

**4T1 MEME KANSERİ FARE MODELİNDE MMH-1'İN  
ANTI-KANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Şükrü AKMEŞE**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Elif GÜREL**

**İkinci Tez Danışmanı  
Doç. Dr. İsmail KOYUNCU**

**Doktora Tezi – 2022**

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

**4T1 MEME KANSERİ FARE MODELİNDE MMH-1'İN  
ANTİ-KANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Şükrü AKMEŞE**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Elif GÜREL**

**İkinci Tez Danışmanı  
Doç. Dr. İsmail KOYUNCU**

Bu Araştırma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından 21010 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2022**

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne**

**ETİK BEYANI**

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Elif GÜREL ve Doç. Dr. İsmail KOYUNCU” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “4T1 Meme Kanseri Fare Modelinde MMH-1’in Anti-Kanser Etkisinin Araştırılması ” başlıklı Doktora tez için elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

...../...../20...

Şükrü AKMEŞE

# İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET .....   | vii  |
| ABSTRACT.....  | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                     | ix   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                    | x    |
| TABLolar DİZİNİ .....                                    | xii  |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                  | 3    |
| 2.1. Kanser .....  | 3    |
| 2.1.1. Kanser Hücresinin Özellikleri .....               | 3    |
| 2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser .....                     | 6    |
| 2.2. Meme Kanseri.....                                   | 7    |
| 2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi .....                | 7    |
| 2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....                 | 9    |
| 2.2.3. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması..... | 11   |
| 2.2.4. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması ..... | 12   |
| 2.2.5. Meme Kanserinde Tanı.....                         | 13   |
| 2.2.6. Meme Kanseri Tedavisi .....                       | 14   |
| 2.3. Tümör Mikroçevresi .....                            | 16   |
| 2.3.1. Hipoksi.....                                      | 17   |
| 2.3.2. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör.....            | 18   |
| 2.4. Apoptoz.....  | 22   |
| 2.4.1. Apoptozun Mekanizmaları .....                     | 23   |
| 2.4.2. Kaspaz Ailesi .....                               | 26   |
| 2.4.3. Kanserde Apoptoz.....                             | 27   |
| 2.5. Karbonik Anhidraz Enzimi .....                      | 28   |

|  |    |
|--|----|
| 2.5.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması .....             | 28 |
| 2.5.2. Karbonik Anhidraz İzofomları .....                                  | 29 |
| 2.5.3. Karbonik Anhidrazlar için Terapötik Hedefler.....                   | 34 |
| 2.6. Sülfonamidler.....  | 35 |
| 2.6.1. Sentezlenen Sülfonamid Türevi.....                                  | 38 |
| 2.7. Metabolomik.....  | 39 |
| 2.7.1. Kanserde Metabolomik.....   | 40 |
| 3. MATERYAL VE METOT .....   | 43 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....                     | 43 |
| 3.2. Çalışmanın Planlanması.....   | 43 |
| 3.2.1. Moleküler Docking .....   | 44 |
| 3.2.2. 4T1 Tümör Hücre Kültürlerinin in vitro Olarak Sürdürülmesi .....    | 44 |
| 3.2.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....                | 44 |
| 3.2.4. Akridin Oranj /Ethidium Bromide Boyaması.....                       | 45 |
| 3.2.5. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi ..... | 45 |
| 3.2.6. Farelere 4T1 Tümör Hücre Enjeksiyonu.....                           | 45 |
| 3.2.7. Grupların Oluşturulması .....                                       | 46 |
| 3.2.8. Letal Doz Çalışması.....  | 47 |
| 3.2.9. Farelerin Bakımı ve Tümör Takibi .....                              | 47 |
| 3.2.10. Tümör ve Kan Örneklerinin Alınması .....                           | 48 |
| 3.2.11. ELISA Analizleri .....   | 50 |
| 3.2.12. Real Time PCR .....  | 51 |
| 3.2.13. Histopatolojik İnceleme .....                                      | 53 |
| 3.2.14. Metabolomik Analizler .....  | 54 |
| 3.3. İstatiksel Analiz .....   | 55 |
| 4. BULGULAR.....   | 56 |
| 4.1. İn Vitro Çalışma Sonuçları .....                                      | 56 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.1.1. Moleküler Docking Sonuçları.....                                    | 56  |
| 4.1.2. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....                | 57  |
| 4.1.3. Akridin Oranj /Ethidium Bromide (AO/EtBr) Boyaması.....             | 58  |
| 4.1.4. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi ..... | 58  |
| 4.2. İn Vivo Çalışma Sonuçları.....  | 59  |
| 4.2.1. Tümör Hacmi.....  | 59  |
| 4.2.2. ELISA ve PCR Analiz Sonuçları.....                                  | 61  |
| 4.2.3. Histopatolojik İnceleme .....                                       | 63  |
| 4.2.4. Metabolomik Analiz Sonuçları.....                                   | 67  |
| 5. TARTIŞMA .....  | 76  |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....  | 84  |
| KAYNAKLAR .....  | 85  |
| EKLER.....   | 100 |
| EK-1. Özgeçmiş.....  | 100 |
| EK-2. Etik Kurul Belgesi.....  | 101 |

## TEŐEKKÜR

Doktora süreci boyunca bilgi ve deneyimleri ile beni destekleyen danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Elif GÜREL ve Doç. Dr. İsmail KOYUNCU 'ya, deneysel analizlerde çalışmama katkı sağlayan Dr. Ebru TEMİZ' e ve histopatolojik analizlerde yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Muhammet Emin GÜLDÜR' e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan babam Veysi AKMEŞE' ye, annem Türkan AKMEŞE' ye, kardeşlerim BahtiŐen ve BüŐra AKMEŞE' ye ve doktora süreci boyunca sabrı ile beni destekleyen eŐim Emine AKMEŞE' ye ve canım evlatlarım Muhammed Aras ve Veysi Asaf AKMEŞE' ye sonsuz teşekkürler.

Şükrü AKMEŞE

## ÖZET

### 4T1 Meme Kanseri Fare Modelinde MMH-1'in Anti-Kanser Etkisinin Araştırılması

**Amaç:** Kanser hücrelerinin büyüüp gelişmesine, hayatta kalmasına, invazyonuna ve metastazına CA IX enziminin destekleyici rolleri bulunur. Sülfonamidlerin bu enzim üzerine inhibitör etki gösterdiği ve kanser tedavisine katkı sağlayabileceği bildirilmektedir. Bu çalışmada sülfonamid türevi olan MMH-1 maddesinin hem in vitro hem de in vivo ortamda meme kanseri üzerine olan etkisini sitotoksik, metabolik ve moleküler düzeyde açıklamayı amaçladık.

**Materyal ve Metot:** CA IX üzerine MMH-1'in inhibitör etkisi Moleküler Docking yöntemiyle incelendikten sonra çalışmanın in vitro kısmına geçildi. 4T1 hücreleri üzerine MMH-1'in sitotoksik etkileri MTT yöntemi belirlendi. Apoptotik etkileri AO/EtBr boyama ve Annexin-V ile flow sitometrik olarak analiz edildi. İn vivo kısmında tümör dokularında CA IX, Vimentin, E-Cadherin ve Kaspaz 3'ün hem protein hem de gen ekspresyonları analiz edildi ve histopatolojik inceleme yapıldı. Ayrıca kan numuneleri ile de metabolomik analiz gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Moleküler Docking sonuçları MMH-1'in CA IX ile bağlanma afinitesi ve modlarına sahip olduğunu gösterdi. MMH-1'in in vitro ve in vivo şartlarda apoptozu tetiklediği görüldü. Tümör hacimlerinin azalmasında ve kanser hücrelerinin ölümünde MMH-1'in etkili olduğunu histopatolojik sonuçlar da destekledi. Ayrıca kanserin neden olduğu metabolomik değişimlerin azalmasında da başarılı sonuçlar gösterdi.

**Sonuç:** Bu bulgular MMH-1 maddesinin CA IX üzerine inhibitör etkisi olduğunu ve apoptozu tetikleyerek kanser hücrelerini öldürdüğünü gösterdi. MMH-1'in farklı dozları ve farklı kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımı meme kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik aday olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Meme Kanseri, MMH-1, Sülfonamid, Kanser Modeli



## ABSTRACT

### Investigation of the Anti-Cancer Effect of MMH-1 in the 4T1 Breast Cancer Mouse Model

**Aim:** CA IX enzyme has supportive roles in the growth, development, survival, invasion and metastasis of cancer cells. Sulfonamides have an inhibitory effect on this enzyme and may contribute to cancer treatment. In this study, we aimed to explain the effect of MMH-1, a sulfonamide derivative, on breast cancer both in vitro and in vivo, in cytotoxic, metabolic and molecular levels.

**Material and Method:** After examining the inhibitory effect of MMH-1 on CA IX with Molecular Docking, in vitro part of the study was started. The cytotoxic effects of MMH-1 on 4T1 cells were determined by the MTT. Apoptotic effects were analyzed by AO/EtBr staining and Annexin-V. In the in vivo part, both protein and gene expressions of CA IX, Vimentin, E-Cadherin and Caspase 3 in tumor tissues were analyzed and histopathological examination was performed. Also, metabolomic analysis was performed with blood samples.

**Results:** Molecular Docking results showed that MMH-1 has binding affinity and modes with CA IX. It was observed that MMH-1 triggered apoptosis in vitro and in vivo. Histopathological results also supported that MMH-1 was effective in the reduction of tumor volumes and the death of cancer cells. It also showed successful results in reducing the metabolomic changes caused by cancer.

**Conclusion:** These findings showed that MMH-1 has an inhibitory effect on CA IX and kills cancer cells by triggering apoptosis. Different doses of MMH-1 and its combined use with different chemotherapeutic agents can be used as potential therapeutic candidate in the treatment of breast cancer.

**Keywords:** Apoptosis, Breast Cancer, Cancer Model, MMH-1, Sulfonamide

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>5-FU</b>                        | : 5-Fluorourasil   |
| <b>ATP</b>                         | : Adenozin Trifosfat                                       |
| <b>AR</b>                          | : Ara Filament   |
| <b>CA</b>                          | : Karbonik Anhidraz  |
| <b>CA IX</b>                       | : Karbonik Anhidraz 9                                      |
| <b>CO<sub>2</sub></b>              | : Karbondioksit  |
| <b>DD</b>                          | : Ölüm Alanı   |
| <b>DMSO</b>                        | : Dimetil Sülfoksit  |
| <b>DNA</b>                         | : Deoksiribo Nükleik Asit                                  |
| <b>EMT</b>                         | : Epitelyal-Mezankimal Geçiş                               |
| <b>ER</b>                          | : Östrojen Reseptörü                                       |
| <b>ESM</b>                         | : Ekstraselüler Matriks                                    |
| <b>FADD</b>                        | : FAS ile İlişkili Ölüm Alanı                              |
| <b>FDA</b>                         | : Food and Drug Administration                             |
| <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> | : Bikarbonat   |
| <b>HER2</b>                        | : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2                         |
| <b>HIF</b>                         | : Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör                        |
| <b>HRE</b>                         | : Hipoksiye Yanıt Veren Element                            |
| <b>HRT</b>                         | : Hormon Replasman Tedavisi                                |
| <b>LC-MS/MS</b>                    | : Sıvı kromatografi/kütle spektrometresi                   |
| <b>MMH-1</b>                       | : 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenil) propanamid-1                |
| <b>MTT</b>                         | : 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| <b>PR</b>                          | : Progesteron Reseptörü                                    |
| <b>TMÇ</b>                         | : Tümör Mikroçevre   |
| <b>TNF</b>                         | : Tümör Nekroz Faktör                                      |
| <b>TP53</b>                        | : Tümör Protein 53   |
| <b>VHL</b>                         | : Von Hippel-Lindau proteini                               |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>             | : Çinko  |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil No</u>   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 2. 1. 2020'deki yeni vaka sayısı (A), 2020'deki ölüm sayısı (B).....          | 8               |
| Şekil 2. 2. 2020'de her iki cinsteki yeni vaka sayısı (A), sadece kadınlar (B)..... | 8               |
| Şekil 2. 3. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırılması .....          | 12              |
| Şekil 2. 4. Hipoksik bir tümör kütesinin özellikleri .....                          | 18              |
| Şekil 2. 5. HIF ile indüklenen gen ürünleri ve işlevleri.....                       | 19              |
| Şekil 2. 6. HIF-1 ile pH, glukoz ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi .....      | 21              |
| Şekil 2. 7. Apoptozun temel mekanizmaları.....                                      | 23              |
| Şekil 2. 8. İçsel ve dışsal apoptotik ölüm yolları.....                             | 25              |
| Şekil 2. 9. Bcl-2 aile üyeleri ile apoptozun düzenlenmesi.....                      | 25              |
| Şekil 2. 10. Kaspazların etki alanı yapısı.....                                     | 26              |
| Şekil 2. 11. Karbonik anhidraz enziminin fonksiyonu .....                           | 28              |
| Şekil 2. 12. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması .....                | 29              |
| Şekil 2. 13. Karbonik anhidrazın izoformları ve aktiviteleri .....                  | 30              |
| Şekil 2. 14. CA IX proteininin alan organizasyonu.....                              | 31              |
| Şekil 2. 15. HIF transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği gen ekspresyonları.....  | 32              |
| Şekil 2. 16. CA IX'un kanser ilerlemesinde çeşitli basamaklarına katılımı .....     | 33              |
| Şekil 2. 17. Sülfonamidlerin genel yapısı (R=R1=H ise).....                         | 36              |
| Şekil 2. 18. Klinikte sıklıkla kullanılan CA inhibitörleri .....                    | 37              |
| Şekil 2. 19. MMH-1 bileşiğinin sentezi ve yapısı. ....                              | 38              |
| Şekil 3. 1. Farelere 4T1 hücrelerinin enjeksiyonu.....                              | 46              |
| Şekil 3. 2. Letal doz hesaplama formülü. ....                                       | 47              |
| Şekil 3. 3. Tümör oluşumu. ....   | 48              |
| Şekil 3. 4. Tümör hacimlerinin hesaplanması ve vernier caliper. ....                | 48              |
| Şekil 3. 5. Kan örneklerinin alınması. ....   | 49              |
| Şekil 3. 6. Tümör dokularının alınması. ....  | 49              |
| Şekil 4. 1. Moleküler Docking sonuçları. ....                                       | 56              |
| Şekil 4. 2. MMH-1, 5-Fu ve SLC-0111 bileşiklerinin IC50 değerleri. ....             | 57              |
| Şekil 4. 3. AO/EtBr boyama sonuçları. ....  | 58              |
| Şekil 4. 4. Apoptotik hücrelerin yüzde oran grafiği. ....                           | 59              |
| Şekil 4. 5. Farelerden çıkarılan tümör doku örnekleri. ....                         | 60              |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 4. 6. Tümör hacimlerinin günlere göre değişimi. ....                          | 60 |
| Şekil 4. 7. ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile vimentin analiz sonuçları.....      | 61 |
| Şekil 4. 8. ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile E-Cadherin analiz sonuçları. ....   | 62 |
| Şekil 4. 9. ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile CA IX analiz sonuçları. ....        | 62 |
| Şekil 4. 10. ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile Kaspaz 3 analiz sonuçları. ....    | 63 |
| Şekil 4. 11. Kontrol grubu meme dokusunda HE boyama (X200).....                     | 64 |
| Şekil 4. 12. DMSO grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).....                       | 64 |
| Şekil 4. 13. MMH-1 (50mg) grubu tümör dokusunda HE boyama (X200). ....              | 65 |
| Şekil 4. 14. MMH-1 (100mg) grubu tümör dokusunda HE boyama (X200). ....             | 65 |
| Şekil 4. 15. 5-FU grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).....                       | 66 |
| Şekil 4. 16. 5-FU + MMH-1 (50mg) grubu tümör dokusunda HE boyama (X200). ....       | 66 |
| Şekil 4. 17. Grupların serum karnitin seviyeleri.....                               | 67 |
| Şekil 4. 18. PLS-DA'nın iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) skor grafikleri.....      | 70 |
| Şekil 4. 19. Önemli karnitinleri gösteren VIP grafiği.....                          | 71 |
| Şekil 4. 20. Gruplardaki karnitinlerin yoğunluklarını gösteren ısı haritası. ....   | 71 |
| Şekil 4. 21. Grupların serum amino asit seviyeleri.....                             | 72 |
| Şekil 4. 22. PLS-DA'nın iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) skor grafikleri.....      | 74 |
| Şekil 4. 23. Önemli amino asitleri gösteren VIP grafiği. ....                       | 75 |
| Şekil 4. 24. Gruplardaki amino asitlerin yoğunluklarını gösteren ısı haritası. .... | 75 |

## TABLULAR DİZİNİ

| <b>Tablo No</b>  | <b>Sayfa No</b> |
|--|-----------------|
| <b>Tablo 2. 1.</b> CA izoformları için çeşitli hastalıklardaki ilaç hedefleri.....         | 35              |
| <b>Tablo 3. 1.</b> Çalışmada kullanılan araç ve gereçler. ....                             | 43              |
| <b>Tablo 3. 2.</b> Grupların oluşturulması ve etken maddelerin doz ve veriliş yolları..... | 47              |
| <b>Tablo 3. 3.</b> Gen Primer dizileri (Mus musculus).....                                 | 52              |
| <b>Tablo 3. 4.</b> qPCR karışımı.....  | 52              |
| <b>Tablo 3. 5.</b> qPCR Tepkime koşulları.....   | 53              |
| <b>Tablo 3. 6.</b> Parafin doku takip yöntemi protokolleri.....                            | 53              |
| <b>Tablo 3. 7.</b> Hematoksilen-Eozin boyama protokolleri.....                             | 54              |
| <b>Tablo 4. 1.</b> CA IX proteininde MMH-1'in in silico sonuçları. ....                    | 56              |
| <b>Tablo 4. 2.</b> Grupların serum karnitin kompozisyonunun kantitatif analizi.....        | 68              |
| <b>Tablo 4. 3.</b> Grupların serum amino asit kompozisyonunun kantitatif analizi.....      | 73              |

# 1. GİRİŞ

Kanser 21.yüzyılda dünya genelinde ölüm nedenlerinin başında gelmekte ve yaşam süresinin artmasının önündeki önemli engellerden biridir. Kanser insidansı ve mortalitesi küresel olarak hızla artmakta ve sosyoekonomik gelişmelerle ilişkili olan risk faktörleri prevalans ve dağılım üzerinde değişiklikler oluşturmaktadır (1). Dünya genelinde 2020 yılında vaka sayısı olarak sırasıyla meme, akciğer, kolorektum, prostat ve mide kanserleri en çok görülen kanser türleridir. Meme kanseri vaka sayısı olarak birinci, kansere bağlı ölüm de ise tüm kanser türleri arasında beşinci sırada yer almaktadır (2). Meme kanseri kadınlarda en sık görülen heterojen malignitedir ve nadir olarak erkeklerde de görülebilmektedir. Gelişen teknoloji ve yapılan birçok araştırma ile son 10-15 yılda meme kanserinin tedavisinde başarılı adımlar atıldı. Ancak meme kanserinin çeşitli alt tiplerinin olması, metastazlar, sağlıklı dokular üzerine sitotoksikite, tedaviye karşı gelişen direnç ve nüks gibi problemlerden dolayı terapötik başarısızlıklar devam etmektedir (3). Bilim insanları bu gibi başarısızlıklardan dolayı kanser hücrelerine odaklanarak tümörün gelişmesi ve büyümesindeki mekanizmaları aydınlatıp fonksiyonel tedaviler geliştirmek için çalışmaktadır. Son araştırmalarda tümör mikroçevresi (TMC) potansiyel olarak yeni tedavilerin geliştirilmesinde verimli bir zemin olduğuna dair kanıtlar sağlamaktadır (4).

TMC kanser hücrelerini, stromal dokuyu (fibroblastlar, miyoblastlar, bağışıklık hücreleri ve vasküler doku) ve hücre dışı matrisi içine alan dinamik bir ağdır (5). Kanser hücrelerini çevreleyen bu ortamın düşük pH, yetersiz besin maddeleri ve hipoksik özellikler gösterdiği araştırmalar tarafından bildirilmektedir. Hızla çoğalan kanser hücrelerinin yaşamla bağdaşmayan bu mikroçevreye uyum sağlayarak canlılıklarını sürdürebilecek yollar geliştirmektedir. Örnek olarak hipoksik ortamda kanser hücreleri yaşamlarını sürdürebilmek için aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya dönüşüm sağlamaktadır (5, 6). Hipoksi durumunda aktivitesi artan hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) bu dönüşümden sorumlu olan genlerin transkripsiyonu desteklemektedir (7). Bu genlerin aktivasyonu hücre proliferasyonu, ilaç direnci, metastaz, anjiyogenez ve pH regülasyonu ile kanserin gelişip ilerleyebilmesini sağlamaktadır. Asidik mikroçevrede kanser hücreleri hayatta kalabilmek için fizyolojik seviyelere yakın hücre içi pH'ı sürdürmelidir. Bu nedenle karbonik anhidraz (CA) enzim aktivitesi bu düzenleyici süreçte anahtar role sahiptir (8).

CA'lar karbondioksitin bikarbonat ve bir protona geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize ederek alkali hücre içi pH'ın korunmasını sağlayan çinko ( $Zn^{+2}$ ) içeren metalloenzim ailesidir. Bu hücre içi alkalinizasyon kanser hücresinin büyümesine ve hayatta kalmasını sağlar. Bu ailenin birçok izoformu bulunmasına rağmen meme kanseri dahil birçok kanserde HIF-1'in aktivasyonun bir sonucu olarak bu izoformlardan karbonik anhidraz 9'un (CA IX) yüksek miktarlarda eksprese edildiği bilinmektedir (9, 10). CA IX'un hücre membranının dış yüzeyinde bulunduğundan küçük molekül inhibitörleri tarafında etkin hedefleme sağlaması, pH regülasyonu gibi hayati fonksiyonlara ek olarak kanser hücrelerinin metastaz, adhezyon/migrasyonunu sağlaması ve normal dokularda sınırlı miktarda eksprese olurken tümör dokusunda yüksek miktarda eksprese olması gibi nedenlerden dolayı kanser tedavisi için çekici bir hedef haline gelmiştir (11). CA enziminin aktif katalitik  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlanan sülfonamidler CA üzerine inhibitör etki göstereceği bildirildiğinden beri bilim insanları CA IX'un inhibisyonunda kullanılabilecek birçok türev sülfonamid sentezleyip araştırmışlardır (12).

Sülfonamidlerin ana yapısını bir benzol halkasına para durumunda bağlı olan bir amino ( $NH_2$ ) grubu ve bir deamido grubu ( $-SO_2NHR$ ) belirler. Sülfonamid grubu ilaçlar glokom, tiroit ve diyabet tedavilerinde uzun süredir kullanılmakta ve CA IX'a inhibitör etkisi bilindikten sonra kanser tedavisi için popüler hale gelmiştir (13, 14). Son zamanlarda sülfonamid türevlerinden bazıları T hücreli lenfoma, kronik lenfosittik lösemi ve akut lösemi tedavisi için FDA ( Food and Drug Administration) tarafından onay almıştır ve birkaç sülfonamidin de faz çalışmaları çeşitli kanser türlerinde devam etmektedir (15).

Bu çalışmada sentezlediğimiz sülfonamid türevi olan 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenil) propanamid-1 (MMH-1 ya da MMH-I) maddesinin meme kanseri hücreleri üzerine muhtemel sitotoksik etkilerini ortaya koyarak hücre ölüm yollarını (Apoptoz veya Nekroz) ve CA IX üzerine inhibitör etkisi ile tümörün büyümesini ve ilerlemesini nasıl etkileyebileceğini belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmanın sonucunda MMH-1 maddesinin potansiyel bir anti-kanser etkisinin olup olmadığı konusunda ilk prelinik bilgiler elde edildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücre ölümü ve hücre proliferasyonu arasında dengenin bozulması sonucunda anormal hücre büyümesi ile karakterize bir hastalıktır. Gen ekspresyonundaki çoklu değişikliklerin neden olduğu bu durum kanser hücrelerinin komşu dokulara ve uzak bölgelere metastaz yapmasına olanak sağlamaktadır. Önemli bir morbiditeye ve tedavi edilmemesi durumunda mortaliteye neden olan bu hastalık dünya çapında görülmektedir (16). Kanser yüzyıllar öncesine kadar uzanan ve bilinen en eski kayıtları ise M.Ö. 3000 yılına dayanmaktadır. Hipokrat kanser terimini ilk defa M.Ö. 460-337 yılları arasında karkinos ya da karkinoma, Galen ise kanser olarak adlandırmışlardır (17).

Tümör anormal hücre kitlesinin vücuttaki birikimi olarak adlandırılır ve iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere ikiye ayrılır. İyi huylu tümörler, birincil konumlarında kalarak vücudun diğer bölgelerini istila etmezler ve vücudun uzak bölgelerine yayılmazlar. Bu tümörler yavaş büyüme eğilimindedir ve sınırları belirgindir. Kötü huylu tümörler, lokal olarak ve/veya uzak bölgelere yayılan ve kontrolsüz büyüyen hücrelere sahiptir. Lenf veya kan dolaşımı ile vücudun uzak bölgelerine yayılırlar (18). Kanser hücrelerinin gelişip büyüebilmeleri için normal hücrelerden ayıran özellikler kazanırlar.

#### 2.1.1. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanserin normal hücrelerden farkları ve tanımlayıcı özellikleri kanser biyolojisini anlamak için bilgiler sunmaktadır. Kanserin 6 ayırt edici özelliği kanser biyolojisinin anlaşılmasında temel bilgiler sağlamaktadır (19).

#### Proliferatif Sinyalleşmeyi Sürdürmek

Kanser hücrelerinin sürekli çoğalma özellikleri en önemli yeteneklerinden biridir. Normal dokular hücre sayısını bir dengede tutup fonksiyon ve yapı bütünlüğünü korumaktadır. Hücre büyümesi ve bölünme döngüsünü düzenleyen sinyallerin varlığı normal dokularda kontrol altındadır ama kanser dokularında bu sinyaller kontrolden çıkmaktadır. Hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili büyüme faktörleri, etkinleştirme



sinyallerini taşıyıp intrasellüler sinyal yolları ile sinyallerin yayılmasını sağlamaktadır. Bu sayede hücre büyümesi, enerji metabolizması ve hücrenin hayatta kalması gibi biyolojik özellikleri etkilemektedir (19).

Kanser hücrelerinde proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmenin temel mekanizması genlerin mutasyonel değişimleridir. Proliferasyonu uyaran sinyallerin sürekli hale gelmesini sağlayan bu mutasyona uğramış genler onkogenler olarak adlandırılmaktadır. Bu genlerin kodladığı proteinler normal hücrelere kıyasla sayısal, işlevsel ve yapısal olarak farklılıklar göstermektedir. Ayrıca kanser hücreleri büyüme faktörü ligandlarını ve aynı kökenli reseptörlerini sentezleyip alternatif sinyalleşme yeteneği elde edebilirler. Bu sayede otokrin proliferatif uyarma sağlamaktadır (19, 20).

### **Büyüme Engelleme Faktörlerinden Kaçınmak**

Normal hücrelerde hücre bölünme döngüsünü başlatan ve bloke eden mekanizmalar bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genler bu bloke mekanizmasındaki proteinleri kodlayan genlerdir (20).

Retinoblastoma protein (RP), hücre içi ve hücre dışı yollardan gelen sinyallerin uyumunu sağlayarak hücrenin bölünme ve büyüme aşamalarından geçiş geçmeyeceğinin kararını vermektedir. RP'in işlevindeki kusur veya yokluk kanser hücrelerinde kalıcı çoğalmaya izin veren döngünün ilerlemesine izin vermektedir. RB, hücre dışından gelen büyüme inhibisyon sinyallerini aktarırken tümör protein 53 (TP53) ise hücre içinden anormallik ve stres yollarından girdileri almaktadır. Genomdaki hasarın derecesi fazla ve nükleotid havuzlarının seviyeleri yetersiz ise ayrıca oksijenasyon, büyüme sinyalleri ve glukoz az ise TP53 bu koşullarda hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyebilir. Hücresel sistemde onarılmaz veya çok büyük hata durumunda TP53 alternatif olarak apoptozu tetikleyebilir (19, 20). Tümör baskılayıcı genlerin etkisizleşmesi ve büyümeye izin veren onkogenlerin aktivasyonu kanser gelişimi için temel mekanizmalardır (21).

### **Hücre Ölümüne Direnmek**

KontROLSÜZ proliferasyona ve onarılmaz deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarına yanıt olarak hücre ölümü devreye girmektedir. Normal dokularda hücre ölümü ve çoğalması bir denge içerisinde olmasına rağmen kanserli dokularda bu denge bozulmaktadır. Bu dengenin sürdürülmesini sağlayan yollardan biri apoptozdur. Apoptoz

yolaklarında aktifleşen kaspaz enzimleri hücrel proteinleri parçalayarak kısa bir süre içerisinde hücre ölümü görevini yerine getirmektedir. Çeşitli yollarla kanser hücreleri apoptozdan kaçabilir. TP53 gibi genlerin mutasyonları hücrede apoptoza başlatan uyarılara karşı duyarsız hale getirir. Ayrıca membran geçirgenliğinin bozulması kaspaz aktivasyonunu inhibe etmektedir. Bu değişiklikler tümörün hayatta kalmasını sağlamasına rağmen tümör içindeki tüm hücreler hücre ölümünden kaçamazlar. Tüm hücrelerde apoptozdan kaçış olsaydı tümör boyutları anormal boyutlara ulaşırdı ve kanser tedavilerinde kullanılan ajanların çoğu işe yaramaz hale gelirdi (21).

Hücre ölümü ile çoğalma arasında dengeyi sağlayan yollardan biri de gereksiz ya da işlevsel proteinlerin, organellerin ve otofagozomlardaki yabancı maddelerin bozulmasından sorumlu katabolik bir işlem olan otofajidir. Otofaji hipoksi, patojen, büyüme faktörü yoksunluğu ve açlık gibi içsel ve dışsal uyarıların etkisiyle hücrenin homeostazisini düzenler. Otofajik işlev bozukluğunun kanser gelişiminde önemli bir rolü bulunmaktadır. Tümör oluşumunun otofajiyi baskılandığı mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır ancak aşırı eksprese olan proteinlerin bozulması, hasarlı mitokondrinin kaldırılması ile reaktif oksijen türlerinin yükünün azalması ve kanserojen virüslere ve bakterileri karşı savunma gibi mekanizmalar bilinmektedir (21, 22).

### **Anjiyogenez**

Damarlardan endotel hücrelerinin filizlenmesi, göçü, bölünmesi ve birleştirilmesi sürecine anjiyogenez denir. Embriyogenez döneminde damarsal ağların genişlemesi ve yeniden şekillenmesi söz konusudur ve doğum sonrası olayların, dişi üreme döngüsü ve yara iyileşmesi gibi olayların bir parçasıdır. Sürecin sürekli aktif olduğu malignitelerden hariç anjiyogenez durur. Proanjiyogenik denge lehine süreç yöneldiğinde anjiyogenez tekrar aktif olur. Çoğu katı tümörün ayırt edici özelliklerinde biri kronik anjiyogenez olmasına rağmen bazı durumlarda kanser normal dokunun damarlanmasını da kullanabilmektedir. Ancak tümörlerin büyümeleri önemli ölçüde kronik anjiyogeneze dayanmaktadır (20, 21).

### **İnvazyon ve Metastaz**

Kanserler kötü huylu bir duruma ilerledikçe çevredeki dokuyu istila etme ve lenfatik veya kan damarları yoluyla metastaz tohumlama yeteneğine ulaşırlar. Epitel

dokulardan kaynaklanan karsinomların invazyon ve metastaz ile malignite derecelerinin artması kanser hücrelerinin şekillerinde ve hücre dışı matrikste/diğer hücrelere bağlanmalarında değişimler oluşturmaktadır. Bu değişimler içinde en iyi karakterize olan E-Cadherin, bitişik epitel hücrelerle yapışık bağlantılar kurarak epitel hücre tabakalarının birleştirilmesine katkı sağlamaktadır. Artan E-Cadherin ekspresyonu invazyon ve metastazın bir antagonisti olarak şekillenmektedir. Karsinomlarda aşağı regüle olan E-Cadherin önemli bir ayırt edici özelliktir (19, 23).

### **Replikatif Ölümsüzlüğü Etkinleştirme**

Memeli kromozomlarının yapısının ayrılmaz bir yapı taşı olan telomer kronik bölünmeye karşı bir engel oluşturur. Ayrıca her hücre bölünmesinde uzunlukları kısılır ve hücre nesillerinin sayısını kaydederek. Telomer tekrarları belirli bir eşiğin altına indiğinde hücre döngüsünün durmasına ya da TP53 aracılığıyla apoptoza neden olmaktadır. Kanser hücreleri telomer uzaması ve bakımı için bir sistemin aktivasyonu ile telomer disfonksiyonu ve kısalmasının oluşturduğu proliferatif engeli atlatır. Bu sistem, telomer uzatıcı enzim olan telomerazın ekspresyonunu oluşturur. Böylece kanser hücreleri kısalmış telomerlerini koruyarak hücre ölümü olarak adlandırılan sürekli çoğalma yeteneği kazanırlar (20).

#### **2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser**

Birçok önemli özellik bakımından kanser hücreleri normal hücrelerden farklıdır. Replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme, invazyon ve metastaz, anjiyogenez, hücre ölümüne direnme ve büyüme engelleyici faktörlerden kaçınma bu farklılıklar arasında bulunmaktadır. Genlerin ekspresyonunda mutasyonlar ve epigenetik anormallikler tümörjenez için gerekli olduğu bilinmektedir. Bu genlerin önemli bir kısmı hücre döngüsündeki olayların sıralanmasını ve DNA tamiri ile hücre döngüsünün ilerlemesini entegre eden fonksiyonları bulunmaktadır (24).

Hücre döngüsü DNA bütünlüğünü, hücre boyutunu ve hücre içi/dışı büyüme sinyallerini değerlendiren birçok kontrol noktaları içeren iyi düzenlenmiş bir süreçtir. Dört farklı aşamadan oluşan somatik hücre döngüsünün iki aşamasında genetik materyalin kopyasının üretilmesi (S fazı) ve hücre elemanlarının iki yavru hücreye bölünmesi (M fazı) gibi temel olaylar bulunmaktadır. Diğer iki aşaması ise S ve M

fazlarının başarıyla tamamlanması için kendilerini hazırladığı boşluk dönemleridir (G1 ve G2). Hücrede mitojenik sinyalleşmesinin olmaması ve antimitojenik sinyaller nedeniyle bölünme durduğunda hücre döngüden çıkar ve durgun bir döneme girmiş olur (G0). G1 ve G2 aşamalarındaki kontrol noktaları hücre döngüsünü, DNA bütünlüğünü ve büyüme sinyalleri değerlendirir ve döngüyü durdurur. Hücre döngüsünün düzenleyicilerindeki mutasyonlar tümörlerin moleküler analizinde gösterilmiştir. Kanserin önlenmesinde hücre döngüsünün olması gerektiği gibi sürdürülmesinin önemli olduğu anlaşılmıştır (25).

DNA'larında hasar oluşan hücreler kontrol noktaları tarafından G fazından S ve M fazına geçişleri engellenir. Hücre döngüsünde kanserin meydana gelmesinde doğrudan/dolaylı etkileri olan onkogenler ve kanserin gelişimini baskılayan tümör baskılayıcı genlerin rolleri bulunmaktadır. DNA hasarı olan normal hücrelerde hücre döngüsü G fazında inhibe olur ve tamir için zaman kazanılmış olur. Normal şartlarda aktif olmayan TP53 proteini DNA hasarı oluştuğunda aktif duruma geçer. Aktif olan TP53 geni G1 fazında hücre döngüsünü durdurur. DNA tamir edilemiyorsa hücre ölümü olan apoptozise gider. Kanserlerin büyük bir kısmında TP53 mutasyonları görülmektedir. Onkogenlerin ekspresyonlarındaki ve yapılarındaki değişimler kanserlerin oluşumuna neden olmaktadır (26, 27).

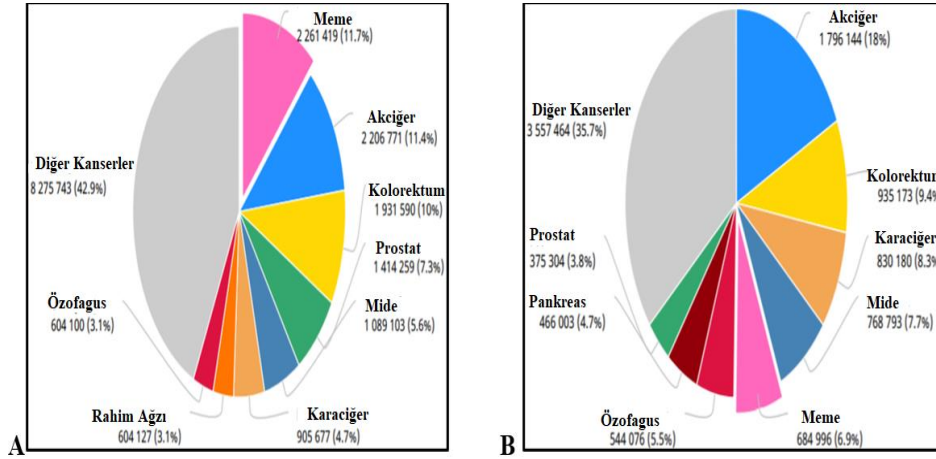
## **2.2. Meme Kanseri**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir ancak kadınlara kıyasla az olmak birlikte erkeklerde de görülebilmektedir. Metastatik bir kanser olan meme kanseri kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi organlara geçebilir. Hastalığın erken teşhisi iyi bir prognoza ve yüksek bir hayatta kalma oranına yol açabilir. Meme tümörleri genellikle duktal hiperproliferasiyondan başlayarak çeşitli kanserojen faktörlerin devamlı uyarılmasıyla benign veya malign tümörlere dönüşür. Meme kanseri patojenezinde TMC meme kanserinin başlaması, gelişmesi ve ilerlemesinde önemli fonksiyonları bulunmaktadır (28).

### **2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi**

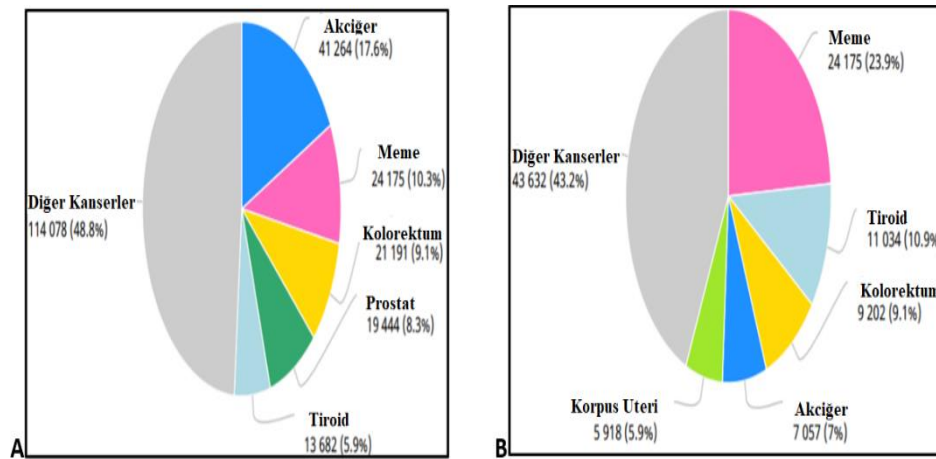
Tüm dünyada kanser morbidite ve mortalitesinin en önde gelen nedenlerinden biri meme kanseridir. En sık teşhis edilen kanser türleri arasında meme kanseri birinci

sıradadır ve tüm kadın kanserlerinin yaklaşık %12'sini oluşturmaktadır. Dünya genelinde tüm kanser vakaları arasında %11.7 ile birinci sırada olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %7'sine yol açan beşinci kanser ölüm nedeni olarak bildirilmektedir (Şekil 2.1) (2).



Şekil 2. 1. 2020'deki yeni vaka sayısı (A), 2020'deki ölüm sayısı (B) (2).

Türkiye'de 2020 yılı verilerine göre yıllık yeni kanser vakası 233.834'tür ve bunun 101.018'ni kadınlar oluşturmaktadır. Kanser nedeni ölüm sayısı ise 126.335 ve bunun 47.386'sını kadınlar oluşturmaktadır. Yeni kanser vakaları arasında birinci sırayı akciğer ikinci sırayı meme üçüncü sırayı kolorektum dördüncü sırayı prostat beşinci sırayı tiroid kanseri oluşturmaktadır. Kadınlar arasında ise meme birinci tiroid ikinci kolorektum üçüncü akciğer dördüncü korpus uteri kanseri beşinci sıraya yerleşmektedir (Şekil 2.2) (29).



Şekil 2. 2. 2020'de her iki cinsteki yeni vaka sayısı (A), sadece kadınlar (B) (29).

## **2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri**

### **Yaş**

Yaşın artışı meme kanseri oluşum hızını artırmaktadır. Genç bir kadının yaşlı bir kadına kıyasla meme kanserine yakalanma olasılığı daha düşüktür (30). 50 yaş üzeri kadınlar meme kanseri vakalarının neredeyse %80'ini oluşturmaktadır (31). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) tahminlere göre yeni meme kanserine yakalanma riski 60-79 yaş aralığında yaklaşık %8, 40-59 yaş aralığında yaklaşık %4, 39 yaş ve altında ise yaklaşık %0.5'tir (32).

### **Cinsiyet**

Meme kanseri erkeklerde nadir görülmektedir. Erkeklerle kıyasla kadınlarda yaklaşık 100 kat daha fazla görülmektedir. Son zamanlarda uluslararası yapılan bir çalışmada tüm meme kanseri vakalarının %0.6'sını erkeklerin oluşturduğu bildirilmektedir (33).

### **Ailede Meme Kanseri Öyküsü**

Bir kadının meme kanserine yakalanma riskini artıran nedenlerden biri de ailede meme kanseri öyküsüdür. Meme kanseri olan kadınların yaklaşık %12'sinde ailede etkilenen başka bir üye olduğu tespit edilmiştir (34). Ayrıca iki ya da daha fazla birinci derece akrabada meme kanseri öyküsü olması kansere yakalanma riskini 2,5 kat arttırmaktadır (28).

### **Obezite**

Son yıllarda önemli bir sağlık problemi olan obezite toplum sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Over, meme ve uterus gibi kanserler kadınlarda sık görülen kanserlerdendir ve obezite bu kanserler için önemli risk faktörlerindedir (35). Postmenopozal dönemde vücut kitle indeksi yüksek olan kadınlarda meme kanseri yakalanma riskinin arttığı bildirilmiştir (36).

## **Alkol**

Alkol kişinin genel sağlığını olumsuz etkileyip meme kanseri gibi birçok kanserin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (37). Yapılan bazı kohort çalışmalarında alkol tüketenlerin tüketmeyenlere göre meme kanserine yakalanma riskini yaklaşık %30 artırdığı öne sürülmüştür. Günlük 10 gr. alkol alımı riski yaklaşık %7 arttırmaktadır (32).

## **Sigara**

Sigaranın kanserojen potansiyeli tartışılmaz bir gerçektir. Ancak, 2004 yılına kadar sigara içmenin meme kanseri arasında nedensel bir ilişki için kesin kanıtlar bulunamamıştır. Daha yakın tarihli epidemiyolojik analizlerin sigara içmenin meme kanserine yakalanma riskini orta düzeyde artırdığını bildirmiştir (38).

## **Fiziksel Aktivite**

Düzenli fiziksel aktivite ile meme kanseri riski arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir kohort çalışmasında düzenli olarak yorucu fiziksel aktivite yapmanın meme kanserine yakalanma riskinde yaklaşık %14'lük bir düşüş olduğunu göstermiştir. Ek olarak, egzersiz süresinin artması riskte azalmayı arttırmaktadır (39).

## **BRCA1 ve BRCA2 Genleri**

Meme kanseri ile ilişkili BRCA1 ve BRCA2 genleri sırasıyla 17q21 ve 13q12 kromozomlarında bulunur. Bu genler meme kanseri riski için önemli anti-onkogendir (28). BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcıları için meme kanseri gelişme riski %80-85'tir. BRCA1 ve BRCA2'nin mutasyonu 1000 kadından yaklaşık 1.2'sinde olduğu düşünülmektedir. 22 çalışmanın birleşik analizine göre 70 yaşına kadar meme kanserine yakalanma riski BRCA1 mutasyonunda %65, BRCA2 mutasyonunda %45'tir (32).

## **Östrojen**

Hem ekzojen hem de endojen östrojenler meme kanseri gelişme riski ile bağlantılıdır. Endojen östrojen genellikle yumurtalık tarafından düşük bir miktarda ise

böbreküstü bezleri ile plasentadan salınmaktadır. Ooferektominin, meme kanseri gelişme riskini azaltabileceği ileri sürülmüştür (40). Hormon replasman tedavisi (HRT) ve oral kontraseptifler ekzojen östrojenin temel kaynaklarıdır.

Oral kontraseptifler kadınlar arasında yaygın olarak kullanılmaktadır ve uzun süreli kullanıcılar arasında meme kanseri riskinde bir artışa neden olabilir. Ancak 10 yıldan az kullanma meme kanserine yakalanma riskini arttırmadığı bildirilmiştir (41). HRT kullanımının meme kanseri gelişme riskini arttırdığı birçok çalışmada ileri sürülmüştür. İngiltere ve Tayvan'da yapılan çalışmalarda HRT kullanımı meme kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (34, 42). Ancak HRT'nin kesilmesinden iki yıl sonra meme kanserinin gelişme riskinin azaldığı gösterilmiştir (43). HRT kullanımındaki azalma ABD'de meme kanseri insidansında yaklaşık %7'lik düşüş göstermiştir (44).

### **Üreme Faktörleri**

Yaş artışı ile meme kanseri riski artmasına rağmen menopoz ile bu riskte belirgin bir düşüş gözlenir. Menopoz başlamasındaki her bir yıllık gecikme meme kanseri riskini %3'lük bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (45).

İlk adet görmenin (Menarş) gerçekleşmesindeki 1 yıllık gecikme kişinin yaşamı boyunca meme kanseri gelişme riskinde %5'lik bir düşüşle ilişkilidir. Önemli risk faktörlerinden biri de 11 yaş ve daha düşük yaşlarda menarşın başlamasıdır (46, 47).

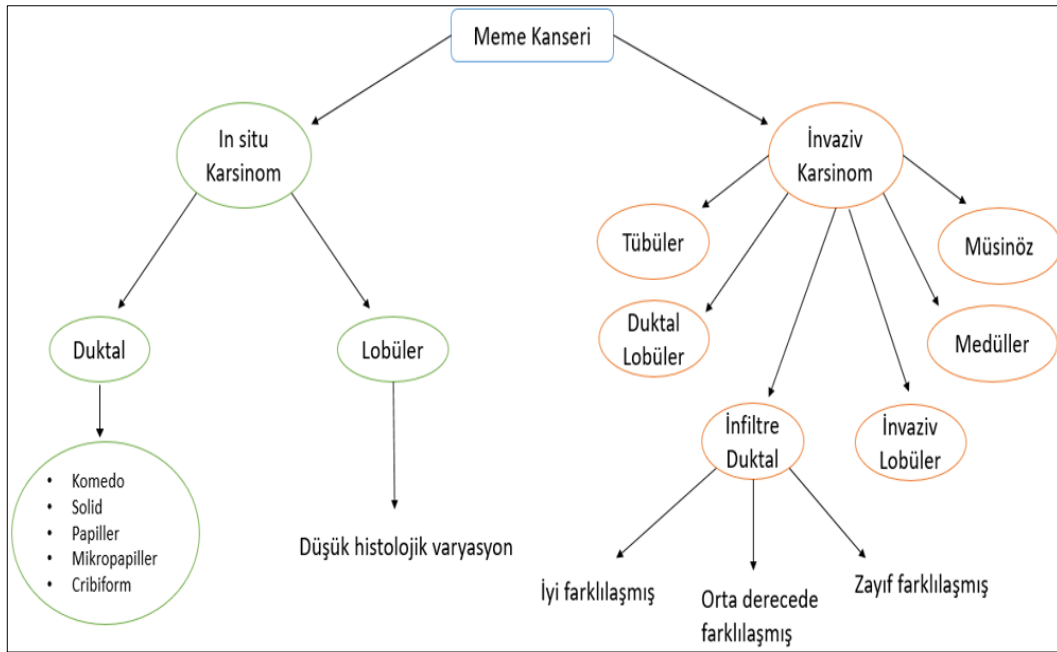
Kişinin yaşamı boyunca en az bir çocuk sahibi olması meme kanserine yakalanma riskinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Çocuk sayısındaki artış bu koruyucu etkiyi artırmaktadır. Kadının yaptığı her doğum meme kanserine yakalanma riskinde yaklaşık %7 oranında bir azalma göstermektedir (48, 49).

### **2.2.3. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması**

Tümörün meme kanallarında mı yoksa loblarda mı geliştiği ya da tümörün sadece memenin epitelyal bileşeniyle mi sınırlı olduğu yoksa çevre stromaya yayıldığını bilmek meme kanserinde doğru tedavi yönteminin belirlenmesi için sınıflandırma gereklidir (50). Meme kanseri kategorize edilirken temel olarak in situ karsinom ve invaziv karsinom olarak iki grupta incelenir. Sitolojik özellikler ve büyüme paternlerine göre in situ karsinom lobüler ve duktal olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Teşhis edilen vakaların büyük çoğunluğunu lobüler karsinoma in situ'ya (LCIS) göre duktal karsinoma in situ



(DCIS) oluşturmaktadır. DCIS tümörün özelliklerine göre daha fazla alt gruba ayrılmıştır. En iyi bilinen beş alt tip; Komedo, solid, papiller, mikropapiller ve cribriform (51). İnvaziv karsinomlar in situ karsinomlar gibi çeşitli histolojik alt tiplere ayrılmaktadır. Bu alt tipler; tübüler, duktal lobüler, infiltre (invaziv) duktal, invaziv lobüler, medüller ve müsinöz. Tüm invaziv tümörlerin yaklaşık %75'ini invaziv duktal karsinomlar (IDC) oluşturmaktadır. Ayrıca nükleer pleomorfizm, mitotik indeks ve glandüler/tübül oluşum seviyelerine göre IDC üç alt sınıfa ayrılır; iyi farklılaşmış, orta derecede farklılaşmış ve zayıf farklılaşmış (Şekil 2.3) (52).



Şekil 2. 3. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırılması (51).

#### 2.2.4. Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırılması

Meme kanserinin moleküler sınıflandırılmasında dört alt grup bulunmaktadır; Bazal tip (Üçlü negatif), HER2, Luminal A ve Luminal B. Bu gruplandırma insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) reseptörü, progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörlerinin (ER) ekspresyon farklılıklarına göre yapılmaktadır (53).

Bu reseptörlerden birincisi östrojen reseptörü; meme kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde östrojenin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Meme kanserinin biyobelirteçlerinden biri de östrojen reseptörleridir. Nükleer hormon reseptör ailesi grubuna giren ER'nin ERa (ölçülebilir izoform) ve ERb olmak üzere iki izoformu vardır.

ER-pozitif olan kanser hastaları endokrin tedavisinden fayda görür ve mortaliteleri azalabilir. Ancak sitotoksik kemoterapiye ER-negatif hastalarla karşılaştırıldığında daha iyi yanıt vermezler (54-56). İkincisi progesteron reseptörü; nükleer reseptörlerin ligandla aktive olan transkripsiyon faktörü üyeleridir. PR-A ve PR-B olmak üzere iki izoformu bulunur ve meme kanseri gelişiminde önemli bir rol oynar (57). PR-pozitif / ER-pozitif tümörler ilerledikçe büyük oranda steroid hormonuna direnç gösterirler ve genellikle steroid reseptörlerinin ekspresyonuna devam ederler. Reseptör pozitif tümöre sahip kadınların yaklaşık %40'ı dirençli hale gelir ve östrojen veya ERa bloke edici tedavilerle başarı düşük kalır (58). Üçüncüsü HER2 reseptörü; ErbB-2 olarak da bilinen HER2 reseptörü MEK/RAF/RAS/hücre dışı sinyal regüle kinaz ve rapamisin hedefi gibi çeşitli sinyal yollar ile hücre proliferasyonunu, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını düzenleyen tirozin kinaz reseptör ailesi üyesidir. Meme kanserli kişilerin yaklaşık %30'unda HER2 gen amplifikasyonu gözlenir. Bu reseptörlerin ekspresyon durumlarına göre moleküler sınıflandırma yapılmaktadır (59);

- Luminal A; tüm invaziv meme kanserlerinin %30 ila %40'nı oluşturmaktadır. Bu tip tümörlerde HER2 ekspresyonu negatif, PR ekspresyonu yüksek, ER ekspresyonu pozitif ve düşük Ki-67 (bir nükleer çoğalma belirteci).
- Luminal B; tüm invaziv meme kanserlerinin %20 ila %30'unu oluşturmaktadır. HER2 ekspresyonu negatif, düşük PR ekspresyonu (<%20), ER ekspresyonu pozitif ve Luminal A'dan daha yüksek Ki-67.
- HER2; tüm invaziv meme kanserlerinin %12 ila %20'sini oluşturur. HER2-pozitif tümörler HER2 ile zenginleştirilmiş alt grup (HER2 ekspresyonu pozitif, ER ekspresyonu negatif ve PR ekspresyonu negatif) ve Luminal HER2 (HER2 ekspresyonu pozitif, ER ekspresyonu pozitif ve PR ekspresyonu pozitif) olmak üzere iki alt gruba ayrılır.
- Bazal tip (Üçlü negatif); tüm invaziv meme kanserlerinin %15 ile %20'sini oluşturmaktadır. Bu tip tümörlerde HER2 ekspresyonu negatif, ER ekspresyonu negatif ve PR ekspresyonu negatiftir ve yüksek oranda Ki-67 gözlenir.

### **2.2.5. Meme Kanserinde Tanı**

Meme kanserinin de yeni vakalardaki sayının artması kaçınılmazdır ama bu kanserinin neden olduğu mortaliteyi azaltmak artık çok daha mümkün hale gelmektedir.

Erken tanı ve tedavi meme kanserinde tam iyileşme için önem arz etmektedir. Bu nedenlerden dolayı erken aşamada teşhis hastaların sağkalım oranını ve kaliteli yaşam standartlarını artırmaktadır. Meme kanserinde hızlı ve doğru tanı için çeşitli görüntüleme teknikleri ve moleküler biyoteknoloji teknikleri geliştirilmiştir (60, 61).

### **Görüntüleme Yöntemleri**

Tümör dokularının morfolojisini ve lokalizasyonu görüntüleme teknikleri kullanılarak hekimlere birçok klinik bilgi sağlanmaktadır. Ancak görüntüleme tekniklerinde kullanılan yüksek enerjili ışınlar ve kontrast maddeler hastalara zarar verebilir. Bu nedenle hekimler meme kanseri hastaları için uygun görüntüleme yöntemini seçmelidir. Bu yöntemler arasında tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi, ultrasonografi, mamografi, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi ve pozitron emisyon bilgisayarlı tomografi bulunmaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin de kendi içlerinde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Pozitron emisyon bilgisayarlı tomografi, bilgisayarlı tomografi ve tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi yöntemleri zayıf uygulanabilirlik, radyasyon hasarı ve yüksek maliyeti nedeniyle meme kanserinin tanısında çok fazla önerilmemektedir. Ancak bu tekniklerin kullanıldığı lenfatik metastazlar ve metastatik meme kanseri taramalarında faydalı bilgiler sunmaktadır (61).

### **Moleküler Biyoteknoloji Yöntemleri**

Görüntüleme tekniklerine göre moleküler biyoteknoloji incelemeleri meme kanserinin erken tanısında daha avantajlı olabilir. Moleküler biyoteknoloji yöntemleri doku, hücre, protein ve nükleik asit gibi yapıları analiz etmektedir. Moleküler biyoteknoloji yöntemleri arasında akış sitometresi, protein hibridizasyon sistemi, realtime floresan kantitatif PCR sistemi, nükleik asit hibridizasyon, iğne biyopsisi ve immünohistokimya bulunmaktadır (61).

#### **2.2.6. Meme Kanseri Tedavisi**

Cerrahi, radyoterapi, hormonal ve kemoterapi tedavileri meme kanserinde uygulanan tedavi yöntemlerinden en yaygın olanlarıdır. Bu tedavi yöntemleri biri ya da daha fazlası seçilirken hastanın klinik durumları göz önüne alınmaktadır (62).

## **Cerrahi Tedavi**

Son yıllarda meme kanserinde cerrahi tedavi, fonksiyonel ve kozmetik sekelleri azaltmayı amaçlayan gelişmelerle birlikte büyük ilerlemeler sağlamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda ya eksizyon ve radyoterapi ya da total mastektomi standart yaklaşımlar olarak belirlenmiştir. Nüksüz ve genel sağkalım açısından bu iki yaklaşımın eş değer olduğu bildirilmiştir. Ayrıca meme cerrahi tedavisinden ayrı düşünülen aksiller lenf nodlarının cerrahi tedavisi hem tanısal hem de terapötik bir amaca hizmet eder. Hasta da aksiller lenf nodunda tutulum olup olmadığı ve sistemik tedavi alıp almadığı göz önünde bulundurularak cerrahi tedaviye karar verilir (63).

## **Radyasyon Tedavisi**

Tüm memeye veya memenin bir kısmına (lumpektomi), bölgesel lenf düğümlerine ve göğüs duvarına radyasyon tedavisi uygulanabilir (64). Geniş çapta yapılan bir meta-analizde lumpektomi sonrası radyasyon tedavisi meme kanseri ölümlerinde yaklaşık altıda bir azalma ve nükslerde yaklaşık yarı yarıya bir düşüş sağladığı bildirilmiştir (63). Radyasyon tedavisinin uygulama alanı, zamanı ve dozu onkologlar tarafından hastalığın evresine ve seyrine bakılarak kişiye özel tedavi protokolü belirlenir (65).

## **Adjuvan Sistemik Tedaviler**

Meme kanserli kadınların çoğu erken evrede adjuvan sistemik tedaviler almaktadır. Doku hedefli tedaviler, endokrin terapi ve kemoterapi hastalığa bağlı ölümleri önemli ölçüde azaltmaktadır. Lenf nodülü tutulumu gösteren hastalar büyük oranda sistemik tedaviden yarar sağlamaktadır ve bu tedaviler (66);

- Kemoterapi: 1 cm'den büyük tümörü olan ve nod pozitif kanser için standart bir tedavidir. Hormon reseptörü-negatif olan kişi hormon reseptörü pozitif olan kişiye göre kemoterapiden daha fazla yarar sağlayabilir. Doxorubicin, Epirubicin, Docetaxel, Paclitaxel ve 5-Fluorourasil (5-FU) kemoterapide kullanılan ilaçlardan bir kaçıdır.
- Endokrin Tedavisi: Gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri, aromataz inhibitörleri ve seçici östrojen reseptör modülatörleri gibi endokrin terapiler ya östrojen üretimini engelleyerek ya da östrojeni bloke ederek östrojene duyarlı bir

tümörün uyarılmasını önler. Hormon reseptörlerinden yoksun kanserli hastalarda endokrin tedavisi etkili değildir.

- Doku Hedefli Terapi: ERBB2 erken evre meme kanserlerinin %20-30'unda aşırı eksprese edilir ve bu kanserler kötü prognoz sergilemektedir. Monoklonal antikoru olan Trastuzumab (Herceptin) nod negatif ve nod pozitif meme kanserli kadınlarda Antrasiklin ve Paclitaxel (Taksol) ile kemoterapiye eklendiğinde genel sağkalımı iyileştirir.

### **2.3. Tümör Mikroçevresi**

TMC kanserin fenotipik özelliklerini tahmin etmek ve daha iyi tanımlamak amacıyla son yıllarda önemli hale gelmiştir. Meme kanseri, lösemi ve gastrointestinal tümörler gibi birçok kanser modeli incelenmiştir. TMC tümörün büyüme, çoğalma, metastaz ve hayatta kalması için ihtiyaç duyduğu çevreyi tanımlamaktadır (5). Temel olarak endotelial hücreler ve fibroblastlar gibi yerleşik hücrelerden, lenfositler ve makrofajlar gibi sızan hücrelerden ve tümörün kendisinden salınan ürünlerinden oluşmaktadır. Sitokinler hücre dışı matris bileşenleri, proteazlar ve diğer enzimler, çeşitli metabolitler, büyüme faktörleri ve kemokin antikorumları gibi ürünlerden oluşturmaktadır. Ayrıca düşük glukoz konsantrasyonu, düşük hücre dışı pH ve hipoksi tümör mikroçevresi için önemli düzenleyicilerdir (67).

TMC'ni oluşturan hücreler bileşenlerinden birincisi olan endotel hücreler, tümörün gelişiminde ve tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Tümörün anjiyojenik damarları endotelial progenitör hücrelerden veya var olan damarların dallanması ile sağlanır. Tümörün gelişmesi ve büyümesi için gerekli besin desteği bu sayede sağlanmış olmaktadır. İkincisi, bağışıklık hücrelerini oluşturan makrofajlar, lenfositler ve granülositlerdir. Bu hücreler çeşitli bağışıklık tepkileri ve aktivitelerde yer alarak tümörün hayatta kalmasını desteklemektedir. Bu hücreler arasında TMC'nde en belirgin olanı makrofajlardır. Makrofajlar tümör hücrelerinin dolaşıma kaçışını teşvik ederler ve antitümör immün mekanizmalarını ve tepkilerini baskılayabilmektedir (19, 68). Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin akciğer gibi uzak bölgelere yayılmasına makrofajların yardımcı olabileceği öne sürülmüştür. Üçüncüsü, hücre tipi fibroblastlardır. Kanser hücrelerinin metastaz için birincil tümör konumundan dolaşıma göç etmesine izin vermektedir. Ayrıca endotelial hücrelerin tümörde anjiyogenezi oluşturmaları için güvenli bir geçiş alanı sağlar (69).

Ekstrasellüler matriksin (ESM) kanser gelişimi ve ilerlemesindeki rolü birçok çalışmada bildirilmiştir. Enzimler, kollajenler ve glikoproteinler gibi makromolekül ağından oluşan ESM hücre yapışmasını, iletişimini ve çoğalmasını etkileyen doku bileşenlerini de barındırmaktadır. İntegrinler gibi hücreyel büyüme faktörleri, hücrelerin TMC ile iletişim sağlamasında rol almaktadır. ESM konsantrasyonu ve adezyon gradienti kanser hücrelerinin göçünü etkilemektedir (69).

Tümör dokularının hücre dışı pH<sub>1</sub>, hipoksida anaerobik glikolizde oluşan laktik asit ve asidik metabolitler nedeniyle genellikle asidiktir. Asidik mikro ortamın hücreyel fenotipin düzenleyicisi olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Cl<sup>-</sup> / HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger ve Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> co-transporter hücre içi pH'da düşüşe neden olmaktadır. H<sup>+</sup>/Laktat co-transporter, H<sup>+</sup>/ATPase ve monokarboksilat taşıyıcıları (MCT) ise H<sup>+</sup> sekresyonu yaparlar (70). Pentoz fosfat yolunun aktif olduğu kanser hücrelerinde aşırı miktarda CO<sub>2</sub> üretimi, pH'ın düşmesine ayrıca katkı sağlamaktadır (71). Lizozomal enzimlerin aktivasyonunu artıran asidik pH ayrıca pro-metastatik faktörlerle alakalı bazı genlerin ekspresyonunu da artırmaktadır. Farelere enjekte edilen asidik ortamda ön işlem geçiren melanom hücreleri, akciğerlere metastaz yaptığı gösterildi. Bu nedenle tümör metastazi ile asidik mikro ortam birbiri ile yakından ilişkilidir (70).

### 2.3.1. Hipoksi

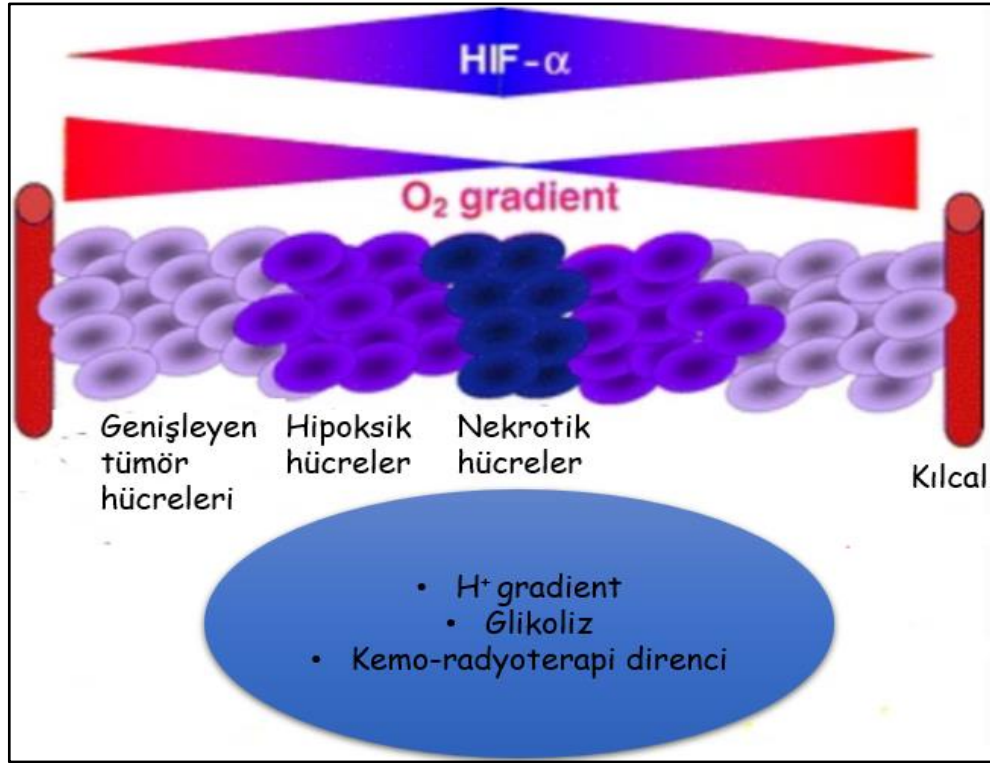
Fizyolojik doku oksijen seviyesinin düşmesi (<5–10 mmHg) hipoksi olarak tanımlanır ve tümör hipoksisi TMC'nin önemli bir özelliğidir. Tümör dokularında hipoksik oksijen seviyesi oluşurken sağlıklı dokularda oksijen 40-60 mmHg arasında değişir (72). Hipoksinin üç temel sınıflandırılması bulunmaktadır (73);

- Yetersiz kan akışı nedeniyle perfüzyonla ilgili (akut) hipoksi
- Oksijen taşıma kapasitesinde azalmaya neden olan anemik hipoksi
- Tümör genişlemesi ile difüzyon mesafesindeki artışın neden olduğu difüzyonla ilgili (kronik) hipoksi

Difüzyonla ilgili kronik hipoksi, damarlara yakın hücrelerin oksijen tüketebilmesi sonucunda uzaktaki hücrelerin yetersiz tüketmesi nedeniyle oluşmaktadır. Büyük tümörlerde kronik hipoksik durumu DNA kırılışında artış ve DNA replikasyon hatalarının birikmesi gibi hücreyel değişikliklere katkıda bulunmaktadır (73, 74).

Hipoksik bir tümörün özellikleri Şekil 2.4' de gösterilmiştir. Kılcal damarlar dokulara oksijen taşımaktadır ve belirli bir difüzyon limitine sahiptir. Kılcal damarlardan

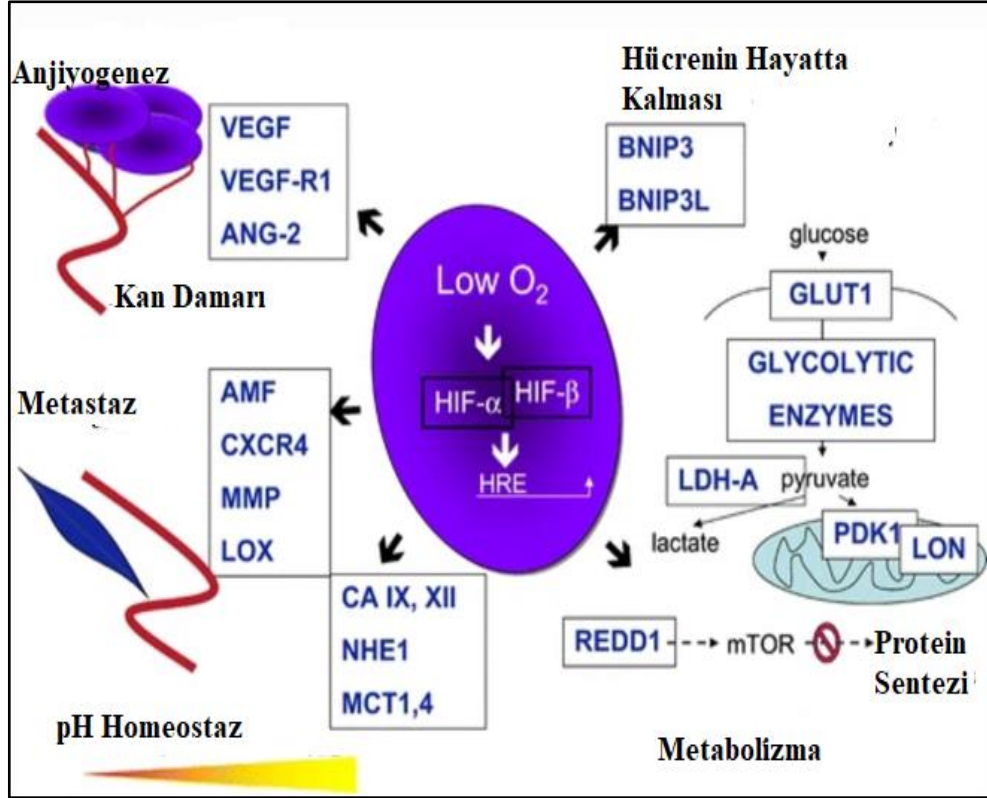
uzaklaştıkça difüzyon konsantrasyonunda azalma görülür. Katı tümörler incelendiğinde merkezi bir bölgeyi oluşturan nekrotik hücrelerin ve kılcallara yakın genişleyen tümör hücrelerin olduğunu ortaya çıkmaktadır. Oksijen gradyanındaki azalma radyo ve kemoterapiye dirençte artış ve hücre dışı pH'da düşüş ile paralellik göstermektedir (75).



Şekil 2. 4. Hipoksik bir tümör kütesinin özellikleri (75).

### 2.3.2. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör

Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 ve 2 (HIF-1 ve HIF-2) heterodimerik transkripsiyon faktörleridir. HIF-1, glikoliz ve pirüvat metabolizmasını düzenler HIF-2 ise yağ asidi metabolizmasını kontrol etmektedir. HIF-1 heterodimerik bir proteindir ve HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  dimerlerinden oluşur (73). HIF-1, hücrelerin ve tüm organizmanın normoksiden hipoksiye uyum sağlamasını ve hayatta kalmasını kolaylaştıran genlerin sitümüle edilmesinden sorumlu önemli bir düzenleyicidir. HIF-1, tümöral hipoksiye cevap olarak onkogenleri aktive eden ve tümör baskılayıcı genleri inaktive eden bir transkripsiyon faktörüdür (76, 77). Hücrenin hayatta kalması veya ölümü, pH regülasyonu, metabolizma, metastaz, hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi ve anjiyogenez gibi geniş bir gen yelpazesi hedeflenir (73).



Şekil 2. 5. HIF ile indüklenen gen ürünleri ve işlevleri (73).

### Anjiyogenez

Tümör hücrelerinin hipoksik durumdan çıkabilmek için HIF aracılığı ile anjiyopoetin-2 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gen ürünlerinin ekspresyonunu sağlayarak vasküler ağın yeniden sağlanmasını gerçekleştirmektedir. Bu sayede tümörün büyümesi ve gelişmesi için oksijenli ve besinli ortam yeniden kurulur (78).

### Hücrenin Hayatta Kalması veya Ölümü

Hipoksi tümörün gelişip büyüebilmesine olanak sağlayan birçok olayın başlamasını ve devam etmesini sağlamaktadır. Ancak hipoksi çok şiddetli ise tümör hücrelerinin ölümüne de yol açabilir. BNIP3 ve BNIP3L, Bcl-2 ailesi proteinlerinin yalnızca BH3 alt ailesinin iki üyesidir ve hücre ölümünü teşvik etmek için karakterize edilmiştir. Bu iki gen ürünü birçok çalışmada pro-apoptotik özellikler göstermesine rağmen halen tartışmalı bir konudur (79). Diğer bir görüş ise BNIP3 ve BNIP3L'nin hücre



ölümünü değil otofajiyi tetikleyerek kanser hücresinin hayatta kalmasını sağlamaktadır (75).

### **Metabolizma**

Kanser hücreleri pirüvatı, laktik asit oluşumuna yönlendirdiği uzun zamandır bilinmektedir. Kanser hücreleri bu yolla glukoz başına daha az adenozin trifosfat (ATP) üretse de hücre içine çok fazla glukoz alarak yani glikolizi artırarak verim kaybını telafi etmektedir. HIF aracılı ekspresyonundaki artış sayesinde hem glikoliz yolunun enzimleri hem de glukoz taşıyıcılarının artışı sağlanır. Pirüvatın, mitokondriyal oksidatif fosforilasyona yönelmeyip laktat oluşumuna yönelmesi HIF aracılı ekspresyonla artan iki enzim ile desteklenir. Laktat dehidrojenaz A (LDH-A) ve piruvat dehidrojenaz kinaz 1 (PDK1) bu iki enzimdir. LDH-A'nın fonksiyonu pirüvatı laktata dönüştürmektir. PDK1'in ise pirüvatın krebs döngüsüne girmesini sağlayan pirüvat dehidrajenazın inhibisyonunu sağlamaktır. Bu sayede pirüvat elektron transport zincirine yönelmesi engellenir. Bu sayede hipoksi şartlarında kanser hücresi oksidatif hasardan korunarak büyümesini ve gelişimini sürdürür (75).

Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) yolu HIF tarafından düzenlenen diğer bir metabolik yoldur. Besinler ve büyüme faktörleri artan protein sentezi sayesinde mTOR yolunu güçlendirerek büyüme, gelişme ve hayatta kalma sinyallerini iletmede kullanır. Ancak artan enerji gereksinimi ve hipoksi, enerji gereken protein sentezini mTOR'u baskılayarak enerji kullanımını azaltır ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar (80).

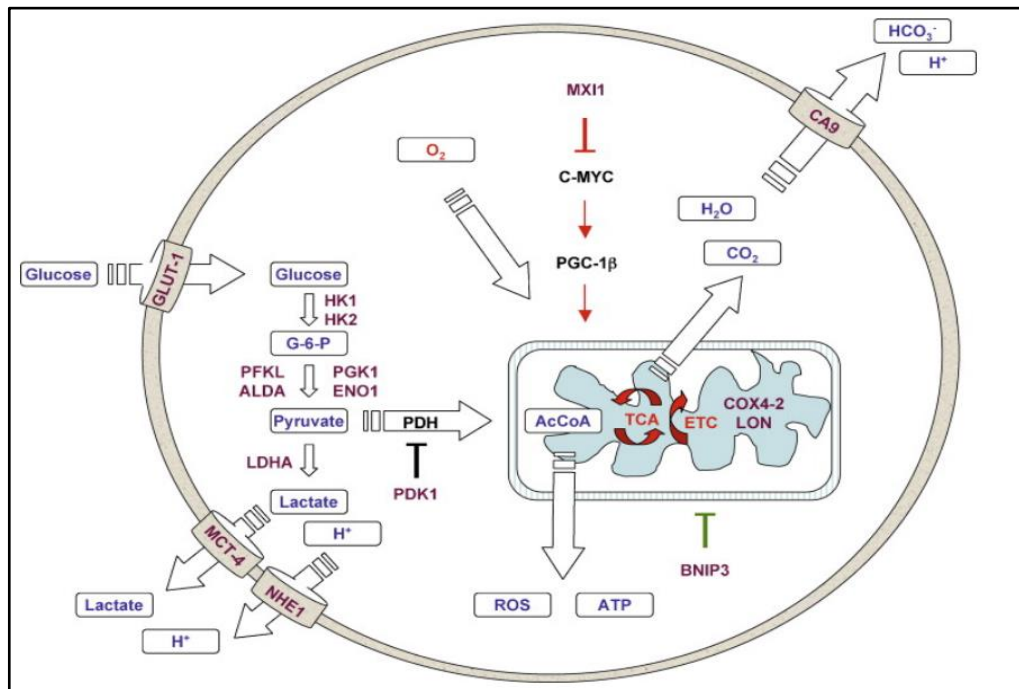
### **Metastaz**

Birçok veri hipoksik şartların tümör hücrelerinin istilacı potansiyelini desteklediğini bildirmektedir. HIF aktivasyonu metastaz baskılayıcı olarak görev yapan E-Cadherin kaybı ile bağlantılıdır (75). Epitel hücrelerinin yüzeylerinde lokalize olan E-Cadherin hücre-hücre adezyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. E- ve N-Cadherinler en iyi karakterize edilenlerdir ve dokuların oluşumu sırasında önemli rolleri bulunmaktadır. Ayrıca tümör gelişimi ve ilerlemesinde de önemli rol oynayan E-Cadherin hücre-hücre yapışmasındaki fonksiyonel bozukluktan sorumludur. Tümörün doku bütünlüğündeki kaybı invazyona neden olmaktadır. Bu nedenler tümörlerdeki invazyonun ve metastazın E-Cadherin ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (81).

Düşük pH'da hayatta kalan hücreler büyüme avantajı kazandığı gibi daha istilacı ve agresif hal oluştururlar. Hücre-hücre ve hücre-ESM etkileşmesini bozan lisil oksidaz gibi metalloproteazlar, HIF'in aktivasyonundaki artış nedeniyle ESM'in yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır. HIF, istila ve metastaz ile ilgili otokrin motilite faktörü, kemokin reseptörü (CXCR4) ve c-met proto-onkogen gibi genlerin de aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (75).

## pH Regülasyonu

Çevreleyen dokulara göre tümörlerdeki parsiyel oksijen basıncı ( $PO_2$ ) önemli ölçüde azalır.  $PO_2$  düşüşün çok olduğu tümörler hastada metastaz yapar ve ölüm riskini artırır. Birçok karsinomda metastaz ile bağlantılı olan yükselen laktat konsantrasyonu gözlenir. Tümör hücrelerinde laktat üretiminin artması, LDH-A ve MCT ile bağlantılıdır. MCT, kanser hücrelerinden laktatı hücre dışına gönderen bir taşıyıcıdır. Bunun sonucunda hücre dışı pH'da düşüş yaşanmaktadır. Kanser hücreleri hücre dışı pH'ı asidik hücre içi pH'ı alkali tutabilmek için CA IX'u ve sodyum-hidrojen değiştiricisini (NHE1) aşırı eksprese ederler. Hipoksi ile ilişkili olan HIF-1, CA IX, NHE1, LDH-A ve MCT4 genlerinin ekspresyonunu artırır. Bu genlerin uyarılması kanser hücrelerinin çoğalmasını ve istilasını için gerekli hücre içi ve dışı pH korunmasını sağlamaktadır (Şekil 2.6) (82).



Şekil 2. 6. HIF-1 ile pH, glukoz ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi (82).

## Vimentin

Mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler (AF'ler) hücre iskelet proteinlerinin üç temel grubunu oluşturmaktadır. İnsanlar, fareler ve diğer memelilerde AF'ler geniş bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Tip III'de vimentinin bulunduğu altı ana AF sınıfı bulunmaktadır (83). AF'lerin diğer hücre iskeleti elemanları ve organeller arasındaki etkileşimleri koordine ettiği bilinmektedir. Böylece organları stabilize eder ve güçlendirir. Pankreas öncü hücreleri, trofoblast dev hücreleri, nöronal öncü hücreler, fibroblastlar, sertoli hücreleri, endotelial hücreler, makrofajlar, lökositler ve mezengial hücreler gibi birçok hücrede de ayrıca eksprese edilir (84). Vimentin epitelyal mezenkimal geçişin (EMT) bir belirteci olarak kabul edilmektedir ve epitel hücrelerinin şekillerini önemli ölçüde değiştirmelerine neden olmaktadır (85). Meme kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, merkezi sinir sistemi tümörleri, gastrointestinal sistem tümörleri ve endometriyal kanserleri gibi çeşitli tümör hücre dizilerinde vimentinin aşırı eksprese edildiği ve artan metastaz oranları ilişkisi bildirilmiştir (84). HIF-1 yoluyla vimentinin transkripsiyonel düzenlenmesi EMT'nin bir süreci olabilir. Vimentinin tümör ilerlemesinde oynayabileceği kilit role işaret eden birçok heyecan verici ilerlemeler bulunmaktadır (86).

## 2.4. Apoptoz

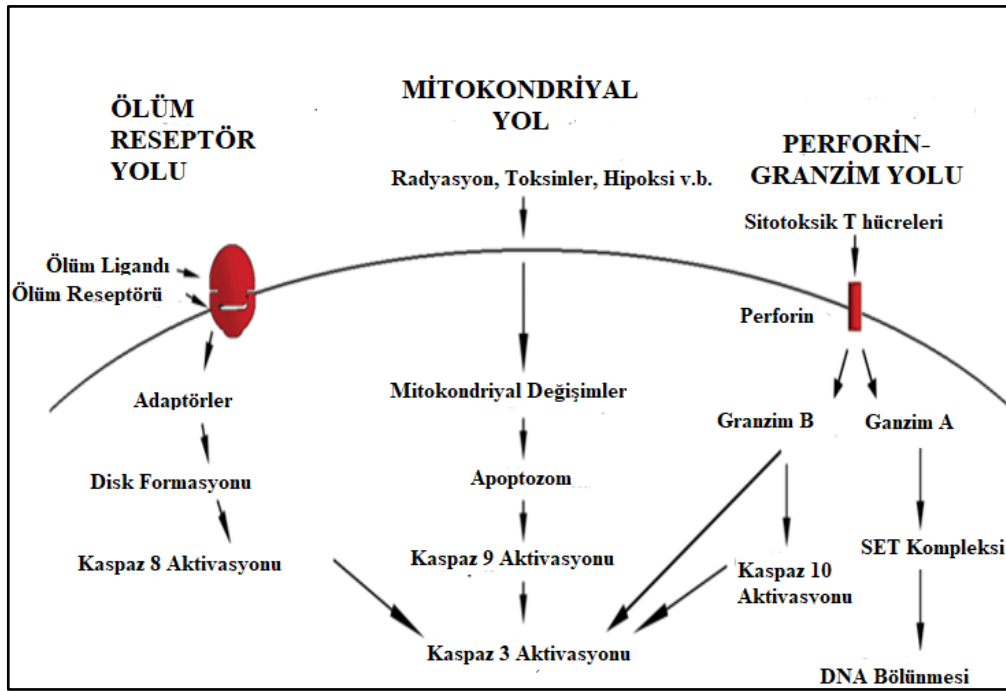
Canlı organizmada hücrelerin sürekli çoğalması ile hücre ölümü bir denge içerisinde. Embriyonik gelişim esnasında dokuların ve organların oluşumunun temelini hücrelerin farklılaşması, aktif bölünmesi ve hareketlilikleri oluşturur. Aynı zamanda yaşamın bu ilk dönemlerinde bile bazı hücrelerin ölümü doğal bir süreçtir. Bu sayede hücre kolonilerinin düzenlenmesi, vücudun belirli bölümlerinin oluşumu ve hücre tipleri arasında bağlantı kurulması sağlanır (87). Hücre ölümünün temelinde apoptoz ve nekroz olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır (88).

Apoptoz kelimesi Yunancada sonbaharda ağaçtan yaprakların dökülmesi anlamına gelen apo-ptosis'ten gelir ve hücrenin morfolojik olarak apoptotik cisimciklerini ifade eder (89). Caenorhabditis Elegans üzerindeki çalışmalarda, ontogenisi sırasında 1090 somatik hücrenin 131'inin ölmesi apoptozun ilk genetik kanıtlarını gösterdi (90). Apoptoza giden hücrelerde ilk olarak bir dizi morfolojik değişimler gözlenir. Başlangıçta apoptotik hücrelerin membran bütünlüğünde değişimler meydana gelmektedir. Ayrıca

hücrel olarak büzülme, zar kabarması, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması diğer özellikleri arasındadır. Nihayetinde zarla çevrili parçacıkların (apoptotik cisimcikler) fagositler tarafından yutulması gerçekleşir (88).

#### 2.4.1. Apoptozun Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları oldukça karmaşık yollar içermektedir ve iki temel apoptotik yol bulunmaktadır; ölüm reseptör yolu veya dışsal yol ve mitokondriyal yol veya içsel yol. Ayrıca bu iki farklı yol arasında bağlantıların olduğu bilinmektedir ve ek olarak perforin-granzim yolu olarak bilinen ek bir yol daha bulunmaktadır (Şekil 2.7) (91).



Şekil 2. 7. Apoptozun temel mekanizmaları (91).

#### Ölüm Reseptör Yolu (Dışsal Yol)

Dışsal yolda plazma membran reseptörleri apoptoz sinyalini tetiklemektedir ve bu reseptörler tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesine aittir. Bu aile üyeleri arasında (88);

- Fas (Apo-1 veya CD95)

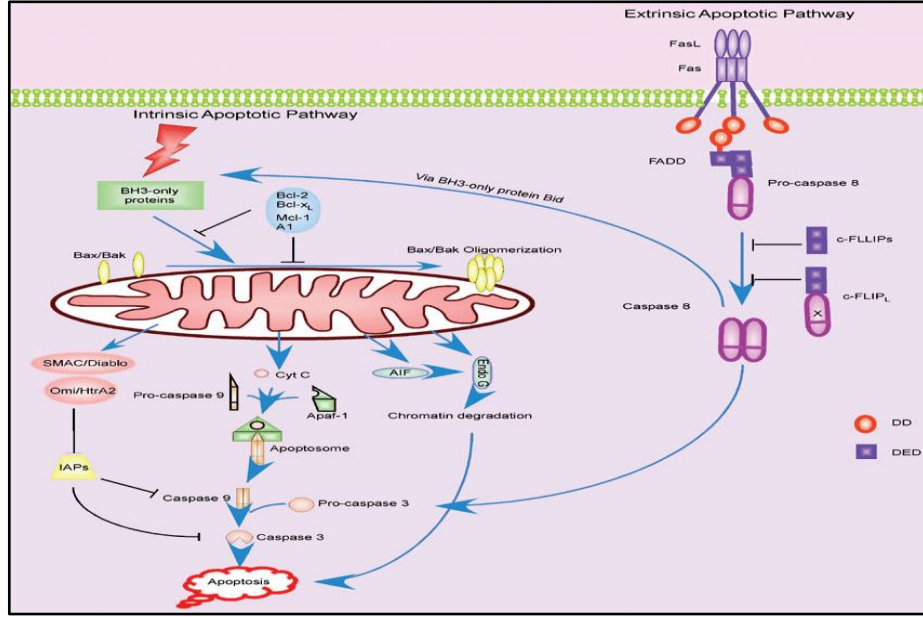
- TNF reseptörü-1 (TNF-R1)
- Ölüm reseptörü-3 [DR3 veya TNF-reseptörü ile ilgili apoptoz aracılık eden protein (TRAMP) veya Apo-3]
- TNF ile ilgili apoptozu indükleyen ligand reseptörü-1 (TRAIL-R1 veya DR4),
- TRAIL-R2 (DR5 veya Apo-2)

Dışsal yolda apoptoz FasL/FasR ve TNF- $\alpha$ /TNFR1 modelleri ile en iyi karakterize edilmiştir. Reseptör kümelenmesi ve ligand ile bağlanma bu modellerde yer alır. Ligandların bağlanması ile ölüm alanları sergileyen adaptör proteinlerin toplanmasına neden olmaktadır (91). Birinci model Fas reseptörü, Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD), ölüm alanı (DD) ve adaptör protein içermektedir ve ölüm reseptörü kaynaklı sinyal kompleksi (DISC) oluşturmaktadır. Ayrıca FADD bir ölüm efektör alanı (DED) içerir ve bu sayede prokaspaz-8'i DISC'e alır. Aktif olmayan prokaspaz-8, proteolitik olarak kaspaz-8'i oluşturur ve bu da efektör kaspazların aktive edilmesini sağlar (88). İkinci model TNF-a'nın TNF-R1'e bağlanması, TNF-R ile ilişkili ölüm alanı proteininin (TRADD) TNF-R1'e bağlanmasına neden olur. Prokaspaz-8, TRADD ölüm alanına alınmasıyla FADD ölüm alanı ile etkileşime girmektedir. Aktifleşen prokaspaz-8, prokaspaz-3'ün aktifleşmesini sağlayarak kaspaz kaskadını oluşturur (92).

### **Mitokondriyal yol (İçsel Yol)**

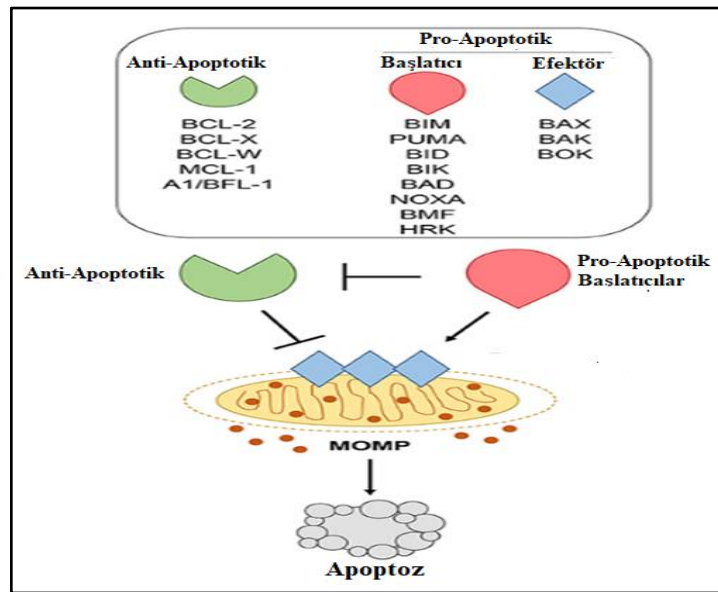
Apoptoz giden hücrenin mitokondriyal dış membranın potansiyeli düşmesiyle por oluşumları gözlenir ve sitokrom c ve bazı proteinlerin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Sitozole salınan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır. Sitokrom c, Apaf-1, prokaspaz 9 ve dATP apoptozum oluşumunda yer alır. Apoptozoma bağlı prokaspaz-9 aktive edilir ve aktif olan kaspaz-9 yapıdan ayrılarak diğer efektör prokaspaz-3,6 ve 7'nin aktif olmasını sağlar (87, 93).

Apoptoz protein inhibitörü (IAP), kaspazların güçlü inhibitörleridir. Kaspazların gereksiz aktivasyonunun önlenmesinde önemli rol oynar ve SMAC/Diablo ve Omi/HtrA2 iki protein tarafından düzenlenir. Sitokrom c ile bu iki protein mitokondriyal boşluktan sitoze salınırlar. IAP aracılı inhiye kaspaz, SMAC/Diablo'nun IAP'lere bağlanması ile serbest kalır. Omi/HtrA2 ise SMAC/Diablo'ya benzer etki göstererek kaspaz aktivasyonunu sağlar (Şekil 2.8) (94).



Şekil 2. 8. İçsel ve dışsal apoptotik ölüm yolları (94).

Apoptotik kaskadın düzenlenmesinde Bcl-2 protein ailesinin önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bu protein ailesi dış mitokondriyal membranda bulunur veya yer değiştirebilir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik olmak üzere Bcl-2 ailesi temel olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.9) (88). Başlatıcı ve efektör olarak ayrıca ikiye ayrılan pro-apoptotik üyeler ile anti-apoptotik üyeler doğrudan etkileşim içerisindedir. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri arasında hassas ve dinamik bir denge bulunur ve bu dengenin bozulması hücrenin apoptoza girip girmeyeceğini yönetir (95).



Şekil 2. 9. Bcl-2 aile üyeleri ile apoptozun düzenlenmesi (95).

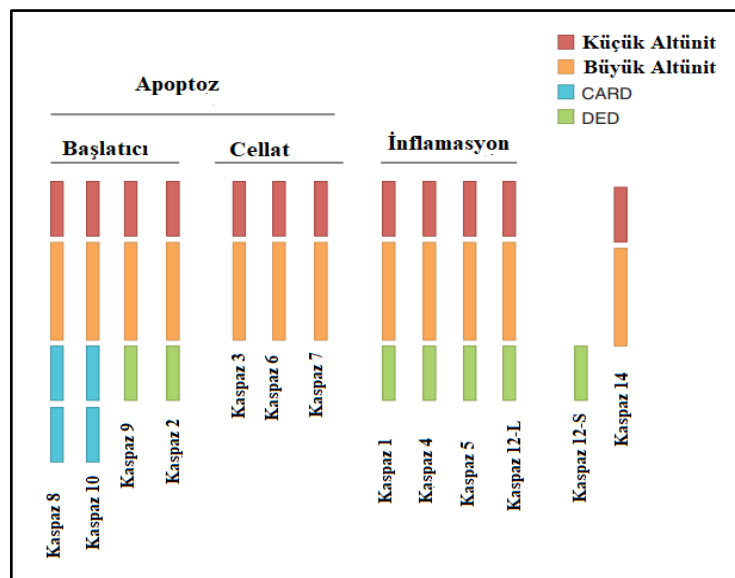
## Perforin/granzim Yolu

Virüs bulaşmış hücelere karşı Sitotoksik T lenfositler (CTL'ler) ve doğal öldürücü (NK) hüceleri ortak sitotoksik yolaklar paylaşan lenfositlerdir. Hem CTL hem de NK farklı iki mekanizma ile hedeflerini öldürürler (96). Birinci mekanizmada membran bozucu protein olan perforin ve serin proteaz olan granzim kaspazların aktivasyonunu sağlayarak hücrenin apoptozunu indükler. İkinci yol ise FasL'in öldürücü hücelerin membranlarında bulunan CD95 reseptörlerine bağlanmasını içerir (97).

Granzim B, prokaspaz-10'nun aspartat kalıntılarına etki ederek aktif hale getirir ve ICAD (Kaspaz ile aktifleştirilmiş DNAz inhibitörü) gibi faktörleri parçalayabilir. Ayrıca granzim B, sitokrom c'nin salınımını sağlayarak apoptoz için içsel yolu kullanabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte granzim B prokaspaz-3'ü direkt olarak aktive ederek birçok sinyal yollarını atlatır ve apoptozu doğrudan indükler (91).

### 2.4.2. Kaspaz Ailesi

Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar hücre ölümünü ve inflamasyonu regüle ederek homeostazın sürdürülmesini sağlayan bir gen ailesidir. Kaspazlar substratlardaki sistein kalıntıları yoluyla proteinlerdeki peptit bağlarını parçalayabilir. Caenorhabditis Elegans'ın bazı hücre hatlarında kaspazlar tanınmıştır ve apoptozdaki önemi ilk kez anlaşılmıştır (98).



Şekil 2. 10. Kaspazların etki alanı yapısı (98).

Kaspaz ailesi üyeleri apoptozda ve inflamasyonda bilinen rollerine göre geniş bir şekilde sınıflandırılmıştır (99). Temel olarak ilk sinyale tepki olarak etkinleştirilenler başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9, 10), apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren cellat kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7) ve inflamasyon mediatörleri olan kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 12, 14) olmak üzere 3 alt gruba ayrılır (Şekil 2.10) (98).

### **2.4.3. Kanserde Apoptoz**

Apoptoz, hücrel stres sonucu ya da organizmanın gelişim aşamasında sağlıklı veya gereksiz hücrelerin uzaklaştırıldığı bir intihar sürecidir (100). Yetersiz apoptoz ve/veya aşırı hücre proliferasyonu kanserin gelişiminde temel mekanizmadır. Anti-apoptotik genlerin up-regülasyonu ya da pro-apoptotik genlerin down-regülasyonu, malign hücrelerin gelişmesi ve büyümesi için avantaj sağlamaktadır (101). Bu süreçte kaspaz ailesinin aktivasyonu gerçekleşir. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9, 10) etkinleşerek diğer zimojen formdaki cellat kaspazlarının (kaspaz-3, 7) aktivasyonunu sağlar ve hücre ölümü gerçekleşir (100). Ayrıca Bcl-2 protein ailesindeki üyelerin regülasyonundaki değişimler malignite ile ilişkilendirilmiştir. Bu ailenin anti-apoptotik üyeleri akut lösemide, lenfomalarda ve birçok katı tümörde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (88). Kanser hücreleri pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu azaltıp anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak apoptozdan kaçabilirler (100).

### **Meme Kanseri Apoptoz**

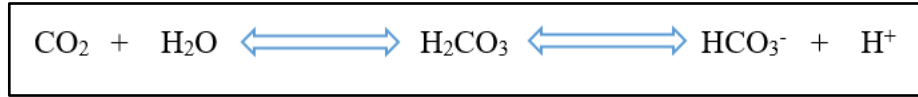
Meme iki ayrı durumda ergenlik ve hamilelik dönemlerinde gelişimi tamamlayan organlardan biridir. Bu dönemlerde proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli değişiklikler olmaktadır. Duktal morfogenez, gebelik, laktasyon ve involüsyon gibi normal meme bezi gelişiminde apoptozun rolü önemlidir (102). Hamileliğin başlangıcına kadar meme kanallarının uçlarındaki hücreler mitotik olarak hareketsiz kalmaktadır. Daha sonra lobuloalveolar büyüme ve duktal dallanma ile hızlı epitelyal proliferasyon oluşmaktadır. Laktasyon sonrası dönemde yeniden yapılanma ve birincil yapıya dönüş apoptoz ile meydana gelir (103). Meme bezindeki hücrelerin çoğalması ve ölümü arasında homeostaz önemlidir. Apoptozu azaltan ve/veya proliferasyonu artıran durumlar meme kanserinin oluşumuna neden olmaktadır (104).



Karsinogenez sırasında epitel dokuda genetik mutasyonlar birikerek fonksiyon kayıplarının oluşmasına, malign lezyon yoluyla yüzeysel kanserlere ve invaziv hastalığa dönüşebilmektedir. Bu sürecin kansere dönüşmesi uzun zamanlar almaktadır (105). Apoptotik mekanizmadaki sapmalar ve değişimler tümörlerin oluşumuna, gelişmesine ve ilerlemesine ya da endokrin, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavilerle tümörün gerilemesini sağlayabilir (106).

## 2.5. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ), bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ile denge halindedir ve tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır. Karbondioksit, bikarbonata göre daha çözündür ve hücre membranlarından serbestçe difüze olmaktadır. Membranlardan  $\text{HCO}_3^-$  taşınması gerektiğinde organizmalar  $\text{CO}_2$ :  $\text{HCO}_3^-$  dönüşüm sürecini hızlandıran karbonik anhidraz olarak adlandırılan bazı enzimler üretmektedir (Şekil 2.11).  $\text{HCO}_3^-$  dehidrasyonu ve  $\text{CO}_2$  hidrasyonu arasındaki reaksiyonu geri dönüşümlü olarak katalize eden bu enzimler ayrıca  $\text{Zn}^{+2}$  içermektedir (107).



Şekil 2. 11. Karbonik anhidraz enziminin fonksiyonu (107).

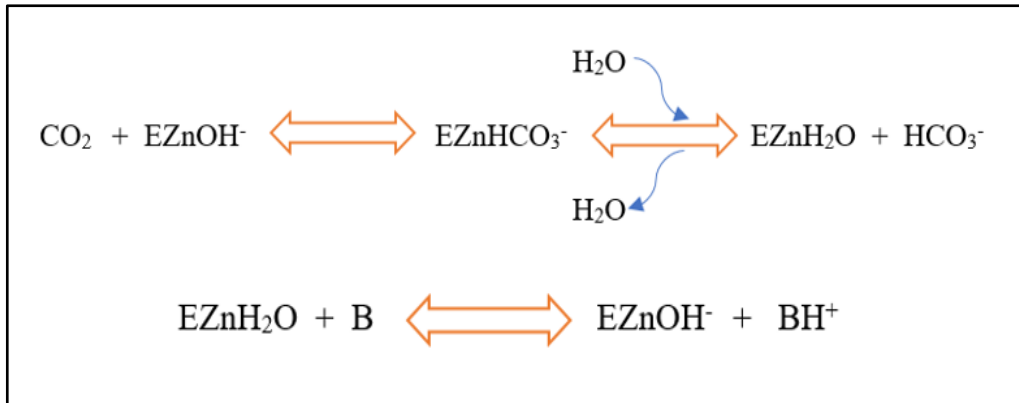
Bakterilerde, bitkilerde, hayvanlarda ve doğada hemen hemen her yerde  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ ,  $\delta$  ve  $\zeta$  olarak adlandırılan CA ailesinin 5 üyesi tanımlanmıştır. Bitkiler, algler, bakteriler ve omurgalılarda  $\alpha$ -CA'lar bulunur. Bitkiler, algler ve bakterilerde  $\beta$ -CA'lar baskındır. Archaea'da ve bazı bakterilerde  $\gamma$ -CA'lar bulunmaktadır. Bazı deniz diatomlarında  $\delta$ -CA'lar ve  $\zeta$ -CA'lar bulunur (108).

### 2.5.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

CA'nın katalitik işlevi için moleküler yapısında dört temel bileşen bulunmaktadır. Bunlar: proton mekik mekanizması, substrat birleşme cebi, treonin-199 döngüsü ve çinko bağlama bölgesidir (109).

Çinko bağlanma bölgesi, üç histidin amino asidinin (His-94, His-96 ve His-119)  $Zn^{+2}$  iyonu ile bağlanması sonucu oluşmaktadır.  $Zn^{+2}$  stabilize olmasına katkı sağlayan her histidin kalıntısına hidrojen bağı sağlayan bir ligand (Gln 92, Asn-244 ve Glu-117) bulunmaktadır. CA IV hariç  $\alpha$ -CA ailesi üyelerinde bu katalitik özellik ortaktır. Substrat birleşme cebi, non-polar altı amino asidin hidrofobik bir cep oluşmasını sağlayan amino asit dizisidir. Çinko bağlanma bölgesine bitişik olan bu cep  $CO_2$ 'in izole edilmesinden sorumludur. Treonin-199 döngüsü,  $Zn^{+2}$ 'ya bağlı hidoksili ( $OH^-$ ) kataliz için yönlendirerek proton mekik mekanizması ile su ( $H_2O$ ) molekülünden bir proton kabul eder. Proton mekik mekanizması,  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlı sudan doğrudan proton almayıp bunun yerine üç  $H_2O$  molekülünden oluşan bir mekik boyuncu protonun hareket etmesiyle alır. Histidin64 kalıntısı aktivitesi yüksek olan CA'larda proton transferini sağlamaktadır (109). İki ana basamaktan oluşan CA'nın katalitik mekanizması şunlardır (Şekil 2.12) (110);

- İlk basamak: Enzim ile  $Zn^{+2}$ 'ya bağlı  $OH^-$  iyonuyla  $CO_2$  bağlanır. Bunun neticesinde  $HCO_3^-$  oluşmuş olur.  $H_2O$ 'nun  $Zn^{+2}$ 'ya bağlanması ile  $HCO_3^-$  serbest hale gelmiş olur.
- İkinci basamak: Enzimin aktif bölgesinin rejenerasyonu için ortama proton salınması gerekmektedir. Enziminin temel formu aktif bölgeden proton transferi ile yeniden üretilir.



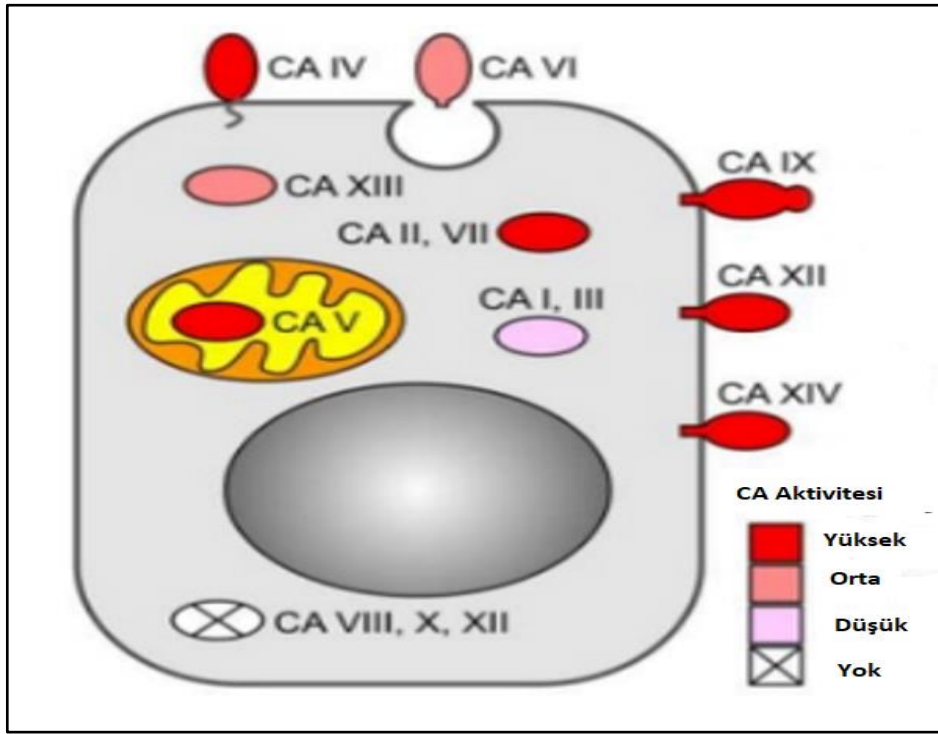
Şekil 2. 12. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması (110).

### 2.5.2. Karbonik Anhidraz İzofomları

CA'ların izofomlarını tanımlamak için araştırmalar uzun süre devam etmektedir. Şu ana kadar 15  $\alpha$ -CA izofomu tanımlanmıştır. CA VII, CA X ve CA XI izofomları

katalitik aktiviteden yoksundur. CA ile ilişkili proteinler olarak adlandırılan bu izoformlar, beyinde eksprese olurlar ve işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Geriye kalan diğer memeli enzimleri katalitik aktiviteye sahiptir ve birçok dokuda eksprese edilmektedir (111).

Hücre içi CA'lar mitokondriyal ve sitozolik izoformlar olmak üzere 2 grupta incelenmektedir. CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik izoformlardır ve CA V (VA ve VB) mitokondriyal izoformdur. Hücre dışı CA'lar, sekrete olan CA VI ve hücre membranı ile ilişkili CA IV, IX, XII, XIV ve XV izoformlarını içermektedir (Şekil 2.13). Memeli  $\alpha$ -CA izoformları spesifik fonksiyonlarına göre farklı katalitik aktiviteler göstermektedir (111).

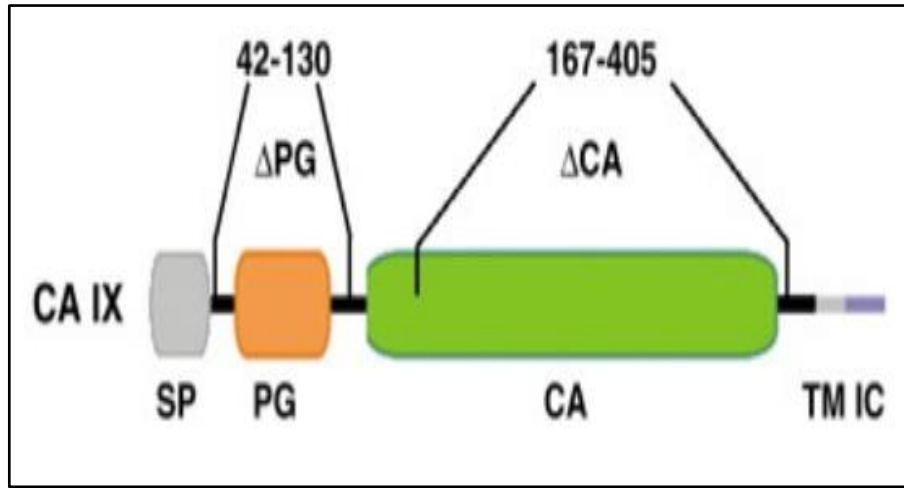


Şekil 2. 13. Karbonik anhidrazın izoformları ve aktiviteleri (111).

### Karbonik Anhidraz IX'un Biyokimyasal Yapısı

İnsanlarda ve hayvanlarda bulunan CA IX, karbonik anhidraz ailesinin transmembran üyesidir. Transmembran bölgesi, hücre içi C-terminal bölgesi ve N terminal sinyal peptidinden oluşan bu enzim 459 amino asit içermektedir. CA IV'e göre CA IX hücre membranına zar ötesi peptid dizileri yolu ile bağlanır ve membranla bütünleyici yapı kazanan bir proteindir (112).

İlk olarak HeLa insan servikal karsinom hücre hattında tanımlanan CA IX, MN proteini olarak adlandırılmıştır ve MN geni tarafından kodlanır. N terminal sinyal peptidi (hücre dışı kısmı) 414 amino asitten, C-terminal bölgesi (hücre içi kuyruğu (IC)) amino asitten ve transmembran bölgesi (TM) 20 amino asitten oluşmaktadır. Hücre dışı kısmı 37 amino asit uzunluğunda bir sinyal peptidinden, proteoglikan keratan sülfatın bağlama alanına benzeyen 59 amino asitlik polipeptit kısmı ve 257 amino asitten oluşan proteoglikan (PG) alanından oluşur (Şekil 2.14) (113).



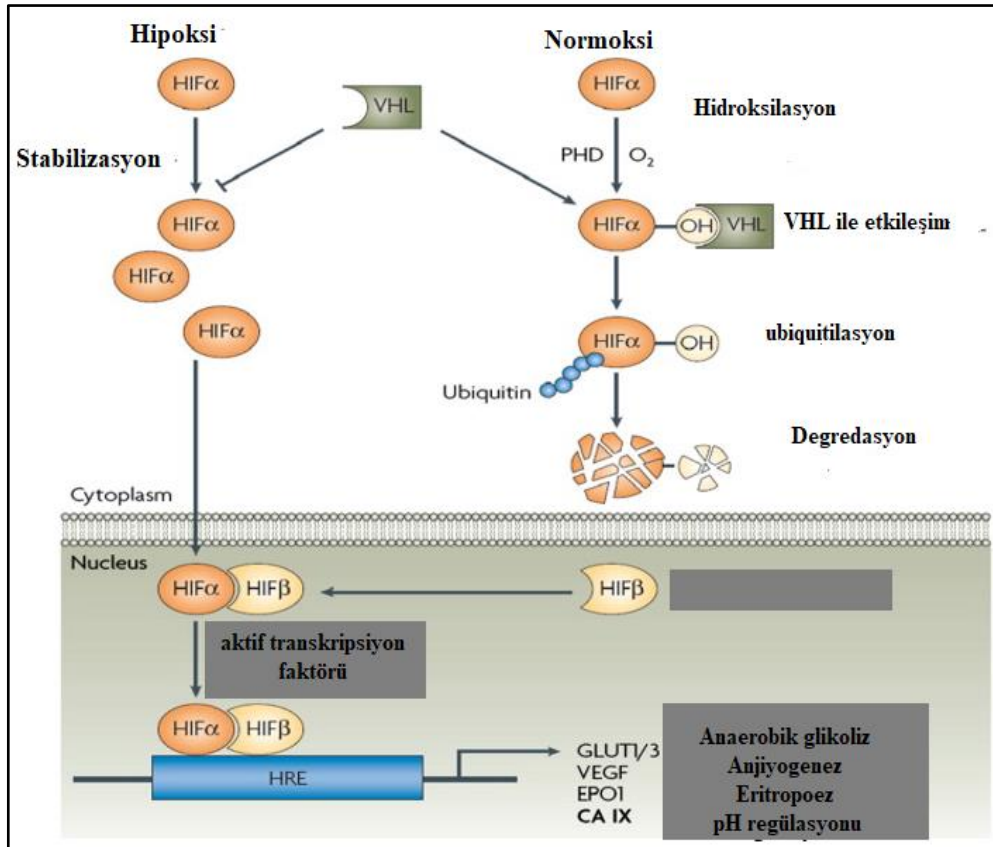
Şekil 2. 14. CA IX proteininin alan organizasyonu (113).

### CA IX'un Ekspresyonunun Regülasyonu

Normoksi şartlarında tümör hücrelerinde CA IX'un ekspresyonu genellikle çok düşüktür. Ancak hipoksi durumuna geçildiğinde ekspresyon güçlü bir şekilde indüklenir. Transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarısında bulunan HIF-1 $\alpha$ 'yı bağlayan hipoksiye yanıt veren element (HRE) içermektedir. HIF-1 $\alpha$ , hipoksi ile indüklenen birçok gene göre CA IX'un aktivitesinde temel düzenleyicidir. Hipoksiye yanıt olarak insan kanser hücrelerinde en güçlü şekilde up-regüle edilen genlerdir (11).

HIF-1 transkripsiyon faktörü, indüklenbilir (HIF-1 $\alpha$ ) ve yapısal olarak eksprese edilmiş (HIF-1 $\beta$ ) iki alt birimden oluşan bir heterodimerdir. HIF-1'in hipoksi şartlarında aktivasyonu, HIF-1 $\alpha$  alt biriminin ekspresyonu ve/veya stabilizasyonu ile sağlanmaktadır (113). Normoksidedeyken prolin-4-hidroksilaz (PHD), HIF-1 $\alpha$  üzerinde Pro-564'ü hidroksile eder. Hidroksillenmiş HIF-1 $\alpha$ 'ya Von Hippel-Lindau proteini (VHL) bağlanarak onu ubiquitin-proteazom sistemi ile degradasyon için hedefler. Hipoksi

şartlarında ise (PHD) dioksijen yokluğunda aktif değildir ve HIF-1 $\alpha$  hidroksillenemez. VHL tarafından tanınmayan hidroksillenmemiş HIF-1 $\alpha$ , stabilize olmaktadır ve birikmektedir. HIF-1 $\alpha$  çekirdeğe girişinden sonra HIF-1 $\beta$  ile aktif bir transkripsiyon faktörü oluşturmak amacıyla dimerleşir. Bunun sonucunda HRE'yi bağlayan HIF transkripsiyon faktörü, onların transkripsiyonunu aktive eder. Tümörijenesis ve pH regülasyonunda yer alan CA IX, eritropoietin (EPO1), VEGF ve glukoz taşıyıcıları (GLUT1 ve GLUT3) hedef genler arasındadır (Şekil 2.15) (114).



Şekil 2. 15. HIF transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği gen ekspresyonları (114).

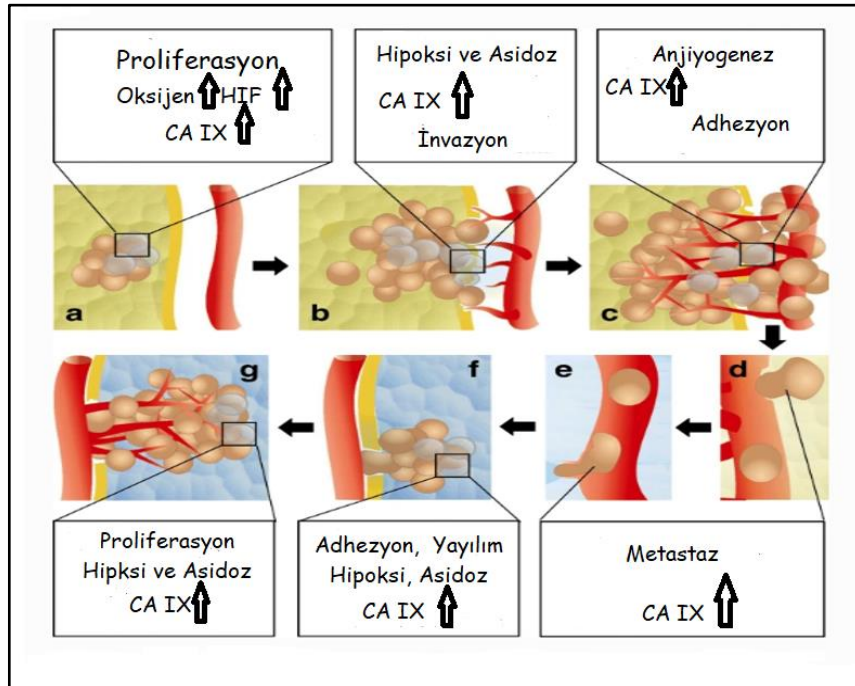
### CA IX Ekspresyonunun Normal Dokudaki Rolü

CA IX normal dokularda sınırlı eksprese edilirken katı tümörlerin çoğunda aşırı eksprese edilmektedir. Bu özelliğinden dolayı kanser tedavisinde ilgi çekici bir hedef haline gelmektedir. CA IX güçlü ekspresyonu insanlarda genellikle ince bağırsağın (duodenum, jejunem ve ileum) mukozasında kript enterositlerinin bazolateral kısımlarında sınırlıdır. CA IX'un zayıf ekspresyonu ise efferent kanallarının epitelinde ve pankreas asiner hücrelerinde rapor edilmiştir (115).

## Tümör Dokusunda CA IX Ekspresyonu

Normal dokularla karşılaştırıldığında çeşitli kanser dokularında CA IX ektopik olarak eksprese edilmektedir. CA IX meme, mesane, akciğer, kolon/rektum, böbrek, baş/boyun ve beyin maligniteleri dahil birçok tümörde eksprese olduğu bilinmektedir. Bu katı tümörlerde CA IX'un aşırı ekspresyonu hipoksi tarafından yönlendirilen farklı mekanizma tarafından stimüle edildiği bildirilmiştir (116).

Hipoksi tarafından CA IX ekspresyonu indüklenir ve asidik ürün üreten metabolik yollara adaptasyon sağlanır. Bu sayede tümör hüresinin yaşaması ve çoğalması sağlanmış olur. CA IX büyüyen tümörlerdeki kanser hücrelerini hücre içi asitleşmeden ve hipoksiden korumaktadır. Ekstrasellüler pH'nın düşmesi ile CA IX invazyona, EMT, ESM bozulmasına, tümör stroma karışmasına ve anjiyogeneze katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Kanser hücrelerinin damarlara adezyonuna aracılık eden CA IX, bölgesel asidoz oluşmasını sağlayarak lümene hücrelerinin geçişine izin vermektedir. Ayrıca dolaşımdaki kanser hücrelerini CA IX, muhtemelen anoikisten koruyabilir ve bir sonraki yerleşme bölgesine ekstrasvazyonlarını kolaylaştırabilmektedir. Metastatik doku hedeflenerek adezyon sağlanır ve hücre yayılması gerçekleştirilmiş olur. Metastatik ilk büyüme CA IX sağladığı pH regülasyonu ile katkı sağlamaktadır. CA IX tüm bu basamaklarda terapötik hedefleme için fırsat sunmaktadır (Şekil 2.16) (117).



Şekil 2. 16. CA IX'un kanser ilerlemede çeşitli basamaklarına katılımı (117).

## **Biyobelirteç Olarak CA IX**

Renal hücreli karsinom için monoklonal antikor G250 kullanılarak spesifik yeni biyobelirteçler keşfedilmiştir. Normal dokularda eksprese olmayan biyobelirteçler tümörde yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Ayrıca diğer tümör tiplerinde de daha düşük oranda olsa da keşfedilmiştir. CA IX ile G250 cDNA'nın %100 özdeş olduğu bildirilmiştir. VHL tümör baskılayıcı genin inaktif olmasını sağlayan mutasyonlar renal hücreli karsinom hastalarının %60-80'inde görülmektedir. Bu mutasyon ile normoksi durumunda HIF-1 $\alpha$  stabilize olur ve CA IX'un ekspresyonunu sağlar. Renal hücreli karsinomun alt tiplerinden biri olan berrak hücreli renal hücreli karsinom vakalarının %97'sinde yüksek düzeyde CAIX eksprese olduğu ve normal böbrek dokusunda olmadığı bildirilmiştir. CA IX bu nedenlerle renal maligniteler için potansiyel bir biyobelirteç olmaktadır (116).

Meme kanseri dahil diğer birçok katı tümör tiplerinde CA IX eksprese olduğu doğrulanmıştır. CA IX'un yüksek ekspresyonu baş/boyun, akciğer, servikal ve meme kanseri dahil birçok kanser türünde kemorezistans ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle CAIX belirli bir malignite için spesifik olmasından ziyade birçok katı tümör için potansiyel bir biyobelirteçtir (111, 116).

### **2.5.3. Karbonik Anhidrazlar için Terapötik Hedefler**

CA'ların önemli rolleri birçok fizyolojik süreçte gösterilmiştir ve bu enzimlerin aktiviteleri ve anormal seviyeleri birçok hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. CA'ların aktivatör ve inhibitörleri ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir. CA aktivatörleri yaşlanma ve Alzheimer gibi patolojilerde, CA inhibitörleri ise kanser, obezite, epilepsi, irtifa hastalığı, glokom gibi durumlar için ilaç ve biyobelirteç araştırmaları için büyük potansiyel taşımaktadır. Tablo 2.1'de CA izoformları için ilaç hedefleri gösterilmiştir (118).

CA inhibitörleri için yapılan çalışmalar sonucunda bu inhibitörler iki temel sınıf ayrılmıştır. Bunlar; CA enziminin aktif bölgesine bağlanarak Zn<sup>+2</sup> iyonu ile etkileşime girenler ve enzimin aktif bölgesine bağlanıp Zn<sup>+2</sup> iyonu ile etkileşime girmeyenler. Zn<sup>+2</sup> iyonuna bağlanan inhibitörler ise dört alt gruba ayrılmıştır. Bu alt grup üyeleri arasında metal kompleksleştirici anyonlar, merkaptofenoller, üreatlar/hidroksamatlar ve sülfonamidler bulunmaktadır (118).

**Tablo 2. 1.** CA izoformları için çeşitli hastalıklardaki ilaç hedefleri.

| CA İzoformları | İlişkili Olduğu Hastalık                   |
|----------------|--|
| CA I           | Retina/Serebral Ödem                       |
| CA II          | Glokom, Ödem, Epilepsi ve İrtifa Hastalığı |
| CA III         | Oksidatif Stres                            |
| CA IV          | Glokom, Retinitis Pigmentosa ve İnme       |
| CA VA/VB       | Obezite                                    |
| CA VI          | Karyogenez                                 |
| CA VII         | Epilepsi                                   |
| CA VIII        | Nörodejenerasyon ve Kanser                 |
| CA IX          | Kanser                                     |
| CA XII         | Kanser ve Glokom                           |
| CA XIII        | Kısırlık                                   |
| CA XIV         | Epilepsi ve Retinopati                     |

### **Kanserde CA IX'un Farmakolojik İnhibisyonu**

Tümörlerdeki CA IX'un aktivasyonu/uyarılması hem anti-kanser ilaçlara karşı kemorezistansa hem de metastatik fenotipin kazanılmasında önemli bir etken olarak kabul edilmektedir. Tümörün hayatta kalması, gelişmesi ve ilerlemesinde CA IX'un önemli bir rolü olduğu bilinmektedir ve kanser biyolojisinin vazgeçilmez bir bileşeni haline gelmiştir. Hipoksik tümörlerde ve metastazik hipoksik tümörlerde bu enzimin katalitik aktivasyonunun inhibisyonu tedavi hedefi haline gelmiştir (119). CA IX'u hedeflemek için üç ana terapötik strateji çalışılmıştır: monoklonal antikolar, küçük molekül inhibitörleri (Sülfonamid, sülfamat ve sülfamit) ve karbonik anhidraz inhibitörleri (CAI) ile türevlendirilmiş nanopartiküller (115). CA IX 'un hedeflenmesi kanser tedavisi için muazzam bir potansiyeldir ve bu enzim inhibitörler için kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır (116).

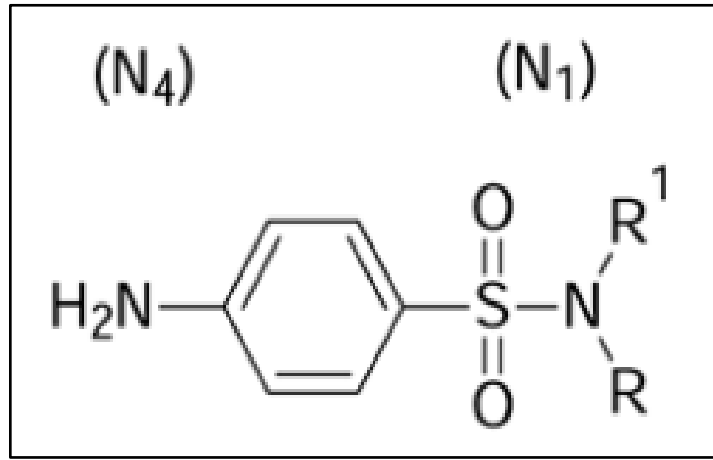
### **2.6. Sülfonamidler**

Sülfa ilaçlar olarak da bilinen sülfonamid bileşikleri çeşitli ilaç sınıflarının temelini oluşturmaktadır. Sülfonamid bölümünü (SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) yapısında bulunduran



moleküller sülfonamid olarak adlandırmaktadır. Tıp, eczacılık ve tarım gibi birçok farklı alanlarda sülfonamidler ilgi odağı haline gelmiştir (120). Anti-fungal, anti-protozoal, anti-bakteriyel, anti-inflamatuar, başlatma inhibitörleri, peptidik olmayan vazopresin reseptör antagonistleri ve antihipertansif ajan dahil olmak üzere 30'dan fazla geliştirilen ilaç klinikte kullanılmaktadır. Son dönemlerde ise HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği), Alzheimer ve anti-kanserojen ajanlar kullanılmaya başlanmıştır (121).

Sülfonamidlerin genel yapısı Şekil 2.17'de gösterilmektedir. Sülfonamidlerin binlerce kimyasal varyasyonları sentezlenmiştir ve sentezlenen bu bileşikler değişen farmakolojik özelliklere sahiptir.  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  bölümündeki bir hidrojen atomu ile heterosiklik halkanın değişiminden elde edilen bileşikler en iyi terapötik sonuçlar vermiştir. Protein bağlanmasında en fazla etkiye sahip olan N1 grubu sülfonamidin lipofilitesidir ve sülfonamidin lipitte çözünürlüğü ne kadar artarsa proteine bağlanması o derece artmaktadır. N4 (anilin) amino grubundaki modifikasyonlar ilaç yapımında aktivite kayıplarına neden olabilir. Bu yüzden bu grup aktivite için çok önemlidir (Şekil 2.17) (121).

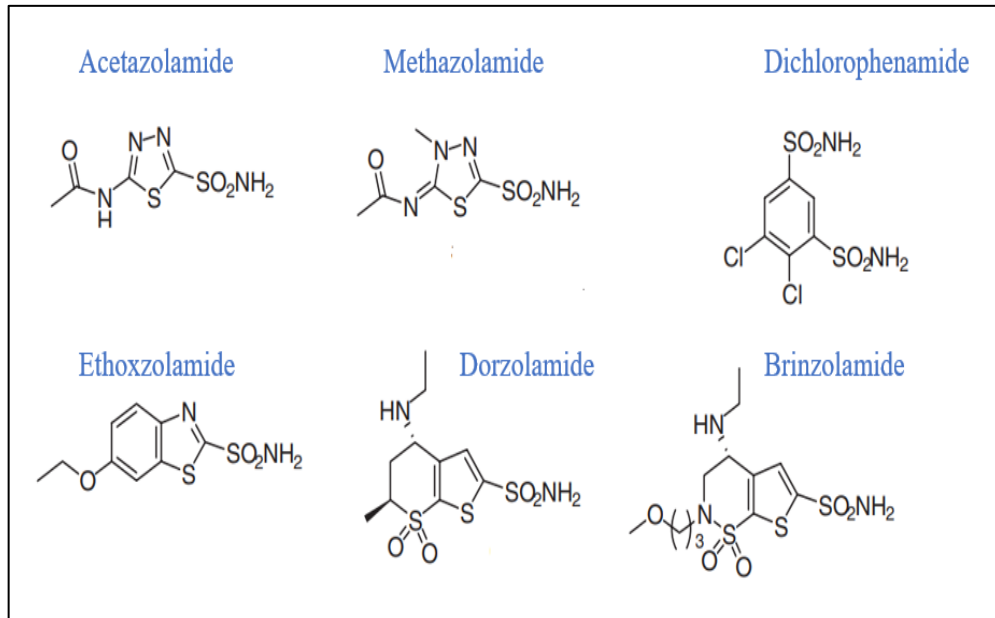


Şekil 2. 17. Sülfonamidlerin genel yapısı ( $\text{R}=\text{R}_1=\text{H}$  ise) (121).

Kanser hücreleri büyümek ve gelişebilmek için yüksek metabolik hız gösterirler ve bundan dolayı yetersiz perfüze olmuş bölgelerde hipoksinin oluşmasına neden olur. Bu sayede normal hücrelere göre tümör hücreleri asidik ortamda büyüyüp çoğalabilirler (122). Hipoksik tümörlerin pH düzenleyicileri arasında CA II, IX ve XII yüksek oranda bulunur. Yüksek metabolik hız  $\text{CO}_2$  gazının aşırı üretilmesine sağlar ve  $\text{HCO}_3^-$  oluşumu için CA'lar  $\text{CO}_2$  gazını kullanırlar (123). Hipoksik olan ve  $\text{CO}_2$  üreten tümörlerde CA

önemlidir ve CA IX ve CA XII'nin birçok katı tümörde yüksek miktarda eksprese olduğunu açıklamaktadır.

Sülfonamidler CA'lar enziminin aktif bölgesindeki metal iyonuna bağlanarak inhibitör olarak işlev gösterirler. İnsan kanser hücrelerinde spesifik sülfonamid CA inhibitörlerinin tedavideki potansiyeli ilk olarak Chegwidde ve Spencer tarafından ileri sürülmüştür (124). Tümör ilişkili izoenzim olan CA IX'un inhibisyonu Brinzolamid, Dorzolamid, Asetazolamid, Diklorofenamid, Etokszolamid ve Metazolamid gibi heterosiklik ve aromatik bir dizi sülfonamid ile ilk olarak araştırılmıştır. Ayrıca CA'ların sitozolik ve zara bağlı diğer izoenzimlerinde de inhibisyonları araştırılmıştır. CA IX diğer izoenzimlere göre bu sülfonamidler için sıra dışı bir inhibisyon göstermiştir. Bu sülfonamidler, klorosülfonilasyon, asetilasyon sonrasında 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-sülfonamid veya amidasyon reaksiyonları ile anilinlerden sentezlenmiştir. Bu sülfonamidlerin CA IX'un inhibisyon etkileri araştırılmıştır ve hem güçlü inhibitör etki hem de basit aromatik özellikler göstermiştir. Ayrıca CA I, II, IV'e göre farklı inhibisyon profili göstermiştir. CA IX tümör dokularında eksprese edilen bir izoenzim olduğundan bu inhibisyon profili potansiyel inhibitör tasarımı için hedef haline gelmiştir (125).



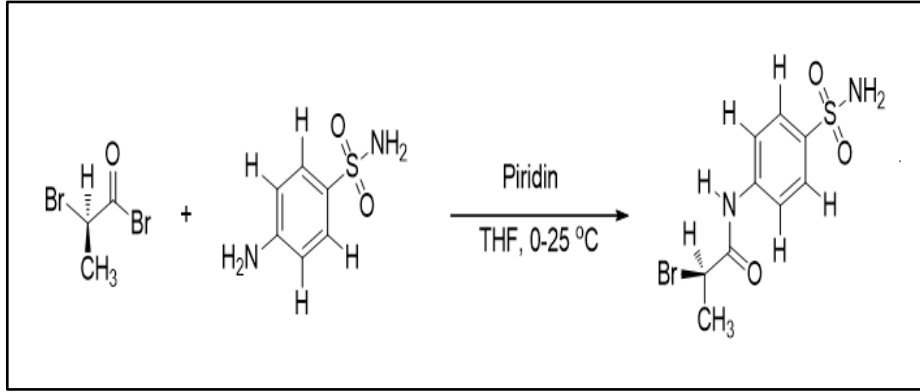
**Şekil 2. 18.** Klinikte sıklıkla kullanılan CA inhibitörleri (126).

Asetazolamid, Metazolamid veya Etokszolamid gibi klinikte kullanılan sülfonamidlerin insan lenfoma hücrelerinin gelişmesini ve büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (127). Başka bir çalışmada kullanılan sülfonamid türevi İndisulam önemli

bir anti-kanser aktivite göstermiştir (128). Sülfonamidlerin CA inhibisyonunun keşfedilmesinden beri antikanser ajanlar olarak araştırılmıştır. Asetazolamid, Metazolamid, Etokszolamid, Dichlorophenamide ve İndisulam klinikte kullanılan sülfonamidlerdir (110).

### 2.6.1. Sentezlenen Sülfonamid Türevi

Bu çalışmada kullandığımız bir sülfonamid türevi olan MMH-1 bileşiği bazı modifikasyonlarla sentezlenmiştir (129). Yapılan analiz sonucunda MMH-1 maddesinin normal meme hücresi (CRL-4010, IC50: 240.3  $\mu$ M) üzerinde çok düşük bir sitotoksik etki gösterirken meme kanseri hücresi (MDA-MB-231, IC50: 8.4  $\mu$ M) üzerinde çok yüksek düzeyde sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Kolon ve meme kanser hücrelerine karşı pozitif kontrol ilaç olarak kullanılan Cisplatin ve katı tümörlerde kullanılan Busulfanın IC50 değerleri sırasıyla; (4.38  $\pm$  0.05  $\mu$ M, 5.77  $\pm$  0.4  $\mu$ M), (173.2  $\mu$ M, >200  $\mu$ M) iken MMH-1 bileşiği (8.461  $\pm$  0.35  $\mu$ M,) olarak sonuç verdi. Sitotoksik analizler haricinde yapılan diğer moleküler biyolojik analizler sonucunda MMH-1 maddesinin meme kanseri hücrelerinde oksidatif stres üzerinden apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir.



Şekil 2. 19. MMH-1 bileşiğinin sentezi ve yapısı.

MMH-1 bileşiği bazı modifikasyonlarla literatür prosedürüne göre sentezlendi (129). Kuru tetrahidrofuran (30 mL) içindeki 2-bromopropionil bromür (2.16 g, 10.00 mmol) damla damla tetrahidrofuran (30 mL) içinde çözülmüş sülfanilamid (1.72 g, 10.00 mmol) ve piridin (1.19 g, 15.00 mmol) karışımına eklendi. Reaksiyon susuz koşullar altında 0 °C'de 4 saat karıştırıldı. Reaksiyon daha sonra oda sıcaklığına ısınmaya bırakıldı

ve 24 saat daha karıştırıldı. Reaksiyonun ilerlemesi TLC ve FT-IR ile izlendi. Oluşan piridinhidroklorür tuzunun beyaz çökeltisi filtre edildi ve kalan süzüntü vakum altında beyaz bir katı verecek şekilde buharlaştırıldı. Daha sonra, ürün dietil ile yıkandı ve THF/CHCl<sub>3</sub> (8/2) 'den yeniden kristallendirildi, beyaz kristal ürün elde edildi.

## 2.7. Metabolomik

Metabolomik organizmadaki metabolitlerin ve metabolizmanın inceleyen proteomik, genomik ve transkriptomik gibi omik biliminden biridir. Metabolomik çalışmalar organizmalardaki değişikliklerle beraber küçük moleküllerin (<1.000 Da) kantitatif ve kalitatif özelliklerini hedeflemektedir (130). Son dönemde, metabolitlerin analizi ile birçok çeşitli alanda metabolomik yaklaşımı uygulanmaya başlamıştır. Biyolojik sistemlerde bulunan lipitler, amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, steroidler ve ksenobiyotikler gibi metabolitlerin saptanması metabolomik bilimini önemli hale getirmiştir (131). Belirli bir fizyolojik dönemde kan, idrar, doku ve diğer vücut sıvıları gibi biyolojik numunede küçük molekülü metabolitlerin toplamına metabolom denir. Metabolomun genoma kıyasla önemli bir avantajı, çevresel etkileri yansıtma ve belirli bir zamanda bireyin patofizyolojik durumunun sergilenmesidir (132).

Metabolomik ürünlerin araştırılmasında nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve kütle spektrometrisidir (MS) en yaygın kullanılan iki temel yaklaşımdır (133). MS teknolojisinde sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi en çok kullanılan ayırma teknikleridir (134). Numunenin türüne ve çalışmanın hedefine göre uygun teknik seçilmektedir. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisinin yüksek oranda tekrarlanabilirliği, düşük miktarda numune gereksinimi ve yüksek seçiciliği avantajları iken düşük hassasiyet ve sadece bol türlerin tespiti dezavantajlarıdır. Öte yandan, MS kromatografik ayırma ile entegre edildiğinde yüksek özgüllük ve hassasiyet sahip olur ve bu sayede hedeflenen metabolitler için avantajlı hale gelir. MS'in en önemli dezavantajı ise nicelleştirmedir (135).

Metabolomik biliminin amaçları arasında belirli bir hastalığın altta yatan patolojik sürecin aydınlatılması ve terapötik müdahalelere tepkilerini anlamak yer almaktadır. Ayrıca patolojik yollar ve normal yollar arasında ayırım yapılmasına izin vererek hastalıkların tanı konulmasında ve prognoz tahmin edilmesinde birçok olanak sağlamaktadır (136). Metabolomik organizmanın fizyolojisi ile proteomik ve genomikten daha yakından bağlantılıdır. Organizmanın hastalanması ile patofizyolojik süreçte

değişiklikler meydana gelir ve çeşitli metabolitlerin oluşmasına ve değişmesine neden olur. Belirli metabolitlerin analiz ile hasta ve sağlığının karşılaştırılması hastalığın teşhisinde kullanılabilecek biyobelirteçlerin keşfine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda MS tabanlı metabolomik yöntemler birçok kanserde (meme, yemek borusu, mide, böbrek, beyin ve mesane kanseri gibi), böbrek hatalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik hastalıkları incelemek için kullanılmaktadır (137).

### **2.7.1. Kanserde Metabolomik**

Kanser nedeniyle her yıl on milyonlarca insanın ölmesi kanseri önemli küresel bir sorun haline getirmektedir. Kanserinin nedenlerini ve etkileyen faktörleri anlamak kanserin nasıl tedavi edilmesi ve ortadan kaldırılması için önemlidir. Genetik faktörler, beslenme ve çevre gibi faktörler kanserin oluşumunu etkilediğinden, bilim insanları kanserin oluşumu üzerindeki etkileri anlamak ve tanımlamak için son dönemlerde metabolomik bilimini kullanmaktadır (137). Kanser hücrelerinde kontrolsüz ve düzensiz çoğalmanın ihtiyaçlarını karşılamak için metabolizma düzensiz hale gelmektedir. Hücrel metabolizmanın yeniden şekillenmesi ile kanserde erken tanı ve tedavinin planlanması ve yeni terapötik hedeflerin keşfinde kullanılabilecek metabolik fenotiplere yol açar (138).

Kanseler genellikle tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu zaman radyografik yöntemlerle tespit edilmektedir. Bu nedenle erken ve alternatif tanı yöntemlerine ihtiyaç devam etmektedir. MS tabanlı metabolomikler araçlar kanserde tanı biyobelirteçlerinin keşfinde ve prognoz takibinde son zamanlarda çok sık araştırılmaktadır (139). Karaciğer, mesane, prostat, ağız, mide, böbrek, beyin, akciğer, kolorektal, over, serviks ve meme kanseri gibi birçok kanser çeşidi bu araştırmalardan bazılarıdır (140).

### **Kanserde Amino Asitler**

Klasik olarak kanser metabolizması, glikoliz ve trikarboksilik asit döngüsü (sitrik asit döngüsü veya TCA döngüsü) dahil olmak üzere merkezi karbon metabolizmasına odaklanmıştır. Ancak son dönemlerde amino asitlerin kanser metabolizması üzerindeki fonksiyonları sıklıkla araştırılmaya başlanmıştır. Ayrıca amino asitler organizmada redoks dengesi, biyosentetik destek, enerji düzenlenmesi ve homeostazın sürdürülmesine hizmet etmektedir. Amino asitlerin bu geniş faaliyetleri kanser araştırmalarında popüler hale gelmektedir (141).

Kanser hücrelerinde amino asitler bir anaplerosis metaboliti olarak görev yaparlar ve mitokondriyal ATP üretimini sürdürmek için TCA döngüsüne katılırlar. Örnek olarak glutamat anaplerotik metabolizması,  $\alpha$ -ketoglutarat ve ardından oksaloasetat üretir ve glutaminoliz olarak adlandırılan bir dizi biyokimyasal reaksiyon yoluyla TCA döngüsünü besler. Glukoz yetersizliği olduğu durumlarda glutamat veya glutamin türevli fumarat, malat ve sitrat önemli ölçüde artar. Benzer şekilde hipoksi durumunda kanser hücrelerinde glutamat, glutamin kullanımı büyük ölçüde değişir (142).

Amino asitler tümörün gelişmesini ve metastaz yeteneğini destekleyen çeşitli türevler üretir. Arjinin amino asidinden türevli polimainler kromatin yapısını ve hücre proliferasyonu regüle ederek gen ekspresyonunu değiştirebilmektedir. Ek olarak triptofandan üretilen kynurenin immünsupresyona neden olmaktadır (143). Ayrıca kanser hücrelerinin proliferasyonu hücre ölümüne yol açabilecek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve birikimine neden olur. Kanser hücreleri bu zararlı birikimin üstesinden gelebilmek için glutamat, glisin ve sistein amino asitlerinden sentezlenen antioksidan molekül olan glutatyona bağımlıdır (144, 145). Kanser hücrelerinin bu aşırı çoğalması ve gelişmesi beraberinde enerji ihtiyacının artmasına neden olmaktadır. Bilindiği üzere glukoz kanser büyümesi için temel enerji kaynağıdır ama glutamin de büyük ölçüde anaplerotiktir ve sitrik asit döngüsünde amin grubunu da bırakır (146). Biyosentetik yollara da amino asitlerin birçoğu katılmaktadır. Bu yollardan biri pürin ve pirimidin biosentezi ile nükleotid sentezidir. Glisin, glutamin ve aspartat bu sentezde gerekli olan amino asitlerdir (147).

Amino asitlerin kanser metabolizması üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar hem tümörüjenik hem de tümör baskılayıcı rolleri olduğunu gösterilmiştir. Kanserde in vitro olarak amino asit metabolizmasının inhibisyonu çeşitli başarılar sağlarken in vivo olarak çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Tümör hücrelerinde amino asitlerin kullanımının tam olarak aydınlatılması terapötik kullanımını, ilaç gelişimini, prognozu ve biyobelirteç keşfini sağlayabilecektir (141).

### **Kanserde Karnitin**

Karnitin ( $\beta$ -hidroksi- $\gamma$ -N-trimetilaminobütirik asit), hayvansal gıdalı besinlerden yaygın olarak alınır ancak çok sınırlı düzeyde bitkilerde de bulunmaktadır. Karnitinin yaklaşık %75'i insanlarda diyet yoluyla alınmaktadır. Geriye kalan kısmi endojen olarak karaciğer ve böbrekte lizin ve metiyonin amino asitlerinden sentezlenmektedir. En çok

karnitin barındıran kalp ve iskelet kası ise karnitin sentezleyemez bu nedenle plazmadan almak zorundadır. Bağırsak bakterileri tarafından emilmeyen karnitinler parçalanır. Karnitin temel olarak esterleşmemiş (L-Karnitin) formda ve az bir oranda ester formlarda bulunmaktadır. Neredeyse karnitinlerin tamamı (%99) hücre içerisinde bulunmaktadır. Karnitin regülasyonunda saptalar şeker hastalığı, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, endokrin bozukluklar ve kanser gibi birçok hastalıkla yakından ilişkilidir (148, 149).

L-karnitinin temel biyolojik işlevi mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyon için yağ asitlerini taşımaktır. Bu taşınım sırasında ayrıca karnitin esterleri ya da diğer adıyla açilkarnitinler oluşmaktadır (150). Ayrıca mitokondriyal açil-CoA/CoA dengesinin sürdürülmesinde, peroksizomal yağ asitlerinin oksidasyonunda ve keton cisimlerinin üretiminde fonksiyonları bulunmaktadır. Enerji metabolizmasında fonksiyon gösteren karnitinlerin mitokondriyal ya da metabolik bozulmaları çeşitli hastalıklarla ilişki göstermektedir (151). Nörodejeneratif bozuklulardan Parkinson ve Alzheimer, ensefalopati, kardiyomyopati, siroz, obezite, diyabet, kardiyovasküler ve kanser bu hastalıklardan bazılarıdır (148, 151).

Kanser diğer hastalıklar göz önüne alındığında yüksek enerji talebi gösteren patolojik bir durumdur. Kanser hücrelerinin anormal çoğalma hızlarını ve gelişimlerini devam ettirebilmeleri için enerjiye ihtiyaçları vardır (19). Yağ asitlerinin metabolizmalarındaki bozukluklar ile kanser arasında ilişki uzun zamandan beridir araştırılmaktadır. Bazı kanser türlerinde yağ asitlerinin kullanımında artışların bazılarında azalmanın olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu göz önüne alındığında karnitin miktarının ve/veya metabolizmasının düzenlenmesi gerekmektedir (152). Kanserde karnitin trafiği yağ asitlerinin oksidasyonunda karmaşık metabolik ağların ilk sürecini oluşturmaktadır. Yağ asidi oksidasyonu uygun ve/veya düzenli karnitin trafiği olmazsa gerçekleşemez (152, 153).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3. 1.** Çalışmada kullanılan araç ve gereçler.

| Ekipma Türü ve Modeli              |                    | Kimyasallar ve Modeli   |               |
|------------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|
| Biyogüvenlik kabini                | Tel Star           | DMEM                    | Sigma Aldrich |
| CO <sub>2</sub> ’li 37°C inkübatör | Thermo Scientific  | Fetal Bovine Serum      | Sigma Aldrich |
| İnverted ışık mikroskop            | Olympus CKX41      | Penicillin/Streptomycin | Sigma Aldrich |
| Su banyosu                         | Memmert            | Trypsin EDTA (%2.5)     | Sigma Aldrich |
| 37°C inkübatör                     | Memmert            | %0,5’lik Trypan-Blue    | Sigma Aldrich |
| Flouresans mikroskop               | Olympus U-RFL-T    | Mouse Caspase 3 Kit     | Elabscience   |
| Santrifüj                          | Thermo Scientific  | Mouse CA IX Kit         | Elabscience   |
| PCR                                | Applied Biosystems | Mouse E-Cadherin Kit    | Elabscience   |
| Real time PCR                      | Qiagen Rotorgene   | Mouse Vimentin Kit      | BT LAB        |
| Vorteks                            | Isolab             |                         |               |
| Spektrofotometre                   | Nano Drop          |                         |               |
| Flow sitometri                     | BD Facs Via        |                         |               |
| -80 Buzdolabı                      | Nüve               |                         |               |
| -20 Buzdolabı                      | Arçelik            |                         |               |
| Doku takip cihazı                  | Thermo Scientific  |                         |               |
| Mikrotom Cihazı                    | LEICA RM2245       |                         |               |

#### 3.2. Çalışmanın Planlanması

MMH-1’in anti-kanser etkisinin araştırıldığı bu çalışma in vitro ve in vivo olarak iki bölümden oluşmaktadır. İn vitro bölümünde MMH-1, 5-Fluorouracil (5-FU) ve CA IX inhibitör etkisi bilenen sülfonamid türevi SLC-0111’in sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile 4T1 hücrelerine olan apoptotik etkileri Akridin Oranj /Ethidium Bromide boyama ve Annexin-V ile flow sitometrik olarak araştırıldı. Ayrıca Moleküler Docking analizi ile MMH-1’in CA IX üzerine inhibitör etkisi belirlendi. İn vivo bölümünde ise kanser oluşturulan ve kontrol grubunu oluşturan farelerden alınan plazma, tümör ve meme dokularından CA IX, vimentin ve E-Cadherin, kaspaz 3 ekspresyonları ELISA ve PCR yöntemleri ile analiz



adildi. Ayrıca farelerden alınan tümör dokularında histopatolojik analiz için Hematoksilen ve Eozin (HE) boyama yapıldı. Meme kanserinin ve MMH-1'in organizmadaki değişen metabolik mekanizmalar üzerine olan etkileri amino asit ve karnitin analizleri yapılarak araştırıldı.

### **3.2.1. Moleküler Docking**

Moleküler docking hesaplamalarında, yapılacak tüm analizler Schrödinger firmasının Maestro programı aracılığıyla gerçekleştirildi. Su fazında B3LYP-D3/6-31G(d) seviyesinde elde edilen kararlı yapılar ve bu yapıların pH=2.5±0.5, 3.5±0.5, 4.5±0.5, 5.5±0.5, 6.5±0.5, 7.5±0.5, 8.5±0.5 koşullarındaki olası yapıları elde edilerek minimize edildi. Farklı pH koşullarının dikkate alınmasındaki sebep ilaçların hedef bölgeye ulaşırken birden fazla ortamda ve farklı pH koşullarına maruz kalmaktadır. Bu yüzden farklı pH koşullarındaki tüm yapıların dikkate alınmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

PDB ID: 5FL6 olan CA IX proteinin OPLS4 metodunda minimize edilerek ve minimizasyon esnasında pH =5±3 olarak belirlendi. Bu esnada "Protein Preparation" kullanılacaktır. Bir proteinin reseptör bağlanma bölgesi dahil en aktif beş bölgesi "SiteMap" paketi kullanılarak belirlendi ve bu bölgeler "Receptor Grid Generation" paketi kullanılarak tanımlandı.

### **3.2.2. 4T1 Tümör Hücre Kültürlerinin in vitro Olarak Sürdürülmesi**

4T1 hücreleri (Üçlü negatif (HR-/HER2-)) hücre kültüründe hücrelerin büyüüp gelişebilmesi için DMEM-F12 (Sigma Aldrich) (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin) ortamı kullanıldı. Hücreler 25 cm<sup>2</sup> kültür şişelerinde 37<sup>0</sup>C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübe edildi. Her deney için farklı kültür kapları kullanıldı.

### **3.2.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi**

25 cm<sup>3</sup> kültür kaplarına hücreler ekildikten sonra tripsinizasyon ile %80-90 oranında dolunca kaldırılıp 96 kuyucuklu plaklara 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Besiyerler 24 saat sonra uzaklaştırıldıktan sonra MMH-1, 5-FU ve SLC-0111 bileşiklerinin 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarında olacak şekilde hücrelere

uygulandı. Her bir kuyucuğa 200 µl bileşiklerden eklendi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde ve 24, 48 ve 72 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde MMH-1, 5-FU ve SLC-0111 doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi incelenmiş olacaktır. İnkübasyondan sonra 10 µl MTT solüsyonu (5mg MTT boyası+1 mL serumsuz besiyeri) 200 µl serumsuz besiyerine eklendi ve inkübasyona (4 saat) bırakıldı. İşlem bittikten sonra dimetil sülfoksitde (DMSO) formazon kristalleri çözdürüldü ve 570 ve 690 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans ölçüleri kaydedildi.

#### **3.2.4. Akridin Oranj /Ethidium Bromide Boyaması**

4T1 hücrelerine 48 saat MMH-1 bileşiği ile muamelesi sonrası hücrelerde apoptozun morfolojik olarak tespit edilmesi için yapıldı. MMH-1 ile muamele edilen hücreler inkübasyon sonrasında PBS ile yıkanarak %70 etanol ile fikse edildi ve akridin oranj/ethidium bromide çalışma solüsyonu (Cat No./ID: A6014-E1510) (Sigma Aldrich, Almanya) ile boyanarak floresans mikroskopta incelendi. MMH-1 bileşiğinin 3 ve 6 µM; 5-FU kemoterapik ilacın ise 30 µM dozunda 48 saat muamele edildi.

#### **3.2.5. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi**

MMH-1 maddesinin olası sitotoksik etkilerinin apoptotik yolağın aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozisle mi olduğu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Cat No./ID:556547) (BD, New Jersey, ABD) kit protokolü göre incelendi. 6 kuyucuklu deney kaplarına 5 x 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan 24 saat sonrasında uygun doz ve saatte bileşikler uygulanarak 5 µL florokrom-konjuge Annexin V ve 5 µL Propidium Iodide boyaları eklendi. 15 dakika inkübe edildikten sonra, flow sitometri (BD Via, New Jersey, ABD) ile analiz edildi.

#### **3.2.6. Farelere 4T1 Tümör Hücresi Enjeksiyonu**

4T1 hücrelerini 1 ml'lik bir şırıngaya aktarıp BALB / c farelerinin meme bezlerine deri altından (subkutan yol) 100 µl hacimde (1 x 10<sup>6</sup> hücre bulunur) 4T1 tümör hücreleri ile fareler inoküle edildi. 10 µl %0,5'lik Trypan-Blue ve 10 µl hücre süspansiyonu karışımı ışık mikroskobu ile thoma lamında boyanmamış hücreler (canlı) sayıldı. 1

ml'deki hücre sayısı = A x B x 10<sup>4</sup> (A:Canlı hücre sayısı, B: Dilüsyon faktörü (Trypan-Blue)(x2)).



**Şekil 3. 1.** Farelere 4T1 hücrelerinin enjeksiyonu.

### **3.2.7. Grupların Oluşturulması**

Bu çalışmada fareler 6 grup ve her grupta 10 fare olacak şekilde oluşturuldu (Tablo 3.2). Deneyde 8 haftalık dişi BALB/c fareleri (18-22 gram) kullanıldı. Yaklaşık iki hafta sonunda tümör oluşan fareler (yaklaşık 50 mm<sup>3</sup>) randomize olarak gruplara ayrıldı. Kanseri oluşturulmayan Kontrol (Negatif Kontrol) ve kanseri oluşturulan DMSO (Pozitif Kontrol), MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU + MMH-1 (50mg) toplam 6 grup oluşturuldu (Tablo 3.2). Kontrol ve DMSO gruplarına DMSO çözücüsü diğer gruplara ise MMH-I, 5-FU ya da her ikisi birlikte 21 gün boyunca günde bir intraperitoneal (İ.p) olarak verildi. Etkin maddeler (MMH-I ve 5-FU) DMSO ortamında çözüldükten sonra %1 DMSO olacak şekilde PBS (phosphate buffered saline) ile dilüe edildikten sonra son konsantrasyon (100 µl) hazırlandı.

**Tablo 3. 2.** Grupların oluşturulması ve etken maddelerin doz ve veriliş yolları.

| Gruplar             | Uygulanan maddeler veya çözücüler | Uygulama dozu                  | Uygulama yolu |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------|
| Kontrol             | DMSO                              | %1                             | İ. p          |
| DMSO                | DMSO                              | %1                             | İ. p          |
| MMH-1 (50mg)        | MMH-1                             | 50 mg/kg                       | İ. p          |
| MMH-1 (100mg)       | MMH-1                             | 100 mg/kg                      | İ. p          |
| 5-FU                | 5 Fluorouracil                    | 20 mg/kg                       | İ. p          |
| 5-FU + MMH-1 (50mg) | 5 Fluorouracil ve MMH-1           | Sırasıyla 20 mg/kg ve 50 mg/kg | İ. p          |

### 3.2.8. Letal Doz Çalışması

MMH-1'in letal dozu (LD50) Karber'in aritmetik yöntemi göre hesaplanmıştır (154). LD50 çalışmasında her grupta 4 fare olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Sırasıyla gruplara 125, 250, 500 ve 1000 mg/kg dozlarında MMH-1 maddesi verildi ve sırasıyla ölen fare sayıları 0, 1, 2, 4 oldu. Şekil 3.2'deki formüle göre LD50 hesaplandı ve 515.62 mg/kg bulundu.

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\Sigma(ab)}{n}$$

LD100: Denemede %100 ölüm dozu  
n: Her gruptaki hayvan sayısı  
a: Ardışık iki doz arasındaki fark  
b: Ardışık iki dozdan ölümlerin aritmetik ortalaması

**Şekil 3. 2.** Letal doz hesaplama formülü.

### 3.2.9. Farelerin Bakımı ve Tümör Takibi

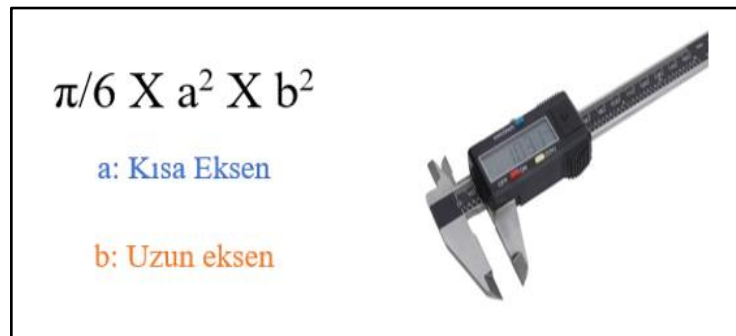
Bütün fareler, 12 saatlik aydınlık / 12 saatlik karanlık bir döngü altında kontrollü bir atmosfer altında (%50 bağıl nemde  $25 \pm 1$  °C) barındırıldı. Hayvanlar her zaman yiyecek ve suya serbestçe erişebildi ve yemek kapları her gün taze diyetle dolduruldu.

Deney hayvanı kullanımı Harran Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan protokollere göre gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3. Tümör oluşumu.

Tümör varlığı için işaret parmağı ve baş parmak ile palpe ederek enjeksiyon alanını günlük olarak tümörü izlendi. Tümör hacimleri Şekil 3.4'te gösterilen formüle göre hesaplandı. Tümör hacimlerinin ölçümleri vernier caliper ile yapıldı.



Şekil 3. 4. Tümör hacimlerinin hesaplanması ve vernier caliper.

### 3.2.10. Tümör ve Kan Örneklerinin Alınması

Deney sonunda fareler genel anestezide alındı (Ketamin/Ksilazin 200/10 mg/kg im,ip). Anestezi bulguları oluşunca ve farelerin refleksleri kaybolduktan sonra,



iyatrojenik hemoliz oluşmaması için önceden heparin ile yıkadığımız enjektörlere doğrudan kalbe girerek kan örnekleri alındı (Şekil 3.4). Daha sonra alınan tümör dokuları % 10' luk formol solüsyonuna alınarak patoloji laboratuvarına gönderildi (Şekil 3.5) Ayrıca alınan kanlar karnitin analizi için 5 µl (yaklaşık 2 damla) Gutrie kağıtlarına damlatıldıktan çalışma gününe kadar saklandı.



**Şekil 3. 5.** Kan örneklerinin alınması.



**Şekil 3. 6.** Tümör dokularının alınması.

### **3.2.11. ELISA Analizleri**

Tümör ve normal dokular yaklaşık 50- 100 mg tartıldı ve 10 kat dilüe edilecek şekilde PBS eklenerek homojenizatörde yaklaşık 30 dakika homojenize edildi. 5000 rpmde 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları temiz tüplere alınarak -20 °C'de çalışma gününe kadar saklandı. Çalışılacak olan örnekler en az 2 saat öncesinde oda sıcaklığına alındı ve kit protokolleri (CA IX Katalog No: E-EL-M0227, Kaspaz 3 Katalog No: E-EL-M0238, E-Cadherin Katalog No: E-EL-M0211 ve Vimentin Katalog No: E2669Mo) uygulandı.

#### **Standart Hazırlama**

CA IX için: 10,000 g'de 1 dk santrifüj edilen standart (1000 pg/mL stok) üzerine Reference Sample & Standard Diluent (RS-SD) (1 ml) eklenerek homojenizasyon yapıldı ve yaklaşık 10 dakika bekletildi. 7 adet temiz tüp yazılarak (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 ve 0 pg/mL) 500µl RS-SD eklendi. İlk tüpe stok solüsyonunundan 500 µl alındı bir sonrakine aktarıldı son tüpe kadar bu şekilde devam edildi.

Kaspaz 3 için: 10,000 g'de 1 dk santrifüj edilen standart (10 ng/mL stok) üzerine RS-SD (1 ml) eklenerek homojenizasyon yapıldı ve yaklaşık 10 dakika bekletildi. 7 adet tüp yazılarak (5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16 ve 0 ng/mL) 500µl RS-SD eklendi. İlk tüpe stok solüsyonunundan 500 µl alındı sonrakine aktarıldı son tüpe kadar bu şekilde devam edildi. E-Cadherin için: 10,000 g'de 1 dk santrifüj edilen standart (4000 pg/mL stok) üzerine RS-SD (1 ml) eklenerek homojenizasyon yapıldı ve yaklaşık 10 dakika bekletildi. 7 adet temiz tüp yazılarak (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 ve 0 pg/mL) 500µl RS-SD eklendi. İlk tüpe stok solüsyonunundan 500 µl alındı bir sonrakine aktarıldı son tüpe kadar bu şekilde devam edildi. Vimentin için: 10,000 g'de 1 dk santrifüj edilen standart (48 ng/mL stok) üzerine RS-SD (1 ml) eklenerek homojenizasyon yapıldı ve yaklaşık 10 dakika bekletildi. 7 adet tüp yazılarak (24, 12, 6, 3, 1.5 ve 0 pg/mL) 500µl RS-SD eklendi. İlk tüpe stok solüsyonunundan 500 µl alındı sonrakine aktarıldı son tüpe kadar bu şekilde devam edildi.

#### **Çalışma Prosedürü (CA IX, Kaspaz 3 ve E-Cadherin)**

ELISA kitindeki çalışma protokollerine göre işlemler sırasıyla yapıldı.

1. 96 kuyucuklu playte 100 µl standart, örnek ve blank olacak şekilde dikkatlice eklendi ve 90 dk 37°C’de inkübe edildi.
2. 1 :100 oranında hazırlanmış biyotinlenmiş deteksiyon çalışma solüsyonundan 100 µl eklenerek, yapışkan film ile kaplandı ve 60 dakika 37°C’de inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuktaki sıvılar uzaklaştırıldı ve yaklaşık 350 µl olacak şekilde yıkama solüsyonu ile 1-2 dk arayla 3 tekrar yıkandı.
4. 100 µl 1 :100 oranında hazırlanmış HRP-konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve 30dk 37°C’de inkübe edildi.
5. Tüm kuyucuktaki sıvılar uzaklaştırıldı ve yaklaşık 350 µl olacak şekilde yıkama solüsyonu ile 1-2 dakika arayla 5 tekrar yıkandı.
6. 90 µl substrat solüsyonu eklenerek 15 dakika 37°C’de inkübe edildi.
7. 50 µl stop solüsyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Optik yoğunluğu 450nm de okutularak tespit edildi.

### **Çalışma Prosedürü (Vimentin)**

ELISA kitindeki çalışma protokollerine göre işlemler sırasıyla yapıldı.

1. Standart kuyucuklarına 50 µl standart eklendi
2. Numune kuyucuklarına 40 µl numune ve 10 µl Anti-VIM antikoru eklendi.
3. Daha sonra numune ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. İyice Karıştırıldıktan sonra yapışkan film ile kaplandı.
4. 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.
5. Yapışkan film çıkarıldıktan sonra yıkama solüsyonu ile 1-2 dk 5 tekrar yıkandı.
6. Her bir kuyucuğa 50 ml substrat solüsyonu A ve ardından 50 ml substrat solüsyonu B eklendi.
7. Yeni bir yapışkan film ile kapatıldıktan sonra 37°C’de 10 dakika süresince inkübe edildi.
8. 50 µl stop solüsyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu
9. Optik yoğunluğu 450nm de okutularak tespit edildi.

### **3.2.12. Real Time PCR**

#### **Total RNA İzolasyonu ve mRNA’dan cDNA Sentezi**



Qiagen RNeasy mini Kit (Cat No./ID:74104) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) protokolleri takip edilerek Total RNA izolasyonu yapıldı. Qiagen RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Cat No./ID:330404) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) iş akış protokollerine göre elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için kullanıldı.

### Real-Time PCR (qPCR-mRNA)

Gen ekspresyon primerleri, gen bölgesinin herhangi bir yerinde olabilir. Bu nedenle NCBI veritabanı ile primerler tasarlandı. Kullanılan primerlerin dizileri Tablo 3.3'te gösterildi. *GAPDH* geni Housekeeping gen olarak kullanıldı.

**Tablo 3. 3.** Gen Primer dizileri (*Mus musculus*).

| Primer     | İleri Primer (5'-3')   | Geri Primer (3'-5')    |
|------------|------------------------|------------------------|
| Vimentin   | TGCTCAAGACTCGGTGGAC    | GGTCAAGACGTGCCAGAGAA   |
| E-Cadherin | GACAGAAACGAGACTGGGTCA  | ACCAACTTCCTCTCCTACCTG  |
| Kaspaz-3   | TCTAAGCCATGGTGATGAAGGG | CGCCTCTGAAGAAGCTAGTCAA |
| CA IX      | TTGTGGGGACCTCGTGATTC   | GGGAAGGAAGCCTCAATCGT   |
| GAPDH      | GAGTTGCTGTTGAAGTCGCAG  | GGCTTGCTCTGGTGTGACAG   |

Eş zamanlı PCR reaksiyonu Rotor Gene 6000 Real-Time PCR cihazı (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak mRNA ekspresyonuna bakılmak için Tablo 3.4'de belirtilen miktarlara göre qPCR karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım 9.5 µl olacak şekilde uygun tüplere dağıtılarak, her farenin tümör ve normal dokusuna ait cDNA, qPCR önkarişımı içeren her tüpe eklendi. Tablo 3.5'de belirtilen PCR koşullarında çalışıldı.

**Tablo 3. 4.** qPCR karışımı.

| Bileşenler             | Hacim (µl) |
|------------------------|------------|
| SYBR Green Mastermix   | 5          |
| İleri Primer (10 µM)   | 0,3        |
| Geri Primer (10 µM)    | 0,3        |
| Rnaz/Dnaz içermeyen su | 3,9        |
| cDNA                   | 1          |
| Total                  | 10         |

**Tablo 3. 5.** qPCR Tepkime koşulları.

| Aktiviteler       | Sıcaklık (°C) | Süre      |
|-------------------|---------------|-----------|
| Enzim aktivasyonu | 95            | 10 Dakika |
| Denatürasyon      | 95            | 15 Saniye |
| Primer bağlanması | 58            | 60 Saniye |
| Primer uzaması    | 72            | 30 Saniye |

### 3.2.13. Histopatolojik İnceleme

Meme kanseri oluşturulan gruplardan elde edilen tümör dokuları plastik doku kasetine alındıktan sonra takip cihazına aktarıldı ve Tablo 3.6'da gösterilen protokoller uygulandı. Bu doku takip işleminden sonra çelik blok kalıplarına alınıp blok hazırlandı.

**Tablo 3. 6.** Parafin doku takip yöntemi protokolleri.

| Sıra No | Yapılan İşlemler    | Süre   |
|---------|---------------------|--------|
| 1.      | %70'lik Formaldehit | 1 Saat |
| 2.      | %10'lik Formaldehit | 1 Saat |
| 3.      | %70'lik Etil Alkol  | 1 Saat |
| 4.      | %80'lik Etil Alkol  | 1 Saat |
| 5.      | %90'lık Etil Alkol  | 1 Saat |
| 6.      | %99'luk Etil Alkol  | 1 Saat |
| 7.      | %99'luk Etil Alkol  | 1 Saat |
| 8.      | %99'luk Etil Alkol  | 1 Saat |
| 9.      | Ksilen              | 1 Saat |
| 10.     | Parafin             | 1 Saat |

Soğutulan kesitler rotari mikrotom cihazı ile 4 mikron kalınlığında kesildi ve benmarî su banyosuna alındıktan sonra lamel üzerine alındı. 1 saat 70 °C'de bekletilen kesitlere Tablo 3.7'deki protokoller uygulandı. İşlemler bittikten sonra lam ile kapatıldı.

**Tablo 3. 7.** Hematoksilen-Eozin boyama protokolleri.

| Sıra No | Yapılan İşlemler   | Süre      |
|---------|--------------------|-----------|
| 1.      | Ksilen             | 1 Saat    |
| 2.      | Ksilen             | 15 Dakika |
| 3.      | Ksilen             | 15 Dakika |
| 4.      | %96'lık Etil Alkol | 15 Dakika |
| 5.      | %80'lik Etil Alkol | 15 Dakika |
| 6.      | %70'lik Etil Alkol | 15 Dakika |
| 7.      | Akarsu             | 5 Dakika  |
| 8.      | Hematoksilen       | 1 Dakika  |
| 9.      | Akarsu             | 2 Dakika  |
| 10.     | %70'lik Etil Alkol | 1 Dakika  |
| 11.     | Eozin              | 1 Dakika  |
| 12.     | %70'lik Etil Alkol | 1 Dakika  |
| 13.     | %90'lık Etil Alkol | 1 Dakika  |
| 14.     | %96'lık Etil Alkol | 1 Dakika  |
| 15.     | Ksilen             | 1 Dakika  |
| 16.     | Ksilen             | 1 Dakika  |

### 3.2.14. Metabolomik Analizler

Plazma örneklerinden 5 µl gutria kağıdına absorbe edilerek 25°C'de gece boyunca kurutuldu. 200 µl NSKA (Amino asit) ve NSKB (Karnitin) internal standartları eklendikten sonra 30 dk karıştırılarak azot gazı altında 30 dk kurutuldu. 60 µl DRVT eklenerek 60 °C de 30 dk inkübasyona bırakılarak türevlendirildi ve azot gazı altında 30 dk kurutuldu. 100 µl mobil faz (asetonitril: metanol: formic acid) solüsyonu eklenerek 8040 LC-MS/MS cihazında çalışıldı.

Serbest karnitin, asetil karnitin, propiyonil karnitin, metilmalonil karnitin, izovaleril karnitin, tiglil karnitin, hidroksiizovaleril karnitin, glutaril karnitin, hekzanoil karnitin, adipoil karnitin, oktanoil karnitin, oktenoil karnitin, suberoil karnitin, dekanoil karnitin, decenoil karnitin, sebakoil karnitin, dodekanoil karnitin, miristoil karnitin, tetradecenoil karnitin, tetradekadienoil karnitin, palmitoil karnitin stearoil karnitin, oleil

karnitin, linoleil karnitin ve hidroksioleil karnitin toplam 27 karnitin analizi yapıldı. Ayrıca metilglutaril, valin, lösin/izölösün, metiyonin, fenilalanin, argininosüksinik asit, tirozin, alanin, aspartat, arjinin, sitrölin, glisin, ornitin ve glutamat toplam 14 amino asit analizi yapıldı.

### **3.3. İstatiksel Analiz**

Veriler IBM SPSS 22.0 kullanılarak istatiksel analizi yapıldı ve ortalama  $\pm$  standart sapma ( $Ort \pm Ss$ ) olarak sunuldu. Shapiro-Wilk testi ile normallik değerlendirilmesi yapılmıştır. Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarında One Way Anova ve çoklu karşılaştırmalarda Tukey testleri kullanıldı. Ayrıca bağımlı grupların değerlendirilmesinde Paired Sample T testi kullanıldı. Çok değişkenli istatistiksel analiz için, LC-MS/MS analiz sonucunda elde edilen metabolit verileri MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) sunucusuna yüklendi. İlk olarak gruplardaki farelerin eğilimlerini ve kümelenmelerini tespit etmek amacıyla kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) yapıldı. Kümeleşmeye ve ayrışmaya katkısı olan karnitinlerin önem dereceleri projeksiyonda değişken önem (VIP) skoru olarak verildi. Analizini yaptığımız amino asitlerin ve karnitinlerin gruplardaki yoğunluklarını görselleştirmek için öklid mesafe ölçüsü, T-test modu ve ward algoritması kullanılarak hiyerarşik kümeleme yoluyla ısı haritaları oluşturuldu.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İn Vitro Çalışma Sonuçları

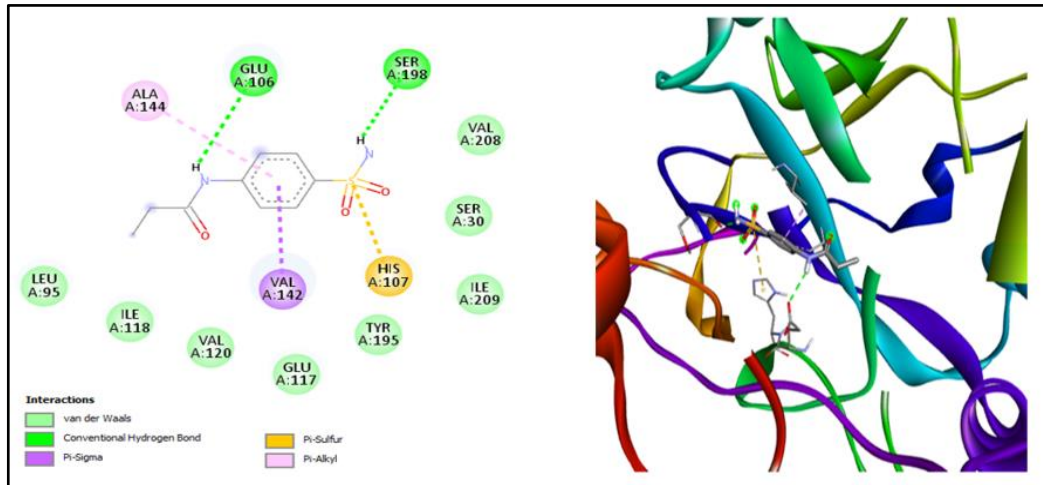
#### 4.1.1. Moleküler Docking Sonuçları

Bu çalışmada kullanılan MMH-1 molekülünün anti-kanser aktiviteleri çalışılmadan önce hedef protein olan CA IX'un üzerindeki inhibitör etkileri moleküler docking yöntemiyle incelendi. MMH-1'in CAIX ile bağlanma afinitesi ve modlarına sahip olduğunu gösterdi (Tablo 4.1). MMH-1'in bağlanma afinitesi -6.6 kcal/mol'dür.

**Tablo 4. 1.** CA IX proteininde MMH-1'in in silico sonuçları.

| Analiz   | Görselleştirme                 | Protein | Ligand | Amino Asit Kalıntısı   |
|----------|--------------------------------|---------|--------|--|
| Autodock | 3 D BIOVIA                     | 5FL6    | MMH-1  | SER30, LEU95, GLU106,  |
| Vina     | Discovery Studio<br>Visualizer |         |        | HIS107, GLU117, ILE118,<br>VAL120, VAL142, TYR195,<br>SER198, ILE209 |

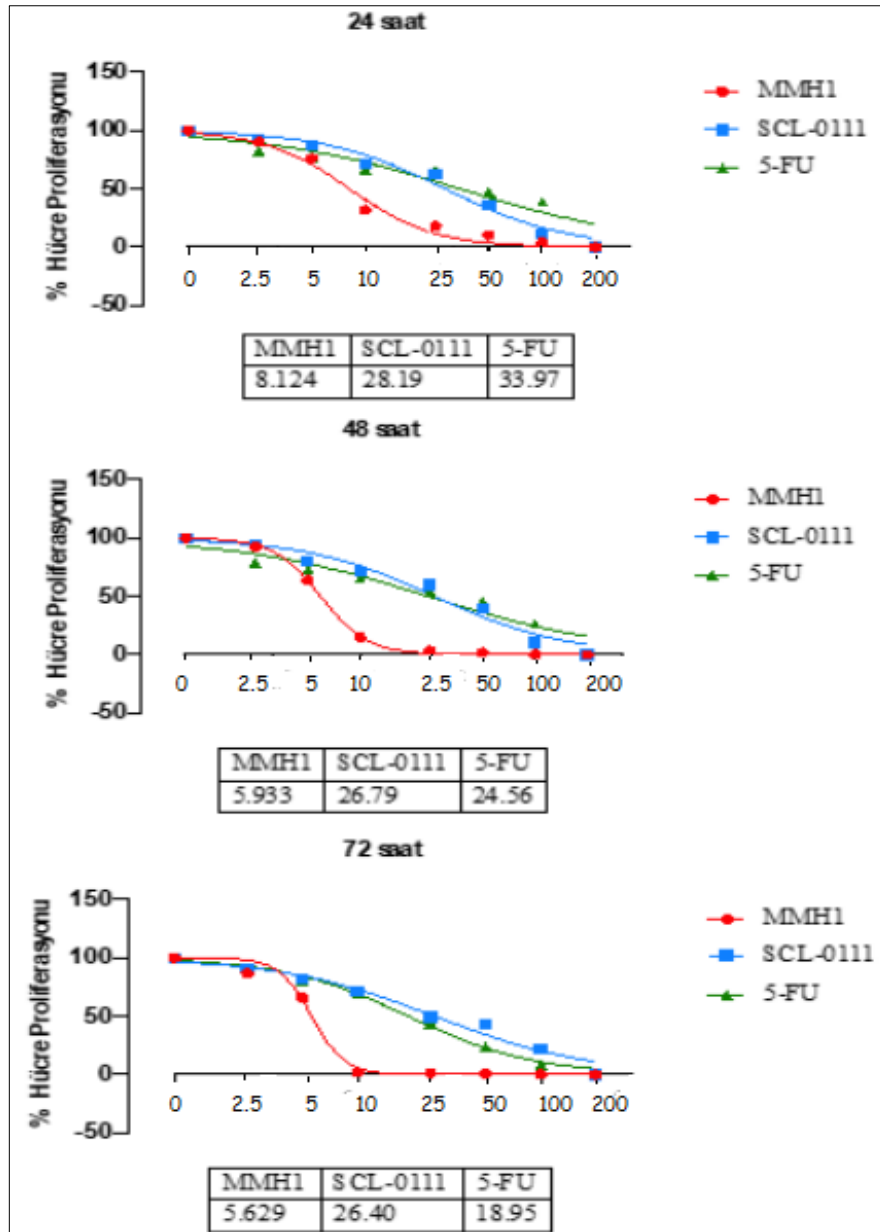
CA IX ile MMH-1 ligandı arasında sırasıyla GLU106, SER198 hidrojen ALA144 ile  $\pi$ -alkil, SER30, LEU95, GLU117, ILE118, VAL120, TYR195, VAL208 ve ILE209 ile van der waals, HIS107 ile  $\pi$ -kükürt ve VAL142 ile  $\pi$ -sigma bağları kurduğu bulundu (Şekil 4.1).



**Şekil 4. 1.** Moleküler Docking sonuçları.

#### 4.1.2. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

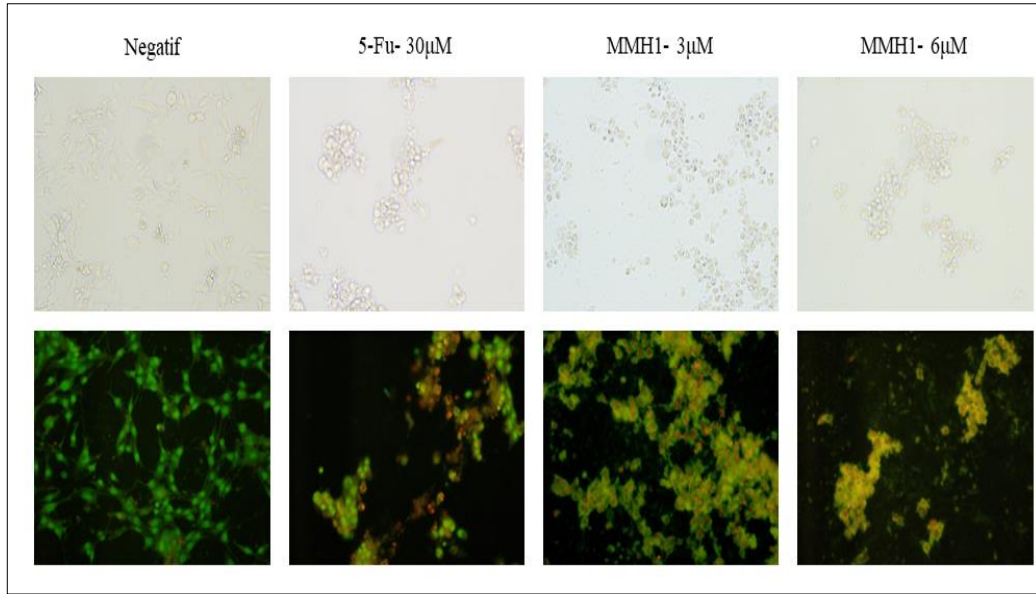
MMH-1 molekülünün hücreler üzerindeki sitotoksik dozu (IC50) ve inkübasyon süresi MTT yöntemiyle tespit edildi. MMH-1'in IC50 değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 8.124  $\mu$ M, 5.933  $\mu$ M ve 5.629  $\mu$ M oldu. SCL-0111 için IC50 değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 28.19  $\mu$ M, 26.79  $\mu$ M, 26.40  $\mu$ M ve 5-FU için ise IC50 değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 33.97  $\mu$ M, 24.56  $\mu$ M ve 18.95  $\mu$ M oldu (Şekil 4.2). Etkin doz ve saat sırasıyla; MMH-1 için, 6  $\mu$ M ve 48 saat olduğu belirlendi.



Şekil 4. 2. MMH-1, 5-Fu ve SCL-0111 bileşiklerinin IC50 değerleri.

#### 4.1.3. Akridin Oranj /Ethidium Bromide (AO/EtBr) Boyaması

4T1 hücrelerine 48 saat MMH-1 bileşiği ile muamelesi sonrası hücrelerde apoptozisin morfolojik olarak tespit edilmesi için yapıldı. MMH-1 bileşiğinin 3 ve 6  $\mu\text{M}$ ; 5-Fu kemoterapik ilacın ise 30  $\mu\text{M}$  dozunda 48 saat muamele edildi. MMH1'in her iki dozda da hücrelerde apoptozisi tetiklediği tespit edildi. Bunun yanı sıra 5-Fu, MMH-1'in 5 katı muamele sonrasında benzer sonuç gösterdi. Yeşil renk canlı, sarı-turuncu erken apoptozis ve kırmızı nekroza uğrayan hücreler olarak yorumlandı.

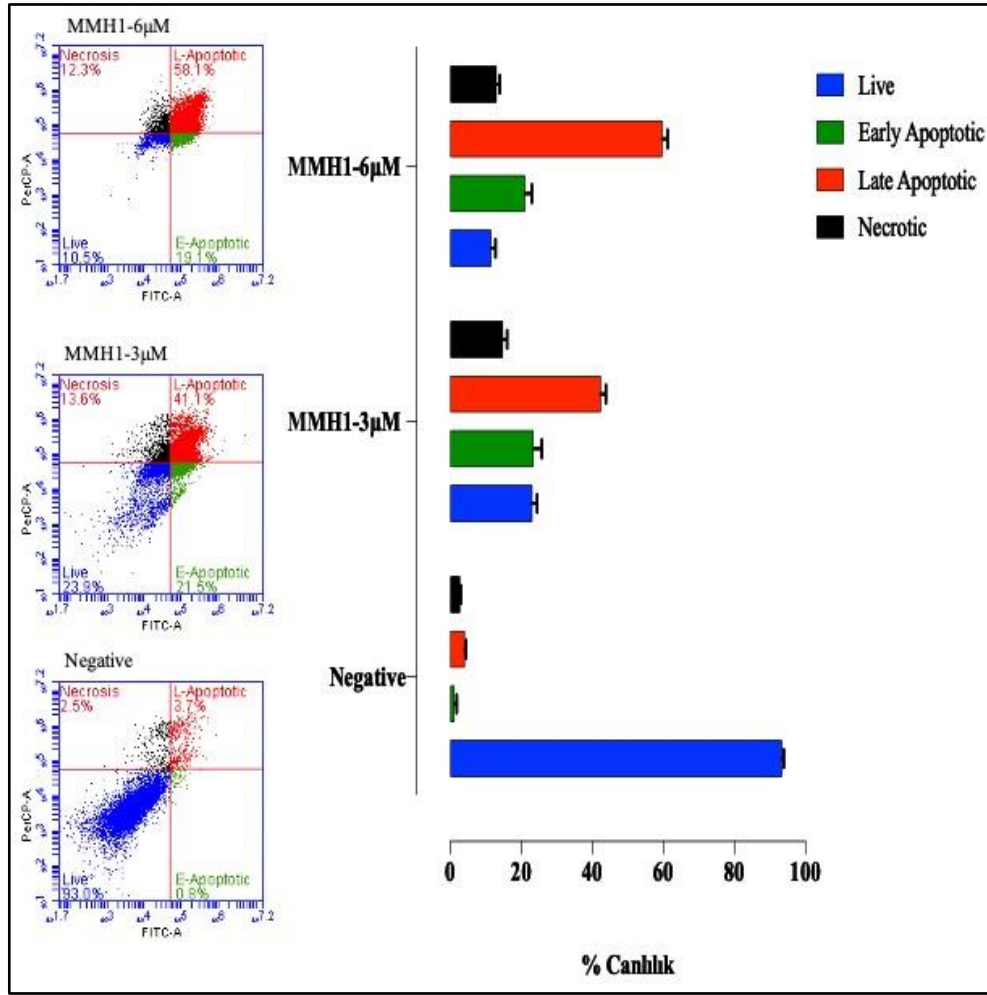


Şekil 4. 3. AO/EtBr boyama sonuçları.

#### 4.1.4. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi

4T1 hücrelerine MMH-1 bileşiği 3  $\mu\text{M}$  ve 6  $\mu\text{M}$  dozlarda uygulandıktan sonra Annexin-V analizi yapıldı. MMH-1'in 3  $\mu\text{M}$  dozda uygulandıktan sonra hücrelerin %21.5'inde erken apoptoz ve %41.1'inde geç apoptoz olduğu saptanmıştır. Ayrıca hücrelerin %13.6'sında nekroz olduğu ve %23.8'i canlı kaldığı görülmüştür. MMH-1'in 6  $\mu\text{M}$  dozu uygulandıktan sonra ise hücrelerin %19.1'inde erken apoptoz ve %58.1'inde geç apoptoz olduğu saptanmıştır. Ayrıca hücrelerin %12.3'ünde nekroz olduğu ve %10.5'i canlı kaldığı görülmüştür (Şekil 4.4). Analiz sonucunda 3  $\mu\text{M}$  doz uygulaması 4T1 kanser hücrelerinin %62.6'sını ve 6  $\mu\text{M}$  dozun ise hücrelerin %77.2'sini apoptoza

götürmüştür. MMH-1 bileşiğinin artan dozu ile orantılı olarak hücrelerde apoptozu tetiklediği sonucuna ulaşıldı.



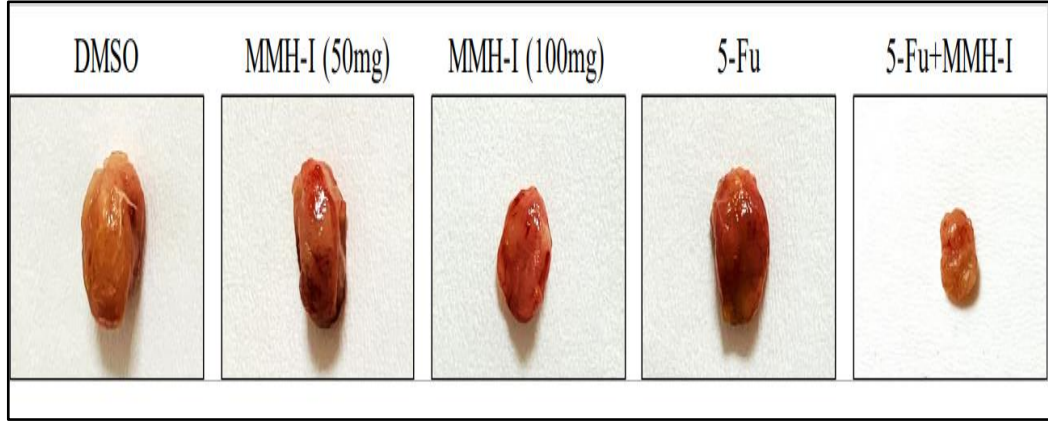
Şekil 4. 4. Apoptotik hücrelerin yüzde oran grafiği.

## 4.2. İn Vivo Çalışma Sonuçları

### 4.2.1. Tümör Hacmi

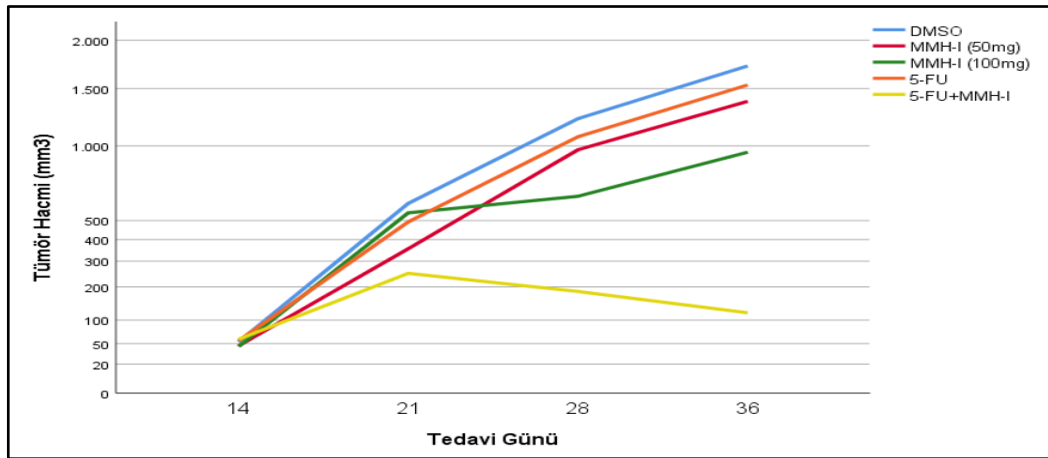
4T1 tümör hücresi farelere enjeksiyonundan 14 gün sonra tümör hacimleri yaklaşık 50-60 mm<sup>3</sup> boyutlarına ulaştıktan sonra fareler gruplara ayrıldı ve tedaviye başlandı. Tedavinin 1. günü, 7. günü, 14. günü ve 21. günü tümör enjeksiyonundan sonraki sırasıyla 14. günü, 21. günü, 28. günü ve 35. gününü oluşturdu. Tedavinin 21. günü tedavi bitirildi ve bir sonraki gün (4T1 enjeksiyonundan sonraki 36. gün) fareler sakrifiye edildi ve tümör dokuları çıkarıldı (Şekil 4.5).





**Şekil 4. 5.** Farelerden çıkarılan tümör doku örnekleri.

DMSO grubunda ortalama tümör hacmi sırasıyla  $53 \text{ mm}^3$ - $600 \text{ mm}^3$ - $1225 \text{ mm}^3$ - $1725 \text{ mm}^3$  boyutuna, 5-FU grubunda sırasıyla  $55 \text{ mm}^3$ -  $493 \text{ mm}^3$ - $1073 \text{ mm}^3$ - $1535 \text{ mm}^3$ , MMH-1 (50mg) grubunda sırasıyla  $46 \text{ mm}^3$ -  $356 \text{ mm}^3$ -  $970 \text{ mm}^3$ - $1389 \text{ mm}^3$ , MMH-1 (100mg) grubunda sırasıyla  $45 \text{ mm}^3$ - $544 \text{ mm}^3$ -  $644 \text{ mm}^3$ -  $951 \text{ mm}^3$ , 5-FU+MMH-1 grubunda ise  $58 \text{ mm}^3$ - $250 \text{ mm}^3$ - $184 \text{ mm}^3$ - $119 \text{ mm}^3$  (Şekil 4.6).



**Şekil 4. 6.** Tümör hacimlerinin günlere göre değişimi.

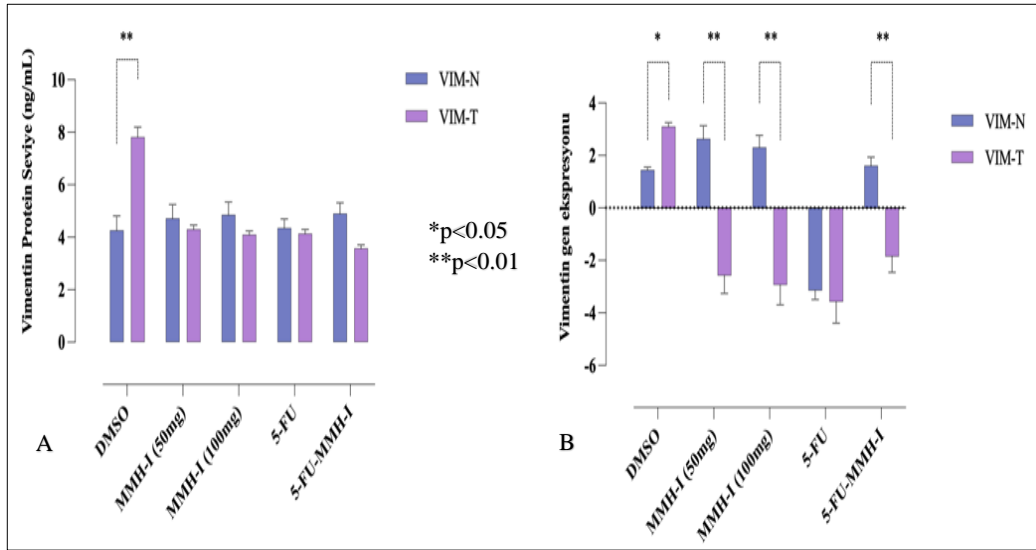
Herhangi bir kemoterapötik ajan almayan DMSO grubunda tümör hacmi en yüksek değere ulaştı. Kemoterapötik ajan olan 5-Fluorourasil'in verildiği 5-FU grubundan ise tümör hacmi DMSO grubuna göre daha yavaş yükseliş ve daha az bir hacme ulaştı. Sülfonamid türevi olan MMH-1'in düşük doz verildiği MMH-I (50mg) grubunda ise tümör hacmi hem DMSO hem de 5-FU grubuna göre daha az bir değere ulaştı. MMH-1'in yüksek doz verildiği MMH-1 (100mg) grubunda ise DMSO, 5-FU ve

MMH-1 (50mg) gruplarına göre belirgin bir şekilde tümör hacminin büyümesindeki hız azaldı ve daha az bir değere ulaştı. 5-FU+ MMH-1 grubunda ise en etkili sonuçlara ulaşıldı. Tümör hacmi tedavinin ilk haftasından sonra azalmaya başladı.

#### 4.2.2. ELISA ve PCR Analiz Sonuçları

Vimentin, E-Cadherin, CA IX (CA 9) ve kaspaz 3 (CAS-3) seviyeleri farelerden alınan hem meme tümör dokularında hemde normal meme dokularında analiz edildi.

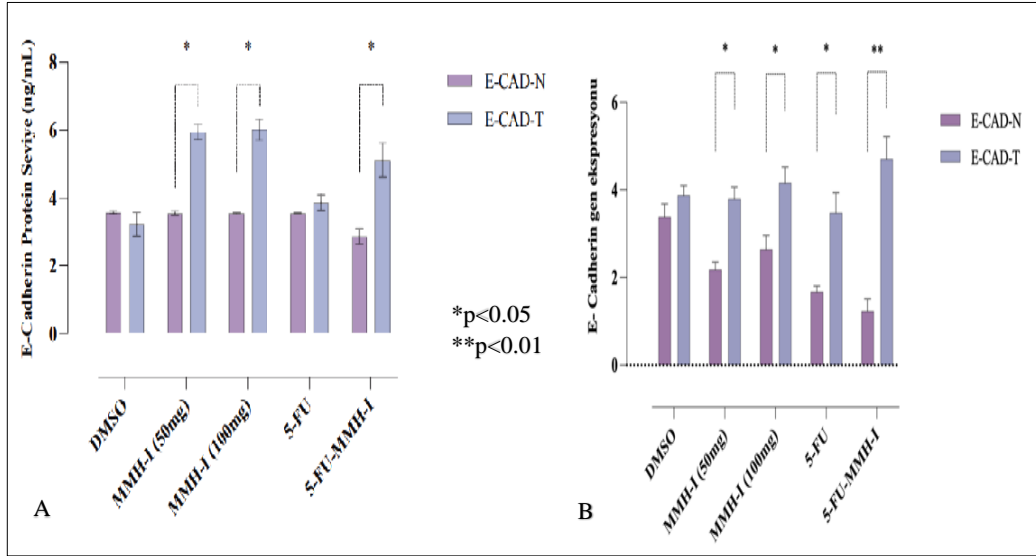
Vimentin tümör protein ekspresyonu (VIM-T) DMSO grubunda normal meme dokusuna (VIM-N) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Diğer gruplarda ise normal dokuya göre tümör dokusunda düşüş gösterdi ( $p>0.05$ ). Gen ekspresyonu düzeyinde ise MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg) ve 5-FU + MMH-1 gruplarında vimentin normal dokuya göre tümör dokularında anlamlı olarak düşük ve DMSO grubunda ise anlamlı olarak yüksek bulundu. Ancak 5-FU grubundaki düşüş anlamlı değildi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile vimentin analiz sonuçları.

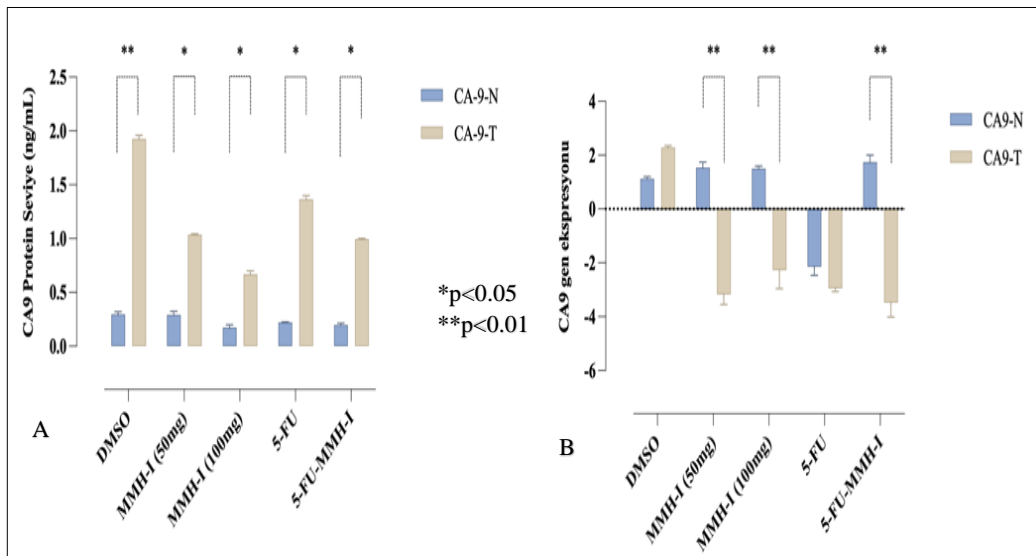
E-Cadherin protein seviyesi MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg) ve 5-FU + MMH-1 gruplarında normal meme dokusuna (E-CAD-N) göre tümör dokularında (E-CAD-T) artış bulundu ( $p<0.05$ ). DMSO ve 5-FU gruplarında ise normal meme dokusuna göre tümör dokularında sırasıyla azalış ve artış bulundu ( $p>0.05$ ). Gen ekspresyon düzeyinde

ise tüm gruplarda normal meme dokularına göre tümör dokularında artış bulundu. Ancak DMSO grubundaki bu artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.8).



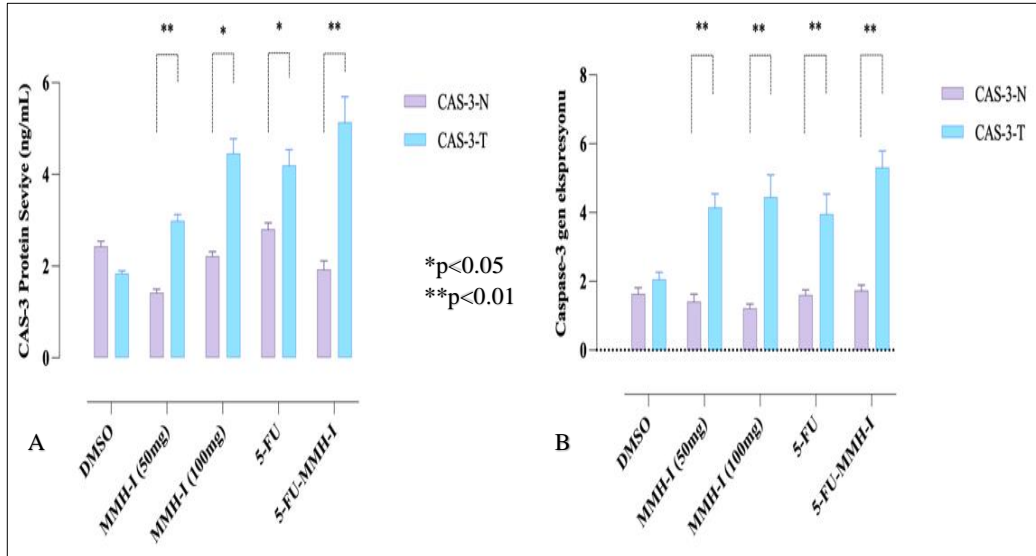
**Şekil 4. 8.** ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile E-Cadherin analiz sonuçları.

CA IX protein seviyesi tüm gruplarda normal dokulara göre (CA-9-N) tümör dokularında (CA-9-T) anlamlı bir artış bulundu ( $p<0.05$ ). Ancak en yüksek artış DMSO grubunda oldu ( $p<0.01$ ). Gen ekspresyonlarında ise DMSO grubu hariç diğer gruplarda normal meme dokularına göre tümör dokularında anlamlı bir azalmanın olduğu bulundu ( $p<0.01$ ). Ancak 5-FU grubundaki bu azalma anlamlı değildi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.9).



**Şekil 4. 9.** ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile CA IX analiz sonuçları.

Kaspaz 3 seviyesi protein seviyesi normal dokulara (CAS-3-N) göre tümör dokularında (CAS-T) MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU + MMH-1 gruplarında anlamlı bir artış olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Ancak DMSO grubunda normal meme dokusuna göre tümör dokusunda azalma bulundu. Gen ekspresyonlarında ise DMSO grubu hariç tüm gruplarda normal meme dokusuna göre (CAS-3-N) tümör dokularında (CAS-3-T) anlamlı artış olduğu bulundu ( $p<0.01$ ) (Şekil 4.10).

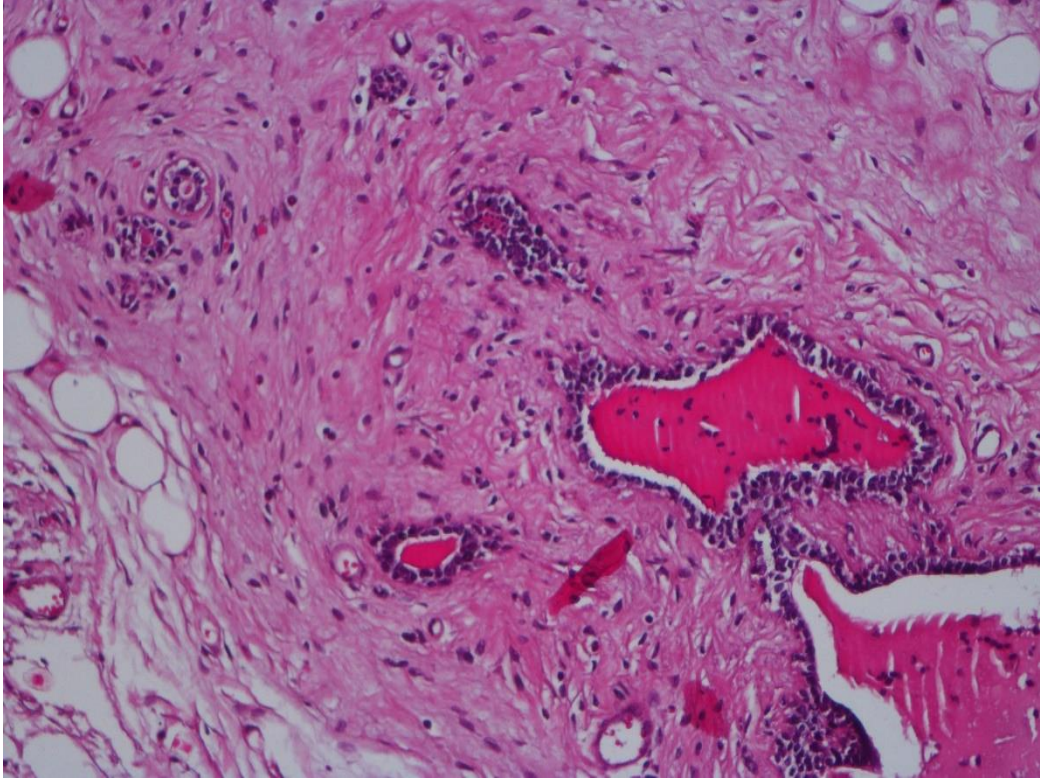


Şekil 4. 10. ELISA (A) ve PCR (B) yöntemleri ile Kaspaz 3 analiz sonuçları.

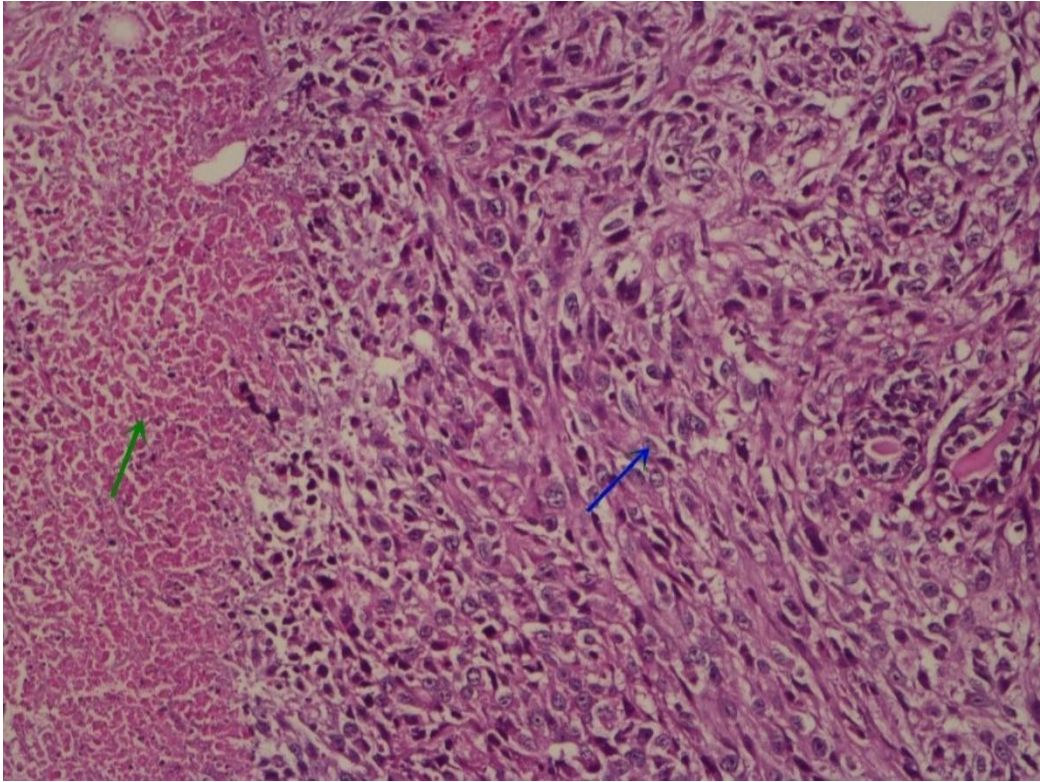
#### 4.2.3. Histopatolojik İnceleme

Tüm grupların histopatolojik incelemelerinde yüksek grade epitelyal kökenli tümör morfolojisi saptandı. Tümör hücrelerinde belirgin nükleol yapıları mevcuttu ve sık mitotik figürler izlendi. Gruplardaki tüm doku örnekleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde DMSO grubunda yaklaşık %30, MMH-I (50mg) grubunda yaklaşık %55, MMH-1 (100mg) grubunda yaklaşık %70, 5-FU grubunda yaklaşık %65 ve 5-FU + MMH-1 (50mg) grubunda yaklaşık %80 oranında nekroz saptandı. Bu patolojik verilere göre tedavide kullandığımız etken maddeler tümör hücrelerini öldürmede başarılı sonuçlar gösterdi. MMH-1 maddesi 50mg göre 100mg dozu daha başarılı sonuçlar gösterdi. En etkili sonuçlar kombine tedavi alan 5-FU + MMH-1 grubunda gözlemlendi (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 (Mavi ok canlı, yeşil ok nekrotik hücreler)).



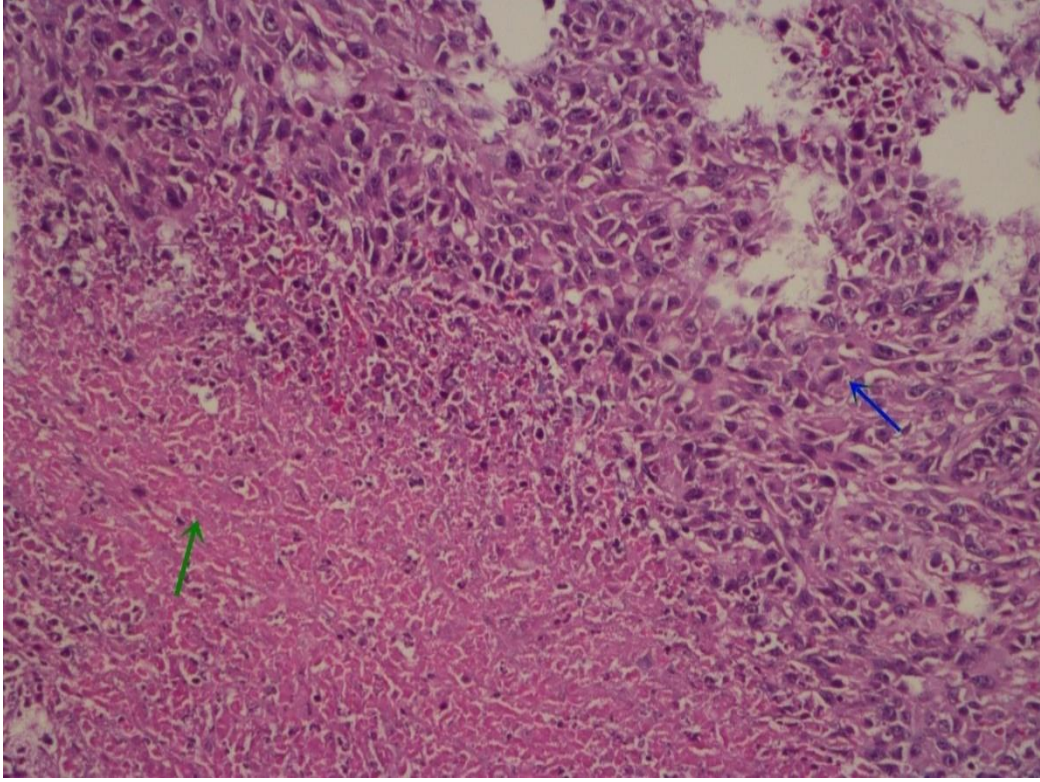


**Şekil 4. 11.** Kontrol grubu meme dokusunda HE boyama (X200).

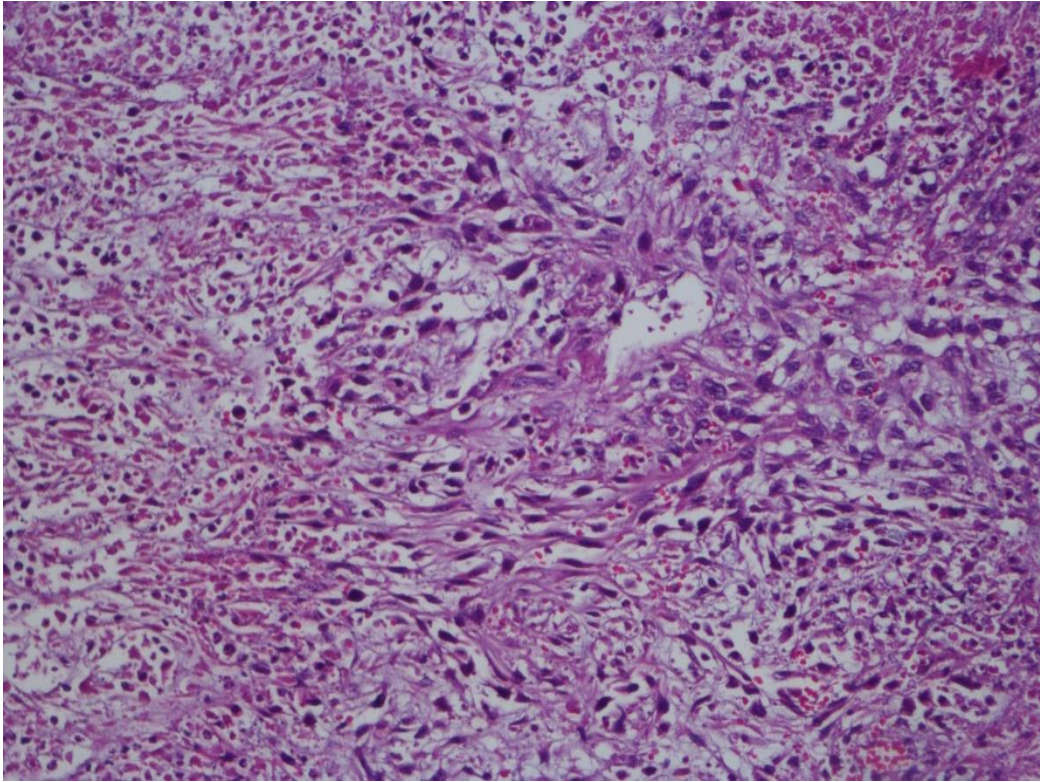


**Şekil 4. 12.** DMSO grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).



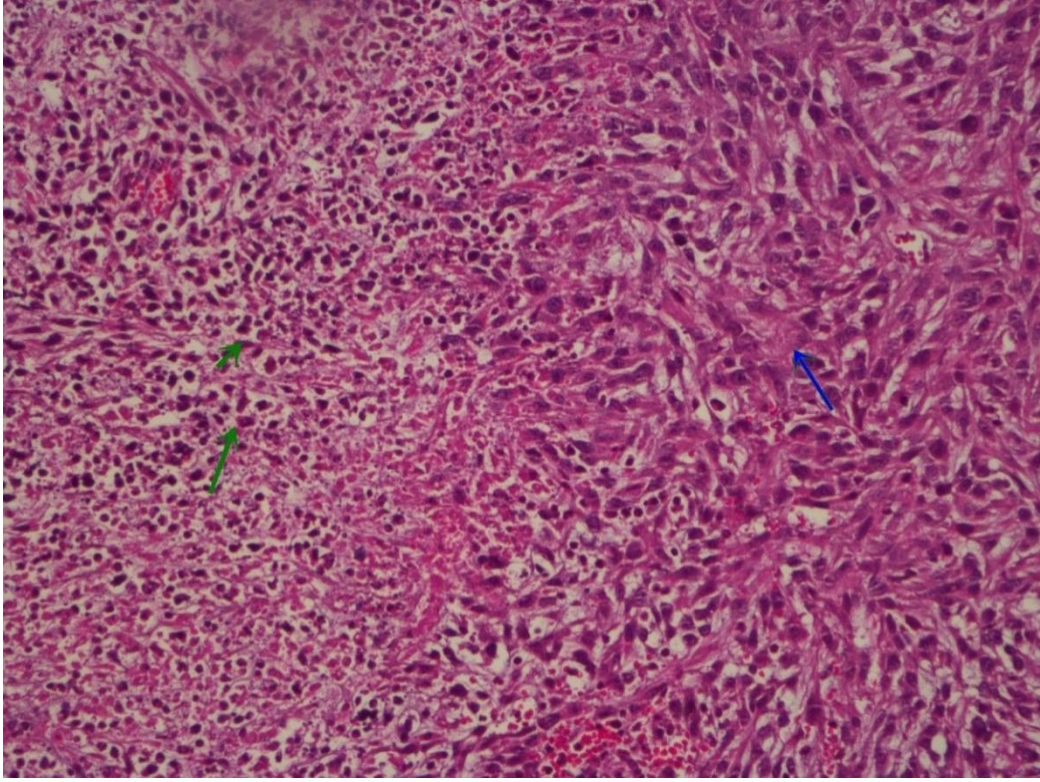


**Şekil 4. 13.** MMH-1 (50mg) grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).

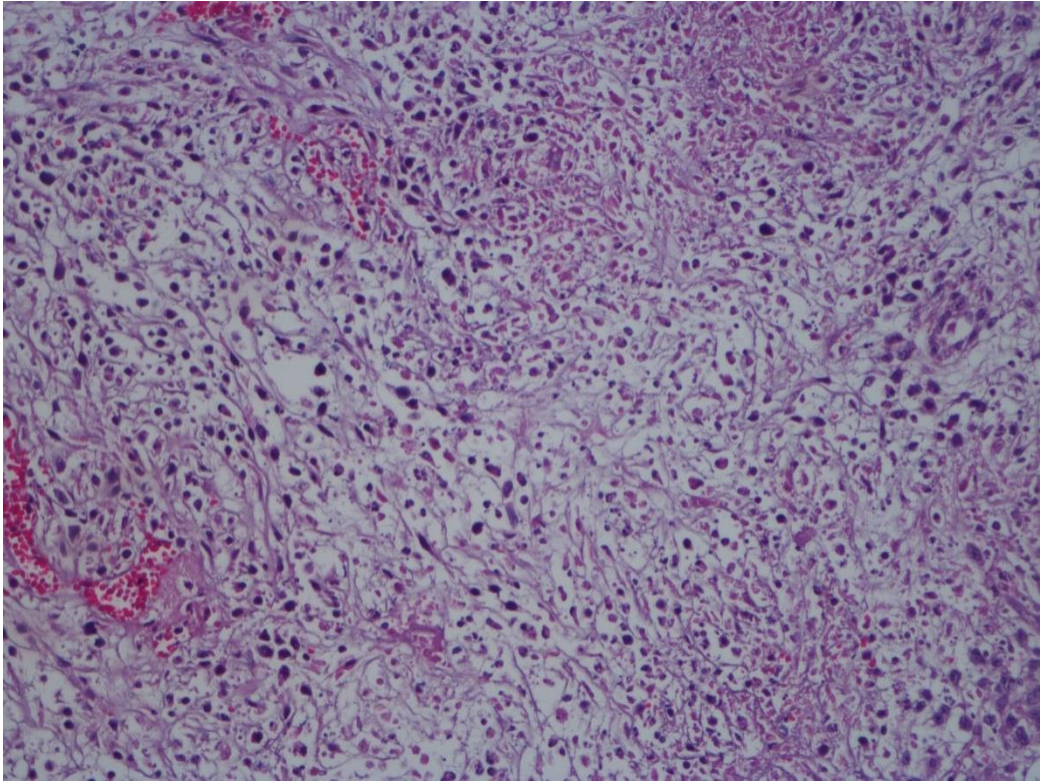


**Şekil 4. 14.** MMH-1 (100mg) grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).





Şekil 4. 15. 5-FU grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).



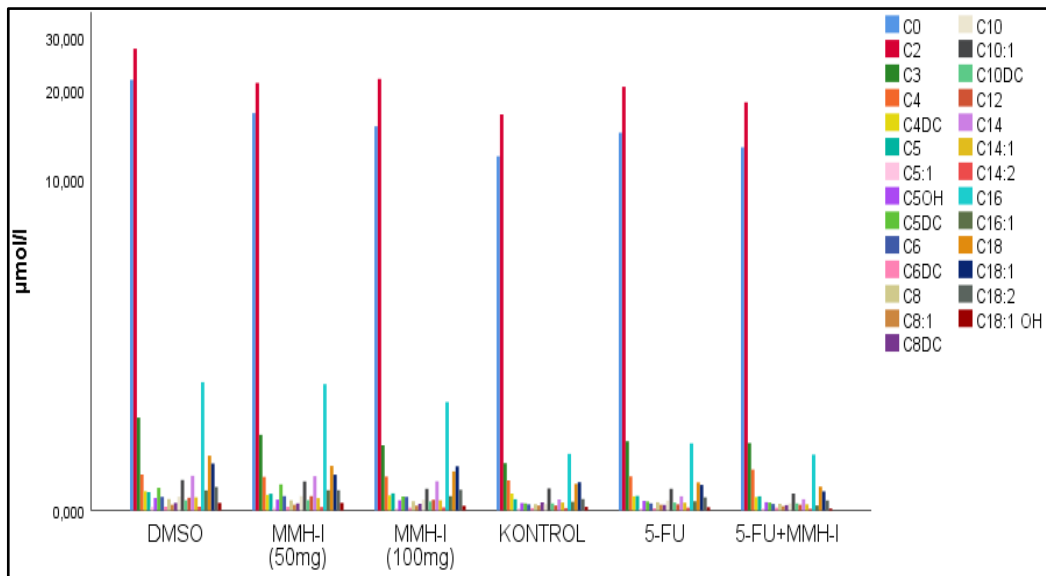
Şekil 4. 16. 5-FU + MMH-1 (50mg) grubu tümör dokusunda HE boyama (X200).

#### 4.2.4. Metabolomik Analiz Sonuçları

##### Karnitin Profilinin İncelenmesi

Meme kanseri gruplarındaki (DMSO, MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU + MMH-1 (50mg)) ve kontrol grubundaki farelerin plazmalarındaki karnitin miktarları Tablo 4.3'te ve Şekil 4.17'de gösterildi.

Çalışmada analizini yaptığımız karnitinler arasında negatif kontrol grubuna göre C0; DMSO grubunda arttı, C2; DMSO grubunda arttı, C3; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, C5; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C5:1; DMSO grubunda arttı, C5-OH; DMSO grubunda arttı, C5DC; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, C6; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C8; DMSO grubunda arttı, C10; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, C10DC; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, C12; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C14; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C14:1; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, C16; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C16:1; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, C18; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C18:1 DMSO ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı, C18:2; DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında arttı ve C18:-OH; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 4. 17. Grupların serum karnitin seviyeleri.



**Tablo 4. 2. Grupların serum karnitin kompozisyonunun kantitatif analizi.**

| Yaygın isim                | Kısaltma | Gruplar (Ort±SS) |                  |                   |             |            |                         |        | P  | Post Hoc (Tukey) |
|----------------------------|----------|------------------|------------------|-------------------|-------------|------------|-------------------------|--------|--|------------------|
|                            |          | (A) DMSO         | (B) MMH-1 (50mg) | (C) MMH-1 (100mg) | (D) Kontrol | (E) 5-FU   | (F) 5-FU + MMH-1 (50mg) |        |  |                  |
| Serbest Karnitin           | C0       | 21.73±7.70       | 16.85±5.67       | 15.23±6.25        | 12.05±1.29  | 14.50±2.52 | 12.94±2.29              | 0.001  | A-C, A-D, A-E, A-F                                     |                  |
| Asetil Karnitin            | C2       | 27.48±9.69       | 21.23±5.15       | 21.88±8.88        | 16.70±2.42  | 20.63±6.59 | 18.32±3.74              | 0.015  | A-D, A-F   |                  |
| Propiyonil Karnitin        | C3       | 0.96±0.23        | 0.73±0.24        | 0.60±0.21         | 0.41±0.08   | 0.65±0.21  | 0.63±0.14               | <0.001 | A-C, A-D, A-E, A-F, B-D                                |                  |
| Butiril Karnitin           | C4       | 0.29±0.12        | 0.27±0.14        | 0.28±0.09         | 0.24±0.10   | 0.28±0.05  | 0.34±0.09               | 0.422  | -  |                  |
| Metilmalonil Karnitin      | C4DC     | 0.15±0.04        | 0.12±0.02        | 0.11±0.02         | 0.13±0.02   | 0.11±0.03  | 0.10±0.01               | 0.003  | A-E, A-F   |                  |
| İzovaleril Karnitin        | C5       | 0.14±0.03        | 0.13±0.04        | 0.13±0.05         | 0.08±0.02   | 0.11±0.01  | 0.11±0.02               | <0.001 | A-D, B-D, C-D  |                  |
| Tiglit Karnitin            | C5:1     | 0.02±0.01        | 0.02±0.01        | 0.01±0.00         | 0.01±0.00   | 0.01±0.00  | 0.01±0.00               | 0.013  | A-C, A-D   |                  |
| Hidroksizovaleril Karnitin | C5-OH    | 0.09±0.03        | 0.08±0.01        | 0.07±0.03         | 0.05±0.02   | 0.07±0.03  | 0.06±0.01               | 0.011  | A-D, A-F   |                  |
| Glutaril Karnitin          | C5DC     | 0.18±0.06        | 0.21±0.08        | 0.10±0.01         | 0.05±0.01   | 0.07±0.02  | 0.06±0.01               | <0.001 | A-C, A-D, A-E, A-F, B-C, B-D, B-E, B-F                 |                  |
| Hekzanoil Karnitin         | C6       | 0.10±0.04        | 0.11±0.04        | 0.10±0.04         | 0.04±0.01   | 0.05±0.02  | 0.05±0.01               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, C-F            |                  |
| Adipoil Karnitin           | C6DC     | 0.03±0.01        | 0.02±0.01        | 0.02±0.01         | 0.02±0.00   | 0.01±0.00  | 0.02±0.01               | 0.021  | A-E,   |                  |
| Oktranoil Karnitin         | C8       | 0.08±0.03        | 0.07±0.03        | 0.07±0.02         | 0.05±0.01   | 0.06±0.02  | 0.05±0.01               | 0.002  | A-D, A-F   |                  |
| Oktenoil Karnitin          | C8:1     | 0.04±0.03        | 0.04±0.03        | 0.03±0.02         | 0.03±0.02   | 0.04±0.01  | 0.03±0.01               | 0.816  | -  |                  |
| Suberoil Karnitin          | C8DC     | 0.05±0.01        | 0.05±0.02        | 0.05±0.02         | 0.06±0.02   | 0.04±0.01  | 0.04±0.01               | 0.054  | -  |                  |
| Dekanoil Karnitin          | C10      | 0.10±0.03        | 0.11±0.04        | 0.08±0.02         | 0.04±0.01   | 0.07±0.02  | 0.05±0.01               | 0.001  | A-D, A-F, B-D, B-E, B-F,                               |                  |
| Decenoil Karnitin          | C10:1    | 0.25±0.15        | 0.23±0.19        | 0.17±0.12         | 0.17±0.08   | 0.17±0.08  | 0.13±0.04               | 0.257  | -  |                  |
| Sebakoil Karnitin          | C10DC    | 0.08±0.01        | 0.08±0.02        | 0.07±0.01         | 0.05±0.00   | 0.06±0.01  | 0.05±0.01               | <0.001 | A-D, A-F, B-D, B-F                                     |                  |
| Dodekanoil Karnitin        | C12      | 0.09±0.03        | 0.11±0.04        | 0.08±0.03         | 0.03±0.01   | 0.04±0.01  | 0.04±0.01               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, C-F            |                  |
| Miristoil Karnitin         | C14      | 0.28±0.09        | 0.28±0.06        | 0.23±0.14         | 0.08±0.01   | 0.11±0.03  | 0.08±0.02               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, C-F            |                  |
| Tetradecenoil Karnitin     | C14:1    | 0.10±0.03        | 0.09±0.03        | 0.08±0.01         | 0.06±0.01   | 0.06±0.01  | 0.04±0.01               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-F,                     |                  |
| Tetradekadienoil karnitin  | C14:2    | 0.03±0.01        | 0.02±0.01        | 0.02±0.01         | 0.02±0.01   | 0.02±0.01  | 0.01±0.00               | 0.01   | A-F, B-F   |                  |
| Palmitoil Karnitin         | C16      | 1.54±0.44        | 1.50±0.42        | 1.19±0.54         | 0.51±0.06   | 0.63±0.19  | 0.50±0.08               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, C-F,           |                  |
| Palmitoleil Karnitin       | C16:1    | 0.15±0.06        | 0.16±0.08        | 0.11±0.03         | 0.06±0.01   | 0.07±0.01  | 0.03±0.01               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-F                      |                  |
| Stearoil Karnitin          | C18      | 0.49±0.14        | 0.38±0.06        | 0.33±0.08         | 0.21±0.03   | 0.22±0.05  | 0.19±0.03               | <0.001 | A-B, A-C, A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, C-F, |                  |
| Oleil Karnitin             | C18:1    | 0.40±0.13        | 0.29±0.07        | 0.38±0.17         | 0.23±0.07   | 0.20±0.06  | 0.15±0.03               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-F, C-D, C-E, C-F                      |                  |
| Linoleil Karnitin          | C18:2    | 0.18±0.07        | 0.16±0.05        | 0.16±0.05         | 0.08±0.00   | 0.10±0.02  | 0.07±0.01               | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, C-F,           |                  |
| Hidroksioleil Karnitin     | C18:1-OH | 0.05±0.02        | 0.05±0.02        | 0.03±0.01         | 0.02±0.00   | 0.02±0.01  | 0.01±0.00               | <0.001 | A-C, A-D, A-E, A-F, B-C, B-D, B-E, B-F, C-F,           |                  |

Sonuçlar One Way ANOVA testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı.

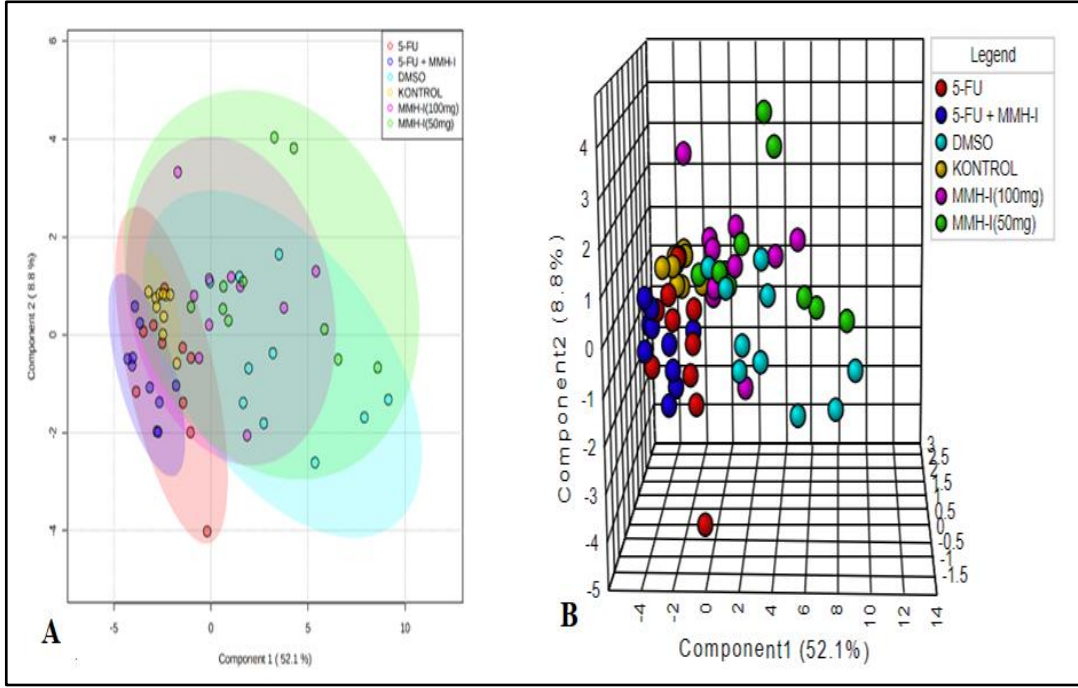
Pozitif kontrol grubuna (DMSO) göre C0; 5-FU, MMH-1 (100mg) ve 5-FU+MMH 50mg gruplarında azalış, C2; 5-FU+MMH-1 (50mg) grubunda azalış, C3; 5-FU, MMH-1 (100mg) ve 5-FU+MMH 50mg gruplarında azalış, C4DC; 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C5:1; MMH-1 (100mg) grubunda azalış, C5OH; 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubunda azalış, C5DC; 5-FU, MMH-1 (100mg) ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C6; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C6DC; 5-FU grubunda azalış, C8; 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubunda azalış, C10; 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubunda azalış, C10DC; 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubunda azalış, C12; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C14; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C14:1; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C14:2; 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubunda azalış, C16; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C16:1; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C18; 5-FU, MMH-1 (100mg) ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C18:1; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış, C18:2; 5-FU ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış ve C18:1-OH; 5-FU, MMH-1 (100mg) ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) gruplarında azalış bulundu ve bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlıydı.

MMH-1 (50mg) grubu 5-FU grubu ile karşılaştırıldığında C5DC, C6, C10, C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:2 ve C18:1-OH karnitinlerinde, 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubu ile karşılaştırıldığında C5DC, C6, C10, C10DC, C12, C14, C14:1, C14:2, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2 ve C18:1-OH karnitinlerinde ve MMH-1 (100mg) grubu ile karşılaştırıldığında C5DC ve C18:1-OH karnitinlerinde anlamlı bir artış olmuştur.

MMH-1 (100mg) grubu 5-FU grubu ile karşılaştırıldığında C6, C12, C14, C16, C18, C18:1 ve C18:2 karnitinlerinde ve 5-FU+ MMH-1 (50mg) grubu ile karşılaştırıldığında C6, C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1 C18:2 ve C18:1-OH karnitinlerinde anlamlı bir artış olmuştur.

### **PLS-DA ile Grupların Ayrılması**

Meme kanseri gruplarındaki (DMSO, MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU, 5-FU + MMH-1 (50mg)) ve kontrol grubundaki farelerin serbest ve ester karnitin seviyelerine göre dağılımlarını kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) ile görselleştirildi. Sonuçlar iki boyutlu ve üç boyutlu olarak verildi (Şekil 4.18). PLS-DA skor grafikleri göre gruplar arasında belirgin kümeleşme oluşmasına rağmen kısmi ayrışma görüldü.

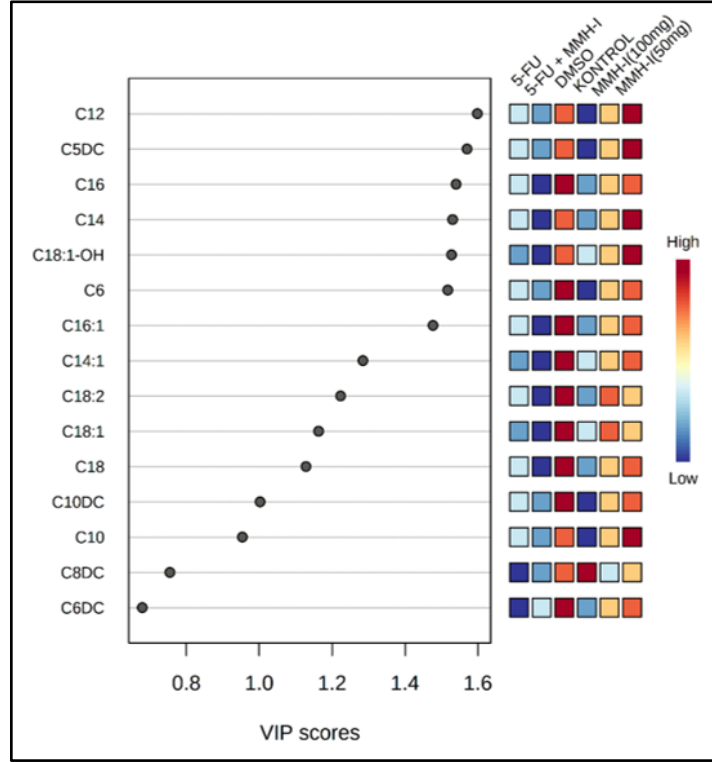


**Şekil 4. 18.** PLS-DA'nın iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) skor grafikleri.

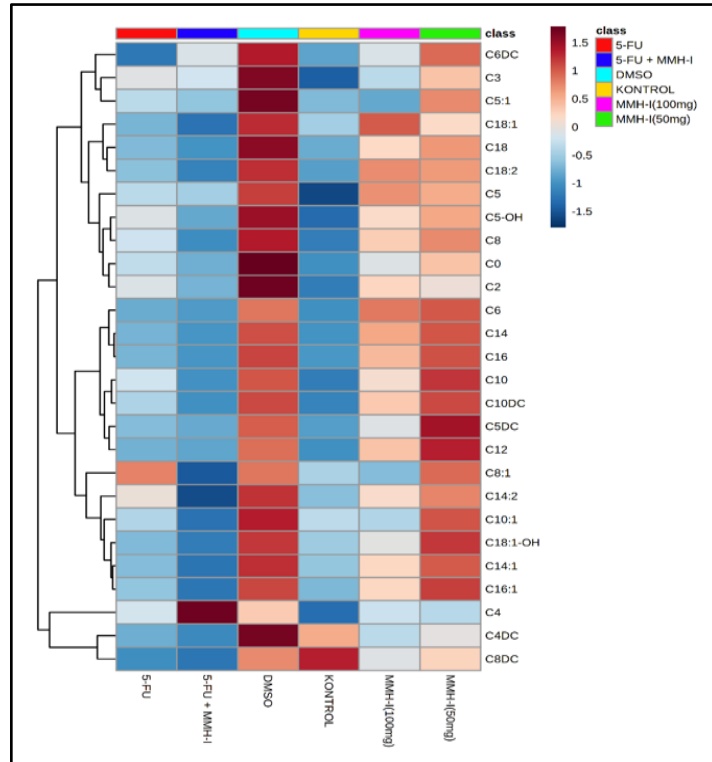
### Diferansiyel Karnitinlerin Taranması

Kanser gruplarını (DMSO, MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU, 5-FU + MMH-1 (50mg)) kontrol grubundan ve kanser gruplarının kendi arasında ayırt etme güçlerine göre karnitinleri sıralayan projeksiyonda değişken önem (VIP) grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.19). Karnitinlerin grupların ayrışmasına katkısı artarsa VIP skoru da artmaktadır. Karnitinlerin gruplardaki yoğunluklarındaki artış azalış sırasıyla kahverengi ve mavi rengi ile belirtilmektedir. Grupların ayrışmasına katkısı en yüksek ilk üç karnitin C12 (Dodekanoil Karnitin), C5DC (Glutaril Karnitin) ve C16'dır (Palmitoil Karnitin).

Gruplardaki karnitinlerin yoğunluklarını gösteren bir ısı haritası çizildi (Şekil 4.20). Sütunlar grupları satırlar ise karnitinleri temsil etmektedir. Karnitinlerin yoğunluğunun artması ve azalması sırasıyla kahverengi ve mavi rengi ile belirtilmektedir. Isı haritasına bakıldığında Kontrol, 5-FU ve 5-FU + MMH-1 (50mg) grupları benzer yoğunlukta karnitin seviyeleri göstermektedir. Ancak DMSO, MMH-1 (50mg) ve MMH-1 (100mg) gruplarında belirgin şekilde karnitin yoğunlukları artmaktadır. MMH-1'in 50mg göre 100mg verilmesi karnitin seviyelerini kontrol grubuna yaklaştırmıştır. Kontrol grubu ile benzerlik oranı en yüksek karnitin profili sergileyen 5-FU + MMH-1 (50mg) grubu olmuştur.



Şekil 4. 19. Önemli karnitinleri gösteren VIP grafiği.

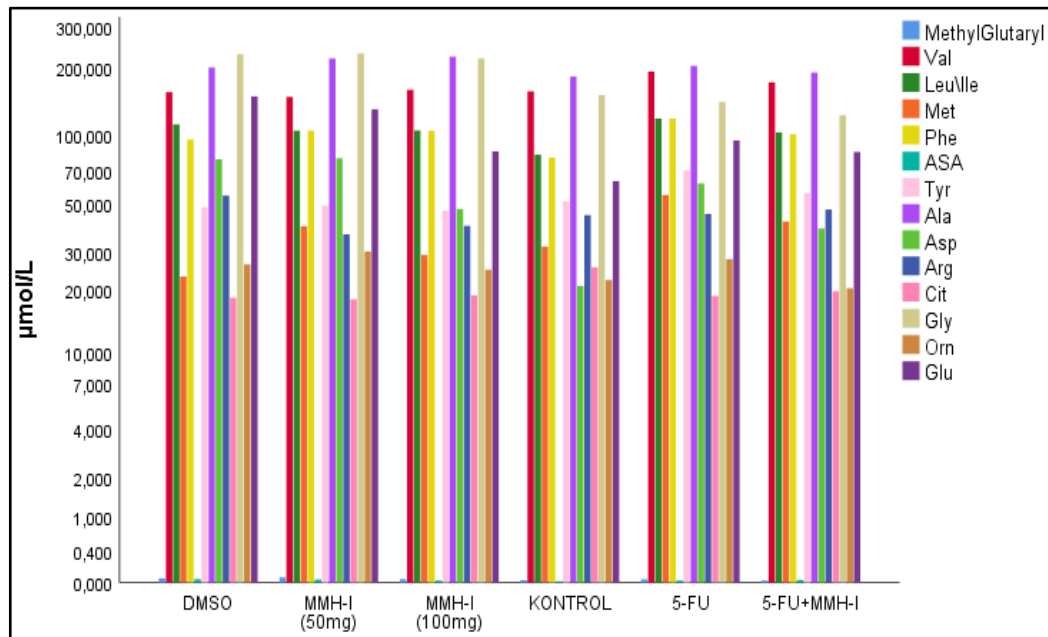


Şekil 4. 20. Gruplardaki karnitinlerin yoğunluklarını gösteren ısı haritası.

## Amino Asit Profilinin İncelenmesi

Meme kanseri gruplarındaki (DMSO, MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU + MMH-1 (50mg)) ve kontrol grubundaki farelerin plazmalarında serbest amino asit miktarları Tablo 4.4 ve Şekil 4.21’de gösterildi.

Analizini yaptığımız amin asitler arasında negatif kontrol grubuna göre metilglutaril; MMH-1 (50mg) grubunda arttı, valin; 5-FU grubunda arttı, lösin / İzolösin oranı; DMSO ve 5-FU gruplarında arttı, metiyonin; 5-FU grubunda arttı, fenilalanin; MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg) ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, argininosüksinat; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, tirozin; 5-FU grubunda arttı, aspartat; DMSO, MMH-1 (50mg) ve 5-FU gruplarında arttı, sitrülün; DMSO, MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg) ve 5-FU gruplarında düştü, glisin; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı ve glutamat; DMSO ve MMH-1 (50mg) gruplarında arttı ve bu artış veya düşüşler istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Pozitif kontrol grubuna göre metilglutaril; 5-FU+MMH-1 (50mg) grubunda düştü, valin; 5-FU grubunda arttı, metiyonin; MMH-1 (50mg), 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında arttı, tirozin; 5-FU grubunda arttı, arjinin; MMH-1 (50mg) grubunda düştü, glisin; 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında düştü ve glutamat; MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında düştü. Bu artış ve düşüşler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4. 21. Grupların serum amino asit seviyeleri.

**Tablo 4. 3. Grupların serum amino asit kompozisyonunun kantitatif analizi.**

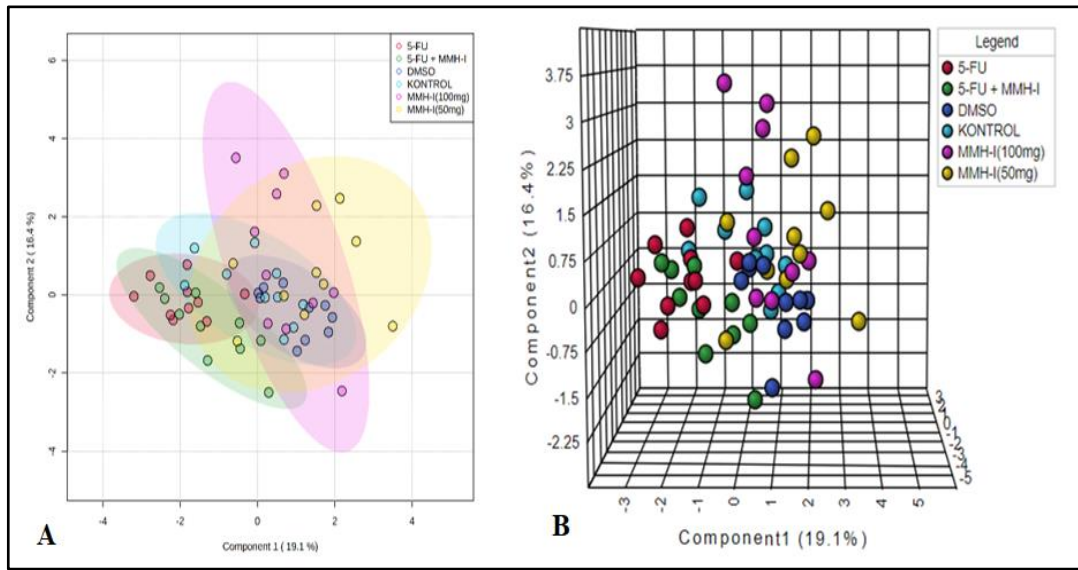
| Amino Asitler    | Kısaltma | Gruplar (Ort±SS) |                        |                         |                |                |                               |        |   | P | Post Hoc (Tukey) |
|------------------|----------|------------------|------------------------|-------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|--------|---|---|------------------|
|                  |          | (A)<br>DMSO      | (B)<br>MMH-1<br>(50mg) | (C)<br>MMH-1<br>(100mg) | (D)<br>Kontrol | (E)<br>5-FU    | (F)<br>5-FU + MMH-1<br>(50mg) |        |   |   |                  |
| MetilGlutaril    | Mg       | 0.043±0.011      | 0.05±0.026             | 0.036±0.013             | 0.026±0.011    | 0.034±0.011    | 0.022±0.002                   | <0.001 | A-F, B-D, B-E, B-F                      |   |                  |
| Valin            | Val      | 155.810±17.416   | 148.368±13.737         | 159.617±30.048          | 157.298±27.458 | 191.810±22.131 | 172.001±30.117                | 0.003  | A-E, B-E, C-E, D-E                      |   |                  |
| Lösin/İzölösin   | Lew/İle  | 112.393±21.831   | 105.527±17.401         | 105.590±36.291          | 82.547±13.891  | 119.250±14.158 | 103.626±20.592                | 0.015  | A-D, D-E                                |   |                  |
| Metiyonin        | Met      | 23.150±4.031     | 39.344±16.608          | 29.090±7.521            | 31.761±10.828  | 54.459±12.343  | 41.294±6.073                  | <0.001 | A-B, A-E, A-F, B-E, C-E, D-E,           |   |                  |
| Fenilalanin      | Phe      | 96.414±6.745     | 105.496±25.907         | 105.262±25.268          | 80.003±13.932  | 119.210±13.409 | 101.787±20.793                | 0.001  | B-D, C-D, F-D                           |   |                  |
| Argininosüksinat | ASA      | 0.036±0.015      | 0.031±0.018            | 0.021±0.013             | 0.013±0.004    | 0.021±0.014    | 0.028±0.009                   | 0.004  | A-D, B-D,                               |   |                  |
| Tirozin          | Tyr      | 48.071±11.359    | 48.876±12.510          | 46.305±18.961           | 51.014±9.217   | 70.236±9.715   | 55.580±10.249                 | 0.001  | A-E, B-E, C-E, D-E,                     |   |                  |
| Alanin           | Ala      | 199.855±28.977   | 219.146±63.752         | 222.753±90.127          | 182.790±54.017 | 203.258±23.638 | 190.045±33.837                | 0.527  | -                                       |   |                  |
| Aspartat         | Asp      | 78.742±29.206    | 79.509±38.499          | 47.158±23.512           | 20.930±2.363   | 61.413±27.149  | 38.452±6.704                  | <0.001 | A-D, A-F, B-D, B-F, D-E                 |   |                  |
| Arjinin          | Arg      | 54.121±17.362    | 36.220±7.831           | 39.527±16.377           | 44.222±10.578  | 44.787±7.268   | 46.930±6.570                  | 0.028  | A-B,                                    |   |                  |
| Sitrülin         | Cit      | 18.448±4.207     | 18.135±6.986           | 18.930±7.986            | 25.522±2.312   | 18.780±2.469   | 19.764±2.576                  | 0.014  | A-D, B-D, C-D, D-E,                     |   |                  |
| Glisin           | Gly      | 228.678±50.300   | 230.312±66.574         | 219.162±103.389         | 151.441±18.746 | 141.095±25.279 | 123.445±20.803                | <0.001 | A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-E, C-F, |   |                  |
| Ornitin          | Orn      | 26.326±6.368     | 30.179±14.173          | 24.895±6.396            | 22.272±3.763   | 27.847±9.820   | 20.425±3.080                  | 0.106  | -                                       |   |                  |
| Glutamat         | Glu      | 149.269±51.091   | 130.912±50.748         | 85.407±32.614           | 62.895±12.696  | 95.472±23.739  | 84.877±13.845                 | <0.001 | A-C, A-D, A-E, A-F, B-D, B-F,           |   |                  |

Sonuçlar One Way ANOVA testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı.

MMH-1 (50mg) grubu 5-FU grubu ile karşılaştırıldığında metilglutaril ve glisin amino asitlerinde artış ve valin, metiyonin, tirozin amino asitlerinde düşüş bulundu. Ayrıca MMH-1 (50mg) grubu 5-FU+MMH-1 (50mg) grubu ile karşılaştırıldığında metilglutaril, aspartat, glisin ve glutamat amino asitlerinde artış anlamlı bulundu. MMH-1 (100mg) grubu 5-FU grubu ile karşılaştırıldığında valin, metiyonin ve tirozin amino asitlerinde düşüş ve glisin amino asidinde artış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

### PLS-DA ile Grupların Ayrılması

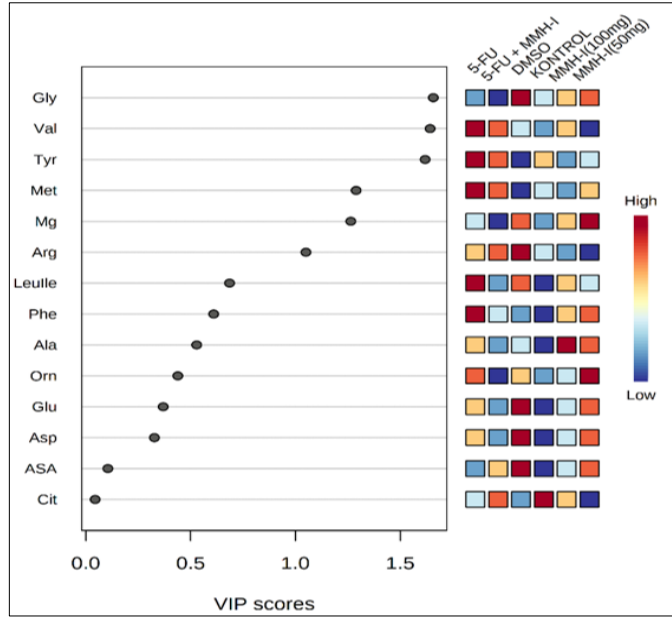
Meme kanseri gruplarındaki ve kontrol grubundaki farelerin plazmalarındaki amino asit seviyelerine göre PLS-DA ile gruplardaki fareler görselleştirildi (Şekil 4.22). PLS-DA analizine göre gruplar arasında belirgin kümeleşme oluşmasına rağmen kısmi ayrışma gösterdi.



Şekil 4. 22. PLS-DA'nın iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) skor grafikleri.

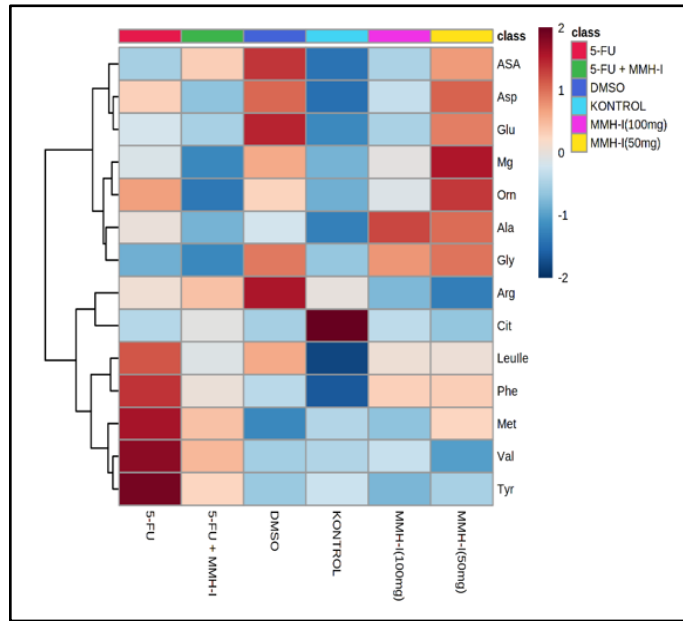
### Diferansiyel Amino asitlerin Taranması

Kanser gruplarını (DMSO, MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU, 5-FU + MMH-1 (50mg)) kontrol grubundan ve kanser gruplarının kendi arasında ayırt etme güçlerine göre amino asitleri sıralayan VIP grafiği oluşturuldu (Şekil 4.23). Amino asitlerin grupların ayrışmasına katkısı artarsa VIP skoru da artmaktadır. Glisin, valin ve tirozin grupların ayrışmasına katkısı en yüksek ilk üç amino asittir.



Şekil 4. 23. Önemli amino asitleri gösteren VIP grafiği.

Gruplardaki karnitinlerin yoğunluklarını gösteren bir ısı haritası çizildi (Şekil 4.24). Isı haritasına bakıldığında kanser gruplarında neredeyse tüm amino asitlerde kontrol grubuna artış görülmektedir ama Kontrol ve 5-FU + MMH-1 (50mg) grupları benzer yoğunlukta amino asit seviyeleri göstermektedir. DMSO, MMH-1 (50mg) ve 5-FU gruplarında belirgin şekilde amino asit yoğunlukları artmaktadır. MMH-1 (100mg) grubu ise kontrol grubuna yaklaşmıştır.



Şekil 4. 24. Gruplardaki amino asitlerin yoğunluklarını gösteren ısı haritası.



## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık teşhis edilen ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Tedavide yeni gelişmeler olmasına rağmen heterojen doğası gereği büyük zorluklar ortaya çıkmaktadır (155). Hormon reseptörlerinin (HR'ler) ve HER2 proteinlerinin varlığı meme kanserinin alt tiplerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu alt tipler: (1) luminal A (HR+/HER2-), (2) HER2+, (3) luminal B (HR+/HER2+) ve (4) üçlü negatif (HR-/HER2-). Bu alt tipler hastalığın ilerlemesi, insidansı, terapötik yanıt ve metastaz için farklı risk faktörleri oluşturmaktadır (156).

HR+ olan luminal meme kanserleri gelişmiş ülkelerde meme kanseri vakalarının çoğunluğunu oluşturmaktadır (156). HR+ meme kanserinde kullanılan ajanlar arasında östrojen alımını engelleyenler, aromataz inhibitörleri ve yumurtalıklardan hormon üretimini engelleyenler bulunmaktadır. Tedavide daha iyi sonuçlar almak için bu ilaçların kombine kullanımı ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır ve metastatik HR+ olan meme kanserinde genomik ve metabolik değişimlerinin olması hormonal tedaviye direnç oluşmasına neden olmaktadır (157). HER2+ meme kanserinde halihazırda çeşitli ajanlar ya tek başlarına ya da standart kemoterapi ile kombine olarak kullanılmaktadır. anti-HER2 monoklonal antikoru, antikor-sitotoksik ajan konjugatı ve ikili tirozin kinaz inhibitörü bu ajanlar arasındadır (156). Son yıllarda HER2+ olan meme kanserinde bu tedavilerin kullanımı ile ortalama hayatta kalma süresi 20 aydan 5 yıla kadar çıkmıştır. Ancak bu ajanlara karşı gelişen direnç, kullanılan terapötiklerin başarı şansını azaltmaktadır (158). HR+ ve HER2+ alt tiplerine göre daha agresif olan üçlü negatif meme kanserinde tedavi daha zor olmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri için kemoterapi standart tedavi olarak devam etmekte ve tedaviye en az yanıt veren alt tiptir (159). Metastatik üçlü negatif meme kanseri diğer alt tiplere göre sitotoksik ajanlarla ortalama hayatta kalma daha düşük olup 9-12 aydır. ER, PR, HER2 reseptörlerinin ekspresyonunun olmaması üçlü negatif meme kanserinde tedavilerinin başarılı sonuç almasını engellemektedir (156). Meme kanserinde kullanılan bu ajanları son yıllarda başarılı sonuçlar göstermesine rağmen tümörün yeniden büyümesini engelleyemedikleri, kemorezistans ve radyorezistansın sık meydana gelmesi ve normal hücrelere karşı spesifik olmayan toksisite standart tedavilerin önemli sınırlamalarıdır. Meme kanserinde yeni terapötik hedeflerle tam tümör regresyonu, daha iyi hedef dışı toksisite ve hedefe

özgü ajanların araştırılmasında bilim insanları arasında fikir birliği vardır. Hedefler arasında kanser hücrelerinin gelişmesini ve ilerlemesini sağlayan enzimlerin engellenmesi bulunmaktadır ve CA IX oldukça ilgi görmüştür (160).

CA IX, su ve karbon dioksiti bikarbonat iyonlarına ve protonlara dönüştüren ve hipoksi ile indüklenebilir bir enzimdir. Kanser hücrelerinin hipoksik mikroçevrede hayatta kalmalarını sağlayarak tümör homeostazında önemli rol oynaktadır (161). Ayrıca CA IX aktivitesi ile tümörlerin agresif/invaziv fenotipindeki artışla bağlantılı olduğu ve kanser hücrelerinin göç yollarını uyararak metastazla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri dahil birçok tümör tipinde CA IX'un aşırı eksprese olduğu birçok çalışmada bildirmiştir (162). Li ve ark. meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada CA IX aktivitesinin kanser ile doğrudan ilişkili olduğunu gösteren ilk bilgileri bildirmişlerdir. Bu çalışmada kanserin ilerlemesiyle CA IX protein ekspresyonunda artış olduğunu ve CA IX özgü inhibitör ile meme kanserinde terapötik müdahale ile başarılı sonuçlar alınabileceği rapor edilmiştir (163). İn vivo klinik öncesi tümör modellerinde yapılan çalışmalar hipoksik tümörlerin büyümesinin ve metastazın engellenmesi için CA IX'un susturulmasının gerekli olduğunu göstermiştir (164). Chiche ve ark. LS147Tr kolorektal kanser ksenograftlarında yaptığı çalışmada tek başına CA IX'un susturulması ksenograft tümör hacminde yaklaşık %40 azalma, hem CA IX'un hem CA XII'in genetik depleasyonu ise yaklaşık %85 oranda azalma sağladığını bulmuştur (165). Bu bağlamda CA IX inhibitörlerinin tasarımı meme kanseri dahil katı tümörlerin tedavisi için potansiyel bir hedef olarak görülmektedir (162). Bu hedefler arasında sülfonamidler, karbonik anhidraz inhibitörlerinin en çok araştırılan sınıfı olmuştur (166).

Sülfonamidlerin ilk keşfinden beri anti-bakteriyel, antifungal, anti-inflamatuar ve anti-diyabetik gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip türevleri geliştirilmiştir (15). CA'ın aktivitesinin sülfonamidle inhibe edilmesinin keşfinden beri birçok sülfonamid ilaçlar, anti-glokom ajanları, anti-tiroit ve anti-kanser ajanların yeni tipleri açıklanmıştır (126). Kanser tedavisinde bazı sülfonamid türevleri FDA tarafından onaylanmıştır. T hücreli lenfoma tedavisinde histon deasetilaz inhibitörü olan Belinostat, Vorinostat ve Romidepsin, kronik lenfositik lösemi tedavisinde bir Bcl-2 inhibitörü olan ABT-199 ve akut lösemilerin ve malign lenfomaların tedavisinde topoizomerez II inhibitörü olan amsakrin onaylan sülfonamidlerdendir (15). Giderek artan sayıda çalışmada sülfonamid türevleri seçici CA IX inhibitörleri olarak hücre kültürü ortamında ve kanser modeli

oluşturulan hayvan deneylerinde değerlendirilmiş olup anti-tümör ajanlar olarak potansiyelleri hakkında kanıtlar sunulmuştur.

Markowicz-Piasecka ve ark. sentezlediği sülfonamid türevlerinin meme kanserinde anti-neoplastik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada hücre kültürü ortamında MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine yeni sentezledikleri sülfonamidlerden bileşik 2 ( $N^1, N^1$ -Dimethyl- $N^4$ -octylsulfonamide-biguanide) güçlü biyolojik aktivite göstermiştir. MCF-7 hücrelerinde 114.0  $\mu\text{mol/L}$  ve MDA-MB-231 hücrelerinde 844.9  $\mu\text{mol/L}$  IC50 değerleri olduğu MCF-7'de daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu güçlü sitotoksik özelliğin apoptozu indüklemeye yeteneği ile kanser hücrelerde G0/G1 ve G2/M fazındaki hücre döngüsünü durdurarak etki gösterdiği bildirilmiştir (167). Schröder ve ark. meme kanseri hücreleri olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine sentezledikleri sülfonamidin (1-((1S,4S)-3-((E)-ferrocenylmethylidene)-7,7-dimethyl-2-oxobicyclo heptan-1-yl)-N-(tert-butyl) methanesulfonamide) anti-kanser etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kanserli olmayan hücrelere (MCF-10A) göre kanser hücrelerinde ( MCF-7 ve MDA-MB-231 ) yüksek oranda sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir (168). Okolotowicz ve ark. yaptığı çalışmada 75.000 bileşiği inceleyip aralarında daha güçlü ve ilaç potansiyeli yüksek olan üç bileşik optimize edilmiştir. Bu sülfonamid türevi olan üç bileşik, bileşik 19, 24 ve 25 MCF-7'de (sırasıyla IC50 değerleri 10, 7 ve 4nM) ve MDA-MB 231'de (IC50 değerleri sırasıyla 13, 13 ve 16nM) sitotoksiteleri araştırılmış ve güçlü anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (169). Andreucci ve ark. MCF7 meme kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmada CAIX inhibitörü olan SLC-0111'in (üreido ikameli benzen sülfonamid) günümüzde kanser tedavisinde kullanılan Doksorubisin ile kombine tedavisi kanser hücreleri üzerine sitotoksikiteyi arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca HCT116 kolon kanseri hücrelerine SLC-0111 ile kemoterapötik ajan olan 5-FU'in kombine tedavisi de sitostatik aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur (170). SLC-0111 yakın zamanda I. faz klinik deneylerini tamamladı ve CA IX'u aşırı ifade eden katı tümörlerin tedavisi için II. Faz denemelerine başlaması planlanmaktadır (171). Bizim yaptığımız çalışmanın in vitro kısmında MMH-1, SLC-011 ve 5-FU'in 4T1 meme kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini araştırdık. MMH-1'in IC50 değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 8.124  $\mu\text{M}$ , 5.933  $\mu\text{M}$  ve 5.629  $\mu\text{M}$  oldu. SLC-0111 için IC50 değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 28.19  $\mu\text{M}$ , 26.79  $\mu\text{M}$ , 26.40  $\mu\text{M}$  ve 5-FU için ise IC50 değerleri 24,48 ve 72 saat için sırasıyla 33.97  $\mu\text{M}$ , 24.56  $\mu\text{M}$  ve 18.95  $\mu\text{M}$  oldu. MMH-1 diğer etken maddeler göre (5-FU ve SLC-011) daha iyi sonuçlar gösterdi ve etkin dozu 6 $\mu\text{M}$  olduğu belirlendi. 4T1

hücrelerinde MMH-1 (3  $\mu$ M ve 6  $\mu$ M dozlarında) ve 5-FU'in (30  $\mu$ M) apoptotik etkisi akridin oranj/ethidium bromide boyama ile araştırıldı. MMH1'in her iki dozda da hücrelerde apoptozu tetiklediği tespit edildi ve 5-FU için MMH-1'in 5 katı muamele sonrasında benzer sonuç elde edildi. MMH-1'in apoptotik etkisi ayrıca Annexin-V ile incelendi ve MMH-1 bileşiğinin artan dozu ile orantılı olarak hücrelerde apoptozu tetiklediği bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda sentezlediğimiz sülfonamid türevi olan MMH-1, hem klinikte kullanılan kemoterapötik ajan olan 5-FU'ya göre hem de CA IX inhibitör etkisi bilinen SLC-0111'e göre meme kanseri hücreleri olan 4T1 üzerinde daha başarılı sonuçlar göstermiştir.

Meme kanseri dahil hipoksik tümörlerde terapötik hedef olan CA IX ilgi giderek artmasına rağmen klinik öncesi dönemde halen birçok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. CA IX-pozitif prelinik modellerin azlığı ve inhibitör moleküllerin sentezlenmesindeki zorluklar devam etmektedir (11). Ancak son dönemlerde artan in vivo çalışmalar ile CA IX için inhibitör etki gösteren ajanlar literatüre kazandırılmıştır. CA IX inhibitörü olarak sülfonamidlerin anti-tümör etki gösterdiğini bildiren ilk çalışma Neri ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada asetazolamid yapı iskeletine albümin bağlayıcı kısımların veya floresein-karboksilik asit eklenmesi oluşturulan ajanlar, SK-RC- 52 ile oluşturulan meme kanseri fare modelinde bir ay süre ile tedavi edildiğinde anti-tümöral aktivite gösterdiği ve bu sayede anti-kanser ilaçların geliştirilebileceği rapor edilmiştir (14).

Pacchiano ve ark. 4T1 fare meme kanseri modelinde çeşitli sülfonamid türevlerinin anti-tümöral ve anti-metastatik etkilerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda üredio sülfonamid, CA IX ekspresyon seviyesi çok yüksek olan 4T1 primer tümörünün hem büyümesini hem de metastaz oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (172). Lou ve ark. yaptığı çalışmada 4T1, MDA-MB-231 ve MDA-MB-231 LM2-4Luc+ (Akciğer metastatik) meme kanseri hücreleri oluşturulan fare ksenograftlarında sülfonamidin (CAI17) anti-tümöral etkileri araştırılmıştır. CAI17'nin 4T1 ortotopik meme tümörlerinin gerilemesine ve spontan akciğer metastazı oluşumunun inhibisyonuna, MDA-MB-231 meme kanseri ksenograftlarında birincil tümör büyümesinin zayıflamasına ve MDA-MB-231 LM2-4Luc+ ortotopik tümörleri barındıran farelerde de primer tümör büyümesi üzerine benzer inhibitör etkiler gösterdiği bulunmuştur. Bu sülfonamid bileşiğinin kanser hücrelerinde büyüme, inhibisyon ve metastaz üzerindeki anti-tümör etkisinin CA IX inhibisyonu yoluyla gerçekleştiğini açık bir şekilde kanıtlamıştır (173). Touisni ve ark. yaptığı çalışmada 4T1 meme kanseri fare modelinde sülfonamid türevi olan glikozil kumarinlerin primer tümörleri önemli ölçüde azalttığını bulmuştur ve kemoterapi/

radoterapiye yanıt vermeyen kanserlerin tedavisinde faydalı olabileceğini bildirilmiştir (174). Bu çalışmalar hipoksik, agresif katı meme kanseri tedavisi için sülfonamidlerin CA IX inhibitörleri olarak kullanımı için güçlü klinik öncesi kanıtlar sağlamaktadır.

Bizim çalışmamızın in vivo kısmında kanser modeli oluşturduğumuz farelerde MMH-1'in anti-tümoral etkisini hem monoterapi hem de kombine tedavi olarak araştırdık. DMSO grubumuza (pozitif kontrol) göre MMM-1'in düşük dozu (50mg/kg) 5-FU'den tümör hacimlerini azaltmada kısmen daha iyi sonuçlar göstermesine rağmen MMM-1'in yüksek dozu (100mg/kg) belirgin olarak azaltmıştır. Ancak en etkili sonuçları kombine tedavi olan MMM-I ve 5-FU birlikte verdiğimiz grupta aldık. Tümör hacimlerinin azalmasındaki neden olan etkenlerden apoptotik etkiyi kaspaz 3'ü ELISA ve PCR yöntemleri araştırdık. MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında kaspaz 3 protein seviyeleri normal meme dokularına göre tümör dokularında anlamlı bir şekilde arttığını ve kaspaz 3 gen ekspresyonlarında bu artış ile paralel anlamlı artışların olduğunu bulduk. DMSO grubunda ise normal meme dokusuna göre tümör dokusunda kaspaz 3 protein seviyesinin azaldığı görüldü. Bu bağlamda tedavide kullandığımız ajanları MMH-1 ve 5-FU'in kaspaz 3 ekspresyonlarını artırarak kanser hücrelerinin ölümüne (Apoptoz) neden olup tümör dokusunun hacminin azalmasını sağlayabileceği bilgisi elde edilebilir. Ayrıca histopatolojik boyama ile tümör dokularındaki hücre ölüm seviyeleri araştırıldı. Düşük orandan yüksek orana doğru DMSO (%30), MMH-1 (50mg) (%55), 5-FU (%65), MMH-1 (100mg) (%70) ve 5-FU+MMH-1 (50mg) (%80) nekrotik alanlar gözlemlendi. Kombine tedavi tümör dokusunda en yüksek oranda hücre ölümünü sağladı. Hem kaspaz 3 analizleri hem de histopatolojik boyama analizleri DMSO grubunda hücre ölümünün diğer gruplara göre azlığından dolayı tümörün daha fazla gelişmesinin ve daha yüksek hacmin olmasının nedenini açıklayabilir.

CA IX normal dokularla karşılaştırıldığında meme tümörü dahil birçok katı tümörde eksprese olmakta ve bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Bu katı tümörlerde hipoksik durumun tümör mikroçevresini şekillendirdiğini ve CA IX'un ekspresyonunu artırarak EMT, invazyona ve anjiyogeneze katkı sağladığı bilinmektedir (116). Hipoksik tümörlerde arttığı bilinen CA IX ekspresyonunu hem ELISA hem de PCR yöntemiyle araştırdık. MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında CA IX protein seviyelerinde normal meme dokularına göre tümör dokularında anlamlı şekilde arttığını bulduk ( $p < 0.05$ ). DMSO grubunda da artış bulundu ve bu artış diğer gruplara göre çok daha fazla oldu ( $p < 0.01$ ). MMH-1 (50mg), MMH-1

(100mg) ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında CA IX gen ekspresyonları normal meme dokusuna göre tümör dokularında anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. DMSO grubunda ise normal meme dokusuna göre tümör dokusunda artış bulundu ( $p>0.05$ ). Bu sonuçlar MMH-1'in CA IX için inhibitör etki gösterebileceğini, kanserin gelişip ilerlemesini engelleyebileceğini ve kombine olarak kullanıldığında tümörün küçülmesinde daha fazla etki sağlayabileceğini gösterebilir.

E-Cadherin, hücre yapışmasında ve hücrelerin epitelyal fenotipinin korunmasında ayrılmaz olan yapışık bağlantıların önemli bir bileşenidir. E-cadherin ekspresyonunun kaybı, temas inhibisyonunun kaybıyla sonuçlanarak artan hücre hareketliliğine, kanserin ilerlemesine ve metastazına neden olduğu bilinmektedir (175). Bizim çalışmamızda MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg) ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında normal meme dokularına göre tümör dokularında E-Cadherin protein seviyesinde anlamlı bir artış bulduk ( $p<0.05$ ). DMSO ve 5-FU gruplarında ise normal meme dokusuna göre tümör dokularında sırasıyla azalış ve artış bulundu ( $p>0.05$ ). Gen ekspresyon seviyelerinde tüm gruplarda normal meme dokularına göre tümör dokularında anlamlı artış olmasına rağmen DMSO grubunda anlamlı değildi. Bu sonuçlar tedavide kullandığımız MMH-1 maddesinin tümörün gelişmesinde ve ilerlemesinde engelleyici rolü olduğunu destekleyebilir ve DMSO grubundaki E-Cadherindeki bu azalmanın sonucu olarak tümörün metastaz yapabileceği sonucuna ulaşılabilir.

Ara filament olan vimentinin tümör oluşumu, EMT ve metastatik yayılım dahil olmak üzere kanserin başlaması ve ilerlemesinin birçok yönüne dahil olduğu bilinmektedir (86). Bizim çalışmamızda DMSO grubunda vimentin protein seviyesinde normal meme dokusuna göre tümör dokularında anlamlı artış ve diğer gruplarda ise azalış ( $p>0.05$ ) olduğunu bulduk. Vimentin gen ekspresyonlarında ise MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg) ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında normal dokuya göre tümör dokularında anlamlı azalış ve DMSO grubunda ise anlamlı artış olduğunu tespit ettik. Vimentinin hem protein hem de gen ekspresyonlarındaki seviyelerine bakılarak DMSO grubundaki farelerin tümörleri gelişimini hızlı bir şekilde devam ettirdiği ve hatta metastaz yapabileceği sonucuna ulaşılabilir. Ayrıca MMH-1 (50mg), MMH-1 (100mg), 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) gruplarında vimentinin azalması tümörün gelişimini ve ilerlemesini baskılayabileceği sonucuna ulaşılabilir.

Tümör metabolizması son yıllarda kanser araştırmalarında büyük bir hedef haline gelmiştir. Kanser tedavisinde geliştirilen terapötik yöntemler değişmiş tümör metabolizmasını hedefleyerek etkili tedavilerin ortaya çıkmasını sağlayabilir (176).

Serbest amino asitler (FAA), kanser hücrelerinde protein ve DNA sentezi için kanserin gelişmesi ve ilerlemesinde aşırı talep gören metabolitlerden biridir. Bu FAA'ların azalmasına yol açtığı gibi artan FAA yüksek proliferasyonun göstergelerinden biridir. Ancak FAA profili meme kanserinin evresi, beslenme, yaş, ölçüm teknikleri ve katılımcı örnekleri farklılıklar oluşturabilmektedir (177). Sağlıklı popülasyonlarda, amino asitlerin protein sentezi ve protein yıkımı için sürekli döngüsüne rağmen nötr net protein dengesini korumak için amino asitler sıkı bir şekilde düzenlenir (178). Amino asitler biyolojik numunelerde kolayca ölçülebildiklerinden dolayı amino asitlerin meme kanserinde tedavinin takibinde kullanılabileceği bildirilmiştir (179). Amino asit metabolizmasındaki değişiklikler kanser hastalarında son zamanlarda araştırılmaya başlanmıştır. Pankreas, tiroid, gastrointestinal ve meme kanseri gibi FFA'lerin azalan seviyeleri bildirilmiştir ve tümörün artan tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (180). Bunun aksine kanserin erken evreleri göz önünde bulunduran birçok çalışmada FFA'lerin düzeylerinde artışın olduğu bildirilmiş (181) ve meme kanseri alt tipleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (178, 182).

Bizim çalışmamızda amino asit profiline (Tablo 4.4) genel olarak bakıldığında negatif kontrol grubu MMH-1 (100mg) grubu ile karşılaştırıldığında fenilalanin ve sitrülün amino asitlerinde, 5-FU+MMH-1 (50mg) grubu ile karşılaştırıldığında sadece fenilalanin amino asidinde, DMSO grubu ile karşılaştırıldığında lösin/izolösin, argininosüksinat, aspartat, sitrülün, glisin ve glutamat amino asitlerinde anlamlı değişimler oldu. DMSO grubu MMH-1 (100mg) grubu karşılaştırıldığında glutamat amino asidinde, 5-FU+MMH-1 (50mg) grubu ile karşılaştırıldığında ise metilglutaril, metiyonin, glisin ve glutamat amino asitlerinde anlamlı değişimler gösterdi. Bu bağlamda tedavi ajanımız olan MMH-1 maddesinin yüksek dozu (100mg) kanserli farelerde kullanıldığında sağlıklı farelerle benzer amino asit profili sergilediğini, ancak 5-FU maddesi ile kombine kullanıldığında ise sağlıklı farelere çok daha yakın amino asit profili sergilediğini bulduk. Kanser olup tedavi edilmeyen pozitif kontrol grubu (DMSO) diğer gruplarla karşılaştırıldığında neredeyse analiz ettiğimiz tüm amino asitlerde anlamlı değişimler olduğunu bulduk. Bu bağlamda kanserin amino asit metabolizmasını önemli ölçüde değiştirebileceğini ve tedavi edildiğinde bu değişimin azaltılabileceği sonucuna ulaşılabilir.

Kanser hücreleri, birincil enerji kaynağı olarak aerobik glikolize öncelik verir (183). Ancak glikozdan farklı besinlerin varlığında metabolik fonksiyonlara katkıda bulunmak için birçok metabolik stratejiyi nasıl kullandığı halen tam olarak bilinmemekle beraber glikolize ek olarak yağ asidi oksidasyonu gibi çeşitli metabolik stratejiler

gerçekleştirebilir (184). Yakın zamanda yapılan araştırmalarda komşu yağ dokularında, hücre içi depo yağından, lipoproteinlerden ve lizofosfolipidlerden kanser hücreleri yararlanarak canlılığını ve büyümesini sürdürdüğü bildirilmiştir. Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu glikozdan mol başına daha fazla ATP kazandırdığından yağ asitleri tümörü tatmin edici bir şekilde besleyebilir (153). B hücreli lenfoma ve prostat kanserinde temel enerji kaynağı olarak yağ asidi oksidasyonunu destekler ve oksidasyon enzimlerini eksprese eder (185, 186). Mitokondriyal  $\beta$ -oksidasyon için yağ asitlerinin taşınmasında karnitin sorumludur ve taşınım esnasında karnitin esterleri oluşmaktadır (150).

Bizim çalışmamızda serbest karnitin ve 26 ester karnitin toplam 27 karnitin analizi yapıldı. Analiz sonuçları doğrultusunda karnitin profiline (Tablo 4.3) genel olarak bakıldığında kontrol grubuna göre DMSO grubunda 20 karnitinde (C0, C2, C3, C5, C5:1, C5-OH, C5DC, C6, C8, C10, C10DC, C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2 ve C18:1-OH) artış, MMH-1 (50mg) grubunda 14 karnitinde (C3, C5, C5DC, C6, C10, C10DC, C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:2 ve C18:1-OH) artış ve MMH-1 (100mg) grubunda 8 karnitinde (C5, C6, C12, C14, C16, C18, C18:1 ve C18:2) artış bulundu ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca kontrol grubu 5-FU ve 5-FU+MMH-1 (50mg) grupları ile karşılaştırıldığında hiçbir karnitinde anlamlı değişim olmadı. Pozitif kontrol grubuna göre MMH-1 (100mg) grubunda 6 karnitinde (C0, C3, C5:1, C5DC, C18 ve C18:1-OH) azalış, 5-FU grubunda 17 karnitinde (C0, C3, C4DC, C5DC, C6, C6DC, C10, C10DC, C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2 ve C18:1-OH) azalış ve 5-FU+MMH-1 (50mg) grubunda 18 karnitinde (C0, C2, C3, C4DC, C5-OH, C5DC, C6, C8, C12, C14, C14:1, C14:2, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2 ve C18:1-OH) azalış bulundu ve bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu bilgiler doğrultusunda tedavi edilmeyen pozitif kontrol grubunda kanserin gelişmesi ve ilerlemesinde artan enerji talebi artırdığından yağ asitlerinin oksidasyonu desteklendiğinden karnitin sentezini artırmış olabilir. MMH-1 artan dozu kanserin büyümesini baskıladığından karnitin metabolizmasındaki bozulmaları azaltmıştır. 5-FU ve kombine tedavi alan (5-FU+MMH-1 (50mg)) farelerde karnitin metabolizması sağlıklı farelerle benzer sonuçlar gösterdi. MMH-1'in mono veya kombine terapisi, CA IX ekspresyonunu azaltması ve kaspaz 3 seviyesini artırması ile tümörün gelişmesini ve ilerlemesini baskılayabileceğinden tümörün enerji ihtiyacındaki artışın önüne geçilerek yağ asitlerinin oksidasyonundan ziyade temel enerji kaynağı olan glikolize yönlendirerek karnitin seviyesindeki artışın önüne geçilmiş olabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tümör mikroçevresi kanser hücrelerinin gelişip ilerlemesini, invazyonunu ve metastazını desteklemektedir. Normal şartlarda yaşamla bağdaşmayan bu mikroçevreye kanser hücreleri adepte olarak yaşamlarını sürdürür. Mikroçevrenin önemli özelliklerinden biri düşük pH'a sahip olmasıdır. Kanser hücresinin bu düşük pH'da hücre içi pH'nı alkali seviyede (yaklaşık 7.4) tutması gerekir ve bunu sağlayan CA IX enzimidir. CA IX bu nedenle meme kanseri dahil birçok kanser çeşidinde yüksek miktarlarda eksprese olmaktadır. Bu nedenle bilim insanları bu enzim üzerine inhibitör etki gösterecek ajanlar geliştirerek kanserde başarılı sonuçlar elde etmeye çalışmışlardır. Bu bağlamda sülfonamidler CA inhibitör etkisi sayesinde günümüzde popüler olmaktadır.

Bu çalışmamızda yeni sentezlenen bir sülfonamid türevi olan MMH-1 maddesinin Moleküler Docking yöntemi ile CA IX üzerine bağlanma sağlayabileceği sonucuna ulaştık. Hücre kültürü ortamında CA IX inhibitör etkisi bilinen sülfonamid olan SLC-0111 ve kemoterapötik ajan olan 5-FU ve MMH-1'in kanser hücrelerinin canlılıklarını azalttığını ve MMH-1 daha başarılı olduğunu bulduk. Bu başarılı sonuçlar doğrultusunda hayvan deneylerine geçilerek MMH-1 meme kanseri olan farelerde tümör hacimlerini azalttığını gösterdik ve kombine tedavide daha başarılı sonuçlar elde ettik. Bu sonuçları ELISA, PCR, Histopatolojik boyama ve metabolik analizlerle destekledik. MMH-1'in daha farklı dozlarla ve farklı kemoterapötik ajanlarla araştırmalar yapılması kanser tedavisindeki potansiyelini güçlendirecektir. Preklinik yapılacak çalışmalar sonrası MMH-1'in klinikte meme kanseri tedavisinde yüksek potansiyel sergileyen kemoterapötik bir ajan olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018, 68(6): 394-424.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021, 71(3): 209-49.
3. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy G, Tsan J, Cardoso F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2019, 5(1): 1-31.
4. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2013, 32(1): 303-15.
5. Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. *Surg Oncol* 2012, 21(3): 172-7.
6. Liu C, Gao S, Qu Z, Zhang L. Tumor microenvironment: hypoxia and buffer capacity for immunotherapy. *Med Hypotheses* 2007, 69(3): 590-5.
7. Brahim-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2011, 21(1): 67-72.
8. Mahon BP, Pinard MA, McKenna R. Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression. *Molecules* 2015, 20(2): 2323-48.
9. Angeli A, Carta F, Nocentini A, Winum J-Y, Zalubovskis R, Akdemir A, Onnis V, Eldehna WM, Capasso C, Simone GD. Carbonic anhydrase inhibitors targeting metabolism and tumor microenvironment. *Metabolites* 2020, 10(10): 412.
10. Meijer TW, Bussink J, Zatovicova M, Span PN, Lok J, Supuran CT, Kaanders JH. Tumor microenvironmental changes induced by the sulfamate carbonic anhydrase IX inhibitor S4 in a laryngeal tumor model. *PLoS One* 2014, 9(9): e108068.
11. McDonald PC, Winum J-Y, Supuran CT, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget* 2012, 3(1): 84.
12. Dubois L, Douma K, Supuran CT, Chiu RK, van Zandvoort MA, Pastoreková S, Scozzafava A, Wouters BG, Lambin P. Imaging the hypoxia surrogate marker CA IX requires expression and catalytic activity for binding fluorescent sulfonamide inhibitors. *Radiother Oncol* 2007, 83(3): 367-73.

13. Supuran CT. Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr Pharm Des* 2008, 14(7): 641-8.
14. Ahlskog JK, Dumelin CE, Trüssel S, Mårlind J, Neri D. In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, 19(16): 4851-6.
15. Wan Y, Fang G, Chen H, Deng X, Tang Z. Sulfonamide derivatives as potential anti-cancer agents and their SARs elucidation. *Eur J Med Chem* 2021, 226: 113837.
16. Ruddon RW. *Cancer biology*, 4<sup>th</sup> ed. Michigan, *Oxford University Press*, 2007: 4-15.
17. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Turk Onkol Derg* 2007, 22(4): 197-204.
18. Patel A. Benign vs malignant tumors. *JAMA Oncol* 2020, 6(9): 1488.
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5): 646-74.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Biological hallmarks of cancer. *Holland-Frei Cancer Medicine* 2016, 9: 1-10.
21. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 2017, 7(5): 1016.
22. Huang T, Song X, Yang Y, Wan X, Alvarez AA, Sastry N, Feng H, Hu B, Cheng SY. Autophagy and hallmarks of cancer. *Crit Rev Oncog* 2018, 23: 5-6.
23. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010, 316(8): 1324-31.
24. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1): 57-70.
25. Park M-T, Lee S-J. Cell cycle and cancer. *BMB Rep* 2003, 36(1): 60-5.
26. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2008, 9(3): 51-61.
27. Arı M. Meme Kanseri Hücre Dizisinde (MCF-7) Oleuropein ve D Vitamininin Antiproliferatif, Apoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2018.
28. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, Shi W, Jiang J, Yao P-P, Zhu H-P. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017, 13(11): 1387.
29. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>  
Son Erişim Tarihi 15 Mayıs 2022.

30. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001, 2(3): 133-40.
31. Subramani R, Lakshmanaswamy R. Pregnancy and breast cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017, 151: 81-111.
32. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine* 2006, 3(1): 8-14.
33. Greif JM, Pezzi CM, Klimberg VS, Bailey L, Zuraek M. Gender differences in breast cancer: analysis of 13,000 breast cancers in men from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol* 2012, 19(10): 3199-204.
34. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet* 2001, 358(9291): 1389-99.
35. Günaldı O, Bozkurt HS, İlter E, Günaldı A, Çelik A, Ayan MT. Obezitenin kadın kanserleri üzerindeki etkileri: derleme makalesi. *Maltepe Tıp Dergisi* 2019, 11(3): 88-97.
36. Suzuki R, Orsini N, Saji S, Key TJ, Wolk A. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status—a meta-analysis. *Int J Cancer* 2009, 124(3): 698-712.
37. Zhao Y, Tan YS, Aupperlee MD, Langohr IM, Kirk EL, Troester MA, Richard CS, Sandra ZH. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. *Breast Cancer Res* 2013, 15(5): 1-20.
38. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res* 2017, 19(1): 1-14.
39. McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Campbell LL, Woods N, Ockene J. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA* 2003, 290(10): 1331-6.
40. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol* 2013, 14(10): 1009-19.

41. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet* 1996, 347(9017): 1713-27.
42. Liu J-Y, Chen T-J, Hwang S-J. The risk of breast cancer in women using menopausal hormone replacement therapy in Taiwan. *Int J Environ Res Public Health* 2016, 13(5): 482.
43. Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8(11): 669-76.
44. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA . The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007, 356(16): 1670-4.
45. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *The Lancet* 1997, 350(9084): 1047-59.
46. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami H-O, Van Den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, Kushi LH, Marshall JR, Miller AB, Speizer FE, Willett W, Wolk A, Yuan S-S. Non-dietary factors as risk factors for breast cancer, and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer. *Cancer Causes and Control* 1997, 8(1): 49-56.
47. Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health* 1996, 17(1): 47-67.
48. Liu Q, Wu J, Lambe M, Hsieh S-F, Ekblom A, Hsieh C-C. Transient increase in breast cancer risk after giving birth: postpartum period with the highest risk (Sweden). *Cancer Causes and Control* 2002, 13(4): 299-305.
49. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet* 2002, 360(9328): 187-95.
50. Fabbri A, Carcangiu ML, Carbone A. Histological classification of breast cancer. *Breast Cancer* 2008, 7: 3-14.
51. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010, 10(10): 955-60.

52. Lester SC, Bose S, Chen Y-Y, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Hill KA, Klee C, Page DL, Smith BL, Tan LK, Weaver DL, Simpson J. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *College of American Pathologists* 2009, 133(10): 1515-38.
53. Tsang J, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2020, 27(1):27-35.
54. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 2005, 365(9472): 1687-717.
55. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 2011, 378(9793): 771-84.
56. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, Renne G, Nole F, Goldhirsch A. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res* 2004, 10(19): 6622-8.
57. Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson J-Å, Tsai M-J, O'Malley BM. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 1988, 55(2): 361-9.
58. Daniel AR, Hagan CR, Lange CAJ. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2011, 6(3): 359-69.
59. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2018, 27(1): 95-120.
60. Bonneau C, Gurard-Levin ZA, Andre F, Pusztai L, Rouzier R. Predictive and prognostic value of the TauProtein in breast cancer. *Anticancer Res* 2015, 35(10): 5179-84.
61. He Z, Chen Z, Tan M, Elingarami S, Liu Y, Li T, Deng Y, He N, Li S, Fu J, Li W. A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell Prolif* 2020, 53(7): e12822.
62. Kurt H, Keşkek ŞÖ, Çil T, Canataroğlu A. Meme kanserli hastalarda tamamlayıcı/alternatif tedavi kullanımı. *Türk Onkoloji Dergisi* 2013, 28(1): 10-5.
63. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *JAMA* 2019, 321(3): 288-300.

64. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong J-H, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002, 347(16): 1233-41.
65. Vaidya JS, Tobias JS, Baum M, Wenz F, Kraus-Tiefenbacher U, D'Souza D, Keshtgar M, Joseph D. TARGeted Intraoperative radiotherapy (TARGIT): an innovative approach to partial-breast irradiation. *Semin Radiat Oncol* 2005, 15: 84-91.
66. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 2010, 81(11): 1339-46.
67. Witz IP, Levy-Nissenbaum O. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. 2006;242(1):1-10.
68. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill FJn. Cancer-related inflammation. *Cancer Lett* 2008, 454(7203): 436-44.
69. Arneith B. Tumor microenvironment. *Medicina* 2020, 56(1): 15.
70. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 2013, 13(1): 1-8.
71. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 2002, 8(4): 1284-91.
72. Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, Meir W. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res* 2005, 65(2): 605-12.
73. Challapalli A, Carroll L, Aboagye EO. Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clin Transl Imaging* 2017, 5(3): 225-53.
74. Chan N, Koritzinsky M, Zhao H, Bindra R, Glazer PM, Powell S, Belmaaza A, Bristow RG. Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res* 2008, 68(2): 605-14.
75. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007, 85(12): 1301-7.
76. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006, 70(5): 1469-80.

77. Xia Y, Choi H-K, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem* 2012, 49: 24-40.
78. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005, 438(7070): 967-74.
79. Mazure NM, Pouyssegur J. Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* 2009, 5(6): 868-9.
80. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006, 441(7092): 437-43.
81. Pećina-Šlaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 2003, 3(1): 1-7.
82. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* 2009, 19(1): 12-16.
83. Green KJ, Böhringer M, Gocken T, Jones JC. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* 2005, 70: 143-202.
84. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011, 68(18): 3033-46.
85. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(6): 442-54.
86. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014, 50(1): 1-6.
87. Savitskaya M, Onishchenko GE. Mechanisms of apoptosis. *Biochem (Mosc)* 2015, 80(11): 1393-405.
88. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005, 84(10): 627-39.
89. Lawen A. Apoptosis—an introduction. *BioEssays* 2003, 25(9): 888-96.
90. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000, 407(6805): 796-801.
91. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007, 35(4): 495-516.
92. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Salvasen GY. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998, 273(42): 27084-90.
93. Waterhouse NJ, Ricci J-E, Green DR. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 2002, 84(2-3): 113-21.



94. Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* 2005, 15(10): 749-69.
95. Adams CM, Clark-Garvey S, Porcu P, Eischen CM. Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma. *Front Oncol* 2019, 8: 636.
96. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995, 16(4): 202-6.
97. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002, 2(10): 735-47.
98. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5(4): a008656.
99. Harvey NL, Kumar S. The role of caspases in apoptosis. *Apoptosis* 1998, 62: 107-28.
100. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 2013, 23(12): 620-33.
101. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001, 411(6835): 342-8.
102. Kadam CY, Abhang SA. Apoptosis markers in breast cancer therapy. *Adv Clin Chem* 2016, 74: 143-93.
103. Kumar R, Vadlamudi R, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr-Relat Cancer* 2000, 7(4): 257-69.
104. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ* 2001, 322(7301): 1528-32.
105. Kelloff GJ, Sigman CC, Johnson KM, Boone CW, Greenwald P, Crowell JA, Hawk TE, Doody LA. Perspectives on surrogate end points in the development of drugs that reduce the risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9(2): 127-37.
106. Hahm H, Davidson NE. Apoptosis in the mammary gland and breast cancer. *Endocr-Relat Cancer* 1998, 5(3): 199-211.
107. Hassan MI, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg Med Chem* 2013, 21(6): 1570-82.
108. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010, 20(12): 3467-74.

109. Esbaugh AJ, Tufts BL. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 2006, 154(1-2): 185-98.
110. Terzi E. Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamidlerin Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX XII (CA-IX, CA-XII) İzoenzimleri ve Sitozolik Karbonik Anhidraz I, II (CA-I, CA-II) İzoenzimleri Üzerine Spesifik İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Kanser Biyolojisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara:Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, 2015.
111. Brown-Glaberman U, Marron M, Chalasani P, Livingston R, Iannone M, Specht J, Stopeck AT. Circulating carbonic anhydrase IX and antiangiogenic therapy in breast cancer. *Dis Markers* 2016, 2016:1-7.
112. Wingo T, Tu C, Laipis PJ, Silverman DN. The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 288(3): 666-9.
113. De Simone G, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2010;1804(2):404-9.
114. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7(2): 168-81.
115. McDonald PC, Winum J-Y, Supuran CT, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget* 2012, 3(1): 84.
116. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Sub Cell Biochem* 2014, 75: 199-219.
117. Pastorekova S, Gillies RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2019, 38(1): 65-77.
118. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev* 2012, 112(8): 4421-68.
119. Pastorekova S, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: from biology to therapy. *Hypoxia and cancer*, 1<sup>nd</sup> ed. New York, Humana Pres, 2014: 121-53.
120. Gulçin İ, Taslimi P. Sulfonamide inhibitors: a patent review 2013-present. *Expert Opin Ther Pat* 2018, 28(7): 541-9.
121. Kołaczek A, Fusiarz I, Ławecka J, Branowska D. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. *CHEMIK* 2014, 68(7): 620-8.

122. Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2011,10(10): 767-77.
123. Carta F, Scozzafava A, Supuran CT. Sulfonamides: a patent review (2008–2012). *Expert Opin Ther Pat* 2012, 22(7): 747-58.
124. Chegwiddden W, Spencer IM. Sulphonamide inhibitors of carbonic anhydrase inhibit the growth of human lymphoma cells in culture. *Inflammopharmacology* 1995, 3(3): 231-9.
125. Winum JY, Rami M, Scozzafava A, Montero JL, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med Res Rev* 2008, 28(3): 445-63.
126. Sławiński J, Pogorzelska A, Żołnowska B, Brożewicz K, Vullo D, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of a novel series of 5-substituted 2, 4-dichlorobenzenesulfonamides and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII. *Eur J Med Chem* 2014, 82: 47-55.
127. Supuran CT, Briganti F, Tilli S, Chegwiddden WR, Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg Med Chem* 2001, 9(3): 703-14.
128. Abbate F, Casini A, Owa T, Carbonic anhydrase inhibitors. E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14: 217-23
129. Durgun M, Turkmen H, Zengin G, Zengin H, Koyunsever M, Koyuncu I. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and antimicrobial investigation and evaluation of physicochemical properties of novel 4-(2-methylacetamide)benzenesulfonamide derivatives. *Bioorg Chem* 2017, 70: 163-72.
130. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Chenge D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Querengesser L. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res* 2007, 35: 521-6.
131. Steuer AE, Brockbals L, Kraemer T. Metabolomic strategies in biomarker research—new approach for indirect identification of drug consumption and sample manipulation in clinical and forensic toxicology? *Front Chem* 2019, 7: 319.
132. Aderemi AV, Ayeleso AO, Oyedapo OO, Mukwevho E. Metabolomics: A scoping review of its role as a tool for disease biomarker discovery in selected non-communicable diseases. *Metabolites* 2021, 11(7) :418.

133. Ho CS, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003, 24(1): 3.
134. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass Spectrom Rev* 2011, 30(5): 884-906.
135. Turi KN, Romick-Rosendale L, Ryckman KK, Hartert TV. A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2018, 141(4): 1191-201.
136. Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Wang X. Metabolomics for biomarker discovery: moving to the clinic. *Biomed Res. Int* 2015, 2015: 6
137. Yang Q, Zhang A-h, Miao J-h, Sun H, Han Y, Yan G-I, Wu F-F, Wang X-J. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Advances* 2019, 9(64): 37245-57.
138. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *Ca-Cancer J. Clin* 2021, 71(4): 333-58.
139. Kaushik AK, DeBerardinis RJ. Applications of metabolomics to study cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer* 2018, 1870(1): 2-14.
140. Gowda GN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008, 8(5): 617-33.
141. Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, Kim J. Amino acids in cancer. 2020;52(1):15-30.
142. Choi B-H, Coloff JL. The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer. *Cancers* 2019, 11(5): 675.
143. Pegg A. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life* 2009, 61(9): 880-94.
144. Chung WJ, Lyons SA, Nelson GM, Hamza H, Gladson CL, Gillespie GY, Sontheimer H. Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J Neurosci* 2005, 25(31) :7101-10.
145. Lo M, Ling V, Wang Y, Gout PW. The xc<sup>-</sup> cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br J Cancer* 2008, 99(3): 464-72.

146. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis R. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* 2013, 123(9): 3678-84.
147. Zhang Y, Morar M, Ealick SE. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(23): 3699-724.
148. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab* 2010, 7(1): 1-14.
149. Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of l-carnitine and acetyl-l-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1033(1): 30-41.
150. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines. *Clin Pharmacokinet* 2012, 51(9): 553-72.
151. Virmani A, Binienda Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. *Mol Aspects Med* 2004, 25(5-6): 533-49.
152. Console L, Scalise M, Mazza T, Pochini L, Galluccio M, Giangregorio N, Tonazzi A, Indiveri C. Carnitine traffic in cells. Link with cancer. *Front. Cell Dev Biol* 2020, 8: 981.
153. Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, Galderisi U, Giordano A, Peluso G. The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell Death Discov* 2018, 9(2): 1-12.
154. Ai-Mashhedy LA, Fijer AN. Acute toxicity of food additives tartrazine and carmoisine on white male mice. *Int J Pharmtech Res* 2016, 9(4): 364-7.
155. Siegle R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *Ca-Cancer J Clin* 2012, 62(1): 10-29.
156. Tong CW, Wu M, Cho W, To KK. Recent advances in the treatment of breast cancer. *Front Oncol* 2018, 8: 227.
157. Reinert T, Barrios CH. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Ther Adv Med Oncol* 2015, 7(6): 304-20.
158. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Pegram M. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med* 2001, 344(783): 2001-792.
159. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Green M. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(8): 1275-81.

160. Alberti D, Michelotti A, Lanfranco A, Protti N, Altieri S, Deagostino A, Geninatti Crich S. In vitro and in vivo BNCT investigations using a carborane containing sulfonamide targeting CAIX epitopes on malignant pleural mesothelioma and breast cancer cells. *Sci Rep* 2020, 10(1): 1-13.
161. Kivelä AJ, Knuutila A, Räsänen J, Sihvo E, Salmenkivi K, Saarnio J, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS. Carbonic anhydrase IX in malignant pleural mesotheliomas: a potential target for anti-cancer therapy. *Bioorg Med Chem* 2013, 21(6): 1483-8.
162. Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World J Clin Oncol* 2012, 7(3): 98
163. Li Y, Wang H, Oosterwijk E, Tu C, Shiverick KT, Silverman DN, Frost SC. Expression and activity of carbonic anhydrase IX is associated with metabolic dysfunction in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Invest* 2009, 27(6): 613-23.
164. Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG, Geusens N, Thiry A, Wigfield S, Carta F, McIntyre A, Scozzafava A, Dogné JM. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol* 2011, 99(3): 424-31.
165. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009, 69(1): 358-68.
166. Nocentini A, Bua S, Lomelino CL, McKenna R, Menicatti M, Bartolucci G, Tenci B, Gratteri P. Discovery of new sulfonamide carbonic anhydrase IX inhibitors incorporating nitrogenous bases. *ACS Med Chem Lett* 2017, 8(12): 1314-9.
167. Markowicz-Piasecka M, Huttunen J, Zajda A, Sikora J, Huttunen KM. Sulfonamide metformin derivatives induce mitochondrial-associated apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2022,352: 109795.
168. Schröder M, Yusein-Myashkova S, Petrova M, Dobrikov G, Kamenova-Nacheva M, Todorova J, Pasheva E, Ugrinova I. The effect of a ferrocene containing camphor sulfonamide DK-164 on breast cancer cell lines. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019, 19(15): 1874-86.

169. Okolotowicz KJ, Dwyer M, Ryan D, Cheng J, Cashman EA, Moore S, Mercola M, Cashman JR. Novel tertiary sulfonamides as potent anti-cancer agents. *Bioorg Med Chem* 2018, 26(15): 4441-51.
170. Andreucci E, Ruzzolini J, Peppicelli S, Bianchini F, Laurenzana A, Carta F, Supuran CT, Calorini L. The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 sensitises cancer cells to conventional chemotherapy. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2019, 34(1): 117-23.
171. Mboge MY, Chen Z, Wolff A, Mathias JV, Tu C, Brown KD, Bozdog M, Carta F, Supuran CT, McKenna R. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX over carbonic anhydrase XII in breast cancer cells using benzene sulfonamides: Disconnect between activity and growth inhibition. *PLoS One*. 2018, 13(11): e0207417.
172. Pacchiano F, Carta F, McDonald PC, Lou Y, Vullo D, Scozzafava A, Dedhar S, Supuran CT. Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J Med Chem* 2011, 54(6): 1896-902.
173. Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, Kyle A, Leung S, Huntsman D. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res* 2011, 71(9): 3364-76.
174. Touisni N, Maresca A, McDonald PC, Lou Y, Scozzafava A, Dedhar S. Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J Med Chem* 2011, 54(24): 8271-7.
175. Mendonsa AM, Na T-Y, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* 2018, 37(35):4 769-80.
176. Zhao Y, Pu C, Liu Z. Essential amino acids deprivation is a potential strategy for breast cancer treatment. *The Breast* 2022, 62: 152-61.
177. Eniu DT, Romanciuc F, Moraru C, Goidescu I, Eniu D, Staicu A, Buiga R, Socaciu C. The decrease of some serum free amino acids can predict breast cancer diagnosis and progression. *Scand J Clin Lab* 2019, 79(1-2): 17-24.
178. Barnes T, Bell K, DiSebastiano KM, Vance V, Hanning R, Russell C. Plasma amino acid profiles of breast cancer patients early in the trajectory of the disease differ from healthy comparison groups. *Appl Physiol Nutr Metab* 2014, 39(6): 740-4.

179. Cheng F, Wang Z, Huang Y, Duan Y, Wang X. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2015, 447: 23-31.
180. Junior RP, Sonehara NM, Jardim-Perassi BV, Pal A, Asad Y, Almeida Chuffa LG. Presence of human breast cancer xenograft changes the diurnal profile of amino acids in mice. *Sci Rep* 2022, 12(1): 1-16.
181. Mayers JR, Wu C, Clish CB, Kraft P, Torrence ME, Fiske BP. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Med* 2014, 20(10): 1193-8.
182. Poschke I, Mao Y, Kiessling R, de Boniface J. Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with molecular tumor subtypes. *J Transl Med* 2013, 11(1): 1-9.
183. Martínez-Reyes I, Diebold LP, Kong H, Schieber M, Huang H, Hensley CT. TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Mol Cell* 2016, 61(2): 199-209.
184. Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab* 2016, 23(1): 27-47.
185. Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, Polak K, Tondera D, Gounarides J, Yin H, Zhou F, Chen L, Monti S, Marto JA, Shipp MA, Danial NN. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell* 2012, 22(4): 547-60.
186. Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* 2014, 2(2): 111.



## **EKLER**

**EK-1. Özgeçmiş**

## **EK-2. Etik Kurul Belgesi**