

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**GLUT-1 İNHİBİTÖRÜ WZB117'NİN MDA-MB 231
İNSAN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan
Fatih Mehmet KOCA**

**Danışman
Doç. Dr. Mehtap NİSARİ**

Yüksek Lisans Tezi

**EYLÜL, 2024
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**GLUT-1 İNHİBİTÖRÜ WZB117'NİN MDA-MB 231
İNSAN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Fatih Mehmet KOCA**

**Danışman
Doç. Dr. Mehtap NİSARİ**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2023-13305 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**EYLÜL, 2024
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Fatih Mehmet KOCA

İmza:

(Faint watermark signature of Fatih Mehmet KOCA)

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“GLUT-1 İnhibitörü WZB117”nin MDA-MB 231 İnsan Meme Kanseri Üzerine Etkisi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi “ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Fatih Mehmet KOCA

Danışman

Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Harun ÜLGER

KABUL ve ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Mehtap NİSARİ danışmanlığında **Fatih Mehmet KOCA** tarafından hazırlanan “**GLUT-1 İnhibitörü WZB117’nin MDA-MB 231 İnsan Meme Kanseri Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

JURİ

İmza

Danışman: Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

Üye: Prof. Dr. Harun ÜLGER

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ÖMERLİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

..... /...../ 2024

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmama başlarken bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, bu süreç boyunca yardım ve desteğini sürdürerek çalışmama katkıda bulunan saygı değer danışmanım sayın Doç. Dr. Mehtap NİSARİ hocama, tez çalışmamda ve değerlendirme süreçlerinde desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Harun ÜLGER'e,

Bilgi ve deneyimlerini samimiyetle aktaran Anatomi Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Erdoğan UNUR, sayın Doç. Dr. İlyas UÇAR, sayın Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER, sayın Dr. Öğr. Üyesi Özge AL'a,

Tezimin gerçekleştirilmesinde büyük katkıları olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Nazmiye BİTKEN ve Veteriner Fakültesi öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Serhat AL hocalarıma,

Tez sürecimde ve deney aşamamda yardımları ile yanımda olan çok değerli Arş. Gör. Dr. Sümeyye UÇAR'a,

Tez yazım sürecimde beni teşvik eden Öğr. Gör. Dr. Emine ÖZTAŞ, Öğr. Gör. Dr. Zeynep SARİMERMER YÜCEL ve Arş. Gör. Dr. Sema Nihal KÜÇÜKOĞLU'na,

Tez sürecimde yanımda olan ve desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşım Öğr. Gör. Mustafa TAŞTAN'a,

Kıymetli dostlarım Arş. Gör. Şükrü ATEŞ, Arş. Gör. Dr. Mustafa Emre BENLİ'ye,

Tez sürecimde beni motive eden Biyofizik Anabilim Dalı'ndan arkadaşlarım Kardelen TUR'a ve Arş. Gör. Salih VAROL'a,

Erciyes Anatomi ailesinin değerli personelleri Ferhat ÇAKMAKKAYA, Kazım KARABULUT'a,

Tez sürecimde maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve tezimin gerçekleştirilmesinde imkanlarını sonuna kadar açan Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi (GENKÖK) yönetici ve çalışanlarına,

GENKÖK'te deney sürecimde bana yardımcı olan Merve ALPTEKİN ve Şerife GÜRBÜZ'e

Yüksek eğitimim süresince büyük bir sabırla beni destekleyen, cesaretlendiren, yılmadan bu yolda devam etmemi sağlayan, maddi ve manevi olarak desteklerini esirgemeyen sevgili annem Zülfiye KOCA ve babam Cengiz KOCA'ya, Bu süreçte her daim yanımda olduklarını hissettiğim baş tacım ablam Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Şeyma KOCA'ya ve sevgili kardeşim kıymetlim Yavuz Selim KOCA'ya,

Göstermiş oldukları sabır ve anlayış için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



GLUT-1 İNHİBİTÖRÜ WZB117’NİN MDA-MB 231 İNSAN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Fatih Mehmet KOCA

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2024

Danışman: Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

ÖZET

Kanser hücreleri, glukoz konsantrasyonundaki değişikliklere karşı normal hücelere göre daha duyarlıdır. Glukoz taşınmasının çeşitli aşamalarının inhibe edilmesi, kanser hücreleri içindeki hem enerji tedarikini hem de biyosentez süreçlerini ciddi şekilde bozmaktadır. WZB117, polifenolik bir bileşiktir ve GLUT-1'in merkezi kanal bölgesine bağlanarak glukoz taşınımını engellemektedir. Bu çalışmada, in vitro hücre kültürü ortamında MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde WZB117 aracılı GLUT-1 inhibisyonunun ve glukozun kanser hücreleri üzerindeki potansiyel etkilerini incelenmesi amaçlandı. Hücrelerin canlılığını belirlemek için MTT analizi gerçekleştirildi. Glukozun ve WZB117'nin hücre proliferasyonuna olan etkileri AgNOR boyama yöntemi kullanılarak ortalama AgNOR sayısı ve TAA/NA oranı ile belirlendi. Apoptoz analizi Flow Sitometri cihazı kullanılarak değerlendirildi, FITC-konjuge Anneksin V ve 7AAD boyama yöntemleri kullanılarak yapılan bu analizlerde, WZB117'nin ve glukozun MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkileri incelendi. MTT analizi sonucunda WZB117'nin 48 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 4,08 µM olarak belirlendi. AgNOR boyama sonuçlarına göre, glukoz konsantrasyonlarının artışı kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırmıştır. Glukoz içermeyen gruplarda ise hücre proliferasyonunun belirgin şekilde azaldığı bulunmuştur. Bu bulgular, glukozun kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili bir faktör olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen apoptoz analizi sonucunda ise WZB117'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerini geç apoptoza indüklediği belirlenmiştir. Glukoz içeren grupların, glukoz içermeyen gruplara göre oldukça yüksek canlı hücre yüzdesine sahip olduğu ayrıca ölü hücre yüzdesinin en yüksek olduğu grubun ise glukoz içermeyen ve WZB117 uygulanan grup olduğu bulunmuştur. Bu tez çalışması, glukoz yoksunluğunun kanser hücrelerinin çoğalması ve invaziv etkiler üzerindeki inhibe edici etkilerini ortaya koymaktadır. Ayrıca, WZB117'nin kanser tedavisinde, kanserin oluşumunu ve ilerlemesini yavaşlatmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: AgNOR; GLUT-1; Kanser; MDA-MB 231; WZB117.

EFFECT OF GLUT-1 INHIBITOR WZB117 ON MDA-MB 231 HUMAN BREAST CANCER

Fatih Mehmet KOCA

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Anatomy

M.Sc. Thesis, September 2024

Supervisor: Assoc. Prof. Mehtap NISARI

ABSTRACT

Cancer cells are more sensitive to changes in glucose concentration than normal cells. Inhibition of various stages of glucose transport seriously impairs both energy supply and biosynthesis processes in cancer cells. WZB117 is a polyphenolic compound and prevents glucose transport by binding to the central channel region of GLUT-1. This study aimed to investigate WZB117-mediated GLUT-1 inhibition and the potential effects of glucose on cancer cells on MDA-MB 231 breast cancer cell line in in vitro cell culture. MTT assay was performed to determine cell viability. The effects of glucose and WZB117 on cell proliferation were determined by the mean AgNOR number and TAA/NA ratio using AgNOR staining method. Apoptosis analysis was evaluated using Flow Cytometry device, and in these analyses performed using FITC-conjugated Annexin V and 7AAD staining methods, the effects of WZB117 and glucose on the MDA-MB-231 cell line were examined. As a result of MTT analysis, the IC_{50} value of WZB117 after 48 hours of application was determined as 4.08 μ M. According to AgNOR staining results, increasing glucose concentrations increased the proliferation of cancer cells. Cell proliferation was found to be significantly reduced in glucose-free groups. These findings show that glucose is an effective factor on the proliferation of cancer cells. As a result of the apoptosis analysis performed, it was determined that WZB117 induced late apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. It was found that the groups containing glucose had a significantly higher percentage of live cells than the groups without glucose, and the group with the highest percentage of dead cells was the group without glucose and treated with WZB117. This thesis study reveals the inhibitory effects of glucose deprivation on cancer cell proliferation and invasive effects. It was also concluded that WZB117 may be effective in cancer treatment, slowing down the formation and progression of cancer.

Keywords: AgNOR; Cancer; GLUT-1; MDA-MB 231; WZB117.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
KISALTMALAR.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Embriyolojisi	3
2.2. Meme Anatomisi.....	5
2.3. Meme Fizyolojisi	8
2.4. Meme Kanserin Moleküler Temelleri.....	9
2.4.1. Meme Kanseri	11
2.4.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	12
2.4.3. Meme Kanseri Patogenezi	14
2.4.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	15
2.4.5. Meme Kanserin Tipleri ve Evreleri	17
2.5. Meme Kanseri Hücre Hatları	21
2.6. Kansere Hücrelerinde Glukoz Metabolizması.....	22
2.6.1. Meme Kanserinde Glukoz Metabolizması.....	22
2.6.2. Meme Kanserinde Glukoz Taşıyıcıları	24
2.6.3. GLUT-1 taşıyıcısı WZB117.....	27
2.7. AgNOR Boyama.....	29
2.8. Apoptoz ve Kansere.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deneyde Kullanılan Demirbaş ve Sarf Malzemeler.....	31
3.2. Hücre Kültürü Protokolleri	33
3.2.1. Hücre Hatları.....	33

3.2.2. Hücre Besiyeri	33
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi	33
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	34
3.2.5. Hücrelerin Sayımı	34
3.3. MTT Analizi için WZB117 Dozlarının Hazırlanması	35
3.4. Glukozun Hazırlanması.....	36
3.5. Sitotoksite Analizi (MTT Analizi).....	36
3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	37
3.7. AgNOR Boyama.....	38
3.7.1. Hücrelerin Fiksasyonu	38
3.7.2. AgNOR Boyama için Çözeltilerin Hazırlanması.....	39
3.7.3. AgNOR Boyamanın Gerçekleştirilmesi.....	39
3.8. Apoptoz (Annexin V&Dead Cell) Testi	40
3.9. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. MTT Sonuçları.....	41
4.2. AgNOR Boyama Bulguları.....	42
4.2.1. Ortalama AgNOR Analiz Sonuçları.....	45
4.2.2. TAA/NA Ortalamalarına Göre ANOVA Testi Sonuçları.....	48
4.3. Apoptoz Analizi Bulguları.....	52
4.3.1. Apoptoz Analizi ile Canlı Hücre Bulguları.....	56
4.3.2. Apoptoz Analizi ile Erken Apoptotik Hücre Bulguları.....	58
4.3.3. Apoptoz Analizi ile Geç Apoptotik Hücre Bulguları.....	59
4.3.4. Apoptoz Analizi ile Ölü Hücre Bulguları	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
7. KAYNAKLAR	72
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

a.:	Arteria
AgNOR:	Argyrofilik Nükleolar Organizatör Bölgeleri
cm:	Santimetre
DCIS:	Ductal Karsinoma In Situ
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER:	Östrojen Reseptörü
ERK:	Hücre Dışı Sinyal Düzenlemeli Kinaz
FBS:	Fetal Bovine Serum
g:	Gram
gl. :	Glandula
GLUT:	Glukoz Taşıyıcı Protein
GLUT-1:	Glukoz Taşıyıcı Protein Tip 1
HER2:	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IARC:	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IC₅₀:	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
IDC:	İnvazif Duktal Karsinom
ILC:	İnvazif Lobüler Karsinom
KRAS:	Kirsten-RAS
LCIS:	Neuroblastoma-RAS
lig.:	Ligamenta
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu
M:	Molar
MAPKK:	Mitogen Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz
MIR:	Mortalite-İnsidans Oranı
mM:	Milimolar
mL:	Mililitre
mm:	Milimetre

NA:	Nor Alanı
NOR:	Nükleolar Organizatör Bölgesi
NRAS:	Neuroblastoma-RAS
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PET:	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K:	Phosphoinositide 3-Kinase
PR:	Progesteron Reseptörü
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SGLT:	Sodyum-Glukoz Ko-Transporter
TAA:	Toplam AgNOR Alanı
TNBC:	Üçlü Negatif Meme Kanseri
v.:	Vena
Vv.:	Venae
µL:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Meme kanseri alt tipleri.....	11
Tablo 2.2. Meme kanserinin değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri.	16
Tablo 3.1. Demirbaş Malzemeler	31
Tablo 3.2. Sarf malzemeler.....	31
Tablo 4.1. WZB117 verilmeyen gruplara ait ortalama AgNOR sayılarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.	45
Tablo 4.2. WZB117 verilen gruplara ait ortalama AgNOR sayılarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.	47
Tablo 4.3. WZB117 verilmeyen gruplara ait AgNOR boyama sonrası TAA/NA ortalamalarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.	49
Tablo 4.4. WZB117 verilen gruplara ait AgNOR boyama sonrası TAA/NA ortalamalarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.	50
Tablo 4.5. Gruplara ait canlı hücre bulguları.....	57
Tablo 4.6. Gruplara ait erken apoptoz bulguları.....	59
Tablo 4.7. Gruplara ait geç apoptoz bulguları.....	61
Tablo 4.8. Gruplara ait ölü hücre bulguları.	63

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Meme çizgileri.....	4
Şekil 2.2. Meme süt çizgisi hattı	5
Şekil 2.3. Meme embriyolojisi	5
Şekil 2.4. Sağlıklı erkek ve kadın meme anatomisi.....	6
Şekil 2.5. Meme anatomisi	7
Şekil 2.6. Kanserin altı ayırt edici özelliği	9
Şekil 2.7. Kadın ve erkeklerde meme kanseri insidansı ve mortalite verileri	13
Şekil 2.8. İnvazif duktal karsinom ile ilişkili tipik yapı	19
Şekil 2.9. WZB117 (3-Fluoro-1,2-phenylene bis(3-hydroxybenzoate)	28
Şekil 3.1. WZB117	35
Şekil 3.2. WZB117'nin çözdürülmesi aşamasında vorteks uygulaması	36
Şekil 3.3. Elisa okuyucu promega ile ölçüm işleminin gerçekleştirilmesi.....	37
Şekil 4.1. WZB117 uygulamasının MDA-MB 231 hücre canlılığına etkisi ve IC ₅₀ değeri.....	41
Şekil 4.2. WZB117 verilmeyen gruplara ait AgNOR boyama örnekleri	42
Şekil 4.3. WZB117 verilen gruplara ait AgNOR boyama örnekleri	43
Şekil 4.4. Ortalama AgNOR sayısı.....	44
Şekil 4.5. TAA/NA oranları	45
Şekil 4.6. WZB117 verilmeyen gruplara ait ortalama AgNOR analiz sonuçları	46
Şekil 4.7. WZB117 verilen gruplara ait ortalama AgNOR analiz sonuçları.....	48
Şekil 4.8. WZB117 verilmeyen gruplara ait TAA/NA ortalamalarına göre AgNOR analiz sonuçları.....	50
Şekil 4.9. WZB117 verilen gruplara ait TAA/NA ortalamalarına göre AgNOR analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücreleri invert mikroskop altındaki görünümü.....	53
Şekil 4.11. WZB117 uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre hattının gruplara ait mikroskop altındaki görüntüsü.....	54
Şekil 4.12. Annexin V ve 7AAD boyama sonrası, ölü hücre apoptoz yüzdesi, geç apoptoz yüzdesi, canlı hücre apoptoz yüzdesi	55
Şekil 4.13. 48 saatlik ölçüm sonucu canlı hücre yüzdeleri.....	56

Şekil 4.14. 48 saatlik ölçüm sonucu erken apoptotik hücre yüzdeleri	58
Şekil 4.15. 48 saatlik ölçüm sonucu geç apoptotik hücre yüzdeleri.....	60
Şekil 4.16. 48 saatlik ölçüm sonucu ölü hücre yüzdeleri	62



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kansere bağlı ölümlerin sayısı her yıl artmakta ve dünya genelinde ölümlerin başlıca nedenlerinden biri haline gelmektedir. Kanser; coğrafyaya ve cinsiyete göre değişen önemli toplumsal ve makroekonomik maliyetlerle ilişkilidir ve 183 ülkenin 177'sinde 30-69 yaş grubu bireylerde başlıca üç ölüm nedeni arasında yer almaktadır (Bray ve ark., 2024).

Kadınlar arasında en yaygın kanser türleri meme, akciğer ve kolorektal kanserleri olup bu kanser türleri, yeni teşhis edilen kanser vakalarının yarısını ifade etmektedir. Amerikan Kanser Derneği tarafından yapılan bir araştırmaya göre ise meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Oransal olarak kadınlarda yeni kanser teşhislerinin %30'unu ise tek başına meme kanseri oluşturmaktadır (Siegel ve ark., 2019). Meme kanseri oldukça heterojen bir hastalık olması sebebi ile klinik tedavi ve prognoz hastalar arasında büyük farklılıklar göstermektedir (Yin ve ark., 2020). Meme kanseri için moleküler tanı yöntemlerinin ve kanser tedavilerinin gelişmesiyle birlikte mevcut tedavi seçenekleri arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviler yer almaktadır (Littleflower ve ark., 2023).

Kanser hücreleri, glukozu normal hücrelerden daha fazla metabolize etmektedir. Oksijen varlığında bile ATP üretimi için mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan ziyade piruvatı laktik aside dönüştürmeyi tercih etmektedir. Bu özel metabolik profil "aerobik glikoliz" veya "Warburg" etkisi olarak adlandırılmaktadır (Pastò ve ark., 2010). Kanser hücreleri artmış glikoliz oranlarına sahiptir ve glukozun glikolize parçalanması sonucu oluşan laktik asit ve H⁺ iyonlarının hücre içerisinde artmış

mevcudiyetine rağmen ATP üretimine devam etmektedir. Laktat ve H⁺ iyonları, nötr hücre içi pH'ı korumak için monokarboksilat taşıyıcıları yoluyla hücre içerisinden hücre dışı boşluğa taşınır. H⁺ iyonlarının hücre dışı boşluğa akışı, pH'ı (~ 6.8) düşürerek hücre dışında asidik bir ortam oluşturur. Hücre dışında oluşan asidik ortam çevre dokuların zarar görmesine ve kanser hücrelerinin metastazını destekleyerek invaziv özelliklerinin artmasına neden olmaktadır (Lebelo ve ark., 2019).

Glukoz hücrelerin ana enerji kaynağıdır ve hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını sürdürmesi için gereklidir. Glukozun hücrelere taşınması, hücre zarında bulunan glukoz taşıyıcıları (GLUT'lar) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Glukoz taşıyıcılarının membran translokasyonu nedeni ile hücre içi glukoz alımı ve protein üretimi kanserli hücrelerde önemli ölçüde daha yüksektir (Kang ve ark., 2002). GLUT-1, glukoz taşıyıcıları arasında bazal glukoz alımı için gereklidir ve antikanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak görev yapmaktadır. GLUT-1 ekspresyonunun meme kanseri, akciğer, beyin ve gastrik adenokarsinom gibi çeşitli insan kanserlerinde up-regülasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Carvalho ve ark., 2011). GLUT-1 ekspresyon seviyesi, kanser hücrelerinin malign özellikleri ile ilişkilidir ve tümör hücrelerinin çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. Kanser hücreleri, glukoz mevcudiyetine karşı daha hassas ve savunmasızdır; bu nedenle, glukoz alımını hedeflemek, antikanser terapötikleri için çekici bir hedef haline gelir (Graham ve ark., 2012).

GLUT-1 inhibitörü olan WZB117 (3-Fluoro-1,2-phenylene bis(3-hydroxybenzoate), GLUT-1'in glukoz taşıma işlevini engelleyen güçlü bir inhibitördür. Bu molekül, GLUT-1 proteinindeki glukoz bağlanma bölgesine bağlanarak, kanser hücrelerinin daha fazla glukoz alımını engellemektedir. WZB117 ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, akciğer karsinomu hücrelerinde GLUT-1 proteininin, glikolitik kapasitenin ve glikolitik enzimlerin down-regülasyonuna (Azalmış ekspresyonuna) neden olurken, aynı zamanda, WZB117'nin paklitaksel ve sisplatin gibi diğer kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında sinerjik antikanser etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2019). Yakisich ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada biguanidlerden olan metformin ve buformin ile WZB117 kombinasyonunun yüksek dirençli insan akciğer kanseri hücrelerinin canlılığının önlediği gösterilmiştir (Yakisich ve ark., 2019).

Bu alışma, in vitro hücre kültürü ortamında MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde WZB117 aracılı GLUT-1 inhibisyonunun ve glukoz yoksunluğunun kanser hücreleri üzerindeki potansiyel etkilerini incelemeyi amaçlamıştır.

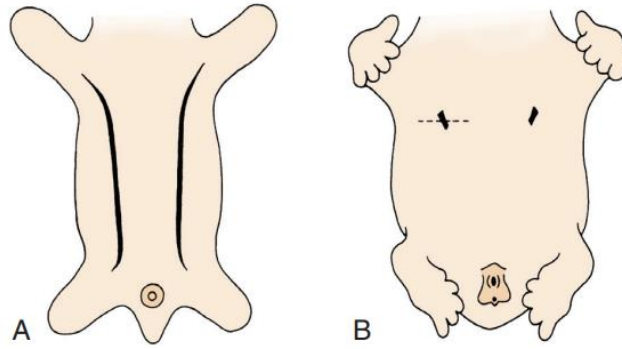


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Embriyolojisi

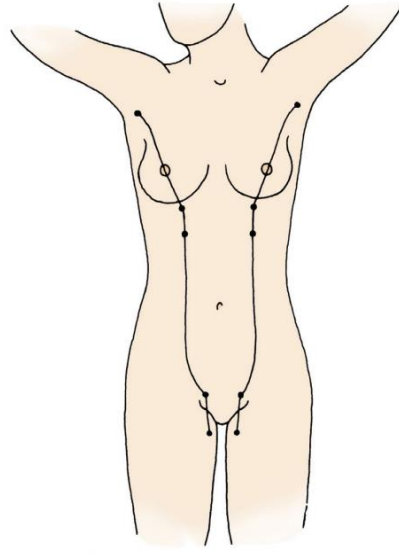
Meme bezleri, ektoderm kökenli epitel hücreleri ve mezenkimal hücreler arasındaki etkileşim sonucu gelişen karmaşık yapılar olarak kabul edilir. Meme gelişiminin ilk evreleri, embriyonun 4.-6. haftalarında başlar. Bu dönemde, embriyonun ventral yüzünün her iki tarafında, aksiller bölgeden inguinal bölgeye uzanan meme çizgileri oluşur (Şekil 2.1.). Meme çizgileri üzerinde, epitel hücreleri tarafından küçük kabartılar şeklinde bilinen meme tomurcukları oluşturulur. İntrauterin hayatın 9. haftasında, meme başının normal lokalizasyonu dışındaki tomurcuklarda atrofi başlar ve bu durum fazla meme veya meme başı oluşumunu engeller. Meme çizgileri, normal gelişim sırasında pektoral alan dışında kaybolur; ancak %2-5 oranında insanda meme çizgisi boyunca fazla meme ucu gözlenebilmektedir. Primer meme tomurcukları, birinci trimester sonunda mezenkimal regülatuar faktörlerin etkisi ile altındaki mezenşime doğru yayılım gösterir. Bu yayılım sonucunda, intrauterin dönemin 16. haftasın da 15-25 epitelyal şerit şeklinde sekonder meme tomurcuklarına farklılaşır. Sekonder meme tomurcukları, ductus lactiferi ve dallarını oluşturacak şekilde farklılaşır. Üçüncü trimesterde, ikincil tomurcuklarda dallanma ve duktualizasyon tekrarlanır (Şekil 2.3.). Bu süreçte, memedeki çevre mezenşimden yağ dokusu ve fibröz bağ dokusu da farklılaşır (Adamhasan., 2023; Bistoni ve Farhadi., 2015). Doğumdan sonra, meme bezlerinin gelişimi devam eder.

- Yenidoğan bebeklerde şekillenmiş ve belirgin olmayan meme başları, doğumdan sonra areolanın etrafındaki bağ dokusunun gelişmesi ile ortaya çıkar.
- Ergenlik döneminde, östrojen ve progesteron hormonlarının etkisiyle meme gelişimi belirgin şekilde artar; süt kanalları ve süt bezleri büyür ve gelişir ayrıca areola ve meme ucu da genişler.
- Hamilelik döneminde, östrojen, progesteron ve prolaktin hormonlarının etkisi ile meme gelişiminde önemli bir artış görülür; süt kanalları ve süt bezleri daha da büyür ve gelişir, areola da koyu renk alır.
- Emzirme döneminde, prolaktin hormonunun etkisi ile süt bezleri süt üretmeye başlar, süt kanalları genişler ve süt bezleri süt üretmek için gerekli olan hücreleri oluşturur.
- Menopoz sonrası dönemde, östrojen hormonunun azalmasıyla birlikte meme gelişimi geriler; süt kanalları ve süt bezleri küçülür ve yağ dokusu oranı artar (Bistoni ve Farhadi, 2015).

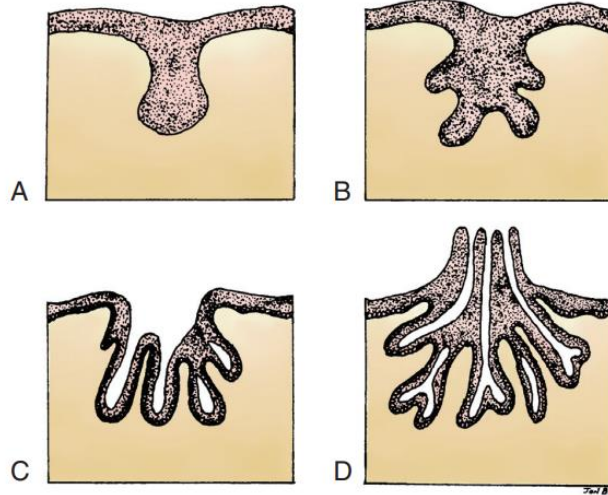


Şekil 2.1. Meme çizgileri (Sun ve ark., 2018). *A’da gelişimin beşinci haftasının başında (yaklaşık 28 gün) bir embriyonun ventral görünümü, ön bacadan arka bacağa uzanan meme oluşumları gösterilmektedir. B’de altıncı haftanın sonunda ventral embriyonun benzer bir görünümü, pektoral bölgede bulunan meme oluşumlarının kalıntılarını göstermektedir.

Ektodermal kalınlaşmanın pektoral bölgesinde süt tomurcuğu geliştikten sonra “süt çizgisi” koltuk altından kasık bölgelerine kadar uzanır (Şekil 2.2.). İntrauterin 9. haftada, fazla sayıda meme ucu veya memenin varlığı dışında kalan tomurcuklarda atrofi meydana gelmiştir.



Şekil 2.2. Meme süt çizgisi hattı (Sun ve ark., 2018).

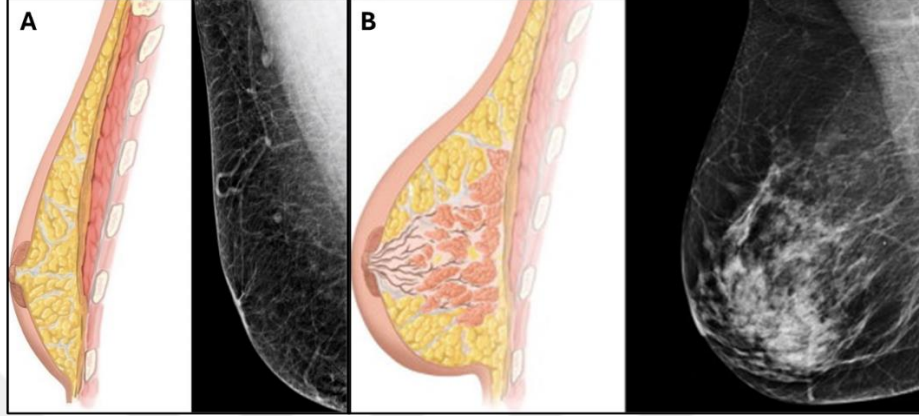


Şekil 2.3. Meme embriyolojisi (Sun ve ark., 2018). *(A- C)' de intrauterin 12. hafta ile doğum arasındaki süreçte meme bezi gelişimi görülmektedir. D' de doğumdan hemen sonra areola'yı oluşturan bağ dokusunun gelişmesi ile meme çukurunun yükselişi görülmektedir.

2.2. Meme Anatomisi

Göğüs ön kısmının yüzeysel fasyasına gömülü modifiye bir ter bezi olarak ifade edilebilen meme hem erkeklerde hem de kadınlarda bulunmaktadır. Erkeklerdeki meme bezleri glandula (gl.) mammaria rudimenter olarak kalır ve tam olarak gelişmez Kadınlarda ise meme bezleri östrojen, progesteron ve prolaktin hormonları

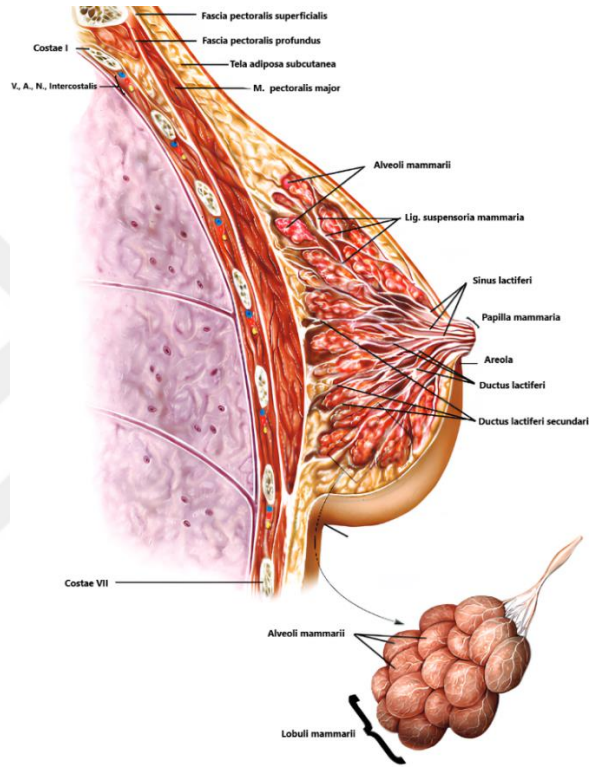
etkilerle daha fazla gelişmektedir (Şekil 2.4.). Ayrıca kadın memesi daha büyük miktarda fibroglandüler doku içerir. Erkek memesinin neredeyse tamamı yağ dokusundan oluşur ve fibroglandüler doku çok az veya hiç bulunmaz (Jesinger ve ark., 2014).



Şekil 2.4. Sağlıklı erkek ve kadın meme anatomisi (jesinger ve ark., 2014). *(A) Erkek memesinin vertikal kesitte gösterimi ve erkek memesinin mediolateral oblik (MLO) mamografik görünümü. *(B) kadın memesinin vertikal kesitte gösterimi ve kadın memesinin mediolateral oblik (MLO) mamografik görünümü.

Meme 2. ve 6. kostalar arasında, sternumun lateralinden linea axillaris medianaya kadar uzanan bir alanda bulunmaktadır. Memenin arkasında memenin göğüs duvarı üzerinde hareket etmesini sağlayan fasyal aralık bulunur. Bu aralık retromammarian aralık olarak bilinir ve memenin göğüs duvarı üzerinde pektoral fasya üzerinde hareket etmesini sağlar. Meme dokusunun bir uzantısı olan aksiller kuyruk (Spence'in kuyruğu) aksillanın tepesine veya koltuk altına kadar uzanır. Memenin 2/3'ü musculus (m.) pectoralis major'u örten fascia pectoralis üzerinde yer alırken 1/3'ü ise m. serratus anterior'u örten fasya üzerindedir ve üst karın kaslarını (Oblik kaslar) alt kısımda kaplamaktadır. Ligamenta (lig.) suspensoria mammaria (Cooper ligamentleri) adı verilen sıkı bağ dokusu bantları, meme bezlerini dermis tabakasına bağlar. Bu bağlar, özellikle memenin üst kısmında yoğunlaşarak meme bezi lobüllerini (lobuli glandulae mammariae) destekler ve sarkmasını önler. Memenin en belirgin noktası meme ucu papilla mammaria olarak adlandırılır. Genellikle 4. intercostal aralıkta ve orta clavicular hatta bulunmaktadır. Meme ucu areola mammae adı verilen koyu renkli ve yuvarlak bir bölgeyle çevrilir. Areola, montgomery

tüberkülleri olarak bilinen küçük yağ bezleri içerir. Meme parankimi, 15-20 lobülden oluşan lobuli glandulae mammae'den oluşur. Her lobül, ductus lactiferi (Süt kanalı) olarak adlandırılan ayrı bir kanal aracılığıyla meme ucuna (papilla mammae) bağlanır (Şekil 2.5.). Areola bölgesinde, her süt kanalı sinus lactiferi adı verilen bir genişlemeye sahip olur. Süt üretimi sırasında, lobüller süt üretir ve bu kanallar aracılığıyla meme ucuna taşınır (Moore ve Dalley, 2020).



Şekil 2.5. Meme anatomisi (Erel ve Atahan, 2019).

Memenin arteriyel beslenmesi 3 ana arteriyel yol ile gerçekleşir:

1. Arteria (a.) thoracica interna'dan çıkan ve memenin medial, orta kısımlarını besleyerek memeye giden kan akışının %60'ını oluşturan, arteriae (Aa.) intercostales anteriores'in perforan dallarından,
2. A. axillaris'in ten çıkan a. thoracica lateralis'in dalları ve yine a. axillaris'in ten çıkan a. thoracoacromialis'in pektoral dalları memenin üst bölümünün dış yüzeyini besler ve memeye giden kan akışının %30'undan sorumludur.

3. Aa. intercostales posteriores'lerden gelen dallar ve subkutan arterler memeye giden kanın geri kalanını sağlar (Pandya ve ark., 2011).

Meme ve göğüs duvarının venöz drenajı aksillaya doğru olacak şekilde arterlerin seyrini takip eder. Areola mammae etrafındaki plexus venosus areolaristen (Haller plexusu) başlayıp primer olarak vena (v.) axillaris daha sonrasında v. thoracica interna, v. thoracica lateralis ve venae (Vv.) intercostaleslere doğru gerçekleşmektedir. Memenin lenfatik drenajının çoğunluğu nodi aksillere doğru geriye kalan lenfatik drenajı ise nodi lymphatici supraclaviculares ve nodi lymphatici infraclaviculares ten oluşan bölgesel lenf nodları ile nodi parasternalese doğru gerçekleşmektedir (Erel ve Atahan., 2019).

2.3. Meme Fizyolojisi

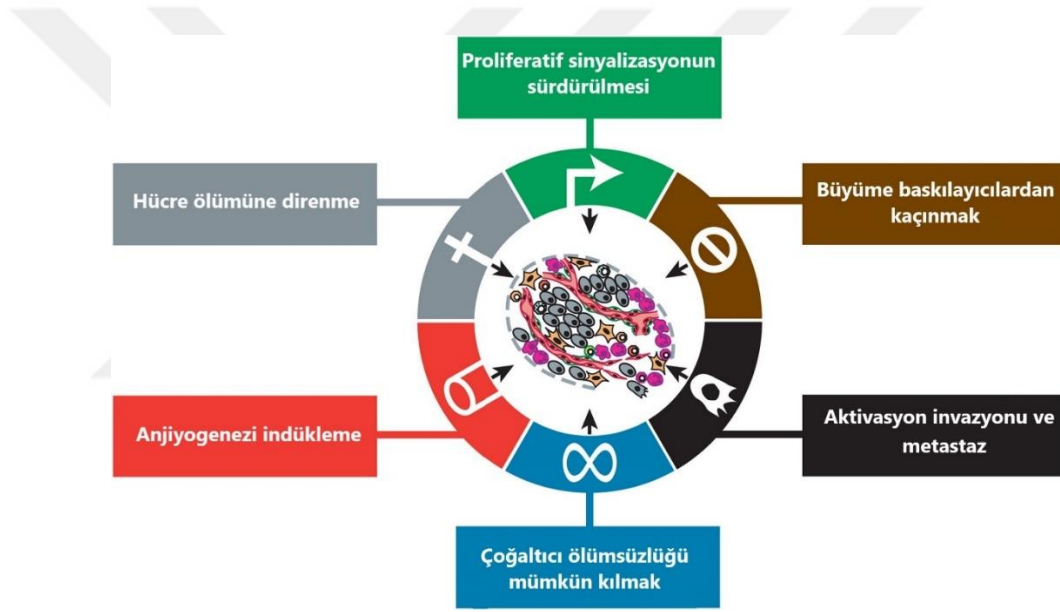
Ergenlik öncesinde erkek ve kadın memesi arasında işlevsel veya yapısal olarak gözle görülür hiçbir fark yoktur. Meme ergenlik öncesi histolojik düzeyde hem erkeklerde hem de kadınlarda, çevresel olarak düzenlenmiş ve meme ucuna doğru birleşen çok sayıda rudimenter kanaldan oluşur. Her gelişmemiş kanalın kör ucunda az gelişmiş fakat potansiyel olarak salgılayıcı asini bulunur. Ergenliğin başlamasıyla birlikte, kadın memesinin morfolojisinde değişiklikler meydana gelmeye başlar. Kadın memesinin başlıca işlevi laktasyondur. Laktasyon, sütün sentezlenmesi, salgılanması ve dışarı atılmasını kapsayan bir terimdir. Ergenlik döneminde kadın memesinin ilk büyümesi öncelikle kanal sisteminin çoğalmasına ve dallanmasına ve ayrıca meme uçlarının olgunlaşmasına ve belirginleşmesine neden olan östrojenden etkilenir. Östrojen, meme dokusunda duktal epitelin gelişimini ve duktus etrafındaki bağ dokusunun miktarını artırırken, progesteron glandüler büyümeye neden olarak lobüllerin ve alveollerin oluşumunu artırır. Bununla birlikte, kanalların areolar uçlarındaki asinilerin (Alveoller) gelişimi ve çoğalması östrojen ve progesteronun kombine ve sinerjistik etkilerinin sonucudur. Meme dokusunda, hücre bölünmesini ve farklılaşmasını etkileyen, bazıları uyarıcı ve bazıları engelleyici olan çok sayıda parakrin faktör vardır. Bu parakrin düzenleyiciler arasında insülin benzeri büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü β bulunur.

Menopozal değişiklikler vücudun östrojen ve progesteron üretimindeki doğal ve keskin bir düşüşle ilişkilidir. Bu hormonal uyarı eksikliği, memedeki glandüler doku

miktarında ilerleyici bir azalmaya ve buna eşlik eden yağ dokusunda bir artışa neden olur (Bazira ve ark., 2022).

2.4. Meme Kanserinin Moleküler Temelleri

Kanserler; hücre çoğalması, canlılık veya ölüm, hareket ve invazyon gibi fenotipleri değiştiren ve farklı hücre tipleri arasında faaliyet gösteren birçok sinyal yolağını bozan genetik mutasyonlar tarafından yönlendirilen oldukça karmaşık hastalıklardır (Clarke ve Fisher, 2020). Kanser gelişmesine ve ilerlemesine yol açan altı farklı yetenek, kanserin orijinal özelliklerine göre tanımlanmıştır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Kanser altı ayırt edici özelliği (Hanahan ve Weinberg., 2011).

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik çoğalmayı sürdürme yeteneklerini içermesidir. Normal dokular, hücre büyüme ve bölünme döngüsüne girişi ve ilerlemeyi yönlendiren büyümeyi teşvik eden sinyallerin üretimini ve salınmasını dikkatli bir şekilde kontrol eder. Böylece hücre sayısının homeostazisini sağlar ve normal doku mimarisinin ve fonksiyonunun korunmasını sağlar. Kanser hücreleri ise bu sinyalleri serbest bırakmaktadır. Kanser hücresi genomlarının yüksek verimli deoksiribonükleik asit (DNA) dizileme analizleri, bazı insan tümörlerinde genellikle aktive edilmiş büyüme faktörü reseptörleri tarafından tetiklenen sinyal devrelerinin

yapısal aktivasyonunu öngören somatik mutasyonları ortaya çıkarmıştır. Bu mutasyonlar, BRAF ve fosfoinositid-3- kinaz (PI3K) gibi genleri etkileyebilir ve mitojen aktif protein kinaz (MAPK) ve protein kinaz B (AKT) gibi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açabilir. PI3K/AKT yolu, hücre hayatta kalmasını desteklerken, MAPK yolu hücrel farklılaşma ve stres yanıtlarında rol oynar. Aktifleştirilmiş sinyal yolları, tümör hücrelerine çoğalma, canlılık ve invazyon avantajları sağlayabilmektedir. Büyüme faktörleri reseptörlerinin ve onların aşağı akışındaki sinyal yollarının aktivasyonu, hücrel çoğalma ve hayatta kalma sinyallerinin sürekli olarak iletilmesine yol açar. Örneğin, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve HER2/neu (ERBB2) gibi reseptör tirozin kinazların aşırı ekspresyonu veya mutasyonu, bu reseptörlerin sürekli aktif olmasına ve hücrel çoğalmanın kontrolsüz hale gelmesine neden olabilir. Aynı şekilde, Kirsten-RAS (KRAS) ve Neuroblastoma-RAS (NRAS) gibi genlerdeki mutasyonlar da sürekli sinyal iletimine katkıda bulunur. Bu sinyal yollarının aktivasyonu sadece hücre çoğalmasını teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda anti-apoptoz sinyalleri de artırır, bu da kanser hücrelerinin hücrel stres ve DNA hasarına karşı dirençli olmasını sağlar. Ayrıca, bu sinyal yolları, hücre hareketliliği ve invazyon yeteneklerini artırarak metastaz oluşumuna da katkıda bulunur (Hanahan ve Weinberg., 2011). Bu sinyal yollarından özellikle PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, hücre büyümesi ve metabolizması üzerinde kritik bir rol oynar ve sıklıkla kanserlerde düzensiz hale gelir. Genomik instabilite ve mutasyon, kanser hücrelerinin bu temel yetenekleri kazanmasında önemli bir faktördür. DNA onarım mekanizmalarındaki bozukluklar ve mutasyon birikimi, kanser hücrelerinin sürekli olarak evrim geçirmesine ve tedaviye karşı direnç geliştirmesine olanak tanır. Bu nedenle, kanser tedavisinde hedeflenmiş tedavi yaklaşımları, spesifik genetik ve moleküler değişiklikleri hedef alarak daha etkili tedavi stratejileri geliştirmeyi amaçlamaktadır (Khan ve ark., 2013).

Kanser hücrelerinin bu temel özelliklerinin yanı sıra, meme kanserinde de benzer sinyal yollarının aktive olduğu bilinmektedir. Bu sinyal yolları, meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle, meme kanserinde sıklıkla gözlenen hormon reseptörü pozitifliği, HER2 pozitifliği veya üçlü negatif özellikler gibi moleküler alt tipler, farklı sinyal yollarının etkisi altında farklı davranışlar sergilemektedir. Bu nedenle, meme kanserinin moleküler alt tiplerini ve

bu alt tiplerin sinyal yollarındaki değişiklikleri anlamak, tedavi stratejilerinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır.

2.4.1. Meme Kanseri

Meme kanseri tüm dünyada kadınları etkileyen, kadınlar arasında farklı prezantasyonlara sahip olan yaygın bir kanserdir. Hem moleküler hem de histolojik kanıtlara dayanarak, meme kanseri üç gruba ayrılabilir;

- Hormon reseptörü eksprese eden östrojen reseptörü pozitif (ER+), progesteron reseptörü pozitif (PR+),
- İnsan epidermal reseptörü 2 eksprese eden (HER2+) ve
- Üçlü negatif meme kanseri (TNBC); östrojen reseptörü negatif (ER-), progesteron reseptörü negatif (PR-), ve HER2 negatif (HER2-).

Meme kanserinde tedavi yaklaşımları, moleküler özelliklerine dayanmalıdır. Buna ek olarak, TNBC altı kategoriye ayrılmıştır; bazal benzeri 1 (BL-1), bazal benzeri 2 (BL-2), immünomodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR) (Tablo 2.1.) (Barzaman ve ark., 2020).

Tablo 2.1. Meme kanseri alt tipleri

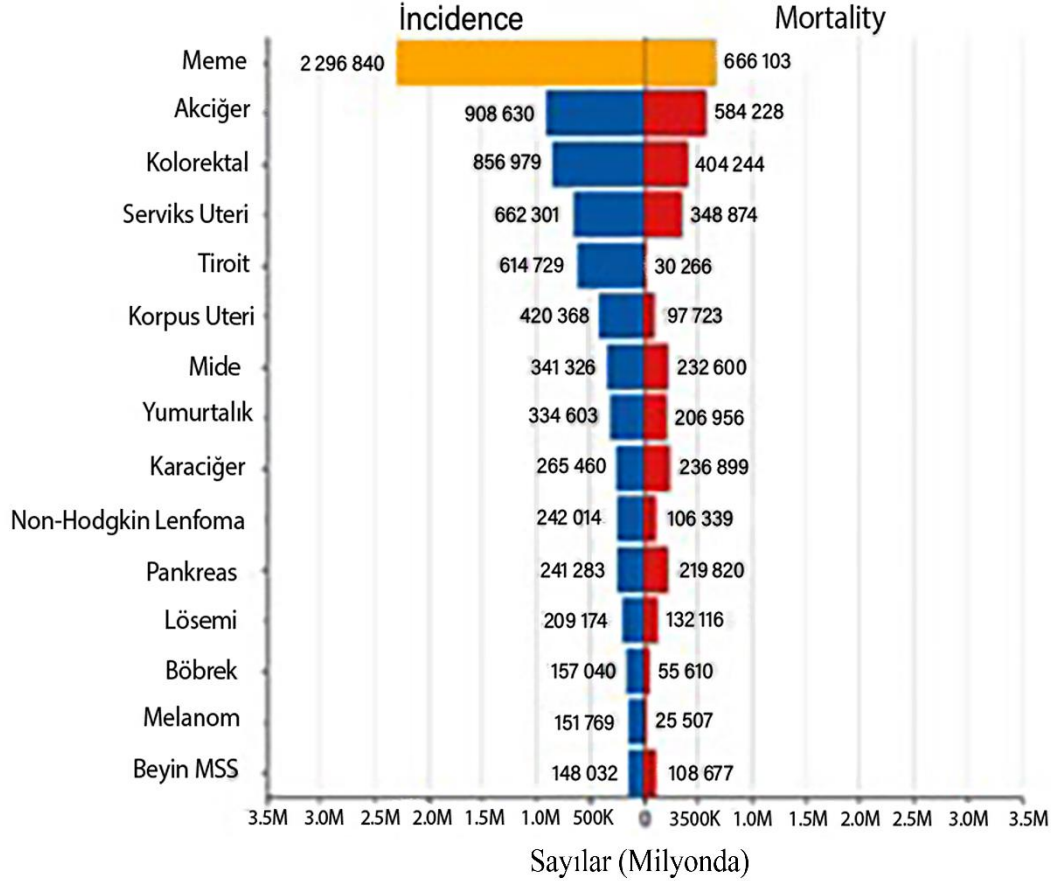
Meme kanseri alt tipi	Reseptör profili	Alt tip prevalansı	Alt katagoriler
Hormon pozitif	ER + veya PR+	%60	Luminal A ve B
HER2 pozitif	HER2+	%20	-
Üçlü negatif meme kanseri	ER-, PR- ve HER2-	%10-20	Bazal Benzeri 1 (BL-1), Bazal Benzeri 2 (BL-2), İmmünomodülatör (IM), Mezenkimal (M), Mezenkimal Kök Hücre Benzeri (MSL) ve Luminal Androjen Reseptörü (LAR)

2.4.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Amerikan Kanser Derneği tarafından yapılan araştırmaya göre meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Kadınlarda en yaygın görülen üç kanser çeşidi; meme, akciğer ve kolorektal kanserleri olup, bu kanser türleri tüm yeni teşhislerin yarısını temsil etmektedir. Kadınlarda tüm yeni kanser teşhislerinin %30'unu ise tek başına meme kanseri oluşturmaktadır (Siegel ve ark., 2019).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 185 ülkeden elde edilen GLOBOCAN 2022 verileri, kadınlarda 2.296,840 yeni meme kanseri vakası (%23,8) ve 666.103 (%15,4) lm oranı bildirmiştir. Bununla birlikte 2022'de her iki cinsiyet, erkekler ve kadınlarda için 19.976,499 yeni kanser vakası arasından meme kanseri insidansı 2.296,840 (%11,5) mortalite oranı ise 666.103 (%6,8) olarak bildirilmiştir (Şekil 2.7.). Ayrıca kanseri insidansı yüksek gelirli ülkelerde düşük gelirli ülkelere kıyasla daha yaygındır (Kashyap ve ark., 2022).

Mutlak Sayılar, İnsidans, Her İki Cinsiyette, 2022
Dünya Genelinde
(15 Kanser Bölgesi)



Şekil 2.7. Kadın ve erkeklerde meme kanseri insidansı ve mortalite verileri (GLOBOCAN., 2022).

2020 yılında meme kanseri için 5 yıllık sağkalım oranlarını temsil eden meme kanseri mortalite-insidans oranı (MIR), küresel olarak 0,30 olarak belirlenmiştir. Bu oran, meme kanseri tanısı konmuş bireyler arasında 5 yıl boyunca ölüm oranını insidans ile ilişkilendirir. Klinik açıdan, meme kanserinin yaygınlığına bağlı olarak, sağlık hizmetlerinin daha gelişmiş olduğu Hong Kong, Singapur, Türkiye gibi bölgelerde lokalize ve bölgesel meme kanseri için 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %89,6 ve %75,4 olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Kosta Rika, Hindistan, Filipinler, Suudi Arabistan, Tayland gibi sağlık hizmetlerinin daha az gelişmiş olduğu ülkelerde lokalize ve bölgesel meme kanseri için sağkalım oranları sırasıyla %76,3 ve %47,4 olarak kaydedilmiştir. Bu istatistikler, meme kanseri teşhisi alan

bireylerin hayatta kalma oranlarının, sağlık altyapısı ve erken tanı imkanları gibi faktörlere bağlı olarak ciddi şekilde değişebileceğini göstermektedir. 1990 ve 2016 yılları arasında meme kanseri insidansı toplam 102 ülkenin arasından 60'ında (Afganistan, Filipinler, Brezilya, Arjantin) iki katından fazla artarken, meme kanserinden ölümler ise 43 ülkede (Yemen, Paraguay, Libya, Suudi Arabistan vd.) iki katına çıkmıştır. Mevcut projeksiyonlar, 2030 yılına kadar dünya çapında teşhis edilen yeni vaka sayısının yılda 2,7 milyona, ölüm sayısının ise 0,87 milyona ulaşacağını göstermektedir. Ayrıca düşük ve orta gelirli ülkelerde meme kanseri insidansının daha da artması beklenmektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021).

2.4.3. Meme Kanseri Patogenezi

Meme; tabakalı epitel, miyoepitelyal ve epitelyal olmak üzere farklı hücre popülasyonlarından oluşur ve bunlar miyozin ve keratin kinaza karşı antikorlarla immünohistokimyasal boyama yoluyla ayırt edilebilmektedir. Meme hastalıklarında hücrel heterojenite oluşumunun, memenin normal fizyolojik gelişim evrelerine bağlı olduğu düşünülmüştür. Meme karsinomunun bu heterojenitesi, miyoepitelyal veya epitelyal hücrenin neoplastik değişiminden kaynaklanabileceği gibi miyoepitelyal veya epitelyal hücrelere dönüşme yeteneğine sahip bir kök hücrelerden de kaynaklanabilmektedir. Meme kanseri onkolojisine göre, neoplastik hücreler normal vücut hücrelerinden farklıdır. Vücudun normal dokuları, dokuların yapısını ve işlevlerini olağan tutmaya yardımcı olan sınırlı bir büyüme desteğine ve düzenlemesine sahiptir. Ancak kanserli hücreler, herhangi bir dış uyaran olmaksızın uzun süreli ve kronik bir çoğalmaya sahiptir. Meme kanseri gelişme olasılığını artırabilecek çok sayıda neden vardır. DNA hasarları ve meme kanserine yol açabilen kalıtsal değişiklikler östrojen hormonu ile ilişkilendirilmiştir. Bazı hastalarda DNA ve P53, BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerde kanserle ilişkili bazı mutasyonlar DNA'daki hataları düzelten mekanizmalarda meydana gelerek kontrolsüz bölünmeye, bağlanma eksikliğine ve uzak organlara metastaza neden olmaktadır. Bununla birlikte genetik ve çevresel faktörler genellikle meme kanseri gelişimini etkiler. Ailesinde meme veya yumurtalık kanseri öyküsü olan hastalarda meme kanseri gelişme olasılığı daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu genetik yatkınlık, normal hücrelerin RAS/ Mitogen Aktifleştirilmiş Protein Kinaz Kinaz (MAPKK) /

Hücre dışı sinyal düzenlemeli kinaz (ERK) yolları ve PI3K/AKT yolları aracılığıyla hücre ölümünden korunmasını etkileyebilmektedir. Bu koruyucu yolları kodlayan genlerde meydana gelen bir mutasyonda, hücreler artık gerekli olmadıklarında kendilerini yok edemez hale gelmekte ve bu durumun kansere neden olduğu ifade edilmektedir. Bu mutasyonların deneysel olarak östrojen hormonu ile ilişkili olduğu ise doğrulanmıştır (Akram ve ark., 2017).

Meme yağ dokusunda leptinin aşırı ekspresyonu, hücre çoğalmasında artışa ve kansere neden olmaktadır. Bunlar epitel hücreleri ve stromal hücreleri etkileyen bir dizi büyüme faktörü sinyali ve diğer faktörlerdir. Bu büyüme faktörleri sinyalizasyonundaki anormalliklerin malign hücre büyümesini kolaylaştırabileceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte telomeraz enzimi ise kanser hücrelerinde kromozomal kısalmayı ortadan kaldırarak kanser hücrelerinin sınırsız bölünmesini sağlar. Böylece tümör hücrelerinin beslenme ve oksijen alımını artırmak için yeni damarlar oluşturduğu anjiyogenez sürecine geçiş yapılır Ayrıca tümör hücreleri kana, lenfatik dokulara ve diğer dokulara girerek ikincil bir tümör oluşumuna neden olabilmektedir. Bu süreçler, kanserin yayılması ve hastalığın ilerlemesi açısından kritik öneme sahiptir. (Akram ve ark., 2017; Kabel ve ark., 2015).

2.4.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserine ilişkin risk faktörleri hem değiştirilebilir faktörleri hem de değiştirilemeyen faktörleri içerir. Bu risk faktörleri arasından yaşlanma, aile öyküsü, üreme faktörleri, östrojen ve yaşam tarzı meme kanserinin beş önemli risk faktörüdür (Tablo 2.2.) (Sun ve ark., 2021).

Tablo 2.2. Meme kanserinin değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri.

Değiştirilemeyen Faktörler	Değiştirilebilir Faktörler
Kadın Cinsiyeti	Hormon Replasman Tedavisi
Yaşlılık	Dietilstilbestrol
Aile Öyküsü (Meme veya Yumurtalık Kanseri)	Fiziksel Aktivite
Genetik Mutasyonlar	Aşırı Kilo/Obezite
İrk / Etnisite	Alkol Alımı
Hamilelik ve Emzirme	Sigara İçmek
Adet Dönemi ve Menopoz	Yetersiz Vitamin Takviyesi
Meme Dokusunun Yoğunluğu	Yapay Işığa Aşırı Maruz Kalma
Önceki Meme Kanseri Öyküsü	İşlenmiş Gıda Alımı
Kanserli Olmayan Meme Hastalıkları	Kimyasallara Maruz Kalma
Önceki Radyasyon Tedavisi	Diğer Uyuşturucular

- **Yaşlanma:** Yaşlanma meme kanserinin en önemli risk faktörlerinden biridir. Çünkü meme kanseri görölme sıklığı artan yaşla yakından ilişkilidir. Yapılan araştırmalar meme kanseri hastalarının yaklaşık %80'ninin 50 yaşın üzerindeki bireylerden olduğunu %40'tan fazlasının ise 65 yaşın üzerinde olduğunu göstermektedir.
- **Aile Öyküsü:** Ailede meme kanseri öyküsü, meme kanseri riskinin artmasıyla önemli ölçüde ilişkili önemli bir faktördür. Meme kanseri tanısı alan hastaların yaklaşık %13-19'unun birinci derece akrabalarında meme kanseri görüldüğü bildirmektedir.
- **Üreme Faktörleri:** Çok sayıda çalışma, endojen hormonlara (Özellikle östrojen ve progesteron) maruz kalma ile kadınlarda aşırı meme kanseri riski arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hamilelik, emzirme, ilk adet görme ve menopoz gibi spesifik olayların ortaya çıkması, süreleri ve eşlik eden hormonal dengesizlik, meme mikro çevresinde kanserojen olayların potansiyel tetiklenmesi açısından değerlendirilmektedir. Erken yaşta (Özellikle yirmili yaşların başlarında) ilk hamilelik ve ardından artan doğum sayısı, meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilidir.

- **Östrojen:** Kadın cinsiyeti, öncelikle artan hormonal uyarı artan meme kanseri riskiyle ilişkili ana faktörlerden birini oluşturur. Meme hücreleri; hormonlara (Özellikle östrojen ve progesteron) ve dengelerindeki herhangi bir bozulmaya karşı çok hassastır. Dolaşımdaki östrojenler ve androjenler meme kanseri riskinin artmasıyla pozitif olarak ilişkilidir. Endojen östrojen genellikle menopoz öncesi kadınlarda ovaryumlar tarafından üretilir ve ovaryumların alınması meme kanseri riskini azalttığı bildirilmektedir.
- **Yaşam Tarzı:** Aşırı alkol tüketimi ve diyetle çok fazla yağ alımı gibi modern yaşam tarzları meme kanseri riskini artırabilir. Alkol tüketimi kandaki östrojenle ilişkili hormonların seviyesini yükseltebilir ve östrojen reseptör yollarını tetikleyebilir. Sigara içme ile meme kanseri riski arasındaki ilişki tartışmalı olmaya devam etse de emzirmeyen kadınların meme sıvısında sigara dumanından kaynaklanan mutajenler tespit edilmiştir. Çalışmalar özellikle erken yaşta sigara içmenin meme kanseri oluşumunda daha yüksek risk taşıdığını göstermektedir (Łukasiewicz ve ark., 2021; Sun ve ark., 2017).

2.4.5. Meme Kanserinin Tipleri ve Evreleri

İnvaziv olmayan meme kanseri, meme kanalları ile sınırlı olup çevredeki yağ dokusuna veya meme bağ dokusuna yayılmamış hücreler tarafından karakterize edilir. İnvaziv meme kanseri ise çevredeki yağ ve meme bağ dokusuna yayılan hücrelerin varlığıyla karakterize edilir. Bu kanser tipleri, lenf düğümlerine veya diğer vücut organlarına metastaz yaparak kanserin yayılmasına neden olabilmektedir.

İnvazif olmayan meme kanseri tipleri;

- **Lobüler karsinom in situ (LCIS, lobüler neoplazi):** “in situ” terimi, başlangıçta geliştiği alanı geçmeyen kansere atıfta bulunur. LCIS invaziv olmayan meme kanserinin daha az sıklıkla görülen formudur. Bu form meme lobüllerinde kanser öncesi değişikliklerin olduğu ancak çevre dokulara yayılmadığı bir durumu ifade eder. Atipik hücreler lobüllerin veya kanalların

dışındaki dokulara yayılmamış olsa da ilerleyebilir ve invaziv meme kanserine dönüşebilirler.

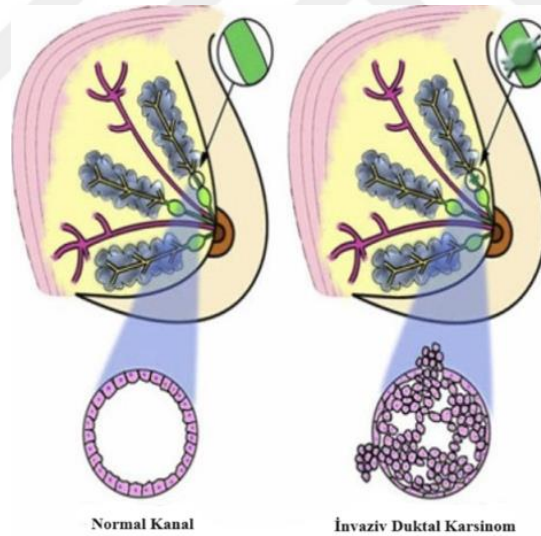
- **Duktal karsinom in situ (DCIS):** İnvaziv olmayan meme kanserinin %90'ından fazlasını oluşturan en yaygın formdur. Süt kanallarını döşeyen hücrelerin aşırı çoğalması ile karakterize olup, yapısal olarak kanser hücrelerine dönüşümün tipik özelliklerinin varlığına işaret eder ancak bu hücreler süt kanallarının sınırları dışına çıkmamaktadır.

İnvazif meme kanseri tipleri;

- **İnvazif lobüler karsinom (ILC);** Memenin süt bezlerinde (lobüllerde) başlayan ancak sıklıkla vücudun diğer bölgelerine metastaz yapan invazif meme kanseri tipidir. ILC meme kanserlerinin %10 ila %15'ini oluşturur.
- **İnvazif duktal karsinom (IDC);** En yaygın olarak görülen meme kanseri tipidir. Memenin süt kanallarında başlar ve kanal duvarını delerek memenin yağ dokusuna ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilen invazif meme kanseri tipidir. Meme kanseri tanılarının %80'ini oluşturur (Şekil 2.8.).
- **Medüller karsinom:** Medüller karsinom, tümör dokusu ile normal doku arasında belirgin bir sınır oluşturan invaziv bir meme kanseridir. Meme kanserlerinin yalnızca %5'i medüller karsinomdur.
- **Müsinöz karsinom:** Kolloid karsinom olarak da adlandırılan müsinöz karsinom, mukus üreten kanser hücreleri tarafından oluşturulan nadir bir meme kanseridir. Genellikle müsinöz karsinomlu kadınlar daha yaygın olarak görülen invaziv karsinom tiplerine sahip kadınlara göre daha iyi bir prognoza sahiptir.
- **Tübüler karsinom:** Meme kanserinin nadir görülen bir tipidir ve adını tümör hücrelerinin mikroskop altında tübüler yapılar oluşturmasından alır. Tübüler karsinomu olan kadınlar genellikle daha yaygın invaziv karsinom tiplerine sahip kadınlardan daha iyi bir prognoza sahiptir. Tübüler karsinomlar, meme kanseri tanılarının yaklaşık %1-2'sini oluşturur.
- **İnflamatuvar meme kanseri;** Kanser hücrelerinin meme üzerindeki deride lenf damarlarını veya kanallarını tıkaması nedeniyle oluşan çukurlar ve/veya

kalın çıkıntılar içeren iltihaplı meme görünümüdür. İltihaplı meme kanseri nadir görülmesine rağmen son derece hızlı büyümektedir.

- **Meme başının Paget hastalığı;** Süt kanallarında başlayıp meme başı ve areola derisine yayılan nadir bir meme kanseri tipidir. Meme kanserlerinin yaklaşık %1'ini oluşturur.
- **Phylloides tümörü;** hem benign (İyi huylu), hem borderline (Sınırdaki), hem de malign (Kötü huylu) olabilen phylloides tümörleri, memenin bağ dokularında gelişir ve cerrahi olarak çıkarılmasıyla tedavi edilebilmektedir. Phylloides tümörleri oldukça nadir görülmektedir (Sharma ve ark.,2010).
- **Üçlü negatif meme kanseri;** Üçlü negatif meme kanseri, progesteron reseptörü, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ve östrojen reseptör ekspresyonunun eksikliği ile tanımlanır. Bu tip özellikle genç ve premenopozal kadınlarda yaygın olarak gözlemlenen meme kanserinin agresif seyirli bir formudur (Sharma ve ark., 2010; Akram ve ark., 2017).



Şekil 2.8. İnvazif duktal karsinom ile ilişkili tipik yapı (Sharma ve ark., 2010).

Meme kanseri evreleri, kanserli hücrelerin yerine ve büyüklüğüne, lenf bezlerine yayılma derecesine ve çevre dokulara ve organlara metastaz yapıp yapmamasına bağlıdır.

- **Evre 0 (Noninvaziv);** Tümör genellikle bir in situ duktal karsinoma ile sınırlıdır ve çevre meme dokusunu istila etmemiştir. Hastaların %40'ında

invazif kansere dönüşebilmektedir. Bu karsinomun tedavisi genellikle lumpektomi ve radyasyon veya mastektomi gibi yöntemlerle gerçekleştirilir. Endokrin tedavisi, duktal karsinomada östrojen reseptörü pozitif olduğunda hastalara seçenek olarak uygulanabilir.

- **Evre I;** Tümörün çapı 3/4 inçten (2 santimetre) azdır ve memenin dışına yayılmamıştır.
- **Evre IIa;** Tümörün çapı 3/4 inç veya daha küçüktür ve axilla altındaki bir ila üç lenf noduna yayılmıştır, Mikroskopik miktarlarda tümörle aynı taraftaki göğüs kemiği yakınındaki lenf nodlarına veya her ikisine yayılmıştır veya tümörün çapı 3/4 inçten büyük ancak 2 inçten (5 santimetre) küçüktür ancak memenin ötesine yayılmamıştır.
- **Evre IIb;** Tümör 3/4 inçten büyük ancak 2 inçten küçük çaptadır ve axilla altındaki bir ila üç lenf noduna yayılmıştır, Mikroskopik miktarlar, tümörle aynı taraftaki göğüs kemiği yakınındaki lenf düğümlerine yayılmış veya tümörün çapı 5 santimetreden büyüktür ancak memenin dışına yayılmamıştır.
- **Evre IIIa;** Tümörün çapı 2 inç veya daha küçüktür ve axilla altında dört ila dokuz lenf noduna yayılmıştır ve tümörle aynı tarafta göğüs kemiği yakınında en az bir lenf nodunu büyütüştür veya tümörün çapı 2 inçten büyüktür ve axilla altındaki dokuz lenf noduna veya göğüs kemiği yakınındaki lenf nodlarına yayılmıştır
- **Evre IIIb;** Tümör göğüs duvarına ya da deriye yayılmış veya inflamatuvar meme kanseri neden olmuştur. Bu evrede tümör herhangi bir boyutta olabilir ve axilla altındaki 10 veya daha fazla lenf düğümüne yayılmış, Os. clavícula altındaki veya üstündeki lenf düğümlerine yayılmış olabilmektedir.
- **Evre IIIc;** Axilla altındaki dört veya daha fazla lenf noduna yayılmıştır ve mikroskopik miktarlarda tümörle aynı taraftaki göğüs kemiği yakınındaki lenf nodlarına yayılmıştır. Tümör Os clavícula altı ve üzeri, boyun bölgesinde çeşitli boyutlarda bulunur.
- **Evre IV;** Bu evrede meme kanseri karaciğer, akciğer, kemik, beyin ve lenf bezlerine yayılmıştır (Sharma ve ark., 2010).

Erken invaziv evreler (I, IIa, IIb) ve lokal ileri evreler (IIIa, IIIb, IIIc) metastaz oluşturmaz fakat metastaz riski her zaman değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Bu evrelerin tedavisi, ameliyat öncesi, ameliyat sonrası ve cerrahi aşamalardan oluşur. Tümörler östrojen, progesteron veya ERBB2 reseptörlerini ekspre ettiğinde, ameliyat öncesi aşamada sistemik endokrin veya immünoterapiler kullanılmaktadır. Bu üç reseptörden hiçbirine sahip tümörlerin olmadığı durumlarda ise kemoterapi seçenek olarak düşünülebilmektedir. Cerrahi aşama için radyasyonlu lumpektomi veya mastektomi olmak üzere iki seçenek belirtilmektedir. Ameliyat sonrası aşamada ise radyasyon, endokrin tedavisi, bağışıklık tedavileri ve kemoterapi seçenekleri uygulanmaktadır (Bolat., 2023).

2.5. Meme Kanseri Hücre Hatları

İlk meme kanseri hücre hattı olan BT-20'nin 1958'de keşfedilmesinden bu yana, çoğu hücre hattı 1970'lerin sonlarında bulunmuştur. Hücre hatlarının adlandırılması genellikle fenotipik özellikleri yansıtmak yerine, nasıl oluşturulduklarına dayanmaktadır. Örneğin, 'HCC serisi' hücre hatları Hamon Kanseri Merkezi'nde izole edilmiştir; 'MDA serisi' ise M. D. Anderson Hastanesi'nde oluşturulmuştur (Dai ve ark., 2017).

Günümüzde en yaygın kullanılan meme kanseri hücre hatlarından biri olan MCF-7, 1973 yılında Michigan Kanseri Vakfı'nda izole edilmiştir. Yakın geçmişte, homojen hücre popülasyonlarının stromal kontaminasyon olmaksızın kültürlenmesindeki zorluklar nedeniyle yeni meme kanseri hücre hatlarının izole edilmesi sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte, bireysel hastalardan elde edilen meme primer tümörleri, plevral efüzyonlar veya metastatik bölgelerden türetilen SUM (Southwestern University Michigan) gibi hücre hatları bu zorlukların üstesinden gelmiş örneklerdendir.

MDA-MB-231 hücre hattı ise 1970'lerde oluşturulmuştur ve yüksek metastatik potansiyele sahiptir. Bu hücre hattı, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ekspresyonu açısından negatiftir ve mutasyona uğramış p53 proteini üretmektedir (Holliday ve Speirs, 2011). HER2 ekspresyonunun olmaması nedeniyle, MDA-MB-231 hücre hattı, üçlü negatif meme kanseri (TNBC) araştırmalarında

yaygın olarak kullanılan önemli bir modeldir. Bu hücrelerin in vitro şartlarda yüksek yapışma yeteneği, laboratuvar deneylerinde tercih edilmelerini sağlamaktadır (Liu ve ark., 2017).

2.6. Kanser Hücrelerinde Glukoz Metabolizması

Kanser, hücrel kontrol mekanizmasındaki kalıtsal bozuklukları içeren, hücrel düzeyde bir hastalıktır. Kanseri hücrelerinin ayrıca, tümör mikro ortamının sağladığı metabolik açıdan riskli koşullar altında hayatta kalmak ve çoğalmak için metabolizmalarını uyarlamaları gerekir. Tümör hücreleri, düzensiz hücrel çoğalmayı sürdürebilmek için metabolizmalarını değiştirir; bu dönüşüm, onları sürekli besin ve enerji tedarikine bağımlı hale getirir. Vücut tümör hücrelerinin hızlı çoğalmalarını ve yayılmalarını desteklemek için metabolizmalarını değiştirirler. 1930'da değişen kanser hücresi metabolizmasına dayalı keşfin ardından, enerji metabolizmalarını hedef alarak tümör hücrelerini etkili bir şekilde ortadan kaldırmanın yeni yollarını bulma ortak hedefiyle çok sayıda çalışma, kanser metabolizmasının çeşitli yönlerine ışık tuttu. Bu hastalık, hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve metabolizmasını kontrol eden mekanizmaların etiyolojik ve patolojik bozukluklar ile ilişkilendirilmektedir. Bazı tümör baskılayıcı proteinlerin inaktivasyonuna yol açan genetik değişiklikler. Kanseri hücrelerinin, artan glukoz alımı, artan glutaminoliz oranları ve yağ asitleri sentezi dahil olmak üzere metabolik programlarında karakteristik değişiklikler yaşadıkları gösterilmiştir; bu, metabolik değişimlerin tümör hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını desteklediğini düşündürmektedir (Fadaka ve ark., 2017).

2.6.1. Meme Kanserinde Glukoz Metabolizması

Kanseri hücreleri, glukoz konsantrasyonundaki değişikliklere karşı normal hücrelere göre daha duyarlıdır ve glukoz temini sınırlı olduğunda ve glikoliz bozulduğunda kanseri hücrelerin ölümü normal hücrelere göre daha kolaydır. Glikolizin veya glukoz taşınmasının çeşitli aşamalarının inhibe edilmesi, kanseri hücreleri içindeki hem enerji tedarikini hem de biyosentez süreçlerini ciddi şekilde bozduğu ve kanseri hücrelerinin çoğalma hızının azalmasına ve kanseri hücrelerinin apoptozunun indüklenmesine neden olduğu düşünülmektedir (Liu ve ark., 2010).

Glukoz yoksunluğu olarak da adlandırılan hücre kültürü ortamından glukozun uzaklaştırılmasının, glukoz taşıyıcılarını yukarı regüle ettiği, glikolizi ise aşağı regüle ettiği ve kanser hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Glukoz, temel hücresel metabolizmayı koruyan, kanser hücresinin hayatta kalmasını, büyümesini ve çoğalmasını destekleyen bir besindir. Glukozdan yoksun bırakmak kanser hücrelerinin hızla ölümüne neden olmaktadır (Cunha ve ark., 2023).

Hemen hemen tüm kanser hücreleri, Warburg etkisi olarak adlandırılan bir fenomen olan, glukoz taşınmasının ve glukoz metabolizmasının, özellikle de glikolizin yukarı regüle edildiği bir fenotip sergiler. Normal hücrelerde glukoz, mitokondride solunum yoluyla tamamen CO₂'ye oksitlenir. Tümörde veya gelişmekte olan hücrelerde glikolizin son ürünü, aşırı oksijen varlığında bile laktattır. Bu olağandışı olay "aerobik glikoliz" veya Warburg etkisi olarak bilinir. Warburg etkisi yalnızca kanserin bir özelliği olarak değil, aynı zamanda kanser için de savunmasız bir hedef olarak kabul edilmiştir. Çünkü kanser hücreleri büyümeleri ve hayatta kalmaları için glukoz ve glikolize büyük ölçüde bağımlıdır (Liu ve ark., 2010). Her ne kadar Warburg etkisinin, glukoz temini yeterli olduğunda kanser hücrelerine büyüme avantajı sağladığı bilirse de bu özellik, glukoz temininin sorun olduğu durumlarda kanser hücreleri için ölümcül bir etkisinin olduğu değerlendirilebilir. Pek çok tümörde glukoz desteğinin zayıf olması ve bununla birlikte kanser hücrelerinin çoğunun son derece yüksek glikolitik kapasiteye sahip olması, tümör içi glukozun tükenmesine neden olacaktır bu durumda, kanser hücresinin ölümüne yol açacaktır (Cunha ve ark., 2023). Diğer bir yandan glikolizin farklı adımlarında yer alan anahtar enzimleri hedef alabilecek ilaçların araştırılması, glukoz metabolizmasını önlemenin umut verici bir yoludur. Öne çıkan yaklaşımlardan biri, glukozu fosforile ederek glikolizin ilk adımını katalize eden heksokinaz-2'nin (HK2) inhibisyonudur. Sitoplazmik ortamda HK2 baskılanmasından sonra glukoz, glukoz-6-fosfata (G6P) dönüştürülemez, bu da glukoz fosforilasyonunun inhibisyonuna, ATP üretiminde azalmaya ve ciddi enerji yoksunluğuna neden olur ve sonuçta hücrelerin hayatta kalmasına ve çoğalmanın bloke olmasına yol açar (Meng ve ark., 2022).

Bu temel araştırma keşifleriyle paralel olarak, [18F] flouro-2-deoxyglucose (FDG) pozitron emisyon tomografisinin (PET) çeşitli insan tümör tiplerinin görüntülenmesinde artan klinik kullanımı, glukoz metabolizmasının fonksiyonel

olarak değiştiğini ortaya çıkarmıştır. Kan dolaşımına enjekte edilen FDG, hücre yüzeyindeki glukoz taşıyıcıları tarafından alınır ve daha sonra heksokinaz tarafından fosforile edilerek FDG-fosfat oluşturulur, böylece en yüksek glukoz alımına ve heksokinaz aktivitesine sahip dokuların görselleştirilmesi sağlanır. Ek olarak, hücre kültürü çalışmaları, bu metabolik değişiklikleri taşıyan tümör hücrelerinin, normal muadillerinin aksine, glikolizin inhibisyonuna karşı benzersiz derecede duyarlı olduğunu göstermiştir ve bu da potansiyel bir terapötik pencere olduğunu ortaya koymaktadır (Shaw; 2006).

2.6.2. Meme Kanserinde Glukoz Taşıyıcıları

Tümör hücreleri genellikle başta glukoz ve glutamin olmak üzere besin maddelerinin alımını artırır. Glukoz, lipid çift katmanı boyunca kolayca yayılmadığından, glukoz alımı kanser hücreleri metabolizması ve büyümesi için önemli bir düzenleyicidir. Glukoz taşımının moleküler mekanizmasının anlaşılması, glukoz alımını engellemeyi amaçlayan ilaçların rasyonel tasarımı için oldukça önemlidir. Lipid içerikli hücre membranı glukozu geçirgen değildir. Glukozun polar yapılı hücre membranından geçebilmesi için çeşitli taşıyıcılara ihtiyaç vardır. Glukoz, glukoz taşıyıcıları olarak bilinen özelleşmiş membran proteinleri aracılığıyla lipid çift tabakasını geçer. Memelilerde iyi bilinen üç glukoz taşıyıcı türü vardır: GLUT ailesi (Glukoz taşıyıcıları), SGLT (Sodyum-glukoz bağlantılı taşıyıcılar) ve yakın zamanda keşfedilen SWEET taşıyıcıları.

SGLT (Sodyum-glukoz ko-transporteri) taşıyıcıları, glukozun hücre zarından geçişini sağlayan bir mekanizma olup, bu taşıyıcılar sodyum iyonlarının gradyanını kullanarak glukoz moleküllerini hücre içine aktarır. Bu taşıma işlemi, sodyum iyonlarının hücre dışında yüksek, hücre içinde düşük konsantrasyonuna dayanan bir ikincil taşıma mekanizmasıdır ve enerji gerektirir. Sodyum iyonlarının hücre içine alınması ve potasyum iyonlarının hücre dışına pompalanması, Na^+ / K^+ ATPaz pompa sistemi tarafından ATP enerjisi kullanılarak sağlanır. Bu, birincil veya ikincil ATP hidrolizi gerektirmeden glukozun konsantrasyon derecesinden aşağı hareketini kolaylaştıran GLUT taşıyıcıları ile temel farkı belirler. SGLT taşıyıcıları ince bağırsakta glukoz emilimi ve böbrek dokusunda glukoz geri emilimi için gereklidir.

SWEET taşıyıcıları, bitkilerde bulunan ve şekerlerin hücre içi ve hücre dışı arasında taşınmasını sağlayan bir protein ailesidir. Bitkilerde şeker taşınımı, büyüme, gelişme ve meyve olgunlaşması gibi temel fizyolojik süreçler için önemlidir.

GLUT ailesi, substrat seçiciliği, doku ekspresyonu ve subselüler lokalizasyon açısından farklılık gösteren 14 üyeden oluşur. Bu taşıyıcılar, substrat özgüllüğü ve sekans benzerliğine dayalı olarak üç sınıfa ayrılır:

- **Sınıf I:** GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4 ve GLUT-14
- **Sınıf II:** GLUT-5, GLUT-7, GLUT-9 ve GLUT-11
- **Sınıf III:** GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10, GLUT-12 ve GLUT-13

Bu taşıyıcıların her birinin farklı konumlara, kinetik özelliklere, substrat spesifliklerine ve işlevlere sahip olduğunu belirtmek önemlidir. Glukoz taşıyıcı proteinlerin her biri, glukoz ve fruktoz gibi diğer heksozlar için farklı afinitelere sahiptir (Zambrano ve ark., 2019; Lebelo ve ark., 2019).

Sınıf I üyeleri glukoz homeostazını doğrudan düzenlemektedir. GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-4, glukoz için yüksek bir afiniteye sahiptir ve normal fizyolojik koşullar altında glukozun yüksek oranda taşınmasına izin verir. Bu proteinler, glukoz homeostazındaki önemleri nedeniyle iyi çalışılmıştır. GLUT-1 birçok dokuda değişken seviyelerde bulunur ve bazal glukoz alımından sorumludur. GLUT-2 ince bağırsak, karaciğer ve pankreas dokusunda lokalize olurken, GLUT-3 esas olarak beyin ve sinir sisteminde bulunur (Macheda ve ark., 2005).

Kanser hücrelerinde glukoz alımı genellikle, büyüme faktörleri tarafından aşırı eksprese edilen ve genellikle kanser malignitesi ile ilişkili olan GLUT-1 ile ilişkilidir, ancak diğer GLUT'lar da dahil olabilir (Gonzalez-Menendez, 2018). GLUT-1, SLC2A1 geni tarafından kodlanan, fizyolojik ve patolojik glukoz alımından sorumlu birçok hücrede bulunan ana taşıyıcı bir uniporter proteindir. Tüm membran taşıma sistemlerinin en kapsamlı çalışılan proteinlerinden biridir (Yu ve ark., 2017). GLUT-1, önemli bir prognostik biyobelirteç olarak çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, GLUT-1 çeşitli hücrelerde, özellikle de beyne ve diğer organlara glukoz sağlanması için gerekli olan

endotelial hücrelerde ve kırmızı kan hücrelerinde de eksprese edilir. GLUT-1 disfonksiyonu, dizartri ve zihinsel ve motor gelişim gecikmeleri gibi çeşitli semptomlarla karakterize edilen GLUT-1 eksikliği sendromu (GLUT-1-DS, De Vivo hastalığı) gibi bir dizi hastalığa neden olabilir (Geng ve ark., 2024). GLUT-1'in hücrelerdeki seviyeleri, fizyolojik ve patolojik koşullar altında değişir. Özellikle RAS, SRC, c-MYC ve P53 genlerinin inhibisyonu ve aktivasyonu GLUT-1 ekspresyon düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur. Bazal glukoz taşınmasının engellenmesi, kanser hücrelerinde çoğalmayı engellemenin yeni bir yolu olarak ortaya çıkmaktadır. Çeşitli çalışmalarda GLUT-1 antikorlarının kullanımı ile apoptoz sonucu tümör boyutunda küçülme sağlandığı ve bazı moleküllerin GLUT-1 inhibisyonuna neden olarak tümör hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği gösterilmiştir. Bu durum, glukoz taşıyıcı proteinler aracılığıyla tümöral hücrelerin karsinogenezi ile glukoz metabolizması arasındaki yakın ilişkiyi ortaya koymakta ve glukoz taşıyıcı proteinlerin kanser tedavisinde hedef moleküller olabileceğini göstermektedir. Kanser tedavisinde GLUT-1 ekspresyonunun tanısal olarak benign ve malign ürotelial tümörleri ayırt etmede kullanılabileceği de bildirilmiştir. Ayrıca osteosarkom, gastrik adenokarsinom, özofagus adenokarsinomu, pankreas karsinomu, akciğer karsinomu, oral skuamöz hücreli karsinom, endometriyal adenokarsinom gibi farklı kanser tiplerinde GLUT-1 ekspresyonunun prognostik önemi çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (Okcu ve ark., 2022). GLUT-1'e spesifik olarak bağlanan bir antikorun, glukoz alımını azalttığı ve akciğer ve meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, bu antikor, sisplatin, paklitaksel ve gefitinib gibi kanser ilaçlarının antikanser etkilerini güçlendirmiştir (Liu ve ark., 2010). Oh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, meme kanseri hücresinde GLUT-1 ekspresyonunun aşağı yönlü düzenlenmesinin Akt sinyal yolağındaki yukarı yönlü düzenlemeyi indükleyerek hücrel apoptozda bir azalma sağladığı görülmüştür (Oh ve ark., 2017). Yayınlanan tüm bu sonuçlar, glukoz taşınmasının inhibisyonunun, glukoz taşınması/glukoz metabolizması ile kanser arasındaki ilişkinin araştırılmasını kolaylaştırabileceğini ve kanser tedavisi için yeni ve etkili bir yol olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

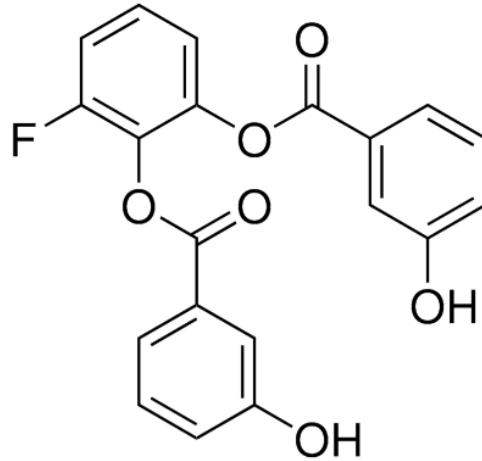
2.6.3. GLUT-1 taşıyıcısı WZB117

TNBC'lerdeki yüksek derecede metabolik heterojenlik, metabolizma hedefli tedaviler için büyük zorluklar oluşturmaktadır. Bu nedenle, GLUT-1 inhibisyonunun TNBC tedavisi için başarılı bir strateji olabilmesi için, bu metabolik yolağın gerekli olduğu kesin bağlamların tanımlanması gerekmektedir. Bununla birlikte, kanser metabolizması türleri arasında oldukça karmaşıktır ve TNBC'de GLUT-1 bağımlılığını ve GLUT-1 inhibisyonuna duyarlılığı öngörmek için güvenilir biyobelirteçler hala eksiktir (Wu ve ark., 2020). Bu doğrultuda, kanser hücrelerini 'aç bırakmak' amacıyla STF-31, resveratrol, naringenin, phloretin, WZB117 (3-Fluoro-1,2-phenylene bis(3-hydroxybenzoate)) ve pirazolopirimidinler dahil olmak üzere çeşitli GLUT-1 inhibitörleri geliştirilmiştir. Polifenolik bir bileşik olan WZB117 (Şekil 2.9), GLUT-1 proteininin glukoz taşınmasını gerçekleştiren merkez kanalına bağlanarak glukoz alımını engelleyen bir inhibitördür (Geng ve ark., 2024). WZB117, güçlü bir GLUT inhibitörü olarak sentezlenmiş olan WZB115'in yapısal bir türevidir. GLUT-1'in aşağı düzenlenmesi (Down-regülasyonu) ile çeşitli kanser hücre hatlarında glukoz taşınmasını ve hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2024).

Birçok araştırmacı, WZB117'yi glukoz alım inhibitörü olarak kullanmıştır. Yapılan çalışmalar, WZB117'nin hem in vitro hem de in vivo olarak akciğer kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, WZB117'nin GLUT-1 proteini, hücre içi ATP ve glikolitik enzimlerin seviyelerini düşürdüğü ve ATP algılayıcı enzim AMP (Adenozin monofosfat) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) fosforilasyonunu yukarı doğru düzenleyerek A549 akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün durmasına, yaşlanmaya ve nekroza yol açtığı bildirilmiştir. WZB117 kullanılarak yapılan başka bir çalışmada, A549 akciğer kanseri hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kemoterapötik ilaçlardan cisplatin veya paklitaksel ile kombinasyonunun sinerjik antikanser etkisi göstermiştir (Li ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2022).

WZB117'nin dozaj belirlemesi sürecinde literatürde yapılan araştırmalara göre, Xintaropoulou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada dört meme kanseri hücre hattında Phloretin, Quercetin, STF31, WZB117, 3PO, 3-bromopiruvat, Dikloroasetat,

Oksamik asit, NHI-1 gibi çeşitli glikolitik inhibitörlerin uygulandığı ve WZB117'nin IC50 konsantrasyonlarının 0.06 ila 30 μ M aralığında olduğu görülmüştür (Xintaropoulou ve ark., 2015). De ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada, GLUT-1 inhibitörleri ve metformin kombinasyonunun kanser hücresi metabolizmasını hedeflemedeki sinerjik etkinliği incelenmiş ve MCF7, MDA-MB-231, MCF10A hücre hatlarında MET, OCMC-MET, WZB117-OCMC-MET ve WZB117'nin IC50 değeri ve seçicilik indeksi hesaplanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde WZB117'nin 48 saat uygulaması sonrası IC50 konsantrasyonu 11.5 μ M olarak bulunmuştur (De ve ark., 2023). Meme kanseri tedavisinin incelendiği başka bir çalışmada ise, dört meme kanseri hücre hattında (MCF-7, MDA-MB-231, HBL100 ve BT549) WZB117'nin 0.6 μ M dozda apoptozu indükleyerek hücre dışı glukoz seviyelerini artırdığı ve hücre dışı laktat seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Barbosa ve ark., 2020).



Şekil 2.9. WZB117 (3-Fluoro-1,2-phenylene bis(3-hydroxybenzoate))

Sonuçlar ve yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde WZB117 çoklu GLUT'ları hedefleyebilen, kanser hücrelerini glukozdan yoksun bırakan ve hücre ölümüne neden olan antikanser terapötik bir bileşiktir. WZB117'nin antikanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde iyi bir seçenek sunabileceği düşünülmektedir.

2.7. AgNOR Boyama

AgNOR (Çekirdekçik oluşturan bölgeler) proteinleri, yüksek oranda çoğalan hücrelerde biriken ve çoğalmayan hücrelerde düşük düzeyde ifade edilen bir protein kümesidir. Bu proteinlerden bazıları, mitoz sırasında nükleolar düzenleyici bölgelerle (NOR'lar) ilişkilidir. AgNOR proteinleri, morfometri ve görüntü analizi kullanılarak gümüş boyama seviyesinin kantifikasyonu ile ölçülmektedir. AgNOR proteinlerinin miktarı, hücrelerin çoğalma hızının bir göstergesidir. Hücre döngüsünün evrelerine göre bu proteinlerin miktarları değişiklik göstermektedir: G0 fazında düşük, G1 fazında biraz daha yüksek, S ve G2 fazlarında ise en yüksek seviyelerde bulunur. Çekirdekçik içindeki AgNOR'ların gümüşle boyanma şiddeti, hücrelerin transkripsiyon aktivitesine bağlıdır ve bu teknik, hücresel çoğalma ve maligniteyi değerlendirmek için kullanılabilir (Sirri ve ark., 2000; Trere ve ark., 2020). Diğer bir deyişle, AgNOR boyama, aktif rDNA bölgelerini boyayıp inaktif bölgeleri boyamaz; bu nedenle, transkripsiyonel aktivitenin bir göstergesi olarak kullanılır (Mohanty ve Padhy, 2020).

2.8. Apoptoz ve Kanser

Apoptoz, başlangıçta bir dizi stereotipik morfolojik değişikliklerle karakterize edilen önemli bir hücre ölümü şeklidir (Cohen ve ark., 1997). 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, genomik DNA parçalanmasıyla ilişkili hücre ölümünü tanımlamak amacıyla ortaya atılmıştır. Apoptoz, DNA parçalanmasının yanı sıra sitoplazmik yoğunlaşma, nükleer piknozis (Nükleusun küçülmesi), kromatin yoğunlaşması, hücrenin yuvarlaklaşması, zar kabarcığı oluşumu, sitoskeletal çöküş ve zarla çevrili apoptotik cisimlerin hızlı bir şekilde makrofajlar veya komşu hücreler tarafından fagosite edilmesiyle karakterize edilir (Li ve ark., 2008).

Apoptoz, nekrozun aksine, bir hücrenin belirli uyarınlardan sonra aktif olarak ölüme doğru izlediği durumu tanımlamak için kullanılır ve hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda önemlidir. Zaman içinde, apoptozdan sorumlu moleküler mekanizmalar büyük ölçüde aydınlatılmış ve bu süreci karakterize eden morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerden sorumlu olan hücre içi proteaz ailesi, yani

kaspazlar, tanımlanmıştır. Özellikle, aspartik asit kalıntılarındaki substratları kesen ve "kaspazlar" olarak bilinen sistein proteaz ailesinin aktivasyonu, bu değişikliklere yol açmaktadır (Reed ve ark., 2000).

Kanser, normal hücrelerin bir dizi genetik değişiklik sonucu kötü huylu hücrelere dönüşmesi olarak tanımlanabilir; bu süreçte hücre ölümünden kaçınma, kötü huylu dönüşümde temel bir değişikliklerdir. Bu nedenle, apoptozun azalması veya apoptoz direnci, karsinogenezde kritik bir rol oynar. Kötü huylu hücreler, apoptozdan kaçınmak veya apoptoz direnci geliştirmek için çeşitli mekanizmalar kullanabilir. Bu mekanizmalar genel olarak şu şekildedir:

- Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması,
- Azalmış kaspaz fonksiyonu,
- Bozulmuş ölüm reseptörü sinyalizasyonu.

Pro-apoptotik proteinlerin (Bax, Bak) ve anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL) dengesi, hücrenin apoptoz yolunu seçmesinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Ayrıca, p53 gibi tümör süpresör proteinlerin işlev bozuklukları da apoptozun etkili bir şekilde gerçekleşmesini engelleyebilir (Wong ve ark., 2011).

Apoptozun altında yatan mekanizmaların anlaşılması, çeşitli kinazların blokajı yoluyla tümör ilerlemesini destekleyen hedefe yönelik tedavilerin tanımlanmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır. Bu keşifler, hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların, hedefe yönelik tedavilerin etkinliğine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Carnerio ve ark., 2020). Son yıllarda, bu tedavilerin klinik etkinliği ve güvenilirliği üzerine yapılan araştırmalar, apoptozun hedefe yönelik tedavilerdeki rolünü ve bu tedavilerin potansiyelini daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) laboratuvarında yürütüldü ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2023-13305 kodlu proje ile desteklendi.

3.1. Deneyde Kullanılan Demirbaş ve Sarf Malzemeler

Tablo 3.1. Demirbaş Malzemeler

Demirbaş Malzemeler	
<ul style="list-style-type: none">• Laminar Akım Kabini (Airstream)• CO₂'li İnkübatör (Panasonic)• Hassas Terazı (Sanyo)• Floresan Mikroskop (Leica)• Invert Mikroskop (Leica)• Buzdolabı +4 (Siemens)• Derin Dondurucu -20 (Uğur)• Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)• Spektrofotometre (Promega)	<ul style="list-style-type: none">• Vorteks (Heidolph)• Sogutmalı Santrifüj (Beckman Counter)• Hassas Terazı (Sanyo)• Su Banyosu (Mettler)• Pipet Tabancası (Gilson)• Mikropipet Seti (Gilson)• Flow Sitometri Cihazı (Beckman Counter)• Vorteks (Heidolph)

Tablo 3.2. Sarf malzemeler

Sarf Malzemeler
<ul style="list-style-type: none">• MTT Hücre Çoğalma Kiti (Sigma Aldrich, katalog no: CT02)• WZB117 (Cayman, 19900)• Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Appliehm, A3672)• Ethanol Absolute (Isolab 920.026.2500)• RPMI 1640 Medium, (ThermoFisher, 11879020)• Fetal Bovine Serum (FBS) (Serox, SF101H)• Glukoz Solüsyon (Capricorn GLC-F)• Trypsin-EDTA (HYCLONE SH30042.01)• Entellan (EDF)• Penicillin-Streptomycin (Capricorn PS-B)• Cryo Tüp (Nest, 607001)• Trypan Blue (HYCLONE SV30084.01)• Gümüş Nitrat (AFG ACS REAGENT, 316727)• Toz Jelatin (AFG Sci-723465)• Phosphate Buffered Saline (PBS) (Biobasic Canada, PD0435)• L-Glutamin (HYCLONE SH30034.01)• Formik Asit (Merck 100264.1000)• 75-25 cm² Flask (Nest 708003/708003)• 6-96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plate (Nest 703001/701001)• 0,45, 0,22 Şırınga Ucu Filtre (Isolab, 094.05.006)• Santrifüj Tüpü, 15 ml (Isolab 078.02.001)• Santrifüj Tüpü, 50 ml (Isolab 078.02.003)• Mikro Santrifüj Tüpü 1,5 ml (Isolab 078.03.002)• Lam (Isother)• Lamel: 20x20 mm (Isolab I.075.00.002)• 0.1-10 µl, 5-200 µl, 200-1000 µl Pipet Uçları (MEDLABIX)• Serolojik Pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml (Grenier, MSP0101)• FITC ANNEXİNV Apoptoz Kiti (Biolegend, 640922)• Contrad 70 (Beckman Counter)• Flow Clean Solüsyon (Beckman Counter)• Cytotflex Sheath Fluid (Beckman Counter)

3.2. Hücre Kültürü Protokolleri

3.2.1. Hücre Hatları

Çalışma kapsamında MDA-MB-231 (Pasaj 18) insan meme kanseri hücre hattı, Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden temin edildi.

3.2.2. Hücre Besiyeri

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerini kültürlemek için (Thermofisher marka); glukoz, HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetan sulfonik asit) + sodyum pirüvat içermeyen ancak L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren (11879020) katalog numaralı sıvı formda glukozsuz RPM 1640 besiyeri kullanıldı. Deney sürecinde kullanılan tüm kültür besiyerleri steril koşullarda laminar air-flow kabin içerisinde hazırlandı. Tüm deneyde besiyerleri %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Pen-strep (100 U penicillin/0.1 mg/mL streptomycin) ve %1 L-glutamin ile desteklendi. Hazırlanan besiyeri +4°C de muhafaza edildi.

3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Daha önce %10 DMSO (Dimetil Sülfoksit) ile cryo tüp içerisinde dondurulmuş halde bulunan hücre hatları, nitrojen tankından alındıktan sonra steril laminar air flow'da 37°C'de çözdürüldükten sonra 15 mL'lik falkon tüplere alındı. Üzerine 9 mL hazırlanan stok besiyeri eklendi ve +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkon tüpte bulunan supernatant kısım aspire edildi ve pelletin üzerine 1 mL besiyeri eklenerek, pipetaj yöntemi ile hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Süspanse edilen hücreler sayım aşamasından geçirildi. Sayım sonrası istenilen oranda hücre 25 cm²'lik flasklara ekildi ve üzerine 4 mL taze besiyeri eklenerek 37°C 'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisine kaldırıldı. İnkübatörde çoğalmaya bırakılan flasklardaki hücreler günlük olarak mikroskopik kontrolü yapıldı. Hücreler konfluense ulaşana kadar 2 günde 1 kez PBS

(Phosphate-buffered saline) ile yıkama yapılarak besiyerleri değiştirildi. Flasklardaki hücreler konfluense ulaştığında pasajlanarak deneysel gruplar için yeterli sayıda hücre elde edilmesi sağlandı.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması aşamasında, inkübatörden çıkarılan flasklar laminar air flow'a alındı ve içerisinde bulunan besiyerleri aspire edildi. Hücre yüzeyi PBS ile yıkandı. Yıkanan hücreler üzerinden PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı. Flasklara 3 mL tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek 5 dk süre boyunca 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Inkübatörden çıkarılan flasklar invert mikroskop altında incelendikten sonra. Flaskların içerisine 6 mL taze besiyeri eklendi. Hücre ve besiyeri karışımı 15 mL'lik falkon tüp içerisine alındı ve +4 °C'de 5 dakika süre ile 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelletinin üzerinde kalan süpernatant kısım aspire edildi ve pellet besiyeri ile çözdürüldü. Hücreler 25 cm²'lik flasklara aktarıldı ve üzerlerine 4 mL taze besiyeri eklendi. Flasklar sonrasında 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatöre alınarak inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. Hücrelerin Sayımı

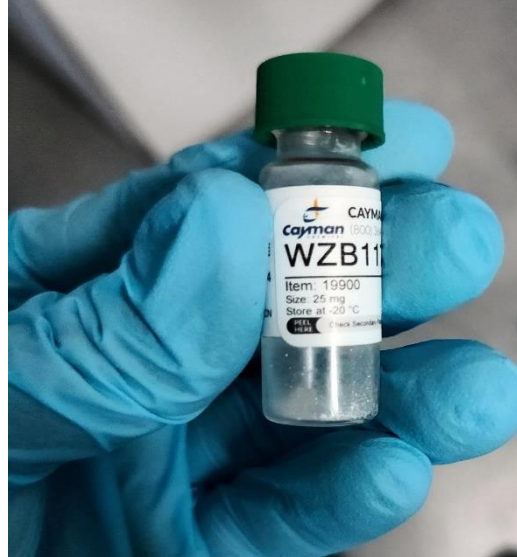
Hücrelerin canlılıklarının belirlenmesinde tripan mavisi (Tripan Blue) boyası testi kullanılmıştır. Hücrelerin çoğalmaya bırakıldığı 25 cm²'lik flasklar laminar air flow'a alındıktan sonra içerisinde bulunan besiyerleri aspire edildi. Yapışan hücrelerin kaldırılması için flaskların içerisine 2 mL tripsin/EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu eklendikten sonra 2-3 dk süre boyunca 37°C'de inkübatörde bekletildi. Inkübatörden çıkarılan flaskların içerisine 4 mL taze besiyeri eklenerek 15 mL'lik falkon tüp içerisine alındı. Falkon tüpe alınan hücreler +4 °C'de 5 dakika süre ile 1500 rpm'de santrifüj edildikten sonra pelletin üzerinde kalan süpernatant kısım aspire edildi. Falkon tabanında bulunan hücre pelletinin üzerine 1 mL taze besiyeri eklenerek yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak hücreler süspansiyon edildi. 1 mL kültür besiyerinde sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak endorf tüpe konuldu ve üzerine 10 µl tripan mavisi boyası konularak karıştırıldı. 10'ar µL hücre süspansiyonu+tripan mavisi karışımı alınarak thoma

lamının çukur kısımlarına 1:1 oranında eklendi. Thoma lamı invert mikroskopta x40 büyütmede canlı hücreler küçük, yuvarlak ve refraktil olarak, ölü hücreler ise büyük ve koyu mavi olarak belirlendi ve 10 µl karışım içerisinde bulunan canlı-ölü ve toplam hücre sayısının yüzde oranı;

- 1 mL'deki hücre sayısı= sayılan bölgelerin ortalama sayısı x dilüsyon katsayısı x 10⁴ formülü ile hesaplandı.

3.3. MTT Analizi için WZB117 Dozlarının Hazırlanması

WZB117 üretici firmanın talimatları izlenerek çözdürüldü. Bu doğrultuda -20 °C'de saklanan 25 mg WZB 117'nin içerisinde 2 mg WZB117 steril kilitli kapaklı bir eppendorf tüpüne eppendorf tüpün darası alındıktan sonra hassas terazide tartılarak alınmıştır. Eppendorf içerisinde tartılan 2 mg WZB117 üzerine 100 µL DMSO eklendi ve 2-3 dk vorteks ile tamamen çözünmesi sağlandı (Şekil 3.2.). MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sitotoksite analizi için gerekli olan 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 25 µM WZB117 elde edilmesi aşamasında oluşturulan çözelti seyreltilerek elde edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. WZB117 (Cayman, item no: 19900).



Şekil 3.2. WZB117'nin çözdürülmesi aşamasında vorteks uygulaması.

3.4. Glukozun Hazırlanması

250 g/L stok glukoz çözeltisinin içerisinde 5 mM glukoz elde etmek için 10.8 µl, 15 mM glukoz elde etmek için 32.4 µl, 25 mM glukoz elde etmek için 54 µl glukoz alınarak besiyerine eklendi.

3.5. Sitotoksite Analizi (MTT Analizi)

WZB117'nin sitotoksik etkileri, MTT deneyi kullanılarak belirlendi. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri, 96 kuyucuklu plate içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Hücreler, 24 saat boyunca 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde ve %10 FBS ile desteklenmiş besiyeri içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin ardından, kontrol grubu oluşturuldu ve WZB117'nin 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 25 µM dozları ile 24, 48 ve 72 saat sürelerle muamele edildi.

Uygulama sonrası her kuyucuğa 20 µl MTT çözeltisi (0,5 mg/mL stok) eklendi ve hücreler tekrar 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, kültür

besiyeri dikkatlice 200 µl DMSO ile değiştirildi ve hücre canlılığı 560 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Promega) ile ölçüldü.

WZB117 ile muamele edilen hücrelerin hayatta kalma oranları, ilaçsız kontrollere kıyasla bağıl absorbansın nispi yüzdesi olarak analiz edildi. Her bir test bileşiminin IC₅₀ değerleri (Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon), hücre sağ kalımının doza bağımlı eğrisi kullanılarak belirlendi ve WZB117'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 10.3.0 yazılımı ile hesaplandı.



Şekil 3.3. Elisa okuyucu promega ile ölçüm işleminin gerçekleştirilmesi.

3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması

MDA-MB-231 hücre hattı 18. Pasajda temin edildikten sonra 2 kez pasajlandı ve aşağıdaki deney grupları oluşturuldu.

1. Grup (RPMI): RPMI 1640 glukoz içermeyen

2. Grup (RPMI+5G): RPMI 1640 besiyeri içerisinde 5 mM eksojen glukoz eklendi.

3. Grup (RPMI +15G): RPMI 1640 besiyeri içerisine 15 mM eksojen glukoz eklendi.

4. Grup (RPMI+25G): RPMI 1640 besiyeri içerisine 25 mM eksojen glukoz eklendi.

5. Grup (RPMI+WZB117): RPMI 1640 içerisine WZB117 eklendi.

6. Grup (RPMI+5G+WZB117): RPMI 1640 içerisine 5 mM eksojen glukoz ve WZB117 eklendi.

7. Grup (RPMI+15G+WZB117): RPMI 1640 içerisine 15 mM eksojen glukoz ve WZB117 eklendi.

8. Grup (RPMI+25G+WZB117): RPMI 1640 içerisine 25 mM eksojen glukoz ve WZB117 eklendi.

3.7. AgNOR Boyama

Gümüş boyama, Benn-Perle ve Lindner yöntemi temel alınarak bu yöntemin hafif bir modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Sıcaklık 37°C olarak süre ise 15 dakika olarak uygulandı (Lindner., 1993; Benn ve Perle., 1986).

3.7.1. Hücrelerin Fiksasyonu

MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri glukozsuz RPMI 1640 besiyeri içerisinde 8 ayrı deney grubu kurularak 6 kuyucuklu platelerinin içerisine yerleştirilmiş olan 20x20 mm ebatlarında no:1 kare lamel üzerine 1×10^5 oranda ekildi. Ekilen hücreler 1 gün süre ile inkübatör içerisinde çoğalmaya bırakıldı. 1 günlük inkübasyon sonrasında hücreler 4.08 μ M WZB117 ile muamele edildi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyonun ardından lamel üzerine yapışmış olan ve WZB117 ile muamele edilmiş olan hücreler metil alkol ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra preparatlara gümüş AgNOR boyama yöntemi uygulandı.

3.7.2. AgNOR Boyama için Çözeltilerin Hazırlanması

- **%33 lük AgNO₃ çözeltisi:** 2/1 oranda 20 mL bidistile su içerisinde 10 g AgNO₃'ün çözdürülmesi ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti de karanlıkta muhafaza edildi.
- **%1 lik formik asit çözeltisi:** 1 mL formik asitin 99 mL bidistile su ile 100 mL ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- **%2 lik jelatinli formik asit çözeltisi:** 98 mL %1 lik formik asit çözeltisi içerisinde 2 g jelatinin ile karıştırılması ile hazırlandı.
- **Gümüş boyama çözeltisi:** %33 lük AgNO₃ çözeltisinden 1 mL (2 hacim), %2 lik jelatinli formik asitten de 0.5 mL (1 hacim) alınarak ışık görmeyen çevresi alüminyum folyo ile sarılı tüp içinde karıştırılarak hazırlandı. +4'te muhafaza edildi.

3.7.3. AgNOR Boyamanın Gerçekleştirilmesi

Hazırlanan gümüş boyama çözeltisi, hiç beklenilmeden fikse edilmiş preparatların üstüne 3-4 damla olacak şekilde konuldu ve lamel ile kapatıldı. Çevresi alüminyum folyo ile sarılı petri kapları içine yerleştirilerek 37 °C de daha önce sıcaklığı sabitlenmiş olan etüv içerisinde 15 dk bekletildi. Bu süre sonunda lamalar distile su ile yıkanma işlemi ile üstlerindeki lamellerinden ayrıldı ve kurumaya bırakıldı. Lamaların üzerlerinde sabitlenmiş olan hücreler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Lamalar kuruduktan sonra NORs alanlarının ölçümüne başlandı. AgNOR ile boyanan olan preparatlar ışık mikroskobu ile (Leica DM 3000) görüntülendi ve bir dijital kamera yardımı ile fotoğraflandı. Çekilen fotoğraflar görüntü işleme yazılımı olan İmaj analiz yöntemine ImageJ (Imaging Color 12 BIT, Made in Canada) aktarıldı. Her bir çekirdek için "freehand selection" aracı kullanılarak hem nükleer alan başına toplam AgNOR alanı (TAA/NA) hem de ortalama AgNOR sayısı hesaplandı.

3.8. Apoptoz (Annexin V&Dead Cell) Testi

Apoptozu analiz etmek için FITC-Konjuge Annexin V bağlanması ve 7AAD boyaması prosedürü uygulandı. MDA-MB-231 hücreleri, glukozsuz RPMI 1640 besiyeri içerisinde 8 ayrı deney grubu kurularak 1×10^6 hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi. Daha sonra hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatin sonrasında tutunan hücreler üzerine $4,08 \mu\text{M}$ WZB117 uygulaması gerçekleştirildi. Hücreler WZB117 uygulaması sonrası 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonrasında FITC-Konjuge Annexin V ve 7AAD boyama için hücreler kaldırılarak eppendorf tüplere alındı. Hücreler 2 kere FACS Buffer ile yıkandı. Daha sonra tüm gruplara sırası ile $5 \mu\text{M}$ Annexin V ve $5 \mu\text{M}$ 7AAD eklendi. Hafif bir vorteks uygulaması sonrası hücreler 15 dk oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, ölçüm için CytoFLEX Flow Sitometri cihazına (Beckman Coulter) alınarak ölçüm işlemi gerçekleştirildi.

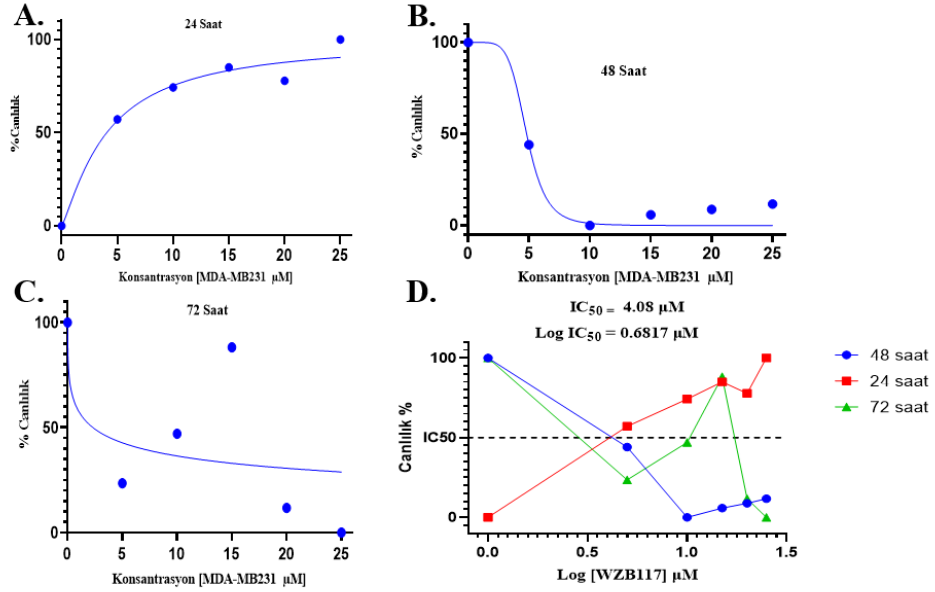
3.9. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizinde GraphPad Prism 10.3.0 kullanıldı. Araştırmada tanımlayıcı verilerin analizi; ortalama, standart sapma, yüzde ve frekans analizleri ile incelendi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca gruplar arası karşılaştırma analizleri için ikiden fazla grubun ortalamaları arasında farklılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edildi. Tek yönlü varyans analizi sonucunda hangi gruplar arasında farkın olduğunu belirlemek için post-hoc testleri kullanıldı. Post-hoc karşılaştırmaları için Tukey HSD testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri alındı.

4. BULGULAR

4.1. MTT Sonuçları

MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 5'er μM 'lık artışlar ile kontrol (0 μM), 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM konsantrasyonlarında WZB117 etken maddesi uygulandı. Uygulama sonrası hücre canlılığı, IC_{50} değerleri, doz cevap durumu 24, 48 ve 72 saatlik ölçümlerle incelenmiştir. (Şekil 4.1.)'de WZB117 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında 24-48-72 saatlik yapılan ölçüm sonuçlarına yer almaktadır.



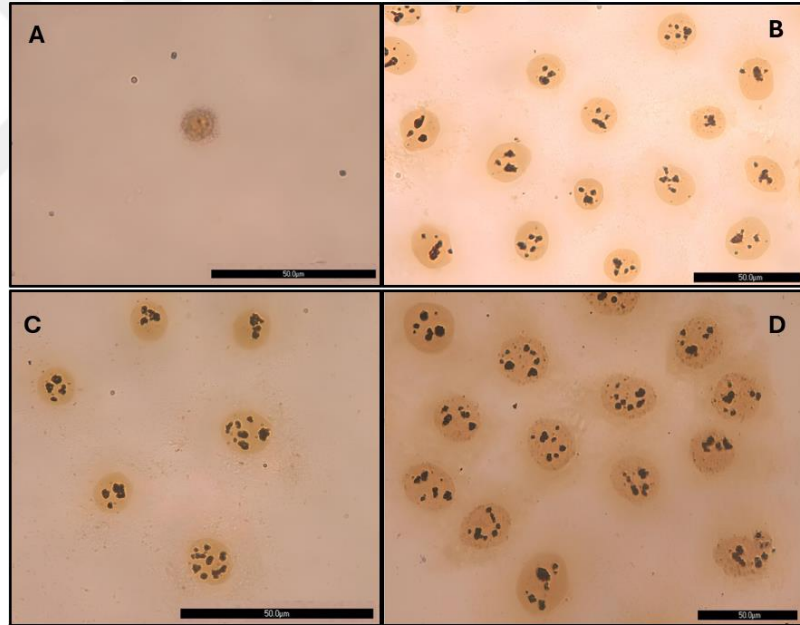
Şekil 4.1. WZB117 uygulamasının MDA-MB-231 hücre canlılığına etkisi ve IC_{50} değeri.

24 saatlik yüzdelerik absorbans verileri incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerinde inhibitör etkisi bulunmamıştır ($R^2 = 0,3921$). 48 ve 72 saatlik veriler incelendiğinde ise anlamlı inhibisyonun 48 saatlik inkübasyon sonrası

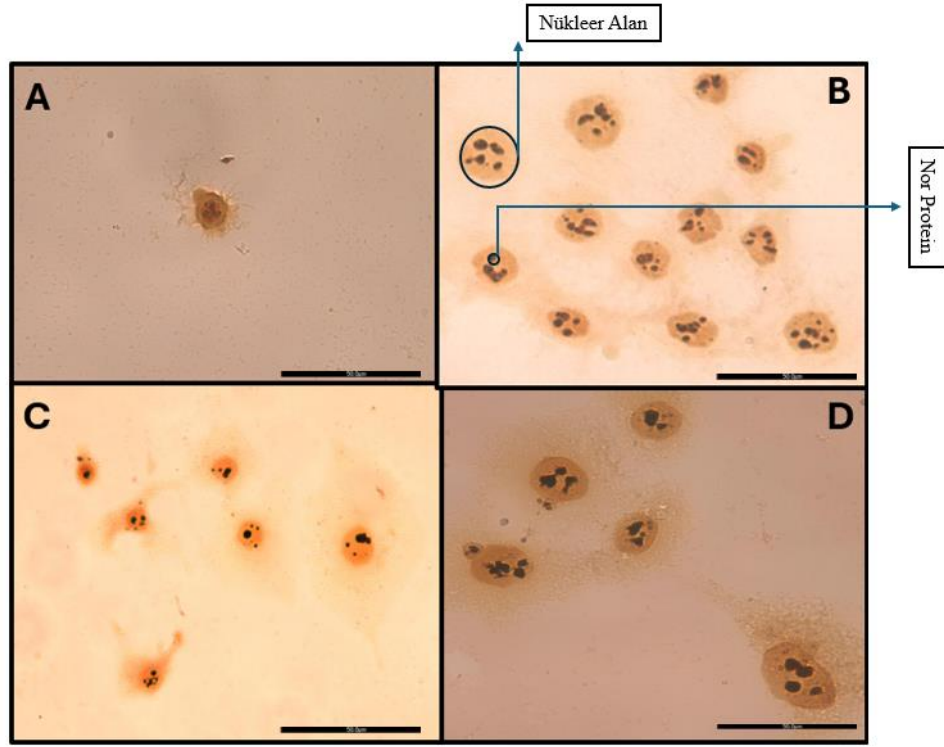
verilerde ($R^2= 0,6667$) elde edilmiştir. 48 saatlik uygulama sonrası elde edilen veriler doğrultusunda WZB117'nin IC_{50} değeri $4.08 \mu M$ olarak bulunmuştur.

4.2. AgNOR Boyama Bulguları

Tez çalışması kapsamında MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde GLUT-1 inhibitörü WZB117 etken maddesi gerçekleştirilen sitotoksite analizleri sonuçları değerlendirilerek elde edilen veriler sonucunda $4.08 \mu M$ olarak 48 saat boyunca uygulandı. AgNOR boyama gerçekleştirilerek tüm grupların ortalama AgNOR sayıları ve TAA/NA ile kanser hücrelerinin çoğalması değerlendirildi. AgNOR boyama sonrası fotoğraflanan gruplara ait görseller (Şekil 4.2.) ve (Şekil 4.3.) de verilmiştir.



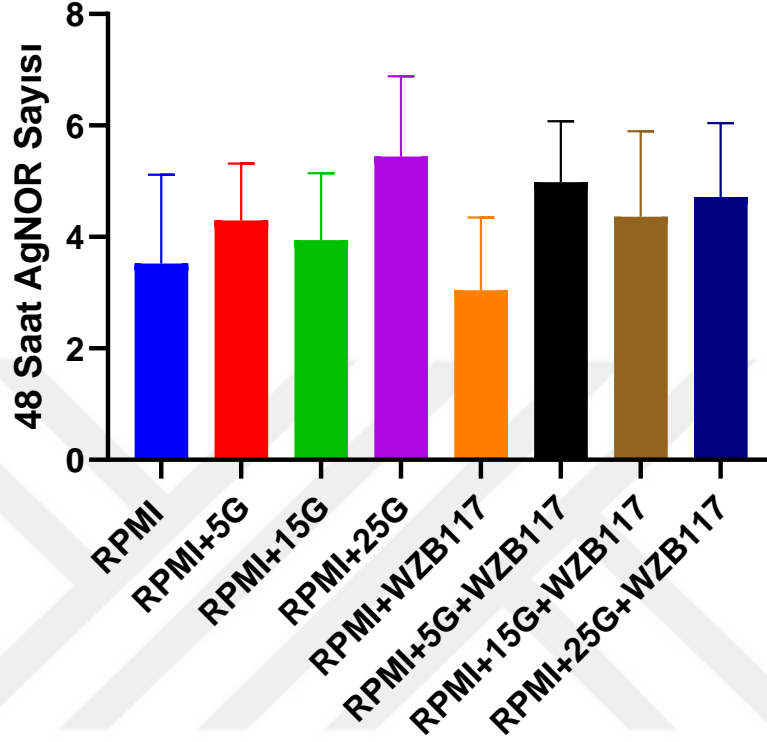
Şekil 4.2. WZB117 verilmeyen gruplara ait AgNOR boyama örnekleri. Ölçek çubuğu: $50,0 \mu m$ *A.) RPMI, B.) RPMI+5G, C.) RPMI+15G, D.) RPMI+25G. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.



Şekil 4.3. WZB117 verilen gruplara ait AgNOR boyama örnekleri. Ölçek çubuğu: 50,0 µm
 *A.) RPMI+WZB117, B.) RPMI+5G+WZB117, C.) RPMI+15G+WZB117, D.) RPMI+25G+WZB117. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

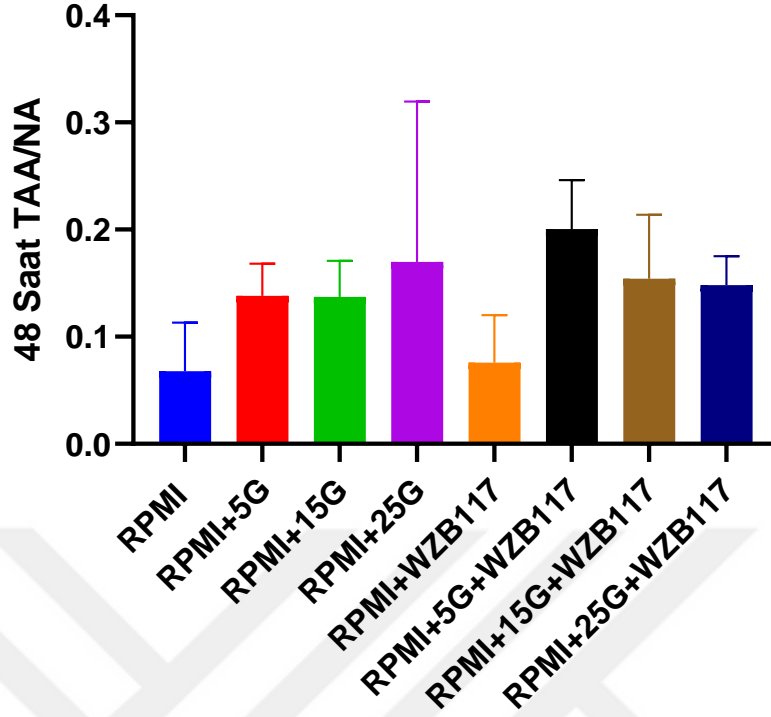
Her bir grup için Ortalama \pm Standart Sapma değerleri verildi. Bu doğrultuda (Şekil 4.4)'te 48 saatlik ölçümler ile sekiz ayrı grup için hesaplanan AgNOR sayılarının ortalamaları verilmiştir. WZB117 verilmeyen gruplar sırası ile ortalama AgNOR sayıları açısından incelendiğinde RPMI grubunda ortalama AgNOR sayısı $3,52 \pm 1,59$; RPMI+5G grubunda ortalama AgNOR sayısı $4,3 \pm 1,02$; RPMI+15G grubunda ortalama AgNOR sayısı $3,94 \pm 1,20$; RPMI+25G grubunda ortalama AgNOR sayısı ise $5,44 \pm 1,45$ olarak hesaplandı. En yüksek ortalama 25 mM glukoz verilen grupta görülmektedir. En düşük ortalama ise RPMI grubunda görülmektedir. WZB117 maddesi verilen gruplar incelendiğinde RPMI+WZB117 grubunda ortalama AgNOR sayısı $3,04 \pm 1,30$ 'tir. Bu grup, tüm gruplar içerisinde en düşük AgNOR sayısının bulunduğu gruptur. RPMI+5G+WZB117 grubunda ortalama AgNOR sayısı $4,98 \pm 1,10$; RPMI+15G+WZB117 grubunda ortalama AgNOR sayısı $4,36 \pm 1,53$ ve RPMI+25G+WZB117 grubunda ortalama AgNOR sayısı $4,72 \pm 1,32$ 'dir. WZB117 etken maddesi verilen gruplar içerisinde en yüksek ortalama

AgNOR sayısı RPMI+5G+WZB117 grubunda görülmekte iken en düşük ortalama AgNOR sayısı RPMI+WZB117 grubunda görülmektedir.



Şekil 4.4. Ortalama AgNOR sayısı. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

(Şekil 4.5.)'te her bir grup için hesaplanan TAA/NA ortalamaları verilmektedir. Gruplara ilişkin ortalamalar incelendiğinde en düşük ortalamanın RPMI grubunda olduğu görülmektedir (ort.±ss.= 0,07±0,04). Bu gruptan sonra en düşük ortalama ise RPMI+WZB117 grubunda olduğu bulunmuştur (ort.±ss.= 0,08±0,05). Dolayısı ile glukoz verilmeyen hücre kültürü ortamlarında ortalama AgNOR alanlarının çekirdek alana oranları daha düşüktür. Diğer gruplar incelendiğinde en yüksek ortalamanın RPMI+5G+WZB117 grubunda görülmektedir (ort.±ss.= 0,20±0,05).



Şekil 4.5. TAA/NA oranları. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

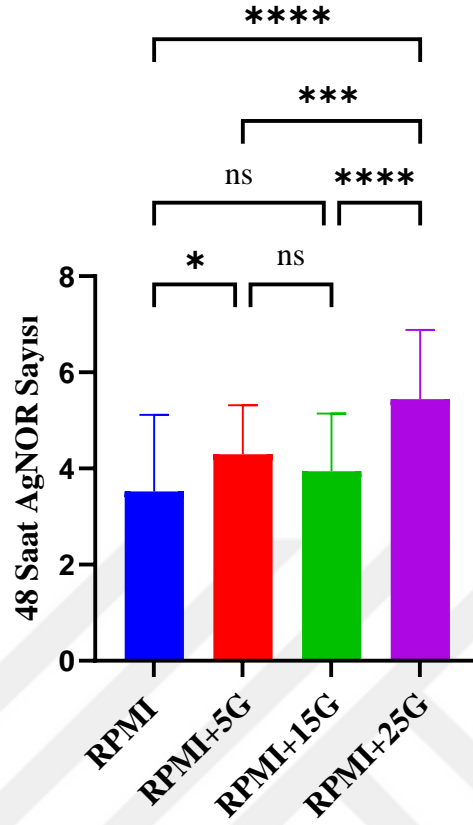
4.2.1. Ortalama AgNOR Analiz Sonuçları

Tablo 4.1.'de ortalama AgNOR sayılarına göre WZB117 verilmeyen grupların karşılaştırmalı ANOVA testi sonuçlarına yer verilmiştir.

Tablo 4.1. WZB117 verilmeyen gruplara ait ortalama AgNOR sayılarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI	3,52±1,59 ^{ab/ad}	19,12	<0.05
RPMI+5G	4,30±1,02 ^{bd/}		<0.05
RPMI+15G	3,94±1,20 ^{cd}		<0.05
RPMI+25G	5,44±1,45		<0.05

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. AgNOR: argyofilik nükleolar organizatör bölgeleri. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile ifade edilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.



Şekil 4.6. WZB117 verilmeyen gruplara ait ortalama AgNOR analiz sonuçları. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

Tablo 4.1.'de yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre tüm gruplar bazında ortalama AgNOR sayıları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve kurulan model anlamlıdır ($F=19,12$; $p<0,05$). İstatistiksel olarak bulunan bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey testi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre RPMI grubu ile RPMI+5G glukoz verilen grup arasında AgNOR sayıları ortalamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,019$). Buna göre 5 mM glukoz verilen hücrelerin ortalama AgNOR sayısı, glukoz verilmeyen RPMI grubuna daha yüksektir. Gruplar arasında bulunan diğer bir farklılık RPMI+15G grubu ile RPMI+25G grubu arasında görülmektedir ($p<0,01$). Grup ortalamaları karşılaştırıldığında 25 mM glukoz verilen grubun ortalaması diğer gruba göre daha yüksektir. Ayrıca gruplar arası AgNOR sayısı ortalamalarına göre istatistiksel olarak bulunan farklılıkların çoğunlukla 25 mM glukoz verilen grup ile olduğu görülmektedir (Şekil 4.6.). Buna göre RPMI+25G ile RPMI grubu, RPMI+5G grubu ve RPMI+15G grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık

bulunmaktadır ($p<0,01$). Karşılaştırma sonucunda da 25 mM glukoz verilen grubun ortalaması daha yüksektir. ANOVA testi sonuçlarına göre diğer bir bulgu, RPMI grubu 15 mM glukoz verilen grup arasında ortalama AgNOR sayıları istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p=0,394$). Farklılığın bulunmadığı diğer bir grup ise 5 mM glukoz verilen grup ile 15 mM glukoz verilen grup arasında görülmektedir ($p=0,531$).

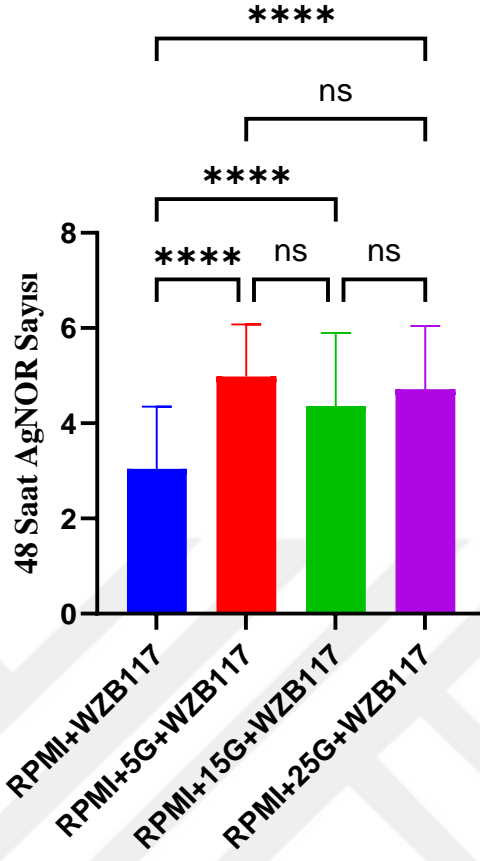
Tablo 4.2.'de ortalama AgNOR sayılarına göre WZB117 verilen gruplara ait karşılaştırmalı ANOVA testi sonuçlarına yer verilmiştir.

Tablo 4.2. WZB117 verilen gruplara ait ortalama AgNOR sayılarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI+WZB117	3,04±1,30 ^{ab/ac/ad}		<0.05
RPMI+5G+WZB117	4,98±1,10	21,12	<0.05
RPMI+15G+WZB117	4,36±1,53		<0.05
RPMI+25G+WZB117	4,72±1,32		<0.05

$p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. AgNOR: argyofilik nükleolar organizatör bölgeleri. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.2'de yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre tüm gruplar bazında ortalama AgNOR sayıları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve kurulan model anlamlıdır ($F=21,12$; $p<0,05$). İstatistiksel olarak bulunan bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey testi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre RPMI+WZB117 grubu ile diğer tüm gruplar arasında AgNOR ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre en yüksek ortalama AgNOR sayısı 5G+WZB117 verilen grupta iken sırası ile bu grubu 25G+WZB117 verilen grup izlemekte, sonrasında ise 15G+WZB117 ve RPMI+WZB117 grupları oluşturmaktadır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. WZB117 verilen gruplara ait ortalama AgNOR analiz sonuçları. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

ANOVA testi sonucunda farklılığın olmadığı gruplar bulunmaktadır. Buna göre 5G+WZB117 verilen grup ile 15G+WZB117 verilen grup ($p=0,09$) ve 25 G+WZB117 verilen grup arasında ortalama AgNOR sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,760$). Ayrıca farklılığın bulunmadığı diğer bir grup ise 15G+WZB117 verilen grup ve 25G+WZB117 verilen grup arasındadır ($p=0,527$).

4.2.2. TAA/NA Ortalamalarına Göre ANOVA Testi Sonuçları

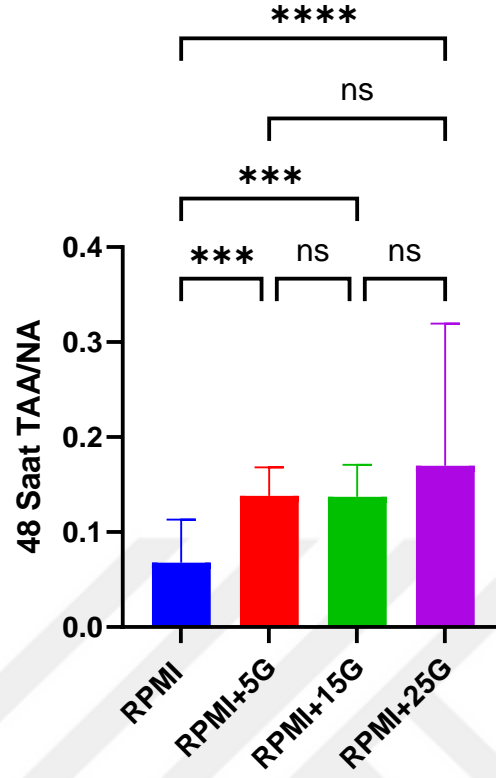
Tablo 4.3'te 48 saatlik inkübasyon sonrası WZB117 verilmeyen gruplara ait TAA/NA ortalamalarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.3. WZB117 verilmeyen gruplara ait AgNOR boyama sonrası TAA/NA ortalamalarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI	0,07±0,04 ^{ab/ac/ad}		<0.05
RPMI+5G	0,14±0,02	14,06	<0.05
RPM+15G	0,14±0,03		<0.05
RPMI+25G	0,17±0,14		<0.05

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. *TAA/NA: Toplam AgNOR Alanı / Çekirdek Alanı ifade etmektedir. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.3.'te yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre tüm gruplar bazında toplam çekirdek alanı/nor alanı oranları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve kurulan model anlamlıdır ($F=14,06$ $p < 0,05$). İstatistiksel olarak bulunan bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey testi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre gruplar arasında görülen bu farklılığın RPMI grubu ile diğer tüm gruplar arasında olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Grupların ortalamaları incelendiğinde RPMI grubunun TAA/NA ortalaması diğer tüm gruplara göre (5 mM, 15 mM ve 25 mM glukoz verilen gruplar) düşüktür. Ayrıca 5 mM glukoz verilen grup ile 15 mM glukoz verilen grubun TAA/NA ortalaması birbirine benzer iken en yüksek ortalama 25 mM glukoz verilen grupta görülmektedir (Tablo 4.3.). Ayrıca gruplar arası karşılaştırmalarda farklılığın olmadığı belirli gruplar vardır ($p > 0,05$). Şekil 4.8.'de bu gruplar verilmektedir. Bu gruplar incelendiğinde 5 mM glukoz verilen grup ile 15 mM glukoz verilen grup arasında TAA/NA ortalaması istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,999$). Benzer şekilde 5 mM glukoz verilen grup ile 25 mM glukoz verilen grup arasında toplam çekirdek alanı/nor alanı ortalaması istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,208$). İstatistiksel olarak farklılığın bulunmadığı son grup ise 15 mM glukoz verilen grup ile 25 mM glukoz verilen grup arasındadır ($p=0,185$).



Şekil 4.8. WZB117 verilmeyen gruplara ait TAA/NA ortalamalarına göre AgNOR analiz sonuçları. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

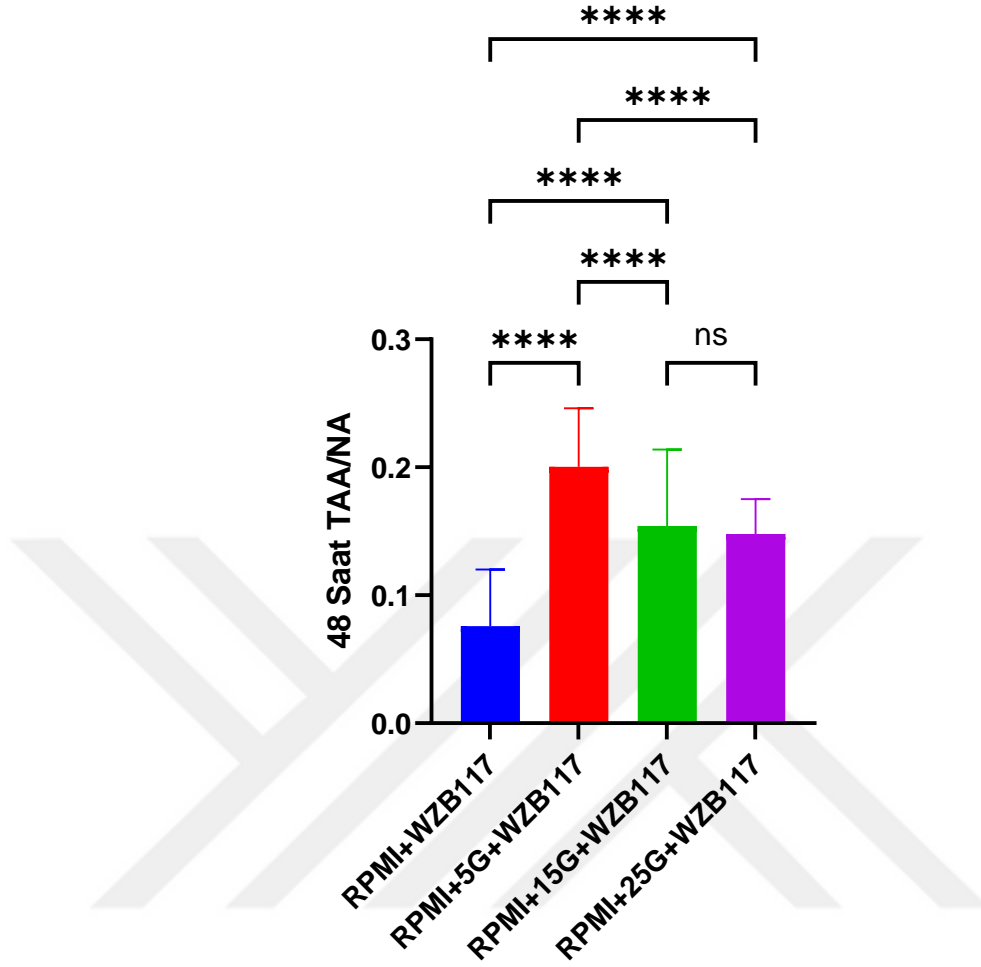
Tablo 4.4. 'te 48 saatlik inkübasyon sonrası WZB117 verilen gruplara ait TAA/NA ortalamalarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.4. WZB117 verilen gruplara ait AgNOR boyama sonrası TAA/NA ortalamalarına göre karşılaştırmalı ANOVA testi bulguları.

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI+WZB117	0,08±0,05 ^{ab/ac/ad}	63,31	<0,05
RPMI+5G+WZB117	0,20±0,05 ^{bc/bd}		<0,05
RPMI+15G+WZB117	0,15±0,06		<0,05
RPMI+25G+WZB117	0,15±0,02		<0,05

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. TAA/NA: Toplam AgNOR Alanı / Çekirdek Alanı. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.4.'te yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre tüm gruplar bazında toplam TAA/NA ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve kurulan model anlamlıdır ($F=63,31$; $p<0,05$). İstatistiksel olarak bulunan bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey testi kullanılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre gruplar arasında görülen bu farklılığın RPMI+WZB117 grubu ile 5G+WZB117, 15G+WZB117 ve 25G+WZB117 grupları arasında TAA/NA ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,05$). TAA/NA ortalamaları incelendiğinde RPMI+WZB117 grubunun ortalaması diğer tüm gruplara göre düşüktür. En yüksek ortalama 5G+WZB117 grubunda görülmektedir. Ayrıca 15G+WZB117 grubu ile 25G+WZB117 gruplarının TAA/NA ortalamaları birbirine benzerdir (Tablo 4.4.). İstatistiksel olarak ikili karşılaştırmalar sonucu bulunan diğer farklılıklar ise 5G+WZB117 grubu ile 15G+WZB117 grubu arasında olduğu ($p<0,05$), yine 5G+WZB117 ile 25G+WZB117 verilen grupları arasında olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca ikili karşılaştırmalarda 15G+WZB117 verilen grup ile 25G+WZB117 verilen grup arasında TAA/NA ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,905$) (Şekil 4.9.).

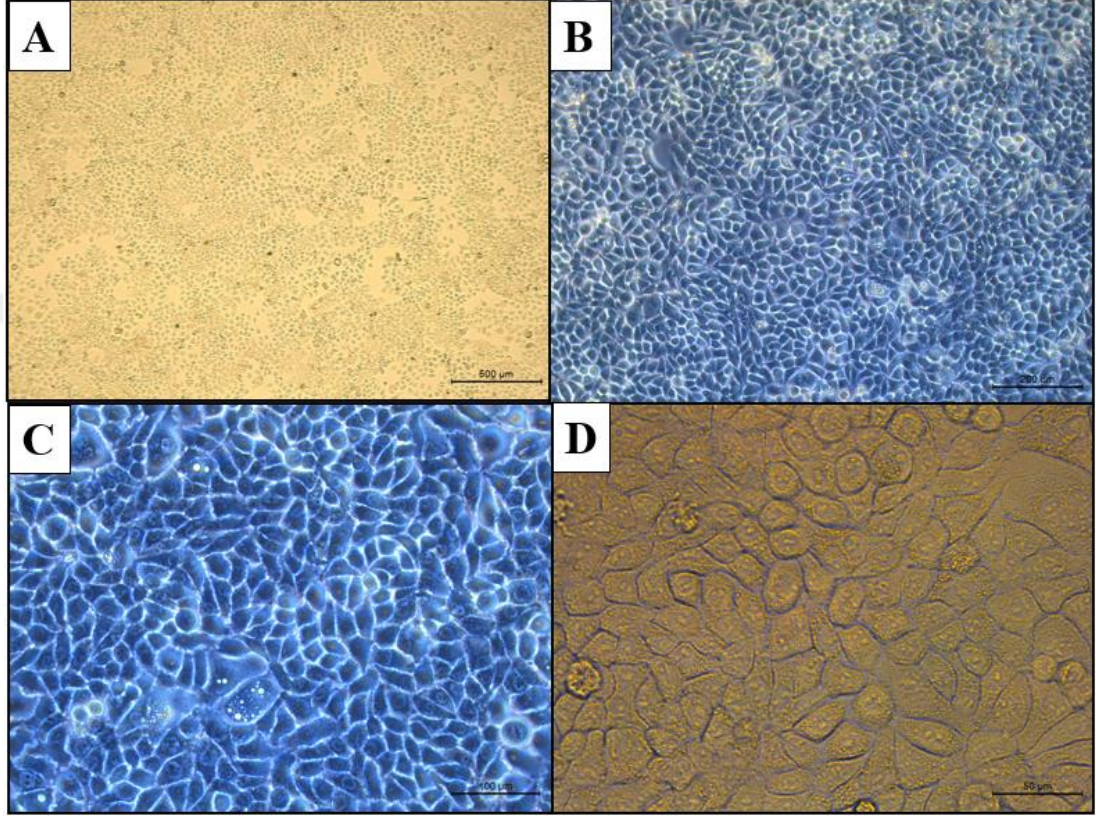


Şekil 4.9. WZB117 verilen gruplara ait TAA/NA ortalamalarına göre AgNOR analiz sonuçları. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

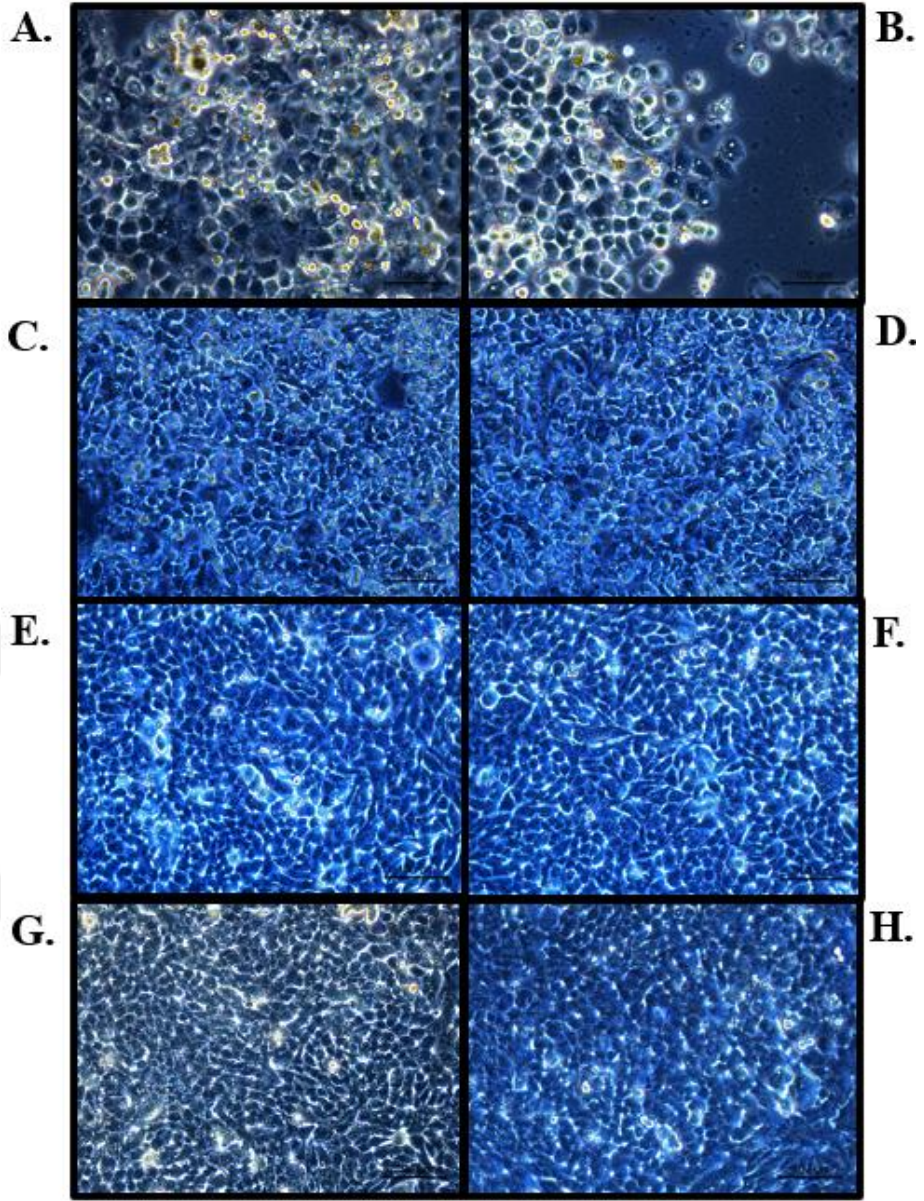
4.3. Apoptoz Analizi Bulguları

Apoptoz hücrelerin kantifikasyonu, Annexin V-FITC/7AAD Apoptoz kiti (Biolegend, San Diego, CA, USA 640922) kullanılarak akış sitometrik analizle gerçekleştirildi. MDA-MB-231 hücreleri, 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda WZB117 ile muamele edildi. Annexin V ve 7AAD boyama, üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Boyamadan sonra, apoptoz hücrelerin kantifikasyonu bir akış sitometresi (CytoFLEX Flow Sitometri- Coulter) ile ölçüldü. Canlı hücre apoptoz yüzdesi, erken apoptoz yüzdesi, geç apoptoz yüzdesi ve ölü hücre apoptoz yüzdesi değerlendirildi. Şekil (4.10.)'da WZB117 uygulaması öncesi MDA-MB-231 hücrelerinin 5x, 10x, 20x ve 40x objektif altındaki görüntüleri

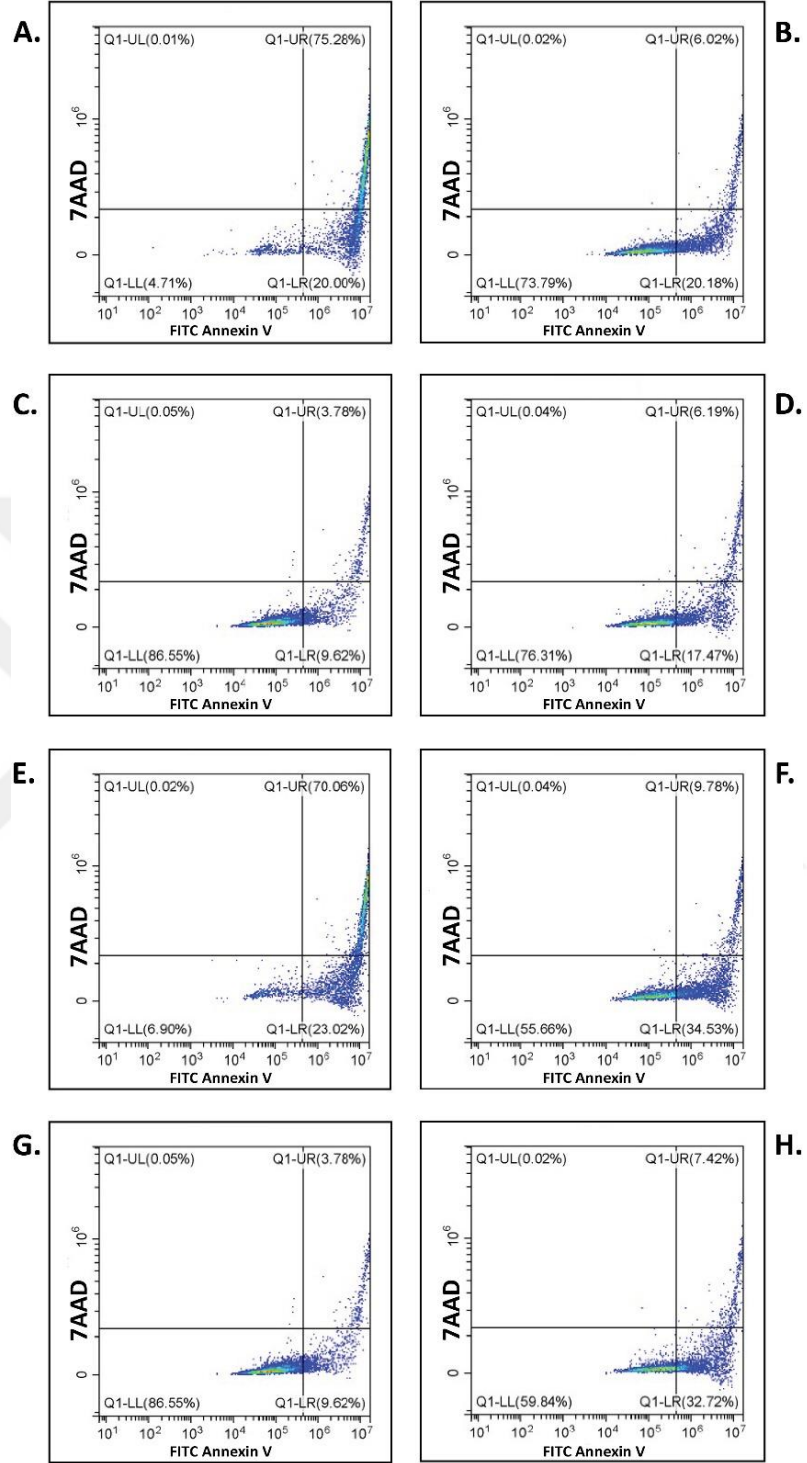
verilmiştir. Şekil (4.11.)'de, 48 saatlik glukoz ve WZB117 uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntülerine yer verilmiştir. Şekil (4.12.)'de ise CytoFLEX Flow Sitometri cihazı kullanılarak yapılan apoptoz analizinin sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücreleri invert mikroskop altındaki görünümü * A.) 4'lük objektif, B.) 10'lük objektif, C.) 20'lik objektif, D.) 40'lük objektif.



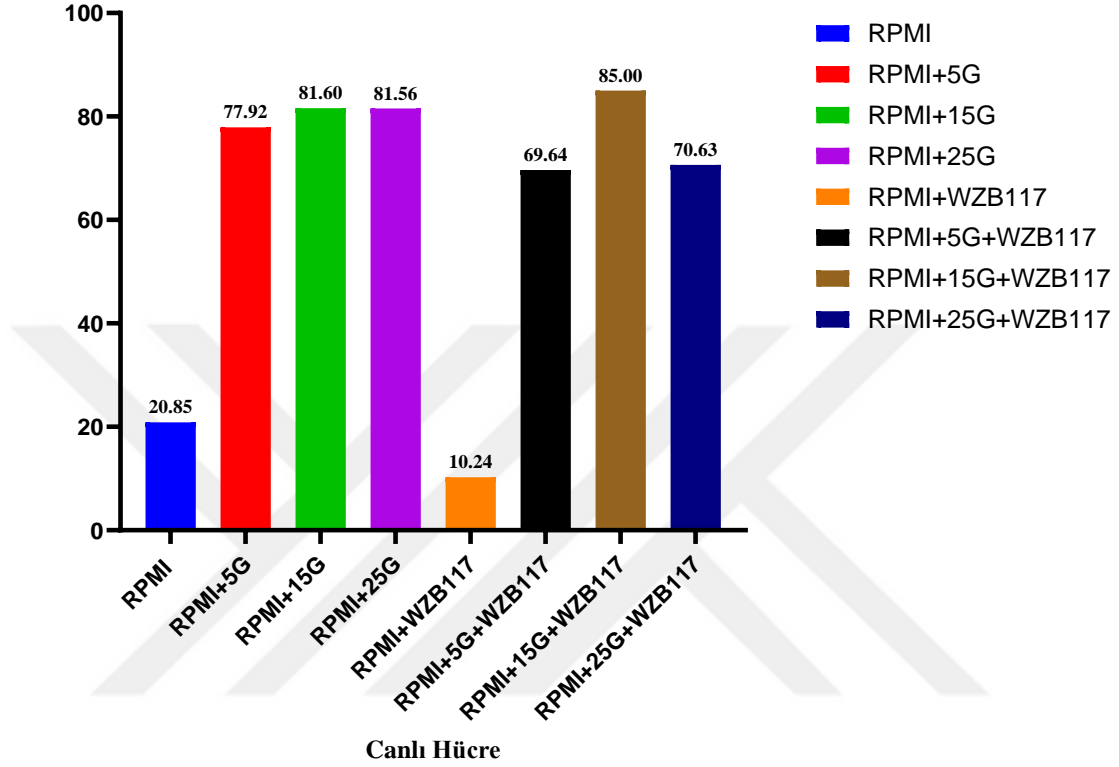
Şekil 4.11. WZB117 uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre hattının gruplara ait mikroskop altındaki görüntüsü. *A.) RPMI, B.) RPMI+5G, C.) RPMI+15G, D.) RPMI+25G, E.) RPMI+WZB117, F.) RPMI+5G+WZB117, G.) RPMI+15G+WZB117, H.) RPMI+25G+WZB117. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.



Şekil 4.12. Annexin V ve 7AAD boyama sonrası, ölü hücre, erken apoptoz yüzdesi, geç apoptoz yüzdesi, canlı hücre apoptoz yüzdesi. *A.) RPMI, B.) RPMI+5G, C.) RPMI+15G, D.) RPMI+25G, E.) RPMI+WZB117, F.) RPMI+5G+WZB117, G.) RPMI+15G+WZB117, H.) RPMI+25G+WZB117. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

4.3.1. Apoptoz Analizi ile Canlı Hücre Bulguları

Apoptoz analizi ile canlı hücelere ilişkin sonuçlar Şekil 4.13'te verilmektedir.



Şekil 4.13. 48 saatlik ölçüm sonucu canlı hücre yüzdeleri. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

Şekil 4.13.'de gruplara göre verilen canlı hücre yüzdeleri incelendiğinde en yüksek ortalama canlı hücre sayısına sahip grup %85 ile RPMI+15G+WZB117 grubunda görülmektedir (ort.±ss.=85,00±2,49). Daha sonra bu grubu takiben en yüksek canlı hücre yüzdesi RPMI+15G (ort.±ss.=81,60±6,19) ve RPMI+25G'te görülmektedir (ort.±ss.=81,56±5,34). En düşük canlı hücre sayısına sahip iki grup ise sırası ile RPMI+WZB117 (ort.±ss.=10,24±3,20) ve RPMI gruplarıdır (ort.±ss.=20,85±14,81).

Tablo 4.5. Gruplara ait canlı hücre bulguları.

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI	20,85±14,81 ^{af/ah}		<0.05
RPMI+5G	77,92±07,26 ^{be}		<0.05
RPMI+15G	81,60±06,19 ^{ce}		<0.05
RPMI+25G	81,56±05,34 ^{de}	46,34	<0.05
RPMI+WZB117	10,24±03,20 ^{eg}		<0.05
RPMI+5G+WZB117	69,64±12,12		<0.05
RPMI+15G+WZB117	85,00±02,49		<0.05
RPMI+25G+WZB117	70,63±34,13		<0.05

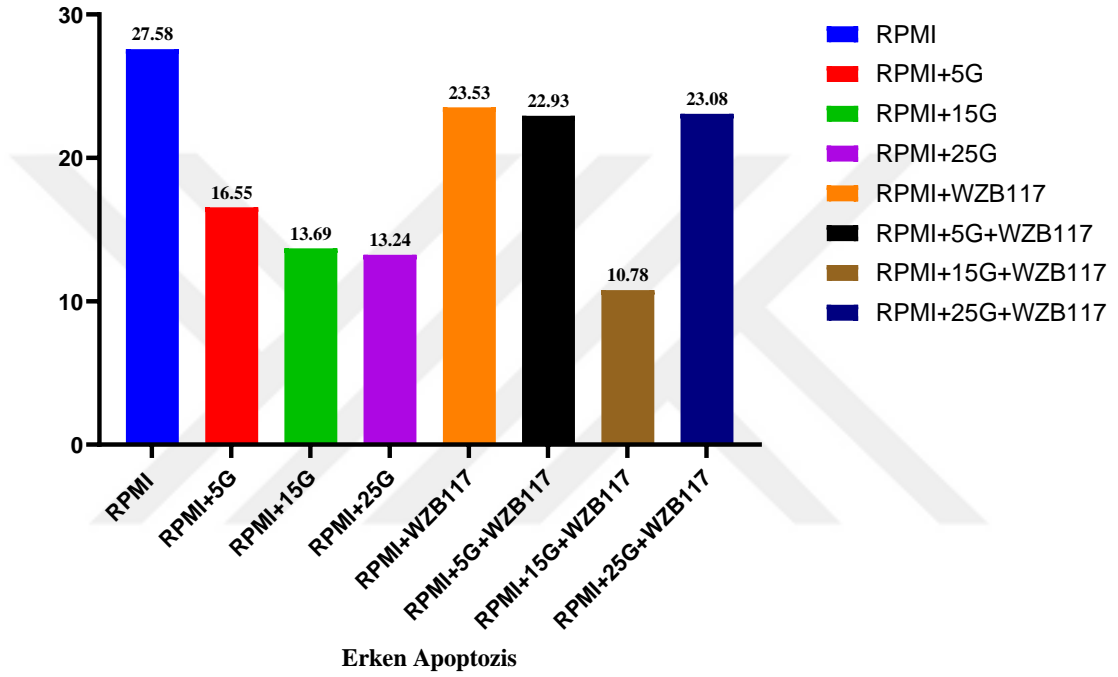
p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.5.'te yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre tüm gruplarda canlı hücre ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve kurulan model anlamlıdır (F=46,34; p<0,05). Gruplar arası karşılaştırma analizleri Tukey HSD testi ile incelenmiştir. Buna göre karşılaştırma analizleri sonuçları incelendiğinde RPMI ile RPMI+5G arasında canlı hücre ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p<0,05). Gruplar arasında görülen ikinci bir farklılık RPMI+5G ve RPMI+15G arasında görülmektedir (p<0,05) ve grupların ortalamaları incelendiğinde RPMI+15G grubunun canlı hücre ortalaması daha yüksektir. Ayrıca RPMI+15G ve RPMI+25G grupları karşılaştırıldığında canlı hücre ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir (p<0,05). Genel anlamda glukoz verilen hücrelerde verilen glukoz miktarı arttıkça canlı hücre sayısı da artış göstermektedir. Son olarak WZB117 etken maddesi verilen gruplar incelendiğinde RPMI grubu ile RPMI+5G+WZB117 ve RPMI+25G+WZB117 grupları arasında canlı hücre ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (p<0,05). Her iki grupta da canlı hücre ortalamaları RPMI grubuna göre daha yüksektir. Ayrıca RPMI+WZB117 ve RPMI+15G+WZB117 arasında canlı hücre ortalamaları

açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır. Buna göre RPMI+15G+WZB117'nin canlı hücre ortalaması RPMI+WZB117'den ve diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu söylenebilir.

4.3.2. Apoptoz Analizi ile Erken Apoptotik Hücre Bulguları

Apoptoz analizi ile erken apoptotik hücelere ilişkin sonuçlar Şekil 4.14.'de verilmektedir.



Şekil 4.14. 48 saatlik ölçüm sonucu erken apoptotik hücre yüzdeleri. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

Şekil 4.14.'de yer alan veriler ile erken apoptotik hücelere ilişkin veriler incelendiğinde ortalamaların birbirine yakın dağılım gösterdiği görülmektedir. Bununla birlikte en yüksek ortalama erken apoptoz hücre RPMI grubunda görülmektedir (ort.±ss.=27,58±08,21). Bu grubu takiben üç grubun ortalamaları birbirine çok yakındır. Bu gruplar sırası ile RPMI+WZB117 (ort.±ss.=23,58±01,10), RPMI+25G+WZB117 (ort.±ss.=23,08±09,64), ve RPMI+5G+WZB117 (ort.±ss.=22,93±10,11)'da görülmektedir. En düşük ortalama erken apoptoz hücre yüzdesi RPMI+15G+WZB117 grubunda görülmektedir (ort.±ss.=10,78±03,05). RPMI+15G (ort.±ss.=13,69±05,68) ve RPMI+5G (ort.±ss.=16,55±06,89) en düşük ortalama apoptoz hücresi yüzdesine sahip diğer gruplardır.

Tablo 4.6. Gruplara ait erken apoptoz bulguları.

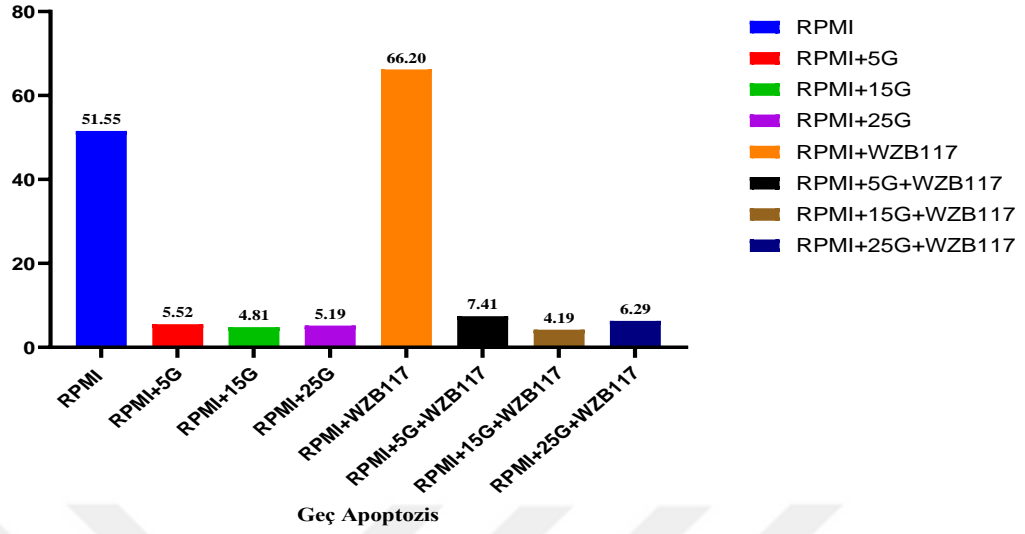
Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI	27,58±08,21		>0.05
RPMI+5G	16,55±06,89		>0.05
RPMI+15G	13,69±05,68		>0.05
RPMI+25G	13,24±04,83	2,589	>0.05
RPMI+WZB117	23,53±01,10		>0.05
RPMI+5G+WZB117	22,93±10,11		>0.05
RPMI+15G+WZB117	10,78±03,05		>0.05
RPMI+25G+WZB117	23,08±09,64		>0.05

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.6.'da yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre erken apoptotik hücre ortalamaları hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ve kurulan model anlamlı değildir ($F=2,589$; $p > 0,05$). Bununla birlikte grup ortalamalarının birbirine yakın bir dağılım göstermesi grupların birbirlerine benzer bir yüzde dağılıma sahip olmalarına ve anlamlı farklılık göstermemelerine de işaret etmektedir.

4.3.3. Apoptoz Analizi ile Geç Apoptotik Hücre Bulguları

Apoptoz analizi ile geç apoptotik hücrelere ilişkin sonuçlar Şekil 4.15.'de verilmektedir.



Şekil 4.15. 48 saatlik ölçüm sonucu geç apoptotik hücre yüzdeleri. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

Şekil 4.15.'de yer alan veriler ile geç apoptotik hücelere ilişkin veriler incelendiğinde en yüksek ortalama RPMI+WZB117'de görülmektedir (ort.±ss.=66,20±04,11). Bu grubu RPMI grubu izlemektedir (ort.±ss.=51,55±22,80) ve RPMI grubu ortalaması en yüksek ikinci gruptur. Diğer grup ortalamaları ise birbirine yakın dağılmaktadır ve birbirine benzerdir. Buna göre diğer gruplarda ortalama en düşük 04,19±0,855 ile en yüksek 07,41±02,10 arasında bir dağılım göstermektedir.

Tablo 4.7. Gruplara ait geç apoptoz bulguları.

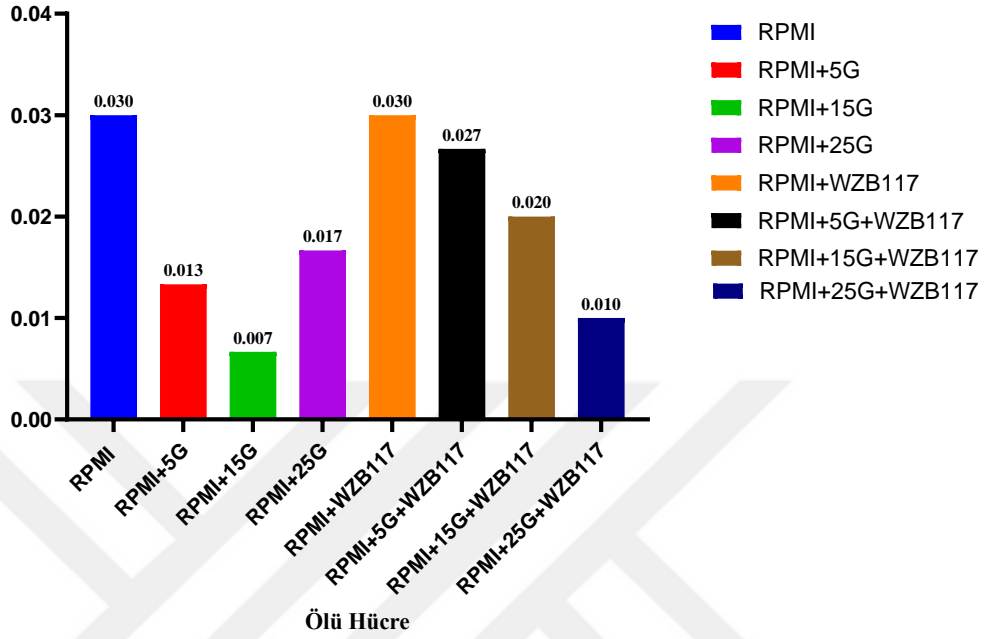
Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI	51,55±22,80		>0.05
RPMI+5G	05,52±0,477 ^{be}		<0.05
RPMI+15G	04,81±0,711 ^{ce}		<0.05
RPMI+25G	05,19±0,938 ^{de}	28,29	<0.05
RPMI+WZB117	66,20±04,11 ^{ef/eg/eh}		<0.05
RPMI+5G+WZB117	07,41±02,10		<0.05
RPMI+15G+WZB117	04,19±0,855		<0.05
RPMI+25G+WZB117	06,29±01,13		<0.05

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.7.'de yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre geç apoptotik hücre ortalamaları incelendiğinde RPMI grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve kurulan model anlamlıdır (F=28,29; p<0,05). Gruplar arasındaki farkın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için yapılan Tukey HSD testi sonuçlarına göre RPMI+WZB117 ile RPMI+5G, RPMI+15G ve RPMI+25G arasında geç apoptotik hücre yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05). Buna göre RPMI+WZB117'nin geç apoptotik hücre yüzdesi diğer tüm gruplardan daha yüksektir. Benzer şekilde RPMI+WZB117 ile RPMI+5G+WZB117, RPMI+15G+WZB117, RPMI+25G+WZB117 arasında geç apoptotik hücre yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05). Grupların ortalamaları incelendiğinde anlamlı farklılığın RPMI+WZB117 grubundan kaynaklandığı ve tüm gruplar değerlendirildiğinde RPMI+WZB117 grubunun geç apoptotik hücre yüzdesinin diğer tüm gruplardan yüksek olduğu görülmektedir.

4.3.4. Apoptoz Analizi ile Ölü Hücre Bulguları

Apoptoz analizi ile ölü hücrelere ilişkin sonuçlar Şekil 4.16.'de verilmektedir.



Şekil 4.16. 48 saatlik ölçüm sonucu ölü hücre yüzdeleri. *G: Glukoz'u ifade etmektedir.

Şekil 4.16.'de yer alan veriler ile ölü hücre yüzdelerine ilişkin veriler incelendiğinde en yüksek ortalama RPMI (ort.±ss.=0,030±0,026) ve RPMI+WZB117'de görülmektedir (ort.±ss.=0,030±0,01). Bu grupların ortalamasını RPMI+5G+WZB117 (ort.±ss.=0,027±0,01) ve RPMI+15G+WZB117 izlemektedir (ort.±ss.=0,020±0,02) ve en yüksek ölü hücre yüzdesine sahip üçüncü ve dördüncü gruplardır. Diğer grup ortalamaları ise birbirine yakın dağılmaktadır ve birbirine benzerdir. Buna göre diğer gruplarda ortalama 0,007±0,005 ile en yüksek 0,017±0,02 arasında bir dağılım göstermektedir.

Tablo 4.8. Gruplara ait ölü hücre bulguları.

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	F	p
RPMI	0,030±0,026		>0.05
RPMI+5G	0,013±0,005		>0.05
RPMI+15G	0,007±0,005		>0.05
RPMI+25G	0,017±0,02	0,846	>0.05
RPMI+WZB117	0,030±0,01		>0.05
RPMI+5G+WZB117	0,027±0,01		>0.05
RPMI+15G+WZB117	0,020±0,02		>0.05
RPMI+25G+WZB117	0,010±0,01		>0.05

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama±SS (Standart sapma) olarak ifade edilmektedir. Tukey testi sonucu farklılığın bulunduğu gruplar ortalama standart sapma değerlerinin üst bilgisinde harfler ile verilmektedir. *G: Glukoz'u ifade etmektedir. *F değeri gruplar arasındaki ortalama farkların, gruplar içindeki varyansa oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.8.'de yer alan ANOVA testi sonuçlarına göre ölü hücre ortalamaları hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ve kurulan model anlamlı değildir ($F=0,846$; $p > 0,05$). Bununla birlikte grup ortalamalarının birbirine yakın bir dağılım göstermesi grupların birbirlerine benzer bir yüzde dağılıma sahip olmalarına ve anlamlı farklılık göstermemelerine de işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Kanser hücrelerinin hızlandırılmış bir metabolizmaya, yüksek bir glukoz gereksinimine ve artmış glukoz alımına sahip olduğu bilinmektedir. Glukozun memeli hücrelerinin plazma membranı boyunca taşınması, glukoz metabolizması için ilk sınırlayıcı adımdır ve kolaylaştırıcı GLUT proteinleri tarafından aracılık edilmektedir. WZB117, glukoz alımını, hücre içi ATP seviyelerini ve glikolitik enzimleri azaltan ve daha düşük glikoliz ve hücre sel büyüme oranına yol açan bir GLUT-1 inhibitörüdür (Zhao ve ark, 2013).

Literatürde GLUT-1 inhibitörü WZB117'nin önce antidiyabetik özelliklere sahip bir bileşik olarak tanımlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar bu bileşiğin serviks, kolon ve meme kanseri hücrelerinde glukoz taşınmasını inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır. WZB117, GLUT-1'in glukoz taşıma aktivitesini inhibe ettiğinde, ATP ve laktat üretim seviyeleri ile glikolizle ilişkili enzimlerin seviyeleri de azalmış, bu da glikoliz seviyesini düşürerek tümör büyümesini engellemiştir. Ayrıca WZB117'nin fareler üzerinde gerçekleştirilen in vivo deneyler, WZB117'nin glukoz taşınmasını inhibe ederek tümör büyümesini %70 oranında engellediğini ve kalıcı hiperglisemiye yol açmadığını göstermiştir (Chen ve ark., 2021). Bu sonuçlara göre WZB117'nin hiperglisemiye önleyici aynı zamanda anti tümöral etkisinden bahsedilebilir. Ayrıca WZB117'nin GLUT-1 inhibitörü olarak glukoz taşıma aktivitesini inhibe etmesi, bu bileşiğin glikoliz üzerinde doğrudan etkili olduğunu ve bu yolla tümör büyümesini engellediğini göstermektedir.

WZB117 glukoz tüketimini azaltan kemoterapötik ilaçların etkinliğini artıran bir bileşiktir. Literatür incelendiğinde Andreas Koch ve arkadaşları 2015 yılında insan melanom hücre hatları üzerinde 10-25-50 μM WZB117 uygulaması sonrası WZB117'nin glukoz tüketiminde ve laktat sekresyonunda doza bağlı bir azalmaya yol açtığı tespit etmiştir. Ayrıca, in vitro insan melanom hücrelerinin çoğalmasını azalttığı ve hücre göçü deneyleri ile insan melanom hücrelerinin göç aktivitesini

düşürdüğü bulunmuştur (Koch ve ark., 2015). Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 10 μ M WZB117 ile tedavisi, hücrelerin kemoterapötik bir ajan olan adriamisine karşı duyarlılığını geri kazandırdığı bulunmuştur (Chen ve ark., 2017). GLUT-1 inhibitörü WZB117'nin nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y canlılığı, hücre döngüsü ve in vitro glikolizin düzenlenmesi üzerindeki etkilerini değerlendirildiği bir çalışmada 10 μ M WZB117 tedavisinin tümör hücrelerinin canlılığını azalttığını, GLUT-1 proteininin seviyesini düşürdüğünü, hücre döngüsünün G0-G1 fazında tümör hücrelerini durdurduğu ve in vitro nöroblastom hücrelerinde tümör hücresi büyümesini baskıladığı görülmüştür (Peng ve ark., 2019).

WZB117 literatürde birçok çalışmanın kombine tedavilerinde kullanılmıştır. Gefitinib'e dirençli akciğer karsinomu PC-9-R hücrelerinde, 7,5 μ M WZB117'nin 10 μ M gefitinib ile kombine tedavisi, GLUT inhibitörleri ve trozin kinaz inhibitörleri ile kombine tedavilerine ilişkin önceki çalışmalar ile tutarlı olarak, hücreleri her iki ilaçtan çok daha etkili bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Kombine tedavinin benzer etkileri in vivo olarak A549 ksenograflarda da doğrulanmıştır. Aynı kombinasyon insan fetal akciğer fibroblastları (IMR-90) üzerinde herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir, bu durum küçük hücreli dışı akciğer karsinomu için yüksek seçiciliğe işaret etmektedir (Tilekar ve ark., 2020). Yine meme kanseri hastalarından radyasyona dirençli (RR) hücreler elde edildiğinde ise GLUT-1 ekspresyonunun ve glikolitik enzimler HK2 ve laktat dehidrojenaz A' seviyelerinin mutasyona uğramış hücrelere kıyasla RR hücrelerinde daha yüksek olduğu ve RR hücrelerin daha fazla ATP ve laktat üretimine ve daha yüksek glukoz alımına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu hücrelerde WZB117 kullanıldığında GLUT-1 ekspresyonu, glikolitik enzimler ve ATP/laktat seviyeleri azaltarak hücre çoğalmasını azalttığı ve kaspaz-3 aktivitesinde artışa sebep olarak RR meme kanseri hücrelerini radyasyona karşı duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Shriwas., 2020). Bu sonuçlar WZB117'nin kanser tedavisinde radyo ve kemoterapinin tedavi etkinliğinin artırılmasındaki sinerjistik etkisini göstermektedir. Liu ve arkadaşları 2014 yılında HT-29 kolon kanseri hücresi üzerinde 5-Fu'nun GLUT-1 inhibitörüyle kombinasyonunun 5-Fu'ya dirençli kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için yapmış oldukları çalışmada 0.5 μ M 5-Fu veya 0.5 μ M WZB117'nin tek başına tedavisi önemli hücre

ölümüne neden olmamıştır. Ancak, hem 5-Fu'ya duyarlı HT-29 hücrelerinde, 5-Fu'nun 5 µM WZB117 ile kombinasyonu, her iki ajanın tek başına verilmesine kıyasla hücre canlılığını engellemede çok daha etkili olduğunu bulmuşlardır (Liu ve ark., 2014).

WZB117'nin etkin dozunun diğer ilaçlarla kombinasyon tedavilerinde değişip değişmediğini anlamak amacıyla literatürdeki doz çalışmaları incelenmiştir. Bu çalışmalardan biri, Li ve arkadaşları tarafından MK-2206 ve WZB117 kombinasyonunun incelendiği bir çalışmadır. Bu çalışmada, 60 µM WZB117 ile yapılan tedavinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine karşı sinerjik bir sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Li ve ark., 2019). Li ve arkadaşları, Liu ve arkadaşlarının A549 hücrelerinde WZB117'nin IC₅₀ dozunu 10 µM olarak belirlediği çalışmasına atıfta bulunarak (Liu ve ark., 2012), yüksek uygulama dozlarının hedef dışı etkiler konusunda endişe yarattığını ifade etmişlerdir. Bu durum, tez çalışmamızda MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde 48 saatlik IC₅₀ değerini 4,08 µM olarak bulmamızın, WZB117'nin diğer ilaçlarla birlikte kullanımında etkin dozun artabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Bu tezi destekler nitelikte, Thulasiraman ve arkadaşlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GLUT-1'in ekspresyon seviyelerini incelediği çalışmada, doksorubisinin hücre çoğalmasını engellediği görülmüştür. Ancak, 6 µM veya 10 µM WZB117 ile yapılan uygulamalar doksorubisinin kaynaklı büyüme baskılanmasını artırmamıştır. Buna karşın, sabit doksorubisin konsantrasyonu (0,5 µM) varlığında, 20 µM'den fazla WZB117 dozlarının kullanılması, doksorubisinin etkinliğini artırarak hücre büyümesini engellemede daha etkili olmuştur (Thulasiraman ve ark., 2024).

Birçok kötü huylu tümörde, AgNOR ekspresyonunun iyi bir prognostik parametre olduğu çalışmalarla belirtilmiştir (Uçar ve ark., 2023; Yılmaz ve ark., 2023; Ertekin ve ark., 2016). 94 oral skuamöz hücreli karsinom vakası üzerinde yapılan çok değişkenli sağkalım analizi, hem invaziv tümör hücrelerinin AgNOR içeriğinin, hem de tümörle ilişkili mortalite ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. (Nakamura ve ark., 2004). Proliferatif indeksi AgNOR ile değerlendirilen başka bir çalışmada invazif duktal karsinomda ortalama AgNOR sayısı ve proliferatif indeks (Çekirdek başına ≥ 5 AgNOR noktasına sahip hücrelerin yüzdesi), artan invazif duktal karsinom derecesi ile önemli ölçüde arttığı görülmüştür (Darkwah ve

ark., 2018). 2023 yılında MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yapmış olduğumuz çalışmada nar (*Punica granatum L.*) kabuğundan elde edilen ekstraktın meme kanseri hücre hattı üzerindeki in vitro etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. TAA/NA oranı ve AgNOR sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Ceyhan ve ark., 2023).

AgNOR boyaması birçok neoplazmda prognozu değerlendirmek için yararlı olabilir, çünkü daha yüksek AgNOR sayıları daha yüksek dereceli tümörler, metastazlar ve daha kısa sağkalım süreleri ile ilişkilidir (Mann ve ark., 2022). Akciğer neoplastik transformasyonunun erken tahmininde NOR ölçümünün faydasını değerlendirme amacı ile yapılan bir çalışmada yaş ve tütün içimine maruz kalma süresinin artmasıyla daha yüksek ortalama NOR sayıları olduğu gözlenmiştir (Ahmed ve ark., 2020). Bu durum kanser öncesi durumlarda erken teşhiste AgNOR yönteminin kullanılabilir önemli ve etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Yapılan başka bir çalışmada. Xeroderma Pigmentosum (Minimal güneş maruziyeti ile ilişkili nadir görülen otozomal resesif kalıtsal bir genodermatoz) olan hastalarda AgNOR'ların erken tanıda kullanılabilirliğini göstermiştir (Karagun ve Eroz., 2021).

Çekirdek başına ortalama AgNOR sayısı ve TAA/NA artışları birçok çalışmada ribozomal RNA sentezi ve dolayısıyla proliferasyon durumu hakkında, malign hastalıklar için ise tümör agresifliğini artırdığı ifade edilen terimlerdir. Bu ölçümler, patolojik incelemelerde ve kanser prognozunun belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Cucer ve ark., 2007; Guneş ve ark., 2020; Gümüşsoy ve ark., 2023).

Bu tez çalışmasında meme kanseri hücrelerinin proliferatif hızlarını değerlendirmek için AgNOR boyama yöntemi uygulanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışma sonrası hem AgNOR sayıları açısından hem de TAA/NA açısından birbirini destekleyen sonuçlar elde edildi. Bu doğrultuda en yüksek ortalama AgNOR sayısı 25 mM glukoz verilen grupta bulunurken en düşük ortalama ise glukoz içermeyen grupta bulundu. WZB117 verilen gruplarda ise AgNOR sayıları açısından en yüksek ortalamanın 5 mM glukoz ve WZB117 etken maddesi içeren grupta bulunurken en düşük ortalama AgNOR sayısı glukoz içermeyen ve WZB117 etken maddesi verilen grupta bulundu. Her iki sonuç değerlendirildiğinde ortalama AgNOR sayılarının en

düşük olduğu grubun glukoz içermeyen gruplarda olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca gruplar arası AgNOR sayısı ortalamalarına göre istatistiksel olarak bulunan farklılıkların çoğunlukla 25 mM glukoz verilen grup ile olduğu bulunmuştur. TAA/NA ortalamaları açısından da gruplar arasında görülen farklılığın glukoz verilmeyen grup ile diğer tüm gruplar arasında olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar glukoz yoksunluğunun hücre çoğalmasına olan inhibitör etkisini göstermesi açısından önemlidir.

WZB117'nin etkinliği değerlendirildiğinde TAA/NA ortalamalarına göre WZB117 maddesi verilen gruplarda RPMI+5G+WZB117 grubu ile RPMI+15G+WZB117 ve RPMI+25G+WZB117 grupları arasında TAA/NA oranı açısından anlamlı bir fark bulundu. Bu durum daha yüksek glukoz ortamlarında WZB117 maddesinin daha etkili olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Ancak aynı fark ortalama AgNOR sayıları açısından bulunmamıştır. Bu durum bize kanser hücrelerinin glukozla olan bağımlılığının WZB117 etken maddesinin etkisine göre daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

WZB117'nin kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını inhibe ederek hücrel apoptoza neden olması ile ilgili literatürde birçok çalışma vardır. Bu çalışmalardan birisi, melanom hücre hatları olan A375 ve SK-MEL-28 hücrelerinde apatinib ve WZB117 kombinasyonunun proliferasyonu doz ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiğini ve STAT3 yoluyla glikolizi inhibe ettiğini rapor etmiştir (Zhang ve ark., 2022). Başka bir çalışmada, SH-SY5Y hücrelerine 48 saat boyunca 10 ila 60 μ M WZB117 uygulanmasının doz bağımlı bir apoptoza yol açtığı bulunmuştur. Apoptozun nedeni olarak, glukoz taşınmasının inhibe edilmesiyle hücre içindeki genel besin akışının azalması ve bunun sonucunda mitokondrinin normal transmembran potansiyelini ve ATP sentezini koruyamaması gösterilmiştir. Bu durum, artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açmaktadır (Chandan ve ark., 2023). Huang ve arkadaşları gastrointestinal stromal tümörü hücre hattı (GIST-T1) üzerinde kademeli ve sürekli imatinib tedavisi ile WZB117 uygulamasının imatinib dirençli hücrelerde apoptozu indükleyerek ek inhibitör etkiler gösterdiğini bulmuştur (Huang ve ark., 2024). Yine Zhao ve arkadaşları 5 μ M WZB117 ile radyasyon kombinasyonunun meme kanseri hücreleri üzerinde sinerjik olarak inhibitör etkiler gösterdiğini göstermiştir (Zhao ve ark., 2016).

Bu çalışmada MDA-MB-231 hücre hattında apoptozu incelemek amacı ile Flow Sitometri ile yapmış olduğumuz analizler ile öncelikle canlı hücre yüzdeleri incelenmiştir. RPMI ve RPMI+WZB117 gruplarına göre glukoz içeren grupların canlı hücre yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum AgNOR analizi ile gerçekleştirdiğimiz glukoz içeren gruplarda AgNOR sayısı ve TAA/NA oranının glukoz içermeyen gruplara göre yüksek olmasının hücre çoğalmasının arttığı bulgusunu desteklemektedir. Ayrıca ölü hücre yüzdesi RPMI ve RPMI+WZB117 gruplarında fazla olması da MDA-MB-231 hücre hattını glukozsuz bırakmanın canlı hücre sayısını azalttığı ölü hücre sayısını ise artırdığını göstermektedir. Erken apoptotik hücrelere ilişkin veriler incelendiğinde ortalamaların birbirine yakın dağılım gösterdiği görülmektedir. Geç apoptotik hücrelere ilişkin veriler incelendiğinde ise RPMI ve RPMI+WZB117 gruplarının diğer gruplara göre geç apoptoz yüzdesi anlamlı bir şekilde yüksektir. Bu durum hücreleri glukozsuz bırakmanın apoptozu artırdığı göstermektedir ayrıca hücrelerin erken apoptoza göre geç apoptoza daha fazla indüklendiğini göstermektedir. RPMI ve RPMI+WZB117 gruplarının geç apoptotik hücre yüzdesi açısından değerlendirildiğinde, RPMI+WZB117 grubunun en yüksek geç apoptoz yüzdesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum WZB117'nin hücre apoptozunu artırdığını göstermektedir.

Tüm sonuçlar, kanser hücrelerinin glukozla olan yüksek bağımlılığını ortaya koymaktadır. Çalışmamız, bu bağımlılığı vurgulama açısından büyük önem taşımakta olup WZB117 ile glukoz yoksunluğunun birbirini destekleyen etkilerini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, WZB117'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında GLUT-1 inhibisyonu yoluyla hücre çoğalmasını belirgin bir şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Özellikle, glukozun hücre çoğalmasını artırıcı etkisinin WZB117 tarafından inhibe edilmesi, bu bileşiğin kanser tedavisinde potansiyel bir ajan olarak önemini vurgulamaktadır. Literatürde az sayıda çalışma ile incelenen WZB117'nin özellikle glukoz ile kombinasyonu, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, WZB117'nin kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli bir GLUT-1 inhibitörü olduğunu desteklemekte ve bu alanda yapılması planlan çalışmalar için önemli bir referans noktası oluşturabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında WZB117'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde glukoz bağımlı etkisi incelenmiştir. Bu doğrultuda aşağıdaki sonuçları elde edilmiştir.

- WZB117'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48 saatte 4,08 μ M dozda hücre çoğalmasını yarıya düşürdü ve 4.08 μ M MDA-MB-231 hücreleri üzerinde WZB117'nin IC₅₀ değeri olarak belirlendi.
- AgNOR boyama sonucu glukozun MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde hücre çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir.
- AgNOR sayısı ve TAA/NA verileri incelendiğinde glukozun olmadığı grupların kanser hücrelerinin çoğalmasını glukoz içeren gruplara göre anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir.
- TAA/NA açısından WZB117 etken maddesinin hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir. Bu durumun ortalama AgNOR sayısı açısından benzer etki göstermemiştir.
- Gerçekleştirilen Flow Sitometri kullanılarak gerçekleştirilen apoptoz analizi ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin geç apoptoza indüklendiği sonucuna ulaşılmıştır.
- Yine canlı hücre sayısının glukoz içeren gruplarda glukoz içermeyen RPMI grubuna ve RPMI+WZB117 grubuna göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür.
- Aynı durum ölü hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde ölü hücre yüzdesinin en yüksek olduğu grupların glukoz içermeyen RPMI ve RPMI+WZB117 grupları olduğu sonucuna ulaşılmıştır.
- RPMI ve RPMI+WZB117 gruplarının geç apoptotik hücre yüzdeleri açısından değerlendirildiğinde ise en yüksek geç apoptotik hücre yüzdesinin

WZB117 ile muamele edilen glukoz içermeyen RPMI+WZB117 grubunda olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde glukoz ile ilgili çalışmaların birçoğu yüksek ve düşük glukoz olarak iki incelenmiş olup gerçekleştirdiğimiz tez çalışması glukozun etkisi 4 farklı glukoz oranları içerisinde değerlendirilerek daha derinlemesine incelemiştir. WZB117 ile yapılan çalışmalar oldukça yenidir ve glukoz ile değerlendirildiği çalışma sayısı oldukça azdır. Bu doğrultuda bu çalışmanın literatür için oldukça faydalı olduğunu düşünülmektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda WZB117+glukoz kombinasyonunun AgNOR boyama ile değerlendirildiği çalışma ile karşılaşılmamıştır. Bu durum literatür için WZB117 ve glukoz ile yapılacak olan yeni çalışmalar için güzel bir kaynak olabileceğini düşünülmektedir. Ayrıca WZB117'nin sadece kanser hastalığı için değil birçok hastalık durumunun erken teşhis ve tedavisinde rol oynayabilecek önemli bir etken madde olduğu düşünülmektedir.

WZB117'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde gerçekleştirdiği GLUT-1 inhibisyonunun hücre içi mekanizmaları ile ilgili daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, GLUT-1 inhibitörlerinin, kanser tedavisinde kullanılan ve vücut için oldukça toksik olan ilaçlarla birlikte kullanımına ilişkin mevcut çalışmalar oldukça yenidir. WZB117 ile bu ilaçların birlikte kullanımının sinerjistik bir etki yaratabileceği ve bu sayede daha düşük dozlarda benzer tedavi edici etki elde edilerek hastaların daha az toksik etkiye maruz kalabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda WZB117'nin kullanılabilecek önemli bir GLUT-1 inhibitörü olabileceği düşünülmekte olup bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Adamhasan A. Şişli Eğitim Aile Sağlığı Merkezine Başvuran Kadınlarda Meme Kanseri Tarama Testlerini Yaptırma Durumlarının Değerlendirilmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Aile Hekimliği Ana Bilim Dalı, İstanbul 2023; s.: 2-3.
- Ahmed HG, El Hag AB, Binsaleh NK Elhussein, GEMO, Hussain MA, Bealy MABI. The utility of nucleolar organizer regions quantitation in early prediction of lung neoplastic transformation. *Cureus*, 2020: 12(11).
- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*, 2017: 50; 1-23.
- Barbosa AM, Martel. Targeting glucose transporters for breast cancer therapy: the effect of natural and synthetic compounds. *Cancers*, 2020: 12(1); 154.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments, *Int Immunopharmacol*, 2020: 84; 106535.
- Bazira PJ, Ellis H, Mahadevan V. Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 2022: 40(2); 79-83.
- Benn P. Chromosome staining and banding techniques. *Hum Cytogenet A Pract Approach*, 1986: 57-84.
- Bistoni G, Farhadi J. Anatomy and physiology of the breast. In: Ross F, Neil B, Sabrina C (eds), *Plastic and Reconstructive Surgery: Approaches and Techniques*. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey 2015: p.: 477-485.
- Bolat A. Foxo3a İfadesi Arttırılan MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Yağ Asit Metabolizması ile İlişkili Mikrona Profillerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Kültür Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul 2023; s.: 8-9.
- Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2024: 74(3); 229-263.
- Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020: 17(7); 395-417.
- Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaíba MM, Begnami MD, Vilela RS, Paiva GR, Andrade RG, Soares FA. GLUT-1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*, 2011: 66(6); 965-972.

- Ceyhan RN, Nisari M, Nisari M, Uçar S, Koca FM, Kerek G, Ozcanlı T, Inanç N. The detection of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel apoptotic effects using AgNOR staining in MDA-MB-231. *Toxicol Res*, 2024;13(1); tfae015.
- Chandan G, Ganguly U, Pal S, Soumya P, Sukhpal S, Reena VS, Sankha SC, Adesh KS, Sasanka C. GLUT inhibitor WZB117 induces cytotoxicity with increased production of amyloid-beta peptide in SH-SY5Y cells prevented by beta-hydroxybutyrate: implications in Alzheimer's disease. *Pharm Rep*, 2023; 75(2); 482-489.
- Chen Q, Meng YQ, Xu XF, Gu J. Blockade of GLUT1 by WZB117 resensitizes breast cancer cells to adriamycin. *Anticancer Drugs*, 2017; 28(8); 880-887.
- Chen X, Zhao Y, Gao Y, Qi Y, Du J. GLUT1: a promising drug target for cancer treatment. *Anti-Cancer Drugs*, 2021; 32(4); 345-364.
- Clarke MA, Fisher J. Executable cancer models: successes and challenges. *Nat Rev Cancer*, 2020; 20(6); 343-354.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326(1); 1-16.
- Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, Demirtas H, Sarac F, Tatlısen A, Öztürk F. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. *Micron*, 2007; 38(6); 674-679.
- Cunha A, Silva PM, Sarmiento B, Queirós O. Targeting glucose metabolism in cancer cells as an approach to overcoming drug resistance. *Pharmaceutics*. 2023; 15(11); 2610-2619.
- Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *J Cancer*, 2017; 8(16); 3131.
- Darkwah WK, Aidoo G, Ao Y, Danquah, KO, Adjei E, Adankwah E, Kadri A. Assessment of proliferative index in different grades of breast cancers using AgNOR (Agyrophilic Nuclear Organizer Region) expression. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2018; 7(4); 587-592.
- De A, Roychowdhury P, Bhuyan NR, Ko Y, Singh SK, Dua K, Kuppusamy G. Folic Acid Functionalized Diallyl Trisulfide-Solid Lipid Nanoparticles for Targeting Triple Negative Breast Cancer. *Molecules*, 2023; 28(3); 1393.
- De A, Wadhvani A, Sauraj, Roychowdhury P, Kang JH, Ko YT, Kuppusamy G. WZB117 decorated metformin-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting breast cancer metabolism. *Polymers*. 2023; 15(4); 976-983.
- Derenzini M. The AgNORs. *Micron*, 2000; 31(2); 117-120.
- Doggett DL, Strehler BL, Makinodan T. Age-related RNA polymerase I activity in isolated nuclei of PHA stimulated human lymphocytes. *Mech Ageing Dev*, 1986; 36(1); 25-39.
- Erel S, Atahan MK. Memenin anatomisi, fizyolojisi ve değerlendirilmesi. Kitap: Akça T, Çakmak Karadeniz G, Emre AU (yazarlar), Genel Cerrahi. Akademisyen Kitapevi, Ankara 2019; Bölüm 35.
- Ertekin T, Bozkurt O, Eroz R, Nisari M, Bircan D, Nisari M, Unur E. May argyrophilic nucleolar organizing region-associated protein synthesis be used for selecting the most reliable dose of drugs such as rhamnetin in cancer treatments? *Bratis Med J*, 2016; 117(11).
- Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, Olayide I, Emuowhochere R. Biology of glucose metabolism in cancer cells. *J Oncol Sci*, 2017; 3(2); 45-51.

- Geng H, Chen L, Lv S, Li M, Huang X, Li M, Liu C, Liu C et. Photochemically Controlled Release of the Glucose Transporter 1 Inhibitor for Glucose Deprivation Responses and Cancer Suppression Research. *J Proteome Res*, 2024; 23(2); 653-662.
- Gonzalez-Menendez P, Hevia D, Alonso-Arias R, Alvarez-Artime A, Rodriguez-Garcia A, Kinet S, Gonzalez-Pola I, Taylor N, Mayo JC, Sainz RM. GLUT-1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress. *Redox Biol*, 2018; 17; 112-127.
- Graham NA, Tahmasian M, Kohli B, Komisopoulou E, Zhu M, Vivanco I, Teitell MA, Wu H, Ribas A, Lo RS, Mellinshoff IK, Mischel PS, Graeber TG. Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death. *Mol Syst Biol*, 2012; 8(1); 589-595.
- Gunes H, Saritas A, Eroz R, Colakoglu S. Use of argyrophilic nucleolar-organizer region-associated protein synthesis in skeletal muscle cells for prediction of chronic carbon monoxide exposure. *Toxin Reviews*, 2020; 39(4); 349-354.
- Gümüşsoy HR, Nisari M, Nisari M, Uçar S, Koca FM, Inanc N. MDA-MB-231 human breast cancer cell line treated with Ginseng (*Panax quinquefolius*): evaluation by Annexin V and AgNOR Staining. *Med Rec*, 2023; 5(2); 355-360.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell Press*, 2011; 144(5); 646-674.
- Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 2011; 13; 1-7.
- Huang H, Kung F-L, Huang Y-W, Hsu C-C, Guh J-H, Hsu L-C. Sensitization of cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis by canagliflozin. *Biochem Pharmacol*, 2024; 223; 116140.
- International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. Erişim: [<https://gco.iarc.fr/en>], Erişim Tarihi: 21 Ağustos 2024.
- Jesinger RA. Breast anatomy for the interventionalist. *ech. Vasc. Interv. Radiol*, 2014; 17(1); 3-9.
- Kabel AM, Baali FH. Breast cancer: insights into risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. *J Cancer Res Treat*, 2015; 3(2); 28-33.
- Kang SS, Chun YK, Hur MH, Lee HK, Kim YJ, Hong SR, Lee JH, Lee SG, Park YK. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT-1) expression in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 2002; 93(10); 1123-1128.
- Karagun E, Eroz R. Argyrophilic nucleolar organizing regions in patients Fwith Xeroderma Pigmentosum Group E. *Exp Dermatol*, 2021; 30(3):41-49
- Kashyap D., Pal D., Sharma R., Garg VK, Goel N., Koundal D., Belay A [Retracted] Global increase in breast cancer incidence: risk factors and preventive measures. *Biomed Res Int*, 2022; 2022(1); 9605439.
- Khan KH, Yap TA, Yan L, Cunningham D. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin J Cancer*, 2013; 32(5); 253-259.
- Koch A, Lang SA, Wild PJ, Gantner S, Mahhli A, Spanier G, Hellerbrand C. Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. *Oncotarget*, 2015; 6(32); 32748.
- Lebelo MT., Joubert AM. Visagie MH. Warburg effect and its role in tumourigenesis. *Arch Pharm Res*. 2019; 42(10); 833-847.

- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008; 27(48); 6194-6206.
- Li YL, Weng HC, Hsu JL, Lin SW, Guh JH, Hsu LC. The combination of MK-2206 and WZB117 exerts a synergistic cytotoxic effect against breast cancer cells. *Front Pharmacol*. 2019; 10; 1311-1319.
- Lindner LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem*, 1993; 41(3); 439-445.
- Littleflower AB, Antony GR, Parambil ST, Subhadradevi L. Metabolic phenotype intricacies on altered glucose metabolism of breast cancer cells upon glut-1 inhibition and mimic hypoxia in vitro. *Appl Biochem Biotechnol*, 2023; 195(10); 5838-5854.
- Liu W, Fang Y, Wang X-T, Liu J, Dan X, Sun LL. Overcoming 5-Fu resistance of colon cells through inhibition of Glut1 by the specific inhibitor WZB117. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15(17); 7037-7041.
- Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, Colvin R, Ding J, Tong L, Wu S, Hines J, Chen X. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 2012; 11(8); 1672-1682.
- Liu Y, Wang R, Zhang L, Li J, Lou K, Shi B. The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett*, 2017; 13(6); 4685-4690.
- Liu Y, Zhang W, Cao Y, Liu Y, Bergmeier S, Chen X. Small compound inhibitors of basal glucose transport inhibit cell proliferation and induce apoptosis in cancer cells via glucose-deprivation-like mechanisms. *Cancer Lett*, 2010; 298(2); 176-185.
- Łukaszewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast cancer epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies an updated review. *Cancers*. 2021; 13(17); 4287-4295.
- Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*, 2005; 202(3); 654-662.
- Mann TR, Engelmann AM, Mello CB, de Andrade CM. Adapted technique for demonstrating argyrophilic nucleolar organizer regions in the cytologic samples of canine mast cell tumors. *Willey*, 2022; 0275-6382.
- Meng X, Lu Z, Lv Q, Jiang Y, Zhang L, Wang Z. Tumor metabolism destruction via metformin-based glycolysis inhibition and glucose oxidase-mediated glucose deprivation for enhanced cancer therapy. *Acta Biomater*, 2022; 145; 222-234.
- Mohanty G, Padhy AK. Diagnostic and prognostic importance of AgNOR pleomorphism in cervical carcinoma. *Indian J Gynecol Onco*, 2020; 18; 1-4.
- Moore KL, Dalley AF, Agur A. Moore temel klinik anatomisi. 6. cilt. Ankara Nobel Tıp Kitapevi, Ankara 2020; s.: 192-194.
- Nakamura M, Sano K, Kitagawa Y, Ogasawara T, Nishizawa S, Yonekura Y. Diagnostic significance of FDG-PET and argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2004; 40(2); 190-198.

- Oh S, Kim H, Nam K, Shin I. Silencing of GLUT-1 induces chemoresistance via modulation of Akt/GSK-3 β / β -catenin/survivin signaling pathway in breast cancer cells. *Arch. Biochem Biophys*, 2017: 636; 110-122.
- Okcu O, Sen B, Ozturk C, Guvendi GF, Bedir R. GLUT-1 expression in breast cancer. *Turk J Pathol*, 2022: 38(2);114-119.
- Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol*, 2011: 54(1); 91-95.
- Pastò A, Bellio C, Pilotto G, Ciminale V, Silic-Benussi M, Guzzo G, Rasola A, Frasson C, Nardo G, Zulato E, Nicoletto MO, Manicone M, Indraccolo S, Amadori A. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget*, 2014: 5(12); 4305-4319.
- Peng Y, Xing S-n, Tang H-y, Chang D-w, Fa-P Y, Ge-L L, Xiang-M W. Influence of glucose transporter 1 activity inhibition on neuroblastoma in vitro. *Gene*, 2019: 689; 11-17.
- Reckzeh ES, Waldmann H. Development of glucose transporter (GLUT) inhibitors. *Eur J Org Chem*, 2020: 2020(16); 2321-2329.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 2000: 157(5); 1415-1430.
- Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma K. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*, 2010: 1(2); 109-126.
- Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 2006: 18(6); 598-608.
- Shriwas P. Characterization of a Novel Glucose Transporter Protein Inhibitor as an Anticancer Agent, PhD Thesis, The College of Arts and Sciences of Ohio University, Athens 2020; s.: 95-100.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 2019: 69(1); 7-34.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*, 2000: 31(2); 121-126.
- Sun SX, Bostancı Z, Kass RB, Mancino AT, Rosenbloom AL, Klimberg VS, Bland KI. Breast physiology: normal and abnormal development and function. In: EM Copeland, Klimberg VS, Gradishar WJ (eds), *The Breast*. 5th ed. Elsevier; 2018. p.: 37-56.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Zhu HP. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*, 2017: 13(11); 1387-1395.
- Thulasiraman P, Foret M, Pandit R, McAlister K. Curcumin Inhibits the PPAR δ -p-Akt-GLUT1 Pathway and Ameliorates the Antiproliferative Effects of Doxorubicin in MDA-MB-231 Cells *APJCP*, 2024: 25(3); 1035-1042.
- Tilekar K, Upadhyay N, Iancu CV, Pokrovsky V, Choe J-y, Ramaa C. Power of two: combination of therapeutic approaches involving glucose transporter (GLUT) inhibitors to combat cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020: 1874(2); 188457.
- Tortora G. Mechanisms of resistance to HER2 target therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2011: 2011(43); 95-98.
- Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron*, 2000: 31(2); 127-131.

- Uçar S, Ulger H, Al Ö, Nisari M, Karatoprak GŞ, Tan FC. Assessment of in vivo and in vitro anti-tumoral effects of Lycium Barbarum extract on ehrlich ascites tumor cells: histopathology, DNA damage and AgNOR. 2023.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Exp Clin Cancer Res*, 2011; 30; 1-14.
- Wu Q, Ba-Alawi W, Deblois G, Cruickshank J, Duan S, Lima-Fernandes E, Haight J, Tonekaboni SAM, Fortier AM, Kuasne H, McKee TD, Mahmoud H, Kushida M, Cameron S, Dogan-Artun N, Chen W, Nie Y, Zhang LX, Vellanki RN, Zhou S, Prinos P, Wouters BG, Dirks PB, Done SJ, Park M, Cescon DW, Haibe-Kains B, Lupien M, Arrowsmith CH. GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer. *Nat Commun*, 2020; 11(1); 4205-4211.
- Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, Marston H, Turnbull A, Langdon SP. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget*, 2015; 6(28); 25677-25682.
- Yakisich JS, Azad N, Kaushik V, Iyer AKV. The biguanides metformin and buformin in combination with 2-deoxy-glucose or WZB117 inhibit the viability of highly resistant human lung cancer cells. *Stem Cells Int*, 2019; 1-11.
- Yılmaz S, Doğanığiğit Z, Oflamaz AO, Ateş Ş, Söylemez ESA, Nisari M, Farooqi AA. Determination of Rutin's antitumoral effect on EAC solid tumor by AgNOR count and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Med Oncol*, 2023; 40(5); 131-139.
- Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S-c. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*, 2020; 22; 1-13.
- Yu M, Yongzhi H, Chen S, Luo X, Lin Y, Zhou Y, Jin H, Hou B, Deng Y, Tu L, Xian Z. The prognostic value of GLUT1 in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2017; 8(26); 43356.
- Zambrano A, Molt M, Uribe E, Salas M. Glut 1 in cancer cells and the inhibitory action of resveratrol as a potential therapeutic strategy. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(13); 3374-3385.
- Zhang RS, Li ZK, Liu J, Deng YT, Jiang Y. WZB117 enhanced the anti-tumor effect of apatinib against melanoma via blocking STAT3/PKM2 axis. *Front Pharmacol*, 2022; 13; 976117.
- Zhao F, Ming J, Zhou Y, Fan L. Inhibition of GLUT-1 by WZB117 sensitizes radioresistant breast cancer cells to irradiation. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016; 77(5); 963-972.
- Zhao J, Sun H, Wang C, Shang D. Breast cancer therapy: from the perspective of glucose metabolism and glycosylation. *Mol Biol Rep*, 2024; 51(1); 546.
- Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis*, 2013; 4(3); 532-532.

GLUT-1 İNHİBİTÖRÜ WZB117'İNİN MDA-MB 231 İNSAN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **14**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **8**

YAYINLAR

% **6**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

% **2**

2

Submitted to Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

% **1**

3

Zekiye Akdağ. "3 boyutlu biyo-basım ile gelma tabanlı hibrit doku iskelesi üretimi ve karakterizasyonu", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2024

Yayın

% **1**

4

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

% **1**

5

Gürkebabçı, İpek. "Farklı Bölgelere ait Pistacia Vera' Ların Etkinliğinin Meme Kanseri Hücre Hattında Oksidatif Stres ve Proliferasyona Etkisinin İncelenmesi", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024

Yayın

% **1**

6

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<% **1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatih Mehmet KOCA
Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

Derece, Kurum, Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı: 2024
Lisans : Ahi Evran Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu: 2018

İş Deneyimleri

Yıl, Kurum, Görev

2019 : Örs Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi, Fizyoterapist
2021 : Simay-Naz Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi, Fizyoterapist
2022-Halen : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, YÖKDİL: 81,25, YDS: 70

YAYINLAR

1. Ceyhan RN, Nisari M, Nisari M, et al. The detection of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel apoptotic effects using AgNOR staining in MDA-MB-231. *Toxicol Res.* 2024;13(1); tfae015.
2. Gümüşsoy HR, Nisari M, Nisari M, Uçar S, Koca FM, Inanc N. MDA-MB-231 human breast cancer cell line treated with Ginseng (*Panax quinquefolius*): evaluation by Annexin V and AgNOR Staining. *Med Rec*, 2023: 5(2); 355-60.
3. Sarımermer Yücel Z, Ülger M, Polat S, Yay A, Yetkin MF, A Ö, Uçar S, Koca FM, Meker M, Kara S, Unur E, Ekıncı N. The effect of *lavandula stoechas* essential oil on nerve regeneration in rats with sciatic nerve injury. *J Cell Neurosci Oxid Stress*, 2023: 15; 50.

SERTİFİKALAR

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Deney Hayvanları Kullanımına Dair Teorik ve Pratik Bilgiler, Kayseri, 27/01/23- 08/02/2023 (Uluslararası)
2. Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu, Genom ve Kök Hücre Merkezi, 18-19/04/2024

BİLDİRİLER

1. Koca FM, Nisari M, Bitgen N, Al Ö, Uçar S, Taştan M, Alptekin M. GLUT-1 inhibitörü WZB117'nin MDA-MB 231 insan meme kanseri üzerine etkisi. 6. Uluslararası Kapadokya Bilimsel Araştırmalar Kongresi, Nevşehir 10-12 Ağustos 2024; s.: 4-5.