



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**PTEROSTİLBEN VE LAKTAT DEHİDROGENAZ
İNİHİTÖRÜNÜN KANSER HÜCRE HATLARINDA TÜMÖR
METABOLİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF YAVUZ DOKGÖZ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF.DR. TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Öğrenci : Elif YAVUZ DOKGÖZ
Tez Başlığı : Pterostilben Ve Laktat Dehidrogenaz İnhibitörünün Kanser Hücre Hatlarında Tümör Metabolizmasına Etkisinin Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi :

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı, Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Neslin Emekli, Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Yasemin Başbınar, Dokuz Eylül Üniversitesi

Prof. Dr. Hülya Ellidokuz, Dokuz Eylül Üniversitesi

Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay, Marmara Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans/Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve mesleki deneyimi ile yol gösteren Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. Neslin Emekli'ye,

Tez hazırlama süreci boyunca eşsiz deneyimi ve anlayışı ile yanımda olan, tez çalışmasının planlanmasından basımına kadar her aşamasında rehberlik eden, içinden çıkılmaz zor zamanlarımda bana her daim moral veren ve destek olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na,

Deneyimlerini ve laboratuvar imkanlarını bizimle paylaşan, vizyonu ile çalışmalarımıza değer katan kıymetli Hocam Prof. Dr. Yasemin Başbınar'a ve ekibine,

Çalışmanın deneysel süreçlerinde büyük özveri ile deneylerin uygulama aşamalarında gösterdiği desteklerinden dolayı doktora öğrencisi MSc. Ezgi Daşkın'a,

Yetişemediğim işlere anında yetişip, tez sürecimi kolaylaştıran kıymetli arkadaşım Arş. Gör. Çağrı Çakıcı'ya ve laboratuvar çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen doktora öğrencisi MSc. Şeyma Çimen'e,

Uzun soluklu süren ve yoğun emek verdiğim doktora eğitimimde her daim beni destekleyip güven veren, işlerimi kolaylaştıran, motivasyonumu arttıran ve yanında olmaktan mutluluk duyduğum biricik eşim Onur Umut Dokgöz'e,

Ve tabiki hayattaki şansım canım annem Ferihan Yavuz, kıymetli babam Hamza Yavuz ve canım kardeşim Yasin Yavuz... Beni hayatım boyunca her daim desteklediniz, güven verdiniz ve işlerimi kolaylaştırdınız. Sizlerden öğrendiğim kararlılık ve çalışma azmi karakterlerine sahip olmasaydım bu çalışmayı gerçekleştirmem de mümkün olmayacaktı. Bana kattıklarınız için sizlere çok minnettarım. İyi ki varsınız.

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif YAVUZ DOKGÖZ

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1 Meme Kanseri.....	4
4.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	4
4.1.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	5
4.1.3 Meme Kanseri Tedavisi.....	5
4.2 Stilbenoidler.....	7
4.2.1 Stilbenoidlerin Biyolojik Aktivite Mekanizması.....	8
4.2.2 Stilbenoidlerin Biyouyumluluğu.....	10
4.2.3 Stilbenoidlerin Metabolizması.....	11
4.2.4 Stilbenoidlerin Stabilitesi.....	12
4.2.5 Stilbenoidlerin Güvenliği.....	13
4.2.6 Pterostilben.....	14
4.3 Warburg Etkisi.....	20

4.3.1	Warburg Etkisi'ne Tarihsel Bir Bakış	20
4.4	Laktat Dehidrojenaz	23
4.4.1	LDH Enzimi ve İnhibitörü	23
4.5	Kanser ve Enerji Metabolizması	26
5.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
5.1	Gereç	32
5.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	32
5.1.2	Kullanılan Sarf Malzemeler	32
5.1.3	Kullanılan Kimyasallar.....	33
5.1.4	Kullanılan Çözeltiler	33
5.1.5	Kullanılan Kitler.....	33
5.1.6	Kullanılan Hücre Kültürleri.....	34
5.2	Yöntem.....	35
5.2.1	Hücre Kültürü.....	35
5.2.2	Deney Gruplarının Oluşturulması	40
5.2.3	Gerçek Zamanlı Sitotoksiste Testi İle İlaçların IC50 Dozlarının Belirlenmesi	41
5.2.4	Asetil KoA Eliza Analizi.....	46
5.2.5	Laktat Analizi	49
5.2.6	ADP/ATP Translokaz ELİZA Analizi	51
5.2.7	Total Antioksidan Kapasitesi (TAK)	54
5.2.8	Total Oksidan Seviyesi (TOS)	55
5.2.9	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	56
5.2.10	Metabolik Akış Analizi	57
5.2.11	Verilerin İstatistiksel Analizinin Yapılması ve Yorumlanması	64

6.	BULGULAR.....	65
6.1	Meme Kanser Hücrelerinin Kültür Edilmesi	65
6.2	İlaç Uygulamaları Sonucu IC50 Değerlerinin Belirlenmesi	65
6.2.1	MCF-7 Hücre Hattı	65
6.2.2	MDA-MB-231 Hücre Hattı	68
6.3	Asetil Koenzim A Eliza Analizi Sonucu.....	71
6.4	Laktat Analizi Sonucu.....	74
6.5	ADP/ATP Translokaz Eliza Analizi Sonucu	77
6.6	Total Antioksidan Kapasitesi Analizinin Sonuçları.....	80
6.7	Total Oksidan Seviyesi Analizinin Sonuçları	82
6.8	Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları.....	85
6.9	Seahorse Deney Sonuçları.....	88
6.9.1	Glikolitik Stres Kiti	89
6.9.2	Mitokondriyal Stres Kiti.....	92
6.9.3	Enerji Fenotipi Kiti.....	94
7.	TARTIŞMA	98
8.	SONUÇ	109
9.	KAYNAKLAR	110
10.	ETİK KURUL ONAYI.....	121
11.	ÖZGEÇMİŞ	124

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- AKAP1:** Kinaz Çapa Proteini 1
- AMP:** Adenozin Mono Fosfat
- ATF3:** Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 3
- cAMP:** Siklik Adenozin Mono Fosfat
- CYP:** Sitokrom P450
- EMT:** Epitelden Mezenkime Dönüşüm
- FoxO:** Forkhead Box O1/O2 genleri
- GLUT1:** Glukoz Taşıyıcısı 1
- GPx:** Glutasyon Peroksidaz
- GR:** Glutasyon Redüktaz
- GSH:** Total Glutasyon
- H₂O₂:** Hidrojen Peroksit
- HIF1 α :** Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1 α
- HK2:** Heksokinaz 2
- HSP70:** Isı Şok Proteini 70
- IC50:** Yarısını İnhibe Eden Konsantrasyon
- KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- mRNA:** Haberci RNA
- MTA1:** Metastaz İlişkili Protein-1
- mTOR:** Mammalian Target of Rapamycin
- MYC:** Myc Proto Onkogen
- NAD⁺:** Nikotinamid Adenin Dinükleotit
- NADP⁺:** Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
- NADPH:** kinon oksidoredüktaz
- OS:** Oksidatif Stres
- p53:** Tümör Protein P53
- PDK4:** Piruvat Dehidrojenaz Lipoamid Kinaz İzozim 4

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RPM: Dakikadaki Devir Sayısı

ShRNA: Susturucu RNA

SOD: Süperoksit Dismutaz

SRC: Sitokin Reseptörleriyle İlişkili Tirozin Kinazlar (Sarkoma İlişkili)

UDP: Uridin-5 difosfo glukuroniltransferaz



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.2.1 Sıçanlarda Oral Uygulama Sonrası Stilbenoidlerin Yarı Ömrü Ve Oral Biyoyararlanımları (Akinwumi et al., 2018).....	10
Tablo 5.2.1. Çalışılan Meme Kanser Hücre Hattı Özellikleri.....	35
Tablo 5.2.2. Pterostilben ve Sodyum Oxamat'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Kullanılan Konsantrasyon Aralıkları	42
Tablo 6.2.1. MCF-7 için Kombinasyon Dozları	67
Tablo 6.2.2. MDA-MB-231 için Kombinasyon Dozları.....	69
Tablo 6.2.3. DeneYlerde Kullanılan IC50 Değerleri	70
Tablo 6.3.1. MCF-7 Hücre Hattında Asetil Koenzim A Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	71
Tablo 6.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Asetil Koenzim A Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	72
Tablo 6.4.1. MCF-7 Hücre Hattında Laktat Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	74
Tablo 6.4.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Laktat Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	75
Tablo 6.5.1. MCF-7 Hücre Hattında ADP/ATP Translokaz Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	77
Tablo 6.5.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında ADP/ATP Translokaz Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	78
Tablo 6.6.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Antioksidan Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	80
Tablo 6.6.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Antioksidan Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	81
Tablo 6.7.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	82
Tablo 6.7.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	83
Tablo 6.8.1. MCF-7 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi	85
Tablo 6.8.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi.....	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1. Seçilmiş Stilbenoid Fenoliklerin Kimyasal Yapılarının Ortak Stilben Omurgalarının Gösterilmesi.....	7
Şekil 4.2.2. Stilbenlerin Biyolojik Aktivite Mekanizmalarının Özet Gösterimi.....	9
Şekil 4.2.3. Pterostilben'in Biyosentezi	15
Şekil 4.2.4. Pterostilben Molekülünün Discovery Studio Visualizer'de Gösterimi	15
Şekil 4.2.5. Pterostilben'in Kompleks Formda X ışını Difraksiyon Yöntemi ile Gösterimi	16
Şekil 4.4.1. L-Laktat Dehidrojenaz A'nın 3 Boyutlu Yapısı	23
Şekil 4.4.2. LDH'nin Katalizlediği Kimyasal Reaksiyonun Gösterimi	24
Şekil 4.4.3. LDH Enziminin (E.C.1.1.1. 27) KEGG Metabolik Yolağında Gösterimi....	25
Şekil 4.5.1. Metabolik Akış Sisteminde Metabolik Yanıtların OCR ve ECAR olarak Gösterimi.....	29
Şekil 4.5.2. Mitokondri Matriksinde Elektron Transfer Sistemi ve Oksidatif Fosforilasyon İnhibitörleri	30
Şekil 5.2.1. Neubauer Lamı Yandan Görünüşü	39
Şekil 5.2.2. Gerçek zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Empedans Ölçümüne Dayanan Analiz Ekipmanları	43
Şekil 5.2.3. Empedans Temelli Hücre Görüntülemesi.....	44
Şekil 5.2.4. Plakalarda Yer Alan Altın Elektrotların Gösterimi	44
Şekil 5.2.5. Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesi	45
Şekil 5.2.6. Asetil KoA Eliza Analizi Çalışma Prensibi.....	46
Şekil 5.2.7. Asetil-KoA Ölçümü için Deney Planı	47
Şekil 5.2.8. Asetil-KoA Standartlarının Hazırlanışı.....	48
Şekil 5.2.9. Asetil KoA Kalibrasyon Eğrisi	48
Şekil 5.2.10. Laktat Dehidrojenaz'ın Sodyum Oxamat aracılığıyla İnhibisyonu	49
Şekil 5.2.11. Laktat Ölçümü için Deney Planı.....	50
Şekil 5.2.12. Laktat Kalibrasyon Eğrisi	51
Şekil 5.2.13. ADP/ATP Translokaz 1'in hücre içi yerleşimi	53
Şekil 5.2.14. ADP/ATP Translokaz Ölçümü için Deney Planı.....	53

Şekil 5.2.15. ADP/ATP Translokaz Kalibrasyon Eğrisi.....	54
Şekil 5.2.16. Metabolik Akış Analizi.....	57
Şekil 5.2.17. Hücre dışı asitleşme oranı (ECAR) grafiği.....	60
Şekil 5.2.18. Oksijen Tüketim Oranı (OCR) Ölçüm Grafiği	62
Şekil 5.2.19. Elektron Transfer Zinciri (ETZ)'nin Mitokondriyal Stres Test Modülatörleri	62
Şekil 6.2.1. MCF-7 için Pterostilben ve LDH-A inhibitörü IC50 Grafiği	66
Şekil 6.2.2. MCF-7 için LDH-A İnhibitörü IC50 Grafiği (Empedans)	66
Şekil 6.2.3. MCF-7 için Pterostilben ve LDH-A İnhibitörü IC50 Kombinasyon Grafiği.....	67
Şekil 6.2.4. MDA-MB-231 için Pterostilben ve LDH-A İnhibitörü IC50 Grafiği	68
Şekil 6.2.5. MDA-MB-231 için Pterostilben ve LDH-A inhibitörü IC50 Kombinasyon Grafiği	69
Şekil 6.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Asetil KoenzimA'ya Ait Konsantrasyon Grafikleri...71	
Şekil 6.3.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Asetil KoenzimA'ya Ait Konsantrasyon Grafikleri	73
Şekil 6.4.1. MCF-7 Hücrelerinde Laktat'a Ait Konsantrasyon Grafikleri.....	74
Şekil 6.4.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Laktat'a Ait Konsantrasyon Grafikleri	76
Şekil 6.5.1. MCF-7 Hücrelerinde ADP/ATP Translokaz'a Ait Konsantrasyon Grafikleri	77
Şekil 6.5.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde ADP/ATP Translokaz'a Ait Konsantrasyon Grafikleri	79
Şekil 6.6.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Antioksidan Kapasite Grafikleri	80
Şekil 6.6.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Antioksidan Kapasite Grafikleri	81
Şekil 6.7.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Grafikleri	82
Şekil 6.7.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Grafikleri.....	83
Şekil 6.8.1. MCF-7 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi Grafikleri.....	85
Şekil 6.8.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi Grafikleri	87
Şekil 6.9.1. MCF-7 Hücrelerinin İlaç Uygulamaları Sonrası Mikroskop Görüntüleri (5X)	88

Şekil 6.9.2.MDA-MB-231 Hücrelerinin İlaç Uygulamaları Sonrası Mikroskop Görüntüleri (5X).....	89
Şekil 6.9.3. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait Glikolitik Stres Sonuçları	90
Şekil 6.9.4. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait Glikolitik Stres Sonuçları.....	90
Şekil 6.9.5. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait Mitokondriyal Stres Sonuçları	92
Şekil 6.9.6. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait Mitokondriyal Stres Sonuçları	93
Şekil 6.9.7. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait Hücresel Enerji Fenotipi Sonuçları	94
Şekil 6.9.8. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait OCR Değerleri.....	95
Şekil 6.9.9. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait ECAR Değerleri	95
Şekil 6.9.10. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait Hücresel Enerji Fenotipi Sonuçları...	96
Şekil 6.9.11. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait OCR Değerleri	97
Şekil 6.9.12. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait ECAR Değerleri.....	97

1. ÖZET

PTEROSTİLBEN VE LAKTAT DEHİDROGENAZ İNHİBİTÖRÜNÜN KANSER HÜCRE HATLARINDA TÜMÖR METABOLİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Warburg etkisi doğrultusunda kanser metabolizmasının yeniden programlanması üzerine olan çalışmalar artmaktadır. Bu çalışma, meme kanserinde antioksidan ve antikanser etkisi olduğu bilinen ancak kanser hücrelerinin oksijeni kullanması ile ilgili etkisi tanımlanmamış olan Pterostilben molekülünün, LDH-A inhibitörü ile birlikte enerji metabolizması açısından etkinliğini meme kanser hücre hatlarında değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

in vitro olarak yapılan çalışmamızda, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanıldı. Meme kanseri hücre hatlarına Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü kombinasyonu uygulandıktan sonra tümör enerji metabolizması açısından etkinliğin yönünü incelemek için gerçek zamanlı Oksijen Tüketim Oranı ve Ekstraselüler Asitlik Oranı ölçümü mikrofluidik yöntemle çalışıldı. Ayrıca MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre lizatlarında Asetil KoA, Laktat, ADP/ATP translokaz ve Oksidatif Stres ölçümü ELIZA yöntemiyle ve fotometrik olarak yapıldı.

Çalışma sonucuna göre; Pterostilben yalnız başına ve LDH-A inhibitörü ile beraber kullanıldığında, kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdi ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda yüksek Asetil KoA, düşük Laktat, yüksek ADP/ATP translokaz ve yüksek oksidatif stres düzeyleri (OSİ) bulundu ($p < 0.05$).

LDH-A inhibitörü ve Pterostilben'in kullanıldığı kombinasyon terapisinde en yüksek Asetil KoA ve en düşük Laktat değerleri bulundu.

Mikrofluidik analiz sonuçları ile de doğrulandığı üzere, Pterostilben +LDH-A inhibitörü kombinasyonunun hücrede glikolitik metabolizmadan oksidatif metabolizmaya önemli bir değişimi sağladığı ve mitokondri fonksiyonlarını iyileştirdiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Enerji, LDH inhibitörü, Meme Kanseri, Metabolizma, Pterostilben, Tümör

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THE PTEROSTILBENE AND LACTATE DEHYDROGENASE INHIBITOR ON CANCER CELLS TO THE TUMOR METABOLISM

Studies on the reprogramming of cancer metabolism are increasing in line with the Warburg effect. This study aims to evaluate the effectiveness of Pterostilbene molecule, which is known to have antioxidant and anticancer effects in breast cancer, but whose effect on the use of oxygen by the cancer cell has not been identified, together with the LDH-A inhibitor in terms of energy metabolism in breast cancer cell lines.

In our *in vitro* study, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were used. After applying a combination of Pterostilbene, LDH-A inhibitor and Pterostilbene + LDH A inhibitor to breast cancer cell lines, real-time Oxygen Consumption Rate and Extracellular Acidity Ratio were studied by microfluidic method to examine the direction of efficacy in terms of tumor energy metabolism. In addition, Acetyl CoA, Lactate, ADP/ATP Translocase and Oxidative Stress were measured by ELISA method and photometrically in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lysates.

According to the results of the study; Pterostilbene showed an antiproliferative effect in cancer cells when used alone or together with LDH-A inhibitor ($p < 0.05$). High Acetyl CoA, low Lactate, high ADP / ATP translocase and high oxidative stress levels (OSI) were found in all groups compared to the control group ($p < 0.05$).

In combination therapy using LDH-A inhibitor and Pterostilbene, the highest Acetyl CoA and lowest Lactate values were found.

As confirmed by the microfluidic analysis results, the combination of Pterostilbene + LDH-A inhibitor was thought to provide a significant change from glycolytic metabolism to oxidative metabolism in the cell and improve mitochondria functions.

Keywords: Energy, LDH inhibitor, Breast Cancer, Metabolism, Pterostilbene, Tumor

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri tüm dünya’da akciğer kanserinden sonra ikinci sırada en yaygın olarak görülen kanserdir. Ülkemizde de kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve insidansındaki artış katlanarak devam etmektedir. Bu artış trendi nedeniyle meme kanseri etiyojisi ve tedavisi ile ilgili araştırmalara gerek duyulmaktadır. Yaban mersini ve üzümün biyoaktif bileşeni olan Pterostilben, resveratrol ile yapısal benzerlik gösterir. Antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-kanser, hipoglisemik ve kolesterol düşürücü etkiler gösterir. Klinik öncesi araştırmalar, Pterostilben’i güçlü bir antikanser ajanı olarak tanımlamaktadır. Pterostilben’in hücre canlılığını azalttığı, apoptozu ve mitokondriyal depolarizasyonu arttırdığı, süperoksit anyonu ve kaspaz 3/7’nin aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

Kanserde önemli bir fenomen olan Warburg etkisi, kanser hücrelerinin proliferasyonlarını ve anabolik büyümelerini desteklemek için anaerobik glikolize dayalı olarak programlandığını ifade eder. Anaerobik glikoliz sonucu olarak glukoz yön değiştirir. ‘Pirüvat-Asetil KoA’ dönüşümü ile krebs siklusu üzerinden, gerçekleşen oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edilmek yerine, pirüvat üzerinden laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığıyla laktata katabolize edilir. Hücre glukoz metabolizmasından kazanması gereken 32 ATP yerine, 2ATP kazanmış olur. Artan glukoneogenez nedeniyle hastalarda kaşeksi ve buna bağlı ölüm meydana gelir. LDH enziminin LDH-A izofromu, kanser hücresinde bulunan, anaerobik glikolizin ana düzenleyicisi olan formdur. Aktif olarak pirüvatı düşürür ve tümör dokularında laktat düzeylerini artırır.

Çalışmada, meme kanserinde antikanser etkisi olduğu bilinen Pterostilben molekülünün, laktat dehidrogenaz-A (LDH-A) inhibitörü ile kombine olarak kullanılarak, meme kanseri hücre hatlarında enerji metabolizması açısından etkinliği değerlendirilecektir. Yapılacak *in vitro* çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılacaktır.

Çalışmamız, Pterostilbenin, LDH-A inhibitörü ile kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde oluşturduğu etkinin tümör enerji metabolizması bakış açısı ile değerlendirileceği ilk çalışma olacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Meme Kanseri

Kanser, Dünya'daki başlıca ölüm nedenlerindedir. Dünya çapında 2030 yılına kadar yılda yaklaşık 13,2 milyon kanser hastasının hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. (Wong, Che, & Leung, 2015).

Meme kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalar neticesinde tahmini 268.670 yeni vaka ile birlikte, kadınlarda görülen en sık kanserdir (Siegel, Miller, & Jemal, 2018).

Her ne kadar adjuvan kemoterapötik ve hormonal ajanların yaygın kullanımı, meme kanserinden kaynaklı ölüm oranını azaltmış olsa da bu tür tedavilerden kimlerin yarar göreceği ve hasta bireylerin toksisite ile karşı karşıya gelip gelmeyeceğini bireysel olarak belirlemenin zorlukları devam etmektedir. Yeni hedefli tedavilerin geliştirilmesi ile birlikte, biyobelirteçlerin kullanımı, meme kanseri teşhisi, prognoz, terapötik cevabın öngörülmesi ve tedavi sırasında ve sonrasında hastalığın izlenmesinde önemli katkı sağlamıştır (Braden, Stankowski, Engel, & Onitilo, 2014).

Meme kanseri tedavisinde artan maliyetlerin sonucu olarak ortaya çıkan yeni gelişmeler, önlem alınabilir kanser mutasyonları ve vücudun bağışıklık sistemini içeren yeni mekanizmaları kullanan gelişmeler, meme kanserinden kaynaklanan ölüm oranlarını azaltma yönündeki gelişmelerin önünü açmıştır (Makhoul, Atiq, & Alwbari, 2018).

4.1.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Meme kanseri ile ilgili insidans ve mortalite ile ilişkili eldeki veriler, gelir düzeyi yüksek ülkelerdeki insidans ve mortalitenin azaldığını, buna karşın gelir düzeyi düşük ülkelerdeki insidans ve mortalitenin de arttığını göstermektedir. Bu paternin, değişen risk faktörü profillerinden ve meme kanserinin erken teşhis ve tedavisine hastaların erişimlerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Winters, Martin, Murphy, & Shokar, 2017).

4.1.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri için risk faktörleri arasında artan yaş, ırk, alkol kullanımı, tütün kullanımı, diyet, fiziksel aktivite ve vücut alışkanlıkları sayılabilir. BRCA 1 ve BRCA 2 tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonlar, 70 yaşına kadar meme ve yumurtalık kanseri gelişimi ile önemli ölçüde ilişkilidir.

Erken menarj, geç menopoz gibi endojen östrojene maruziyeti artıran üreme faktörleri ve menopoz sonrası kullanılan östrojen-progesteron hormonlarının kombinasyonu meme kanseri riskini arttırmaktadır (The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2002).

Meme kanserinde hayatta kalma, hem evre hem de moleküler alt tipe bağlıdır. Meme kanserinin erken evresinde tanı alınması, prognozu iyileştirmek için önemli bir strateji kabul edilir. Amerika Birleşik Devletleri ve diğer ülkelerdeki büyük profesyonel kuruluşlar, önerilen yaş ve tarama sıklığı farklılık gösterse de, uygun takip ile mamografi taraması yapılmasını tavsiye etmektedir. Çalışmalar, taramaların %15 ile %40 oranında mortaliteyi azalttığını göstermektedir, ancak tanı konma yüzdesinin artması (%5-%54) ve uzun vadeli komplikasyonlara neden olan tedaviler ve yanlış negatif tanı konma olasılığı (%6-%46) gibi dezavantajları bulunmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları açısından risk altındaki kadınların belirlenmesi amacıyla, ek olarak genetik test yaptırmaları tavsiye edilmektedir.

Yaşam tarzı değişikliği, tıbbi ve cerrahi müdahaleler, BRCA mutasyonları açısından pozitif test sonucu olan kadınlar için meme kanserini önlemek açısından önemlidir (Winters et al., 2017).

4.1.3 Meme Kanseri Tedavisi

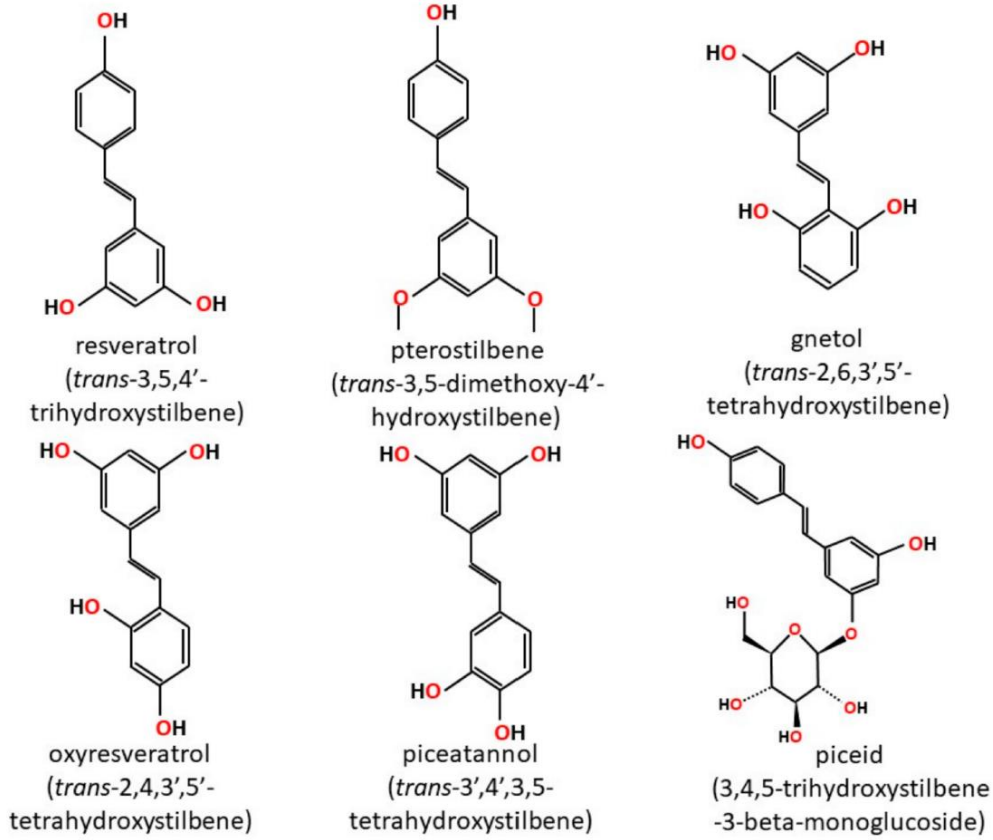
Son 25 yılda, kanser hücrelerinin normal hücrelerden nasıl dönüştürüldüğünü anlama çabaları, klinik açıdan önemli kanser terapötikleri gibi kanseri hedefleyen ilaçların keşfine yol açmıştır (Gotwals et al., 2017). Bununla birlikte, esas olarak kanser hücreleri üzerinde pro-apoptotik etkiler uygulayan bu terapötik stratejilerin sonuçları, sonradan kazanılan

ilaç direnci ve metastatik nüks olaylarından dolayı çoğunlukla mortalitede ironik olarak artış göstermektedir (Miller et al., 2016). Bundan dolayı, tıbbi ve fonksiyonel diyet bitkilerinin ya da fitokimyasalların kansere karşı koordineli bir şekilde savaşmasının avantajları, tamamlayıcı ve alternatif tıbbi dikkatleri giderek arttırmaktadır (Mathiyalagan & Yang, 2017).

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapidir. İmmünoterapi, güncel kanser tedavi yöntemleri arasında yerini almıştır (Therapy, Vol, Torrero, & Li, 2004). İmmünoterapinin spesifik başarılarının çoğu, melanom, böbrek kanseri, akciğer kanseri ve geleneksel olarak immünojenik olarak bilinen diğer alanlarda olmuştur. Fakat, meme kanserinin köken olarak immünojenik olduğu düşünülmemiş olsa da, son birkaç yıl içinde tedavide umut verici sonuçları olan bir kanser çeşidi olduğu görülmektedir (Makhoul et al., 2018).

4.2 Stilbenoidler

Stilbenoidler çeşitli bitki türlerinde bulunan ve fenolik bileşiklerden doğal olarak meydana gelen bir gruptur (Rivière, Pawlus, & Mérillon, 2012). Stilbenoidler, stilben olarak bilinen ortak bir omurga yapısını paylaşırlar, fakat doğada halka üzerindeki moleküllerin tipi ve pozisyonu farklıdır (Şekil 4.2.1) (Larronde et al., 2005).



Şekil 4.2.1. Seçilmiş Stilbenoid Fenoliklerin Kimyasal Yapılarının Ortak Stilben Omurgalarının Gösterilmesi

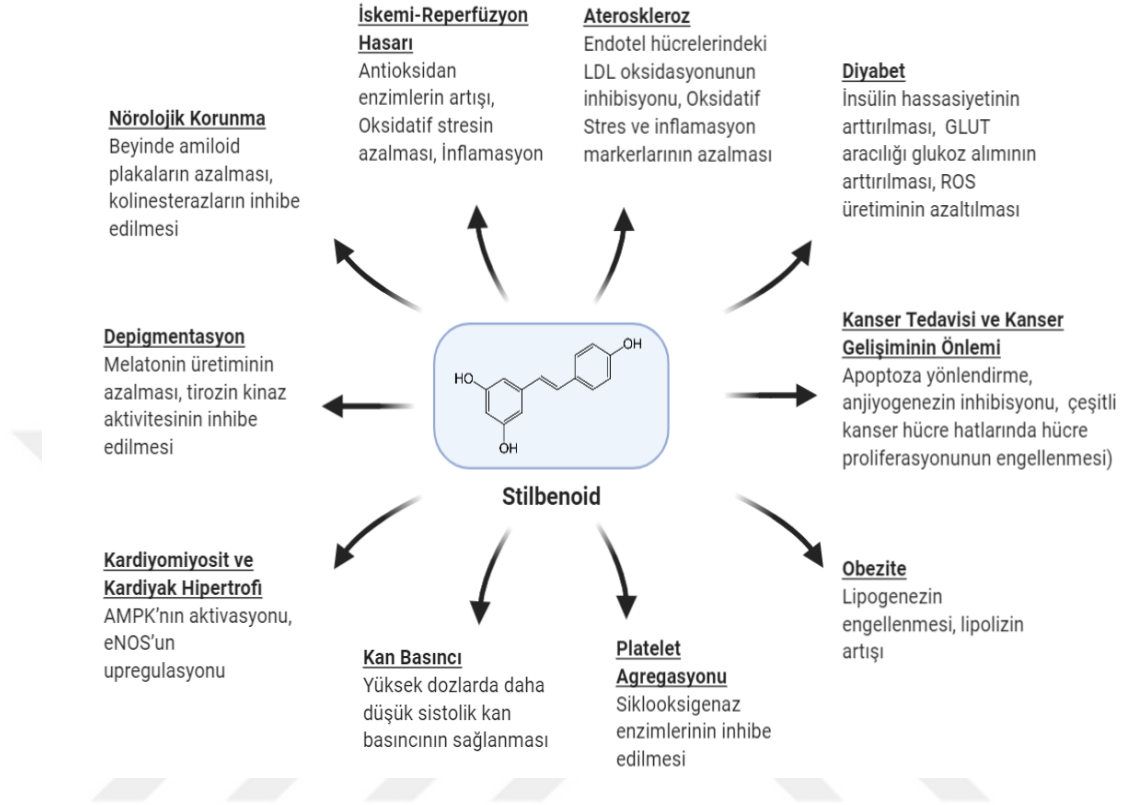
Stilbenoidler monomerler veya oligomerler olarak bulunur. Ayrıca serbest (aglikon) ya da glikozitler gibi konjuge olarak bulunabilirler. Örneğin Piceid, Resveratrol-3-O-glukozittir (Larronde et al., 2005; Teguo et al., 1998). Monomerik stilben (*trans*-1,2-difeniletilen) aglikon yapısı, bir etilen köprüsüyle birleştirilen iki fenil halkasından oluşur. Stilbenler *cis*- ya da *trans*-izomer olarak mevcut olabilirler, fakat *trans*-izomerler daha yaygın ve stabil konfigürasyondur (Rivière et al., 2012).

Stilbenler, fenilpropanoid yolu ile bitkilerde flavonoidlere benzer şekilde sentezlenir (Rivière et al., 2012). Biyosentetik yol, Fenilalanin Amonyak Liyazın etkisi ile Fenilalaninin, Sinamik Aside dönüşümü ile başlar (Yu & Jez, 2008). Bu dönüşümden sonra, bir asetil-CoA grubu Sinamik Aside, CoA ligaz aracılığıyla aktarılır ve nihayetinde Cinnamoyl-CoA oluşturulur. Cinnamoyl-CoA, malonil CoA'nın üç ünitesini kullanan bir süreç ile Stilben Sentazın aktiflenmesi ile stilbenoidlere dönüştürülür (Yu & Jez, 2008).

Stilbenoidler, metilasyon, glikozilasyon ve prenilleme ile ileri şekillerde işlenebilir. Stilbenoidlere örnek olarak Resveratrol, Pterostilbene, Gnetol ve Piceatannol verilebilir. En popüler ve belki de en yaygın olarak incelenen stilbenoid Resveratrol'dür. Potansiyel olarak yararlı tıbbi özelliklere sahip başka yapısal analogları olsa da bu analogların biyolojik etkileri hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Akinwumi, Bordun, & Anderson, 2018).

4.2.1 Stilbenoidlerin Biyolojik Aktivite Mekanizması

Stilbenoidler, bitkiyi mantar enfeksiyonu ve toksinlerden korumak için, de novo üretilen antimikrobiyal bileşikler olan fitoaleksinlerdir. Stilbenoidler çeşitli biyolojik aktivite mekanizmalarında etki gösterir. Kardiyo korumadan nöro korumaya, anti-diyabetik özelliklerden, depigmentasyona, anti-enflamasyondan kanser önleme ve tedavi alanlarında çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler (Akinwumi et al., 2018). Stilbenlerin biyolojik aktivite mekanizmaları **Şekil 4.2.2**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.2. Stilbenlerin Biyolojik Aktivite Mekanizmalarının Özet Gösterimi

Yapılan çalışmalar neticesinde sunulan sonuçlar, hücre kültüründen hayvan çalışmalarına hatta insan klinik denemelerine kadar çok sayıda modeli kapsamaktadır. Çoğu hücre kültüründe ve hayvan çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilmiş olsa da Stilbenoidlerin yararlı etkilerini kanıtlamak için daha ileri insan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Resveratrol en çok çalışılan stilbenoiddir. Daha az yaygın olan stilbenoidlerin potansiyeli ile ilgili de sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Bundan dolayı, çeşitli stilbenoidlerin yararlı etkilerini değerlendirebilmek için daha fazla ileri araştırmalar yapılarak bu yararlı etkilerinin kanıtlanması gereklidir (Akinwumi et al., 2018).

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksistilben), Vitis türleri (üzüm), kırmızı şarap ve diğer bitki türlerinde bulunur (Langcake & Pryce, 1976; López, Martínez, Del Valle, Orte, & Miró, 2001). Pterostilben (trans-3,5-dimetoksi-4'-hidroksistilben) ise resveratrolün dimetil eter analogu olup Pterocarpus marsupium, Vitis ve Vaccinium türleri (yaban mersini) gibi bitki türlerinde bulunmaktadır (Langcake, Cornford, & Pryce, 1979;

Rimando, Kalt, Magee, Dewey, & Ballington, 2004; Seshadri, 1972). HPLC analizi, Ayurveda tıbbında kullanılan eski bir kardiyotonik üzüm preparatı olan Drakshasava'da Resveratrol ve Pterostilbenin bulunduğunu ortaya koymuştur (Paul, Masih, Deopujari, & Charpentier, 1999).

4.2.2 Stilbenoidlerin Biyoyumluluğu

Resveratrol, suda zayıf çözünürlük ve düşük oral biyoyararlanım sergilemektedir. Siklodekstrinlerle kompleks oluşturması, Resveratrolün sulu çözünürlüğünü artırır fakat, biyoyararlanımını arttırmaz. Daha yüksek Resveratrol dozlarının uygulanmasının da farmakokinetik profili geliştirmedeği bildirilmiştir (Das, Lin, Ho, & Ng, 2008).

Stilbenoidlerin biyoyararlanımını iyileştirmeye yönelik, safra asitleri ile kompleks oluşturma, lipozomlara katılma, ve nanopartikül salınım sistemlerine formülasyonları olarak diğer girişimler de bulunmaktadır (Coimbra et al., 2011; Neves, Lúcio, Martins, Lima, & Reis, 2013; F. Silva, Figueiras, Gallardo, Nerín, & Domingues, 2014; Zhang et al., 2014)

Sıçanlarda oral uygulamayı takiben seçilen stilbenoidlerin biyoyararlılıkları ve yarı ömürleri **Tablo 4.2.1**'de gösterilmektedir. Pterostilben, %80 oran ile en yüksek biyoyararlanım göstermişken, Gnetol ise % 6,59 ile en düşük oral biyoyararlanım göstermiştir (Kapetanovic, Muzzio, Huang, Thompson, & McCormick, 2011; Remsberg et al., 2015)

Tablo 4.2.1 Sıçanlarda Oral Uygulama Sonrası Stilbenoidlerin Yarı Ömrü Ve Oral Biyoyararlanımları (Akinwumi et al., 2018)

Stilbenoid	Oral Doz (mg/kg)	Yarı Ömür (saat)	Oral Biyoyumluluk (Ratlar) (%)
Resveratrol	50	1,48	29,8
Pterostilbene	20	1,73	80
Gnetol	100	4,2	6,59
Piceatannol	10	4,23	50,7
Oxyresveratol	24,4	-	9,13

İntravenöz uygulama sonrası resveratrol, hızlı metabolize edilmesine bağlı olarak 14 dakikalık kısa bir yarı ömür sergilemektedir. Resveratrol için rapor edilen oral biyoyararlanım değerleri %20 ile %29,8 arasında değişmektedir (Kapetanovic et al., 2011; Marier, 2002). Gnetolün en düşük biyoyararlanımı olmasına rağmen, sıçanlarda 100 mg/kg oral uygulamadan sonra bildirilen yarı ömür 4.2 saattir (Remsberg et al., 2015). Bu değer, Resveratrol (1.48 h) (Marier, 2002) ve Pterostilben (1.73 h) için bildirilen değerlerden anlamlı şekilde daha uzundur (Remsberg et al., 2008). Bu bilgiye ek olarak, Gnetol glukuronid metabolitinin daha yüksek seviyeleri, oral alımdan sonra serumda 72 saate kadar kalmaya devam etmiştir (Remsberg et al., 2015). Gnetol glukuronidin serbest gnetole dönüştürülmesi ve böylece düşük biyoyararlanımı telafi etmesi mümkündür (Akinwumi et al., 2018).

Pterostilben yapısındaki iki metoksi grubunun varlığı, onu daha fazla lipofilik hale getirir ve böylece biyolojik olarak kullanılabilir hale getirir (Kapetanovic et al., 2011). Pterostilben ayrıca metabolik olarak daha stabildir çünkü glukuronidasyon veya sülfatlama için sadece bir adet serbest hidroksil grubu vardır. Gerçekten de, insan karaciğer mikrozomlarında gerçekleşen bir enzim kinetik glukuronidasyon işlemiyle, Resveratrolün, Pterostilben ile karşılaştırıldığında glukuronidasyon ile daha verimli bir şekilde metabolize edildiğini göstermiştir (Dellinger, Gomez Garcia, & Meyskens, 2014). Bu süreç, daha fazla serbest Pterostilben seviyesine ve daha yüksek biyoyararlanıma katkıda bulunabilir. Stilbenoidlerin farmakokinetik profiline dayanarak, Pterostilben'in Resveratrol'den daha fazla biyoyumlu olması nedeniyle, Pterostilben, Resveratrolün bir alternatifi olarak potansiyel bir aday olabilir (Akinwumi et al., 2018).

4.2.3 Stilbenoidlerin Metabolizması

Stilbenoidlerin düşük biyoyararlanımı, büyük ölçüde bağırsak ve karaciğerdeki hızlı ve yoğun metabolizmaya bağlıdır. Stilbenoidlerin emilim sırasında ve emilim sonrasında, ana bileşiklerin düşük seviyelerde bulunması nedeniyle düşük biyoyumlulukları vardır (Walle, 2011). Resveratrol, bağırsakta glukuronidasyona uğrar ve esas olarak glukuronid olarak emilir (Andlauer, Kolb, Siebert, & Furst, 2000; Kuhnle et al., 2000). Geri kalan

Resveratrol, aglikon olarak emilir, ve karaciğerde sülfatlar ve glukuronidler olarak daha ileri seviyede metabolize edilir (Boocock et al., 2007). Oral alım sonrasında, plazma ve dokularda sülfatlar ve glukuronitler gibi stilben metabolitlerinin yüksek seviyelerde bulunduğu dedekte edilmiştir (Boocock et al., 2007). Ana Resveratrol'un, nispeten düşük biyoyararlanımına rağmen birçok çalışma, çeşitli hayvan çalışmalarında in vivo biyolojik aktivitelerini göstermiştir. Farmakokinetik çalışmalar, plazmada yüksek düzeyde stilben metabolitlerinin bulunduğunu (sülfatlar ve glukuronitler) göstermiştir (Walle, Hsieh, DeLegge, Oatis, & Walle, 2004). Bu nedenle, bu metabolitlerin, ya metabolitlerin doğrudan etkisi ile ya da enterohepatik geri dönüşüm yoluyla stilbenoidler için rezervuarlar olarak hareket edebileceğini öne süren görüşler vardır (Marier, 2002; Walle et al., 2004).

Stilbenoidler, esas olarak idrarda (böbrekle ilişkili) ve dışkıda (renal olmayan) metabolitler olarak vücuttan dışarı atılır. Böbrek dışı yolların, Resveratrol (Marier, 2002) ve Pterostilben (Remsberg et al., 2008) için elimine edilmesinde böbrek yollarına kıyasla baskın olduğunu göstermektedir ki, bu da enterohepatik dolaşımın önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, ana stilbenoid bileşiklerinin dolaşımında olan düşük seviyeleri ile biyolojik etkiler elde edilebilir (Akinwumi et al., 2018).

4.2.4 Stilbenoidlerin Stabilitesi

Stilbenoidler, stabilite bakımından, ısı, hava, ışık ve oksidatif enzimlere karşı duyarlıdır. Özellikle, Resveratrol'un hem ultraviyole ışığa hem de görünür ışığa maruz kaldığında, trans formundan cis formuna izomerizasyonu meydana gelir (C. G. Silva et al., 2013). Resveratrol'un trans formunun daha aktif formu olduğu bilinmektedir (Rius et al., 2010). Ayrıca, Resveratrol, örneğin Sodyum Bikarbonat varlığında, belirli koşullar altında oksidasyon ile degrade olabilir (Delmas et al., 2011; N.-C. Yang, Lee, & Song, 2010). Siklodekstrin ile kompleks oluşturma hem çözünürlüğü hem de fotostabiliteyi artırır (F. Silva et al., 2014). Resveratrol, insan plazmasında organik çözücülere kıyasla daha karardır. Bu bağlanmanın, muhtemelen albümin gibi plazma proteinleri ile bağlanarak meydana gelebileceği bildirilmiştir (Pantusa, Bartucci, & Rizzuti, 2014).

Resveratrol ve Pterostilben'in çözünürlüğü ve stabilitesi lipozomlara aktarılarak da geliştirilebilir (Coimbra et al., 2011).

4.2.5 Stilbenoidlerin Güvenliği

Toksikolojik veriler, düşük dozlarda, Resveratrolün insanlarda iyi tolere edildiğini göstermesine rağmen, uzun süreli uygulamayı takiben güvenlik bilgilerinin eksik olduğunu göstermektedir (Cottart, Nivet-Antoine, Laguillier-Morizot, & Beaudeau, 2010).

Ayrıca, Pterostilben'in 6–8 hafta boyunca günde iki kez 125 mg'lık dozlar ile klinik denemelerde uygulanması güvenli bulunmuş olup bu denemelerde istenmeyen herhangi bir yan etki bulunmamıştır (Riche et al., 2013).

Gnetol'ün güvenliği, araştırmalarda nispeten yeni bir molekül olması dolayısıyla henüz insanlarda değerlendirilmemiştir. Bu nedenle, daha büyük popülasyon örnekleri ve daha uzun takip süreleri ile yapılacak ek randomize klinik çalışmalar, Resveratrol ve diğer stilbenoidlerin güvenliğini tespit etmek için önemlidir (Akinwumi et al., 2018)

4.2.5.1 Stilbenoidlerin Kanser Tedavisinde ve Kanserlerden Korumada Etkileri

Kanseri önlemeye ve/veya tedavi etmeye yönelik müdahaleler, karsinogenezin başlama, çoğalma ve ilerleme gibi spesifik aşamalarında meydana gelebilir. Stilbenler, sitokrom P450 (CYP) enzimlerinin spesifik izoformlarını inhibe ederek pro-karsinogenlerin metabolik aktivasyonunu bloke ederler. Dolayısıyla, kültüre edilmiş insan tümör hücrelerinde karsinogenez bloklanır (Chang, Lee, & Ko, 2000; Chun et al., 2009).

Stilbenlerden Resveratrol, ayrıca kanserojenlerin faz II metabolizmasını indükleyerek kansere karşı koruyabilir ve böylece vücuttan atılmasını sağlayabilir (Signorelli & Ghidoni, 2005). Bu duruma fare epidermisinde, Üridin -5 Difosfo (UDP) Glukuroniltransferaz ve NADPH: Kinon Oksidoredüktaz gibi metabolize edici enzimlerin Resveratrol kaynaklı aktivitesi örnek olarak gösterilebilir (Szaefer, Cichocki, Brauze, & Baer-Dubowska, 2004). Resveratrol, hücre kültürü çalışmalarında kanserin başlatılması

ve kanser hücrelerinin çoğalmasında rol oynayan p53, FoxO ve ATF3 genlerinin de dahil olduğu transkripsiyon ve büyüme faktörlerinin etkilerini baskılayarak kanserin ilerlemesini önleyebilir (Whitlock & Baek, 2012).

Buna ek olarak, Resveratrol ve Pterostilben, meme, prostat, pankreas, karaciğer ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanser türlerinde apoptozu indükler ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu önler (Carter, D’Orazio, & Pearson, 2014; McCormack & McFadden, 2012).

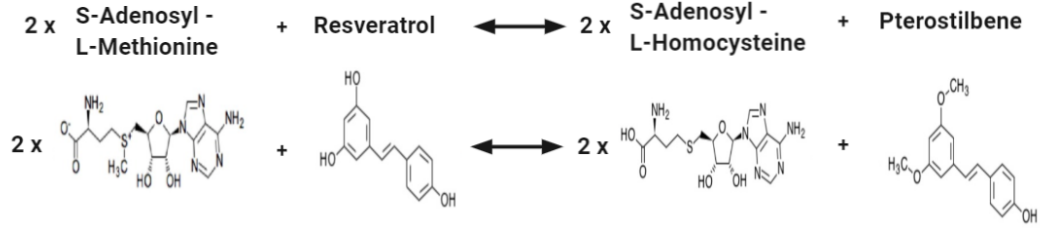
Resveratrol ve Pterostilben’in antikanser özelliklerinin gösterildiği mekanizmalar, apoptozisin indüksiyonu, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, hücre siklusunun durdurulması ve anjiyogenezin inhibisyonu içermektedir (Kosuru, Rai, Prakash, Singh, & Singh, 2016; Pavan et al., 2016).

4.2.6 Pterostilben

4.2.6.1 Pterostilben’in Kimyasal ve Biyolojik Özellikleri

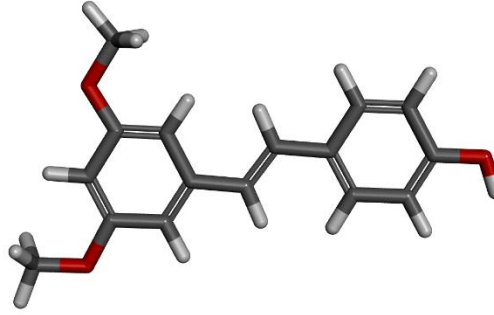
Pterostilben, ‘Trans-3,5-dimetoksi-4-hidroksistilben’ kimyasal adı ile bilinen doğal bir diyet bileşimidir ve yaban mersininin birincil antioksidan bileşenidir. Diğer stilben bileşiklerine kıyasla Pterostilben’in biyoyararlanımının fazla olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında, Pterostilben’in biyoyumumluluğu %80 iken, Resveratrol için bu değerin %20 olduğunu bildirilmiştir (Kapetanovic et al., 2011). Pterostilben’in Resveratrol’dan biyosentezi, tek karbon gruplarının transferini yapan enzim sınıfından biri olan EC 2.1.1.240 kodlu trans-resveratrol di-O-Metiltransferaz (Resveratrol O-Metiltransferaz / Pterostilben Sentaz) ile gerçekleşir.

Pterostilben’in biyosentezi **Şekil 4.2.3**’te gösterilmiştir (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?K16040+2.1.1.240+R09872, Erişim tarihi: 27 Temmuz 2020).



Şekil 4.2.3. Pterostilben'in Biyosentezi

Pterostilben molekülünün, molekül çizim programında gösterim **Şekil 4.2.4**'de gösterilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* modeller ile yapılan çalışmalar, Pterostilben'in antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmektedir. (McCormack, Denise; McFadden, 2013)



Şekil 4.2.4. Pterostilben Molekülünün Discovery Studio Visualizer'de Gösterimi

X-Işını Difraksiyon Yöntemi ile yapılan bir yapısal gösterim çalışmasında Pterostilben molekülü, fizyolojik koşullar altında retinol bağlayıcı protein ile bir kompleks oluşturan Transtiretin (Transthyretin) ile beraber kristalize edilmiştir. Pterostilben molekülü ve Transtiretin'in retinol bağlayıcı proteinle kristalografi yapısında gösterimi **Şekil 4.2.5**'te gösterilmiştir (<https://www.rcsb.org/3d-view/4WNS>, Erişim tarihi: 27.07.2020).



Şekil 4.2.5. Pterostilben'in Kompleks Formda X ışını Difraksiyon Yöntemi ile Gösterimi

4.2.6.2 Pterostilben'in Antioksidan Aktivitesi ve Hastalık Modifikasyonu

İnsan hastalıklarının tedavisinde ve önlenmesinde Pterostilben'in çoklu faydaları bildirilmiştir. Pterostilben'in, hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde terapötik yararlarını gösteren antioksidan etkinliği bilinmektedir. Pterostilben'in antioksidan, anti-inflamatuar ve normal hücrelerin daha iyi işlev göstermesini sağlayan ve malign hücrelerin de inhibisyonuna yol açan antikanserojenik etkilere sahip bir molekül olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Remsberg et al., 2008; Rimando et al., 2002).

Pterostilbenin antioksidan aktivitesi, antikarsinogenez, nörolojik hastalıkların modülasyonu, anti-inflamasyon, vasküler hastalıkların gerilemesi ve diyabetin iyileştirilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Mannal et al., 2013; McCormack, Denise; McFadden, 2013).

Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri bazı hastalık süreçlerinin başlangıcında ve patogenezinde rol oynarlar. Pterostilben, oksidatif stres (OS) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltır (Adly, 2010)

Ek olarak, Pterostilben uygulanan çeşitli hücre hatlarında, katalaz antioksidanlar, total glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve süperoksit

dismutaz (SOD) ekspresyonlarının artmış olduğunu gösterilmiştir (McCormack, Denise; McFadden, 2013).

4.2.6.3 Pterostilben ve Kanser

Önemli kanıtlar Pterostilben'in kanser, dislipidemi, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi için farmakolojik açıdan faydalara sahip olabileceğini düşündürmektedir. Pterostilben'in iyi tanımlanmış farmakolojik etkileri antineoplastik, anti-enflamatuar ve antioksidanlar olup, Pterostilben'in bazı malignitelerde güçlü bir antikanser ajanı olduğu klinik öncesi yapılmış çalışmalarda bildirilmiştir (Chen et al., 2018; McCormack, Denise; McFadden, 2013).

4.2.6.4 Pterostilben ve Meme Kanseri

Meme kanserleri, meme parankim epitelinden, özellikle de terminal duktal lobüler birimin hücrelerinden geliştiği düşünülen adenokarsinomlardır. Dünyada, kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri, kanser ilişkili mortalitede akciğer kanserinden sonra %15'lik oranıyla ikinci sırada yer alır (Hortobagyi et al., 2005). Erkeklerde ise meme kanseri yaklaşık % 1 sıklıkta görülür (Fentiman, Fourquet, & Hortobagyi, 2006).

Pterostilbenin meme kanseri üzerindeki etkisi ile ilgili mevcut çalışmalar, *in vitro* olarak çalışılan meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığını yönündedir. Bununla birlikte Pterostilbenin meme kanseri hücre hatlarında apoptozu, mitokondriyal depolarizasyonu, süper oksit anyonu ve Kaspaz 3 ile Kaspaz 7'yi arttırdığı gösterilmiştir (Alosi, McDonald, Schneider, Privette, & McFadden, 2010).

Pterostilben molekülünün meme kanser hücre hatlarına uygulanması ile yapılmış çalışmalardan birinde, Pterostilben'in Tamoksifen ile birlikte aditif olarak inhibitör etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Mannal, McDonald, & McFadden, 2010).

Chakraborty ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; Pterostilben'in meme kanseri hücrelerinde Kaspaz-3, Bax ve p53'ün indüksiyonu yoluyla hücre proliferasyonunu

azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Chakraborty, Gupta, Ghosh, & Roy, 2010).

Chakraborty'nin meme kanseri hücre hatlarında yaptığı bir diğer çalışmada, MCF-7 hücrelerinin Pterostilben molekülüne uzun süreli maruz kalmasıyla, meme kanseri hücrelerinin morfoloji ve otofajinin aktivasyonu gibi normal epitel hücresine farklılaşmasından kaynaklanabilecek büyüme durmasına neden olduğunu göstermektedir. (Chakraborty et al., 2012).

Moon ve arkadaşlarının meme kanseri hücre hatlarında yaptığı başka bir çalışma, Pterostilben molekülünün hücrelere uygulanmasının ardından hücrelerde sitokrom-c artışı olduğunu ve Pterostilben'in sitozolik Ca^{++} 'un aşırı yüklenmesine neden olduğunu göstermiştir. Pterostilben molekülünün, MDA-MB-231 hücre hattında MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase) aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı ve Pterostilben'in sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarında belirgin artışlara neden olduğu gösterilmiştir (Moon, McCormack, McDonald, & McFadden, 2013).

4.2.6.5 Pterostilben ve Diğer Kanseler

Meme kanserinin haricinde Pterostilben ile çalışılmış diğer kanselerde Pterostilben'in antikanserojen özellikte olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur. Gastrik, kolorektal, karaciğer, pankreas ve prostat kanserlerinde, Pterostilben'in kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Kliniğe yansiyacak sonuçlar için, çalışılan bu kanselerde mekanizmaları aydınlatacak daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir (McCormack, Denise; McFadden, 2013).

4.2.6.6 Pterostilben'in Kansere Karşı Apoptotik ve Non-Apoptotik Aktiviteleri

Kümülatif kanıtlar, Resveratrol'ün dimetile analogu olan Pterostilben'in, çeşitli kanser türlerinin önlenmesi ve tedavisi için apoptoza yol açarak ya da apoptozdan bağımsız etkilerle çok iyi farmakolojik faydalara sahip olduğuna işaret etmektedir (McCormack & McFadden, 2012; Nagao, Jinnouchi, Kai, & Yanagita, 2017).

Pterostilben'in kansere karşı pro-apoptotik etkileri bulunmaktadır. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin sadece % 0.01'inin kısmen apoptoz gibi hücre ölümüne neden olan çeşitli streslere bağlı olarak makro metastazlar ürettiği tahmin edilmektedir (Luzzi et al., 1998). Bu nedenle, apoptozun başlatılması, metastatik kanserlerin tedavisi için önemli stratejilerden biri olabilir. Buna göre, Pterostilben'in önemli anti-kanser etkilerinden biri, hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolları kolaylaştırmaktır (Kosuru et al., 2016).

Pterostilben'in kansere karşı, apoptozu başlatıcı özellikteki mekanizmaları aşağıda belirtilmiştir (Chen et al., 2018) :

1. Endoplazmik retikulum stresi sinyalizasyonunun artırılması
2. Otofajinin başlatılması
3. miRNA profillerinin düzenlenmesi
4. Büyüme reseptörlerinin fonksiyonunun engellenmesi
5. Epigenetik yolları etkilemesi

Pterostilben'in pro-apoptotik etkileri kategorisinde, onkomikro RNA'ların ve büyüme faktörlerinin inhibe edilmesi, MTA1(Metastaz İlişkili Protein-1)'in inhibisyonu yoluyla bir epigenetik modifikasyonun tetiklenmesi, endoplazmik retikulum sinyalizasyonu ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının artırılması ya da otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyonunu otofajiyi ile azaltması bildirilmektedir (Chen et al., 2018).

4.3 Warburg Etkisi

Kanser hücreleri, büyümelerini, hayatta kalmalarını, çoğalmalarını devam ettirmek ve indüklemek için enerji metabolizmalarını yeniden düzenlerler. Değiştirilerek düzenlenen bu metabolizmanın ortak özelliği, glukoz alımının artması ve glukozun laktata fermentasyonudur (Liberti & Locasale, 2016).

Temel makrobesin olan glikozun metabolizması, karbon bağlarının oksidasyonu yoluyla enerjinin ATP biçiminde kullanılmasına izin verir. Bu süreç tüm memeli yaşamını sürdürmek için gereklidir. Memelilerde, son ürün laktat ya da mitokondrilerde gerçekleşen solunum yoluyla glukozun tam oksidasyonu ile oluşan CO₂ olabilir. Tümörlerde ve diğer çoğalan ya da gelişmekte olan hücrelerde, ortamda oksijen varlığında ve tamamen işleyen mitokondri varlığında dahi glukoz alım oranı ve laktat üretimi dramatik ölçüde artar. Mitokondri üzerinden gerçekleşen bu fenomen, 'Warburg Etkisi' olarak isimlendirilmektedir (Liberti & Locasale, 2016).

Warburg Etkisi, 90 yılı aşkın bir süredir belgelenmiş olup son 10 yılda, bu etkinin nedenlerini ya da işlevlerini oluşturduğunu bildiren binlerce makale ile kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Ancak, dikkatli bir incelemeden sonra, hücre büyümesi ve sağkalımı için faydalarının henüz çözülmediği ek olarak Warburg Etkisinin fonksiyonunun halen belirsizliğini koruduğu anlaşılmaktadır. Warburg Etkisi'nin fonksiyonu ile ilgili retrospektif çalışmalarda yer verilen öneriler, bu etkinin avantajları ve dezavantajları olarak ayrıntılı ele alındığını göstermektedir. Warburg Etkisi için retrospektif makalelerde önerilmiş ve üzerinde tartışılan birkaç biyolojik açıklamanın analizi aşağıda detaylı olarak ifade edilmektedir. Yapılan bu retrospektif çalışmalarla, kanser metabolizmasındaki mevcut fikirlere ek bir bağlam getirilmesi amaçlanmıştır (Liberti & Locasale, 2016).

4.3.1 Warburg Etkisi'ne Tarihsel Bir Bakış

1920'lerde Otto Warburg ve meslektaşları, tümörlerin çevre dokularda görülenlere kıyasla, çok büyük miktarlarda glukoz aldıklarını gözlemlemiştir. Buna ek olarak, oksijen varlığında bile, laktat üretebilmek için glikoz fermentasyonunun yapıldığını ve bu nedenle

de ‘aerobik glikoliz’ terimini kullanmıştır (Otto Warburg, 1925). Bununla birlikte, solunumun tek başına tümörün canlılığını devam ettirebildiğini de not etmişlerdir. Bu nedenle, tümör hücrelerini, enerjiden mahrum bırakarak öldürebilmek için hem glukoz hem de oksijenin ortadan kaldırılması gerektiği sonucuna varmışlardır (B. Y. O. Warburg & Wind, 1926).

Daha sonra, 1929 yılında, İngiliz biyokimyacı Herbert Crabtree, Warburg'un çalışmalarını genişleterek tümör tiplerinde glikolizin heterojenliğini araştırmıştır. Crabtree, Warburg'un bulgularını doğrulamış. Ayrıca, tümörlerde solunumun büyüklüğünün, önemli miktarda solunum sergileyen birçok tümör ile birlikte değiştiğini keşfetmiştir (Crabtree, 1929). Bu nedenle, Crabtree, sadece tümör hücrelerinin aerobik glikoliz sergilediğini değil, aynı zamanda, muhtemelen çevresel veya genetik etkilerden dolayı da fermantasyonda değişkenlik olduğu sonucuna varmıştır (Crabtree, 1929).

Daha önce ortaya konulmuş bulguların aksine Warburg, daha sonra aerobik glikolizin esas temelini işlevsiz mitokondri olduğunu ve bu olayın kanserin birincil nedeni olduğunu ileri sürmüştür (O Warburg, 1956). Bu fenomen, daha sonra 1970'lerin başlarında, önceki verilerinin tümörlerin solunum kapasitesi olduğuna işaret eden Efraim Racker tarafından ‘Warburg Etkisi’ olarak adlandırılmıştır. Racker, intraselüler pH'daki dengesizliklerden ATPaz aktivitesindeki bozukluklara kadar değişen Warburg Etkisi'nin kökenleri hakkında kendi teorilerini geliştirmiştir (Racker, 1972).

Daha sonra Racker, Jeffrey Flier ve Morris Birnbaum tarafından aerobik glikolizin, büyüme faktörü sinyallemesi ile doğrudan regüle edilebilen kontrol edilebilir bir süreç olduğu gözlenmiştir. O zamana kadar, onkogenlerin keşfi sayesinde, büyüme faktörü sinyallemesinin anormal regülasyonunun, onkogenezi başlatıcı bir olay olarak etkilediği sonucuna varılmıştır. Böylece, bu gözlemlerde ortaya çıkan bulgular, Warburg'un kanser biyolojisindeki hipotezine yeni bir anlam kazandırmıştır (Birnbaum, Haspel, & Rosen, 1987; Boerner, Resnick, & Racker, 1985; Flier, Mueckler, Usher, & Lodish, 1987; Hiraki, Rosen, & Birnbaum, 1988).

Bununla birlikte, yakın zamana kadar, Warburg Etkisi'nin kanser patogenezinde bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi, genetik ve farmakolojik çalışmalardan alınan bulgularla tümör büyümesi için Warburg Etkisinin gerekli olduğunu göstermesiyle netlik kazanmıştır (Fantin, St-Pierre, & Leder, 2006; Hiraki et al., 1988).

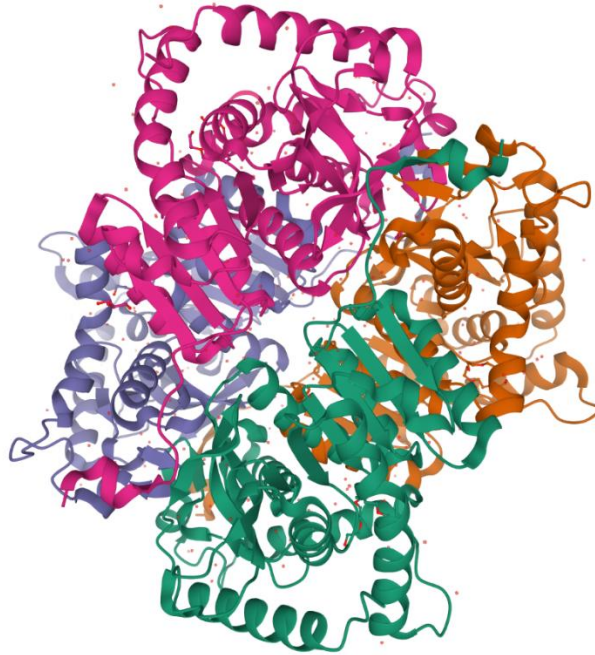
Tümör metabolizması ile ilgili orijinal bulgulara geri dönüldüğünde, hem aerobik glikoliz hem de mitokondriyal metabolizmanın hedeflenmesinin gerekebileceği açık olarak görünmektedir. Tarih boyunca, Warburg Etkisi'nin işlevleri tartışmalı bir konu olarak değerlendirilmekte olup, günümüz literatürlerinde de tümör büyümesi için Warburg Etkisi'nin işlevlerinin henüz net olarak bilinmediği konular mevcuttur (Birsoy et al., 2015; Flaveny et al., 2015; Sullivan et al., 2015; Viale et al., 2014).

4.4 Laktat Dehidrojenaz

4.4.1 LDH Enzimi ve İnhibitörü

Laktat dehidrojenaz (LDH), substrat olarak NADH'yı kullanarak NAD⁺ kazanımıyla piruvatın laktata dönüşümünü katalizleyen oksiredüktazlar sınıfından kritik bir metabolik enzimdir. Bakterilerden insanlara kadar çeşitli organizmalarda bulunan Laktat dehidrojenaz, tetramer olarak aktiftir (Kolappan et al., 2015).

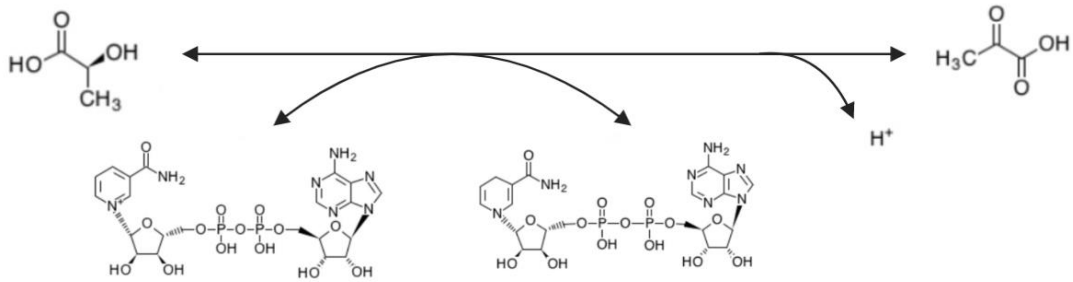
İnsanlarda LDH'nin iki ana izoformu bulunmaktadır. LDHA geni tarafından kodlanan LDHA, iskelet kası ve karaciğerde bulunan bir homotetramerdir. LDHB ise LDHB geni tarafından kodlanan ve kalp dokusunda bulunan bir homotetramerdir. LDH-A, insanlarda Glikoliz, Glukoneogenez, Sistein ve Metiyonin metabolizması, Piruvat Metabolizması, Propanot Metabolizması, HIF-1 sinyalizasyon yolağı, Glukagon sinyalizasyon yolağı ve kanserde merkezi karbon metabolizması ile ilişkili yollarda etkin bir fonksiyona sahiptir. Laktat Dehidrojenaz A'nın 3 Boyutlu Yapısı **Şekil 4.4.1**'de gösterilmiştir (<https://www.rcsb.org/3d-view/4OJN/1>, Erişim tarihi: 27 Temmuz 2020).



Şekil 4.4.1. L-Laktat Dehidrojenaz A'nın 3 Boyutlu Yapısı

Laktat dehidrojenazdaki katalitik mekanizma, izoformlar ve türler içinde korunmaktadır (Kolappan et al., 2015). Çoğu kanser hücresi, glikozun laktata dönüşümü sonucunda LDH seviyelerini arttırması ile Warburg Etkisi olarak bilinen glikolitik bir fenotip sergilemektedir. ATP'nin esas olarak aerobik glikoliz yoluyla üretildiği bu Warburg etkisi, piruvatın laktata dönüşümünün LDH ile katalizlendiği metabolik yoldan ibarettir. Bu etki neticede, LDH'yi onkoloji açısından çekici ve tedavi edici bir hedef konumuna getirmiştir (Hamanaka & Chandel, 2012; Vander Heiden, 2011; Otto Warburg, 1956). LDH'ın katalizlediği kimyasal reaksiyonun gösterimi **Şekil 4.4.2**'de gösterilmiştir.

(https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?reaction+R00703+R01000+R03104, Erişim tarihi: 27.07.2020).



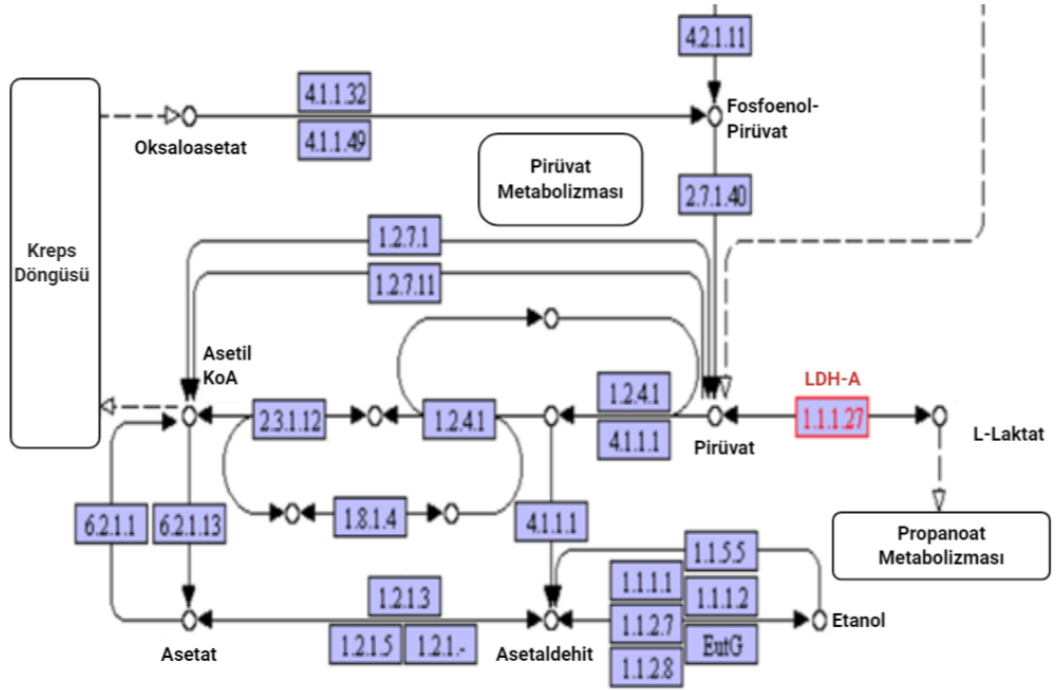
Şekil 4.4.2. LDH'ın Katalizlediği Kimyasal Reaksiyonun Gösterimi

LDH'nın, potansiyel bir terapötik hedef olarak gösterilmesi ile LDH izoformlarına spesifik inhibitörler sentezlettiler, LDH izoformlarının inhibe edilmesinin amaçlandığı çalışmalar yapılmıştır. LDHA'nın shRNA (short hairpin RNA) ile susturulması ya da küçük bir molekül ile inhibisyonu neticesinde, kanser hücrelerinde oksidatif hasar ve hücre ölümü meydana gelir (Granchi, Roy, Giacomelli, et al., 2011; Granchi, Roy, Mottinelli, et al., 2011). Bu nedenle, bu anormal fenotipi kullanarak ve kanser hücresi metabolizmasını bloke etmek için küçük molekülü LDH inhibitörleri aktif olarak araştırılmaktadır (Billiard et al., 2013; Dragovich et al., 2013; Fauber et al., 2013).

LDHA'nın inhibisyonu, kanser hücrelerinin enerjisini ve anabolik kaynağını kesmesi anlamına gelmektedir. Böylece kanser hücrelerinin metastatik ve invaziv potansiyelleri

azaltılmış olur. Bu özelliklerinden dolayı LDHA, yeni anti-kanser ajanları için potansiyel bir hedef olarak düşünülmektedir (Granchi, Roy, Giacomelli, et al., 2011).

LDH enziminin metabolik yolakta gösterimi Şekil 4.4.3'te gösterilmiştir. (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00010+K00016, Erişim tarihi: 27.07.2020).



Şekil 4.4.3. LDH Enziminin (E.C.1.1.1. 27) KEGG Metabolik Yolağında Gösterimi

4.5 Kanser ve Enerji Metabolizması

Memeli hayatının devam ettirilebilmesi için gerekli olan glukoz metabolizması, karbon bağlarının oksidasyonu ile ATP üzerinden devam etmektedir. Kanser hücrelerinde ve diğer proliferen olan hücrelerde, glukoz kullanımı ve laktat üretimi fark edilir seviyede artış gösterir. Mitokondri üzerinden gerçekleşen ve 'Warburg Etkisi' olarak isimlendirilen bu değişim kanser hücreleri için glikoz alımını ve glikolizi arttıracak şekilde programlanmıştır (Liberti & Locasale, 2016). Değişmiş enerji metabolizması, kanser hücrelerinde yaygın olarak görülmekte olup, yeni bir kanser karakteristiği olarak da kabul edilmiştir (Hanahan & Weinberg, 2011).

Kanser hücreleri enerji metabolizmalarını oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize doğru yönlendirirler. Bu durumu Wang ve araştırma grubu, Papiller Tiroid Karsinomalı hücre hatlarında göstermek amacıyla, metabolik bir inhibitör olan sentetik glukoz analogu 2-deoksi-D-glukozun (2-DG) anti-kanser aktivitesini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada BRAFV600E mutasyonuna sahip olan BCPAP hücre hattı ve BRAFV600E mutasyonu olmayan CG3 hücre hatlarında tek başına 2-deoksi-D-glukoz ya da Doxorubisin ya da Sorafenib ile kombinasyon halinde 2-deoksi-D-glukozun (2-DG) etkisini değerlendirmişlerdir. BCPAP hücrelerinin, CG3 hücrelerine kıyasla, daha yüksek hücre dışı L-Laktat üretimi, daha düşük hücre içi ATP düzeyi, düşük oksijen tüketim hızı (OCR) ve oksijen tüketim hızı/ hücre dışı asitleşme oranı göstermiştir. BCPAP hücrelerinin, CG3 hücrelerine kıyasla daha asidik olduğu çalışmada gösterilmiştir. Düşük kombine dozlarda 2-DG ve Doksorubisin/Sorafenib'in terapötik etkilerinin, BRAFV600E mutasyonuna bakılmaksızın, PTC hücre hatlarında tek başına Doxorubicin /Sorafenib'in yüksek dozlarına benzer olduğu da bildirilmiştir (Wang et al., 2015).

Pankreatik duktal karsinomalarda enerji metabolizması ile ilgili olarak ARF6 ekspresyonunun susturulmasının, Extrasellüler Asitlik Oranına (ECAR) bakılarak PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerindeki glikolitik kapasiteyi inhibe ederken, Oksijen Tüketim Oranına (OCR) göre de mitokondriyal solunumu arttırdığını gösterilmiştir. ARF6'nın

ekspresyonunun susturulması, GLUT1, HK2, LDHA'nın mRNA ve protein ekspresyonlarını azaltmıştır (Liang et al., 2017).

Baş ve boyun kanserli skuamöz hücre karsinomlarında, Cetuximab'ın LDH-A ekspresyonunu ve enzimatik aktivitesini, glikolitik yolağın temel düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü HIF1 α 'nın ekspresyonunu azaltarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmada, eş zamanlı olarak baş ve boyun kanserli skuamöz hücre karsinomlarının enerji profilleri hakkında bilgi sahibi olmak için ECAR ve OCR değerleri de sunulmuştur (Lu, Li, Luo, Liu, & Fan, 2013).

Kanser hücrelerindeki metabolik değişikliklerin oluşumunda önemli rol oynayan HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha)'nın baskılanması ile ilgili başka bir kanser enerji metabolizması araştırmasında Kolorektal kanser hücreleri ile Ban ve arkadaşları çalışmışlardır. Hipoksi koşulları altında kolorektal kanser hücrelerinde (HCT116) yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda HIF1 α 'nın birikimini, IDF-11774'ün inhibe ettiği gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, IDF-11774'ün, HSP70'in şaperon aktivitesini inhibe ettiği ve HIF1 α 'nın birikimini baskıladığı gösterilmiştir. Kolorektal kanser hücrelerine IDF-11774'ün uygulanması, HIF1 α 'nın hedef genlerinin ekspresyonunu azaltmasıyla, kanser hücrelerinin anjiyogenezini baskıladığı görülmüştür. Glukoz alımını azaltması dolayısıyla düşük glikoz koşulları altında hücrelerin büyümesini duyarlı hale getirip, kanser hücrelerindeki ECAR ve OCR oranlarını da azaltmıştır. IDF-11774 uygulanan hücrelerin metabolik enerji profillemesinde, Glikoliz ve Krebs döngüsündeki ara ürünlerle birlikte, düşük seviyelerde NAD⁺, NADP⁺, ve Laktat açığa çıkardığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, artmış AMP ve azalmış ATP seviyeleri gözlenmiştir. Bu durum, AMP/ATP oranını arttırarak sonuçlanmıştır. AMP ile aktive olan Protein Kinaz fosforilasyonunun da seviyesini arttırmış olup, bu artış, IDF11774 uygulanan hücrelerde mTOR sinyallemesinin inhibisyonunu yönlendirmiştir. Araştırmada, IDF-11774'ün, hipoksi ile indüklenmiş HIF1 α birikimini baskıladığını ve kanser metabolizması ile ilişkili spesifik enerji üretimi ile tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Ban et al., 2017).

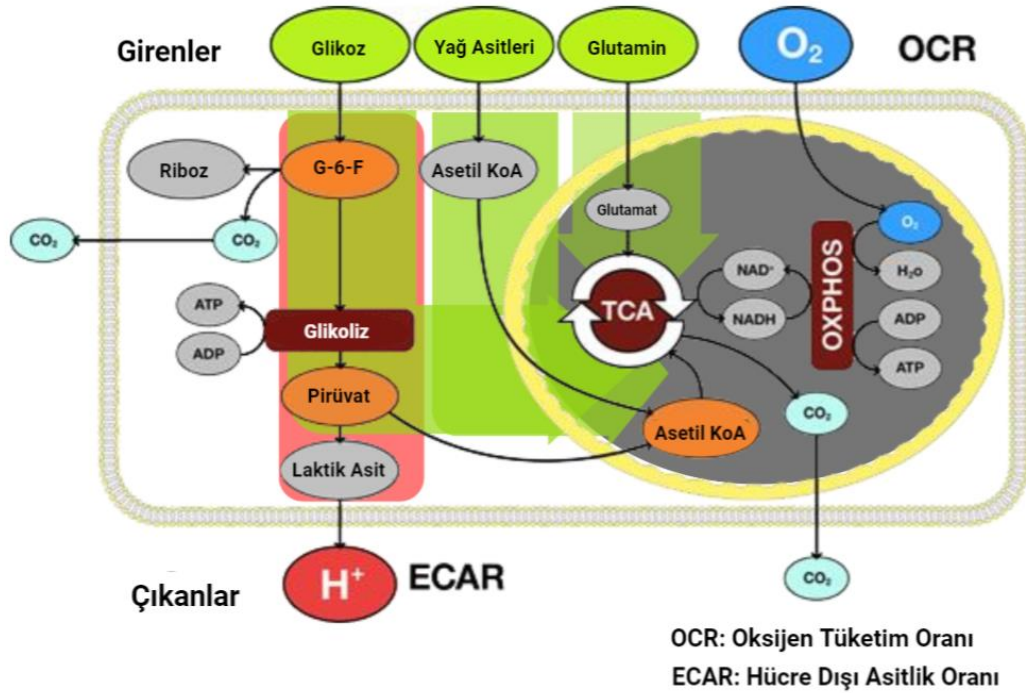
Tümör enerji metabolizması alanındaki güncel gelişmeler, metastaz ile metabolik yeniden programlama arasındaki ilişkiyi ve mekanizmasını araştırmaya yönlendirmektedir. Sun ve arkadaşlarının bu alanda yaptıkları bir çalışmada, FAM210B'nin insan yumurta kanserindeki rolünü araştırmışlardır. Hücre proliferasyonu, koloni oluşumu ve invazyon analizlerinin yapıldığı çalışmada, insan yumurtalık kanseri xenograft modelinde, ShRNA (short hairpin RNA) aracılığıyla FAM210B'nin inhibe edilmesinin tümör metastazına etkileri gösterilmiştir. FAM210B aracılı metabolik yeniden programlamayı saptamak için oksijen tüketim oranı ve hücre dışı asitleşme oranını da göz önünde bulundurarak FAM210B'nin *in vivo* ve *in vitro* yapılmış çalışmalarda, düşük ekspresyonunun, azalmış sağ kalım ve metastaz ile anlamlı korelasyonu olduğunu göstermişlerdir. FAM210B'nin kaybının, artmış mitokondriyal solunum kapasitesine ve EMT programını aktive eden, migrasyon ve invazif özellikleri arttıran PDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4)'ün azalmış ekspresyonu üzerinden glikolizin azalmasına neden olduğunu literatüre kazandırmışlardır. Çalışma sonucunda çıkan verilerin, potansiyel bir metabolik hedef ve kanser metastazı mekanizmasını açığa çıkarmaktadır (Sun et al., 2017).

Mitokondriyal biyoenerjetikler ile ilgili yapılan metabolizma çalışmaları son zamanlarda artış göstermektedir. Mitokondri, metabolik yolların ve hayatta kalma sinyallerinin entegrasyonunun ve odaklanmasının, besinin kullanılabilirliğinin ve hormon stimülasyonuna adaptif yanıtın başlatılmasının yeri olup, enerji üretiminin en iyi oyuncusudur. Artan kanıtlar, mitokondriyal biyoenerjetiklerin, metabolizmanın ve sinyalizasyonun tümörigenez ile bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu konu ile ilgili olarak, organel biyogenezinin, oksidatif metabolizmanın ve hücre yaşamının düzenlenmesinin, mitokondrideki cAMP ve SRC sinyallemesinin entegre edilmesi gibi alanlarda fonksiyon gösteren AKAP1 skaffold proteini de bu kapsamda araştırılmıştır.

Rinaldi ve arkadaşlarının, AKAP1'in, Myc'nin transkripsiyonel bir hedefi olduğuna ve kanser hücrelerinin büyümesini desteklediğine dair kanıtların sunulduğu bir çalışmada, mitokondri üzerinde, AKAP1'in yeni bir komponenti olarak, lösin sensörü ve mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitörü olan Sestrin2 tanımlanmıştır. AKAP1'in down regülasyonunun mTOR yolağına zarar verdiği ve glioblastoma büyümesini engellediği

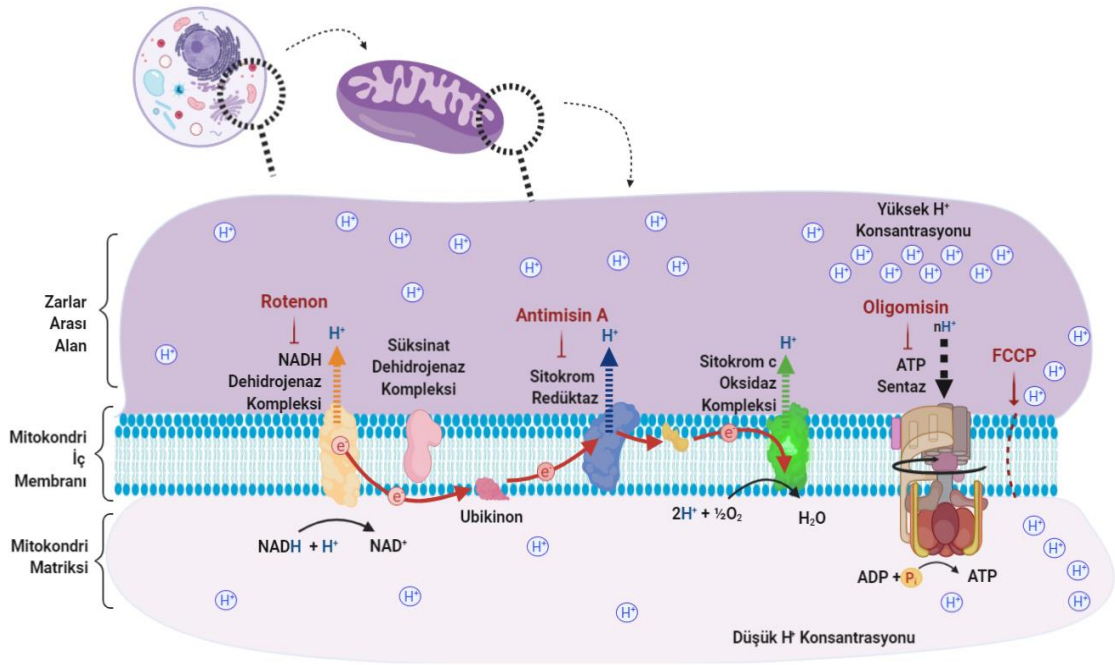
gösterilmiştir. Araştırmada, glioblastoma hücrelerinin büyümesinde ve oksidatif fosforilasyonunda, AKAP1 proteininin gerekli olduğu, kinetik oksijen tüketim oranlarına (OCR) bakılarak teyit edilmiştir. Akciğer kanserinde, AKAP1 ifadesinin, yüksek Myc, mTOR fosforilasyon seviyeleri ve hasta sağ kalımı ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Toplu halde bu veriler, mTOR yolağı düzenlemesinde ve kanser gelişiminde, AKAP1'in önceden bilinmeyen bir rolünü ortaya çıkarmakta olup, mitokondri üzerindeki AKAP1/mTOR sinyal entegrasyonunun, kanser tedavisi için yeni bir hedef oluşturabileceğini öngörmektedir (Rinaldi et al., 2017).

Çalışmamızda, meme kanser hücrelerindeki tümör enerji metabolizması ile ilgili edinilecek bulgular, aerobik glikolizin ve de mitokondriyal metabolizmanın çıktıları olarak ölçülecek olan H^+ çıkışı ve O_2 tüketim hızı aracılığı ile elde edilecektir (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.1. Metabolik Akış Sisteminde Metabolik Yanıtların OCR ve ECAR olarak Gösterimi
Çalışılacak sistem, glikoliz yolağında, glukozun parçalanmasının ardından oluşan 3 Karbonlu Pirüvat'ın Laktik Asite dönüşmesiyle, hücre medyumuna salınacak olan H^+ iyonlarının oluşturduğu pH değişimini (ECAR) ölçerken, eş zamanlı olarak da mitokondri

matriksindeki elektron transfer sisteminden aktarılan elektronların ve serbest hidrojenlerin bir araya gelmesi sonucunda oksijenin suya indirgenmesi reaksiyonundan faydalanılarak O_2 tüketimindeki veriyi kullanarak Oksijen Tüketim Hızını (OCR) ölçer. Hücelere uygulanan IC50 dozlarının ardından, bazal ve stres sonrası hücrelerin oksijen tüketimi (OCR) ve ekstrasellüler asidifikasyon hızı (ECAR) ölçülecektir (Şekil 4.5.1 ve Şekil 4.5.2).



Şekil 4.5.2. Mitokondri Matriksinde Elektron Transfer Sistemi ve Oksidatif Fosforilasyon İnhibitörleri

Mitokondride yer alan Sitokrom-c oksidaz kompleksi, solunum zincirinin H^+ pompalayan son elemanı olduğu için elektronlar sitokrom-c'den oksijene aktarılır (Şekil 4.5.2). Mitokondri iç membranına gömülü kompleksleri inhibe edici kimyasallar, mitokondri komplekslerindeki normal durumda meydana gelen elektron akışını engellerler. Rotenon, Antimisin A, Oligomisin gibi inhibitörler sırayla NADH dehidrojenaz, Sitokrom Redüktaz ve Sitokrom-c Komplekslerini inhibe ederler. Karbonil siyanür-4 fenilhidrazon (FCCP) ise zarlar arası alandan mitokondri matriksine girecek olan H^+ lerin ayrıştırılmasına neden olarak ATP sentezini bozar. FCCP, mitokondride oksidatif

fosforilasyonun (OXPHOS) bir ayırıcısı olarak fonksiyon göstermektedir. Çalışmamızda, mitokondriyal inhibitörlerin uygulandığı stres durumunda hücrel metabolizmanın tepkisi de değerlendirilecektir.

Değişmiş enerji metabolizmaları, kanser hücrelerinde yaygın olarak gözlenmekte olup, yeni bir kanser karakteristiği olarak sınıflandırılmaktadır. Literatürde yer alan kanser enerji metabolizması araştırmaları incelendiğinde meme kanseri hücrelerinde Pterostilben ve LDH-A inhibitörünün kombine etkilerinin hücrelerin enerji metabolizmalarına olan etkilerinin yer aldığı bir araştırma bulunmamaktadır.

Meme kanseri ve diğer kanserde enerji metabolizmalarının değişimi ile ilgili araştırmalardan çıkacak sonuçlar, yeni keşiflerinin yapılmasını ve bu konuda yapılacak ileri seviyede çalışmalar neticesinde, klinikte uygulanabilecek sonuçlar sağlayabileceğinden tüm insanlık için önem arz etmektedir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Thermo Maxisafe 2020 -Sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D)
- xCelligence- Gerçek zamanlı Hücre Analiz Sistemi, Acea, Agilent, (A.B.D)
- Inverted Mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Neubauer – improved Hücre Sayım Lamı, Isolab, (Almanya)
- Pipet Adaptörü, Gilson, (Fransa)
- Otomatik Pipet Seti, 0,5-2 µl; 2-20 µl; 20-200 µl;100-1000 µl) Gilson, (Fransa)
- pH Metre, (Halo Wireless General Use), Hanna Instruments, (A.B.D)
- Multimod Plaka Okuyucu, (Synergy HTX, BioTek, (A.B.D)
- İnkübatör, ESCO Cell Culture CO₂ Incubator (A.B.D)
- Doku Parçalayıcısı, (TissueLyser LT, Qiagen), (Almanya)

5.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Ependorf Tüp 1.5 mL, Axygen (A.B.D.)
- Ependorf Tüp 2.0 mL, Axygen (A.B.D.)
- Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)
- Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
- Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)
- Falkon Tüp 50 mL, TPP (İsviçre)
- Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)
- Serolojik Pipetler (5mL, 10mL, 25 mL), Axygen (A.B.D.)
- Kuvartz küvetler
- T25 Filtreli Flask, Greiner Bio One. (Avusturya)
- T75 Filtreli Flask, Greiner Bio One. (Avusturya)
- 6'lı Hücre Kültür Plakası, Greiner Bio One. (Avusturya)
- 2 mL'lik Dondurucu Tüpler, Greiner Bio One. (Avusturya)

- pH Ölçüm Kağıtları (0-14), (Isolab, Almanya)
- Lamel, Isolab, (Almanya)

5.1.3 Kullanılan Kimyasallar

- Pterostilben, Sigma (A.B.D.)
- Sodyum Okzamat (LDH-A İnhibitörü), Sigma (A.B.D.)
- Paclitaxel (Ebetaksel), (A.B.D.)
- D-MEM/F:12(1:1), Thermo Fisher (A.B.D.)
- Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher (A.B.D.)
- DMSO (Dimetil Sülfoksit), Thermo Fisher (A.B.D.)
- L-Glutamin, Thermo Fisher (A.B.D.)
- D- Glucose, Sigma (A.B.D.)
- Piruvat, Sigma (A.B.D.)
- Tripsin-EDTA (% 0.25), Thermo Fisher (A.B.D.)
- Penisilin-Streptomisin (10.000U/mL), Thermo Fisher (A.B.D.)
- Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Sigma, (A.B.D.)
- Trypan Blue, (Tripan Mavisi), Sigma, (A.B.D.)

5.1.4 Kullanılan Çözeltiler

- 0,1 M HCl
- 0,5 M NaOH
- % 4'lik PFA (Paraformaldehit) Solüsyonu
- % 70'lik Etil Alkol
- % 0.4'lük Tripan Blue Solüsyonu

5.1.5 Kullanılan Kitler

- 0,1 M HCl
- 0,5 M NaOH

- % 4'lik PFA (Paraformaldehit) Solüsyonu
- % 70'lik Etil Alkol
- % 0.4'lük Tripkan Blue Solüsyonu
- Seahorse, Glikoliz Stres Kiti (Agilent, Seahorse, A.B.D)
- Seahorse Mito Stres Kiti (Agilent, Seahorse, A.B.D)
- Seahorse XF Enerji Fenotipi Kiti (Agilent, Seahorse, A.B.D)

5.1.6 Kullanılan Hücre Kùltürleri

- MCF-7 (ATCC HTB-22), (A.B.D)
- MDA-MB-231 (ATCC CRM-HTB-26), (A.B.D)

5.2 Yöntem

5.2.1 Hücre Kültürü

Çalışmada, ticari olarak satılan meme kanser hücre hatlarından olan MCF-7 (ATCC® HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26) kullanıldı. Meme kanser hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)'den satın alındı. Her iki hücre hattı sağlıklı çoğalmalarının gözlemlendiği pasaja kadar çoğaltıldı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları da aynı pasaj sayısında (4 pasaj) çoğaltıldı.

MCF-7 ve MDA-MB-231 deneylerde kullanılmak üzere %10 fetal sığır serumu (EU-Approved, Thermo Fisher) ve %1 Penisilin- Streptomisin (Thermo Fisher) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium /F12 (1:1)(CE) (Thermo Fisher)'dan oluşan kültür ortamı kullanılarak 37°C'de ve % 5 CO₂ içeren inkübatör ortamında 25 cm²'lik hücre kültür flasklarında inkübe edilerek eşit koşullarda çoğalmaları sağlandı.

Tablo 5.2.1. Çalışılan Meme Kanseri Hücre Hattı Özellikleri

Hücre Hattı	Hücre Tipi	Hasta / Sağlıklı- Organ	Tanısı-Evresi	İmmün Profili
MCF-7	Epitel	69 Yaş Kadın- Metastatik alandan türetilmiş meme, meme bezi. Plevral efüzyon	Adenokarsinoma	HER2(-) E.R(+) P.R(+)
MDA-MB-231	Epitel (KRAS CRM)	51 Yaş Kadın- Metastatik alandan türetilmiş meme, meme bezi. Plevral efüzyon	Adenokarsinoma	HER2(-) E.R(-) P.R(-)

MCF-7 hücre hattının immün profili, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 HER2 açısından (-), Estrogen receptor (E.R) açısından (+) ve Progesterone receptor (P.R) açısından ise (+)'tir.

MDA-MB-231 hücre hattının immün profili ise; HER2(-), E.R(-) ve P.R(-)'dir. Her üç reseptör açısından negatiftir (Triple Negative).

Çalışılan meme kanser hücre hatlarının özellikleri **Tablo 5.2.1**'de gösterilmiştir.

5.2.1.1 Sekonder Hücrelerin Çözdürülmesi Protokolü

1. Çalışılacak olan laminar akış kabini, hücreler kabine getirilmeden 30 dakika önce ultraviyole ışığına maruz bırakılarak steril edildi.
2. 2ml'lik dondurucu tüp (cryo) içerisindeki hücreler -80°C 'den 37°C 'lik su banyosuna alındı.
3. Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) $+4^{\circ}\text{C}$ 'den ve FBS (Fetal Bovine Serum) -20°C 'den alınarak sıcaklığı 37°C 'ye ayarlı su banyosunda çözdürüldü.
4. Ultraviyole ışığa maruz bırakılan laminar akış kabininin içi 30 dakika sonra sırasıyla steril distile su ve %70'lik etil alkol ile silinerek steril edildi.
5. Kullanılacak ekipmanlar %70'lik etil alkol ile silinerek laminar akış kabinine alındı.
6. 15 ml'lik falkon içerisine 10 ml FBS free medyum aktarıldı.
7. Üzerine 37°C 'ye ayarlı su banyosunda çözülmüş olan hücreler damla damla aktarılarak 1 ml ilave edildi.
8. Soğutmalı santrifüjde oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Hücreleri kaldırmadan süpernatant çekilip uzaklaştırıldı.
10. Pelletin üzerine sırayla önce 1 ml, ardından 4 ml Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) ilave edilerek pipetaj yapıldı.
11. Ardından 5 ml daha Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) ilave edilerek pipetaj yapıldı.
12. Hücreler ve medyum falkondan flaska aktarıldı.
13. Flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin homojen dağılması sağlandı.
14. Flaskın üzerine açılan pasaj sayısı, hücre hattı, pasajı yapan kişinin adı ve tarih bilgileri yazıldı.
15. Flask içerisindeki hücreler, invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, flaskın kapağı tam kapatılmayacak şekilde 37°C 'ye ayarlı %5 CO_2 içeren inkübatör ortamında inkübe edilerek çoğalmaya bırakıldı. Hücreler düzenli olarak invert mikroskopta hücrelerin morfolojisi ve sayısı yönünden incelendi. Hücrelerin durumuna göre ortalama 2 günlük aralıklarla pasaj yapıldı.
16. Kabin içi sıra ile steril distile su ve %70'lik etil alkol ile silindi.

5.2.1.2 Hücrelerin Pasajlanması Protokolü

1. Çalışılacak olan laminar akış kabini, çalışılmadan 30 dakika önce ultraviyeye ışığına maruz bırakılarak steril edildi.
2. Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) +4°C'den ve FBS (Fetal Bovine Serum) -20°C'den alınarak sıcaklığı 37°C'ye ayarlı su banyosunda çözündürüldü.
3. Ultraviyole ışığına maruz bırakılan laminar akış kabininin içi 30 dakika sonra sırasıyla steril distile su ve %70'lik etil alkol ile silinerek steril edildi.
4. Kullanılacak tüm ekipmanlar %70'lik etil alkol ile silinerek laminar akış kabine alındı.
5. %90 hücre yoğunluğa ulaşan flasklar, %5 CO₂ içeren inkübatörden çıkarılarak laminar akış kabine alındı. İstenilen hücre yoğunluğu seviyesine ulaşamayan flasklardaki hücrelerin inkübasyonuna devam edildi.
6. Flask dik konumda iken içerisindeki medyum maksimum seviyede uzaklaştırıldı.
7. Hücreleri kaldırmayacak şekilde 3,5 ml FBS-Free Medyum ile yıkama yapıldı.
8. 1 ml Tripsin ile 2-3 dakika 37°C'de inkübe edildi.
9. Tripsin ile muamele edilmiş hücreler falkon tüplere aktarıldı ve üzerine 10 ml FBS içeren Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) konuldu. Nötralizasyon sağlandı.
10. 1000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası falkondaki süpernatant maksimum seviyede uzaklaştırıldı.
12. Pelletin üzerine sırasıyla 1 ml, 4 ml ve 5ml Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı.
13. Hücrelerle birlikte medyum flaska aktarıldı. Hücrelerin homojen dağılmasını sağlamak amacıyla hafifçe çalkalandı.
14. Flaskın üzerine açılan pasaj sayısı, hücre hattı, pasajı yapan kişinin adı ve tarih bilgileri yazıldı.
15. Flask içerisindeki hücreler, invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, flaskın kapağı kapatılarak 37°C'ye ayarlı %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında inkübe edilerek çoğalmaya bırakıldı. Hücreler düzenli olarak invert mikroskopta hücrelerin

morfolojisi ve sayısı yönünden incelendi. Hücrelerin durumuna göre ortalama 2 günlük aralıklarla pasaj yapıldı.

16. Kabin içi sıra ile steril distile su ve %70'lik etil alkol ile silindi.

5.2.1.3 Hücrelerin Dondurulması Protokolü

1. Çalışılacak olan laminar akış kabini, çalışılmadan 30 dakika önce ultraviyole ışığına maruz bırakılarak steril edildi.
2. Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) +4°C'den ve FBS (Fetal Bovine Serum) -20°C'den alınarak sıcaklığı 37°C'ye ayarlı su banyosunda çözündürüldü.
3. 37°C'ye ulaşan FBS ile %10'luk 2 ml hacimde DMSO hazırlandı (0,2 ml DMSO + 1,8 ml FBS)
4. Ultraviyole ışığına maruz bırakılan laminar akış kabininin içi 30 dakika sonra sırasıyla steril distile su ve %70'lik etil alkol ile silinerek steril edildi.
5. Kullanılacak tüm ekipmanlar %70'lik etil alkol ile silinerek laminar akış kabinine alındı.
6. %90 hücre yoğunluğa ulaşan flasklar, %5 CO₂ içeren inkübatörden çıkarılarak laminar akış kabinine alındı. İstenilen hücre yoğunluğu seviyesine ulaşamayan flasklardaki hücrelerin inkübasyonuna devam edildi.
7. Flask dik konumda iken içerisindeki medyum maksimum seviyede uzaklaştırıldı.
8. Hücreleri kaldırmayacak şekilde 3,5 ml FBS-Free Medyum ile yıkama yapıldı.
9. 1 ml Tripsin uygulanarak 2-3 dakika 37°C'de inkübe edildi.
10. 1 ml Tripsin içeren hücreler falkona alındı, üzerine 10 ml FBS içeren Complete Medium (Tamamlanmış Medyum) konuldu ve nötralizasyon sağlandı.
11. 1000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
12. Falkondan süpernatant maksimum seviyede uzaklaştırıldı.
13. Üzerine 2 ml %10'luk DMSO eklenerek hafifçe çalkalama ile homojen hale getirildi
14. 2 adet dondurucu (cryo) tüpüne her birine 1'er ml gelecek şekilde aktarıldı.
15. Dondurucu (cryo) tüplerin üzerine pasaj no, hücre hattı, kişinin adı ve tarih bilgileri yazıldı.
16. Dondurucu (cryo) tüpleri -80°C'ye kaldırıldı.

17. Kabin içi sıra ile steril distile su ve %70'lik etil alkol ile silindi.

5.2.1.4 Hücrelerin Sayım Protokolü

1. Her pasaj işleminin ardından hücre canlılığı Tripan Blue Solüsyonu kullanılarak yapıldı. Tripan Blue boyasını hücre zarından geçirmeyen hücreler, canlı hücreler olduğu için bu özellikten faydalanıldı.
2. Hücre kültür medyumu ile dilue edilmiş hücrelerden 5 μ l alınarak üzerine 45 μ l Tripan Blue boyası eklenerek 1,5 ml'lik tp içerisinde karıştırıldı.
3. Bu karışımdan 10 μ l Neubauer lamı üzerine aktararak lam üzerindeki bölmelerde yer alan hücreler invert mikroskopta sayıldı (şekil 5.2.1).
4. Bulunan sonuç, dilüsyon faktörü ile çarpılarak, 1 ml medyumda yer alan canlı hücre sayısı hesaplandı.



şekil 5.2.1. Neubauer Lamı Yandan Görünüşü

5.2.2 Deney Gruplarının Oluşturulması

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında, Pterostilben'in sitotoksik etkilerini incelemek amacı ile aşağıda belirtilen deney grupları ve her grubun altında alt deney kolları oluşturuldu.

GRUP-1: Deney grubu olarak MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

- A- Kolu: [MCF-7 Hücre Mediumu] (Negatif kontrol)
- B- Kolu: [MCF-7 Hücre kültürü+Medium] + (Pozitif kontrol) Paclitaxel (IC50 doz)
- C- Kolu: [MCF-7 Hücre kültürü+Medium] + Pterostilben (IC50 doz)
- D- Kolu: [MCF-7 Hücre kültürü+Medium] + LDH-A inhibitörü (IC50 doz)
- E- Kolu: [MCF-7 Hücre kültürü+Medium] + LDH-A inhibitörü + Pterostilben (IC50 doz)

GRUP-2: Deney grubu olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

- A- Kolu: [MDA-MB-231 Hücre Mediumu] (Negatif kontrol)
- B- Kolu: [MDA-MB-231 Hücre kültürü+Medium] +(Pozitif kontrol) Paclitaxel (IC50 doz)
- C- Kolu: [MDA-MB-231 kültürü+Medium] + Pterostilben (IC50 doz)
- D- Kolu: [MDA-MB-231 Hücre kültürü+Medium] + LDH-A inhibitörü (IC50 doz)
- E- Kolu: [MDA-MB-231 Hücre kültürü+Medium] + LDH-A inhibitörü + Pterostilben (IC50 doz)

5.2.3 Gerçek Zamanlı Sitotoksiste Testi İle İlaçların IC50 Dozlarının Belirlenmesi

Deney gruplarında yer alan meme kanseri hücrelerinde Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Paclitaxel'in sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla IC50 ilaç doz belirlemesi yapıldı. Seçilen ilaçlar için, IC50 dozu (**Half Maximal Inhibitory Concentration**) hücrelerde canlılığın %50 oranında inhibe edildiği ilaç konsantrasyonu olarak temel alındı. IC50 değeri, hücre canlılığını/ sayısını deneyin başlangıcına oranla %50 oranında azaltan ilaç konsantrasyonudur ve hücrelerin net kaybını ifade etmektedir. Hücre canlılığı, ilaçla muamele edilmemiş kontrol hücrelerinin canlılığının %100 olarak ifade edilmesiyle gösterilmiştir.

Pterostilben ve LDH inhibitörü Sodyum Oxamatın literatürde daha önce yapılmış IC50 değeri araştırıldı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için çalışılacak uygun konsantrasyon aralığına karar verildi (Alosi et al., 2010). Daha sonra MCF-7 hücre hattı için Pterostilben 20-40-60-80-100-120 µM konsantrasyon aralıkları ve Sodyum oxamatın için 10-20-40-60-80 mM konsantrasyonlarının IC50 dozunu belirlemek için uygun olduğuna karar verildi. MDA-MB-231 hücre hattı için Pterostilben 40-80-100-150 µM konsantrasyon aralıkları ve Sodyum oxamat için 40-60-80-100-120-160 mM konsantrasyonlarının IC50 dozunu belirlemek için uygun olduğuna karar verildi.

Çalışmanın pozitif kontrolü olan Paclitaxel, ticari adı Ebetaksel olan sıvı flakon (6mg/mL) şeklinde temin edildi, Paclitaxel test ilaç konsantrasyonu (TDC) değerine göre hazırlandı. TDC, test ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır ve TDC değerleri farmokokinetik/klinik bilgi ve deney sonuçlarının değerlendirilmesi ile belirlenmektedir. %100 TDC değerleri literatürde, yaklaşık olarak plazma pik konsantrasyonlarına karşılık gelmektedir (Andreotti et al., 1995). Paclitaxel için test ilaç konsantrasyonu 16,9 µM olarak belirlenmiştir. (Hunter EM1, Sutherland LA, Cree IA, Subedi AM, Hartmann D, Linder D, 1994).

Doz belirlemesinden sonra, deneysel uygulamalar 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. Pozitif ve negatif kontrol dahil olmak üzere tüm çalışma 3 tekrar olarak Xcelligence cihazında çalışılmak üzere çalışma planı oluşturuldu (**Tablo 5.2.2**).

Tablo 5.2.2. Pterostilben ve Sodyum Oxamat'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Kullanılan Konsantrasyon Aralıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MCF-7 Hücre Hattı						MDA-MB-231 Hücre Hattı					
A	20 µM Pterostilben	20 µM Pterostilben	20 µM Pterostilben	10 mM LDH-A İnh.	10 mM LDH-A İnh.	10 mM LDH-A İnh.	40 µM Pterostilben	40 µM Pterostilben	40 µM Pterostilben	40 mM LDH-A İnh.	40 mM LDH-A İnh.	40 mM LDH-A İnh.
B	40 µM Pterostilben	40 µM Pterostilben	40 µM Pterostilben	20 mM LDH-A İnh.	20 mM LDH-A İnh.	20 mM LDH-A İnh.	80 µM Pterostilben	80 µM Pterostilben	80 µM Pterostilben	60 mM LDH-A İnh.	60 mM LDH-A İnh.	60 mM LDH-A İnh.
C	60 µM Pterostilben	60 µM Pterostilben	60 µM Pterostilben	40 mM LDH-A İnh.	40 mM LDH-A İnh.	40 mM LDH-A İnh.	100 µM Pterostilben	100 µM Pterostilben	100 µM Pterostilben	80 mM LDH-A İnh.	80 mM LDH-A İnh.	80 mM LDH-A İnh.
D	80 µM Pterostilben	80 µM Pterostilben	80 µM Pterostilben	60 mM LDH-A İnh.	60 mM LDH-A İnh.	60 mM LDH-A İnh.	150 µM Pterostilben	150 µM Pterostilben	150 µM Pterostilben	100 mM LDH-A İnh.	100 mM LDH-A İnh.	100 mM LDH-A İnh.
E	100 µM Pterostilben	100 µM Pterostilben	100 µM Pterostilben	80 mM LDH-A İnh.	80 mM LDH-A İnh.	80 mM LDH-A İnh.	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	120 mM LDH-A İnh.	120 mM LDH-A İnh.	120 mM LDH-A İnh.
F	120 µM Pterostilben	120 µM Pterostilben	120 µM Pterostilben	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	160 mM LDH-A İnh.	160 mM LDH-A İnh.	160 mM LDH-A İnh.
G	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	Sadece MDA-MB-231	Sadece MDA-MB-231	Sadece MDA-MB-231	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol	16,9 µM Taxol
H	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	Sadece MCF-7	Sadece MCF-7	Sadece MCF-7				(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol

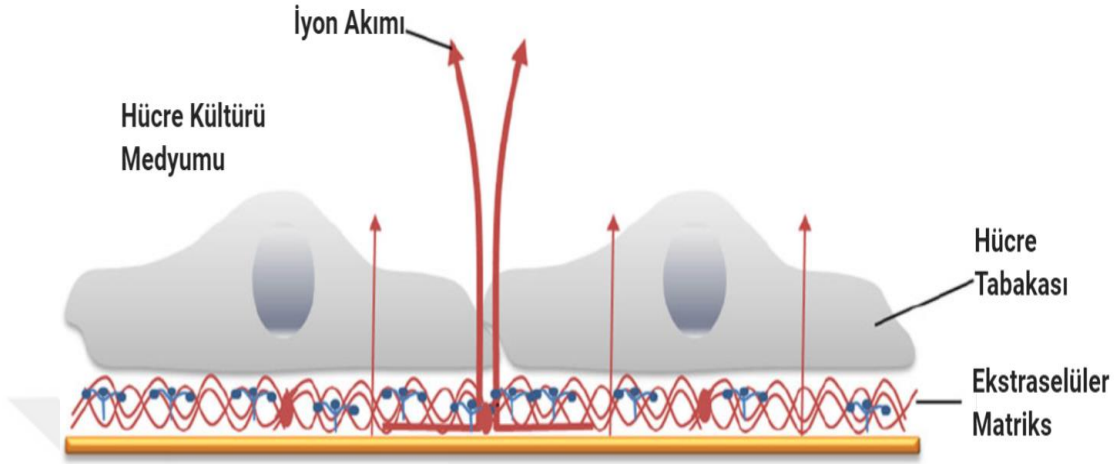
Bunun için ilaçların seri dilüsyonları kuyulara yerleştirilerek hücre indeks ve sayısındaki değişimler, Gerçek zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Xcelligence Real Time Cell Analyzer, ACEA Biosciences) kullanılarak değerlendirildi (Şekil 5.2.2).



Şekil 5.2.2. Gerçek zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Empedans Ölçümüne Dayanan Analiz Ekipmanları

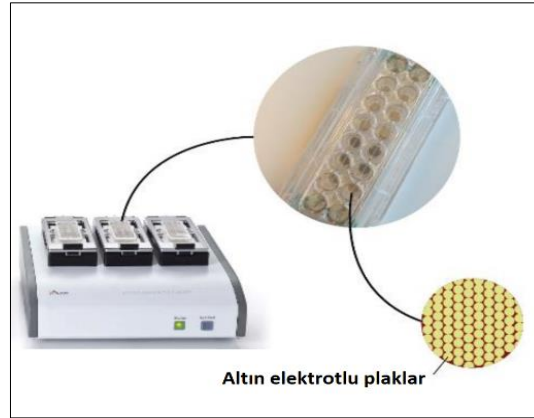
Sisteme ait olarak tasarlanan 96'lı E-plate içerisine her bir kuyucuk için 200 μ L hücre kültür ortamının hacmine 1×10^4 hücre denk gelecek şekilde 96'lı E-plate'e hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler, 24 saat boyunca 37°C'de, %5'lik CO₂ içeren ortamda gerçek zamanlı görüntülendi ve 24. saatinde 96'lı E-plate içerisindeki tüm kültür ortamı çekilerek ilaçlara yönelik farklı konsantrasyonlar uygulandı. Hücrelerin 48 saat boyunca, her 15 dakikada bir hücre indeksi ölçümü alındı.

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi, hücrenin empedans ölçümüne dayanan bir analiz yöntemidir. **Şekil 5.2.3'**de Empedans Temelli Hücre Görüntülemesi gösterilmiştir Sisteme ait plakada her bir kuyucukta yer alan opak mikroelektrotlar her bir kuyucuktaki hücre çoğalmasını detekte ederek akımdaki değişime bağlı olarak gerçek zamanlı olarak hücre ölçümünün zamana bağlı grafiğini vermektedir.



Şekil 5.2.3. Empedans Temelli Hücre Görüntülemesi

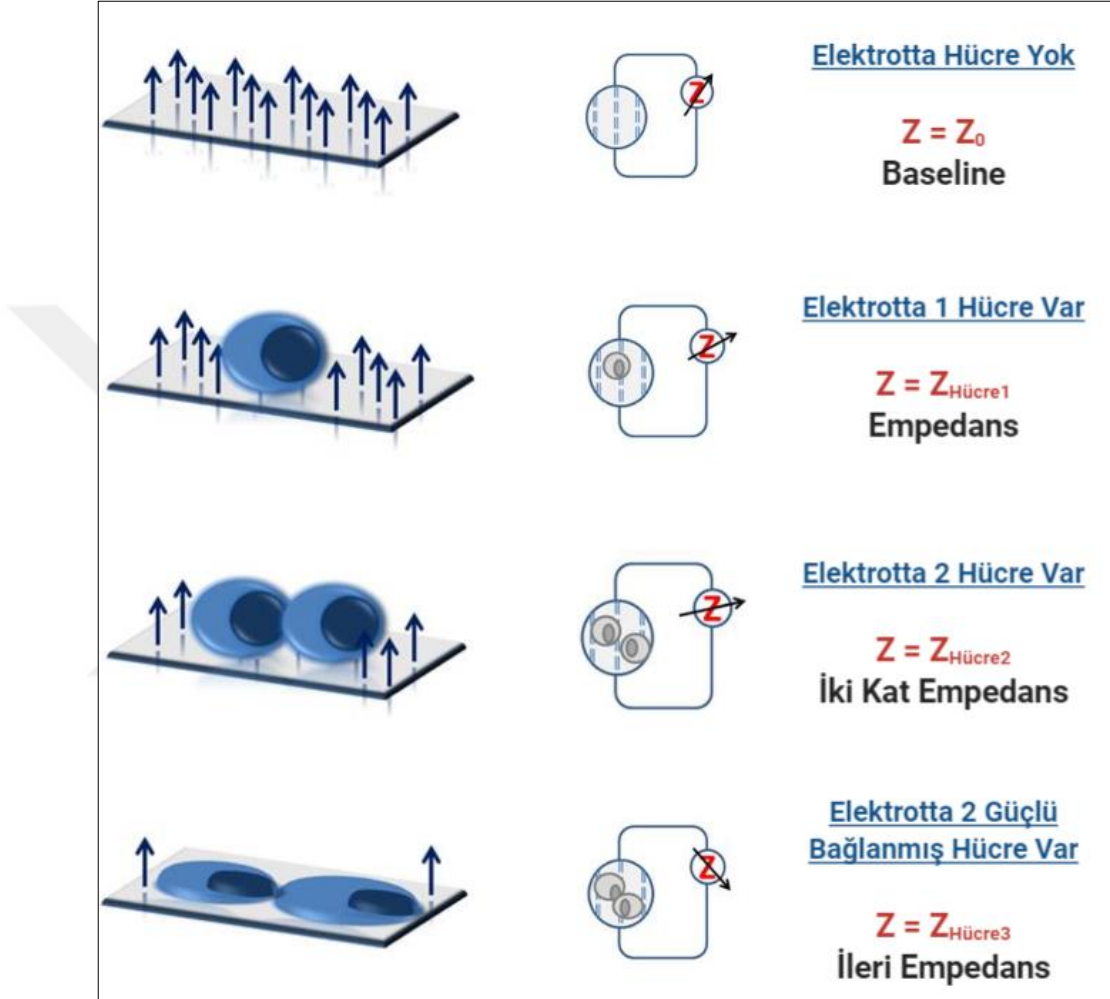
Sistemin plakalarına hücre eklenmeden önce kültür ortamı üzerinden, plakada yer alan mikroelektrotlar (**Şekil 5.2.4**) arasında elektrik akımı aktifken sisteme hücrelerin eklenmesi ile hücreler elektrotlar üzerine yapışıp çoğalmaya başlarlar ve nihayetinde elektrik akımı engellenir. Burada hücrenin empedans ölçümüne göre hücre sayısı analiz edilir.



Şekil 5.2.4. Plakalarda Yer Alan Altın Elektrotların Gösterimi

Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesi ve zamana bağlı olarak grafiklenmesi sistemden otomatik olarak aktarılmaktadır. **Şekil 5.2.5**'te

Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesinin empedansa etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.2.5. Mikroelektrotlar üzerinde hücre yayılması ile değişen akımın ölçülmesi

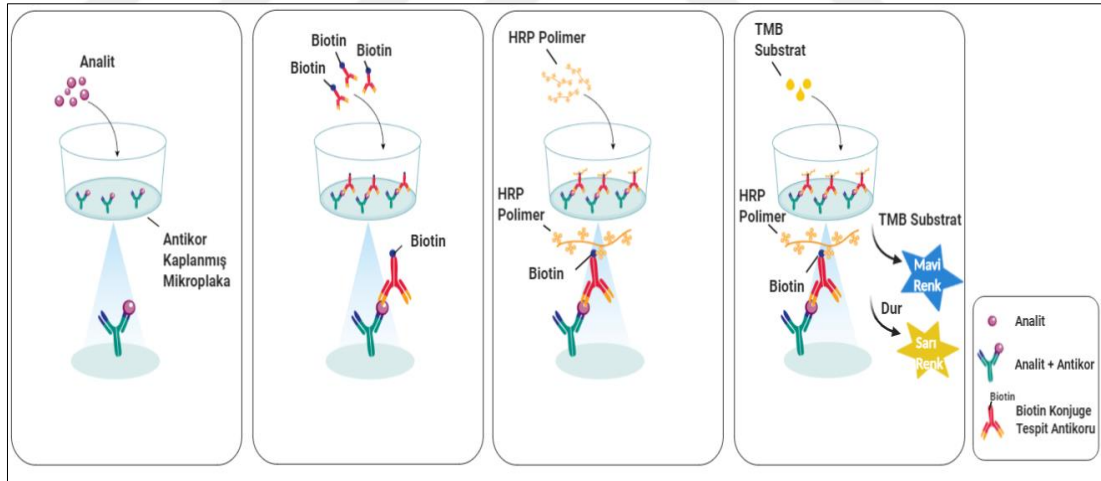
Hücre canlılığı grafiği, hücrelerin kullanılan moleküle verdiği yanıtı dayalı olarak yüzde büyüme oranı kullanılarak sunulacaktır. Yüzde büyüme oranı, ilaç/molekül ilave edilmemiş kontrol ve deneyin sıfır noktasındaki hücre sayılarının oranı kullanılarak tespit edilmiştir. Deneyin başındaki sıfır zamanı (time zero, Tz) kontrol (C), ve bileşiklerin bulunduğu konsantrasyonlarda yapılan ölçüm (Ti) değerleri kullanılarak inhibisyon oranı yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

IC50 değeri: $[(Ti - Tz) / Tz] \times 100 = -50$ formülü kullanılmıştır.

Microsoft Excel Programı aracılığıyla uygulanan doza karşı % hücre sitotoksosite eğrisi çizilerek, hücrelerde canlılığın %50 oranında inhibe edildiği IC50 değeri hesaplandı.

5.2.4 Asetil KoA Eliza Analizi

Asetil CoA seviyesinin belirlenmesi için Human Acetyl-CoA ELISA Kit kullanarak ölçüm yapıldı. Asetil KoA seviyesinin ölçümü, enzime bağlı sandviç immün-sorbent tahlil teknolojisine dayanmaktadır. İki antikorun aynı protein üzerindeki farklı epitoplara tanınmasıyla yüksek hassasiyette sonuç verebilen bu teknolojiye, test kitinde yer alan 96 kuyucuklu plakalara anti-Asetil-KoA antikorları önceden kaplanarak hazır hale getirilmiştir. Analit (tespit edilecek numune), antikor ile kaplanmış mikropalakaya aktarıldıktan sonra, antikorun (yakalama antikor) uygun bölgesinden tutunur. Testte, Biotin konjuge anti-Asetil-KoA antikorları, tespit antikorları olarak kullanılmaktadır. Testin çalışma prensibi Şekil 5.2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 5.2.6. Asetil KoA Eliza Analizi Çalışma Prensibi

Hücre lizatlarının hazırlığı için yapışık hücreler için önerilen ön işlem basamağı uygulanmıştır. Hücre kültüründe büyüyen hücreler, %80-%90 yoğunluğa erişince hücre kültür ortamı çekilerek, ardından hücrelere taze kültür ortamı eklenmiştir. Memeli hücrelerinden proteini etkili bir şekilde lize edip ve çıkarmak için kitin bu ön işlem için önerdiği RIPA Lysis Buffer kullanılmıştır. Ön işlemin ardından kit protokolünde

belirtildiği gibi dilüsyonlar yapılarak Standartlar, spesifik gruplara ait hücre lizatları ve biotin konjuge edilmiş tespit antikoru kuyucuklara eklenerek ve kit prosedüründe belirtildiği gibi yıkamaların gerçekleştirilmesi ile bağlanmamış konjugatların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Asetil KoA ölçümü için deney planı tasarımı

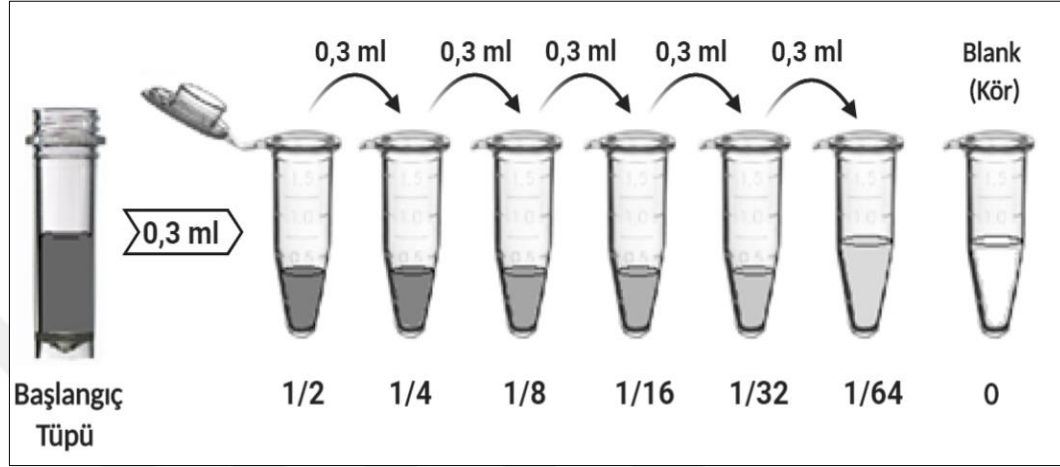
Şekil 5.2.7’de gösterilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MCF-7 Hücre Hattı						MDA MB 231 Hücre Hattı					
A	LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	Ptero- stilben	Ptero- stilben	Ptero- stilben + LDH- A İnh.	Ptero- stilben + LDH- A İnh.	LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	Ptero- stilben	Ptero- stilben	Ptero- stilben + LDH- A İnh.	Ptero- stilben + LDH- A İnh.
B	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
C	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
D	(+) Kontrol	(+) Kontrol	Std. 7	Std. 7	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(+) Kontrol	(+) Kontrol	Std. 7	Std. 7	(-) Kontrol	(-) Kontrol

Şekil 5.2.7. Asetil-KoA Ölçümü için Deney Planı

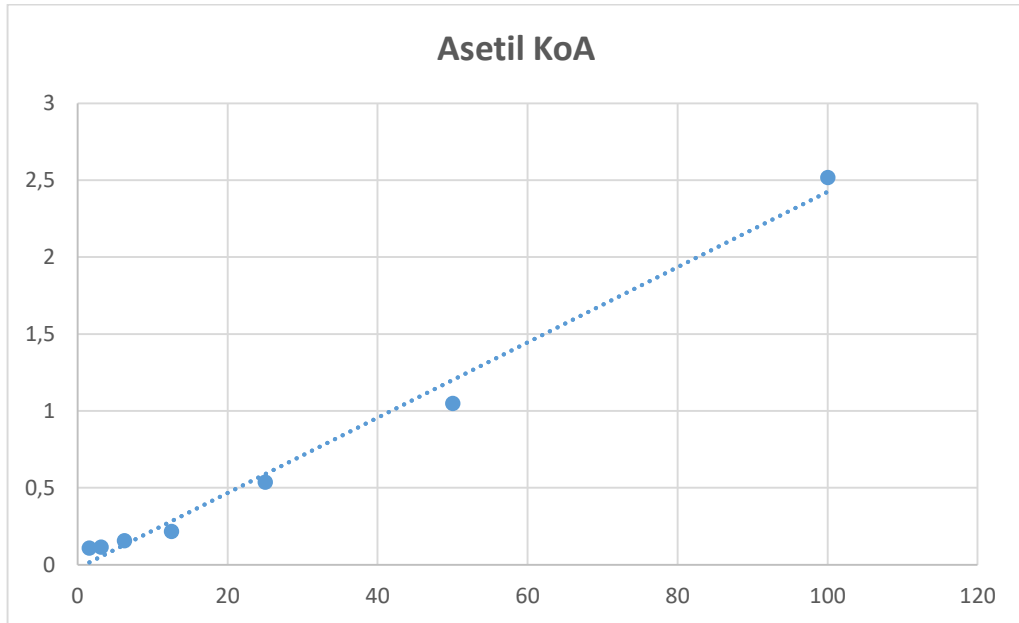
İkinci bir Biotin konjuge antikor (tespit antikor) eklenir ve yakalanan analite bağlanır. Bağlanmamış tespit antikorunu yıkanır. Streptavidin-HRP Polimeri, tespit antikoruna bağlanmak için kullanılır. Bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanır. Kuyucuklara tetrametilbenzidin (TMB) substrat solüsyonu eklenir. TMB, asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli bir ürün üretmek için HRP ile katalizlenmektedir. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra sarı rengin oluşması sağlanmıştır. Sarı rengin yoğunluğu, plakada yakalanan Asetil KoA örnek miktarıyla doğru orantılıdır. Absorbansın 450nm’de ölçülmesinin ardından örneklerde mevcut olan

Asetil KoA konsantrasyonu standartlar aracılığı ile elde edilen kalibrasyon eğrisi aracılığı ile hesaplanmıştır. Asetil KoA standartların hazırlanışı Şekil 5.2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 5.2.8. Asetil-KoA Standartlarının Hazırlanışı

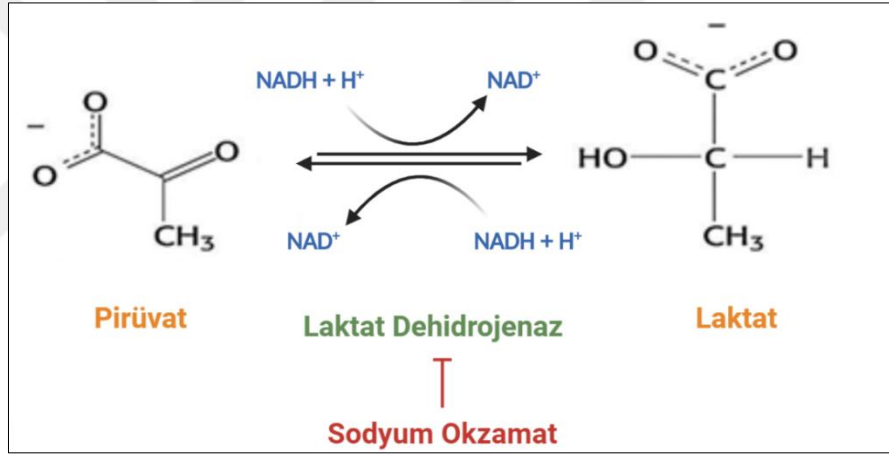
Asetil Koenzim A Eliza Testi için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 5.2.9).



Şekil 5.2.9. Asetil KoA Kalibrasyon Eğrisi

5.2.5 Laktat Analizi

Laktat dehidrojenaz hayvanlarda, bitkilerde ve prokaryotlarda bulunan, piruvatın laktata dönüşümünü katalize eden, çift yönlü çalışabilen bir enzimdir. Laktat dehidrojenaz, piruvatın laktata dönüşümünü katalize ederken, NADH'ı NAD⁺'a dönüştürerek hücre için sağlanması gereken NAD⁺'ları geri kazanmış olur. Reaksiyon çift yönlü gerçekleşebilen bir reaksiyon olduğundan aynı zamanda Laktat Dehidrojenaz, Laktat'ın Piruvata oksidasyonunu da katalize eden bir hidrojen transfer enzimidir. L(+)- Laktat, insan ara metabolizmasında oluşan başlıca laktat stereoizomeridir. L(+)- Laktat, kanda 1-2 mmol / L seviyelerinde bulunur.



Şekil 5.2.10. Laktat Dehidrojenaz'ın Sodyum Oxamat aracılığıyla İnhibisyonu

Her iki hücre hattındaki spesifik gruplara uygulanan Pterostilben, Laktat Dehidrojenaz inhibitörü (Sodyum Oxamat) ve her iki molekülün de IC₅₀ konsantrasyonları baz alınarak hazırlanan kombinasyonlu dozlarının uygulandığı örneklerde, Laktat metabolizması hakkında bilgi sahibi olabilmek için Pirüvat'ın Laktat'a dönüşümüne bakılmıştır. Pirüvat'ın Laktat'a indirgendiği bu reaksiyonda NADH, NAD⁺'a oksitlenir.

Laktat Dehidrojenazın, Sodyum Oxamat aracılı inhibisyonuyla NADH'ın NAD⁺'a dönüşümünün azalması sonucuyla zamanla azalan ve inhibe olan Laktat miktarı kolorimetrik yöntemle ölçülecektir. Laktat Dehidrojenaz'ın Sodyum Oxamat aracılığıyla İnhibisyonu Şekil 5.2.10'da gösterilmiştir.

Çalışma için önceden belirlenen spesifik gruplara moleküllerin uygulamasını takip eden 48. saat sonunda Laktat oluşumuna ilişkin analizler gerçekleştirilmiştir. Laktat Ölçümü için Deney Planı **Şekil 5.2.11**'de gösterilmiştir. Laktat ölçümü için Lactate Assay Kit (MAK064) kullanılmıştır. Lactate Assay Kit'te laktat konsantrasyonu enzimatik yöntemeye dayalı olarak, numunedeki laktat varlığına göre açığa çıkacak rengin şiddetinin 470 nm'de okunması prensibine dayanmaktadır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MCF-7 Hücre Hattı						MDA MB 231 Hücre Hattı					
A	LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	Ptero-stilben	Ptero-stilben	Ptero-stilben + LDH-A İnh.	Ptero-stilben + LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	Ptero-stilben	Ptero-stilben	Ptero-stilben + LDH-A İnh.	Ptero-stilben + LDH-A İnh.
B	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
C	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
D	(+) Kontrol	(+) Kontrol	(+) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(+) Kontrol	(+) Kontrol	(+) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(-) Kontrol

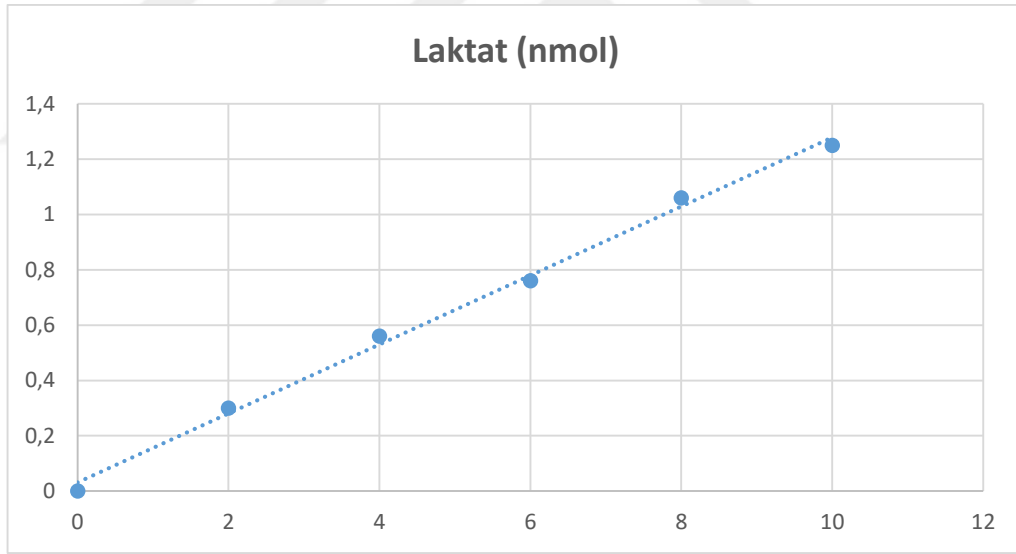
Şekil 5.2.11. Laktat Ölçümü için Deney Planı

Bunun için her bir deney grubuna ait hücre lizatlarından 50 µl alınmıştır. Standartlar için kit protokolünde belirtilen şekilde dilusyon işlemleri yapılmıştır. Kitten çıkan 100 nmol / mL Laktat standardının 10 µl 'sini alınarak, 990 µl Lactate Assay Buffer ile dilue ederek 1 nmol / µl konsantrasyonunda standart çözelti elde edilmiştir. 1 nmol / µl konsantrasyonunda standart çözeltiden 96 kuyulu plakanın standartlar için ayrılan her bir kuyusuna 0 (blank), 2, 4, 6, 8 ve 10 µl Laktat Standardı eklenerek hacim 50 µl'ye Lactate

Assay Buffer ile getirilmiştir. Her bir kuyudaki standartların konsantrasyonu: 0-2-4-6-8 ve 10 nmol olacak şekilde kit protokolünde belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Standartlardan yararlanarak standart eğri grafiği çizdirilmiştir.

Örneklerin hazırlık aşamasında kit prosedüründe belirtilen dilüsyon ve önerilen deproteinizasyon işlemleri yapıldı. Her örnekten 50 µL alınıp, üzerine 50 µL ana reaksiyon karışımı (Lactate Assay Buffer- 46µL; Lactate Probe 2µL; Lactate Enzyme mix- 2µL) eklendi. Yatay bir çalkalayıcı kullanarak reaksiyon 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sırasında plakayı ışıktan korumaya özen gösterildi. 450 nm’de absorbans okuması gerçekleştirildi. Çizdirilen standart eğriden faydalanılarak Laktat konsantrasyonları hesaplandı.

Laktat Analizi için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 5.2.12).



Şekil 5.2.12. Laktat Kalibrasyon Eğrisi

5.2.6 ADP/ATP Translokaz ELİZA Analizi

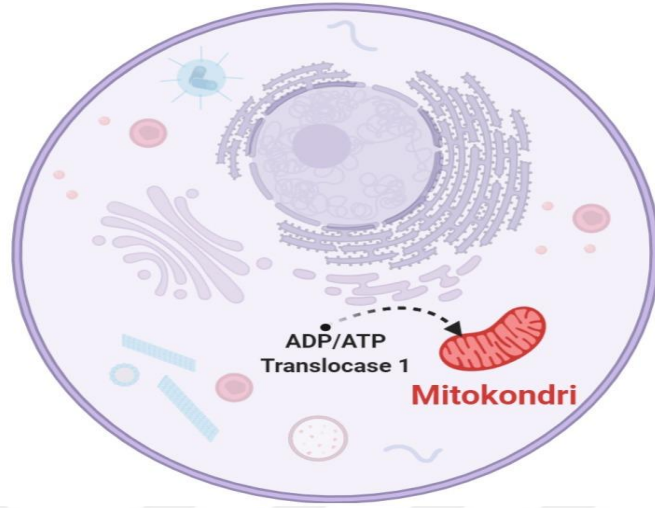
ADP/ATP translokaz analizi için Human SLC25A4(ADP/ATP translocase 1) ELISA Kiti kullanarak ölçüm yapıldı. Yöntemin ölçüm prensibi, sandviç enzime bağlı immün-sorbent tahlil teknolojisine dayanmaktadır. Yöntem, iki antikorun aynı protein üzerindeki farklı epitoplara tanınmasıyla yüksek hassasiyette sonuç vermektedir. Ölçüm için ‘ADP/ATP

translocase 1' proteini kullanılmıştır. ADP/ATP translocase 1 proteini, mitokondriyal ADP/ATP taşınmasında rol oynar ve sitoplazmik ADP'nin mitokondriyal iç zar boyunca mitokondriyal ATP ile değişimini katalize eder. **Şekil 5.2.13**'te proteinin hücre içinde yerleşimi gösterilmiştir.

Aerobik solunum yapan ökaryotik hücrelerde, yüksek enerjili ATP metaboliti, oksidatif fosforilasyon sürecini takiben esas olarak mitokondri içinde üretilir (Clémençon, Babot, & Trézéguet, 2013). Adenin nükleotid translokaz olarak da adlandırılan mitokondriyal ADP/ATP taşıyıcısı (ANC), ökaryotik hücrelerde en önemli taşıma faaliyetlerinden birini gerçekleştirir, ADP'yi ATP sentezi için mitokondriyal matrise aktarır ve ATP'yi hücrenel aktivite için sitoplazmaya ihraç eder (Ruprecht & Kunji, 2019).

ANC, iç zar proteinlerinin % 10'unu temsil ettiği için en bol bulunan mitokondriyal proteinlerden biridir. ANC, dört farklı gen tarafından kodlanır: SLC25A4 (ANC1 veya ANT1 olarak da bilinir), SLC25A5 (ANC3 veya ANT2), SLC25A6 (ANC2 veya ANT3) ve SLC25A31 (ANC4 veya ANT4). Eliza analizinde çalışılan SLC25A5 proteini, dört farklı gen tarafından kodlanan mitokondriyal ADP/ATP taşıyıcısının bir tanesini sentezinden sorumlu olan proteindir. Bu zar proteininin herhangi bir eksikliği veya disfonksiyonu, hücre metabolizması üzerinde ciddi sonuçlara yol açar. İnsan ANC kusurları, transkripsiyonel veya translasyonel deregülasyon veya protein inaktivasyonundan kaynaklanabilir. ANC ekspresyonunun modifikasyonu; miyopati, ensefalopati, miyoklonik epilepsi, laktik asidoz, felç benzeri ataklar ve Kearn-Sayre Sendromu'nda tanımlanmıştır. Benzer şekilde, mitokondriyal fosfat taşıyıcılarının eksiklikleri şiddetli neonatal laktik asidoz, hipertrofik kardiyomiyopati ve genel kas hipotonisi ile sonuçlanmaktadır.

Test, ADP/ATP translokaz 1'in saptanması için yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. (<https://www.uniprot.org/uniprot/P12235>).



Şekil 5.2.13. ADP/ATP Translokaz 1'in hücre içi yerleşimi

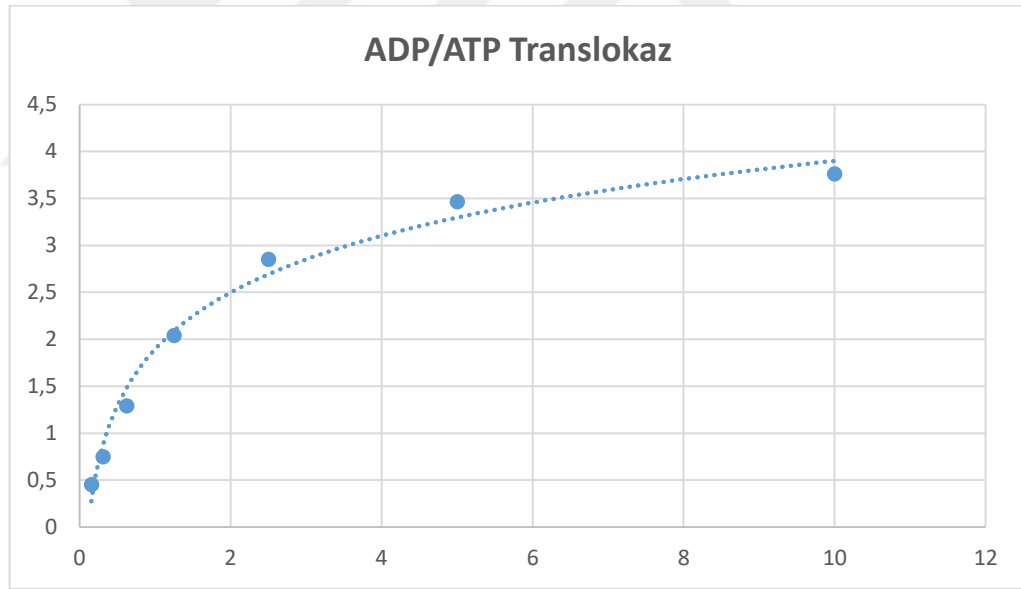
ADP/ATP translokaz analizi için tüm materyaller, kit protokolünde belirtilen şekilde hazırlandı. Tüm standartlar, örnekler ve blank çift olacak şekilde çalışıldı. ADP/ATP translokaz ölçümü için deney planı tasarımı Şekil 5.2.14'te gösterilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MCF-7 Hücre Hattı						MDA MB 231 Hücre Hattı					
A	LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	Ptero - stilben	Ptero - stilben	Ptero - stilben + LDH-A İnh.	Ptero - stilben + LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	LDH-A İnh.	Ptero - stilben	Ptero - stilben	Ptero - stilben + LDH-A İnh.	Ptero - stilben + LDH-A İnh.
B	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
C	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
D	(+) Kontrol	(+) Kontrol	Std. 7	Std. 7	(-) Kontrol	(-) Kontrol	(+) Kontrol	(+) Kontrol	Std. 7	Std. 7	(-) Kontrol	(-) Kontrol

Şekil 5.2.14. ADP/ATP Translokaz Ölçümü için Deney Planı

Benzer çalışma prensibine sahip Asetil-KoA ölçümünde de olduğu gibi ADP/ATP translokaz ölçüm hazırlığı öncesinde de, hücre lizatlarının hazırlığı için yapışık hücreler için önerilen ön işlem basamağı uygulandı. Hücre kültüründe büyüyen hücreler, %80-%90 yoğunluğa erişince hücre kültür ortamı çekilerek, ardından hücrelere taze kültür ortamı eklenmiştir. Memeli hücrelerinden proteini etkili bir şekilde lize edip ve çıkarmak için kitin bu ön işlem için önerdiği RIPA Lysis Buffer kullanılmıştır. Ön işlemin ardından kit protokolünde belirtildiği gibi dilüsyonlar yapılarak 'ADP/ATP translocase 1' miktarı, absorbansın 450nm'de ölçülmesinin ardından standartlar aracılığı ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır.

ADP/ATP Translokaz Eliza analizi için kalibrasyon eğrisi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 5.2.15).



Şekil 5.2.15. ADP/ATP Translokaz Kalibrasyon Eğrisi

5.2.7 Total Antioksidan Kapasitesi (TAK)

Bu ölçüm sayesinde kemoterapötik aracılı oksidatif stres hakkında yorum yapılabilmesi için ortamdaki antioksidan kapasitesi hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır. Numunelerdeki TAK düzeyleri Erel tarafından geliştirilen yöntemle ölçülmüştür (Erel,

2004). Bu yöntemin prensibinde; Tampon çözelti varlığında ortam pH'sının sabit tutulması ile ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) reaktifi hidrojen peroksit ile radikal hale getirilir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan çözelti kendine özgü koyu yeşil-lacivert arası bir renge sahiptir. Bu çözeltiliye, hücre lizatlarının ilave edilmesi ile, numuneler içerisindeki antioksidanlar mevcut ABTS radikallerini nötralize eder. Nötralizasyon işleminin gerçekleşmesi ile birlikte çözeltinin de rengi açılır. Dolayısıyla ölçülen numuneler içinde bulunan total antioksidan miktarı ile çözeltinin renk şiddeti orantılıdır. Standartların ve numunelerin absorbansı 658 nm'de köre karşı ölçülür. Standart olarak kullanılan çözeltinin Absorbans-Molarite verilerini kullanılarak; hücre lizatlarındaki total antioksidan molaritesi hesaplanır.

Kullanılan Reaktifler:

Reaktif 1: 0.4 Molar Asetat tamponu (pH:5.8)

Reaktif 2: 30mM Asetat Tamponu (pH:3.6); 10mM ABTS Reaktifi +1000ml için 278 µL H₂O₂; %10 Etilen glikol

(Her iki reaktif karıştırılıp 24 saat bekletildikten sonra kullanılır)

Standart: 0.1 Molar (pH:8) Tris tamponu içinde 1mM Potasyum heksosiyanoferat (C₆FeK₃N₆)

5.2.8 Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Total oksidan seviyesi analizi ile ortamdaki oksidan seviyesi hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır. Hücre lizatlarına Pterostilben, Sodyum Oxamat ve Pterostilben/Sodyum Oxamat kombinasyonlarının uygulamasının akabinde ortamdaki oksidatif stres hakkında yorum yapılabilmesi sağlanmıştır. Numuneler içindeki total oksidan ölçümü, Erel tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemle yapılmıştır (Erel, 2005).

Yöntemin prensibi şu şekildedir: Fe₂SO₄'nin suda çözünmesi ile Fe²⁺ açığa çıkar. Hazır hale getirilmiş hücre lizatlarında bulunan oksidanlar, Fe²⁺'nin Fe³⁺'e yükseltgenmesini sağlar. 1 numaralı reaktif solüsyonunun içindeki X-orange reaktifi Fe³⁺ ile birlikte renkli

bir kompleks oluşturur. Oluşan rengin şiddeti; numunelerin içindeki total oksidan miktarı ile orantılıdır. Standartların ve numunelerin absorpsiyonları 658 nm’de köre karşı ölçülür. Standart olarak kullanılan çözeltinin Absorbans-Molarite verilerini kullanılarak; numunenin total oksidan molaritesi hesaplanır. Total antioksidan kapasite birimi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ olarak tanımlanmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

Reaktif 1: 140mM NaCl; 25mM Sülfürik asit; Fox solüsyonu içine 150mM D-Sorbitol ve 250 μM X-orange

Reaktif 2: Fox solüsyonu içine 10mM 4-Hidroksibenzoik asit ve 5mM Amonyum Fe_2SO_4

Standart: 20 μM H_2O_2

5.2.9 Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres indeksinin hesaplanması için; TAK’ın birimi $\mu\text{mol Trolox ekivalent/L}$ ’ye çevrilir ve aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi hesaplanır.

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalent / L})}{\text{TAK } (\mu\text{mol Trolox ekivalent / L})} \times 100$$

Oksidatif Stres İndeksi=TOS/TAS olarak hesaplanmıştır;

OSİ Referans Aralığı:0-3’tür.

Numunedeki oksidatif stres indeksi, örneklerin TOS düzeylerinin toplam antioksidan seviyesi oranına yüzdesi olarak belirtilir. Hesaplama öncesi TAK testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi mikromol birimine çevrildi ve 100 ile çarpılarak bulundu.

$$\text{OSİ} = \text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalent / L}) \times 100 / \text{TAK } (\mu\text{mol Trolox ekivalent / L})$$

5.2.10 Metabolik Akış Analizi

Kanser hücreleri, metabolik fenotiplerini değiştirebilen hücreler oldukları için substrat tercihlerini de değiştirme eğilimindedirler. Glutamin metabolizmasını arttırabilen kanser hücreleri, lipid metabolizmasını da değiştirebilirler ya da anabolik/katabolik süreçler arasındaki dengeyi kaydırabilirler. Genler, substratlar ve fenotipler arasındaki etkileşimde metabolik süreci altın standart yöntemle gerçek zamanlı ölçebilen ve biyoenerjitik akışlar hakkında çıktı sunabilen metabolik akış sisteminden (Seahorse XF⁹⁶ Bioscience, Agilent) yararlanıldı. Kanser hücrelerinin oksijensiz solunuma ya da mitokondriyal solunuma doğru geçiş gösterdiği değerleri sistemde sağlayan OCR değerleri ile bazal solunum, ECAR değerleri aracılığıyla da glikoliz hakkında bilgi sahibi olundu. Kullanılacak metabolik akış sistemi Şekil 5.2.16'da gösterilmiştir.



Şekil 5.2.16. Metabolik Akış Analizi

Metabolik akış sisteminde metabolik modölatörler olarak sırasıyla; D-Glukoz, Oligomisin, Karbonil siyanür-4 fenilhidrazon (FCCP), Antimisin A ve Rotenon kullanıldı. Rotenon, mitokondriyal kompleks 1 inhibitörüdür. Antimisin A, mitokondriyal kompleks

3 inhibitörüdür. Oligomisin, mitokondriyal kompleks 5 (ATP Sentaz) inhibitörüdür. FCCP, oksidatif fosforilasyon ayrıştırıcısıdır. Çalışmada kullanılan metabolik modülatörler, sisteme özgü tasarlanan ticari olarak temin edilen kitlerden kullanıldı.

Deneyde, MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin Pterostilben ve LDH-A inhibitörüne ayrı ayrı ve kombinasyon olarak yanıt olarak gösterdiği biyoenerjistik akışlar Seahorse XF⁹⁶ Extrasellüler akış analizörü ile değerlendirildi.

Hücreler, aşağıda belirtilen ajanlarla 48 saat boyunca IC50 dozlarında muamele edildi.

MCF-7 hücreleri için, pozitif kontrol olarak 16,9 µM Taxol, sadece Pterostilben grubu için 40 µM, sadece LDH-A grubu için 60 mM ve kombine grup için; 40 µM Pterostilben ve 30 mM LDH-A inhibitörü kullanıldı.

MDA-MB-231 hücreleri için, pozitif kontrol olarak 16,9 µM Taxol, sadece Pterostilben grubu için 95,6 µM, sadece LDH-A grubu için 76 mM ve kombine grup için; 95,6 µM Pterostilben ve 38 mM LDH-A inhibitörü kullanıldı. Her bir deney grubu 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

Deneylere başlamadan önce Agilent Seahorse XF⁹⁶ sensör kartuşu, XF⁹⁶ kalibratör içerisinde gece boyunca CO² içermeyen inkübatörde 37°C'de nemlendirildi. Hücre hatları, uygun hücre kültürü ortamı kullanılarak istenilen hücre yoğunluğunda (MCF-7 için; 2x10⁴ hücre/100 µl; MDA-B-231 için 15x10³ hücre/100 µl) Agilent Seahorse XF⁹⁶ plak içerisine ekildi. Kültür ortamının buharlaşmasını önlemek için plak haznelere 200µl steril dH₂O eklendi. Deney günü, 96'lı plakada problemleri nemlendirmek amacıyla eklenen steril dH₂O her bir kuyudan çekilerek, yerine 37°C de 1 gece bekletilen XF kalibratör sıvısı pipetlendi.

Agilent Seahorse XF⁹⁶ plak 37°C'lik inkübatörden çıkarılarak kültür ortamının sadece 20µl'si kalacak şekilde tüm ortam pipetle çekildi ve hazırlanan bazal ortam (1mM piruvat, 2mM glutamin ve 10mM glukoz, pH:7,4) ile hücreler yıkanarak ortam değiştirildi. Her bir kuyu için son hacim 180 µl olacak şekilde bazal ortam ile tamamlandı. Deneylere başlamadan önce plate 1 saat boyunca CO² içermeyen 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi.

Glikoliz, glikolitik kapasite, glikolitik rezerv ve non-glikolitik asitlik ölçmek için Glukoz, Oligomisin ve 2-DG modölatörleri mini enjeksiyon kuyularına yüklendi. Mitokondriyal fonksiyon için ise, Oligomisin, Karbonil siyanür-4 fenilhidrazon (FCCP), Rotenon ve Antimisin gibi solunum modölatörleri taze olarak hazırlanarak mini enjeksiyon kuyularına yüklendi. Sensör kartuşu cihaza konularak 20 dakikalık kalibrasyon işlemi gerçekleştirildi. Kalibrasyon sonrası 96'lık çalışma plakası cihaza verilerek deney başlatıldı ve ardışık dakikalarda ölçümler alındı.

Sistemde çalışılan test parametreleri aşağıda belirtilmiştir.

5.2.10.1 Glikolitik Stres Kiti

ECAR'ı ölçmek için aç hücrelere glikolizi arttırmak amacıyla glukoz verilir. Glikolizi inhibe etmek için 2-deoksiglukoz (2-DG) kullanılır.

2-DG, heksokinaz tarafından rekabetçi bir fosfoglukozomeras inhibitörü olan 2-deoksiglukoz-6-fosfata dönüştürülür. Oligomisin, ATP sentaz inhibitörüdür. Oksidatif fosforilasyonda ATP sentezini engeller.

Rotenon (kompleks I'e spesifik bir ETC inhibitörü), Antimisin A (kompleks III'e spesifik bir ETC inhibitörü), oligomisin (ATP sentaz inhibitörü) ve ayırıcı ajan 2,4-dinitrofenol (DNP), elektron taşınması, proton gradyanı ve ATP sentezi ile ilgili özel olaylara müdahale etmek için kullanıldı. 2,4-DNP yerine karbonil siyanür-4- (triflorometoksi) fenilhidrazon (FCCP) da kullanılabilir. Çalışmamızda FCCP kullanıldı.

Hücre dışı asitleşme oranı (ECAR) grafiği **Şekil 5.2.17**'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2.17. Hücre dışı asitleşme oranı (ECAR) grafiği

Glikolitik Stres Kitinde, Glikolitik Olmayan Asidifikasyon, Glikoliz, Glikolitik Rezerv ve Glikolitik Kapasite parametrelerine bakıldı.

Glikolitik Olmayan Asidifikasyon:

Glikoliz stres testi, daha önce aç bırakılmış hücrelerde, hücre dışı asitleşme oranının (ECAR) bir temel ölçümü (baseline) ile başlar. Bu hücreler, bazal minimum seviyelerinde olduğundan ve pratik olarak glikolitik olmayan olarak kabul edilebildiğinden, ECAR bu noktada ölçülmüştür. Bu nokta glikolitik olmayan asidifikasyon olarak anılır. Bu asitleşme muhtemelen TCA döngüsünde üretilen solunum CO_2 'in HCO_3^- ve H^+ 'e dönüştürülmesine karşılık gelir.

Glikoliz:

Glikolitik olmayan asidifikasyonu, glikolizi etkinleştirmek için yapılan glikoz enjeksiyonu izler. Glikoliz neticesi laktat oluşumunda artış nedeniyle asidite artar. Bu artış, normal glikoliz oranını temsil eder.

Glikolitik Rezerv:

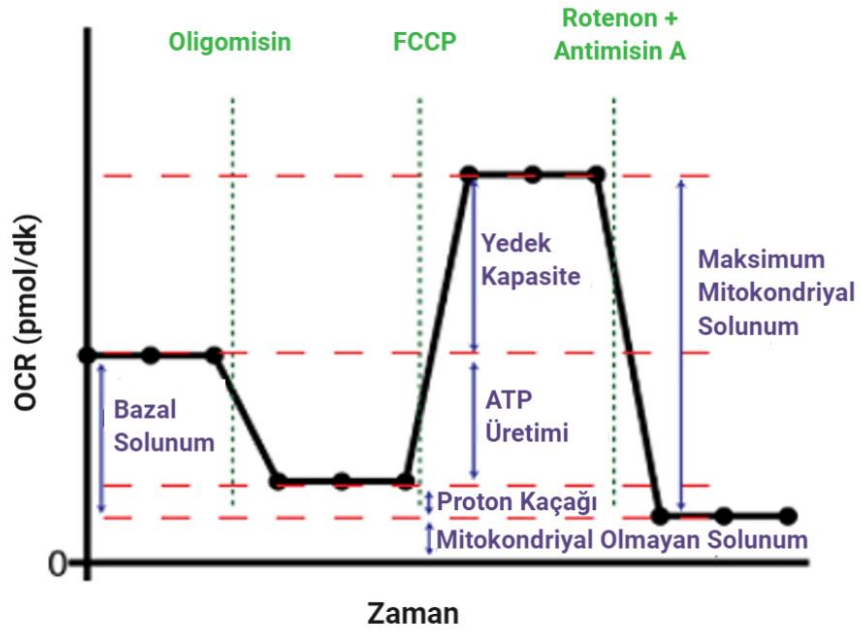
Hücrelere daha sonra oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP oluşumunu engelleyen amacıyla oligomisin enjeksiyonu uygulanır. Hücreler, ATP üretimindeki bu dramatik düşüşe glikolizi maksimum seviyede aktive ederek yanıt verir ve bu, ECAR seviyesinde ikincil bir artışa (glikolitik rezerv) neden olur.

Glikolitik Kapasite:

Test, ECAR'ı glikolitik olmayan seviyeye döndüren glikoz analogu 2-DG kullanılarak glikolizin toplam inhibisyonu ile sonlandırılır. İlginç bir şekilde, üreticinin önerilerinin aksine, maksimum glikolizin mutlaka oligomisin enjeksiyonu ile elde edilmesinin gerekmediği öne sürülmüştür. Yüksek glikolitik kapasiteye sahip hücrelerde, mitokondriyal ATP kaybı durumunda, ATP talebinde önemli bir artış yoksa, glikoliz, yukarı regüle edilmesine gerek kalmadan mükemmel bir şekilde baş edebilir.

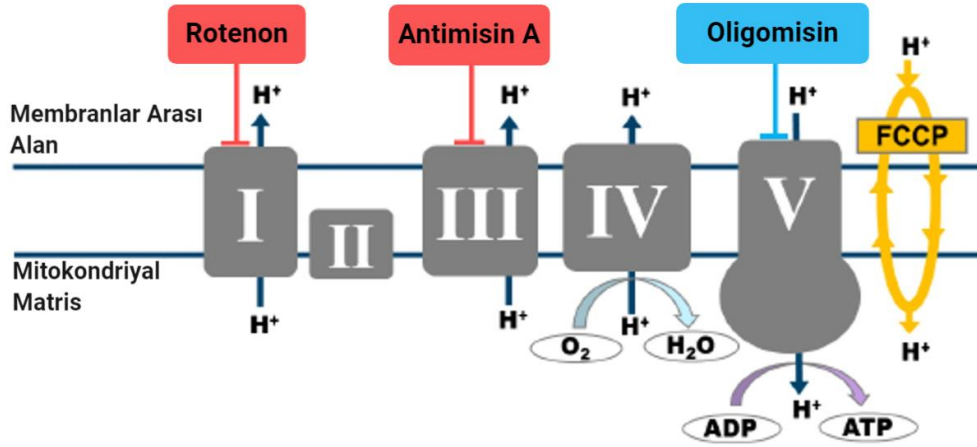
5.2.10.2 Mitokondriyal Stres Kiti

Mitokondriyal stres testi (**Şekil 5.2.18**), aç olmayan hücrelerde oksijen tüketim oranının (OCR) temel ölçümü ile başlar. Bunu, FO / F1 kompleksinden protonların geri dönüşünü engelleyen ve böylece mitokondriyal membranı hızla hiperpolarize eden oligomisin enjeksiyonu izler (**Şekil 5.2.19**). Hiperpolarizasyon, solunum kompleksleri yoluyla daha fazla proton pompalanmasını önler ve solunum hızı düşer.



Şekil 5.2.18. Oksijen Tüketim Oranı (OCR) Ölçüm Grafiği

Kalan solunuma, protonların lipidler veya diğer kanallardan akışını temsil eden proton sızıntısı denir. Bu hiperpolarize durum, bir proton iyonofor gibi davranan ayırıcı ajan 2,4-DNP'(ya da FCCP) nin eklenmesiyle hızla tersine çevrilir. Buna yanıt olarak hücreler, elektron taşıma hızını maksimuma çıkararak zar potansiyelini kurtarmaya çalışır ve bu da OCR'yi artırır. Son olarak, iki ETZ inhibitörünün (antimisin A ve rotenon) eklenmesiyle mitokondriyal solunum tamamen durur ve OCR en düşük seviyesine iner.



Şekil 5.2.19. Elektron Transfer Zinciri (ETZ)'nin Mitokondriyal Stres Test Modülatörleri

Bu seviyede oksijen tüketimi mitokondriyal aktiviteye (mitokondriyal olmayan) bağılı değildir. Bunların oluşturduğu OCR'deki fark inhibitörler, temel solunum ve yedek kapasitenin toplamı olan maksimum mitokondriyal solunum olarak adlandırılır. (https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XFp_Cell_Mito_Stress_Erişim Tarihi: 21.10.2020)

5.2.10.3 Enerji Fenotipi Kiti

Enerji Fenotipi Kiti, hücrelere ilaç/inhibitörler uygulandıktan sonra hücresel enerji fenotipinin glikolitik yola ya da mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemine (OXPHOS) doğru yönelimi OCR ve ECAR parametreleri aracılığıyla verir.

Metabolik akış sisteminde metabolik modülatörler olarak Hücre Enerji Fenotipi Kitinde sırasıyla; Oligomisin, FCCP ve Rotenon / Antimisin kullanıldı. Oligomisin, mitokondriyal kompleks 5 (ATP Sentaz) inhibitörüdür. FCCP, mitokondride oksidatif fosforilasyonun (OXPHOS) bir ayırıcısıdır. ATP sentezini bozan güçlü bir oksidatif fosforilasyon ayırıcısıdır. Rotenon, mitokondriyal kompleks 1 inhibitörüdür. Antimisin A, mitokondriyal kompleks 3 inhibitörüdür.

Stres Durumunda OCR ve ECAR yüzdeleri için kitin önerdiği Metabolik Potansiyel Eşitliği aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Stres OCR (\%)} = \frac{\text{Stres OCR}}{\text{Bazal OCR}} \times 100$$

$$\text{Stres ECAR (\%)} = \frac{\text{Stres ECAR}}{\text{Bazal ECAR}} \times 100$$

5.2.11 Verilerin İstatistiksel Analizinin Yapılması ve Yorumlanması

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ABD) / SPSS version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, United States) kullanılarak gerçekleştirildi. Değerlendirilen parametreler kapsamında farklılıkları değerlendirmek için parametrik olmayan Mann Whitney U testi kullanıldı. Testler 3 bağımsız deneyde tekrar edildi. Metin ve şekillerin sayısal değerleri, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. P değeri ≤ 0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



6. BULGULAR

6.1 Meme Kanser Hücrelerinin Kültür Edilmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde ilaç uygulamalarının yapılabilmesi için ticari olarak satılan meme kanser hücre hatlarından olan MCF-7 (ATCC® HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26) ATCC'den satın alındı. ATCC'de belirtilen kültür koşullarına göre her iki hücre hattı DMEM bazlı hücre kültürü medyumları ile beslenerek ATCC'de belirtilen hücre morfolojilerine uyumlu şekilde mikroskopta gözlenerek sağlıklı büyütüldü.

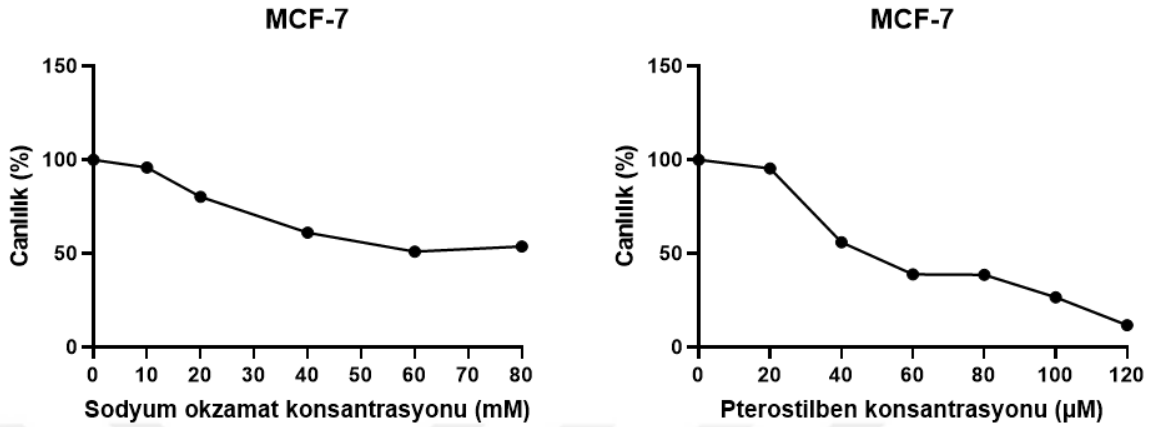
6.2 İlaç Uygulamaları Sonucu IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde ilaç uygulamalarının yapılabilmesi için ilaçların ve kimyasalların öncelikle IC 50 dozları yani *in vitro* kültür edildiği koşullarda hücre canlılığını-sayısını deneyin başlangıcına oranla %50 oranında azaltan ilaç konsantrasyonları belirlendi.

6.2.1 MCF-7 Hücre Hattı

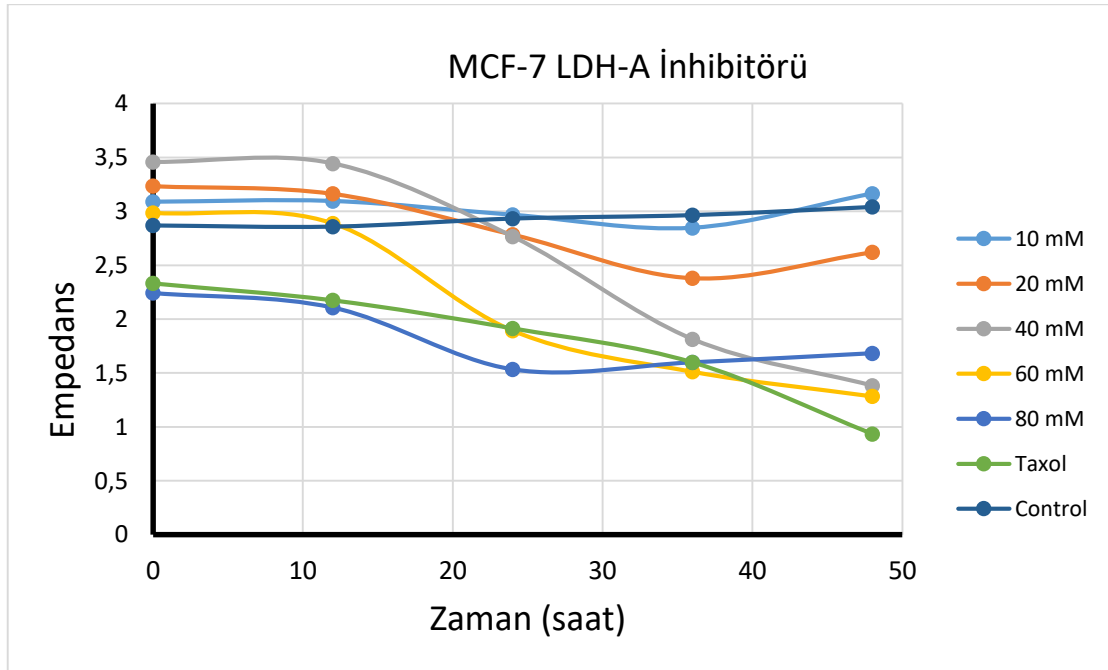
Yapılan Xcelligence denemelerinin sonuçlarına göre MCF-7 hücre hattı için sodyum okzamat IC50 dozu 60 mM, Pterostilben IC50 dozu ise 40 µM olarak bulunmuştur. Kullanılan iki ilacın kombinasyon dozları ise 30 mM LDH-A inhibitörü ve 40 µM Pterostilben'den oluşan ilaç çözeltisidir.

MCF-7 hücre hattı için Pterostilben ve LDH-A inhibitörüne ait canlılık eğrileri **Şekil 6.2.1**'de gösterilmiştir.



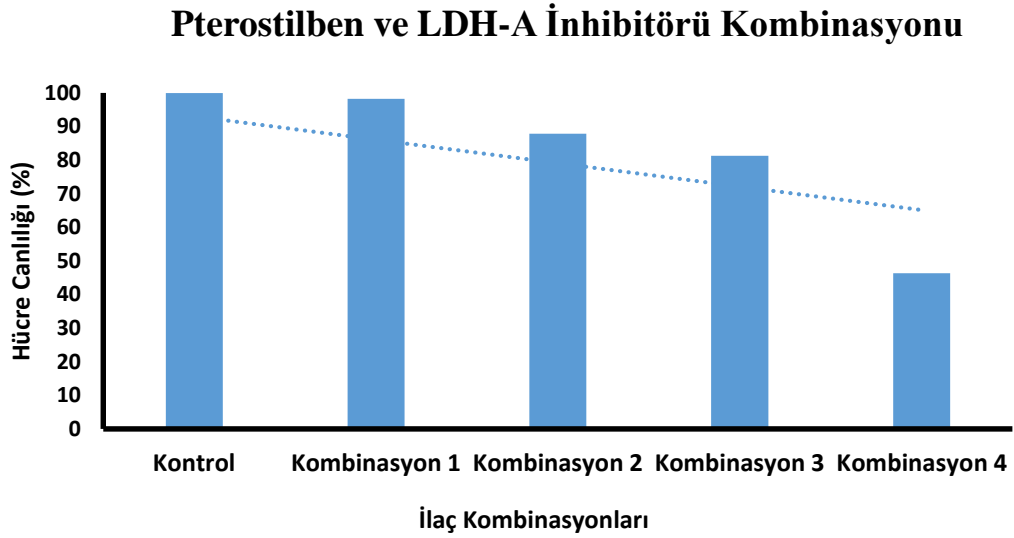
Şekil 6.2.1. MCF-7 için Pterostilben ve LDH-A inhibitörü IC50 Grafiği

MCF-7 hücre hattında, 48 saatlik canlılık verileri incelendiğinde hem Pterostilben hem de LDH-A uygulaması canlılığı kontrole göre azaltmıştır. MCF-7 hücre hattı için LDH-A inhibitörüne ait zamana göre empedans grafiği Şekil 6.2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 6.2.2. MCF-7 için LDH-A İnhibitörü IC50 Grafiği (Empedans)

MCF-7 hücre hattı için Pterostilben ve LDH-A inhibitörü grubuna ait hücre canlılığının farklı konsantrasyonlarda çalışılan ilaç kombinasyon dozlarına göre grafiği **Şekil 6.2.3**'te gösterilmiştir.



Şekil 6.2.3. MCF-7 için Pterostilben ve LDH-A İnhibitörü IC50 Kombinasyon Grafiği

Tablo 6.2.1. MCF-7 için Kombinasyon Dozları

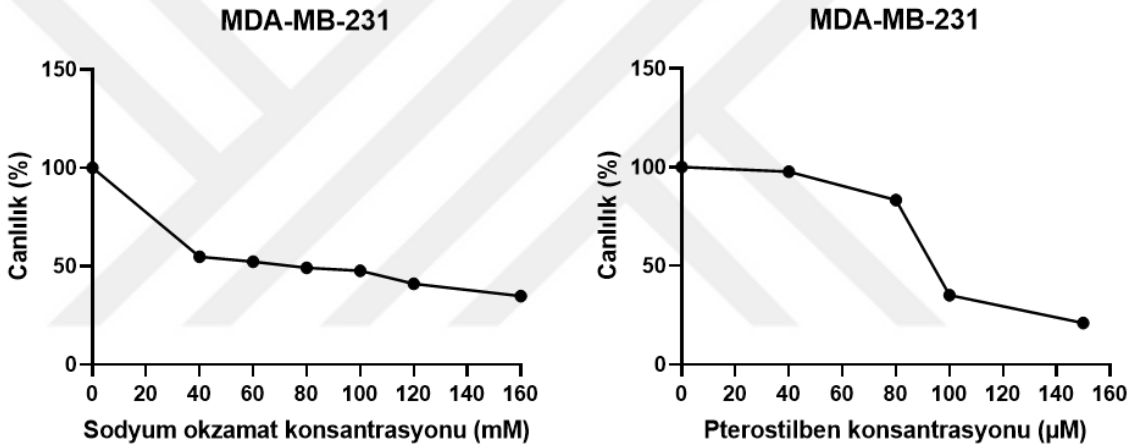
MCF-7 Kombinasyon Grupları	IC50 Dozu		
	LDH-A İnh.		Pterostilben
Kombinasyon 1	15 mM	+	10 µM
Kombinasyon 2	30 mM	+	20 µM
Kombinasyon 3	30 mM	+	40 µM
Kombinasyon 4	60 mM	+	20 µM
Kombinasyon 5	60 mM	+	40 µM

MCF-7 Hücre hattının Kombinasyon grubunda Kombinasyon 3'deki konsantrasyonlar ile çalışılmıştır (**Tablo 6.2.1**).

6.2.2 MDA-MB-231 Hücre Hattı

Yapılan proliferasyon denemelerinin sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücre hattı için sodyum okzamat IC50 dozu 76 mM, pterostilben IC50 dozu ise 95,6 μ M olarak bulunmuştur. Kullanılan iki ilacın kombinasyon dozları ise 38 mM sodyum okzamat (LDH-A inhibitörü) ve 95,6 μ M pterostilbenden oluşan ilaç çözeltisidir.

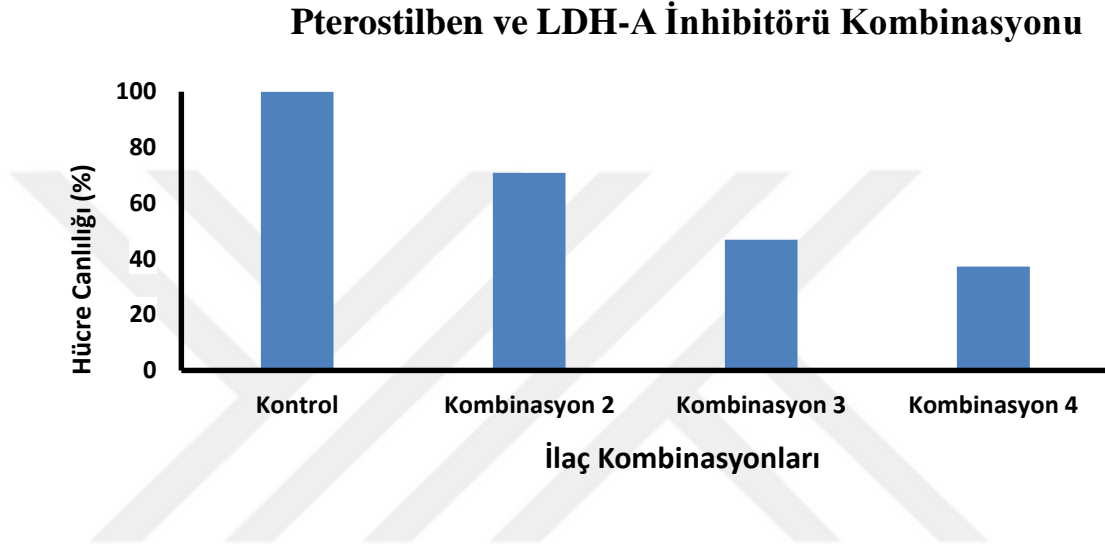
MDA-MB-231 hücre hattı için Pterostilben ve LDH-A inhibitörüne ait canlılık eğrileri Şekil 6.2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 6.2.4. MDA-MB-231 için Pterostilben ve LDH-A İnhibitörü IC50 Grafiği

MDA-MB-231 hücre hattında, 48 saatlik canlılık verileri incelendiğinde hem Pterostilben hem de LDH-A uygulaması canlılığı kontrole göre azaltmıştır.

MDA-MB-231 hücre hattı için Pterostilben ve LDH-A inhibitörü grubuna ait hücre canlılığının farklı konsantrasyonlarda çalışılan ilaç kombinasyon dozlarına göre grafiği Şekil 6.2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 6.2.5. MDA-MB-231 için Pterostilben ve LDH-A inhibitörü IC50 Kombinasyon Grafiği

Tablo 6.2.2. MDA-MB-231 için Kombinasyon Dozları

MDA-MB-231 Kombinasyon Grupları	IC50 Dozu	
	LDH-A İnh.	Pterostilben
LDH-A İnhibitörü	76 mM	+
Pterostilben	-	+
Kombinasyon 1	38 mM	+
Kombinasyon 2	76 mM	+
Kombinasyon 3	38 mM	+
Kombinasyon 4	76 mM	+
Kontrol (Hücre Medyumu)	-	-

MDA-MB-231 Hücre hattının Kombinasyon grubunda Kombinasyon 3'teki konsantrasyonları ile çalışılmıştır (Tablo 6.2.2).

Deneylerde kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki IC50 dozları **Tablo 6.2.3**'te verilmiştir.

Tablo 6.2.3. Deneylerde Kullanılan IC50 Değerleri

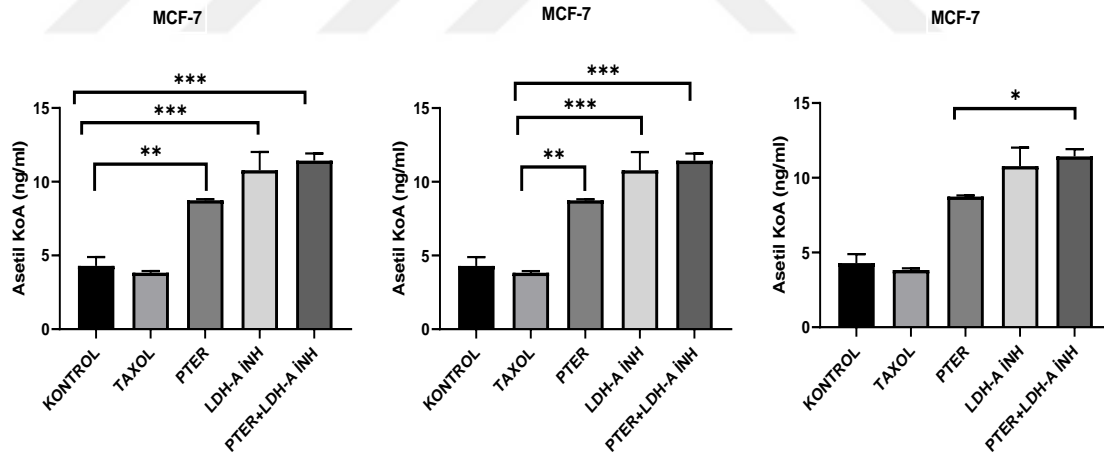
İlaç /Kimyasal	IC50 Dozu	
	MCF-7	MDA-MB-231
Paclitaxel	16,9 µM	16,9 µM
Pterostilben	40 µM	95,6 µM
LDH-A inhibitörü	60 mM	76 mM
LDH-A inhibitörü+ Pterostilben	30 mM + 40 µM	38 mM + 95,6 µM

6.3 Asetil Koenzim A Eliza Analizi Sonucu

MCF-7 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Asetil Koenzim A Eliza Analizinin ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 6.3.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 6.3.1. MCF-7 Hücre Hattında Asetil Koenzim A Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Asetil Koenzim A Eliza Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (ng/ml)
Taxol	3,82 ± 0,08
Pterostilben	8,74 ± 0,06
LDH-A İnhibitörü	10,78 ± 0,88
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	11,44 ± 0,35
Negatif Kontrol	4,29 ± 0,43



Şekil 6.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Asetil Koenzim A'ya Ait Konsantrasyon Grafikleri

MCF-7 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Asetil Koenzim A Eliza sonuçları **Şekil 6.3.1**'de gösterilmiştir. Asetil KoA konsantrasyonlarına bakıldığında Negatif Kontrol 4,29 ng/ml olarak bulundu. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek Asetil KoA değerleri bulundu ($p < 0.05$).

Taxol grubu ile kıyaslandığında, Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek Asetil KoA değerleri bulundu ($p < 0.05$).

En yüksek Asetil KoA değeri tüm gruplara bakıldığında, Pterostilben + LDH-A inhibitörü grubunda ($11,44 \pm 0,35$) görüldü.

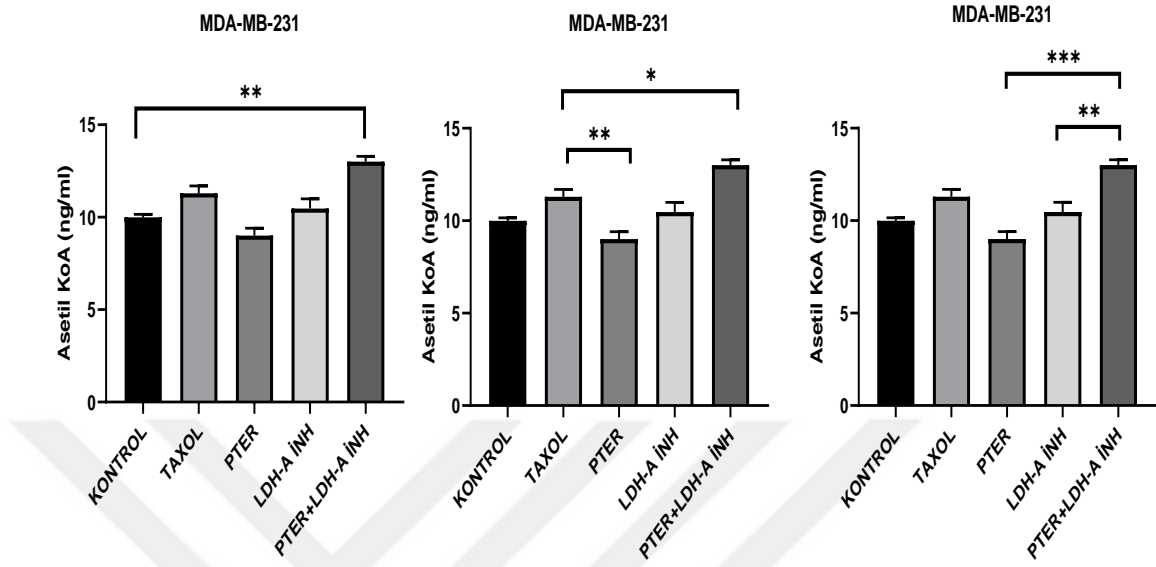
MDA-MB-231 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Asetil Koenzim A Eliza Analizinin ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 6.3.2**'de gösterilmiştir.

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Asetil KoA konsantrasyonlarına bakıldığında Negatif Kontrol 9.99 ng/ml olarak bulundu. Pterostilben grubu (9,01 ng/ml), Taxol grubu (11,29 ng/ml), LDH-A inhibitörü grubu (10,48 ng/ml) ve Pterostilben ve LDH-A inhibitörünün beraber kullanıldığı kombinasyon grubunda ise 13,01 ng/ml olarak Asetil KoA düzeyleri saptanmıştır.

Tablo 6.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Asetil Koenzim A Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Asetil Koenzim A Eliza Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama \pm Standart Sapma (ng/ml)
Taxol	11,29 \pm 0,29
Pterostilben	9,01 \pm 0,29
LDH-A İnhibitörü	10,48 \pm 0,37
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	13,01 \pm 0,20
Negatif Kontrol	9,99 \pm 0,12

MDA-MB-231 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Asetil Koenzim A Eliza sonuçları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (**Şekil 6.3.2**).



Şekil 6.3.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Asetil KoenzimA'ya Ait Konsantrasyon Grafikleri

MDA-MB-231 grubunda Asetil KoA değerlerine bakıldığında kontrole göre Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek değer görüldü ($p < 0.05$). Taxol grubu ile kıyaslandığında Pterostilben grubunda daha düşük, Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek Asetil KoA değerleri saptandı ($p < 0.05$). Pterostilben ve LDH-A inhibitörü ile kıyaslandığında Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek Asetil KoA değerleri görüldü ($p < 0.05$). Tüm gruplara bakıldığında MDA-MB-231 grubunda en yüksek Asetil KoA değeri, Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda ($13,01 \pm 0,20$) görüldü.

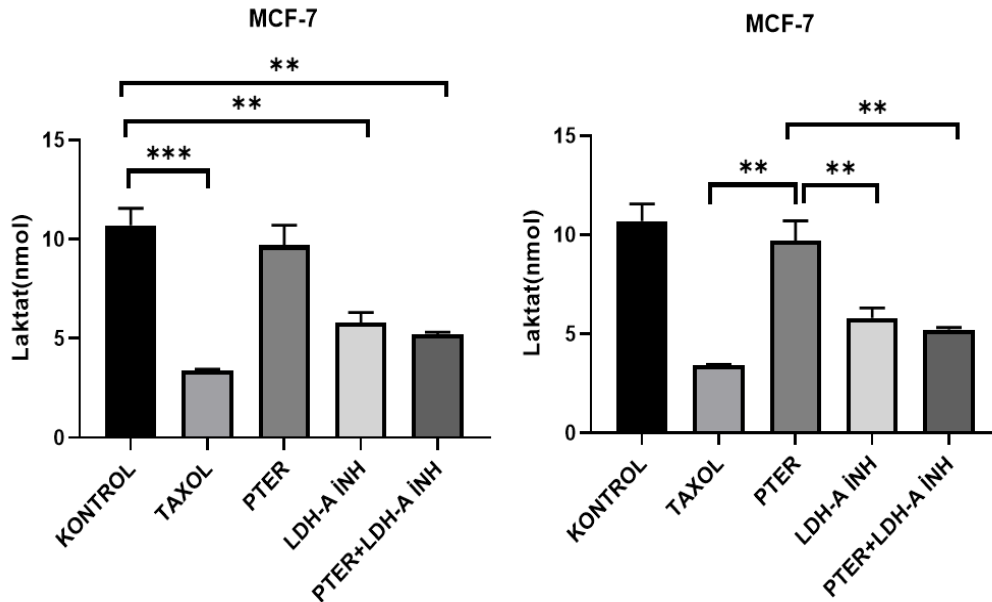
6.4 Laktat Analizi Sonucu

MCF-7 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Laktat Analizinin ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 6.4.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 6.4.1. MCF-7 Hücre Hattında Laktat Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Laktat Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (nmol)
Taxol	3,40 ± 0,04
Pterostilben	9,69 ± 0,72
LDH-A İnhibitörü	5,80 ± 0,36
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	5,20 ± 0,08
Negatif Kontrol	10,69 ± 0,60

MCF-7 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Laktat sonuçları **Şekil 6.4.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 6.4.1. MCF-7 Hücrelerinde Laktat'a Ait Konsantrasyon Grafikleri

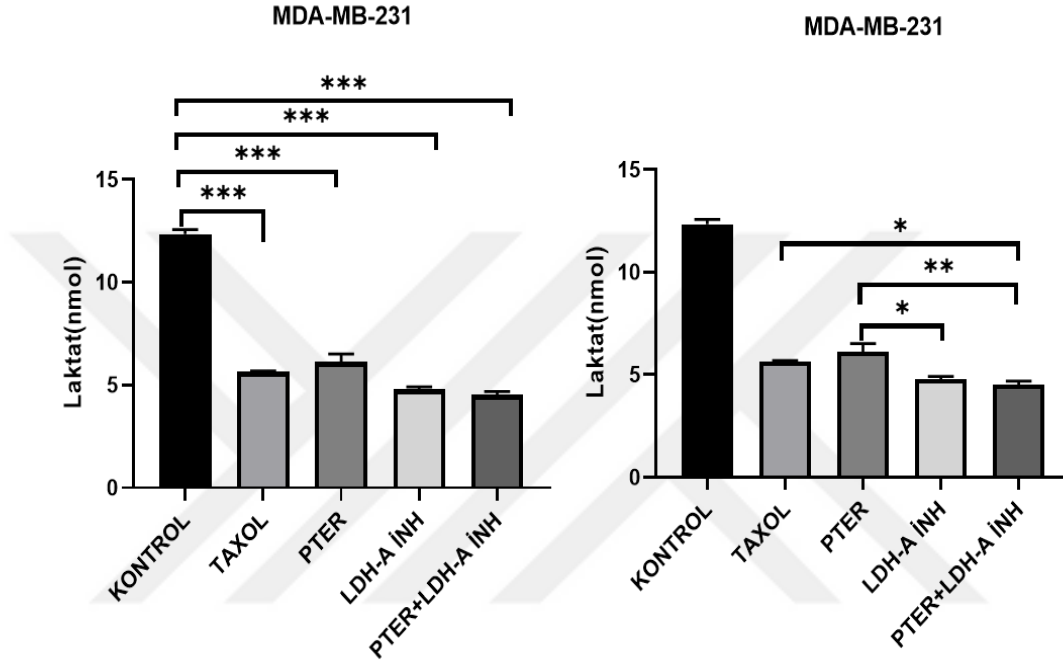
MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Laktat konsantrasyonlarına bakıldığında Negatif Kontrol ile kıyaslandığında Taxol grubunda, Pterostilben +LDH-A inhibitörü grubunda daha düşük değerler görüldü ($p<0.05$). Taxol ile kıyaslandığında, Pterostilben grubunda daha yüksek Laktat değeri görüldü ($p<0.05$). Pterostilben ile kıyaslandığında, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha düşük Laktat düzeyleri bulundu ($p<0.05$).

MDA-MB-231 Hücre Hattının IC50 dozlarında uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Laktat sonuçları aşağıdaki tabloda yer almaktadır (**Tablo 6.4.2**).

Tablo 6.4.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Laktat Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Laktat Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (nmol)
Taxol	5,64 ± 0,04
Pterostilben	6,12 ± 0,28
LDH-A İnhibitörü	4,80 ± 0,08
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	4,52 ± 0,12
Negatif Kontrol	12,34 ± 0,16

MDA-MB-231 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Laktat Analizi sonuçları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 6.4.2).



Şekil 6.4.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Laktat'a Ait Konsantrasyon Grafikleri

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Laktat konsantrasyonlarına bakıldığında Negatif Kontrol ile kıyaslandığında, Taksol grubunda, Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha düşük Laktat düzeyleri gözlemlendi ($p < 0.05$). Taxol ile kıyaslandığında, Pterostilben + LDH-A inhibitörü grubunda daha düşük Laktat düzeyleri gözlemlendi ($p < 0.05$). Pterostilben ile kıyaslandığında, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü grubunda daha düşük Laktat düzeyleri gözlemlendi ($p < 0.05$).

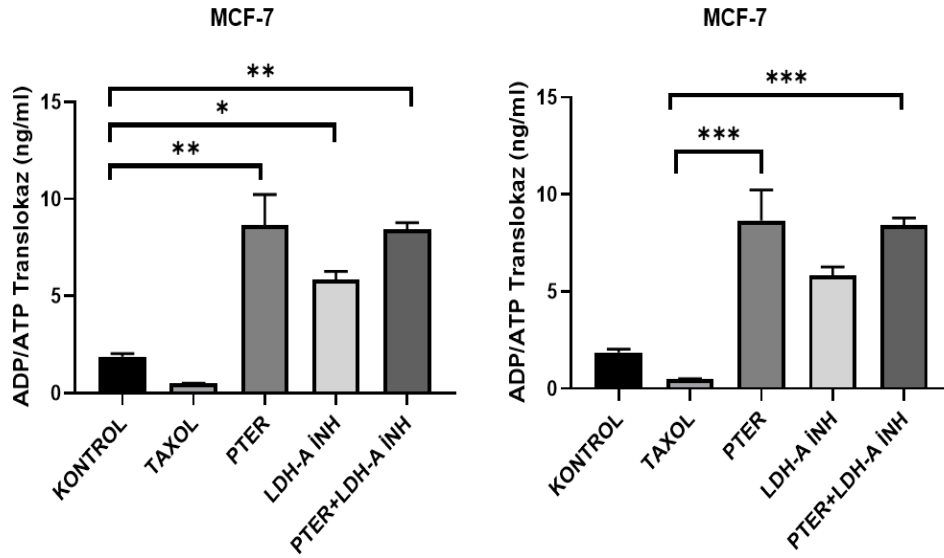
6.5 ADP/ATP Translokaz Eliza Analizi Sonucu

MCF-7 hücre hattında ADP/ATP Translokaz Eliza analizi ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 6.5.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 6.5.1. MCF-7 Hücre Hattında ADP/ATP Translokaz Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

ADP/ATP Translokaz Eliza Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (ng/ml)
Taxol	0,09 ± 0,01
Pterostilben	8,65 ± 1,11
LDH-A İnhibitörü	5,85 ± 0,30
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	8,43 ± 0,25
Negatif Kontrol	1,87 ± 0,11

MCF-7 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki ADP/ATP Translokaz Eliza sonuçları **Şekil 6.5.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 6.5.1. MCF-7 Hücrelerinde ADP/ATP Translokaz'a Ait Konsantrasyon Grafikleri

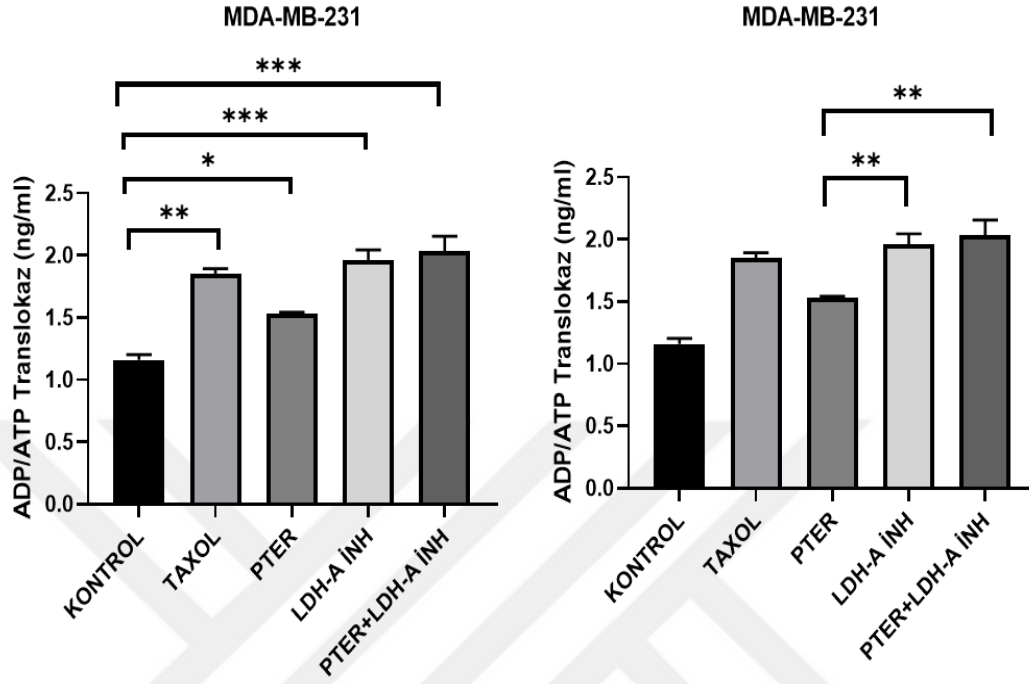
MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan ADP/ATP Translokaz konsantrasyonlarına bakıldığında, kontrol ile kıyaslandığında Pterostilben+ LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek ADP/ATP Translokaz değerleri gözlemlendi ($p < 0.05$). Taxol ile kıyaslandığında, Pterostilben grubunda ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek ADP/ATP Translokaz değerleri gözlemlendi ($p < 0.05$).

MDA-MB-231 Hücre Hattına IC50 dozlarında ilaç/inhibitör uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki ADP/ATP Translokaz Eliza analizi ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 6.5.2**).

Tablo 6.5.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında ADP/ATP Translokaz Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

ADP/ATP Translokaz Eliza Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (ng/ml)
Taxol	1,85 ± 0,03
Pterostilben	1,54 ± 0,01
LDH-A İnhibitörü	1,96 ± 0,06
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	2,04 ± 0,08
Negatif Kontrol	1,16 ± 0,03

MDA-MB-231 Hücre Hattında IC50 dozlarında ilaç/inhibitörlerin uygulanmasının ardından elde edilen hücre lizatlarındaki ADP/ATP Translokaz sonuçları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (**Şekil 6.5.2**).



Şekil 6.5.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde ADP/ATP Translokaz'a Ait Konsantrasyon Grafikleri
MDA-MB-231 Hücre Hatlarında ADP/ATP Translokaz değerlerine bakıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda daha yüksek değerler saptandı ($p < 0.05$).

Pterostilben grubu ile kıyaslandığında LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek değerler görüldü ($p < 0.05$).

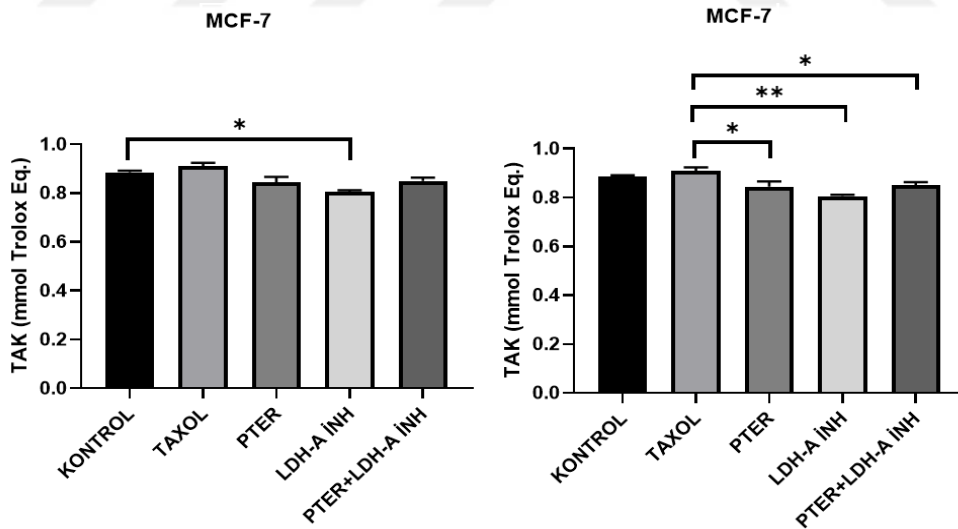
6.6 Total Antioksidan Kapasitesi Analizinin Sonuçları

MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) analizleri sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 6.6.1**).

Tablo 6.6.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Antioksidan Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (mmol Trolox Eq.)
Taxol	0,91 ± 0,01
Pterostilben	0,85 ± 0,02
LDH-A İnhibitörü	0,81 ± 0,01
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	0,85 ± 0,01
Negatif Kontrol	0,88 ± 0,00

MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) analizleri sonuçları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (**Şekil 6.6.1**).



Şekil 6.6.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Antioksidan Kapasite Grafikleri

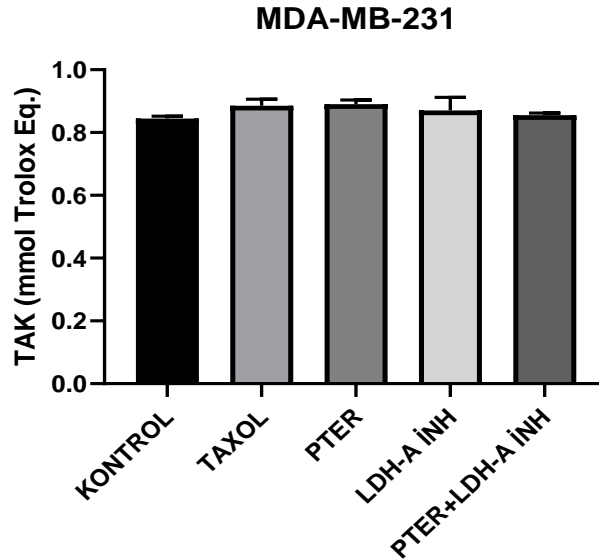
MCF-7 hücrelerinde TAK sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuna göre, LDH-A inhibitörü grubunda azalma saptanmıştır ($p < 0.05$). Taxol grubu ile kıyaslandığında Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha düşük değerler bulunmuştur ($p < 0.05$).

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Total Antioksidan Kapasitesi analizleri sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 6.6.2**).

Tablo 6.6.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Antioksidan Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Total Antioksidan Kapasitesi Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (mmol Trolox Eq.)
Taxol	0,88 ± 0,01
Pterostilben	0,89 ± 0,01
LDH-A İnhibitörü	0,87 ± 0,03
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	0,85± 0,00
Negatif Kontrol	0,84 ± 0,01

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) analizleri sonuçları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (**Şekil 6.6.2**).



Şekil 6.6.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Antioksidan Kapasite Grafikleri

MDA-MB-231 hücre hattında, TAK açısından gruplar arası istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

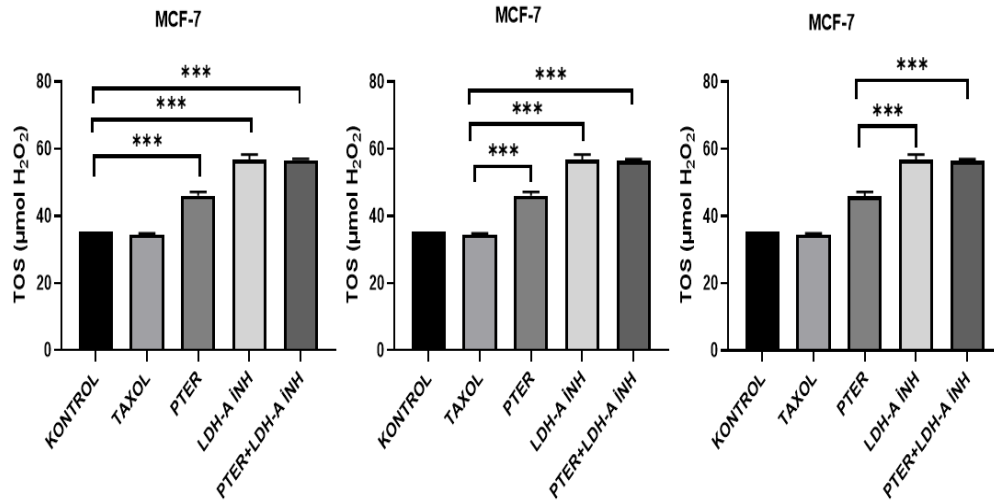
6.7 Total Oksidan Seviyesi Analizinin Sonuçları

MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Total Oksidan Seviyesi (TOS) analizinin sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 6.7.1).

Tablo 6.7.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Total Oksidan Seviyesi Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama ± Standart Sapma (µmol H ₂ O ₂)
Taxol	34,47 ± 0,26
Pterostilben	46,05 ± 0,79
LDH-A İnhibitörü	56,84 ± 1,05
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	56,58 ± 0,26
Negatif Kontrol	35,26 ± 0,00

MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Total Oksidan Seviyesi (TOS) analizleri sonuçları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 6.7.1).



Şekil 6.7.1. MCF-7 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Grafikleri

MCF-7 hücrelerinde TOS düzeylerine bakıldığında Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek düzeyler bulunmuştur (p<0.05).

Taxol ile kıyaslandığında; Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek düzeyler bulunmuştur ($p < 0.05$).

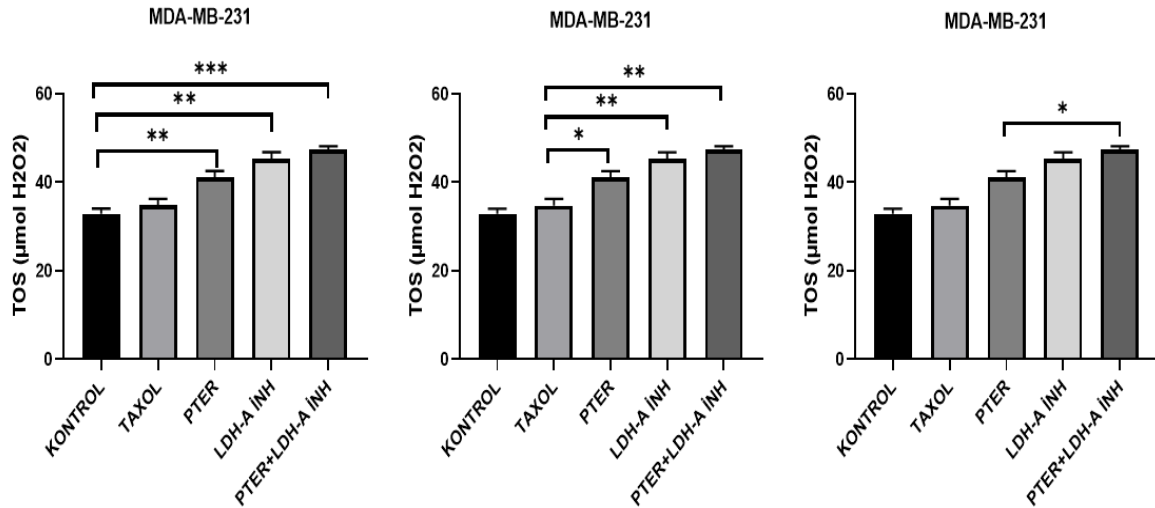
Pterostilben ile kıyaslandığında LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek TOS değerleri bulunmuştur ($p < 0.05$).

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Total Oksidan Seviyesi analizinin sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 6.7.2**).

Tablo 6.7.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Total Oksidan Seviyesi Analizi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama \pm Standart Sapma ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$)
Taxol	34,74 \pm 1,05
Pterostilben	41,05 \pm 1,05
LDH-A İnhibitörü	45,26 \pm 1,05
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	47,37 \pm 0,53
Negatif Kontrol	32,89 \pm 0,79

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Total Oksidan Seviyesi (TOS) analizleri sonuçları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (**Şekil 6.7.2**).



Şekil 6.7.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Total Oksidan Seviyesi Grafikleri

MDA-MB-231 hücre hatlarında, kontrol ve Taxol grubuna göre, Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek değerler gözlenmiştir ($p<0.05$).

Pterostilben grubu ile kıyaslandığında, Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek değerler gözlenmiştir ($p<0.05$).



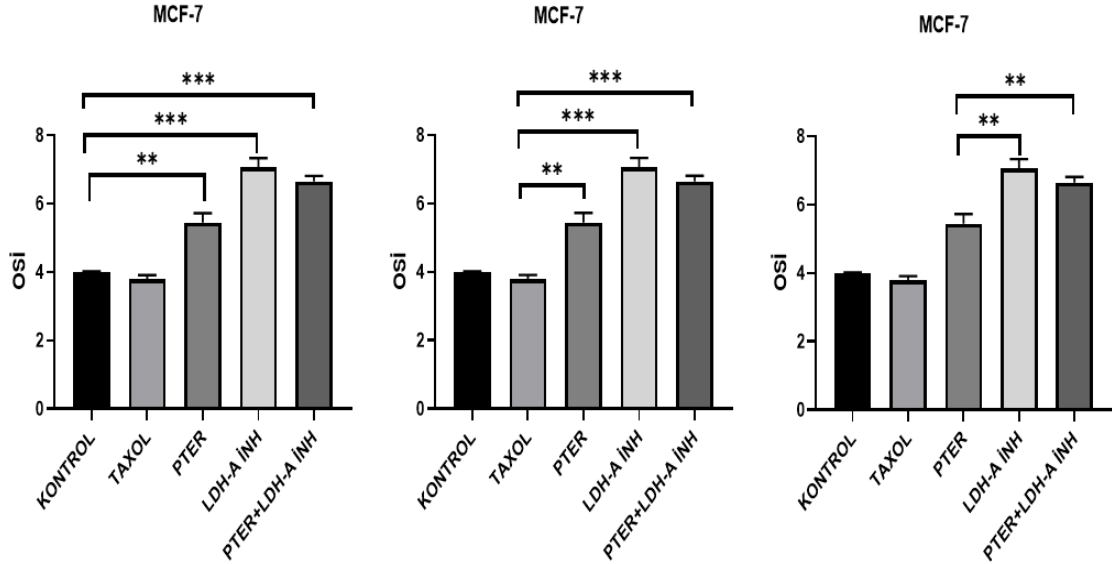
6.8 Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları

MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 6.8.1).

Tablo 6.8.1. MCF-7 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi

İlaç / Kimyasal	Ortalama
Taxol	3,80
Pterostilben	5,44
LDH-A İnhibitörü	7,06
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	6,65
Negatif Kontrol	3,99

MCF-7 hücre lizatlarında çalışılan Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) analizleri sonuçları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 6.8.1).



Şekil 6.8.1. MCF-7 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi Grafikleri

MCF-7 hücre hatlarında OSİ değerleri incelendiğinde, hem Taxol, hem de kontrol grubuna göre Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek değerler gözlenmiştir ($p<0.05$).

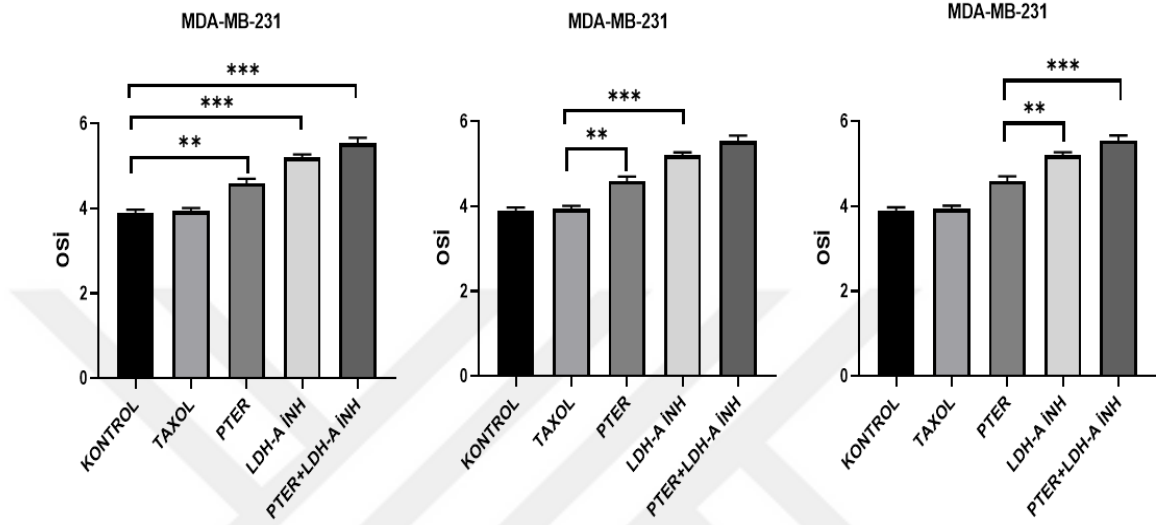
Pterostilben grubuna göre; LDH-A inhibitörü, Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında daha yüksek değerler gözlenmiştir ($p<0.05$).

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Oksidatif Stres İndeksi sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 6.8.2**).

Tablo 6.8.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları	
İlaç / Kimyasal	Ortalama
Taxol	3,94
Pterostilben	4,60
LDH-A İnhibitörü	5,20
Pterostilben + LDH-A İnhibitörü	5,54
Negatif Kontrol	3,90

MDA-MB-231 hücre lizatlarında çalışılan Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) analizleri sonuçları aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 6.8.2).



Şekil 6.8.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Oksidatif Stres İndeksi Grafikleri

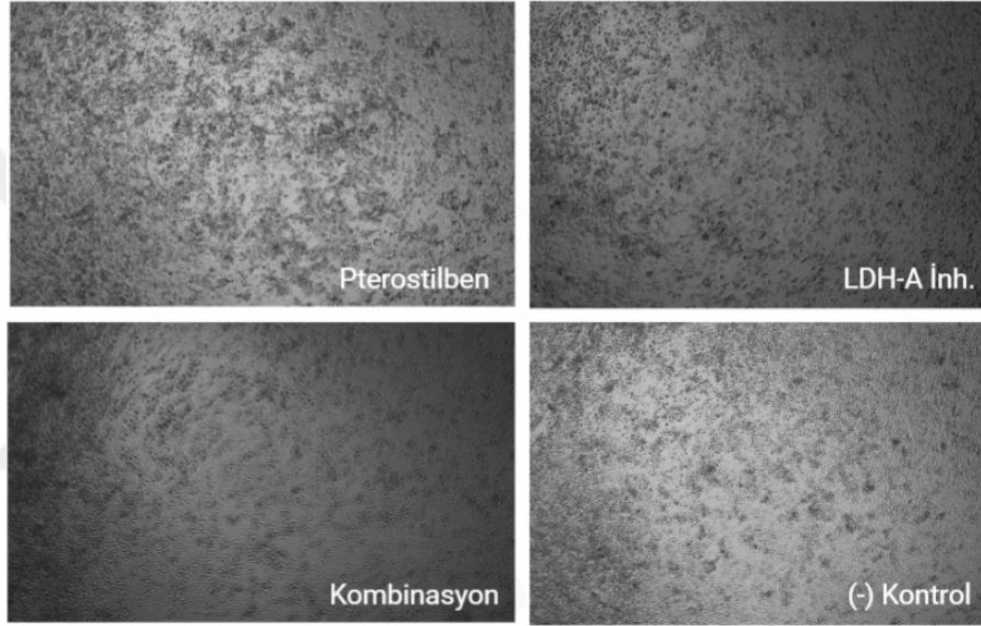
Kontrol grubuna göre MDA-MB-231 hücre hattında, Pterostilben, LDH-A inhibitörü, Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında yüksek değerler gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Taxol grubuna göre; Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında yüksek değerler gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Pterostilben grubuna göre; LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında yüksek değerler gözlenmiştir ($p < 0.05$).

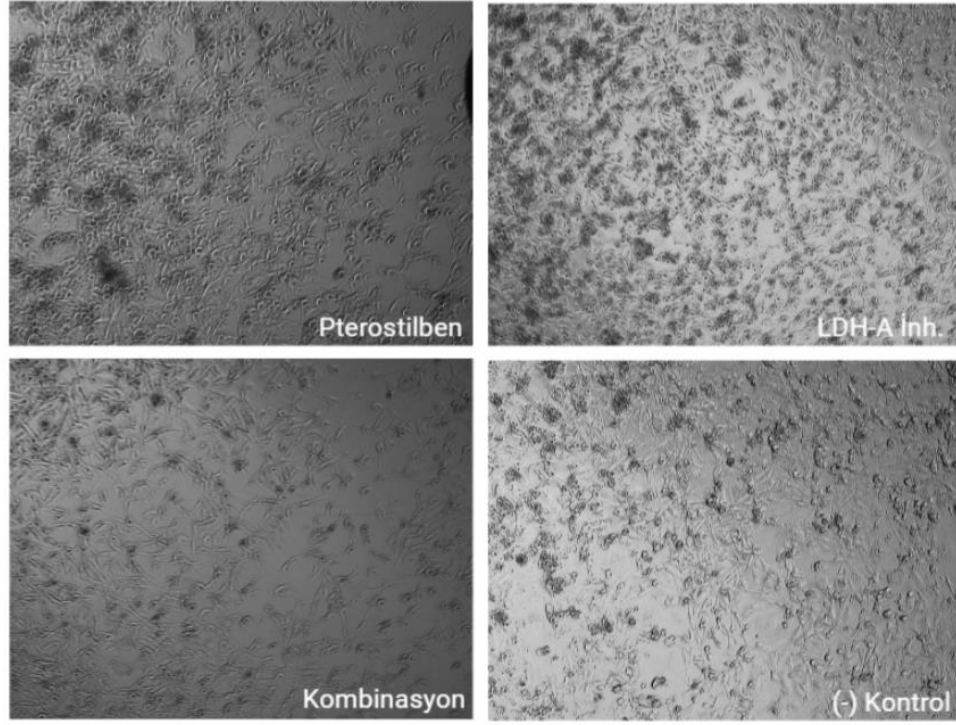
6.9 Seahorse Deney Sonuçları

Metabolik akış sisteminde Glikolitik Stres, Mitokondriyal Stres ve Hücre Fenotipi Kitleri çalışılmadan önce MCF-7 Hücre hatlarında Pterostilben, LDH-A İnhibitörü, Kombinasyon (Pterostilben + LDH-A İnhibitörü) gruplarına ilaç uygulaması sonrası hücrelerin mikroskop görüntüleri **Şekil 6.9.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 6.9.1. MCF-7 Hücrelerinin İlaç Uygulamaları Sonrası Mikroskop Görüntüleri (5X)

Metabolik akış sisteminde Glikolitik Stres, Mitokondriyal Stres ve Hücre Fenotipi Kitleri çalışılmadan önce MDA-MB-231 Hücre hatlarında Pterostilben, LDH-A İnhibitörü, Kombinasyon (Pterostilben + LDH-A İnhibitörü) gruplarına ilaç uygulaması sonrası hücrelerin mikroskop görüntüleri **Şekil 6.9.2**'de gösterilmiştir.



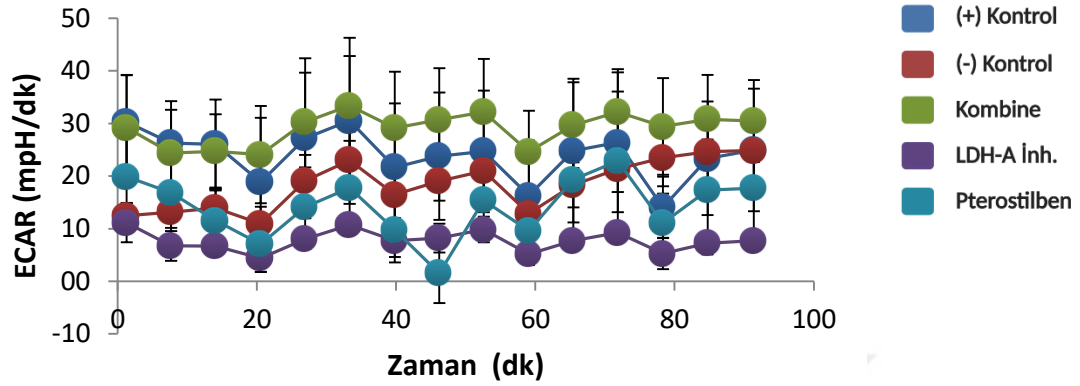
Şekil 6.9.2.MDA-MB-231 Hücrelerinin İlaç Uygulamaları Sonrası Mikroskop Görüntüleri (5X)
Seahorse Metabolik Akış sisteminde çalışılan testlerin sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

6.9.1 Glikolitik Stres Kiti

Metabolik akış sisteminde metabolik modülatörler olarak Glikoliz Stres Kitinde sırasıyla; D-Glukoz, Oligomisin ve 2-DG kullanıldı. 2-DG, heksokinaz inhibitörüdür. Oligomisin, mitokondriyal kompleks 5 (ATP Sentaz) inhibitörüdür.

MCF-7 hücre hattına ait, Glikolitik stres kiti sonuçları aşağıda yer almaktadır (**Şekil 6.9.3**).

Glikolitik Stres Grafiği

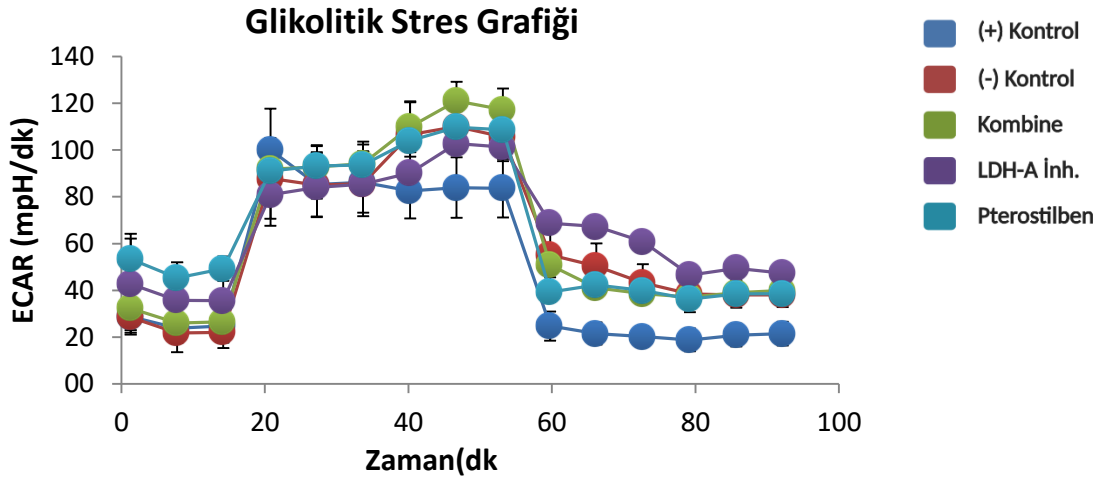


Şekil 6.9.3. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait Glikolitik Stres Sonuçları

MCF-7 hücrelerinin Glikolitik Stres grafiğine göre, ilk 20 dakikanın ardından ortama akut olarak Glukoz'un eklenmesi ile, tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış meydana geldi.

MCF-7 hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt veren grup, Pterostilben+LDH-A grubu olmuştur.

MDA-MB-231 hücre hattına ait, Glikolitik Stres Kiti sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.4).



Şekil 6.9.4. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait Glikolitik Stres Sonuçları

MDA-MB-231 hücrelerinin Glikolitik Stres grafiğine göre, ilk 20 dakika ardından ortama akut olarak Glukoz'un eklenmesi ile, tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış meydana geldi.

Oligomisin'in 40. dakikada ortama akut olarak eklenmesi ile normal koşullarda oksidatif fosforilasyon inhibe olacağı için, medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış olması beklenir. Tüm gruplarda artış gözlemlendi. Ortama 2-DG akut eklendiğinde tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda azalma olduğu kaydedildi.

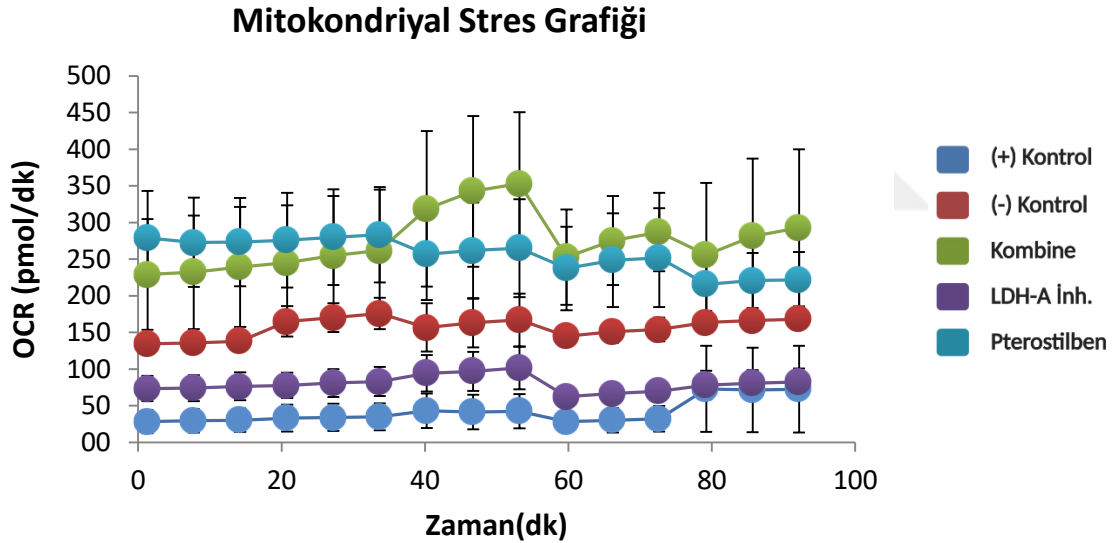
Mitokondrilerdeki kompleks V inhibitörü olan Oligomisin'in 40. dakikada ortama akut olarak eklenmesi ile normal koşullarda üretilen ATP sentezinde azalma olacağı için, hücre medyumuna salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış olması beklenir. Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında artış gözlemlendi.

Ardından ortama heksokinaz inhibitörü olan 2-DG akut olarak eklendiğinde tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda azalma olduğu kaydedildi.

6.9.2 Mitokondriyal Stres Kiti

Metabolik akış sisteminde metabolik modülatörler olarak Mito Stres Kitinde sırasıyla; Oligomisin, FCCP ve Rotenon / Antimisin kullanıldı. Oligomisin, mitokondriyal kompleks 5 (ATP Sentaz) inhibitörüdür. FCCP, mitokondride oksidatif fosforilasyonun (OXPHOS) bir ayırıcısıdır. ATP sentezini bozan güçlü bir oksidatif fosforilasyon ayırıcısıdır. Rotenon, mitokondriyal kompleks 1 inhibitörüdür. Antimisin A, mitokondriyal kompleks 3 inhibitörüdür.

MCF-7 hücre hattına ait, Mitokondriyal Stres Kiti sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.5).



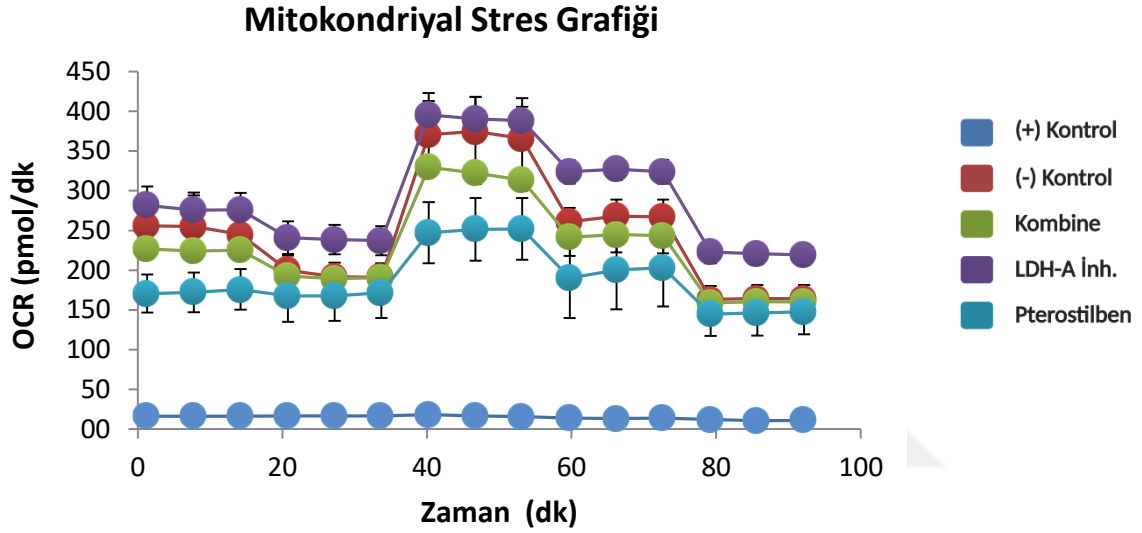
Şekil 6.9.5. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait Mitokondriyal Stres Sonuçları

MCF-7 hücrelerinde 3. ölçümden sonra ortama akut olarak Oligomisin eklenmesi ile Oksijen Tüketim Oranı negatif kontrolde belirgin seviyede arttı.

MCF-7 hücrelerinde 6. ölçümün ardından ortama FCCP'nin eklenmesi ile kombinasyon grubunda diğer gruplara kıyasla fark edilir düzeyde OCR artışı kaydedildi.

9. ölçümden sonra ortama Rotenon /Antimisin A'in akut olarak eklenmesi OCR'da tüm gruplarda azalma kaydedildi. En belirgin düzeyde azalma Pterostilben+ LDH-A inhibitörü grubunda gözlemlendi.

MDA-MB-231 hücre hattına ait, Mitokondriyal Stres Kiti sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.6).



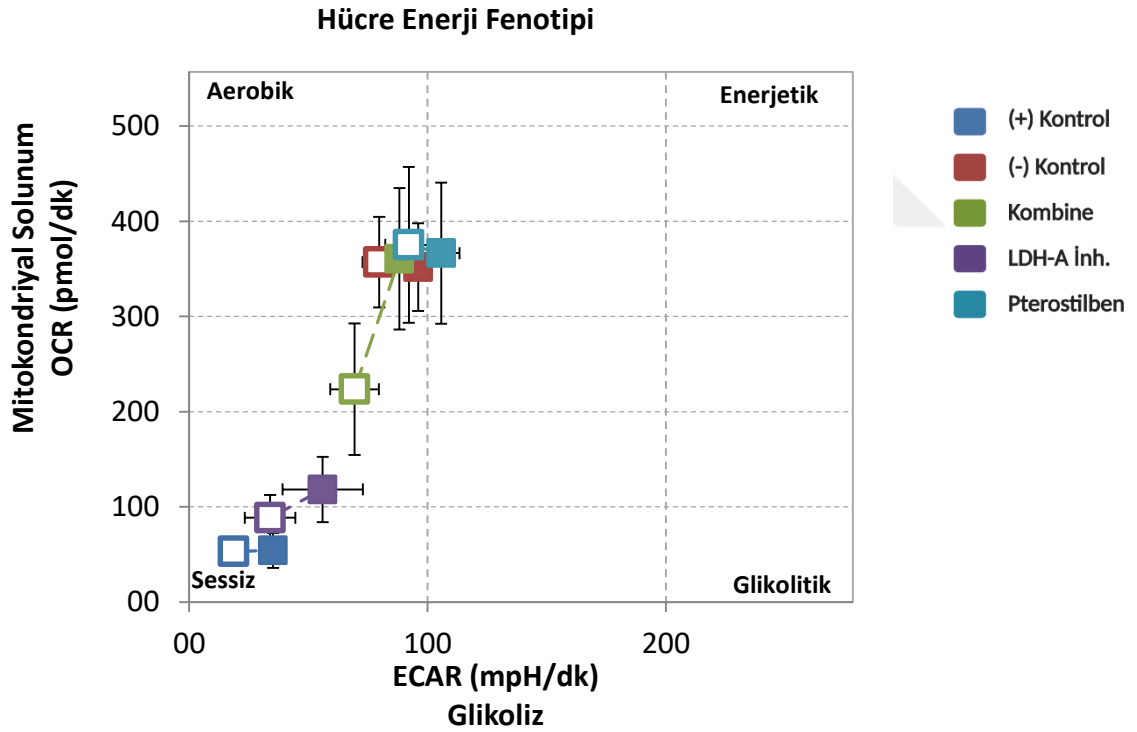
Şekil 6.9.6. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait Mitokondriyal Stres Sonuçları

MDA-MB-231 hücrelerinde 3. ölçüm sonrası ortama akut olarak Oligomisin eklenmesi ile Oksijen Tüketim Oranı pozitif kontrol harici tüm gruplarda azaldı. 6. ölçümden sonra, ortama FCCP akut olarak eklendiğinde, hücre gruplarında beklenildiği gibi OCR düzeyi artmıştır. 9. ölçümden sonra ortama Rotenon / Antimisin 'in akut olarak eklenmesi ile OCR'da belirgin seviyede azalma gözlenmiştir.

6.9.3 Enerji Fenotipi Kiti

Metabolik akış sisteminde metabolik modülatörler olarak Hücre Enerji Fenotipi Kitinde sırasıyla; Oligomisin, FCCP ve Rotenon/ Antimisin kullanıldı. Oligomisin, mitokondriyal kompleks 5 (ATP Sentaz) inhibitörüdür. FCCP, mitokondride oksidatif fosforilasyonun (OXPHOS) bir ayırıcısıdır. ATP sentezini bozan güçlü bir oksidatif fosforilasyon ayırıcısıdır. Rotenon, mitokondriyal kompleks 1 inhibitörüdür. Antimisin A, mitokondriyal kompleks 3 inhibitörüdür.

MCF-7 hücre hatlarına ait, Hücresel Enerji Fenotipi sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.7).

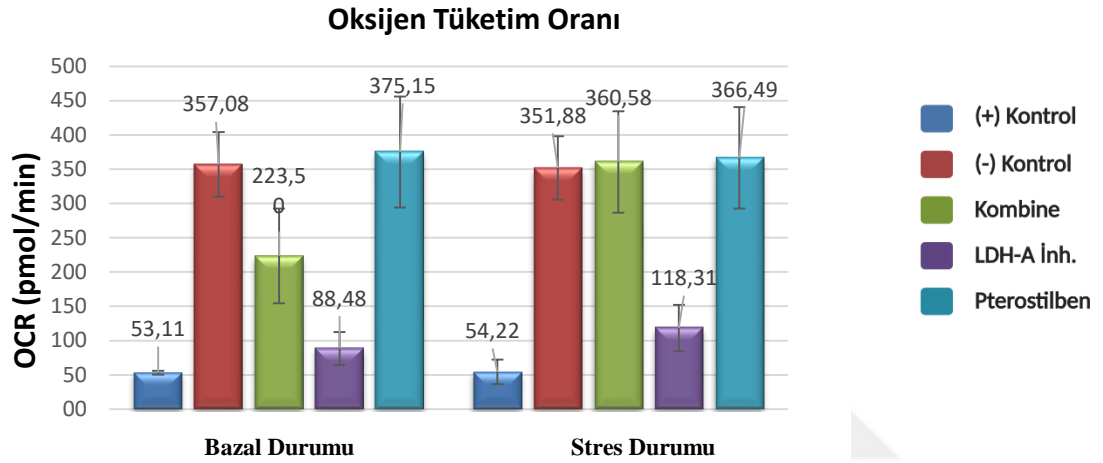


Şekil 6.9.7. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait Hücresel Enerji Fenotipi Sonuçları

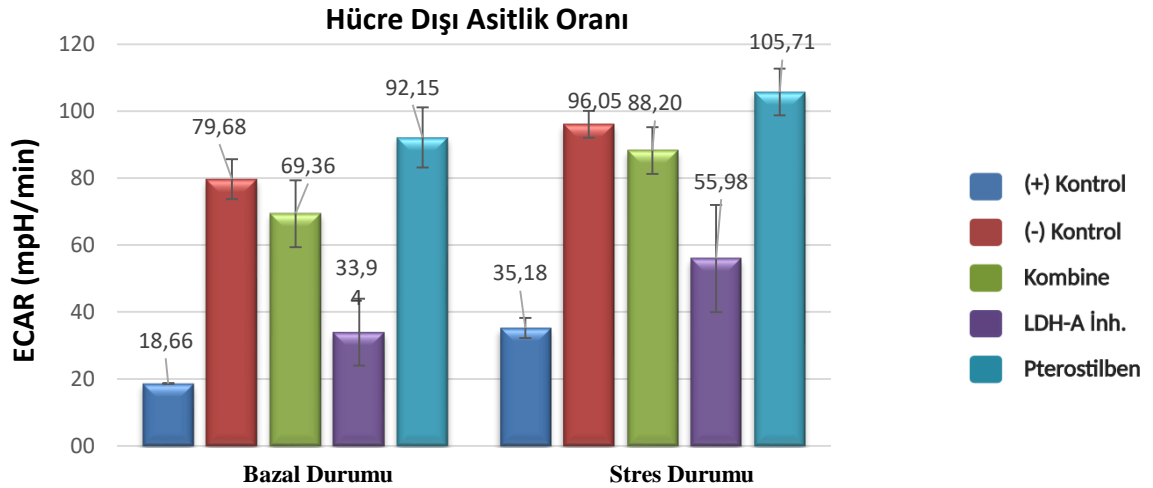
MCF-7 hücrelerinin tüm gruplarının IC50 dozlarında muamele edilmesiyle bazal fenotipe kıyasla, stres fenotiplerinin enerjetik yöne en fazla eğilim gösterdiği grup, Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda kaydedildi. Kombinasyon grubunda hücresel enerji fenotipinin enerjetik yola kaydığı gösterildi. Bu sonuç mitokondriyal oksidatif

fosforilasyon sisteminin (OXPHOS) arttığını ve metabolik kaymanın enerjetik yöne doğru olduğunu göstermiştir.

MCF-7 hücre hatlarına ait, bazal durum ve stres koşullarında OCR ve ECAR oranları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.8 ve Şekil 6.9.9).

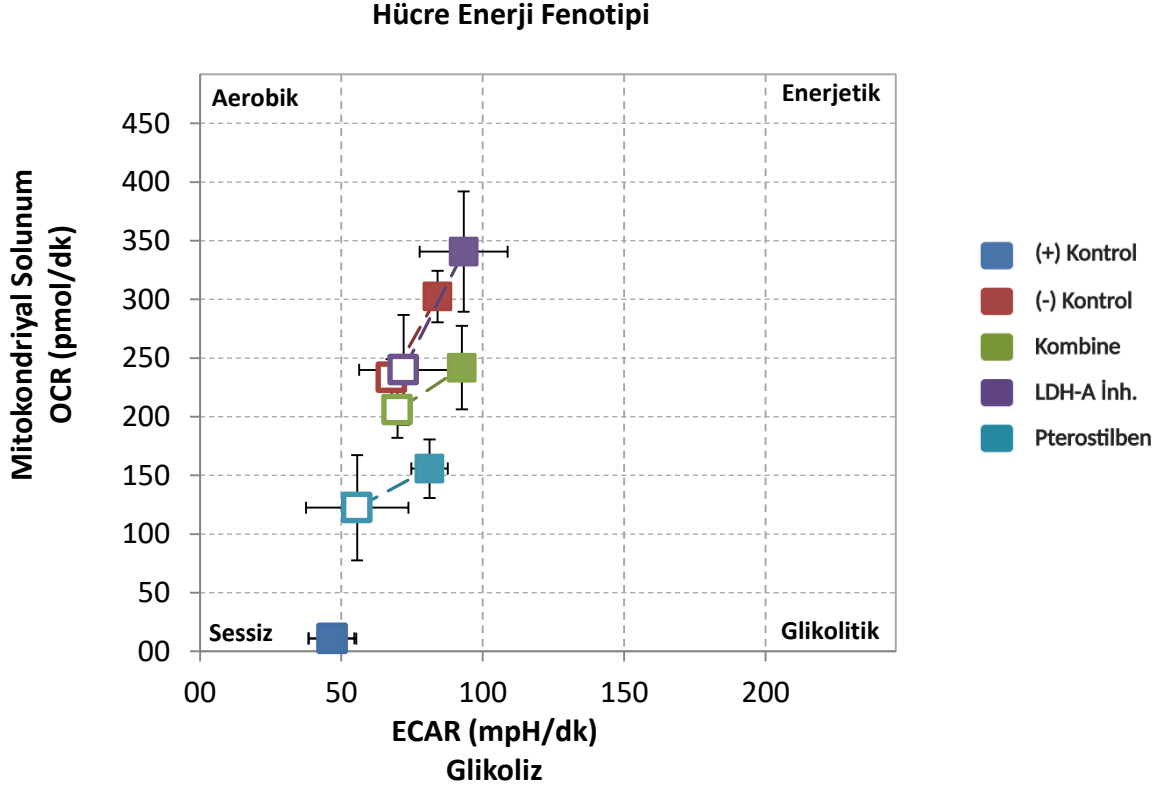


Şekil 6.9.8. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait OCR Değerleri



Şekil 6.9.9. MCF-7 Hücre Hatlarına Ait ECAR Değerleri

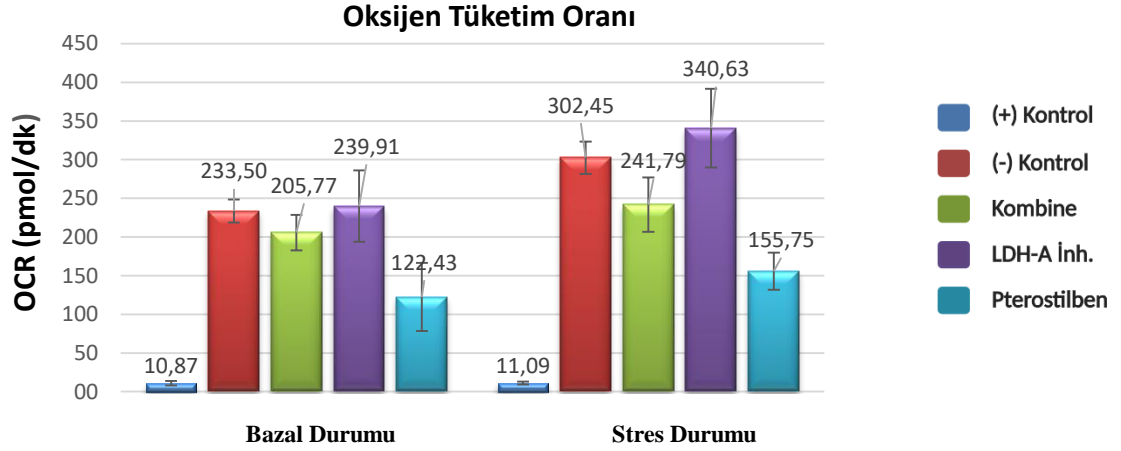
MDA-MB-231 hücre hatlarına ait Hücresel Enerji Fenotipi sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.10).



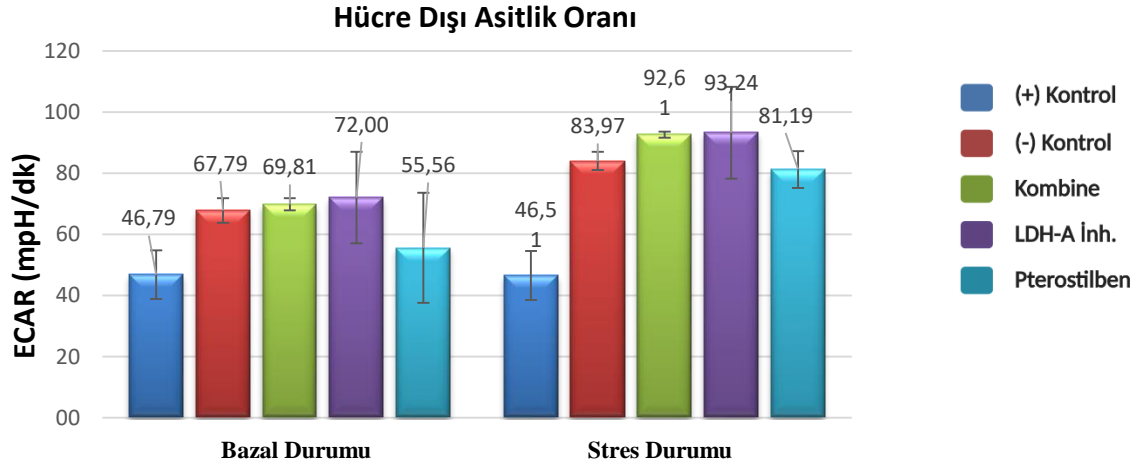
Şekil 6.9.10. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait Hücresel Enerji Fenotipi Sonuçları

MDA-MB-231 hücrelerinin tüm gruplarının IC50 dozlarında muamele edilmesiyle bazal fenotipe kıyasla, stres fenotiplerinin karşılaştırmalarına bakıldığında, Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında stres durumlarında hücresel enerji fenotipinin enerjetik yola kaydığı kaydedildi. LDH-A inhibitörünün uygulandığı grupta ise hücresel enerji fenotipinin enerjetik yola doğru en yüksek yönelim gösterdiği kaydedildi. Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sisteminin (OXPHOS) arttığı görüldü.

MDA-MB-231 hücre hatlarına ait, bazal durum ve stres koşullarında OCR ve ECAR oranları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.9.11 ve Şekil 6.9.12).



Şekil 6.9.11. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait OCR Değerleri



Şekil 6.9.12. MDA-MB-231 Hücre Hatlarına Ait ECAR Değerleri

7. TARTIŞMA

Meme kanseri tüm dünya’da akciğer kanserinden sonra ikinci sırada en yaygın olarak görülen kanserdir. Ülkemizde de kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve insidansındaki artış katlanarak devam etmektedir. Bu artış trendi nedeniyle meme kanseri etiyojisi ve tedavisi ile ilgili araştırmalara gerek duyulmaktadır.

Pterostilben molekülünün antikarsinojen etkileri olduğu bilinmekle birlikte antioksidan olduğuna dair de literatürde bilgiler mevcuttur. Bu kapsamda Pterostilben, doğal bir diyet bileşeni ve yaban mersininin birincil antioksidan bileşeni olarak kabul edilmiştir. Birçok çalışmada, Pterostilben’in terapötik yararlarını gösteren antioksidan etkinliği *in vitro* ve *in vivo* modellerde gösterilmiştir. Mannal ve arkadaşları, Pterostilben’in antioksidan aktivitesi olduğunu, antikarsinogenez özellik gösterdiğini, nörolojik hastalıkların modülasyonunda etkin olduğunu, anti-inflamasyon özellik göstermesini, vasküler hastalıkların gerilemesinde rolünün olduğunu ve diyabetin iyileştirilmesinde ilişkili roller bulunduğunu yaptıkları derlemelerde ifade etmişlerdir (Mannal et al., 2013).

Meme kanserinde Pterostilben molekülü ve Pterostilben gibi fitokimyasallar içeren meyveler ile ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır. Fenolik asitler, antosiyaninler ve diğer flavonoidler gibi çeşitli fitokimyasallar içeren yenilebilir meyvelerin çeşitli potansiyel kemopreventif aktivitelere ilgi her geçen gün artmaktadır (Boivin, Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Beliveau, 2007).

Meme kanseri xenograft modelinin kullanıldığı çalışmalarda, yaban mersini özütü uygulanması ile, bir hücre proliferasyonu belirteci olan Ki-67'nin ekspresyonunda azalma ve bir apoptoz belirteci olan Kaspaz-3'ün ifadesinde artış olduğu Adams ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Çalışmada, yaban mersini ile beslenen farelerde, kontrol grubuna kıyasla Akt ve NK-kabba β sinyalleşmesinde aktivasyonun azaldığı gözlenmiştir. Çalışma bulgularından hareketle, yaban mersini özütünün içeriğinde bulunan özel kimyasal bileşenin, meme kanseri hücrelerinde kanserojenik yolağın modifikasyonunda önemli bir rolü olduğunu *in vivo* olarak göstermektedir (Adams, Kanaya, Phung, Liu, & Chen, 2011).

Pterostiben'in metastazı inhibe edici etkisine yönelik çalışmalar da literatürde yer almaktadır.

Adams ve arkadaşlarının çalışmalarında, yaban mersini özütünün *in vitro* uygulamalarında meme karsinogenezinde rol oynayan HGF'nin (Human Growth Factor), PI3K/AKT/ NK-kabba β yolağının aktivitesini de önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Yaban mersini uygulanması, HGF'ye bağlı hücre göçünü ve matris metalloproteinaz- (MMP-2 ve MMP-9) aktivitesini inhibe ederek meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyelini *in vitro* ortamda inhibe ettiğini göstermiştir (Adams et al., 2011).

Laktat dehidrojenaz (LDH), substrat olarak NADH'yı kullanarak NAD⁺ kazanımıyla piruvatın laktata dönüşümünü katalizleyen oksiredüktazlar sınıfından kritik bir metabolik enzimdir. Bakterilerden insanlara kadar çeşitli organizmalarda bulunan Laktat dehidrojenaz, tetramer olarak aktiftir (Kolappan et al., 2015).

LDHA'nın inhibisyonu, kanser hücrelerinin enerjisini ve anabolik kaynağını kesmesi anlamına gelmektedir. Böylece kanser hücrelerinin metastatik ve invaziv potansiyelleri azaltılmış olur. Bu özelliklerinden dolayı LDHA, yeni anti-kanser ajanları için potansiyel bir hedef olarak düşünülmektedir (Granchi, Roy, Giacomelli, et al., 2011).

Çoğu kanser hücresi, glikozun laktata dönüşümü sonucunda LDH seviyelerini arttırması ile Warburg Etkisi olarak bilinen glikolitik bir fenotip sergilemektedir. ATP'nin esas olarak aerobik glikoliz yoluyla üretildiği bu Warburg etkisi, piruvatın laktata dönüşümünün LDH ile katalizlendiği metabolik yoldan ibarettir (Hamanaka & Chandel, 2012; Vander Heiden, 2011; Otto Warburg, 1956).

Meme kanserinde Taxole dirençli hücrelerde LDH-A inhibisyonu durumunda hücreler Taxol'e duyarlı hale gelmektedir. Bu nedenle meme kanserinde hedefe yönelik tedavilerin kullanımı açısından Sodyum Oxamat (LDH-A inhibitörü) hedef olmuştur (Zhou et al., 2010).

Çalışmamızda, Pterostilben molekülü ile LDH-A inhibitörü kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde oluşturduğu etkinin tümör enerji metabolizması bakış açısı ile

değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, Warburg Etkisi doğrultusunda, LDH enzimi inhibitörü olan Sodyum Oxamat kullanılarak, Pterostilben molekülünün meme kanseri hücrelerindeki kombine etkisi araştırılmıştır.

Pterostilben'in LDH-A inhibitörü ile kombine etkilerinin tümör enerji metabolizması açısı ile değerlendirildiği çalışmalar literatürde henüz yer almamaktadır.

Araştırmamızın özgün yönü;

1. Pterostilben ve LDH-A inhibitörü kombine şekilde Warburg etkisi yönüyle ilk defa değerlendirilmiştir.
2. Pterostilben+LDH-A inhibitörünün etkinliğini ölçen ECAR ve OCR parametreleri daha önce çalışılmamıştır. Meme kanseri hücrelerinde Pterostilben ve LDH-A inhibitörü etkinliğinin kombine olarak tümör enerji metabolizması açısından değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Literatürde, yaban mersini özütünün ve Pterostilben'in meme kanserinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanser hücrelerini inhibe ettikleri bildirilmiştir. Adams ve arkadaşlarının farklı üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında (HCC38, HCC1937 ve MDA-MB-231), kültür ortamına uygulanan yaban mersini özütünün, kanser hücre hatlarında çoğalmayı azalttığını göstermişlerdir. Tümörojenik olmayan MCF-10A hücre hattında ise hücre çoğalmasını etkilemediğini bulmuşlardır. Yaban mersini özütlerinin *in vivo* uygulamalarında ise üçlü negatif meme kanserli farelerde, tümör hacminin azaldığı ve tümör hücrelerinin büyümesinin baskılandığı gösterilmiştir (Adams et al., 2011).

Boivin ve arkadaşlarının farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 30, 40, 50 µl/ml) fitokimyasallar içeren meyve özütlerini kullanarak meme kanseri proliferasyonunda doza bağlı inhibisyonunu hücre canlılık analizi yaparak göstermişlerdir. 48 saatlik inkübasyonun ardından, Pterostilben molekülünü içeren yaban mersini suyunun meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'e karşı antiproliferatif bir etki yaptığını göstermiştir (Boivin et al., 2007).

Bizim çalışmamızda da her 2 hücre hattında da Pterostilben'in etkisi antiproliferatif olarak bulundu ($p < 0.05$).

Pterostilben'in meme kanserinde *in vitro* ve *in vivo* olarak çoklu kanser yollarının değişimi yoluyla anti-kanser etkiler sergilediği gösterilmiş olup, Alosi ve arkadaşları, Pterostilben'in apoptozu indüklediğini, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Araştırma sonucunda, Pterostilben tedavisinin kaspaz bağımlı apoptoz yoluyla meme kanserinin büyümesini *in vitro* olarak engellediğini göstermiştir. Mitokondriyal membran depolarizasyonunun ve artan süperoksit anyonunun, efektör kaspazların aktivasyonuna katkıda bulunabileceğini ve kaspaz inhibisyonunun da Pterostilben ile hücre canlılığı üzerindeki etkisini tamamen tersine çevirmesine neden olabileceğini göstermiştir (Alosi et al., 2010).

Mannal ve arkadaşlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada Pterostilben, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan Tamoksifen ile kombinasyon halinde hücrelere verildiğinde, hücre hatlarında farklı sonuçlar bildirmişlerdir. Östrojen reseptörü negatif hücre hattı olan MDA-MB-231'de Pterostilben, hücre büyümesini inhibe etmesi açısından yalnız başına inhibe edici etki göstermesine rağmen, kombinasyon olarak verildiğinde ek bir inhibe edici etki göstermediği görülmüştür. Östrojen reseptörü pozitif hücre hattı olan MCF-7 hücrelerine kombinasyon olarak Pterostilben uygulandığında, Pterostilben'in bu hücre hattında ek bir inhibitor etki gösterdiği bildirilmiştir (Mannal et al., 2010).

Benzer bir şekilde, Adams ve arkadaşları, yüksek konsantrasyonda yaban mersini özütünün, triple-receptor açısından negatif olan meme kanseri hücre hatlarında (HCC38, HCC1937 ve MDA-MB-231) çoğalmayı azalttığını, fakat tümörojenik olmayan MCF-10A hücre hattında ise çoğalmayı etkilemediğini bulmuşlardır (Adams et al., 2011).

Çalışmamızdaki sitotoksikite denemelerinin sonuçlarına göre MCF-7 hücre hattı için Sodyum Okzamat'ın (LDH-A inhibitörü) IC50 dozu 60 mM, Pterostilben'in IC50 dozu ise 60 μ M olarak bulunmuştur. Kullanılan iki ilacın kombinasyon dozları ise 30 mM LDH-A inhibitörü ve 40 μ M Pterostilben'den oluşmaktadır.

MDA-MB-231 hücre hattı için Sodyum Okzamat'ın (LDH-A inhibitörü) IC50 dozu 76 mM, Pterostilben'in IC50 dozu ise 95,6 µM olarak bulunmuştur. Kullanılan iki ilacın kombinasyon dozları ise 38 mM LDH-A inhibitörü ve 95,6 µM Pterostilbenden oluşmaktadır.

MCF-7 hücre hattına uygulanan Pterostilben için literatürde yer alan IC50 dozlarına bakıldığında Alosi ve arkadaşlarının 48 saat için buldukları değer 40,51±10,72 olarak bildirilirken, MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan Pterostilben için 29,6 ± 4,77 olarak bildirilmiştir (Alosi et al., 2010).

Niu ve arkadaşları, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki hücrelere muamele edilen LDH-A inhibitörünü aerobik glikolizi inhibe etmek için 48 saat için 50 mM dozunda kullanmışlardır (Niu et al., 2018). Bizim çalışmamızda MCF-7 için 20-40-60-80-120-160 mM aralıklarında analizler yapılarak IC50 dozu 60 mM olarak bulunmuştur. MDA-MB-231 için 40-60-80-100-120-160 mM aralıklarında analizler yapılarak IC50 dozu 76 mM bulunmuştur. Bulduğumuz sonuçlar, literatür ile uyumludur.

Asetil KoA sonuçlarına bakıldığında;

1. Hem MCF-7, hem de MDA-MB-231 hücre hatlarında en yüksek Asetil KoA, Pterostilben +LDH-A inhibitörü grubunda görüldü.
2. MCF-7 hücre hattında Kontrol grubuna göre Pterostilben ve LDH inhibitörü gruplarında daha yüksek Asetil KoA değerleri gözlemlendi ($p<0.05$). MDA-MB-231 hücre hattında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$).
3. Her iki hücre hattında da Pterostilben' e ve Laktat'a göre Pterostilben +LDH-A inhibitörü grubunda daha yüksek Asetil KoA değerleri gözlemlendi ($p<0.05$).

Laktat sonuçlarına bakıldığında;

1. Hem MCF-7, hem de MDA-MB-231 hücre hatlarında en düşük Laktat düzeyi, Pterostilben +LDH-A inhibitörü grubunda görüldü.
2. Her iki hücre hattında Kontrol grubuna göre tüm gruplarda daha düşük Laktat düzeyi gözlemlendi ($p<0.05$).

3. Her iki hücre hattında da Pterostilben' e göre Pterostilben +LDH-A inhibitörü grubunda daha düşük Laktat değerleri gözlemlendi ($p<0.05$).

Sonuç olarak;

Pterostilben+LDH inhibitörü grubunda en yüksek Asetil KoA ve en düşük Laktat düzeyinin görülmesi bu kombinasyonun glikolitik metabolizmadan oksidatif metabolizmaya önemli bir değişimi sağladığına işaret etmektedir.

Tek başına Pterostilben veya LDH-A inhibitörüne yerine, Pterostilben+LDH-A inhibitörü kullanmak metabolik yönü enerjeye çevirmek açısından daha etkili olabilir.

ADP/ATP Translokaz sonuçlarına baktığımızda;

1. MDA-MB-231 hücre hatlarında en yüksek ADP/ATP Translokaz değerleri, Pterostilben +LDH-A inhibitörü grubunda görüldü. MCF-7 hücre hattında en yüksek ADP/ATP Translokaz değerleri Pterostilben ($8,65\pm 1,11$), ikinci sırada Pterostilben +LDH-A inhibitörü ($8,43\pm 0,25$) grubunda görüldü.

2. Her iki hücre hattında kontrole göre tüm gruplarda ADP/ATP Translokaz daha yüksek bulundu ($p<0.05$).

ADP-ATP translocase, ATP ve ADP'nin iç mitokondrial zarıdan geçmesini sağlayan bir taşıyıcı proteindir. Oksidatif fosforilasyondan üretilen ATP mitokondriyal matriksten sitoplazmaya taşınırken, ADP sitoplazmadan mitokondriyal matrise taşınır. İç mitokondriyaldeki proteinin % 10'undan fazlası membran ATP-ADP translokazdan oluşur (Klumpe et al., 2016).

ANC üretimindeki değişiklikler ayrıca Rett Sendromunda ve MFN2 ile ilişkili Charcot-Marie-Tooth Tip 2A hastalığında tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümünde belirleyici bir oyuncu olarak tanımlanan ADP / ATP translokazın, kanserde rol oynadığı da gösterilmiştir (Clémençon et al., 2013). SLC25A5, çeşitli insan kanser hücrelerinde güçlü bir şekilde aşırı ifade edilir ve bu durum SLC25A5 inhibitörlerinin kanser tedavisinde hedef olabileceğini düşündürmüştür.

ANT'nin bazı apoptotik süreçlerde yer aldığı bilinmektedir. ANT3'ün, MCF-7 hücrelerinde TNF ve oksidatif stresle indüklenen hücre ölümü için seçici olarak gereklidir (Z. Yang et al., 2007).

ADP/ATP translokazın kardiyak iskemide arttığı bilinmektedir. Tahmin edilebileceği gibi, iskemi mitokondriyal sınırlı oksidatif fosforilasyona bağlı işlev bozukluğu ve böylece kardiyak aktiviteyi tehlikeye atar. Klumpe ve arkadaşlarının yaptığı araştırmalarda iskemi ile beraber artan oksidatif strese karşı transgenik sıçanlardaki ADP/ATP translokaz 1 aşırı eksprese olmuştur (Klumpe et al., 2016).

Çalışma gruplarımızda ADP/ATP translokaz düzeylerinin OSİ artışıyla paralel olması, ADP/ATP translokaz artışının oksidatif strese cevap olarak arttığı şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışma sonuçlarımız, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki kombinasyon terapisinin hücrelerdeki Laktat miktarını azaltırken, Asetil KoA ve ADP/ATP Translokaz miktarını da eş zamanlı olarak arttırdığını göstermiştir.

Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bozulmuş dengenin sonucu artan ROS'in, OS'i arttırdığı ve meme kanserinin ilerlemesinde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha yüksek ROS seviyeleri sergilediği bulunmuştur. Bununla birlikte, kanser hücreleri içindeki oksidatif durumu dengeleyen artan antioksidan savunma, yüksek ROS seviyelerinin çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör oluşumunu önleyebileceğini düşündürmektedir (Gurer-Orhan, Ince, Konyar, Saso, & Suzen, 2017).

Pek çok çalışmada Pterostilbenin'in antioksidan olduğu söylenmekle (Mannal et al., 2013) beraber oksidan etkisi olduğunu söyleyen çalışmalar da literatürde bulunmaktadır (Chakraborty et al., 2010).

MCF-7 kanser hücre hatlarında, Pterostilben'in antikanser etkilerinin incelendiği çalışmada; Pterostilben'in apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bu apoptozun MCF-7

hücrelerinde ROS üretimini arttırmasından kaynaklandığı düşünölmüş ve antioksidan enzimler ile bu etkiyi ortadan kaldıramamışlar. Pterostilben'in AKT, Bcl-2 gibi faktörleri inhibe etmesi, Bax gibi apoptotik sinyalleri ve Kaspaz serisini indüklemesi apoptoza neden olabilecek diğler mekanizmalar arasında sayılmıştır (Chakraborty et al., 2010).

Alosi ve arkadaşlarının çalışmasında, Pterostilbenin antioksidan aktivitesini tespit etmek için hidroetidin kullanılarak, O²⁻ (Süperoksit Anyonu) üretimi de gösterilmiştir (Alosi et al., 2010).

Mannal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, Alosi ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olarak, Pterostilben'in uygulandığı meme kanseri hücrelerinde kaspaz salınımını ve O²⁻ üretiminin arttırdığını bildirmişlerdir (Mannal et al., 2010).

Chakraborty ve arkadaşlarının çalışmasında, Pterostilben'in, MCF-7 hücrelerinde ROS üretimini arttırdığı saptanmıştır (Chakraborty et al., 2010).

Chakraborty ve arkadaşlarının çalışmasını doğrular şekilde, çalışmamızda da Pterostilben grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında TOS düzeyinin istatistiksel olarak yüksek olduğu bulundu. Ayrıca Pterostilben grubu ile kıyaslandığında Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda TOS düzeyinin istatistiksel olarak yüksek olduğu bulundu (p<0.05).

Bu bulgular Pterostilben'in etkilerinin doza bağılı olarak değişebileceğini, IC50 dozunda oksidan özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Mikrofluometrik metabolik akış sistemi ile çalışmamızda metabolik sürecin iki ana yolunun Pterostilben ve LDH-A inhibitörünün ayrı ayrı ve kombine olarak oluşturacağı etkiden yola çıkarak, kanser enerji metabolizması ile ilişkili yeni bağlantı mekanizmalarının bulunması amaçlandı.

Çalışmamızın metabolik akış analizi ile ilgili Glikolitik Stres Analizi sonuçlarına bakıldığında, MCF-7 hücrelerinde modölatörlere en iyi yanıt veren grubun, Pterostilben+LDH-A grubu olduğu gözlemlendi. MDA-MB-231 hücreleri, MCF-7 hücrelerine göre modölatörlere ve kullanılan moleküllere OCR ve ECAR değerleri açısından daha etkili sonuç verdi. Bu hücre grubunda, Oligomisin eklenmesi ile

beklenildiği gibi medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış olduğu gözlemlendi ve çalışılan tüm gruplarda bu artış kaydedildi. Bir diğer modülatör olan Kompleks V inhibitörü Oligomisin'in ortama akut olarak eklenmesi ile ATP sentezinde meydana gelen azalma neticesinde hücre medyumuna salınan H⁺ iyonu konsantrasyonundaki artış en yüksek Pterostilben grubunda gözlemlendi. İkinci yüksek değer ise, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben + LDH-A inhibitörü gruplarında kaydedildi.

Mitokondriyal Stres Analizi sonuçlarına bakıldığında, MCF-7 hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt veren grubun, Pterostilben+LDH-A grubu olduğu gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinde üçüncü ölçümün ardından ortama akut olarak Oligomisin eklenmesi ile OCR negatif kontrolde belirgin seviyede artarken, MDA-MB-231 hücrelerinde OCR pozitif kontrol harici tüm gruplarda azaldı. MCF-7 hücrelerinde altıncı ölçümün ardından ortama FCCP'nin eklenmesi ile kombinasyon grubunda diğer gruplara kıyasla fark edilir düzeyde OCR artışı kaydedilirken, MDA-MB-231 hücre gruplarında OCR düzeylerinin tüm gruplarda arttığı kaydedildi. Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde dokuzuncu ölçümden sonra ortama Rotenon /Antimisin A'nın akut olarak eklenmesi tüm gruplarda OCR'da azalma gözlemlendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında en belirgin düzeyde azalma yani modülatörlere en iyi yanıt, Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda gözlemlendi.

Hücre Enerji Fenotipi Analizi sonuçlarına bakıldığında, MCF-7 hücrelerinde yer alan alt grupların IC50 dozlarında muamele edilmesiyle bazal fenotipe kıyasla, stres fenotiplerinin enerjetik yöne en fazla eğilim gösterdiği grubun, Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubu olduğu gözlemlendi. Bu grupta, hücrel enerji fenotipinin enerjetik yola kaydığı görüldü ve bu sonuç mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sisteminin arttığını ve metabolik kaymanın enerjetik yöne doğru olduğunu göstermiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Pterostilben grubunda bazal fenotipe kıyasla stres durumunda, hücrel enerji fenotipinin enerjetik yola kaydığı en yüksek oran olarak kaydedildi. MDA-MB-231 hücrelerinde sırasıyla, bazal fenotipe stres fenotipi arasındaki farkın ikinci en yüksek olduğu değer LDH-A inhibitörü grubu ve üçüncü yüksek ise Pterostilben + LDH-A inhibitörü grubu olduğu

gözlendi. Pterostilben, LDH-A inhibitörü ve Pterostilben+LDH-A inhibitörü gruplarında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sisteminin arttığı görüldü.

Mikrofluidik akış analizi sonuçlarında, pozitif kontrol gruplarında Taxol'un en düşük yanıtı verdiği gözlendi. Literatürde glikoliz aşamasında Fruktoz-6 Fosfat'ı, Fruktoz 1,6 difosfat'a dönüştüren hız kısıtlayıcı enzim olan Fosforuktokinaz 1'in etkisinin Taxol tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Fare melanoma hücrelerine 25 µM dozlarında Taxol uygulandığında, hücre iskeletine bağlı enzimlerde %50 oranında azalma görüldüğü bilinmektedir (Glass-Marmor & Beitner, 1999). Çalışmamızın mikrofluidik akış analiz sonuçlarına göre Taxol, hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatlarında OCR değerlerinde değişiklik yaratmamıştır. Bu durumun, Taxol tarafından glikoliz enzimlerinin inhibe edilmesi neticesi olduğu düşünülmektedir.

MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin her ikisi de invaziv duktal / meme karsinomu hücreleridir. MCF-7 hücreleri, epitelyal hücre fenotipi gösterirken, MDA-MB-231 hücreleri ise mezenkimal karakterdedir. Metabolik olarak MCF-7 hücreleri, normoksik koşullarda oksidatif fosforilasyondan ATP üretimine dayanan Pasteur fenotipini gösterir. Fakat, hipoksik koşullar altında, artmış glikolitik aktivite gösterirler. MDA-MB-231 hücreleri ise, Warburg fenotipi gösterirler. Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda ATP üretimleri glikolize dayalıdır (Theodossiou et al., 2019).

Bulduğumuz sonuçlarda, MDA-MB-231 hücreleri mikrofluometrik akış analizinde MCF-7 hücrelerine göre daha etkin yanıt verdiği gözlendi. Bu durumun hücre karakteristiklerinin farklı olmasından kaynaklanmış olduğu düşünüldü.

Literatürde meme kanseri metabolizması ile ilgili öne çıkan çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalardan ilki Harami ve arkadaşlarının, kapsamlı bir veri tabanında hem in siliko ve ıslak laboratuvar çalışmasını içermektedir. Çalışmada, meme kanseri hücre hatlarında TP53 mutasyonunu içeren gruplar ile enerji metabolizması arasındaki ilişki araştırılmıştır. Kanser hücrelerinde yaygın olarak mutasyon geçiren tümör baskılayıcı gen TP53'teki mutasyon ile metabolizma arasındaki korelasyonun değerlendirilerek, hücre hatlarına metabolik inhibitörlerin uygulandığı araştırmada, TP53 geni açısından mutant olan meme

kanserli hücre hatlarında, daha yüksek glikolitik ve mitokondriyal aktivite olduğu gösterilmiştir (Harami-Papp et al., 2016).

Kanser hücrelerinde aerobik glikolizin regülasyonundaki mekanizmalar henüz net bir şekilde aydınlatılamamıştır. Konu ile ilgili literatüre bakıldığında, glikoz taşıyıcıları ve glikolitik süreçte hız kısıtlayıcı fonksiyonu bulunan heksokinazların glikolitik süreci regüle ettiği görülmektedir. Kanserde, değişmiş enerji metabolizmalarında önemli bir rolü olan transkripsiyon faktörü HIF1 α ' (Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1 α)nın glikolitik süreçte etkin bir rolü bulunmaktadır. HIF1 α , hipoksik strese karşı kritik genleri indükler. Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da HIF1 α 'nın hedefi olarak monometiltransferaz SETD8'in kanser hücre çoğalması ve metabolizması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. SETD8'in, HIF1 α 'nın transkripsiyonel hedefi olduğunun gösterildiği çalışmada, SETD8'in susturulduğu hücre hattı olan MDA-MB-231'de glikoliz miktarının ve OCR'ın azaldığını bildirmişlerdir. Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HIF1 α 'nın hedefi olarak monometiltransferaz SETD8'in kanser hücre çoğalması ve metabolizması üzerinde doğru orantı gösterdiğini bildirmişlerdir. SETD8, anabolik metabolizmanın pozitif düzenleyicisi olarak değerlendirmiştir (Huang et al., 2017).

Bizim çalışmamız, Huang ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bir protein hedefleyerek metabolizmanın araştırıldığı bir çalışma olmayıp, meme kanser hücrelerindeki enerji metabolizmasının karşılaştırması bakış açısıyla ele alınmıştır. Hücre enerji fenotipi sonuçlarına göre, MCF-7 hücrelerinde stres sonrası metabolik yöne eğilim en yüksek Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda gözlenmişken, MDA-MB-231 hücrelerinde, stres sonrası metabolik yöne eğilimin en yüksek olduğu grup Pterostilben grubu olmuştur.

8. SONUÇ

Meme kanseri hücre hatlarında Pterostilben+LDH-A inhibitörü grubunda yüksek Asetil KoA, düşük Laktat, yüksek ADP/ATP Translokaz ve yüksek OSİ değerleri gözlemlendi. Pterostilben+LDH-A inhibitörü kombinasyonunun hücrede glikolitik metabolizmadan oksidatif metabolizmaya önemli bir değişimi sağladığı ve mitokondri fonksiyonlarını iyileştirdiği düşünüldü. Kullanılan meme kanseri hücrelerinin farklı karakterlerde olması, uygulanan IC50 değerlerinde enerji metabolizması analizinde farklı etkinlikte sonuç vermesine neden oldu. Mezenkimal karakter sergileyen MDA-MB-231 hücreleri mikrofluidik akış sisteminde daha etkin yanıt verdi. Pterostilben+LDH-A inhibitörü kombinasyonunun, tek başına Pterostilben ve tek başına LDH-A inhibitörü ile kıyaslandığında, hücrede glikolitik metabolizmadan oksidatif metabolizmaya daha etkin bir değişim sağladığı ve mitokondri fonksiyonlarını iyileştirdiği düşünüldü.

Birlikte ele alındığında, hızlı, hassas ve yüksek verimli metabolik substrat akışı analizi yöntemleri, hücresel metabolizmayı düzenleyen genetik ve epigenetik yolların daha iyi anlaşılması ve kanser metabolizmasını hedefleyen tedavilerin geliştirilmesi için değerli yaklaşımlar sunacağı kanaatini oluşturdu.

9. KAYNAKLAR

- Adams, L. S., Kanaya, N., Phung, S., Liu, Z., & Chen, S. (2011). *Whole Blueberry Powder Modulates the Growth and Metastasis of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Tumors in Nude Mice 1 – 3*. <https://doi.org/10.3945/jn.111.140178.the>
- Adly, A. A. M. (2010). Oxidative stress and disease: An updated review. *Research Journal of Immunology*, Vol. 3, pp. 129–145. <https://doi.org/10.3923/rji.2010.129.145>
- Akinwumi, B. C., Bordun, K. A. M., & Anderson, H. D. (2018). Biological activities of stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 792. <https://doi.org/10.3390/ijms19030792>
- Alosi, J. A., McDonald, D. E., Schneider, J. S., Privette, A. R., & McFadden, D. W. (2010). Pterostilbene Inhibits Breast Cancer In Vitro Through Mitochondrial Depolarization and Induction of Caspase-Dependent Apoptosis1. *Journal of Surgical Research*, 161(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.07.027>
- Andlauer, W., Kolb, J., Siebert, K., & Furst, P. (2000). Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 26(2), 47–55. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10894555
- Andreotti, P. E., Hartmann, D. M., Linder, D., Harel, G., Gleiberman, I., Caruso, P. A., ... Bruckner, H. W. (1995). Chemosensitivity Testing of Human Tumors Using a Microplate Adenosine Triphosphate Luminescence Assay: Clinical Correlation for Cisplatin Resistance of Ovarian Carcinoma. *Cancer Research*, 55(22), 5276–5282.
- Ban, H. S., Kim, B.-K., Lee, H., Kim, H. M., Harmalkar, D., Nam, M., ... Won, M. (2017). The novel hypoxia-inducible factor-1 α inhibitor IDF-11774 regulates cancer metabolism, thereby suppressing tumor growth. *Nature Publishing Group*, 8(6), e2843-8. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.235>
- Billiard, J., Dennison, J. B., Briand, J., Annan, R. S., Chai, D., Colón, M., ... Duffy, K. J. (2013). Quinoline 3-sulfonamides inhibit lactate dehydrogenase A and reverse aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer & Metabolism*, 1(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-19>
- Birnbaum, M. J., Haspel, H. C., & Rosen, O. M. (1987). Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3029870>
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., & Sabatini, D. M. (2015). An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>

- Boerner, P., Resnick, R. J., & Racker, E. (1985). Stimulation of glycolysis and amino acid uptake in NRK-49F cells by transforming growth factor beta and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2004.07.037>
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., & Beliveau, R. (2007). Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NF kappa B by edible berry juice. *Anticancer Research*, 27(2), 937–948. Retrieved from wos:000245563000033
- Boocock, D. J., Patel, K. R., Faust, G. E. S., Normolle, D. P., Marczylo, T. H., Crowell, J. A., ... Steward, W. P. (2007). Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848(2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.017>
- Braden, A., Stankowski, R., Engel, J., & Onitilo, A. (2014). Breast Cancer Biomarkers: Risk Assessment, Diagnosis, Prognosis, Prediction of Treatment Efficacy and Toxicity, and Recurrence. *Current Pharmaceutical Design*, 20(30), 4879–4898. <https://doi.org/10.2174/1381612819666131125145517>
- Carter, L. G., D’Orazio, J. A., & Pearson, K. J. (2014). Resveratrol and cancer: Focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*, Vol. 21, pp. 209–225. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0171>
- Chakraborty, A., Bodipati, N., Demonacos, M. K., Peddinti, R., Ghosh, K., & Roy, P. (2012). Long term induction by pterostilbene results in autophagy and cellular differentiation in MCF-7 cells via ROS dependent pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(1), 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.009>
- Chakraborty, A., Gupta, N., Ghosh, K., & Roy, P. (2010). In vitro evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-oxidant properties of pterostilbene isolated from *Pterocarpus marsupium*. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1215–1228. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.02.007>
- Chang, T. K., Lee, W. B., & Ko, H. H. (2000). Trans-resveratrol modulates the catalytic activity and mRNA expression of the procarcinogen-activating human cytochrome P450 1B1. *Can J Physiol Pharmacol*, 78(11), 874–881. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11100935
- Chen, R. J., Kuo, H. C., Cheng, L. H., Lee, Y. H., Chang, W. T., Wang, B. J., ... Cheng, H. C. (2018). Apoptotic and nonapoptotic activities of pterostilbene against cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms19010287>
- Chun, Y. J., Oh, Y. K., Kim, B. J., Kim, D., Kim, S. S., Choi, H. K., & Kim, M. Y. (2009). Potent inhibition of human cytochrome P450 1B1 by tetramethoxystilbene. *Toxicology Letters*, 189(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.005>

- Cléménçon, B., Babot, M., & Trézéguet, V. (2013). The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): Pathological implications of its dysfunction. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 34. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.006>
- Coimbra, M., Isacchi, B., Van Bloois, L., Torano, J. S., Ket, A., Wu, X., ... Schiffelers, R. M. (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(2), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.056>
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C., & Beaudoux, J. L. (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, Vol. 54, pp. 7–16. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900437>
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23(3), 536–545. <https://doi.org/10.1042/bj0230536>
- Das, S., Lin, H. S., Ho, P. C., & Ng, K. Y. (2008). The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharmaceutical Research*, 25(11), 2593–2600. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9677-1>
- Dellinger, R. W., Gomez Garcia, A. M., & Meyskens, F. L. (2014). Differences in the Glucuronidation of Resveratrol and Pterostilbene: Altered Enzyme Specificity and Potential Gender Differences. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(2), 112–119. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-012>
- Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazué, F., Ghiringhelli, F., & Latruffe, N. (2011). Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 48–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05871.x>
- Dragovich, P. S., Fauber, B. P., Corson, L. B., Ding, C. Z., Eigenbrot, C., Ge, H., ... Zhang, X. (2013). Identification of substituted 2-thio-6-oxo-1,6-dihydropyrimidines as inhibitors of human lactate dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(11), 3186–3194. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.001>
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., & Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>
- Fauber, B. P., Dragovich, P. S., Chen, J., Corson, L. B., Ding, C. Z., Eigenbrot, C., ... Yue, Q. (2013). Identification of 2-amino-5-aryl-pyrazines as inhibitors of human

- lactate dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(20), 5533–5539. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.060>
- Fentiman, I. S., Fourquet, A., & Hortobagyi, G. N. (2006). Male breast cancer. *The Lancet*, 367(9510), 595–604. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68226-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68226-3)
- Flaveny, C. A., Griffett, K., El-Gendy, B. E. D. M., Kazantzis, M., Sengupta, M., Amelio, A. L., ... Burris, T. P. (2015). Broad Anti-tumor Activity of a Small Molecule that Selectively Targets the Warburg Effect and Lipogenesis. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.007>
- Flier, J. S., Mueckler, M. M., Usher, P., & Lodish, H. F. (1987). Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3103217>
- Glass-Marmor, L., & Beitner, R. (1999). Taxol (paclitaxel) induces a detachment of phosphofructokinase from cytoskeleton of melanoma cells and decreases the levels of glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate and ATP. *European Journal of Pharmacology*, 370(2), 195–199. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00155-7)
- Gotwals, P., Cameron, S., Cipolletta, D., Cremasco, V., Crystal, A., Hewes, B., ... Dranoff, G. (2017). Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 17, pp. 286–301. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.17>
- Granchi, C., Roy, S., Giacomelli, C., MacChia, M., Tuccinardi, T., Martinelli, A., ... Minutolo, F. (2011). Discovery of N-hydroxyindole-based inhibitors of human lactate dehydrogenase isoform A (LDH-A) as starvation agents against cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(6), 1599–1612. <https://doi.org/10.1021/jm101007q>
- Granchi, C., Roy, S., Mottinelli, M., Nardini, E., Campinoti, F., Tuccinardi, T., ... Minutolo, F. (2011). Synthesis of sulfonamide-containing N-hydroxyindole-2-carboxylates as inhibitors of human lactate dehydrogenase-isoform 5. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(24), 7331–7336. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.031>
- Gurer-Orhan, H., Ince, E., Konyar, D., Saso, L., & Suzen, S. (2017). The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 25(33), 4084–4101. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170711114336>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2012). Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 211–215. <https://doi.org/10.1084/jem.20120162>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Harami-Papp, H., Pongor, L. S., Munkácsy, G., Horváth, G., Nagy, Á. M., Ambrus, A., ... Hajnalka Harami-Papp, Lőrinc S. Pongor, Gyöngyi Munkácsy, Gergő Horváth, Ádám M. Nagy, Attila Ambrus, Péter Hauser, András Szabó, László Tretter, B. G. (2016). TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. *Oncotarget*, 7(41), 67183–67195. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11594>
- Hiraki, Y., Rosen, O. M., & Birnbaum, M. J. (1988). Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *Journal of Biological Chemistry*.
- Hortobagyi, G. N., de la Garza Salazar, J., Pritchard, K., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C. A., ... Albain, K. S. (2005). The Global Breast Cancer Burden: Variations in Epidemiology and Survival. *Clinical Breast Cancer*, 6(5), 391–401. <https://doi.org/10.3816/CBC.2005.n.043>
- Huang, R., Yu, Y., Zong, X., Li, X., Ma, L., & Zheng, Q. (2017). Monomethyltransferase SETD8 regulates breast cancer metabolism via stabilizing hypoxia-inducible factor 1?? *Cancer Letters*, 390, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.038>
- Hunter EM1, Sutherland LA, Cree IA, Subedi AM, Hartmann D, Linder D, A. P. (1994). *The Influence of storage on cytotoxic drug activity in an ATP based chemosensitivity assay. 1994..pdf* (pp. 171–176). pp. 171–176. Anticancer Drugs.
- Kapetanovic, I. M., Muzzio, M., Huang, Z., Thompson, T. N., & McCormick, D. L. (2011). Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(3), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1525-4>
- Klumpe, I., Savvatis, K., Westermann, D., Tschöpe, C., Rauch, U., Landmesser, U., ... Dörner, A. (2016). Transgenic overexpression of adenine nucleotide translocase 1 protects ischemic hearts against oxidative stress. *Journal of Molecular Medicine*, 94(6). <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1413-4>
- Kolappan, S., Shen, D. L., Mosi, R., Sun, J., McEachern, E. J., Vocadlo, D. J., & Craig, L. (2015). Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 185–195. <https://doi.org/10.1107/S1399004714024791>
- Kosuru, R., Rai, U., Prakash, S., Singh, A., & Singh, S. (2016). Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 789, pp. 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.046>
- Kuhnle, G., Spencer, J. P. E., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srail, S. K. S., ... Hahn, U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 212–217. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2750>
- Langcake, P., Cornford, C. A., & Pryce, R. J. (1979). Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, 18(6), 1025–1027.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91470-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91470-5)

- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(76\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(76)90077-1)
- Larronde, F., Richard, T., Delaunay, J. C., Decendit, A., Monti, J. P., Krisa, S., & Mérillon, J. M. (2005). New stilbenoid glucosides isolated from *Vitis vinifera* cell suspension cultures (cv. Cabernet Sauvignon). *Planta Medica*, 71(9), 888–890. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871294>
- Liang, C., Qin, Y., Zhang, B., Ji, S., Shi, S., Xu, W., ... Xu, J. (2017). ARF6, induced by mutant Kras, promotes proliferation and Warburg effect in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 388, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.014>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., & Miró, M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922(1–2), 359–363. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00913-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00913-X)
- Lu, H., Li, X., Luo, Z., Liu, J., & Fan, Z. (2013). Cetuximab reverses the Warburg effect by inhibiting HIF-1-regulated LDH-A. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12, 2187–2199. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1245>
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3)
- Makhoul, I., Atiq, M., & Alwbari, A. (2018). Breast Cancer Immunotherapy : An Update. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 12, 1–15. <https://doi.org/10.1177/1178223418774802>
- Mannal, P., McDonald, D. E., McFadden, D. W., Alosi, J. A., McDonald, D. E., Schneider, J. S., ... McCormack, Denise; McFadden, D. (2013). A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and DiseaseModification. *Journal of Surgical Research*, 2013(2), 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/575482>
- Mannal, P., McDonald, D., & McFadden, D. (2010). Pterostilbene and tamoxifen show an additive effect against breast cancer in vitro. *American Journal of Surgery*, 200(5), 577–580. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2010.07.022>
- Marier, J.-F. (2002). Metabolism and Disposition of Resveratrol in Rats: Extent of Absorption, Glucuronidation, and Enterohepatic Recirculation Evidenced by a

- Linked-Rat Model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), 369–373. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.033340>
- Mathiyalagan, R., & Yang, D. C. (2017). Ginseng nanoparticles: A budding tool for cancer treatment. *Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0070>
- McCormack, Denise; McFadden, D. (2013). A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(3), 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/575482>
- McCormack, D., & McFadden, D. (2012). Pterostilbene and cancer: Current review. *Journal of Surgical Research*, 173(2), e53–e61. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.054>
- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., ... Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21349>
- Moon, D., McCormack, D., McDonald, D., & McFadden, D. (2013). Pterostilbene induces mitochondrially derived apoptosis in breast cancer cells in vitro. *Journal of Surgical Research*, 180(2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.04.027>
- Nagao, K., Jinnouchi, T., Kai, S., & Yanagita, T. (2017). Pterostilbene, a dimethylated analog of resveratrol, promotes energy metabolism in obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 43, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.009>
- Neves, A. R., Lúcio, M., Martins, S., Lima, J. L. C., & Reis, S. (2013). Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 177–187. <https://doi.org/10.2147/IJN.S37840>
- Niu, W., Luo, Y., Wang, X., Zhou, Y., Li, H., Wang, H., ... Zhou, M. (2018). BRD7 inhibits the Warburg effect and tumor progression through inactivation of HIF1 α /LDHA axis in breast cancer article. *Cell Death and Disease*, 9(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0536-7>
- Pantusa, M., Bartucci, R., & Rizzuti, B. (2014). Stability of trans -resveratrol associated with transport proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4384–4391. <https://doi.org/10.1021/jf405584a>
- Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., & Charpentier, C. (1999). Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00044-6)
- Pavan, A. R., da Silva, G. D. B., Jornada, D. H., Chiba, D. E., Dos Santos Fernandes, G. F., Chin, C. M., & dos Santos, J. L. (2016). Unraveling the anticancer effect of curcumin and resveratrol. *Nutrients*, Vol. 8, p. 628.

<https://doi.org/10.3390/nu8110628>

- Racker, E. (1972). Racker Efraim and Bioenergetics of Tumor Growth the Problem. *American Scientist*, 60(1), 56–63.
- Remsberg, C. M., Martinez, S. E., Akinwumi, B. C., Anderson, H. D., Takemoto, J. K., Sayre, C. L., & Davies, N. M. (2015). Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics and Content Analysis of Gnetol in Foodstuffs. *Phytotherapy Research*, 29(8), 1168–1179. <https://doi.org/10.1002/ptr.5363>
- Remsberg, C. M., Yáñez, J. A., Ohgami, Y., Vega-Villa, K. R., Rimando, A. M., & Davies, N. M. (2008). Pharmacometrics of pterostilbene: Preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytotherapy Research*, 22(2), 169–179. <https://doi.org/10.1002/ptr.2277>
- Riche, D. M., McEwen, C. L., Riche, K. D., Sherman, J. J., Wofford, M. R., Deschamp, D., & Griswold, M. (2013). Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene. *Journal of Toxicology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/463595>
- Rimando, A. M., Cuendet, M., Desmarchelier, C., Mehta, R. G., Pezzuto, J. M., & Duke, S. O. (2002). Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3453–3457. <https://doi.org/10.1021/jf0116855>
- Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., & Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4713–4719. <https://doi.org/10.1021/jf040095e>
- Rinaldi, L., Sepe, M., Delle Donne, R., Conte, K., Arcella, A., Borzacchiello, D., ... Feliciello, A. (2017). Mitochondrial AKAP1 supports mTOR pathway and tumor growth. *Cell Death and Disease*, 8(6), e2842. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.241>
- Rius, C., Abu-Taha, M., Hermenegildo, C., Piqueras, L., Cerda-Nicolas, J.-M., Issekutz, A. C., ... Sanz, M.-J. (2010). Trans- but Not Cis-Resveratrol Impairs Angiotensin-II-Mediated Vascular Inflammation through Inhibition of NF- B Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Upregulation. *The Journal of Immunology*, 185(6), 3718–3727. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001043>
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Mérillon, J. M. (2012). Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, Vol. 29, pp. 1317–1333. <https://doi.org/10.1039/c2np20049j>
- Ruprecht, J. J., & Kunji, E. R. (2019). Structural changes in the transport cycle of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 57. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.029>
- Seshadri, T. R. (1972). Polyphenols of Pterocarpus and Dalbergia woods. *Phytochemistry*,

Vol. 11, pp. 881–898. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88430-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88430-7)

- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Signorelli, P., & Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: Molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(8), 449–466. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.017>
- Silva, C. G., Monteiro, J., Marques, R. R. N., Silva, A. M. T., Martínez, C., Canle L., M., & Faria, J. L. (2013). Photochemical and photocatalytic degradation of trans-resveratrol. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 12(4), 638–644. <https://doi.org/10.1039/c2pp25239b>
- Silva, F., Figueiras, A., Gallardo, E., Nerín, C., & Domingues, F. C. (2014). Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids. *Food Chemistry*, 145, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.034>
- Sullivan, L. B., Gui, D. Y., Hosios, A. M., Bush, L. N., Freinkman, E., & Vander Heiden, M. G. (2015). Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>
- Sun, S., Liu, J., Zhao, M., Han, Y., Chen, P., Mo, Q., ... Wu, P. (2017). Loss of the novel mitochondrial protein FAM210B promotes metastasis via PDK4-dependent metabolic reprogramming. *Cell Death and Disease*, 8(6), e2870. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.273>
- Szafer, H., Cichocki, M., Brauze, D., & Baer-Dubowska, W. (2004). Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutrition and Cancer*, 48(1), 70–77. https://doi.org/10.1207/s15327914nc4801_10
- Teguo, P. W., Fauconneau, B., Deffieux, G., Huguet, F., Vercauteren, J., & Merillon, J. M. (1998). Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Journal of Natural Products*, 61(5), 655–657. <https://doi.org/10.1021/np9704819>
- The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. (2002). Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *Cancer Spectrum Knowledge Environment*, 94(8), 606–616. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.8.606>
- Theodossiou, T. A., Ali, M., Grigalavicius, M., Grallert, B., Dillard, P., Schink, K. O., ... Berg, K. (2019). Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT–tamoxifen hybrid therapy. *Npj Breast Cancer*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0108-8>
- Therapy, G., Vol, M. B., Torrero, M. N., & Li, S. (2004). *Growth factor receptors : targets*

- for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment *Review Article*. 8, 175–180.
- Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 10, pp. 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrd3504>
- Viale, A., Pettazzoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sánchez, N., Marchesini, M., ... Draetta, G. F. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13611>
- Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, (1), 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- Wang, S. Y., Wei, Y. H., Shieh, D. Bin, Lin, L. L., Cheng, S. P., Wang, P. W., & Chuang, J. H. (2015). 2-Deoxy-D-glucose can complement doxorubicin and sorafenib to suppress the growth of papillary thyroid carcinoma cells. *PLoS ONE*, 10(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130959>
- Warburg, B. Y. O., & Wind, F. (1926). *I. Killing-Off of Tumor Cells in Vitro* .
- Warburg, O. (1956). Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, Otto. (1925). The metabolism of carcinoma cells 1. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148–163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>
- Warburg, Otto. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Whitlock, N. C., & Baek, S. J. (2012). The anticancer effects of resveratrol: Modulation of transcription factors. *Nutrition and Cancer*, Vol. 64, pp. 493–502. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.667862>
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (pp. 1–32). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
- Wong, A. S. T., Che, C. M., & Leung, K. W. (2015). Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: A functional and mechanistic overview. *Natural Product Reports*, Vol. 32, pp. 256–272. <https://doi.org/10.1039/c4np00080c>
- Yang, N.-C., Lee, C.-H., & Song, T.-Y. (2010). Evaluation of resveratrol oxidation in vitro and the crucial role of bicarbonate ions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(1), 63–68. <https://doi.org/10.1271/bbb.90549>

- Yang, Z., Cheng, W., Hong, L., Chen, W., Wang, Y., Lin, S., ... Gu, J. (2007). Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor-induced apoptosis of MCF-7 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11). <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-12-1161>
- Yu, O., & Jez, J. M. (2008). Nature's assembly line: Biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant Journal*, Vol. 54, pp. 750–762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03436.x>
- Zhang, Y., Shang, Z., Gao, C., Du, M., Xu, S., Song, H., & Liu, T. (2014). Nanoemulsion for Solubilization, Stabilization, and In Vitro Release of Pterostilbene for Oral Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 15(4), 1000–1008. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0129-4>
- Zhou, M., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Liu, Z., Fodstad, O., ... Tan, M. (2010). Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Molecular Cancer*, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-33>

10. ETİK KURUL ONAYI

Etik kurul onayı, 24.01.2018 tarihli 75 numaralı karar ile İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan oybirliği ile alınmıştır (Sayı: 10840098-604.01.01-E.2867).



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.2867
Konu : Etik Kurulu Kararı

26/01/2018

Sayın Elif Yavuz Dokgöz

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Pterostilben ve Laktat Dehidrogenaz İnhibitörünün Kanser Hücre Hatlarında Tümör Metabolizmasına Etkisinin Araştırılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 26.01.2018 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden BE971B45X2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr






İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Pterostilben ve Laktat Dehidrogenaz İnhibitörünün Kanser Hücre Hatlarında Tümör Metabolizmasına Etkisinin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Elif Yavuz Dokgöz			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	18.01.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	18.01.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	Karar No: 75	Tarih: 24/01/2018		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı:	Elif
Soyadı:	YAVUZ DOKGÖZ
Doğum Tarihi:	01.05.1987
E-posta:	elif.ydokgoz@gmail.com

Eğitim Bilgileri:

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Başlangıç Yılı – Mezuniyet Yılı
Doktora	İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı	2015 - Devam Ediyor
Yüksek Lisans	İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2010 - 2013
Lisans + Tezsiz Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Eğitimi Bölümü	2005 - 2010

İş Deneyimi:

Görevi	Kurumun Adı	Başlangıç Yılı – Ayrılış Yılı
Öğretim Görevlisi	İstinye Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	2016 – Devam Ediyor
Aplikasyon Uzmanı	Aka Biyoteknoloji	2013 - 2016
Araştırmacı	İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı	2010 - 2013

Yüksek Lisans Bitirme Tezi

Baş ve Boyun Kanserli Hastalarda DLEC1 Geninin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Danışmanı: Prof. Dr.Turgut Ulutin (2010-2013).

Yayınlar

Seven D., Yavuz Dokgöz E., Kılıç E., Baltacı E. Karaman E., Ulutin T., Buyru N. (2015). DLEC1 is not silenced solely by promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Gene*, 563(1), 83-86.

Yavuz Dokgöz E., Tengirşek E., Güleç M., Akgüner Z.P., Erol T., Emik S., Olgun A., Bal Öztürk A. Comparative Toxicity Assessment of Cancer-Targeted Polymeric Nanoparticles: in vivo *C. elegans* and in vitro Cell Culture Models. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44 (S2), 1-3.

Konferans Bildirileri

Yavuz Dokgöz E., Tengirşek E., Güleç M., Akgüner Z.P., Erol T., Emik S., Olgun A., Bal Öztürk A. In vitro and in vivo Toxicity of Cancer-Targeted Polymeric Nanoparticles. 2nd International Cancer & Ion Channels Congress. 22-24th, September 2019. (Abstract Number: 11392)

Buyru N., Baltacı E., Yavuz Dokgöz E., Seven D., Kilic E., Karaman E. Downregulation of the DLEC1 gene is not associated with promoter methylation in head and neck cancer. EACR-23, Scientific Programme. *European Journal of Cancer* 50, Suppl. 5. 5-6 July 2014.

Akıncı Ş., Özyiğit İ. İ., Çubuk S., Öztürk B., Yalçın İ.E., Yavuz Dokgöz E. (2007). The Effects of Water Stress on Growth Parameters and Total Phenolics of *Cucumis sativus* L. Cucumber Seedlings. *International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs*, Antalya. (Number: 3523624)

Kitap ve Kitap Bölümleri

Yavuz Dokgöz E., 'Elektron Transfer Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon', Sağlık Bilimleri için Temel Biyokimya, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, Bölüm 13, 224-236, 2020