

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYASAL OLARAK İNDÜKLENMİŞ MEME KANSERİ
MODELİNDE KLOROFİLİN-Cu KOMPLEKSİNİN ANTİOKSİDAN
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Mehmet ÖZCAN

Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİMYASAL OLARAK İNDÜKLENMİŞ MEME KANSERİ
MODELİNDE KLOROFİLİN-Cu KOMPLEKSİNİN ANTİOKSİDAN
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ÖZCAN

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin AKSOY**

**ANKARA
2015**

Anabilim Dalı :Biyokimya
 Program :Biyokimya
 Tez Başlığı :Kimyasal Olarak İndüklenmiş Meme Kanseri Modelinde
 Klorofilin-Cu Kompleksinin Antioksidan Etkinliğinin
 İncelenmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı :Mehmet ÖZCAN
 Savunma Sınavı Tarihi :05.02.2015

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Kamer KILINÇ



TOBB Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tez danışmanı:

Doç. Dr. Yasemin AKSOY

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Üye:

Doç. Dr. Z. Günnur DİKMEN

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Üye:

Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI

Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü

Üye:

Doç. Dr. İncilay LAY

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülüşü ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür y

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm eğitimim süresince göstermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı akademik çalışanları, asistan ve öğrencilerine teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam, Doç. Dr. Yasemin Aksoy'a yürekten teşekkür ediyorum.

Tezimin laboratuvar çalışmaları süresince, bana tüm hayatım boyunca kullanabileceğim bilgileri kazandıran, çalışmalarımın titizlikle destek olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Esra Büber'e ve Arş. Gör. Deniz Ceyhan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya ve deneysel çalışmalarımın yardımlarını esirgemeyen Dr. Merve Bacanlı ve Mojtaba Beyramzadeh'e gönülden teşekkür ederim. Tezimin istatistiksel çalışmalarında bana yol gösteren Prof. Dr. Ergun Karaağaoğlu'na 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: 012 D09 101 001) ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Özcan, M. Kimyasal olarak indüklenmiş meme kanseri modelinde klorofilin-Cu kompleksinin antioksidan etkinliğinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015. Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invaziv nitelik kazanması ve metastaz yapmasıyla kendini gösteren bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen ilaç direnciyle birlikte glutasyon ve glutatyona bağlı enzim düzeylerinin de değiştiğini göstermektedir. Bu grup içerisinde yer alan glutasyon transferaz (GST) enzim ailesinden GST P1-1 izoziminin kanser hücrelerinde ekspresyon düzeyinin oldukça yüksek olduğu gözlenmektedir. Literatürde kuvvetli GST P1-1 inhibisyonu gösterebilen sayılı inhibitör bulunmaktadır. Bunların birçoğu toksik etkiye sahip olduğundan canlı üzerinde etkilerini gösteren çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle, araştırmacılar daha az toksik ya da toksik olmayan spesifik inhibitör moleküller geliştirmeye yönelmektedir. Klorofilin, GST P1-1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu kanıtlanmış antioksidan bir moleküldür. Bu çalışmada klorofilinin inhibisyon özelliğinden yararlanılarak kimyasal olarak indüklenmiş meme kanseri modeli üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, N-metil-N-nitrozüre kullanarak Sprague-Dawleys ırkı dişi sıçanlarda meme kanseri indüklenmiştir. Meme kanseri modeli olarak seçilen sıçanların 5 aylık çalışma süresince ağırlık, tümör oluşumu ve tümör boyutları gibi fiziksel özellikleri takip edilmiştir. Çalışmanın sonunda tüm deney hayvanları sakrifiye edilerek karaciğer ve tümör dokularında GST aktiviteleri ölçülmüştür. Kan, karaciğer ve tümör dokularında glutasyon seviyeleri ve DNA hasarları incelenerek klorofilinin meme kanseri tedavisine olası katkıları araştırılmıştır. Sonuç olarak, klorofilinin antioksidan özelliğinden dolayı özellikle karaciğer dokusunda glutasyon düzeyini arttırdığı; kan, karaciğer ve tümör dokularındaki DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, DNA hasarı, glutasyon S-transferaz, glutasyon, klorofilin, meme kanseri, N-metil-N-nitrozüre.

Destekleyen kuruluşlar: H.Ü. B.A.B., Proje No: 012 D09 101 001; ÖYP.

ABSTRACT

Özcan, M. Investigation of antioxidant effect of chlorophylline-Cu complex on chemically induced breast cancer model. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Master Thesis in Biochemistry, Ankara, 2015. Cancer is a group of diseases involving abnormal cell growth with the potential to invade or spread to other parts of the body. Investigation show that glutathione and related enzymes are often overexpressed in tumor cells and are regarded as a contributor to their drug resistance. The GST P1-1 isozyme of glutathione S-transferases family (GST) is thought to play an important role in cancer progression and resistance to chemotherapy because it is frequently overexpressed in cancer cells and drug-resistant tumors. The available literature contains a limited number of strong GST P1-1 inhibitors. Additionally, in vivo studies of these inhibitors are highly restricted because of their toxic effects. Therefore, the most potent and comparatively less harmful GST P1-1 inhibitors seem to be an attractive target for drug development. The aim of this study is to evaluate the protective effects of chlorophylline as an antioxidant molecule which has inhibitory effects on GST P1-1 on chemically-induced breast cancer model. For this purpose, N-methyl nitrosourea (MNU) was used for inducing carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. Their weight and tumor diameters were measured throughout 5 months. At the end of the study, all animals were sacrificed and GST activities in liver and tumor tissues were determined. Glutathione levels and DNA damage were also determined in blood, liver and tumor tissues. As a result, it was observed that chlorophylline treatment increased glutathione level in liver because of its antioxidant effect. and significantly decreased the DNA damage in blood, liver and tumor tissues ($P < 0.05$).

Key Words: Antioxidant, chlorophylline, DNA damage, glutathione, glutathione S-transferases, breast cancer, N-methyl nitrosourea.

Supported by H.U. Scientific Research and Projects Coordination Unit, Project No: 012 D09 101 001; ÖYP (Teaching Staff Training Program).

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| TABLolar DİZİNİ | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Kanser | 3 |
| 2.2. Meme Kanseri | 4 |
| 2.2.1. Meme Kanseri Tedavisi | 4 |
| 2.3. Glutasyon | 5 |
| 2.3.1. Glutasyon Metabolizması | 6 |
| 2.3.2. Glutasyon S-Transferazlar | 7 |
| 2.3.3. Glutasyon S-Transferaz İnhibitörleri | 8 |
| 2.4. Antioksidan Moleküller | 11 |
| 2.4.1. Klorofilin | 11 |
| 2.5. DNA Hasarı | 12 |
| 2.6. N-metil-N-nitrozüre ile İndüklenmiş Meme Kanseri Modeli | 13 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 15 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 15 |
| 3.2. Kullanılan Gereçler | 15 |
| 3.3. Deney Hayvanları | 16 |
| 3.3.1. Deneysel Meme Tümörü Modelinin Oluşturulması | 16 |
| 3.3.2. Hayvanların Genel Durumlarının Takibi | 17 |
| 3.3.3. Sakrifiye İşlemi ve Örneklerin Alınması | 17 |
| 3.4. DNA Hasarlarının Belirlenmesi “Comet Assay” | 18 |
| 3.4.1 “Comet Assay” için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.5. Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi | 20 |
| 3.5.1 Total Glutasyon Düzeyinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi | 20 |
| 3.5.2. Glutasyon Düzeyinin HPLC ile belirlenmesi | 22 |
| 3.5.3. Okside Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi | 23 |
| 3.5.5. Hemoglobin Ölçümü | 24 |
| 3.6. Dokularda Glutasyon-S-transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi | 25 |
| 3.6.1 Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi | 26 |
| 3.7. Tümör Dokularının Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Boyaması | 27 |
| 3.8. İstatiksel Değerlendirme | 27 |
| 4. BULGULAR | 28 |
| 4.1. Sıçanların Genel Durumlarının Takibi | 28 |
| 4.2. DNA Hasarı Düzeyleri | 32 |
| 4.3. Glutasyon Düzeyleri | 34 |
| 4.3.1 HPLC Sonuçları | 34 |
| 4.3.2. Kanda Glutasyon Düzeyleri | 35 |
| 4.3.3. Dokularda Glutasyon Düzeyleri | 37 |
| 4.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivite Sonuçları | 41 |
| 4.5. Tümör Dokularının Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Boyaması | 42 |
| 5. TARTIŞMA | 45 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 52 |
| KAYNAKLAR | 53 |
| EKLER | |
| Ek 1. Etik Kurul Onayı | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|--|
| 5-FU | 5-florourasil |
| BSA | Sığır serum albümini |
| CDNB | 1-kloro-2,4- dinitrobenzen |
| DCIS | İn-situ duktal karsinom |
| DCM | Dikloro metan |
| DMBA | Dimetil benzantrasen |
| DMSO | Dimetil sulfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DTNB | 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) |
| EtBr | Etidiyum bromür |
| GPx | Glutasyon peroksidaz |
| GR | Glutasyon redüktaz |
| GSH- Px | Glutasyon peroksidaz |
| GSH | Redükte glutasyon |
| GSH/GSSG | Glutasyonun redükte ve okside formların oranı |
| GSH-DXR | Doksorubisin |
| GSSG | Okside glutasyon |
| GST P1-1 | Glutasyon S-tranferaz P1-1 |
| GST | Glutasyon S-tranferaz |
| H+E | Hematoksilen-eozin |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| HPLC | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| HT-29 | İnsan kolon adenokarsinoma |
| IDC | İnvaziv duktal karsinom |
| ILC | İnvaziv lobüler karsinom |
| JNK1 | c-Jun N-terminal kinaz 1 |
| JNK-GSTp | c-Jun N-terminal kinaz 1 - glutasyon S-tranferaz P kompleksi |
| KAT | Katalaz |
| KH ₂ PO ₄ | Potasyum fosfat monobazik |
| K ₂ HPO ₄ | Potasyum fosfat dibazik |

| | |
|----------------------|---|
| K ₃ EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit tripotasyum |
| Klr. | Klorofilin |
| LCIS | İn-situ lobüler karsinom |
| LMPA | Düşük erime noktalı agar |
| MAP kinase | Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz |
| MAPEG | Eikosanoid ve glutatyon metabolizmasındaki membran bağımlı proteinler |
| MDR | Çoklu ilaç direnci |
| MNU | N-metil-N-nitrozüre |
| Na ₂ EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit disodyum |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| NBD | 7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol |
| NBDHEX | 7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolun 6-merkaptohexanol |
| NCI | Uluslararası Kanser Enstitüsü |
| NEM | N-etil maleimid |
| NMPA | Normal erime noktalı agar |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| SF | Serum fizyolojik |
| SKOV-3 | İnsan over karsinoma |
| 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 |
| UrPhg | TLK 177'nin bir analogu |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|--|----------|
| 2.1. Glutasyon | 6 |
| 2.2. Glutasyonun (GSH) ksenobiyotiklerle glutasyon S-transferaz (GST) katalizli reaksiyonu | 7 |
| 2.3. Klorofilin | 11 |
| 3.1. Glutasyon seviyesinin TNB oluşumu üzerinden belirlenmesi | 21 |
| 3.2. Glutasyon standart grafiği | 21 |
| 3.3. GSH-NEM standart grafiği | 23 |
| 3.4. Okside glutasyonun (GSSG) standart grafiği | 24 |
| 3.5. Hemoglobin standart grafiği | 25 |
| 3.6. İndirgenmiş glutasyonun elektrofilik CDNB'ye konjugasyonu | 25 26 |
| 3.7. BSA standart grafiği | 26 |
| 4.1. Deney gruplarının ağırlıklarının değişimi. | 28 |
| 4.2. Sıçanların enjeksiyon sonrası görüntüleri | 29 |
| 4.3. MNU grubunun tümör çapları | 30 |
| 4.4. MNU+Klr. grubunun tümör çapları | 30 |
| 4.5. MNU grubunda oluşan tümör sayıları | 31 |
| 4.6. MNU+Klr. grubunda oluşan tümör sayıları | 31 |
| 4.7. Karaciğerde DNA hasarı görüntüleri | 32 |
| 4.8. Karaciğerde DNA hasar düzeyleri (**P<0.05, *P>0.05) | 32 |
| 4.9. Kanda DNA hasar düzeyleri (**P<0.05, *P>0.05) | 33 |
| 4.10. Tümör Dokularında DNA hasar düzeyleri (**P<0.05) | 33 |
| 4.11. GSH-NEM standardının HPLC kromatogramı | 34 |
| 4.12. Karaciğer örneğinin kromatogram görüntüsü | 35 |
| 4.13. Kan örneğinin kromatogram görüntüsü | 35 |
| 4.14. Kanda HPLC ile belirlenen total GSH düzeyleri | 36 |
| 4.15. Kanda GSSG düzeyleri | 36 |
| 4.16. Kanda GSH / GSSG oranları | 37 |
| 4.17. Karaciğerde spektrofotometrik yöntem ile belirlenen total GSH düzeyleri | 38 |

| Şekil | Sayfa |
|--|-------|
| 4.18. Karaciğerde HPLC yöntemi ile belirlenen total GSH düzeyleri (**P<0.05, *P>0.05) | 38 |
| 4.19. Karaciğerde GSSG düzeylerinin belirlenmesi | 39 |
| 4.20. Karaciğerde GSH / GSSG oranının belirlenmesi | 39 |
| 4.21. Tümör dokularında total GSH düzeylerinin spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesi | 40 |
| 4.22. Karaciğer dokularında GST aktivitesi | 41 |
| 4.23. Tümör dokularında GST aktivitesi | 41 |
| 4.24. MNU grubu H+E görüntüsü (x40) | 43 |
| 4.25. MNU+Klr. grubu H+E görüntüsü (x40) | 43 |
| 4.26. MNU grubu H+E görüntüsü (x400) | 44 |
| 4.27. MNU+Klr. grubu H+E görüntüsü (x400) | 44 |

TABLOLAR

| Tablo | Sayfa |
|--|-------|
| 3.1. Enjeksiyon uygulamaları | 17 |
| 4.1. Tümör dokularında total GSH düzeyleri | 40 |

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invaziv nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren öldürücü bir hastalıktır. Günümüzde kanser tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır. İlkinde amaç tümörlü doku veya organın uzaklaştırılması, son ikisinde ise kanser hücrelerinin öldürülmesidir. Kemoterapi ilaçlarının çoğu sitotoksik etkileri ile malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önlerler ve onların ölümüne yol açarlar. Antikanser ilaçlarının yüksek toksik özellikleri nedeniyle sağlıklı doku ve hücrelerde de hasarı söz konusudur. Bu nedenle, araştırmacılar daha az toksik ya da toksik olmayan spesifik inhibitör moleküller geliştirmeye yönelmektedirler.

Meme kanseri, dünyada olduğu gibi, Türkiye'de de kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (1,2). Pek çok kanser türünde olduğu gibi meme kanseri tedavisinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri kanser hücrelerindeki proliferasyonu etkileyen protein ekspresyonundaki değişikliklerdir. 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 P1-1 (GST P1-1) izoziminin aşırı üretimi ve glutatyon konjugasyonu aracılığıyla kemoterapötik ajanları inaktive ederek ilaç direncini indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle bu enzim ve onun konjuge substratı glutatyon kanser araştırmalarının önemli hedeflerinden biri haline gelmiştir (3-5).

Hücresel yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürütmesine bağlıdır. Bu dengeyi bozacak yönde ortaya çıkan endojen ve/veya eksojen kaynaklı faktörler hücre hasarına yol açarlar. DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir moleküldür. Hücre dengesini bozacak yöndeki değişiklikler DNA hasarı oluşmasına neden olabilir. Ağır DNA hasarları oluştuğunda ya da DNA onarım aktivitesi efektif olmadığında DNA hasarı kısa dönemde replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise

mutasyona ve kromozom bozukluklarına sebep olmaktadır. Kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıkların etiyolojisinde yer alan DNA hasarı günümüzde kronik dejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin takibinde, ksenobiyotik ve radyasyon aracılı genotoksisitenin belirlenmesinde biyolojik belirteç olarak değerlendirilmektedir (6,7).

Literatürde kuvvetli GST P1-1 inhibisyonu gösterebilen sayılı inhibitör bulunmaktadır. Bunların birçoğu toksik etkiye sahip olduğundan canlı üzerinde etkilerini gösteren çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Klorofilin, GST P1-1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu kanıtlanmış antioksidan bir moleküldür (8). Bu çalışmada klorofilinin inhibisyon ve antioksidan özelliğinden yararlanılarak kimyasal olarak indüklenmiş meme kanseri modeli üzerindeki etkileri araştırıldı. Yapılan araştırma kapsamında meme kanseri modeli olarak seçilen sıçanların çalışma boyunca ağırlık, tümör oluşumu ve tümör boyutları gibi fiziksel özellikleri takip edildi. Çalışma sonunda tüm deney hayvanları sakrifiye edilerek karaciğer ve tümör dokularında GST aktiviteleri ölçüldü. Kan, karaciğer ve tümör dokularında glutatyon seviyeleri ve DNA hasarları incelenerek klorofilinin meme kanseri tedavisine olası katkıları araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler içeren, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler, hücre yaşamını ve çoğalmasını, komşu hücrelerle ilişkilerini ve immün sistemden kaçma kapasitelerini kapsar. Kanseri hücreleri, komşu normal hücrelere göre daha hızlı çoğalırlar. Normal hücrelerin bölünmesi belli bir zaman sonra dururken, kanserli hücrelerin bölünmesi hiçbir zaman durmaz. Buldukları yerden başka bölgelere kan veya lenf damarları ile taşınarak metastaz oluştururlar (9). Normal hücrelerde hücre çoğalması ile apoptoza bağlı hücre kayıpları arasında uyumlu bir denge vardır. Kanseri hücrelerde bu denge bozularak kontrol mekanizması kaybolur (10). Vücudun değişik yerlerine taşınan kanserli hücreler invazyon yaparak organizmanın organlarına zarar verirler. Taşındıkları yerlerde kanserli hücreler çoğaldıkça tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler (11). Malign tümörler genelde doğrudan yayılma, lenfatik ve kan dolaşım sistemleri yoluyla metastaz kabiliyetlerinden dolayı kötü bir prognoza sahiptir (12). Tümör hücreleri kendi proliferasyonlarını uyarabilme kabiliyetine sahip olup, bu kabiliyetlerini kendi büyüme hormonlarını sentezleyerek sağlarlar. Tümör hücreleri daha az yapışkan olup hücre dışı yüzeye etkileşime girmeden alt alta ya da üst üste büyürler. Belirli bir yoğunluğa ulaşan normal hücrelerin proliferasyonu durabilirken, tümör hücrelerinin proliferasyonu durmaksızın devam edebilir (13).

Tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Karsinomalar, epitel hücrelerden türevlenirler. Sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibroz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. Lösemi ise kan hücrelerinden gelişir (14).

2.2. Meme Kanseri

Dünya genelinde ve ülkemizde meme kanseri, kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Dünya’da en çok tanı konulan kanser türlerinin; akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) kanserleri olduğu belirtilmiştir. Görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında da ikinci sırada yer almaktadır (1,2). Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) verilerine göre her sekiz kadından birinde meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından birinin meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (15).

Meme kanserleri invaziv ve invaziv olmayan (in-situ) karsinomlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. İn-situ karsinomda kanser hücreleri meme içinde belli bir alanda olup yayılma göstermezler. İn-situ lobüler karsinom (LCIS) süt bezlerinde görülürken, in-situ duktal karsinom (DCIS) süt kanalları içinde görülmektedir. İnvaziv karsinom ise meme kanseri, süt bezleri veya süt kanallarına yayılmış ve diğer organlara yayılma potansiyeline sahip kanserlerdir. İnvaziv lobüler karsinom (ILC), süt bezlerinden başlayarak çevre dokulara yayılır. İnvaziv duktal karsinomda (IDC) süt kanallarından başlayarak proliferer olur ve çevre dokulara yayılır. İnvaziv karsinomlar diğer organlara ve lenf düğümlerine metastaz yapabilme kabiliyetini lenfatik ve dolaşım sistemini invaze ederek sağlar (13). Patolojik tip ve derecesi, lenf düğümü durumu, tümör büyüklüğü, etnik yapı, lenfatik ve vasküler invazyon, ile tanı yaşı meme kanserinde önemli prognostik faktörlerdir. Bunun yanında onkogenler, tümör baskılayıcı genler, steroid hormon reseptörleri de meme karsinomu prognozu üzerine etkili moleküler faktörlerdir (16).

2.2.1. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin tedavisi, tanı konulduğunda hastalığın safhası, kanserin hücre yapısı, reseptör durumu, onkogenlerin olup olmaması, hastanın yaşı, hastanın sağlık durumuna göre farklılıklar gösterir. Günümüzde meme kanseri tedavisi genel cerrahi, tıbbi onkoloji, radyasyon

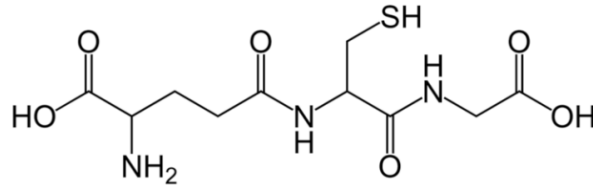
onkolojisi, patoloji, radyoloji ve nükleer tıp gibi uzmanlık dallarının koordineli çalışması, doğru tedavinin seçimi ile etkili bir noktaya gelmiştir (17).

Meme kanseri tedavisi lokal ve/veya sistemik yolla olmaktadır. Lokal tedavi cerrahi ve radyoterapi şeklinde kanseri ortadan kaldırmak ya da yok etmek amacıyla yapılmaktadır. Sistemik tedavi ise kemoterapi, hormon terapisi, biyolojik tedavi yöntemlerini kapsamaktadır. Burada amaç, kanserli hücrelerin proliferasyonunu önlemenin yanı sıra bağışıklık sisteminin de harekete geçirilmesidir (18,19).

Kemoterapi kanser tedavisinde uygulanan en yaygın yöntemlerden biridir. Tedavi sırasında başarıya ulaşmak için birden fazla antikanser ilaç uygulamasına gidilmekte ancak zamanla gelişen ilaç direnci ile karşı karşıya kalınmaktadır. Tedavinin etkinliğini artırmak ve ilaç direncini ortadan kaldırmak için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalar içerisinde detoksifikasyon mekanizmasının önemli enzimlerinden biri olan glutatyon S-transferaz enzimi ve bu enzimin elektrofilik bileşiklerle konjugasyonunu katalizleyen glutatyon önem kazanmıştır (18,19).

2.3. Glutatyon

Glutatyon (GSH) hücrenin antioksidan savunmasında görev yapan non-protein özellikte tiyol içeren bir moleküldür. GSH tripeptit yapısında bir molekül olup glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmaktadır. Molekülün ortasında bulunan sistein amino asitinin amino grubu glutamatın yan zincirindeki karboksile, karboksil grubu ise glisine bağlıdır. Glutamat ve sistein arasındaki olağandışı bu bağ, molekülü hücre içerisinde peptidazlara karşı korumaktadır. GSH molekülü karboksil grubundan gelen iki negatif, amino grubundan gelen bir pozitif yük sayesinde suda çözünebilir özelliğe sahiptir. Molekülün sistein kalıntısındaki tiyol grubu elektrofilik etkileşimlere açık konumdadır. Deneysel koşullarda tiyol grubunun pKa'sı 9,2 civarındadır (Şekil 2.1) (20).



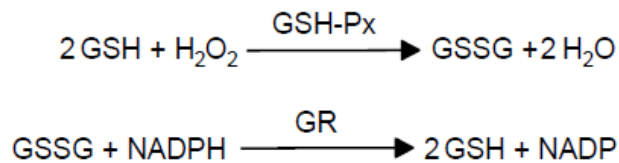
Şekil 2.1. Glutatyon

2.3.1. Glutatyon Metabolizması

Hücrelerde total glutatyon, serbest veya proteinlere bağlı (%15) olarak bulunur. Serbest glutatyon çoğunlukla redükte formda (GSH) tutulur ve oksidatif streste okside forma (GSSG) dönüştürülür. Hücrelerde glutatyonun redükte ve okside formların oranı (GSH/GSSG) kritik öneme sahiptir. Normalde memeli hücrelerinde, glutatyon redoks çifti 1-10 mM konsantrasyon aralığında bulunur ve % 99'dan fazlası indirgenmiş formda tutulur (18,19) .

GSH homeostazı hücresel düzeyde, biyosentez, oksidasyon, import ve eksport arasındaki dengeyle sağlanırken; doku düzeyinde, GSH metabolizması ile ilgili işlemlere ve dokular arasındaki GSH akışına bağlı olarak düzenlenmektedir. (21).

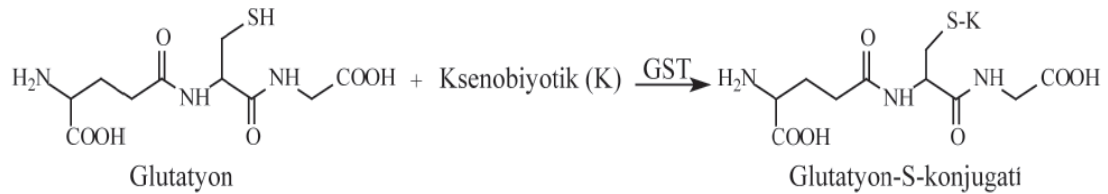
Glutatyon, reaktif oksijen türlerine karşı engelleyici olarak görev alır. Bu amaçla serbest radikalleri süpürür ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) azaltır. Hücrelerde oksidatif stresin etkisiyle oluşan H_2O_2 , glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi ve GSH'nin etkisiyle suya yıkılır ve redükte glutatyon (GSH), okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Okside glutatyon daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile tekrar GSH'a dönüştürülür (18,19,22) .



Hücre içerisinde GSH, başta savunma ve metabolizma olmak üzere pek çok role sahiptir. Glutasyon peroksidazlar ve bazı peroksiredoksinler aracılığıyla peroksidazların indirgenmesini ve glutasyon S-transferazlar aracılığı ile ksenobiyotiklerin konjugasyon tepkimelerine aracılık etmektedir (22) .

2.3.2. Glutasyon S-Transferazlar

Glutasyon S-transferazlar (GST; EC 2.5.1.18), endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (Şekil 2.2) (23).



Şekil 2.2. Glutasyonun (GSH) ksenobiyotiklerle glutasyon S-transferaz (GST) katalizli reaksiyonu.

Doğada glutasyon S-transferaz aktivitesi gösteren enzimler, sitosolik, mitokondriyal ve mikrozomal (membran bağlı-MAPEG) olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır. Memelilerde sitosolik GST'ler, kimyasal özellikleri, immünolojik reaktiviteleri ve amino asit diziliş benzerliklerine göre alfa (α), pi (π), mü (μ), teta (θ), sigma (σ), zeta (ζ) ve omega (ω) olarak 7 gruba ayrılırlar (24,25). Sitosolik GST'ler her bir alt ünitesi yaklaşık 25 kD ağırlığında bulunan, dimerik proteinlerdir. Her bir alt ünite, iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan bir aktif konuma sahiptir. Bu fonksiyonel bölgeler, fizyolojik substratı (GSH) bağlayan hidrofilik G bölgesi ile yapısal olarak farklı elektrofilik substratları bağlayan hidrofobik H bölgesidir. GST izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit kompozisyonunun farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğinin nedenidir (26) .

GST izozimlerinden GSTP1-1'in farklı insan kaynaklı tümörde (akciğer, kolon, böbrek, over, ösefagus ve mide) fazla miktarda salgılandığı bildirilmiştir (27). Artmış GSH/GST seviyelerinin kemoterapi tedavisinde bu sistemle metabolize olan pek çok ilacın (adriamisin, klorambusil, melfalan ve diğer nitrojen mustard vs.) metabolizmasını hızlandırarak; ilaçla hedeflenen etkiye ulaşamamasına, bir başka deyişle ilaca kazanılmış direnç gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir (28). Bu bilgilere ilave olarak son yıllarda yapılan çalışmalar, mü ve pi sınıfı GST'lerin, hücre sel yaşam ve ölüm sinyal iletimine katılan, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase-MAP kinase) yolağındaki düzenleyici rolünün de kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesinde etkili olduğunu göstermiştir. GSTP'nin MAP kinazlardan biri olan ve istemli hücre ölümü yolağında anahtar enzim olan JNK 1 ile (c-Jun N-terminal kinaz 1) JNK-GSTP kompleksi oluşturarak JNK1'i inhibe ettiği ve böylece nihai etkisi istemli hücre ölümü olan JNK'nın etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (29,30).

Bu nedenle kemoterapide, geleneksel elektrofilik kanser ilaçlarının (alkilleyici bileşiklerin) etkinliğinin düzenlenmesinde, GST inhibitörlerinin kullanımının faydalı olabileceği düşüncesi doğmuştur. Bu amaçla bu sistemi hedef alan çeşitli bileşikler geliştirilmiş ve hem deneysel olarak hem de klinikte denenmiştir (26,31).

2.3.3. Glutasyon S-Tranferaz İnhibitörleri

Antikanser ajanlara karşı gelişen hücre direncini ortadan kaldırmak için bugüne kadar birçok GST inhibitörü geliştirilmiştir. GSH'a yapıcı benzer bileşikler (peptidomimetikler, GSH analogları) GSH bağlanma bölgesinin kompetitif inhibitörleri olarak bilinmektedir. Bu bileşiklerin kullanılmasındaki amaç ya izozim seçiciliğini ya da ilacın stabilitesini artırmaktır. Bu amaçla sentezlenen bileşiklerden TLK 199 [γ -glutamil-S-(benzil) sisteinil fenil glisil dietil ester] miyeloproliferatif bir ajandır. 5-flurourasil (5-FU) ile indüklenen nötropeni sonrası lökosit sayısında artışa neden olduğu ve nötrofil iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. TLK 199'un HT-29 insan kolon

adenokarsinoma ve SKOV-3 (insan over karsinoma) hücrelerinin adriyamisine karşı duyarlılığını artırırken, mitomisin C'ye karşı etkisiz olduğu tespit edilmiştir (32). Diğer yandan bileşiğin etil esterinin meme kanser hücrelerinde tiyotepa, sisplatin ve doksorubisine karşı gelişen direnci geri çevirdiği gözlenmiştir (33). Diğer bir GSH analogu bileşik TLK 117 [γ -glutamil-S-(benzil)sisteinil-R(-)-fenilglisin]'nin ise alkilleyici ajanlar kadar melfalan, klorambusil gibi bileşiklerin etkinliğini artırdığı rapor edilmektedir (32). Diğer yandan TLK 177'nin bir analogu olan UrPhg'nin seçici bir GST P1-1 inhibitörü olduğu ve adenokarsinoma hücre dizisinde GSTP1-1 oligomerizasyonunu indükleyerek hem JNK hem de c-jun fosforilasyonunu artırdığı saptanmıştır. Bu tepkime sayesinde hücreler apoptotik yola girebilmişlerdir (34) . GSH türevleri GST'lerin iyi birer inhibitörleri olmalarına karşın hücre içi birikimden kaçınmak için spesifik eksport pompaları aracılığıyla dışarı atıldıkları için kanser hücrelerinde etkilerini gösterememektedir. Kanser hücrelerinde GSTP1-1 konsantrasyonu 0.05×10^{-3} M'a kadar ulaşmaktadır. Bu düzeydeki bir enzimi inhibe etmek için ya eşit ya da daha yüksek derişimlerde kullanılacak inhibitör hücre içinde birikecek, bu da çoklu ilaç direnci (MDR) proteini açısından sorun yaratacaktır. Bu problemin üstesinden gelmek için GST'ye etkin bir şekilde bağlanabilen, fakat GSH türevi olmayan ve hücre membranını kolaylıkla geçebilen lipofilik özelliklere sahip yeni moleküllerin tasarımı yoluna gidilmektedir (35). Enzimin G bölgesinin (fizyolojik substratı glutatyonu bağlayan bölge) yanı sıra GSH'nin türevlerini tanıyabilen, değişik hidrofobik kosubstratlar ile interaksiyona girebilen H bölgesi farklı topografi ve substrat spesifitesine sahiptir. GST alfa, pi ve mü izozimlerinde mikromolar, hatta nanomolar düzeyde Km değerleri ile bu bileşiklere karşı ılımlı afinite gösteren bileşiklere ihtiyaç vardır (34,36). Bu amaçla farklı benzoksazol, benzotiyazol türevi bileşikler üretilme yoluna gidilmekte ve özgün, GST spesifik, geri dönüşümsüz inhibitörler sentezlenmektedir (37).

Özgün bileşikler tasarlanırken spesifik pompalar aracılığıyla hücreden atılım gibi sorunlardan kaçınmak gereklidir. Bunun için üretilecek antikanser ajanın ABC "transporter"larının substratı olmaması, yüksek giriş hızı ve

lipofilik özelliklere sahip olması önem kazanmaktadır. Bu amaçla, GST için güçlü inhibitör etkileri gözlenen 7-nitro-2,1,3- benzoksadiazol (NBD) gibi non-GSH peptidomimetik türevleri (GSH konjugatları) sentezlenme yoluna gidilmiştir. Bu NBD tiyoeterleri GST alfa, pi ve mü izoenzimlerine enzime yüksek afinite ile bağlandıkları bildirilen hidrofobik bileşiklerdir (38). NBD'lerin JNK-GSTP1-1 kompleksinin ayrılmasıyla apoptozu başlattıkları gösterilmiştir (35,39,40). Bunlar içerisinde 6-merkaptohexanol türevi NBDHEX'in lösemi, hepatic karsinoma, küçük hücreli akciğer karsinomalarında GSTM2-2 ve GSTP1-1'e karşı güçlü inhibitör etki gösterdikleri saptanmıştır (39,40). Diğer yandan bu bileşiğin iki farklı melanoma hücre dizisinde (Me501 ve A375) apoptozu indüklediği, *in vivo* olarak da efektif olduğu ve melanoma modellerinde tümör büyümesinde %70 azalmaya yol açtığı da rapor edilmiştir (40,41).

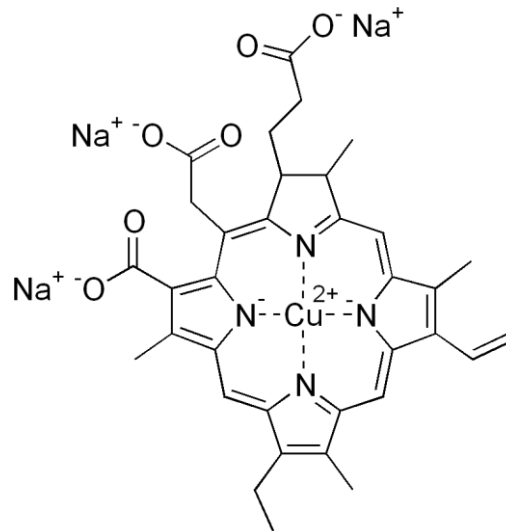
GSH konjugatları içerisinde en iyi bilinen ve kanser tedavisinde en çok kullanılan bileşiklerden biri olan doksorubisin (GSH-DXR), GSTP1-1'in nonkompetitif inhibitörüdür. Art arda yapılan çalışmalar GSH-DXR'nin GSTP1-1'e bağlanmasının sadece enzimatik aktiviteyi baskılamadığı, aynı zamanda JNK aktivasyonunda da artışa neden olduğu gösterilmiştir (42). GST inhibitörü olarak üzerinde en çok çalışılan molekül ise etakrinik asittir. GST P1-1'in geri dönüşümlü inhibitörü olan bu molekül enzimin H bölgesine düşük afinite ile bağlanmakta, GSH ile konjuge halde hücreden dışarı kolaylıkla atılmaktadır. Aynı zamanda Faz I çalışmalarında diürez, metabolik anomaliler, miyelosüpresyon gibi çeşitli sorunlarla karşılaşılması ve izozim spesifik olmaması nedeni ile etkinliği kısıtlı kalmıştır (28). Sitotoksisite için JNK yolunu kullanarak tümör hücrelerinin apoptozu gitmesini sağlayan ilaçlar (antimikrotübül ilaçlar, topoizomerez I ve II inhibitörleri, mitomisin C, adriyamisin ve sisplatin) için zaman içerisinde oluşabilecek ilaç direncini ortadan kaldırmada GST inhibitörlerini beraberinde tedaviye sokmak yararlı olacaktır (26).

2.4. Antioksidan Moleküller

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar, bu sisteme de antioksidan savunma denir. İnsan antioksidan savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik; ürat, askorbat, glutatyon ve flavonoidler gibi hidrofilik; tokoferoller, karotenoidler ve ubikinol gibi lipofilik yakalayıcılarla donatılmıştır. Bu savunma sistemi ayrıca glutatyon redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz gibi moleküler antioksidanların okside formlarını redükte duruma çeviren enzimleri de içermektedir (43). Antioksidan moleküllerin bazıları hücrenin kendisi tarafından sentezlenirken askorbik asit, lipoik asit, polifenoller, organosülfürlü bileşikler, karotenoit ve klorofil gibi bitkisel moleküller beslenme yoluyla alınan antioksidan maddelerdir (44,45).

2.4.1. Klorofilin

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 2.3) (46).



Şekil 2.3. Klorofilin

Klorofil 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 antimitojenik, antienotoksik ve antikanserojenik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (46). Klorofilinin özellikle aflatoksin gibi çeşitli kanserojenlerin hedef dokudaki etkilerini azalttığı DNA hasarını önlediği ifade edilmektedir (47-50). Bu tez çalışmasına konu olarak, klorofilin GST P1-1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu kanıtlanmış antioksidan bir moleküldür (8).

2.5. DNA Hasarı

Genetik bilginin sağlıklı bir şekilde aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA'nın fonksiyonu bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları çift sarmal DNA'yı oluştururlar. DNA bazlarının polar gruplarında oluşan kimyasal değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye ve sonuçta mutasyona neden olur. Deoksiriboz fosfat iskeletinde meydana gelen kopmalar ise replikasyonu bloke etmenin yanı sıra aşırı miktarlarda oluştuğunda hücre ölümüne yol açmaktadır (7).

DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Normal DNA metabolizması sırasında oluşan DNA hasarının en önemli nedeni bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimlerdir. Pürin ve pirimidin bazlarının keto-enol tautomerizmi ya da deaminasyonu bazların eşleşme spesifitesini değiştirerek yanlış eşleşmeye yol açar. Ayrıca bazların termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı oluşur ve sonuçta apürinik/apirimidinik bölgeler meydana gelir. Baz kaybı hem replikasyonu etkiler hem de bu bölgelerde kolaylıkla zincir kırıkları oluşur (51).

DNA hasarına yol açan çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Fiziksel ajanların başında iyonizan radyasyon gelir. Radyasyon enerjisinin doğrudan etkisi ile DNA zincir kırıkları oluşurken; radyasyonla açığa çıkan enerjiyle uyarılan moleküllerin (hidroksil radikalleri) DNA ile etkileşimi hem

DNA zincir kırıklarına hem de oksidatif baz modifikasyonlarına neden olmaktadır. Bir diğer fiziksel faktör olan UV ışınları DNA üzerinde çapraz bağlanmalara, pirimidin dimerleri oluşumuna ve zincir kırıklarına yol açmaktadır. DNA hasarı oluşturan kimyasal ajanların başında alkilleyici maddeler, nitroz asid, platinyum türevleri gibi çapraz bağlayıcılar ve sitokrom P450 sistemi ile metabolize edilen ksenobiyotikler (aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aflatoksinler ve fenitoin, warfarin, rifampin gibi ilaçlar) gelmektedir. Bu kimyasallar bazıları alkilleyerek, oksitleyerek, bazılar arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak veya zincir kırıklarına neden olarak DNA hasarı oluştururlar (52).

DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir molekül olduğundan hücre dengesini bozacak bu değişiklikler DNA hasarları oluşmasına neden olabilir. Ağır DNA hasarları oluştuğunda ya da DNA onarım aktivitesi efektif değil ise DNA hasarı kısa dönem de replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anormalliklerine sebep olmaktadır. Kanseri, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıkların etiyolojisinde yer alan DNA hasarı günümüzde kronik dejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin takibinde, ksenobiyotik ve radyasyon aracılı genotoksisitenin belirlenmesinde biyolojik belirteç olarak değerlendirilmektedir (6,7).

2.6. N-metil-N-nitrozüre ile İndüklenmiş Meme Kanseri Modeli

Sıçanlarda meme kanseri araştırmalarına bazı türlerde spontan meme tümörlerinin oluştuğunun farkına varılmasıyla başlanmıştır (53). Deneysel hayvan modelleri kanser inisiasyonu, progresyonu ve çok basamaklı karsinogenez hakkında birçok bilgi sunmaktadır.

Sıçanlarda meme tümörleri virüs enfeksiyonları, genotoksik kimyasallar ve radyasyonla indüklenebilmektedir. Sıçan meme kanseri modelinde, agresif tümörlerin oluşturulmasında genellikle N-metil-N-nitrozüre

(MNU) veya dimetil benzantrasen (DMBA) gibi polisiklik hidrokarbonlar kullanılmaktadır. Bu iki karsinogen maddeyle oluşturulan tümörler histolojik ve biyolojik olarak insandaki lezyonlara benzemektedir. Tümör indüksiyonu hedef dokuya özeldir ve bir veya birkaç dozda kolayca sağlanabilmektedir. Her iki karsinogen de meme adenokarsinomlarının gelişmesini sağlarken, uygulanan hayvanlarda herhangi bir sistemik toksisiteye rastlanmamaktadır. Ayrıca, değişik dozlarla farklı tipte tümörlerin oluşması sağlanabilmektedir (54,55).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril, asetik asit, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), dimetil sulfoksit (DMSO), düşük erime noktalı agar (LMPA), etidiyum bromür (EtBr), dikloro metan (DCM), 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), Drabkin çözeltisi, etil alkol (Etanol), etilendiamin tetraasetik asit disodyum (Na_2EDTA), etilendiamin tetraasetik asit tripotasyum (K_3EDTA), redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG), heparin (sodyum tuzu), klorofilin bakır kompleksi sodyum tuzu (Klr.), N-etil maleimid (NEM), N-metil-N-nitrosurea (MNU), brij 35 çözeltisi, N-lauril sarkosinat sodyum tuzu, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), normal erime noktalı agar (NMPA), potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4), potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), trikloroasetik asit (TCA), tris, triton X-100 Sigma (St. Louis USA) firmasından; trietanolamin (TEAM) ve serine British Drug Houses Ltd. (Poole, İngiltere) firmasından; alfamin ve ksilazin Alfasan International B.V. (Hollanda) firmasından, izotonik sodyum klorür çözeltisi Eczacıbaşı Baumax firmasından ve sığır serum albümini Bio-Rad firmasından; borik asit Hopkin & William Ltd. (İngiltere) firmasından sağlandı.

3.2. Kullanılan Gereçler

Deneylerde Biometra Analitik elektroforez cihazı, Consort C830 pH metre cihazı, Eppendorf 5417R santrifüj cihazı Power Pack P25 elektroforez güç kaynağı, Heidolph Titramax 101 yatay çalkalayıcı, Mettler Toledo AG204 analitik terazi, Marienfeld lam (26x76 mm) ve lamel (24x60 mm), Molecular Devices SpektraMax M2 mikro-plaka spektrofotometresi, Nanopure Infinity distile su cihazı, Perceptive Software comet bilgisayar yazılımı, Sanyo derin dondurucu (-80°C), Stuart Scientific, 7801Dottingen, M-21 manyetik karıştırıcı, Gilson, Eppendorf mikropipetler, HPLC cihazında Macherey-Nagel EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN kolonu, Shimadzu CTO-20AC fırını,

Shimadzu SPD-M20A Diode Array dedektörü, Shimadzu LC-20AD kromatografi cihazı, yazılım olarak Shimadzu LC Solution programı kullanıldı.

3.3. Deney Hayvanları

Meme kanseri modeli için 3 haftalık dişi Sprague-Dawley ırkı sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nden temin edildi. Deneylere başlamadan önce Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı alındı (2013/72-10). Tüm deneysel işlemler Helsinki Deklerasyonu'nda belirtilen önerilere uygun olarak gerçekleştirildi (56).

Hayvanların bakımı ve deneysel uygulamalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirildi. Sıçanların bakımı havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde, %30-70 nem, 21°C ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda sürdürüldü. Sıçanlar 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.

3.3.1. Deneysel Meme Tümörü Modelinin Oluşturulması

Literatürde yapılmış benzer çalışmalar incelenerek ve istatistiksel olarak değerlendirilebilir sonuçlar elde etmek için toplam 18 adet deney hayvanı ile çalışıldı. Kontrol grubu için 3, MNU, Klr. ve MNU+Klr. gruplarının her biri için 5'er adet deney hayvanı ile deneyler gerçekleştirildi.

Serum fizyolojik içerisinde çözülerek hazırlanan 50 mg/kg dozdaki MNU ve 200 mg/kg Klr. hayvanların sağ ya da sol periton boşluğuna, intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna ise sadece serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı. Tüm madde konsantrasyonları enjeksiyon hacimleri 0,5 ml den fazla olmayacak şekilde ayarlandı. Klr.+MNU grubuna

yapılan Klr. ve MNU enjeksiyonları en az bir gün arayla uygulandı. Enjeksiyon işlemleri belirli bir sıraya göre haftalık olarak gerçekleştirildi. Tüm enjeksiyonlar 4 hafta sürede tamamlandı. (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Enjeksiyon uygulamaları

| Enjeksiyon Tarihi | Deney Grupları | | | |
|-------------------|----------------|------------|-----|-----------------|
| | Kontrol | Klorofilin | MNU | Klorofilin+ MNU |
| 1. Hafta | SF | Klr. | SF | Klr. |
| | SF | SF | MNU | MNU |
| 2. Hafta | SF | Klr. | SF | Klr. |
| | SF | SF | MNU | MNU |
| 3. Hafta | SF | Klr. | SF | Klr. |
| | SF | SF | MNU | MNU |
| 4. Hafta | SF | Klr. | SF | Klr. |
| | SF | SF | MNU | MNU |

3.3.2. Hayvanların Genel Durumlarının Takibi

Hayvanların ağırlıkları enjeksiyon işlemlerin başladığı tarihten itibaren haftalık olarak takip edildi. Tümör oluşumu başladıktan sonra tümör çapları iki gün aralıklarla "caliper" ile ölçülerek kaydedildi. Tümörü aşırı büyüyen (tümör çapı > 3 cm) ve durumu kötüleşen hayvanlar sakrifiye edildi.

3.3.3. Sakrifiye İşlemi ve Örneklerin Alınması

Hayvanlara anestezi madde olarak 80 mg/kg dozda ketamin ve 15 mg/kg dozda ksilazin karışımı intraperitoneal olarak enjekte edildi. Anestezi madde sonrası hayvanların uyuması için yaklaşık 1 dakika beklendi. Daha sonra hayvanların kalplerinden 3 ml kan çekildi ve yapılacak analizler için uygun tüplere alınarak muhafaza edildi. Kan alma işlemi

bittikten sonra hayvanların karaciğer, dalak, böbrek, kalpleri ve tümör dokuları alındı. Alınan dokular soğuk serum fizyolojik ile yıkanarak yapılacak analizler için uygun koşullarda saklandı.

3.4. DNA Hasarlarının Belirlenmesi “Comet Assay”

Kan hücrelerinde DNA hasarını belirlemek amacıyla tam kan örnekleri ile tümör ve karaciğer dokularının hücrelerinde DNA hasarını belirlemek amacıyla doku homojenatları kullanıldı.

Yaklaşık 100 mg doku örnekleri 1 ml Hank's Balanced Solution (HBBS) ile homojenize edildikten sonra üstte kalan hücre süspansiyonu ile çalışıldı. 25 µl hücre süspansiyonu ve heparinli kan örnekleri 75 µl % 0,5'lik düşük erime noktalı agar (LMPA) ile karıştırıldı. Daha sonra örnekler % 1'lik normal erime noktalı agar (NMPA) çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamaların üzerine yayılarak lamaların üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar katılaştıktan sonra lamel zedelenmeden alındı. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.

Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu. Lamalar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde ve elektroforez kuvvetinde aralık bırakmayacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Lamalar akım uygulamadan 20 dakika süreyle elektroforez çözeltisi içerisinde bekletildi. Bu süre sonunda 25 V ve 300 mA akım uygulanarak 20 dakika elektroforez uygulandı.

Elektroforez işlemi bittikten sonra elektroforez kuvvetinden alınan lamalar 5 dakika distile suda ve daha sonra 15 dakika nötralizasyon tamponu içerisinde bekletildi. Nötralizasyon işleminden sonra lamalar sırasıyla 5'er dakika % 50'lik, % 75'lik ve %99'luk etanol çözeltisinde bekletildi. Okuma öncesi lamaların kuruması için en az 1 gün beklenildi.

Okuma işlemleri için lamaların üzerine 60 µl 20µg/ml etidiyum bromür çözeltisi damlatıldı. Her lamda 100 hücre floresan mikroskopunda değerlendirilerek DNA hasar derecesi kuyruk momenti olarak değerlendirildi (57,58).

3.4.1 “Comet Assay” için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

HBSS Çözeltisi: 2.25 ml Stok 1, 9 ml Stok 2 ile 0.5 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırıldı.

Stok 1 çözeltisi: 0.14 g sodyum bikarbonat (NaHCO_3) 10 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

Stok 2 Çözeltisi: 1 g glukoz, 8.5 g sodyum klorür (NaCl), 0.4 g potasyum klorür (KCl), 0.06 g sodyum bifosfat (Na_2HPO_4) ve 0.06 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) 90 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi: 125 mg LMPA sıcak su banyosu kullanılarak 25 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklandı.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi: 500 mg NMPA sıcak su banyosu kullanılarak 50 ml PBS (phosphate buffered saline) içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde 4°C’de saklandı.

Lizis Çözeltisi: 146.1g NaCl, 37.2 g Na_2EDTA , 1.2 g Tris 500 ml distile suda çözüldü. 10 g NaOH eklenip çözelti pH’sı 10’a ayarlandı. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 890 ml’ye tamamlanıp maddeler çözüneceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti oda sıcaklığında saklandı. Daha sonra deney günü 178 ml stok lizis çözeltisi, 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO karıştırıldı. Kullanılacağı zamana kadar 4°C’de bekletildi ve deney sırasında soğuk olarak kullanıldı.

Elektroforez Tampon Çözeltisi: 1705 ml soğuk distile su, 52.8 ml 10 N NaOH ve 8.8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırıldı. Deney günü taze hazırlandı.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi: 48.5 mg Tris, 700 ml distile suda çözülüp çözelti pH'sı 7.5'a ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 750 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi: 10 mg EtBr 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden boyama sırasında 1 ml alınıp distile suyla 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

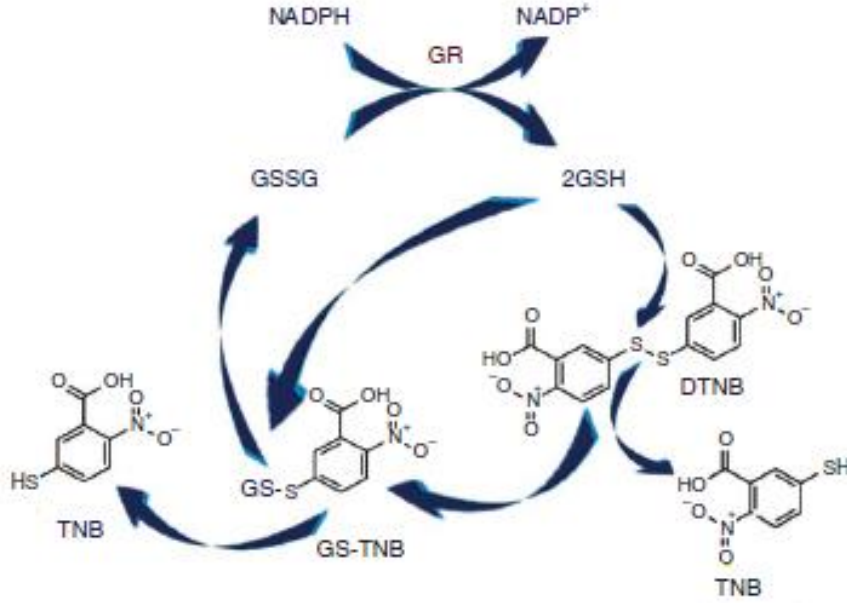
3.5. Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi

3.5.1 Total Glutasyon Düzeyinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Dokular 1:10 oranında 50 mM fosfat tamponunda (pH:7, 1mM EDTA içeren) homojenize edildi. Homojenizatlar +4°C'de 15 dk. boyunca, 10000xg'de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantların üzerine eşit hacimde % 10 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi eklenerek vortekslendi. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dk. boyunca 2000xg'de tekrar santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatantlar analiz edileceği zamana kadar -20⁰ C'de muhafaza edildi.

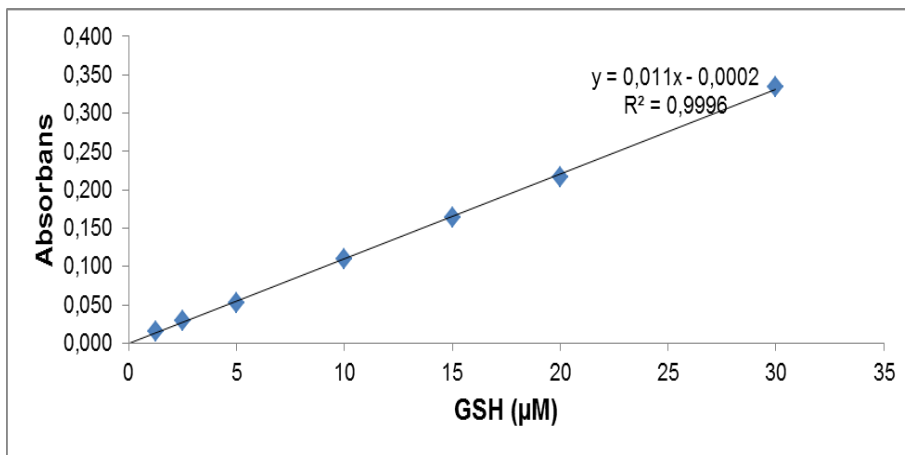
Örnekler -20⁰ C'den çıkarıldıktan sonra taze hazırlanmış 4 M trietanolamin (TEAM) çözeltisinden % 5 oranında eklenerek örneklerin pH değeri 7.0'e getirildi. Daha sonra uygun reaksiyon ortamında (48 mM NADPH, 78 µM DTNB ve 0.115 U/ml glutasyon redüktaz (GR), 1 mM EDTA içeren 100 mM potasyum fosfat tamponunda (pH:7) NADPH eklenerek tepkime başlatıldı. Oluşan 5-merkpto-2-nitro benzoik asitin (TNB) 412 nm'deki absorbansı ölçülerek GSH düzeyleri belirlendi (Şekil 3.1). Ölçümler

mikro-plaka okuyucuda gerçekleştirildi. Daha sonra glutatyon seviyeleri doku örnekleri için yaş doku ağırlıklarına oranlandı (59,60).



Şekil 3.1. Glutatyon düzeyinin TNB oluşumu üzerinden belirlenmesi

Standart grafiği için 1.25 – 30.0 μM konsantrasyon aralığında glutatyon standartları hazırlandı. Standartlar örnekler ile beraber aynı mikropilaka içerisinde absorbansları ölçüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Glutatyon standart grafiği.

3.5.2. Glutasyon Düzeyinin HPLC ile belirlenmesi

Kanda GSH düzeyini belirlemek için kan örnekleri sıçanlardan alınır alınmaz daha önceden hazırlanmış 150 µl 310 mM N-etilmaleimid (NEM) içeren tripotasyum etilendiamin tetraasitik asit (K_3EDTA)'li tüpler içerisine aktarıldı. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında 1 dk. boyunca yavaşça karıştırılarak GSH'nun NEM ile konjugatlarının oluşması sağlandı. Örnekler daha sonra HPLC cihazında analiz edilmek üzere $-80^{\circ}C$ ' de muhafaza edildi (61).

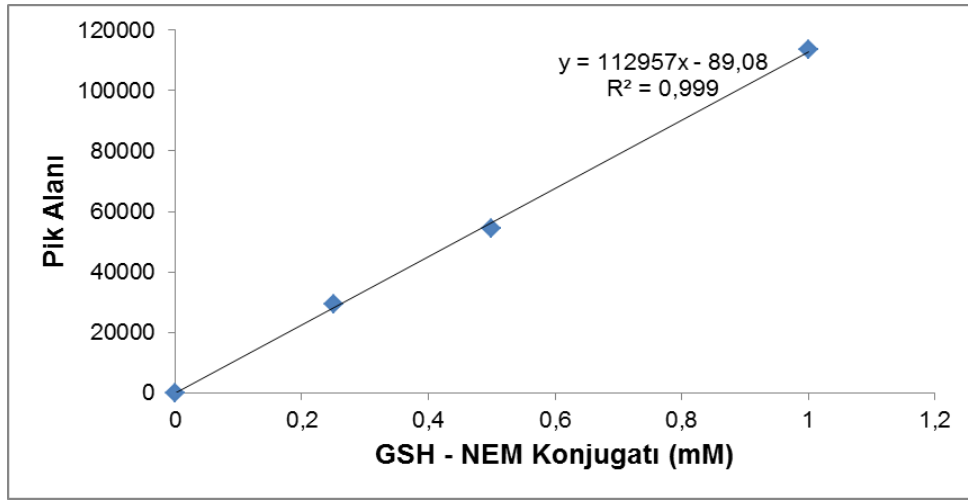
Tüm kan örnekleri toplandıktan sonra örnekler $-80^{\circ}C$ ' den çıkartılarak $25^{\circ}C$ ' deki su banyosunda çözünmeleri sağlandı. Bu aşamada 50 µl kan örneği hemoglobin ölçümü için ayrıldı. Örneklerin kalan kısmı üzerine eşit hacimde % 15'lik TCA çözeltisi eklenerek vortekslendi. Proteinler çöktürüldükten sonra oda sıcaklığında 14000xg hızda 2 dk. santrifüj yapıldı. Daha sonra süpernatantlardan 250 µl okside glutasyon (GSSG) ölçümü için örnek ayrıldı. Süpernatantların kalan kısmı ile HPLC cihazında analiz işlemine geçildi. Kan örnekleri için GSH ve GSSG ve total glutasyon seviyeleri kandaki hemoglobine oranlandı.

Dokuda GSH seviyesini belirlemek için $-80^{\circ}C$ ' de saklanan doku örnekleri 1/1 oranda 31 mM NEM, 2mM serin, 20 mM borik asit içeren 50 mM tris tamponunda (pH=8) homojenize edildi. Daha sonra % 10 hacmi kadar % 60'lık TCA çözeltisi homojenatın üzerine eklenerek vortekslendi ve ardından örnekler oda sıcaklığında 14000xg hızda 2 dk. santrifüjlendi. Daha sonra süpernatantlardan 250 µl GSSG ölçümü için ayrılarak kalan kısım ile HPLC cihazında analiz işlemine geçildi. Doku örnekleri için GSH ve GSSG ve total glutasyon seviyeleri yaş doku ağırlığına oranlandı.

HPLC cihazında C-18 kolonu ve UV-görünür bölge PDA (Prominence Diode Array) dedektörü kullanıldı. Hareketli faz olarak A ve B çözeltileri hazırlandı. Hareketli faz A için % 0.25 asetik asit çözeltisi 2 M NaOH ile pH=3.1 olacak şekilde ayarlandı. Hareketli faz B için HPLC-grade (% 99.9' luk) asetonitril kullanıldı. Tüm analizler $25^{\circ}C$ ' de, % 94 A, % 6 B hareketli faz bileşimi kullanılarak 1.25 ml/dk akış hızıyla gerçekleştirildi. Her analizden

sonra 5 dk. % 100 B ile yıkandı. Her örnek yüklemesinden önce ise 5 dk % 94 A, % 6 B hareketli faz bileşimi uygulanarak kolonun şartlandırılması sağlandı.

HPLC’de yapılan analizler sonrası GSH-NEM konjugatına ait piklerin alıkonma sürleri tespit edildi. Daha sonra örneklerdeki GSH seviyelerini tespit edebilmek için GSH-NEM konjugatların standartları hazırlandı. Standartlara ait piklerin kantitasyonu için pik alanları cihazın programı (LC Solution) ile hesaplandı. Pik alanları kullanılarak GSH-NEM standart grafiği çizildi (Şekil 3.3).



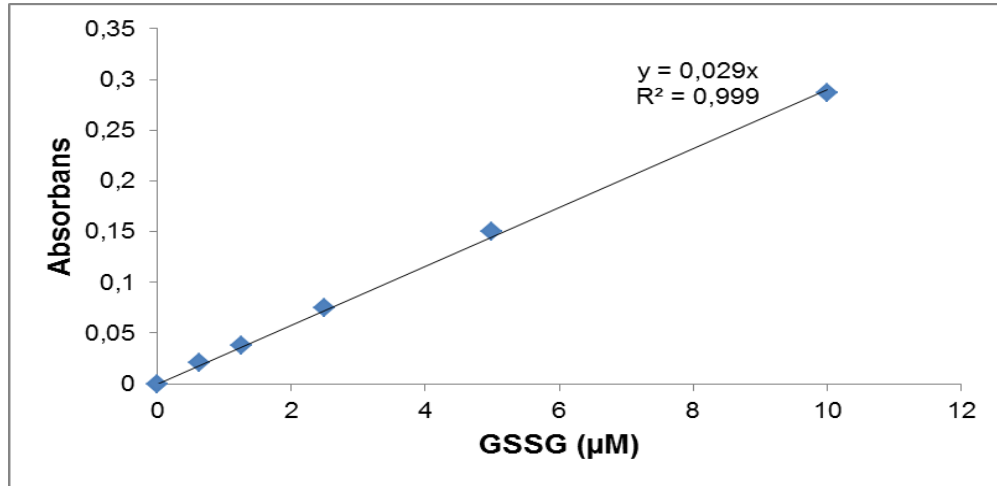
Şekil 3.3. GSH-NEM standart grafiği.

3.5.3. Okside Glutatyon Düzeyinin Belirlenmesi

Kan ve dokuda HPLC yöntemi ile GSH seviyesi belirlenirken ayrılmış olan örneklerdeki NEM’i uzaklaştırmak için örnek hacminin üç katı kadar diklorometan organik çözücüsü eklendi. Daha sonra her bir örnek 1 dk. vortekslenerek NEM’in organik faza geçip ekstrakte edilmesi sağlandı. NEM’i uzaklaştırılmış örnekler üzerine % 5 hacimde 4 M trietanol amin (TEAM) çözeltisinden eklenerek örneklerin pH’sı 7.0’ e getirildi. Daha sonra reaksiyon ortamı 0.038 mg/ml (48 mM) NADPH, 0.031 mg/ml DTNB ve 0.115 U/ml

glutasyon redüktaz, 1 mM EDTA içeren 100 mM potasyum fosfat tamponunda (pH:7) hazırlandı. Reaksiyon en son NADPH eklenerek başlatıldı. Reaksiyon başlatıldıktan 5 dk sonra glutasyon redüktazın NADPH kullanarak indirgediği glutasyonların DTNB ile reaksiyonu sonucu oluşan TNB'nin 412 nm'deki absorbansı ölçülerek GSH düzeyleri belirlendi. Ölçümler mikro-plaka oyucuda gerçekleştirildi. Daha sonra GSSG ve total glutasyon seviyeleri doku örnekleri için yaş doku ağırlıklarına, kan örnekleri için hemoglobin seviyelerine oranlandı (59,60).

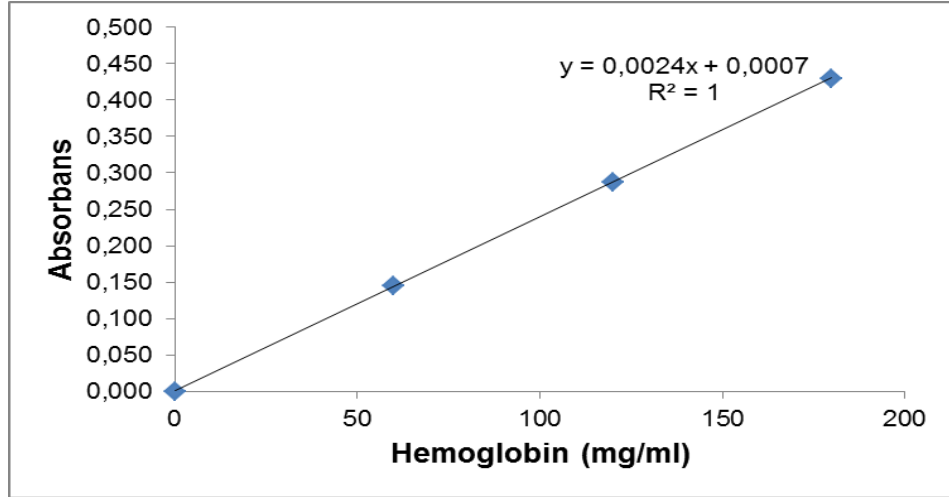
Standart grafiği için 1.25 – 30.0 μM konsantrasyon aralığında GSSG standartları hazırlandı. Standart ve örneklerin aynı mikro-plaka içerisinde absorbansları ölçüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Okside glutasyonun (GSSG) standart grafiği

3.5.5. Hemoglobin Ölçümü

Hemoglobin ölçümü için ayrılmış tam kan örneklerinden 20 μl alınarak içerisinde 5 ml Drabkin çözeltisi bulunan tüplere aktarıldı. Tüpler yavaşça karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 540 nm'de absorbansları ölçüldü (62). Hemoglobin standart grafiği için insan hemoglobini kullandı (Şekil 3.5).

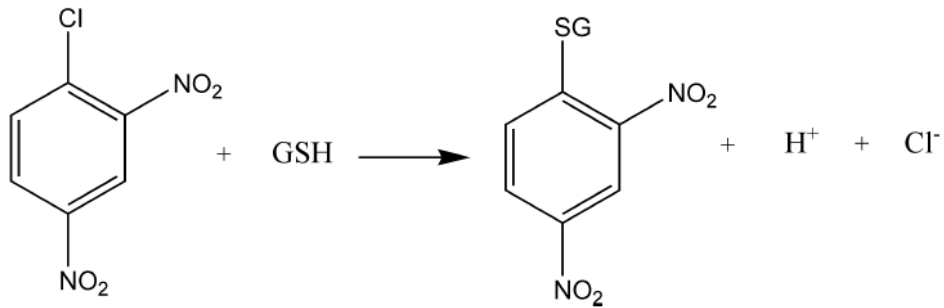


Şekil 3.5. Hemogloblin standart grafiği

3.6. Dokularda Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Dokular 1: 10 oranında (w/v) soğuk 100 mM potasyum fosfat tamponu (2 mM EDTA, ph=7.0) içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar +4°C'de 10000xg'de 15 dk. boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatantlarda GST aktivitesine bakıldı.

Glutasyon-S-transferaz aktivitesi, GSH'nin 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ile oluşturduğu konjugasyon ürününün 340 nm'de absorbans artışı üzerinden belirlendi (Şekil 3.5) (63).

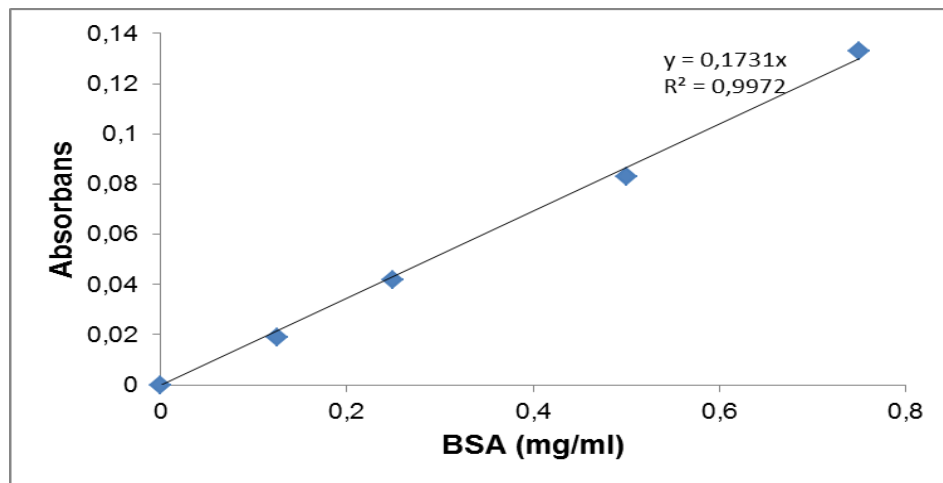


Şekil 3.6. İndirgenmiş glutasyonun elektrofilik CDNB'ye konjugasyonu

Aktivite ortamı 1 mM EDTA içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5), 1 mM GSH, 1 mM CDNB, ve % 5 etanol içerecek şekilde hazırlandı. Aktivite ölçümleri 30 °C'de 340 nm'deki absorbands artışı üzerinden mikro-plaka okuyucu (Molecular Devices, Spektra Max M2) kullanılarak her bir örnek için 5 dk. boyunca izlenerek gerçekleştirildi. Tüm aktivite ölçümleri en az üç tekrarlı olarak yapıldı. Spesifik aktivite $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ absorbsiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı ve $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}$ protein olarak ifade edildi.

3.6.1 Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi (64) temeline dayanan bir protein ölçüm kiti (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Ölçümler Bradford'un mikro-yöntemine göre mikro-plaka kullanılarak, ticari kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. Bütün çalışmalarda protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Bu koşullarda mikropilaka kullanılarak yapılan ölçüm için doğrusal çalışma aralığı 0.1-1.4 mg/ml olarak belirtildi (Şekil 3.7) (65).



Şekil 3.7. BSA standart grafiği

3.7. Tümör Dokularının Hemotoksilen-Eozin Histokimyasal Boyaması

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra tümör dokuları % 10'luk formol çözeltilisine alınarak saklandı. Daha sonra formol içerisinde fikse edilen dokulardan alınan kesitler parafine gömülerek bloklar oluşturuldu. Mikrotom kesitleri lam üzerine alınarak standart hematoksilin-eozin (H+E) histokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi. Sıçan meme tümörlerinin histopatolojik analizi Russo ve arkadaşları tarafından belirtilen kriter ve sınıflamalara göre yapılmıştır (66).

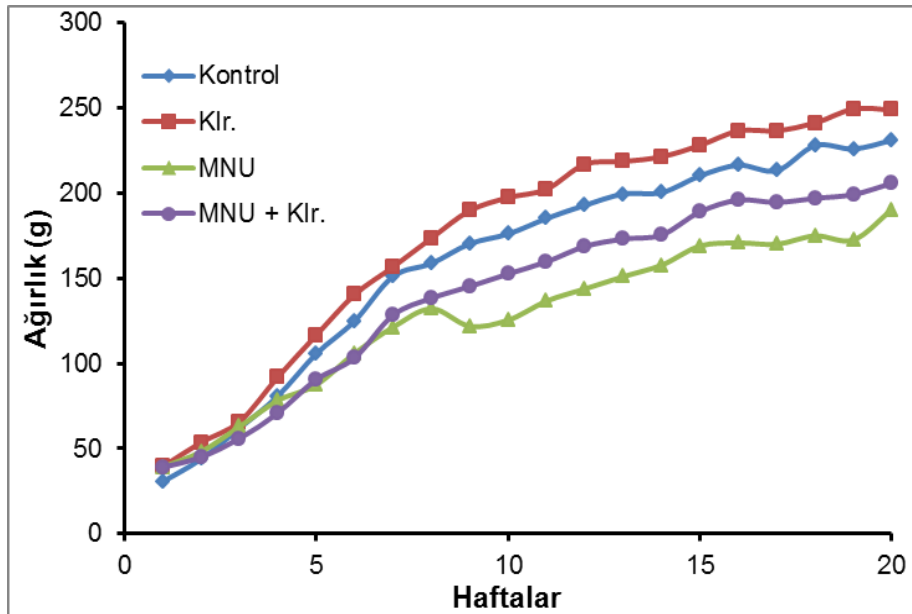
3.8. İstatiksel Değerlendirme

Bu çalışmada elde edilen değerlerin karşılaştırılması için IBM SPSS 22 istatistik programı kullanıldı. Parametrik olmayan bağımsız çoklu grupların istatiksel olarak değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi yapıldı. Bağımsız ikili alt gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesi için Mann Whitney U Testi yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler için, iki grup arasındaki farkın istatiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Genel Durumlarının Takibi

Sıçanların ağırlıkları enjeksiyon işlemlerinin başladığı tarihten itibaren haftalık olarak ölçüldü. Zamana bağlı olarak deney gruplarının ağırlıklarındaki değişim Şekil 4.1'de gösterilmektedir. MNU grubundaki sıçanların ağırlıkları 8. haftadan itibaren diğer gruplara göre % 20-35 oranında azalmaya başladığı gözlemlendi. Tüm gruplar arasında Klr. grubundaki sıçanların ağırlıklarının en yüksek olduğu ve kontrol grubu ile paralel seviyede olduğu tespit edildi.



Şekil 4.1. Deney gruplarının ağırlıklarının değişimi.

Klorofilin enjeksiyonu yapılan sıçanların deri renklerinin yeşile döndüğü ve enjeksiyonlar tamamlandıktan sonraki 20 gün boyunca yeşilimsi rengi koruduğu gözlemlendi. Şekil 4.2' de sıçanların enjeksiyon işlemleri tamamlandıktan sonraki gün çekilmiş görüntüleri gösterilmektedir.

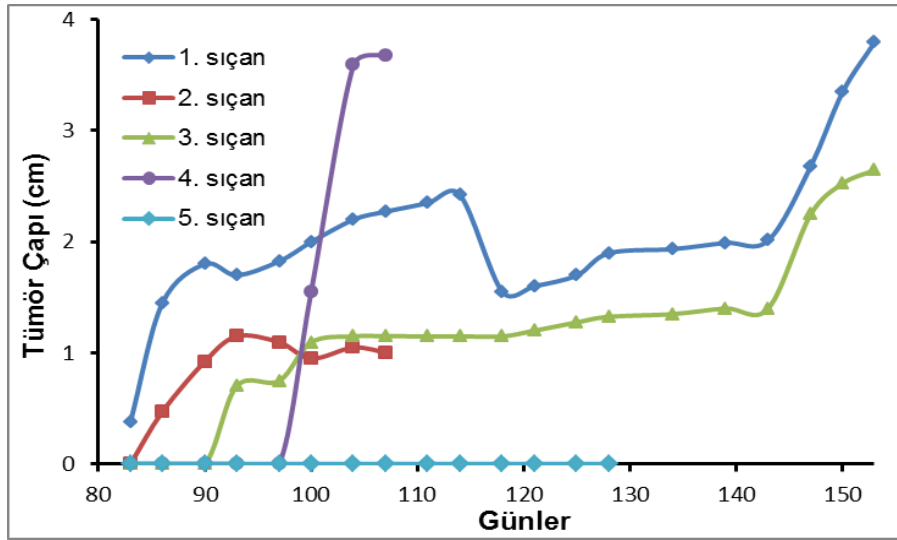


Şekil 4.2. Sıçanların enjeksiyon sonrası görüntüleri

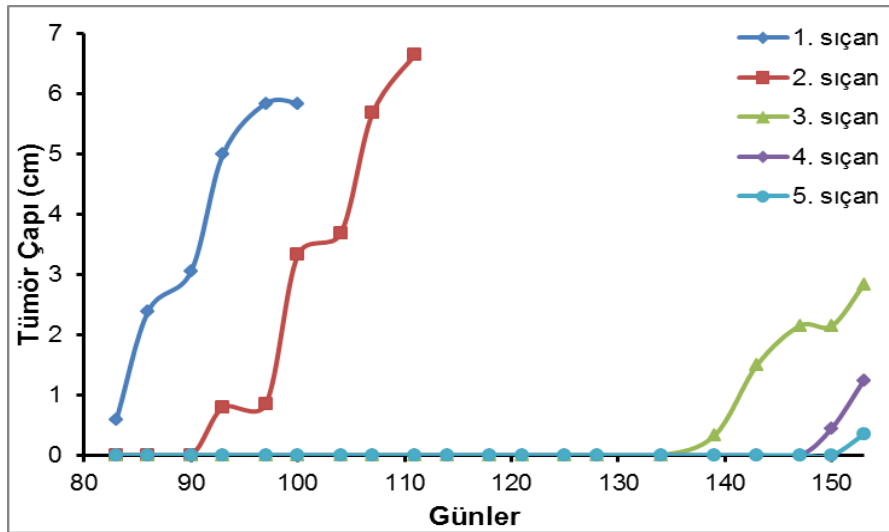
Tümör oluşumu başladıktan sonra 2-3 gün aralıklarla ölçülen tümör çaplarının geometrik ortalamaları hesaplandı. Enjeksiyon işleminden 83 gün sonra MNU grubundaki bir sıçanda tümör oluşumunun başladığı tespit edildi. Daha sonraki 2 hafta içinde MNU grubundaki 3 sıçanda daha tümör oluştuğu tespit edildi. 5 nolu sıçanda tümör oluşmadığı fakat ağırlığının giderek

azalarak halsizleştigi gözlemlendi ve 128. günde bu sıçan sakrifiye edildi (Şekil 4.3).

MNU + Klr. grubunda 1. sıçanda 83. gün, 2 nolu sıçanda 90. günde tümör oluşumu gözlemlendi. Diğer 3 sıçanda tümör oluşumunun 140. günden sonra başladığı görüldü (Şekil 4.4).

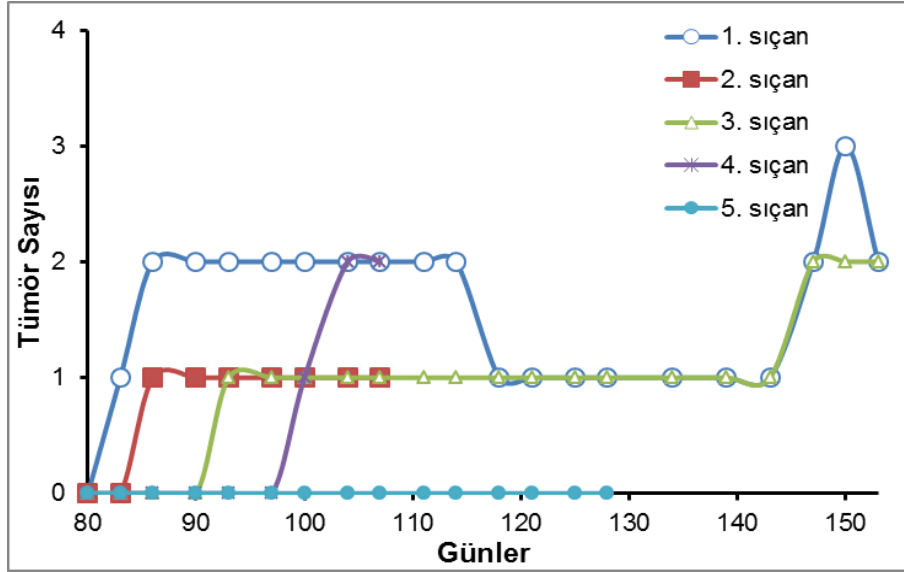


Şekil 4.3. MNU grubunun tümör çapları

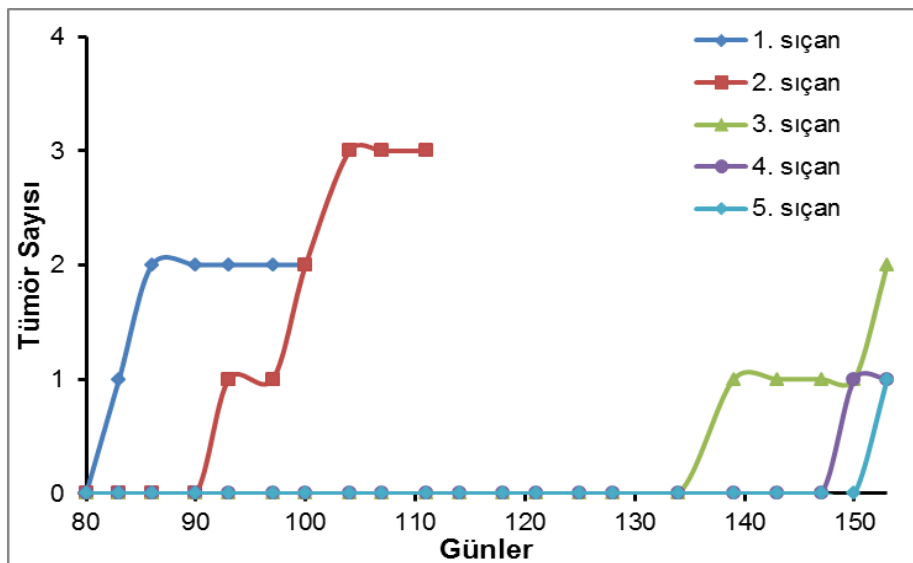


Şekil 4.4. MNU + Klr. grubunun tümör çapları.

MNU grubu (Şekil 4.5) ve MNU + Klr. grubundaki (Şekil 4.6) her bir sıçanda oluşan tümör sayısının zamana karşı değişimi incelendi. Tümörü aşırı büyüyen (tümör çapı>3 cm) ve durumu kötüleşen hayvanlar sakrifiye edildi. Bu nedenle çalışma sürecinde önceden sakrifiye edilen sıçanların tümör verileri grafiklerde erken sonlanmaktadır.



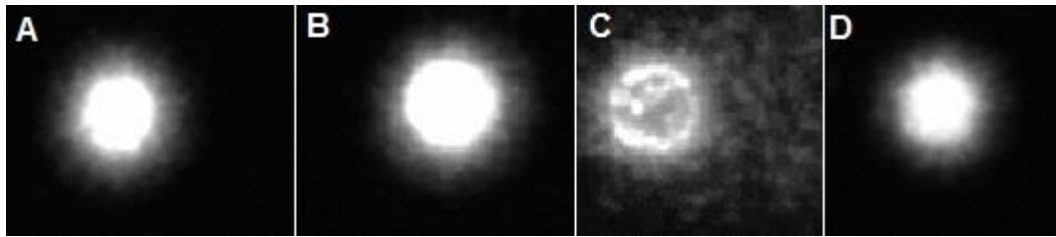
Şekil 4.5. MNU grubunda oluşan tümör sayıları.



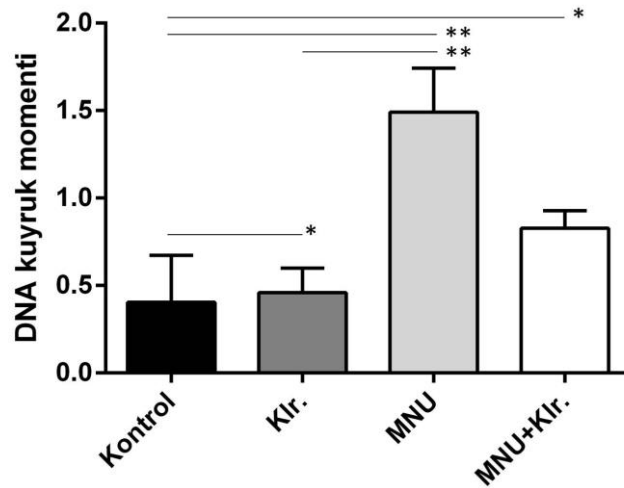
Şekil 4.6. MNU + Klr grubunda oluşan tümör sayıları.

4.2. DNA Hasarı Düzeyleri

Karaciğer oluşan DNA hasarı görüntüleri Şekil 4.7' de gösterilmektedir. Karaciğerde oluşan DNA hasarı sonuçlarına göre; kontrol ve Klr. grupları ile MNU grubu arasındaki oluşan fark istatistiksel açıdan önemli bulundu ($P<0.05$). MNU grubunda gözlenen yaklaşık 1.5 birimlik DNA kuyruk momentinin MNU+Klr grubunda 0.85 birime gerilediği, ancak kontrol ve tek başına Klr. uygulanan grupların değerlerine (0.40 ± 0.27 , 0.46 ± 0.14) ulaşamadığı gözlemlendi (Şekil 4.8).



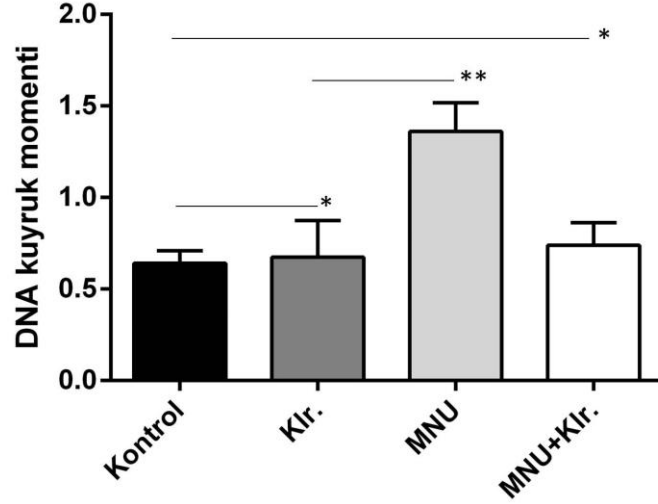
Şekil 4.7. Karaciğer DNA hasarı görüntüleri: A) Kontrol; B) Klr.; C) MNU; D) MNU+Klr. grubu.



Şekil 4.8. Karaciğerde DNA hasar düzeyleri (** $P<0.05$, * $P>0.05$).

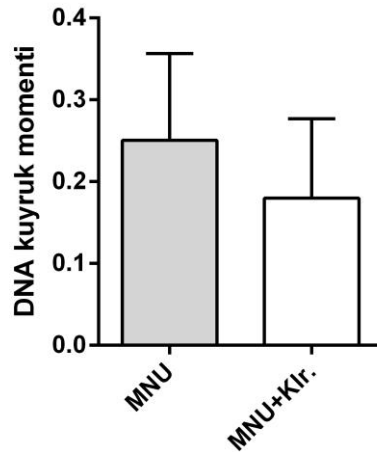
Kanda DNA hasarı sonuçlarına göre; MNU grubunda gözlenen DNA hasarı (1.36 ± 0.16) hem kontrol (0.64 ± 0.07), hem de Klr. (0.67 ± 0.2) ile karşılaştırıldığında yaklaşık % 100 daha fazla idi. MNU+ Klr. grubunda (0.77

± 0.11) bu oranın yaklaşık % 75 civarına gerilediği gözlemlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Kanda DNA hasar düzeyleri (** $P < 0.05$, * $P > 0.05$).

Tümör dokularında oluşan DNA hasarı sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmektedir. MNU+ Klr grubunda (0.18 ± 0.09) tek başına MNU uygulanan gruba (0.25 ± 0.11) göre daha düşük DNA hasarı tespit edilmiş olmasına rağmen iki grup arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($P > 0,05$).

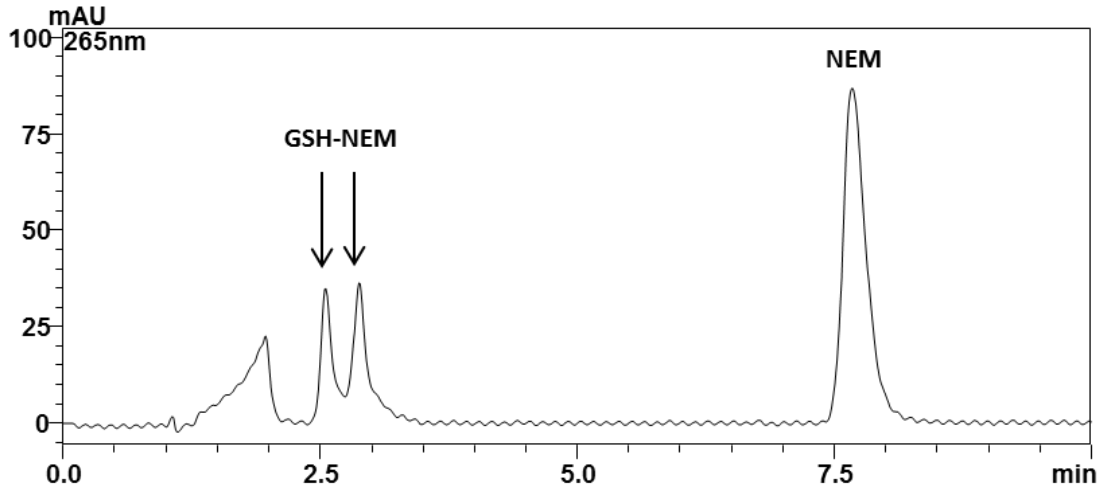


Şekil 4.10. Tümör Dokularında DNA hasar düzeyleri (** $P < 0.05$).

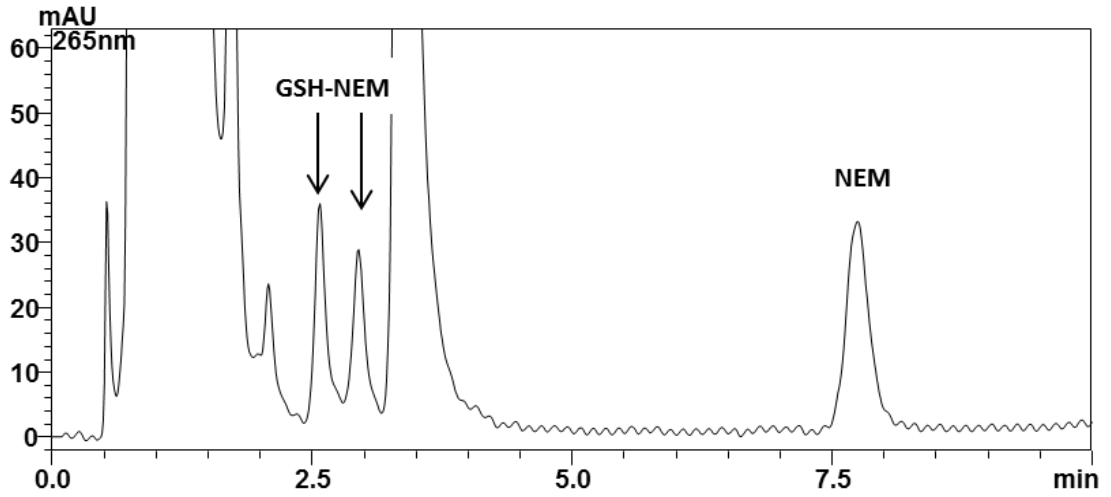
4.3. Glutasyon Düzeyleri

4.3.1 HPLC Sonuçları

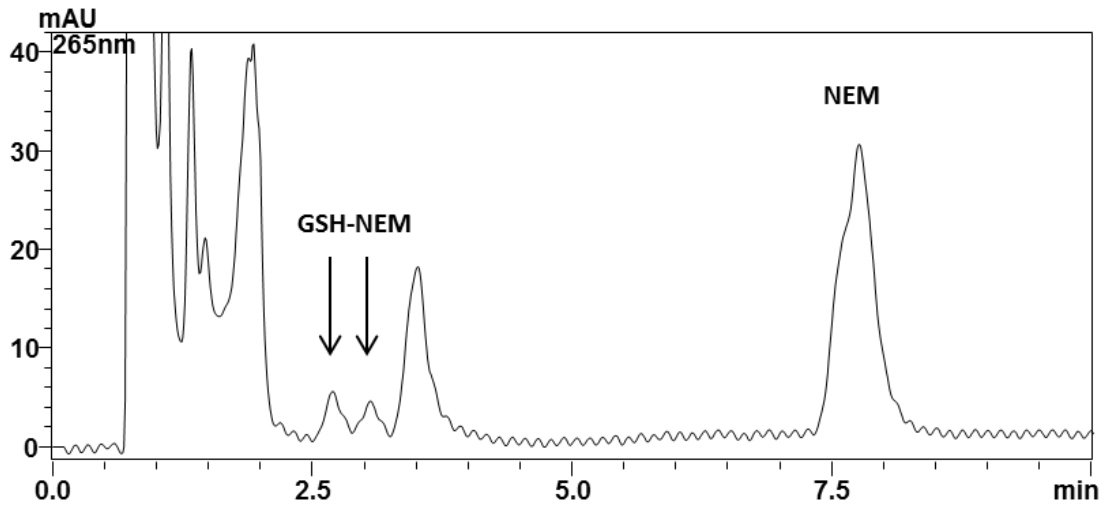
HPLC yöntemine göre elde edilen kromatogram görüntüsünde GSH-NEM konjugatının diastereomerlerine ait art arda iki pik şeklinde geldiği görüldü. Örneklerde GSH ile konjugat oluşturmayan NEM'in fazlasının 7.5-8. dk. arasında geldiği tespit edildi (Şekil 4.11). Reaksiyon ortamındaki tampon ve TCA'nın 1-2. dk arasında geldiği belirlendi. Karaciğer ve kan örneklerinden elde edilen kromatogram görüntüleri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de gösterilmektedir. Karaciğer ve kan örneklerinde bulunan ve TCA ile protein çöktürme işleminden sonra çökmemiş küçük molekül ağırlıklı biyolojik bileşenlerin ilk 2. dakikaya kadar elüe oldukları belirlendi. Kromatogramda 3-4. dakika arasında GSH dışındaki tiyol grubu içeren ve protein çöktürme işlemi sırasında çökmemiş olan diğer bileşenler olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.11. GSH-NEM standartının HPLC kromatogramı



Şekil 4.12. Karaciğer örneğinin kromatogram görüntüsü.

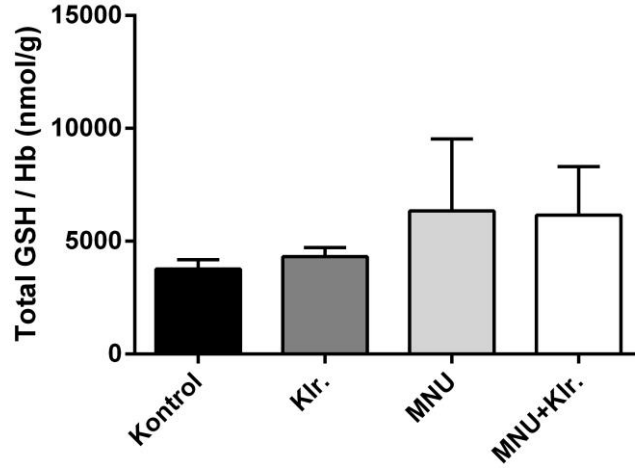


Şekil 4.13. Kan örneğinin kromatogram görüntüsü.

4.3.2. Kanda Glutasyon Düzeyleri

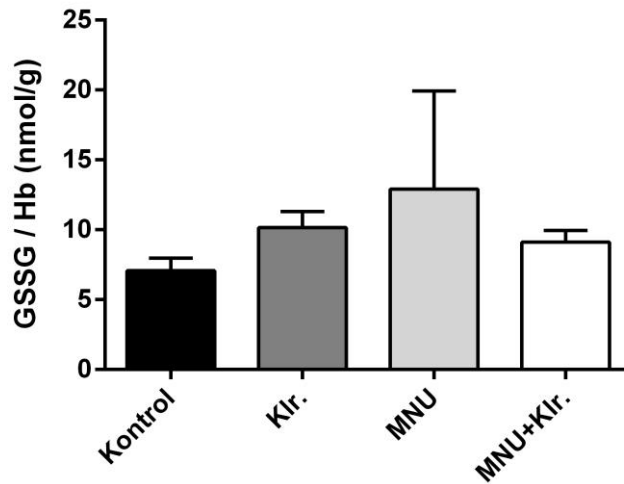
Kandaki total GSH düzeylerinin HPLC metodu ile elde edilen sonuçlarına göre MNU ve MNU+Klr. gruplarında GSH düzeylerinin (sırasıyla; 6345 ± 3187 ve 6152 ± 2147 nmol/g), kontrol ve Klr. gruplarının değerlerine (sırasıyla; 3770 ± 408 ve 4325 ± 389 nmol/g) göre yüksek olduğu saptandı

(şekil 4.14). Tek başına Klr. uygulanan grubun GSH değerleri ise kontrol grubuna yakın bulundu.



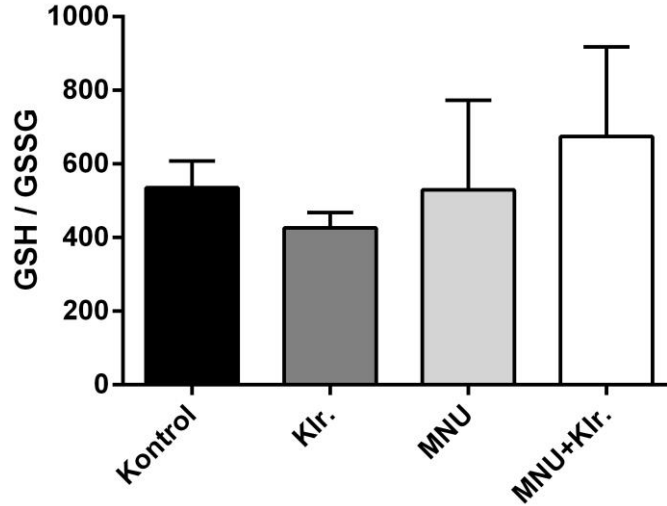
Şekil. 4.14. Kanda HPLC ile belirlenen total GSH düzeyleri

Kanda okside glutatyon (GSSG) düzeyleri incelendiğinde ise MNU grubunda GSSG düzeyinin diğer gruplardan daha yüksek (12.9 ± 7.0 nmol/g) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15). Klr. ve MNU+Klr. gruplarında alınan sonuçlar (sırasıyla: 10.2 ± 1.1 ve 9.1 ± 0.9 nmol/g) ise kontrol değerine (7.1 ± 0.9 nmol/g) yakındı. Grupların arasında anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil. 4.15. Kanda GSSG düzeyleri

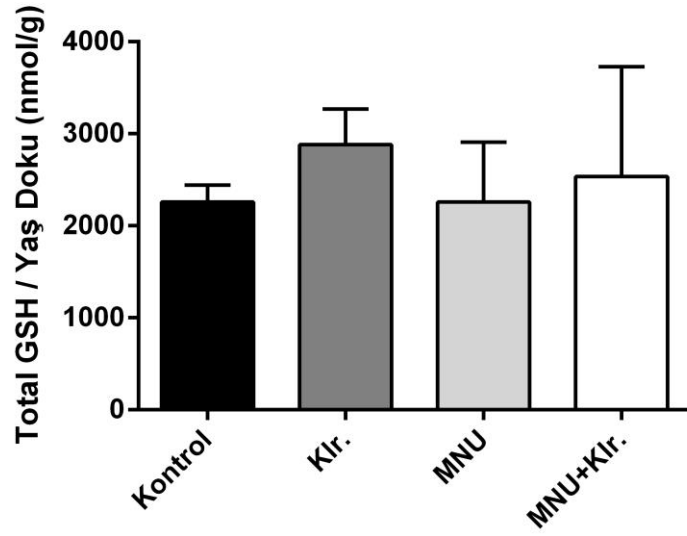
Kanda GSH / GSSG oranları değerlendirildiğinde gruplar arasında önemli bir fark bulunmadı (Şekil 4.16).



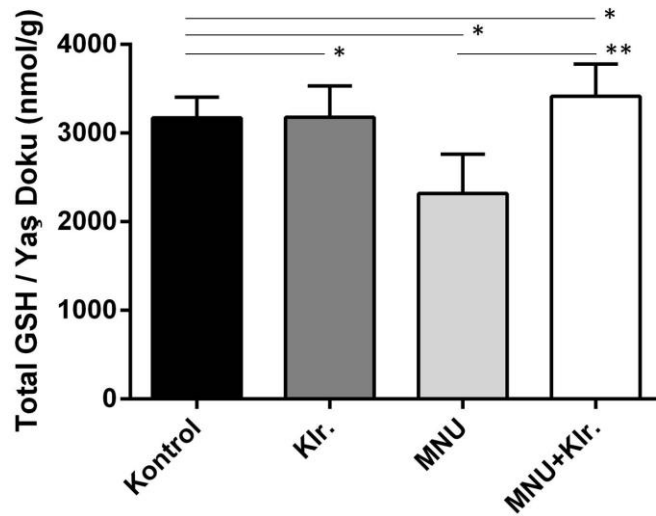
Şekil 4.16. Kanda GSH / GSSG oranları.

4.3.3. Dokularda Glutasyon Düzeylerinin Saptanması

Karaciğer dokularında total GSH düzeyleri spektrofotometrik yöntemle incelendiğinde gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmadı (Şekil 4.17). HPLC yöntemi ile incelendiğinde ise MNU ve MNU+Klr gruplarının total GSH düzeyleri (sırasıyla; 2319 ± 442 ve 3413 ± 363 nmol/g) arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu ($P < 0,05$), MNU + Klr. grubu sonuçlarının kontrole (3172 ± 233 nmol/g) yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18). Her iki yöntemle de klorofilin uygulandığı gruplarda total GSH düzeyinin kontrole yakın düzeylerde olduğu tespit edildi.

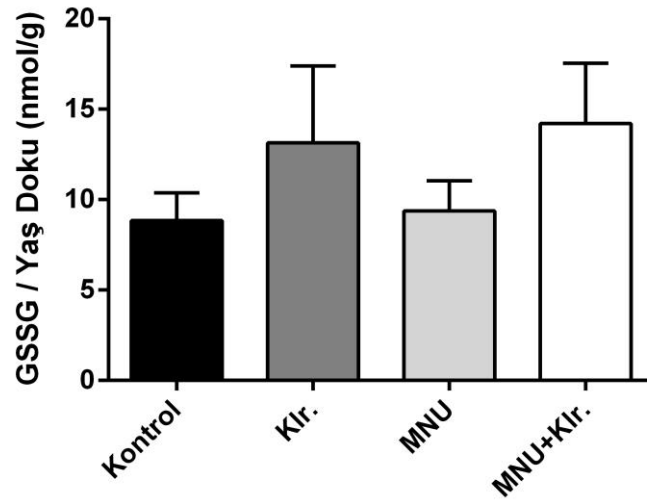


Şekil 4.17. Karaciğerde spektrofotometrik yöntem ile belirlenen total GSH düzeyleri.

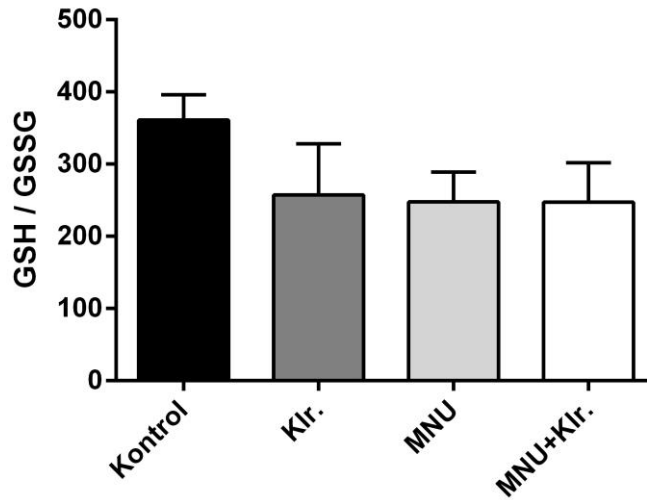


Şekil 4.18. Karaciğerde HPLC yöntemi ile belirlenen total GSH düzeyleri (**P<0.05, *P>0.05).

Karaciğer dokusunda GSSG düzeyleri (Şekil 4.19) ve GSH/GSSG oranları (Şekil 4.20) incelendiğinde ise, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptandı (P>0.05).



Şekil 4.19. Karaciğerde GSSG düzeylerinin belirlenmesi

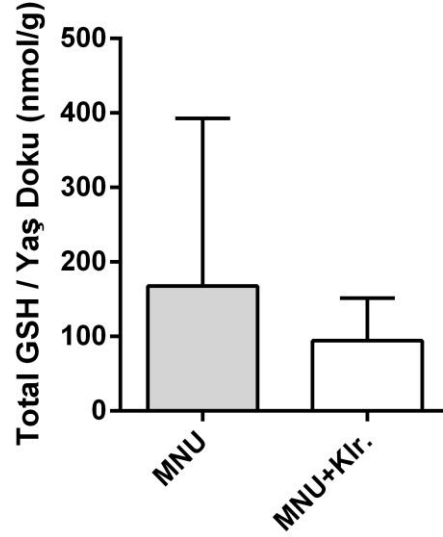


Şekil 4.20. Karaciğerde GSH / GSSG oranının belirlenmesi

MNU ve MNU+ Klr. gruplarından alınan toplam 14 tümör dokusundaki total GSH düzeyleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Gerek grup içi gerekse gruplar arası değerlendirmede alt ve üst değerler arasında önemli bir fark olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.21).

Tablo 4.1. Tümör dokularında total GSH düzeyleri

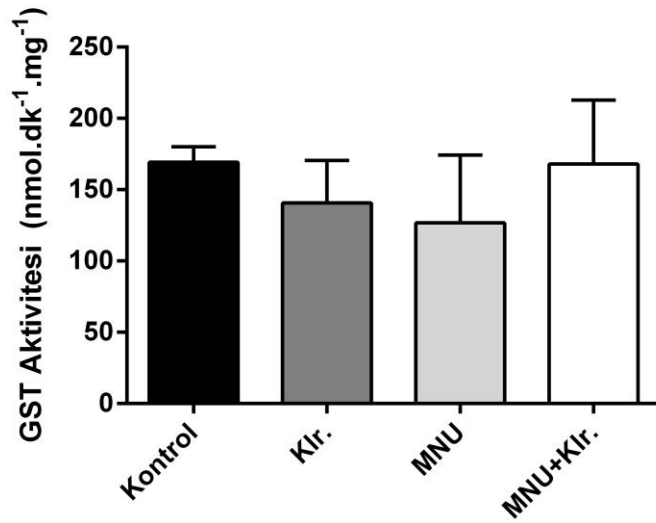
| Tümör No | Total GSH/ Yaş Doku (nmol/g) |
|------------|------------------------------|
| MNU 1 | 16 |
| MNU 2 | 83 |
| MNU 3 | 32 |
| MNU 4 | 173 |
| MNU 5 | 613 |
| MNU 6 | 88 |
| MNU+Klr. 1 | 104 |
| MNU+Klr. 2 | 218 |
| MNU+Klr. 3 | 49 |
| MNU+Klr. 4 | 76 |
| MNU+Klr. 5 | 118 |
| MNU+Klr. 6 | 36 |
| MNU+Klr. 7 | 62 |
| MNU+Klr. 8 | 93 |



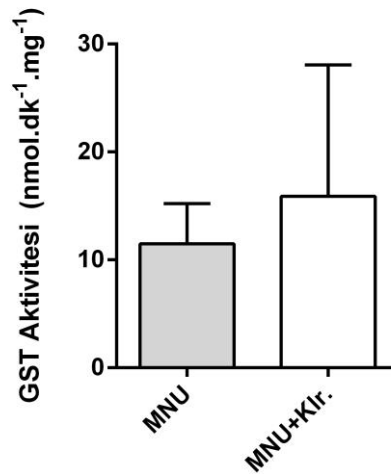
Şekil 4.21. Tümör dokularında total GSH düzeylerinin spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesi

4.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivite Sonuçları

Karaciğer dokularında GST aktiviteleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.22). Tüm gruplarda birbirine yakın düzeyde GST aktivitesi (kontrol 169.2 ± 10.8 ; Klr. 140.8 ± 29.8 ; MNU 126.7 ± 47.5 ve MNU+Klr. 168.0 ± 44.8 nmol.dk⁻¹.mg) tespit edildi. Tümör dokularında ise MNU+Klr. Grubunda (15.9 ± 12.2 nmol.dk⁻¹.mg) MNU grubuna (11.5 ± 3.7 nmol.dk⁻¹.mg) göre daha yüksek GST aktivitesi bulundu (Şekil 23).



Şekil 4.22. Karaciğer dokularında GST aktivitesi

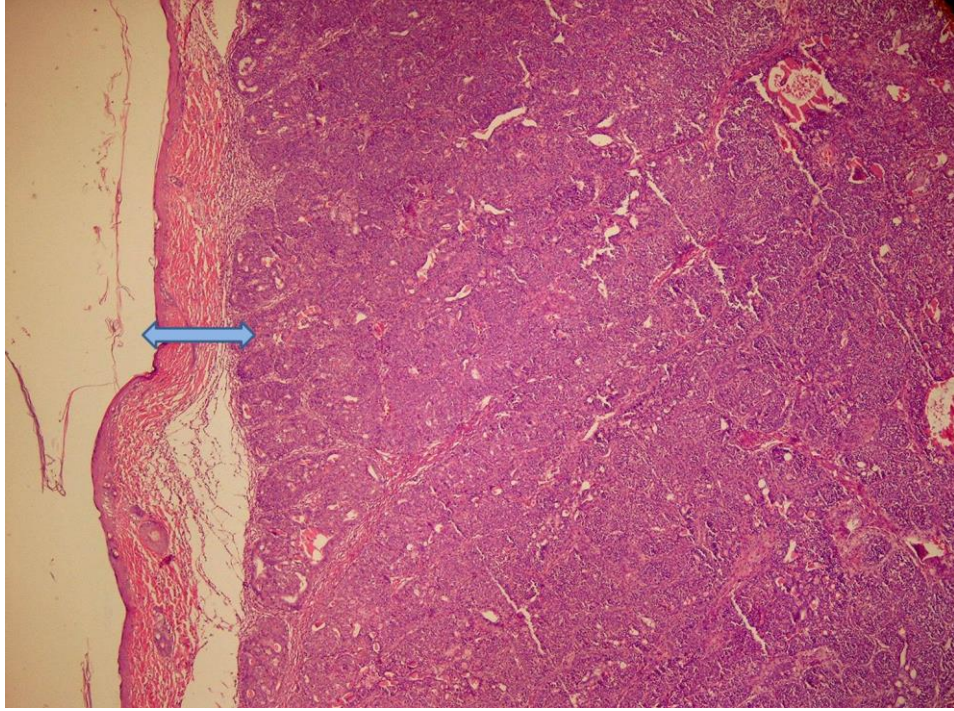


Şekil 4.23. Tümör dokularında GST aktivitesi

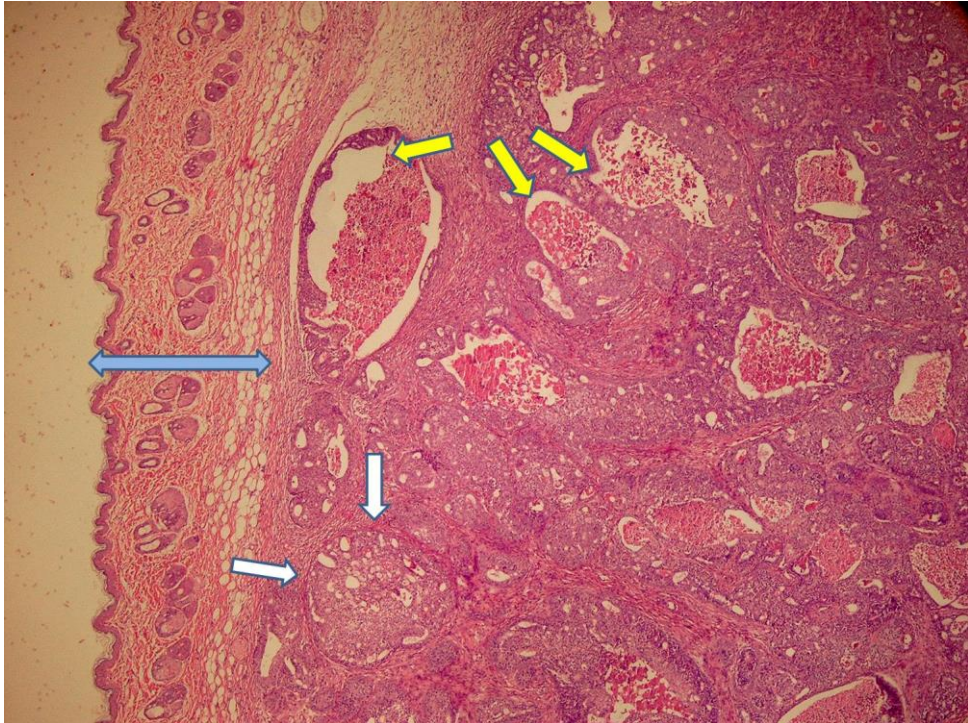
4.5. Tümör Dokularının Hematoksilen-Eozin Histokimyasal Boyaması

Tümör dokularının H+E boyaması sonucu elde edilen görüntüler x40 büyüklükte incelendiğinde, MNU+Klr. grubunda sarı renkteki oklarla ifade edilen fokal nekroz odaklarının (Şekil 4.24), MNU grubuna (Şekil 4.25) göre daha çok sayıda ve belirgin olduğu saptandı. Bu nedenle MNU+Klr. grubunda tümörün daha hızlı büyüdüğü sonucuna varıldı. MNU+Klr. grubunda beyaz oklarla gösterilen tümör asiner yapısının korunduğu tespit edildi. Tümör görüntülerinde deri kısmı mavi ok ile ifade edilmektedir.

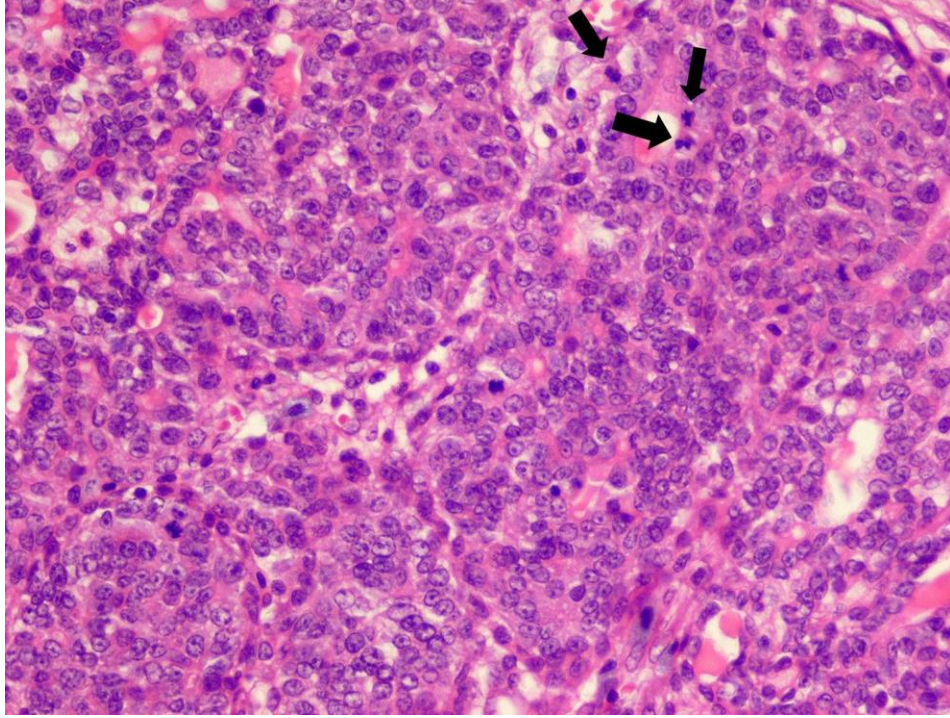
Tümör görüntüleri daha büyük ölçekte incelendiğinde (x400) MNU (Şekil 4.26) ve MNU+Klr. gruplarında (Şekil 4.27) mitozdaki hücreler siyah oklarla gösterildi. Her iki grupta da çok sayıda mitozda hücre görüldüğünden tümörlerin agresif özellikte olduğu tespit edildi. MNU+Klr. grubunda nekrotik alan sarı oklarla gösterildi.



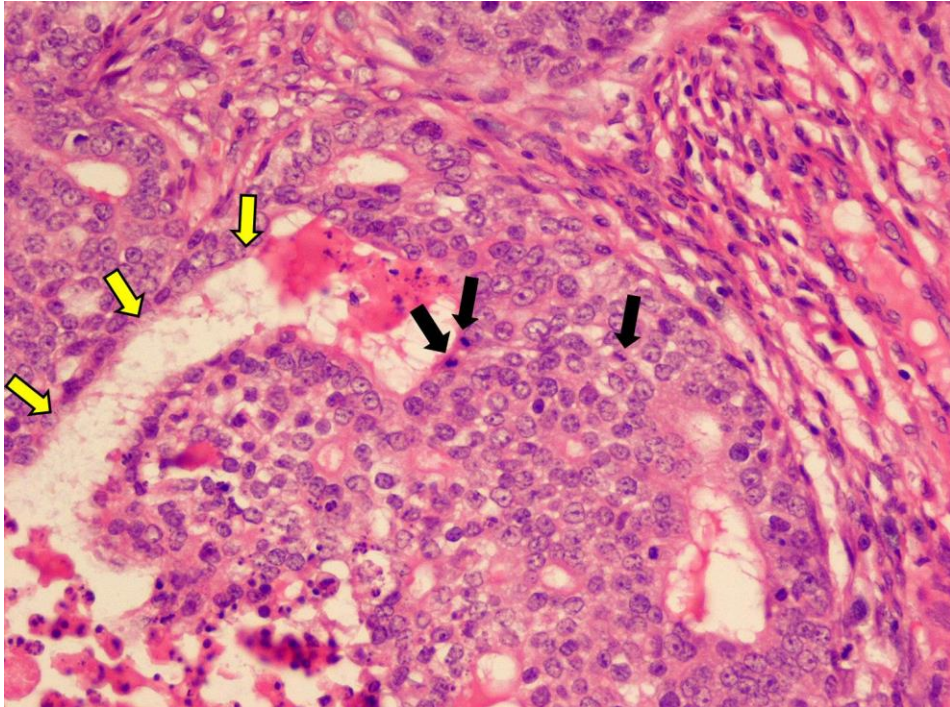
Şekil 4.24. MNU grubu H+E görüntüsü (x40)



Şekil 4.25. MNU+Klr. grubu H+E görüntüsü (x40)



Şekil 4.26. MNU grubu H+E görüntüsü (x400)



Şekil 4.27. MNU+ Klr. grubu H+E görüntüsü (x400)

5. TARTIŞMA

Sıçanlarda meme kanseri araştırmalarına bazı türlerde spontan meme tümörlerinin oluştuğunun farkına varılmasıyla başlanmıştır (53). Deneysel meme kanseri çalışmalarında, *in vivo* hayvan modelleri kullanılarak çeşitli ajanların koruyucu etkileri gösterilmiştir. Bu tip çalışmalarda Genellikle Sprague-Dawley ırkı sıçan seçilmektedir.

Sıçanlarda meme tümörleri virüs enfeksiyonları, genotoksik kimyasallar ve radyasyonla indüklenebilmektedir. Sıçan meme kanseri modelinde, agresif tümörlerin oluşturulmasında genellikle N-metil-N-nitrozüre (MNU) veya dimetil benzantrasen (DMBA) gibi polisiklik hidrokarbonlar kullanılmaktadır. Bu iki karsinojen maddeyle oluşturulan tümörler histolojik ve biyolojik olarak insandaki lezyonlara benzemektedir. Tümör indüksiyonu hedef dokuya özeldir ve bir veya birkaç dozda kolayca sağlanabilmektedir. Her iki karsinojen de meme adenokarsinomlarının gelişmesini sağlarken, uygulanan hayvanlarda herhangi bir sistemik toksisiteye rastlanmamaktadır. (54,55). Bizim alışmamızda da MNU ile indüklenmiş meme kanseri modeli oluşturulmuştur. MNU ve MNU + Klr. gruplarında tümör oluşumu tespit edilmiş ve bu dokuların patolojik değerlendirmeleri sonucunda bu durum onaylanmıştır. Oluşan tümör dokularının adenokarsinoma (papiller, kribriform ve solid) olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda GST inhibitörü olarak daha önce araştırma grubumuz tarafından etkinliği saptanmış olan Klorofilin kullanılmış ve bu molekülün Ki^{GSH} değerinin $1.7 \pm 0.2 \mu M$ ve Ki^{CDNB} değerinin $4.2 \pm 0.3 \mu M$ olduğu tespit edilmiştir (8). Molekül ile ilgili olarak normal meme epiteli (MCF12A) ve meme kanser hücre hatlarında (MDA-MB-231 ve MCF- 7) hücre siklusu ve hücre proliferasyonu üzerine çalışmalar yapılmış ve bu molekülün hücrelerde hücre proliferasyonuna yol açtıkları gözlenmiştir. Çalışmanın bu bölümü yayın aşamasındadır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda deney hayvanları ile çalışılmaya ve kimyasal olarak indüklenmiş meme kanseri modeli üzerinde inhibitör molekülün GSH ve GST üzerindeki etkinliği incelemeye alınmıştır. Tezin araştırma konusu bu bölümden oluşmaktadır.

Klorofil bitkilerdeki fotosentez olayının meydana gelmesini sağlayan yeşil renkli biyolojik pigmenttir. Klorofiller veya bunların türevleri gıda sektöründe renklendirme amaçlı katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (67). Farmasötik olarak klorofil'e reçetesiz bir ilaç olarak ve klorofilin (klorofil'in semisentetik, suda çözünebilir, sodyum- bakır tuzu türevi) şeklinde ulaşılabilir. Klorofilin, ilaç kütüphanesinde yer alan ve insan için zaten güvenli olduğu bilinen bir bileşiktir. Klorofilin'in sıçan karaciğerinde lipid peroksidasyonunun inhibisyonuna neden olduğu (68,69) bu yolla da mitokondriyi çeşitli reaktif oksijen bileşenlerinden kaynaklanan oksidatif hasardan koruma becerisinde olduğu bulunmuştur (70) . Ayrıca, radyasyona-bağlı DNA ve mitokondri membran hasarını inhibe ettiği gösterilmiş (71) ve aynı zamanda oksidatif hasara karşı DNA'nın potansiyel bir koruyucusu olduğu gösterilmiştir (72).

Son zamanlarda klorofilin kanserle ilgili araştırmalarda da kullanılmaktadır. Klorofilin ve klorofilin ile ilgili bileşiklerin antioksidan, antimutajenik, anti-tümöral, anti-viral etkileri gösteren çalışmalar mevcuttur (46) . Bitkisel bir pigment olan klorofil'in suda çözünebilir bir türevi olan klorofilin (Klr.)'in, aflatoksin absorpsiyonunu bloke eden engelleyici bir molekül olarak görev yaparak, aflatoksinin DNA'da meydana getirdiği hasarı azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (47-50). Bu moleküllerin bu etkilerini nasıl gerçekleştirdikleri ile ilgili moleküler- mekanistik veriler yeterli değildir.

MAP kinaz yolağını protein-protein ilişkisi yoluyla düzenleyen GST P1-1, apoptoz ve proliferasyonda rol alan JNK1'in endojen inhibitörü olarak davranmaktadır. Stres altında olmayan hücrelerde oluşan GSTP1-1-JNK heterokompleksi sayesinde apoptotik sinyal baskı altında tutulmaktadır. Oksidatif stres altında bu kompleksin birbirinden ayrılması ve GSTP1-1 oligomerizasyonu ile apoptoz indüklenmektedir (24,73). GST inhibitörü olan bir molekülün hücrelere verildikten sonra GST-JNK mekanizması üzerinden hücreyi apoptoza götürme ihtimali varken, proliferasyon gözlemlenmesi klorofilin molekülünün antioksidan özelliğini ön plana çıkardığını

göstermektedir. Nitekim çalışmamızda DNA hasarı ile ilgili yapılan “Comet Assay” yönteminde klorofilinin bu etkisi gözlenmiştir.

DNA hasarını tespit etmek için çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal test geliştirilmiştir. Çeşitli DNA lezyonlarının ölçümünde birtakım analitik teknikler; immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (Comet Assay), ³²P “post labeling” ölçüm teknikleri, alkalın elüsyon testi ve kromatografik teknikler gibi yöntemler kullanılmaktadır (74-76). “Comet Assay” basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği, en önemlisi ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Oluşan DNA kırıklarının elektroforezde anoda doğru göçmesiyle oluşan kuyruklu yıldız görüntüsü nedeniyle yöntem bu ismi almıştır (77,78). Oluşan kuyruk görüntüsünün DNA hasarı ile ilişkilendirilebilmesi için kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti gibi ölçüm parametreleri türetilmiştir. Kuyruk momenti kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunun çarpımıyla türetilmiş ve DNA hasarını seviyesini daha doğru yansıttığı düşünülen bir parametredir. Bu nedenle bu çalışmada DNA hasarı seviyelerinin kuyruk momenti yönünden değerlendirilmesi uygun bulundu. (79,80).

Kan, karaciğer ve tümör dokularında incelenen DNA hasarı sonuçlarına göre Klr+MNU grubunda MNU’dan kaynaklanan DNA hasarının Klr. ile önemli derecede azaldığı tespit edildi. Hayvanlarda tümör oluşuktan sonra MNU+Klr. grubunda tümör çaplarının daha hızlı artması, tümörlerin H+E görüntülerinde fokal nekrotik odaklarının daha fazla ve belirgin olması klorofilinin antioksidan özelliğinin baskın çıktığını ve hücre kültürü çalışmalarında elde edilen proliferasyon sonuçlarını desteklediğini ispatlamaktadır.

Pek çok kanser türünde olduğu gibi meme kanseri tedavisinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri kanser hücrelerindeki proliferasyonu etkileyen protein ekspresyonundaki değişikliklerdir. Literatürde kanser hücrelerinin kemoterapötik 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 P1-1 (GST P1-1) izoziminin aşırı üretimi ve glutatyon konjugasyonu aracılığıyla kemoterapötik ajanları inaktive ederek ilaç direncini indüklediği bilinmektedir (3-5). Bizim çalışmamızda kan örneklerinde glutatyon değerleri HPLC ile değerlendirildi. Sıçanlardan alınan kardiyak kan örneklerinin yaklaşık 3 ml olması ve “comet assay” için 2 ml kan örneğine ihtiyaç duyulması nedeniyle geri kalan miktarda sadece HPLC analizi gerçekleştirilebildi, spektrofotometrik ölçüm yapılamadı. Bu yöntemle alınan sonuçlarda Kontrol ve Klr. Gruplarında birbirine yakın (sırasıyla; 3770 ± 408 ve 4324 ± 389 nmol/g) sonuçlar elde edilirken MNU ve MNU+Klr gruplarında daha yüksek değerler (sırasıyla 6345 ± 3187 ve 6152 ± 2148 nmol/g) elde edildi. Bu sonuçlar literatürdeki meme kanseri modeli için sıçanların total GSH düzeyleri ile (2367-8864 nmol/g) uyumlu idi (81-83).

Hücresele seviyede, GSH homeostazı biyosentez, oksidasyon, import ve eksport arasındaki dengeyle sağlanır. Doku ve organizma ise bu GSH metabolizması ile ilgili proseslere ve dokular arasındaki GSH akışına bağlıdır (84). Hücrelerden GSH salınımı homeostatik mekanizmalar için önemli bir faktördür. Plazma GSH kaynağının çok büyük bir kısmını karaciğer oluşturur (85).

Glutatyon konsantrasyonu çeşitli oksidan ajanlarla karşılaştığı zaman değişmektedir. Okside glutatyonun miktarı artmakta ve hücrede GSH/GSSG oranını korumak amacıyla GSSG'nin hücre dışına transfer edildiği bilinmektedir.

Çeşitli biyolojik olaylarda, örneğin antimikrobiyal savunma, iltihaplanma, kanser radyasyon hasarı, fotobiyolojik etkiler ve yaşlanmada reaktif oksijen türleri işe karışır. Sonuçta protein oksidasyon ürünleri, lipid peroksidasyon ürünleri ve DNA baz hasarları ortaya çıkar (86).

GSH ve GSSG hücrenin ana tiyol redoks sistemini oluşturur. GSH/GSSG oranının korunması hücrenin canlılığı açısından önemlidir (87).

Biyolojik örneklerde, GSH'nin varlığında, GSSG tayini, düşük derişimlerde olması nedeniyle, zordur. Bu nedenle GSH'ın ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. GSSG ölçümünde tiyol gruplarının bloke edilmesi için NEM kullanıldı. NEM tiyollerle hızlı bir şekilde tepkimeye giren ve spesifitesi oldukça yüksek olan bir maddedir. Böylece örneklere NEM uygulanarak redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyonu (GSSG) dönüşümü engellenir ve GSH ve GSSG seviyelerinin ayrı ayrı belirlenmesine olanak sağlanır. Çalışmamızda karaciğer doku örnekleri NEM ile muamele edildikten sonra HPLC metoduyla redükte GSH, spektrofotometrik yöntemle de GSSG seviyeleri belirlendi. Aynı örneklerin total GSH düzeyleri spektrofotometrik yöntemle de belirlendi ve birbirine yakın sonuçlar elde edildi. Her iki yöntemle de MNU grubunda GSH seviyesinin diğer gruplara göre düşük çıktığı gözlemlendi. Bu durum; MNU enjeksiyonu yapılan gruplarda oluşan oksidatif stresi engellemek amacıyla daha fazla GSH tüketilmesinin sebep olabileceğini düşündürdü. Yapılan benzer çalışmalarda MNU ile indüklenen kanser modellerinde GSH düzeyinin kontrol ve antikarsinojen madde uygulanan gruplara göre yaklaşık %10 -25 daha düşük olduğu belirtilmiştir (84-86).

Spektrofotometrik yöntemde örneklerin GSH düzeyleri mikro-plaka düzeneğinde daha hızlı ve pratik bir şekilde ölçülebilirken, HPLC metodunda her bir örnek için analiz süresi en az 20 dk. sürmesi yöntemler arasındaki zaman kullanımı açısından önemli farklardan biridir. Diğer yandan spektrofotometrik yöntemde enzimatik bir reaksiyon sonucu oluşan TNB'nin 412 nm'deki absorbansı ölçülerek GSH düzeyi belirlenmektedir. Bu nedenle enzim aktivitesini etkileyecek pH, sıcaklık, tampon ve reaksiyon ortamı bileşenleri, protein çöktürmek için kullanılan kimyasallar, gibi birçok faktör hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. DTNB nin ışıktan etkilenmesi ve kör okuması yapılan örneğin zamanla farklı absorbans vermesi yanlış okunmasına neden olabilecek diğer unsurlardır. Ayrıca örneklerdeki diğer tiyol grubu içeren bileşikler spektrofotometrik yöntemde interferansa neden olmaktadır. Bu nedenle bazı ölçümlerin beklenenden farklı çıkması sonuçları olumsuz etkileyebilecek olası bir durumdur. Bu nedenlerden dolayı bu

çalışmada spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçları teyit etmek için HPLC yöntemi kullanılmasına ihtiyaç duyulmuştur. HPLC metoduyla belirlenen total GSH seviyeleri, spektrofotometrik yöntemle göre daha yüksek bulunmuş ve HPLC metodunda her bir deney grubu için hesaplanan standart sapma değerinin spektrofotometrik yöntemle göre daha düşük çıktığı tespit edilmiştir.

Glutasyon S-transferazlar, endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir. Çalışmamızda, karaciğer ve tümör dokularında GST aktiviteleri incelendiğinde MNU grubunda ölçülen GST aktivite değerinin ($126.7 \pm 47.5 \text{ nmol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) kontrol grubunda ölçülen aktivite değerinden ($169.2 \pm 10.8 \text{ nmol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) yaklaşık % 25 daha düşük olduğu tespit edilmiştir. MNU+Klr. grubunda GST aktivitesinin ($168.0 \pm 44.8 \text{ nmol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) kontrol grubuna çok yakın olması klorofilinin karaciğer dokusunda koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. MNU sitotoksik bir kimyasal olduğundan karaciğerde GST aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır (88) . Daha önce yapılan meme kanseri modeli çalışmalarında da karaciğer GST aktivitelerinin MNU grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık aynı oranlarda düşük çıktığı gösterilmektedir (88,89) . MNU+Klr. grubunda klorofilin sayesinde MNU'nun karaciğerde sitotoksik etkiyi neredeyse % 100 önlediği kanıtlanmıştır. Tümör dokularındaki GST aktiviteleri incelendiğinde, her tümör dokusunun büyüklüğü farklı olduğundan GST aktiviteleri de farklılık göstermektedir. Ayrıca denek sayısı az olduğundan tümör dokularında GST aktivitesi standart sapma değeri yüksek bulunmuştur. Bu nedenle MNU ve MNU+Klr. gruplarında hem GST aktivitesi hem de glutasyon seviyeleri açısından anlamlı bir karşılaştırma yapılamadı.

GST'lerin detoksifikasyon enzimi olma dışında bazı molekülleri yapısına bağlayarak bu molekülleri korumak gibi önemli özellikleri de bulunmaktadır (90,91) . Yapısında porfirin halkası bulunan klorofilinin ve klorofillin katabolitlerinin GST enzimleri tarafından bağlandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (91-93) . Bizim çalışmamızda Klr. ve MNU+Klr. gruplarındaki

sıçanlara klorofilin enjeksiyonları tamamlandıktan sonra yaklaşık 20 gün boyunca sıçanların derilerinin yeşil renkte olduğu gözlemlendi. Bu durum klorofilinin GST'ler tarafından tutularak GST inhibisyonuna ek olarak uzun süre antioksidan molekül olarak etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. MNU+Klr. grubunun karaciğer dokusundaki glutatyon düzeylerinin MNU grubuna göre yüksek bulunması ve buna bağlı olarak MNU+Klr. grubunun kan, karaciğer ve tümör dokularında DNA hasarı seviyelerinin MNU grubuna göre düşük bulunması bu durumu desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında GST P1-1 üzerinde inhibisyon etkisi olduğu kanıtlanmış antioksidan bir molekül olan klorofilinin inhibisyon ve antioksidan özelliğinden yararlanılarak kimyasal olarak indüklenmiş meme kanseri modeli üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Klorofilin kan, karaciğer ve tümör dokularında antioksidan özelliği sayesinde karaciğer dokusunda glutatyon düzeyinin artmasını sağlarken kan, karaciğer ve tümör dokularında MNU kaynaklı DNA hasarını engellemektedir. Bu çalışmanın devamında karaciğer, böbrek, kalp ve dalak organları ve tümör dokularında glutatyon peroksidaz (GPx) , glutatyon redüktaz (GR), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) gibi antioksidan enzim aktiviteleri araştırılması planlanmaktadır. Ayrıca klorofilinin MNU ile indüklenmiş meme kanseri modeli üzerine olan erken dönem etkileri de araştırılacaktır.

GST izozimlerinin (özellikle tümör dokularında Pi ve karaciğer dokularında Mü) ekspresyonlarının değerlendirilmesi daha yol gösterici olacaktır.

Antioksidan özelliğe sahip moleküllerin kanser tedavisi alan kişilerde kullanımının tartışılması gerektiği kaçınılmazdır. Oksidatif hasarı önleme adına gerek hücre kültürü çalışmalarında kanser hücrelerinde proliferatif etkiye neden olmaları, gerekse deney hayvanları uygulamalarında savunma odaklı davranışları sonucu detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinde değişikliğe neden olmaması, DNA hasarını geriye döndürebilme gibi mekanizmaları harekete geçirebilmeleri nedeniyle kanser tedavisini istenen amaçtan uzaklaştıracağı görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E.,Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61 (2), 69-90.
2. Özmen, V. (2013) Türkiye'de Meme Kanseri. *Türkiye Klinikleri Genel Cerrahi Özel Dergisi*, 6 (2), 1-6.
3. Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G.,Caccuri, A.M. (2010) Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of biochemistry and biophysics*, 500 (2), 116-122.
4. Hayes, J.D., Flanagan, J.U.,Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.
5. Coles, B., Ketterer, B.,Hinson, J.A. (1990) The role of glutathione and glutathione transferases in chemical cardnogenesis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25 (1), 47-70.
6. Dinçer, Y.,Akçay, T. (2000) DNA hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (2), 73-79.
7. Dinçer, Y.,Kankaya, S. (2010) DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30 (4), 1365-1373.
8. Musdal, Y., Hegazy, U.M., Aksoy, Y.,Mannervik, B. (2013) FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Chemico-biological interactions*, 205 (1), 53-62.
9. Hanahan, D.,Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *cell*, 100 (1), 57-70.
10. Ruddon, R.W. (2007). *Cancer biology*: Oxford University Press.

11. Ringer, D.P., Schniper, L. (2000) Principles of cancer biology. *RC Bast, DW Kufe, RE Pollock, RR Weischselbaum, JF Holland & E. Frei, Cancer medicine. BC Decker Inc., Hamilton, Ontario.[Links]*, 25-30.
12. Croce, C.M. (2008) Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, 358 (5), 502-511.
13. Topuz, E., Aydiner, A., Karadag, A. (2000) Klinik Onkoloji Kitabı. *İstanbul. Tunç Matbaası. s. 35, 39.*
14. Kumar, C.S. (2007). Nanomaterials for cancer diagnosis (c. 3): Wiley-VCH Weinheim.
15. Curado, M.P., Cancer, I.A.f.R.o., Organization, W.H. (2008) Cancer incidence in five continents.
16. Weigel, M.T., Dowsett, M. (2010) Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-related cancer*, 17 (4), R245-R262.
17. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ağ Sitesi:
<http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-tedavisi.html>.
18. Meister, A., Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52 (1), 711-760.
19. Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27 (9), 916-921.
20. Josephy, P.D., Mannervik, B. (2006). Molecular toxicology: Oxford University Press.
21. Aksoy, Y. (2002) Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22 (4), 442-448.
22. Estrela, J.M., Ortega, A., Obrador, E. (2006) Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 43 (2), 143-181.

23. Tozkoparan, B.,Aytaç, S.P. (2007) Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar. *Hacettepe Üniv Eczacılık Fak Dergisi*, 27, 139-164.
24. Aksoy, Y. (2010) Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 30 (6), 2011-2016.
25. Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I.,Pearson, W.R. (2005) Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 1-8.
26. Townsend, D.M.,Tew, K.D. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22 (47), 7369-7375.
27. Tew, K.D. (1994) Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer research*, 54 (16), 4313-4320.
28. Schultz, M., Dutta, S.,Tew, K.D. (1997) Inhibitors of glutathione-*S*-transferases as therapeutic agents. *Advanced drug delivery reviews*, 26 (2), 91-104.
29. Cho, S.-G., Lee, Y.H., Park, H.-S., Ryoo, K., Kang, K.W., Park, J. ve diğerleri. (2001) Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (16), 12749-12755.
30. Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z.e.,Tew, K.D. (2001) Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (24), 20999-21003.
31. Mahajan, S.,Atkins, W. (2005) The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62 (11), 1221-1233.

32. Morgan, A.S., Tew, K.D., Kauvar, L.M., Ciaccio, F. (1996) Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 37 (4), 363-370.
33. Burg, D., Riepsaame, J., Pont, C., Mulder, G., van de Water, B. (2006) Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GST π function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. *Biochemical pharmacology*, 71 (3), 268-277.
34. Burg, D., Filippov, D.V., Hermanns, R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Mulder, G.J. (2002) Peptidomimetic glutathione analogues as novel gammaGT stable GST inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 10 (1), 195-205.
35. Ricci, G., De Maria, F., Antonini, G., Turella, P., Bullo, A., Stella, L. ve diğeri. (2005) 7-Nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole Derivatives, a New Class of Suicide Inhibitors for Glutathione S-Transferases MECHANISM OF ACTION OF POTENTIAL ANTICANCER DRUGS. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (28), 26397-26405.
36. Flatgaard, J.E., Bauer, K.E., Kauvar, L.M. (1993) Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 33 (1), 63-70.
37. Caccuri, A.M., Ascenzi, P., Antonini, G., Parker, M.W., Oakley, A.J., Chiessi, E. ve diğeri. (1996) 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. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (27), 16193-16198.
38. Rotili, D., De Luca, A., Tarantino, D., Pezzola, S., Forgione, M., della Rocca, B.M. ve diğeri. (2015) Synthesis and structure–activity relationship of new cytotoxic agents targeting human glutathione-S-transferases. *European journal of medicinal chemistry*, 89, 156-171.

39. Tew, K.D. (2007) Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Biochemical pharmacology*, 73 (9), 1257-1269.
40. Pellizzari Tregno, F., Sau, A., Pezzola, S., Geroni, C., Lapenta, C., Spada, M. ve diğerleri. (2009) In vitro and in vivo efficacy of 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *European journal of cancer*, 45 (14), 2606-2617.
41. Federici, L., Sterzo, C.L., Pezzola, S., Di Matteo, A., Scaloni, F., Federici, G. ve diğerleri. (2009) Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer research*, 69 (20), 8025-8034.
42. Asakura, T., Sasagawa, A., Takeuchi, H., Shibata, S.-i., Marushima, H., Mamori, S. ve diğerleri. (2007) Conformational change in the active center region of GST P1-1, due to binding of a synthetic conjugate of DXR with GSH, enhanced JNK-mediated apoptosis. *Apoptosis*, 12 (7), 1269-1280.
43. Woźniak, B., Woźniak, A., Kasprzak, H.A., Drewa, G., Mila-Kierzenkowska, C., Drewa, T. ve diğerleri. (2007) Lipid peroxidation and activity of some antioxidant enzymes in patients with glioblastoma and astrocytoma. *Journal of neuro-oncology*, 81 (1), 21-26.
44. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89 (3), 217-233.
45. Lanfer-Marquez, U.M., Barros, R., Sinnecker, P. (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38 (8), 885-891.

46. Marquez, U.M.L., Sinnecker, P. (2007). Chlorophylls: Properties, biosynthesis, degradation and functions: Taylor and Francis, Boca Raton.
47. Woo, L.L., Egner, P.A., Belanger, C.L., Wattanawaraporn, R., Trudel, L.J., Croy, R.G. ve diğerleri. (2011) Aflatoxin B1-DNA adduct formation and mutagenicity in livers of neonatal male and female B6C3F1 mice. *Toxicol Sci*, 122 (1), 38-44.
48. Dashwood, R., Negishi, T., Hayatsu, H., Breinholt, V., Hendricks, J., Bailey, G. (1998) Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B₁: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399 (2), 245-253.
49. Reddy, A.P., Harttig, U., Barth, M.C., Baird, W.M., Schimerlik, M., Hendricks, J.D. ve diğerleri. (1999) Inhibition of dibenzo [a, l] pyrene-induced multi-organ carcinogenesis by dietary chlorophyllin in rainbow trout. *Carcinogenesis*, 20 (10), 1919-1926.
50. Egner, P.A., Wang, J.-B., Zhu, Y.-R., Zhang, B.-C., Wu, Y., Zhang, Q.-N. ve diğerleri. (2001) Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin–DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (25), 14601-14606.
51. Lindahl, T. (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238 (3), 305-311.
52. Hussain, S.P., Harris, C.C. (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*, 58 (18).
53. Russo, I.H., Russo, J. (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives*, 104 (9), 938.

54. Hong, W.K., Sporn, M.B. (1997) Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278 (5340), 1073-1077.
55. Ip, C. (1996) Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 1 (1), 37-47.
56. Association, W.M. (2001) World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bulletin of the World Health Organization*, 79 (4), 373.
57. Ostling, O., Johanson, K. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123 (1), 291-298.
58. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175 (1), 184-191.
59. Baker, M.A., Cerniglia, G.J., Zaman, A. (1990) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical biochemistry*, 190 (2), 360-365.
60. Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, 27 (3), 502-522.
61. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Fanti, P., Rossi, R. (2013) Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature protocols*, 8 (9), 1660-1669.
62. Drabkin, D.L., Austin, J.H. (1935) Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 112 (1), 51-65.

63. Habig, W.H., Pabst, M.J.,Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249 (22), 7130-7139.
64. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1), 248-254.
65. Sigma Protein Assay, A.S.
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.pdf>
66. Russo, J., Wilgus, G.,Russo, I.H. (1979) Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis: I Differentiation of the mammary gland as determinant of tumor incidence and type of lesion. *The American journal of pathology*, 96 (3), 721.
67. Timberlake, C.,Henry, B. (1986) Plant pigments as natural food colours. *Endeavour*, 10 (1), 31-36.
68. Sato, M., Iguchi, N.,Murata, T. (1977) [Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. I. Effect on lipid peroxidation in rat liver homogenates in the presence of both Fe²⁺ and L-ascorbic acid (author's transl)]. *Yakugaku Zasshi*, 97 (3), 268-273.
69. Sato, M., Imai, K., Kimura, R.,Murata, T. (1986) Effect of Sodium Copper Chlorophyllin on Lipid Peroxidation. IX.: On the Antioxidative Components in Commercial Preparations of Sodium Copper Chlorohyllin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 34 (6), 2428-2434.
70. Kamat, J.P., Bloor, K.K.,Devasagayam, T.P. (2000) Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1487 (2), 113-127.

71. Bloor, K., Kamat, J., Devasagayam, T. (2000) Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against γ -radiation and photosensitization. *Toxicology*, 155 (1), 63-71.
72. Kumar, S.S., Chaubey, R., Devasagayam, T., Priyadarsini, K., Chauhan, P. (1999) Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism (s) of action. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 425 (1), 71-79.
73. Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D. ve diğeri. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO journal*, 18 (5), 1321-1334.
74. Reddy, M.V., Randerath, K. (1986) Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 7 (9), 1543-1551.
75. Atmaca, E., Aksoy, A. (2009) Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 79-83.
76. Shigenaga, M.K., Ames, B.N. (1991) Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 10 (3), 211-216.
77. Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26 (3), 249-261.
78. Green, M.H., Lowe, J.E., Delaney, C.A., Green, I.C. (1996) [23] Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods in enzymology*, 269, 243-266.
79. Olive, P.L., Banáth, J.P., Durand, R.E. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation research*, 122 (1), 86-94.

80. Durmaz, A., Dikmen, N., Gündüz, C. (2010) DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (Komet Yöntemi). *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19 (4).
81. Mills, B.J., Lindeman, R.D., Lang, C.A. (1981) Differences in blood glutathione levels of tumor-implanted or zinc-deficient rats. *J Nutr*, 111 (9), 1586-1592.
82. Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Lusini, L., Colombo, R. ve diğerleri. (2002) Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clinical chemistry*, 48 (5), 742-753.
83. Hercbergs, A., Brok-Simoni, F., Holtzman, F., Bar-Am, J., Brenner, H., Leith, J. (1992) Erythrocyte glutathione and tumour response to chemotherapy. *The Lancet*, 339 (8801), 1074-1076.
84. Dass, P.D., Bermes, E.W., Holmes, E.W. (1992) Renal and hepatic output of glutathione in plasma and whole blood. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1156 (1), 99-102.
85. Kannan, R., Garcia-Ruiz, C., Ookhtens, M., Yi, J.-R. (1996) GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 377, 267-273.
86. Prchal, J., Srivastava, S., Beutler, E. (1975) Active transport of GSSG from reconstituted erythrocyte ghosts. *Blood*, 46 (1), 111-117.
87. Morell, S., Ayers, V., Greenwalt, T., Hoffman, P. (1964) Thiols of the Erythrocyte I. Reaction of n-ethylmaleimide with intact erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 239 (8), 2696-2705.
88. Cengiz, M., Hacıhanefioğlu, S., Cenani, A. (1996) Glutathione and related enzymes in rat liver treated with methyl nitrosourea. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 7 (4), 341-346.
89. Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Raisuddin, S., Rao, A.R. (2003) Chemomodulatory influence of *Ferula asafoetida* on mammary epithelial differentiation, hepatic drug metabolizing enzymes,

antioxidant profiles and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats. *Breast cancer research and treatment*, 81 (1), 1-10.

90. Walbot, V., Mueller, L.A., Silady, R.A., Goodman, C.D. (2000) Do glutathione S-transferases act as enzymes or carrier proteins for their natural substrates. *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. Paul Haupt, Bern, Switzerland, 155.
91. Lederer, B., Böger, P. (2005) A ligand function of glutathione S-transferase. *Zeitschrift für Naturforschung 60c*, 166-171.
92. Lu, Y.P., Li, Z.S., Drozdowicz, Y.M., Hortensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P.A. (1998) AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell*, 10 (2), 267-282.
93. Lederer, B., Böger, P. (2003) Binding and protection of porphyrins by glutathione S-transferases of *Zea mays* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1621 (2), 226-233.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: 52338575 -147

2013

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

| | |
|---------------------------------|--|
| TOPLANTI TARİHİ | : 17.12.2013 (SALI) |
| TOPLANTI SAYISI | : 2013/10 |
| DOSYA KAYIT NUMARASI | : 2013/72 |
| KARAR NUMARASI | : 2013/72-10 |
| ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ | : Doç.Dr.Yasemin AKSOY |
| HAYVAN DENEYLERİNDE | |
| SORUMLU ARAŞTIRMACI | : Doç.Dr.Güneş ESENDAĞLI |
| YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR | : MSc.Deniz CEYHAN, Dr.Mojtaba BEYRAMZADEH |
| ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI | : 29 adet Sprague-Dawley Sıçan |

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Yasemin AKSOY'un araştırma yürütücüsü olduğu 2013/72 kayıt numaralı "*ChlorophyllideCu Kompleksinin GSTP1-1 İnhibitörü Olarak İncelenmesi ve Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı