

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLOROFİLİNİN MEME KANSERİ KAYNAKLI METASTAZ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dyt. Ayşe BURUŞ**

**Biyokimya Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2022**

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLOROFİLİNİN MEME KANSERİ KAYNAKLI METASTAZ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dyt. Ayşe BURUŞ**

**Biyokimya Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT**

**ANKARA**

**2022**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KLOROFİLİNİN MEME KANSERİ KAYNAKLI METASTAZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Ayşe Buruş**

**Danışman: Prof. Dr. Yasemin Bayazıt**

Bu tez çalışması 3.08.2022 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

*Prof. Dr. Z. Günnur DİKMEN*

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.*

**Üye:**

*Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT*

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D*

**Üye:**

*Prof. Dr. İncilay LAY*

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.*

**Üye:**

*Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER*

*Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.*

**Üye:**

*Dr. Başak ÇELTİKÇİ*

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

**Enstitü Müdürü**

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

28.07.2022

Ayşe BURUŞ

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurul tarafından** karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**Ayşe BURUŞ**

## TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki lisansüstü eğitimim süresince yol göstericim ve rol modelim olan, öğrencisi olduğum için onur ve şükran duyduğum çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT'a bana sunduğu tüm imkanlar, paylaştığı bilgi birikimi ve deneyimler adına, ve yine cesaretlendiren, motive eden, ilham veren tüm maddi ve manevi destekleri adına, gönülden sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yine eğitimim süresince engin araştırma tecrübesi ve bilgi birikiminden yararlanma fırsatı bulduğum, güleryüzüyle bana çalışma azmi aşılayan ve yol gösteren çok sevgili Dr. Başak ÇELTİKÇİ hocama tüm katkı ve destekleri için yüreктen minnettirim ve kendisine teşekkürü bir borç bilirim.

Hem asistanlığım hem de eğitimim süresince, başta Prof. Dr. Z. Günnur DİKMEN ve Prof. Dr. İncilay LAY hocam olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma süreçteki değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. Yine tüm destekleri ve katkıları için asistan arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Çalışmamın histoloji ayağında sağladığı değerli bilgi ve katkıları için sayın Prof. Dr. N. Dilara ZEYBEK hocama teşekkür ederim. Yine çalışmamın onkoloji ayağında değerli bilgi ve tecrübelerini tüm güleryüzlülüğü ve özverisi ile paylaşan saygıdeğer Doç. Dr. Hande CANPINAR hocama teşekkür ederim. Tüm çalışmam boyunca hem teorik hem de pratik bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, öğrenme sürecimde çok büyük katkıları olan Dr. Mehmet ÖZCAN'a çok teşekkür ederim.

En çok da, hastalığımda sağlığımda her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili anneciğim Emine BURUŞ'a ve gün geçtikçe kendisine benzediğim sevgili babam ve hocam, emekli edebiyat öğretmeni Ahmet BURUŞ'a maddi ve manevi tüm destekleri için müteşekkirim.

Son olarak, karantina dönemi de dahil olmak üzere tüm bu süreç boyunca serotonin düzeylerimi yükselten sevgili kedim Morfin'e teşekkür ederim.

## ÖZET

**Buruş, A. Klorofilinin Meme Kanseri Kaynaklı Metastaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022.** Kemoterapik ajanlara karşı ilaç direnci gelişmesi, meme kanseri tedavisinde başarıyı düşüren ana nedenlerden birisidir. Çeşitli kanser hücre hatlarında, Glutasyon S-transferaz enzim ailesine ait Glutasyon S-transferaz P1'in ekspresyon düzeylerinin arttığı ve kemoterapiye karşı ilaç direnci gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir. Antioksidan klorofilinin, GSTP1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu bilinmektedir. Meme kanseri tedavisinde başarıyı düşüren ve mortaliteye sebep olan diğer ana etmen, özellikle üçlü negatif meme kanserlerinde uzak doku metastazı görülmesidir. Bu çalışmada, antioksidan ve GSTP1 inhibitörü olan klorofilinin, üçlü negatif meme kanseri metastazı üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, 4T1 meme kanseri hücre hattında ve oluşturulan meme kanseri hayvan modelinde, kanser ilacı olan dosetaksel ve/veya klorofilinin etkinliği *in vivo/in vitro* olarak araştırıldı. Bunun için, klorofilinin ve dosetakselin hem tekli olarak hem de kombine uygulanmasının 4T1 hücre hattında hücre canlılığı, hücre döngüsü ve hücre migrasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Hücre ve doku lizatlarında MMP-9 ekspresyonu, total jelatinaz aktivitesi araştırıldı. Karaciğer doku lizatlarında total GST aktivitesi ve glutasyon düzeyleri araştırıldı. Karaciğer doku kesitlerinde mikrometastazlar araştırıldı. Sonuç olarak; klorofilin ve dosetakselin birlikte uygulanmasının migrasyonu *in vitro* olarak önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edildi ( $p<0,01$ ). Klorofilinin tekli uygulanmasının dokularda MMP-9 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, dosetaksel ile birlikte uygulandığında bu etkinin daha yüksek düzeylerde olduğu gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Kombine tedavi uygulanan grupta, *in vivo* analiz edilen toplam jelatinaz aktivitesinde de anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p<0,01$ ). Klorofilin bileşiği uygulanan grupta *in vivo* olarak total glutasyon (GSH) düzeylerinin arttığı, Glutasyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesinin azaldığı tespit edildi ( $p<0,05$ ). Kombine tedavi uygulanan grupta karaciğer dokularındaki mikrometastatik lezyonların azaldığı bulundu. Çalışmanın sonucunda, klorofilin ve dosetakselin birlikte uygulanmasının metastazdaki ana süreçlerden olan migrasyon ve jelatinaz enzim ekspresyonu/aktivitesi ile karakterize olan invazyon basamağını inhibe ettiği, dolayısıyla metastatik süreçlerin kontrolünde potansiyel bir role sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Metastaz, Meme Kanseri, Klorofilin, Glutasyon S-transferaz, 4T1 hücre hattı

Destekleyen Kuruluşlar: H.Ü. B.A.P. Proje No: THD-2021-19458

**ABSTRACT**

**Buruş, A. Investigation of the Effects of Chlorophyllin on Breast Cancer-Induced Metastasis, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Programme Master Thesis, Ankara 2022.** The development of drug resistance against chemotherapeutic agents is one of the main reasons for reducing the success of breast cancer treatment. It has been reported that the expression levels of Glutathione S-transferase P1, which belongs to the Glutathione S-transferase family of enzymes, increase in various cancer cell lines, and play a role in the development of drug resistance against chemotherapy. The antioxidant chlorophyllin is known to have an inhibitory effect on GSTP1. The other main factor that reduces the success of breast cancer treatment and leads mortality is distant tissue metastasis, especially in triple negative breast cancers. In this study, it is aimed to investigate the effect of chlorophyllin, an antioxidant and GSTP1 inhibitor, on triple negative breast cancer metastasis. For this purpose, the effect of the cancer drug docetaxel and/or chlorophyllin was investigated *in vivo/in vitro* in 4T1 breast cancer cell line and breast cancer animal model. For this purpose, the effects of both single and combined administration of chlorophyllin and docetaxel on cell viability, cell cycle and cell migration in 4T1 cell line were investigated. MMP-9 expression and total gelatinase activity were investigated in cell and tissue lysates. Total GST activity and glutathione levels were investigated in liver tissue lysates. Micrometastases were investigated in liver tissue sections. As a result, it was determined that the co-administration of chlorophyllin and docetaxel significantly inhibited cell migration *in vitro* ( $p<0.01$ ). It was observed that the single application of chlorophyllin significantly reduced the expression of MMP-9 in the tissues, and this effect was observed at higher levels when applied together with docetaxel ( $p<0.05$ ). In the combined treatment group, a significant decrease was observed in the total gelatinase activity *in vivo* ( $p<0.01$ ). It was determined that *in vivo* total glutathione (GSH) levels increased, and Glutathione S-transferase (GST) enzyme activity decreased in the chlorophyllin group ( $p<0.05$ ). It was found that the micrometastatic lesions in the liver tissues were reduced in the combined treatment group. As a result of the study, it was concluded that the co-administration of chlorophyllin and docetaxel inhibited the migration step, which is one of the main processes in metastasis, and the invasion step, which is characterized by gelatinase enzyme expression/activity, and therefore may have a potential role in the control of metastatic processes.

**Keywords:** Antioxidant, Metastasis, Breast Cancer, Chlorophyllin, Glutathione S-transferase, 4T1 cell line

Supporting Organizations: H.U. Scientific Research and Projects Coordination Unit,

Project No: THD-2021-19458



**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Meme Kanseri Alt tipleri	3
2.1.2. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	4
2.1.3. Meme Kanseri Tedavisinde Başarıyı Düşüren Faktörler	5
2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimleri	5
2.3. Klorofilin	7
2.4. Metastaz	8
2.5. Matriks Metalloproteaz Enzimleri	10
2.5.1. Matriks Metalloproteazların Genel Yapısı	11
2.5.2. Matriks Metalloproteazların Regüle Edilmesi	12
2.6. Metastazda Matriks Metalloproteazlar	13
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>15</b>
3.1. Gereçler	15
3.2. Yöntemler	16
3.3. Hücre Kültüründeki Çalışmalar	17
3.3.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	17
3.3.2. Akım Sitometrisi ile Hücre Döngüsünün Belirlenmesi	18
3.3.3. Yara İyileşme Deneyi ile Hücre Göçünün Ölçülmesi	19
3.4. Deney Hayvanları Çalışmaları	19

3.4.1. Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması	20
3.4.2. Deneysel Hayvanlarının Takibi ve Sakrifikasyon Uygulamaları	20
3.5. Hücre Lizatları ve Karaciğer Dokularındaki Analizler	21
3.5.1. Western Blot ile MMP-9 (Jelatinaz) Ekspresyonunun Belirlenmesi	21
3.5.1.1. Hücre ve Doku Lizisi	22
3.5.1.2. Protein Tayini	22
3.5.1.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	23
3.5.1.4. Proteinlerin Membrana Transferi	23
3.5.1.5. Bloklama, Antikorların Bağlanması ve Görüntüleme	24
3.5.2. MMP-2/MMP-9 (Jelatinaz) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	24
3.5.3. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	25
3.5.4. Glutasyon Düzeylerinin Ölçülmesi	26
3.6. Histokimya Yönteminin Uygulanması	27
3.6.1. Frozen Kesit ve Hematoksilen&Eozin Boyama	27
3.6.2. Kesitlerin Görüntülenmesi ve Histokimyasal Değerlendirmeler	28
3.7. İstatistiksel Analizler	28
<b>4. BULGULAR</b>	29
4.1. Hücre Kültüründeki Çalışmalar	29
4.1.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Analizi	29
4.1.2. Akım Sitometri ile Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi	30
4.1.3. Yara İyileşme Deneyi ile Hücre Göçünün Değerlendirilmesi	31
4.2. Karaciğer Dokuları ve Hücre Lizatlarındaki Analizler	33
4.2.1. Western Blot ile MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	33
4.2.2. MMP-2/MMP-9 (Jelatinaz) Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	34
4.2.3. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi	35
4.2.4. Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	36
4.3. Histokimya ile Karaciğer Metastazının Değerlendirilmesi	37
<b>5. TARTIŞMA</b>	39
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	44
<b>7. KAYNAKLAR</b>	46
<b>8. EKLER</b>	53
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	56

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>BCA</b>	Bikinkoninik asit yöntemi
<b>BSA</b>	Sığır serum albümini
<b>CDNB</b>	1-kloro-2,4- dinitrobenzen
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoksit
<b>Dos</b>	Dosetaksel
<b>D-PBS</b>	Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu
<b>DTNB</b>	5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
<b>ECL</b>	"Enhanced" Kemiluminesans
<b>EMT</b>	Epitelyal mezankimal dönüşüm
<b>ER</b>	Östrojen reseptörü
<b>ESM</b>	Ekstraselüler matriks
<b>FBS</b>	Fetal sığır serumu
<b>FITC</b>	Floresan izosiyanat
<b>GR</b>	Glutasyon redüktaz
<b>GSH</b>	Redükte glutasyon
<b>GSSG</b>	Okside glutasyon
<b>GSTP1</b>	Glutasyon S-tranferaz P1
<b>GST</b>	Glutasyon S-tranferaz
<b>HER2</b>	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>İ.p.</b>	İntraperitonal

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Potasyum fosfat monobazik
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Potasyum fosfat dibazik
<b>K<sub>3</sub>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit tripotasyum
<b>Klr</b>	Klorofilin
<b>Klr+Dos</b>	Klorofilin ve dosetakselin birlikte uygulandığı grup
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteaz
<b>MT-MMP</b>	Membran tipi matriks proteaz
<b>MTT</b>	(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>PR</b>	Progesteron reseptörü
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SF</b>	Serum fizyolojik
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>TIMP</b>	MMP'lerin doğal doku inhibitörleri
<b>TNB</b>	5-Merkapto-2-nitro benzoik asit
<b>4T1</b>	Fare meme kanseri hücre hattı

**ŞEKİLLER**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Meme kanserinde uygulanan 5 standart tedavi seçeneği	4
<b>2.2.</b> Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzimleri tarafından katalizlenen konjugasyon tepkimesi	6
<b>2.3.</b> Klorofilinin yapısı	7
<b>2.4.</b> Metastatik sürecin basamakları	8
<b>2.5.</b> Matriks Metalloproteaz (MMP) enzimlerinin yapısı	11
<b>2.6.</b> proMMP aktivasyon basamakları	13
<b>3.1.</b> MTT'nin formazana enzimatik olarak indirgenmesi	17
<b>3.2.</b> 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun (GSH) glutasyon S-transferaz aracılı konjugasyon tepkimesi	25
<b>3.3.</b> Enzimatik döngü yönteminde glutasyon aracılığıyla DTNB'den TNB oluşumu	26
<b>3.4.</b> Frozen kesitlerin elde edilmesinde kullanılan kriyostat mikrotom	28
<b>4.1.</b> Doksetsel ve klorofilinin 4T1 hücre hattı üzerindeki IC50 değerleri	30
<b>4.2.</b> 4T1 hücrelerinde hücre döngüsündeki faz dağılımı	31
<b>4.3.</b> 4T1 hücreleri ile yapılan migrasyon analizinin başlangıç ve 24. saat görüntüleri (10x büyütme)	32
<b>4.4.</b> Başlangıç saati baz alınarak hesaplanan 24. saate ait % motilite indeksi grafiği	32
<b>4.5.</b> Western Blot bant görüntüleri, MMP-9 ekspresyon düzeyleri	34

<b>4.6.</b>	4T1 hücre hattında(A) ve karaciğer dokularında(B) farklı gruplara ait jelatinaz aktiviteleri	35
<b>4.7.</b>	Karaciğer dokusunda Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivite düzeyleri	36
<b>4.8.</b>	Karaciğer dokusunda glutatyon (GSH) düzeyleri	37
<b>4.9.</b>	Karaciğerdeki mikrometastatik odak görüntüleri (A) ve sayıları (B)	38

**TABLolar**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Meme kanserinde alt tipler	3
<b>2.2.</b> Subsrat özgülüklerine göre matriks metalloproteinazların sınıflandırılması	10
<b>2.3.</b> MMP'lerin regülasyonu	12
<b>3.1.</b> Deneysel gruplar ve enjeksiyon uygulamaları	20
<b>3.2.</b> SDS-Poliakrilamid jel hazırlığında kullanılan reaktifler	23
<b>4.1.</b> Farklı grupların 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucunda 4T1 hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı	31
<b>4.2.</b> 4T1 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinin 24. saatine ait % motilite indeks verilerini ve istatistiksel anlamlılıklarını içeren tablo	32
<b>4.3.</b> MMP-9 ekspresyon düzeylerine ait ortalama $\pm$ standart sapma değerleri	34
<b>4.4.</b> Farklı grupların jelatinaz aktivite (U/mg) sonuçlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri	35
<b>4.5.</b> Farklı grupların Glutatyon S-Transferaz aktivite ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) sonuçlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri	36
<b>4.6.</b> Farklı grupların glutatyon (GSH) düzeylerine ait ortalama ve standart sapma değerleri	37

## 1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlar arasında görülme sıklığı ve mortalite oranı en yüksek seyreden kanser türüdür ve insidansı giderek artış göstermektedir (3). Meme kanserinin tedavisinde, hastalığın alt tiplerine göre farklı tedavi seçenekleri uygulanabilmektedir ve bu kanser alt tipleri arasında reseptör duyarlılığı olmayan üçlü negatif (ER, PR ve HER2 negatif) meme kanseri; heterojenitesi, agresif oluşu ve tedavi seçeneklerinin eksikliği nedeni ile en ölümcül olanıdır (4). Hormonal tedavi veya HER2'yi hedefleyen ilaç tedavilerine yanıt vermediği için ana ve tek tedavi olarak kemoterapi yöntemi uygulanmaktadır (5, 6). Ancak kemoterapiye karşı ilaç direnci gelişmesi, meme kanseri tedavisinde bu başarısızlığın ana nedenlerinden birisidir. Çeşitli kanser hücre hatlarında, Glutasyon S-transferaz enzim ailesine ait Glutasyon S-transferaz P1 (GSTP1) enzim izoziminin ekspresyon düzeylerinin artarak, kemoterapiye karşı ilaç direnci gelişiminde rol oynadığı rapor edilmektedir (6, 7).

Meme kanseri tedavisinde, ilaç direnci gelişmesi ve tümörlerin tekrar nüksetmesinin yanında başarıyı düşüren ve mortaliteye sebep olan bir diğer ana etmen ise, özellikle üçlü negatif meme kanserlerinin uzak dokulara metastaz yapabilme yeteneğidir (8). Metastaz, kanser hücrelerinde migrasyonu ve invazyonu da içine alan çok basamaklı bir biyolojik süreçtir. Bu sürecin gerçekleşmesi, ekstrasellüler matriksin (ESM) yıkımını gerektirmektedir. ESM'nin proteolitik yıkımından matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin sorumlu olduğu ve bu MMP'lerin çeşitli tümör dokularında yüksek oranlarda eksprese edilmesine bağlı olarak invazyon ve de metastazda rol aldıkları rapor edilmektedir (9).

Üçlü negatif meme kanserinde yüksek mortalite gözlemlenmesi ve insidansın giderek artması, hastalığı global bir problem haline getirmektedir. Mevcut tedavi yöntemlerinin kısıtlı oluşu ve başarı oranlarının düşük olması nedeniyle, günümüzde meme kanseri tedavisine yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Bu bağlamda bir çok *in vivo* ve *in vitro* kanser modelleriyle çalışmalar yürütülmekte ve kombine terapi yöntemleri de dahil olmak üzere yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilmesi için araştırmalar devam etmektedir. Bu nosyon kapsamında yapılan



çalışmalardan bir kısmı özellikle bitkisel kaynaklı fitokimyasallardan bazılarının antitümörel etki göstermesi ve antioksidan özellikleriyle kemotöropik ajanların sitotoksik yan etkilerine karşı koruyucu olması nedeniyle kanser tedavisinde önemli bir faktör olabileceklerini göstermektedir (10, 11).

Antioksidan bir bileşik olan klorofilinin, grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmalarda ilaç direncinde rol olan GSTP1 enziminin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (12). Dolayısı ile klorofilinin kemoterapik tedavi etkinliğini potansiyel olarak arttırabilmesi söz konusudur (13, 14).

Tüm bunlar göz önüne alındığında, bu çalışmada hem antioksidan hem de GSTP1 inhibitörü özelliği gösteren klorofilinin, üçlü negatif meme kanseri metastazı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, kanser tedavisine dirençli, üçlü (ER, PR, HER2) negatif metastatik 4T1 meme kanseri hücre hattında ve oluşturulan meme kanseri hayvan modelinde, kanser ilacı olan dosetaksel ve/veya klorofilinin etkinliği *in vivo/in vitro* olarak araştırılmak istendi. Klorofilinin ve dosetakselin hem tekli olarak hem de kombine olarak uygulanması sonucunda 4T1 hücre hattında, hücre canlılığı, hücre döngüsü, hücre migrasyonu, MMP-9 ekspresyonu, total jelaşinaz aktivitesi, total GST aktivitesi, glutatyon düzeyleri ve karaciğer dokusunda oluşan mikrometastazlar araştırıldı ve değerlendirildi. Sonuç olarak; dosetaksel, klorofilin ve klorofilinin dosetaksel ilacı ile birlikte uygulanmasının, meme kanseri kaynaklı metastaz ve ilişkili süreçler üzerinde etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak ortaya koyuldu.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın olarak görülen kanser türüdür ve her yıl yeni kanser teşhislerinin %10'undan fazlasını oluşturmaktadır. Ayrıca dünyada kadınlar arasında kanser ölümlerinin ikinci en yaygın nedenidir ve insidansı giderek artmaktadır (15, 16). Buna ek olarak meme kanserinde tümörlerin lenfatik ve hematolojik olarak yayılma eğilimi göstermesi uzak doku metastazına ve kötü prognoza yol açmaktadır (15). Dolayısıyla, hem insidansının hem de mortalite oranlarının yüksek olmasından ötürü, meme kanserine yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve mevcut tedavilerin etkinliğinin artırılması önem önem arz etmektedir ve bu alanda bir çok çalışma yürütülmektedir.

#### 2.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri

Meme kanseri moleküler olarak çeşitli alt gruplara ayrılabilir. Bu moleküler sınıflandırmalar yapılırken çeşitli hücresel belirteçler baz alınmaktadır. Örneğin hormon reseptörleri, büyüme faktörleri reseptörleri, hücre döngüsünde görev alan bileşenler, yüksek oranda aktivite olmuş hücre sinyal yolları veya hücrenin büyümesinde rol alan elemanlar, meme kanseri alt tiplerini belirlemede kullanılmaktadır (17, 18). Tüm bu faktörler göz önüne alındığında meme kanseri dört ana gruba ayrılabilir ve bunlar luminal A, luminal B, İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) pozitif ve bazal benzeri meme kanserleridir. Bu grupların hangi belirteçleri içerdiği Tablo 2.1.'de gösterilmektedir (18, 19).

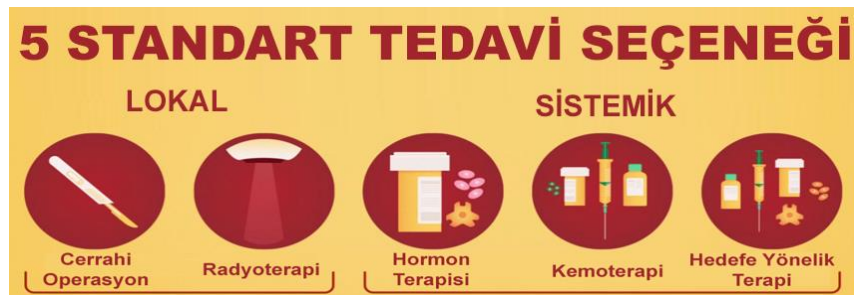
**Tablo 2. 1.** Meme kanserinde alt tipler

Meme Kanserine Ait Alt Tipler	Östrojen Reseptörü (ER)	Progesteron Reseptörü (PR)	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (HER2)
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+
HER2	-	-	+
Bazal Benzeri	-	-	-

### 2.1.2 Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri heterojen bir hastalık olduğu ve farklı moleküler alt gruplar içerdiği için, bu alt gruplara yönelik farklı tedavi seçimleri uygulanmaktadır. Cerrahi operasyon, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedaviler başlıca tedavi yaklaşımlarını oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (20). Ancak tümörün lokasyonu, boyutu, metastaz gerçekleştirip gerçekleştirmemesi, menapoz durumu, hastanın yaşı, lenf nodlarının boyutu, kanserin hangi evrede olduğu ve hastanın genel sağlık profili gibi faktörler tedavi seçeneğini belirlemede rol oynayan faktörlerdir (21, 22).

Bu alt gruplar arasında Luminal A; ER+, PR+, HER2- olduğu için tedavisinde genellikle hormon tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Diğer alt gruplarla kıyaslandığında tümör nüksetme oranının düşük olduğu ve daha iyi prognoz sergilediği görülmektedir (23). HER2 pozitif olan alt gruplar da ise HER2 blokörleri tedavide kullanılabilir. Ancak bazal benzeri meme kanseri alt grubu incelendiğinde ise ER, PR ve HER2 reseptörleri negatiflik göstermektedir ve bu yüzden üçlü negatif meme kanseri olarak da adlandırılmaktadır. Dolayısıyla bu hasta grubunda üç reseptörün aynı anda yokluğuna bağlı olarak, hormon tedavisine yanıt alınamamaktadır. Tüm bu alt gruplar arasında tedaviye dirençli, agresif ve oldukça metastatik oluşu nedeniyle üçlü negatif meme kanseri, en yüksek mortalite oranı ve kötü prognoza sahip olan kanser grubu olarak yerini almaktadır (24). Alternatif tedavilerin yokluğuna bağlı olarak, başta dozetaksel olmak üzere taksan sınıfı bileşikler de içeren kemoterapi yöntemi hala ana tedavi olarak mevcudiyetini sürdürse de bu tedavide başarı oranları oldukça düşüktür. Dahası, metastaz gelişiminden itibaren hayatta kalım ortalamaları nadiren bir yılı aşabilmektedir (24).



Şekil 2. 1. Meme kanserinde uygulanan 5 standart tedavi seçeneği

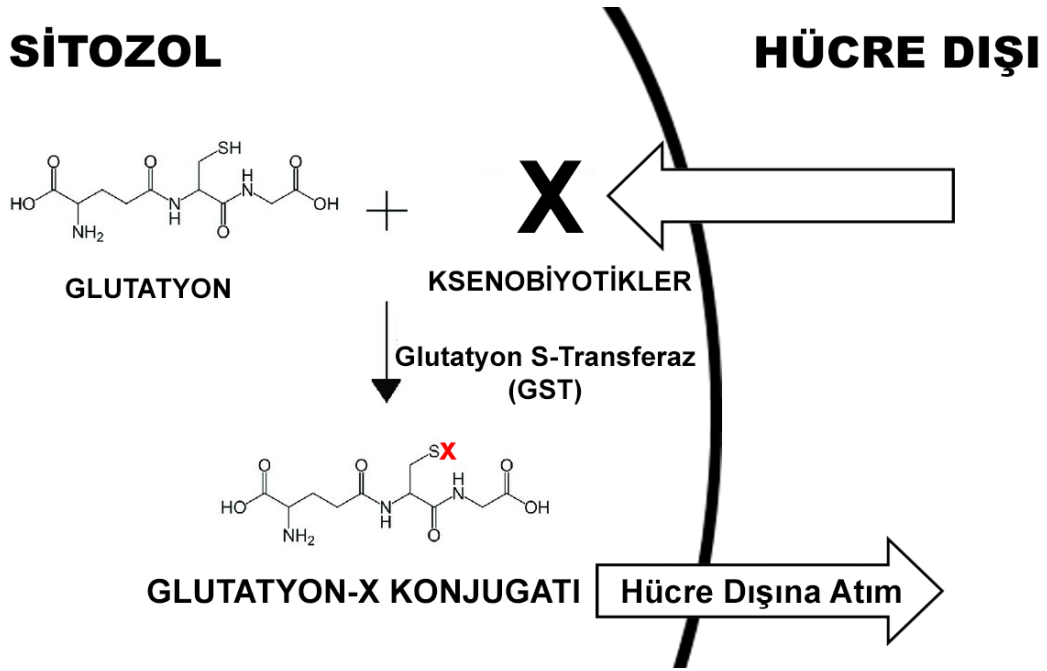
### **2.1.3. Meme Kanseri Tedavisinde Başarıyı Düşüren Faktörler**

Meme kanserinde cerrahi işlem uygulanarak tümör içeren doku ve organların elimine edilmesi amaçlanmaktadır. Ancak cerrahi rezeksiyonundan sonra dahi kanser hücrelerinin nüksetmesi söz konusu olabilmektedir. Üçlü negatif meme kanseri ele alındığında, oldukça agresif bir klinik davranışı olduğu görülmektedir. Sıklıkla görülen lokal relapsların yanı sıra uzak doku metastazı mortaliteden sorumlu başlıca faktörlerden birisidir (25). Kemoterapi yöntemi ise, belirli organ ve dokularda yer alan kanser hücrelerinin büyümesini önlemek ve kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlamaktadır ancak bu ilaçlar toksik etkilerinin yüksek olması sebebiyle, sağlıklı hücrelere de zarar vererek çeşitli yan etkilere de neden olabilmektedirler (26). Dolayısıyla sağlıklı hücreler üzerine olan bu yan etkilerin azaltılması ve hedef kanser hücrelerine yönelik etkinin artırılması için araştırmalar devam etmekte ve bir çok aday bileşik test edilmektedir.

Mevcut kemoterapi yönteminde başarı düşüklüğünün en büyük etkilerinden birisi de kemoterapik ajanlara karşı ilaç direnci gelişiminin gözlemlenmesidir (27). Özellikle üçlü negatif meme kanserleri düşünüldüğünde, kemoterapiye karşı gelişen direnç ve diğer tedavi yöntemlerinin kısıtlılığı nedeniyle güvenli ve etkili bir tedavi yaklaşımına acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda, detoksifikasyon sürecinden sorumlu olan Glutasyon S-transferaz enziminin, antikanser ilaçlara karşı direnç gelişiminde de rol oynadığı rapor edilmektedir (5, 28).

### **2.2. Glutasyon S-Transferaz Enzimleri**

İnsan glutasyon S-transferazları (GST'ler), konjugasyon reaksiyonlarında glutasyon (GSH) kullanan detoksifikasyon enzim ailesidir. Çeşitli toksik elektrofilik veya hidrofobik bileşikleri substrat olarak kullanabilirler ve bu bileşiklerin glutasyon ile konjugasyon tepkimesini gerçekleştirerek safra veya idrarla daha kolay bir şekilde atılabilen daha az toksik bileşenlere dönmelerinde rol alırlar (29). GST'lerin katalizlediği konjugasyon tepkimesi Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.2.** Glutasyon S-transferaz (GST) enzimleri tarafından katalizlenen konjugasyon tepkimesi (30, 31).

GST'ler dimerik yapıya sahip enzimlerdir ve alt ünitelerinde 2 çeşit fonksiyonel bölge bulunmaktadır. G bölgesi glutasyonun bağlanma bölgesini içerirken, H bölgesi ise hidrofilik yapıda olan ve çeşitli elektrofilik maddeleri bağlayan bölgedir. H bölgesindeki aminoasitlerin dizilişinin çeşitlilik göstermesi, GST izozimlerinin oluşmasında ve dolayısıyla hedef süstratın değişmesinde rol oynamaktadır (31). Sitozolik, mikrozomal ya da mitokondriyal GST alt aileleri bulunmaktadır ve bu grupların arasında sitozolik GST'ler alfa ( $\alpha$ ), pi ( $\pi$ ), mü ( $\mu$ ), sigma ( $\sigma$ ), zeta ( $\zeta$ ), teta ( $\theta$ ), ve omega ( $\omega$ ) olmak üzere yedi farklı izozim içermektedir (31, 32).

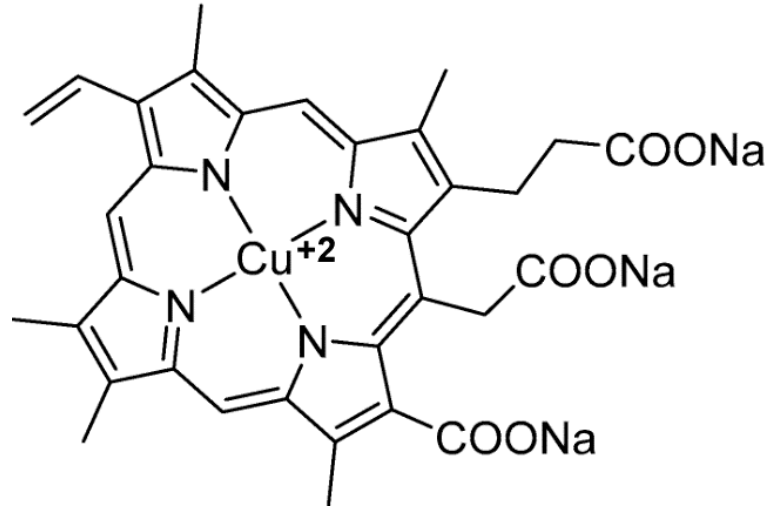
Son 20 yılda yapılan çalışmalar, GSTP1 izoziminin çeşitli kanser hücrelerinde ekspresyonunun arttığını göstermekte ve bu anormal GSTP1 ekspresyon artışı tümörlerde kemoterapik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ile ilişkilendirilmektedir (31). Bu nosyonun ardında yatan biyokimyasal mekanizma, kanser hücrelerinde artmış GSTP1 aktivitesinin, kanser ilaçlarının hızlı bir şekilde detoksifiye edilmesine neden olması ve bu ilaçların istenilen etkinliğe ulaşmasına engel olmasıdır (33).

Tüm bu çalışmaların ardından; GST enziminin sadece metabolizmada rol almadığı aynı zamanda tümör biyolojisinde de önemli bir işlevi olduğu anlaşılmıştır.

Bu keşfin ardından GST inhibitörleri antikanser ilaç direncini elimine etmek adına, anti kanser ilaç keşfi çalışmalarında yerini almaya başlamıştır ve bir çok GST inhibitörü geliştirilmiştir. Çalışma grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmalarda, antioksidan bir bileşik olan klorofilinin de ilaç direncinde rol olan GSTP1 enziminin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (12). Dolayısı ile klorofilinin kemoterapik tedavi etkinliğini potansiyel olarak arttırabilmesi söz konusudur (13, 14).

### 2.3. Klorofilin

Klorofil, bitkilere yeşil rengi veren doğal bir pigmenttir. Bitkiler ve bazı algler, fotosentez süreci için ışığı yakalamak için klorofil kullanır. Klorofilin ise, klorofilden türetilen sodyum-bakır tuzlarının suda çözünür bir karışımıdır (Şekil 2.3) (34). Gıda katkı maddesi olarak da kullanılan klorofilin aynı zamanda yara iyileştirici özelliğe sahiptir ve tıp ile beslenme alanlarında kullanımı yaygındır.



Şekil 2.3. Klorofilinin yapısı (1).

Literatürde klorofilini, antioksidan potansiyeli açısından inceleyen bir çok çalışma yer almaktadır (35, 36). Buna ek olarak klorofilinin; antijenotoksik, antimutajenik, ve antikanserojenik olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Klorofilinin antikanserojenik özelliklerini; sigaradan kaynaklanan serbest radikallerin, işlenmiş ve ızgaralanmış gıdalardan kaynaklı oluşan heterosiklik aminlerin ve özellikle aflatoksin-B1'in neden olduğu hasarı bloke ederek gösterdiği belirtilmektedir (37).



Primer tümör dokusundaki malign kanser hücrelerinin metastaz gerçekleştirebilmesi için gerekli olan biyolojik basamaklar şu şekildedir: Öncelikle epitelyal hücrelerin kimliğini kaybederek mezankimal fenotip kazandığı epitelyal mezankimal dönüşüm (EMT) adımı gerçekleşmektedir. Bu değişiklik, hücrelerin hareketlilik kazanmasına ve birincil bölgeden göç etmesine olanak sağlar (41). Ardından hücrelerin adezyon ile ilişkili özelliklerinin farklılaşması sonucu kanser hücrelerinin tümörden ayrılması söz konusudur. Böylece lokal invazyonlar gerçekleşmektedir ve hücre migrasyonu görülmektedir. Sonrasında anjiyogenez ve vasküler alana intravazasyon gerçekleşmektedir. Bu esnada kanser hücrelerinin dolaşımdayken immün sistemden kaçması ve hayatta kalması gerekmektedir. Bu süreci ekstravazasyon ile damar dışına çıkan kanser hücrelerinin sekonder bölgeye yerleştikten sonra mikrometastazlar oluşturması takip eder. Ardından proliferasyon ile tekrar tümör büyümesi gerçekleşerek makrometastazlar oluşur ve sekonder tümörler meydana gelmiş olur (2).

Tümör hücreleri metastaz yaptığında, yeni oluşan bu ikincil tümörler original tümördekilere benzer. Bu durum, meme kanserinin karaciğere metastaz yapması durumunda, ikincil tümörün anormal karaciğer hücrelerinden değil, anormal meme hücrelerinden oluştuğu anlamına gelir. Dolayısıyla karaciğerdeki bu tümör, karaciğer kanseri değil metastatik meme kanseri olarak isimlendirilir.

Meme kanserinin mortalitesinde etkin rol oynayan faktör de, yaygın olarak uzak doku metastazı görülmesidir. Metastatik meme kanserinde tedavinin amacı yaşam süresini uzatmak ve semptomları iyileştirmektir. Diğer meme kanseri alt grupları için genel sağ kalım 5 yıl iken, metastatik üçlü negatif meme kanseri için ise bu süre ortalama 1 yıldır (21). Metastatik süreçte yer alan basamaklardan birinin bile tamamlanamaması metastazı engellemektedir (42). Bu bağlamda, ekstraselüler matriksin proteolitik yıkımına neden olarak, metastazın invazyon basamağında yer alan matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin inhibisyonu ile ilgili çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. MMP inhibitörleri geliştirilerek metastazın baskılanması hedeflenmektedir (43).



## 2.5. Matriks Metalloproteaz Enzimleri

Ekstraselüler matriks (ESM); proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, kollajen ve elastin gibi yapısal proteinler, fibronektin ve laminin gibi yapışma proteinleri ve matriks metalloproteazlar (MMP'ler) olarak adlandırılan proteaz enzimlerini de içeren çeşitli moleküllerden oluşmuş, doku ve hücrelere destek sağlayan yapıdır. Destek rolünün ötesinde hücre motilitesi ve sinyal iletimi gibi bir çok fonksiyonda da rol almaktadır (44).

MMP'ler, 23 üye içeren bir endopeptidaz ailesine ait enzimlerdir. Aktif bölgelerinde çinko ( $Zn^{2+}$ ) atomu içeren ve kalsiyuma bağlı olan bu enzimler ESM'yi oluşturan proteinleri degrade edebilir ve yeniden şekillendirebilir. Bu özellikleri sayesinde başta kanser invazyonu da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlere katılırlar. MMP'ler hücredeki yerleşimleri ve sübstrat özgüllüklerine göre, membran tipi matriks metalloproteazlar (MT-MMP'ler), kollajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler ve matrilizinler olarak sınıflara ayrılmaktadırlar. Sübstrat özgüllüğüne göre yapılan sınıflandırma Tablo 2.2.'de gösterilmektedir (45, 46).

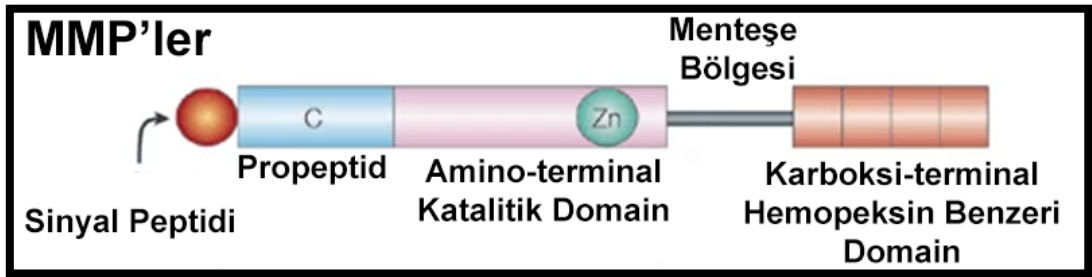
**Tablo 2.2.** Sübstrat özgüllüklerine göre matriks metalloproteazların sınıflandırılması

Alt Tip Sınıflandırılması	Sübstratları	MMP'ler
Kollajenazlar (1-4)	Kollajen II, III, VIII, X, jelatinler, agregan, entaktin	MMP-1, -8, -13, -18
Jelatinazlar (A ve B)	Jelatinler, kollajen I, IV, V, VII, X, XI, fibronektin elastin, laminin, vitronektin, proMMPler-9 ve 13	MMP-2, MMP-9
Stromelizinler (1-3)	Proteoglikanlar, laminin, jelatinler, fibronektin, entaktin, kollajen III, IV, V, IX, X, XI, proMMPler 1, 8, 9 ve 13, vitronektin, $\alpha$ 1-proteinaz inhibitör	MMP-3, -10, -11
Matrilizin	Proteoglikanlar, laminin, fibronektin, jelatinler, entaktin, kollajen IV, elastin, tenaskin	MMP-7, MMP-26
Membrane-tip MMPler (MT-MMP-1, -3, -4)	Kollajen I, II, III, jelatinler, fibronektin, laminin, proteoglikanlar, proMMP-2 ve 13	MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25

MMP grupları arasında jelatinazlar, jelatinleri ve diğer çeşitli ekstrasellüler matriks proteinlerinin degradasyonunda yer alan çinko bağımlı matrix metaloproteazlardır. Memeli jelatinazları arasında Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9) enzimleri bazal membranın parçalanmasında kritik bir role sahiptir ve çeşitli tümör hücrelerinde artmış aktivite göstererek invazyon ve metastaz gibi patolojik süreçlerde ana rol oynarlar (47-49). Jelatinaz aktivitesi başlıca ölçüm yöntemlerinden birisi, örneklerin jelatin substratı içeren bir sodium dodesil sülfat akrilamid jel (SDS-PAGE) üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulduğu ve sonrasında yine uygun bir tampon içerisinde yeniden renature edildiği jelatin zimografi yöntemidir (50).

### 2.5.1. Matriks Metalloproteazların Genel Yapısı

MMP'lerin yapıları göz önüne alınırsa, tüm MMP'lerin bir sinyal peptit, bir propeptit ve bir amino-terminal katalitik domainden oluştuğu görülmektedir. Yine bazı istisnai MMP'ler hariç bir karboksi-terminal hemopeksin domaini görülmektedir. Sinyal peptit, enzimin sekrete edilmesinde önem arz ederken; propeptit ise MMP'lerin regüle edilebilmesinde önem arzetmektedir. Çoğu MMP'ler için geçerli olan yapı Şekil 2.5.'te şematize edilmiştir (51). Jelatinazların yapısında farklı olarak katalitik bölgeye yerleştirilmiş bir fibronektin tip II benzeri alan olduğu belirtilmektedir. Bu bölge, tip IV, V, I kollajen ve elastine bağlanabilmekte ve dolayısıyla substrat özgüllüğüne katkıda bulunmaktadır (52).

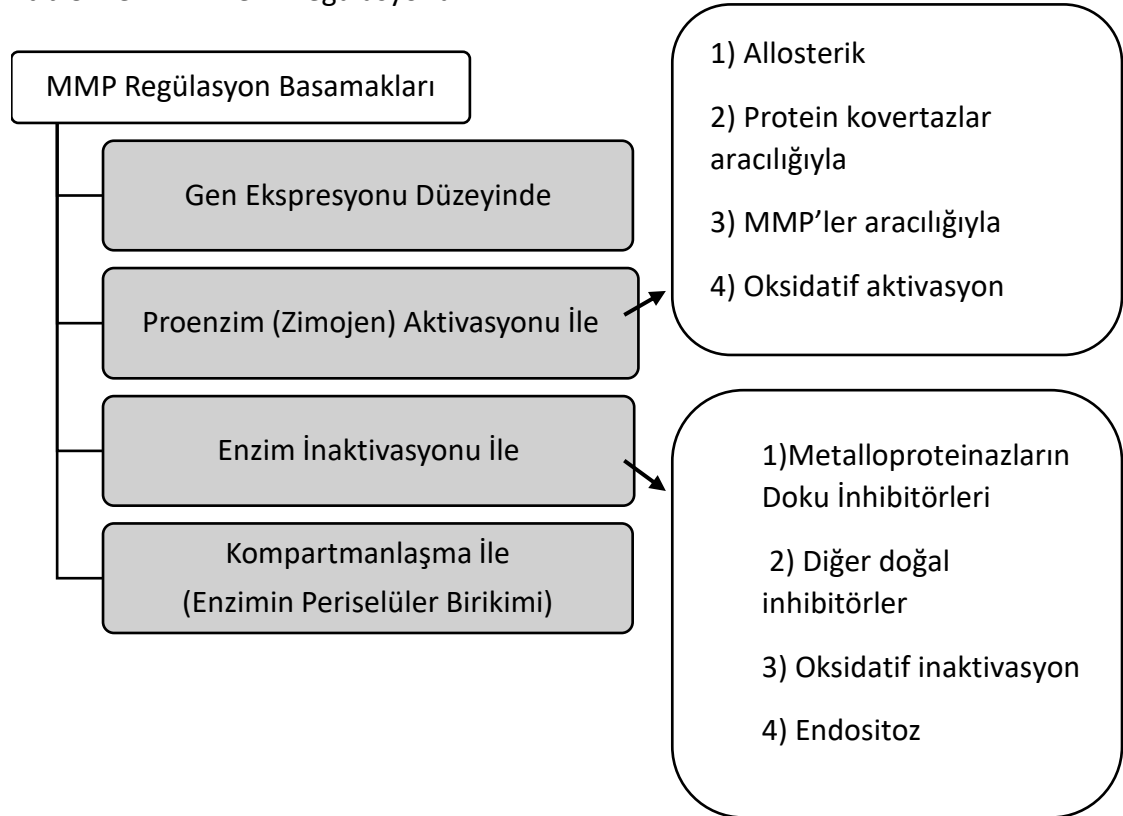


Şekil 2.5. Matriks metalloproteaz (MMP) enzimlerinin yapısı

### 2.5.2. Matriks Metalloproteazların Regüle Edilmesi

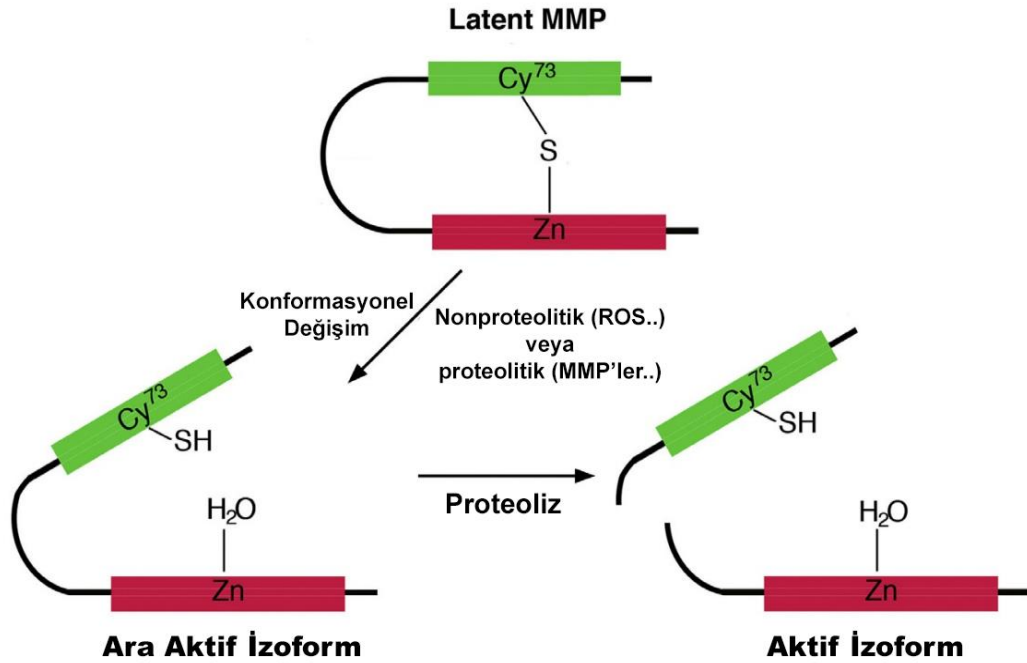
MMP'lerin regülasyonu gen ekspresyonu, proenzim aktivasyonu, enzim inaktivasyonu ve kompartmanlaşma olmak üzere 4 temel basamak ile gerçekleştirilir. MMP'lerin regülasyonu Tablo 2.3.'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.** MMP'lerin regülasyonu



MMP'ler proenzim formda iken katalitik olarak inaktif halde tutulurlar. Bunun nedeni katalitik bölgede yer alan çinko iyonu ile korunmuş prodomainde bulunan sisteinin tiyol grubunun bağ yapmasıdır. İnaktif halde bulunan bir MMP'nin katalitik aktivite kazanabilmesi için bu tiyol-Zn<sup>2+</sup> bağının kırılması gereklidir. Bu kırılma fizyolojik ve ya nonfizyolojik olarak oksidan maddeler, elektrofil bileşikler veya proteinazlar tarafından gerçekleştirilebilir. MMP proenzimlerinin aktivasyonu Şekil 2.6.'da gösterilmektedir (53).

MMP'lerin doğal doku inhibitörleri (TIMP'ler) aracılığıyla inaktif formda tutulması, dokudaki aktivitelerinin kontrol altında tutulabilmesindeki ana mekanizmalardan birisidir (54). Sonuç olarak MMP'lerin ilk olarak inaktif zimojen



**Şekil 2.6.** ProMMP aktivasyon basamakları

formda sentezlenmesi ve aktivasyonlarının proteoliz ve ya çeşitli ajanlar aracılığıyla gerçekleşmesi ve yine TIMP'ler aracılığıyla inaktive halde tutulmasına bağlı olarak, MMP ekspresyonu tek başına enzimin etkinliği ile ilgili bilgi verememektedir. Bu yüzden yapılan çalışmalarda MMP'lerin TIMP'lere oranı veya aktivitelerinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

## 2.6. Metastazda Matris Metalloproteazlar

MMP'ler, en az üç farklı mekanizma ile tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını kolaylaştırır. İlk olarak proteinaz etkisi ile, kollajenler, lamininler ve proteoglikanlar gibi ESM makromoleküllerinin yıkımı yoluyla invazyonun önündeki fiziksel engelleri ortadan kaldırır. Bu süreç, hem *in vitro* kemoinvazyon deneyleriyle hem de tümörlerin invaziv cephesinde MMP aktivitelerini değerlendiren *in vivo* deneylerle gösterilmiştir (55). İkinci olarak, MMP'ler hücre adezyonunu modüle etme yeteneğine sahiptir. Hücrelerin ESM'de hareket edebilmeleri için, yeni hücre matrisi

ve hücre-hücre tutunmaları oluşturabilmeleri ve mevcut olan bağlantıları kırabilmeleri gerekir. Bu bağlamda MMP/TIMP oranını değiştiren bir hücre transfeksiyon sisteminde, tümör hücrelerinin adeziv fenotipinde önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir (9, 55). Son olarak, MMP'lerin ESM bileşenleri veya diğer proteinler üzerindeki aktiviteleri sonucunda bu bileşenlerin olası biyolojik rolleri açığa çıkabilir. Örneğin, MMP aktivitesi sonucunda plazminojenden anjiyogenez inhibitörü anjiyostatin üretilebilir veya laminin-5'in spesifik olarak MMP-2 ile degradasyonu sonucu kemotaksik bileşenler oluşabilir (9). Sonuç olarak MMP'ler, tümör hücrelerinin metastazını kolaylaştırma yönünde birçok anahtar role sahiptir. Spesifik MMP aktivitelerine müdahale etmek için tasarlanan tedavi yöntemleri, metastatik kanserlerin kontrol altına alınmasında faydalı bir seçenek olabilir.

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

Çalışmanın hücre kültürü aşamalarında kullanılmakta olan 4T1 meme kanseri hücre hattı, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü'nün Prof. Dr. Güneş Esendağlı Laboratuvarı'ndan tedarik edildi. Çalışmanın deneysel hayvan modeli aşamasında kullanılan Balb/c fareleri, Ankara Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan tedarik edildi. Farelerin beslenmesi için Dokuztuğ Yem Sanayii'nden tedarik edilen standart pellet yemler kullanıldı. Bakım ve deneysel muameleler ise Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nde uygulandı.

Deneylerde kullanılan genel kimyasallar: MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolyum bromür), Dimetil sulfoksit (DMSO), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), Sodyum klorür (NaCl), Dosetaksel, Sodyum hidroksit (NaOH), Dulbecco'nun fosfat tamponu (D-PBS), 2-merkaptoetanol, Etilendiamin tetraasetik asit tripotasyum ( $K_3EDTA$ ), Etilendiamin tetraasetik asit disodyum ( $Na_2EDTA$ ), Glutasyon redüktaz (GR), Redükte glutasyon (GSH), Klorofilin-bakır kompleksi sodyum tuzu (Klr.), SDS, Potasyum fosfat monobazik ( $KH_2PO_4$ ), Potasyum fosfat dibazik ( $K_2HPO_4$ ), Tripan mavisini, Tris, Trikloroasetik asit (TCA), Tween 20, İzopraponal alkol, Metanol, Ribonükleaz A ve RIPA tampon Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD); Penisilin/streptomisin karışımı, Fetal sığır serumu (FBS), Fenol kırmızısı içermeyen RPMI besiyeri, RPMI 1640 (RPMI) besiyeri, Tripsin-EDTA, L-glutamin Biowest firmasından (Nuaille, France); Sığır serum albümin Bio-Rad firmasından (Hercules, CA, ABD), MMP-9 için primer antikor ve sekonder anti-IgG antikor St John's Laboratory firmasından (Londra, İngiltere); Enhanced Kemilüminesans (ECL) Advansta firmasından (San Jose,CA, ABD); Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) Cayman firmasından (Ann Arbor, Michigan,ABD) sağlandı.

Çalışmada kullanılan kitler: Jelatinaz aktivite ölçüm kiti Abcam firmasından (Cambridge, İngiltere) temin edildi.

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları: Mikro-plaka spektrofotometresi (Molecular Devices SpektraMax M2 ve SpektraMax İ3x), Akım sitometresi (Beckman Coulter, Cytoflex), Hücre Görüntüleme Cihazı (Juli Br), pH metre cihazı (Consort C830), Yatay çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101), Homojenizatör (Bio-gen PRO200), Santrifüj cihazı (Eppendorf 5417R ve Nüve NF800), Vortex (IKA), Fast Semi-Dry Blotter (Thermo Scientific, Pierce), Elektroforez güç kaynağı (Biorad, Power Pack 300), Distile su cihazı (Nanopure Infinity), Elektronik Analitik terazi (Shangping FA1104N), Derin dondurucu, -80°C (Sanyo), Mikropipetler (Gilson ve Eppendorf), Manyetik karıştırıcı (Elektromag M-21), Işık mikroskobu (Leica DM6B Upright), Kamera (Leica DFC7000T), Kriyostat-Kızaklı Mikrotom Cihazı (Leica CM1900 UV) ve Western blot görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDoc Touch).

Çalışmada kullanılan programlar: Deneyle sonuçunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve sonrasında grafiklerin çizimi için GraphPad Prism (Versiyon 8.3) kullanıldı. Yara açıklığı alan ölçümleri, Western blot bant yoğunluklarının analizi ve metastaz odaklarının sayımı için Fiji: ImageJ programı kullanıldı.

### 3.2. Yöntemler

Bu çalışmada, klorofilinin ve dosetaksel ilacı ile birlikte kombine kullanımının meme kanseri metastazı üzerine etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırıldı. İlk olarak 4T1 meme kanseri hücre hattında klorofilin molekülünün hem tekli kullanımının hem de kemoterapik ilaç dosetaksel ile kombine kullanımının hücre canlılığı, hücre döngüsü ve hücre migrasyonu üzerine etkileri incelendi. Ardından, dişi Balb/c farelerinde abdominal bölgeye subkutan 4T1 hücre inokülasyonu yapılarak *in vivo* olarak meme kanser modeli oluşturuldu. Tümör oluşumunun ardından on gün süresince klorofilin, dosetaksel ve ikisinin kombinasyonu farelere enjeksiyon ile uygulandı. Bileşiklerin uygulama işlemlerinin tamamlanmasının ardından bütün hayvanların servikal dislokasyon metodu ile sakrifikasyonu gerçekleştirildi. Alınan karaciğer dokuları soğuk serum fizyolojik (SF) ile yıkanarak -80° C'de saklandı. Ardından hem 4T1 hücre lizatları hem de karaciğer dokularında Jelatinaz B (MMP-9) ekspresyon düzeyleri, Jelatinaz aktivitesi analiz edildi. Yine karaciğer dokularında GST

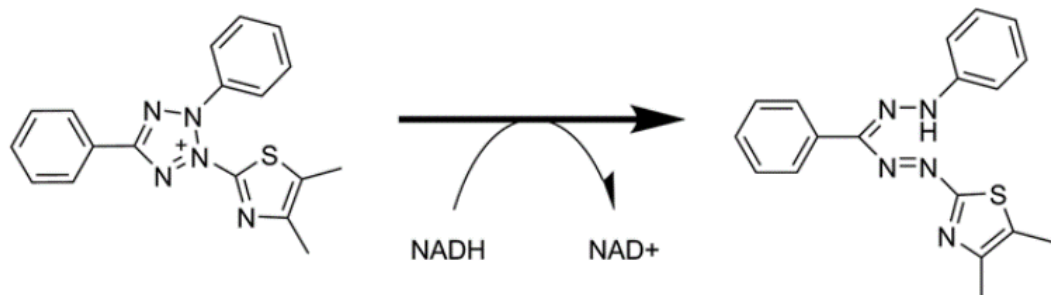
aktivitesi, GSH düzeyleri analiz edildi. Meme kanserinin uzak doku metastazını değerlendirmek için karaciğer dokularından alınmış frozen kesitler üzerinde mikrometastatik odak sayıları değerlendirildi.

### 3.3. Hücre Kültüründeki Çalışmalar

Hücre kültürü çalışmaları üçlü (ER, PR, HER2) negatif 4T1 meme kanseri hücre hattı ile gerçekleştirildi. 4T1 hücre hattını kültüre etmek için 4mM L-glutamin, %10 fetal dana serumu ve antibiyotik çözeltisi olarak %1 penisilin/streptomisin (v/v) içeren RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Hücrelerin bakımı %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübator cihazında ve 37°C'de gerçekleştirildi. Pasajlama işlemleri ise hücreler %80 konfluenseye ulaştığında %0,25 tripsin-EDTA kullanılarak gerçekleştirildi.

#### 3.3.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) hücre kültüründe ilk ve en yaygın olarak kullanılan tetrazolyum tuzlarından birisidir. Tetrazolyum tuzu çözeltileri reksiz veya zayıf renge sahip çözeltilerdir. Sarı renkli olan MTT bileşiği canlı hücrelerdeki mitokondriyal veya plazma kaynaklı olan oksidoredüktazlar, dehidrojenazlar, oksidazlar ve peroksidazlar gibi enzim aktivitesine bağlı olarak indirgenerek, mor renkli suda çözünmeyen formazan kristalleri oluşturur (56). Şekil 3.1.'de formazan bileşiğinin oluşumu gösterilmektedir. Oluşan formazan maddesinin absorbansı 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntemlerle ölçülerek, hücre canlılığı analizi yapılabilmektedir.



Şekil 3.1. MTT'nin formazana enzimatik olarak indirgenmesi (57).



4T1 meme kanseri hücre hattında klorofilin ve dosetaksel maddelerinin sitotoksitesini analiz etmek için MTT testi ile hücre canlılığı değerlendirildi. Bunun için 4T1 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara, kuyucuk başına  $5 \times 10^3$  hücre/100  $\mu$ l besiyeri olacak şekilde ekildi. 37°C`de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat inkübasyon sonucu hücrelerin plaklara tutunması sağlandı. Hücrelerin tutunmasının ardından kuyucuklardaki besiyeri çekildi ve yerine klorofilin ve dosetakselin farklı konsantrasyonlarını içeren 100  $\mu$ l besiyeri eklenerek 24 ve 48 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. 24 ve 48 saat inkübasyonların sonucunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri çekildi ve bu sefer hücrelerin üzerine MTT içeren 50  $\mu$ l besiyerleri eklenerek (1mg/ml) 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin MTT ile inkübasyonunun ardından MTT çözeltileri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak için kuyucuklara 100  $\mu$ l izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Mikroplaka okuyucu kullanılarak oluşan formazan bileşiğinin 570 nm dalga boyunda absorbansı okundu ve hücre canlılığı değerlendirildi. GraphPad Prism (Versiyon 8.3) programında, klorofilin ve dosetakselin farklı konsantrasyonlarına karşılık hücrelerin yüzde canlılık değerleri grafik haline getirildi ve IC50 değerleri belirlendi.

### **3.3.2. Akım Sitometri ile Hücre Döngüsünün Belirlenmesi**

Dosetaksel için belirlenen IC50 konsantrasyonları (24 saat için 32,05  $\mu$ M, 48 saat için 34,4  $\mu$ M) ile klorofilinin literatüre göre belirlenen dozu (50  $\mu$ M) 4T1 meme kanseri hücrelerine uygulandı (58). Hücreler 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresinin ardından tripsin-EDTA kullanılarak kültür kaplarından toplandı ve santrifüj edildi (1000 rpm, 5 dakika). Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin iki kez PBS ile yıkanması gerçekleştirildi. 2 ml PBS eklenen hücreler, 2 ml %99 etil alkol ile fikse edildi. Bir gece inkübasyonun ardından hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Daha sonrasında hücrelerin üstüne 70 $\mu$ l Rübonükleaz A ile 100  $\mu$ l propidium iodide eklendi. Yarım saat karanlıkta inkübasyonun ardından 50.000 hücre sayıldı ve akım sitometri cihazı (Cytotflex; BeckmanCoulter) kullanılarak hücre döngüsü analizi (Go/G1 ile Sentez ve G2/M oranları) iki değişkenli histogramlardan yapıldı.

### 3.3.3. Yara İyileşme Deneyi ile Hücre Göçünün Ölçülmesi

4T1 hücrelerinde klorofilin, dosetaksel ve ikisinin kombinasyonunun hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini saptayabilmek için yara iyileşmesi lateral migrasyon deneyi gerçekleştirildi. İlk olarak 24 kuyulu plağın kuyucuklarına  $5 \times 10^4$  hücre ekildi.  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  koşullarında hücrelerin tutunması için inkübasyon gerçekleştirildi. Hücreler %95-100 konfluent duruma geldiğinde kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve yara alanı oluşturmak için  $200\mu\text{l}$ 'lik steril bir pipet ucu yardımıyla kuyucuğun bir ucundan sonuna kadar çizik atıldı. Çizilen alandaki kalkan hücreler 1X PBS ile 3 kere yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Açılan yaraların sıfır zaman noktasında (başlangıç) ters faz ışık mikroskopunda görüntüleri alındı. Ardından kuyulara %2 FBS içeren besiyeri ortamı içerisinde klorofilin ( $50\ \mu\text{M}$ ), dosetaksel ( $32,05\ \mu\text{M}$ ) ve ikisinin kombinasyonu uygulandı. 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra tekrar yara görüntüleri alındı. Yara genişliklerinin ölçümleri Fiji:ImageJ programında "Wound healing size tool" aracı kullanılarak gerçekleştirildi (59). Hücrelerin migrasyon yeteneğini değerlendirmek için % Motilite İndeksi " $100 - (\text{Belirli bir zamanın yara genişliği} * 100 / \text{başlangıcın yara genişliği})$ " formülü kullanılarak hesaplandı.

### 3.4. Deney Hayvanları Çalışmaları

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak (Onay no: 2018/08-03) deney hayvanları çalışmaları başlatıldı. Çalışma kapsamında kullanılacak 6-8 haftalık dişi Balb/c farelerin temini Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı aracılığıyla gerçekleştirildi. Bütün deneysel uygulamalar Helsinki Deklarasyonu'nda belirtilen önerilere uygun bir şekilde gerçekleştirildi (60). Farelerin bakımı ve ilgili deney uygulamaları Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirildi. Farelerin bakımı havalandırma sistemine sahip bir ortamda, özel olarak dizayn edilmiş ve her gün temizliği yapılan kafeslerde; %30-70 nem,  $21^\circ\text{C}$  sıcaklık, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık koşullarına sahip bir ortamda sürdürüldü. Farelerin beslenmesi Dokuztuğ Yem Sanayii'nden temin edilen standart pellet yem ile gerçekleştirildi. Su ihtiyacı ise paslanmaz çelik bilyeli

biberonlar kullanılarak normal çeşme suyu ile karşılandı. Farelerin yem ve su ihtiyaçları ise sınırsız (*ad libitum*) olarak sağlandı.

### 3.4.1 Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması

6-8 haftalık dişi Balb/c farelerde meme yağ dokusuna  $5 \times 10^4$  adet 4T1 meme kanseri hücresi subkütan olarak SF çözeltisi içerisinde inoküle edilerek meme tümörü modeli oluşturuldu. Kanser hücreleri enjeksiyonunun yapıldığı gün 0. gün olarak kabul edildi. 8. Günde ortalama tümör çapları 2 mm'ye ulaştı ve bu basamakta fareler ilaç uygulamaları için randomize olarak gruplara ayrıldı. Klorofilin ve dosetakselin hem ayrı olarak uygulanmasının hem de birlikte uygulanmasının meme kanseri metastazı üzerindeki etkilerini araştırmak için 4 deney grubu oluşturuldu (Tablo 3.1). 10 gün süresince intraperitoneal (i.p.) olarak ilaçların enjeksiyonu yapıldı. Dosetaksel ilacı %1 DMSO'da çözülebilmektedir bu yüzden hem kontrol hem de deney gruplarında aynı oranda DMSO içeren enjeksiyonlar yapıldı.

**Tablo 3.1.** Deneysel gruplar ve enjeksiyon uygulamaları

No	Deney Grupları	Fare Sayısı	Uygulanan Enjeksiyonlar
1	Kontrol	6	0,1 ml SF çözeltisi, %1 DMSO
2	Dosetaksel (Dos)	6	8 mg/kg dozda dosetaksel (0,1 ml SF çözeltisi, %1 DMSO içerisinde)
3	Klorofilin (Klr)	6	30 mg/kg dozda klorofilin (0,1 ml SF çözeltisi, %1 DMSO içerisinde)
4	Klorofilin+Dosetaksel (Klr+Dos)	6	8 mg/kg dosetaksel + 30 mg/kg klorofilin (0,1 ml SF çözeltisi, %1 DMSO içerisinde)

### 3.4.2. Deney Hayvanlarının Takibi ve Sakrifikasyon Uygulamaları

İlk ilaç enjeksiyon uygulaması yapıldıktan itibaren her gün hayvan ağırlıklarının takibi yapıldı. İki gün aralıklarla "caliber" kullanılarak tümör çapı ölçümleri gerçekleştirildi. Tüm ilaç uygulama işlemleri bitirildikten sonra bütün fareler servikal dislokasyon metodu kullanılarak sakrifiye edildi. Alınan karaciğer dokuları, soğuk SF

ile yıkandı ve sonra gerçekleştirilecek analizlerde kullanılmak üzere - 80°C'de muhafaza edildi.

### **3.5. Hücre Lizatları ve Karaciğer Dokularındaki Analizler**

Hücre kültüründen elde edilecek lizatlar ve sonrasında yapılacak analizler için, 50 µM klorofilin, 32,05 µM dosetaksel ve ikisinin kombinasyonu 4T1 hücreleri içeren flasklara uygulandı ve 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından tripsin-EDTA kullanılarak hücreler flasklardan toplandı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından supernatant uzaklaştırıldı. Pelletlere 2 ml PBS eklenerek 2 kere PBS ile yıkama yapıldı. Western blot analizi yapılacak lizatları elde etmek için ayrılan hücrelere %1 inhibitör kokteyli içeren 40 µL RIPA tamponu eklenerek 20 kere pipetaj ve 5 saniye vorteksleme yapıldı. Ardından +4°C, 10.000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında elde edilen supernatantlar alikotlanarak -20 °C'de sonraki analizler için saklandı.

Karaciğer doku lizatlarında gerçekleştirilecek Glutasyon düzeyleri ve Glutasyon S transferaz aktivite analizleri için, ilk olarak karaciğer doku örneklerinin tartımı gerçekleştirildi. Ardından örneklere, homojenizasyon tamponu (100 mM potasyum fosfat tamponu, 1 mM EDTA, pH:7.0) 1:10 ağırlık/hacim oranında olacak şekilde ilave edildi. Homojenizasyon işlemi buz üzerinde ve homojenatör ile gerçekleştirildikten sonra örnekler 10 dakika boyunca 10.000xg'de santrifüj edildi ve supernatant elde edilerek ilgili analizler için kullanıldı. Western blot analizi için ise karaciğer doku örneklerinin homojenizasyonu %1 inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu ile gerçekleştirildi.

#### **3.5.1. Western Blot ile MMP-9 (Jelatinaz) Ekspresyonunun Belirlenmesi**

Bu çalışmada 4T1 meme kanseri hücre hattı ve karaciğer doku homojenatlarında MMP-9 ekspresyonu western blot yöntemi ile test edildi. Western blot yöntemi, proteinlerin varlığını test etmede ve ekspresyon düzeylerini semikantitatif olarak analiz etmede kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilk olarak proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlıklarına göre ayrımı gerçekleştirilir. Proteinlerin SDS ile muamelesi sonucu hem negatif yük

yüklenmeleri hem de denatürasyon sonucu primer yapıda kalmaları, proteinlerin yapısal ve yüksel farklılıklarını ortadan kaldırarak molekül ağırlıklarına göre ayrılmalarını sağlamaktadır (61). Sonrasında jel üzerinde ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin elektroblotlama metodu ile bir membrana tranferi gerçekleştirilir. Ardından membranın ilgilenilen proteine özgü primer antikor ile inkübasyonu gerçekleştirilir. Protein-primer antikor kompleksi oluşuktan sonra genellikle enzim bağlı olan bir sekonder antikor ile inkübasyon gerçekleştirilir. Bu enzimler arasında Horseradish Peroksidaz (HRP) sıklıkla kullanılan bir enzim olup, hidrojen peroksit ile luminol substratını oksitleyerek kemilüminesan bir ışımaya neden olur. CDD kamera yardımıyla kemilüminesan ışımaya algılanır ve hedef proteinlerin dedeksiyonu sağlanır (62).

#### **3.5.1.1. Hücre ve Doku Lizisi**

Proteinleri elde etmek amacıyla, karaciğer doku örneklerinin homojenizasyonu %1 inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu ile gerçekleştirildi. 4T1 hücreleri ise tripsin-EDTA kullanılarak flasklardan toplandıktan sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından supernatant uzaklaştırıldı. Pelletlere 2 ml PBS eklenerek 2 kere PBS ile yıkama yapıldı. Ardından hücrelere %1 inhibitör kokteyli içeren 40 µL RIPA tamponu eklenerek 20 kere pipetaj ve 5 saniye vorteksleme yapıldı. Ardından +4°C, 10.000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında elde edilen supernatantlar alikotlanarak -20 °C'de sonraki analizler için saklanırken bir kısmı protein tayini için kullanıldı.

#### **3.5.1.2. Protein Tayini**

Hücre ve doku lizatları elde edildikten sonra toplam protein konsantrasyonunu belirlemek için Bikinkoninik Asit (BCA) metodu kullanıldı. BCA metodunda proteinler alkali ortamda  $Cu^{+2}$  iyonunu  $Cu^{+1}$  iyonuna indirgenmesine neden olur ve 562 nm dalga boyunda absorpsiyon veren koyu mor renk oluşumu ile ölçüm gerçekleştirilir (63). Bu çalışmada sığır serum albumin (CD) standard protein olarak kullanıldı ve farklı konsantrasyonlarında ( $\mu\text{g/ml}$ ) ölçüm yapılarak standard eğri (absorpsiyon değerlerine karşı konsantrasyon) grafiği oluşturuldu. Çalışma reaktifini

oluşturmak için A reaktifi (Bikinkoninik asit) ve B reaktifi (% 4 bakır sülfat) 50:1 hacim/hacim oranında karıştırılarak kullanıldı. Mikroplakalara 25 µl örnek, 200 µl çalışma reaktifi eklendikten sonra 10 kez pipetaj yapıldı ve 37°C'de ağzı kapalı bir şekilde 30 dakika inkübe edildi. Ardından 562 nm'de absorbanans değerleri okunarak, standart grafiğinden yardımıyla örneklerin total protein konsantrasyonları belirlendi.

### 3.5.1.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Protein ölçümü gerçekleştirildikten sonra; hucre lizatları ve doku homojenati örnekleri herbir elektrofrez kuyucuguna sirasiyla 20, 25 µg protein uygulanacak sekilde ayarlandı. Daha sonra örnekler Laemmli yükleme tamponu [125 mM Tris-HCl (pH: 6,8), %0,004 bromfenol mavisi, %20 gliserol, %4 SDS ve %10 Beta-merkaptolanol] ile 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek denature edildikten sonra, SDS-poliakrilamid jel (%10'luk ayırıcı jel, %5'lik paketleyici jel) elektrofrezine yüklenerek yürütüldü (+4°C, 70V'da 30 dakika ve ardından 110V'da yaklaşık 90 dakika). SDS-Poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan maddeler Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

**Tablo 3.2.** SDS-Poliakrilamid jel hazırlığında kullanılan reaktifler

Kullanılan Reaktifler	%5'lik Paketleyici Jel	%10'luk ayırıcı Jel
%30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı	0,67 mL	3,3 mL
dH <sub>2</sub> O	2,7 mL	4 mL
1,0 M Tris-HCl (pH:6,8)	0,5 mL	-
1,5 M Tris-HCl (pH:8,8)	-	2,5 mL
%10 APS	0,04 mL	0,1 mL
%10 SDS	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

### 3.5.1.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Elektrofrez işlemi sonrasında proteinleri membrana aktarmak için, PVDF membranlar (0.45 mikron) kullanıldı ve membran transferden önce etanolla iletılarak aktive edildi. Proteinler, Fast Semi-Dry Blotter cihazı kullanılarak 25 voltta 30 dakika olacak şekilde membrana aktarıldı.

### 3.5.1.5. Bloklama, Antikorların Bağlanması ve Görüntüleme

Nonspesifik bant oluşumunu engellemek için proteinlerin membrana transferi sonrasında, membran %5 süt tozu içeren TBS-T (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, %0,1 Tween 20) ile 5 rpm'de ve oda sıcaklığında 1 saat bloke edildi.

Bloklama çözeltisinin uzaklaştırılmasından sonra 1:1000 oranında TBS-T ile dilüe edilmiş primer MMP-9 antikor ve  $\beta$ -Aktin uygulandı ve gece boyunca 5 rpm'de ve +4°C'de inkübasyon yapıldı. Daha sonra bağlanmamış primer antikorları uzaklaştırmak için 4 kere TBS-T ile oda sıcaklığında yıkama (ilki 15 dakika, diğerleri 5 dakika) yapıldı. Ardından 1:5000 dilüe edilmiş sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerektekrar aynı yıkama basamakları uygulandı.

Yıkamaların ardından membrana Enhanced Kemilüminesans (ECL) çözeltisi eklenerek Western blot görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDoc Touch) aracılığıyla görüntüler alındı. ImageJ programı kullanılarak bantların yoğunlukları analiz edildi ve MMP-9 düzeyleri  $\beta$ -Aktin düzeylerine oranlandı.

### 3.5.2. MMP-2/MMP-9 (Jelatinaz) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

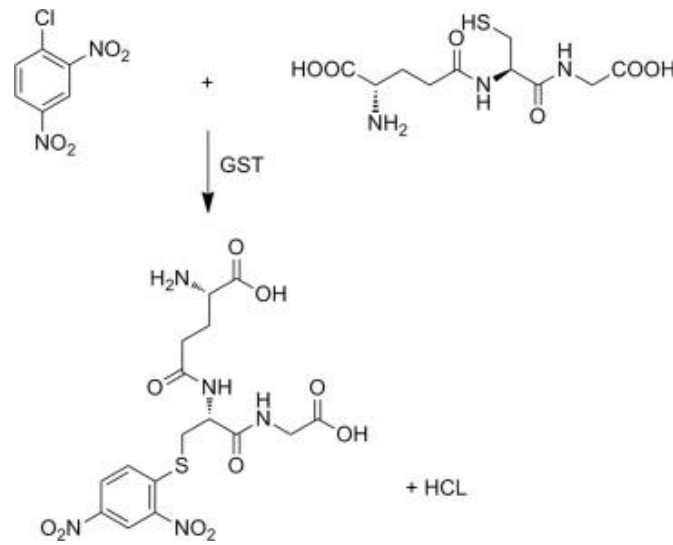
Bu çalışmada, 4T1 meme kanseri hücre hattı ve karaciğer dokusunda MMP-2/MMP-9 Jelatinaz aktivitesi jelatin degradasyon kiti ile gerçekleştirildi (ab234057). Kitte kullanılan substrat, jelatinazlar tarafından degradasyona uğradığında floresan ışığa vermektedir. Bu ışığa mikropłaka okuyucuda okunarak düşük miktarlarda dahi jelatinaz aktivitesi kantitatif olarak ölçülebilmektedir.

Kullanılan kit protokolüne göre; hem 4T1 hücre hattı hem de karaciğer doku örnekleri lizis tamponu ile homojenize edildi. Homojenizasyonun ardından 16.000xg ve +4°C'de santrifügasyon gerçekleştirildi ve süpernatantlardan 10  $\mu$ l hacimde örnekler alınarak BCA yöntemi ile protein ölçümü yapıldı (64). Daha sonra kit içeriğindeki protokole uygun olarak hazırlanan floresan izosiyanat (FITC) standartlarından 100  $\mu$ l alınarak 96 kuyucuklu siyah(opak) plaka kuyucuklarına uygulandı. Yine kuyulara uygulanan örnekler ve pozitif kontrollerin üzerine substrat karışımı toplamda 100  $\mu$ l olacak şekilde uygulandı. Eksitasyon/Emisyon 490/520 nm

dalga boyu olmak üzere, 37 °C ve 2 saat boyunca kinetik modda floresan ölçüm yapıldı. Işıma veren FITC standartı (pmol) değerlerine karşı  $\Delta$ RFU değerleri kullanılarak oluşturulan standart grafiği aracılığıyla RFU düzeyleri üzerinden örneklerin aktiviteleri belirlendi ve protein miktarlarına oranlanarak jelatinaz aktiviteleri (U/mg) tespit edildi.

### 3.5.3. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Glutasyon S-transferaz enzimleri indirgenmiş glutasyon ile ksenobiyotik substratların konjugasyonunu katalizleyerek detoksifikasyonda rol alır (65). Bu çalışmada Glutasyon S-transferaz aktivitesinin ölçümü için, GSH'nin 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) bileşiği ile meydana getirdiği konjugatın 340 nm'de gösterdiği absorbanstaki artış kullanılmıştır. Glutasyon S-transferaz tarafından katalizlenen bu konjugasyon reaksiyonu şekil 3.2.'de verilmiştir (66).



**Şekil 3.2.** 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun (GSH) glutasyon S-transferaz aracılı konjugasyon tepkimesi

Karaciğer doku örneklerinde aktivitenin ölçümü için, 100 mM sodyum fosfat tamponu (1 mM EDTA, pH: 6,5), 1 mM CDNB (%5 etanol içerisinde) ve 1 mM GSH ile reaksiyon ortamı hazırlandı. 30°C'lik reaksiyon ortamında, 340 nm'de 1 dakika boyunca kinetik spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi ve absorban değerlerindeki artışa bağlı olarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen

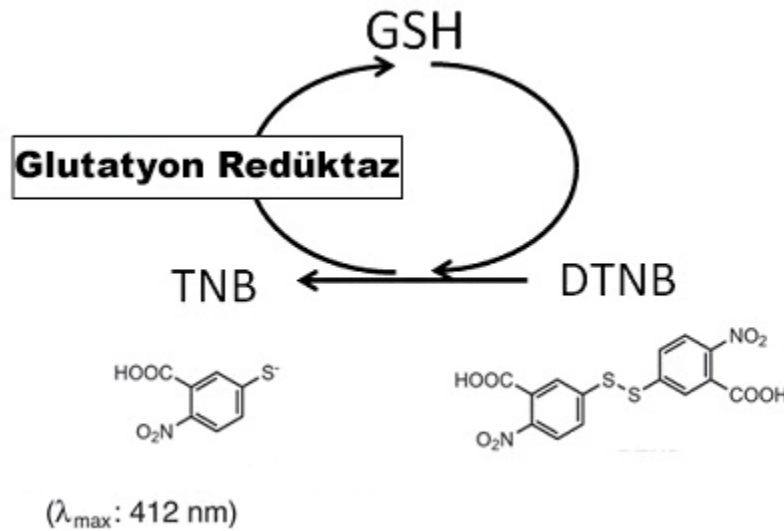


aktivite değerleri absorpsiyon katsayısı ( $5.3 \text{ mM}^{-1}$ ) ve örneklerin protein miktarlarına oranlanarak spesifik Glutasyon S-transferaz aktivite değerleri  $\mu\text{mol.dakika}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  cinsinden belirlendi

### 3.5.4. Glutasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Glutasyon, sistein, glutamik asit ve sisteinden oluşan bir tripeptittir ve çoğunlukla indirgenmiş olarak (GSH) bulunmaktadır. Okside olması durumunda glutasyon disülfid bileşiği yani okside glutasyon (GSSG) meydana gelmektedir. Bu çalışmada, enzimatik döngü yöntemi kullanılarak toplam glutasyon (GSH + GSSG) seviyeleri tespit edildi (67).

Enzimatik döngü yönteminde okside haldeki glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enzimi ve NADPH varlığında redükte haldeki glutatyona (GSH) dönüşmektedir. Redükte haldeki glutasyon ise DTNB [5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid)] bileşiği ile reaksiyona girerek TNB (2-nitro-5-tiyobenzoik asit) bileşiğini oluşturmaktadır (Şekil 3.3.). Spektrofotometre yardımıyla ortamdaki TNB bileşiğinin absorbansı  $412 \text{ nm}$ 'de ölçülerek toplam glutasyon düzeyleri belirlenmektedir (68).



**Şekil 3.3.** Enzimatik döngü yönteminde glutasyon aracılığıyla DTNB'den TNB oluşumu

Karaciğer dokusuna ait örneklerdeki GSH seviyelerini analiz etmek için, önce homojenizasyon tamponu (100 mM potasyum fosfat tamponu, 1 mM EDTA, pH: 7,0) ile buz üzerinde örneklerin homojenizasyonu gerçekleştirildi. Sonrasında örnekler

santrifüj edildi (10.000xg, 10 dk) ve supernatant elde edildi. Sonrasında hacim olarak 1:1 olacak şekilde %10 TCA çözeltisi süpernatantların üzerine eklendi ve vorteksleme işlemi gerçekleştirildi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek 22500xg'de 2 dakika tekrar santrifüje edildikten sonra elde edilen süpernatantlar ependorflara alındı. Daha sonrasında glutatyon seviyelerini belirlemek için reaksiyon ortamı pH:7,0 olacak şekilde 1 mM EDTA içeren 100 mM potasyum fosfat tamponu, 48 µM NADPH, 78 µM DTNB ve 0.115 U/ml glutatyon redüktaz enzimi içerecek şekilde hazırlandı. NADPH eklenerek reaksiyon başlatıldı ve reaksiyon sonucunda ortaya çıkan 2-nitro-5-tiyobenzoik asitin (TNB) 412 nm'deki absorbansı mikto-plaka okuyucuda ölçüldü ve GSH seviyeleri tespit edildi (68, 69). Doku lizatlarındaki glutatyon düzeyi yaş doku ağırlığına oranlanarak glutatyon düzeylerinin değerlendirilmesi yapıldı.

### **3.6. Histokimya Yönteminin Uygulanması**

Karaciğer doku kesitleri frozen kesit yöntemiyle alındı ve kesitlerin boyanması Hematoksilen&Eozin boyama yöntemi ile gerçekleştirildi.

#### **3.6.1. Frozen Kesit ve Hematoksilen&Eozin Boyama**

Kızaklı mikrotom kullanılarak, dondurularak sertleştirilmiş örnek dokular - 20°C sıcaklıkta kesilerek 5 µm kalınlığında kesitler elde edildi. Frozen kesitlerin elde edilmesinde kullanılan kriyostat-mikrotom Şekil 3.4.'de gösterilmiştir.

Hazırlanan kesitler lam üzerine alındı. Lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki frozen kesitlerin kuruması beklenildikten sonra Hematoksilen-Eozin (H&E) boya yöntemine geçildi. İlk olarak kesitler 15 dakika Hematoksilen boyasında bekletildi. Ardından sırasıyla su ve amonyaklı su ile yıkandıktan sonra 3 dk Eozin boyasında bekletildi. %80, %96 ve %96'lık olmak üzere 3 kez seri alkolden geçirildi ve kurutuldu. 20 dakika ksilende bekletildikten sonra Entellan kapatma medyumu ile kapatıldı. Üzerine pens yardımıyla baskı uygulanarak hava kabarcıkları yok edildi.



**Şekil 3.4.** Frozen kesitlerin elde edilmesinde kullanılan kriyostat mikrotom

### **3.6.2. Kesitlerin Görüntülenmesi ve Histokimyasal Değerlendirmeler**

Hematoksilen–Eozin uygulanan kesitler, LAS X programı kullanarak, Leica DM6B Upright ışık mikroskobu ile görüntülendi. Her doku örneğinden homojen olarak alınan 20 adet kesitin, Leica DFC7000T kamera kullanılarak fotoğrafları elde edildi. 10 ve/veya 20'lik büyütmede mikrometastazlar (>4 hücre) sayıldı ve toplam alana normalize edilerek mikrometastaz/mm<sup>2</sup> olarak hesaplandı.

### **3.7. İstatistiksel Analizler**

Bu çalışmada hem hücre ve hem de hayvan deneylerinden elde edilen verilerin istatiki olarak karşılaştırılabilmesi için GraphPad Prism uygulaması kullanıldı. Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi kullanılarak parametrik olmayan bağımsız çoklu grupların istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldı. Değerler P<0.05 olarak bulunduysa, bu grupların sahip olduğu farkın istatistiksel olarak anlam ifade ettiği kabul edildi.

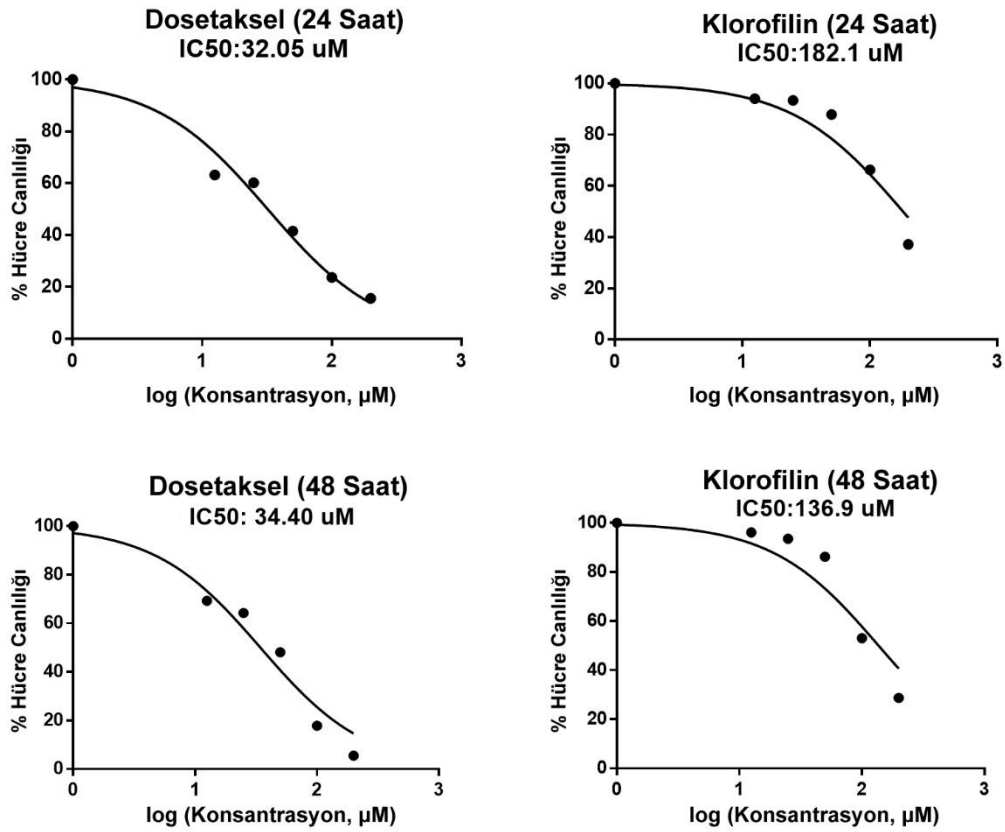
## 4.BULGULAR

### 4.1. Hücre Kültüründeki Çalışmalar

Bu çalışmada, antioksidan ve aynı zamanda GSTP1 inhibitörü olan klorofilinin meme kanseri metastazı üzerindeki etkileri araştırıldı. Hücre kültürü çalışması için kanser tedavisine dirençli üçlü (ER, PR, HER2) negatif olan 4T1 meme kanseri hücre hattı seçildi. Klorofilin ve kanser tedavisinde kullanılan dosetaksel, hem ayrı hem de kombine bir şekilde uygulanarak, bu grupların hücre canlılığı, hücre döngüsü ve hücre göçü üzerindeki etkileri araştırıldı.

#### 4.1.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Analizi

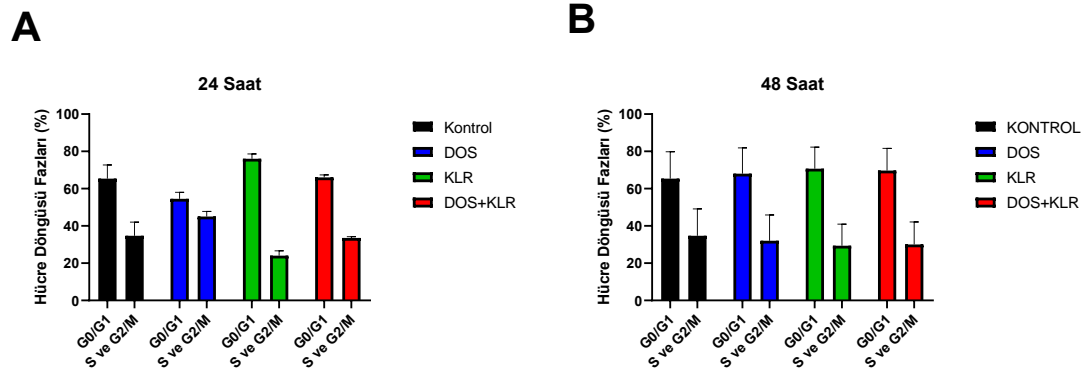
4T1 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda dosetaksel ve klorofilin uygulanarak hem 24 hem de 48 saat inkübasyonun ardından MTT yöntemi ile hücre canlılıkları tespit edildi. GraphPad Prism programı yardımıyla, uygulanan dosetaksel ve klorofilin dozlarına karşı, % hücre canlılığı değerleri kullanıldı ve IC50 değerleri hesaplandı (Şekil 4.1). Elde edilen IC50 değerlerine göre, dosetakselin 24 saat inkübasyon süresinde en yüksek etkinliği gösterdiği gözlemlenirken, klorofilinin ise 48 saat inkübasyon süresinde en yüksek etkinlik gösterdiği gözlemlendi. Daha sonra yapılan hücre kültürü çalışmalarında, dosetakselin 24 saat inkübasyon süreleri için uygulama dozu 32,05  $\mu\text{M}$  olarak belirlenirken, 48 saat inkübasyon süreleri içinse 34,04  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi. Bu nedenle, 4T1 hücre hattı için klorofilin uygulama dozu literatüre göre 50  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi (58).



**Şekil 4.1.** Dosetaksel ve klorofilinin 4T1 hücre hattı üzerindeki IC50 değerleri

#### 4.1.2. Akım Sitometri ile Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi

48 saatlik inkübasyonda ise hücrelere 34,4 μM Dosetaksel, 50 μM Klorofilin ve ikisinin kombinasyonu uygulandı. Daha sonra hücre döngüsü analizi için, hücre döngüsü fazları akım sitometri cihazında analiz edildi. Hem klorofilin hem de klorofilin ve dosetakselin kombine uygulandığı grupta kontrole göre sentez ve G2/M oranları azalsa da, farklı grupların 4T1 hücrelerinde hücre döngüsü fazlarına etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Şekil 4.2.'de farklı koşullardaki 4T1 hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı grafik olarak gösterilmekte olup, Tablo 4.1.'de ise 4T1 hücrelerinin hücre döngüsü fazlarının oranları gösterilmektedir.



**Şekil 4.2.** 4T1 hücrelerinde hücre döngüsündeki faz dağılımı: A)24 saat, B)48 saat. DOS: dosetaksel, KLR: klorofilin.

**Tablo 4.1.** Farklı grupların 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucunda 4T1 hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı. DOS: dosetaksel, KLR: klorofilin, S: sentez.

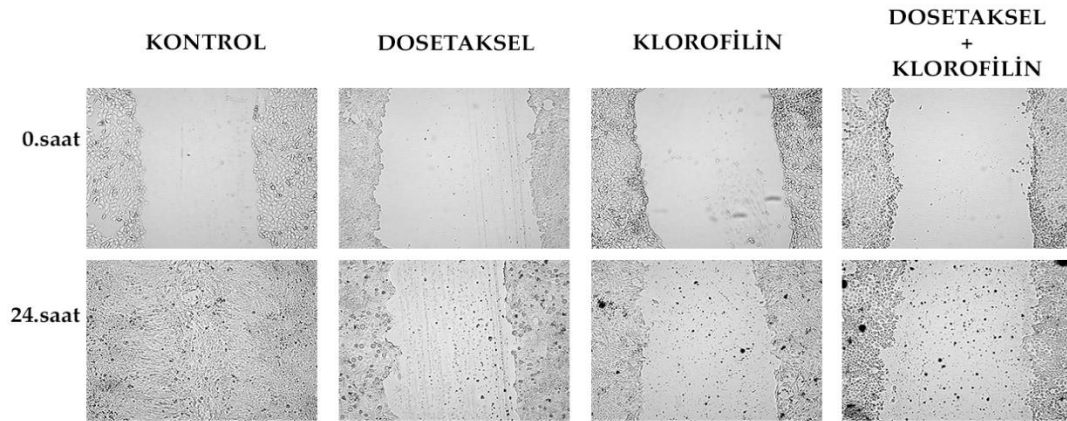
24 SAAT	G0/G1 Fazı (%) Ortalama±Standart Sapma	S ve G2/M Fazları (%) Ortalama±Standart Sapma
KONTROL	65,3±7,4	34,7±7,4
DOSETAKSEL	54,5±3,5	45±2,8
KLOROFİLİN	76±2,6	24±2,6
DOSETAKSEL+KLOROFİLİN	66±1,4	33,5±0,7
48 SAAT	G0/G1 Fazı (%) Ortalama±Standart Sapma	S ve G2/M Fazları (%) Ortalama±Standart Sapma
KONTROL	65,3±14,5	34,7±14,5
DOSETAKSEL	68±13,8	32±13,8
KLOROFİLİN	70,7±11,6	29,3±11,6
DOSETAKSEL+KLOROFİLİN	69,7±11,9	30±12,2

#### 4.1.3. Yara İyileşme Deneyi ile Hücre Göçünün Değerlendirilmesi

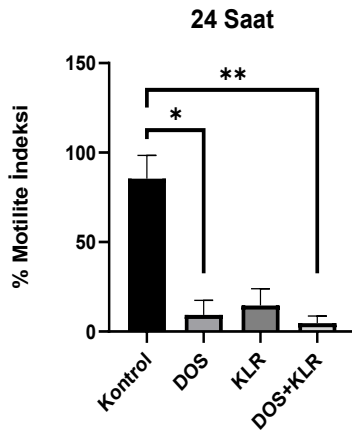
Yara modeli oluşturulan ve 32,05 µM Dosetaksel, 50 µM Klorofilin ve bu iki grubun kombinasyonu ile kültür edilen 4T1 hücrelerinde 0. saat ve 24. saatlerde mikroskop görüntüleri alındı. Alınan görüntüler arasında 0. ve 24. saatlere ait kapanma görüntüleri Şekil 4.3.'de verildi.

Şekildeki yara kapanma bölgelerinin alanı ImageJ programı ile belirlenerek, grupların 24 saat inkübasyonuna ait % motilite indeksleri hesaplandı ve grafik haline getirildi

(Şekil 4.4.) Yine 24. saate ait % motilite indekslerinin ortalaması, standart sapma değerleri ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri Tablo 4.2.'de gösterildi.



**Şekil 4.3.** 4T1 hücreleri ile yapılan migrasyon analizinin başlangıç ve 24. saat görüntüleri (10x büyütme)



**Şekil 4.4.** Başlangıç saati baz alınarak hesaplanan 24. saate ait % motilite indeksi grafiği. DOS: dosetaksel, KLR: klorofilin. \* p<0,05, \*\* p<0,01.

**Tablo 4.2.** 4T1 hücre hattında yapılan migrasyon deneyinin 24. saatine ait % motilite indeks verilerini ve istatistiksel anlamlılıklarını içeren tablo

GRUPLAR	Ortalama	Standart Sapma	p değeri
Kontrol	85	13,06	-
Dosetaksel (32,05 µM)	9	8,14	0,011*
Klorofilin (50 µM)	15	9,37	0,113
Dosetaksel+Klorofilin (32,05 µM+50 µM)	5	3,99	0,005**

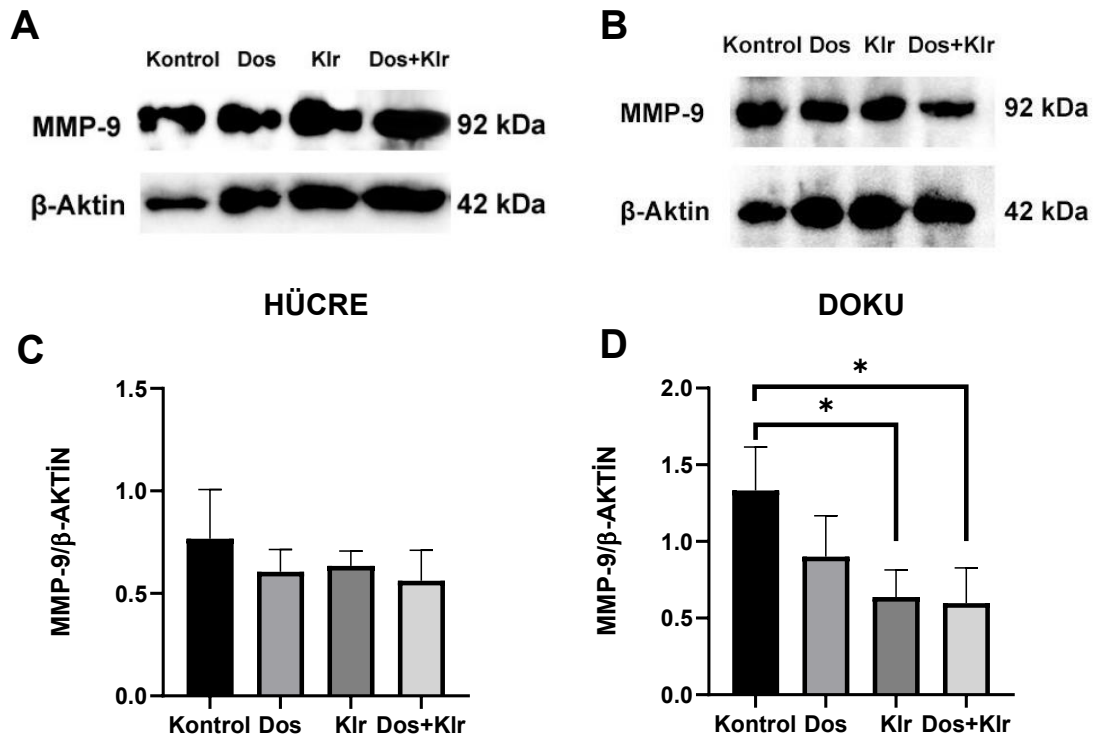
Grafik ve tabloda da belirtildiği gibi üç ayrı grupta da kontrol grubuna göre yara kapanma oranının ve hücrelerin migratif özelliklerinin azaldığı belirlendi. Ancak hücrelerin motilite indeksindeki bu azalma için klorofilinin tekli uygulandığı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken dosetaksel uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p<0,05$ ). Hücrelerin motilite indeksinin etkin şekilde azaldığı grup ise dosetaksel ve klorofilinin kombine uygulandığı grup olarak belirlendi ve motilite indeksinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturarak %80 azaldığı bulundu ( $p<0,01$ ).

## **4.2. Karaciğer Dokuları ve Hücre Lizatlarındaki Analizler**

### **4.2.1. Western Blot ile MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi**

Klorofilin, dosetaksel ve klorofilin+dosetaksel grupları için hücre ve doku örneklerindeki MMP-9 (Jelatinaz B) ekspresyonu Western blot yöntemi ile değerlendirildi. Western Blot bant görüntüleri ve MMP-9 Ekspresyonuna ait değerlendirmeler şekil 4.5.'de gösterildi. Ortalama ve standart sapma değerleri ise tablo 4.3.'de verildi. Hücre kültürü hattında yapılan analizlerde klorofilin, dosetaksel ve kombine tedavi uygulanan grup olmak üzere her üç grupta da MMP-9 ekspresyonunun kontrole göre azaldığı görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı (Şekil 4.5C) Karaciğer doku lizatlarında yapılan analizler sonucu ise dosetaksel grubundaki MMP-9 ekspresyonundaki azalış anlamlı bir fark oluşturmazken, hem klorofilin uygulanan hem de klorofilinin dosetaksel ile kombine uygulandığı grupta MMP-9 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.5D).





**Şekil 4.5.** Western Blot bant görüntüleri: A. 4T1 hücre hattı, B. Karaciğer dokusu. MMP-9 ekspresyon düzeyleri: C. 4T1 hücre hattı, D. Karaciğer dokusu. Dos: Dosetaksel, Klr: Klorofilin. \* p<0,05.

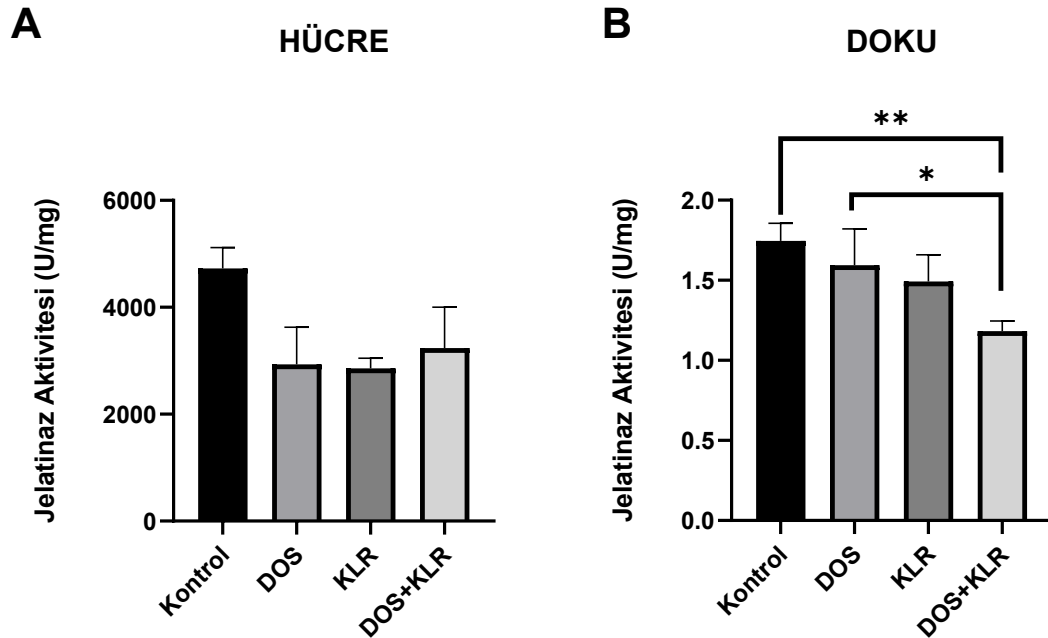
**Tablo 4.3.** MMP-9 Ekspresyon düzeylerine ait ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri

	Kontrol	Dosetaksel	Klorofilin	Dosetaksel+Klorofilin
<b>HÜCRE</b>	0,77 $\pm$ 0,24	0,61 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,07	0,56 $\pm$ 0,15
<b>DOKU</b>	1,33 $\pm$ 0,28	0,90 $\pm$ 0,27	0,64 $\pm$ 0,18	0,60 $\pm$ 0,23

#### 4.2.2. MMP-2/MMP-9 (Jelatinaz) Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

4T1 hücreleri ve karaciğer dokularındaki MMP-2/MMP-9 Jelatinaz aktivite değerleri Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Ortalama ve standart sapma değerleri ise Tablo 4.4.'de verilmiştir. Hem hücre hem de dokuda, kontrole göre her üç grupta da jelatinaz aktivitesinin azaldığı gözlemlendi ancak hücrede bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Dokulardaki jelatinaz aktivitesinin ise klorofilin ve dosetakselin

kombine uygulandığı grupta hem kontrole göre hem de dosetaksel ilacı uygulanan gruba göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,05$ ).



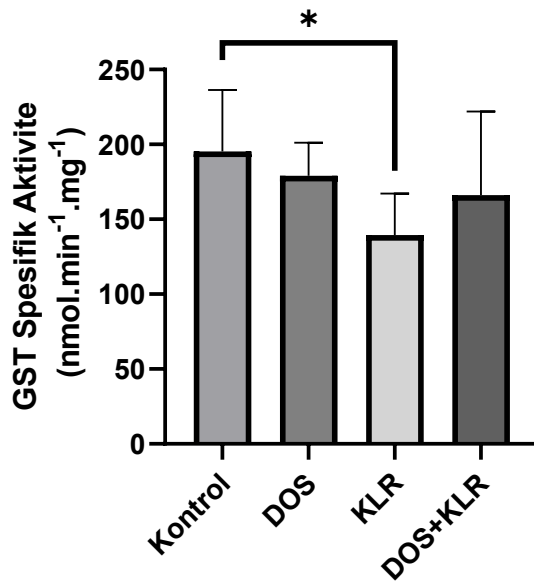
**Şekil 4.6.** 4T1 hücre hattında(A) ve karaciğer dokularında(B) farklı gruplara ait jelatinaz aktiviteleri DOS: Dosetaksel, KLR: Klorofilin. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .

**Tablo 4.4.** Farklı grupların jelatinaz aktivite (U/mg) sonuçlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri (ortalama±standart sapma)

	KONTROL	DOSETAKSEL	KLOROFİLİN	DOSETAKSEL+KLOROFİLİN
HÜCRE	1,750,11	1,59±0,23	1,49±0,17	1,18±0,06
	KONTROL	DOSETAKSEL	KLOROFİLİN	DOSETAKSEL+KLOROFİLİN
DOKU	4725,30±393,45	2933,67±695,22	2859,55±189,78	3237,33±763,72

#### 4.2.3. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Karaciğer dokularındaki Glutasyon S-transferaz (GST) aktivite değerleri Şekil 4.7.'de, ortalama ve standart sapma değerleri ise Tablo 4.6.'da verilmiştir. Dokularda tüm gruplarda GST aktivitesinin kontrole göre azaldığı gözlemlenirken, bu azalmanın klorofilin uygulanan grupta en yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ).



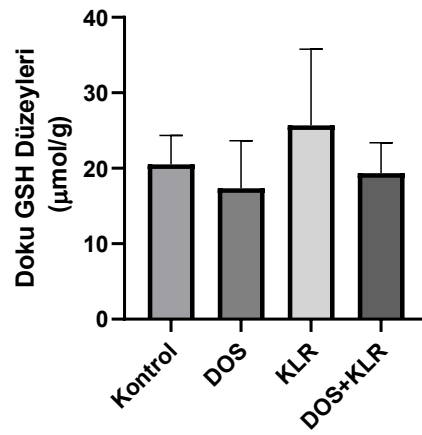
**Şekil 4.7.** Karaciğer dokusunda Glutatyon S-transferaz (GST) Aktivite düzeyleri. DOS: Doksetsel, KLR: Klorofilin. \*p<0,05.

**Tablo 4.5.** Farklı grupların Glutatyon S-transferaz Aktivite (nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) sonuçlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol	Doksetsel	Klorofilin	Doksetsel+Klorofilin
<b>DOKU</b>	195,29±40,96	178,99±22,16	139,55±27,69	166,07±55,97

#### 4.2.4. Glutatyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Karaciğer dokularında glutatyon (GSH) düzeyleri Şekil 4.8.'de, ortalama ve standart sapma değerleri ise Tablo 4.5.'de gösterilmektedir. Dokularda GSH düzeyleri kontrole göre klorofilin grubundistatistiksel olarak fark oluşturmayan bir artma gösterirken, dosetaksiel ve dosetaksiel ile klorofilinin kombine uygulandığı grupta anlamlı bir fark gözlemlenmedi.



**Şekil 4.8.** Karaciğer dokusunda glutasyon (GSH) düzeyleri. DOS: Dosetaksel, KLR: Klorofilin. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterildi.

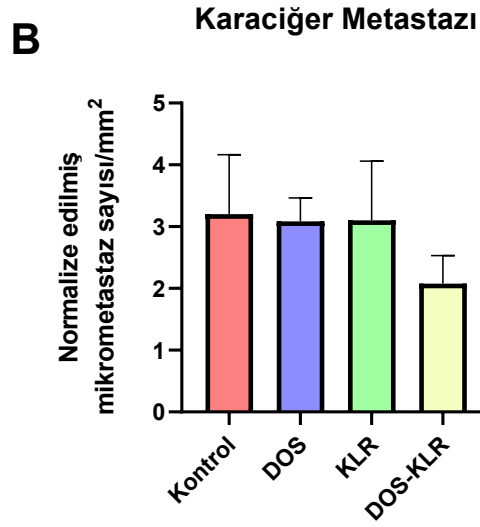
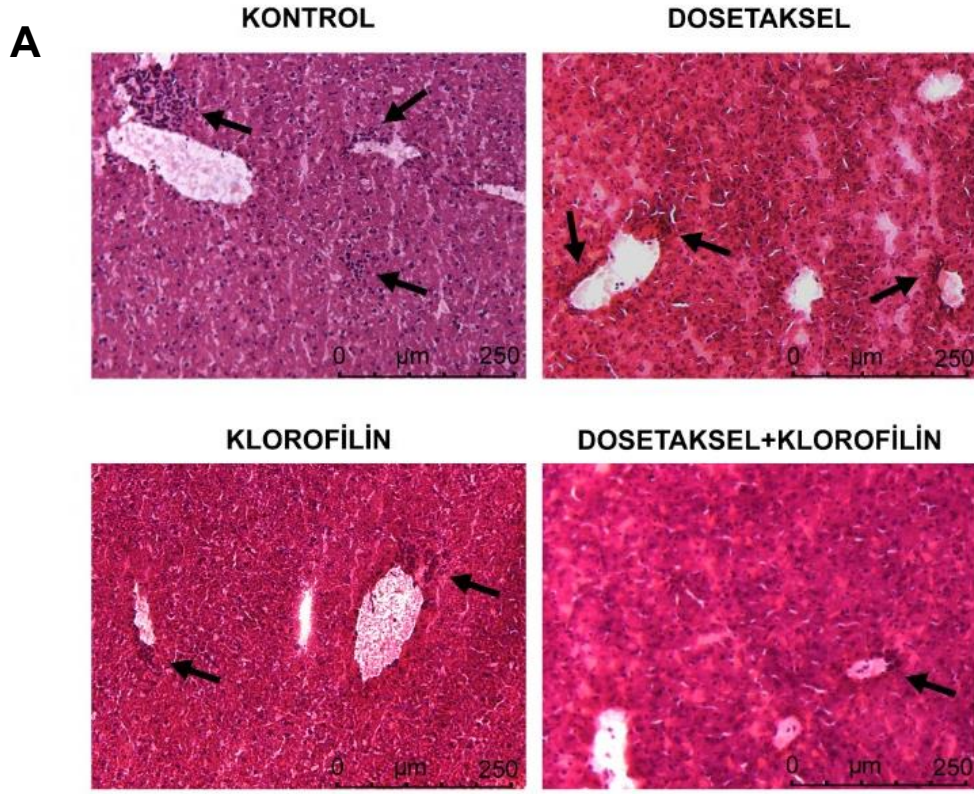
**Tablo 4.6.** Farklı grupların glutasyon (GSH) düzeylerine ait ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol	Dosetaksel	Klorofilin	Dosetaksel+Klorofilin
<b>DOKU</b>	20,52 $\pm$ 3,82	17,36 $\pm$ 6,29	25,68 $\pm$ 10,10	19,37 $\pm$ 4,03

### 4.3. Histokimya ile Karaciğer Metastazının Değerlendirilmesi

Karaciğer dokusundan alınan kesitlerin hematoxilen-eozin boyama sonucu görüntüleri ve bu dokulardaki mikrometastaz odaklarının düzeyi Şekil 4.9.'da, ortalama ve standart sapma değerleri ise Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Dosetaksel ya da klorofilin uygulanan grupta kontrol grubuna göre mikrometastaz odak sayılarında bir fark gözlemlenmezken, dosetaksel ve klorofilinin kombine uygulandığı tedavi grubunda mikrometastaz odak sayılarının azaldığı gözlemlenmiştir ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



**Şekil 4.9.** Karaciğerdeki mikrometastatik odak görüntüleri (A) ve sayıları (B). DOS: Dozetaksel, KLR: Klorofilin.

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri tedavisinde, hastalığın alt tiplerine göre farklı tedavi seçenekleri uygulanabilmektedir ve bu kanser alt tipleri arasında reseptör duyarlılığı olmayan üçlü negatif (ER, PR ve HER2 negatif) meme kanseri; heterojenitesi, agresif oluşu ve tedavi seçeneklerinin eksikliği nedeni ile en ölümcül olanıdır (4). Hormonal tedavi veya HER2'yi hedefleyen ilaç tedavilerine yanıt vermediği için ana ve tek tedavi olarak kemoterapi yöntemi uygulanmaktadır (5). Kemoterapi standart yöntem olmasına rağmen hastalarda sıklıkla ilaç direnci gelişmesi tedavi başarısı düşüren en büyük etmenlerdendir (4). Sıklıkla nüksetmesinin yanı sıra yüksek oranda metastatik özellik göstermesi kötü prognozdan ve de en önemlisi mortaliteden sorumludur. Bu çalışmada da oldukça agresif olan fare meme kanseri hücreleri (4T1 hücre hattı) ve aynı hücre hattı kullanılarak elde edilen deneysel hayvan modeli oluşturuldu ve klorofilin bileşiğinin meme kanseri metastazı üzerindeki etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak hedeflendi (70). Klorofilin bileşiğinin incelenme sebebi ise hem antioksidan bir bileşik olması hem de tümör hücrelerinde ekspresyon düzeyi artan ve ilaç direncinde rol alan Glutasyon S-transferaz P1 enziminin inhibisyonunda görev almasıdır (13, 14, 28, 58). Bu amaçla klorofilinin hem tek olarak uygulanmasının, hem de taksan grubu bir anti kanser ilaç olan dosetaksel ile birlikte uygulanmasının üçlü negatif meme kanseri metastazı üzerine etkileri incelendi (71). Bu bağlamda hücre canlılığı, hücre döngüsü ve migrasyon analizleri yapıldı. Ardından hem hücre hem doku lizatlarında metastazın en kritik basamaklarından biri olan invazyonda yer alan jelatinaz enzimlerinden MMP-9 ekspresyonu ve total jelatinaz (MMP-2 ve MMP-9) aktivitesi test edildi. Dokulardatotal Glutasyon S-transferaz aktivitesi ve GSH düzeyleri değerlendirildi. Son olarak deneysel hayvan modelinden elde edilen karaciğer dokularında, histokimyasal incelemeler yardımıyla mikrometastaz oluşumları değerlendirildi. Sonuç olarak, meme kanseri metastazında klorofilinin etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiş oldu.

Çalışmada, ilk olarak klorofilin ve dosetakselin 4T1 hücre canlılığı üzerinde etkilerini incelemek için MTT testi kullanıldı ve IC50 değerleri belirlendi. Dosetakselin

24 saat ve 48 saat inkübasyonuna ait IC50 değerleri sırasıyla 32,05 ve 34,4  $\mu\text{M}$  bulunurken, antioksidan bir bileşik olan klorofilinin IC50 değerleri oldukça yüksek (182,1  $\mu\text{M}$  ve 136,9  $\mu\text{M}$ ) düzeylerde bulundu. Literatürde klorofilin bileşiği yine çok agresif olan HT-1080 kanser hücre hattında denenmiş olup 50  $\mu\text{M}$  'a kadar hücre canlılığı veya proliferasyona etkisinin olmadığı gösterilmiştir (58). Bu çalışmada da literatüre uygun olarak klorofilinin uygulama dozu 50  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi.

Uygulama dozlarının belirlenmesinin ardından klorofilin ve dosetakselin hem ayrı ayrı hem de kombine kullanımlarının, hücre döngüsü faz dağılımlarına etkisi akım sitometrisi ile değerlendirildi. 24 saat ve 48 saat inkübasyonda kontrol grubunun S ve G2/M fazı hem klorofilin grubundan hem de klorofilinin kombine uygulandığı gruptan daha yüksektir. Tedavi gruplarında kontrole göre S ve G2/M fazının düşük olması, klorofilinin 4T1 hücre hattında antiproliferatif etki gösterebileceğini işaret etmektedir. Literatürde klorofilinin MCF-7 meme kanseri hücre hattında da G0/G1 fazını arttırdığını, G2/M fazını azalttığını ve antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir (38). Kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada da klorofilin ile muamelenin HCT116 kolon kanseri hücrelerinde hücre döngüsü arrestini sağladığı belirtilmektedir. Klorofilinin bu etkiyi; E2F1 ve E2F4 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak ve dolayısıyla önemli bir hücre döngüsü kontrol noktası olan G1/S kontrol basamağı inhibisyonunu sağlayarak gösterdiği ortaya koyulmuştur (72).

Kanser hücrelerinin migrasyonu uzak doku metastazları için kritik bir öneme sahiptir. Hücrenin hücre iskeletini yeniden düzenleme ve kendini ileri doğru itme yeteneği, çeşitli dokulara ulaşım ve invazyon basamaklarından çok daha önce gereklidir. Bir besin kaynağına (örneğin kan damarlarına) doğru hareket edemeyen hücreler muhtemelen hayatta kalamazlar. Bu sürecin önemi nedeniyle, bu çalışmada 4T1 hücrelerinde hücre migrasyonu analizi yapıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubunun motilite indeksi %85 iken, dosetaksel, klorofilin ve kombine uygulamada bu değerlerin sırasıyla %9, %15 ve %5 olduğu görülmektedir. Antikanser ilaç olan dosetaksel ve klorofilin tek başına hücre göçünü yavaşlatabiliyorken, kombine uygulandıklarında bu etkinin daha çok arttığı görülmektedir. Mevcut

ulaşılabilir literatürde klorofilinin anti kanser ilaçlarla kombine kullanımının hücre migrasyonuna etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmamaktadır. Ancak bu sonuçlar tekli olarak uygulanan klorofilin gibi bazı antioksidan ve/ya fitokimyasalların agresif hücre hatlarında migrasyonu azalttığını gösteren literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur (58, 73, 74). Metastatik özelliği yüksek olan HT-1080 fibrosarkom hücrelerinde yapılan bir çalışmada, klorofilinin doza bağımlı olarak hücre migrasyonunu azalttığı ve bu etkinin en çok bizim de çalışmamızda da kullandığımız 50 µM klorofilin uygulama dozunda gerçekleştiği gösterilmiştir (58).

Matriks metalloproteazlar (MMP'ler), ekstraselüler matriks ve bazal membranın degradasyonunda rol alan proteaz ailesine ait enzimler olup kanser hücre invazyonu ve metastazında anahtar faktörlerden birisidir (9). Birçok çalışma Jelatinaz B olarak da bilinen MMP-9'un meme kanserlerinde oldukça yüksek eksprese olduğunu göstermektedir (47, 48, 75). Buna paralel olarak, metastatik süreçleri kontrol altına alabilmek için MMP'leri hedefleyen inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik bir çok çalışma da bulunmaktadır (43). Western blot analizleri sonucu, hücre lizatlarında MMP-9 ekspresyonunun kontrole kıyasla tüm gruplarda azaldığı görülmektedir ancak bu azalmanın istatistiksel bir fark oluşturacak düzeyde değildir. Doku örnekleri incelendiğinde ise yine MMP-9 ekspresyonunun tüm gruplarda azalmış olduğu görülse de, klorofilin ve klorofilinin kombine uygulandığı grupta bu azalmanın oldukça yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada klorofilin içeren grupların MMP-9 ekspresyonunu azaltması, klorofilinin invazyonu azaltmada rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu sonuç, literatürde klorofilinin metastatik karaciğer kanserinde ve mide tümörlerinde MMP-9 ekspresyonunu ve invazyonu azalttığını gösteren çalışma sonuçlarıyla uyuşmaktadır (58, 76).

MMP'ler ilk olarak zimojen (inaktif pro enzim) formda sentezlenen proteaz enzimleridir ve aktivasyonları proteoliz ve ya çeşitli ajanlar aracılığıyla gerçekleşmektedir (77). Doğal doku inhibitörleri (TIMP'ler) aracılığıyla inaktif formda tutularak dokudaki aktiviteleri kontrol altında tutulmaktadır (54). Dolayısıyla MMP



ekspresyonunun yanı sıra TIMP'lere oranı veya aktivitenin de değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada hem hücre lizatlarında hem de hayvan modelinden elde edilen doku lizatlarında, jelatinaz (MMP-9 ve MMP-2) aktivitesi değerlendirildi. Hem hücrede hem de doku lizatlarında, tedavi gruplarında jelatinaz aktivitesinin düştüğü gözlemlenmektedir. Ancak jelatinaz aktivitesinde anlamlı düzeylerde bir düşüş sadece doku örneklerindeki klorofilin ve klorofilinin kombine uygulandığı grupta görülmektedir. Bu sonuçlar klorofilinin jelatinaz aktivitesini azaltarak, anti-invaziv ve anti-metastatik özellik gösterebileceğini öne sürmektedir. Literatürde klorofilinin MMP ekspresyonuna etkisini gösteren çalışmalar bulunsa da MMP enzim aktivitesi üzerine etkisi ve olası inhibisyon mekanizması ile ilgili bilgiler bulunmamaktadır (58, 78). Ancak literatürde reaktif oksijen türleri (ROS) gibi okside edici ajanların disülfid bağlarını kırarak MMP'lerin aktivasyonunda yer alabildiği bilgisi bulunmaktadır (54, 79). Dolayısıyla klorofilinin antioksidan özellik göstermesi, disülfid bağlarının oksidasyonunu engellediği için MMP aktivitesinde düşüşü sağlıyor olabilir. Sonuç olarak klorofilin hem jelatinaz B ekspresyonunu azalttığı hem de total jelatinaz aktivitesini düşürdüğü için invazyon ve metastazın önlenmesinde potansiyel bir role sahip olabilir. Pek çok kanser hücre hattında görüldüğü gibi meme kanseri hücrelerinde de GST enziminin ve glutatyonun yüksek oranda sentezlendiği rapor edilmiştir (80, 81). Klorofilinin ise GST enzimlerinden GSTP1'e spesifik bir inhibitör olduğu gösterilmiştir. Grubumuz tarafından daha önce yapılmış bir çalışmada, N-metil nitrozüre ile kimyasal olarak indüklenerek oluşturulmuş meme kanseri hayvan modelinde klorofilinin meme kanseri yayılımında yavaşlatıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (14). Bu çalışmada ise, klorofilin kullanımının meme kanseri kaynaklı karaciğer metastazı üzerindeki etkinliği araştırılmış olup, klorofilinin meme kanseri hücrelerinde migrasyonu ve MMP aktivitelerini azaltarak metastazı engelleyici yönde etkilerinin olduğu ortaya konuldu. Bu bağlamda, klorofilin uygulanan hayvanların karaciğer dokularında metastatik etkinin azalmasına paralel olarak GST aktivitelerinde düşüş tespit edilmiştir. Öte yandan, klorofilin GSTP1 inhibitörü özelliğine ek olarak antioksidan özelliği sayesinde, karaciğer dokusunda glutatyon düzeylerinin artmasında etkili olmuştur. Glutatyon düzeyinin artmasının dolaylı olarak MMP aktivitelerini azalttığı düşünülmektedir. Bunun nedeni ROS'ların enzim yapısındaki disülfid bağlarını yıkarak MMP enzimlerinin aktiveleşmesinde rol alabilmesidir (54, 79).

Klorofilinin ve glutatyonun antioksidan özelliği göz önüne alındığında, disülfid bağ oksidasyonunun engellenmesi üzerinden MMP aktivasyonunda azalma gözlemlenmesi olasıdır.

Kanser hücrelerinin sekonder bir alanda kolonize olması invazyon ve metastaz süreçleri ile gerçekleşmektedir. Başlangıçta bazal membranın ve civar dokuların invazyonu ile başlayan süreci, çevre kan ve lenf damarlarına kanser hücreleri tarafından gerçekleştirilen intravazyon adımı takip eder. Daha sonrasında ise vasküler sistemle uzak dokulara ulaşma, bu dokuların parenkimine ekstrasvazyon, mikrometastaz (küçük nodüller) oluşumu ve final olarak da bu mikrometastatik odakların kolonizasyon gerçekleştirerek makroskopik tümörler oluşturması adımı gözlenmektedir (82). Bu çalışmada dosetakselin, klorofilinin ve ikisinin kombine uygulanmasının; deneysel hayvan modeli kullanılarak oluşturulan meme kanserinde uzak doku metastazını değerlendirmek için karaciğer dokularında histokimyasal analizler yapılarak, oluşan mikrometastatik lezyonlar (>4 hücre) değerlendirildi (83). Literatüre uygun olarak yapılan değerlendirmede, kontrol grubunda (tedavi uygulanmamış kanser grubu) normalize edilmiş mikrometastatik odak sayısı; dosetaksel ve klorofilinin tekli uygulandığı gruplarda değişim göstermezken, kombine tedavide mikrometastatik odak sayılarında azalma görülmektedir. Bu veriler klorofilin ve dosetakselin kombine uygulanmasının mikrometastatik lezyon sayısını azaltmada rol alabileceğini göstermektedir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülebilmesi için daha büyük örnek gruplarında çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada dosetaksel, klorofilin ve iki bileşiğin kombine uygulanmasının agresif üçlü negatif meme kanserinde metastatik süreçler üzerine etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırıldı.

Sonuç olarak, klorofilin ve dosetakselin birlikte uygulanmasının meme kanseri hücrelerinde migrasyonu *in vitro* olarak önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edildi ( $p<0,01$ ). Yine klorofilinin tekli uygulanmasının dokularda MMP-9 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, dosetaksel ile birlikte uygulanmasında ise bu azalma etkisinin çok daha yüksek düzeylerde görüldüğü gözlemlendi. Buna ek olarak yine kombine tedavi uygulanan grupta, *in vivo* olarak analiz edilen toplam jelatinaz aktivitesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gözlemlendi. Bu sonuçlar kombine uygulanmış tedavi grubunda; metastazdaki ana süreçlerden olan migrasyon ve jelatinaz enzim ekspresyonu/aktivitesi ile karakterize olan invazyon basamağında bir inhibisyon olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla klorofilinin dosetaksel ilacı ile birlikte muamelesi metastatik süreçlerin kontrolünde potansiyel bir role sahip olabilir.

Çalışmada klorofilin yer alan gruplarda jelatinaz enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Bu etkinin klorofilinin sahip olduğu antioksidan özellik nedeniyle enzim içi disülfid bağlarının oksidasyonunu engelleyerek gerçekleştirmiş olabileceği düşünülmektedir. Klorofilinin dolaylı yoldan MMP'lerin jelatinaz aktiviteleri üzerindeki etkinliğinin daha detaylı araştırılması için ilave deneylere ihtiyaç vardır. Ayrıca, MMP'ler ilk olarak zimojen (inaktif pro enzim) formda sentezlenen proteaz enzimleridir ve aktivasyonları proteoliz ve/ya çeşitli ajanlar aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir. Dolayısıyla MMP ekspresyonunun yanı sıra TIMP'lere oranı veya aktivitenin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Yine yukarıdaki durumla paralel olarak antioksidan klorofilin bileşiği uygulanan grupta total Glutasyon (GSH) düzeylerinin *in vivo* olarak arttığı bulunmuştur. Yine klorofilin uygulanan grupta, kanser hücrelerinde ilaç direncinden

sorumlu olan Glutasyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesinin önemli ölçüde azalmış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hem antioksidan özellik gösteren hem de Glutasyon S-transferaz P1 (GSTP1) inhibitörü olan klorofilinin kanser tedavisinde metastazı azaltarak tedavi başarısını arttırabileceği fikrini desteklemektedir. Bu bulgular daha geniş deney gruplarıyla desteklenerek, konuyla ilgili ileriki klinik çalışmalara zemin oluşturabilir.

Son olarak, metastazın migrasyon ve invazyon basamakları incelendikten sonra uzak doku mikrometastazını *in vivo* incelemek amacıyla karaciğer dokularında mikrometastaz odakları sayıldı. Çalışma sonucunda klorofilin ve dosetakselin kombine uygulandığı grupta mikrometastatik lezyonların azaldığı bulundu. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan farkların anlamlı olup olmadığını irdelemek amacıyla örneklem sayısı ve/ya deneysel tekrar sayılarının arttırılması gerektiği öngörüldü.

Sonuç olarak üçlü negatif meme kanserinde ilaç direnci, tümör invazyonu ve uzak doku metastazına bağlı olarak tedavi başarısının oldukça düşük olduğu göz önüne alındığında ve çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda üçlü negatif meme kanseri tedavisinde klorofilinin dosetaksel ile kombine uygulanmasının migrasyon, invazyon ve metastaz süreçlerini azaltabileceğini düşünmekteyiz. Ancak meme kanseri tedavisinde olası pozitif rolünü değerlendirmek için ileri ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Liu SJ, Zhang M, Lu R, Li XY, Che GB. Sodium Copper Chlorophyllin Catalyzed Chemoselective Oxidation of Benzylic Alcohols and Diarylmethanes in Water. *Molecules*. 2018;23(8).
2. Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*. 2008;10 Suppl 1:S2.
3. Braithwaite D, Demb J, Henderson LM. Optimal breast cancer screening strategies for older women: current perspectives. *Clin Interv Aging*. 2016;11:111-25.
4. Nedeljkovic M, Damjanovic A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*. 2019;8(9).
5. Won KA, Spruck C. Triplenegative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. 2020;57(6):1245-61.
6. An J, Peng C, Tang H, Liu X, Peng F. New Advances in the Research of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17).
7. Peter Guengerich F, Chun YJ, Kim D, Gillam EM, Shimada T. Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutat Res*. 2003;523-524:173-82.
8. Wu Q, Siddharth S, Sharma D. Triple Negative Breast Cancer: A Mountain Yet to Be Scaled Despite the Triumphs. *Cancers (Basel)*. 2021;13(15).
9. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;43 Suppl:S42-51.
10. Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Front Pharmacol*. 2019;10:1614.
11. Rizeq B, Gupta I, Ilesanmi J, AlSafran M, Rahman MM, Ouhtit A. The Power of Phytochemicals Combination in Cancer Chemoprevention. *J Cancer*. 2020;11(15):4521-33.
12. Musdal Y, Hegazy UM, Aksoy Y, Mannervik B. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Chem Biol Interact*. 2013;205(1):53-62.
13. Ozcan M, Aydemir D, Bacanli M, Anlar HG, Ulusu NN, Aksoy Y. Protective Effects of Antioxidant Chlorophyllin in Chemically Induced Breast Cancer Model In vivo. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(12):4475-88.
14. Ozcan M, Esendagli G, Musdal Y, Canpınar H, Bacanli M, Anlar HG, et al. Dual actions of the antioxidant chlorophyllin, a glutathione transferase P1-1 inhibitor, in tumorigenesis and tumor progression. *J Cell Biochem*. 2018.

15. Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. StatPearls. Treasure Island (FL)2022.
16. Sancho-Garnier H, Colonna M. [Breast cancer epidemiology]. *Presse Med.* 2019;48(10):1076-84.
17. Roulot A, Hequet D, Guinebretiere JM, Vincent-Salomon A, Lerebours F, Dubot C, et al. Tumoral heterogeneity of breast cancer. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016;74(6):653-60.
18. Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *Breast J.* 2007;13(2):172-9.
19. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;13(4):215.
20. Hospital P. Breast Cancer Treatment Options [Internet] 2013 [Available from: <http://puhuahospital.com/treatments/cancer/breast>].
21. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA.* 2019;321(3):288-300.
22. Hwang ES, Lichtensztajn DY, Gomez SL, Fowble B, Clarke CA. Survival after lumpectomy and mastectomy for early stage invasive breast cancer: the effect of age and hormone receptor status. *Cancer.* 2013;119(7):1402-11.
23. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist.* 2018;23(5):556-65.
24. Guarneri V, Dieci MV, Conte P. Relapsed triple-negative breast cancer: challenges and treatment strategies. *Drugs.* 2013;73(12):1257-65.
25. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2016;8:93-107.
26. Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Front Pharmacol.* 2018;9:245.
27. Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int.* 2015;15:71.
28. Dong X, Yang Y, Zhou Y, Bi X, Zhao N, Zhang Z, et al. Glutathione S-transferases P1 protects breast cancer cell from adriamycin-induced cell death through promoting autophagy. *Cell Death Differ.* 2019;26(10):2086-99.
29. Whalen R, Boyer TD. Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis.* 1998;18(4):345-58.

30. Khalil S, Abbas O, Kibbi AG, Kurban M. Scabies in the age of increasing drug resistance. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11):e0005920.
31. Dong SC, Sha HH, Xu XY, Hu TM, Lou R, Li H, et al. Glutathione S-transferase pi: a potential role in antitumor therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:3535-47.
32. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369-75.
33. Tew KD, Dutta S, Schultz M. Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;26(2-3):91-104.
34. Dashwood RH. The importance of using pure chemicals in (anti) mutagenicity studies: chlorophyllin as a case in point. *Mutat Res*. 1997;381(2):283-6.
35. Kamat JP, Bloor KK, Devasagayam TP. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1487(2-3):113-27.
36. Kumar SS, Devasagayam TP, Bhushan B, Verma NC. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. *Free Radic Res*. 2001;35(5):563-74.
37. Breinholt V, Schimerlik M, Dashwood R, Bailey G. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chem Res Toxicol*. 1995;8(4):506-14.
38. Chiu LCM, Kong CKL, Ooi VEC. The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and Cyclin D1 depletion. *Int J Mol Med*. 2005;16(4):735-40.
39. Smith WA, Freeman JW, Gupta RC. Effect of chemopreventive agents on DNA adduction induced by the potent mammary carcinogen dibenzo[a,l]pyrene in the human breast cells MCF-7. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;480-481:97-108.
40. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
41. Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpakis DV, Kyriazopoulou V, Zaravinos A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:499.
42. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic Cancer Cell. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008;3(1):221-47.
43. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(6):1147-55.
44. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.

45. Jablonska-Trypuc A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177-83.
46. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la fa C, Ramirez-Acuna JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
47. Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)*. 2018;18(10).
48. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5865-70.
49. Tb\_kan T, Gönenç A, editors. *The Role of MMP-2 and MMP-9 in Breast Cancer* 2020.
50. Toth M, Sohail A, Fridman R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol*. 2012;878:121-35.
51. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(7):502-11.
52. Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*. 2003;24(2):157-202.
53. Jones GT. Matrix metalloproteinases in biologic samples. *Adv Clin Chem*. 2014;65:199-219.
54. Bağış YH. Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri Ve Adezyondaki Önemi. *Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2018;45(3):191-9.
55. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(1):9-34.
56. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1):55-63.
57. Prabst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hubner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1-17.
58. Roomi MW, Bhanap B, Niedzwiecki A, Rath M. Chlorophyllin Suppresses Growth, MMP Secretion, Invasion and Cell Migration of Fibrosarcoma Cell Line HT-1080. *Medical Research Archives*. 2018;6(12).
59. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbelaez P, Cruz JC, Munoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7):e0232565.



60. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-4.
61. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*. 1984;1:41-55.
62. Ramachandran PV, Mutlu AS, Wang MC. Label-free biomedical imaging of lipids by stimulated Raman scattering microscopy. *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;109:30 3 1- 3 17.
63. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:5-8.
64. Shen C-H. Chapter 8 - Quantification and Analysis of Proteins. In: Shen C-H, editor. *Diagnostic Molecular Biology*: Academic Press; 2019. p. 187-214.
65. Pabst MJ, Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J Biol Chem*. 1974;249(22):7140-7.
66. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249(22):7130-9.
67. Salbitani G, Bottone C, Carfagna S. Determination of Reduced and Total Glutathione Content in Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea*. *Bio Protoc*. 2017;7(13):e2372.
68. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem*. 1990;190(2):360-5.
69. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*. 1969;27(3):502-22.
70. Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. 2012;12:120.
71. Willson ML, Burke L, Ferguson T, Gherzi D, Nowak AK, Wilcken N. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;9:CD004421.
72. Chimpoy K, Diaz GD, Li Q, Carter O, Dashwood WM, Mathews CK, et al. E2F4 and ribonucleotide reductase mediate S-phase arrest in colon cancer cells treated with chlorophyllin. *Int J Cancer*. 2009;125(9):2086-94.

73. Dehghani S, Kooshafar Z, Almasirad A, Tahmasvand R, Moayer F, Muhammadnejad A, et al. A novel hydrazide compound exerts anti-metastatic effect against breast cancer. *Biol Res.* 2019;52(1):40.
74. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, et al. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci.* 2005;25(1):57-65.
75. Cao D, Polyak K, Halushka MK, Nassar H, Kouprina N, Iacobuzio-Donahue C, et al. Serial analysis of gene expression of lobular carcinoma in situ identifies down regulation of claudin 4 and overexpression of matrix metalloproteinase 9. *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R91.
76. Thiyagarajan P, Kavitha K, Thautam A, Dixit M, Nagini S. Dietary chlorophyllin abrogates TGFbeta signaling to modulate the hallmark capabilities of cancer in an animal model of forestomach carcinogenesis. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6725-37.
77. Rosenblum G, Meroueh S, Toth M, Fisher JF, Fridman R, Mobashery S, et al. Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a matrix metalloproteinase zymogen: challenging the cysteine switch dogma. *J Am Chem Soc.* 2007;129(44):13566-74.
78. Nagini S, Palitti F, Natarajan AT. Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. *Nutr Cancer.* 2015;67(2):203-11.
79. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: a critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;174(3):299-306.
80. Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 1994;54(16):4313-20.
81. Keith WN, Stallard S, Brown R. Expression of mdr1 and gst-pi in human breast tumours: comparison to in vitro chemosensitivity. *Br J Cancer.* 1990;61(5):712-6.
82. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
83. Madsen CD, Pedersen JT, Venning FA, Singh LB, Moeendarbary E, Charras G, et al. Hypoxia and loss of PHD2 inactivate stromal fibroblasts to decrease tumour stiffness and metastasis. *EMBO Rep.* 2015;16(10):1394-408.

## 8. EKLER

## EK-1: Bu tez çalışması için etik kurul kararı



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-53

30.03.2021

Prof. Dr. Yasemin AKSOY  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. AKSOY,

Kuruluma za sunmuş olduğunuz 26.02.2021 tarihli dilekçenizdeki beyanınız doğrultusunda, Kurulumuz 30.03.2021 tarihli toplantısında başvurunuzu değerlendirilmiş olup "*Antioksidan Uygulamasının Meme Kanseri Tedavisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı araştırma projenizde kullanılan farelerden elde ettiğiniz organ ve dokuları danışmanı olduğunuz Ayşe BURUŞ'un yüksek lisans tez çalışması olan "*Klorofilinin Meme Kanseri Kaynaklı Metastaz Üzerine Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı araştırma projenizde kullanmayı planladığınız anlaşılmaktadır. Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik Madde 8(8) k fıkrası HADYEK onayı gerektirmeyen durumları belirlemiş olup, bu fıkrasında 2 nci maddesinde "Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler" için HADYEK onayı gerekmediği açıkça belirtilmiştir. İlgili yasal düzenleme gereği araştırma projenizde kullanmayı planladığınız organ ve doku örnekleri için Etik Kurul onayı almanıza gerek olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı


EK :  
Toplantı Katılım Tutanağı

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ**

TOPLANTI TARİHİ VE SAATİ : 30.03.2021 (SALI)  
TOPLANTI SAATİ : 14.00  
TOPLANTI SAYISI : 2021/03  
KARAR NUMARASI : 2021/03-23

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Ornek BUKEN (Üye)	Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)
Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Prof. Dr. Abdullah ÇAKMAN (Üye)	Prof. Dr. Ersoy KONAR (Üye)
Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	Doç. Dr. Güray SOYDAN (Üye)	Doç. Dr. Mustafa ÖNBAŞILAR (Üye)
Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)	Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	Dr. Öğr. Üyesi Esin Akbay ÇETİN (Üye)
(İZİNLİ) Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

**EK-2: Turnitin dijital makbuz**



## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ayşe Buruş  
Ödev başlığı: Yüksek Lisans Tez  
Gönderi Başlığı: Ayşe Buruş Tez  
Dosya adı: in\_Meme\_Kaynakli\_Metastaz\_Uzerine\_Etkilerinin\_Arastirilma...  
Dosya boyutu: 4.78M  
Sayfa sayısı: 47  
Kelime sayısı: 8,659  
Karakter sayısı: 62,204  
Gönderim Tarihi: 05-Ağu-2022 03:49ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1879128643

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLOROFİLİNİN MEME KANSERİ KAYNAKLI METASTAZ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doç. Ayşe BURUŞ

Biyokimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA  
2022

Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

## EK-3: Turnitin orijinallik raporu

## Ayşe Buruş Tez

## ORJİNALLIK RAPORU

% <b>12</b>	% <b>11</b>	% <b>1</b>	% <b>2</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>6</b>
<b>2</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://acikerisim.ktu.edu.tr">acikerisim.ktu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://9lib.net">9lib.net</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://doczz.biz.tr">doczz.biz.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://docplayer.biz.tr">docplayer.biz.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<a href="http://tr.byvdev.com">tr.byvdev.com</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>9</b>	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>

## 9. ÖZGEÇMİŞ