitörü PFK15'in IC₅₀ dozunun uygulamasında GATA3 ekspresyonu seviyesinde ~ 25 kat artış gözlemlenmektedir. Bu durumda EMT geçişini kolaylaştıran p38 Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazların (p38 MAPK'lar) bir üyesi olan p38γ'nın ErbB2 ve ErbB4'ün yukarı akışta reseptör kinaz olarak görev aldığı ErbB2/ErbB4/p38γ/GATA3/miR-200b/Suz12 yolağı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Her ikisi de ubiquitin-proteazoma bağlı bozunma yoluyla p38γ'yı aktive etme yeteneğine sahiptir ve bu daha sonrasında GATA3'ün

bozulmasına neden olur. Bu baskılama, miR-200b'nin yukarı regülasyonuna neden olur ve Suz12'nin ifadesini aşağı regüle eder, sonunda EMT'ye ve meme kanseri invazivliğine yol açar (Xu vd., 2021). Kombinasyon dozlarının uygulamasından sonra ise GATA3 ekspresyonu kayda değer derecede düşüşe uğramıştır. BPTES+PFK15 kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında sinerjik etki gösterdiği ve oldukça öldürücü olduğu önceki deney aşamaları olan sitotoksikite ve apoptoz aşamalarında gösterilmiştir. Bu aşamada ekspresyon seviyelerindeki düşüşün hücre sayısındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.

Ekspresyon analizi sonuçlarına göre (Tablo 10.) MDA-MB-231 hücre hattında glikoliz ve glutaminoliz mekanizmaları incelenmiştir. Glikoliz ile ilişkilendirilen PFKFB3 ekspresyonu glutaminaz inhibitörü BPTES'in IC_{50} dozunun uygulamasında ~ 2,3 kat, glikoliz inhibitörü PFK15'in IC_{50} dozunun uygulamasında ~ 3,6 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumun PFKFB3 proteininin inhibisyonunun PFKFB3 geninde aşırı ekspresyona sebep olabileceği düşünülmüştür. Kombinasyon dozlarının uygulamasından sonra ise PFKFB3 ekspresyonu 4 kat azalmış olarak bulunmuştur. BPTES+PFK15 kombinasyonunun MDA-MB-231 hücre hattında additif etki gösterdiği ve etken maddelerin teker teker uygulanmasına göre daha öldürücü olduğu önceki deney aşamaları olan sitotoksikite ve apoptoz aşamalarında gösterilmiştir. Bu aşamada ekspresyon seviyelerindeki düşüşün hücre sayısındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.

Glutaminoliz ile ilişkilendirilen GATA3 ekspresyonu BPTES'in IC_{50} dozunun uygulamasında 1,1 kat artmış durumda, PFK15'in IC_{50} dozunun uygulamasında 1,1 kat azalmış durumda ve kombinasyonun IC_{50} dozunun uygulamasında 1,2 kat artmış olarak bulundu.

MYC ve MYCN ekspresyonlarına ise MDA-MB-231 hücre hattında saptanmamıştır. GLS2 ekspresyonu ise BPTES'in IC_{50} dozunun uygulamasında 2,5 kat artmış durumda, PFK15'in IC_{50} dozunun uygulamasında yaklaşık yaklaşık 2,1 kat artmış durumda, kombinasyonun IC_{50} dozunun uygulamasında 2,1 kat artmış olarak bulundu.

MYC ailesi üyelerinin ekspresyonunun üçlü negatif meme kanseri hücre hattında ekspresyonları olmadığı düşünülmektedir. GLS2 ekspresyonu GATA3 transkripsiyon faktörü GLS2 ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyona ve tümörigeneze neden olduğu bilinmekte ve glutaminoliz ile ilişkilendirilen GATA3 ekspresyonu MDA-

MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında GLS2 ekspresyonu ile doğru orantılı olarak sonuç vermektedir. MDA-MB-231 hücre hattında GATA3 transkripsiyon faktörünün ekspresyon seviyeleri ile GLS2'nin ekspresyon seviyeleri korelasyon göstermektedir. Ancak, BPTES ve PFK15 etken maddelerinin ve kombinasyonun MDA-MB-231 hücre hattında belirli genlerin ekspresyon düzeylerinde kayda değer bir fark yaratmadığı düşünülmektedir.



Sonuç ve Öneriler

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en çok görülen kanser türüdür ve geliştirilen yeni tedavi olanaklarına rağmen ölüm oranlarında az miktarda azalma elde edilebilmiştir. Tez çalışmamızda meme kanseri hücre modelinde değişen metabolizma yollarına odaklanılarak, glikoliz ve glutaminoliz mekanizmalarının BPTES ve PFK15 ajanları ile eş zamanlı baskılanması hedeflenmiş ve bu amaç doğrultusunda bu hücre hatlarında antikanser özellikler araştırılmıştır.

BPTES+PFK15 kombinasyonunun MCF-7 Luminal A meme kanseri hücre hattında oldukça sinerjik ve sitotoksik etkilere sahip olduğu sitotoksosite ve kombinasyon çalışmaları ile gösterilmiş olup, kombinasyonunun apoptotik etkileri de apoptoz çalışması ile desteklenmektedir. BPTES+PFK15 kombinasyonu Luminal A tipi meme kanseri araştırmalarında model organizmalar kullanılarak ileri aşama çalışmalar için elverişlidir.

MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı tedaviye cevap vermesi oldukça zor olmasına rağmen kombinasyon uygulamalarının yüksek konstanstrasyonlarda daha sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğu sitotoksosite, kombinasyon ve apoptoz deneyleri ile desteklenmekte olup, model organizmalar üzerinde çalışmalar yapılabilir durumdadır.

Glutaminaz ekspresyonu ve glutaminoliz agresif meme kanseri türlerinde daha çok ortaya çıkmaktadır. Üçlü negatif meme kanserinde glutaminoliz ekspresyonu çok daha fazladır.

Normal şartlar altında GLS2 ekspresyonu ile ilişkilendirilen GATA3 transkripsiyon faktörünün Luminal A meme kanseri hücre hattında dikkat çeken ekspresyonu ErbB2/ErbB4/p38 γ /GATA3/miR-200b/Suz12 yolağı ile ilişkili olabilir ve başka bir araştırma konusu olarak ortaya çıkabilir.

İlgili genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon analizlerinin yanı sıra gen ürünlerinin protein düzeyinde Western Blot analizleri de yapılarak daha kapsamlı sonuçlar elde edilebilir.

Proliferasiyona uğrayan hücrelerin yanı sıra sağlıklı hücreler de glikoliz ve glutaminoliz mekanizmalarını gerçekleştirmektedir. Etken maddelerin ve kombinasyonun sağlıklı hücreleri ne derecede etkileyeceği test edilmelidir.

Kaynaklar

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221. doi: 10.2174/1389201017666160808160513
- Akins, N., Nielson, T., & Le, H. (2018). Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Current Topics In Medicinal Chemistry*, 18(6), 494-504. doi: 10.2174/1568026618666180523111351
- Bedewy, A. M., Elmaghraby, S. M., Shehata, A. A., & Kandil, N. S. (2017). Prognostic value of miRNA-155 expression in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Turkish Journal of Hematology*, 34(3), 207.
- Bernard-Gallon, D. J., Satih, S., Chalabi, N., Rabiau, N., Bosviel, R., Fontana, L., & Bignon, Y. J. (2010). Phytoestrogens regulate the expression of genes involved in different biological processes in BRCA2 knocked down MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10a cell lines. *Oncology reports*, 23(3), 647-653.
- Berrouet, C., Dorilas, N., Rejniak, K. and Tuncer, N., 2020. Comparison of Drug Inhibitory Effects in Monolayer and Spheroid Cultures. *Bulletin of Mathematical Biology*, 82(6).
- Biosciences, B. D. (2011). Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System.
- Burstein, S. H., McQuain, C. A., Ross, A. H., Salmonsens, R. A., & Zurier, R. E. (2011). Resolution of inflammation by N- arachidonoylglycine. *Journal of cellular biochemistry*, 112(11), 3227-3233.
- Cantor, J., & Sabatini, D. (2012). Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discovery*, 2(10), 881-898. doi: 10.1158/2159-8290.cd-12-0345
- Cho, D. H., Jo, Y. K., Hwang, J. J., Lee, Y. M., Roh, S. A., & Kim, J. C. (2009). Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer letters*, 274(1), 95-100.
- Dias, M., Adamoski, D., dos Reis, L., Ascensão, C., de Oliveira, K., & Mafra, A. vd. (2019). GLS2 is protumorigenic in breast cancers. *Oncogene*, 39(3), 690-702. doi: 10.1038/s41388-019-1007-z

- Feng, F., Yu, Q. and Zhang, F., 2022. Roles of microRNAs in metabolic reprogramming of breast cancer. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 72(2), pp.312-316.
- Ferreira, I., Quesñay, J., Bastos, A., Rodrigues, C., Vollmar, M., & Krojer, T. vd. (2021). Structure and activation mechanism of the human liver-type glutaminase GLS2. *Biochimie*, 185, 96-104. doi: 10.1016/j.biochi.2021.03.009
- Geck, R. and Toker, A., 2016. Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Advances in Biological Regulation*, 62, pp.11-17.
- Gustafsson, N., Färnegårdh, K., Bonagas, N., Ninou, A., Groth, P., & Wiita, E. vd. (2018). Targeting PFKFB3 radiosensitizes cancer cells and suppresses homologous recombination. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-06287-x
- Hamidi, H., Lilja, J., & Ivaska, J. (2017). Using xCELLigence RTCA instrument to measure cell adhesion. *Bio-protocol*, 7(24), e2646-e2646.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., & Poortmans, P. vd. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1). doi: 10.1038/s41572-019-0111-2
- Liao, M., Liao, W., Xu, N., Li, B., Liu, F., Zhang, S., ... & Zhang, Y. (2019). LncRNA EPB41L4A-AS1 regulates glycolysis and glutaminolysis by mediating nucleolar translocation of HDAC2. *EBioMedicine*, 41, 200-213.
- Liberti, M. and Locasale, J., 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), pp.211-218.
- Lu, L., Chen, Y., & Zhu, Y. (2017). The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer. *Oncotarget*, 8(37), 62793-62802. doi: 10.18632/oncotarget.19513
- Lukey, M., Cluntun, A., Katt, W., Lin, M., Druso, J., & Ramachandran, S. vd. (2019). Liver-Type Glutaminase GLS2 Is a Druggable Metabolic Node in Luminal-Subtype Breast Cancer. *Cell Reports*, 29(1), 76-88.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.076
- Lüönd, F., Tiede, S., & Christofori, G. (2021). Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression. *British Journal Of Cancer*. doi: 10.1038/s41416-021-01328-7

- Katt, W., & Cerione, R. (2014). Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. *Drug Discovery Today*, 19(4), 450-457. doi: 10.1016/j.drudis.2013.10.008
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American family physician*, 81(11), 1339–1346.
- Masisi, B., El Ansari, R., Alfarsi, L., Rakha, E., Green, A. and Craze, M., 2020. The role of glutaminase in cancer. *Histopathology*, 76(4), pp.498-508.
- Moon, H., Ospina-Muñoz, N., Noe-Kim, V., Yang, Y., Elzey, B., Konieczny, S. and Han, B., 2020. Subtype-specific characterization of breast cancer invasion using a microfluidic tumor platform. *PLOS ONE*, 15(6), p.e0234012.
- Moulder, D., Hatoum, D., Tay, E., Lin, Y. and McGowan, E., 2018. The Roles of p53 in Mitochondrial Dynamics and Cancer Metabolism: The Pendulum between Survival and Death in Breast Cancer?. *Cancers*, 10(6), p.189.
- Nagana Gowda, G. A., Barding, G. A., Jr, Dai, J., Gu, H., Margineantu, D. H., Hockenbery, D. M., & Raftery, D. (2018). A Metabolomics Study of BPTES Altered Metabolism in Human Breast Cancer Cell Lines. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, 49. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00049>
- Nguyen, O. T. K., Bui, A. N. T., Vu, N. B., & Van Pham, P. (2016). Overexpress of CD47 does not alter the stemness of MCF-7 breast cancer cells. *Biomedical Research and Therapy*, 3(09), 826-835.
- Park, J. H., Pyun, W. Y., & Park, H. W. (2020). Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*, 9(10), 2308. <https://doi.org/10.3390/cells9102308>
- Pathak, T., Gueguinou, M., Walter, V., Delierneux, C., Johnson, M. T., Zhang, X., ... & Trebak, M. (2020). Dichotomous role of the human mitochondrial Na⁺/Ca²⁺/Li⁺ exchanger NCLX in colorectal cancer growth and metastasis. *Elife*, 9, e59686.
- Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J., & Lange, A. J. (1995). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 799-835.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the 2⁻($\Delta\Delta$ CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71–85.

- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011 Apr 24;(50):2597. doi: 10.3791/2597. PMID: 21540825; PMCID: PMC3169266.
- Samal, K., Zhao, P., Kendzicky, A., Yco, L. P., McClung, H., Gerner, E., ... & Sholler, G. (2013). AMXT- 1501, a novel polyamine transport inhibitor, synergizes with DFMO in inhibiting neuroblastoma cell proliferation by targeting both ornithine decarboxylase and polyamine transport. *International journal of cancer*, 133(6), 1323-1333.
- Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 151–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Shukla, K., Ferraris, D., Thomas, A., Stathis, M., Duvall, B., & Delahanty, G. vd. (2012). Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl Sulfide 3 (BPTES) Analogs as Glutaminase Inhibitors. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 55(23), 10551-10563. doi: 10.1021/jm301191p
- Tallarida, R. (2010). Combination Analysis. *Chemo Fog*, 133-137. doi: 10.1007/978-1-4419-6306-2_17
- Tanaka, K., Sasayama, T., & Kohmura, E. (2015). Targeting glutaminase and mTOR. *Oncotarget*, 6(29), 26544-26545. doi: 10.18632/oncotarget.5263
- Vander Heiden, M. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), 671-684. doi: 10.1038/nrd3504
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (New York, N.Y.), 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Wang, Y., Qu, C., Liu, T., & Wang, C. (2020). PFKFB3 inhibitors as potential anticancer agents: Mechanisms of action, current developments, and structure-activity relationships. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 203, 112612. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112612

- Xiao, D., Ren, P., Su, H., Yue, M., Xiu, R., Hu, Y., Liu, H., & Qing, G. (2015). Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget*, 6(38), 40655–40666. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5821>
- Xu, L., Yin, Y., Li, Y., Chen, X., Chang, Y., & Liu, J. vd. (2020). A Glutaminase Isoform Switch Drives Therapeutic Resistance and Disease Progression of Prostate Cancer. *SSRN Electronic Journal*. doi: 10.2139/ssrn.3600561
- Xu, M., Wang, S., Wang, Y., Wu, H., Frank, J. A., Zhang, Z., & Luo, J. (2018). Role of p38 γ MAPK in regulation of EMT and cancer stem cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(11), 3605–3617. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.024>
- Xu, W., Liu, R., Dai, Y., Hong, S., Dong, H., & Wang, H. (2021). The Role of p38 γ in Cancer: From review to outlook. *International journal of biological sciences*, 17(14), 4036–4046. <https://doi.org/10.7150/ijbs.63537>
- Yin, L., Duan, J., Bian, X., & Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1). doi: 10.1186/s13058-020-01296-5
- Zhu, W., Ye, L., Zhang, J., Yu, P., Wang, H., Ye, Z., & Tian, J. (2016). PFK15, a Small Molecule Inhibitor of PFKFB3, Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Inhibits Invasion in Gastric Cancer. *PLOS ONE*, 11(9), e0163768. doi: 10.1371/journal.pone.0163768

Teşekkür

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca değerli bilgileriyle ve özverisiyle, karşılaştığım her sorunumda desteğini hep hissettiğim Sayın Danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e, Sonsuz desteğini ve sınırsız yardımlarını her zaman gördüğüm İkinci danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Besra ÖZMEN YELKEN'e, Katkıları ve yardımlarını her zaman gördüğüm değerli Jüri üyem Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül DALMIZRAK'a, Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Zuhale EROĞLU, Doç.Dr. Çığır BİRAY AVCI, Doç. Dr. Buket KOSOVA, Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ, Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ, Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER, Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL ve Doç. Dr. Aşlı TETİK VARDARLI'ya, Ekip arkadaşlarım Aycan AŞIK, Röya GASIMLI, Çağla KAYABAŞI ve Çağlar ÇELEBİ'ye, Sınırsız yardımlarından dolayı değerli Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri Latife Merve OKTAY ve İbrahim Halil ÇİTÇİ ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Burak DURMAZ'a, Özveri ve desteklerini her zaman gördüğüm yüksek lisans öğrencileri sevgili Burcu BÖLÜK, Ayşe ÇEKİN, Uygur GENİŞ, Emir ÇAKAR ve İrem KARACAN'a Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca sevgi ve desteklerini eksik etmeyen Annem Nurten ÜLGER ve eşim Oğuz ÖZİLERİ başta olmak üzere Bütün aile fertlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım... Projemize verdikleri destekten dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonu'na ve Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 14.09.2022

Zeynep ÖZİLERİ

Özgeçmiş

Lisans eğitimini İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde tamamladı. 2019 yılında Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başlamıştır.

