



**MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE
BAZI METABOLİK İNHİBİTÖRLERİN
APOPTOZA OLAN ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Julien Agyemang GYAMFI

Eskişehir 2024

MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE BAZI METABOLİK İNHİBİTÖRLERİN APOPTOZA OLAN ETKİSİ

Julien Agyemang GYAMFI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz Özdemir

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran, 2024

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen TYL-2023-2349 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Julien Agyemang GYAMFI'nın "Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Bazı Metabolik İnhibitörlerin Apoptoza Olan Etkisi" başlıklı tezi 24/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR	
Üye	:Prof. Dr. Güngör KANBAK	
Üye	:Prof. Dr. Zerrin SELLER	

.....
Prof. Dr. Saime ÖNCÜ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Bazı Metabolik İnhibitörlerin Apoptoza Olan Etkisi

Julien Agyemang GYAMFI

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2024

Danışman: Prof.Dr. Filiz Özdemir

Kanser, özellikle de meme kanseri, her yıl milyonlarca ölüme neden olan ve toplumsal üretkenliği önemli ölçüde etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Kanserin türüne, evresine ve lokasyonuna göre tekli veya çoklu tedavi gibi tedavi seçenekleri mevcuttur. Metastatik olmayan meme kanserlerinde ameliyat gibi tedaviler kullanılır. Kansere bağlı ölümlerin %90'ından fazlasından metastaz sorumludur. Kemoterapi metastatik kanserlerin tedavisinde kullanılır çünkü metastatik bölgelere ulaşabilmektedir. Antikanser ilaçları, onkogenez sırasında inhibe edilen apoptotik mekanizmaları yeniden aktive ederek apoptozu teşvik eder. Hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederek etkili kanser tedavisi için metabolik yollar hedeflenebilir. 2-deoksi-D-glikoz ve Lonidamin gibi metabolik inhibitörler, metabolik yollardaki temel enzimleri inhibe ederek tümör büyümesi için gerekli olan aşağı yöndeki ürünlerin mevcudiyetini azaltır.

Bu çalışmada MCF-7 hücre hattında 2-deoksi-D-glikoz ve Lonidamin inhibitörlerinin apoptozdaki rolleri araştırıldı. Lonidamin ve 2-deoksi-D-glikoz inhibitörlerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, MTT ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. RTCA analizine göre, 2-deoksi-D-glikoz ve Lonidamin, 24 saatlik IC₅₀ değerleri sırasıyla 5,9 mM ve 142,3 uM olacak şekilde MCF-7 kanser hücrelerine karşı sitotoksikti. Bu çalışmada hücre ölümünü değerlendirebilmek için, Annexin-V FITC, Kaspaz 3 ve Kaspaz-9 akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirildi. 2-deoksi-D-glikoz ve Lonidamin'in hücre ölümünün apoptoz yoluyla meydana geldiği tespit edildi. Mitokondriyal membran potansiyelinin azalması, kaspaz-9'un ekspresyonu ve ardından kaspaz-3'ün aktivitesi ile kanıtlanan sonuçlarımız, 2-deoksi-D-glikoz ve Lonidaminin apoptoz içsel yollarını aktive ederek hücre ölümüne neden olduğunu gösterdi.

Anahtar Sözcükler: MCF-7 Hücre Dizisi, Apoptoz, Lonidamin, 2-deoksi-D-glukoz, Kaspaz

ABSTRACT

EFFECT OF SOME METABOLIC INHIBITORS ON APOPTOSIS IN BREAST

CANCER CELL LINE

Julien Agyemang GYAMFI

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School, June 2024

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Cancer, particularly breast cancer, is a global health concern, causing millions of deaths annually and significantly impacting societal productivity. Treatment options such as single or multiple therapies are available depending on the type, stage, and location of the cancer. Treatments like surgery are used for non-metastatic breast cancers. Metastasis is responsible for more than 90% of cancer-related deaths. Chemotherapy is used for treating metastatic cancer because it can reach metastatic areas. Anticancer drugs promote apoptosis by reactivating apoptotic mechanisms inhibited during oncogenesis. Metabolic pathways can be targeted for effective cancer treatment by inhibiting cell growth and proliferation. Metabolic inhibitors like 2-deoxy-D-glucose and Lonidamine inhibit essential enzymes in metabolic pathways, reducing the availability of downstream products necessary for tumor growth.

This study investigated the roles of 2-deoxy-D-glucose and Lonidamine inhibitors in apoptosis in the MCF-7 cell line. The cytotoxic effects of Lonidamine and 2-deoxy-D-glucose inhibitors on MCF-7 cells were assessed using the MTT cytotoxicity assay and xCELLigence real-time cell analyzer (RTCA) methods. From the RTCA analysis, 2-deoxy-D-glucose and Lonidamine were cytotoxic to MCF-7 cancer cells, with 24-hour IC₅₀ values of 5.9 mM and 142.3 μ M, respectively. The study utilized Annexin-V FITC labeling and flow cytometry to evaluate cell death through apoptosis, revealing that 2-deoxy-D-glucose and Lonidamine cell death occurs through apoptosis. The expressions of caspase-3 and caspase-9 were assessed.

Evidenced by the mitochondrial membrane potential reduction, expression of caspase-9, and subsequent activity of caspase-3, our results indicated that 2-deoxy-D-glucose and Lonidamine caused cell death by activating apoptosis intrinsic pathways.

Keywords: MCF-7 Cell Line, Apoptosis, Lonidamine, 2-deoxy-D-glucose, Caspase

TEŞEKKÜR

Öncelikle, Türkiye'deki kalışım boyunca bana sonsuz nimetler ve güç veren Evrenin Rabbi Yüce Tanrı'ya şükranlarımı sunmak istiyorum. Beni her anlamda destekleyen aileme ve arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim; sevgileri, ilgileri, duygusal destekleri ve tavsiyeleri beni bu noktaya getirdi.

Tez danışmanım Prof. Dr. Filiz Özdemir'e, bu tez boyunca sağladığı büyük destek, yararlı yorumlar ve yapıcı eleştiriler için özel bir minnettarlık duyuyorum. Bu çalışmanın tamamlanmasına olan katkısı ölçülemez.

Bu araştırmayı destekleyen proje numarası TYL-2023-2349 kapsamında Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Proje hedeflerine ulaşmada büyük katkılar sağlayan ve laboratuvarında çalışmamı gerçekleştirmeme izin veren Biyokimya Bölümü'nden Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi'ye teşekkür ederim. Ayrıca, Biyokimya Bölümü'nün değerli üyeleri Prof. Dr. Zerrin Seller ve Prof.Dr. Halide Edip Temel'e teşekkür ederim.

Son olarak, laboratuvar çalışmaları sırasında destek veren laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim. İstatistiksel analizler ve deney tasarımı sırasında yardımları için Gamze Yılmaz ve Elif Apaydın'a teşekkür ederim.

Fakültedeki ve Türkçe hazırlık kursum süresince ders aldığım tüm hocalarıma, sizinle geçirdiğim değerli zamanlar için teşekkür ederim. Türkiye'deki ve Türkiye dışındaki tüm arkadaşlarıma ve uluslararası topluluğa tekrar teşekkürler, hepinizle tanışmak çok güzel oldu.

Eğitimimi Türkiye'de sponsor eden Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB) özel teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Julien Agyemang GYAMFI

.....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
DENKLEMLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 KANSER.....	1
1.2 KANSER NEDENLERİ VE TÜRLERİ	2
1.3 MEME KANSERİ VE TEDAVİ STRATEJİLERİ	3
1.4 KANSER TEDAVİSİNDE APOPTOZUN ÖNEMİ.....	4
1.5 KANSER HÜCRELERİNDE METABOLİZMA VE KANSER TEDAVİSİNDE METABOLİK İNHİBİTÖRLER.....	5
1.6 GEREKÇE	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 MEME KANSERİ	8
2.1.1 Türler ve Risk Faktörleri	9
2.1.2 Meme Kanseri Teşhisi.....	10
2.1.3 Meme Kanseri için Tedavi Seçenekleri	12
2.2 MCF-7 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATTI.....	13
2.3 KANSER TEDAVİSİNDE APOPTOZ	13
2.3.1 Kanser Tedavisinde Apoptozun Önemi.....	14
2.3.2 Kültürlenmiş hücrelerde Apoptoz Tespiti.....	14
2.3.3 Apoptotik Sinyal Yolları	15
2.3.4 Efektör Yolağı.....	18

Sayfa

2.3.5	Kanser Hücrelerinde Apoptoza Direnç.....	19
2.4	KANSER HÜCRELERİNDE METABOLİZMA.....	19
2.5	KANSER TEDAVİSİNDE METABOLİK İNHİBİTÖRLER	20
2.5.1	Metabolik İnhibitör Türleri.....	21
2.5.2	Metabolik İnhibitörlerin Etki Mekanizmaları.....	23
3.	MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	32
3.1	MATERYALLER	32
3.1.1	Kullanılan Hücre Hatları	32
3.1.2	Kullanılan Bilgisayar programları ve İnternet Kaynakları.....	32
3.1.3	Kullanılan ekipmalar.....	32
3.1.4	Kullanılan kimyasallar	34
3.1.5	Kullanılan ticari kitler.....	35
3.2	YÖNTEMLER	35
3.2.1	Hücre Kültürü Uygumaları	35
3.2.2	Sitotoksiste Testleri	37
3.2.3	Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	38
3.2.4	İstatistiksel Analiz.....	40
4.	BULGULAR.....	41
4.1	SİTOTOKSİSİTE BULGULARI	41
4.1.1	Xcelligence kullanılarak gerçek zamanlı hücre analizi sonuçları	42
4.1.2	MTT Sonuçları.....	46
4.1.3	MTT ve RTCA Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	49
4.1.4	Sitotoksitenin Zamana Bağımlılığı	49
4.2	MCF-7 HÜCRELERİNDE APOPTOZUN İNDÜKLENMESİ.....	50
4.2.1	MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Lonidamin ve 2-Deoksi-D-glukoz İndüklenmiş Apoptoz.....	50
4.2.2	Lonidamin ve 2-Deoksi-D-glukoz ile İndüklenen Apoptozda Kaspaz-3, kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un Bulguları.....	52
4.2.3	Mitokondriyal Geçirgenlik Geçişindeki Değişiklikler.....	55
5.	TARTIŞMA	58
	KAYNAKÇA	65
	EKLER	
	ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Tümör hücrelerinde yukarı regüle edilen Metabolik Yollar	21
Tablo 2.2. Bazı metabolik inhibitörlerin listesi ve kanser hücrelerindeki sitotoksik yolları	22
Tablo 3.1. Kullanılan Bilgisayar programları ve Internet Kaynakları	32
Tablo 3.2. Kullanılan ekipmalar	32
Tablo 3.3. Kullanılan kimyasallar	34
Tablo 3.4. Kullanılan ticari kitler	35
Tablo 4.1. Metabolik inhibitör olarak MCF-7 dizisi üzerine uygulanan 2-DG ve LND'in RTCA ve MTT sonuçlarının Karşılaştırması	49
Tablo 4.2. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücrelerin tespit edilmesi.	51
Tablo 4.3. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik hücrelerin kaspaz ekspresyonlar tespit edilmesi.	53
Tablo 4.4. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 48 saatlik hücrelerin mitokondriyal membran potansiyel tespit edilmesi	56

SEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolları	17
Şekil 2.2. Apoptozun Granzim/Perforin Yolu	18
Şekil 2.3. α -D-glukoz (a) ve 2-deoksi-D-glukozun (b) yapısı	24
Şekil 2.4. Hücrelerde glikoz ve 2-deoksiglikoz metabolizması	25
Şekil 2.5. Lonidamin'in Yapısı (ChemSketch ile oluşturuldu)	28
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 72 saat boyunca farklı 2-deoksi-D-glukoz konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği	42
Şekil 4.2. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı 2-DG konsantrasyonlarının muamelesi ile xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen grafik	43
Şekil 4.3. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 72 saat boyunca farklı Lonidamin konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği	44
Şekil 4.4. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı LND konsantrasyonlarının muamelesi ile xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen grafikleri.	45
Şekil 4.5. 2-MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24 ve 48 saat boyunca farklı 2-DG konsantrasyonlarının muamelesi ile MTT hücre analiz sistemi ile ölçüm sonucu elde edilen grafikleri	47
Şekil 4.6. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24 ve 48 saat boyunca farklı LND konsantrasyonlarının muamelesi ile MTT ile ölçüm sonucu elde edilen grafikleri	48
Şekil 4.7. Metabolik inhibitörlerden 2-DG ve LND xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) elde edilen Sitotoksitenin zamana bağımlılığı (IC ₅₀ dozları)	50
Şekil 4.8. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik total apoptoz (erken ve geç) ve nekrotik hücrelerin grafikleri	51
Şekil 4.9. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücrelerin tespit edilmesi. UL: Nekrotik hücreler; UR: Geç apoptoz; LL: Canlı hücreler; LR: Erken apoptoz	52

Şekil 4.10. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik hücrelerin kaspaz ekspresyonlar tespit edilmesi	54
Şekil 4.11. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 48 saatlik hücrelerin kaspaz ekspresyonlarının tespit edilmesi	55
Şekil 4.12. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 48 saatlik hücrelerin mitokondriyal membran potansiyel grafikleri	57
Şekil 4.13. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yönteminden ile 48 saatlik hücrelerin mitokondriyal membran potansiyel elde edilen grafikleri	57



DENKLEMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Denklem 4.1. MTT için % canlılığın belirlenmesi	41
Denklem 4.2. Konsantrasyonların normalleştirilmesi için	41
Denklem 4.3. RTCA için % canlılığın belirlenmesi	41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
Akt	: Protein kinaz B
AMP	: Adenozin monofosfat
ANAK	: Adjuvan ve Neoadjuvan kemoterapi
As	: Arsenik
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP:	: Adenozin trifosfat
BCSC	: Meme kanseri kök hücreleri
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BRCA2	: Meme kanseri Gen 2
CAV1	: Caveolin-1
CD	: Farklılaşma kümesi
CHOP	: C/EBP homolog protein
CoA	: Koenzim A
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü

EB	: Ethidium bromid
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMK	: Erkek meme kanseri
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
ER+	: Östrojen reseptörü pozitif
ErbB2	: Hümanize epidermal büyüme faktörü reseptörü
F-6P	: Fruktoz-6-fosfat
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanı
FasL/FasR	: FS-7 ile ilişkili yüzey antijeni Ligand/Reseptör
FBS	: Fetal sığır serumu
FLS	: Fibroblast benzeri sinoviyositler
G-6P	: Glukoz-6-Fosfat
GBCI	: Küresel Meme Kanseri Girişimi
HCN	: Hidrojen siyanür
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2
HMOX1	: Hem oksijenaz 1
HIF- α	: Hipoksi ile indüklenbilir faktör
HK	: Heksokinaz
HT	: Hormon tedavisi
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu

ICAD	: Kaspazla aktifleşen DNaz inhibitörü
IRE1	: İnositol gerektiren enzim 1
IMK	: İnflamatuvar meme kanseri
JNK/SAPK	: c-Jun N-terminal kinaz/ Stresle aktive olan protein kinaz
KMK	: Kadın meme kanseri
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LND	: Lonidamin
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı
MK	: Meme kanseri
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mPTP	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği
mRNA	: Mikro RNA
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NDRG1 ve 2	: N-myc aşağı yönde düzenlenmiş gen 1 ve 2
NH ₃	: Amonyak

NSABP	: Ulusal Cerrahi Adjuvan Meme Programı
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlardır
Pb	: Kurşun
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PET	: Pozitron emisyon tomografi
PI3K	: Fosfatidilinositol-3 kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PKR	: Pankreatik ER kinaz
PTDSS2	: Fosfatidil serin sentaz 2
PVA	: Polivinil alkol
RAD51	: RAD51 rekombinaz
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RTCA	: xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SGK1	: Serum/glukokortikoidle düzenlenen kinaz 1
TNF/TNFR1	: Tümör nekroz faktörü/ tümör nekroz faktörü reseptör 1
TRADD	: TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı
UPR	: katlanmamış protein tepkisini
UV	: Ultraviole
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

XRCC2 ve 3 : X-Ray Onarımı Çapraz Tamamlayıcı

°C : Santigrat derece

$\Delta\Psi_m$: Mitochondrial membrane permeability change

% : Yüzde

μL : Mikrolitre

μM : Mikromolar

2-DG : 2-deoksi-D-glukoz

1. GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser, anlaşılması zor ve korkutucu bir hastalık veya bir hastalık dizisidir. Milyonlarca yıldır çok hücreli organizmaların başına bela olmuştur. Kanser sağlıklı vücut dokularını istila edebilir ve yok edebilir. Kanser, normal hücrelerin kontrolsüz şekilde büyümesi olarak tanımlanır. Kanser, normal hücre büyümesi, bölünmesi ve ölüm süreçlerine müdahale eden bir veya daha fazla mutasyon nedeniyle gelişir. Mutasyonlar, normal hücre bölünmesini düzenleyen genlerin işlevini yerine getirememesine, yanlış zamanda aktive olmasına veya değişmesine neden olan, DNA'nın nükleotid dizilimindeki kalıcı değişikliklerdir. İnsanlarda, büyüme veya çoğalma genlerinde onarılmamış genetik değişikliklerin (mutasyonların) birikmesi, kanserin gelişmesi ve ilerlemesiyle sonuçlanır. Organizmanın bir bölgesinde başlayabilir ve metastaz yoluyla diğer bölgelere yayılabilir. Ölüm oranına katkıda bulunan önemli faktörlerden biridir ve 2020 yılında on milyondan fazla ölüme neden olmuştur ([http-1](#)). Kanser, konakçıdaki çeşitli yollardan yararlanırken, kendi yararı için diğerlerinden ödün verir. Aktipis'in kitabına haklı olarak 'Hile Yapan Hücre' adını verdiği gibi, kanserin vücudu temel metabolitlerden aldattığı, hücre ölümünü tehlikeye attığı ve diğer hücrelere sızdığı söylenebilir. Kanser, büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, büyüme kısıtlamalarına karşı duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kaçınma, sonsuz çoğalma potansiyeli, kalıcı anjiyogenez, doku istilası ve metastaz ile karakterize edilir. Cerrahi ve radyasyon gibi lokalize kanser tedavileri etkilidir, ancak metastatik kanserler vücudun tüm organlarına ulaşma yetenekleri nedeniyle kemoterapi, hormon tedavisi ve biyolojik tedaviler gerektirir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015).

Kanser vücutta her yerde görülebilen ve belirli bir bölgeyle sınırlı değildir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (Cancer Today's rating), 2020 yılında cinsiyete bakılmaksızın 0-74 yaş arası kişilerde tüm kanser türlerinde en yüksek vaka sayısının Asya'da görüldüğünü belirtmektedir. Avrupa uzak ara ikinci sırada yer alırken, onu sırasıyla Kuzey Amerika, Latin Amerika, Karayipler, Afrika ve Okyanusya takip ediyor. Raporda, Asya'nın 4.262.855 ile en yüksek ölüm sayısına sahip olduğu, onu Avrupa ve Afrika'nın izlediği belirtilmektedir. Okyanusya en düşük tahmini ölüm sayısına sahiptir ([http-1](#)). Bu düzeyde

görölme ve ölüm oranına sahip olan hastalık, henüz tam bir tedavisi olmadığı için bir gizem olarak kalmaya devam etmektedir.

1.2 Kanseri Nedenleri ve Türleri

Kanser, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ile DNA hasarını ve tümör gelişimini düzenleyen tümör duyarlılık gen mutasyonlarından kaynaklanır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Kanserinin altında yatan faktörler, DNA mutasyonlarına neden olan faktörlere ve mutasyonun bir sonraki nesile aktarılma yeteneğine göre tanımlanmaktadır.

Bazı kanserler aileden kalıtsal olarak aktarılmaktadır. Ebeveynlerden çocuğa aktarılan mutasyona uğramış olan anormal genler de kansere sebep olabilmektedir. Örneğin, germline p53 gen defektleri, bağ dokusu tümörleri üretmeye kalıtsal bir yatkınlığa neden olarak Li-Fraumeni Sendromu gibi %100 penetranslı kanserlere yol açar. Başka bir örnek verecek olursak, kalıtsal nonpolipozis kolon kanseri, DNA uyumsuzluğu onarım süreçlerindeki kusurların neden olduğu tipik bir kalıtsal kanser duyarlılık durumudur. Bu kusuru miras alan kişilerde kanser gelişme olasılığı yüksektir (Nelson ve Cox, 2017). Bununla birlikte, kanseri ebeveynlerden edinilen genlerle ilişkilendiren kesin bir kanıt yoktur (Fletcher ve Houlston, 2010).

Tütün ürünlerinde bulunan zararlı kimyasallar (karsinojenler) kansere neden olabilir (Fararjeh vd., 2019). Bu kanserojenlerden bazıları hidrojen siyanür (HCN), formaldehit, kurşun (Pb), arsenik (As), amonyak (NH₃), benzen, tütüne özgü nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlardır (PAH'lar) (http-1). Bu kimyasalların tütündeki varlığı, dünya çapında sigara içenlerde görülen yüksek kanser insidansının nedenidir. Günlük yaşam, bizi tütün kullanımından kaynaklanmayan kanserojenlere maruz bırakmaktadır. Kanseröjenler bebek pudrası, makyaj malzemeleri, ter önleyiciler ve saç boyaları gibi ürünlerde bulunmaktadır. Diğer kanserojen kaynaklar ise akrilamid, asbest, aspartam ve suyun klorlanmasıdır (http-1).

Bazı malignitelerin ortaya çıkışında beslenme ve fiziksel aktivitenin rolü vardır. Dünya Kanser Araştırma Fonu, ABD'de teşhis edilen kanser vakalarının %18'inde vücut

yağlanması, fiziksel aktivite eksikliği, alkol kullanımı ve kötü beslenmenin etken olduğunu bildirmektedir (http-1).

Bazı bakteri ve parazitler hücrelerin içindeki genleri etkileyebildiğinden enfeksiyonlar kanser riskini artırır (Farrell, 2016). *Helicobacter pylori* (Cherif, 2019) ve *Chlamydia trachomatis* bakterileri (Al-Zeer vd., 2017) ile *Opisthorchis viverrine* (Matchimakul vd., 2015) ve *Clonorchis sinensis* parazitleri bazı kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, enfeksiyonlar kansere karşı bağışıklık fonksiyonunun azalmasına neden olabilmektedir.

X-ışınları ve gama ışınları, radon, ultraviyole (UV) radyasyon, radyofrekans radyasyonu, elektrik hatları, cep telefonları ve cep telefonu kuleleri gibi iyonlaştırıcı radyasyonlara maruz kalmak, vücutta DNA mutasyonlarına ve dolayısıyla kansere neden olabilen reaktif radikal türlerinin oluşumuna yol açabilmektedir (Engram vd., 2022).

Kanserlerin isimlendirilmesi, orijin hücre, doku veya organa ve vücuttaki bazı benzersiz özelliklere dayanmaktadır. 100'den fazla kanser türü sınıflandırılmıştır. En yaygın olanları mesane, meme, kolon, rektum, lösemi, karaciğer, akciğer, melanom, pankreas ve prostat kanserleridir. Bu kanser vakalarının bazıları, uyarlanmış davranışlar, çevresel değişiklikler ve bağımlılıklar nedeniyle giderek artan bir hızla artmaktadır. Deri melanomu insidansı 40 yıl öncesine göre altı kat daha fazladır ve UV ışığına maruz kalma en önemli çevresel risk faktörüdür (Welch vd., 2021) Doğal olmayan cinsel aktivitelerin benimsenmesi nedeniyle ağız (Osborne vd., 2014) ve boğaz (Emmett vd., 2018) kanserlerinin oranı artmaktadır.

1.3 Meme Kanseri ve Tedavi Stratejileri

Meme kanseri, küresel olarak her yıl iki milyondan fazla kadını etkilemekte ve 500,000'den fazla ölümden sorumlu olmaktadır (Wilkinson ve Gathani, 2022). Meme kanserinin şiddetini artıran faktörler arasında ırk, etnik köken, aile öyküsü, genetik özellikler ve dış etkenlere maruz kalmak yer almaktadır (Hossain vd., 2019; Prakash vd., 2020). Az gelişmiş bölgelerde hayatta kalma oranları en alt seviyededir. Geç teşhis, yetersiz tedavi

olanakları ve kanserin semptomlarının bilinmemesi buna neden olabilmektedir. Dolayısıyla bu durum meme kanseri ve diğer kanserler için bir risk faktörü teşkil etmektedir.

Hastalığın türüne, evresine ve organdaki konumuna göre tekli veya çoklu tedavisi olmak üzere farklı tedavi seçenekleri mevcuttur (Almansour, 2023). Kanserli dokuların veya hücrelerin ortadan kaldırılması için en çok kullanılan tedavi seçenekleri kemoterapi, radyoterapi, hormon ve biyolojik tedaviyi içerir (Almansour, 2023). Çoğu durumda, radyoterapi öncesi ve sonrasında kemoterapi uygulanır. Kemoterapötik ilaçlar, vücudun tüm organlarına ulaşma ve metastatik kanserleri yok etme yetenekleri nedeniyle günümüzde kanser için en sık kullanılan tedavi stratejisidir (M. Jiang vd., 2021). Bu tip ilaçlar, kötü huylu hücrelerde apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin ölümünü teşvik ederler. Bununla birlikte, bu kemoterapötik ajanların normal vücut hücreleri üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir (Was vd., 2022). Bu ajanların seçimi, verimliliklerine ve normal hücreler üzerindeki daha düşük zararlı etkilerine dayanmaktadır. Bununla birlikte, yan etkiler ve düşük verimlilik, kemoterapötik ajanların klinik ortamlarda kullanımını kısıtlamaktadır. Kanser kemoterapisinin etkinliği, kanser hücrelerinin birden fazla kemoterapötik ilaca karşı direnç geliştirmesi anlamına gelen çoklu ilaç direncinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Ayrıca, tümör hipoksisi, radyoterapi direncinde önemli bir faktördür (X. Ma vd., 2020).

1.4 Kanser Tedavisinde Apoptozun Önemi

Antikanser ilaçlar, tümör hücrelerinde apoptozu teşvik eder ve onkogeneze apoptotik mekanizmaları engeller. Warburg etkisi, metabolik yolların değişiminin kansere neden olduğunu ve kanser hücrelerinin enerji üretimi için anaerobik metabolizmayı tercih ettiğini göstermektedir (Liberti ve Locasale, 2016; Tekade ve Sun, 2017). Artan apoptotik oranlar, tümör büyümesini engelleyebilir. Kanserli hücreler, apoptotik yolak genlerindeki mutasyonlar nedeniyle apoptoza direnç gösterir ve bu nedenle apoptozu artıran veya inhibe eden yolları hedef alan tedavilere ihtiyaç duyarlar (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Bu yolların devre dışı bırakılması, proliferatif yolları güçlendirebilir.

1.5 Kanser Hücrelerinde Metabolizma ve Kanser Tedavisinde Metabolik İnhibitörler

Glikoliz, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir enerji ve biyosentez yoludur. Glukoz, glukoz taşıyıcıları aracılığıyla hücreye girer ve hekzokinazlar tarafından glukoz-6-fosfata (G-6P) fosforile edilir. G-6P, fruktoz-6-fosfata (F-6P) izomerize edilir. Kanser hücreleri, enerji (ATP) üretimi, büyüme ve gelişim için en çok glikoliz yolunu tercih eder. Tümör hücreleri, glikolizi oksidatif fosforilasyona tercih eder. Yüksek glukoz maruziyeti sinyal kanallarını aktive edebilir, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE) üretimini artırabilir, antioksidan aktiviteyi azaltabilir ve Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)- α 'yı stabilize ederek EMT kaynaklı kanser büyümesini teşvik edebilir (S. Li vd., 2020; Santos ve Hussain, 2020). Kanser hücreleri laktat dehidrojenazı (LDH) aşırı eksprese ederek glikolitik akışı ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) rejenerasyonunu artırır. Bu durum mikroçevrenin asitlenmesini teşvik ederek tümör anjiyogenezini, invazyonunu ve yayılmasını destekler (de la Cruz-López vd., 2019).

Tümör hücresi metabolizması, normal hücre metabolizmasından önemli ölçüde farklılık göstererek çoğalma, büyüme ve hayatta kalmayı optimize eder. Metabolik yolların hedeflenmesi, kanser hücresi büyümesine ve çoğalmasına müdahale ederek etkili kanser tedavisi potansiyeli sunabilir. Metabolik inhibitörler, nükleik asitler, proteinler veya lipid sentezi gibi temel bileşenleri engelleyerek normal metabolik süreçleri bozabilir ve bu nedenle de yeni antikanser ilaçları geliştirme potansiyeline sahiptir (Schiliro ve Firestein, 2021; Shen vd., 2021).

1.6 Gerekçe

Kanser, her yıl milyonlarca insanın hayatına mal olan ve ciddi küresel sağlık sorunlarına yol açan korkutucu bir hastalıktır. Meme kanseri, yüksek insidansı ile dünya çapında büyük bir sağlık sorunudur. Hastalık oldukça heterojendir ve alt tiplerine göre farklı terapötik rejimler gerektirir (Kashyap vd., 2022). Meme kanseri, ilaç direnci ve kök hücre nüksetmesi nedeniyle ölümcül olmaya devam etmektedir. İlgili direnç ve ölüm oranı nedeniyle etkisini azaltmak için yeni terapötik yaklaşımlar aranmaktadır. Çeşitli kanser tedavi seçenekleri mevcuttur, ancak çoğu maliyetlidir ve genellikle olumsuz yan etkilerle

birlikte gelir. Cerrahi, hormon tedavisi, biyolojik terapi ve radyoterapi maliyetlidir ve yeniden ortaya çıkma riski taşır. Bu maliyet ve nispeten toksik tedavi seçeneklerine alternatifler aranmaktadır. Siklofosfamid ve klorambusil gibi antimitotik ilaçlar 1970'lerde kan kanseri tedavisinde kullanılmış ve modern kemoterapiye öncülük etmiştir (Ahlmann ve Hempel, 2016). 1980'lerde bir anti-folat olan metotreksat kullanılmış ancak direnç gelişerek hastalığın nüksetmesine neden olmuştur (Yip ve Papa, 2021). O zamandan beri, yeni kanser tedavilerini belirlemek için kapsamlı ilaç tarama çalışmaları yürütülmektedir. Anti-kanser ilaçlarının süreçlerinin anlaşılması, iyi tanımlanmamış ilaçlarla ilişkili toksisite nedeniyle güvenli ve etkili tedaviler için çok önemlidir. Kemoterapötik ajanlar, kanser tedavisinde tek başına veya diğer tedavi stratejileriyle birlikte yaygın olarak kullanılmakta ve apoptozu indüklemek için temel sinyal yollarını ve metabolik veya proliferatif yolları hedef alarak kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Kanserlin ayırt edici özelliklerinden biri olan metabolik yeniden programlamayı hedef alan yaklaşımlar, etkili kanser tedavisi için benzersiz fırsatlar sunmaktadır.

Kanser hücrelerinde antikanser ilaçları olarak düzenlenen bir veya daha fazla metabolik yolu inhibe edebilen metabolik inhibitörler olan moleküller ve bileşikler üzerinde araştırmalar yapılır. Normal hücreler üzerinde daha az etkiye sahip kanser hücresi biyolojik süreçlerindeki bir veya daha fazla adımı etkileyen çeşitli metabolik inhibitörler tanımlanmıştır. Bazıları kapsamlı olarak çalışılmışken, diğerleri daha az kapsamlı olarak çalışılmıştır. 2-DG ve LND üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, her ikisinin de kanser hücresi apoptozunu tetiklediğini, ancak etkinliklerinin derecesinin hücre hattına göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. 2-DG'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki yüksek öldürücü etkisi (Ciavardelli vd., 2014) ve LND'nin glioblastoma (Davidescu vd., 2015) hücrelerinin büyümesi üzerindeki inhibitör etkisi rapor edilmiştir. Kanser hücrelerinde apoptotik oran ne kadar yüksek olursa, tümörlerin büyümesi de o kadar düşük olur. Dolayısıyla, bu metabolik inhibitörler kanser hücrelerinde apoptotik oranların artmasına yardımcı olarak potansiyel kanser tedavi seçeneklerini artırır.

Hem 2-DG hem de Lonidaminin glikolitik yoldaki heksokinaz enzimini hedef aldığı bildirilmiştir. Ancak, bu inhibitörler, her bir inhibitöre özgü olan diğer yolları hedef alır ve

böylece hücre büyümesi üzerinde farklı inhibitör etkiler gösterir. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde bu iki metabolik inhibitör üzerinde daha az rapor edilen deneysel çalışma dikkat çekicidir. Literatür, MCF-7 İnsan meme kanseri hücrelerinin bu metabolik inhibitörler tarafından öldürülmesinde hangi apoptotik yolun aktive edildiğini belirtmemektedir.

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptoz üzerindeki 2-DG ve Lonidamin etkilerinin incelenmesi, terapötik ajanlar olarak potansiyellerinin anlaşılması, kanser hücrelerinde metabolik modülasyonun aydınlatılması, meme kanserine özgü bilgi edinmesi, mekanistik ayrıntıların ortaya çıkarılması ve gelecekteki klinik uygulamalar için çeviri sonuçlarının araştırılması açısından önemlidir. Bu çalışma, bu iki metabolik engelleyicinin etkinliğine ve özellikle apoptoz bağlamında etki biçimlerine bütünsel bir bakış getirmiştir. Sonuçlar, kanser araştırmaları hakkındaki bilgilerimize katkıda bulunacak ve gelecekteki araştırmalar, ilaç geliştirme ve klinik uygulamalar hakkında bilgi verecektir.

2. GENEL BİLGİLER

1.7 Meme Kanseri

Meme kanseri (MK), yılda bir milyondan fazla kadına tanı konması ve 500.000'den fazla kadının hayatını kaybetmesi nedeniyle önemli bir küresel sağlık sorunudur. Meme kanserlerinin %95'i adenokarsinom olarak sınıflandırılmakta olup, erken evrelerinde yüksek tedavi başarısına sahiptir (Rommasi, 2023). Kadınlar arasında çok yaygın olup ölüm, sakatlık ve hastalık nedenidir. Uluslararası Dünya Kanseri Araştırma Fonu 2020 yılında 2,26 milyon yeni meme kanseri vakası ve 684.996 ölüm bildirmiştir (http-2). Cancer Today tarafından yapılan tahminlere göre 2020 yılında 1.948.321 meme kanseri vakası (0-74 yaş) ve 513.525 ölüm vakası görülmüştür (http-3). Risk faktörleri arasında ırk, etnik köken, aile geçmişi, genetik özellikler, alkol tüketimi ve fiziksel hareketsizlik gibi değiştirilebilir sebepler yer almaktadır (Coughlin, 2019). Hastalık insani gelişmişlikle ilişkilidir, ancak daha az gelişmiş bölgelerde hayatta kalma oranı minimumdur (Wilkinson ve Gathani, 2022). Azamjah ve ark. (2019), Güney Asya, Güneydoğu Asya, Latin Amerika, Karayipler, Orta Avrupa, Kuzey Afrika ve Sahra Altı Afrika olmak üzere yedi bölgedeki meme kanseri ölüm oranlarının 25 yıllık eğilimlerini incelemiştir. Orta Avrupa olan yüksek gelirli bölge hariç, tüm bölgelerde belirgin şekilde daha yüksek ölüm oranları görülmüştür (Azamjah vd., 2019). Dolayısıyla, ekonomik durum kanser ölümlerinde etkili bir faktördür. Hamilelik sırasında genç yaş, orta yaş ve ileri yaş MK riskini etkileyebilir. 40 yaşın altındaki kadınlarda MK, doğurganlıktan etkilenen karmaşık bir durumdur. Son zamanlarda, vakaların %90'ı genç bireylerde görülmektedir ve saldırgan alt tip türleri 40 yaşın altındaki kadınlarda daha yaygındır (Ribnikar vd., 2015).

Meme kanseri araştırmalarının çoğu kadınlardaki kanser üzerine yoğunlaşmaktadır. Bununla birlikte, nadiren de olsa erkeklerde de görülmektedir (tüm MK vakalarının <%1'i). Erkekleri nadir etkileyen fakat farklı bir meme kanseri türü, lenfatik istilaya sahiptir ve hormon reseptörü pozitifdir. Târcoveanu ve arkadaşları (2016) Lasi'deki First Surgical Clinic'te 2008-2015 yılları arasında erkeklerde görülen 319 meme kanseri vakasını analiz eden geriye dönük bir çalışma yürütmüştür. Meme kanseri olan erkeklerin ortalama yaşı 67 olup, kadınlardan on yıl daha yüksektir (Târcoveanu vd., 2016). Erkeklerde meme kanserinin

bir zorluğu da geç teşhis ve kötü prognozudur (Darre vd., 2020). Sigara, diyabet, alkol kullanımı, obezite, kan grubu A, Rh+ ve periüretal adenom MK'li erkekler için risk faktörleridir (Meo vd., 2017; Târcoveanu vd., 2016). Saskatchewan'da yapılan bir çalışmada, genel sağlık durumu zayıf olan, nod pozitif hastalığa sahip ve adjuvan tedavi almamış 188 erkek meme kanseri (EMK) hastası tespit edilmiştir (Fisher vd., 2023). Obezite, testis hastalıkları ve BRCA2 genindeki kalıtsal mutasyonlar nedeniyle EMK prevalansı küresel olarak rahatsız edici bir şekilde artmaktadır (Fox vd., 2022). Meme kanseri kadınlarda daha sık görülmesine rağmen, erkek ve kadın meme kanseri birbirinden çok farklı değildir. Fox ve arkadaşları, EMK'nin KMK'ye benzerliğini 2. derece hormon reseptörü pozitifliği ve İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatifliği ekspresyonu nedeniyle bildirmişlerdir (Fox vd., 2022). Bu prevalanstaki farklılık genetik farklılıkların bir sonucu olabilmektedir. Bu akrabalık ve erkek meme kanseri ile ilgili araştırma eksikliği nedeniyle, tedavi önerileri kadın hastalardan elde edilen verilere dayanmaktadır (Gucalp vd., 2019).

1.7.1 Türler ve Risk Faktörleri

Meme kanseri, östrojen veya progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2) belirteçlerine dayalı olarak üç alt tipte gruplandırılır: hormon reseptörü pozitif/ERBB2 negatif/Bazal benzeri (hastaların ~%70'i), ERBB2 pozitif (~%15-%20) ve üçlü-negatif (~%15) (Parise vd., 2009). Yüksek molekül ağırlıklı bazal sitokeratin, vimentin, p-cadherin, alfa B kristalin, kaveolin 1 ve 2 ve EGFR gibi bazal epitel hücrelerine özgü genler bazal benzeri meme kanseri tarafından ifade edilir (Parise vd., 2009). Hormon reseptörü pozitif meme kanserleri, östrojen veya progesteron reseptörlerine sahip olan tümörlerdir ve bu reseptörlere sahip olmayanlara göre daha hızlı büyürler. Bu tür kanserler, östrojen seviyelerini azaltan veya östrojen reseptörlerini bloke eden hormon tedavisi ilaçları ile tedavi edilir. ER Triple-negatif MK çok saldırgan olup ve östrojen, progesteron ve HER-2 reseptör ekspresyonundan yoksundur. Yüksek oranda meme kanseri kök hücreleri (MKKH) ile spesifik tedavilerden yoksundurlar ve geleneksel tedavi seçeneklerine karşı oldukça dirençlidirler (Parise vd., 2009).

Meme kanseri olan birinci derece kadın akrabaların hastalığa yakalanma olasılığı iki kat daha fazladır ve etkilenen her aile üyesi ile bu oran artmaktadır. Yüksek penetranslı genler

olan BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, kalıtsal meme kanserinin en yaygın türlerinin birincil nedenleridir (Kleibl ve Kristensen, 2016). Bu genler, DNA onarımı için gerekli olan tümör baskılayıcı proteinleri kodlar. BRCA1 mutasyonları, üçlü-negatif meme kanserlerinin %11'inde bulunurken, BRCA2 eksikliği daha nadirdir (Rastelli vd., 2010). Michalska ve arkadaşları RAD51 ve XRCC2 genlerinin üçlü-negatif meme kanserine katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (Michalska vd., 2015). Meme tümörlerinin çoğu (yaklaşık %90'ı) metastatik değildir, ancak ölümlerin %90'ından fazlası metastazla bağlantılıdır (Medeiros ve Allan, 2019). Bununla birlikte, iyi huylu veya kötü huylu MK kesin klinik terimler değildir. Çünkü bazı iyi huylu meme kanserleri kötü huylu hale gelebilirken, bazı kötü huylu meme kanserleri zamanla iyi huylu hale gelebilir. Araştırmacılar, MK metastazı için birincil bölgelerin, stromal hücrelerle etkileşimlerden etkilenen kemik, akciğer, karaciğer ve beyin olduğunu bulmuşlardır (Jin vd., 2018). T lenfositler, miyeloid türevli hücreler ve nötrofiller öncelikle akciğer ve karaciğer metastazlarında toplanırken, kemik lezyonlarında daha az toplanır (Tabariès vd., 2015). Ly-6G+ hücre tükenmesi karaciğer metastazı oluşumunu bozarken, CD11b+/Ly-6G+ nötrofiller N2 fenotipinde polarize olmuştur (Tabariès vd., 2015).

1.7.2 Meme Kanseri Teşhisi

Tümör hücrelerine veya mikro ortamlara karşı ajanların belirlenmesi, metastatik hastalığın önlenmesine ve hasta prognozunun iyileştirilmesine yardımcı olabilir. Tümörün ortadan kaldırılması ve nüksetmesinin önlenmesi kanserle mücadelede terapötik yaklaşımlardır (Waks ve Winer, 2019). Meme kanseri tedavisi için moleküler seçenekler önerilmiştir. Kim ve arkadaşları, Androjen reseptörü (AR) ve AR ile ilişkili gen ekspresyonunun tedaviye dirençli meme kanseri tedavisindeki potansiyelini ortaya koymuştur (Kim vd., 2017). Son meme kanseri tedavileri, agresiflik ve tedavi direnci için genetik ve çevresel değişkenleri ele alırken meme kanseri kök hücrelerini (MKKH'ler) hedeflemektedir. MKKH'ler metastaz ve rekürrens açısından önemlidir. Oncotype DX ve Mamm αPrint gibi prognostik biyobelirteçler etkili tedavi için gereklidir (Barzaman vd., 2020). Meme kanseri teşhisi ve yönetimi, prognozun belirlenmesini ve uygun tedavinin seçilmesini içerir. UPA/PAI1, Oncotype DX ve MammaPrint gibi çok genli prognostik testler sonuçları tahmin etmeye yardımcı olur. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin

ölçümleri ve HER2 gen amplifikasyonu çok önemlidir (Nicolini vd., 2017). Xu ve arkadaşlarına göre, C1ql4, meme kanseri dokularında ve hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. C1ql4'ün işlevinin ortadan kaldırılması, meme kanseri kök hücre (MKKH) özelliklerini azaltırken hücre döngüsünü hızlandırır ve hücre göçü ile istilasını önler. Bu, C1ql4'ün meme kanseri hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişi (EMT) ve kök hücre özelliklerini teşvik etmek için PI3K/AKT/NF- κ B sinyal yolunu etkilediğini göstermektedir (Xu vd., 2023). Portekizde bir çalışmada, heterozigot XRCC2 polimorfizmine sahip bireylerin hiç doğurmamış kadınlarda azalmış MK riskine sahip olduğu, XRCC3 varyantlarına sahip menopoz sonrası kadınların ise daha düşük riske sahip olduğu bulunmuştur (Michalska vd., 2015). Emzirmek kanser riskini üçte iki oranında azaltabilir (Michalska vd., 2015).

Meme kanserinin ayırt edici özellikleri giderek daha belirgin hale gelmekte ve yeni moleküler biyobelirteçler tanısal algoritmalar için kullanılmaktadır. EGFR, VEGF, FGFR, HER2 ve NOTCH gibi biyobelirteçler, TNBC'de (üçlü negatif meme kanseri) prognostik değerlendirme ve tedavi seçimlerinde kritik öneme sahiptir (Sukumar vd., 2021). Klinik sonuçları ve sağkalımı iyileştirmek için PI3K/AKT/mTOR, bağışıklık biyobelirteçleri ve yeni hedefler gibi yeni tedaviler ve biyobelirteçler geliştirilmektedir (Sukumar vd., 2021). ER ve HER2 hedefe yönelik tedaviler için prognostik göstergelerdir (Trapani vd., 2019). Ki67 yüksek riskli ER-pozitif ve HER2-negatif kanserler için bir belirteçtir (Najjar ve Allison, 2022). Meme kanseri insidansı yaşla önemli ölçüde ilişkilidir (Desai ve Aggarwal, 2021); ancak MK hastalarının önemli bir kısmı 40 yaşın altındadır. 40 yaşın altındaki kadınlarda görülen meme kanseri, kendine özgü bir risk faktörüne, tümör morfolojisine, prognostik özelliklere ve psikolojik sorunlara sahiptir (Rossi vd., 2018). Erken teşhis, meme kanseriyle ilişkili riskleri azaltmaya ve radyasyon tedavisinden kaçınmaya yardımcı olabilir. Genç kadınlar için tedavi seçenekleri arasında mastektomi ve radyasyon tedavisi bulunur; ayrıca, doğurganlığın korunması da önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Genetik testler ve psikolojik destek, meme kanseri olan genç kadınlar ve aileleri için büyük önem taşır (Radecka ve Litwiniuk, 2016).

1.7.3 Meme Kanseri için Tedavi Seçenekleri

Meme Sağlığı Küresel Girişimi ve Amerikan Kanser Derneği gibi küresel sağlık programları, kanserin küresel yükünü azaltmak için çalışmaktadır (Coughlin ve Ekwueme, 2009). Küresel Meme Kanseri Girişimi (GBCI), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sağlıklı yaşamın teşviki, hızlı teşhis, kapsamlı tedavi ve destekleyici bakım yoluyla sağkalımın iyileştirilmesi amacıyla başlatılmıştır (Trapani vd., 2022; Wilkinson ve Gathani, 2022). Girişim, evre 1 veya 2 invaziv kanserleri azaltmayı, teşhis çalışmalarını 60 gün içinde tamamlamayı ve %80 veya daha fazla kadının multimodal tedavi almasını sağlamayı amaçlamaktadır (Trapani vd., 2022).

Meme kanserinin dört ana evresi vardır: erken invaziv (Evre I ve II), lokal olarak ilerlemiş (III) ve metastatik (IV). Erken evrelerdeki meme kanseri lokorejyonel ve sistemik tedavilerle tedavi edilebilir (Loibl vd., 2021). Risk değerlendirme araçları meme kanseri riskini belirlemeye yardımcı olur ve yüksek riskli hastalar için risk azaltıcı ilaçlar önerebilir. Kanser tedavi seçeneklerine moleküler alt tiplere ve tümör yüküne göre karar verilir. Meme kanserinin erken evrelerinde (I, II ve III) tedavinin üç aşaması vardır: ameliyat öncesi, cerrahi ve ameliyat sonrası. En ileri evre olan metastatik meme kanseri tedavi edilebilir ancak iyileştirilemez; tedavi hedefleri hastaların yaşam kalitesini artırmaya yöneliktir. Ameliyat öncesi aşama radyasyon, endokrin tedavileri ve östrojen, progesteron veya ERBB2 reseptörlerine sahip tümörler için kemoterapiyi; cerrahi aşama lumpektomi veya mastektomiye; ameliyat sonrası aşama ise radyasyon, endokrin tedavisi ve kemoterapiyi içerir (Trayes ve Cokenakes, 2021). Meme kanserinin doğası gereği, bazı tedavi seçenekleri eş zamanlı veya birlikte kullanılır. Örneğin, ameliyattan önce veya eş zamanlı olarak radyasyon tedavisi (Recht, 1996).

Dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen kanser meme kanseridir. Halen radyasyon tedavisi, hedefe yönelik tedavi (kemoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi) ve cerrahi tedavi olarak kullanılmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri vakalarında ölüm oranını azaltan ve yaşam kalitesini artıran ileri immünoloji temelli tedaviler kullanılabilir hale gelmiştir. Bu tedaviler arasında immün kontrol noktası blokajları, aşılar, hedefe yönelik tedaviler ve gen terapisi bulunmaktadır (Singh vd., 2021). MK'nin agresif bir alt tipi olan

inflamatuvar meme kanseri (IMK), yüksek prognoza ve orantısız olarak yüksek meme kanseri ölüm oranlarına sahiptir. Önerilen tedavi şekli radyasyon, sistemik tedavi ve modifiye radikal mastektomi (meme koruyucu bir ameliyat) birleştiren trimodal tedavidir (Newman ve Lynce, 2023).

1.8 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı.

MCF-7, kanser araştırmalarında sıklıkla ve yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır. Bu metastatik kanser hücreleri 1970 yılında Kafkasyalı bir kadının meme tümörü dokusundan türetilmiştir (Lee vd., 2015). Hücreler östrojen reseptörü pozitif (ER+) ve meme kanserinin luminal A alt tipidir, bu da onları hormona bağlı meme kanserlerini incelemek için değerli bir model haline getirir. Yüksek proliferasyon oranı ve kültür yüzeylerine yapışma özelliği ile proliferatif ve yapışkırlar. MCF-7 hücreleri bir anti-östrojen ilacı olan tamoksifene duyarlıdır ve tipik olarak HER2 için negatiftir (Benz vd., 1992). Meme kanseri metastazı, hücre göçü, invazyon ve uzak metastazların tümü MCF-7 hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Gen ekspresyon profilleri kapsamlı bir şekilde incelenerek kanser ilerlemesi ve tedavi yanıtının altında yatan moleküler mekanizmalar ortaya çıkarılmıştır. Sınırlamalara rağmen MCF-7, kullanılabilirliği, iyi karakterize edilmiş yapısı ve östrojene bağımlı meme kanseriyle ilgisi nedeniyle meme kanseri araştırmalarında daha yaygın olarak kullanılan bir hücre hattı olmaya devam etmektedir.

1.9 Kanser Tedavisinde Apoptoz

Apoptoz Yunanca *apó*, "uzaklaşmak" ve *ptôsis*, "düşmek" kelimelerinden türetilmiştir ve 1972 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir. Evrim boyunca korunmuş, kendi kendini yenileyebilen, tetikleyici dalga yeteneğine sahip programlı bir hücre ölümüdür. (Cheng ve Ferrell, 2018). Apoptoz yoluyla hücreler intihar eder ve bu intihar tek hücreli ve çok hücreli organizmalarda gerçekleşir. Apoptozun yanı sıra, diğer hücre ölüm süreçleri arasında nekroz, otofaji, piroptoz ve nekroptoz bulunur (D'Arcy, 2019; Gudipaty vd., 2018).

Klinik kanser tedavisi, metabolik yolları veya programlanmış hücre ölümünü inhibe ederek kanser hücrelerini ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Apoptoz, hücresel stres, DNA hasarı ve immünolojik gözetim sistemlerinin neden olduğu hücre içi ve dışı süreçler yoluyla

gerçekleşebilir. İlaç geliştirme sürecinde biyoyararlanım ve stabilite, tümör penetrasyonu, akut veya kronik normal doku toksisitesi, ilaç etkileşimleri, hedef dışı etkiler, tümör heterojenitesi ve dirençli klonların oluşumu gibi faktörler, başarılı pro-apoptotik ilaçların klinik uygulamaya dönüştürülmesinde önemli rol oynar (Carneiro ve El-Deiry, 2020).

Milyonlarca protein, efektör kaspazlar, kaspaz-3,-6 ve -7 tarafından proteolitik olarak parçalanarak apoptozu tetikler. Efektör kaspazlar, içsel veya dışsal olarak başlatılan ve başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10 aracılığıyla aktive edilen sıralı bir süreçle etkinleştirilir. Bu süreç kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Kiraz vd., 2016). Sitotoksik T-hücre granüllerinde veya doğal öldürücü (NK) hücrelerde bulunan granzimler, hedef hücrelerde perforin aracılı delik oluşturma yoluyla kaspazları aktive etmeden de apoptozu tetikleyebilir. Hücre küçülmesi ve büzülmesi, kromatin yoğunlaşması (piknoz), nükleer membranın parçalanması (karyoreksis), DNA'nın nükleozomal yapılara parçalanması ve kaspaz-6 aracılı lamin bölünmesi, apoptoz sürecindeki morfolojik değişikliklerdir (Xu vd., 2019).

1.9.1 Kanser Tedavisinde Apoptozun Önemi

Antikanser ilaçlar apoptozisi teşvik eder çünkü onkogeneze apoptotik mekanizmaları inhibe eder. Apoptoz, doğuştan gelen tümör baskılayıcı sistemin doğal bir bileşenidir. Warburg etkisi, metabolik yolların değişiminin kansere neden olduğunu belirtir. Kanser hücreleri, kansere neden olan mekanizmalardan biri olan anaerobik metabolizmayı kullanırken, normal hücreler aerobik metabolizmaya dayanır. Son çalışmalar, embriyonik hücrelerin, kök hücrelerin ve agresif kök benzeri kanser hücrelerinin, insan hücrelerinin patolojik yaşlanması sırasında özellikle aktif olarak anaerobik solunumu kullandığını göstermektedir (Kaczanowski, 2016). Kanser hücrelerinde apoptotik oranların artırılmasıyla tümör büyümesi engellenebilir (Grasl-Kraupp vd., 1997).

1.9.2 Kültürlenmiş hücrelerde Apoptoz Tespiti

Akış sitometrisi, fosfatidilserin eksternalizasyonu ve aktif kaspazlar gibi apoptotik belirteçler, kültürlenmiş hücrelerde apoptozu tespit etmek için kullanılan yöntemlerdir. Görüntüleme taramaları veya kaspaz enzimatik aktivitesinin hücre bazlı çalışmaları da bunu ortaya çıkarabilir. PET taraması, klinik çalışmalarda immünoterapi yanıtının bir ölçüsü

olarak Granzim B'yi tanımlamak için kullanılmıştır (Lasalle vd., 2020). İlaç geliştirme araçları ve klinik örneklerde terapötik aktivitenin doğrulanması apoptozun tespit edilmesiyle mümkün olmaktadır . Apoptozun saptanması, ilaç keşif araçları ve klinik modellerde ilaç etkisini doğrulamak için pratik yöntemler sağlamaktadır (Carneiro ve El-Deiry, 2020).

1.9.3 Apoptotik Sinyal Yolları

1.9.3.1 İntrinsik Yolağı

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal mekanizmaları, reseptör aracılı olmayan çeşitli sinyalleri içerir (Şekil 2.1). Mitokondriyal olarak başlatılan bu süreçler, hücre hedefleri için doğrudan reseptör görevi gören hücre içi sinyaller sağlar. Radyasyon, toksinler ve serbest radikaller dahil olmak üzere pozitif uyaranlar iç mitokondriyal membranı değiştirerek mitokondriyal transmembran potansiyelinin düşmesine neden olur. Mitokondriyal membran potansiyeli Değişimi ($\Delta\Psi_m$), normalde kilitli olan iki pro-apoptotik proteinin (Bax ve Bak) sitoplazmaya salınmasına yol açar (Zhou ve Chang, 2008). Pro- veya anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesinin üyeleri bu mitokondriyal apoptotik yolları kontrol eder ve düzenler. Çok işlevli fosfoserin bağlayıcı molekül 14-3-3 ptotein, Bad'in serin fosforilasyonuna bağlıdır (Masters vd., 2001). Bcl-X ve Apaf-1, procaspase-9'un aktive olmasını engelleyen Aven olarak bilinen ayrı bir protein tarafından eş zamanlı olarak bağlanmış görünür (Kutuk vd., 2010). Apoptoz, Bax protein ekspresyonunun artışı, konformasyonel değişim, mitokondriyal translokasyon ve oligonükleozomal DNA kırılması gibi olaylarla karakterizedir (Gahl vd., 2014). Puma ve Noxa, p53 aracılı apoptoz süreçlerinde kritik rol oynar (Nakajima & Tanaka, 2007).

1.9.3.2 Endoplazmik Retikulum Yolağı

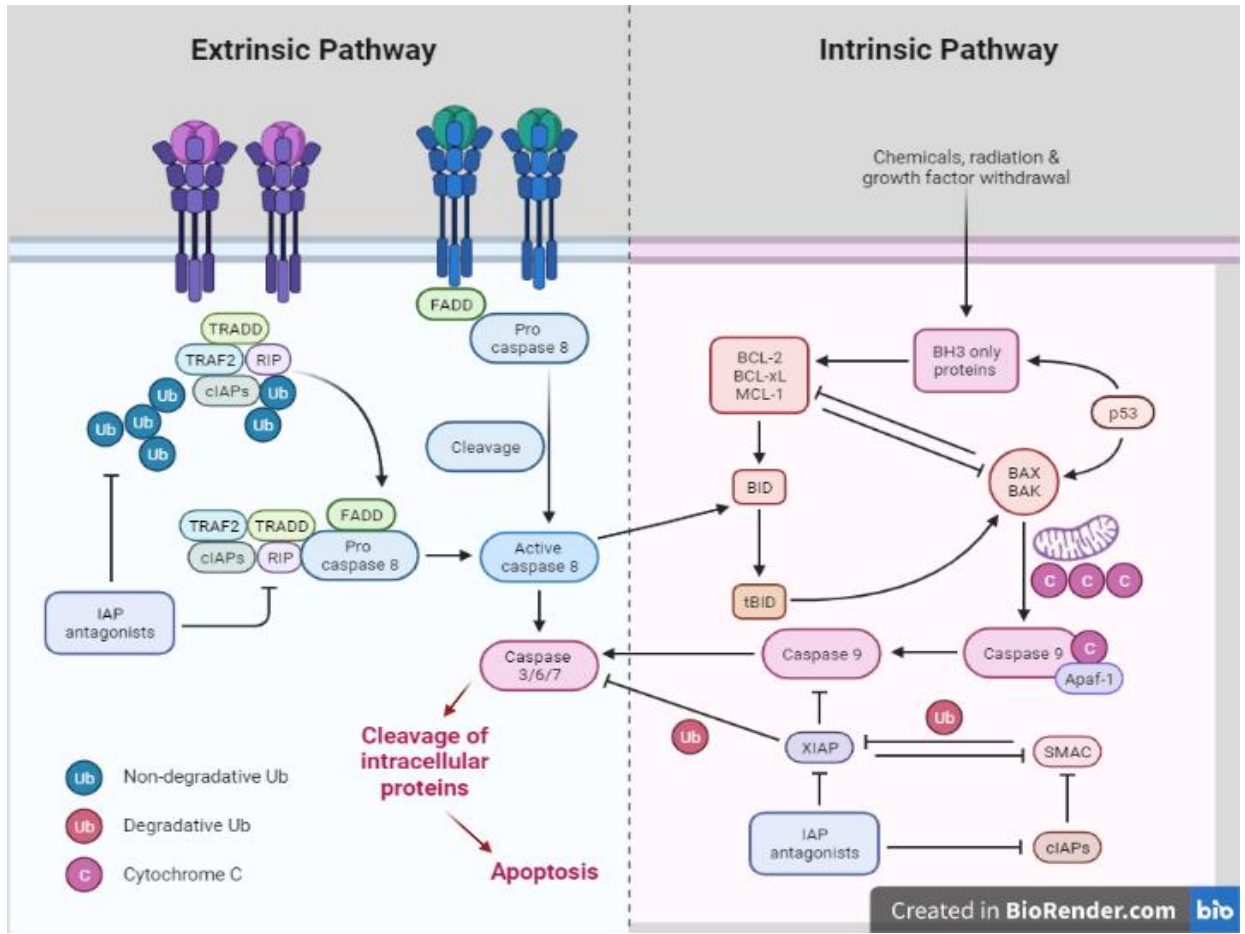
Endoplazmik retikulum (ER), salgılama, membran bağlanması ve organel hedeflemesi için proteinlerin katlanmasını ve işlenmesini sağlar. Hücrel enerji seviyelerini, redoks durumunu veya Ca^{2+} konsantrasyonunu değiştiren stres faktörleri, katlanmamış proteinlerin birikmesine ve agregasyonuna neden olarak ER fonksiyonunu önemli ölçüde etkileyebilir. Hücreler, ER stresinin zararlı sonuçlarına karşı koymak için katlanmamış protein tepkisini (UPR) geliştirmiştir (Huang vd., 2021). Pankreatik ER kinaz (PKR), aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) ve inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) bu yanıtı aracılık

eden üç ER transmembran reseptörüdür (Jäger vd., 2012). ER şaperonu GRP78 ile olan ilişkileri sayesinde, her üç ER stres reseptörü de hareketsiz hücrelerde inaktiftir (Szegezdi vd., 2006).

c-Jun N terminal kinaz (JNK) aktive olur ve şiddetli ER stresine yanıt olarak C/EBP homolog proteini (CHOP) indüklenir. Bu ayarlamalar Bax ve Bak'ı aktive ederek, ER'den mitokondriye ve diğer süreçlere sinyal göndererek ölümü sağlar. Ölüm sinyali mitokondriye gönderildikten ve sitokrom c salındıktan sonra, ER membranında ve apoptozomda kaspazlar tetiklenebilir (Breckenridge vd., 2003).

1.9.3.3 Ekstrinsik Yolağı

Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörleri arasındaki etkileşimleri içerir (Ashkenazi, 2002). FasL/FasR ve TNF-/TNFR1 modellerinde, reseptör kümelenmesi ve homolog trimerik ligandlar aracılığıyla etkileşim söz konusudur. Procaspase-8 ve FADD, ölüm efektör alanını (DED) dimerize ederek bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşturur (Şekil 2.1) (Sayers, 2011). DISC'nin aktivasyonu apoptozise yol açar. c-FLIP adı verilen bir protein, FADD ve kaspaz-8'e bağlanarak ve onları inaktif hale getirerek ölüm reseptörü aracılı apoptozu önleyebilir. TRADD reseptörü diğer ekstrinsik yollara da katılır. TNFR süper ailesi gibi sitozol içi ölüm alanlarından yoksun transmembran reseptörleri olan tuzak reseptörler, reseptör yolları aracılığıyla ölümün engellenmesinde çok önemlidir (Ashkenazi, 2002).

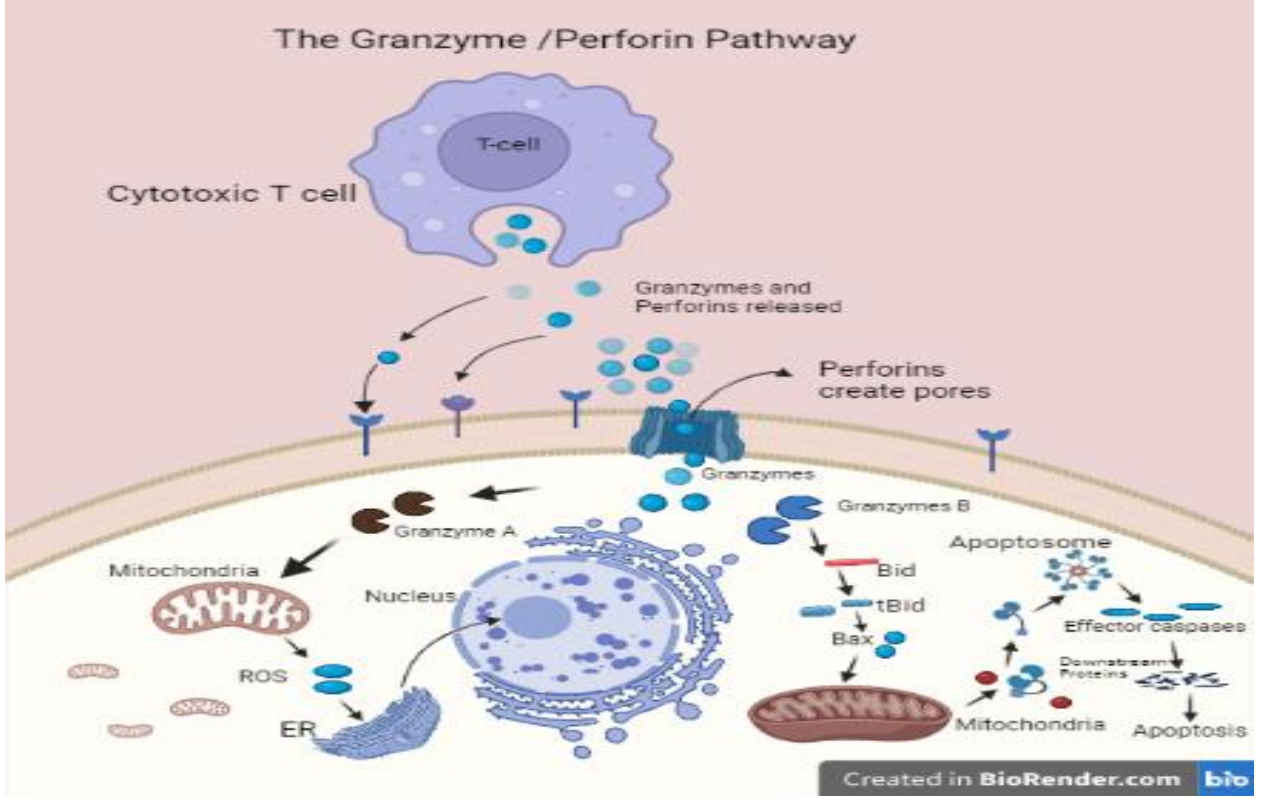


Şekil 2.1. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolları

1.9.3.4 Perforin/granzim yolu

T-hücresi aracılı sitotoksiste, antijene özgü CD8+ hücrelerinin hassaslaştırılmış CD8+ hücreleri tarafından öldürüldüğü bir tip IV aşırı duyarlılık varyasyonudur. Perforin salgılanması ve sitoplazmik granüllerin porlar aracılığıyla hedef hücelere boşaltılması, kanserli ve virüsle enfekte olmuş hücrelerde de sitotoksitelerini uyguladıkları benzersiz bir kanal sağlar (Şekil 2.2) (Chakraborty vd., 2017). Sitotoksik T-hücreli lenfositler (STL'ler) FasL/FasR etkileşimi yoluyla hücreleri ekstrinsik olarak yok edebilir. Granüllerdeki en önemli unsurlar serin proteazlar olan granzim A ve granzim B'dir. Granzim A doğrudan hücre içi proteinleri parçalar. Buna karşılık granzim B, proteinleri aspartat kalıntılarından parçalayarak prokaspaz-10 ve ICAD'nin aktivasyonunu katalize eder (Loeb vd., 2006). Ek olarak, çalışmalar granzim B'nin Bid'i spesifik olarak parçalayarak ve sitokrom c salınımını

indükleyerek mitokondriyal yol üzerinden ölüm sinyalini artırabileceğini göstermiştir (Thomas vd., 2001; Waterhouse vd., 2006).



Şekil 2.2. Apoptozun Granzim/Perforin Yolu

1.9.4 Efektör Yolağı

Hücre iskeleti, hücre içi hareket, hücre bölünmesi ve sinyal iletimi apoptotik süreç sırasında bozulur. Apoptozun hem ekstrinsik hem de intrinsik yolları, sürecin son aşaması olan yürütme aşamasında sona erer. efektör kaspazları, sitoplazmik endonükleazların ve proteazların sırasıyla nükleer ve hücre iskeleti proteinlerini ve nükleer materyali bozmasına neden olur (Slee vd., 2001). En önemli yürütücü kaspaz olan Kaspaz-3, başlatıcı kaspazlardan herhangi biri (kaspaz-8, -9 veya -10) tarafından tetiklenebilir. Gelsolin ve parçalanmış bileşenlerini, ardından kalsiyumdan bağımsız olarak aktin filamentlerini parçalar (Geng vd., 1998).

Fosfolipid asimetrisi ve fosfatidilserin dışsallaşması apoptotik hücrelerin fagositik emiliminin özellikleridir (Fadok vd., 2001).

1.9.5 Kanser Hücrelerinde Apoptoza Direnç

Kanser hücrelerinin ayırt edici bir özelliği apoptoza karşı dirençli olmalarıdır. Direnç, yatay olarak aktarılan spesifik direnç mutasyonlarını barındıran kanser hücreleri ile daha da artar (Junqueira-Neto vd., 2022). Kansere karşı uygulanan tedavilerin çoğu, kanserli olmayan hücreleri etkilemeden apoptozu artıran veya metabolik yollarını inhibe eden yolları hedef alır. Kanser hücreleri apoptoza yol açan çeşitli yolları geçersiz kılabilir ve proliferatif yolları artırabilir BRCA1 gen eksikliği olan yumurtalık kanseri hücrelerinin cAMP aracılı apoptotik direncinin aşırı üretimi (Yue vd., 2022).

Landowski ve meslektaşları, miyelom ve T-hücreli lösemi hücre hatlarında Fas aracılı apoptoza direnç için iki strateji ortaya koymuştur. Mekanizmalardan biri Fas antijeni yüzey ekspresyonunda doza bağlı bir düşüştü. İkinci bir ilaç direnci mekanizmasında Fas antijeninin ifadesi değişmeden kalmıştır; bununla birlikte, apoptotik yanıtta bir düşüş olmuştur (Landowski vd., 1997). Literatürde bazı gen proteinlerinin aşırı ekspresyonu ile bağlantılı başka direnç mekanizmaları da belgelenmiştir (Wu vd., 2021).

1.10 Kanser Hücrelerinde Metabolizma

Enerji kaynağı ve biyosentezin bir bileşeni olarak ikili rolleriyle glukoz, çok çeşitli biyolojik süreçler için gereklidir. Hekzokinazlar, glukozu anaerobik fermantasyonda, aerobik oksidatif fosforilasyonda, glikojenezde ve glukoz taşıyıcıları (GLUT'lar) yoluyla hücreye girdiğinde pentoz-fosfat yolunda kullanılmak üzere glukoz-6-fosfata (G-6P) metabolize eder. Glukoz-6-fosfat ya glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6PD) tarafından metabolize edilir ya da fosfoglukoz izomeraz tarafından fruktoz-6-fosfata (F-6P) izomerize edilir. F-6P, glikolitik yoldan geçerek aerobik koşullar altında bir Krebs döngüsü ara ürünü olan asetil CoA'ya metabolize edilebilen piruvat üretir. Laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi pirüvatı anaerobik koşullar altında laktata metabolize eder.

Anaerobik glikoliz, Warburg etkisi olarak adlandırılan bir fenomen olan oksijen varlığında bile kanserli hücrelerde oldukça yaygındır. Warburg etkisine göre, kanser hücreleri ATP üretmek için glikolizi oksidatif fosforilasyona tercih ederek, glikoliz ve Krebs döngüsünden (Liberti ve Locasale, 2016) gelen metabolitlerin artan kullanılabilirliği yoluyla

kanserin ilerlemesini teşvik eder (Lu vd., 2015). Metabolik değişim artık kanserin ayırt edici bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Kronik yüksek glukoz maruziyeti, PKC, PI3K, Akt, mTOR, Ras, Raf ve MAPK gibi sinyal kanallarını açarak kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilir (Hoxhaj & Manning, 2020).

Kanser hücreleri, PKM1'den daha az katalitik olarak aktif olan yüksek miktarda piruvat kinaz, PK izoenzim tip M2 (PKM2) ifade eder. Sonuç olarak, glikolitik ara ürünler birikir ve amino asitler, fosfolipitler ve nükleik asitlerin üretilmesine yardımcı olur (Shen vd., 2021) LDH'yi aşırı eksprese eden kanser hücreleri, NAD⁺ rejenerasyonunu teşvik eden ve gliseraldehit-3-fosfatın 1,3-bisfosfogliseraata dönüştürülmesine neden olan yüksek bir glikolitik akışı sağlar. Kanser hücreleri normal hücrelere göre yaklaşık 30 kat daha fazla glikolitik hıza sahiptir ve daha fazla glukoz tüketir (Zhang vd., 2014).

1.11 Kanser Tedavisinde Metabolik İnhibitörler

Tümör hücresi metabolizması, normal hücre metabolizmasından önemli ölçüde farklılık göstererek çoğalma, büyüme ve hayatta kalmayı optimize eder. Metabolik yolların hedeflenmesi, kanser hücresi büyümesine ve çoğalmasına müdahale etmek için bu farklılıklardan yararlanır. Bu metabolik yeniden modelleme, etkili kanser tedavisi için olağanüstü olanaklar sunmaktadır. Alternatif hayatta kalma yollarının hedeflenmesi, kanser hücrelerinin hayatta kalmak için diğer metabolitlere veya besinlere geçişini engellemeye yardımcı olur. Bu yolları hedef alan moleküller kullanılarak yeni antikanser ilaçlar geliştirilebilir. Tümör hücrelerinde aerobik glikoliz ve apoptoz direnci anormaldir, bu da atipik enerji üretiminde mitokondriyal işlev bozukluğuna işaret eder. Metabolik inhibitörler, canlı hücrelerdeki metabolik süreçlerin normal işleyişine müdahale eden bileşiklerdir. ATP sentaz gibi çok sayıda metabolik süreçte yer alan enzimlerin bloke edilmesi hücresel metabolizmaya müdahale edebilir. Ayrıca, nükleik asitler, proteinler veya lipidler (Tablo 2.1) gibi temel bileşenlerin sentezini engelleyerek hücresel süreçleri her zamanki gibi bozabilirler (Shen vd., 2021).

Tablo 2.1. Tümör hücrelerinde yukarı regüle edilen Metabolik Yollar

Metabolik Yol	Kanser hücreleri için işlev
Glikoliz	Kanser hücreleri ATP ve biyosentez için diğer metabolik ara ürünleri üretmek için glikolize güvenir.
Pentoz fosfat yolu (PFY)	Kanser hücreleri, redoks homeostazı için nükleotid sentezi ve NADPH ihtiyacı nedeniyle PPP'yi değiştirir. Bunlar, apoptoza neden olabilen ROT'un biyosentezi ve azaltılması için çok önemlidir.
Yağ Asidi Sentezi	Membran bileşen sentezi ve sinyalizasyon için artan ihtiyacı karşılamak için FA sentezinde yüksek bir artış vardır.
Mitokondriyal metabolizma	Kanser hücreleri belirli koşullar altında enerji üretimi için mitokondriyal metabolizmaya başvurabilir.
Amino Asit Metabolizması	Artan büyüme, çoğalma ve metastazın bir sonucu olarak, kanser hücreleri protein sentezi ve diğer biyosentetik süreçler için yüksek amino asitlere ihtiyaç duyar.
Tek karbonlu metabolizma	Kanser hücreleri nükleotid sentezi, metilasyon reaksiyonları ve redoks homeostazı için bu metabolik yolu değiştirir.
Glutamin metabolizması	Glukozun yanı sıra glutamin de kanser hücreleri için mükemmel bir enerji metabolizması kaynağıdır.

1.11.1 Metabolik İnhibitör Türleri.

Literatürde kanser hücrelerinde bir veya daha fazla metabolik süreci inhibe eden çeşitli metabolik inhibitörler incelenmiş ve rapor edilmiştir (Tablo 2.2). Bu metabolik inhibitörler arasında Lonidamin, 2-deoksi-D-glukoz, rapamisin, metformin, sikloheksimid ve

diğerleri bulunmaktadır. Öncelikle diğer inhibitörler veya sinyal blokerleri ile kombinasyon tedavisinde kullanılırlar.

Tablo 2.2. Bazı metabolik inhibitörlerin listesi ve kanser hücrelerindeki sitotoksik yolları

Metabolik İnhibitör	İnhibitör Bölge/Süreç
Aktinomisin D	Bir RNA sentez inhibitörü. TNF/TNFR ailesi ekspresyonunu artırır ve apoptozu geliştirir (Liu vd., 2016). JNK/SAPK ve Bax aracılığıyla apoptoz (Kleeff vd., 2000).
Cycloheximide	Apoptoz klorür iyonları, NF-kB ve kaspaz aktivasyonu ile bağlantılıdır (Fujita vd., 1999). p53 ekspresyonunu artırarak tümör baskılanmasını teşvik eder (Higami vd., 2000). ER stresi aracılı yolla hücre ölüm (Ito vd., 2006)
Staurosporine	Kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız mekanizmalar apoptozu tetikler (Belmokhtar vd., 2001).
Brefeldin A	Apoptoz, ER'deki protein taşıma inhibisyonundan kaynaklanır. GSK-3'ü aktive ederek Bax'ın mitokondriye translokasyonuna neden olur. (Kwok ve Daskal, 2008). BFA, ER yolu (Wlodkowic vd., 2007) ve ölüm reseptörü yolları aracılığıyla apoptozu teşvik eder (S. A. Lee vd., 2013).
Rotenone	Mitokondriyal kompleks I'i inhibe eder ve mitokondriyal solunum zincirini bozarak apoptozu neden olur.

	Sitotoksisite ve oksidatif stres pro-apoptotik belirteçleri artırırken, anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonu azalır (Feng vd., 2015). Kanser hücresi sitotoksisitesine, oksidatif stresin artmasına ve mitokondriyal disfonksiyona neden olur (Jiang vd., 2017).
Dikloroasetat (DKA)	Glikolizi inhibe eder ve kanser hücrelerinde mitokondriye bağlı apoptozu tetiklemek için oksidatif fosforilasyonu teşvik eder (Nikraves vd., 2021).
3-bromopyruvate	Enerji metabolizmasını bloke eder (Wang vd., 2016). Mitokondri fonksiyonunu bozar (Roy vd., 2022). Bax ve kaspaz-3 aktivitesi yoluyla apoptoza neden olur (Xu vd., 2016).
Arsenic Trioxide	Nrf2/CASP3 sinyal yolu üzerinden apoptoza neden olur (Rao vd., 2023). AsO, p53 mutantlarına termostabilite ve transkripsiyonel aktivite sağlayarak p53'ü yeniden aktive eder (Chen vd., 2021).

Tablo 2.3. Bazı metabolik inhibitörlerin listesi ve kanser hücrelerindeki sitotoksik yolları (Devam)

1.11.2 Metabolik İnhibitörlerin Etki Mekanizmaları

1.11.2.1 2-deoksi-D-glukoz (2-DG)

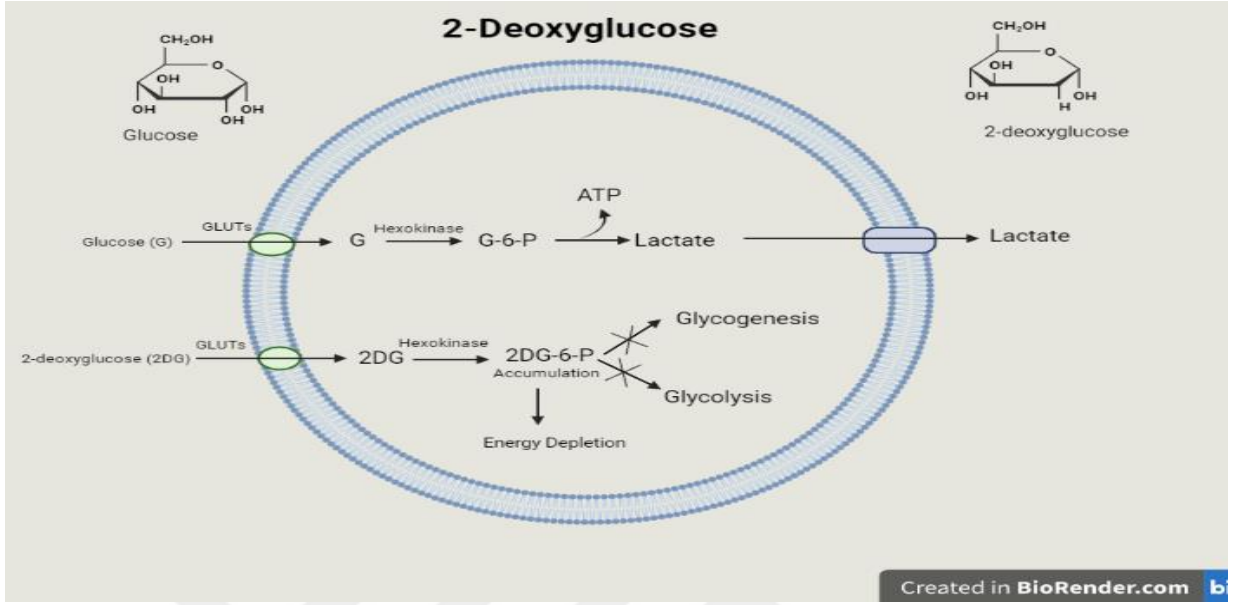
Sentetik bir glukoz analogu olan 2-DG, hücrelere girdiğinde ATP üretimini ve glikolizi engeller. İkinci karbon üzerindeki hidroksil grubu hidrojen ile değiştirilmiştir (Şekil 2.3b) ve bu konu 1950'lerden beri üzerinde çalışılmaktadır. Toksisiteye yönelik 2-DG mekanizmaları, glukoz metabolizması, endoplazmik retikulum stresi, protein glikozilasyonunun baskılanması ve sinyalleşme basamaklarının bozulması gibi hücre büyümesi metabolik yollarının tercihli olarak hedeflenmesini içerir (Obaid vd., 2022), endoplazmik retikulum stresi, protein glikozilasyonunun baskılanması ve sinyal

kaskadlarının bozulması. D-glukoz (Şekil 2.3a) taklidi, glukoz alımını rekabetçi bir şekilde inhibe eder ve 2-deoksi-D-glukoz-6-fosfat (2-DG6P) üreterek glikolizi önler. 2-DG6P, önceki glikolitik enzim için bir substrat değildir (Şekil 2.4). Bu nedenle, hekzokinaz ve glukoz-6-fosfat izomeraz fonksiyonları inhibe edilir. Ek olarak, TCA döngüsünü, oksidatif fosforilasyonu ve heksoz monofosfat şantını inhibe eder, kanser ilerlemesini durdurur, anti-inflamatuar araçları destekler ve bağışıklık fonksiyonunu modüle eder (Dey vd., 2022). Bu hayati yolların engellenmesi ATP sentezinin azalmasına, hücre döngüsünün tıkanmasına, büyümenin azalmasına ve hücre ölümüne neden olur. ATP sentezi azaldıkça, AMP'nin ATP'ye oranı yükselir, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktive olur ve hücreler intrinsik ve ekstrinsik apoptoza daha duyarlı hale gelir. Bu, 2-DG'nin sitoprotektif etkisini göstermektedir. PI3K, MAPK ve AMPK gibi sinyal yollarını aktive ederek kanser hücre tiplerinde toksisiteye neden olur.



Şekil 2.3. α-D-glukoz (a) ve 2-deoksi-D-glukozun (b) yapısı (ChemSketch ile oluşturuldu)

2-DG ayrıca N-bağlı glikozilasyonu, oksidatif stresi ve antioksidatif savunmayı bloke eder ve otofajiyi indükler. 2-DG ile tedavi, kanser hücrelerinin antioksidan savunmalarına zarar verebilir, ancak p53 bu etkiyi iyileştirebilir. 2-DG, mannozu taklit ederek ve sonu 2-DG-GDP'ye dönüştürerek N-bağlı glikozilasyonu keser (Berthe vd., 2018). Eksojen glukoz 2-DG toksisitesini tersine çeviremez, protein katlanmasına ve ER stresine neden olur. UPR tetiklenir ve mitokondriyal apoptotik yollar 2-DG ile indüklenen hücre apoptozunda rol oynar. Eksojen mannoz 2-DG ile indüklenen hücre ölümünü önleyebilir ancak ATP üretimindeki azalmayı tersine çeviremez (Ramírez-Peinado vd., 2011). Önemli bir katabolik süreç olan otofaji, tümör gelişimi, nörodejenerasyon, enfeksiyonların artması ve yaşlanma dahil olmak üzere patojenik ve fizyolojik süreçleri düzenler. Bir 2-DG tedavisi, ATP ve ER stres yanıtlarını tüketerek otofajiyi indükler (Xi vd., 2011).



Şekil 2.4. Hücrelerde glikoz ve 2-deoksiglikoz metabolizması (Biorender'da oluşturuldu).

Ramirez-Peinado ve arkadaşları, alveolar rabdomyosarkomda Noxa'ya bağlı apoptoz yoluyla 2-DG tarafından indüklenen bir yolak bildirmişlerdir (Ramírez-Peinado vd., 2011). Xian ve arkadaşları, fibroblast benzeri sinoviyositler (FLS) üzerinde yaptıkları çalışmada, heksokinaz-2'nin mTOR ile etkileşimini engelleyerek, heksokinaz-2 inhibitörü 2-DG'nin otofajiyi inhibe ettiği ve cVIM'in FLS apoptozunu indüklediği sonucuna varmışlardır (Xian vd., 2023). 2-DG glikolizi azaltır ve servikal kanser hücre hatları HeLa ve SiHa'da mitokondrinin rollerini bozar. Hücre büyümesini, göçünü ve istilasını inhibe eder ve Wnt/ β -katenin sinyalini düşürür (Su vd., 2023).

Bir çalışmada 2-DG'nin protein yıkımını engelleyerek, ketogenezi artırarak ve mitokondriyal biyoenerjettiği geliştirerek tümör kaşeksisine bağlı kas atrofisini iyileştirdiği bulunmuştur (Wei vd., 2022). Bir çalışma, Hs578Ts(i)8 varyantlarında mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle migrasyon, invazyon ve glikolizi inhibe ederek agresif TNBC için olası bir tedavi olarak glukoz analogu olan 2-DG önermektedir (O'Neill vd., 2019). 2-DG, hormona bağımlı ve bağımsız MK hücrelerinde hücre sayısını azaltmış ve N-bağılı glikozilasyona müdahale etmiş, mannoz ise etkilerini kısmen tersine çevirmiştir (Berthe vd., 2018). C/EBP β -LIP üretiminin artması, hücrelerin 2-deoksi-D-glukoz glikoliz inhibitörlerine karşı duyarlılığına neden olur. MAS aktivitesi ile glikolizin inhibe edilmesi NADH

tükenmesine ve apoptoza yol açar, bu da MAS veya diğer NAD⁺ yenileyici mekanizmaların bloke edilmesiyle önlenabilir (Ackermann vd., 2023). Üçlü negatif meme kanserlerinde Zoptarelin Doksorubisin veya 2-DG kullanılarak aerobik glikolizin inhibe edilmesi hücre canlılığını azaltmış ve apoptozu artırmıştır (Gründker vd., 2019).

1.11.2.1.1 Kombinasyon Tedavisi

2-DG antikanser ilaçlarında, özellikle de kombinasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Moselhy ve arkadaşları, 7,12-dimetilbenz(a)antrasen ile indüklenen karsinojenik sıçanlarda 2-DG ve malonatın tek ve kombine etkilerini araştırmışlardır. Hücre enerji tükenmesinin karsinogenezin erken aşamalarında meydana geldiği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde, Neuro-Oncology'de Kim ve meslektaşları 2-DG ve metformin kombinasyonu ile glioblastoma tümör kürelerinin (GBM-TS) inhibisyonunu rapor etmişlerdir. GBM-TS hücrelerinin invazivliğinde ve farelerin sağkalımında bir azalma olduğunu göstermişlerdir (Kim vd., 2017). Benzer çalışmalar aynı hücre hattı üzerinde ancak 2-DG ile tek bir terapide Huang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Huang vd., 2015). Pruss ve arkadaşları, ONC201/TIC10 ve 2-deoksi-D-glukoz kullanarak glioblastomda antikanser aktivitesi için metabolik yeniden programlamayı araştırdı ve sinerjik etkiler ve tümör inhibisyonu ile sonuçlandı (Pruss vd., 2020). Literatür, 2-DG ve hidroksikamptotesinin (HCPT) MCF-7 ve MDA-MB-231 meme antitümör aktivitesi üzerinde sinerjik bir etkisi olduğunu, Akt fosforilasyonunu inhibe ettiğini, Kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığını ve PARP proteinlerini parçaladığını göstermektedir (Ge vd., 2019). Bu, kombinasyon tedavisinde 2-deoksi-D-glukozun yüksek etkinliğini göstermektedir. Yazarlar herhangi bir yan etki bildirmemiştir. Polidatin ve 2-deoksi-D-glukoz, meme hücre hatlarında beklenmedik antikanser etkinliği göstermiş, ROT'u azaltmış, PI3K/Akt yolağını baskılamış ve morfolojik değişiklikler olmaksızın tümör regresyonunu teşvik etmiştir (Zhang vd., 2019). HBC hücrelerinde mitokondriyal hasarı, apoptozu ve otofajiyi artırmak için 2-DG ve PDT'yi birleştiren, kaspazdan bağımsız sitotoksik etkilere neden olan ve otofajiyi N-asetilsistein ile tersine çeviren bir çalışma (Feng vd., 2019). Farelerde glikoliz ve alfa-glukozidaz inhibitörleri olarak 2-deoksi-D-glukoz ve akarbozun birleştirilmesi tümör hacmini iyileştirdi, büyümeyi engelledi, vücut kütlesini artırdı, glukoz seviyelerini, HK-1 proteinini ve glikolitik ürünleri yukarı regüle etti (Obaid vd., 2022). Meme kanseri tedavisi, seçici östrojen reseptör

modulatorleri ile hormon duyarlılığını hedefler. Yüksek glukoz gereksinimi ve yüksek glutaminoliz, ikincil 4-OHT direnci olan ER α -pozitif MK'yi iyileştirebilir. 2-DG ve CB-839 ile ortak tedaviler canlılık üzerinde daha güçlü inhibisyon gösterir (Steifensand vd., 2021). WFA ve 2-DG kombine edildiğinde sinerjik inhibisyon ortaya çıkmaktadır; apoptoz indüksiyonu ve WFA tarafından büyüme inhibisyonu için gerekli olan enerji bozukluğu (Muniraj vd., 2019). 2-DG ile kombinasyon, GnRH reseptörü pozitif TNBC için potansiyel olarak antitümör tedavileri geliştirerek, canlılığı azalttı ve apoptozu güçlendirdi (Gründker vd., 2019).

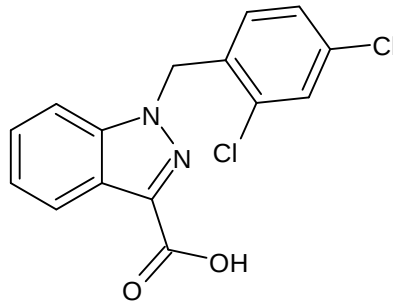
1.11.2.1.2 2-deoksi-D-glukoz Direnci

Memeli ve mikroorganizma hücre kültürlerinde 2-DG toleransına sahip mutantlar tanımlanmış ve 2-DG'ye bağışık mutantların belirlenmesi için genomik taramaya olanak sağlanmıştır. Direnç oluşumunun fazla meydana gelmesi bu çalışmaları kolaylaştırmıştır (Laussel ve Léon, 2020). p53 ve HIF kusurları da 2-DG etkinliğini azaltarak dirence neden olur. *Saccharomyces cerevisiae* genetik taramasında, 2-deoksi-D-glukoza karşı dirence neden olan, glukozun bağlandığı bölgeyi değiştiren, potansiyel olarak kanser biyolojisini ve ilaç direncini etkileyen bir heksokinaz-2 mutasyonu bulunmuştur (Hellemann vd., 2022).

1.11.2.2 Lonidamin (LND)

Lonidamin ([1-(2,4 diklorofenil)-metil]-1H-indazol-3-karboksilik asit) diklorlu bir indazol-3-karboksilik asit türevidir (Şekil 2.5). Hücrelerin vücudun birincil enerji kaynağı olan ATP'yi üretmesini engelleyebilen tümör hücresine özgü bir mitokondriyal heksokinaz II inhibitörüdür. Mitokondriyal adenin translokaz (ANT) ile doğrudan etkileşime girer, böylece mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin (mPTP) açılmasını tetikleyerek apoptoza neden olur. DNA, RNA veya protein sentezi üzerinde doğrudan bir etki tespit edilmemiş olsa da, laktat akışı inhibe edilerek enerji metabolizması yavaşlatılır. İlacın antikanser etkileri tek bir hedefle sınırlı olmayıp birden fazla bölgede çalışarak tümör hücrelerinin hücrel metabolizmayı ve mitokondriyal fonksiyonu yeniden programlamasını bozar (Bhutia vd., 2016). LND, kanser tedavisinde metabolik yolları hedef alarak glikoliz ve mitokondriyal solunum inhibisyonu yoluyla biyoenerjetikliği değiştirir. Ayrıca, hücrelerden H⁺-ilişkili monokarboksilat taşıyıcıları (MKT) ailesi üyeleri aracılı laktik asit çıkışını ve

piruvatın mitokondriyal piruvat taşıyıcı (MPT) alımını önler (Huang vd., 2020). Son çalışmalara göre, izole sıçan karaciğer mitokondrisinde LND, MPC aktivitesini baskılar ve MCT1, MCT2 ve MCT4'ün laktatı taşınmasını önler. İzole sıçan kalp mitokondrisinde MPC'yi inhibe ederek α -siyano-4-hidroksisinnamat gibi MPC ve MCT inhibitörlerini taklit eder (Nancolas vd., 2016). LND ayrıca solunum kompleksi II süksinat-ubikinon redüktaz aktivitesini bozar, hücresel ROT'u uyarır ve PPP'yi baskılayarak hücre ölümünü teşvik eder (Nath vd., 2016). Lonidamin (LND) tarafından laktat taşınmasının engellenmesi, hücre dışı pH'nın hızlı bir şekilde düşmesine ve inorganik fosfatın artmasına neden olarak insan kanser modellerini etkiler (Coss vd., 2014; Nath vd., 2015). Hassas meme kanseri hücre hatlarında laktat taşınımı inhibisyonu hücre canlılığını, metabolizmasını, proliferasyonunu, apoptozunu, migrasyonunu ve invazyonunu azaltır (Marathe vd., 2016). DB-1 melanom, HCC1806 ve BT-474 meme, LNCaP prostat ve A2870 yumurtalık karsinomları dahil olmak üzere çeşitli insan kanser modellerinde karşılaştırılabilir sonuçlar ürettiği gösterilmiştir (Nath vd., 2015). Bir çalışmada, Lonidamin tedavisinin insan melanom hücrelerinde ve DB-1 fare ksenograftlarında NADH seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve Fp redoks oranını artırdığı bulunmuştur (Xu vd., 2019).



Şekil 2.5. Lonidamin'in Yapısı (ChemSketch ile oluşturuldu)

1.11.2.2.1 Lonidamin ve Apoptoz

Lonidamin, birçok kanser hücre hattında apoptoza neden olduğu keşfedildikten sonra olası bir antikanser ilaç olarak araştırılmaktadır. Kanser hücrelerinde enerji üretimini, oksijen tüketimini ve glikolizi inhibe eder. Seçici etkisi, mitokondriyal bağlı heksokinazın inhibisyonu ve hücre iskeleti ve hücre zarlarının yapısı ve işlevindeki erken değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca mitofaji akışını bloke ederek piroptozu indükleyebilir (Ye vd.,

2023). Antikanser ilaç olarak potansiyeline ilişkin araştırmalar devam etmekle birlikte, bazı ülkeler kanser tedavisinde kullanmaktadır (Bhutia vd., 2016). Hücrelerin LND'ye maruz bırakılması hem ebeveyn hem de R-HepG2 hücrelerinde DNA parçalanması, fosfatidilserin dışsallaşması, mitokondriyal işlev bozukluğu ve sitokrom c salınımı dahil olmak üzere birçok önemli apoptotik sürecin indüklenmesine neden olur (Li vd., 2002). MK'de, LND'nin doksorubisin direncini tamamen ortadan kaldırdığı ve epidoksorubisinin sitotoksik etkisini artırdığı bildirilmektedir. Shao ve meslektaşları tarafından yapılan bir alışma, Lonidaminin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptozu nasıl etkilediğini gösterilmiştir. Bulgular, Lonidaminin hücre büyümesini azalttığını ve zaman ve konsantrasyona bağlı inhibisyon ile apoptozu teşvik ettiğini göstermiştir. Azaltılmış ATP seviyeleri, endoplazmik retikulum stres yanıtı, cIAP1'in aşağı regülasyonu ve kaspaz-8 aktivasyonunun teşvik edilmesi etkilere aracılık eden mekanizmalardı (Shao vd., 2015). LND, mitokondriyal yolu sinerjik olarak inhibe ederek tümör gelişimini ve hücresel ölümü azaltır (De Cesare vd., 1998). Bu faktörlerin mPTP'yi aan ve sitokrom c'yi serbest bırakan mitokondriyal sinyal sistemi üzerindeki birleşik etkisi ve ardından apoptozu gerçekleştirmek için kaspaz 9 ve kaspaz 3 aracılı olaylardan oluşan bir kaskadı hazırlaması, sinerjik olarak antikanser etkinliğinin altında yatan mekanizmalardır. İlaça dirençli hücrelerde p53 yolu LND tarafından aktive edilmemiştir (Bufalo vd., 1996).

Lonidamin, net olmayan bir yapı-aktivite ilişkisi ile dönüşmemiş hareketliliği baskılayarak hücre genişlemesini düzenler. alışmalar, halojenasyon modellerinin, karboksilik asit kısmının ve hidrofobikliğin inhibisyon aktivitesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Aoyama vd., 2023). LND, tedavi edilen hücrelerde süksinat biriktirerek fumarat ve malat oluşumunu engeller ve mitokondriyal solunumu baskılar. LND hücresel ROT'u uyararak hücre canlılığını azaltır ve hücre ölümünü teşvik eder. Ek olarak, glutaminolizi artırırken glutaminden üretilen α -ketoglutaratın indirgeyici karboksilasyonunu azaltır (Guo vd., 2016).

1.11.2.2 Kombinasyon Tedavisi

Lonidaminin farklı kanserlere karşı seçici aktivitesi ile diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine edildiğinde yan etkileri arasında bir örtüşme yoktur, bu da onu antitümör etkilerini arttırmak için gl bir kemosensitizer yapar. Metabolik modifiye edicilerin kanser ilaçlarıyla birleştirilmesi, in vitro ve in vivo olarak umut verici bir etki göstermiştir ve bu da

etkinliği artırma ve direnci azaltma potansiyeline işaret etmektedir. Araştırmalardaki son gelişmeler arasında yeni formölasyonlar ve Lonidamin türevi adjudinin bir antikanser ilacı olarak geliştirilmesi yer almaktadır (Huang vd., 2020). Cohen-Erez ve meslektaşları tarafından yapılan bir çalışmada, LND-mPoP-NP ilaç konsantrasyonlarının terapötik olarak değerli seviyelere yükseltilmesi mümkün olmuştur. C-LND-mPoP-NPs formölasyonu nanopartiköl (NP) boyutunu korumuş ve mitokondriyi hedef alarak zararlı etkiler olmaksızın %40 daha iyi sitotoksosite ve tümör büyümesi inhibisyonu sergilemiştir (Cohen-Erez vd., 2019). Araştırmacılar doksorubisin (DOX) ve Lonidamini aynı anda vermek için hücre dışı veziköller kullandılar. Sonuçlar arasında artan sitotoksosite, daha düşük dozajlar, azalan kanser hücresi çoğalması ve iyileştirilmiş in vivo çalışma etkinliği yer aldı (Li vd., 2022). Glikoliz, glutaminoliz ve yağ asidi sentezini hedeflemek için Cervantes-Madrid ve arkadaşları Lonidamin, 6-diazo-5-okso-L-norlösin ve orlistat kombinasyonunun in vivo uygulanabilirliğini ve etkinliğini araştırmıştır. Kombinasyon, toksisite gözlenmeden tümör büyümesini önemli ölçüde azaltmış ve umut verici bir kanser tedavisi yaklaşımına işaret etmiştir (Cervantes-Madrid vd., 2017). Başka bir çalışmada, kombinasyon kemokin ve büyüme faktörü ekspresyonunu azaltarak fosforile-nökleer faktör κ B-p65'i etkilemiştir. (Schcolnik-Cabrera vd., 2019). Nath ve arkadaşları, Lonidaminin melanom ksenograftlarında temozolomid aktivitesini artırarak tümör hacmini ve medyan büyüme gecikmelerini azaltabileceğini bulmuşlardır. (Nath vd., 2017). Platin bazlı antikanser ilaçlar, LND ile konjuge edildiğinde, sisplatinden elde edilen kompleks 1 ile LNCaP hücrelerine karşı antikanser aktivitesini artırarak apoptoz ve hücre döngüsü durmasını tetikleyerek iyileşir (Chen vd., 2018). Azot (N)-mustard, klorambusil, siklofosfamid ve bendamustinin analiz edildiği bir çalışmada, LND'nin asit stabilizasyonu, glutatyon-S-transferaz inhibisyonu ve DNA onarım inhibisyonu yoluyla bu ilaçları güçlendirdiği bulunmuştur (Nath vd., 2016).

1.11.2.2.3 Lonidamine Direnci

İlaç direnci, tüm ilaç türleri için önemli bir zorluktur. Çoklu ilaç direnci (MDR), aşırı eksprese edilen P-glikoproteinler ve yukarı regölö edilen anti-apoptotik proteinler ile kanser tedavisinde çok önemlidir. Yetersiz tedaviler nedeniyle kanser insidansı ve mortalitesi artmakta, bu da tedaviye direnç ve nökse yol açmaktadır. Del Bello ve meslektaşları, LND türevleri ile Cu(I) ve Cu(II) kompleksleri oluşturarak önemli antitümör aktivite göstermiş,

sisplatinden daha iyi performans göstermiş ve oksaliptatin ve çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmiştir (Del Bello vd., 2022). Bu durum, direnci azaltmak için kombinasyon tedavilerinde Lonidaminin potansiyel kullanımına işaret etmektedir. İlerlemiş MK hastalarında LND, adriamisin ve cis-platinuma karşı tümör hücresi direncini tersine çevirebilir ve epirubisin aktivitesini artırabilir. MCF-7 ADRR insan meme kanseri hücre hatlarında, Lonidamin ADR direncini tersine çevirir (F. Wang vd., 2000).

1.11.2.2.4 Diğer Kullanım Alanları

Antitümör etkinliğinin yanı sıra, Lonidamin, inflamazomla ilişkili bozuklukların deneysel modellerinde anti-inflamatuvar etkilere sahiptir, hasarı hafifletir ve inflamazom aktivasyonunu bloke eder (Chen vd., 2022). Akciğer kanserinde, modifiye bir Lonidamin olan Mito-LND, mitokondriyal biyoenerjettiği inhibe ederek farelerde hücre canlılığını ve metastazı azaltır ve umut verici bir terapötik yaklaşım olarak mitokondriyal hedeflemeyi önermektedir (Cheng vd., 2019). Benzer araştırmalar Mito-LND'nin AKT/mTOR/p70S6K sinyalizasyonunu ve mitokondriyal kompleks I ve II'yi inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Zhang vd., 2022). Misellerde kemosenstizer olarak betulinik asit ve Lonidamin kullanılarak yumurtalık kanserinin tedavisi için sinerjik kombinasyon terapisinde tümöre özgü alan salınımı olasılığı gösterilmiştir (Jin vd., 2019). Martinez-Florez ve arkadaşları, Lonidamin gibi kanser tedavisinde etkili olan ilaçların parazit hastalıklarını tedavi edebileceğini tespit etmişlerdir (Martínez-Flórez vd., 2020).

1.11.2.2.5 Lonidamin klinik kullanımının önündeki zorluklar

Lonidamin, sinerjik etkileri nedeniyle kanser tedavisinde kullanılır, ancak zayıf çözünürlüğü ve yavaş difüzyonu kullanımını engeller (Liu vd., 2017). Suda çözünürlüğünün zayıf olmasının yanı sıra, LND'nin klinik uygulaması düşük mitokondriyal seçiciliği ile sınırlıdır (Yang vd., 2023). Bir çalışmada hipergliseminin Lonidaminin terapötik yanıtını azalttığı ve yaklaşık 8 günlük bir büyüme gecikmesine neden olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, tümörlerde laktik asit üretimini alt kat oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Nath vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

1.12 3.1. Materyaller

1.12.1 Kullanılan Hücre Hatları

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D'dan (Eskişehir, Türkiye) temin edilmiştir. Bütün deneyler, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

1.12.2 Kullanılan Bilgisayar programları ve Internet Kaynakları

Tablo 3.1. Kullanılan Bilgisayar programları ve Internet Kaynakları

İsim	Şirket
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software California
Biorender.com	Science Suite Inc.
RTCA Software 2.0	ACEA Biosciences Inc.
ChemSketch	ACD/Labs
Biotek Gen5 Software	Agilent BioTek Gen5
CytExpert Software Version 2.6	Beckman Coulter Inc.

1.12.3 Kullanılan ekipmanlar

Tablo 3.2. Kullanılan ekipmanlar

İsim	Şirket
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton, Almanya
CytoFLEX Flow Cytometer	Beckman Coulter Inc.

Ultra düşük sıcaklıklı dondurucu	Eppendorf U410, Almanya
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik No Frost, Türkiye
Distile su cihazı	Nüve ND12, Türkiye
Karbondioksitli (CO ₂ 'li) inkübatör	Thermo Fisher Scientific Hera Cell 240, Almanya
Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem (ELISA) okuyucu	BioTek ELx800, US
Santrifüj	Thermo Fisher Scientific Heraeus Megafure 1.0R, ABD
25 cm ² ve 75 cm ² hücre kültürü flasklar	NEST Biotech, Çin
Otoklav	ALP CL32L, Japonya
Su banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Vorteks	IKA Yellowline TTS2, Çin
Buz makinesi	Simag, İtalya
Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA)	Roche, Almanya
Hassas terazi	Ohaus AV264C, İsviçre
Sterilizatör	Nüve FN500, Türkiye
İnverted mikroskop	Leica DM IL LED, Almanya

Tablo 3.3. Kullanılan ekipmalar (Devam)

1.12.4 Kullanılan kimyasallar

Tablo 3.4. Kullanılan kimyasallar

İsim	Şirket
2-deoksi-D-glukoz	ThermoFisher Scientific, ABD
Lonidamin	Boston Scientific, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, ABD
Disodyum fosfat (NA ₂ HPO ₄)	Merck, Almanya
Etil alkol	Necm, Türkiye
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, ABD
MTT [(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)]	Appllichem, Almanya
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma-Aldrich, ABD
Penisilin/Streptomisin solüsyonu	Thermo Fisher Scientific, ABD
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, Almanya
Akridine orange	Sigma-Aldrich, Almanya

Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum klorür (NaCl)	Detsan, Türkiye

Tablo 3.5. Kullanılan kimyasallar (Devam)

1.12.5 Kullanılan ticari kitler

Tablo 3.6. Kullanılan ticari kitler

İsim	Şirket
CaspGLOW Fluorescein Aktive Caspase-9 Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, ABD
Caspase-8 Detection Kit (FITC-IETD-FMK)	Calbiochem/Sigma-Aldrich, Almanya
JC-1 Assay Kit	BD Biosciences, ABD
Active Caspase-3 FITC Mab Apoptosis Kit	BD Biosciences, ABD
Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, ABD

1.13 Yöntemler

Bu metabolik inhibitörlerin meme kanseri hücre hatlarında apoptoz üzerindeki etkilerini incelemek için kontrollü koşullar altında aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

1.13.1 Hücre Kültürü Uygulamaları

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eskişehir, Türkiye) Biyokimya A.B.D’den temin edilmiştir. Meme kanseri hücreleri, hücre kültürü çalışmalarında %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco’s Modified

Eagle Media (DMEM) ortamında yetiştirilmiş ve %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren bir inkübatörde 37°C'de kültürde tutulmuştur. Her deneyden önce ve sonra steril bir çalışma ortamı sağlanmıştır.

1.13.1.1 Hücrelerin stoklanması

Çoğaltılan hücreler, ileri çalışmalar için sıvı azot içinde -196°C'de stoklanıp saklanmıştır. Hücrelerin saklanması için, %90 doluluğa ulaşmış olan 75 cm²'lik flasklardaki MCF-7 hücreleri toplandı, eski besiyeri atıldı ve hücreler 1×fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile bir kez yıkandı. Hücreler, 1×Tripsin-EDTA ile muamele edilerek 5 dakika inkübe edildi. Hücrelerin flasktan ayrılması, inverted mikroskop ile gözlemlendi ve ayrılan hücrelerin üzerine tripsinin etkisini nötralize etmek için besiyeri eklendi. Hücreler, bir falcon tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve her bir karyotüp için 1800 µl besiyeri (hücre içeren) ve 200 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklendi. Karyotüpler, -20°C'de 2 saat bekletildikten sonra bir gece -80°C'de saklandı ve daha sonra sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirildi.

1.13.1.2 Hücrelerin stoktan çıkarılması

Hücreler azot tankından alınmadan önce, 15 ml'lik bir Falcon tüpü 2 ml oda sıcaklığında ki DMEM besiyeri ile dolduruldu. Hücreler azot depolama tankından çıkarıldı ve oda sıcaklığında çözölmeye bırakıldı. Çözölen hücreler tüplere aktarıldı ve hemen ardından oda sıcaklığında 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve hücreler PBS ile yıkayıp yeniden santrifüj edildi. DMSO'nun tamamen uzaklaştırıldığından emin olmak için işlem besiyeri ile tekrarlandı. Daha sonra hücrelere 5 ml DMEM ilave edilip 25 cm²'lik bir flaska aktarıldı. Hücrelerin homojen dağılımı mikroskop altında gözlemlendi ve %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. 24 saat sonra, eski besiyeri yenisi ile değiştirildi.

1.13.1.3 Hücre hatlarının pasajlanması

Hücreler %80-90 doluluğa ulaştıktan sonra besiyeri çıkarıldı ve hücreler bir kez PBS ile yıkandı. PBS aspirasyonundan sonra, hücreler 1×Tripsin-EDTA ile muamele edildi ve 5

dakika inkübe edildi. Hücrelerin flasktan ayrılması inverted mikroskop kullanılarak gözlemlendi ve ardından tripsinin etkisini nötralize etmek için besiyeri eklendi. Hücreler Falcon tüplerine aktarıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı, hücre pelletine besiyeri eklendi ve hücreler 75 cm²'lik flasklara aktarıldı. Flasklar, hücrelerin çoğalması için %5 CO₂ ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.

Her üç günde bir hücreler, tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilerek çoğaltıldı, 25°C'de 1200 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlendi ve 1:3 oranında alt kültürlendi.

1.13.2 Sitotoksite Testleri

Kanser hücresi canlılığı MTT, tetrazolium boya yöntemi ve Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (xCELLigence) kullanılarak değerlendirilmiştir.

1.13.2.1 MTT Testi

MTT yönteminde MTT formazana indirgenir. % 90 doluluk seviyesindeki MCF-7 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara 1×10⁴ hücre/kuyucuk (200 µL) olacak şekilde ekilmiş, ardından hücrelerin kuyucuk duvarlarına yapışması için 24 saat (37 °C) inkübe edilmiştir. 24 saat sonra, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi için 37 °C'de değişen konsantrasyonlarda 2-DG (0.5, 1, 1.25, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 ve 30 mM) ve Lonidamin (0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ve 150 µM) ile inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/ml) eklenmiş (karanlık ortamda) ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bunun ardından inkübasyon ortamı (MTT boyasıyla birlikte) çıkarılmış, 200 µL DMSO eklenmiş ve Biometra WT 17 rotor üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimi ELx800 Bio-Tek plaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir. MTT testinde, deneyler her konsantrasyon grubu için beş kuyu kullanılarak üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar inhibisyon konsantrasyonlarını belirlemek için kullanıldı.

1.13.2.2 xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA) ile Lonidamin ve 2-Deoksi-D-glukozun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

RTCA sistemi, hücre morfolojisi, canlılığı ve ölüm durumu hakkında altın elektrot plakaları kullanarak karakterizasyon, proliferasyon, sitotoksikite, adezyon ve sinyal iletimi için hassas ve gerçek zamanlı veriler sağlar.

Gerçek zamanlı analizle hücre canlılığı testinde, çeşitli konsantrasyonlarda Lonidamin ve 2-DG ile muameleden sonra canlı hücreler xCELLigence canlı hücre analiz cihazı ile belirlenmiştir. Bu yöntemde, üç hücre plakasına önce 100 µL besiyeri eklenmiş ve okumalar boş konsantrasyonlar olarak alınmıştır. Bunu MCF-7 hücrelerinin kuyu başına 1×10^4 hücre konsantrasyonunda inkübasyonu izlemiştir. Ölçümler 24 saat boyunca 15 dakikaya ayarlanmıştır. İlk 24 saatten sonra kültür ortamı bir konsantrasyon ortamı ile değiştirilmiştir. Ölçümler 72 saat boyunca her 15 dakikada bir olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyler, her bir Lonidamin ve 2-DG konsantrasyonları için dört kuyucukta ve üç tekrar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar inhibisyon konsantrasyonlarını belirlemek için kullanıldı. Kontrol grubu için %100 canlılık varsayılarak IC₅₀ belirlendi.

1.13.3 Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

1.13.3.1 Annexin V FITC: Erken ve Geç Apoptozun Tespiti

Lonidamin ve 2-DG tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümü, üreticinin protokolüne göre Annexin V-FITC kiti kullanılarak akış sitometrisi ile ölçülmüştür. Hücreler altı kuyulu bir plakaya 1×10^6 yoğunlukta yerleştirilmiş ve 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saatin sonunda hücreler soğuk PBS ile iki kere yıkanıp ardından 1x tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Kalkan hücreler 1 mL besi ortamı kullanılarak tüplere aktarılmış ve 5 dakika boyunca 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, hücre peletleri 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda 100 µL 1x bağlama tamponu içinde yeniden süspanse edilmiştir. 5'er µL Annexin V FITC ve PI (propidium iyodür) eklenmiştir. Hücreler karanlık bir ortamda 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süspansiyona 400 µL 1x bağlayıcı tampon eklenmiş ve bir saat içinde BECKMAN COULTER CytoFLEX akış sitometresi (ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücrelerin sayısı pozitif kontrollere (boya içermeyen hücreler ve boya içeren ancak

ilaç tedavisi uygulanmayan hücreler) göre hesaplanmıştır. Sonuçlar BECKMAN COULTER CytoFLEX 2.6 yazılım programı ile tespit edilmiştir.

1.13.3.2 Kaspaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kaspaz-3 ve -8, -9 ekspresyonlarını ölçmek için Aktivite Test kitleri kullanılmıştır. Prosedürler üreticilerin yönergelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

1.13.3.2.1 Kaspaz-3 Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Kaspaz-3 için, MCF-7 hücreleri LND ve 2-DG ile 24 ve 48 saatlik muameleden sonra toplanmış, iki kez soğuk 1X PBS ile yıkanmış ve 1×10^6 hücre/0,5 ml konsantrasyonunda BD Cytofix/Cytoperm solüsyonunda yeniden süspanse edilmiştir. Hücreler buz üzerinde 20 dakika inkübe edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Pellet de kalan hücreler oda sıcaklığında 0,5 ml tampon/ 1×10^6 hücre hacminde 1X BD Perm/yıkama ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler pelletlenmiş ve 0,1 ml 1X BD Perm/Yıkama tamponu ve 20 µL antikor içinde yeniden süspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Her test 1,0 ml BD Perm/Yıkama tamponunda yıkandı, 0,5 ml BD Perm/Yıkama tamponunda yeniden süspanse ve edilmiş olan hücreler akış sitometri cihazı ile değerlendirilmiştir.

1.13.3.2.2 Kaspaz-9 Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Kaspaz-9 için, hücrelerde 24 ve 48 saat boyunca LND ve 2-DG ile muamele edilerek indüklenmiştir. Muameleden sonra, hücreler yıkanmış ve 300 µL besiyeri kullanılarak bir tüpte yeniden süspanse edilmiştir. Her tüpe 1 µL FITC-LEHD-FMK eklenmiş ve %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde 40 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, 0,5 mL Yıkama Tamponu ile yıkanmış (bu aşama iki kez tekrarlanmıştır) ve süspanse edilmiş olan hücreler akış sitometri cihazı ile değerlendirilmiştir.

1.13.3.2.3 Kaspaz-8 Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Caspase-8 için, hücrelerde apoptoz, LND ve 2-DG ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda indüklenmiştir. Muameleden sonra, hücreler yıkanmış ve 300 µL besiyeri kullanılarak bir tüpte süspanse edilmiştir. Her tüpe 1 µL FITC-IETD-FMK eklenmiş ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki bir inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir. Hücreler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 0.5 mL yıkama tamponu ile yıkanmıştır ve bu adım tekrarlanmıştır.

Hücreler 300 µL yıkama tamponunda süspansiyon edilerek buz üzerine konulmuştur. Analiz, FL-1 kanalını kullanarak akış sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir.

1.13.3.3 Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP) Tayini:

Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$), ticari kit talimatlarına göre JC-1 kiti kullanılarak değerlendirildi.

$\Delta\Psi_m$, lipofilik katyonik bir JC-1 probu kullanılarak tahmin edilmiştir. 5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1) mitokondriyal matrikste birikir ve $\Delta\Psi_m$ etkisi altında kırmızı bir floresan verir. Mitokondri depolarizasyonu, JC-1 agregatlarının kaybına ve yeşil floresan JC-1 monomerlerinin artışına yol açar. MCF-7 hücreleri 6 kuyulu plakalara 1×10^6 hücre/mL konsantrasyonlarında ekilir. Belirlenen 2-DG ve LND konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edildikten sonra hücreler 2 µM JC-1 ile muamele edilmiş ve 37°C, %5 CO₂'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Kontroller için hücreler önce 50 mM karbonil siyanür 3-klorofenilbenhidrazon (CCCP) ile muamele edilmiş ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. CCCP ile muamele edilmemiş hücreler pozitif kontrol olarak kabul edilmiştir. Hücreler 2 mL PBS içinde bir kez yıkandı ve 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Hücreler tüplere hafifçe vurularak 500 µL içinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Hücreler 488 nm uyarımlı FACS Vantage akış sitometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Son olarak, mitokondriyal membrandaki değişiklikler, yeşil floresan (FL-1, kayıp $\Delta\Psi_m$ olan hücreler) ile kırmızı floresanın (FL2, canlı $\Delta\Psi_m$ canlı hücreler) nokta grafiği elde edilerek belirlenmiştir.

1.13.4 İstatistiksel Analiz

Kontrol ve tedavi edilen hücreler arasındaki yarı-maksimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri, R-kare ve p-değeri GraphPad Prism sürüm 8.0 (GraphPad Software Inc.) kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ anlamlılık seviyeleri kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar Bonferroni'nin çoklu karşılaştırmaları ile tek yönlü ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm deneysel grafikler ve sonuçlar ekte yer almaktadır.

4. BULGULAR

1.14 Sitotoksosite Bulguları

DG ve Lonidaminin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkileri artan 2-DG (0.5, 1, 1.25, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 mM) ve Lonidamin (0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ve 150 µM) konsantrasyonları ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı hem MTT testinde hem de Xcelligence kullanılarak gerçek zamanlı (RTCA) hücre analizinde tespit edilmiştir (Bölüm 3.2.2'de açıklandığı gibi). MTT deneyi ve RTCA sonuçları Ek A'da sunulmuştur. RTCA ve MTT'den elde edilen 2-DG ve Lonidaminin sitotoksik etkileri konsantrasyona ve zamana bağlıydı; daha yüksek dozlar yüksek sitotoksositeye sahipti ve sitotoksosite zamanla arttı. MTT için, % canlılık formülü kullanılarak her doz için yüzde canlılığı tespit edildi.

Denklem 4.1. MTT için % canlılığın belirlenmesi

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Konsantrasyon Ortalaması} - \text{Boş Ortalama}}{\text{Kontrol Ortalaması} - \text{Boş Ortalama}} \times 100$$

RTCA için, aşağıda gösterilen formüller kullanılarak her bir doz için yüzde canlılığı tespit edildi (Denklem 4.2 ve Denklem 4.3).

Denklem 4.2. Konsantrasyonların normalleştirilmesi için

$$\text{Normalization} = \frac{\text{Belirli bir zamandaki konsantrasyon}}{\text{Normalleştirme sırasındaki konsantrasyon}}$$

Denklem 4.3. RTCA için % canlılığın belirlenmesi

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Normalize edilmiş konsantrasyon ortalaması}}{\text{Normalize edilmiş kontrol ortalaması}} \times 100$$

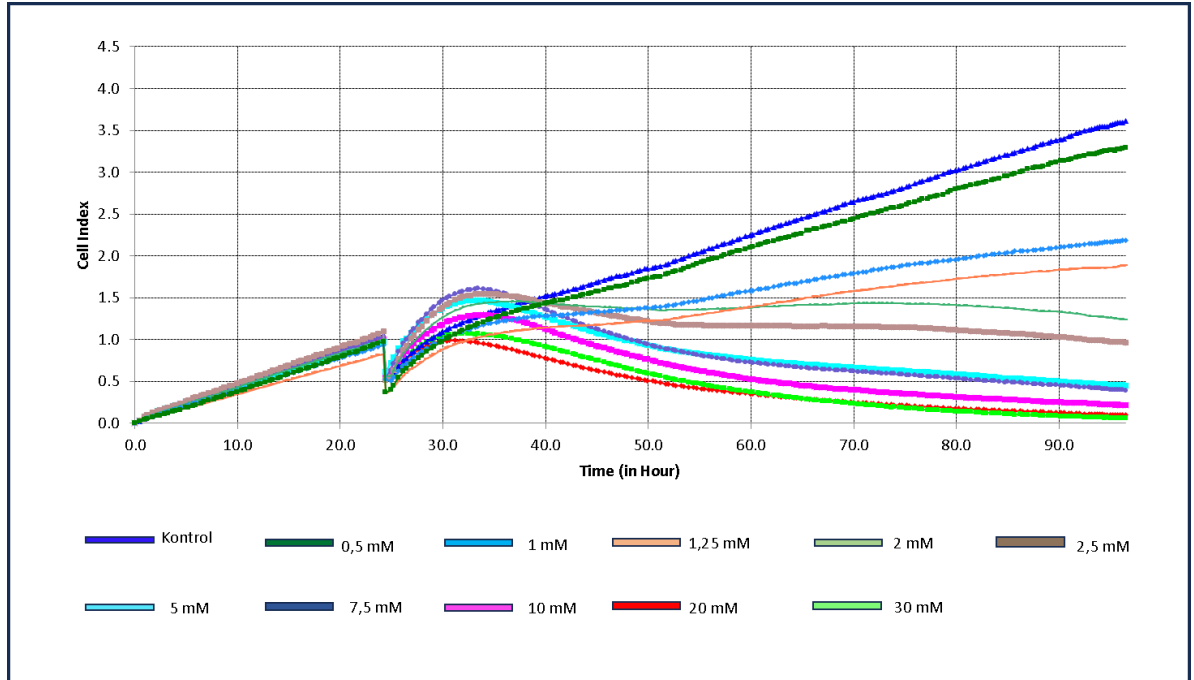
Her bir konsantrasyon için % canlılık formülü (Denklem 4.1 and Denklem 4.3) kullanılarak hesaplanan ortalamalar alınmış ve GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Grafikselleştirilmiş sonuçlar Şekil 4.1- 4.4'de ve ortalama veriler Ek A'da sunulmuştur.

1.14.1 Xcelligence kullanılarak gerçek zamanlı (RTCA) hücre analizi Sonuçları

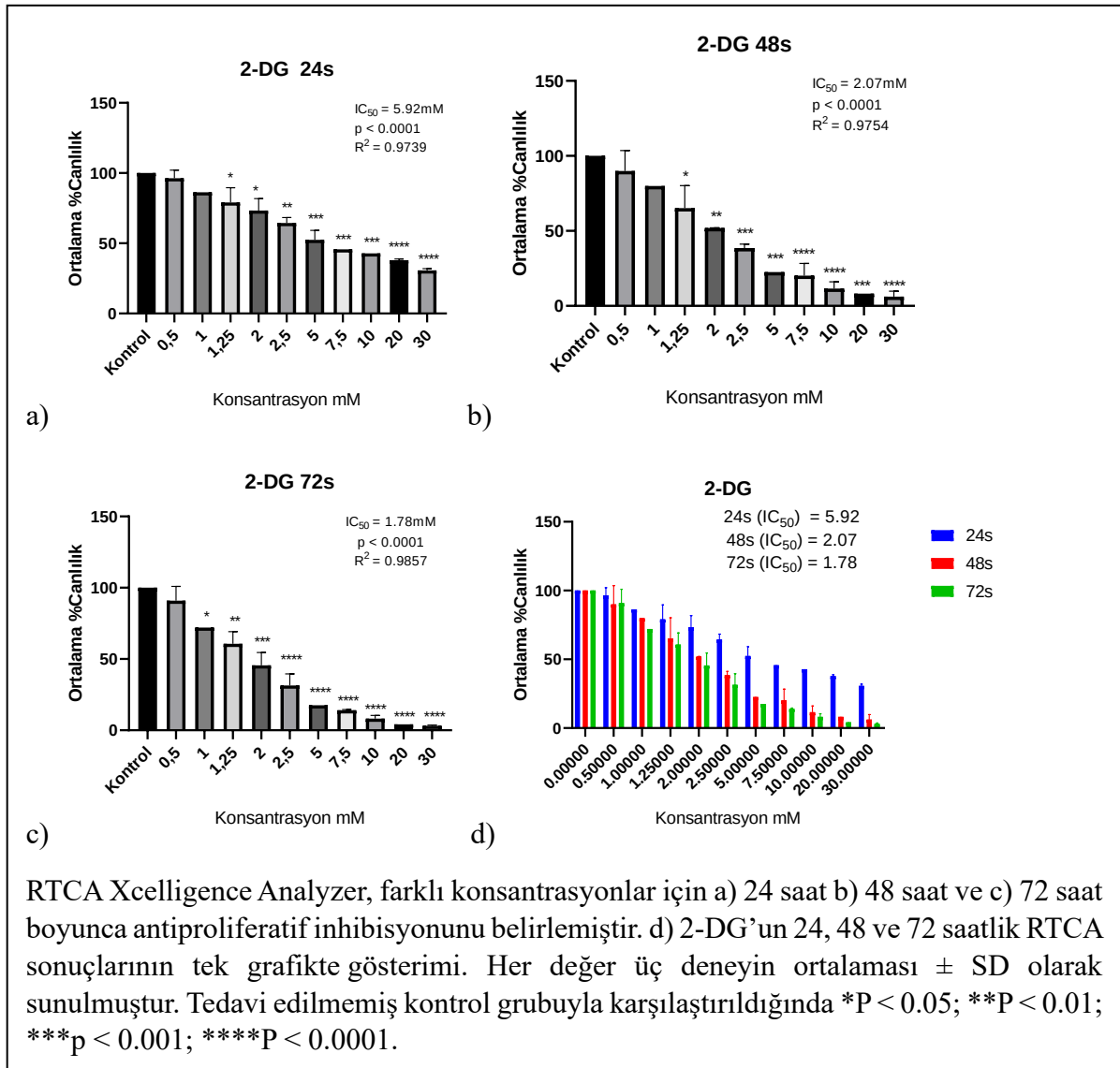
1.14.1.1 2-deoksi-D-glukoz

2-deoksi-D-glukoz muamelesi sonuçları için xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden GraphPad Prism kullanılarak belirlenen IC₅₀ değerleri 24 saatlik: 5,9173 mM; 48 saatlik: 2,07 mM; ve 72 saatlik: 1,78 mM (Şekil 4.1). Grafiğe göre (Şekil 4.2), 24 ve 48 saatleri için, 0,5 ve 0,1 dozları MCF-7 kanser hücrelerine istatistiksel olarak daha az sitotoksik etki gösterirken, daha yüksek dozların hücre canlılığını engellemesi istatistiksel olarak anlamlıydı. 72 saatlik muamelede 1 mM dozda istatistiksel olarak anlamlı hücre büyüme inhibisyonu gözlenmiştir. Grafiğe göre, metabolik inhibitör 2-DG'nin antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağlı; daha yüksek dozlar, hücre proliferasyonunu düşük dozlara göre daha fazla inhibe etti. 2-DG, MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağımlı bir şekildeydi.

Hücre indeksi verileri RTCA Software 2.0 programında 24 saate normalize edilmiştir. Verilerin hücre indeksi grafiği çizilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 72 saat boyunca farklı 2-deoksi-D-glukoz konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği



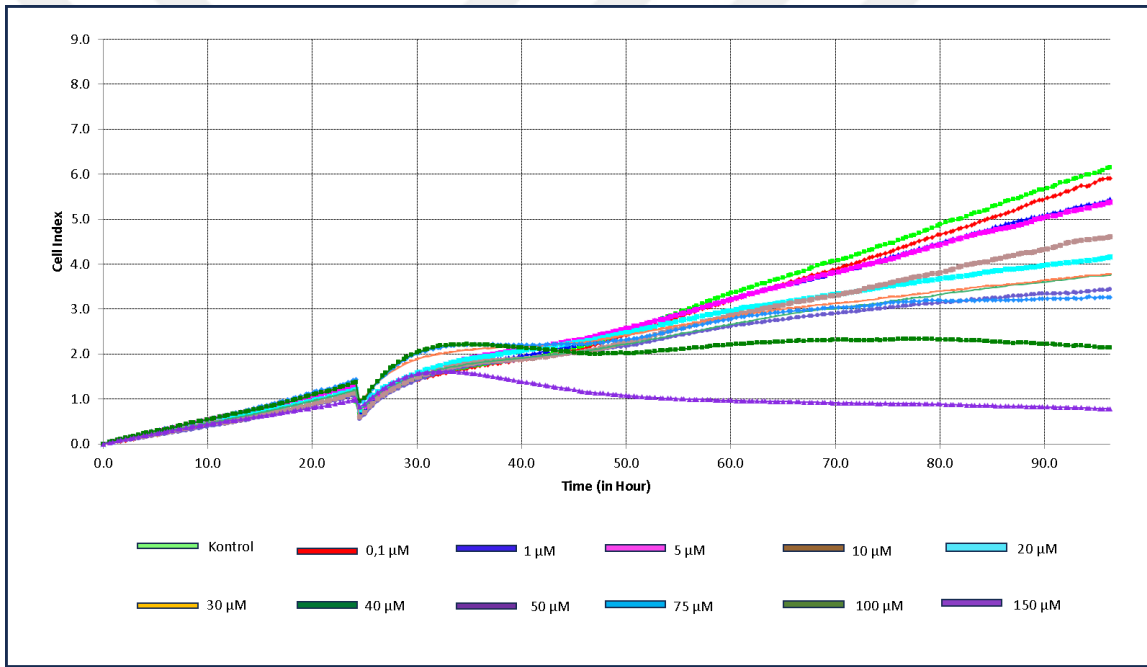
Şekil 4.2. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı 2-DG konsantrasyonlarının muamelesi ile xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen grafik

1.14.1.2 Lonidamin

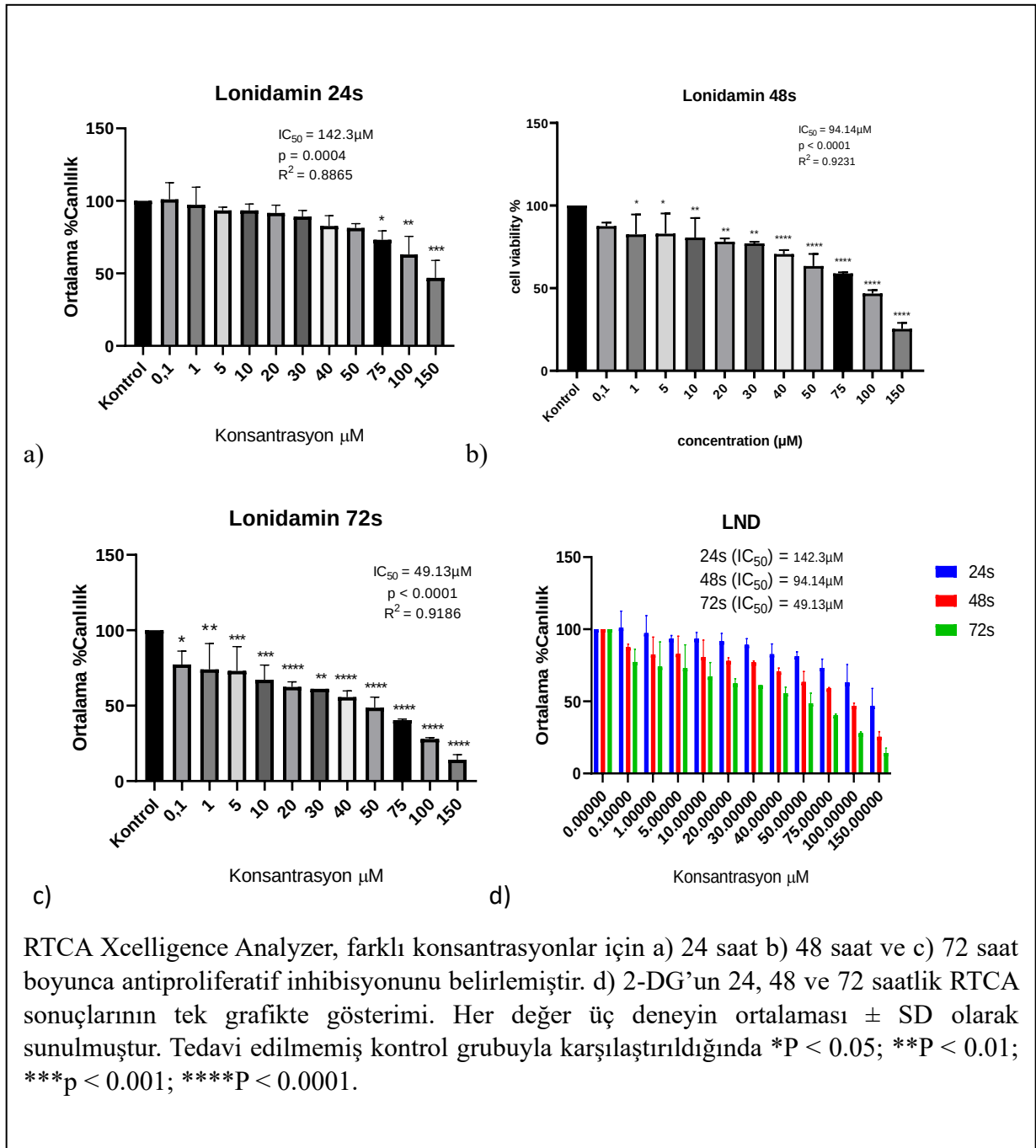
Lonidamin muamelesi sonuçları için xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden GraphPad Prism kullanılarak belirlenen IC_{50} değerleri 24 saatlik: 142,30 μM ; 48 saatlik: 94,24 μM ; ve 72 saatlik: 49,13 μM (Şekil 4.4) olarak tespit edildi. Grafiğe göre, 24 saat boyunca, 50 μM ve daha düşük Lonidamin dozlarının MCF-7 kanser hücrelerinde istatistiksel olarak daha az sitotoksik etki gösterdiği, daha yüksek dozların ise hücre canlılığını engellemesinin istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu görülmüştür. 48 saatlik muamelede 0,1 μM dozda istatistiksel olarak anlamlı hücre büyüme inhibisyonu

gözlenmiştir. 72 saatlik muamelede her dozda istatistiksel olarak anlamlı hücre büyüme inhibisyonu gözlemlendi. Grafiğe göre, metabolik inhibitör LND'nin antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağlıydı; daha yüksek dozlar, hücre proliferasyonunu düşük dozlara göre daha fazla inhibe etti. LND, MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağımlı bir şekildeydi.

Hücre indeksi verileri RTCA Software 2.0 programında 24 saate normalleştirildi. Verilerin hücre indeksi grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MCF-7 meme kanseri hücre hattının 72 saat boyunca farklı Lonidamin konsantrasyon aralıkları ile muamelesinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen hücre indeksi grafiği

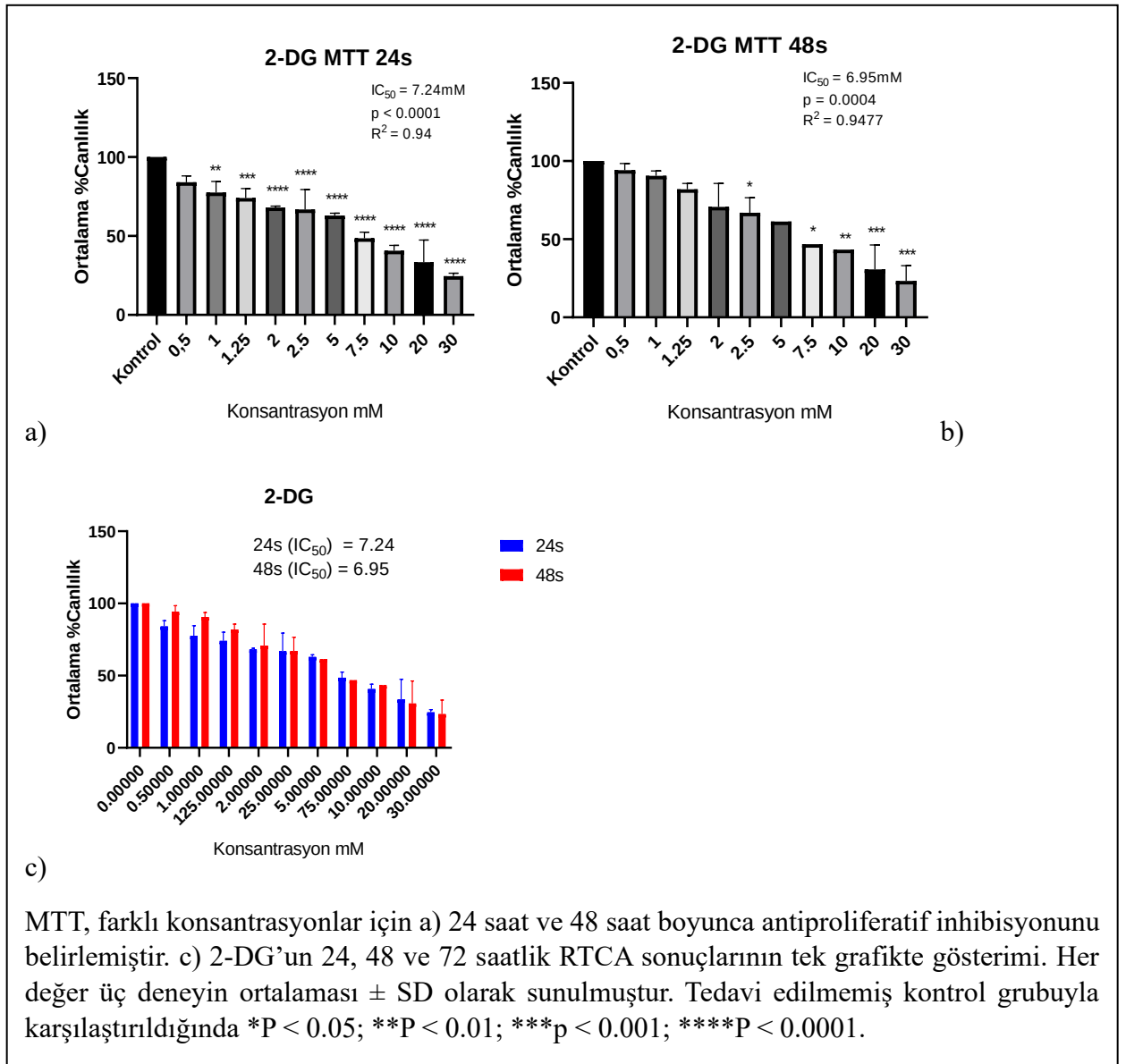


Şekil 4.4. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı LND konsantrasyonlarının muamelesi ile xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) ile ölçüm sonucu elde edilen grafikleri.

1.14.2 MTT Sonuçları

1.14.2.1 2-deoksi-D-glukoz

2-Deoksi-D-glukoz muamelesi sonuçları için MTT analizi yöntemi kullanılarak GraphPad Prism ile belirlenen IC₅₀ değerleri, 24 saatlik: 7,24 mM ve 48 saatlik: 6,95 mM olarak bulunmuştur (Şekil 4.5). Grafiğe göre (Şekil 4.5), 24 saat boyunca MCF-7 kanser hücrelerine uygulanan 0,5 mM 2-deoksi-D-Glukoz dozu istatistiksel olarak daha az sitotoksik etki gösterirken, daha yüksek dozların hücre canlılığını engellemesi istatistiksel olarak anlamlıydı. 48 saatlik muamelede, 5 mM ve düşük dozlarda, 2,5 mM doz hariç, istatistiksel olarak anlamlı hücre büyüme inhibisyonu gözlenmedi. Daha yüksek dozların hücre canlılığını engellemesi istatistiksel olarak anlamlıydı. Grafiğe göre, metabolik inhibitör 2-DG'nin antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağlıydı; daha yüksek dozlar, hücre proliferasyonunu düşük dozlara göre daha fazla inhibe etti. 2-DG, MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağımlı bir şekildeydi.

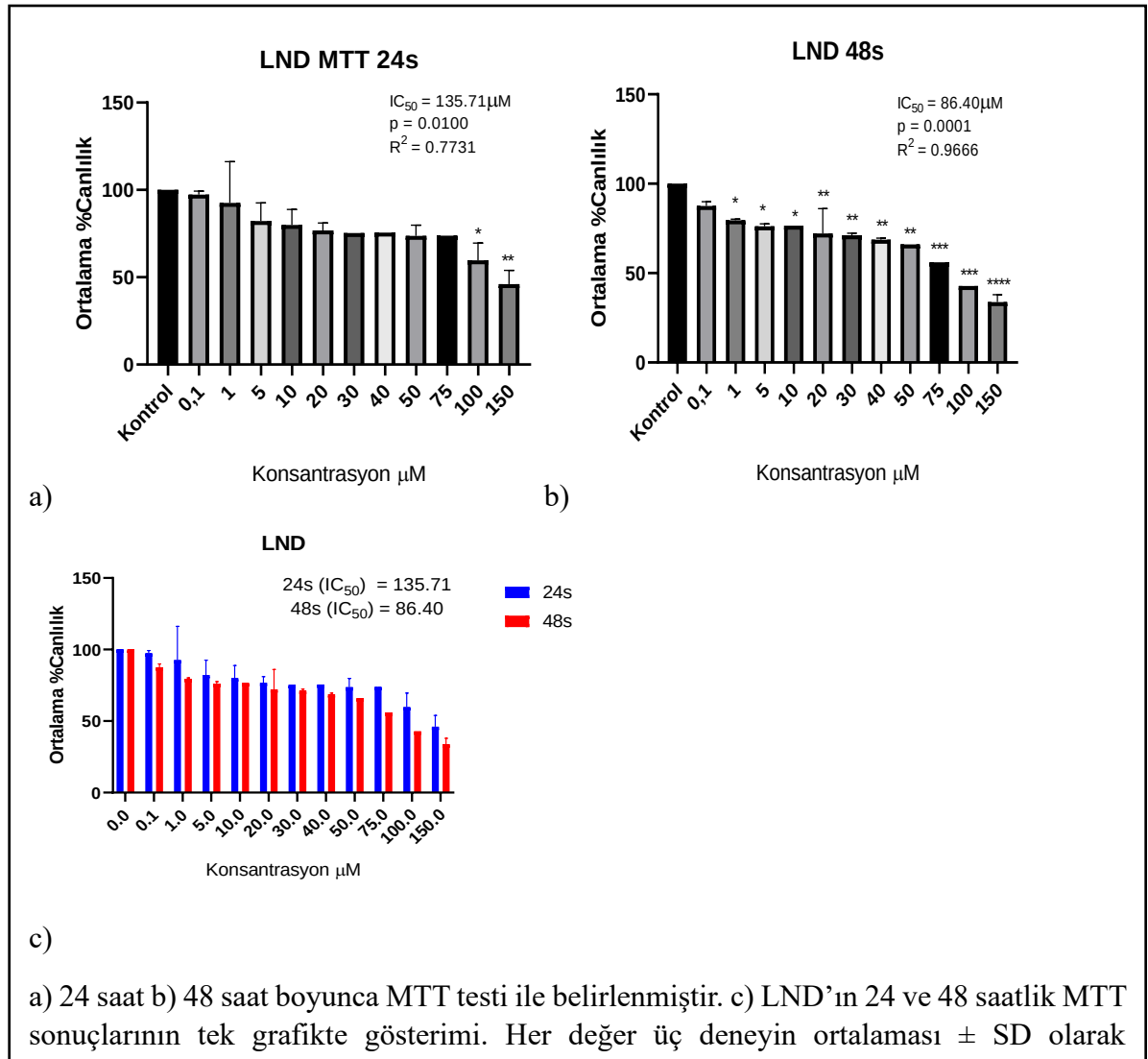


Şekil 4.5. 2-MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24 ve 48 saat boyunca farklı 2-DG konsantrasyonlarının muamelesi ile MTT hücre analiz sistemi ile ölçüm sonucu elde edilen grafikleri

1.14.2.2 Lonidamin

Lonidamin muamelesi sonuçları için MTT analizi yönteminden GraphPad Prism kullanılarak belirlenen IC₅₀ değerleri 24 saatlik: 135,71 µM; 48 saatlik: 94,24 µM; ve 72 saatlik: 49,13 µM (Şekil 4.6) olarak bulunmuştur. Grafğe göre (Şekil 4.6), 24 saatlik için, 75 µM ve daha düşük dozları MCF-7 kanser hücrelerine istatistiksel olarak daha az sitotoksik etki gösterirken, daha yüksek dozların hücre canlılığını engellemesi istatistiksel olarak

anlamlıydı. 48 saatlik muamelede 0,1 μM dozda istatistiksel olarak anlamlı hücre büyüme inhibisyonu gözlenmemiştir, daha yüksek dozların hücre canlılığını engellemesi istatistiksel olarak anlamlıydı. Grafiğe göre, metabolik inhibitör LND'nin antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağlıydı; daha yüksek dozlar, hücre proliferasyonunu düşük dozlara göre daha fazla inhibe etti. LND, MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi konsantrasyona bağımlı bir şekildeydi.



Şekil 4.6. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin 24 ve 48 saat boyunca farklı LND konsantrasyonlarının muamelesi ile MTT ile ölçüm sonucu elde edilen grafikleri

1.14.3 MTT ve RTCA Sonuçlarının Karşılaştırılması

MTT ve RTCA sonuçlarında veri noktaları ve IC_{50} değerlerinde az da olsa bazı farklılıklar gözlenmiştir (Ek B ve Ek A). Tablo 4.1'e göre, 2-DG için 48 saatlik muamele sürelerinde IC_{50} değerleri arasında önemli farklılıklar vardı. RTCA sonuçları, 2-DG için 24 ve 48 saatlerde daha düşük çıkmıştır. Lonidamine için sonuçlar, hem 24 hem de 48 saatler için RTCA'da MTT'ye kıyasla biraz daha yüksek değerler göstermiştir. 72 saatlik MTT analizi yapılmamıştır. 48 saat süresince RTCA ve MTT sonuçlarındaki hafif farklılıkların kişisel ve çevresel koşullar nedeni ile oluşmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Tablo 4.1. Metabolik inhibitör olarak MCF-7 dizisi üzerine uygulanan 2-DG ve LND'in RTCA ve MTT sonuçlarının Karşılaştırması

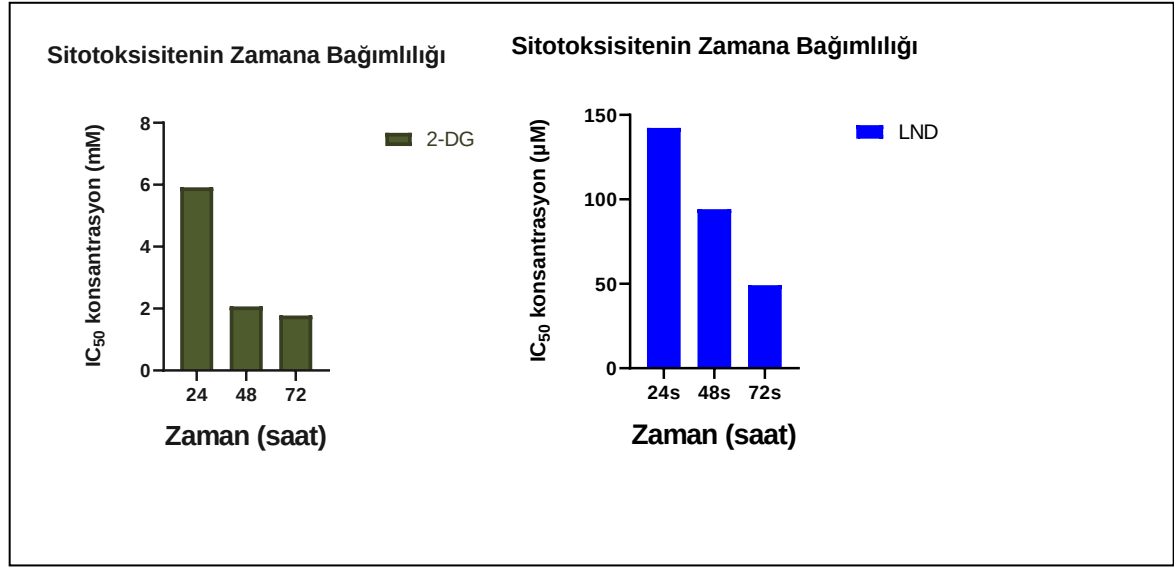
	Lonidamin (μ M)		2-DG (mM)	
Saat	MTT	RTCA	MTT	RTCA
24	135.71	142.30	7.24	5.92
48	86.40	94.14	6.95	2.07
72		49.13		1.78

1.14.4 Sitotoksitenin Zamana Bağımlılığı

2-DG ve LND için dozaj süresiyle (Şekil 4.7) daha düşük yarı-maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri gözlenmiştir.

2-DG için, RTCA'ya göre IC_{50} değeri 24 saat sonra 5,92 mM olarak belirlendi; 48 saat sonra bu değer keskin bir şekilde 2,07 mM'ye (%64,97 azalma) ve 72 saat sonra 1,78 mM'ye (%48 saatlik değerden %14,25 azalma) kadar azalma göstermiştir. Benzer şekilde, MTT analizine göre 2-DG için IC_{50} değeri, 24 saatlik muamele sonrasında 7,24 mM'den 48 saat sonra 6,94 mM'ye düştüğü tespit edilmiştir.

LND için, RTCA'ya göre IC₅₀ değeri 24 saat sonra 142,3 µM olarak belirlendi; 48 saat sonra keskin bir şekilde 94,14 µM'ye (%33,84 azalma) ve 72 saat sonra %49,13'e (48 saatlik değerden %47,81 azalma) düştüğü gözlemlendi. Benzer şekilde MTT için LND'ye yönelik IC₅₀ değeri, 24 saatlik tedavi sonrasında 135,71 µM'dan 48 saat sonrasında 86,40 µM'a kadar düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Metabolik inhibitörlerden 2-DG ve LND xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) elde edilen Sitotoksitenin zamana bağımlılığı (IC₅₀ dozları)

1.15 MCF-7 Hücrelerinde Apoptozun İndüklenmesi

1.15.1 MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Lonidamin ve 2-Deoksi-D-glukoz İndüklenmiş Apoptoz

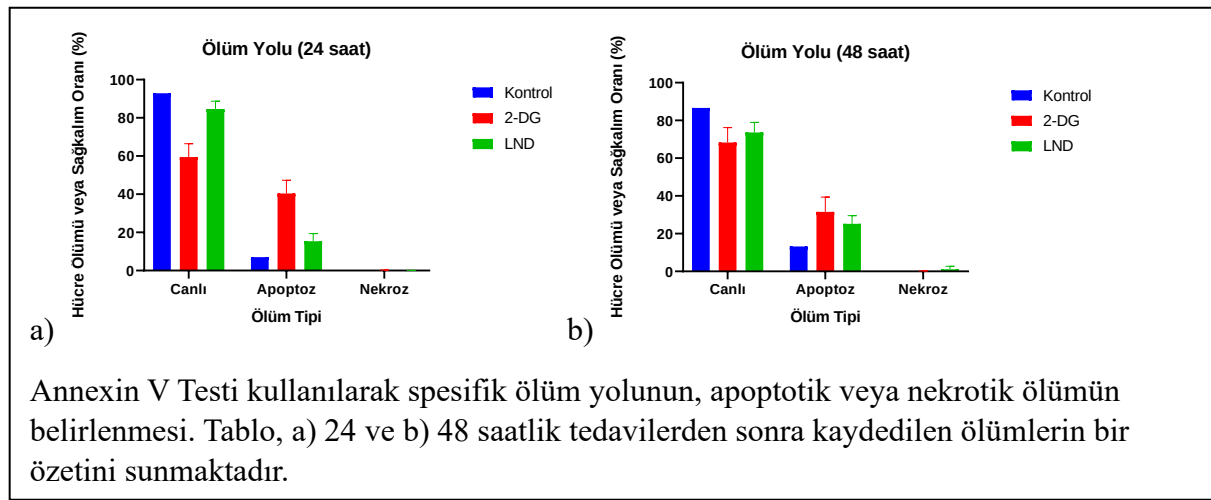
2-deoksiglukoz ve Lonidamin metabolik inhibitörlerinin kanser hücrelerindeki apoptoz, nekroz veya diğer hücre ölümleriyle bağlantılı olup olmadığını tespit etmek için apoptotik hücreleri ayırt etmek üzere Annexin-V FITC işaretleme yöntemi kullanılarak analiz edildi. Annexin-V FITC analizi için apoptoz indüksiyonunda 2-DG (5,9) ve LND (142,3 µM) için 24 saatlik xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) IC₅₀ değerleri kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri 24 ve 48 saatlik bir süre boyunca Lonidamin ve 2-deoksi-D-glukoza maruz bırakılmış ve Annexin V boyama (3.2.3'te açıklandığı gibi) ile muameleden sonra hücreler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Kontrol hücreleri için metabolik inhibitör ilave edilmeyen MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Şekil 4.8'de gösterildiği gibi, hücre ölümü

büyük ölçüde apoptozdan kaynaklanmıştır. Hem LND hem de 2-DG apoptozu ağırlıklı olarak erken apoptotik olaylar yoluyla tetiklemektedir. Bu nedenle, her iki ilaç da MCF-7 hücrelerine karşı etkilidir ve muhtemelen daha düşük inhibitör oranları MCF-7 hücrelerine karşı etkilidir ve muhtemelen daha fazla düşüş gerçekleşecektir.

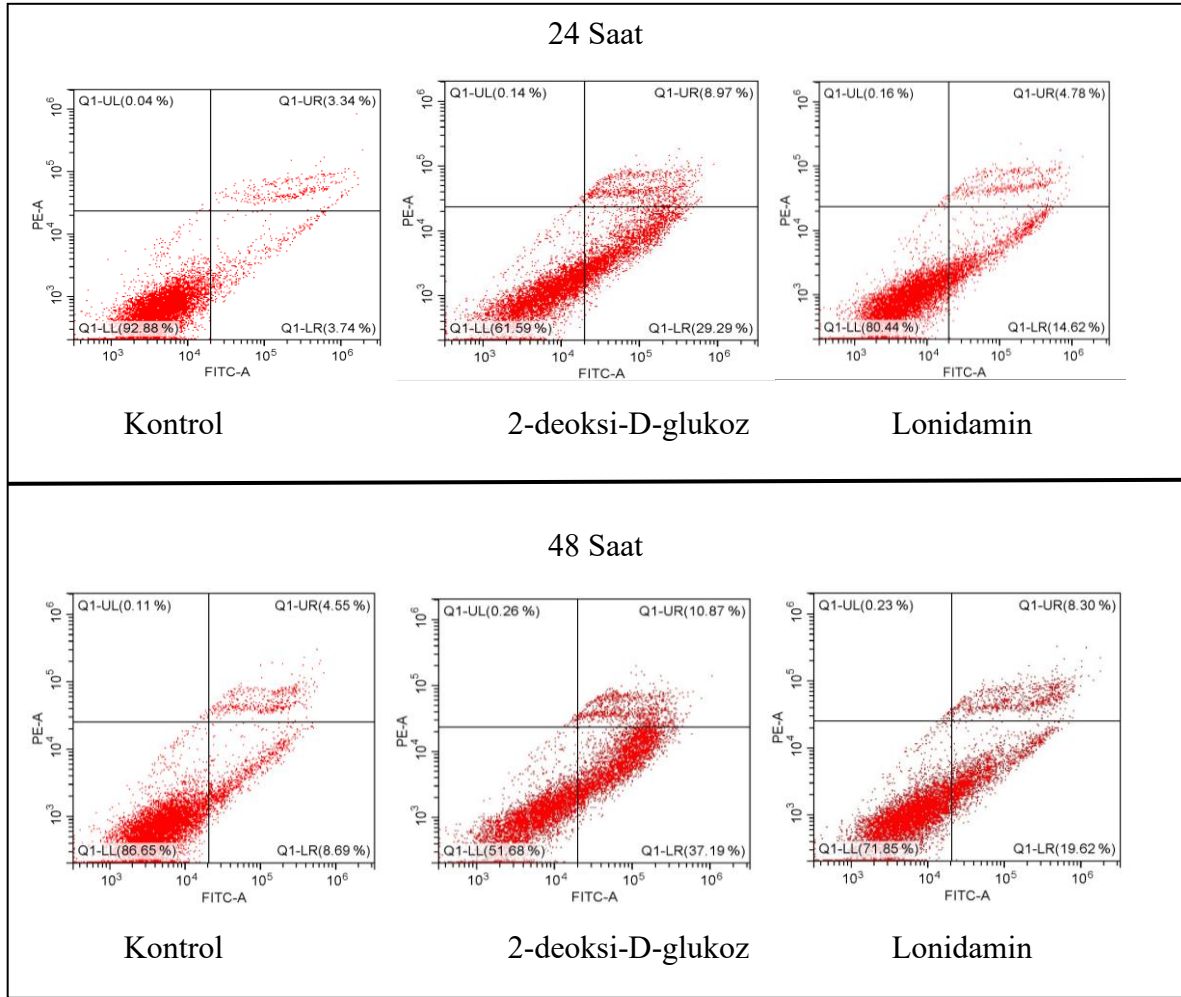
Tablo 4.2. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücrelerin tespit edilmesi.

	24 saat			48 saat		
	Kontrol	2-DG	LND	Kontrol	2-DG	LND
Canlı	92,88	59,46	84,58	86,65	68,26	73,64
Erken apoptoz	3,74	31,32	10,38	8,69	24,68	13,96
Geç apoptoz	3,34	9,06	4,95	4,55	6,85	11,28
Nekroz	0,04	0,16	0,08	0,11	0,20	1,11

Tablo 4.2'de apoptoz (Erken + geç apoptoz), nekrozla karşılaştırıldığında 2-DG ve LND için en yüksek ölümü açıklamaktadır. 2-DG için toplam apoptoz (erken + geç), 24 ve 48 saatlik muamele süreleri için 40.38 mM ve 31.53 mM idi. LND için toplam apoptoz (erken + geç) 24 ve 48 saatlik muamele süreleri için 15.33 μ M ve 25.24 μ M olarak tespit edildi. Tablo 4.2'ye göre apoptozun önemli bir indüksiyonu öncelikle erken aşamadaydı. Erken apoptotik belirteçlerin yüksek seviyeleri, hücre ölümünün birincil mekanizmasının erken apoptoz aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.8. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik total apoptoz (erken ve geç) ve nekrotik hücrelerin grafikleri



Şekil 4.9. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücrelerin tespit edilmesi. UL: Nekrotik hücreler; UR: Geç apoptoz; LL: Canlı hücreler; LR: Erken apoptoz

1.15.2 Lonidamin ve 2-Deoksi-D-glukoz ile İndüklenen Apoptozda Kaspaz-3, kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un Bulguları

Kaspazların aktivasyonu apoptoz için çok önemlidir. MCF-7 hücrelerinde Lonidamin ve 2-deoksi-D-glukoz tarafından indüklenen ölüme kaspaz katkısını belirlemek için, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri 24 ve 48 saat boyunca akış sitometrisi ile araştırılmıştır (3.2.3.2'de açıklandığı gibi). Kaspaz ekspresyonunun analizi için apoptoz indüksiyonunda 2-DG (5,9) ve LND (142,3 μ M) için 24 saatlik xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) IC₅₀ değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik hücrelerin kaspaz ekspresyonlarının tespit edilmesi.

		24 Saat		48 Saat	
		Canlılık	Kaspaz aktivitesi (%)	Canlılık	Kaspaz aktivitesi (%)
Kaspaz-9	Kontrol	87,71	12,14	95,83	4,14
	2-DG	89,80	10,13	73,41	26,43
	LND	83,41	16,68	85,91	13,95
Kaspaz-3	Kontrol	95,96	3,63	96,59	3,09
	2-DG	95,16	4,43	89,74	9,57
	LND	96,59	3,10	95,41	4,23

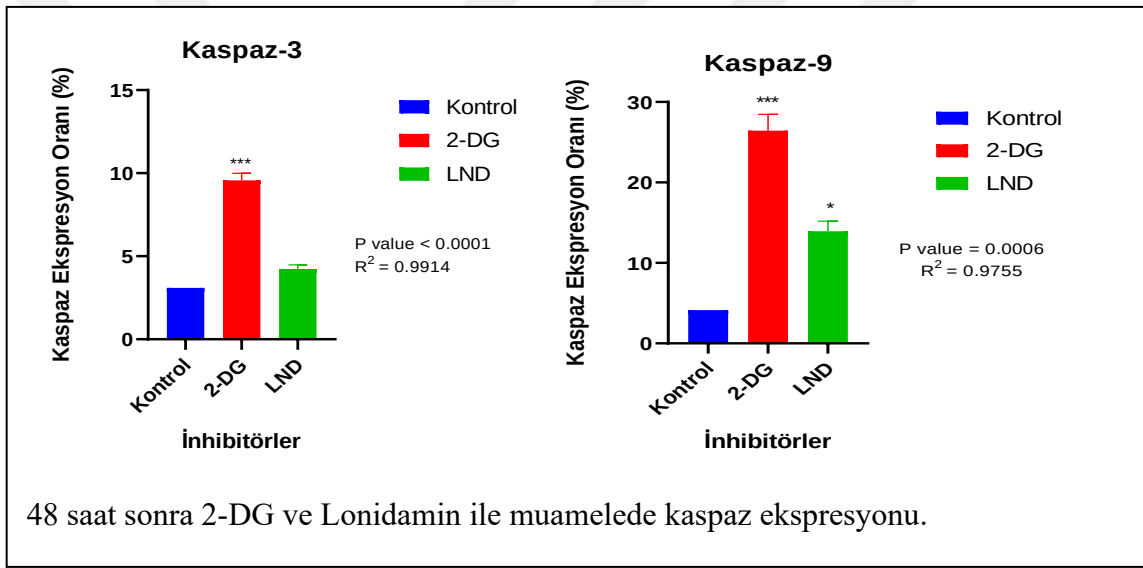
Tablo 4.3'e göre, 2-deoksi-D-glikoz ve Lonidamin ile tedavide kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ekspresyonu, 24 saat sonra kontrol grubundan önemli ölçüde farklı gözlenmemiştir.

24 saat boyunca 2-DG ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin kaspaz-9 ekspresyonu (10.33) kontrol grubuna göre (12.14) istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 48 saatlik 2-DG muamelesinde kaspaz-9 ekspresyonu (26.43) kontrol grubuna göre (4.14) yaklaşık olarak altı kattan fazla bir artış gözlemlendi (Tablo 4,3). LND ile 24 saatlik muamele sonucu Kaspaz-9 düzeyleri (16.68) kontrol grubu (12.14) arasında istatistiksel olarak bir fark yoktu. LND ile 48 saatlik muamele kaspaz-9 ekspresyonunda (13,95) önemli bir değişiklik göstermiştir (kontrol grubundan üç kattanartılmıştır) (Şekil 4.10) (Akış sitometri grafikleri EK J de gösterilmiştir).

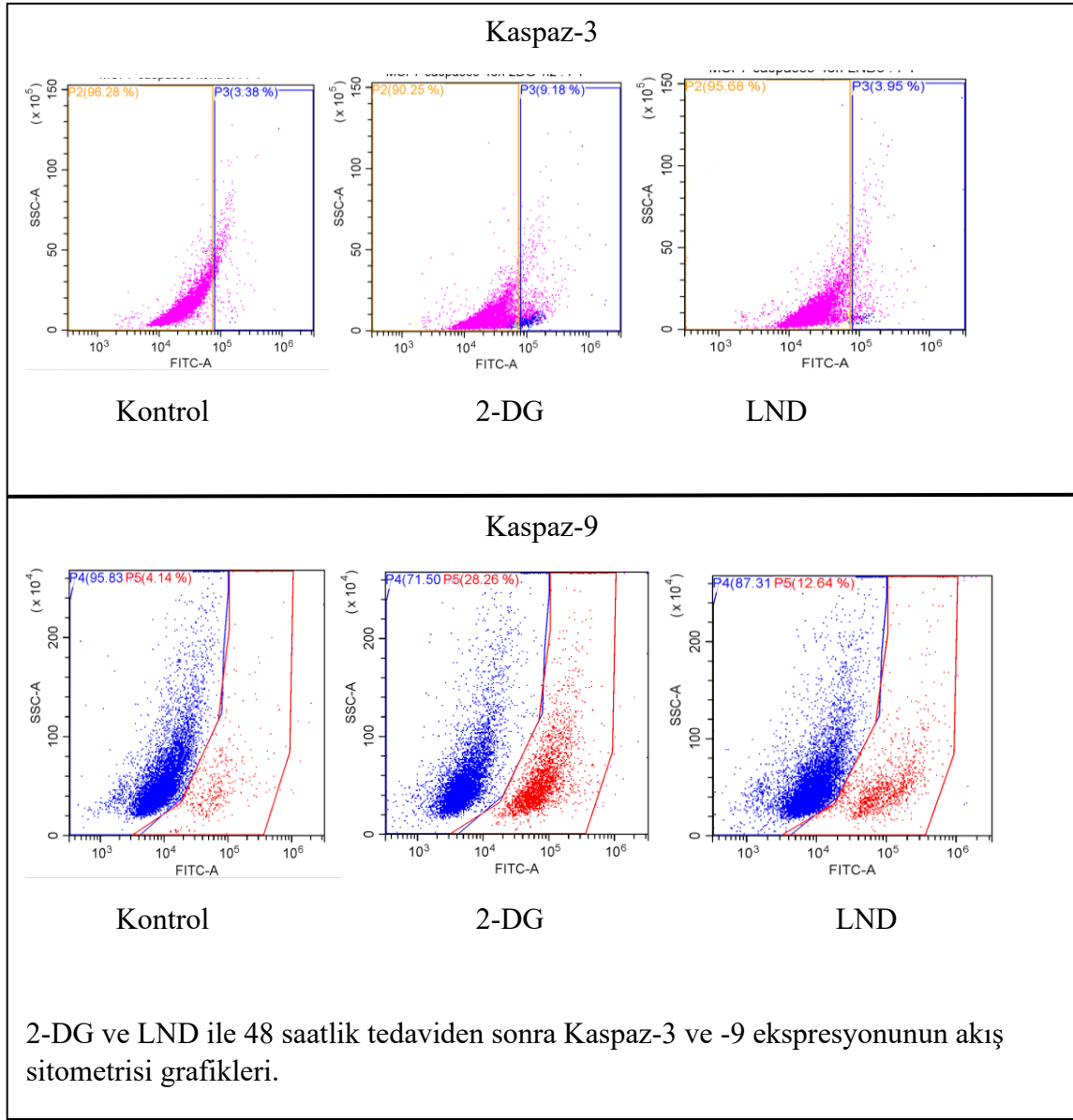
Benzer şekilde kaspaz-3 ekspresyonu, 2-DG (4,43) ve LND (3,10) ile 24 saatlik tedavi sonrasında kontrol grubundan (3,63) anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 48 saatlik muameleden sonra kaspaz-3 ekspresyonu 2-DG (9,57) için kontrol grubuna (3,09) göre yaklaşık üç kat arttı. Kaspaz-3'ün ekspresyonu, 48 saat boyunca LND (4,23) ile muamele sonrasında kontrol grubundan (3,09) istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı değildi. LND,

hücre ölümüne neden olmada kaspaz-3'ü aktive etmedi. Kaspaz-3 ve -9 akış sitometri grafikleri için Şekil 4.11.

Kaspaz-8 bulguları: kaspaz-8 aktiviteleri 24 ve 48 saat boyunca akış sitometrisi ile araştırılmıştır ancak deneyin 3 kez tekrar edilmesine rağmen kit yeterli aktiviteyi gösterememiş ve sonuç elde edilememiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen 24 saatlik veriler tezin sonunda ki ek de verilmiştir. 48 saatte ise hiç sonuç alınamamıştır o nedenle veriler ek de gösterilmemiştir.



Şekil 4.10. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 24 ve 48 saatlik hücrelerin kaspaz ekspresyonlar tespit edilmesi



Şekil 4.11. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 48 saatlik hücrelerin kaspaz ekspresyonlarının tespit edilmesi

1.15.3 Mitokondriyal Geçirgenlik Geçişindeki Değişiklikler

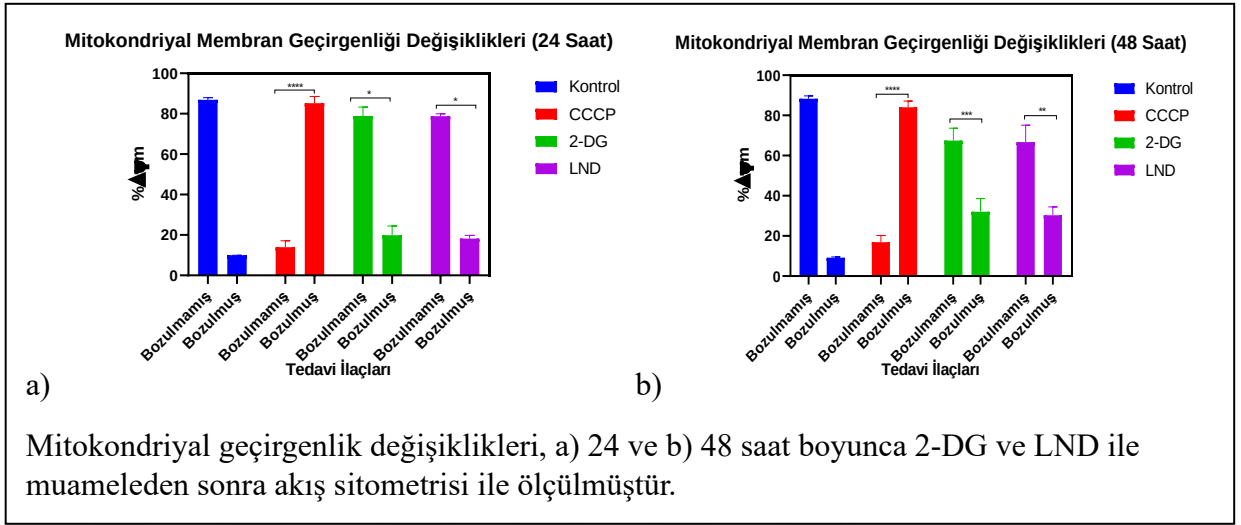
Mitokondriyal potansiyel çöküşü, intrinsik apoptotik yolağın erken bir aşamasıdır. MCF-7 insan hücrelerinde apoptoz indüksiyonunda mitokondrinin rolünü anlamak için mitokondriyal potansiyel incelenmiştir. Mitokondriyal membran geçiş gözenağı değişiminin 3.2.3.3.'te açıklandığı gibi JC-1 floresan boyası kullanılarak incelenmiştir.

Tablo 4.4. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 48 saatlik hücrelerin mitokondriyal membran potansiyel tespit edilmesi

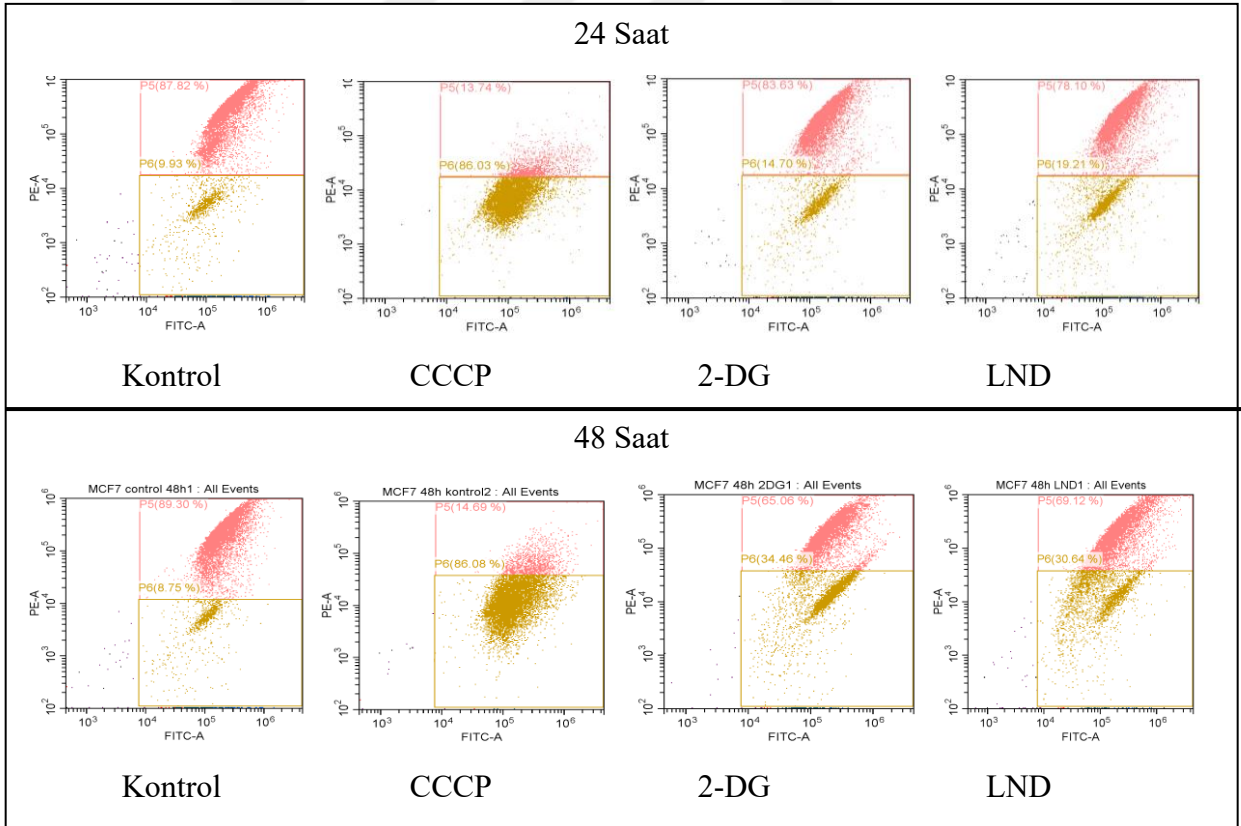
	24 Saat		48 Saat	
	Bozulmamış (%)	Bozulmuş (%)	Bozulmamış (%)	Bozulmuş (%)
Kontrol	86,89	9,92	88,28	9,09
CCCP	13,98	85,25	13,86	86,95
2-DG	78,89	19,91	64,44	35,28
LND	78,83	18,25	67,34	32,02

Negatif kontrol olarak bir mitokondriyal membran bozucu olan CCCP kullanılmış ve mitokondriyal membranı etkili bir şekilde bozduğu tespit edilmiştir. Buna göre, 24 ve 48 saatlik muameleler sırasıyla %13,98 ve %13,86 olarak bulunmuştur. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 24 saatlik 2-DG (%19,91) ve LND (%18,25) muamelesi mitokondriyal membranda istatistiksel olarak anlamlı bozulma göstermiştir. Benzer şekilde 2-DG (%35,28) ve LND (32,02) ile 48 saatlik muamele de, mitokondriyal membranda istatistiksel olarak anlamlı bozulmalar tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Sonuçlara göre, mitokondriyal membran potansiyelinde zamana bağlı bir azalma gözlenmiştir. Mitokondriyal potansiyelin bu zaman bağımlılığı kaspaz-9 ekspresyonunun zaman bağımlılığı ile tutarlıydı. Mitokondriyal Geçirgenlik Geçişindeki Değişiklikler grafikleri için Şekil 4.13.



Şekil 4.12. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yöntemi ile 48 saatlik hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelgrafikleri



Şekil 4.13. Metabolik inhibitör 2-DG ve LND'nin akış sitometre yönteminden ile 48 saatlik hücrelerin mitokondriyal membran potansiyel elde edilen grafikleri

5. TARTIŞMA

Onarılmamış DNA mutasyonlarının birikiminden kaynaklanan çok hücreli bir organizma hastalığı olan kanser, hücre büyümesini, bölünmesini ve ölümünü etkileyen karmaşık bir hastalıktır. Tek bir bölgede başlayıp metastaz yoluyla yayılabilir ve 2020 yılında on milyondan fazla ölüme neden oldu (http-1). Hastalık, normal hücresel süreçlerden, aile öyküsünden, genetik yatkınlıklardan ve çevresel faktörlerden kaynaklanan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. Tütün ürünlerindeki kanserojenler, talk pudrası, makyaj malzemeleri ve diğer maddeler yüksek kanser insidansına katkıda bulunur (Fararjeh vd., 2019; Khani vd., 2018). Kötü beslenme, vücut yağlanması ve iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma da kanser riskini artırır (Dietze vd., 2018; http-1).

Meme kanseri, yılda bir milyondan fazla kadına teşhis konulması ve 500.000 kadının ölümüyle küresel bir sağlık sorunudur (http-3). Risk faktörleri arasında ırk, etnik köken, aile öyküsü, genetik özellikler ve değiştirilebilir çevresel faktörler yer almaktadır. Hastalık, kadınlarda daha yaygın olmakla birlikte, erkekler de sigara, diyabet, alkol kullanımı, obezite ve kalıtsal mutasyonlar gibi risk faktörleriyle nadir görülen meme kanseri türüyle karşı karşıya kalabilir (Târcoveanu vd., 2016). Meme Sağlığı Küresel Girişimi ve Amerikan Kanser Derneği gibi küresel sağlık programları, invaziv meme kanserini azaltmak için çalışmaktadır. Tedavi seçenekleri arasında kemoterapi, radyasyon terapisi, hedefe yönelik terapi, biyolojik terapi ve cerrahi yer almaktadır (Almansour, 2023).

Tedavi güçlüğü çoğunlukla hücre ölümünün yaklaşık %90'ından sorumlu bir faktör olan metastatik kanserler ile ilişkilidir (Medeiros ve Allan, 2019). İnsan meme kanserinin önlenmesi ve tedavisi için yenilikçi ilaçların geliştirilmesi, tanı ve tedavideki son gelişmelere rağmen yüksek ölüm oranları nedeniyle çok önemlidir. Cerrahi gibi tedavi seçenekleri çoğunlukla metastatik olmayan meme kanserleri için etkilidir. Tüm metastatik bölgelere ulaşabilen daha etkili bir tedavi kemoterapi ve hormon tedavisidir (Woods vd., 2022).

Glikoliz, çeşitli biyolojik süreçlerde hayati bir enerji yolu ve biyosentez bileşenidir (C. Li vd., 2023). Kanser hücrelerinin glikolizi tercih ettiği Warburg etkisi, glikoliz ve Krebs döngüsünden gelen metabolitlerin artan kullanılabilirliği yoluyla kanserin ilerlemesini teşvik

eder. Glikolitik yolun inhibisyonu, kanser hücresi büyümesi için gerekli biyosentetik başlangıç materyallerinin mevcudiyetini azalttığı için kanser tedavisinde esastır. Metabolik inhibitörler, kanser tedavisinde kullanılabilir ve tümör hücrelerinin hayatta kalmak için kullandığı alternatif yolları hedef alarak etkili bir tedavi sağlar. Bu inhibitörler nükleik asitler, proteinler veya lipidler gibi temel bileşenlerin sentezini engelleyerek hücrel süreçleri bozabilir (Shen vd., 2021). Bunlar kanser tedavisi için umut verici kemoterapötik ajanlardır. Tümör büyümesi, tümör mikroçevresindeki metabolizma, kaçınma ve hayatta kalmadan etkilenir, bu da hedeflenen kontrol noktalarını kanser tedavisi için çok önemli hale getirir. 2-Deoksi-D-glukoz ve Lonidamin gibi metabolik inhibitörler, metabolik yoldaki temel enzimleri inhibe eder, böylece tümör büyümesi için gerekli olan aşağı akış ürünlerinin kullanılabilirliğini azaltır (Ma vd., 2022).

Bu çalışma, 2-Deoksi-D-glukoz ve Lonidaminin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde inhibitör etkileri olduğunu göstermiştir. Daha önce bildirildiği gibi, hem Lonidamin hem de 2-DG, MCF-7 insan meme kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücreleri üzerinde inhibitör etkiler göstermektedir (Aoun vd., 2022; Ozkan ve Bakar-Ates, 2020; Zhang vd., 2019). Bu çalışmada, 2-DG için, hesaplanan 24 saatlik IC_{50} değeri sırasıyla 5,92 mM (RTCA kullanılarak) ve 7,24 mM (MTT ile) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Zhang ve arkadaşları (2019) ve Tagg ve arkadaşları (2008) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 2-DG için IC_{50} değerini sırasıyla 8,67 mM ve 8,10 mM olarak belirlemiştir; bu değerler bizim belirlediğimiz değerlerden biraz daha yüksektir (Tagg vd., 2008; T. Zhang vd., 2019). Lonidamin için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 142,30 μ M (RTCA için) ve 135,70 μ M (MTT için), olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Shao ve arkadaşları 50 ila 250 mM arasında Lonidamin konsantrasyonları ile muamelede hücre proliferasyonunun azaldığını bildirmiştir (Shao vd., 2015). Özkan ve Bakar-Ates'in (2020) çalışması, 10 μ M LND ile muamele edildiğinde hücre proliferasyonunun %80'in altına düştüğünü göstermiştir. Bununla birlikte yapılan bu çalışmalar da LND'nin gerçek IC_{50} değerini bildirmemişlerdir. Bununla birlikte, Shao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma da (2015) bildirilen konsantrasyon aralığı değerleri bizim konsantrasyon çalışma aralığımızdan önemli ölçüde daha yüksekti. Bu farklılıklar hücre sayıları, çevresel koşullar ve tespit yöntemlerindeki farklılığın bir sonucu olabilir. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında, hücrelerin ekildiği plakalara konan

hücreler çalışmamızda kullandığımız 1×10^4 'e kıyasla 5×10^4 olarak daha yüksek sayıda hücre ettikleri görülmüştür. Yapmış olduğumuz bu çalışmada MTT ve RTCA olmak üzere iki farklı sitotoksosite yöntemi kullanılmış ve her ikisinde de yakın sonuçlar elde edilmiştir. 2-DG'nin inhibitör etkisi, lonidamin (μM) konsantrasyonlarına kıyasla yüksek IC_{50} (yüksek mM konsantrasyonları) değerlerinde gözlenmiştir. Bu bileşiklerin antikanser özellikleri, kemoterapi için antitümör ilaçlar olarak potansiyellerini göstermektedir. LND ve 2-DG'nin MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki inhibitör etkileri zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. (Şekil 4.7).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bu metabolik inhibitörler tarafından kullanılan apoptotik ölüm yolunu belirten literatür oldukça sınırlı olduğundan, çalışmamızı bu inhibitörlerin etki mekanizmaları üzerine odakladık. Bu iki inhibitör bileşik, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin in vitro büyümesini inhibe etmede güçlü bir etki göstermiştir. Kanser hücresi ölümü, birçok farklı ilaç tarafından çeşitli yolak inhibisyonları yoluyla başlatılır, ancak apoptoz adı verilen bir hücre ölümü biçimiyle sonuçlanır. Apoptoz, gelişim, yaşlanma, bağışıklık savunması ve homeostatik dengenin korunmasında önemli bir rol oynayan, tetikleyici dalga yeteneğine sahip, kendi kendini yenileyebilen programlanmış bir hücre ölümüdür. Hücresel stres, DNA hasarı ve immünolojik gözetim sistemleri gibi hücre içi ve dışı süreçler yoluyla gerçekleşebilir. Apoptozun tetiklenmesi, hem metastatik hem de metastatik olmayan kanserlerin tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir (Hamzeloo-Moghadam vd., 2015). Metabolik yolları inhibe eder ve programlanmış hücre ölümünü aktive eder. Antikanser ilaçlar, kanser hücrelerinde apoptotik mekanizmaları aktive ederek, doğuştan gelen tümör baskılayıcı sistemin önemli bir bileşeni olan apoptozu teşvik eder.

Apoptoz, fagosit tanımlaması için fosfolipid fosfatidilserin translokasyonu, hücre küçülmesi ve büzülmesi, kromatin yoğunlaşması (piknoz), nükleer membran parçalanması (karyoreksis), nükleozomal yapılarda DNA parçalanması ve kaspaz 6 aracılı lamin bölünmesi dahil olmak üzere fiziksel ve biyokimyasal özelliklerle ayırt edilir. Annexin V-FITC, negatif yüklü fosfatidil serine bağlanarak apoptotik hücreleri tanımlamak için kullanılırken, nekrotik ve apoptotik hücreleri birbirinden ayırmak için propidium iyodür eklenir. Yaptığımız çalışmada metabolik inhibitör olan LND ve 2-DG'un apoptozu uyardığını tespit ettik.

Apoptoz indüksiyonunun MCF-7 hücre dizisi ölümlerinde LND ve 2-DG tarafından aktive edilen ana ölüm yolu olduğu gösterilmiştir. Her iki inhibitör için de erken ve geç apoptoz gözlenmiştir. Ancak, her iki inhibitörde de erken apoptoz çok daha yüksekti (Tablo 4.2). 2-DG için 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde erken ve geç apoptoz arasında anlamlı bir fark yoktu. Ancak, LND için geç apoptotik oran zamana bağlı olarak önemli ölçüde artmıştır (Tablo 4.2). Yapılan bir çalışma da Normoksik şartlar da 2-DG ile muamele edilen MCF-7 hücreleri kontrol grubu ile mukayese edildiğinde apoptoz üzerinde çok az bir etkiye sahip olduğu ve istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmediğini tespit etmişlerdir (Tagg vd., 2008). Bu bulgu, hücre ölümü oranının, dolayısıyla apoptoz indüksiyonunun, metabolik inhibitör muamele uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla düşük olması nedeniyle sonuçlarımızla tutarlıdır. Çalışmamızda, apoptoz oranının tek bir dozda belirlendiğini belirtmek gerekir. Ji ve arkadaşları (2017) bir anti-kanser ilacı olan likorin hidroklorürün MCF-7 insan hücre hattı üzerindeki apoptoz etkisi üzerine bir çalışma yürütmüş ve konsantrasyona bağlı bir apoptotik oran bildirmiştir (Ji vd., 2017). Bununla birlikte, apoptoz oranının hem 2-DG hem de LND için dozla değişip değişmediğini anlayabilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaspazlar apoptotik sürecin yürütülmesinde önemli roller oynar. Kaspaz 9 aktivasyonu apoptozun intrinsik yolunun başlıca özellikleriyken, kaspaz 8 aktivasyonu ekstrinsik apoptotik hücre ölümünü belirler (Kiraz vd., 2016). Bununla birlikte, kaspaz 8 aktivasyonu proapoptotik protein Bid'in tBid'e bölünmesine yol açtığında bu iki yol çakışabilir. tBid, apoptozun intrinsik yolunu aktive edebilir; böylece ekstrinsik bir yol, intrinsik yol aracılığıyla apoptotik sinyalin genişlemesiyle sonuçlanır. Aktive olan kaspaz 8 ve 9, kaspaz 3, 6, 7 veya bunların bir kombinasyonuna bağlanır ve bunları parçalar. Kaspazların aktivasyonu, hücre hayatta kalma için gereken temel proteinlerin aşağı yönde bölünmesine yol açarak hücre ölümüne neden olur. Potansiyel antitümör mekanizmalarını anlamak için, LND ve 2-DG tarafından indüklenen kaspaz 3 ve kaspaz 9 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri akış sitometrik analiz ile tespit edilmiştir. Bu kaspazların ekspresyonu, LND ve 2-DG'nin neden olduğu apoptoza katkılarını belirlemek için değerlendirilmiştir.

Dış veya iç uyaranlar, apoptozu oluşturmak için kaspaz-9 ve Apaf-1 ile birleşen sitokrom c salınımına yol açan mitokondriyal membran potansiyelinin düzensizliği yoluyla apoptozu içsel olarak uyarır. Kaspaz-9 bu kompleks içinde aktive olur. Aktive kaspaz-9, kompleks oluşumu yoluyla kaspaz-3'ü aktive eder. Hücreleri 24 saat boyunca metabolik inhibitörler ile muamele ettiğimizde, her iki inhibitör için de önemli bir kaspaz-9 ekspresyonu göstermemiştir. Ancak çalışmamızda, 2-DG ile 48 saatlik muameleden sonra kaspaz-9 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla altı kat arttığını tespit etmiş bulunmaktayız. LND uygulamasından sonra kaspaz-9 ekspresyonu üç kat artmıştır. Çalışmamızda ki Kaspaz-9 ekspresyonunun, yapılan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kaspaz-9'un ekspresyon ekspresyonuna ilişkin diğer literatürdeki çalışmalarla tutarlıdır. Yaptığımız literatür araştırmalarında lonidamin veya 2-DG muamelesi uygulanan MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 veya -9 ekspresyonu hakkında herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Ullah ve arkadaşları, MCF-7 hücrelerinde kaspaz-9 ve -3 ekspresyonunun gümüş nanopartiküller (AgNPs) ile muamele edilen hücrelerde iki kat arttığını bildirmiştir (Ullah vd., 2020). 2-DG kaspaz-3 ve -9'u aktive eder ve DNA hasarına, endoplazmik retikulum stresine, proteinin yanlış katlanmasına ve apoptozu neden olur (Ullah vd., 2020). Mawalizadeh ve arkadaşları (2021) kuersetin ve kuersetin-florourasil kombinasyonları ile MCF-7 muamelede kaspaz-9 ekspresyonunda bir artış olduğunu bildirmişlerdir (Mawalizadeh vd., 2021). Bulgularımız da metabolik inhibitör olarak kullandığımız ve apoptozla olan ilişkisini araştırdığımız çalışmamızda hem 2-DG hem de lonidaminin kaspaz-9 ekspresyonunu farklı oranlarda artırdığını göstermektedir.

Kaspaz 3'ün aktivasyonu, DNA parçalanması ve apoptoz ile ilişkili morfolojik değişiklikler için gereklidir (Jänicke vd., 1998). Kaspaz 3, kaspaz ile aktive olan DNase'yi aktive ederek erken apoptoz aşamalarında kilit bir olay olan DNA parçalanmasına yol açar. Mevcut çalışmada, 48 saat boyunca 2-DG ile muameleden sonra kaspaz-3 ekspresyonu kontrole kıyasla üç kat artmıştır. Bu durum kaspaz-9 ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir, dolayısıyla aktive kaspaz-9 daha sonra 2-DG ile muamelede kaspaz-3'ü aktive etmiştir. LND kaspaz-9'u aktive etmesine rağmen, kaspaz-3 ekspresyonunda önemli bir değişiklik yaratmamıştır. Bu da LND tedavisi ile aktive edilen kaspaz-9'un kaspaz-3'ü değil diğer aşağı akım proteinlerini aktive ederek apoptozu neden olduğunu göstermektedir.

Yapılan bir çalışma da Metil jasmonat (MJ) ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (Yeruva vd., 2008). Muñoz-Pinedo ve arkadaşları (2003) ve Wang ve arkadaşları (2016) MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir (Muñoz-Pinedo vd., 2003; S. Wang vd., 2016). Buna karşılık, Wang ve arkadaşları (2009), PUMA geninin adenovirüs tarafından MCF-7 hücrelerine indüklenmesinin, ışınlamadan sonra hücrel kaspaz 3 ekspresyonunu artırdığını bulmuşlardır (Wang vd., 2009). Lin'in (2021) yapmış olduğu literatür taramasına göre, MCF-7 hücrelerindeki kaspaz-3 ekspresyonuna ilişkin bazı çelişkili bulgular olduğu ve bu tartışmaları "Editöre Mektup"ta sorgulayarak tartışmaya açmıştır (Lin, 2021). Çalışmamızda, biz MCF-7 hücre hattında kaspaz-3 ekspresyonunu tespit etmiş bulunmaktayız ve bulduğumuz bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla uyumluydu (Khan vd., 2021; Kucukbagriacik vd., 2023; Ullah vd., 2020). 2-deoksi-D-glukoz, kaspaz-9 ekspresyonu ile apoptozu intrinsik olarak aktive eder, bu da daha sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Bununla birlikte, LND ile aktive olan kaspaz-9'un, diğer aşağı akış yollarıyla apoptozu aktive eder.

ROT birikimi, metabolik süreçlerin düzensizliği, apoptozun ekstrinsik yolunun aktivasyonu ve proapoptotik Bcl-2 ailesi protein aktivasyonu hücreleri intrinsik yol üzerinden öldürür (Dadsena vd., 2021; Szabo vd., 2021). Mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesi, intrinsik apoptotik yolda önemli bir bileşen olan sitokrom c'nin sitozole salınmasına yol açar (Ni vd., 2022; Pessoa, 2022). Mitokondri membranında ki değişikliklerin ve apoptoz indüksiyonunun rolünü aydınlatmak için, çalışmamızda 2 metabolik inhibitör olan 2-DG ve LND kullanılarak mitokondriyal membran potansiyeli ölçülmüştür. Bu çalışma da kullanılan hem lonidamin hem de 2-deoksiglukoz ile muameleden sonra mitokondriyal membran değişikliği gözlenmiştir. Bu bulgular, 2-DG ve LND'in uygulandığı farklı kanser hücresi tipleri ile ilgili yapılan mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığını bildiren önceki çalışmalarla tutarlıdır (Ni vd., 2022; Pessoa, 2021). LND, kanser hücrelerinde farklı hedeflere etki ederek apoptozu indükler (Ravagnan vd., 1999). Mitokondriye bağlı heksokinazın işlevine müdahale ettiği, aerobik glikolizi inhibe ettiği, Ca^{2+} seviyelerini artırdığı, laktat birikimi yoluyla asidoza neden olduğu ve mitokondriyal solunuma müdahale ettiği bildirilmiştir (Ravagnan vd., 1999). Lonidaminin apoptojenik etkisine kısmen mitokondri aracılık eder (Sordet vd., 2001). Yapılan bir çalışma

da 2-DG ve metformin kombinasyonun prostat kanseri hücrelerinde mitokondriyal membranda bozulmalar gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir (Sahra vd., 2010). 6-aminonikotinamid ve 2-ABT-263/737 ile kombine edilmiş 2-deoksi-D-glukoz, mitokondriyal membran potansiyeli değişiklikleri, mitokondriden sitokrom c salınımı, kaspazların aktive edilmesi ve apoptozun tetiklenmesi yoluyla kanser hücrelerini etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bhardwaj vd., 2011; Yamaguchi vd., 2011).

Sonuç olarak, bu bulgular, lonidamin ve 2-deoksiglukozun antikanser ilaçları olarak potansiyelini göstermekte ve güçleri için potansiyel hedef bölgeleri sağlamaktadır. Temel metabolik yolları hedef alan bu ilaçlarla, gelecekteki araştırmalar normal meme kanseri hücrelerini de içermelidir. Çalışma, bu ilaçların etki mekanizmaları hakkında büyük bilgi sağlamıştır ve sonuca göre normal hücreler potansiyel olarak etkilenebilir. Ayrıca, gelecekteki araştırmalar da bu ilaçların in vivo etkilerini de araştırarak dikkate alınması gereklidir. İn vitro değerlendirme potansiyel ilaçlar için bir ön testtir, bu ilaçların hayvan modelleri üzerinde test edilmesi kanser tedavisindeki potansiyelleri hakkında daha fazla kanıt sağlayacaktır.

Öneriler

Bu çalışma, MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde lonidamin ve 2-deoksiglukoz ile apoptoz indüksiyon mekanizmasına dair kanıtlar sunmaktadır. Kaspaz-8, apoptozun ekstrinsik yolunda önemli bir proteindir. Ancak Kaspaz-8 için bazı problemler nedeni ile çalışma 3 kez yapılmasına rağmen sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte, finansman kısıtlamaları nedeniyle, MCF-7 hücrelerinde apoptozun kapsamlı bir şekilde araştırılması hedefine ulaşılamamıştır. Ayrıca, kaspaz-6 ve -7 gibi aşağı akış proteinlerinin yanı sıra kaspaz ile aktive olmayan apoptotik hücre ölümü de incelenememiştir. O nedenle bu kaspazların incelenmesi de çok yararlı olacaktır. Çalışma, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptozun düzenlenmesine ilişkin içgörü sağlamış olsa da, kanser için daha güçlü ve kesin tedavi seçenekleri arayışında sadece bir bölümdür. Bu sonuçlarla, kanserin artık hastaların hayatında bir ölüm cezası olmayacağı, kişiye özel tedavi ve yüksek kanser sağkalımının olduğu bir geleceği araştırmaya devam edebiliriz.

KAYNAKÇA

- Ackermann, T., Zuidhof, H. R., Müller, C., Kortman, G., Rutten, M. G. S., Broekhuis, M. J. C., Zaini, M. A., Hartleben, G., & Calkhoven, C. F. (2023). C/EBP β -LIP mediated activation of the malate-aspartate shuttle sensitizes cells to glycolysis inhibition. *Molecular Metabolism*, 72.
- Ahlmann, M., & Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(4), 661-671.
- Ahmed Belmokhtar, C., Hillion, J., & Seâ Gal-Bendirdjian, E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 20, 3354-3362.
- Almansour, Z. H. (2023). Early Development of Cancer Treatments. *The Gulf journal of oncology*, 1 43, 51-60.
- Al-Zeer, M. A., Xavier, A., Abu Lubad, M., Sigulla, J., Kessler, M., Hurwitz, R., & Meyer, T. F. (2017). Chlamydia trachomatis Prevents Apoptosis Via Activation of PDPK1-MYC and Enhanced Mitochondrial Binding of Hexokinase II. *EBioMedicine*, 23, 100-110.
- Aoun, R., El Hadi, C., Tahtouh, R., El Habre, R., & Hilal, G. (2022). Microarray analysis of breast cancer gene expression profiling in response to 2-deoxyglucose, metformin, and glucose starvation. *Cancer cell international*, 22(1), 123.
- Aoyama, M., Homma, T., Koharazawa, R., Suhara, Y., & Semba, K. (2023). Effect of lonidamine derivatives on the inhibition of transformed cell area expansion. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 34.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 420-430.
- Azamjah, N., Soltan-Zadeh, Y., & Zayeri, F. (2019). Global trend of breast cancer mortality rate: A 25-year study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(7), 2015-2020.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International immunopharmacology*, 84.
- Benz, C. C., Scott, G. K., Sarup, J. C., Johnson, R. M., Tripathy, D., Coronado, E., Shepard, H. M., & Osborne, C. K. (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Research and Treatment*, 24(2), 85-95.
- Berthe, A., Zaffino, M., Muller, C., Foulquier, F., Houdou, M., Schulz, C., Bost, F., De Fay, E., Mazerbourg, S., & Flament, S. (2018). Protein N-glycosylation alteration and

- glycolysis inhibition both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 171(3), 581-591.
- Bhardwaj, R., Sharma, P. K., Jadon, S. S., & Varshney, R. (2011). A combination of 2-deoxy-d-glucose and 6-aminonicotinamide induces oxidative stress mediated selective radiosensitization of malignant cells via mitochondrial dysfunction. *Tumor Biology*, 32(5), 951-964.
- Bhutia, Y. D., Babu, E., & Ganapathy, V. (2016). Re-programming tumour cell metabolism to treat cancer: No lone target for lonidamine. *Biochemical Journal*, 473(11).
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., & Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. İçinde *Oncogene* (C. 22, Sayı 53 REV. ISS. 7, ss. 8608-8618).
- Bufalo, D. Del, Biroccio, A., Soddu, S., Laudonio, N., D'angelo, C., Sacchi, A., & Zupi, G. (1996). p53-independent LND-induced Apoptosis in Drug-resistant Cancer Lines
Lonidamine Induces Apoptosis in Drug-resistant Cells Independently of the p53 Gene. İçinde *J. Clin. Invest* (C. 98, Sayı 5).
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. İçinde *Nature Reviews Clinical Oncology* (C. 17, Sayı 7, ss. 395-417). Nature Research.
- Cervantes-Madrid, D., Dominguez-Gomez, G., Gonzalez-Fierro, A., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Trejo-Becerril, C., & Duenas-Gonzalez, A. (2017). Feasibility and antitumor efficacy in vivo, of simultaneously targeting glycolysis, glutaminolysis and fatty acid synthesis using lonidamine, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine and orlistat in colon cancer. *Oncology Letters*, 13(3), 1905-1910.
- Chakraborty, S., Latheef, S. K., Munjal, A., Tiwari, R., Samad, H. A., Karthik, K., Khandia, R., & Dhama, K. (2017). Cytotoxic T cells and Cancer Therapy. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(4), 412-427.
- Chen, C., Zhou, Y. W., Ning, X. P., Li, S. L., Xue, D. D., Wei, C. L., Zhu, Z., Sheng, L. X., Lu, B. Z., Li, Y., Ye, X. Y., Fu, Y. Z., Bai, C., Cai, W., Ding, Y. X., Lin, S. Z., Yan, G. M., Huang, Y. J., & Yin, W. (2022). Directly targeting ASC by lonidamine alleviates inflammasome-driven diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1).
- Chen, H., Chen, F., Hu, W., & Gou, S. (2018). Effective platinum(IV) prodrugs conjugated with lonidamine as a functional group working on the mitochondria. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 180, 119-128.
- Chen, S., Wu, J. Le, Liang, Y., Tang, Y. G., Song, H. X., Wu, L. L., Xing, Y. F., Yan, N., Li, Y. T., Wang, Z. Y., Xiao, S. J., Lu, X., Chen, S. J., & Lu, M. (2021). Arsenic Trioxide Rescues Structural p53 Mutations through a Cryptic Allosteric Site. *Cancer Cell*, 39(2), 225-239.e8.

- Cheng, G., Zhang, Q., Pan, J., Lee, Y., Ouari, O., Hardy, M., Zielonka, M., Myers, C. R., Zielonka, J., Weh, K., Chang, A. C., Chen, G., Kresty, L., Kalyanaraman, B., & You, M. (2019). Targeting lonidamine to mitochondria mitigates lung tumorigenesis and brain metastasis. *Nature Communications*, 10(1).
- Cheng, X., & Ferrell, J. E. (2018). Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves. *Science*, 361(6402), 607-612.
- Cherif, S. (2019). Linking *Helicobacter pylori* with gallbladder and biliary tract cancer in Moroccan population using clinical and pathological profiles. *Bioinformation*, 15(10), 735-743.
- Ciavardelli, D., Rossi, C., Barcaroli, D., Volpe, S., Consalvo, A., Zucchelli, M., De Cola, A., Scavo, E., Carollo, R., D'Agostino, D., Forli, F., D'Aguanno, S., Todaro, M., Stassi, G., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., & Urbani, A. (2014). Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell death & disease*, 5(7).
- Cohen-Erez, I., Issacson, C., Lavi, Y., Shaco-Levy, R., Milam, J., Laster, B., Gheber, L. A., & Rapaport, H. (2019). Antitumor effect of lonidamine-polypeptide-peptide nanoparticles in breast cancer models. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(36).
- Coughlin, S. S. (2019). Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Advances in experimental medicine and biology*, 1152, 9-29.
- Coughlin, S. S., & Ekwueme, D. U. (2009). Breast cancer as a global health concern. *Cancer epidemiology*, 33(5), 315-318.
- Dadsena, S., King, L. E., & García-Sáez, A. J. (2021). Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(12), 183716.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- Darre, T., Tchaou, M., Djiwa, T., Simgbani, P., Amavi, A. K., N'Timon, B., Amadou, A., Bombonne, M., Sama, B., Amégbor, K., & Napo-Koura, G. (2020). Male Breast Cancer in Togo: Imaging and Clinicopathological Findings. *International Journal of Breast Cancer*, 2020.
- Davidescu, M., Macchioni, L., Scaramozzino, G., Cristina Marchetti, M., Migliorati, G., Vitale, R., Corcelli, A., Roberti, R., Castigli, E., & Corazzi, L. (2015). The energy blockers bromopyruvate and lonidamine lead GL15 glioblastoma cells to death by different p53-dependent routes. *Scientific Reports*, 5.
- De Cesare¹, M., Pratesi¹, G., Giusti², A., Polizzi¹, D., & Zunino¹, F. (1998). Stimulation of the apoptotic response as a basis for the therapeutic synergism of lonidamine and

- cisplatin in combination in human tumour xenografts. İçinde *British Journal of Cancer* (C. 77, Sayı 3).
- de la Cruz-López, K. G., Castro-Muñoz, L. J., Reyes-Hernández, D. O., García-Carrancá, A., & Manzo-Merino, J. (2019). Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology*, 9.
- Del Bello, F., Pelli, M., Bagnarelli, L., Santini, C., Giorgioni, G., Piergentili, A., Quaglia, W., Battocchio, C., Iucci, G., Schiesaro, I., Meneghini, C., Venditti, I., Ramanan, N., De Franco, M., Sgarbossa, P., Marzano, C., & Gandin, V. (2022). Cu(I) and Cu(II) Complexes Based on Lonidamine-Conjugated Ligands Designed to Promote Synergistic Antitumor Effects. *Inorganic Chemistry*, 61(12), 4919-4937.
- Desai, P., & Aggarwal, A. (2021). Breast Cancer in Women Over 65 years- a Review of Screening and Treatment Options. *Clinics in Geriatric Medicine*, 37(4), 611-623.
- Dey, S., Murmu, N., Mondal, T., Saha, I., Chatterjee, S., Manna, R., Haldar, S., Dash, S. K., Sarkar, T. R., & Giri, B. (2022). Multifaceted entrancing role of glucose and its analogue, 2-deoxy-D-glucose in cancer cell proliferation, inflammation, and virus infection. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 156.
- Dietze, E. C., Chavez, T. A., & Seewaldt, V. L. (2018). Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology. *American Journal of Pathology*, 188(2), 280-290.
- Emmett, S., Boros, S., Whiteman, D. C., Porceddu, S. V., Panizza, B. J., & Antonsson, A. (2018). Sexual behaviour, HPV status and p16INK4a expression in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinomas: a case-case comparison study. *The Journal of general virology*, 99(6), 783-789.
- Engram, G., Nweke, F., & Nkeh-Chungag, B. (2022). Free Radicals, Oxidative Stress-Related Diseases, and Antioxidant Supplementation. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 28(1), 114.
- Fadok, V. A., De Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1071-1077.
- Fararjeh, A. F. S., Tu, S. H., Chen, L. C., Cheng, T. C., Liu, Y. R., Chang, H. L., Chang, H. W., Huang, C. C., Wang, H. C. R., Hwang-Verslues, W. W., Wu, C. H., & Ho, Y. S. (2019). Long-term exposure to extremely low-dose of nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induce non-malignant breast epithelial cell transformation through activation of the $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathway. *Environmental Toxicology*, 34(1), 73-82.
- Farrell, P. (2016). Infections causing gastric cancer. *Nature Microbiology*, 1(4).

- Feng, X., Shi, Y., Xie, L., Zhang, K., Wang, X., Liu, Q., & Wang, P. (2019). 2-deoxy-D-glucose augments photodynamic therapy induced mitochondrial caspase-independent apoptosis and energy-mediated autophagy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 51(4).
- Feng, Y., Liu, T., Dong, S. Y., Guo, Y. J., Jankovic, J., Xu, H., & Wu, Y. C. (2015). Rotenone affects p53 transcriptional activity and apoptosis via targeting SIRT1 and H3K9 acetylation in SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry*, 134(4), 668-676.
- Fisher, L. A. B., Ahmed, O., Chalchal, H. I., Deobald, R., El-Gayed, A., Graham, P., Groot, G., Haider, K., Iqbal, N., Johnson, K., Le, D., Mahmood, S., Manna, M., Meiers, P., Pauls, M., Salim, M., Sami, A., Wright, P., Younis, M., & Ahmed, S. (2023). Outcomes of Rural Men with Breast Cancer: A Multicenter Population Based Retrospective Cohort Study. *Cancers*, 15(7), 1995.
- Fletcher, O., & Houlston, R. S. (2010). Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010 10:5, 10(5), 353-361.
- Fox, S., Speirs, V., & Shaaban, A. M. (2022). Male breast cancer: an update. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 480(1), 85-93.
- Fujita, H., Morita, I., & Murota, S.-I. (1999). A possible involvement of ion transporter in tumor necrosis factor α and cycloheximide-induced apoptosis of endothelial cells.
- Gahl, R. F., He, Y., Yu, S., & Tjandra, N. (2014). Conformational rearrangements in the pro-apoptotic protein, bax, as it inserts into mitochondria: A cellular death switch. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32871-32882.
- Ge, X. M., Liu, Y. M., Zhang, P., Sun, X. J., Zhen, Y. N., Li, J. K., & Liu, H. (2019). Synergistic effect of 2-deoxy-d-glucose combined with hydroxycamptothecin on apoptosis of breast cancer cells. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 50(4), 527-532.
- Geng, Y. J., Azuma, T., Tang, J. X., Hartwig, J. H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P., & Kwiatkowski, D. J. (1998). Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *European Journal of Cell Biology*, 77(4), 294.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Müllauer, L., Taper, H., Huber, W., Bursch, W., & Schulte-Hermann, R. (1997). Inherent increase of apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology*, 25(4), 906-912.
- Gründker, C., Wokoun, U., Hellriegel, M., & Emons, G. (2019). Inhibition of aerobic glycolysis enhances the anti-tumor efficacy of Zoptarelin Doxorubicin in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45(7), 1334-1342.

- Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., Elias, A. D., Baskin-Bey, E. S., & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 173(1), 37-48.
- Gudipaty, S. A., Conner, C. M., Rosenblatt, J., & Montell, D. J. (2018). Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34, 311-332.
- Guo, L., Shestov, A. A., Worth, A. J., Nath, K., Nelson, D. S., Leeper, D. B., Glickson, J. D., & Blair, I. A. (2016). Inhibition of mitochondrial complex II by the anticancer agent lonidamine. *Journal of Biological Chemistry*, 291(1), 42-57.
- Hamzeloo-Moghadam, M., Aghaei, M., Fallahian, F., Jafari, S. M., Dolati, M., Abdolmohammadi, M. H., Hajiahmadi, S., & Esmaeili, S. (2015). Britannin, a sesquiterpene lactone, inhibits proliferation and induces apoptosis through the mitochondrial signaling pathway in human breast cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(2), 1191-1198.
- Helleman, E., Walker, J. L., Lesko, M. A., Chandrashekarappa, D. G., Schmidt, M. C., O'Donnell, A. F., & Durrant, J. D. (2022). Novel mutation in hexokinase 2 confers resistance to 2-deoxyglucose by altering protein dynamics. *PLoS Computational Biology*, 18(3).
- Higami, Y., Tanaka, K., Tsuchiya, T., & Shimokawa, I. (2000). Intravenous injection of cycloheximide induces apoptosis and up-regulates p53 and Fas receptor expression in the rat liver in vivo. *İçinde Mutation Research (C)* 457).
- Hossain, F., Danos, D., Prakash, O., Gilliland, A., Ferguson, T. F., Simonsen, N., Leonardi, C., Yu, Q., Wu, X. C., Miele, L., & Scribner, R. (2019). Neighborhood social determinants of triple negative breast cancer. *Frontiers in Public Health*, 7(FEB).
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74-88.
- http-1. (t.y.). *What Causes Cancer?* American Cancer Society. Geliş tarihi 05 Nisan 2023, gönderen <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes.html>
- http-2. (t.y.). *Worldwide cancer data | World Cancer Research Fund International*. Geliş tarihi 21 Mayıs 2024, gönderen <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>
- http-3. (t.y.). Geliş tarihi 30 Haziran 2023, gönderen https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=14&nb_items=1

0&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Afalse%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D

- Huang, C. C., Wang, S. Y., Lin, L. L., Wang, P. W., Chen, T. Y., Hsu, W. M., Lin, T. K., Liou, C. W., & Chuang, J. H. (2015). Glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose simultaneously targets cancer and endothelial cells to suppress neuroblastoma growth in mice. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 8(10), 1247-1254.
- Huang, J., Pan, H., Wang, J., Wang, T., Huo, X., Ma, Y., Lu, Z., Sun, B., & Jiang, H. (2021). Unfolded protein response in colorectal cancer. *Cell and Bioscience*, 11(1).
- Huang, Y., Sun, G., Sun, X., Li, F., Zhao, L., Zhong, R., & Peng, Y. (2020). The potential of lonidamine in combination with chemotherapy and physical therapy in cancer treatment. *Cancers*, 12(11), 1-25.
- Ito, K., Kiyosawa, N., Kumagai, K., Manabe, S., Matsunuma, N., & Yamoto, T. (2006). Molecular mechanism investigation of cycloheximide-induced hepatocyte apoptosis in rat livers by morphological and microarray analysis. *Toxicology*, 219(1-3), 175-186.
- Jäger, R., Bertrand, M. J. M., Gorman, A. M., Vandenabeele, P., & Samali, A. (2012). The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 104(5), 259-270.
- Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9357-9360.
- Ji, Y., Yu, M., Qi, Z., Cui, D., Xin, G., Wang, B., Jia, W., & Chang, L. (2017). Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(4), 633.
- Jiang, M., Zeng, J., Zhao, L., Zhang, M., Ma, J., Guan, X., & Zhang, W. (2021). Chemotherapeutic drug-induced immunogenic cell death for nanomedicine-based cancer chemo-immunotherapy. *Nanoscale*, 13(41), 17218-17235.
- Jiang, X. W., Qiao, L., Feng, X. X., Liu, L., Wei, Q. W., Wang, X. W., & Yu, W. H. (2017). Rotenone induces nephrotoxicity in rats: oxidative damage and apoptosis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(7), 528-536.
- Jin, L., Han, B., Siegel, E., Cui, Y., Giuliano, A., & Cui, X. (2018). Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer Biology and Therapy*, 19(10), 858-868.

- Jin, X., Zhou, J., Zhang, Z., & Lv, H. (2019). Doxorubicin combined with betulinic acid or lonidamine in RGD ligand-targeted pH-sensitive micellar system for ovarian cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 571.
- Junqueira-Neto, S., Oliveira, A. R., Marques, J., Oliveira, P., Fernandes, M., Hespanhol, V., Barroso, A., Pinheiro, J., Souto-Moura, C., Cavadas, B., Pereira, L., Adem, B., Silva, M. G., Melo, S., Costa, J. L., & Machado, J. (2022). Resistance to EGFR inhibitors in lung cancer occurs through horizontal transfer and is associated with increased caveolins expression. *bioRxiv*.
- Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. İçinde *Physical Biology* (C. 13, Sayı 3). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>
- Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., Zaguia, A., Koundal, S., & Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *BioMed research international*, 2022.
- Khan, I., Zaib, S., Javed, M., Rashid, F., Iqbal, J., & Ibrar, A. (2021). Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of Thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazoles in Breast and Cervical Cancer Cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 21(16), 2181-2191.
- Khani, Y., Pourgholam-Amiji, N., Afshar, M., Otroshi, O., Sharifi-Esfahani, M., Sadeghi-Gandomani, H., Vejdani, M., & Salehiniya, H. (2018). Tobacco Smoking and Cancer Types: A Review. *Biomedical Research and Therapy*, 5(4), 2142-2159.
- Kim, E. H., Lee, J. H., Oh, Y., Koh, I., Shim, J. K., Park, J., Choi, J., Yun, M., Jeon, J. Y., Huh, Y. M., Chang, J. H., Kim, S. H., Kim, K. S., Cheong, J. H., Kim, P., & Kang, S. G. (2017). Inhibition of glioblastoma tumorspheres by combined treatment with 2-deoxyglucose and metformin. *Neuro-Oncology*, 19(2), 197-207.
- Kim, J. Y., Park, K., Lee, E., Jung, H. H., Ahn, J. S., Im, Y. H., Park, W. Y., & Park, Y. H. (2017). The effect of androgen receptor expression on clinical characterization of metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 8(5), 8693-8706.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. İçinde *Tumor Biology* (C. 37, Sayı 7, ss. 8471-8486). Springer Science and Business Media B.V.
- Kleeff, J., Kornmann, M., Sawhney, H., & Korc, M. (2000). Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer*, 89(2), 399-407.
- Kleibl, Z., & Kristensen, V. N. (2016). Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast*, 28, 136-144.

- Kucukbagriacik, Y., Dastouri, M., Yilmaz, H., & Altuntas, E. G. (2023). The apoptotic effect of the *Lycopodium clavatum* extracts on MCF-7 human breast cancer cells. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 40(10).
- Kutuk, O., Temel, S. G., Tolunay, S., & Basaga, H. (2010). Aven blocks DNA damage-induced apoptosis by stabilising Bcl-xL. *European Journal of Cancer*, 46(13), 2494.
- Kwok, S. C. M., & Daskal, I. (2008). Brefeldin A activates CHOP promoter at the AARE, ERSE and AP-1 elements. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1-2), 203-208.
- Landowski, T. H., Gleason-Guzman, M. C., & Dalton, W. S. (1997). Selection for drug resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis. *Blood*, 89(6), 1854-1861.
- Lasalle, T., Austin, E. E., Rigney, G., Wehrenberg-Klee, E., Nesti, S., Larimer, B., & Mahmood, U. (2020). Granzyme B PET imaging of immune-mediated tumor killing as a tool for understanding immunotherapy response. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1).
- Laussel, C., & Léon, S. (2020). Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Içinde Biochemical Pharmacology (C. 182)*. Elsevier Inc.
- Lee, S. A., Kim, Y. J., & Lee, C. S. (2013). Brefeldin a induces apoptosis by activating the mitochondrial and death receptor pathways and inhibits focal adhesion kinase-mediated cell invasion. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 113(5), 329-338.
- Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7).
- Li, C., Liu, F. Y., Shen, Y., Tian, Y., & Han, F. J. (2023). Research progress on the mechanism of glycolysis in ovarian cancer. *Frontiers in Immunology*, 14.
- Li, H., Xu, W., Li, F., Zeng, R., Zhang, X., Wang, X., Zhao, S., Weng, J., Li, Z., & Sun, L. (2022). Amplification of anticancer efficacy by co-delivery of doxorubicin and lonidamine with extracellular vesicles. *Drug Delivery*, 29(1), 192-202.
- Li, S., Zhu, H., Chen, H., Xia, J., Zhang, F., Xu, R., & Lin, Q. (2020). Glucose promotes epithelial-mesenchymal transitions in bladder cancer by regulating the functions of YAP1 and TAZ. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(18), 10391-10401.
- Li, Y. C., Fung, K. P., Kwok, T. T., Lee, C. Y., Suen, Y. K., & Kong, S. K. (2002). Mitochondrial targeting drug lonidamine triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells. *Life Sciences*, 71, 2729-2740.
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218.

- Lin, J. (2021). Comments on “Dihydroartemisinin induces pyroptosis by promoting the AIM2/caspase-3/DFNA5 axis in breast cancer cells.”. *Chemico-Biological Interactions*, 345, 109551.
- Liu, X. F., Xiang, L., Zhou, Q., Carralot, J. P., Prunotto, M., Niederfellner, G., & Pastan, I. (2016). Actinomycin D enhances killing of cancer cells by immunotoxin RG7787 through activation of the extrinsic pathway of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(38), 10666-10671.
- Liu, Y., Zhang, X., Zhou, M., Nan, X., Chen, X., & Zhang, X. (2017). Mitochondrial-Targeting Lonidamine-Doxorubicin Nanoparticles for Synergistic Chemotherapy to Conquer Drug Resistance. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(50), 43498.
- Loeb, C. R. K., Harris, J. L., & Craik, C. S. (2006). Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28326-28335.
- Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., & Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *The Lancet*, 397(10286), 1750-1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3)
- Lu, J., Tan, M., & Cai, Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*, 356(2), 156.
- Ma, C., Tsai, H. Y., Zhang, Q., Senavirathna, L., Li, L., Chin, L. S., Chen, R., & Pan, S. (2022). An Integrated Proteomic and Glycoproteomic Investigation Reveals Alterations in the N-Glycoproteomic Network Induced by 2-Deoxy-D-Glucose in Colorectal Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15).
- Ma, X., Yao, M., Shi, J., Li, X., Gao, Y., Luo, Q., Hou, R., Liang, X., & Wang, F. (2020). High Intensity Focused Ultrasound-Responsive and Ultrastable Cerasomal Perfluorocarbon Nanodroplets for Alleviating Tumor Multidrug Resistance and Epithelial-Mesenchymal Transition. *ACS nano*, 14(11), 15904-15918.
- Marathe, K., McVicar, N., Li, A., Bellyou, M., Meakin, S., & Bartha, R. (2016). Topiramate induces acute intracellular acidification in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 130(3), 465-472.
- Martínez-Flórez, A., Galizzi, M., Izquierdo, L., Bustamante, J. M., Rodríguez, A., Rodríguez, F., Rodríguez-Cortés, A., & Alberola, J. (2020). Repurposing bioenergetic modulators against protozoan parasites responsible for tropical diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 17-27.
- Masters, S. C., Yang, H., Datta, S. R., Greenberg, M. E., & Fu, H. (2001). 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Molecular Pharmacology*, 60(6), 1325-1331.

- Matchimakul, P., Rinaldi, G., Suttiaprapa, S., Mann, V. H., Popratiloff, A., Laha, T., Pimenta, R. N., Cochran, C. J., Kaewkes, S., Sripa, B., & Brindley, P. J. (2015). Apoptosis of cholangiocytes modulated by thioredoxin of carcinogenic liver fluke. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 72-80.
- Mawalizadeh, F., Mohammadzadeh, G., Khedri, A., & Rashidi, M. (2021). Quercetin potentiates the chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Molecular Biology Reports*, 48(12), 7733-7742.
- Medeiros, B., & Allan, A. L. (2019). Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 20(9).
- Meo, S. A., Suraya, F., Jamil, B., Rouq, F. Al, Meo, A. S., Sattar, K., Ansari, M. J., & Alasiri, S. A. (2017). Association of ABO and Rh blood groups with breast cancer. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1609-1613.
- Michalska, M. M., Samulak, D., Romanowicz, H., & Smolarz, B. (2015). Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of RAD51-G172T and XRCC2-41657C/T Homologous Recombination Repair Genes and the Risk of Triple- Negative Breast Cancer in Polish Women. *Pathology and Oncology Research*, 21(4), 935-940.
- Muniraj, N., Siddharth, S., Nagalingam, A., Walker, A., Woo, J., Gyorffy, B., Gabrielson, E., Saxena, N. K., & Sharma, D. (2019). Withaferin A inhibits lysosomal activity to block autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 40(9), 1110-1120.
- Muñoz-Pinedo, C., Ruiz-Ruiz, C., De Almodóvar, C. R., Palacios, C., & López-Rivas, A. (2003). Inhibition of Glucose Metabolism Sensitizes Tumor Cells to Death Receptor-triggered Apoptosis through Enhancement of Death-inducing Signaling Complex Formation and Apical Procaspase-8 Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12759-12768.
- Najjar, S., & Allison, K. H. (2022). Updates on breast biomarkers. *Virchows Archiv*, 480(1).
- Nakajima, W., & Tanaka, N. (2007). Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *Journal of Nippon Medical School*, 74(2), 148.
- Nancolas, B., Guo, L., Zhou, R., Nath, K., Nelson, D. S., Leeper, D. B., Blair, I. A., Glickson, J. D., & Halestrap, A. P. (2016). The anti-tumour agent lonidamine is a potent inhibitor of the mitochondrial pyruvate carrier and plasma membrane monocarboxylate transporters. *Biochemical Journal*, 473(7), 929-936.
- Nath, K., Guo, L., Nancolas, B., Nelson, D. S., Shestov, A. A., Lee, S. C., Roman, J., Zhou, R., Leeper, D. B., Halestrap, A. P., Blair, I. A., & Glickson, J. D. (2016). Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1866(2), 151-162.

- Nath, K., Nelson, D. S., Heitjan, D. F., Leeper, D. B., Zhou, R., & Glickson, J. D. (2015). Lonidamine induces intracellular tumor acidification and ATP depletion in breast, prostate and ovarian cancer xenografts and potentiates response to doxorubicin. *NMR in Biomedicine*, 28(3), 281-290.
- Nath, K., Nelson, D. S., Heitjan, D. F., Zhou, R., Leeper, D. B., & Glickson, J. D. (2015). Effects of hyperglycemia on lonidamine-induced acidification and de-energization of human melanoma xenografts and sensitization to melphalan. *NMR in Biomedicine*, 28(3), 395-403.
- Nath, K., Nelson, D. S., Putt, M. E., Leeper, D. B., Garman, B., Nathanson, K. L., & Glickson, J. D. (2016). Comparison of the lonidamine potentiated effect of nitrogen mustard alkylating agents on the systemic treatment of db-1 human melanoma xenografts in mice. *PLoS ONE*, 11(6), 01-17.
- Nath, K., Nelson, D. S., Roman, J., Putt, M. E., Lee, S. C., Leeper, D. B., & Glickson, J. D. (2017). Effect of lonidamine on systemic therapy of DB-1 human melanoma xenografts with temozolomide. *Anticancer Research*, 37(7), 3413-3421.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (Seventh). W.H. Freeman and Company.
- Newman, A. B., & Lynce, F. (2023). Tailoring Treatment for Patients with Inflammatory Breast Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 24(6), 580-593.
- Ni, X. W., Chen, K. Z., & Qiao, S. L. (2022). A photocontrollable thermosensitive chemical spatiotemporally destabilizes mitochondrial membranes for cell fate manipulation. *Biomaterials Science*.
- Nicolini, A., Ferrari, P., & Duffy, M. J. (2017). Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Seminars in cancer biology*, 52, 56-73.
- Nikraves, H., Khodayar, M. J., Behmanesh, B., Mahdavinia, M., Teimoori, A., Alboghobeish, S., & Zeidoooni, L. (2021). The combined effect of dichloroacetate and 3-bromopyruvate on glucose metabolism in colorectal cancer cell line, HT-29; the mitochondrial pathway apoptosis. *BMC Cancer*, 21(1).
- Obaid, Q. A., Khudair, K. K., & Al-Shammari, A. M. (2022). Glucose deprivation using 2-deoxyglucose and acarbose induce metabolic oxidative stress and apoptosis in female mice bearing breast cancer. *Biochimie*, 195, 59-66.
- O'Neill, S., Porter, R. K., McNamee, N., Martinez, V. G., & O'Driscoll, L. (2019). 2-Deoxy-D-Glucose inhibits aggressive triple-negative breast cancer cells by targeting glycolysis and the cancer stem cell phenotype. *Scientific Reports*, 9(1).

- Osborne, M. C., Maykel, J., Johnson, E. K., & Steele, S. R. (2014). Anal squamous cell carcinoma: an evolution in disease and management. *World journal of gastroenterology*, 20(36), 13052-13059.
- Ozkan, E., & Bakar-Ates, F. (2020). Potentiation of the effect of lonidamine by quercetin in mcf-7 human breast cancer cells through downregulation of mmp-2/9 mrna expression. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(4), 1-12.
- Parise, C. A., Bauer, K. R., Brown, M. M., & Caggiano, V. (2009). Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast Journal*, 15(6), 593-602.
- Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 93, 52-79.
- Pessoa, J. (2021). Live-cell visualization of cytochrome c: A tool to explore apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 49(6), 2903-2915.
- Pessoa, J. (2022). Cytochrome c in cancer therapy and prognosis. *Bioscience Reports*, 42(12).
- Prakash, O., Hossain, F., Danos, D., Lassak, A., Scribner, R., & Miele, L. (2020). Racial Disparities in Triple Negative Breast Cancer: A Review of the Role of Biologic and Non-biologic Factors. *Frontiers in Public Health*, 8.
- Pruss, M., Dwucet, A., Tanriover, M., Hlavac, M., Kast, R. E., Debatin, K. M., Wirtz, C. R., Halatsch, M. E., Siegelin, M. D., Westhoff, M. A., & Karpel-Massler, G. (2020). Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma. *British Journal of Cancer*, 122(8), 1146-1157.
- Radecka, B., & Litwiniuk, M. (2016). Breast cancer in young women. *Ginekologia Polska*, 87(9), 659-663.
- Ramírez-Peinado, S., Alcázar-Limones, F., Lagares-Tena, L., El Mjiyad, N., Caro-Maldonado, A., Tirado, O. M., & Muñoz-Pinedo, C. (2011). 2-Deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Research*, 71(21), 6796-6806.
- Rao, G., Zhong, G., Hu, T., Wu, S., Tan, J., Zhang, X., Huang, R., Tang, Z., & Hu, L. (2023). Arsenic Trioxide Triggers Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis via Nrf 2/Caspase 3 Signaling Pathway in Heart of Ducks. *Biological Trace Element Research*, 201(3), 1407-1417.

- Rastelli, F., Biancanelli, S., Falzetta, A., Martignetti, A., Casi, C., Bascioni, R., Giustini, L., & Crispino, S. (2010). Triple-negative breast cancer: current state of the art. *Tumori*, 96(6), 875-888.
- Ravagnan, L., Marzo, I., Costantini, P., Susin, S. A., Zamzami, N., Petit, P. X., Hirsch, F., Goulbern, M., Poupon, M. F., Miccoli, L., Xie, Z., Reed, J. C., & Kroemer, G. (1999). Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene* 1999 18:16, 18(16), 2537-2546.
- Recht, A. (1996). Selection of patients with early stage invasive breast cancer for treatment with conservative surgery and radiation therapy. *Seminars in Oncology*.
- Ribnikar, D., Ribeiro, J. M., Pinto, D., Sousa, B., Pinto, A. C., Gomes, E., Moser, E. C., Cardoso, M. J., & Cardoso, F. (2015). Breast Cancer Under Age 40: a Different Approach. *Current Treatment Options in Oncology*, 16(4), 1-24.
- Rommasi, F. (2023). Identification, characterization, and prognosis investigation of pivotal genes shared in different stages of breast cancer. *Scientific reports*, 13(1), 8447. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35318-x>
- Rossi, L., Mazzara, C., & Pagani, O. (2018). Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in Young Women. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(12).
- Roy, S., Dukic, T., Bhandary, B., Tu, K. J., Molitoris, J., Ko, Y. H., & Shukla, H. D. (2022). 3-Bromopyruvate inhibits pancreatic tumor growth by stalling glycolysis, and dismantling mitochondria in a syngeneic mouse model. *Içinde Am J Cancer Res (C*. 12, Sayı 11).
- Sahra, I. Ben, Laurent, K., Giuliano, S., Larbret, F., Ponzio, G., Gounon, P., Le Marchand-Brustel, Y., Giorgetti-Peraldi, S., Cormont, M., Bertolotto, C., Deckert, M., Auberger, P., Tanti, J. F., & Bost, F. (2010). Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer research*, 70 6(6), 2465-2475.
- Santos, J. M., & Hussain, F. (2020). Higher Glucose Enhances Breast Cancer Cell Aggressiveness. *Nutrition and Cancer*, 72(5), 734-746.
- Sayers, T. J. (2011). Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8), 1173-1180.
- Scholnik-Cabrera, A., Dominguez-Gómez, G., Chávez-Blanco, A., Ramírez-Yautentzi, M., Morales-Bárcenas, R., Chávez-Díaz, J., Taja-Chayeb, L., & Dueñas-González, A. (2019). A combination of inhibitors of glycolysis, glutaminolysis and de novo fatty acid synthesis decrease the expression of chemokines in human colon cancer cells. *Oncology letters*, 18(6), 6909-6916.

- Schiliro, C., & Firestein, B. L. (2021). Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells*, 10(5).
- Shao, F., Wang, L., & Chu, X. (2015). Lonidamine induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress response and down-regulating cIAP expression in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 35(6), 883-887.
- Shen, Y. A., Chen, C. C., Chen, B. J., Wu, Y. T., Juan, J. R., Chen, L. Y., Teng, Y. C., & Wei, Y. H. (2021). Potential Therapies Targeting Metabolic Pathways in Cancer Stem Cells. *Cells*, 10(7).
- Singh, K., Yadav, D., Jain, M., Singh, P. K., & Jin, J.-O. (2021). Immunotherapy for Breast Cancer Treatment: Current Evidence and Therapeutic Options. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 22(2), 212-224.
- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320-7326.
- Sordet, O., Rébé, C., Leroy, I., Bruey, J. M., Garrido, C., Miguët, C., Lizard, G., Plenchette, S., Corcos, L., & Solary, E. (2001). Mitochondria-targeting drugs arsenic trioxide and lonidamine bypass the resistance of TPA-differentiated leukemic cells to apoptosis. *Blood*, 97(12), 3931-3940.
- Steifensand, F., Gallwas, J., Bauerschmitz, G., & Gründker, C. (2021). Inhibition of metabolism as a therapeutic option for tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cells*, 10(9).
- Su, M., Shan, S., Gao, Y., Dai, M., Wang, H., He, C., Zhao, M., Liang, Z., Wan, S., Yang, J., & Cai, H. (2023). 2-Deoxy-D-glucose simultaneously targets glycolysis and Wnt/ β -catenin signaling to inhibit cervical cancer progression. *IUBMB Life*.
- Sukumar, J., Gast, K., Quiroga, D., Lustberg, M., & Williams, N. (2021). Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(2), 135-148.
- Szabo, I., Zoratti, M., & Biasutto, L. (2021). Targeting mitochondrial ion channels for cancer therapy. *Redox Biology*, 42, 101846.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. İçinde *EMBO Reports* (C. 7, Sayı 9, ss. 880-885).
- Tabariès, S., Ouellet, V., Hsu, B. E., Annis, M. G., Rose, A. A. N., Meunier, L., Carmona, E., Tam, C. E., Mes-Masson, A. M., & Siegel, P. M. (2015). Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. *Breast cancer research : BCR*, 17(1).

- Tagg, S. L. C., Foster, P. A., Leese, M. P., Potter, B. V. L., Reed, M. J., Purohit, A., & Newman, S. P. (2008). 2-Methoxyoestradiol-3,17-O,O-bis-sulphamate and 2-deoxy-D-glucose in combination: a potential treatment for breast and prostate cancer. *British journal of cancer*, 99(11), 1842-1848.
- Târcoveanu, E., LupaÈcu, C., Vasilescu, A., Vlad, N., NegoÈÄ, I., Ciobanu, D., Andriescu, C., Crumpei, F., & Georgescu, È. (2016). Particularities of Primary Breast Cancer in Men. *The Journal of Surgery*, 12(01).
- Tekade, R. K., & Sun, X. (2017). The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug Discovery Today*, 22(11), 1637-1653.
- Thomas, D. A., Scorrano, L., Putcha, G. V., Korsmeyer, S. J., & Ley, T. J. (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 14985-14990.
- Trapani, D., Ginsburg, O., Fadelu, T., Lin, N. U., Hassett, M., Ilbawi, A. M., Anderson, B. O., & Curigliano, G. (2022). Global challenges and policy solutions in breast cancer control. *Cancer Treatment Reviews*, 104.
- Trapani, D., Rajasekar, A. K. A., & Mathew, A. (2019). More options for adjuvant treatment of HER2-positive breast cancer: How to choose wisely? *International Journal of Cancer*, 145(11), 2901-2906.
- Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast Cancer Treatment. *American family physician*, 104(2), 171-178.
- Ullah, I., Khalil, A. T., Ali, M., Iqbal, J., Ali, W., Alarifi, S., & Shinwari, Z. K. (2020). Green-Synthesized Silver Nanoparticles Induced Apoptotic Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cells by Generating Reactive Oxygen Species and Activating Caspase 3 and 9 Enzyme Activities. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288-300.
- Wang, F., Jiang, X. P., Yang, D., Ri, E., & Jf, H. (2000). Doxorubicin-gallium-transferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF-7/ADR cells. *Anticancer Research*.
- Wang, R., Wang, X., Li, B., Lin, F., Dong, K., Gao, P., & Zhang, H. Z. (2009). Tumor-specific adenovirus-mediated PUMA gene transfer using the survivin promoter enhances radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(1), 45-54.
- Wang, S., He, M., Li, L., Liang, Z., Zou, Z., & Tao, A. (2016). Cell-in-Cell Death Is Not Restricted by Caspase-3 Deficiency in MCF-7 Cells. *Journal of Breast Cancer*, 19(3).

- Wang, T. A., Zhang, X. D., Guo, X. Y., Xian, S. L., & Lu, Y. F. (2016). 3-Bromopyruvate and sodium citrate target glycolysis, suppress survivin, and induce mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cells and inhibit gastric orthotopic transplantation tumor growth. *Oncology Reports*, 35(3), 1287-1296.
- Was, H., Borkowska, A., Bagues, A., Tu, L., Liu, J. Y. H., Lu, Z., Rudd, J. A., Nurgali, K., & Abalo, R. (2022). Mechanisms of Chemotherapy-Induced Neurotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- Waterhouse, N. J., Sedelies, K. A., Sutton, V. R., Pinkoski, M. J., Thia, K. Y., Johnstone, R., Bird, P. I., Green, D. R., & Trapani, J. A. (2006). Functional dissociation of $\Delta\psi_m$ and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 13(4), 607-618.
- Wei, L., Wang, R., Wazir, J., Lin, K., Song, S., Li, L., Pu, W., Zhao, C., Wang, Y., Su, Z., & Wang, H. (2022). 2-Deoxy-D-glucose Alleviates Cancer Cachexia-Induced Muscle Wasting by Enhancing Ketone Metabolism and Inhibiting the Cori Cycle. *Cells*, 11(19).
- Welch, H. G., Mazer, B. L., & Adamson, A. S. (2021). The Rapid Rise in Cutaneous Melanoma Diagnoses. *New England Journal of Medicine*, 384(1), 72-79.
- Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British journal of radiology*, 95(1130).
- Wlodkowic, D., Skommer, J., & Pelkonen, J. (2007). Brefeldin A triggers apoptosis associated with mitochondrial breach and enhances HA14-1- and anti-Fas-mediated cell killing in follicular lymphoma cells. *Leukemia Research*, 31(12), 1687-1700.
- Woods, E., Le, D., Jakka, B. K., & Manne, A. (2022). Changing Landscape of Systemic Therapy in Biliary Tract Cancer. *Cancers*, 14(9).
- Wu, Z. X., Mai, Q., Yang, Y., Wang, J. Q., Ma, H., Zeng, L., Chen, Z. S., & Pan, Y. (2021). Overexpression of human ATP-binding cassette transporter ABCG2 contributes to reducing the cytotoxicity of GSK1070916 in cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 136.
- Xi, H., Kurtoglu, M., Liu, H., Wangpaichitr, M., You, M., Liu, X., Savaraj, N., & Lampidis, T. J. (2011). 2-Deoxy-d-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(4), 899-910.
- Xian, H., wang, Y., Bao, X., Zhang, H., Wei, F., Song, Y., Wang, Y., Wei, Y., & Wang, Y. (2023). Hexokinase inhibitor 2-deoxyglucose coordinates citrullination of vimentin and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes by inhibiting HK2 /mTORC1-induced autophagy. *International Immunopharmacology*, 114.

- Xu, D. Q., Tan, X. Y., Zhang, B. W., Wu, T., Liu, P., Sun, S. J., & Cao, Y. G. (2016). 3-Bromopyruvate inhibits cell proliferation and induces apoptosis in CD133+ population in human glioma. *Tumor Biology*, 37(3), 3543-3548.
- Xu, F., Wang, J., Zhen, S., Duan, Y., Li, Q., & Liu, L. (2023). C1ql4 regulates breast cancer cell stemness and epithelial-mesenchymal transition through PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway. *Frontiers in oncology*, 13.
- Xu, H. N., Feng, M., Nath, K., Nelson, D., Roman, J., Zhao, H., Lin, Z., Glickson, J., & Li, L. Z. (2019). Optical Redox Imaging of Lonidamine Treatment Response of Melanoma Cells and Xenografts. *Molecular Imaging and Biology*, 21(3), 426-435.
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *İçinde Bioscience Reports* (C. 39, Sayı 1). Portland Press
- Yamaguchi, R., Janssen, E., Perkins, G., Ellisman, M., Kitada, S., & Reed, J. C. (2011). Efficient Elimination of Cancer Cells by Deoxyglucose-ABT-263/737 Combination Therapy. *PLoS ONE*, 6(9).
- Yang, T., Zhang, X., Yang, X., Li, Y., Xiang, J., Xiang, C., Liu, Z., Hai, L., Huang, S., Zhou, L., Liang, R., & Gong, P. (2023). A mitochondria-targeting self-assembled carrier-free lonidamine nanodrug for redox-activated drug release to enhance cancer chemotherapy. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Ye, Y., Ren, K., Dong, Y., Yang, L., Zhang, D., Yuan, Z., Ma, N., Song, Y., Huang, X., & Qiao, H. (2023). Mitochondria-Targeting Pyroptosis Amplifier of Lonidamine-Modified Black Phosphorus Nanosheets for Glioblastoma Treatments. *ACS Applied Materials and Interfaces*.
- Yeruva, L., Elegbede, J. A., & Carper, S. W. (2008). Methyl jasmonate decreases membrane fluidity and induces apoptosis through tumor necrosis factor receptor 1 in breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 19(8), 766-776.
- Yip, H. Y. K., & Papa, A. (2021). Signaling pathways in cancer: Therapeutic targets, combinatorial treatments, and new developments. *Cells*, 10(3), 1-30.
- Yue, W., Ma, J., Xiao, Y., Wang, P., Gu, X., Xie, B., & Li, M. (2022). The Apoptotic Resistance of BRCA1-Deficient Ovarian Cancer Cells is Mediated by cAMP. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.
- Zhang, D., Li, J., Wang, F., Hu, J., Wang, S., & Sun, Y. (2014). 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Letters*, 355(2), 176-183.
- Zhang, Q., Xiong, D., Pan, J., Wang, Y., Hardy, M., Kalyanaraman, B., & You, M. (2022). Chemoprevention of Lung Cancer with a Combination of Mitochondria-Targeted Compounds. *Cancers*, 14(10).

- Zhang, T., Zhu, X., Wu, H., Jiang, K., Zhao, G., Shaukat, A., Deng, G., & Qiu, C. (2019). Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 α /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5), 3711-3723.
- Zhou, L., & Chang, D. C. (2008). Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *Journal of Cell Science*, 121(13), 2186-2196.



EKLER

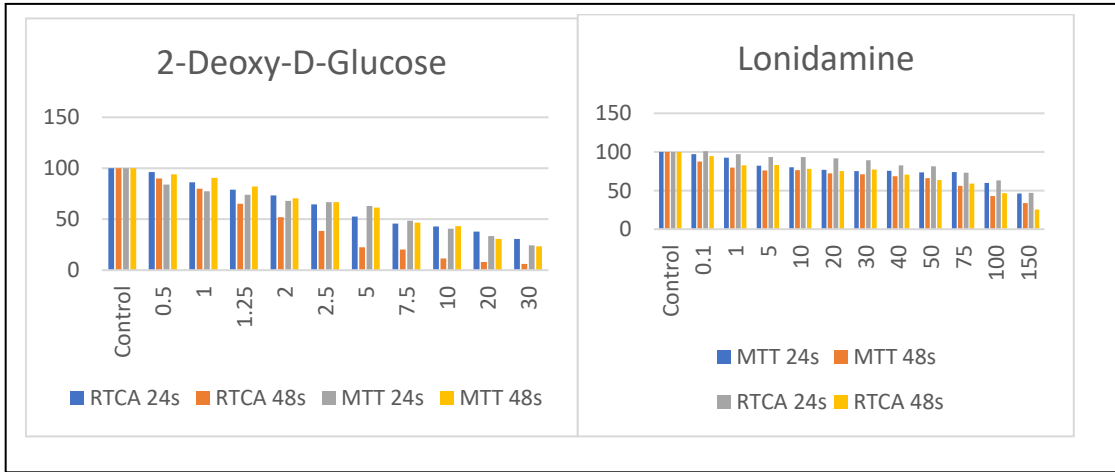
Ek. A. Hem MTT hem de RTCA kullanılarak LND ve 2-DG için Deneysel Sonuçlar (Ortalamalar)

2-deoksi-D-glukoz (mM)					
	RTCA			MTT	
Konsantrasyon	24s	48s	72s	24s	48s
Kontrol	100	100	100	100	100
0.5	96.26	89.94	90.92	84.11	94.19
1	86.30	79.88	72.10	77.55	90.59
1.25	79.02	65.22	60.64	74.04	81.99
2	73.28	51.94	45.57	68.05	70.63
2.5	64.50	38.61	31.46	66.87	66.89
5	52.47	22.61	17.54	62.98	61.28
7.5	45.74	20.20	14.10	48.51	46.79
10	42.83	11.59	8.15	40.74	43.30
20	37.99	8.15	4.19	33.40	30.66
30	30.72	6.14	3.17	24.51	23.27

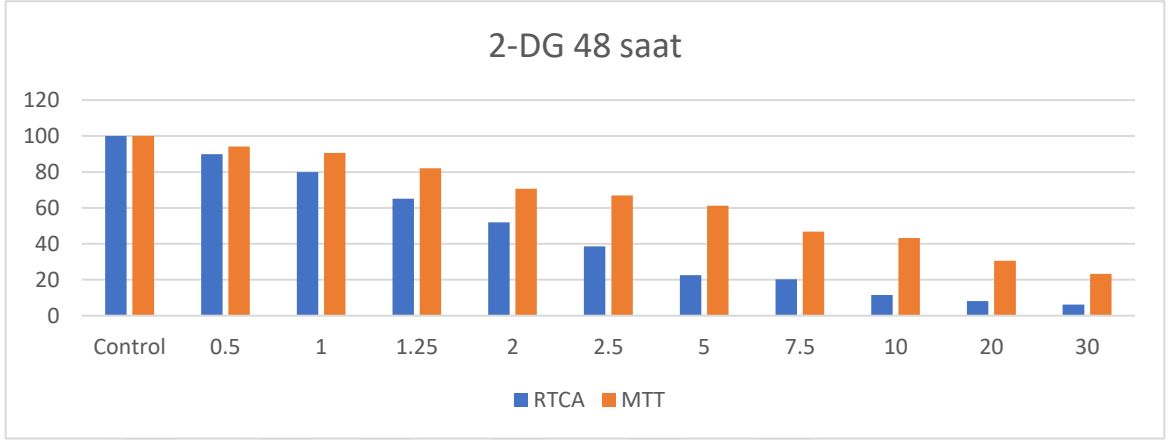
Lonidamin (μM)					
	RTCA			MTT	
Konsantrasyon	24s	48s	72s	24s	48s
Kontrol	100	100	100	100	100
0.1	101.03	87.55	77.33	97.30	87.61
1	97.32	82.55	74.07	92.61	79.62
5	93.44	82.99	73.03	82.22	76.20
10	93.39	80.64	67.19	79.99	76.56
20	91.74	78.11	62.42	76.82	72.25
30	89.25	77.11	61.21	75.30	71.22
40	82.64	70.64	55.67	75.55	68.66
50	81.26	63.39	48.64	73.67	66.09
75	73.16	58.90	40.48	73.76	56.03
100	63.12	46.78	27.93	59.68	42.81
150	46.96	25.43	14.13	46.12	33.86

Ek. A. Hem MTT hem de RTCA kullanılarak LND ve 2-DG için Deneysel Sonuçlar (Ortalamalar) (Devam)

Ek B: 2-DG ve Lonidamin için RTCA ve MTT karşılaştırması

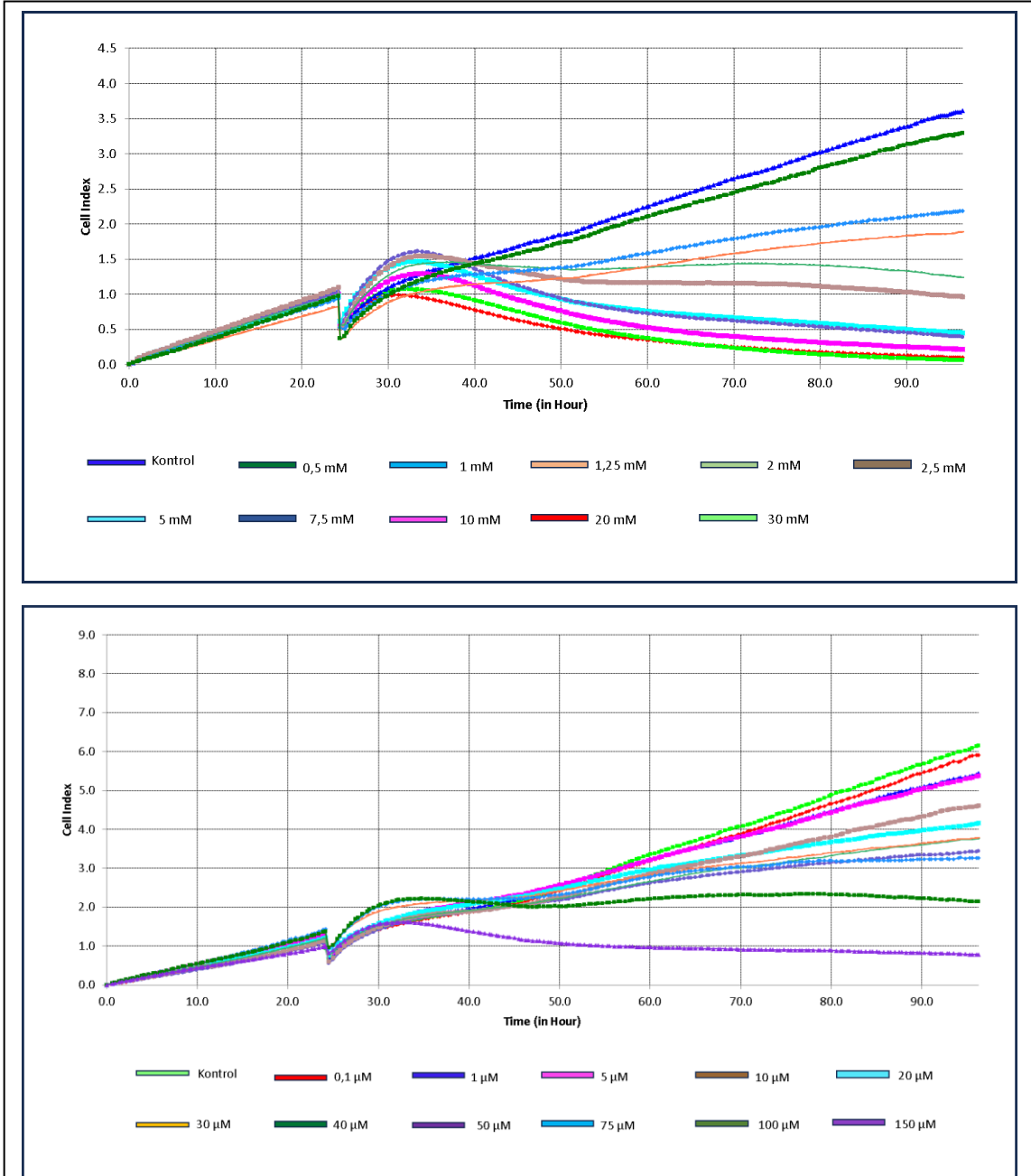


Ek C: Bireysel konsantrasyonlar kullanılarak 48 saatlik sonuçlardan RTCA ve MTT karşılaştırması



Şekilden, MTT ve RTCA sonuçları arasında açık bir fark vardır; RTCA, MCF-7 hücreleri üzerinde daha yüksek canlılık gösterir (IC_{50} değerleri sırasıyla 6,9461 ve 2,0727).

Ek D: RTCA İlerleme Grafiği

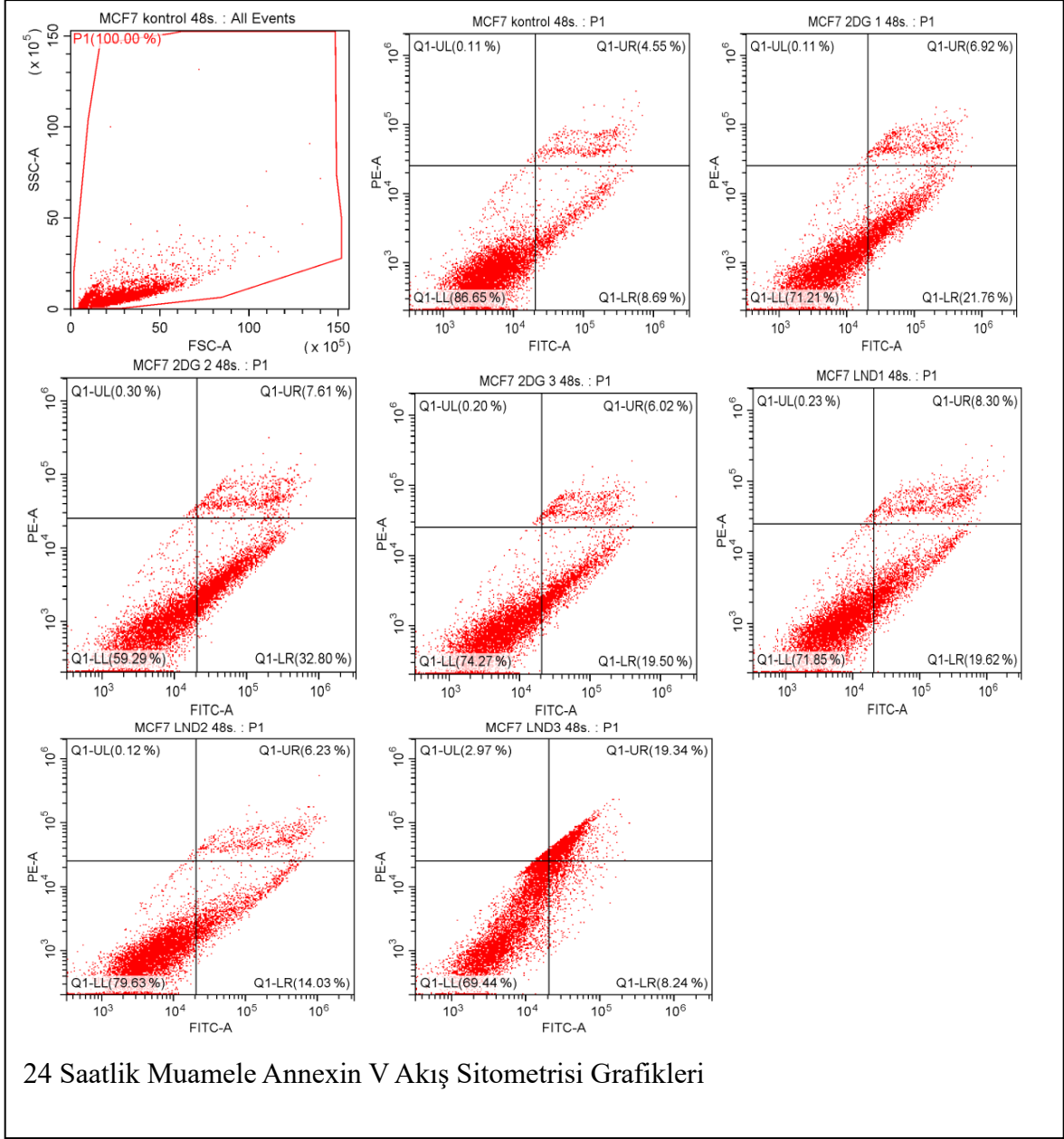


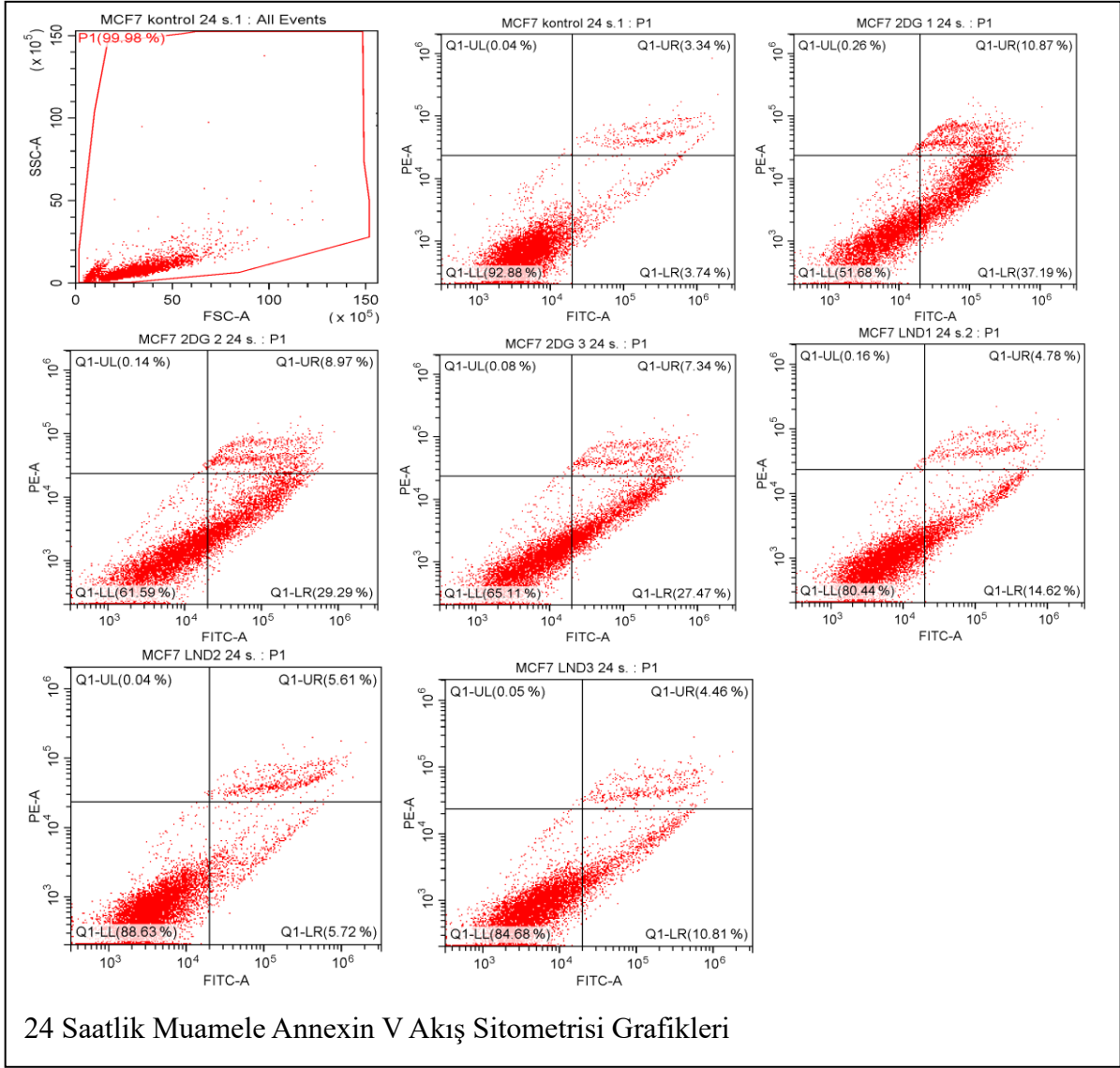
RTCA grafikleri. A)LND B)2-DG

Ek E: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Annexin Sonuçları

	24						48			
		Canlı Hücreler	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz		Canlı Hücreler	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol (Ortalama)		92.88	3.74	3.34	0.04	Kontrol (Ortalama)	86.65	8.69	4.55	0.11
2-DG	1	51.68	37.19	10.87	0.26	1	71.21	21.76	6.92	0.11
	2	65.11	27.47	7.34	0.08	2	59.29	32.8	7.61	0.3
	3	61.59	29.29	8.97	0.14	3	74.27	19.5	6.02	0.2
	Ortalama	59.46	31.31667	9.06	0.16	Ortalama	68.26	24.68	6.85	0.20
LND	1	80.44	14.62	4.78	0.16	1	71.85	19.62	8.3	0.23
	2	88.63	5.72	5.61	0.04	2	79.63	14.03	6.23	0.12
	3	84.68	10.81	4.46	0.05	3	69.44	8.24	19.32	2.97
	Ortalama	84.58	10.38	4.95	0.083	Ortalama	73.64	13.96	11.28	1.11

Ek F: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Annexin Grafikleri





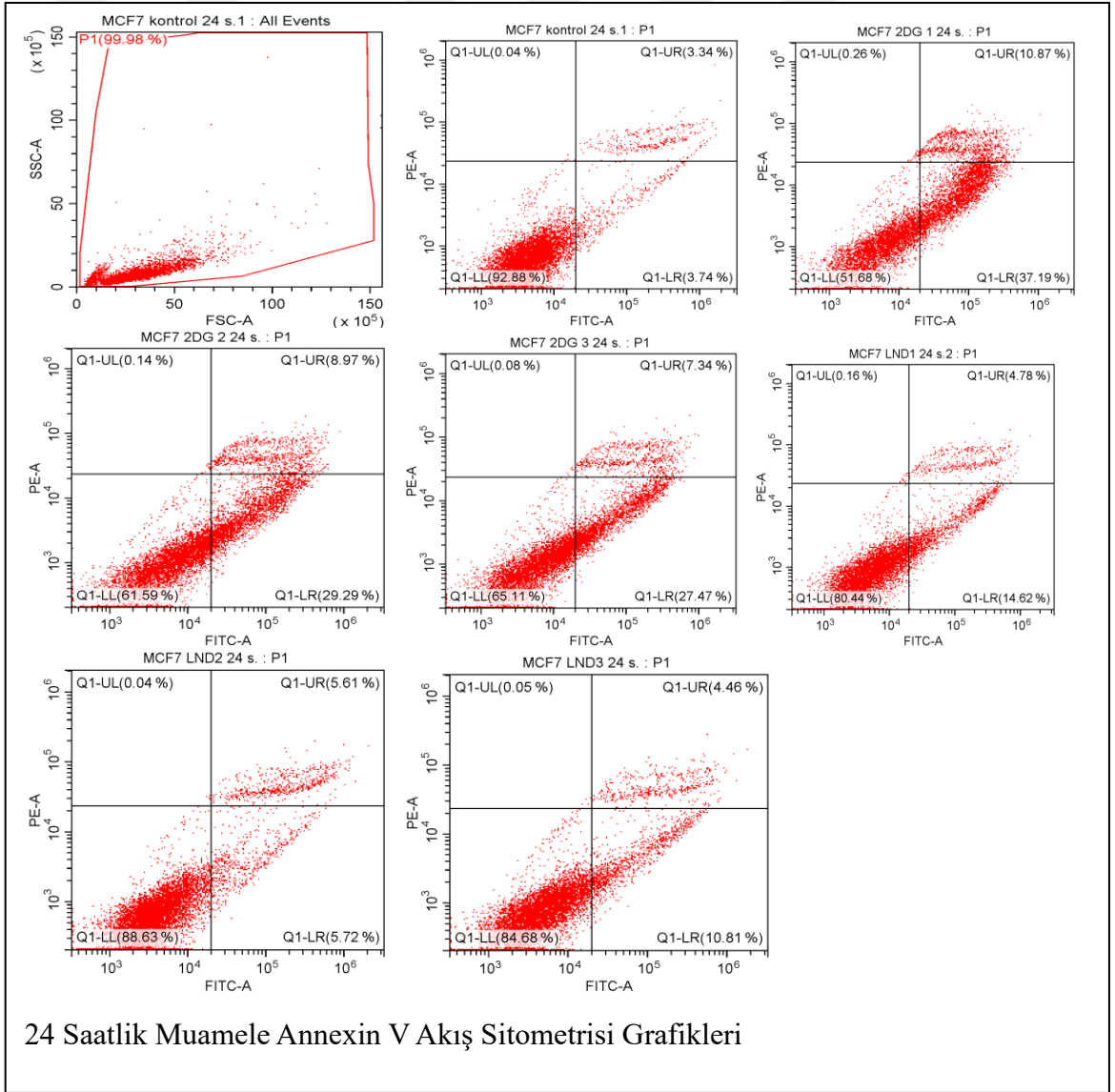
Ek G: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Annexin Sonuçları

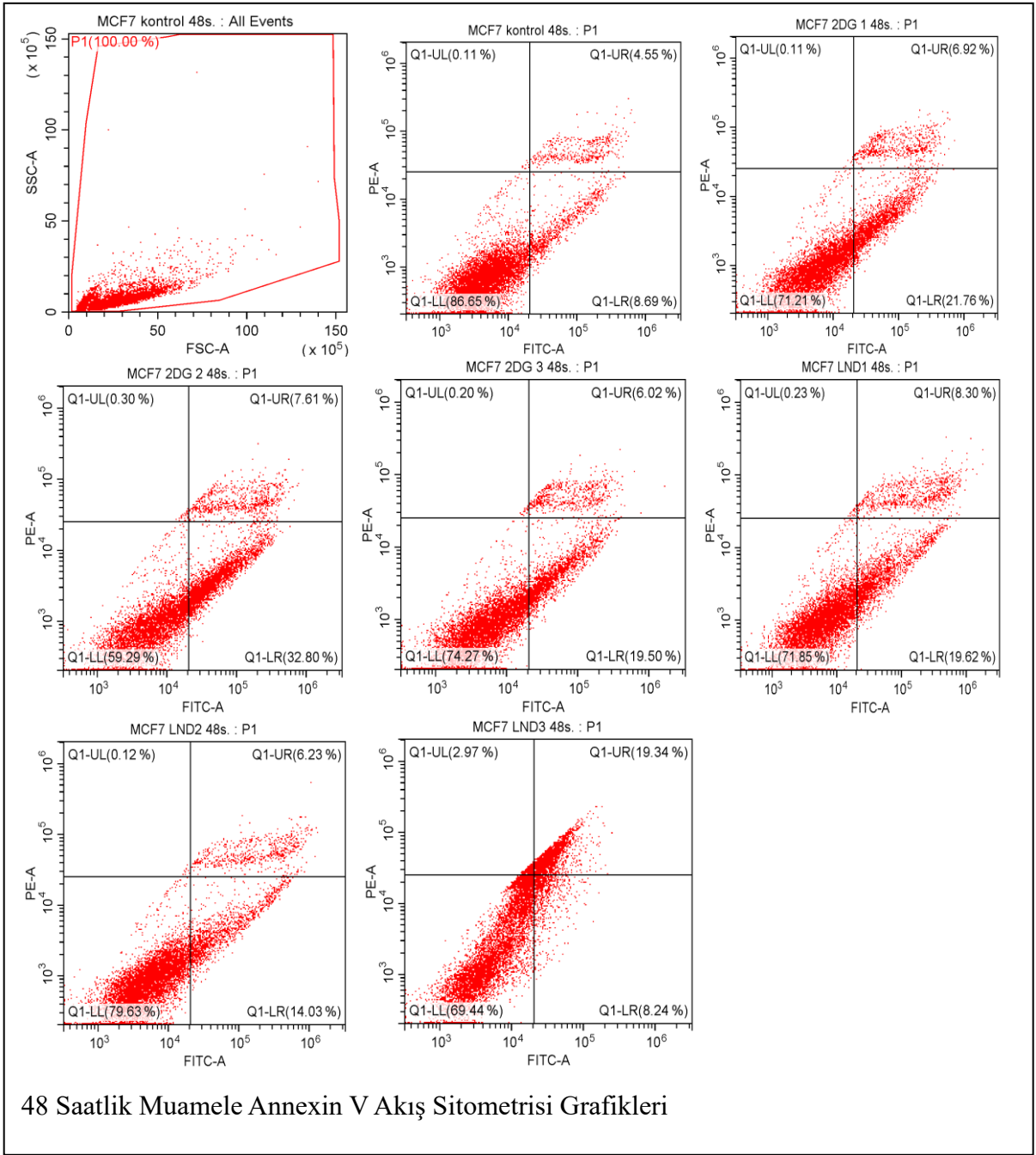
		24				48			
		Canlı Hücreler	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz	Canlı Hücreler	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol		92.88	3.74	3.34	0.04	86.65	8.69	4.55	0.11
2-DG	1	51.68	37.19	10.87	0.26	71.21	21.76	6.92	0.11
	2	65.11	27.47	7.34	0.08	59.29	32.8	7.61	0.3
	3	61.59	29.29	8.97	0.14	74.27	19.5	6.02	0.2

	Ortalama	59.46	31.31667	9.06	0.16		68.26	24.68	6.85	0.20
LND	1	80.44	14.62	4.78	0.16		71.85	19.62	8.3	0.23
	2	88.63	5.72	5.61	0.04		79.63	14.03	6.23	0.12
	3	84.68	10.81	4.46	0.05		69.44	8.24	19.32	2.97
	Ortamala	84.58	10.38	4.95	0.083		73.64	13.96	11.28	1.11

Ek G: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Annexin Sonuçları (Devam)

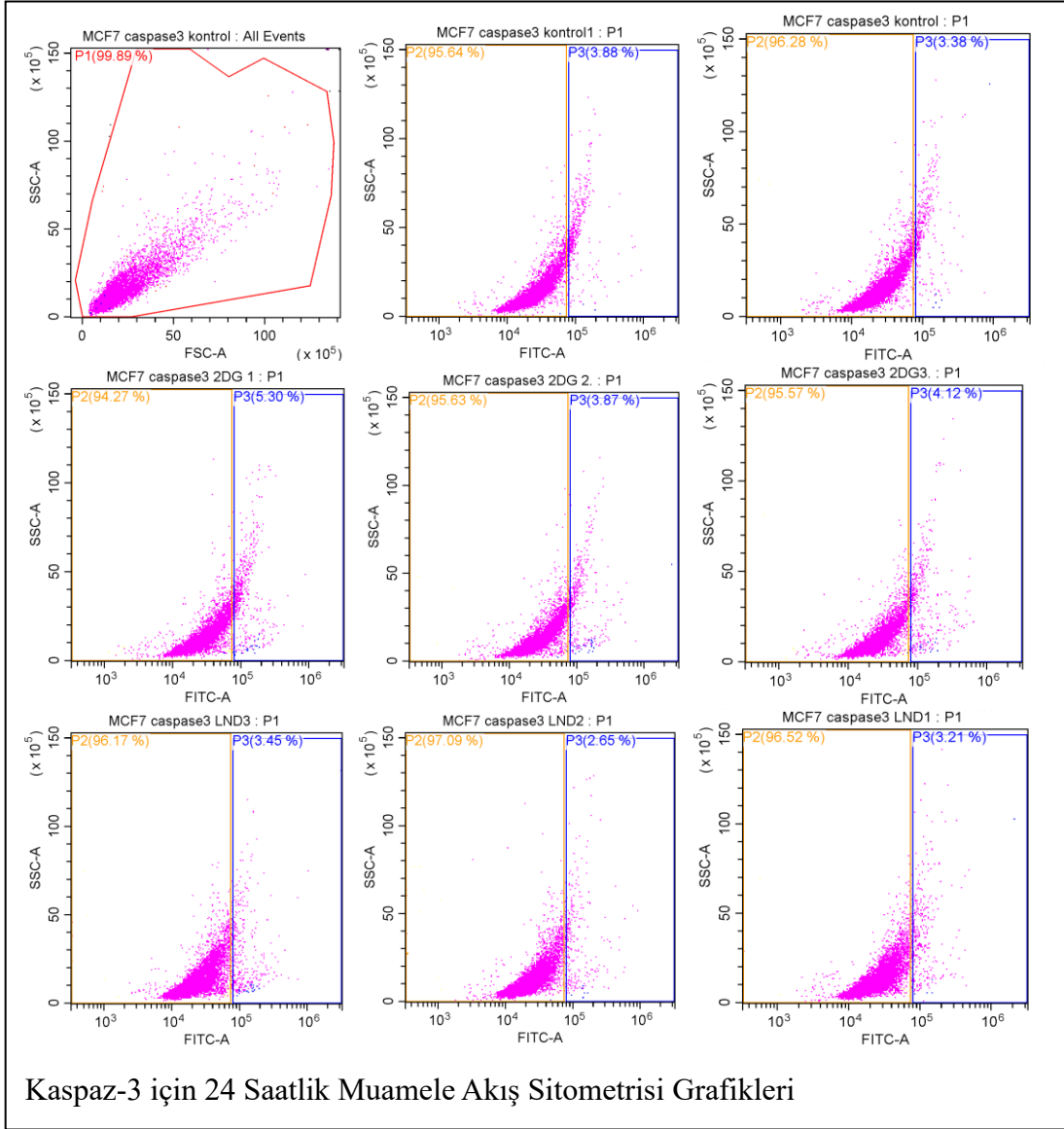
Ek H: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Annexin Grafikleri



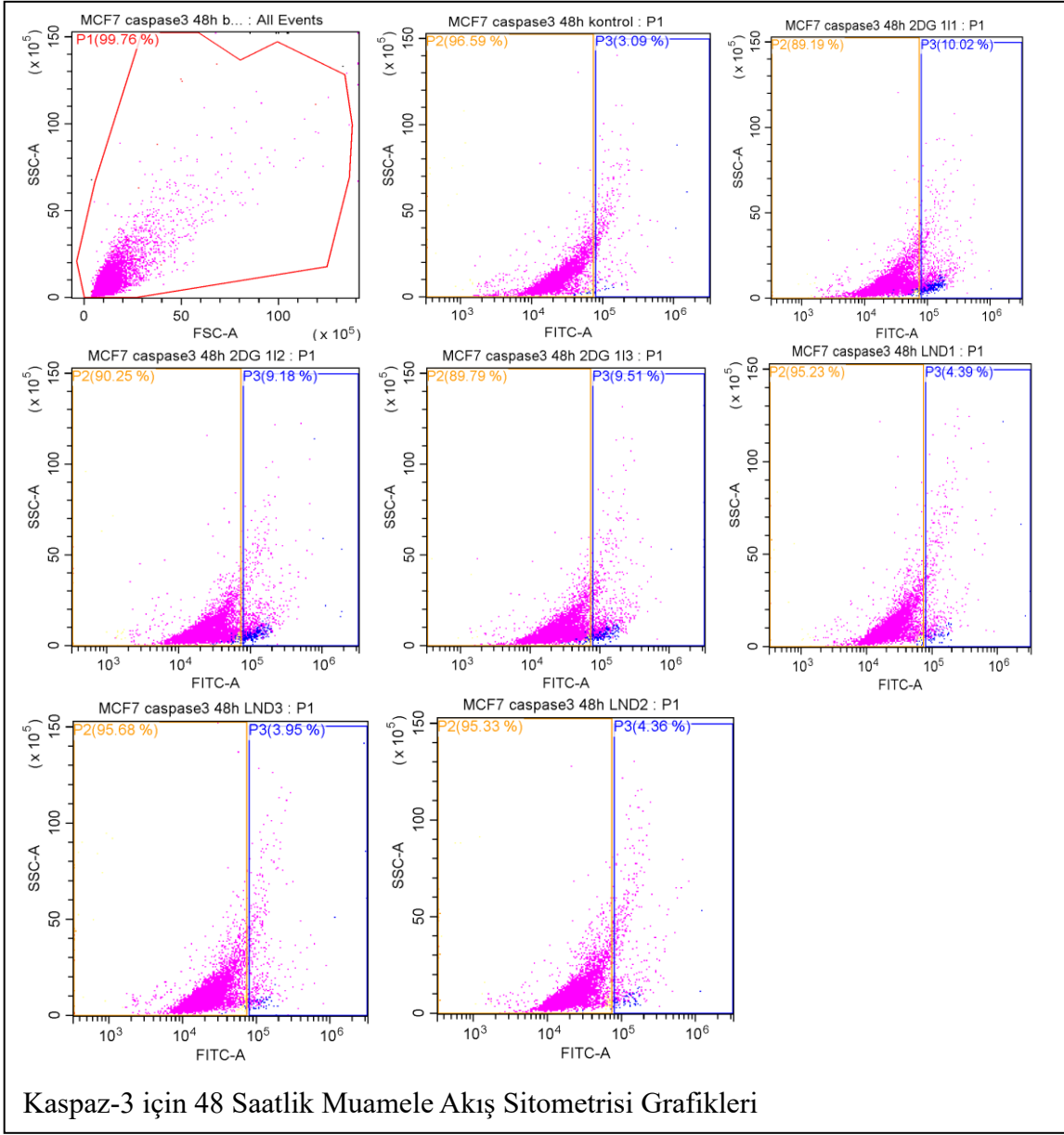


Ek H: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Annexin Grafikleri (Devam)

Ek I: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Kaspaz-3 Grafikleri

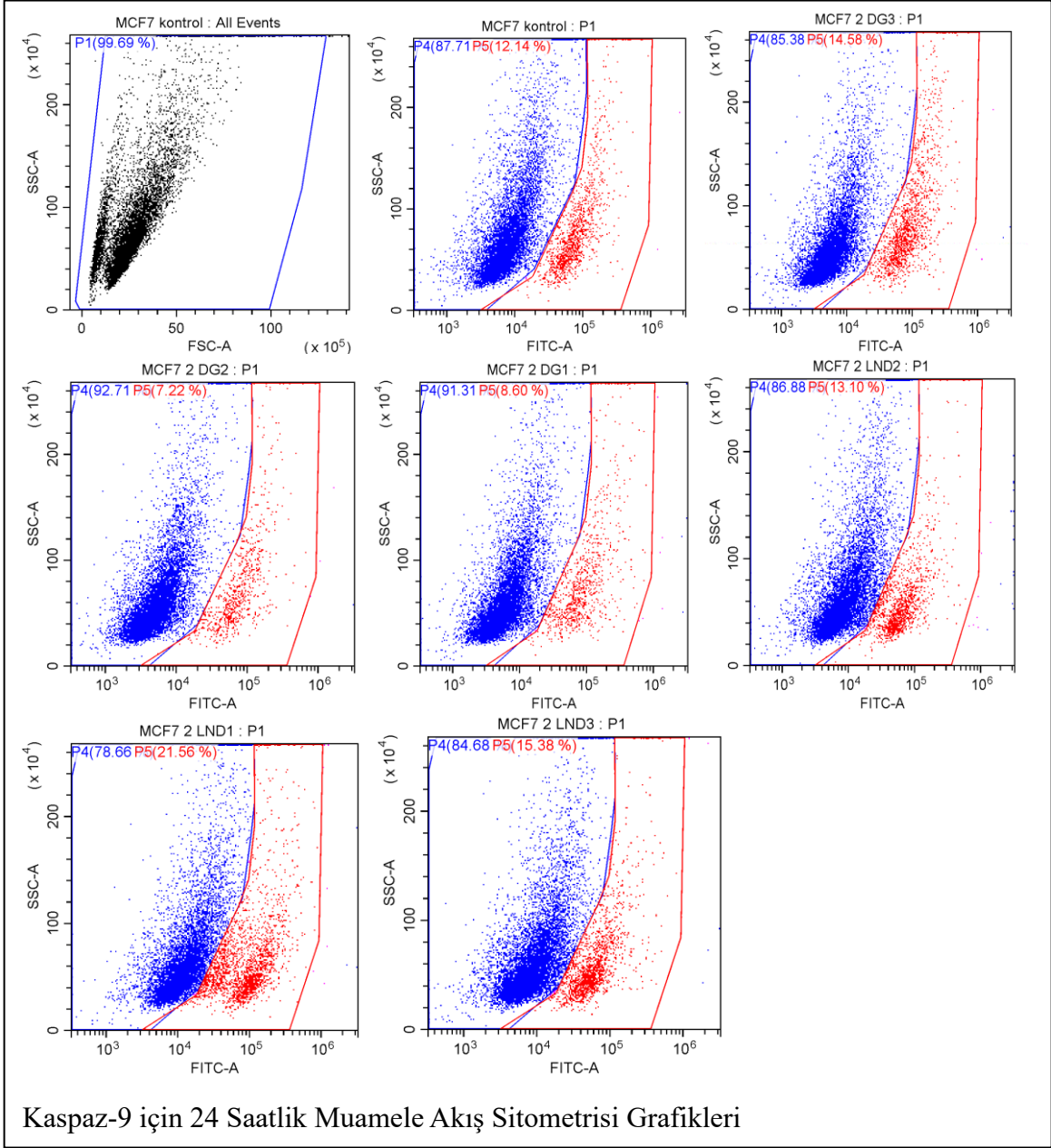


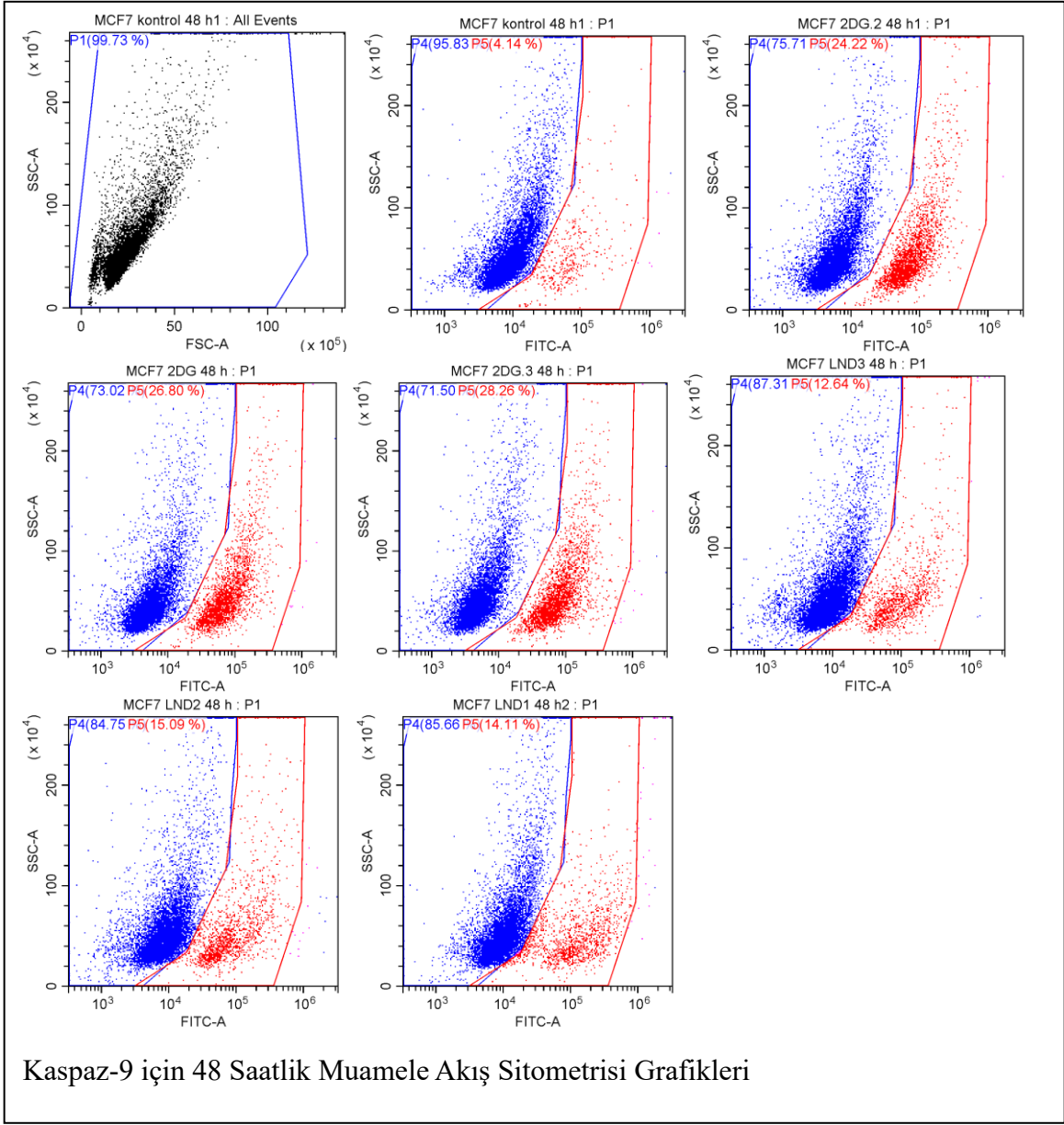
Kaspaz-3 için 24 Saatlik Muamele Akış Sitometrisi Grafikleri



Ek I: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Kaspaz-3 Grafikleri (Devam)

Ek J: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Kaspaz-9 Grafikleri

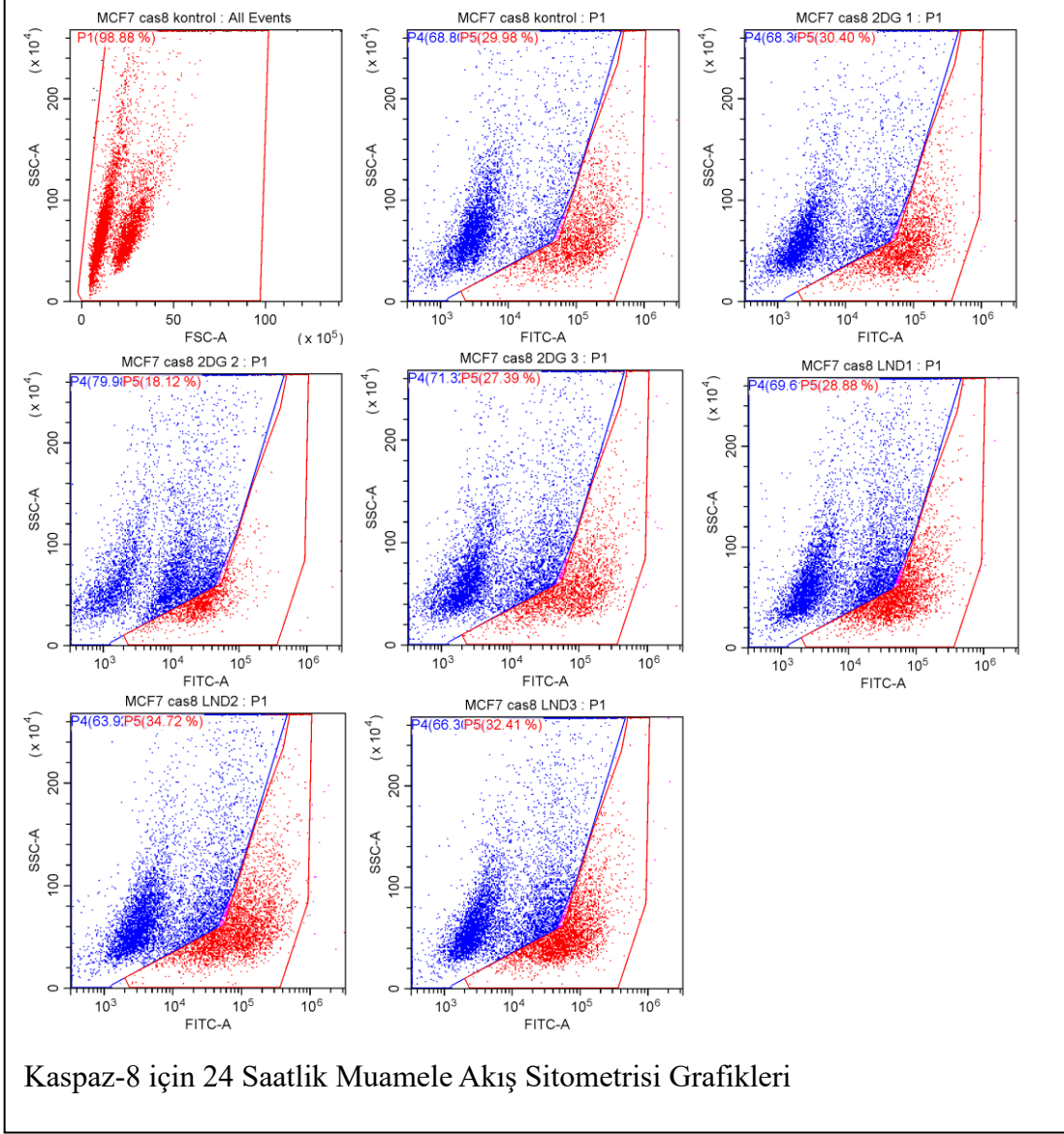




Kaspaz-9 için 48 Saatlik Muamele Akış Sitometrisi Grafikleri

Ek J: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Kaspaz-9 Grafikleri (Devam)

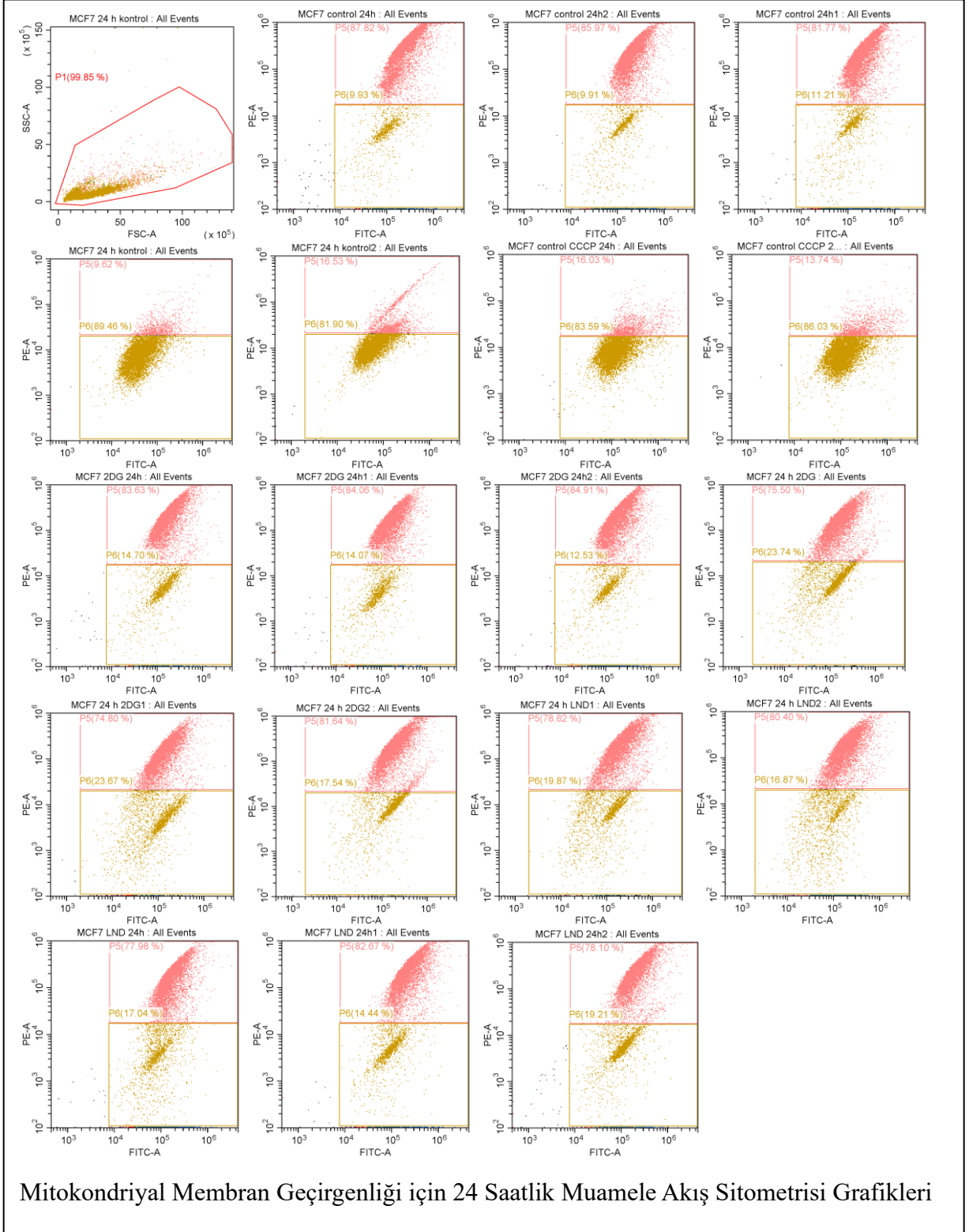
Ek K: Akış Sitometrik Analizinden Elde Edilen Kaspaz-8 Grafikleri



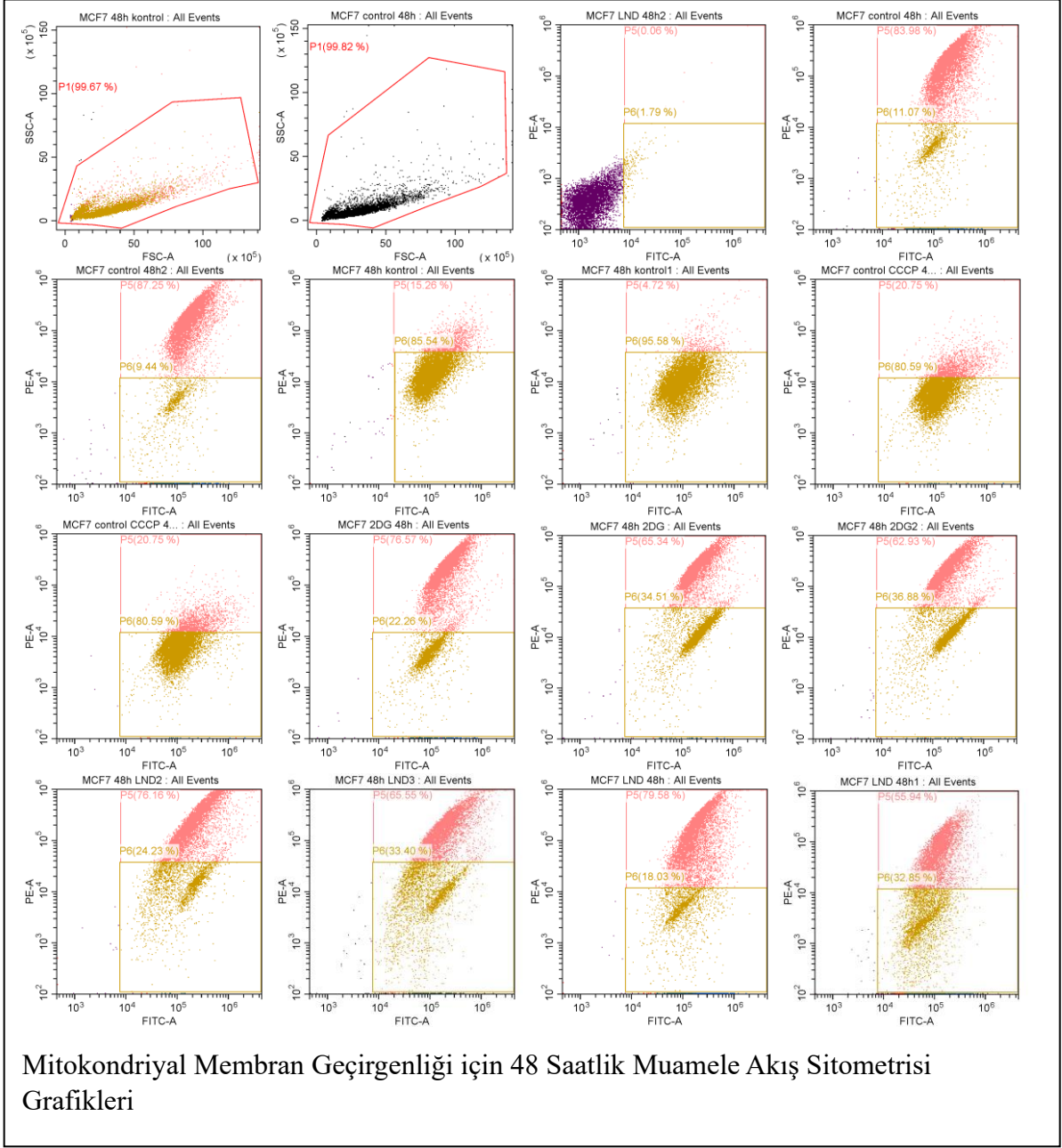
Ek L: Mitokondriyal Membran Potansiyeli Sonuçları

	24 Saat			48 Saat	
	% Canlılık	Bozuluk		% Canlılık	Bozuluk
Kontrol	86.895	9.92		88.275	9.095
CCCP	13.98	85.245		13.855	86.9475
2-DG	78.8925	19.9125		64.44333	35.28333
LND	78.825	18.2475		67.335	32.02

Ek M: Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Akış Sitometrik Sonuçları



Mitokondriyal Membran Geçirgenliği için 24 Saatlik Muamele Akış Sitometrisi Grafikleri



Mitokondriyal Membran Geçirgenliği için 48 Saatlik Muamele Akış Sitometrisi Grafikleri

Ek M: Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Akış Sitometrik Sonuçları (Devam)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Julien Agyemang GYAMFI

Resmi Dil :İngilizce

Yabancı Dil :Türkçe

Eğitim:

- 2016-2020, University for Development Studies, Ghana, Faculty of Applied Sciences, Biyokimya
- 2012-2015, Anglican Senior High School, Kumasi Ghana, General Science