

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

**ANTİOKSİDAN KULLANIMININ MEME KANSERİ TEDAVİSİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet ÖZCAN

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2021**

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

**ANTİOKSİDAN KULLANIMININ MEME KANSERİ TEDAVİSİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet ÖZCAN

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yasemin AKSOY**

**ANKARA
2021**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANTIÖKSİDAN KULLANIMININ MEME KANSERİ TEDAVİSİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Özcan

Danışman: Prof. Dr. Yasemin Aksoy

Bu tez çalışması 07.01.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Özden Tacal

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fak. Biyokimya A.D.

Üye:

Prof. Dr. Kamer Kılınç

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D

Üye:

Prof. Dr. İncilay Lay

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.

Üye:

Prof. Dr. Adil Mardinoğlu

*KTH Royal Institute of Technology School of Engineering Sciences
in Chemistry, Biotechnology and Health, Protein Science, Systems Biology*

Üye:

Prof. Dr. Güneş Esendağlı

Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji A.D.

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

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

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

20.01.2021

Mehmet Özcan

¹ ¹“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 **danışmanının** 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 **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı 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 **danışmanının** 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 AKSOY danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Mehmet ÖZCAN

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm eğitimim süresince göstermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı akademik çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında lisansüstü eğitimim boyunca göstermiş oldukları desteklerden dolayı Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı akademik çalışanlarına teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam, Prof. Dr. Yasemin Aksoy'a yürekten teşekkür ederim.

İsveç'teki çalışmalarım süresince, çalışmalarına titizlikle destek olarak bana tüm hayatım boyunca kullanabileceğim bilgileri kazandıran ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Adil Mardinoğlu ve çalışma ekibine gönülden teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan Prof. Dr. Kamer Kılınç ve Prof. Dr. Özden Tacal'a değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya ve deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, Doç. Dr. Hande Canpınar, Dr. Esra Büber, Dr. Süleyman Can Öztürk ve Dr. Gürcan Tunalı'ya teşekkür ederim. Ayrıca, tezimin istatistiksel çalışmalarında bana yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Sevilay Karahan'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, sevgi ve desteklerini benden hiç esirgemeyen çalışma arkadaşlarım ve kadim dostlarım Dr. Müslüm Gök, Dr. Yusuf Bayrakçeken, Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Çiçek, Dr. Seda Önder ve Dr. Ahmet Yalçınkaya'e teşekkür ederim.

Her şeyden önemlisi beni bu günlere getiren, her şeyi başarabileceğime inanan ve beni inandıran, sevgi ve özveri ile beni destekleyen, attığım her adımda benim yanımda olan, hep daha iyiye ulaşmamı dileyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: TDK-2018-17483); Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı; TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs programı; TÜBİTAK 2228-B Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Özcan, M. Antioksidan Kullanımının Meme Kanseri Tedavisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. Kemoterapiye karşı gelişen ilaç direnci kanser tedavisinin başarısını engelleyen temel etmenlerden biridir. Birçok kanser hücre dizisinde, Glutasyon S-transferaz enzim ailesinden, glutasyon S-transferaz P1 (GSTP1) izoziminin ekspresyon seviyesinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. GSTP1'in kemoterapötik ajanları glutasyon (GSH) konjugasyonu ile inaktive ederek ilaç direncini indüklediği ve ayrıca, apoptozda rol alan mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) kaskadının bir üyesi olan JNK1 (c-Jun N-terminal kinaz1)'in endojen inhibitörü olarak davrandığı bilinmektedir. Bu çalışma için seçilen klorofilin grubumuz tarafından GSTP1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiş ve aynı zamanda antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür. N-asetil sisteinin (NAC), GSTP1'in kosubstratı GSH'nun öncül molekülü olup antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür. Bu çalışmada, klorofilin ve NAC'in meme kanseri tedavisindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, tedaviye dirençli, üçlü (ER, PR, HER2) negatif olan 4T1 meme kanseri hücre hattı kullanılarak oluşturulan meme kanseri modelinde klorofilin, NAC ve kanser ilacı olan dosetakselin etkinlikleri *in vivo/in vitro* ve transkriptomik (*in silico*) olarak araştırıldı. Bu çalışmada, 4T1 hücre lizatları ve tümör dokularında GST aktivitesi, GSH düzeyi, JNK sinyal yolağı bileşeni olan c-Jun ile apoptotik bir protein olan p38 ve kaspaz 8-9'un düzeyleri araştırıldı. Kanser hücrelerinin apoptoz ve/veya proliferasyona yönelimlerini detaylı araştırmak için tümör dokularından elde edilen RNA dizileme verilerinin üzerinde transkriptomik analizler yapıldı. Sonuç olarak, klorofilin kanser tedavisinde kullanılan dosetakselin etkinliğini hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak önemli ölçüde artırdığı tespit edildi ($p < 0,05$). Transkriptomik çalışmanın sonucunda ise GSTP1 inhibitörü olan klorofilin ile dosetakselin birlikte uygulanmasının başta MAPK sinyal yolağı olmak üzere kanserle ilişkili baskılanmış birçok mekanizmanın (MAPK, Wnt, oksitosin sinyal yolakları ve otofaji) aktivasyonunu sağladığı tespit edildi. Ayrıca, ilaç direncinin baskılanmasıyla apoptotik sinyal yolaklarının aktivasyonuna karşın anti-apoptotik fosfolipaz D (FLD) sinyal yolağının da aktive olduğu saptandı. Bu nedenle, kanser tedavisinde ilaç direncinin yanında FLD sinyal yolağının yeni bir terapötik hedef olabileceği belirlendi. Bu çalışmada antioksidan özelliğe sahip GSTP1 inhibitörü olan klorofilinin meme kanseri tedavisinde ilaç direncini önleyici ve apoptozu indükleyici etkilerine karşın, NAC gibi antioksidanların apoptotik sinyal yolaklarını baskılayarak kanser tedavisinin prognozunu olumsuz yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Apoptoz, Glutasyon S-transferaz, İlaç Direnci, Klorofilin, Meme Kanseri, N-asetil sistein, RNA dizileme, Sistem Biyolojisi

Destekleyen Kuruluşlar: H.Ü. B.A.P. Proje No: TDK-2018-17483; Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı; TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı; TÜBİTAK 2228-B Doktora Burs Programı

ABSTRACT

Özcan, M. Investigation of The Effects of Antioxidant Use on Breast Cancer Treatment, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Programme Doctor of Philosophy Thesis, Ankara 2021. Drug resistance against chemotherapy is one of the main factors limiting the success of cancer treatment. Several studies have reported that the expression level of the glutathione S-transferase P1 (GSTP1) isozyme from glutathione S-transferases is increased in many cancer cell lines. GSTP1 induces drug resistance by inactivating chemotherapeutic agents with glutathione (GSH) conjugation and also acts as an endogenous inhibitor of JNK1 (c-Jun N-terminal kinase1), a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade involved in apoptosis. The chlorophyllin, an antioxidant molecule, has been shown to have an inhibitory effect on GSTP1 by our group. The antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) is the precursor molecule of GSH, the cosubstrate of GSTP1. This study aimed to investigate the effects of chlorophyllin and NAC on breast cancer treatment. For this purpose, the effects of chlorophyllin, NAC and an anti-cancer drug (docetaxel), were investigated in a breast cancer model created by using a treatment-resistant triple (ER, PR, HER2) negative 4T1 breast cancer cells *in vivo* / *in vitro* and transcriptomically (*in silico*). In this study, GST activity, GSH levels, JNK signaling pathway component c-Jun, and the apoptotic protein p38 and caspase 8-9 levels were also investigated in 4T1 cell lysates and tumor tissues. Transcriptomic analyzes were performed on RNA sequencing data obtained from tumor tissues to investigate the tendency of cancer cells to apoptosis and / or proliferation in detail. As a result, chlorophyllin significantly increased the effectiveness of docetaxel used in cancer treatment both *in vivo* and *in vitro* ($p < 0.05$). According to the transcriptomic study results, the combination of GSTP1 inhibitor chlorophyllin and docetaxel activated many cancer-related suppressed mechanisms MAPK, Wnt, oxytocin signaling pathways and autophagy. On the other hand, the anti-apoptotic phospholipase D (FLD) signaling pathway was also activated, despite the activation of apoptotic signaling pathways by suppressing drug resistance. Therefore, FLD signaling pathway could be a new therapeutic target in addition to drug resistance in cancer treatment. In this study, it was concluded that despite the anti-drug resistance and apoptosis-inducing effects of chlorophyllin, a GSTP1 inhibitor with antioxidant properties, in the treatment of breast cancer, antioxidant molecules such as NAC may negatively affect the prognosis of cancer treatment by suppressing apoptotic signaling pathways.

Keywords: Antioxidant, Apoptosis, Glutathione S-transferase, Drug Resistance, Chlorophyllin, Breast Cancer, N-acetyl cysteine, RNA sequencing, Systems Biology.

Supporting Organizations: H.U. Scientific Research and Projects Coordination Unit, Project No: TDK-2018-17483; Teaching Staff Training Program; TÜBİTAK 2214-A International Research Fellowship Program; TÜBİTAK 2228-B Ph.D Scholarship Program.

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	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri	3
2.3. Glutasyon S-Transferaz	5
2.3.1 Glutasyon S-Transferaz İnhibitörleri	7
2.3.2. Glutasyon Metabolizması	10
2.4. Apoptoz	11
2.4.1. Glutasyon S-transferazların Apoptozdaki Rolü	13
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	14
2.5.1. Antioksidanların Kanser Tedavisinde Kullanımı	15
2.6. Sistem Biyolojisi ve Biyoinformatik Çalışmalar	17
2.6.1 Transkriptomik Analizler	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Gereçler	19
3.2. Yöntemler	21
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	22
3.3.1. GSTP1 Ekspresyonunun Belirlenmesi	22
3.3.2. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi	23
3.3.3. Annexin V ile Erken Apoptozisin Belirlenmesi	24
3.4. Deney Hayvanları Çalışmaları	25

3.4.1 Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması	25
3.4.2. Hayvanların Takibi ve Sakrifikasyon İşlemleri	26
3.5. Tümör Dokuları ve Hücre Lizatlarındaki Analizler	26
3.5.1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	27
3.5.2. Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	27
3.5.3. c-Jun Düzeylerinin Belirlenmesi	29
3.5.4. p38 Düzeylerinin Belirlenmesi	29
3.5.5. Kaspaz 8 ve 9 Düzeylerinin Belirlenmesi	30
3.5.6. Protein Konsantrasyonlarının Tayini	31
3.6. Transkriptomik Analizler	31
3.6.1. RNA İzolasyonu	31
3.6.2. RIN (RNA Integrity Number) Skorunun Belirlenmesi	32
3.6.3. RNA Dizileme İşlemleri	33
3.6.4. RNA Dizileme Verilerinin Kantifikasyonu	34
3.6.5. Farklı Eksprese Olan Genlerin Analizi	35
3.6.6. Fonksiyonel Analizler	35
3.7. İstatiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	36
4.1.1. GSTP1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	36
4.1.2. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi	36
4.1.3. Annexin V ile Erken Apoptozisin Değerlendirilmesi	38
4.2. Deney Hayvanları Çalışmaları	39
4.3. Tümör Dokuları ve Hücre Lizatlarındaki Analizler	40
4.3.1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	40
4.3.2. Glutasyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	41
4.3.3. c-Jun Düzeylerinin Değerlendirilmesi	42
4.3.4. p38 Düzeylerinin Değerlendirilmesi	44
4.3.5. Kaspaz-8 Düzeylerinin Değerlendirilmesi	46
4.3.6. Kaspaz-9 Düzeylerinin Değerlendirilmesi	47
4.4. Transkriptomik Analizlerin Değerlendirilmesi	48
4.4.1. RIN (RNA Integrity Number) Skorlarının Değerlendirilmesi	48

4.4.2. Farklı Eksprese Olan Genlerin Analizi	51
4.4.3 Fonksiyonel Analiz Sonuçları	57
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
7. KAYNAKLAR	79

SİMGELER ve KISALTMALAR

ASK1	Apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1
BCA	Bisinkoninik asit yöntemi
BSA	Sığır serum albümini
CAT	Katalaz
cDNA	Komplemental DNA
CDNB	1-kloro-2,4- dinitrobenzen
DISC	Ölüm-indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dos	Dosetaksel
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu
DTNB	5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
ECL	“Enhanced” Kemiluminisans
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal sığır serumu
FLD	Fosfolipaz D
GO	Gen Ontolojisi
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GSTP1	Glutasyon S-tranferaz P1
GST	Glutasyon S-tranferaz
G6PDH	Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etansulfonik asit
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
H₂O₂	Hidrojen peroksit
İ.p.	İntraperitonal
JNK1	c-Jun N-terminal kinaz 1
JNK-GSTP1	c-Jun N-terminal kinaz 1 Glutasyon S-tranferaz P1

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
K₂HPO₄	Potasyum fosfat dibazik
K₃EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit tripotasyum
Klr	Klorofilin
Klr+Dos	Klorofilin ve dosetakselin birlikte uygulandığı grup
MAPK	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MAPEG	Eikosanoid ve glutasyon metabolizmasındaki membran bağımlı proteinler
MDR	Çoklu ilaç direnci
MNU	N-metil-N-nitrozüre
MTT	(3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
Na₂EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum
NAC	N-asetil sistein
NAC+Dos	N-asetil sistein ve dosetakselin birlikte uygulandığı grup
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaF	Sodyum florür
NaOH	Sodyum hidroksit
NBDHEX	7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol 6-merkaptohexanol
NCI	Uluslararası Kanser Enstitüsü
NGI	National Genomics Infrastructure
NGS	Yeni Nesil Dizileme
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
PR	Progesteron reseptörü
RNA	Ribonükleik asit
RIN	RNA Integrity Number
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SF	Serum fizyolojik
SKOV-3	İnsan over karsinoma hücrelerinde

SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikloroasetik asit
TEAM	Trietanolamin
TLK 117	γ -glutamil-S-(benzil)sisteinil-R(-)-fenilglisin
TLK 199	γ -glutamil-S-(benzil)sisteinil fenil glisil dietil ester
TNB	5-Merkapto-2-nitro benzoik asit
TRAF2	TNF reseptörüyle ilişkili faktör 2
UrPhg	TLK 177'nin bir analogu
4T1	Fare meme kanseri hücre hattı

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Dosetaksel ve Paklitakselin moleküler yapıları	5
2.2.	Glutatyon S-transferazın (GST) katalizlediği konjugasyon reaksiyonu ve ksenobiyotiklerin hücre dışına atılımı	6
2.3.	Glutatyon S-transferazın mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağındaki düzenleyici rolü	7
2.4.	Glutatyon molekülünden türetilmiş GSTP1 inhibitörleri	8
2.5.	Etakrinik asit ve NBDHEX'in moleküler yapıları	9
2.6.	Glutatyonun (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) moleküler yapısı	10
2.7.	Glutatyon ve ilişkili enzimler	11
2.8.	İntrinsik ve Ekstrinsik kaynaklı olarak apoptozun indüklenmesi	12
2.9.	Glutatyon S-transferazların apoptotik sinyal yolları üzerindeki etkileri	14
2.10.	Antioksidan savunma mekanizmaları	15
2.11.	N-asetil sisteinin hücre içine alınarak glutatyon molekülünün sentezlenmesi	16
2.12.	Klorofilinin molekül yapısı	17
3.1.	Deney akış diyagramı	22
3.2.	MTT bileşiğinin formazana dönüşümü	23
3.3.	Glutatyon-S-transferaz katalizlediği glutatyonun (GSH) elektrofilik CDNB'ye konjugasyonu	27
3.4.	Glutatyon ile DTNB'den TNB oluşum reaksiyonu	28
3.5.	RNA izolasyonu deney akış diyagramı	32

3.6.	(A) RNA Nano Chip elektroforez tabakası , (B) jel yayma aparatı	33
3.7.	RNA dizileme için kütüphane hazırlık aşamaları	34
4.1.	4T1 meme kanseri hücre hattında GSTP1 ekspresyonu	36
4.2.	Klorofilin ve dosetakselin 4T1 hücre hattındaki IC50 değerleri	37
4.3.	Ölü, canlı, erken ve geç apoptotik hücrelerin yüzdeleri	38
4.4.	Annexin V görüntüleri	39
4.5.	Zamana bağlı tümör çapı değişimleri	40
4.6.	Glutasyon s-transferaz (GST) aktiviteleri	41
4.7.	Glutasyon (GSH) düzeyleri	42
4.8.	Fosforillenmiş c-Jun düzeyleri	43
4.9.	Toplam c-Jun düzeyleri	43
4.10.	Fosforillenmiş / toplam c-Jun oranları	44
4.11.	Fosforillenmiş p38 düzeyleri	45
4.12.	Toplam p38 düzeyleri	45
4.13.	Fosforillenmiş / toplam p38 oranları	46
4.14.	Kaspaz-8 düzeyleri	47
4.15.	Kaspaz-9 düzeyleri	48
4.16.	RIN skorunun belirlenmesi için elde edilen elektroforez görüntüleri	50
4.17.	Klorofilin ve N-asetil sisteinin (NAC) meme kanseri tedavisindeki etkileri	69

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Meme kanseri alt gruplarının sınıflandırılması	4
3.1. Deney hayvanı grupları ve enjeksiyon uygulamaları	26
4.1. RIN skorları, RNA konsantrasyonları ve RNA saflık dereceleri	49
4.2. Gruplar arası farklı eksprese olan gen sayıları	51
4.3. Kontrol grubuna göre Klorofilin grubundaki gen ekspresyonu değişimleri	51
4.4. Kontrol grubuna göre N-asetil sistein grubundaki gen ekspresyonu değişimleri	52
4.5. Kontrol grubuna göre Dostaksel grubundaki gen ekspresyonu değişimleri	53
4.6. Kontrol grubuna göre Klorofilin + Dostaksel grubundaki gen ekspresyonu değişimleri	54
4.7. Kontrol grubuna göre N-asetil sistein + Dostaksel grubundaki gen ekspresyonu değişimleri	55
4.8. Kontrol grubuna göre Klorofilin grubunda aktive ve deaktive olan Yolaklar	57
4.9. Kontrol grubuna göre N-asetil sistein grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar	60
4.10. Kontrol grubuna göre Dostaksel grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar	60
4.11. Kontrol grubuna göre, Klorofilin+Dostaksel grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar	63
4.12. Kontrol grubuna göre, N-asetil sistein+Dostaksel grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar	66

- 4.13.** Fonksiyonel analizler sonuçlarına göre gruplar arasındaki aktive ve deaktive olan yollar

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak invaziv nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren, ölüm oranı yüksek olan hastalıklardan biridir. Kemoterapi, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlarının çoğu sitotoksik özellikleriyle kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını önlemektedirler. Antikanser ilaçlar yüksek toksik özellikleri nedeniyle sağlıklı doku ve hücrelere de hasar vermektedir. Bu nedenle, araştırmacılar antikanser ilaçların yan etkilerini azaltmak ve hedef hücredeki etkinliğini artırmak amacıyla daha spesifik inhibitör bileşikler geliştirmeye yönelmektedirler.

Meme kanseri, dünyada olduğu gibi, Türkiye'de de kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (1). Meme kanserinin gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığı ve ölüm oranları giderek artmaktadır (2). Pek çok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasına neden olan protein ekspresyonlarındaki değişiklikler terapötik hedef olarak gösterilmektedir. Literatürde kanser hücrelerinin kemoterapik ilaçlara karşı direnç geliştirmesinde glutatyon ve glutatyona bağlı enzim düzeylerinin değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Birçok kanser hücre dizisinde Glutatyon S-transferazların, özellikle de Glutatyon S-transferaz P1 (GSTP1) izoziminin aşırı üretildiği gösterilmiştir. GSTP1'in kemoterapötik ajanları glutatyon konjugasyonu ile inaktive ederek ilaç direncini indüklediği bilinmektedir (3-5). Bunun yanısıra, hücre canlılığında ve apoptotik sinyalde rol oynayan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağında da düzenleyici olarak görev almaktadır. MAPK yolağını protein-protein etkileşimi yoluyla düzenleyen GSTP1, apoptoz ve proliferasyonda rol alan JNK1'in endojen inhibitörü olarak davranmaktadır (6). Bu nedenlerle, GSTP1 inhibisyonu ile kemoterapik tedavilerin etkinliğinin artacağı düşünülmektedir. Bu çalışma için seçilen klorofilin grubumuz tarafından, GSTP1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiş aynı zamanda antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür (7). Ayrıca, klorofilinin N-metil nitrozüre ile indüklenmiş meme kanseri hayvan modelinde tümör oluşumunu geciktirdiğini, fakat tümör oluşuktan sonra tümör gelişimini hızlandırdığını gözlemledik (8, 9).

Hücresel yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürütmesine bağlıdır. Sistem biyolojisi bir organizmada genlerin, proteinlerin ve biyokimyasal reaksiyonların etkileşimli olarak birlikte incelemesini sağlayan multidisipliner bir bilim dalıdır (10). Bu bağlamda, sistem biyolojisi genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik bilimlerden faydalanmaktadır (11). Transkriptomik analizlerle, hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA'ları eş zamanlı olarak inceleyerek hücredeki gen ifadeleri hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Bir denek üzerindeki çevresel etkilere göre gen ifadelerindeki değişikliklerin ilişkilendirilmesi sistem biyolojisi yaklaşımıyla sağlanabilir.

Bu çalışmada, klorofilin ve GSTP1'in kosubstratı olan GSH'nun öncül molekülü N-asetil sisteinin (NAC) meme kanseri tedavisi üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla çalışmaya önce tedaviye dirençli olduğu bilinen üçlü (ER, PR, HER2) negatif olan 4T1 meme kanseri hücre hattında başlandı. Klorofilin ve NAC bileşiklerinin ayrı ayrı ve kanser ilacı dosetaksel ile birlikte kullanımlarının hücre canlılığı ve apoptozu üzerindeki etkileri araştırıldı. Ardından hayvan deneylerine geçildi ve 4T1 hücreleri dişi Balb/c farelerinin abdominal bölgesine subkütan olarak inoküle edilerek *in vivo* meme kanseri modeli oluşturuldu. Tümör oluşuktan sonra on gün boyunca klorofilin ve NAC bileşikleri ayrı ayrı ve dosetaksel ile beraber uygulandı. Deney sonunda hayvanlar sakrifiye edilip tümör dokuları alındı. Daha sonra, 4T1 hücre lizatları ve tümör dokularında GST aktivitesi, GSH düzeyleri, JNK sinyal yolağı bileşeni olan c-Jun ile apoptotik bir protein olan p38 ve kaspaz 8-9'un düzeyleri araştırıldı. Kanser hücrelerinin apoptoz ve/veya proliferasyona yönelimlerinin antioksidan moleküllerle ilişkisinin daha detaylı incelenmesi için tümör dokularından elde edilen RNA dizileme sonuçlarının üzerinde transkriptomik analizler yapıldı. Sonuç olarak, klorofilin ve NAC'in meme kanseri tedavisi üzerindeki etkileri *in vivo/vitro* ve transkriptomik olarak gösterildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına neden olan genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreçtir. Bu değişiklikler nedeniyle, kanser hücrelerinde proliferasyonu kontrol eden mekanizmalar bozulduğu için kanserli hücreler normal hücrelere göre çok daha hızlı çoğalırlar. Başka bir ifadeyle, normal hücrelerin çoğalması belli bir zaman sonra yavaşlayıp dururken, kanserli hücreler sürekli olarak çoğalmaya devam eder (12). Kanser hücreleri, buldukları bölgeden başka yerlere kan veya lenf damarları aracılığıyla ulaşarak metastaza neden olabilirler (13). Bu şekilde, vücudun değişik bölgelerine taşınan metastatik kanserli hücreler invazyon yaparak diğer organlara da zarar verebilirler. Taşındıkları yerlerde kanserli hücreler çoğaldıkça tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler (14). Malign tümörler genelde doğrudan yayılma, lenfatik ve kan dolaşım sistemleri yoluyla metastaz kabiliyetlerinden dolayı kötü bir prognoza sahiptir (15). Tümör hücreleri kendi büyüme hormonlarını sentezleyerek ve kendi kendilerine uyarılarak çoğalma kabiliyetine sahiptirler. Belirli bir yoğunluğa ulaşan normal hücrelerin çoğalmasını sınırlandıran kontak inhibisyonu mekanizması kanser hücrelerinde bozulmuş olup hücreler yan yana ve çok katmanlı olarak çoğalabilirler (16).

2.2. Meme Kanseri

Dünya’da en çok rastlanan kanser çeşitleri akciğer (% 11,6), meme (% 11,6) ve kolon (% 10,2) kanserleri olarak sıralanmaktadır (17). Meme kanseri, dünya genelinde ve Türkiye’de kadınlar arasında en sık tanısı konulan kanser türüdür. Görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kadınlarda ölüm nedenleri arasında da ikinci sırada yer almaktadır (18, 19). Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) verilerine göre her sekiz kadından birinde meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından birinin de meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (20). Yüksek görülme sıklığı ve mortalite oranlarından dolayı, meme kanseri tedavilerin geliştirilmesi ve etkinliğinin artırılması amacıyla pek çok çalışma yapılmaktadır.

Günümüzde meme kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapisi ve immünoterapi gibi çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Cerrahi yönteminde amaç tümörlü doku veya organın kesilip çıkarılmasıdır. Diğer yöntemlerde ise hedef doku veya organdaki kanser hücrelerinin öldürülmesidir (21). Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlarının çoğu sitotoksik özellikleriyle kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını önleyerek, ölmelerini sağlarlar. Antikanser ilaçlar yüksek toksik özellikleri nedeniyle sağlıklı doku ve hücrelere de hasar vermektedir. Bu nedenle, araştırmacılar antikanser ilaçların yan etkilerini azaltmak ve hedef hücredeki etkinliğini artırmak amacıyla daha spesifik inhibitör bileşikler geliştirmeye yönelmektedirler.

Meme kanseri, kompleks ve heterojen yapıya sahip bir hastalıktır. Bu nedenle, meme kanseri için uygulanacak tedaviler değerlendirilirken çeşitli sınıflandırmalar yapılmaktadır. Meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) ekspresyonlarına göre beş temel alt gruba ayrılır. Bu gruplar, luminal A, luminal B, bazal benzeri, düşük klaudinli ve HER2 pozitif olarak isimlendirilmektedir (Tablo 2.1) (22). Bazal benzeri ve düşük klaudinli meme kanseri alt grupları ER, PR ve HER2 ekspresyonları yönünden yoksun olduğu için üçlü negatif meme kanseri olarak da isimlendirilmektedir. Üçlü negatif meme kanseri özellikle hızlı çoğalma ve metastaz yapma özelliklerinden dolayı invazyon riski yüksek, sağkalımı kötü ve tedaviye dirençli olmasıyla bilinir (23, 24).

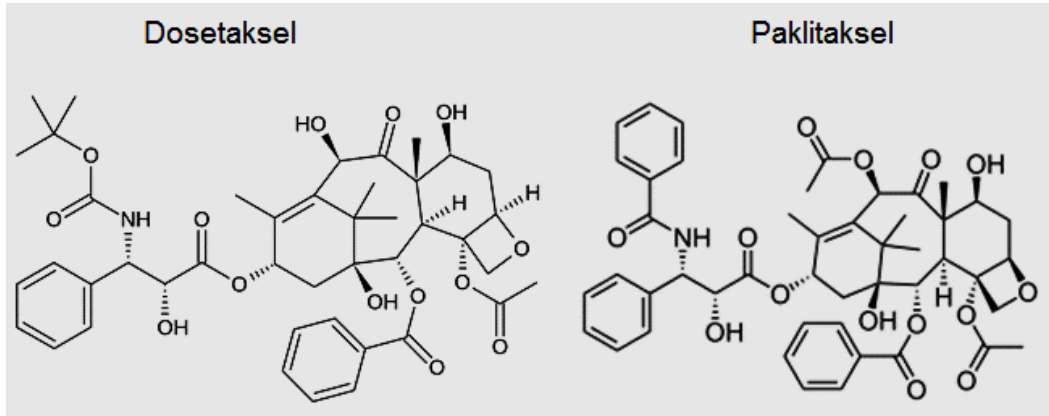
Tablo 2.1. Meme kanseri alt gruplarının sınıflandırılması.

Meme Kanseri grupları	Östrojen reseptörü (ER)	Progesteron reseptörü (PR)	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2)
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+
Bazal Benzeri	-	-	-
Düşük Klaudinli	-	-	-
HER2	-	-	+

Meme kanseri tedavisinde başarıya ulaşmak için alt gruplara özgü tedaviler uygulanmaktadır. ER ve/veya PR pozitif olan alt gruplarının tedavisinde kemoterapi ek olarak tamoksifen gibi ajanlar ile hormon tedavisi uygulanmaktadır. HER2 pozitif

olan meme kanseri alt gruplarının tedavisinde trastuzumab gibi HER2'ye bağlanarak bloke eden ilaçlar kullanılmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri alt grubu tedavisinde ise reseptör duyarlılığı söz konusu olmadığı için kemoterapi tek tedavi seçeneği olarak görülmektedir (25).

Meme kanserinin tedavisinde kullanılan taksan sınıfı bileşikler paklitaksel ve yarı sentetik türevi olan dosetaksel antitümör etkilerini, β -tübülün alt ünitelerine yüksek afinite ile bağlanarak, mitozun metafaz aşamasında mikrotübüllerin depolimerizasyonunu engelleyerek etkisini gösterir (26). Dosetaksel, paklitaksel'e göre hücre içine daha hızlı alınır ve hücre içinde daha uzun süre kalır. Bu özelliklerinden dolayı *in vivo* ve *in vitro* antitümör aktivite çalışmalarında dosetaksel'in paklitaksel'e göre 2-4 kat daha kuvvetli olduğu görülmüştür (26).



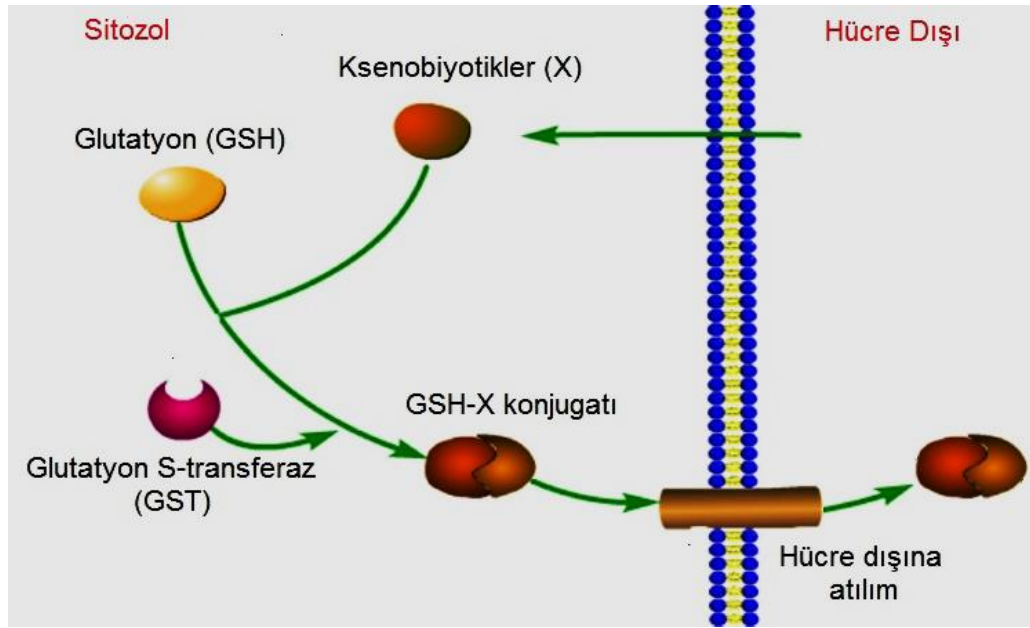
Şekil 2.1. Dosetaksel ve Paklitakselin moleküler yapıları

Birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde kemoterapiye karşı direnç gelişmektedir. Bu nedenle, ilaç direncini yenmek ve tedavinin etkinliğini artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde, hücrede detoksifikasyon mekanizmasından sorumlu olan glutatyon S-transferaz enzimi ve bu enzimin ksenobiyotik bileşiklerle konjugasyonunu katalizleyebilmesi için kullandığı glutatyon molekülü önem arz etmektedir (27, 28).

2.3. Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon S-transferazlar (GST; EC 2.5.1.18), endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu sağlayarak,

genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (Şekil 2.2) (29).



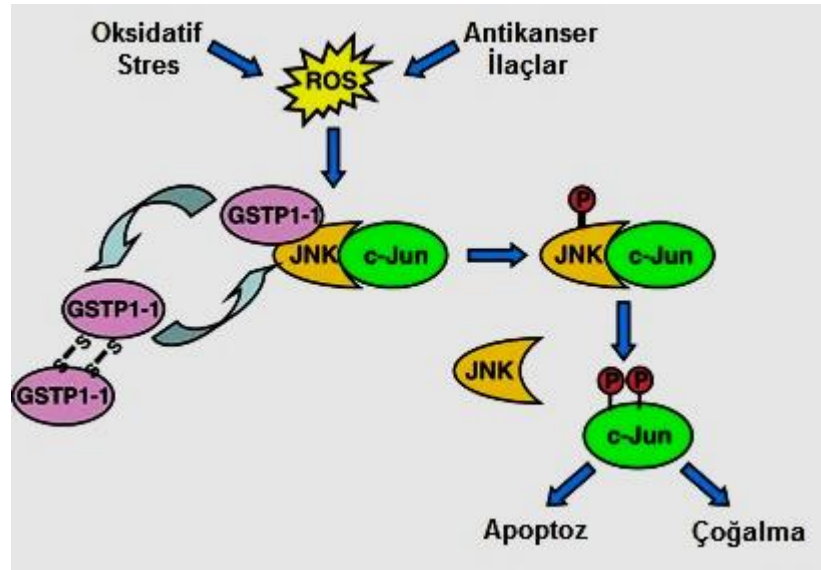
Şekil 2.2. Glutatyon S-transferazın (GST) katalizlediği konjugasyon reaksiyonu ve ksenobiyotiklerin hücre dışına atılımı (29).

Glutatyon S-transferazlar (GST), hücrede bulunduğu konuma göre, sitozolik, mitokondriyal ve mikrozomal (membran bağlı-MAPEG) olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır. Sitozolik GST'lerin, kimyasal özellikleri, amino asit diziliş benzerlikleri ve immünolojik reaktivitelerine göre alfa (α), mü (μ), pi (π), sigma (σ), teta (θ), zeta (ζ) ve omega (ω) olarak yedi farklı izozimi vardır (30, 31). GST'ler dimerik yapıda olup, her bir alt ünitesi yaklaşık 25 kD ağırlığındadır. Alt ünitelerinin her birinin yapısında iki farklı fonksiyonel bölge bulunur. GST'nin fizyolojik substratı GSH'ü bağlayan ve hidrofilik özellikte olan kısım G bölgesi; yapısal olarak farklı elektrofilik substratları bağlayan ve hidrofobik özellikte olan kısım ise H bölgesi olarak isimlendirilir. GST enzim ailesindeki farklı izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit dizilişlerinin farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğine neden olmaktadır (32).

Birçok kanser hücre dizisinde ve tümör dokusunda GSTP1'in ve glutatyonun (GSH) yüksek oranda üretildiği rapor edilmiştir(33). Tümörlerde GSH düzeyleri ve GSTP1 aktivitelerinin artması pekçok kanser ilacının hızlı bir şekilde detoksifiye

olmasına ve ilaçların tümör dokularında istenilen etkinliğe ulaşmasını engel olmaktadır. Bir başka ifadeyle, kanser tedavisinde ilaç direncini gelişimine neden olmaktadır (34).

GST'lerin katalitik etkilerinin yanında, hücre canlılığında ve apoptotik sinyalde rol oynayan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağında da düzenleyici olarak görev almaktadır (Şekil 2.3) (6). MAPK yolağını protein-protein etkileşimi yoluyla düzenleyen GSTP1, apoptoz ve proliferasyonda rol alan JNK1 (c-Jun N-terminal kinaz1)'in endojen inhibitörü olarak davranmaktadır. Oluşan JNK1-GSTP1 kompleksi JNK1'in etkinliğini azaltarak apoptozun baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (35, 36). Bu nedenlerle, GSTP1 inhibisyonu ile kemoterapik tedavilerin etkinliğinin artırmayı hedefleyen birçok bileşik geliştirilerek deneysel ve klinik çalışmalarda etkinlikleri araştırılmıştır (32, 37).

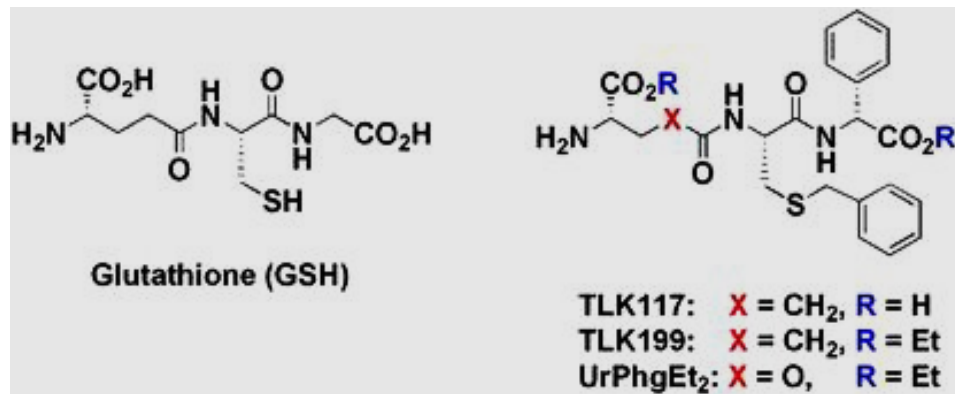


Şekil 2.3. Glutasyon S-transferazın mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağındaki düzenleyici rolü (6).

2.3.1. Glutasyon S-Tranferaz İnhibitörleri

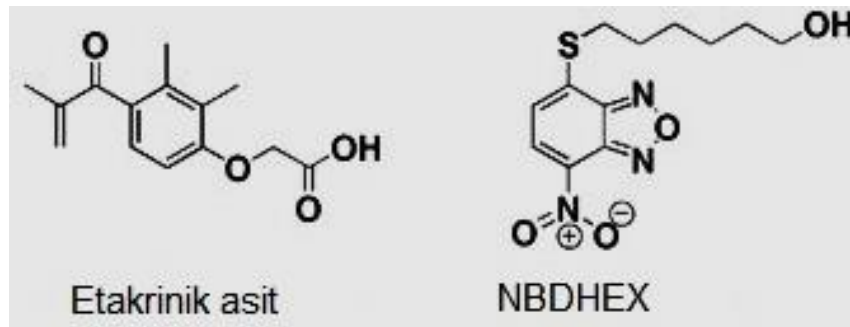
Kemoterapik tedavilerin etkinliğini artırmak için antikanser ilaçlara karşı gelişen hücre direncini hedef alan birçok glutasyon S-transferaz (GST) inhibitörü geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları yapı olarak GST'in substratı olan glutatyona (GSH) benzemektedir (Şekil 2.4). Peptidomimetikler veya GSH analogları olarak

adalandırılan bu bileşikler GSH'nun bağlanma bölgesine bağlanmak için yarıştıklarından dolayı kompetitif inhibitör olarak davranmaktadırlar. Bu tür inhibitörler ile izozim seçiciliğinin ve ilaç stabilitesinin artırılması hedeflenmektedir. Miyeloproliferatif bir ajan olan TLK 199 [γ -glutamil-S-(benzil) sisteinil fenil glisil dietil ester] bu amaçla sentezlenen bir bileşiktir. Yapılan bir çalışmada, TLK 199'un insan kolon adenokarsinoma (HT-29) ve insan over karsinoma hücrelerinde (SKOV-3) antikanser ilacı olan adriyamisin'in etkinliğini artırmasına karşın, başka bir kemotöröpötik ajan olan mitomisin C'ye karşı etkisiz olduğu tespit edilmiştir (38). Başka bir çalışmada TLK 199'un etil esterinin meme kanser hücrelerinde tiyotepa, sisplatin ve doksorubisin gibi çeşitli antikanser ilaçlarına karşı gelişen direnci bloke ederek kemoterapinin etkinliğini artırdığı rapor edilmiştir (39). Başka bir GSH analogu bileşiği olan TLK 117 [γ -glutamil-S-(benzil)sisteinil-R(-)-fenilglisin]'nin melfalan, klorambusil gibi antikanser ilaçlarının etkinliğini artırdığı bildirilmiştir (38). Öte yandan, GSH analogundan türetilmiş moleküller güçlü GST inhibitörleri olmasına rağmen gama-glutamiltranspeptidaz aracılı parçalanmaya karşı hassastırlar. Yapılan bir çalışmada, glutatyon türevi olan UrPhg-Et₂ isimli molekül içerisindeki peptid bağının özel yapısından dolayı gama-glutamiltranspeptidazlara karşı stabil olmasının yanında GSTP1'e spesifik bir inhibitör olduğu ve meme kanseri hücre hattında GSTP1 aracılı ilaç direncini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, kanser hücrelerine UrPhg-Et₂'e uygulanması, JNK aktivasyonuna yol açarak apoptozu indüklendiği saptanmıştır (39).



Şekil 2.4. Glutatyon molekülünden türetilmiş GSTP1 inhibitörleri

GSH türevlerinden üretilen GST inhibitörlerinin, yüksek inhibisyon özelliklerine rağmen, eksport pompaları aracılığıyla hücre dışına atılmalarından dolayı hücre içerisinde istenilen etkiyi gösteremedikleri ortaya sürülmüştür. Kanser hücrelerinde GSTP1 ekspresyonu oldukça fazla olduğu için hücre içerisinde GSTP1 inhibisyonunu sağlayacak GSH türevlerinden üretilmiş inhibitör bileşiklerin konsantrasyonun da yüksek olması durumunda istenilen etki sağlayabileceği düşünülmüştür. Ancak, yüksek konsantrasyonda uygulanacak inhibitörler hücrede çoklu ilaç direncini de (MDR) tetikleyebilmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek ve kemoterapötik tedavilerin etkisini artırmak için düşük dozda etkin olabilecek GST inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır (40, 41). Bu amaçla günümüze kadar benzoksazol, benzotiyazol türevleri gibi daha spesifik ve geri dönüşümsüz GST inhibitörleri tasarlanmıştır (42). Ayrıca, tasarlanan inhibitörler hücre içine girmesi kolaylaştırılmış ve ABC taşıyıcı pompaları tarafından atılması zorlaştırılmış yapıda olursa, hücre içerisinde daha uzun süre kalarak daha etkili olmaları sağlanabilir. Yapılan bir çalışmada, GSTP1 inhibitörü olduğu bilinen NBDHEX bileşiğinin (Şekil 2.5) çeşitli türevleri sentezlenerek çözünürlüğü ve GSTP1 spesifikliğı artırılmış ve bu sayede, kanser hücrelerindeki etkinliğı de artırılmıştır (43). Ayrıca, söz konusu bileşikler kanser hücrelerine uygulandığında JNK aktivasyonuna yol açarak apoptozu indükledikleri de rapor edilmiştir (44-46).



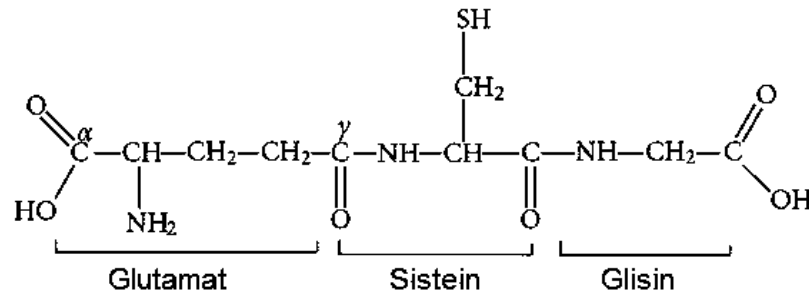
Şekil 2.5. Etakrinik asit ve NBDHEX'in moleküler yapıları.

Diüretik olarak kullanılan etakrinik asit (47) aynı zamanda GST inhibitörüdür (Şekil 2.4). Etakrinik asit, GSTP1'in H bölgesine zayıf etkileşimlerle bağlanabilmektedir. Bu bağlanma geri dönüşümlü olduğu için etakrinik asit ve glutatyon konjugatı şeklinde enzimden ayrılarak hücre dışına kolaylıkla

atılabilmektedir. Etakrinik asitin GST inhibisyon etkisini artırmak için çeşitli glutasyon konjugatları sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin kanser hücre hatlarında mitomisin, klorombusilin ve melfalan gibi antikanser ilaçlarının etkinliğini artırdığı tespit edilmiştir. Ancak etakrinik asit ile yapılan faz 1 çalışmalarında izozim spesifik olmaması, diüretik etkisinin olması ve hastalarda metabolik sorunlara yol açması nedeniyle etkinliği kısıtlı kalmıştır (34).

2.3.2. Glutasyon Metabolizması

Glutasyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) hücrenin antioksidan savunmasında görev alan bir tripeptiddir. Normal peptidlerden farklı olarak glutasyon molekülünün ortasında bulunan sistein amino asitinin amino grubu glutamatın karboksil grubu yerine yan zincirindeki γ karboksile bağlıdır (Şekil 2.6). Glutamat ve sistein arasındaki sıradışı olan bu bağ sayesinde glutasyon molekülü hücre içerisinde peptidazlara karşı korumaktadır. Glutasyon molekülü yapısında bulunan uç karboksil gruplarından dolayı iki negatif yük ve amino grubundan gelen bir pozitif yük sayesinde suda çözünebilir özelliğe sahiptir. Molekülün yapısında bulunan sistein kalıntısındaki tiyol grubu elektrofilik etkileşimlere açık pozisyonda olmasıyla molekül işlevsellik kazanmaktadır. Glutasyon molekülünün tiyol grubunun pKa'sı 9,2'dir (48).

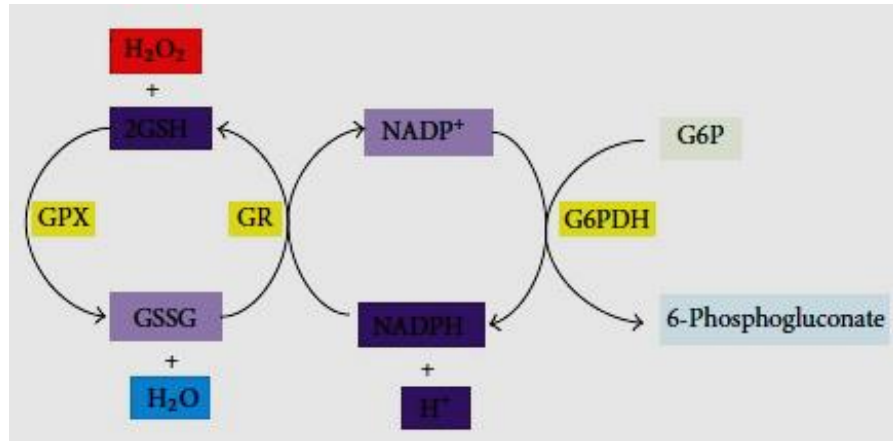


Şekil 2.6. Glutasyonun (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) moleküler yapısı

Hücrede glutasyon molekülü serbest ya da proteinlere bağlı halde bulunur. Serbest halde bulunan glutasyon büyük oranda redükte formda (GSH) bulunmaktadır. Oksidatif stres durumunda, glutasyon redükte formdan (GSH) okside forma (GSSG) dönüştürülür. Normalde memeli hücrelerinde, glutasyon konsantrasyonu 1-10 mM aralığında değişmektedir. Hücrelerde glutasyonun redükte ve okside formlarının oranı (GSH/GSSG) kritik öneme sahiptir. (27, 28). Bu nedenle hücredeki glutasyon

homeostazi biyosentez, oksidasyon, redüksiyon reaksiyonları ek olarak hücre içine alınımı ve atılımı dengesiyle sağlanmaktadır. (49).

Glutasyon, reaktif oksijen türlerini, serbest radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi zararlı moleküllerin etkisiz hale getirilmesinde kullanılır (Şekil 2.7). Glutasyon peroksidaz enzimi (GPx) aracılığıyla H_2O_2 molekülü ve redükte formda glutasyonun (GSH) reaksiyonu sonucu H_2O_2 moleküler suya (H_2O) yıkılırken, okside formda glutasyon (GSSG) oluşur. Daha sonra, okside formdaki glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enzimi (GR) aracılığıyla NADPH kullanılarak tekrar redükte formdaki glutatyon (GSH) dönüştürülür. NADPH rejenerasyonu glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) enzimi aracılığıyla sağlanır (27, 28, 50).



Şekil 2.7. Glutasyon ve ilişkili enzimler

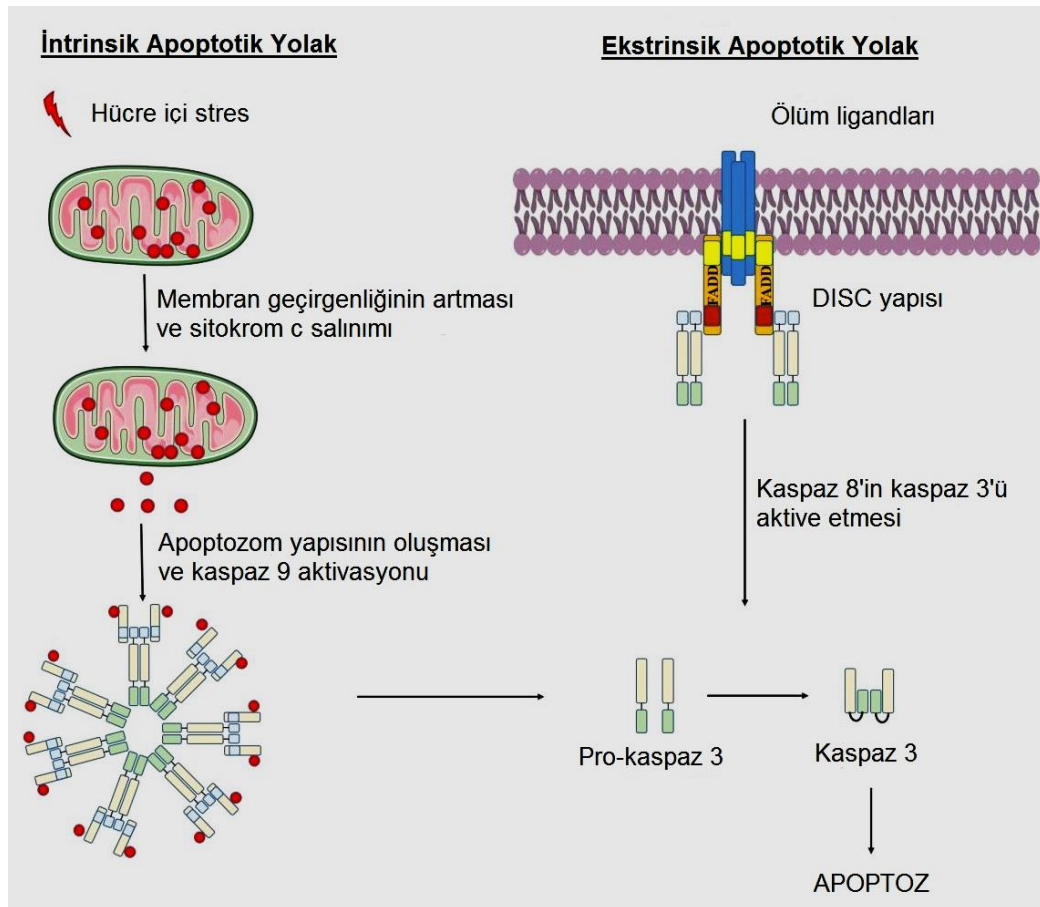
Hücre içersinde GSH, başta oksidatif strese karşı savunma olmak üzere pek çok role sahiptir. Glutasyon peroksidazlar ve bazı peroksiredoksinler aracılığıyla peroksitlerin indirgenmesinde ve glutasyon S-transferazlar aracılığı ile ksenobiyotiklerin konjugasyon tepkimelerine glutasyon substrat olarak kullanılmaktadır (50). Bu nedenlerle, GSTP1 gibi glutasyon da hücre canlılığı ve hücre ölümünü etkileyen süreçlerle direkt ya da dolaylı olarak ilişkilidir.

2.4. Apoptoz

Hücrelerin kontrollü olarak ölümü olarak tanımlanan apoptoz, hücre ölümü ve çoğalması arasındaki dengenin korunmasında önemli bir role sahiptir (51). Apoptozun baskılanması, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açarak başta kanser olmak üzere

birçok hastalığın oluşumunu tetikler (51-53). Farklı bir ifadeyle, kanser hücrelerinde genellikle apoptotik sinyal yolları baskılanmış durumdadır.

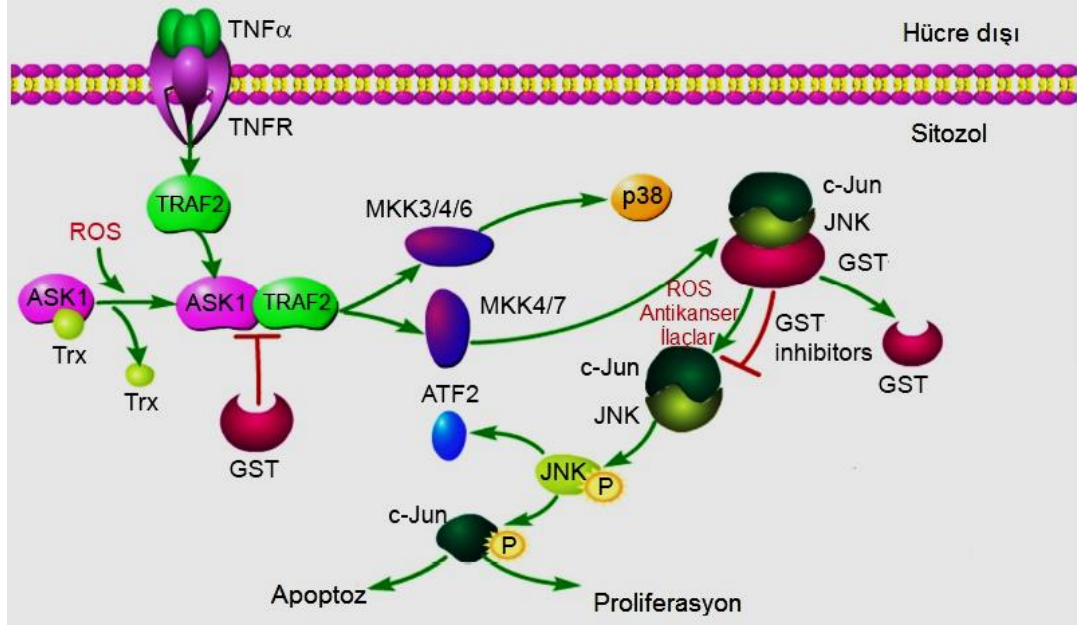
Apoptoz mekanizması iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) kaynaklı olmak üzere iki temel yolak tarafından aktive edilebilmektedir. İç ve dış kaynaklı sinyal yollarının aktivasyonunu takiben hücredeki ilgili kaspazlar aktive olur (Şekil 2.8). İntrinsik apoptoz yolağında, hücre içi stresten dolayı mitokondrinin membran geçirgenliği artar ve mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c molekülü salınır. Salınan sitokrom c molekülü apoptozom oluşumu ve kaspaz 9 aktivasyonunu tetikler. Aktifleşen kaspaz 9, kaspaz 3'ü aktifleştirir ve apoptoz indüklenir (54). Ekstrinsik apoptoz yolağı ise, gelişim sırasında işlevi biten hücrelerin veya kanser hücrelerinin kontrollü olarak öldürülmesi için aktive olur. Bunun için ölüm reseptörü ligandının bağlanması ile oluşan ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) kaspaz 8'i aktive eder. Aktifleşen kaspaz 8'in, kaspaz 3'ü aktifleştirmesiyle intrinsik apoptoz yolağının son basamağında olduğu gibi aktifleşen kaspaz 3 apoptozu indükler (55).



Şekil 2.8. İntrinsik ve ekstrinsik kaynaklı olarak apoptozun indüklenmesi

2.4.1. Glutasyon S-transferazların Apoptozdaki Rolü

Birçok kanser hücre dizisinde ve çeşitli tümör dokularında glutayon S-transferazların (GST) ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (33). GST'ler katalitik etkilerinin yanında, hücre canlılığında ve apoptotik sinyalde rol oynayan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağında da düzenleyici olarak görev almaktadır(6). MAPK yolağını protein-protein etkileşimi yoluyla düzenleyen GSTP1, apoptoz ve proliferasyonda rol alan JNK (c-Jun N-terminal kinaz) 'in endojen inhibitörü olarak davranmaktadır. Oluşan JNK-GSTP1 kompleksi JNK'in etkinliğini azaltarak apoptozun baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (35, 36). Diğer yandan antikanser ilaçlar hücreyi uyararak JNK aktivasyonunu sağlamaktayken GSTP1 antikanser ilaçları hem detoksifiye ederek hem de JNK aktivasyonunu engelleyerek apoptozun baskılanmasına neden olmaktadır (Şekil 2.9). Bunlara ek olarak, GSTP1'in, TNF reseptörüyle ilişkili faktör 2 (TRAF2) ile de etkileşimi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (29, 56). Kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen GSTP1, TRAF2 ve apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1 (ASK 1) arasındaki etkileşimi baskılayarak, TRAF2-ASK1 kompleksin'in indüklediği JNK ve p38-MAPK' apoptotik sinyal yollarının inhibisyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.6). Kanser hücrelerinde, GSTP1 inhibisyonu sağlanırsa antikanser ilaçların etkinliği artarak ve JNK aktivasyonu sayesinde c-Jun fosforilasyonunun sağlanmasına bu da bir transkripsiyon faktörü olan AP-1' aracılığıyla apoptotik genlerin indüklenmesine yol açacaktır.

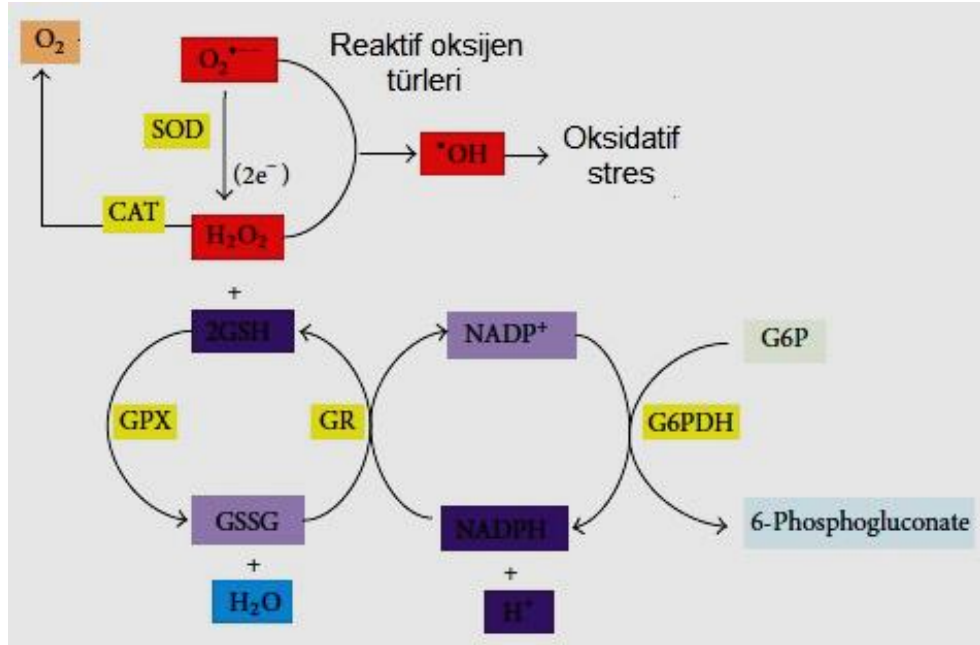


Şekil 2.9. Glutatyon S-transferazların apoptotik sinyal yolları üzerindeki etkileri (29).

Sitotoksik etki göstererek, JNK sinyal yolağı üzerinden kanser hücrelerini apoptoza yönlendiren antikanser ilaçlar (dosetaksel gibi antimikrotübül ilaçlar, topoizomeraz I ve II inhibitörleri, mitomisin C, adriyamisin ve sisplatin) için zaman içerisinde oluşabilecek ilaç direncini ortadan kaldırmada, GST inhibitörlerini beraberinde tedaviye sokmak yararlı olacaktır.

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi antioksidan savunma sistemleriyle sağlanabilir. İnsanda bulunan antioksidan savunma sistemini oluşturan elemanlar endojen veya eksojen kaynaklı olabilir. Endojen antioksidan savunma sisteminde antioksidan enzimler ve biyomoleküller görev alır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) enzimleri antioksidan savunma sisteminde görev alan enzimlerdir (Şekil 2.10) (57). Askorbik asit, lipoik asit, N-asetil sistein, polifenoller, organosülfürlü bileşikler, karotenoit ve klorofil gibi bitkisel moleküller beslenme yoluyla alınan antioksidan maddelerdir (58, 59).



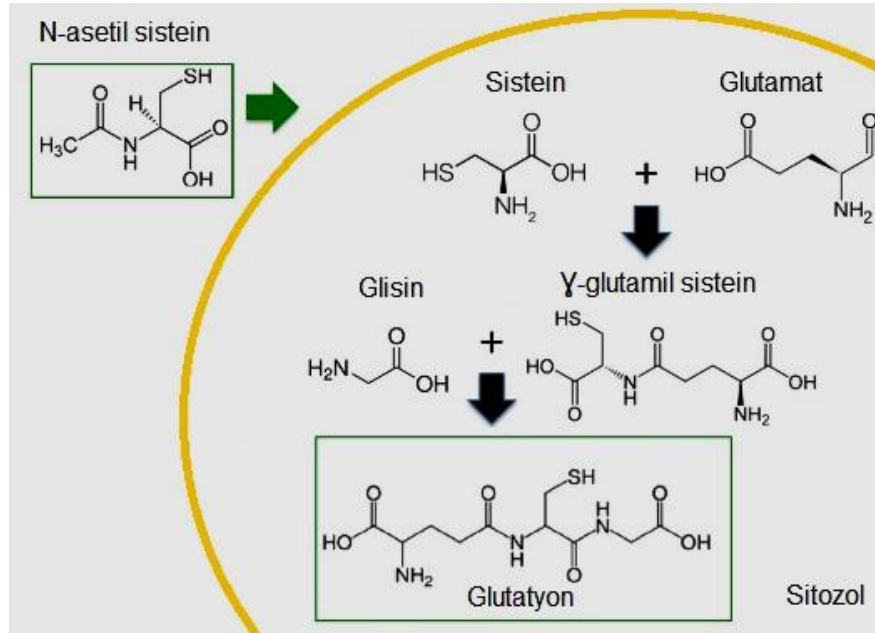
Şekil 2.10. Antioksidan savunma mekanizmaları.

2.5.1. Antioksidanların Kanser Tedavisinde Kullanımı

Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlarının çoğu sitotoksik özellikleriyle kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını önleyerek, ölmelerini sağlarken, yüksek toksik özellikleri nedeniyle sağlıklı doku ve hücrelere de hasar vermektedir. Antikanser ilaçların sağlıklı dokular üzerindeki toksik etkilerinin azaltılması için kemoterapi yanında antioksidan kullanımı yaygındır (60). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bilinenin aksine antioksidanlar kullanımının kanser tedavisini olumsuz yönde etkilediğini gösterilmektedir (61-63).

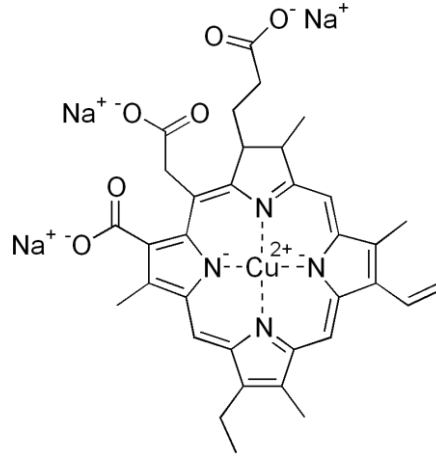
Glutasyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) hücrenin antioksidan savunmasında görev alan bir moleküldür. Tripeptid yapıda olan glutasyon molekülü büyüklüğünden dolayı dışarıdan takviye olarak hücre içerisine alınması mümkün değildir. Bunun yerine hücre içi glutasyon sentezinde hız kısıtlayıcı bir bileşen olan sistein için dışarıdan N-asetil sistein molekülünün (Şekil 2.11) hücrelere verilmesi glutasyon sentezini artırabilmektedir. Glutasyon sentezinin artmasıyla hücrelerin antioksidan savunma kapasitesi artmaktadır (64). Antioksidan kullanımının kanser tedavisindeki etkilerinin araştırılmasında NAC en çok kullanılan moleküllerden biridir. Antioksidan

kullanımının kanser tedavisi üzerine yapılan bazı çalışmalarda, NAC'in kanser oluşumunu ve gelişimini hızlandırarak metastazı artırdığı tespit edilmiştir (63, 65-67).



Şekil 2.11. N-asetil sisteinin hücre içine alınarak glutatyon molekülünün sentezlenmesi

Klorofil, çeşitli dalga boylarındaki ışınları absorblayarak bitkide fotosentez (özümleme) olayının gerçekleşmesini sağlayan, Mg^{+2} içeren, yeşil renkli biyolojik bir pigmenttir. Klorofilin (Klr.) ise klorofil molekülünden türetilmiş merkezinde bakır iyonu ve çevresinde dört pirol halkasından oluşmuş yarı sentetik antioksidan bir moleküldür (Şekil 2.12) (68). Klorofil ve türevi bileşikler gıdalarda renk ajanı, doğal gıda katkı maddesi ve yaraları iyileştirici özellikleri ile hem tıbbi hem de beslenme açısından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Klorofilin antimutajenik, antigenotoksik ve antikanserojenik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (68). Klorofilinin özellikle aflatoksin gibi çeşitli kanserojenlerin hedef dokudaki etkilerini azalttığı DNA hasarını önlediği ifade edilmektedir (69-72). Klorofilin grubumuz tarafından, GSTP1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiş aynı zamanda antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür (7). Daha önceki çalışmamızda klorofilinin meme kanseri hücre hatlarında proliferatif bir etkiye sahip olduğu, N-metil-nitrozüre ile indüklenmiş meme kanseri hayvan modelinde tümör oluşumunu geciktirdiğini, fakat tümör oluşuktan sonra tümör gelişimini hızlandırdığını gözlemledik (9).



Şekil 2.12. Klorofilinin molekül yapısı

2.6. Sistem Biyolojisi ve Biyoinformatik Çalışmalar

HücreSEL yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürütmesine bağlıdır. Sistem biyolojisi bir organizmada genlerin, proteinlerin ve biyokimyasal reaksiyonların etkileşimli olarak birlikte incelemesini sağlayan multidisipliner bir bilim dalıdır (8). Bu bağlamda, sistem biyolojisi genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik bilimlerden faydalanmaktadır (9).

Biyoinformatik, gelişen teknolojileri sayesinde elde edilen büyük çaptaki biyolojik verilerin depolanması, düzenlemesini ve analiz edilmesini sağlayan interdisipliner bir bilim dalıdır. Gelişen teknolojiler sayesinde elde edilen DNA, RNA ve protein verilerinin değerlendirilmesiyle omik bilimleri ortaya çıkmıştır. DNA (genomik), RNA (transkriptomik) ve protein dizilerinin (proteomik) içerikleri ve fonksiyonları araştırılarak, hastalıklara ve genetik bozukluklara çözüm üretmek biyoinformatiğin amaçlarından (72). Biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılan transkriptomik analizlerle, hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA'ları eş zamanlı olarak inceleyerek hücredeki gen ifadeleri hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Bir denek üzerindeki çevresel etkilere göre gen ifadelerindeki değişikliklerin ilişkilendirilmesi sistem biyolojisi yaklaşımıyla sağlanabilir.

2.6.1 Transkriptomik Analizler

Transkriptom, bir hücrenin veya hücreler grubunun belirli bir gelişim evresinde ya da belirli bir fizyolojik durumdaki eksprese edilen tüm transkriptlerini ifade eden bir terimdir. Transkriptomik analizlerle, gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin hastalık mekanizmaları olan ilişkisi araştırılmak için verilerin üretilmesinde “Microarray” ve RNA dizileme olarak iki temel yöntem uygulanmaktadır(73). RNA dizileme yönteminde daha kısa sürede daha çok veri üretilebildiği için daha çok tercih edilmektedir. (74).

RNA dizileme işlemlerinde, Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisi uygulanmaktadır. Bu yöntemde direkt olarak RNA üzerinde dizileme olmaz. RNA tek zinciri yapısı itibarıyla, DNA'ya göre daha kırılgan yapıdadır. Bu nedenle yeni nesil dizileme teknolojilerinde RNA'dan cDNA üretilerek dizileme işlemleri gerçekleştirilir. Böylece RNA dizileme yöntemiyle daha yüksek verimde transkriptom verisi elde edilebilir. RNA dizileme işlemleri tamamlandıktan sonra, transkriptlerin hangi gene ait olduğunu belirlemek için çalışılan türün referans genomu kullanılarak her bir genin ekspresyon düzeyleri kantifiye edilir (75). Deneysel gruplar arasındaki farklı eksprese olan genler belirlenerek bu farklılıkların nedenlerinin araştırılması transkriptomik analizlerin asıl amacını oluşturur. Bu amaç için farklı eksprese olan genler sınıflandırılarak deneysel gruplardaki oluşan değişikliklerin mekanistik ve işlevsel olarak hangi biyolojik sistemleri etkilediği tespit edilir. Gen setlerindeki değişiklikleri sınıflandırılması için Gen Ontolojisi (GO) analizi ve beraberinde, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanına dayalı olarak deneysel gruplar arasındaki farklılıkların metabolik ve sinyal yolları üzerindeki etkileri incelenir(76). Sonuç olarak, deneysel gruplar arasındaki transkriptomik farklılıklardan yola çıkılıp hastalığın oluşumunu etkileyen mekanizmaların aydınlatılması sağlanarak uygun tedavi yöntemleri önerilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 4T1 meme kanseri hücre dizisi Prof. Dr. Güneş Esendağlı Laboratuvarı'ndan (Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü) temin edildi. Deney hayvanları çalışmalarında kullanılan Balb/c fareleri Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan (Ankara, Türkiye) temin edildi. Fareler Dokuztuğ Yem Sanayii'nden temin edilen standart pellet yem ile beslendi. Farelerin bakımı ve deneysel uygulamalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirildi.

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan genel kimyasallar: Dimetil sulfoksit (DMSO), 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), Dosetaksel, Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu (D-PBS), Etil alkol (Etanol), Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (Na_2EDTA), Etilendiamin tetraasetik asit tripotasyum (K_3EDTA), Enhanced Kemilüminesans (ECL), Fenilmetilsülfonil florür (PMSF), Fetal sığır serumu (FBS), Fosfataz inhibitörü calyculin A, Redükte glutasyon (GSH), Glutasyon redüktaz (GR), GSTP1 için primer tavşan antikoru ve sekonder anti-IgG antikoru, HEPES, İzopraponal alkol, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Klorofilin bakır kompleksi sodyum tuzu (Klr.), L-glutamin, 2-merkaptotanol, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), N-asetil sistein, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), NP-40 deterjanı, Penisilin/streptomisin karışımı, Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4), Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4), PVDF membran (0.45 mikron), RPMI 1640 (RPMI) besiyeri, Fenol kırmızısı içermeyen RPMI besiyeri, Sodyum deoksikolat, Sodyum dodesil sülfat (SDS), Sodyum florür (NaF), Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum pirüvat, Trikloroasetik asit (TCA), Tris, Tripan mavisi, Tripsin-EDTA, Triton X-100, Tween 20 kimyasalları Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD); Trietanolamin (TEAM) ve Serine British Drug Houses Ltd. firmasından (Poole, İngiltere); İzotonik sodyum klorür çözeltisi Eczacıbaşı firmasından (İstanbul, Türkiye), Sığır serum albümini Bio-Rad firmasından (Hercules, CA, ABD), proteaz inhibitörleri karışımı içeren tabletler Roche firmasından (Upper Bavaria, Almanya) sağlandı.

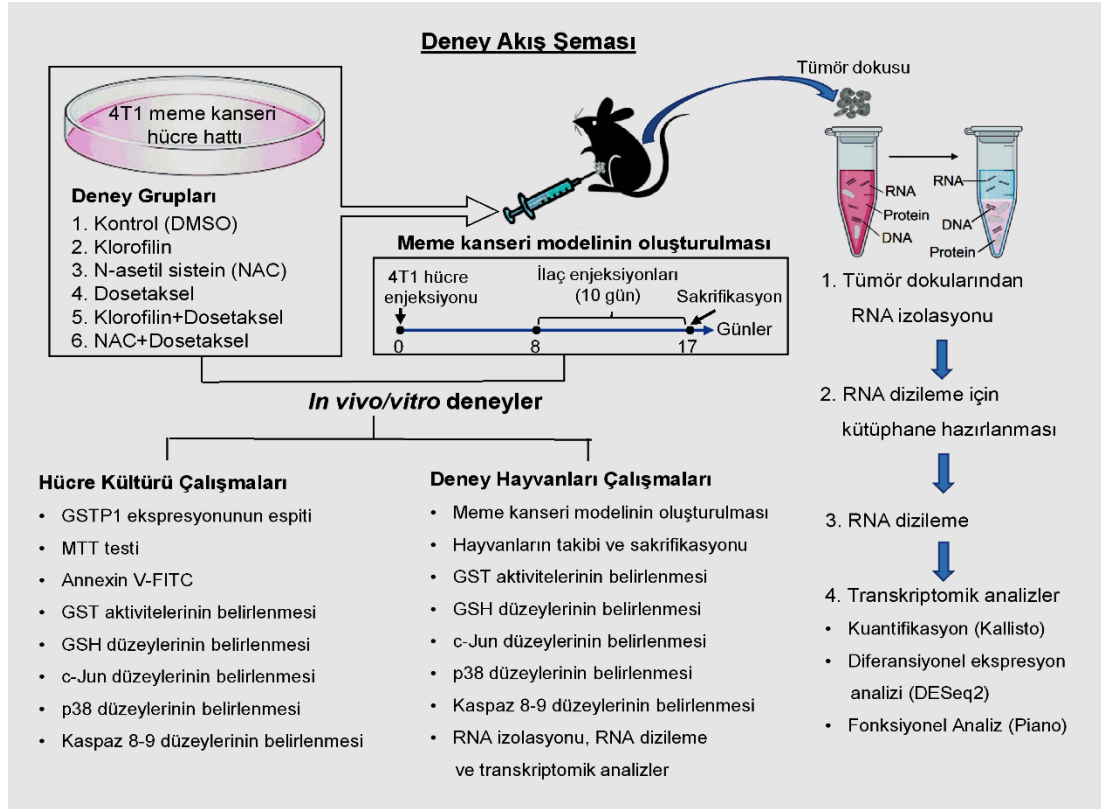
Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan kitler: FITC Annexin V Apoptosis Detection kiti BD Biosciences firmasından (San Jose, CA, USA), c-jun Elisa kiti (ab205708) ve p38 Elisa kiti (ab205708) Abcam firmasından (Cambridge, MA, USA), kaspaz 8 (SEA853Mu) ve kaspaz 9 (SEA627Mu) kitleri Cloud-Clone Corp firmasından (Katy, TX, USA), RNeasy kiti Qiagen firmasından (Hilden, Almanya) RNA 6000 Nano Assay kiti Agilent firmasından (Santa Clara, CA, USA), TruSeq Stranded mRNA kiti Illumina firmasından, (San Diego, CA, USA), BCA Protein Assay kiti Thermo Fisher Scientific Pierce Protein Research Products'tan (Rockford, IL, ABD), Bradford Protein Assay kiti Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD) temin edildi.

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan laboratuvar cihazları: RNA dizileme cihazı (NovaSeq 6000), Akım sitometresi (Beckman Coulter, Cytoflex), Biyoanalizör (Agilent 2100 Bioanalyzer), NanoDrop spektrofotometresi (Agilent), Homojenizatör (Qiagen Tissuelyser Lt Bead Mill), vortex (IKA) pH metre cihazı (Consort C830), Santrifüj cihazı (Eppendorf 5417R), Elektroforez güç kaynağı (Power Pack P25), Fast Semi-Dry Blotter (Thermo Scientific, Pierce), Yatay çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101), Analitik terazi (Mettler Toledo AG204), Mikro-plaka spektrofotometresi (Molecular Devices SpektraMax M2), Distile su cihazı (Nanopure Infinity), Derin dondurucu, -80°C (Sanyo), Manyetik karıştırıcı (Elektromag M-21), Mikropipetler (Gilson ve Eppendorf).

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan programlar ve veri tabanları: Kallisto programı ile RNA dizileme verileri kantifiye edildi. Balb/c fare türüne ait referans cDNA verisi www.ensembl.org web sitesinden dosyası indirildi. DESeq2 R paketiyle farklı eksprese edilen genler belirlendi. Piano paketinin fonksiyonlarıyla gen setlerindeki değişiklikleri istatistiksel olarak analiz edildi. Gen Ontolojisi ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanları kullanılarak fonksiyonel analizler yapıldı. Tüm transkriptomik analizler yapılırken R programlama dili kullanıldı. Deneysel verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için IBM SPSS 22 programı kullanıldı. Grafiklerin çizimi için GraphPad Prism (Version 6) kullanıldı.

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada, klorofilin ve N-asetil sisteinin (NAC) meme kanseri tedavisi üzerindeki etkileri *in vitro* / *in vivo* ve *in silico* (transkriptomik analiz) olarak araştırıldı (Şekil 3.1). Deney akış diyagramına göre, 4T1 meme kanseri hücre hattında klorofilin ve NAC moleküllerinin ayrı ayrı ve kanser ilacı dosetaksel ile birlikte kullanımlarının hücre canlılığı ve apoptozu üzerindeki etkileri araştırıldı. Daha sonra, 4T1 hücreleri dişi Balb/c farelerinin abdominal bölgesine subkütan olarak inoküle edilerek *in vivo* meme kanseri modeli oluşturuldu. Tümörler oluştuğundan sonra on gün boyunca klorofilin, NAC ve dosetaksel enjekte edildi. İlaç uygulamaları tamamlandıktan sonra tüm hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Tümör dokularının bir kısmı RNA izolasyonu için sıvı azot yardımıyla hızlı bir şekilde donduruldu. Alınan diğer dokular ise, soğuk serum fizyolojik (SF) ile yıkanarak yapılacak analizler için -80°C’de muhafaza edildi. Daha sonra 4T1 hücre lizatları ve tümör dokularında GST aktivitesi, GSH düzeyleri, JNK sinyal yolağı bileşeni olan c-Jun ile apoptotik bir protein olan p38 ve kaspaz 8-9’un düzeyleri araştırıldı. Kanser hücrelerinin apoptoz ve/veya proliferasyona yönelimlerinin antioksidan moleküllerle ilişkisinin detaylı incelenmesi için tümör dokularında RNA dizileme sonuçları üzerinde transkriptomik analizler yapıldı.



Şekil 3.1. Deney akış diyagramı.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda üçlü (ER, PR, HER2) negatif olan 4T1 meme kanseri hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattı %10 fetal dana serumu, 4mM L-glutamin ve penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) antibiyotik çözeltisi içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde kültüre edildi. Çalışmanın tüm aşamalarında hücreler 37°C’de %5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. Hücreler %80 yaygınlığa ulaştığında tripsin-EDTA yardımı ile kültür kaplarından kaldırılarak pasajlama işlemleri yapıldı.

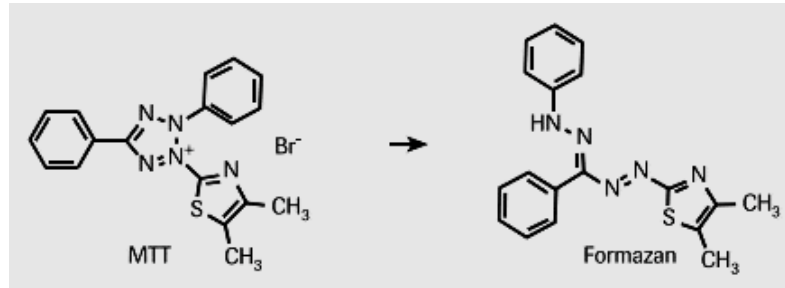
3.3.1. GSTP1 Ekspresyonunun Belirlenmesi

4T1 meme kanseri hücre hattında GSTP1 ekspresyonunun olup olmadığı western blot yöntemi ile test edildi. Bu amaçla, 4T1 hücreleri T25’lik flask içerisinde çoğaltıldıktan sonra hücrelerin üzerine 400 µl liziz çözeltisi (25 mM Tris-HCl (pH: 7,6), 150 mM NaCl, %1 NP-40, %1 sodyum deoksikolat, %0,1 SDS, 1X proteaz inhibitör kokteyli, 200 mM sodyum florür (NaF), 50 nM Calyculin A, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) eklendi ve 10 dk. inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin kazıyıcı (scraper) yardımıyla kazınarak flaskın tabanından kaldırılması sağlandı. Flasklardaki hücre

lizatları 20°C’de soğutulmuş olan 1.5 mL’lik tüplere aktarılarak santrifüj (10.000xg, 15 dk., +4°C) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak protein miktarı BCA (bisinkoninik asit yöntemi) ile ölçüldü. Protein ölçümünden sonra, örnekler her bir kuyuya 100 ug protein gelecek şekilde yükleme çözeltisiyle [160 mM Tris-HCl (pH: 6,8), %20 gliserol, 0.6 mM bromfenol mavisi, %10 SDS ve 1.4 M β-merkaptolanol] 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler %10’luk SDS-poliakrilamid jel elektroforezine yüklenerek 100 volta 1 saat süreyle yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrasında proteinleri membrana aktarmak için etanolle ıslatılarak aktive edilmiş PVDF membranlar (0.45 mikron) kullanıldı. Proteinler 25 volt 10 dakika süreyle Fast Semi-Dry Blotter (Thermo Scientific, Pierce) cihazı yardımıyla membrana aktarıldı. Daha sonra membran %5 süt tozu içeren PBS-Tween 20 (PBS-T; %0,1) ile 1 saat bloke edildi. Membran GSTP1 için primer tavşan antikoru (1:1000) ile bir gece ve ertesi gün sekonder anti-IgG antikoru (1:2500) ile 1 saat inkübe edildi. Döngüler arasında 3 kez 10’ar dakika süreyle PBS-T ile yıkama yapıldı. Protein bantlarının görüntülenmesinde Enhanced Kemilüminesans (ECL) kullanıldı.

3.3.2. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) besiyeri ortamında çözülebilen sarı renkte bir tetrazolyum tuzudur (77). Bu bileşik, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimi aktivitesi ile tetrazolyum halkasının kırılması sonucu, mor renkli formazan kristallerine dönüşür (Şekil 3.2). Oluşan formazan bileşiği miktarı 570 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülerek hücrelerin canlılıkları test edilir.



Şekil 3.2. MTT bileşiğinin formazana dönüşümü.

Bu çalışmada, klorofilin ve dosetaksel bileşiklerin 4T1 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle test edildi (78). Bu amaçla, 4x10⁶ sayıda 4T1

hücresi %10 fetal bovine serum ve 2 mM L-Glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri içinde (100 µl hacimde) 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücreler tutunması için 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek üzerine farklı konsantrasyonlarda klorofilin ve dosetaksel maddeleri içeren besiyerleri (100 µl hacimde) eklenerek 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri kaldırıldı ve kuyucuklara 1 mg/ml MTT içeren besiyeri (50 µl hacimde) eklenerek 3 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra MTT çözeltileri kuyucuklardan çekildi. Kuyucukların tabanında oluşan formazan kristallerini çözmek için 100 µl izopropanol eklenerek karıştırıldı. Çözünen formazan bileşiğinin absorbansı 570 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucuda ölçülerek hücre canlılıkları analiz edildi. Hücre canlılığını yüzde olarak hesaplamak için (örneğin absorbans değeri / kontrolün absorbans değeri)x100 formülü kullanıldı. Klorofilin ve dosetaksel konsantrasyonlarına karşı yüzde canlılık değerleri kullanılarak GraphPad Prism (Version 6) yardımıyla IC50 değerleri hesaplandı.

3.3.3. Annexin V ile Erken Apoptozun Belirlenmesi

Dosetaksel ve klorofilin için belirlenen IC50 konsantrasyonları (28,4 µM ve 52.1 µM) ile N-asetil sisteinin literatüre göre belirlenen dozu (5 mM) (79) 4T1 meme kanseri hücrelerine uygulandı. Hücreler 48 saat inkübasyondan sonra tripsin-EDTA yardımı ile kültür kaplarından toplanarak santrifüj edildi (500xg'de 5 dakika). Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Daha sonra örnekler 1x10⁶ hücre/ml'de olacak şekilde tüplere ayrıldı ve 1X bağlanma solüsyonu ile süspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 100µl alınarak tüplere konuldu. Daha sonra hücreler üzerine 5 µl Annexin V ve 5 µl 7-AAD (BD Biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit) eklenerek, 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücelere 400 µl 1X bağlanma solüsyonu eklendi ve 1 saat içinde akım sitometri cihazında (Beckman Coulter, Cytoflex) 10.000 hücre sayılarak analiz edildi.

3.4. Deney Hayvanları Çalışmaları

Deney hayvanları çalışmalarına başlamadan önce Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı (Onay no: 2018/08-03). Çalışmada kullanılan 6-8 haftalık dişi Balb/c fareleri Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Tüm deneysel işlemler Helsinki Deklarasyonu'nda belirtilen önerilere uygun olarak gerçekleştirildi (80).

Farelerin bakımı ve deneysel uygulamalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirildi. Hayvanların bakımı havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün temizlenen kafeslerde, %30-70 nem, 21°C'de ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda sürdürüldü. Fareler Dokuztuğ Yem Sanayii'nden temin edilen standart pellet yem ile beslendi. Su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Sıçanların yem ve su ihtiyaçları sınırsız (*ad libitum*) olarak sağlandı.

3.4.1 Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması

Meme tümörü modeli oluşturmak için, 6-8 haftalık dişi Balb/c farelerin meme yağ dokusuna 5×10^4 sayıda 4T1 meme kanseri hücresi serum fizyolojik (SF) çözeltisi içerisinde subkütan olarak inoküle edildi. Kanseri hücrelerinin enjekte edildiği gün 0. gün olarak kabul edildi. 8. günde tümörlerin ortalama çapı 2 mm'ye ulaştı. Bu aşamada, ilaç uygulamaları için fareler randomize olarak gruplara ayrıldı. Klorofilin, N-asetil sistein ve dosetakselin ayrı ayrı uygulanmasına ek olarak klorofilin ve N-asetil sisteinin dosetaksel ile birlikte uygulanmasının meme kanseri üzerindeki etkileri araştırmak için 6 deneysel grup oluşturuldu (Tablo 3.1). İlaçlar 10 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. Dosetaksel % 1 lik DMSO içinde çözülebildiği için kontrol ve deney gruplarında enjeksiyonlar yapılırken aynı oranda DMSO kullanıldı.

Tablo 3.1. Deney hayvanı grupları ve enjeksiyon uygulamaları

No	Deney Grupları	Hayvan Adedi	Enjeksiyon Uygulamaları
1	Kontrol	6	0.1 ml SF çözeltisi, % 1 DMSO
2	Klorofilin (Klr)	6	30 mg/kg dozda klorofilin (0.1 ml SF çözeltisi, % 1 DMSO içerisinde)
3	N-asetil sistein (NAC)	6	100 mg/kg dozda N-asetil sistein (0.1 ml SF çözeltisi, % 1 DMSO içerisinde)
4	Dosetaksel (Dos)	6	8 mg/kg dozda dosetaksel (0.1 ml SF çözeltisi, % 1 DMSO içerisinde)
5	Klorofilin + Dosetaksel (Klr+Dos)	6	30 mg/kg klorofilin + 8 mg/kg dosetaksel (0.1 ml SF çözeltisi, % 1 DMSO içerisinde)
6	N-asetil sistein + Dosetaksel (NAC+Dos)	6	100 mg/kg N-asetil sistein + 8 mg/kg dosetaksel (0.1 ml SF çözeltisi, % 1 DMSO içerisinde)

3.4.2. Hayvanların Takibi ve Sakrifikasyon İşlemleri

Hayvan ağırlıkları ilaç enjeksiyonları yapılmaya başlandıktan itibaren günlük olarak takip edildi. Tümör çapı ölçümleri iki gün aralıklarla “caliber” yardımıyla gerçekleştirildi. İlaç uygulamaları tamamlandıktan sonra tüm hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Tümör dokularının bir kısmı RNA izolasyonu için sıvı azot yardımıyla hızlı bir şekilde donduruldu. Alınan diğer dokular ise, soğuk serum fizyolojik (SF) ile yıkanarak daha sonra yapılacak analizler için -80°C’de muhafaza edildi.

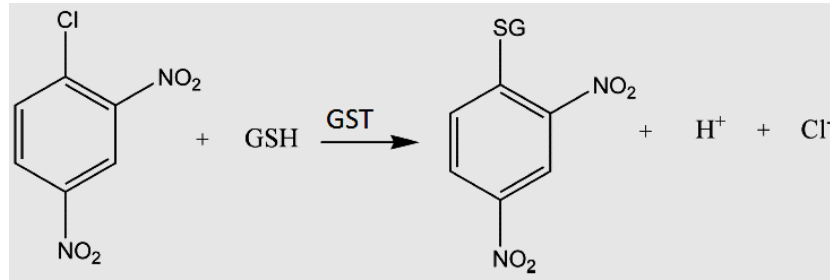
3.5. Tümör Dokuları ve Hücre Lizatlarındaki Analizler

Tümör dokularında yapılacak analizler için, örnekler 1:10 ağırlık/hacim oranında homojenizasyon tamponu (100 mM potasyum fosfat tamponu, 2 mM EDTA, pH:7.0) ile buz üzerinde homojenize edildi. Ardından örnekler 10.000xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan supernatantlarda ilgili analiz işlemleri yapıldı. Hücre lizatlarında yapılacak analizler için, dosetaksel ve klorofilin için belirlenen IC50

konsantrasyonları (28,4 μM ve 52.1 μM) ile N-asetil sistein (5 mM) (79) 4T1 meme kanseri hücrelerine uygulandı. Hücreler 48 saat boyunca bileşiklerle inkübe edildikten sonra tripsin-EDTA yardımı ile kültür kaplarından toplanarak santrifüj edildi (500xg'de 5 dakika). Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Daha sonra örnekler homojenizasyon tamponu ile homojenize ve ardından da santrifüj edildi (10.000xg'de 10 dakika). Süpernatantlarda ilgili analiz işlemleri yapıldı.

3.5.1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Glutasyon S-transferaz aktivitesi, GSH'nin 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ile oluşturduğu konjugasyon ürününün 340 nm'de absorbans artışı üzerinden belirlendi (Şekil 3.3) (81).



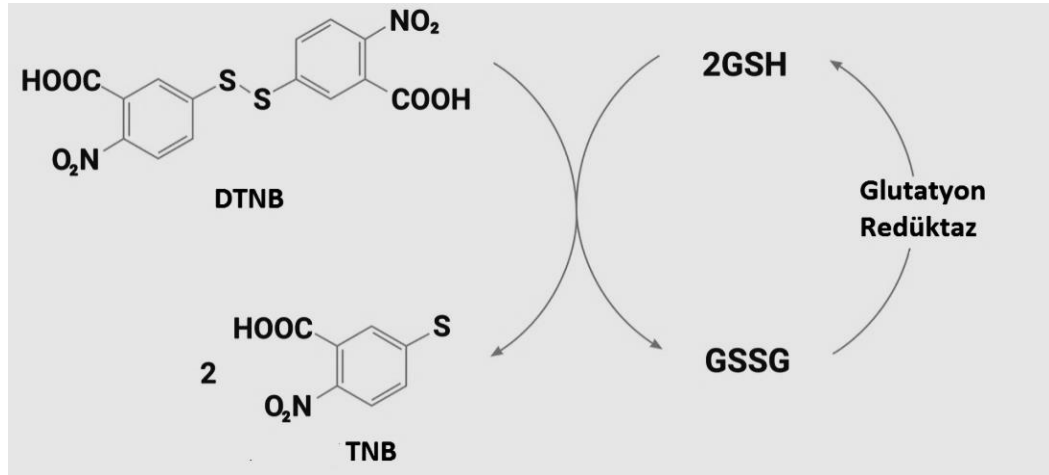
Şekil 3.3. Glutasyon S-transferaz katalizlediği glutasyonun (GSH) elektrofilik CDNB'ye konjugasyonu

Glutasyon S-transferaz aktive ölçümü için deney ortamı (1 mM EDTA içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 6,5), 1 mM GSH ve 1 mM CDNB % 5 etanol) hazırlandı. Aktivite ölçümleri 30°C'de 340 nm'deki absorbans artışı üzerinden 1 dakika boyunca spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Tüm örnekler için aktivite ölçümleri en az üç tekrarlı olarak yapıldı. Ölçülen aktivite değerleri 9,6 $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ absorpsiyon katsayısı ve protein miktarına oranlanarak spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Sonuçlar spesifik aktive değerleri ($\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) olarak ifade edildi.

3.5.2. Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Glutasyon hücre içerisinde çoğunlukla (%90 - 95) indirgenmiş formda (GSH) bulunmaktadır. Glutasyonun oksidasyonu sonucu okside formdaki glutasyon bileşiği (GSSG) oluşmaktadır. Bu çalışmada, toplam glutasyon (GSH + GSSG) düzeyini ölçmek için enzimatik döngü (recycling) yöntemi kullanıldı (66). Bu yöntemde

glutasyon redüktaz aracılığıyla NADPH ile okside glutasyon (GSSG) redükte forma (GSH) dönüşürken, redükte glutasyonun DTNB ((5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid) ile reaksiyonu sonucu TNB (2-nitro-5-tiyobenzoik asit) oluşmaktadır (Şekil 3.4). Oluşan TNB bileşiğinin 412 nm’deki absorbansı ölçülerek toplam glutasyon miktarları belirlenir.



Şekil 3.4. Glutasyon ile DTNB’den TNB oluşum reaksiyonu

Tümör dokusu ve 4T1 meme kanseri hücre örneklerindeki GSH düzeylerini belirlemek için, örnekler homojenizasyon tamponu (100 mM potasyum fosfat tamponu, 2 mM EDTA, pH: 7,0) ile buz üzerinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi sonrası örnekler santrifüj edildi (10.000xg’de 10 dk). Daha sonra süpernatantların üzerine eşit hacimde %10 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi eklenerek vortekslendi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk süreyle 2000xg’de tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatantlar alınarak üzerine taze hazırlanmış 4 M trietanolamin (TEAM) çözeltisinden %5 oranında eklenerek örneklerin pH değeri 7,0’e getirildi. Daha sonra glutasyon düzeylerini ölçmek için reaksiyon ortamı (1 mM EDTA içeren 100 mM potasyum fosfat tamponu pH:7,0, 48 µM NADPH, 78 µM DTNB, 0.115 U/ml glutasyon redüktaz) hazırlandı. Reaksiyon NADPH eklenerek başlatıldı. Oluşan 2-nitro-5-tiyobenzoik asitin (TNB) 412 nm’deki absorbansı ölçülerek GSH düzeyleri belirlendi (82, 83). Ölçümler mikro-plaka okuyucuda gerçekleştirildi. Daha sonra glutasyon düzeyleri protein miktarlarına oranlanarak değerlendirildi.

3.5.3. c-Jun Düzeylerinin Belirlenmesi

c-Jun, transkripsiyon faktörü olan Aktivatör Protein-1 (AP-1)'in bir bileşenidir. AP-1 protein kompleksinin bileşenleri hücrelerin büyümesi, çoğalması, farklılaşması, kontrollü ölümü gibi birçok süreçte rol alır. c-Jun' un transkripsiyonel aktivasyonu yapısında bulunan Ser63 ve Ser73 aminoasitlerinin JNK aracılığıyla fosforilenmesi üzerinden düzenlenir. Mitojenik ve stres kaynaklı sinyal yolları dahil birçok faktör, c-Jun'un fosforilasyonunu uyarır (84).

Bu çalışmada, fosforile c-jun ve toplam c-jun düzeyleri Elisa kit (ab205708) ile ölçüldü. Kit protokolüne göre; hücre ve doku örnekleri ekstraksiyon tamponu ile homojenize edildi. Homojenatlar 20 dk buz üzerinde inkübe edildikten sonra santrifüj edildi (18.000xg, 20dk, 4°C). Elde edilen süpernatantlardan 10 µl örnek alınarak protein ölçümü için ayrıldı. Daha sonra kit protokolüne göre hazırlanan standartlar ve örneklerden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu plakanın uygun kuyucuklarına uygulandı. Ardından, örnek ve standartların üzerine 50 µl antikor kokteyli eklendi ve tabakanın yüzeyi kapatılarak, 400 rpm devire ayarlanmış çalkalayıcıda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. Daha sonra 100 µl TMB substratı eklenerek, 400 rpm devirde çalkalayıcı üzerinde 15 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek plaka çalkalayıcıda 600 rpm'de 1 dakika karıştırıldı. Örneklerin Elisa okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek fosforile c-jun ve toplam c-jun düzeyleri tespit edildi.

3.5.4. p38 Düzeylerinin Belirlenmesi

Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) protein ailesinin bir üyesi olan p38, hücrenin büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve kontrollü ölümü gibi birçok süreçte rol alır. Sitokinler, UV ışınları, ozmotik şok ve lipopolisakkaritler gibi çeşitli hücrel stres faktörleriyle p38 aktive olur. p38'in aktivasyonu yapısında bulunan Thr180 ve Tyr182 aminoasitlerinin fosforilenmesi ile gerçekleşir (85).

Bu çalışmada fosforile p38 ve toplam p38 düzeyleri Elisa kit (ab205708) ile ölçüldü. Kit protokolüne göre; hücre ve doku örnekleri ekstraksiyon tamponu ile homojenize edildi. Homojenatlar 20 dk buz üzerinde inkübe edildikten sonra santrifüj

edildi (18.000xg, 20dk, 4°C). Elde edilen süpernatantlardan 10 µl örnek alınarak protein ölçümü için ayrıldı. Daha sonra kit protokolüne göre hazırlanan standartlar ve örneklerden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu plakanın uygun kuyucuklarına pipetlendi. Örnek ve standartların üzerine 50 µl antikor kokteyli eklendi. Daha sonra plakanın yüzeyi kapatılarak, 400 rpm'lik devir ile çalalayıcıda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. Daha sonra 100 µl TMB substratı eklenerek, 400 rpm devirde 15 dakika boyunca karanlık bir ortamda çalkalanarak inkübe edildikten sonra 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek 600 rpm'de 1 dakika daha karıştırıldı. Örneklerin absorbansı 450 nm dalga boyunda Elisa okuyucuda ölçülerek fosforile p38 ve toplam p38 düzeyleri tespit edildi.

3.5.5. Kaspaz 8 ve 9 Düzeylerinin Belirlenmesi

Apoptoz mekanizması dış (ekstrinsik) ve iç (intrinsik) kaynaklı olmak üzere iki temel yolak tarafından aktive edilmektedir ve bunu takiben hücredeki ilgili kaspazlar aktive olmaktadır. Dış kaynaklı sinyal yolağında, ölüm reseptörü ligandının bağlanması ile oluşan protein kompleksi kaspaz-8 oluşumunu sağlamak ve bu da efektör kaspazları aktive etmektedir. İç sinyal yolağında ise, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c molekülü salınmakta ve daha sonra kaspaz-9 aktive edilmektedir (55).

Bu çalışmada kaspaz 8 ve 9 düzeyleri Elisa kit (SEA853Mu, SEA627Mu) kullanılarak ölçüldü. Kit protokolüne göre; hücre ve doku örnekleri ekstraksiyon tamponu ile homojenize edilerek santrifüjlendi (18.000xg, 20dk, 4°C). Elde edilen süpernatantlardan 10 µl örnek alınarak protein ölçümü için ayrıldı. Daha sonra kit protokolüne göre, hazırlanan standartlar ve örneklerden 100 µl 96 kuyucuklu plakanın uygun kuyucuklarına pipetlenerek 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra kuyucuktaki standart ve örnek çözeltileri geri çekildi. Sonrasında, 100 µl "Detection Reagent A" eklendi. Ardından plakanın yüzeyi kapatılarak, 400 rpm devirde çalkalayıcı üzerinde 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra tüm kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. Sonrasında, 100 µl "Detection Reagent B" eklenerek plakanın yüzeyi kapatıldı 400 rpm devirde çalalayıcıda 1 saat boyunca 37°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar 350 µl yıkama tamponu ile 5

defa yıkandıktan sonra 90 µl substrat solüsyonu eklenerek, 400 rpm devirde çalkalayıcıda 37°C’de karanlık bir ortamda 15 dakika süreyle daha bekletildi. İnkübasyon sonrası 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek, plaka çalkalayıcıda 600 rpm’de 1 dakika karıştırıldı. Örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyunda ölçülerek kaspaz 8 ve 9 düzeyleri tespit edildi.

3.5.6 Protein Konsantrasyonlarının Tayini

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi (86) temeline dayanan protein ölçüm kiti (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Ölçümler Bradford’un mikro-yöntemine göre mikropilaka kullanılarak, kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Bütün çalışmalarda protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Mikropilaka kullanılarak yapılan ölçümler için doğrusal çalışma aralığı 0.1-1.4 mg/ml olarak belirlendi. Ayrıca, Bradford yönteminde interferansa neden olacak yüksek konsantrasyonda deterjan içeren hücre lizatı örneklerindeki protein miktarı analizi için BCA (bisinkoninik asit yöntemi) temeline dayalı deterjanlarla uyumlu protein ölçüm kiti (Pierce) kullanıldı (87).

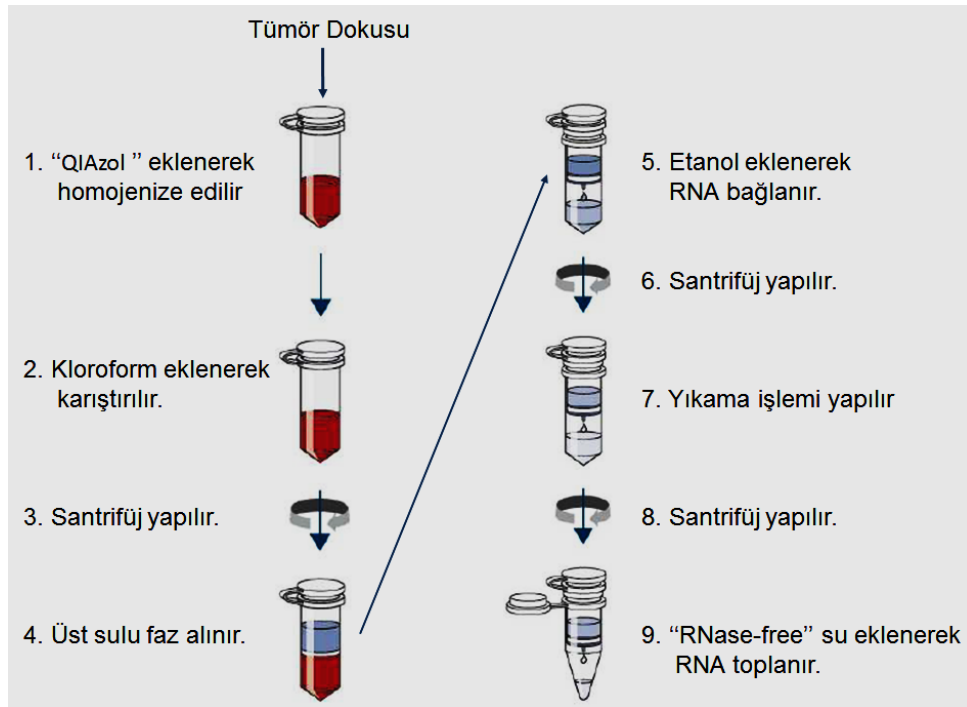
3.6. Transkriptomik Analizler

Deney hayvanlarından elde edilen tümörler üzerinde transkriptomik analizler yapıldı. Transkriptomik analizler için işlem basamakları; RNA izolasyonu, RIN (RNA Integrity Number) skorunun belirlenmesi, RNA dizileme işlemleri, RNA dizileme verilerinin kantifikasyonu ve fonksiyonel analizler şeklinde gerçekleştirildi.

3.6.1. RNA İzolasyonu

Meme tümörü dokularından RNA izolasyonu yapmak için “RNeasy” kiti (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre; tümör dokusu örnekleri 1 ml QIAzol liziz reaktifi içinde homojenizatör (Qiagen TissueLyser Lt Bead Mill) yardımıyla homojenize edildi (20 Hz, 5 dakika). QIAzol liziz reaktifi, yağlı dokuların erimesini kolaylaştırmak ve RNazları inhibe etmek için tasarlanmış, fenol ve guanidin tiyosiyanat içeren bir solüsyondur. Homojenizasyon sonrası örnekler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra homojenata 200 µL kloroform ilave edilerek 15 saniye vorteksledikten sonra örnekler santrifüjlenerek (12.000xg, 15 dk., 4°C’de) sulu ve organik fazlara ayrıldı. Faz ayrımı sayesinde RNA’lar üstteki sulu fazda

ekstrakte olurken, DNA'lar ara fazda, proteinler ise ara fazda veya alttaki organik fazda kalarak ayrıştırılmaları sağlandı. Sonra üstteki sulu faz alınarak üzerine eşit hacimde %70'lik etanol eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra örnekler RNeasy Mini spin kolonuna aktarılarak oda sıcaklığında santrifüjlendi (8000xg, 15 saniye). Böylece RNA'nın kolon membranına tutunması sağlandı. Daha sonra, kolona 700 µl RW1 yıkama solüsyonu eklenip santrifüjlendikten sonra (8000xg,15 saniye) kolona 500 µl RPE yıkama solüsyonu eklenip tekrar santrifüjlendi. Son olarak, RNaz içermeyen 50 µl saf su eklenerek RNA'nın filtreden süzülerek tüpe toplanması sağlandı (Şekil 3.5). Tüpte toplanan saflaştırılmış RNA örneklerinden 5 µl alınarak RNA konsantrasyonu ve RIN (RNA Integrity Number) skorunun belirlenmesi için ayırt edildi. Kalan kısım (45 µl) RNA dizileme analizleri için kullanıldı.

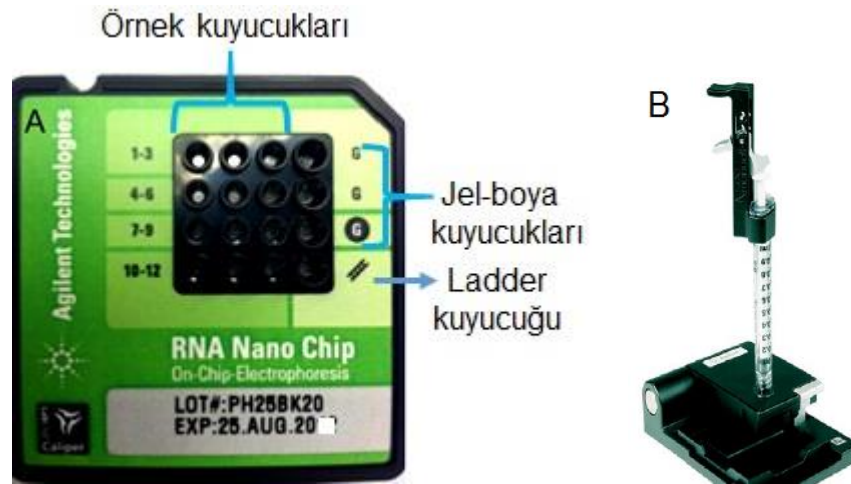


Şekil 3.5. RNA izolasyonu deney akış diyagramı

3.6.2. RIN (RNA Integrity Number) Skorunun Belirlenmesi

RIN skoru, ribozomal RNA'ların oranıyla (28S/18S) ilişkili bir değerdir (88). RIN skorunun yüksek olması RNA izolasyonu işlemleri sırasında RNA bütünlüğünün korunduğunu gösterir. RIN skorunun düşük olması ise RNA örneklerinin uygun koşullarda saklanmadığını veya RNA izolasyonu işlemleri sırasında degradasyona uğradığını gösterir. Bu çalışmada, RIN skorunu belirlemek için "Agilent RNA 6000

Nano Assay” kiti kullanıldı. Kit protokolüne göre jel ve RNA boya solüsyonları hazırlandıktan sonra RNA elektroforez çipi açılıp jel yayma aparatına yerleştirildi (Şekil 3.6). Daha sonra 9 μ L jel-boya karışımı ilgili kuyucuğa (Ⓔ) koyularak jel yayma aparatının pistonu yardımıyla jel-boya karışımının RNA elektroforez çipinin yüzeyine yayılması sağlandı. Sonra tekrar ilgili kuyucuklara (Ⓒ) 9 μ L jel-boya karışımı koyuldu. Daha sonra jel kuyucukları dışındaki tüm kuyucuklara, 5'er μ L yeşil renkli RNA işaretleyicisi (RNA 6000 Nano marker) eklendi. Sonrasında 1 μ L “ladder” ilgili kuyucuğa konuldu. Daha sonra 1'den 12'ye kadar numaralanan kuyucuklara 1'er μ L RNA örnekleri pipetlendi. Sonra RNA elektroforez çipi 1 dakika boyunca çalkalandı (IKA vortex, 2400 rpm). Ardından RNA elektroforez çipi biyoanalizör cihazına (Agilent 2100 Bioanalyzer) yerleştirilerek RIN skorları belirlendi. RNA örneklerinin konsantrasyonlarını ve saflığını ölçmek için “NanoDrop” spektrofotometresi (Agilent) kullanıldı.

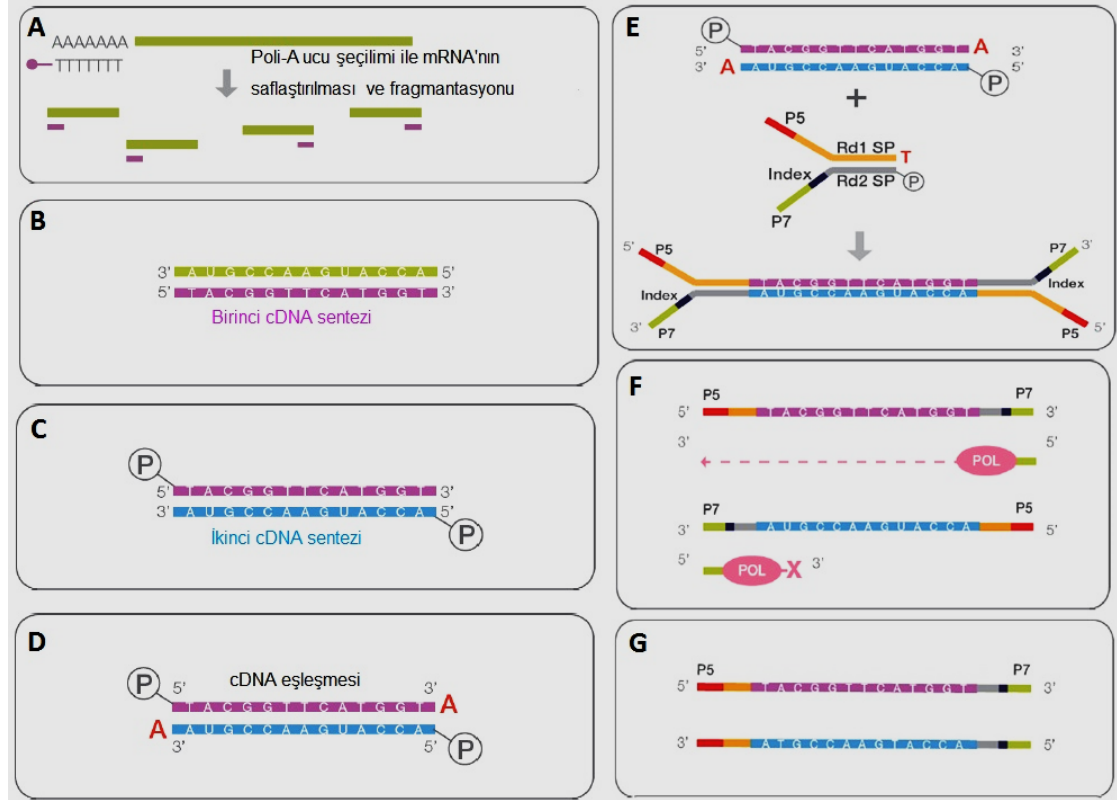


Şekil 3.6. (A) RNA Nano Chip elektroforez tabakası, (B) jel yayma aparatı.

3.6.3. RNA Dizileme İşlemleri

Bu çalışmada RNA dizileme için cDNA kütüphanelerinin hazırlanması ve dizileme işlemleri İsveç'teki “National Genomics Infrastructure” (NGI) da gerçekleştirildi. Kütüphane hazırlığı “Illumina TruSeq Stranded mRNA” protokolüne göre hazırlandı. RNA dizileme için Kütüphane hazırlığı işlemleri temel olarak 7 aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; (A) Poli-A ucu seçilimi ile mRNA'nın saflaştırılması ve fragmentasyonu, (B) Tek zincirli cDNA Sentezi, (C) Çift zincirli

cDNA Sentezi, (D) Uç onarımı, fosforilasyon ve adenilasyon, (E) Adaptör ligasyonu, (F) PCR amplifikasyonu (G) Kütüphanelerin tamamlanması ve kalite kontrolü olarak sıralanabilir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. RNA dizileme için kütüphane hazırlık aşamaları: (A) Poli-A ucu seçimi ile mRNA'nın saflaştırılması ve fragmentasyonu, (B) Tek zincirli cDNA Sentezi, (C) Çift zincirli cDNA Sentezi, (D) Uç onarımı, fosforilasyon ve adenilasyon, (E) Adaptör ligasyonu, (F) PCR amplifikasyonu (G) Kütüphanelerin tamamlanması ve kalite kontrolü.

RNA dizileme için kütüphane hazırlığı tamamlandıktan sonra NovaSeq 6000 ile S1-100 akış hücresi kullanılarak çift uçlu okuma yöntemiyle sekanslama işlemleri tamamlandı. Bu çalışmada her deney grubunda 3 örnek olmak üzere toplam 18 örnek için RNA dizileme işlemi yapıldı.

3.6.4. RNA Dizileme Verilerinin Kantifikasyonu

RNA dizileme sonrası elde edilen fastq formatındaki veri dosyaları kallisto programı kullanılarak kantifiye edildi. Kallisto, RNA dizileme verilerinden

transkriptlerin ekspresyon miktarlarını kantifiye etmek için kullanılan bir programdır. Bu araştırmada Balb/c fareleri üzerinde çalışıldığı için www.ensembl.org web sitesinden Balb/c fare türüne ait referans cDNA dosyası ve “ensembl” web sitesinde bulunan “BioMart” sekmesinden transkriptlere karşılık gelen protein kodlayan genlerin olduğu “mart_export.txt” dosyası indirildi. Daha sonra protein kodlayan genlerin ekspresyon değerlerinin analizi bir programlama dili olan R yazılımında gerçekleştirildi.

3.6.5. Farklı Eksprese Olan Genlerin Analizi

Farklı eksprese olan genlerin analizi, kantifiye edilmiş gen ekspresyon değerleri kullanılarak R’ da DESeq2 paketiyle gerçekleştirildi (89). Bu çalışmada, gruplar arasındaki farklı eksprese olan genleri belirlemek için tüm gruplar öncelikle bir arada analiz edildi. Daha sonra DESeq2 iş paketinin kontrast fonksiyonu aracılığıyla ikili gruplar arasındaki farklı eksprese olan genler belirlendi ($p < 0,05$).

3.6.6. Fonksiyonel Analizler

Farklı eksprese olan genlerin yolaklar üzerindeki etkilerini araştırmak için fonksiyonel analizler yapıldı. Fonksiyonel analiz için R’da Piano paketi kullanıldı (90). Piano paketinin fonksiyonlarıyla gen setlerindeki değişiklikler istatistiksel olarak analiz edilerek, Gen Ontolojisi ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanlarına dayalı olarak yolaklar üzerindeki etkileri araştırıldı. Sonuç olarak, her deneysel grup için aktive ve deaktive olan yolaklar belirlendi ($p < 0,05$).

3.7. İstatiksel Analizler

Bu çalışmada elde edilen deneysel verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması için IBM SPSS 22 programı kullanıldı. Parametrik olmayan bağımsız çoklu grupların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi yapıldı. Bağımsız ikili alt gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesi için Mann Whitney U Testi yapıldı. Ayrıca transkriptomik analizler için DESeq2 ve Piano paketleri içerisindeki istatistiksel fonksiyonlar kullanıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler için, iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

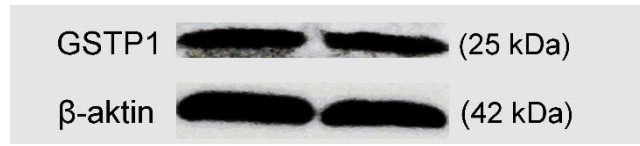
4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmada, GSTP1 inhibitörü klorofilin ve antioksidan özelliğinin yanında GSTP1'in kosubstratı GSH'nun öncül molekülü olan N-asetil sisteinin (NAC) kanser tedavisi üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu çalışma için seçilen tedaviye dirençli üçlü (ER, PR, HER2) negatif olan 4T1 meme kanseri hücre hattında GSTP1 ekspresyonunun varlığı tespit edildikten sonra klorofilin ve NAC moleküllerinin ayrı ayrı ve kanser ilacı dosetaksel birlikte kullanımlarının hücre canlılığı ve apoptozu üzerindeki etkileri araştırıldı.

4.1.1. GSTP1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

4T1 meme kanseri hücre lizatlarında GSTP1 ekspresyonunun varlığı western blot yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.1). GSTP1 ekspresyonunun varlığı tespit edildikten sonra hücre kültürü çalışmaları ve meme kanseri hayvan modelinin oluşturulması için 4T1 hücre hattının kullanılmasına karar verildi.

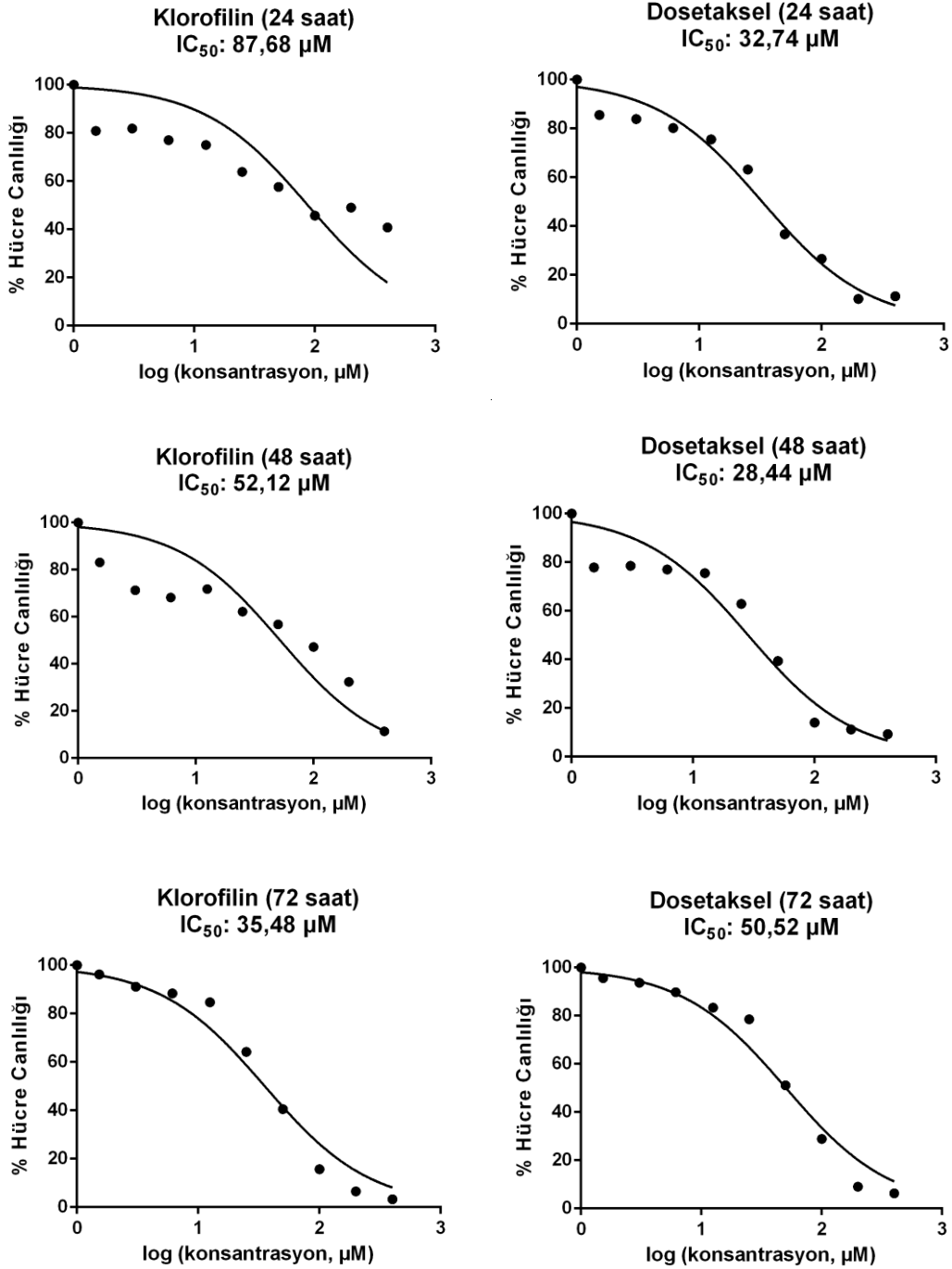


Şekil 4.1. 4T1 meme kanseri hücre hattında GSTP1 ekspresyonu

4.1.2. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi

4T1 meme kanseri hücrelerine farklı konsantrasyonlarda klorofilin ve dosetaksel uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra MTT yöntemi ile hücre canlılıkları belirlendi. Uygulanan klorofilin ve dosetaksel dozlarına karşı, % hücre canlılığı değerleri kullanılarak GraphPad Prism programıyla IC50 değerleri hesaplandı (Şekil 4.2). Belirlenen IC50 değerleri göre, dosetakselin en etkin olduğu inkübasyon süresi 48 saat olarak ve Klorofilinin ise en etkin olduğu inkübasyon süresi 72 saat olarak tespit edildi. Daha sonra yapılan hücre kültürü çalışmalarında, dosetakselin en etkin olduğu inkübasyon süresi baz alınarak inkübasyon süreleri 48 saat olarak uygulandı. Klorofilin ve dosetakselin uygulama dozları sırasıyla 52,12 μ M ve 28,44 μ M olarak belirlendi. N-asetil sistein IC50 değerini belirlemek için yapılan

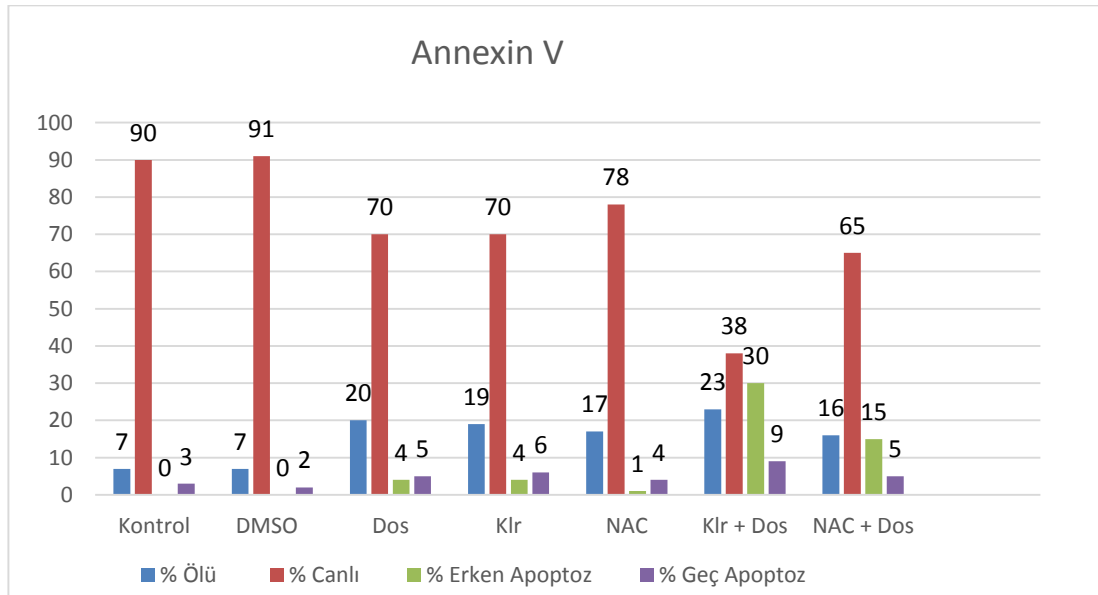
deneylerde N-asetil sisteinin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği için tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemedi. Bu nedenle, N-asetil sisteinin 4T1 hücre hattı için uygulama dozu literatüre göre 5 mM olarak belirlendi (79).



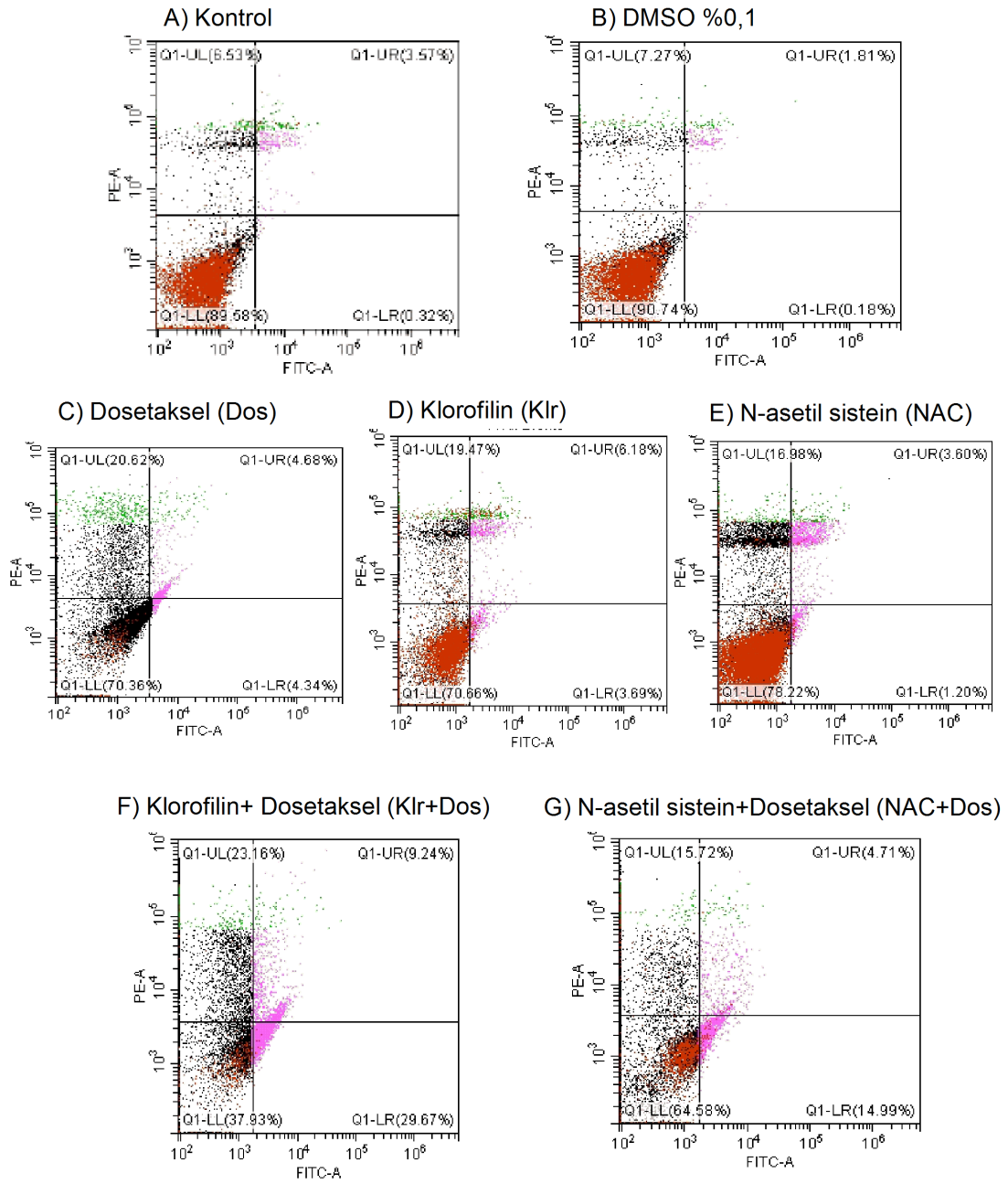
Şekil 4.2. Klorofilin ve dosetakselin 4T1 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri

4.1.3. Annexin V ile Erken Apoptozun Değerlendirilmesi

4T1 meme kanseri hücre hattında klorofilin (Klr) ve N-asetil sistein (NAC) moleküllerinin ayrı ayrı ve kanser ilacı dosetaksel (Dos) ile birlikte kullanımlarının apoptotik etkileri akım sitometrisinde Annexin V ile belirlendi. Annexin V sonuçlarına göre, erken apoptotik hücre oranının, klorofilin ve N-asetil sisteinin dosetaksel ile birlikte uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarında arttığı tespit edildi. Klorofilin, NAC ve dosetakselin ayrı ayrı uygulandığı gruplardaki erken apoptotik hücre oranları sırasıyla %4, %1 ve %4 iken, Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarında sırasıyla %30 ve %15 olduğu saptandı (Şekil 4.3). Annexin V görüntüleri Şekil 4.4' te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Ölü, canlı, erken ve geç apoptotik hücrelerin yüzdeleri. Klr: klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel, DMSO: %0,1 DMSO kontrolü.

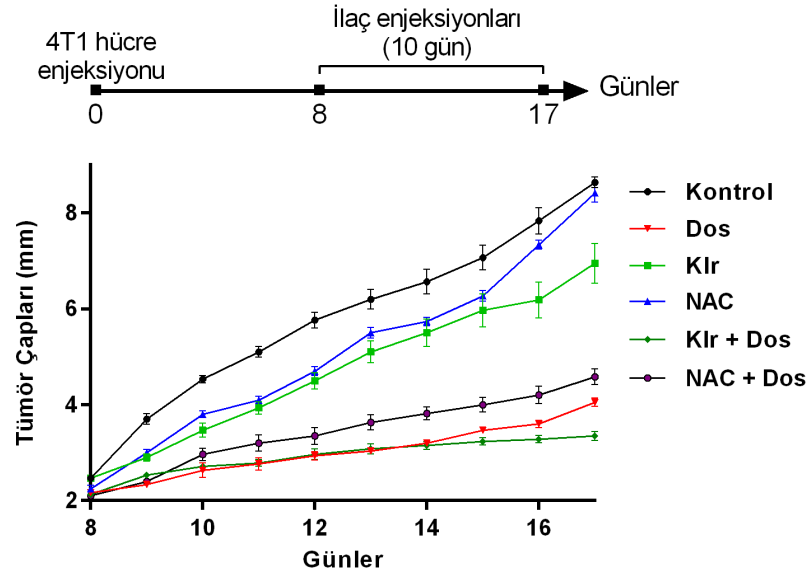


Şekil 4.4. Annexin V görüntüleri: A. Kontrol, B. DMSO (% 0.1), C. Dosetaksel, D. Klorofilin, E. N-asetil sistein, F. Klorofilin + Dosetaksel, G. N-asetil sistein + Dosetaksel.

4.2. Deney Hayvanları Çalışmaları

Deney hayvanları çalışmaları için 4T1 meme kanseri hücreleri farelere enjekte edilerek meme tümörleri oluşturuldu. Kanser hücrelerinin enjekte edildiği gün 0. gün olarak kabul edildi. Enjeksiyondan 8 gün sonra, tümörler yaklaşık 2 mm çapına

ulaşınca klorofilin (Klr), N-asetil sistein (NAC) ve dosetaksel (Dos) ayrı ayrı ve beraber olarak 10 gün boyunca farelere enjekte edilerek tümör gelişimi üzerindeki etkileri incelendi (Şekil 4.5). Zamana bağlı tümör çapı değişimlerine göre, NAC ve Klr gruplarında tümör gelişiminin yavaşladığı tespit edildi. Fakat NAC enjeksiyonu yapılan grubun tümör çaplarının ortalaması 16. günde kontrol grubunun tümör çaplarının ortalamasına yaklaştığı gözlemlendi. Dos, Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarında tümör büyüme hızının kontrole göre oldukça yavaş olduğu tespit edildi. Ancak, 14. günden sonra Klr+Dos grubunda ortalama tümör çapı sabit kalırken, Dos ve NAC+Dos gruplarındaki ortalama tümör çaplarının artmaya devam ettiği belirlendi. Sonuç olarak, dosetakselin klorofilin ile beraber kullanımının dosetakselin yalnız ve NAC ile beraber kullanımından daha etkili olduğu tespit edildi.



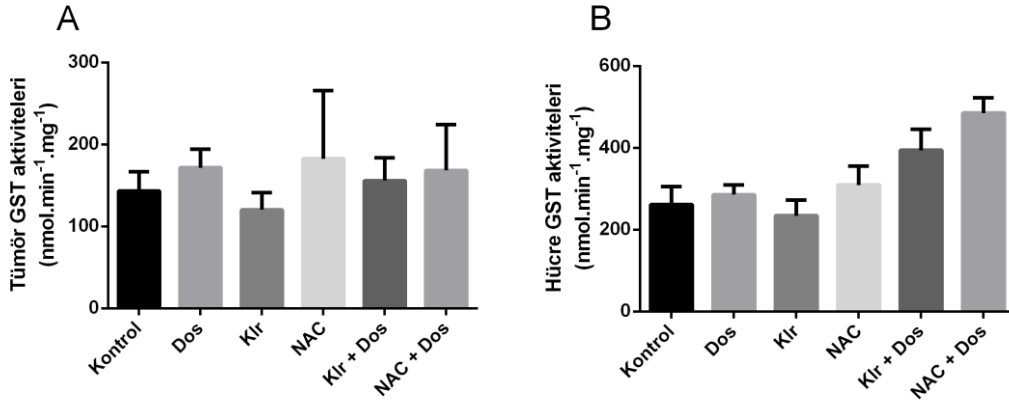
Şekil 4.5. Zamana bağlı tümör çapı değişimleri. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Tümör çapı değerleri ortalama \pm standart hata olarak gösterildi.

4.3. Tümör Dokuları ve Hücre Lizatlarındaki Analizler

4.3.1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki Glutasyon S-transferaz (GST) aktivite değerleri Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Hücre ve tümörde, N-asetil sistein (NAC) GST

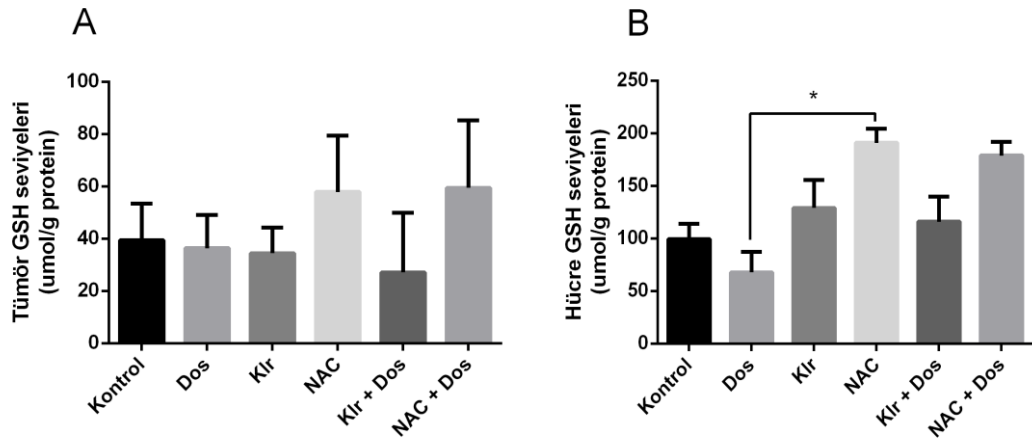
aktivitesini artırırken, klorofilinin (Klr) azalttığı saptandı. Hücrede, klorofilin (Klr) ve N-asetil sisteinin (NAC) dosetaksel (Dos) ile beraber uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarındaki GST aktivitelerinin kontrole göre artarken, tümör dokularında değişmediği tespit edildi.



Şekil 4.6. Glutatyon s-transferaz (GST) aktiviteleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi.

4.3.2. Glutatyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

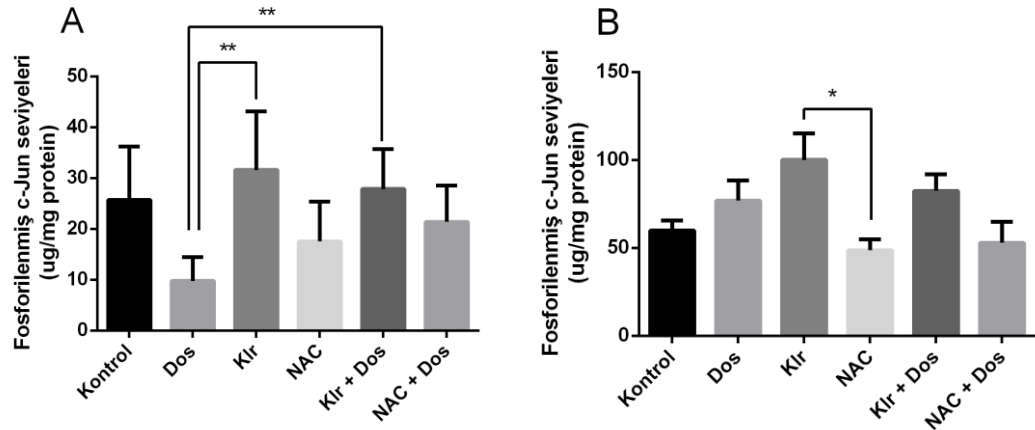
Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki glutatyon (GSH) düzeyleri, Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Tümör dokusu ve hücrelerde N-asetil sistein (NAC) ve N-asetil sisteinin dosetaksel ile birlikte kullanıldığı NAC+Dos grubundaki GSH düzeylerinin arttığı tespit edildi. Klorofilin (Klr) kullanımı tümör dokusundaki GSH miktarını değiştirmezken, hücredeki GSH miktarını artırdığı tespit edildi. Klorofilin ve dosetakselin birlikte kullanımı (Klr+Dos) ise tümör dokusundaki GSH düzeylerini azaltırken, hücredeki GSH düzeyini değiştirmediği saptandı. Ayrıca, hücrede N-asetil sistein (NAC) grubundaki GSH seviyesi artarken, Dosetaksel (Dos) grubunda GSH seviyesi azaldığı için bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Glutasyon (GSH) düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p < 0,05$.

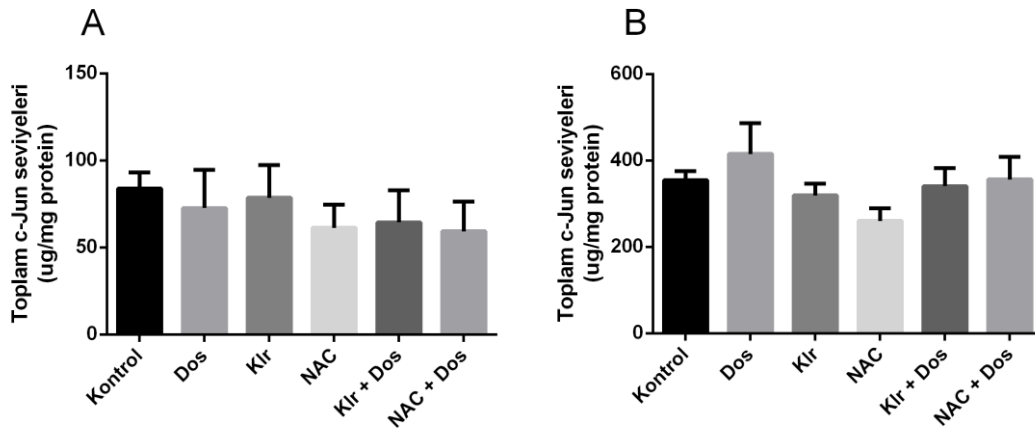
4.3.3. c-Jun Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki fosforilenmiş c-Jun düzeyleri Şekil 4.8'de gösterilmektedir. Tümör dokusunda fosforile c-jun düzeyi klorofilin (Klr) uygulamasıyla artarken, N-asetil sistein (NAC) ve dosetaksel (Dos) ile azaldığı tespit edildi. Tümör dokularında, Dos ile Klr ve Klr+Dos grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,01$) (Şekil 4.8A). Hücrede ise, fosforilenmiş c-Jun miktarının Klr ve Dos ile arttığını, NAC ile azaldığını belirledik. Hücrede, Klr ve NAC grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 4.8B).



Şekil 4.8. Fosforillenmiş c-Jun düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Doksetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

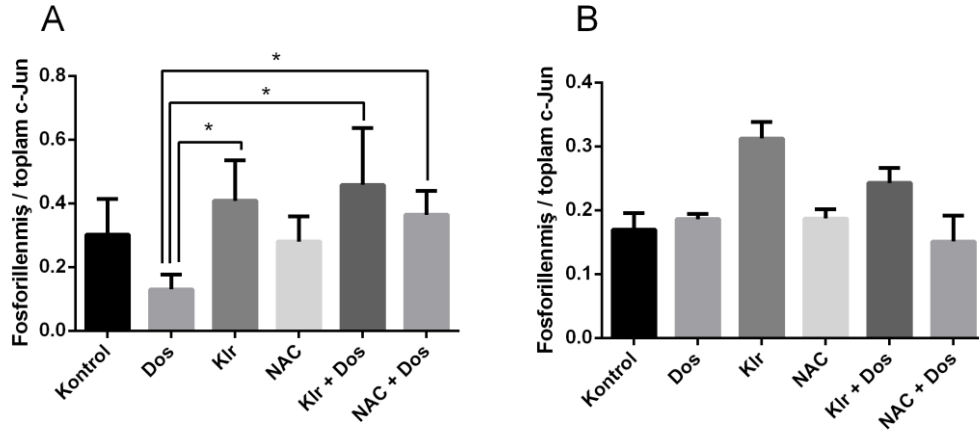
Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki toplam c-Jun düzeyleri Şekil 4.9' da gösterilmektedir. Tümör dokularında toplam c-Jun düzeylerinin değişmediği tespit edildi (Şekil 4.9A). Hücrede ise doksetakselin (Dos) toplam c-Jun seviyesini kontrole göre artırırken, N-asetil sisteinin (NAC) azalttığı gözlemlendi. Ancak, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.9B).



Şekil 4.9. Toplam c-Jun düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Doksetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi.

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki fosforillenmiş c-Jun düzeyleri ile toplam c-Jun düzeyleri oranı Şekil 4.10' da gösterilmektedir. Fosforillenmiş / toplam c-Jun

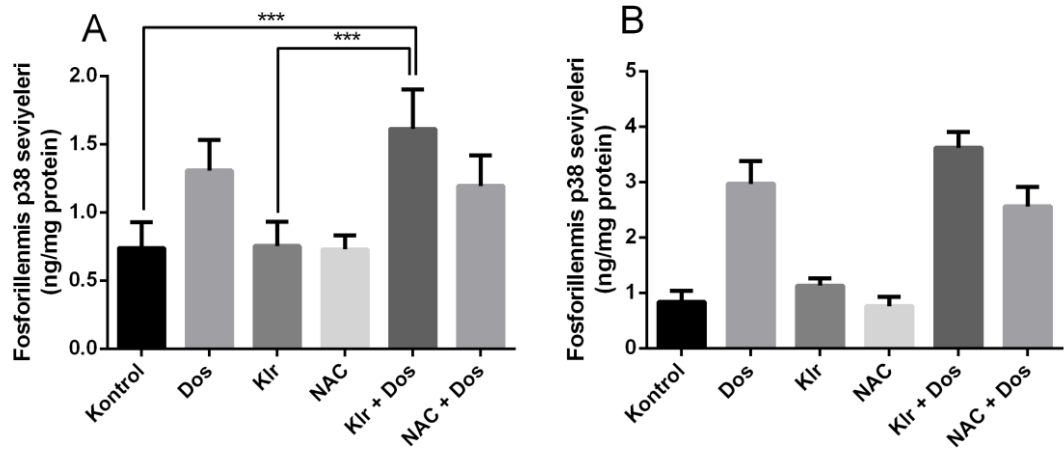
oranlarının, fosforile c-Jun düzeyleriyle (Şekil 4.8) benzerlik gösterdiği sonucuna varıldı.



Şekil 4.10. Fosforillenmiş / toplam c-Jun oranları: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Doksetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p < 0,05$.

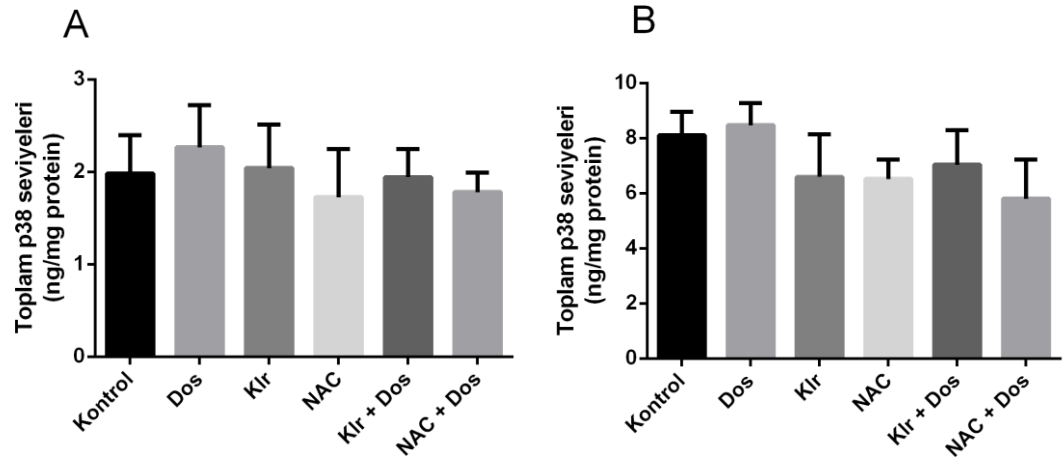
4.3.4. p38 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki fosforilenmiş p38 düzeyleri Şekil 4.11'de verilmiştir. Tümör dokusunda dosetaksel (Dos) uygulamasıyla fosforilenmiş p38 düzeyi kontrol grubuna göre artarken, N-asetil sistein (NAC) ve klorofilin (Klr) gruplarında değişmediği tespit edildi. Tümör dokularında, klorofilin ve dosetakselin birlikte kullanımının (Klr+Dos), dosetakselin p38'in fosforilasyonu üzerindeki etkisini artırırken, NAC ile dosetakselin birlikte uygulanmasının (NAC+Dos) değiştirmedeği saptandı. Tümör dokusunda, Klr+Dos grubu ile kontrol ve Klr gruplarındaki arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,001$) (Şekil 4.11A). Hücrede, Dos uygulamasıyla fosforilenmiş p38 düzeyi kontrol grubuna göre artarken, NAC ve Klr gruplarında ise değişmediği tespit edildi. Hücrede, klorofilin ve dosetakselin beraber uygulanması (Klr+Dos), dosetakselin p38'in fosforilasyonu üzerindeki etkisini artırırken, NAC ile dosetakselin (NAC+Dos), birlikte kullanımının bir değişikliğe yol açmadığı saptandı (Şekil 4.11B).



Şekil 4.11. Fosforillenmiş p38 düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Kır: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

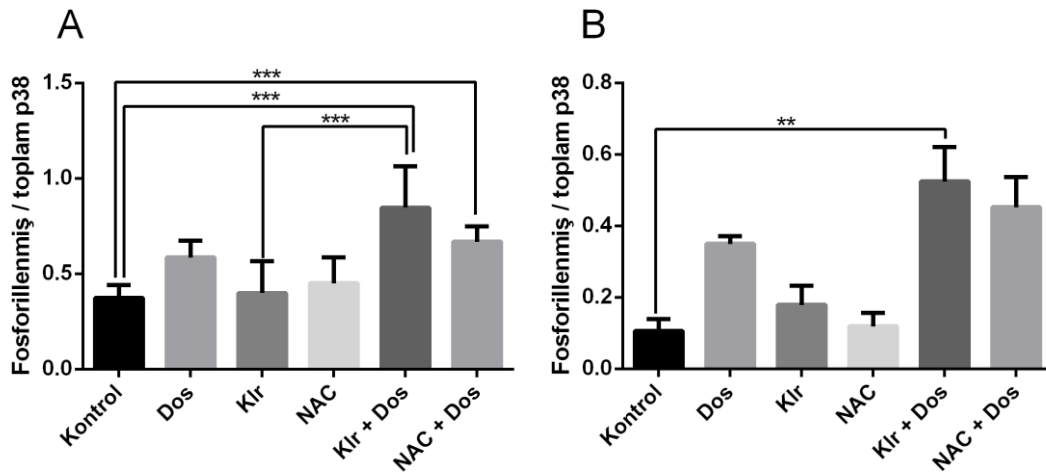
Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki toplam p38 düzeyleri Şekil 4.12' de gösterilmektedir. Gerek tümör dokularında gerekse hücrelerde toplam p38 düzeylerinin değişmediği tespit edildi.



Şekil 4.12. Toplam p38 düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Kır: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi.

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki fosforillenmiş p38 düzeyleri ile toplam p38 düzeyleri oranları Şekil 4.13' te gösterilmektedir. Tümör dokusunda dosetaksel

(Dos) uygulamasıyla fosforilenmiş p38 oranı kontrol grubuna göre artarken, N-asetil sistein (NAC) ve klorofilin (Klr) gruplarında değişmediği tespit edildi. Tümör dokularında, dosetakselin klorofilin ve N-asetil sistein ile birlikte uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarındaki fosforillenmiş p38 oranlarının Dos grubuna göre arttığı saptandı. Tümör dokusunda, Klr+Dos grubu ile kontrol ve Klr grupları arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,001$). Ayrıca Kontrol grubu ile NAC ve Dos grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, kontrol ile NAC+Dos grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil 4.13A). Hücrede, Dos ve Klr gruplarındaki fosforilenmiş p38 oranları kontrol grubuna göre artarken, NAC grubundaki fosforilenmiş p38 oranının değişmediği gözlemlendi. Hücrede, dosetaksel ile klorofilin ve N-asetil sisteinin birlikte uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarındaki fosforillenmiş p38 oranlarının Dos grubuna göre arttığı saptandı. Hücrede kontrol ve Klr+Dos grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$) (Şekil 4.13B).

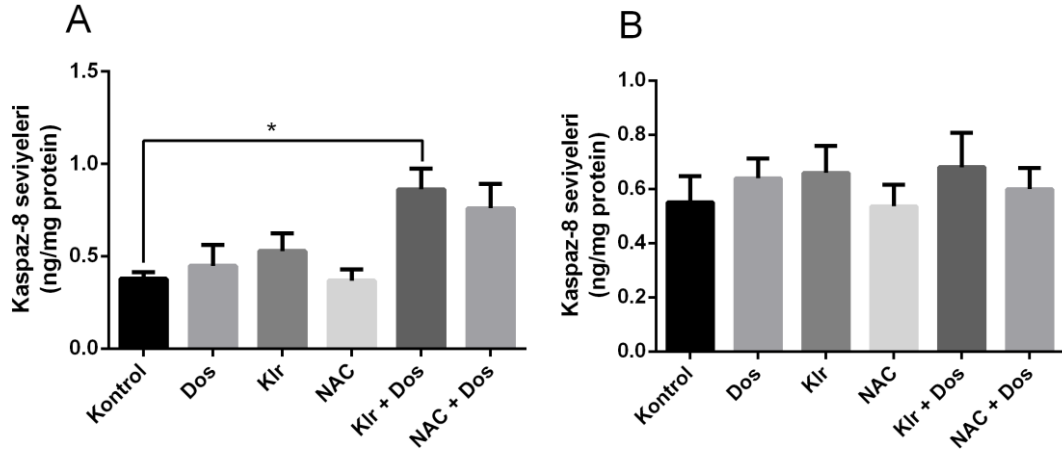


Şekil 4.13. Fosforillenmiş / toplam p38 oranları: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

4.3.5. Kaspaz-8 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki toplam kaspaz-8 düzeyleri Şekil 4.14'de gösterilmektedir. Tümör dokusunda, dosetakselin klorofilin ve N-asetil ile beraber

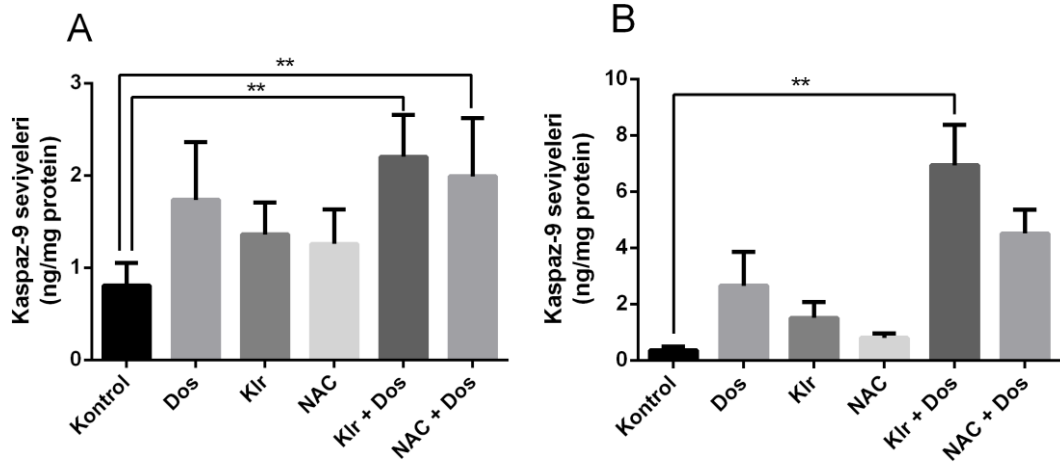
uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarındaki kaspaz-8 düzeyleri kontrol grubuna göre artarken, hücrelerde ise kaspaz-8 düzeylerinin değişmediği tespit edildi.



Şekil 4.14. Kaspaz-8 düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Dosetaksel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p < 0,05$.

4.3.6. Kaspaz-9 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tümör dokuları ve 4T1 hücrelerindeki toplam kaspaz-9 düzeyleri Şekil 4.15'te verilmektedir. Tümör dokusu ve 4T1 hücrelerinde, dosetakselin klorofilin ve N-asetil sistein ile birlikte uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarındaki kaspaz-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. Tümör dokusunda kontrol grubu ile Klr+Dos ve Klr+NAC grupları arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,01$) (Şekil 15A). 4T1 hücrelerinde ise Kontrol ve Klr+ Dos grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$) (Şekil 15B).



Şekil 4.15. Kaspaz-9 düzeyleri: A. Tümör, B. 4T1 hücre hattı. Klr: Klorofilin, NAC: N-asetil sistein, Dos: Doksetel. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4. Transkriptomik Analizlerin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, deney hayvanlarından elde edilen tümörler üzerinde transkriptomik analizler yapıldı. RNA izolasyonu yapıldıktan sonra örneklerin RIN (RNA Integrity Number) skorları değerlendirildi. Daha sonra, elde edilen RNA dizileme verileri üzerinde transkriptomik analizler (farklı eksprese edilen genlerin belirlenmesi ve fonksiyonel analizler) gerçekleştirilerek gruplar arasında aktive ve deaktive olan yollar değerlendirildi.

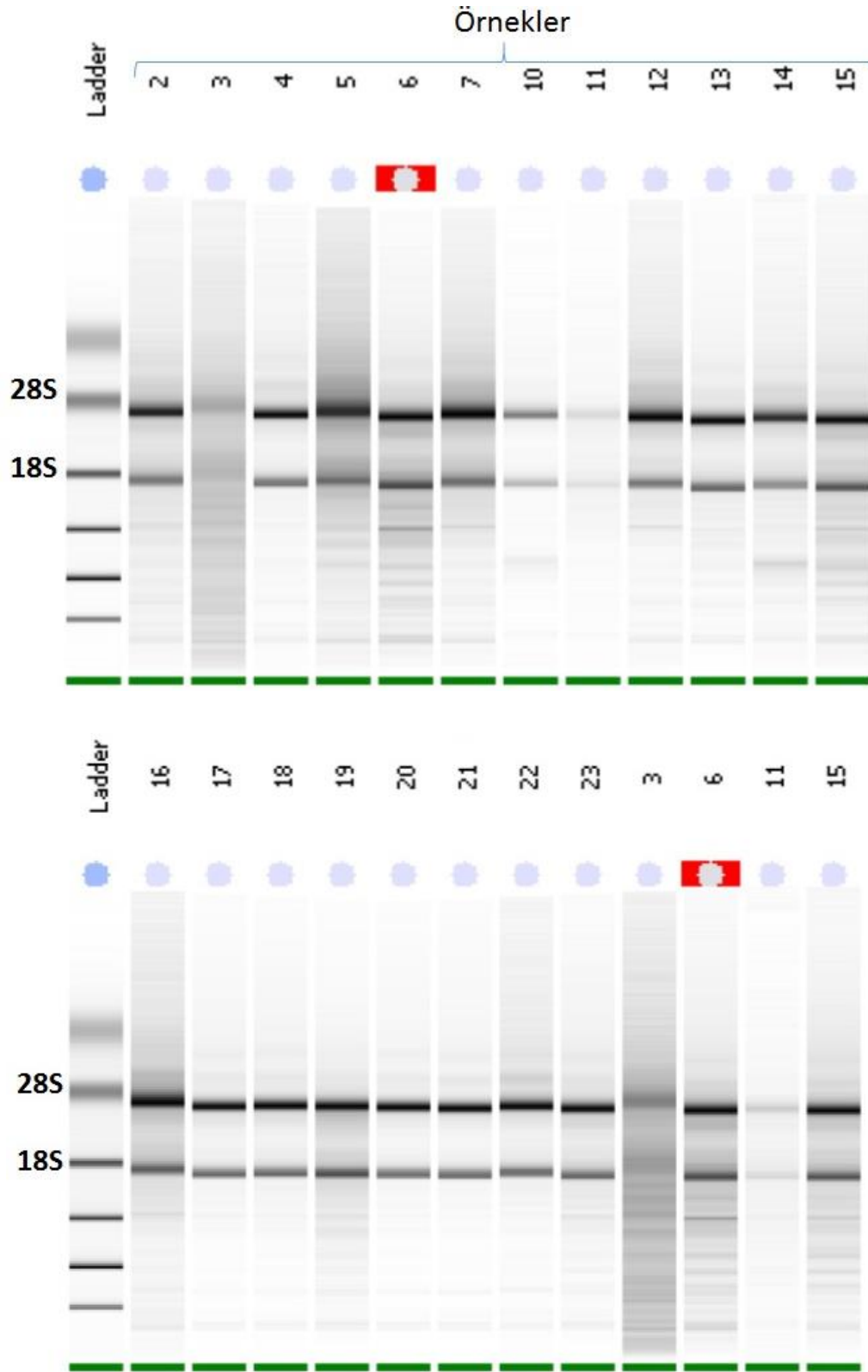
4.4.1. RIN (RNA Integrity Number) Skorlarının Değerlendirilmesi

RIN skoru, 28S/18S ribozomal RNA'ların oranıyla ilişkili bir değerdir (88). RIN skorunun yüksek olması RNA izolasyonu işlemleri sırasında RNA bütünlüğünün korunduğunu, düşük olması ise RNA örneklerinin uygun koşullarda saklanmadığını veya RNA izolasyonu işlemleri sırasında degradasyona uğradığını gösterir. Genellikle, RNA dizileme işlemleri için RIN skorunun 8'den yüksek olması istenirken, RNA saflık derecesini gösteren 260/280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans oranının ise 2'ye yakın olması tercih edilmektedir. Bu oranın 2'nin altında olması istenilmeyen bir durumdur. Çünkü 260/280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans oranının 2 olması saf RNA içerdiğini gösterirken, bu oranın 1,8 olması saf DNA içerdiğini gösterir. Bu nedenle, 260/280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans oranının 2'den küçük olması

RNA'nın DNA'dan tam olarak ayrıştırılmadığı ya da içerisinde safsızlıkların olduğunu gösterir. Bu çalışmada, her bir deney grubu için en yüksek RIN skoruna sahip 3'er örnek seçilerek toplam 6 deney grubu için 18 örnek üzerinde RNA dizileme analizleri gerçekleştirildi. Seçilen 18 RNA örneğine ait RIN skorları, RNA konsantrasyonu ve saflık dereceleri Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Ayrıca, RIN skorunun belirlenmesi için elde edilen elektroforez görüntüleri ise Şekil 4.16'da verilmektedir.

Tablo 4.1. RIN skorları, RNA konsantrasyonları ve RNA saflık dereceleri

Grup Adı	Örnek No	RNA (ng/ µl)	260/280 nm Absorbans oranı	RIN Skoru
Kontrol	1	2000	2,07	7,3
	2	2486	2,08	8,4
	3	1774	2,08	9,3
Klorofilin	4	3152	2,07	8,2
	5	584	2,04	6,9
	6	1945	2,08	9,1
N-asetil sistein	7	806	2,08	8,2
	8	821	2,08	8,8
	9	2716	2,08	8,8
Dosetaksel	10	450	2,07	8,9
	11	1611	2,09	8,5
	12	2272	2,09	8,9
Klorofilin + Dosetaksel	13	380	2,07	9,6
	14	432	2,08	9,5
	15	505	2,05	9,8
N-asetil sistein + Dosetaksel	16	529	2,07	9,8
	17	1997	2,09	9,8
	18	210	2,07	9



Şekil 4.16. RIN skorunun belirlenmesi için elde edilen elektroforez görüntüleri.

4.4.2. Farklı Eksprese Olan Genlerin Analizi

RNA dizileme verileri kantifiye edildikten sonra farklı eksprese olan genlerin analizi için protein kodlayan genler değerlendirildi. Bu çalışmada, gruplar arasındaki farklı eksprese olan genleri belirlemek için tüm deneysel gruplar bir arada analiz edildi. Daha sonra DESeq2 iş paketinin kontrast fonksiyonu aracılığıyla ikili gruplar arasındaki farklı eksprese olan genler belirlendi ($p < 0,05$). Deneysel gruplara göre farklı eksprese olan genlerin sayısı Tablo 4.2'de gösterilmektedir. Farklı eksprese olan genlerin analiz sonuçlarına göre, dosetakselin klorofilin ve N-asetil sistein ile birlikte kullanımının, farklı olarak eksprese edilen genlerin sayısını artırdığı saptandı.

Tablo 4.2. Gruplar arası farklı eksprese olan gen sayıları

Grup karşılaştırmaları	Farklı eksprese edilen genlerin sayısı
Kontrol ile Klorofilin	32
Kontrol ile N-asetil sistein	8
Kontrol ile Dosetaksel	88
Kontrol ile Klorofilin+ Dosetaksel	815
Kontrol ile N-asetil sistein+Dosetaksel	274

Farklı eksprese olan genlerin analizi sonuçlarına göre, Klorofilin (Tablo 4.3), N-asetil sistein (Tablo 4.4), Dosetaksel (Tablo 4.5), Klorofilin + Dosetaksel (Tablo 4.6), N-asetil sistein + Dosetaksel (Tablo 4.7) gruplarındaki gen ekspresyon değişimleri ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılık dereceleri gösterildi. Dosetaksel, Klorofilin + Dosetaksel ve N-asetil sistein + Dosetaksel gruplarındaki farklı eksprese olan genlerin sayısı diğer gruplara göre daha fazla olduğu için, bu gruplardaki farklı eksprese olan genlerin istatistiksel anlamlılık derecesine (p) göre ilk 50'si gösterildi.

Tablo 4.3. Kontrol grubuna göre Klorofilin grubundaki gen ekspresyonu değişimleri

No	Gene Adı	Log ₂ (ekspresyon değişimi)	p değeri
1	B4galnt3	-18,5514	2,43E-13
2	Spink5	21,70555	5,70E-09
3	Ace2	19,02556	2,12E-08
4	Mphosph9	-18,5314	2,26E-06

5	Mtss11	-1,09499	0,003661
6	Gm29666	1,635515	0,008434
7	Msc	-14,9989	0,008434
8	Tmem69	1,171375	0,009083
9	Scmh1	-0,83589	0,009083
10	Zfp362	-0,92432	0,009257
11	Pyroxd2	-0,96423	0,009454
12	Nmnat1	1,193714	0,013065
13	Fam122b	0,827313	0,014516
14	Hspe1	0,600032	0,014959
15	Dock6	-1,08059	0,015088
16	Trim65	2,040482	0,018359
17	Asns	1,247504	0,018594
18	Anks1	-1,04246	0,019042
19	Mrpl45	0,618976	0,019147
20	Zfp395	-0,75217	0,025629
21	Nfu1	0,762247	0,034379
22	Jup	-1,28607	0,037861
23	Srgap3	-1,30825	0,037861
24	Ddr1	-1,00483	0,043431
25	Taf15	0,48047	0,043642
26	Hs6st1	-1,02298	0,043642
27	Arvcf	-1,16426	0,043642
28	Hs3st1	-2,1139	0,043642
29	Zfp319	-0,77839	0,045504
30	Pbdc1	0,549124	0,049367
31	Pold3	0,477221	0,049367
32	Ankrd13d	-7,9666	0,049367

Tablo 4.4. Kontrol grubuna göre N-asetil sistein grubundaki gen ekspresyonu değişimleri

No	Gene Adı	Log ₂ (ekspresyon değişimi)	p değeri
1	B4galnt3	-18,572	6,07E-12
2	Mphosph9	-18,9519	1,49E-05
3	Usp7	-1,03408	0,00044
4	Ttc30a2	8,158685	0,003897
5	Mynn	-1,46243	0,00839
6	Sipa111	-2,04076	0,020592

7	Crtc2	-3,7202	0,025388
8	Nudcd3	-0,97424	0,03886

Tablo 4.5. Kontrol grubuna göre Dostaksel grubundaki gen ekspresyonu değişimleri

No	Gene Adı	Log ₂ (ekspresyon değişimi)	p değeri
1	Ace2	18,60416	6,86E-09
2	Spink5	18,75761	3,50E-07
3	Gm20425	-27,4672	1,24E-05
4	Tsc22d3	1,756368	0,00049
5	Cyp4b1	6,352667	0,001778
6	Il7r	3,705066	0,002507
7	Rbp7	5,678487	0,002926
8	Cd37	4,254961	0,0034
9	Itk	4,622238	0,005185
10	Fkbp4	-0,50594	0,005188
11	Grap2	4,464679	0,005188
12	Cxcl13	7,515182	0,005968
13	Gimap3	4,069447	0,005968
14	Cd300lg	4,259426	0,006011
15	Fkbp5	0,808007	0,006011
16	Lax1	4,746073	0,006262
17	Hs6st1	-1,06728	0,006458
18	Prep	3,305699	0,006458
19	Stap1	3,870014	0,006517
20	Gm21762	6,1043	0,00654
21	Ptn	5,524568	0,007203
22	Timd4	4,517008	0,007203
23	Dpt	3,136672	0,008334
24	Klhl6	2,59136	0,008334
25	Sit1	3,962542	0,008334
26	Cacna1e	5,37485	0,008661
27	Cd3e	4,417724	0,008751
28	Tox	5,753851	0,008751
29	Rasgef1a	4,846583	0,01144
30	Stc2	4,774362	0,01144
31	Vipr2	5,447044	0,01144
32	B3gnt5	4,521555	0,011656
33	Spata6	0,947854	0,011656
34	Ikzf3	4,678585	0,012242

35	Lck	3,650706	0,012269
36	Kcne3	-2,00015	0,013792
37	Cd2	4,856027	0,014653
38	Cxcl12	3,351789	0,014653
39	Dennd4a	0,964275	0,014653
40	Itgb7	3,414457	0,014653
41	Ms4a4b	3,917805	0,015852
42	Ablim3	4,300172	0,016516
43	Cd36	4,248513	0,017778
44	Cln6	0,643126	0,017778
45	Kif21b	2,734125	0,017778
46	Dnase113	3,471605	0,018261
47	Fam122b	0,704126	0,018261
48	Il6ra	0,666134	0,018261
49	Pamr1	3,941386	0,018261
50	Tyw5	-6,64829	0,018261

Tablo 4.6. Kontrol grubuna göre Klorofilin + Dosetaksel grubundaki gen ekspresyonu değişimleri

No	Gene Adı	Log ₂ (ekspresyon değişimi)	p değeri
1	Ace2	22,80318	3,27E-15
2	Per1	3,07656	1,61E-11
3	Thap11	-0,84333	1,99E-11
4	Tsc22d3	2,484937	3,10E-10
5	Fkbp5	1,157162	2,57E-07
6	Rpe	-0,81548	5,26E-07
7	Adamtsl4	2,008423	5,65E-07
8	Spink5	17,71175	1,31E-06
9	Spata6	1,357997	1,70E-06
10	Irf2bp1	-0,7759	2,73E-06
11	Npc1	0,802297	7,18E-06
12	Pamr1	5,699452	7,54E-06
13	Banp	-1,86844	1,01E-05
14	Rab7	0,617162	1,32E-05
15	Daam1	0,859726	1,55E-05
16	Lmcd1	5,77675	1,56E-05
17	Tmem252	4,579858	3,13E-05
18	Gadd45gip1	-0,85686	3,72E-05

19	Scara5	2,80751	4,66E-05
20	Il6ra	0,893934	4,98E-05
21	Pi15	1,862347	4,98E-05
22	Rassf8	1,292284	4,98E-05
23	Klf9	2,858757	6,03E-05
24	Map3k6	2,522934	6,71E-05
25	Cacna1d	1,554084	6,78E-05
26	Bcl7c	-0,94038	6,83E-05
27	Klf11	1,575732	7,63E-05
28	Npm3	-0,74088	7,63E-05
29	Ptx3	3,768264	7,91E-05
30	Tm6sf2	-2,76688	8,30E-05
31	Ttc30a2	-7,56401	9,29E-05
32	Slc10a6	5,366044	9,67E-05
33	Fkbp4	-0,56629	0,0001
34	Rps26	-0,79517	0,0001
35	Adh1	8,226307	0,000111
36	Per2	1,883232	0,000118
37	Ralgapb	0,55505	0,000135
38	Gpnmb	4,444945	0,000145
39	Cdkn1a	2,249785	0,000159
40	Usp4	0,464353	0,000159
41	Tra2b	-0,5324	0,000205
42	Gab2	1,577707	0,000223
43	Srsf7	-0,81528	0,000226
44	Nipal1	3,553033	0,000232
45	Adamts15	2,935513	0,00025
46	Cd163	2,621288	0,00025
47	Nr1d1	2,714204	0,000261
48	Fam46b	3,500185	0,000267
49	Pmp22	1,895764	0,000273
50	Paccin2	0,560392	0,000281

Tablo 4.7. Kontrol grubuna göre N-asetil sistein + Dosetaksel grubundaki gen ekspresyonu değişimleri

No	Gene Adı	Log ₂ (ekspresyon değişimi)	p değeri
1	Ace2	20,23213	7,34E-10
2	Tsc22d3	2,687147	7,34E-10

3	Spink5	22,34242	7,38E-10
4	Per1	2,608723	1,71E-06
5	Irf2bp1	-0,84669	1,05E-05
6	Rpe	-0,75406	0,000189
7	Vldlr	4,239983	0,00021
8	Egf	5,032145	0,000249
9	Cst6	5,826238	0,000265
10	Gm20425	-26,054	0,000265
11	Fsd2	5,461659	0,000373
12	Pde4dip	3,060112	0,000373
13	Phka1	1,763993	0,000373
14	Rps26	-0,84311	0,000412
15	Fabp3	5,383147	0,000419
16	Rragd	3,736895	0,000479
17	Pex6	-1,65691	0,000484
18	Actn2	5,049015	0,000526
19	Thap11	-0,57864	0,000526
20	Sptb	3,776478	0,00081
21	Mtmr6	0,688469	0,000979
22	Tacc2	3,157134	0,000995
23	Agl	2,204815	0,001003
24	Dennd4a	1,209149	0,001067
25	2310036O22Rik	-0,5108	0,00108
26	Pkia	3,343672	0,00108
27	Ckmt2	5,610429	0,001246
28	Trim27	-0,72648	0,001324
29	Tmem38a	3,654797	0,001351
30	Abcb4	4,274313	0,001383
31	Adamts14	1,604839	0,001383
32	Banp	-1,64285	0,001383
33	Cacna1d	1,466577	0,001607
34	Osbpl1a	0,674318	0,001608
35	Srl	4,176851	0,001701
36	Klhl38	6,075156	0,001727
37	Aqp4	7,834994	0,001829
38	Kcnc1	4,922392	0,002284
39	Tuba4a	2,447171	0,002408
40	Ttc30a2	-7,31176	0,00242
41	Cpeb3	2,172291	0,002466
42	Aldh1a1	4,714774	0,003611
43	Il6ra	0,783425	0,004002

44	Mb	4,368095	0,004002
45	Pcbp1	-0,39235	0,004002
46	Rtn2	3,527304	0,004002
47	Alkbh3	0,812388	0,004016
48	Cox7a1	3,772301	0,004016
49	Clic5	4,672742	0,00454
50	Ctxn3	7,404462	0,00454

4.4.3 Fonksiyonel Analiz Sonuçları

Farklı eksprese olan genlerin yollar üzerindeki etkilerini araştırmak için fonksiyonel analiz yapıldı. Fonksiyonel analiz için kullanılan Piano programıyla gen setlerindeki değişiklikleri istatistiksel olarak analiz edilerek Gen Ontolojisi ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanlarına dayalı olarak yollar üzerindeki etkileri araştırıldı. Sonuç olarak, her deneysel grupta aktive ve deaktive olan KEGG yolları belirlendi. Klorofilin (Tablo 4.8), N-asetil sistein (Tablo 4.9), Dosetaksel (Tablo 4.10), Klorofilin + Dosetaksel (Tablo 4.11), N-asetil sistein + Dosetaksel (Tablo 4.12) gruplarında aktive ve deaktive olan KEGG yolları gösterildi.

Tablo 4.8. Kontrol grubuna göre Klorofilin grubunda aktive ve deaktive olan yollar

Aktive olan KEGG yolları	p değeri	Deaktive olan KEGG yolları	p değeri
Oksidatif fosforilasyon	0	Fokal adezyonu	1.75E-07
Parkinson hastalığı	1.66E-10	Kanser yolları	1.75E-07
Termogenez	1.44E-09	Aritmojenik sağ vntrikül kardiyomiyopati (ARVC)	5.72E-07
DNA replikasyonu	2.21E-09	PI3K-Akt sinyal yolağı	8.15E-07
Huntington hastalığı	4.07E-09	Notch sinyal yolağı	9.07E-07
Proteazom	4.07E-09	ECM-reseptör etkileşimi	2.94E-06
Spliceozom	7.63E-09	Aktin hücre iskeletinin regülasyonu	6.68E-06
Homolog rekombinasyon	1.09E-07	Gastrik Kanseri	2.16E-05
Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)	3.24E-07	Meme kanseri	3.02E-05
PPAR sinyal yolağı	2.00E-06	Amebiyazis	3.74E-05
Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı	6.81E-06	Akson rehberliğı	3.74E-05

Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	3.52E-05	Kanser proteoglikanları	3.74E-05
Alzheimer hastalığı	4.32E-05	Hepatoselüler karsinome	8.36E-05
Propanoate metabolizm	0.000128	Endositoz	0.000125
Mismatch onarımı	0.000159	Hippo sinyal yolağı	0.000125
Piruvat metabolizması	0.000159	İnsan papillomavirus enfeksiyonu	0.000125
Glutasyon metabolizması	0.000160	Wnt sinyal yolağı	0.000125
Baz eksizyon onarımı	0.000872	MAPK sinyal yolağı	0.00016
Hücre Döngüsü	0.001286	Dilate kardiyomiyopati (DCM)	0.000168
İlaç metabolizması	0.001286	Rap1 sinyal yolağı	0.000355
Nükleotid eksizyon onarımı	0.001286	Kök hücre pluripotentini düzenleyici sinyal yollakları	0.000401
Ribozom	0.001286	Hipertropik kardiyomiyopati (HCM)	0.000468
Fankoni anemisi yolağı	0.002615	Tiroid hormonu sinyal yolağı	0.000716
Peroksizom	0.003536	Relaksin sinyal yolağı	0.000758
Steroid biyosentezi	0.004416	Adherenlerin bağlanması	0.000814
Renin-anjiyotensin sistem	0.004851	MicroRNAs in cancer	0.00113
Beta-alanin metabolizması	0.004851	TGF-beta sinyal yolağı	0.00113
Romatizmal eklem iltihabı	0.005361	Paratiroid hormon sentezi, salgılanması ve aktivasyonu	0.001422
Valin, lösin ve izolösin degradasyonu	0.006911	Neurotrophin sinyal yolağı	0.00175
Nitrojen metabolizması	0.009003	Bazal hücreli karsinom	0.002117
Folat tek karbon deposu	0.010612	Fosfolipaz D sinyal yolağı	0.002117
Aminoaçil-tRNA biyosentezi	0.01065	Kronik miyeloid lösemi	0.002341
Yağ sindirimi ve absorpsiyonu	0.010874	Ras sinyal yolağı	0.003029
Yağ asidi sentezi	0.011722	Akut miyeloid lösemi	0.005662
Ribozom biyosentezi	0.013232	ErbB sinyal yolağı	0.005662
Yağ asidi degradasyonu	0.013558	Platelet activation	0.00796
Sitokrom P450 ksenobiyotik metabolizması	0.018983	Mannoz O-glikan biyosentezi	0.010739
Porfirin ve klorofil metabolizması	0.021896	Oksitosin sinyal yolağı	0.010739
RNA transportu	0.023617	Kolinerjik sinaps	0.011085

RNA degradasyonu	0.02762	Hepatit B	0.011085
Terpenoit biyosentezi	0.030301	Prostat kanseri	0.011085
Protein eksportu	0.033826	Kanserde trasnkripsiyonel yanlış düzenlenme	0.011085
NHEJ yolağı	0.03585	Kolorektal kanser	0.012366
Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi	0.049355	Gap bağlantı proteini	0.013862
		Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı	0.014186
		Endometriyal Kanser	0.014186
		Glikozaminglikanlar biyosentezi	0.015532
		Otofaji	0.016476
		Melanogenez	0.016476
		Östrojen sinyal yolağı	0.018501
		Salmonella enfeksiyonu	0.024673
		Hedgehog sinyal yolağı	0.025708
		Apelin sinyal yolağı	0.028243
		Herpes simplex virus 1 enfeksiyonu	0.028243
		Renal hücre karsinomu	0.030196
		cGMP-PKG sinyal yolağı	0.031977
		Cushing sendromu	0.033678
		Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	0.035503
		Kanserde kolin metabolizması	0.035735
		Kaposi'nin sarkoma ile ilişkili herpes virüsü enfeksiyonu	0.035735
		Epitel hücrelerin bakteriyal invazyonu	0.039809
		Küçük hücreli akciğer kanseri	0.04023
		O-glikanın diğer türlerinin biyosentezi	0.04304

Tablo 4.9. Kontrol grubuna göre N-asetil sistein grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar

Aktive olan KEGG yolakları	p değeri	Deaktive olan KEGG yolakları	p değeri
DNA replikasyonu	9.33E-08	Ribozom	0
Homolog rekombinasyon	1.31E-07	Mannoz O-glikan biyosentezi	0.035126
Fankoni anemisi yolağı	5.39E-07	Oksidatif fosforilasyon	0.035126
Hücre Döngüsü	2.67E-06	Retrograde endocannabinoid sinyali	0.035126
Steroid biyosentezi	5.45E-06	Notch sinyal yolağı	0.049656
Mismatch onarımı	3.27E-05		
Epstein-Barr virus enfeksiyonu	0.000204		
İnsan T-cell lösemi virüsü 1 enfeksiyonu	0.000417		
Antijen prosesi	0.001392		
Folat tek karbon deposu	0.00149		
Hücre yaşlanma	0.004721		
Oosit mayozu	0.013596		
İnflamatuvar barsak hastalığı	0.014833		
Toll-like reseptör sinyal yolağı	0.018446		
Baz eksizyon onarımı	0.022026		
İnsan sitomegalo virüsü enfeksiyonu	0.026117		
NF-kappa B sinyal yolağı	0.037782		
Nükleotid eksizyon onarımı	0.040519		
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	0.046565		

Tablo 4.10. Kontrol grubuna göre Dosetaksel grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar

Aktive olan KEGG yolakları	p değeri	Deaktive olan KEGG yolakları	p değeri
Oksidatif fosforilasyon	0	Fokal adezyon	1.17E-07
Parkinson hastalığı	3.12E-10	Kanser yolakları	1.32E-07
Huntington hastalığı	3.64E-09	PI3K-Akt sinyal yolağı	2.94E-07

Spliceozom	3.64E-09	Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopati (ARVC)	4.89E-07
Termogenez	3.64E-09	Notch sinyal yolağı	1.59E-06
DNA replikasyonu	5.40E-09	ECM-reseptör etkileşimi	3.99E-06
Proteazom	1.46E-08	Aktin hücre iskeletinin regülasyonu	3.99E-06
Homolog rekombinasyon	1.44E-07	Akson rehberliği	2.80E-05
Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)	8.28E-07	Amebiyazis	2.88E-05
Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı	1.13E-05	Meme kanseri	3.24E-05
PPAR sinyal yolağı	1.59E-05	Kanser proteoglikanları	3.55E-05
Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	2.19E-05	Gastrik Kanseri	5.19E-05
Propanoat matabolizması	4.68E-05	Wnt sinyal yolağı	5.19E-05
Alzheimer disease	6.19E-05	Hippo sinyal yolağı	8.93E-05
Mismatch onarımı	0.000111	Endositoz	9.26E-05
Glutasyon metabolizması	0.000156	Hepatoselüler karsinome	9.26E-05
Piruvat metabolizması	0.000248	İnsan papillomavirus enfeksiyonu	0.000123
Baz eksizyon onarımı	0.000847	Dilated kardiyomiyopati (DCM)	0.000132
Hücre Döngüsü	0.001552	Kök hücre pluripotentini düzenleyici sinyal yolları	0.000234
Nükleotid eksizyon onarımı	0.001693	MAPK sinyal yolağı	0.000239
İlaç metabolizması	0.00175	Hipertropik kardiyomiyopati (HCM)	0.000281
Ribozom	0.001809	Rap1 sinyal yolağı	0.000642
Steroid biyosentezi	0.002032	MicroRNAs in cancer	0.000756
Renin-anjiyotensin sistem	0.002043	Relaksin sinyal yolağı	0.000756
Fankoni anemisi yolağı	0.003288	Tiroid hormonu sinyal yolağı	0.000941
Peroksizom	0.004715	Bazal hücreli karsinom	0.001285
Beta-alanin metabolizması	0.004813	Paratiroid hormon sentezi, salgılanması ve aktivasyonu	0.001344
Romatizmal eklem iltihabı	0.006487	Adherenlerin bağlanması	0.001429
Valin, lösin ve isolösin degradasyonu	0.008992	TGF-beta sinyal yolağı	0.001443

Aminoaçil-tRNA biyosentezi	0.011921	Nörotrofin sinyal yolağı	0.002128
Yağ asidi sentezi	0.011921	Fosfolipaz D sinyal yolağı	0.003223
Nitrojen metabolizması	0.01264	ErbB sinyal yolağı	0.003667
Yağ sindirimi ve absorpsiyonu	0.012791	Ras sinyal yolağı	0.003667
Folat tek karbon deposu	0.013179	Akut miyeloid lösemi	0.006567
Ribozom biyosentezi	0.013204	Kronik miyeloid lösemi	0.006653
Yağ asidi degradasyonu	0.014177	Platelet activation	0.009466
Sitokrom P450 ksenobiyotik metabolizması	0.014177	Kanserde trasnkripsiyonel yanlış düzenlenme	0.009935
Terpenoit biyosentezi	0.017999	Kolinerjik sinaps	0.01082
RNA transportu	0.026012	Oksitosin sinyal yolağı	0.011414
Porfirin ve klorofil metabolizması	0.028235	Kolorektal kanser	0.011943
NHEJ yolağı	0.0308	Hepatit B	0.011943
RNA degradasyonu	0.0308	Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı	0.01339
Protein eksportu	0.036204	Glikozaminglikanlar biyosentezi	0.01339
Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi	0.039933	Mannoz O-glikan biyosentezi	0.01339
Antijen prosesi	0.041948	Prostat kanseri	0.014843
		Endometriyal Kanser	0.01768
		Gap bağlantı proteini	0.01768
		Melanogenez	0.01768
		Östrojen sinyal yolağı	0.018918
		Otofaji	0.021422
		Cushing sendromu	0.025146
		Apelin sinyal yolağı	0.031292
		Herpes simplex virus 1 enfeksiyonu	0.031292
		Renal hücre karsinomu	0.033011
		Hedgehog sinyal yolağı	0.033706
		Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	0.038294
		O-glikanın diğer türlerinin biyosentezi	0.038947

		Küçük hücreli akciğer kanseri	0.038947
		cGMP-PKG sinyal yolağı	0.038947
		Epitel hücrelerin bakteriyal invazyonu	0.041796
		Kaposi'nin sarkoma ile ilişkili herpes virüsü enfeksiyonu	0.041796
		Salmonella enfeksiyonu	0.041796
		Insulin secretion	0.041905
		Kanserde kolin metabolizması	0.04381
		Sirkadiyan hareketlilik	0.048454
		GnRH sinyal yolağı	0.048454

Tablo 4.11. Kontrol grubuna göre, Klorofilin+Doksetaksel grubunda aktive ve deaktive olan yollar

Aktive olan KEGG yolları	p değeri	Deaktive olan KEGG yolları	p değeri
Lizozom	9.43E-09	Ribozom	0
Sitokrom P450 ksenobiyotik metabolizması	7.97E-07	Spliceozom	0
Hipertropik kardiyomiyopati (HCM)	2.20E-06	Herpes simplex virus 1 enfeksiyonu	1.35E-06
Dilated kardiyomiyopati (DCM)	4.82E-06	Ribozom biyosentezi	0.000145
Aktin hücre iskeletinin regülasyonu	8.34E-06	RNA polimeraz	0.003225
Fokal adezyon	5.70E-05	RNA transportu	0.014469
Kalsiyum sinyal yolağı	8.78E-05	Systemic lupus eritematuzus	0.017091
Sirkadiyen hareketlilik	0.00029	RNA degradasyonu	0.019981
PPAR sinyal yolağı	0.00029	Bazal transkripsiyon faktörleri	0.029676
Kardiyomiyositlerde adrenerjik sinyal	0.000343	Sitozolik DNA duyarlı yolak	0.029676
Aldosteron sentezi ve salgılanması	0.000347	Protein eksportu	0.035469
cAMP sinyal yolağı	0.000426		
Glutamaterjik sinaps	0.000442		

Kanserde kolin metabolizması	0.000473		
Kanser proteoglikanları	0.000473		
AMPK sinyal yolağı	0.000575		
İnsülin salgılanması	0.000575		
Endositoz	0.000949		
Kimyasal karsinogenez	0.001075		
ABC transporterları	0.001139		
ECM-reseptör etkileşimi	0.001139		
Renin salgılanması	0.001139		
Pankreatik salgı	0.001153		
Oksitosin sinyal yolağı	0.001735		
Adherenlerin bağlanması	0.001938		
Kortizol sentezi ve salgılanması	0.001938		
Fosfatidilinositol sinyal sistemi	0.001938		
İlaç metabolizması	0.001978		
Sirkadiyen ritim	0.002161		
Glutasyon metabolizması	0.002161		
Otofaji	0.002314		
Dopaminerjik sinaps	0.002314		
Gliserolipid metabolizması	0.002314		
Amebiyazis	0.002316		
Histidin metabolizması	0.003067		
Amfitamin bağımlılığı	0.003449		
Endokrin ve diğer faktör tarafından düzenlenen kalsiyum geri Emilimi	0.003449		
Renin-anjiyotensin sistem	0.003449		
Beta-alanin metabolizması	0.003504		
Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopati (ARVC)	0.004089		
GABAerjik sinaps	0.004257		
Kalp kası kasılması	0.00432		
GnRH sinyal yolağı	0.004893		
Vasküler düz kas kasılması	0.00527		
Mide asidi salgısı	0.005492		
Fosfolipaz D sinyal yolağı	0.006119		
MAPK sinyal yolağı	0.006443		
Sfingolipid metabolizması	0.006443		

Fagozom	0.006519		
Kolestrol metabolizması	0.008257		
Aldosteron ile düzenlenen sodyum geri emilimi	0.008455		
Serotonerjik sinaps	0.008842		
Mitofaji	0.009264		
Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi	0.009671		
Uzun süreli depresyon	0.010901		
Safra salgısı	0.011305		
Rap1 sinyal yolağı	0.013082		
Sfingolipid sinyal yolağı	0.013082		
cGMP-PKG sinyal yolağı	0.013082		
Ömür uzunluğu düzenleme yolağı	0.015051		
Proksimal tübül bikarbonat ıslahı	0.015051		
Gap bağlantı proteini	0.016419		
Glukagon sinyal yolağı	0.016419		
Apelin sinyal yolağı	0.016536		
Vazopressin ile düzenlenen su geri emilimi	0.021471		
Melanogenez	0.021665		
Paratiroid hormon sentezi, salgılanması ve aktivasyonu	0.023831		
Tükürük salgısı	0.025311		
Epitel hücrelerin bakteriyal invazyonu	0.02537		
Yağ sindirimi ve absorpsiyonu	0.02537		
Insulin sinyal yolağı	0.027665		
Tiroid hormonu sinyal yolağı	0.027665		
Mineral absorpsiyon	0.028881		
Inositol fosfat metabolizması	0.030439		
PI3K-Akt sinyal yolağı	0.030439		
Morfin bağımlılığı	0.032977		
Sıkı bağlantı	0.033943		
Wnt sinyal yolağı	0.034375		
Yağ asidi sentezi	0.040895		

Ferroptoz	0.043888		
Sinaptik vezikül döngüsü	0.045009		
Yumurtalık steroidogenezi	0.047328		
Uzun vadeli güçlendirme	0.048331		

Tablo 4.12. Kontrol grubuna göre, N-asetil sistein+Doksetaksel grubunda aktive ve deaktive olan yolaklar

Aktive olan KEGG yolakları	p değeri	Deaktive olan KEGG yolakları	p değeri
Kalsiyum sinyal yolağı	1.57E-06	Ribozom	0
Kalp kası kasılması	1.57E-06	Spliceozom	0
Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)	1.57E-06	Notch sinyal yolağı	0.006711
Dilate kardiyomiyopati (DCM)	2.77E-06	Viral karsinogenez	0.006711
Hipertropik kardiyomiyopati (HCM)	1.18E-05	Sistemik lupus eritematozus	0.016762
Alzheimer hastalığı	3.64E-05	RNA polimeraz	0.019108
Termogenez	3.64E-05	Hippo sinyal yolağı	0.020107
Oksidatif fosforilasyon	4.07E-05	mRNA surveillance pathway	0.027564
Propanoat matabolizması	4.07E-05	Sitozolik DNA duyarlı yolak	0.033438
Kardiyomiyositlerde adrenerjik sinyal	4.11E-05	İnsan papillomavirus enfeksiyonu	0.033438
Parkinson hastalığı	7.66E-05	Ribozom biyosentezi	0.033438
PPAR sinyal yolağı	8.94E-05		
Nişasta ve sükrözmetabolizması	9.44E-05		
Glucagon sinyal yolağı	0.000454		
ABC transporterları	0.000679		
Sirkadiyen hareketlilik	0.001056		
Lizozom	0.001339		
Renin salgılanması	0.001473		
AMPK sinyal yolağı	0.001564		
Insulin sinyal yolağı	0.001903		
Oksitosin sinyal yolağı	0.002139		
Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı	0.002985		

Fosfatidilinositol sinyal sistemi	0.003022		
Renin-anjiyotensin sistem	0.003022		
Peroksizom	0.004524		
Mide asidi salgısı	0.004907		
Safra salgısı	0.005931		
Sirkadiyen ritim	0.006913		
Aldosteron sentezi ve salgılanması	0.008595		
Fagozom	0.01103		
cGMP-PKG sinyal yolağı	0.01252		
Inositol fosfat metabolizması	0.01262		
Retrograd endokannabinoid sinyali	0.01303		
Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi	0.015371		
Tükrük salgısı	0.015371		
Adipositlerde lipolizin regülasyonu	0.023533		
cAMP sinyal yolağı	0.02519		
	0.026097		
Nitrojen metabolizması	0.026334		
Aldosteron ile düzenlenen sodyum geri emilimi	0.027675		
Apelin sinyal yolağı	0.027675		
Sitokrom P450 ksenobiyotik metabolizması	0.027675		
Pankreatik salgı	0.027675		
Proksimal tübül bikarbonat ıslahı	0.027675		
Piruvat metabolizması	0.036103		
Beta-alanin metabolizması	0.036103		
Yağ asidi degradasyonu	0.042862		
Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopati (ARVC)	0.047755		
İnsülin salgılanması	0.048982		

Fonksiyonel analizler sonuçlarına göre gruplar arasındaki aktive ve deaktive olan yollar istatistiksel anlamlılıklarına göre değerlendirilerek Tablo 4.13'te gösterildi.

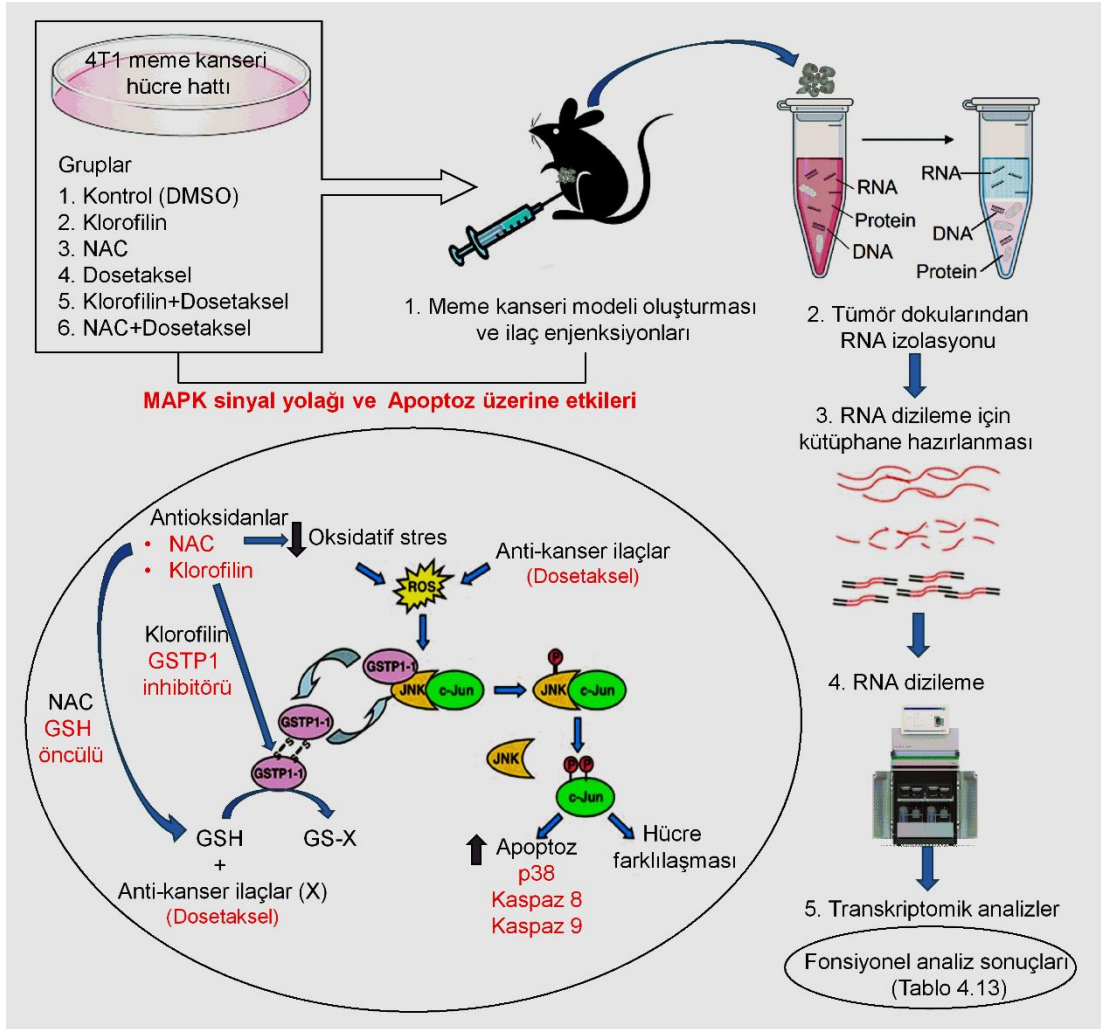
Aktive olan yolaklar (+), deaktive olan yolaklar (-), etkilenmeyen yolaklar ise (0) ile gösterildi. İstatiksel olarak anlamlılık derecelerine göre (+) ve (-) simgelerinin sayısı artırıldı. (+): $p < 0,05$, (++): $p < 0,01$, (+++): $p < 0,001$, (++++): $p < 0,0001$ ve (-): $p < 0,05$, (--): $p < 0,01$, (---): $p < 0,001$, (----): $p < 0,0001$.

Tablo 4.13. Fonksiyonel analizler sonuçlarına göre gruplar arasındaki aktive ve deaktive olan yolaklar.

	Klr	NAC	Dos	Klr + Dos	NAC + Dos
Oksidatif fosforilasyon	++++	-	++++	0	++++
DNA replikasyonu	++++	++++	++++	0	0
Hücre döğüsü	++	++++	++	0	0
Glutasyon metabolizması	+++	0	+++	++	0
Sitokrom P450 ksenobiyotik metabolizması	+	0	+	++++	+
İlaç metabolizması	++	0	++	++	0
MAPK sinyal yolağı	---	0	---	++	0
Wnt sinyal yolağı	---	0	----	+	0
Fosfolipaz D sinyal yolağı	--	0	--	++	0
Oksitosin sinyal yolağı	-	0	-	++	++
Notch sinyal yolağı	----	-	-----	0	--
Otofaji	-	0	-	++	0
Kanser proteoglikanları	----	0	----	+++	0
Adherenlerin bağlanması	---	0	--	++	0
Gap bağlantı proteini	-	0	-	+	0

Sonuç olarak, GSTP1 inhibitörü olan klorofilin ile desetakselin beraber uygulanması başta MAPK sinyal yolağı olmak üzere kanserle ilişkili baskılanmış birçok mekanizmanın (MAPK, Wnt, oksitosin sinyal yolakları ve otofaji) aktivasyonunu sağladığı tespit edildi. Ayrıca, ilaç direncinin baskılanmasıyla apoptotik sinyal yolaklarının aktivasyonuna karşın anti-apoptotik fosfolipaz D (FLD) sinyal yolağının da aktive olduğu saptandı. Bu nedenle, kanser tedavisinde ilaç direncinin yanında FLD sinyal yolağını yeni bir terapötik hedef olarak ortaya çıkarılmıştır (Tablo 4.13). Bu çalışmada antioksidan özelliğe sahip GSTP1 inhibitörü olan klorofilinin meme kanseri

tedavisinde ilaç direncini önleyici ve apoptozu indükleyici etkilerine karşın, NAC gibi antioksidanların apoptotik sinyal yollarını baskılayarak kanser tedavisinin prognozunu olumsuz yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Klorofilin ve N-asetil sisteinin (NAC) meme kanseri tedavisindeki etkileri

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kompleks ve heterojen yapıya sahip bir hastalıktır. Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde başarıya ulaşmak için meme kanseri türlerine özgü tedaviler uygulanmaktadır. ER ve/veya PR pozitif olan alt gruplarının tedavisinde kemoterapiye ek hormon tedavisi; HER2 pozitif olan meme kanseri alt grubunun tedavisinde HER2'yi baskılayacak ajanlar kullanılmaktadır. Üçlü negatif (ER, PR, HER2) meme kanseri alt grubu tedavisinde ise reseptör duyarlılığı söz konusu olmadığı için kemoterapi tek tedavi seçeneği olarak gözükmektedir (25). Üçlü negatif meme kanserinde tedavinin başarısını engelleyen en önemli sorunlardan biri kemoterapiye karşı gelişen ilaç direncidir. Kanser tedavisinde ilaç direncini hedef alan bu çalışmada üçlü negatif meme kanseri üzerinde çalışılmıştır.

Birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de, Glutasyon S-transferaz enzim ailesinden, glutasyon S-transferaz P1 (GSTP1) izoziminin ekspresyon seviyesinin arttığı bilinmektedir (91-93). GSTP1 kemoterapötik ajanları glutasyon (GSH) konjugasyonu ile inaktive ederek kanser hücrelerinde ilaç direncini indüklemektedir(3-5). Bunun yanısıra, hücre canlılığında ve apoptotik sinyalde rol oynayan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağında GSTP1 düzenleyici olarak görev almaktadır(6, 29). Bu nedenlerle, meme kanserinde gelişen ilaç direncini yenmek ve kanser hücrelerinin apoptoza yönelmesini baskılayan mekanizmaları engellenmek için GSTP1'in inhibe edilmesi önem arz etmektedir (27, 28). Bu çalışma için seçilen klorofilin grubumuz tarafından, GSTP1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiş aynı zamanda antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür (7). Bir önceki çalışmamızda klorofilinin kimyasal olarak indüklenmiş (N-metil nitrozüre) meme kanseri hayvan modelinde tümör oluşumunu geciktirdiğini, fakat tümör oluşuktan sonra tümör gelişimini hızlandırdığını gözlemledik (9). Bu nedenle klorofilinin antioksidan özelliğinin kanser hücrelerinin çoğalmasını indükleyebileceği kanısına vardık. Bu çalışmada ise, antioksidan özelliğinin yanısıra GSTP1 inhibitörü olan klorofilin ile GSTP1'in kosubstratı GSH'nun öncül molekülü olan N-asetil sisteinin (NAC) kanser tedavisi üzerindeki etkileri araştırıldı.

İnsandaki üçlü negatif meme kanserinin fenotipik özelliklerini yansıttığı için 4T1 fare meme kanseri hücre hattının dışı balb/c farelerinin meme dokusuna enjekte

edilmesiyle oluşturulan meme kanseri hayvan modeli deneysel araştırmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (94). Bu alışmada, 4T1 hücreleri kullanılarak yapılan *in vivo* ve *in vitro* alışmalarda klorofilin ve NAC kullanımının kanser tedavisi üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, 4T1 hücre lizatları ve tümör dokularında GST aktivitesi, GSH düzeyleri, JNK sinyal yolağı bileşeni olan c-Jun ile apoptotik bir protein olan p38 ve kaspaz 8-9'un düzeyleri değerlendirildi. Kanser hücrelerinin apoptoz ve/veya proliferasyona yönelimlerinin antioksidan moleküllerle ilişkisinin daha detaylı incelenmesi için tümör dokularından elde edilen RNA dizileme sonuçları transkriptomik analizlerle değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, klorofilin ve NAC'in meme kanseri tedavisi üzerindeki etkileri *in vivo/vitro* ve *in silico* (transkriptomik) olarak gösterildi.

Bu çalışmada, klorofilin (Klr) ve N-asetil sistein (NAC) moleküllerinin ayrı ayrı ve kanser ilacı dosetaksel (Dos) ile birlikte kullanılmalarının 4T1 meme kanseri hücrelerinin apoptozu akım sitometrisinde Annexin V ile belirlendi. Annexin V sonuçlarına göre, Klorofilin, NAC ve dosetakselin ayrı ayrı uygulandığı gruplardaki erken apoptotik hücre oranları sırasıyla % 4, % 1 ve % 4 iken, klorofilin ve NAC'in dosetaksel ile birlikte uygulandığı Klr+Dos ve NAC+Dos gruplarındaki erken apoptotik hücre oranlarının sırasıyla % 30 ve % 15 olduğu tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre, Klorofilin ve NAC'in dosetaksel ile birlikte olarak uygulanmasının 4T1 meme kanseri hücrelerinde sinerjik olarak apoptozu indkleyebildikleri saptandı. Klorofilinin uygulama dozu (52,12 μ M) NAC'in uygulama dozundan (5 mM) yaklaşık 100 kat daha düşük olmasına karşın, klorofilin ve dosetakselin birlikte uygulanmasındaki erken apoptotik hücre oranının (% 30), NAC ve dosetakselin beraber uygulanmasındaki erken apoptotik hücre oranından (% 15) daha fazla olduğu saptandı. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, klorofilin kullanımının meme, akciğer, kolon ve mesane kanserlerinde apoptozu indükleyici etkisinin olduğu rapor edilmiştir (9, 95-100). NAC kullanımının ise, antikanser ilaçların sitotoksik etiklerini azaltarak apoptozu baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur (101, 102). Bizim alışmamızda ise, 4T1 l negatif meme kanseri hücre hattında apoptozun indüklenmesi için klorofilin kullanımının NAC kullanımından daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Birçok kanser hücre dizisinde olduğu gibi meme kanseri hücrelerinde de GSTP1'in ve glutatyonun (GSH) yüksek oranda üretildiği rapor edilmiştir (33, 103). Tümörlerde GSH düzeyleri ve GSTP1 aktivitelerinin artması kanser ilacının hızlı bir şekilde detoksifiye olmasına ve ilaçların tümör dokularında istenilen etkinliğe ulaşmasına engel olmaktadır (34). Bu çalışmada Glutatyon-S-transferazların aktivitesi CDNB substratı kullanılarak toplam aktivite olarak ölçülmüştür. Klorofilin GSTP1 izozimine spesifik bir inhibitör olduğu için (7), GST aktivitesi üzerinde kısmi inhibisyona neden olmuştur. Toplam GST aktiviteleri sonuçlarına göre, hücre ve tümörde N-asetil sistein (NAC), GST aktivitesini artırırken, klorofilinin (Klr) azalttığı saptanmıştır. Klorofilin GSTP1'in inhibitörü olduğu için GST aktivitesini kısmi olarak azalttığı, NAC'in ise GST'nin kosubstratı olan glutatyonun öncül molekülü olduğu için GST aktivitesini indüklediği düşünülmektedir. Diğer yandan tümör dokusu ve hücrelerdeki GSH düzeyleri değerlendirilecek olursa, GSH'un öncül molekülü olan NAC'ın uygulandığı deneysel gruplarda GSH düzeyinin arttığı sonucuna varıldı. Klorofilin (Klr) kullanımı tümör dokusundaki GSH miktarını değiştirmezken, hücredeki GSH miktarını artırdığı tespit edildi. Klorofilin ve dosetakselin birlikte kullanımı (Klr+Dos) ise tümör dokusundaki GSH düzeylerini azaltırken, hücredeki GSH düzeyini değiştirmediği saptandı. Klorofilinin GST aktivitesi ve GSH düzeyleri üzerindeki etkileri beraber değerlendirildiğinde, Klorofilinin GSTP1'i inhibe ederek dosetakselin tümör dokusundaki etkinliğini artırdığı için dosetakselin sitotoksik özelliği nedeniyle tümör dokusundaki GSH düzeyinin düştüğü sonucuna varıldı. Hücrede ise klorofilin GSH düzeylerini artırdığı için hücrede antioksidan özelliğinin inhibitör özelliğinden daha baskın olduğu sonucuna varıldı. N-metil nitrozüre ile indüklenmiş meme kanseri hayvan modeli oluşturduğumuz bir başka çalışmada klorofilinin tümör oluşumunu geciktirdiğini, fakat tümör oluşuktan sonra tümör gelişimini hızlandırdığını rapor ettik (9). Bir başka çalışmamızda ise klorofilinin erken ve geç dönem koruyucu etkilerini araştırdığımız meme kanseri hayvan modelinde glutatyon ilişkili antioksidan enzimlerini ve DNA hasarı düzeylerini değerlendirdik (M. Ozcan, D. Aydemir, M. Bacanlı, H.G. Anlar, N. N. Ulusu, Y. Aksoy, Protective Effects of Antioxidant Chlorophyllin in Chemically Induced Breast Cancer Model *in Vivo*, Journal of Biological Trace Element Research; accepted). Bahsi geçen her iki çalışmada da klorofilinin koruyucu etkisinin erken dönemde daha baskın olduğunu

saptadık. Bu çalışmamızdaki hücre kültüründe elde ettiğimiz sonuçlar diğer iki çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ayrıca, literatürde klorofilinin antimutajenik, antijenotoksik ve antikanserojenik özelliklerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (69-72)

GST'ler katalitik etkilerinin yanında, hücre canlılığında ve apoptotik sinyalde rol oynayan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağında da düzenleyici olarak görev almaktadır (6). MAPK yolağını protein-protein etkileşimi yoluyla düzenleyen GSTP1, apoptoz ve proliferasyonda rol alan JNK (c-Jun N-terminal kinaz)'in endojen inhibitörü olarak davranmaktadır. Oluşan JNK-GSTP1 kompleksi JNK'nin etkinliğini azaltarak apoptozun baskılanmasına neden olmaktadır (35, 36). Kanser hücrelerinde, GSTP1 inhibisyonu sağlanırsa antikanser ilaçların etkinliği artarak ve JNK aktivasyonu sayesinde c-Jun fosforilasyonu sağlanır. Fosforillenmiş c-Jun bir transkripsiyon faktörü olan AP-1' aracılığıyla apoptotik genlerin indüklenmesini sağlar. Literatürde dosetakselin sitotoksik etki göstererek JNK sinyal yolağı üzerinden kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (104-106). N-asetil sisteinin ise, antikanser ilaçların toksik etkilerini azalttığı için JNK aktivitesini baskıladığı rapor edilmiştir (107-109). Ancak, klorofilinin kanser tedavisinde apoptotik sinyal yolları üzerinde etkisini gösteren kapsamlı bir çalışma yoktur. Bu araştırma, dosetaksel, N-asetil sistein ve klorofilinin MAPK apoptoz yolağı üzerinde etkinliklerinin gösterilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada dosetakselin hücrede JNK aktivasyonunu sağlayarak fosforillenmiş c-Jun miktarını artırdığı, tümör dokusunda ise azalttığı tespit edildi. Bu durumun tümörde gelişen GSTP1 aracılı ilaç direncinden kaynaklandığı düşünülmektedir (91). N-asetil sistein hem hücrede hem de tümör dokularında JNK aktivasyonunu azaltarak fosforillenmiş c-jun miktarını azalttığı saptandı (Şekil 4.8). N-asetil sisteinin kanser hücreleri ve tümör dokularında gerek dosetakselden kaynaklanan sitotoksikite gerekse kanser hücrelerinde oluşan oksidatif stresi engelleyerek JNK aktivasyonunu baskıladığı sonucuna varıldı. Dosetaksel tümör dokusunda fosforillenmiş c-jun miktarını azaltırken, klorofilin ve dosetakselin beraber kullanımında fosforillenmiş c-jun düzeyinin arttığı tespit edildi. Bu artışın nedeni dosetakselden dolayı artmış ilaç direncininin klorofilin aracılığıyla baskılanmasından kaynaklanmış olabilir. Buradan klorofilinin, hem GSTP1

inhibisyonu hem de GST-JNK regülasyonu üzerinde etkili olarak tümör dokularında JNK aracılı apoptozun indüklenmesine katkı sağladığı sonucuna varılmıştır.

Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) protein ailesinin bir üyesi olan p38, hücrenin büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve kontrollü ölümü gibi birçok süreçte rol alır. Sitokinler, UV ışınları, ozmotik şok ve lipopolisakkaritler gibi çeşitli hücresel stres faktörleriyle p38 aktive olur. p38'in aktivasyonu yapısında bulunan Thr180 ve Tyr182 aminoasitlerinin fosforilenmesi ile gerçekleşir (85). Fosforillenmiş p38 hücre içerisinde apoptotik yolları aktive ettiği için fosforillenmiş p38 miktarı ve bu miktarın toplam p38 miktarına bölünmesiyle elde edilen fosforillenmiş p38 oranının belirlenmesi hücredeki apoptotik yolların aktivasyonunu değerlendirmek açısından önemlidir (110, 111). Literatürde, çeşitli kanser türlerinde dosetaksele karşı gelişen çoklu ilaç direncinden dolayı baskılanmış p38 sinyalinin aktivasyonunu amaçlayan birçok çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda dosetaksel ile bazı doğal veya sentetik bileşiklerin (deguelin, tomentodione ve noscapine) beraber kullanımının kanser hücrelerinde fosforillenmiş p38 miktarını artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (112-115). Bizim çalışmamızda ise, dosetaksel ile klorofilin ve N-asetil sisteinin beraber uygulanması tümör ve kanser hücrelerinde dosetakselin p38'i aktive edici özelliğini artırdığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.11).

Apoptoz mekanizması dış (ekstrinsik) ve iç (intrinsik) kaynaklı olmak üzere iki temel yolak tarafından aktive edilmekte ve bunu takiben hücredeki ilgili kaspazlar aktive olmaktadır. Dış kaynaklı sinyal yolağında, ölüm reseptörü ligandının bağlanması ile oluşan protein kompleksi kaspaz-8 oluşumunu sağlamakta ve bu da efektör kaspazları aktive etmektedir. İç sinyal yolağında ise, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c molekülü salınmakta ve daha sonra kaspaz-9 aktive edilmektedir (55). Bu çalışmada klorofilin, N-asetil sisteinin ve dosetaksel uygulaması sonucunda hücre ve tümör dokularında kaspaz 8/9 aktivite düzeyleri ölçülmüş ve baskın apoptotik yolağın aydınlatılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak, klorofilin ve N-asetil sisteinin dosetaksel ile beraber kullanılması kaspaz 9'un aktivasyonunu hem hücrede hem de tümör dokusunda artırırken, kaspaz 8'in sadece tümördeki aktivasyonunu artırdığı tespit edildi. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, üçlü negatif meme kanserinde MAPK sinyal yolağının aktivasyonu ile kaspaz 9 aracılı apoptozun indüklediği rapor edilmektedir (104, 108, 116). Bizim çalışmamızda ise, MAPK sinyal

yollağının üyeleri (JNK ve p38) aktivasyonu ile hem hücre hem de tümör dokularında kaspaz 9 aracılı apoptozun indüklendiği sonucuna varıldı.

Transkriptom, bir hücrenin veya hücreler grubunun belirli bir gelişim evresinde ya da belirli bir fizyolojik durumdaki eksprese edilen tüm transkriptlerini ifade eden bir terimdir. Transkriptomik analizlerle, gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin hastalık mekanizmaları ile olan ilişkisi aydınlatılabilir (73, 117, 118). Bu çalışmada, transkriptomik analizlerle, meme kanseri tedavisinde klorofilin, N-asetil sistein ve dosetaksel uygulanmasıyla kanser hücrelerinin apoptoz ve/veya proliferasyona yönelimlerini sağlayan yolların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Herbir deneysel gruptaki farklı eksprese olan gen sayıları (Tablo 4.2) ve buna bağlı olarak aktive ve/veya deaktive olan yollar değerlendirildiğinde herbir grupta farklı sayıda yolağın etkilendiği görülmüştür. Klorofilin uygulanan grupta baz eksizyon onarımı, “Mismatch” onarımı ve Nükleotid eksizyon onarımı gibi yollar aktive olurken kanserle ilişkili birçok yolağın deaktive olduğu tespit edildi (Tablo 4.8). Bu nedenle klorofilin koruyucu etki gösterdiği sonucuna varıldı. Daha önceki çalışmamızda da kimyasal (N-metil nitrozüre) ile indüklenmiş meme kanseri hayvan modelinde klorofilinin DNA hasarını önlediğini “comet assay” sonuçlarıyla göstermiştik (9). Bu çalışmada ise klorofilinin mekanistik olarak (baz eksizyon onarımı, “mismatch” onarımı, nükleotid eksizyon onarımı) DNA hasarını nasıl engellediğini ortaya çıkardık. Literatürde antioksidan özellikteki moleküllerin DNA hasarını önlediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (119-121). Ayrıca klorofilinin DNA replikasyonunu aktive ederek kanser hücrelerinin proliferasyonunu indükleyici etki gösterdiği de gözlemlendi. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada antioksidan moleküllerin kanser hücrelerinin çoğalmasını indüklendiği bildirilmektedir (61-63). Bu nedenle kanser tedavisi alan kişilerde antioksidanların kontrolsüzce kullanımı tehlike oluşturabilmektedir. Bu çalışmada da antioksidan kullanımının koruyucu etkilerine karşın kanser hücrelerinin proliferasyonunu indüklediği sonucu transkriptomik olarak doğrulanmıştır. Ayrıca klorofilinin birçok metabolik yolağı aktive ettiği saptandı. Bu metabolik yollar: oksidatif fosforilasyon, sitrat döngüsü (TCA döngüsü), termogenez, glioksilat ve dikarboksilat metabolizması, propanoat metabolizması, piruvat metabolizması, glutatyon metabolizması, ilaç metabolizması, steroid biyosentezi, valin, lösin ve izölösün degradasyonu, beta-alanin metabolizması, nitrojen

metabolizması, folat metabolizması, aminoasit-tRNA biyosentezi, yağ asidi sentezi, yağ sindirimi ve absorpsiyonu, porfirin ve klorofil metabolizması, sitokrom p450 ksenobiyotik metabolizması olarak sıralanabilir. Bu metabolik yollardan yağ asidi sentezi ve aminoasit-tRNA biyosentezi gibi reaksiyonlar hücrelerin gelişip çoğalmasında önemli rol oynamaktadır. Grubumuz tarafından yayınlanan bir derleme de kanser hücrelerinde aktive olan lipogenezin L-carnitin analogu olan perheksil ile inhibe edilmesiyle kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenebileceği önerilmektedir (122, 123).

Bu çalışmamıza konu olan klorofilin molekülü GSTP1 inhibitörü olmasının yanında antioksidan özellikte bir molekül olduğu için kanser hücrelerinin proliferasyonu indüklediğini daha önceki çalışmamızda göstermiştik (9). Bu çalışmada kanser tedavisinde klorofilin antioksidan özelliklerini karşılaştırmak için N-asetil sistein molekülü (NAC) seçildi. NAC, hücre içinde önemli bir antioksidan molekül olan glutatyonun öncül molekülüdür. Dışarıdan N-asetil sistein molekülünün hücrelere verilmesi glutatyon sentezini artırabilmektedir. Glutatyon sentezinin artmasıyla hücrelerin antioksidan savunma kapasitesi artmaktadır (64). Antioksidan kullanımının kanser tedavisindeki etkilerinin araştırılmasında NAC en çok kullanılan moleküllerden biridir. Antioksidan kullanımının kanser tedavisi üzerine yapılan bazı çalışmalarda, NAC'in kanser oluşumunu ve gelişimini hızlandırarak metastazı artırdığı tespit edilmiştir (63, 65-67). Transkriptomik çalışmanın sonuçlarına göre, klorofilin kullanımda olduğu gibi, NAC kullanımında da mekanistik olarak (baz eksizyon onarımı, "mismatch" onarımı, Nükleotid eksizyon onarımı) DNA hasarının engellediği saptanmıştır (Tablo 4.9). Ancak klorofilin uygulamasında oksidatif fosforilasyon ve sitrat döngüsü (TCA döngüsü) aktive olurken, N-asetil sistein oksidatif fosforilasyon uygulamasında deaktive olduğu tespit edildi. Bilindiği üzere, sağlıklı hücreler enerji gereksinimlerini öncelikle glikoliz ve oksidatif fosforilasyon reaksiyonlarından elde edilen ATP ile sağlamaktadır. Kanser hücreleri ise çoğalmak için enerji gereksinimlerini glikolizden sağlarlar. Kanser hücrelerini glikolize yönlendiren bu durum Warburg etkisi olarak isimlendirilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Warburg etkisinden dolayı kanser hücrelerinde ilaç direncinin indüklendiği ve kanser tedavisinin zorlaştığı bildirilmektedir (124, 125). Bizim çalışmamızda da NAC kullanımının kanser hücrelerindeki oksidatif fosforilasyon

yolağını deaktive ederek, Warburg etkisini artıracadı ve kanser hücrelerinde ilaç direncinin indüklenmesine neden olacağı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle kanser tedavisi gören bireylerin kontrolsüzce antioksidan kullanmasının tedavi sürecini olumsuz yönde etkileyeceği sonucu çıkarılmaktadır.

Transkriptomik analizlerden elde edilen tüm sonuçlara göre, GSTP1 inhibitörü olan klorofilin ile dosetaksel birlikte kullanılmasının başta MAPK sinyal yolağı olmak üzere kanserle ilişkili baskılanmış birçok mekanizmanın (MAPK, Wnt, oksitosin sinyal yolakları ve otofaji) aktivasyonunu sağladığı tespit edildi (Tablo 4.13). İlaç direncinin inhibisyonuyla kanser hücrelerini apoptoza yönlendirecek sinyal yolaklarının aktivasyonuna karşı anti-apoptotik özellikteki fosfolipaz D (FLD) sinyal yolağının da aktive olduğu saptandı. Bu nedenle, kanser tedavisinde ilaç direncinin yanında FLD sinyal yolağının yeni bir terapötik hedef olabileceği sonucuna varıldı. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da FLD sinyal yolağı yeni bir terapötik hedef olarak gösterilmektedir (126-128). Ayrıca, klorofilin ve dosetakselin ayrı ayrı ve beraber uygulandığı gruplarda glutasyon ve P450 ksenobiyotik metabolizmalarının aktive olduğu belirlenmiştir. Bu durum, büyük olasılıkla GSTP1'in klorofilinle inhibisyonundan dolayı hücre içinde artan sitotoksisiteyi kompanse etmek amacıyla olabileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, klorofilin ve GSTP1-1'in kosubstratı olan GSH'nun öncül molekülü N-asetil sisteinin (NAC) meme kanseri tedavisi üzerindeki etkileri *in vitro* / *in vivo* ve *in silico* (transkriptomik analiz) olarak araştırıldı

Sonuç olarak, klorofilinin kanser tedavisinde kullanılan dozetaksel ilacının etkinliğini hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak önemli ölçüde artırdığı tespit edildi ($p < 0,05$). Transkriptomik çalışmanın sonucunda ise GSTP1 inhibitörü olan klorofilin ile dozetaksel beraber uygulanması başta MAPK sinyal yolağı olmak üzere kanserle ilişkili baskılanmış birçok mekanizmanın (MAPK, Wnt, oksitosin sinyal yolakları ve otofaji) aktivasyonunu sağladığı gözlemlendi. Ayrıca, ilaç direncinin baskılanmasıyla apoptotik sinyal yolaklarının aktivasyonuna karşı anti-apoptotik fosfolipaz D (FLD) sinyal yolağının da aktive olduğu saptandı. Sonuç olarak, kanser tedavisinde ilaç direncinin yanında FLD sinyal yolağı yeni bir terapötik hedef olarak ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada antioksidan özelliğe sahip GSTP1 inhibitörü olan klorofilinin meme kanseri tedavisinde ilaç direncini önleyici ve apoptozu indükleyici etkilerine karşı, NAC gibi antioksidanların apoptotik sinyal yolaklarını baskılayarak kanser tedavisinin prognozunu olumsuz yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmaya ek olarak, transkriptomik analiz sonuçlarına göre aktive veya deaktive olan yolakların PCR ve western blot yöntemleriyle valide edilmesi planlanmaktadır. Daha sonra elde edilen sonuçlara göre belirlenen yolakların baskılanması ya da aktivasyonunu sağlamak için inhibitör veya aktivatör bileşikler tasarlanarak kanser tedavilerinin etkinliğinin artırılması planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Özmen V, Özmen T, Doğru V. Breast Cancer in Turkey; An analysis of 20.000 patients with breast cancer. *European Journal of Breast Health*. 2019;15(3):141.
2. Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2019;20(7):2015.
3. Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys*. 2010;500(2):116-22.
4. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.
5. Coles B, Ketterer B, Hinson JA. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1990;25(1):47-70.
6. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell death & differentiation*. 2010;17(9):1373-80.
7. Musdal Y, Hegazy UM, Aksoy Y, Mannervik B. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Chemico-biological interactions*. 2013;205(1):53-62.
8. Özcan M. Kimyasal Olarak İndüklenmiş Meme Kanseri Modelinde Klorofilin-Cu Kompleksinin Antioksidan Etkinliğinin İncelenmesi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2015.
9. Ozcan M, Esendagli G, Musdal Y, Canpinar H, Bacanlı M, Anlar HG, et al. Dual actions of the antioxidant chlorophyllin, a glutathione transferase P1-1 inhibitor, in tumorigenesis and tumor progression. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(5):7045-55.
10. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *science*. 2002;295(5560):1662-4.
11. Kuo T-C, Tian T-F, Tseng YJ. 3Omics: a web-based systems biology tool for analysis, integration and visualization of human transcriptomic, proteomic and metabolomic data. *BMC systems biology*. 2013;7(1):64.
12. Ruddon RW. *Cancer biology*: Oxford University Press; 2007.
13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
14. Ringer DP, Schniper L. Principles of cancer biology. RC Bast, DW Kufe, RE Pollock, RR Weischselbaum, JF Holland & E Frei, *Cancer medicine* BC Decker Inc, Hamilton, Ontario[Links]. 2000:25-30.
15. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502-11.

16. Topuz E, Aydiner A, Karadag A. Klinik Onkoloji Kitabı. İstanbul Tunç Matbaası s 35. 2000;39.
17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
19. Özmen V. Türkiye'de Meme Kanseri. *Türkiye Klinikleri Genel Cerrahi Özel Dergisi*. 2013;6(2):1-6.
20. Curado MP, Cancer IAfRo, Organization WH. Cancer incidence in five continents. 2008.
21. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Progress in molecular biology and translational science*. 151: Elsevier; 2017. p. 1-32.
22. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*. 2011;13(4):1-7.
23. Dawood S. Triple-negative breast cancer. *Drugs*. 2010;70(17):2247-58.
24. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research*. 2007;13(15):4429-34.
25. Partridge AH, Hughes ME, Warner ET, Ottesen RA, Wong Y-N, Edge SB, et al. Subtype-dependent relationship between young age at diagnosis and breast cancer survival. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(27):3308-14.
26. ERDEMOĞLU N, ŞENER B. The antitumor effects of the taxane class compounds. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2000;29(1).
27. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52(1):711-60.
28. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9):916-21.
29. Dong S-C, Sha H-H, Xu X-Y, Hu T-M, Lou R, Li H, et al. Glutathione S-transferase π : A potential role in antitumor therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018;12:3535.
30. AKSOY Y. Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2010;30(6):2011-6.
31. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol*. 2005;401:1-8.

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. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer research*. 1994;54(16):4313-20.
34. Schultz M, Dutta S, Tew KD. Inhibitors of glutathione-S-transferases as therapeutic agents. *Advanced drug delivery reviews*. 1997;26(2):91-104.
35. Cho S-G, Lee YH, Park H-S, Ryoo K, Kang KW, Park J, et al. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12749-55.
36. Wang T, Arifoglu P, Ronai Ze, Tew KD. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem*. 2001;276(24):20999-1003.
37. Mahajan S, Atkins W. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2005;62(11):1221-33.
38. Morgan AS, Tew KD, Kauvar LM, Ciaccio F. Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;37(4):363-70.
39. Burg D, Riepsaame J, Pont C, Mulder G, van de Water B. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GST π function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. *Biochemical pharmacology*. 2006;71(3):268-77.
40. Flatgaard JE, Bauer KE, Kauvar LM. Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1993;33(1):63-70.
41. Burg D, Filippov DV, Hermanns R, van der Marel GA, van Boom JH, Mulder GJ. Peptidomimetic glutathione analogues as novel gammaGT stable GST inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2002;10(1):195-205.
42. Caccuri AM, Ascenzi P, Antonini G, Parker MW, Oakley AJ, Chiessi E, et al. Structural Flexibility Modulates the Activity of Human Glutathione Transferase P1-1 Influence of A Poor Co-Substrate on Dynamics and Kinetics of Human Glutathione Transferase. *J Biol Chem*. 1996;271(27):16193-8.
43. Rotili D, De Luca A, Tarantino D, Pezzola S, Forgione M, della Rocca BM, et al. Synthesis and structure-activity relationship of new cytotoxic agents targeting human glutathione-S-transferases. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;89:156-71.
44. Tew KD. Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(9):1257-69.
45. Pellizzari Tregno F, Sau A, Pezzola S, Geroni C, Lapenta C, Spada M, et al. In vitro and in vivo efficacy of 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio)

- hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *Eur J Cancer*. 2009;45(14):2606-17.
46. Ricci G, De Maria F, Antonini G, Turella P, Bullo A, Stella L, et al. 7-Nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole Derivatives, a New Class of Suicide Inhibitors for Glutathione S-Transferases Mechanism of Action of Potential Anticancer Drugs. *J Biol Chem*. 2005;280(28):26397-405.
 47. Beyer KH, Baer JE, Michaelson JK, Russo HF. Renotropic characteristics of ethacrynic acid: a phenoxyacetic saluretic-diuretic agent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1965;147(1):1-22.
 48. Josephy PD, Mannervik B. *Molecular toxicology*: Oxford University Press; 2006.
 49. AKSOY Y. Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2002;22(4):442-8.
 50. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(2):143-81.
 51. Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.
 52. Li Y, Takahashi Y, Fujii S-i, Zhou Y, Hong R, Suzuki A, et al. EAF2 mediates germinal centre B-cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. *Nature communications*. 2016;7(1):1-13.
 53. López-Iglesias B, Pérez Cn, Morales-García JA, Alonso-Gil S, Pérez-Castillo A, Romero A, et al. New melatonin-n, n-dibenzyl (n-methyl) amine hybrids: Potent neurogenic agents with antioxidant, cholinergic, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(9):3773-85.
 54. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*. 2014;2014.
 55. Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012;19(1):107-20.
 56. Wu Y, Fan Y, Xue B, Luo L, Shen J, Zhang S, et al. Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene*. 2006;25(42):5787-800.
 57. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
 58. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*. 2011;89(3):217-33.

59. Lanfer-Marquez UM, Barros R, Sinnecker P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*. 2005;38(8):885-91.
60. Ozben T. Antioxidant supplementation on cancer risk and during cancer therapy: an update. *Current topics in medicinal chemistry*. 2015;15(2):170-8.
61. Chandel NS, Tuveson DA. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(2):177-8.
62. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer cell*. 2015;27(2):211-22.
63. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science translational medicine*. 2014;6(221):221ra15-ra15.
64. Hong WK, Endicott J, Itri LM, Doos W, Batsakis JG, Bell R, et al. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *New England Journal of Medicine*. 1986;315(24):1501-5.
65. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends in Cell Biology*. 2020.
66. Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science translational medicine*. 2015;7(308):308re8-re8.
67. Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*. 2015;527(7577):186-91.
68. Marquez UML, Sinnecker P. Chlorophylls: Properties, biosynthesis, degradation and functions: Taylor and Francis, Boca Raton; 2007.
69. Woo LL, Egner PA, Belanger CL, Wattanawaraporn R, Trudel LJ, Croy RG, et al. Aflatoxin B1-DNA adduct formation and mutagenicity in livers of neonatal male and female B6C3F1 mice. *Toxicol Sci*. 2011;122(1):38-44.
70. Dashwood R, Negishi T, Hayatsu H, Breinholt V, Hendricks J, Bailey G. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B 1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1998;399(2):245-53.
71. Reddy AP, Harttig U, Barth MC, Baird WM, Schimerlik M, Hendricks JD, et al. Inhibition of dibenzo [a, l] pyrene-induced multi-organ carcinogenesis by dietary chlorophyllin in rainbow trout. *Carcinogenesis*. 1999;20(10):1919-26.
72. Egner PA, Wang J-B, Zhu Y-R, Zhang B-C, Wu Y, Zhang Q-N, et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(25):14601-6.

73. Morrison N, Cochrane G, Faruque N, Tatusova T, Tateno Y, Hancock D, et al. Concept of sample in OMICS technology. *Omics: a journal of integrative biology*. 2006;10(2):127-37.
74. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*. 2009;10(1):57-63.
75. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*. 2008;5(7):621-8.
76. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*. 2000;25(1):25-9.
77. Slater T, Sawyer B, Sträuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et biophysica acta*. 1963;77:383-93.
78. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*. 1988;48(17):4827-33.
79. Li Q, Wang X, Wang P, Zhang K, Wang H, Feng X, et al. Efficacy of chlorin e6-mediated sono-photodynamic therapy on 4T1 cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2014;29(1):42-52.
80. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bull World Health Organ*. 2001;79(4):373.
81. 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.
82. 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.
83. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1969;27(3):502-22.
84. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK-signaling: a multiplexing hub in programmed cell death. *Genes & cancer*. 2017;8(9-10):682.
85. Brichkina A, Nguyen NT, Baskar R, Wee S, Gunaratne J, Robinson R, et al. Proline isomerisation as a novel regulatory mechanism for p38MAPK activation and functions. *Cell Death & Differentiation*. 2016;23(10):1592-601.
86. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.

87. Smith Pe, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
88. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*. 2006;7(1):1-14.
89. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 2014;15(12):550.
90. Våremo L, Nielsen J, Nookaew I. Enriching the gene set analysis of genome-wide data by incorporating directionality of gene expression and combining statistical hypotheses and methods. *Nucleic acids research*. 2013;41(8):4378-91.
91. Arai T, Miyoshi Y, Kim S, Akazawa K, Maruyama N, Taguchi T, et al. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2008;34(7):734-8.
92. Huang J, Tan P-H, Thiyagarajan J, Bay B-H. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. *Modern pathology*. 2003;16(6):558-65.
93. Su F, Hu X, Jia W, Gong C, Song E, Hamar P. Glutathion S Transferase π indicates chemotherapy resistance in breast cancer. *Journal of Surgical Research*. 2003;113(1):102-8.
94. 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(1):120.
95. Chimpoy K, Díaz 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. *International journal of cancer*. 2009;125(9):2086-94.
96. Chiu LC-M, Kong CK-L, Ooi VE-C. The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and Cyclin D1 depletion. *International journal of molecular medicine*. 2005;16(4):735-40.
97. Das J, Samadder A, Mondal J, Abraham SK, Khuda-Bukhsh AR. Nano-encapsulated chlorophyllin significantly delays progression of lung cancer both in in vitro and in vivo models through activation of mitochondrial signaling cascades and drug-DNA interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;46:147-57.
98. Du L, Jiang N, Wang G, Chu Y, Lin W, Qian J, et al. Autophagy inhibition sensitizes bladder cancer cells to the photodynamic effects of the novel

- photosensitizer chlorophyllin e4. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014;133:1-10.
99. Lihuan D, Jingcun Z, Ning J, Guozeng W, Yiwei C, Wei L, et al. Photodynamic therapy with the novel photosensitizer chlorophyllin f induces apoptosis and autophagy in human bladder cancer cells. *Lasers in surgery and medicine*. 2014;46(4):319-34.
 100. Nagini S, Palitti F, Natarajan AT. Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. *Nutrition and Cancer*. 2015;67(2):203-11.
 101. Dastmalchi N, Baradaran B, Latifi-Navid S, Safaralizadeh R, Khojasteh SMB, Amini M, et al. Antioxidants with two faces toward cancer. *Life Sciences*. 2020:118186.
 102. Swetha KL, Sharma S, Chowdhury R, Roy A. Disulfiram potentiates docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells through enhanced ROS and autophagy. *Pharmacological Reports*. 2020;72(6):1749-65.
 103. Keith W, Stallard S, Brown R. Expression of *mdr1* and *gst- π* in human breast tumours: comparison to in vitro chemosensitivity. *British journal of cancer*. 1990;61(5):712-6.
 104. Dávila-González D, Choi DS, Rosato RR, Granados-Principal SM, Kuhn JG, Li W-F, et al. Pharmacological inhibition of NOS activates ASK1/JNK pathway augmenting docetaxel-mediated apoptosis in triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(5):1152-62.
 105. Mhaidat N, Zhang XD, Jiang CC, Hersey P. Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of JNK and inhibited by the MAP kinase ERK1/2 pathway. *AACR*; 2007.
 106. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters*. 2014;344(2):174-9.
 107. Na H-K, Kim E-H, Choi M-A, Park J-M, Kim D-H, Surh Y-J. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(10):1241-50.
 108. Zhang X, Wang X, Wu T, Li B, Liu T, Wang R, et al. Isolensinine induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation. *Scientific Reports*. 2015;5:12579.
 109. Zhao Q, Liu Y, Zhong J, Bi Y, Liu Y, Ren Z, et al. Pristimerin induces apoptosis and autophagy via activation of ROS/ASK1/JNK pathway in human breast cancer in vitro and in vivo. *Cell death discovery*. 2019;5(1):1-13.
 110. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes & cancer*. 2013;4(9-10):342-59.

111. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(6):1913.
112. Chen L, Jiang K, Chen H, Tang Y, Zhou X, Tan Y, et al. Deguelin induces apoptosis in colorectal cancer cells by activating the p38 MAPK pathway. *Cancer Management and Research*. 2019;11:95.
113. Doddapaneni R, Patel K, Chowdhury N, Singh M. Noscapine chemosensitization enhances docetaxel anticancer activity and nanocarrier uptake in triple negative breast cancer. *Experimental cell research*. 2016;346(1):65-73.
114. Doddapaneni R, Patel K, Chowdhury N, Singh M. Reversal of drug-resistance by noscapine chemo-sensitization in docetaxel resistant triple negative breast cancer. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
115. Zhou X-W, Xia Y-Z, Zhang Y-L, Luo J-G, Han C, Zhang H, et al. Tomentodione M sensitizes multidrug resistant cancer cells by decreasing P-glycoprotein via inhibition of p38 MAPK signaling. *Oncotarget*. 2017;8(60):101965.
116. Yu P, Zhang C, Gao C-Y, Ma T, Zhang H, Zhou M-M, et al. Anti-proliferation of triple-negative breast cancer cells with physagulide P: ROS/JNK signaling pathway induces apoptosis and autophagic cell death. *Oncotarget*. 2017;8(38):64032.
117. Uhlén M, Hallström BM, Lindskog C, Mardinoglu A, Pontén F, Nielsen J. Transcriptomics resources of human tissues and organs. *Molecular systems biology*. 2016;12(4):862.
118. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357(6352).
119. Klaunig JE. Oxidative stress and cancer. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(40):4771-8.
120. Silva MM, Rocha CRR, Kinker GS, Pelegrini AL, Menck CFM. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-11.
121. Srinivas US, Tan BW, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*. 2019;25:101084.
122. Agren R, Mardinoglu A, Asplund A, Kampf C, Uhlen M, Nielsen J. Identification of anticancer drugs for hepatocellular carcinoma through personalized genome-scale metabolic modeling. *Molecular systems biology*. 2014;10(3):721.
123. Ozcan M, Altay O, Lam S, Turkez H, Aksoy Y, Nielsen J, et al. Improvement in the current therapies for hepatocellular carcinoma using a systems medicine approach. *Advanced Biosystems*. 2020:2000030.

124. Icard P, Shulman S, Farhat D, Steyaert J-M, Alifano M, Lincet H. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resistance Updates*. 2018;38:1-11.
125. Schwartz L, T Supuran C, O Alfarouk K. The Warburg effect and the hallmarks of cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2017;17(2):164-70.
126. Cho JH, Han J-S. Phospholipase D and its essential role in cancer. *Molecules and cells*. 2017;40(11):805.
127. Diaz-Aragon R, Ramirez-Ricardo J, Cortes-Reynosa P, Simoni-Nieves A, Gomez-Quiroz L-E, Salazar EP. Role of phospholipase D in migration and invasion induced by linoleic acid in breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2019;457(1-2):119-32.
128. Noble AR, Maitland NJ, Berney DM, Rumsby MG. Phospholipase D inhibitors reduce human prostate cancer cell proliferation and colony formation. *British journal of cancer*. 2018;118(2):189-99.