



**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE
2,3-DİHİDROKSİBENZOİK ASİT (2,3-DHBA)'İN
ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI VE
LİPİD PROFİL DEĞİŞİMLERİNİN SHOTGUN
LİPİDOMİK ANALİZLE BELİRLENMESİ**

BÜŞRA DAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK BİYOKİMYA
ANA BİLİM DALI**

SIVAS-2020

**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE
2,3-DİHİDROKSİBENZOİK ASİT (2,3-DHBA)'İN
ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI VE
LİPİD PROFİL DEĞİŞİMLERİNİN SHOTGUN LİPİDOMİK
ANALİZLE BELİRLENMESİ**

BÜŞRA DAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARMASÖTİK BİYOKİMYA
ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ SERAP ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI**

SIVAS-2020

“Meme kanser hücreleri üzerine 2,3-dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA)’in anti-kanser aktivitesinin araştırılması ve lipid profil değişimlerinin shotgun lipidomik analizle belirlenmesi” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi İsmail SARI



Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ERGÜL



Üye (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi

Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI



ONAY

Bu tez çalışması, Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI'na, çalışmalarım sırasında ilgisiyle ve sabrıyla her zaman beni destekleyip yanımda olan sevgili eşim Ahmet DAŞ'a, her türlü desteği sağlayan babam Bahattin KARADAĞ'a, annem Gülnur KARADAĞ'a, kardeşim Ahmet KARADAĞ'a ve sürekli çalışmama izin verdiği için oğlum Çağlar'a teşekkür ederim. Bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim tüm süreçlerde benden yardımlarını esirgemeyen Esra DAŞ ve Emine DAŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamın her aşamasındaki yardım ve destekleri için sevgili arkadaşlarım Derya TANDOĞAN KURT'a, Dilek ÇANKAYA DURGUN'a ve Serkan CAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Bu süreçte beni her zaman dinleyen ve desteğini esirgemeyen iş arkadaşlarım Özge KUŞCU ve Merve YANPAL ÇELİK'e teşekkür ederim.

Çalışmaya maddi destek sağlayan Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) birimine teşekkür ederim. ‘‘Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından ECZ-049 proje numarası ile desteklenmiştir.’’



ÖZET

MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE 2,3-DİHİDROKSİBENZOİK ASİT (2,3-DHBA)'İN ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI VE LİPİD PROFİL DEĞİŞİMLERİNİN SHOTGUN LİPİDOMİK ANALİZLE BELİRLENMESİ

Büşra DAŞ
Yüksek Lisans Tezi
Farmasötik Biyokimya Ana Bilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI
2020, 94 sayfa + xvii

Meme kanseri (MK) dünyada kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. Birçok çalışma fenolik asitlerin antikanser ajanlar olduğunu göstermiştir. 2,3-dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA), farklı meyve veya sebzelerde bulunan doğal bir fenolik asittir. Lipidomik yaklaşımlar, hem normal hem de patolojik koşullarda lipit türlerindeki değişiklikleri araştırmaktadır. Kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların, bazı lipit tiplerindeki spesifik değişikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir ve lipit metabolizmasını içeren yeni tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Ancak, şimdiye kadar, 2,3-DHBA'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin lipit türleri üzerindeki etkilerini göstermek için herhangi bir çalışma yapılmamıştır. İlk olarak, 2,3-DHBA'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri üzerinde antikanser aktiviteye sahip olup olmadığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) yöntemi ile belirlendi. 2,3 DHBA'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri üzerinde antikanser aktiviteye sahip olduğunu ve bu etkinin zamana ve doza bağlı bir şekilde arttığı bulundu. İkinci olarak, 2,3 DHBA'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinin lipit profili üzerindeki etkileri, hedeflenmemiş lipidomik yaklaşımı kullanılarak incelendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerine 2,3 DHBA uygulanmasının gliserofosfolipid, sfingolipid, gliserolipid ve yağ asidi lipid türlerinde değişikliklere neden olduğu belirlendi. Bu çalışmada meme kanseri tedavisinde 2,3-DHBA literatürüne katkıda bulunulması ve lipit türleri üzerindeki etkilerinin açıklığa kavuşturulması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: 2,3-Dihidroksibenzoik asit, Meme kanseri, MCF-7, MDA-MB-231, MTT, Lipidomik, Antikanser aktivite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTICANCER ACTIVITY OF 2,3-DIHYDROXYBENZOIC ACID (2,3-DHBA) ON BREAST CANCER CELLS AND DETERMINATION OF LIPID PROFILE CHANGES WITH SHOTGUN LIPIDOMIC ANALYSIS

Büşra DAŞ

Master Thesis

Department of Pharmaceutical Biochemistry

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI

2020, 94 pages + xvii

Breast cancer (BC) is the most commonly diagnosed cancer in females in the world. Several studies demonstrated that phenolic acids are anticancer agents. 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) is a natural phenolic acid found in different kinds of fruits or vegetables. Lipidomic approaches are investigating the changes in lipid species both in normal and pathological conditions. Several diseases, including cancer, have been shown to be associated with specific changes in certain lipid types, and new treatment strategies have been developed to include lipid metabolism. However, so far, no study has been conducted to demonstrate the effects of 2,3-DHBA on the lipid species of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. Firstly, it was determined whether or not 2,3-DHBA has anticancer activity on MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) method. 2,3 DHBA was found to have anticancer activity on MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells and this effect increased in a time and dose-dependent manner. Secondly, the effects of 2,3 DHBA on the lipid profile of MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells were examined using the non-targeted lipidomic approach. The application of 2,3 DHBA to MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells was determined to cause changes in glycerophospholipid, sphingolipid, glycerolipid, and fatty acid lipid species. In this study, it was aimed to contribute to the literature on 2,3-DHBA in the treatment of breast cancer and to clarify the effects on lipid species.

Key words: 2,3-Dihydroxybenzoic acid, Breast cancer, MCF-7, MDA-MB-231, MTT, Lipidomic, Anticancer activity

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
YÖNERGE	iii
KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR	iv
İTHAT	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bitkiler ve Etken Maddeler	3
2.2. Fenolik Bileşikler	3
2.3. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	4
2.3.1. Fenolik Asitler	4
2.3.1.1. Hidroksibenzoik Asitler	4
2.3.1.2. Hidroksisinnamik Asitler	5
2.4. 2,3-Dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA)	6
2.5. Fenolik Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri	7
2.6. Kanser ve Alternatif Tedaviler	8
2.7. Kanser	9
2.8. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	9
2.9. Meme Kanseri Risk Faktörleri	11
2.9.1. Demografik Özellikler	11
2.9.2. Reprodüktif Öykü	12
2.9.3. Ailesel/Genetik Risk Faktörleri	12
2.9.4. Çevresel Faktörler	13
2.9.4.1. Beslenme	13
2.9.4.2. Vitaminler	13
2.9.4.3. Radyasyona Maruz Kalma	13
2.9.4.4. Alkol Kullanımı	14
2.9.4.5. Diğer Faktörler	14

2.10. Meme Kanseri Belirti ve Bulguları	14
2.11. Meme Kanseri Tanı ve Tedavisi	15
2.12. Lipidler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları	16
2.13. Lipidomik	18
2.14. Lipidomik Analizler İçin Analitik Yaklaşımlar	19
2.14.1. Hedeflenmemiş Lipidomik Yaklaşımlar	21
2.14.2. Hedeflenmiş Lipidomik Yaklaşımlar	23
2.15. Biyomedikal Araştırmalar İçin Anahtar Bir Araç Olarak Lipidomik	26
2.16. Kütle-Spektrometre Temelli Lipidomik Biyobelirteç Geliştirilmesi	27
2.17. İnsan Hastalıklarında Lipidomik Uygulamalar	31
2.17.1. Metabolik Sendrom	32
2.17.2. Nörodejeneratif Hastalıklar	33
2.17.3. Bulaşıcı Hastalıklar	34
2.18. Kanser İçin Lipit Temelli Biyobelirteçler	36
2.18.1. Lipidler ve Kanser	36
2.18.1.1. Fosfoinosititler	38
2.18.1.2. Sfingolipidler	39
2.18.1.3. Lizofosfolipidler ve Yağ Asitleri	41
2.19. Hücre Kültürü	41
2.20. MTT testi	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM	43
3.1 Kullanılan Malzemeler	43
3.2 Kullanılan Cihazlar	43
3.3. Antikanser Aktivite	44
3.3.1. Besi Yerinin Hazırlanması	44
3.3.2. Hücrelerin Çözülmesi	44
3.3.3. Hücrelerin Büyütülme Koşulları	44
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Sayımı	44
3.3.4. Bileşiğin Seyreltik Çözeltilerinin Hazırlanması	45
3.3.5. Hücrelerin Ekimi ve MTT ölçümü	45
3.4. Lipidomiks Analiz	45
3.4.1. Bligh-Dyer Yöntemi ile Lipid İzolasyonu	45
3.4.2. İnorganik Fosfat Tayini	46
3.4.3. Lipid Türlerinin Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometresiyle (ESI-MS) ile Belirlenmesi	46
3.4.4. Lipidler İçin Çok Değişkenli İstatistik Analizler;	46
3.5. İstatistik Analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1. 2,3-DHBA'in MCF-7 ve MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antikanser Aktivitesi	47

4.2.Lipidomiks Analiz	50
4.2.1. İnorganik Fosfat Tayini	50
4.2.2. ESI-MS Analizi	50
4.2.3.Lipidler İçin Çok Değişkenli İstatistik Analizler;	55
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ	79
7. KAYNAKLAR	80
8. ÖZGEÇMİŞ	94



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	(a) Salisin, (b) salisilik asit ve (c) asetilsalisilik asit yapıları	3
Şekil 2.2.	Bazı hidroksibenzoik asitler (a) gallik (b) protokateşik asit(c) vanilik asit	5
Şekil 2.3.	Bazı hidroksisinnamik asitler (a) p-kumarik asit (b) kafeik asit (c) ferulik asit (d) sinapik asit	5
Şekil 2.4.	2,3-Dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA) yapısı	6
Şekil 2.5.	2018 Yılında dünyada görülen toplam kanser (a) vaka sayıları ve yüzdeleri (b) ölümlü vaka sayısı ve yüzdeleri	9
Şekil 2.6.	Meme kanseri görülme oranları ve ölümlü vaka oranlarının coğrafi bölgelerde dağılımı	10
Şekil 2.7.	Türkiye’de kadınlarda en sık görülen beş kanser türünün vaka sayıları ve yüzdeleri	11
Şekil 2.8.	Meme kanseri belirtileri	14
Şekil 2.9.	Meme kanser tedavi yöntemleri	16
Şekil 2.10.	Biyolojik lipidomların kütle spektrometrik analizinin tipik iş akışı TLC, ince tabaka kromatografisi; GC, gaz kromatografisi; HPLC, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi; NMR, nükleer manyetik rezonans; ESI, elektrosprey iyonizasyonu; MALDI, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu; APCI, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon; APPI, atmosferik basınç fotoiyonizasyonu; DESI, desorpsiyon elektrosprey iyonizasyonu; EI, elektron iyonizasyonu; MS, kütle spektrometrisi	20
Şekil 2.11.	Hedeflenmemiş yaklaşım kullanan karşılaştırmalı lipidomik örneği	22
Şekil 2.12.	Hücrel lipitlerin tandem kütle spektrometrisi B: Ham bir lipit mayası ekstraktından 184'ün PreIS taraması. C: Mayaların ham bir lipit ekstraktından 241'in PreIS taraması. D: Ham bir lipit mayası ekstraktından 87'nin NL taraması	24
Şekil 2.13.	Lipid temelli bir biyobelirteç geliştirilmesi için akış şeması	30
Şekil 2.14.	Lipidler ve kanserle ilişkisi	38

- Şekil 4.1.** 2,3-DHBA'in MCF-7 insan meme kanser hücreleri üzerine anti-kanser aktivitesi. Deneyle 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; **p<0.005, ##p<0.0001) 47
- Şekil 4.2.** 2,3-DHBA'in MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitesi. Deneyle 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; *p<0.05, **p<0.005, #p<0.0005, ##p<0.0001) 48
- Şekil 4.3.** 2,3-DHBA'in L-929 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine antikanser aktivitesi. Deneyle 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; #p<0.0005, ##p<0.0001) 48
- Şekil 4.4.** Fosfor standart eğrisi 50
- Şekil 4.5.** Kontrol MCF-7 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 51
- Şekil 4.6.** 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 51
- Şekil 4.7.** Kontrol MCF-7 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 52
- Şekil 4.8.** 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 52
- Şekil 4.9.** Kontrol MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 53
- Şekil 4.10.** 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 53
- Şekil 4.11.** Kontrol MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin negative iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 54
- Şekil 4.12.** 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600) 54

- Şekil 4.13.** MCF-7 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu **(a)** Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve **(b)** Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) **(c)** t-testi ve **(d)** Kat değişim (Fold change, FC), **(e)** Volcano Plot (VC) grafikleri 56
- Şekil 4.14.** MCF-7 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu **(a)** Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve **(b)** Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) **(c)** t-testi ve **(d)** Kat değişim (Fold change, FC), **(e)** Volcano Plot (VC) grafikleri 57
- Şekil 4.15.** MCF-7 meme kanser hücrelerine 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC_{50} derişimi uygulanmasında değişen lipid türleri (a) pozitif iyon modu (b) negatif iyon modu 62
- Şekil 4.16.** MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu **(a)** Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve **(b)** Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) **(c)** t-testi ve **(d)** Kat değişim (Fold change, FC), **(e)** Volcano Plot (VC) grafikleri 63
- Şekil 4.17.** MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu **(a)** Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve **(b)** Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) **(c)** t-testi ve **(d)** Kat değişim (Fold change, FC), **(e)** Volcano Plot (VC) grafikleri 64
- Şekil 4.18.** MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC_{50} derişimi uygulanmasında değişen lipid türleri (a) pozitif iyon modu (b) negatif iyon modu 66

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Temel lipid sınıfları ve yapıları	17
Tablo 4.1. 2,3-DHBA'in MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri ve L-929 Sağlıklı fare fibroblast hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC ₅₀ değerleri	49
Tablo 4.2. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC ₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi ^a [M+H] ⁺	58
Tablo 4.3. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC ₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi ^a [M-H] ⁻	59
Tablo 4.4. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC ₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi ^a	65
Tablo 4.5. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC ₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi ^a	67

KISALTMALAR/SİMGELER

DHBA	Dihidroksibenzoik Asit
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
BRCA1	Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini
BRCA2	Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini
KKMM	Kendi Kendine Meme Muayenesi
KMM	Klinik Meme Muayenesi
KETEM	Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezleri
ER	Endoplazmik Retikulumda
GPCR	G Proteini Ile Bağlanmış Reseptörler
MAPK	Mitojen-Aktivated Protein Kinaz
LC / MS	Sıvı-Kütle Spektrometresi
GC / MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
ESI	Elektrosprey İyonizasyonu
MS	Multisentrik
QTOF-MS	Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
NAPE	N-Açıl Fosfatidiletanolamin
PIS	Ürün İyon Taraması
PreIS	Öncü İyon Taraması
NL	Nötral Kayıp
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
LBPA	Lizosifosfatidik Asid
SIM	Seçilmiş İyon İzleme
ST	Steroller
MAG	Mono Açılglicerid
DAG	Di Açılglicerid
TAG	Tri Açılglicerid
PSA	Prostat Spesifik Antijen
CID	Çarpışma Kaynaklı Ayrışma
AD	Alzheimer Hastalığı

APOE	Apolipoprotein E
SwAPP	İsveç APP
PD	Parkinson Hastalığı
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
PIP	Fosfatidilinositol Fosfat
PIP₂	Fosfatidilinositol Bifosfat
Mtb	Mycobacterium Tuberculosis
LD	Lipit-Damlacık
MA	Mikolik Asitler
TMAP_s	Toplam Mikolik Asit Piki
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	TNF-İlgili Apoptoz- İndükleyici Ligand
JNK	C-Jun N-Terminal Kinaz
CCAAT	Arttırıcı Bağlayıcı Protein
CHOP	Homolog Proteini
PUMA	Düzenlenmiş Apoptoz Modülatörünün
ROS	Reaktif Oksijen Türlerinin
HNE	4-Hidroksi-2-Nonal
AMP	Adenosin Monofosfat
ERK	Hücre Dışı Sinyal Düzenlenmiş Kinaz
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
MAPK	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinazlar
IP3	Inozitol Trisfosfat
MAM	Mitokondri-Birleşik Zar
GEM	Zenginleştirilmiş Mikro Domain
PC	Fosfatidilkolin
PS	Fosfatidilserin
PI	Fosfatidilinositol
DAG	Diaçilgliseroller
TAG	Triaçilgliseroller
PI3K_s	Fosfatidilinositol 3-Kinazlar
PKB	Protein Kinaz B

S1P	Sfingozin 1-Fosfat
PKC	Protein Kinaz C
GCS	Glukozilseramid Sentaz
GPCR_s	G-Protein-Bağlı Reseptörlere
CO₂	Karbondioksit
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Fetal Bovin Serom
PBS	Phosphate Buffer Saline
EM	Ekstrasellüler Matriks
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
MTT	3-(4, 5-dimetilthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid
DMSO	Dimetilsülfoksit
RPMI-1640	Hücre kültüründe kullanılan bir büyüme ortamı
PCA	Esas Bileşen Analizi
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
Sİ	Seçicilik İndeksi
Gram	g
Santigrat	°C
µM	Mikromolar

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bitkisel preparatlardan izole edilen ilk farmakolojik-aktif ilaçların tanımlanmaları 19.yüzyıl boyunca devam etmiştir. Salisinin keşfi ve aspirinin sentezlenmesinden sonra bitkilerde bulunan farmakolojik aktif bileşiklerin izolasyonu ve tanımlamalarıyla ilgili büyük bir farmasötik endüstri oluşmuştur. Günümüzde, farmakolojik olarak aktif bileşiklerin yalnızca bitkisel ürünlerde değil bunlardan başka birçok yiyecekte de bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle besinlerin, temelde yaşam tarzıyla ilgili olan ve yaşla daha belirgin duruma gelen hastalıklardan korunmak için kullanılabiliceği fikri güç kazanmıştır. Son yıllarda doğaya geri dönüş eğilimiyle birlikte bitkisel ilaçların kullanımı daha sık hale gelmiştir.

Fenolik bileşikler, suda çözünen antioksidanların en önemli grubunu oluşturmakta olup, bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde doğal olarak ve yüksek oranlarda bulunan aromatik sekonder metabolitlerdir. Bitkilerdeki fenolik bileşikler, flavonoidler ve fenolik asitler olarak başlıca iki gruba ayrılmakta ve benzen halkasına bağlı bir veya daha fazla sayıdaki hidroksil grubunun varlığıyla karakterize edilmektedirler. Fenolik bileşikler özellikle renk, koku ve tat üzerine etkili olup, bitkiyi dış etkenlerden koruyucu özellikleri de bulunmaktadır. Gallik, klorojenik, kafeik, ellajik ve ferulik asit gibi bitkilerden izole edilen birçok fenolik asitin farmakolojik olarak aktif bileşikler oldukları; antimutajenik, antioksidan, antikanserojen, antimikrobiyal, antiviral ve antitümör etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. Doğal olarak bulunan fenolik asitler benzoik ve sinamik asitten türeyen hidroksillenmiş bileşikler olup hidroksisinamik asitler (sinapik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit vb.) ve hidroksibenzoik asitler (benzoik asit, salisilik asit, vanilik asit, gallik asit vb.) olmak üzere iki farklı grupta incelenmektedirler. Salisilik asitle bağlantılı birçok dihidroksibenzoik asit (DHBA) bileşiği vardır ve 2,3-dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA) bunlardan birisidir. Güney ve güney-doğu asyada genellikle batoko eriği, avokado ve yaban mersini gibi birkaç meyve türünde de bulunmakta olup esas diyetisel kaynağı Japonya da popüler olan aspergillus fermented soya ürünleridir. 2,3-DHBA'nın bitki dünyasında dağılımı ve törapatik mekanizmaları konularında

oldukça az bilgiye sahip olduğumuzdan her iki konudaki çalışmalar ileri araştırmalar önem kazanmaktadır. 2,3-DHBA bitkilerde doğal olarak bulunan bir demir taşıyıcıdır. Demire, transferrin ve laktoferrinden daha büyük bağlanma sabitine sahiptir. Bu nedenle 2,3-DHBA β -talasemi hastalarında demir-denge sağlayıcı olarak değerlendirilmek amacıyla ağızdan alınan etkili demir-şelat ajanı olarak kullanılmaktadır.

Meme kanseri kadınlarda ilk sırada en sık teşhisi konulan ve tüm dünyada en yaygın ikinci sıradaki kanser türüdür. Kanser tedavisi için günümüzde mevcut modern tıbbın çok pahalı, toksik ve bazan verimsiz olması nedeniyle, olası alternatif ve/veya ilave tıropatik ajanlar olarak geleneksel olarak tarif edilen doğal kaynakların ayrıntılı bir şekilde incelenmesine ihtiyaç vardır. Epidemiyolojik çalışmalar bitki türevli tüketimin artmasının, kanser gelişim riskini düşürdüğünü göstermektedir. Bu durum insan besinlerinde doğal olarak var olan antikanserojen ajanların güvenli, non-toksik ve insan sağlığı üzerine uzun süreli faydalı etkileri olduğu görüşünü desteklemektedir.

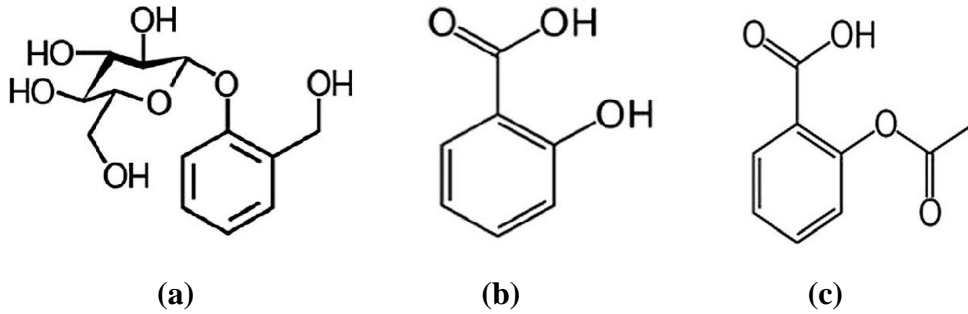
Lipidlerin biyolojik sistemlerde çok farklı ve önemli biyolojik rol oynadıkları bilinmektedir. Bu nedenle, lipidlerin büyük ölçeklerde toplu olarak karakterize edilmeleri sağlık araştırmalarında yüksek öneme sahiptir. Lipidomiks, lipid türlerinin tam karakterizasyonu ve gen regülasyonunu da içeren lipid metabolizma ve fonksiyonlarına katılan protein ekspresyonlarıyla ilgili biyolojik rollerini çalışan bir bilim alanı olarak kabul edilmektedir. Gelişen bilgiler göstermektedirki kanser ve farklı insan hastalıkları lipid oranlarındaki değişimle güçlü bir korelasyon göstermektedir. Belirli lipid türleri farklı hastalıkların gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmanın ilk kısmında, doğal fenolik bir bileşik olan 2,3-DHBA'nın asidin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerine antikanser aktivitesinin olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca 2,3-DHBA, L-929 sağlıklı fare fibroblast hücrelerine de uygulanarak, sağlıklı ve kanserli hücreler arasında olası seçici özelliği de araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, 2,3-DHBA uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin lipid profillerindeki değişimlerin araştırılması amacıyla lipidomiks çalışmalar yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkiler ve Etken Maddeler

Bitkisel preparatlardan izole edilen ilk farmakolojik-aktif ilaç olan söğüt kabuğu ekstresinden elde edilen analjezik salisin (2-(hidroksi-metil)fenil- β D-glukopiranozid) ve onun metaboliti olan salisilik asit (2-hidroksibenzoik asit)'tir [1]. 19. Yüzyılın ikinci yarısında salisilik asit, daha bağırsak dostu, steroidal olmayan anti-inflammatuvar ilaç olan ve yaygın olarak aspirin olarak bilinen asetil salisilik asit (ASA; (2-[asetiloksil]benzoik asit) eldesi için asetillenmiştir. Salisinin keşfi ve aspirinin sentezlenmesinden sonra, bitkilerde bulunan farmakolojik aktif bileşiklerin izolasyonu ve tanımlamalarıyla ilgili büyük bir farmasötik endüstri oluşmuştur. Farmasötik endüstri sıklıkla, aktif bileşiklerin hali hazırda klinik kullanıma uygun ilaçlar oluşturmak üzere modifiye edilmesiyle ilgili çalışmaları içermektedir [2]. Günümüzde, farmakolojik olarak aktif bileşiklerin yalnızca bitkisel ürünlerde değil bunlardan başka birçok yiyeceğimizde de bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle besinlerin, temelde yaşam tarzıyla ilgili olan ve yaşla daha belirgin duruma gelen hastalıklardan korunmak için kullanılabiliceği fikri güç kazanmıştır. Son yıllarda doğaya geri dönüş eğilimiyle birlikte bitkisel ilaçların kullanımı daha yaygın hale gelmiştir.



Şekil 2.1. (a) Salisin, (b) salisilik asit ve (c) asetilsalisilik asit yapıları [1]

2.2. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, suda çözünen antioksidanların en önemli grubunu oluşturmakta olup, bitkilerde doğal olarak ve yüksek oranlarda bulunan sekonder metabolitlerdir [3]. Fenolik bileşiklerin, meyve ve sebzelerdeki sarı, kırmızı, mavi gibi renkleri ve farklı lezzetleri oluşturmalarının yanısıra, böcek

ve hayvan zararlılarına karşı korunmada da etkili oldukları bilinmektedir. Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde yüksek oranlarda bulunabilmektedirler. Meyveler, içerdikleri fenolik bileşiklerin sağlığa faydalı biyolojik aktiviteleri nedeniyle fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir. Fenolik bileşiklere "biyoflavonoid" adı verilmekte ve bazı kaynaklarda P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar [4].

2.3. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Bitkilerdeki fenolik bileşikler, flavonoidler ve fenolik asitler olarak başlıca iki gruba ayrılmakta ve benzen halkasına bağlı bir veya daha fazla sayıdaki hidroksil grubunun varlığıyla karakterize edilmektedirler.

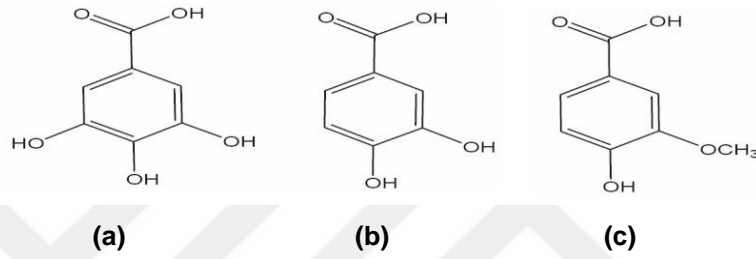
2.3.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, aromatik sekonder bitki metabolitleridir [3]. Fenolik asitlere çay, kırmızı şarap, meyve ve çeşitli tıbbi bitkilerde büyük oranda rastlanmaktadır. Soya fasulyesi, pamuk çekirdeği ve yerfıstığı gibi ürünlerde serbest formda ya da karbonhidrat esterleri halinde bulunmaktadırlar [5]. Ayrıca böğürtlen, ahududu, siyah kuş üzümü, kırmızı kuş üzümü, çilek, soğan ve yaban turpunda da bulunmaktadırlar [6]. Gıdalardaki fenolik asitler bitkisel yaşamda çok önemli bir yere sahiptirler. Fenolik bileşikler özellikle renk, koku ve tat üzerine etkilidirler. Bu bileşiklerin bitkiyi dış etkenlerden koruyucu etkileri de vardır. Acı, buruk tatları ve renkleriyle zararlı böcekleri itici etkiye sahiptirler. Gallik, klorojenik, kafeik, ellajik ve ferulik asit gibi bitkilerden izole edilen birçok fenolik asitin farmakolojik olarak aktif bileşikler oldukları; antimutajenik, antioksidan, antikanserojen, antimikrobiyal, antiviral ve antitümör etkiye sahip oldukları gösterilmiştir [5, 7]. Doğal olarak bulunan fenolik asitler benzoik ve sinnamik asitten türeyen hidroksillenmiş bileşikler olup hidroksisinnamik asitler (sinapik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit vb.) ve hidroksibenzoik asitler (benzoik asit, salisilik asit, vanilik asit, gallik asit vb.) olarak iki farklı grupta incelenmektedirler [8].

2.3.1.1. Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ iskeletiyle oluşan bileşiklerdir. Renksiz bileşikler olan benzoik asit türevleri, sinnamik asit türevlerine oranla daha

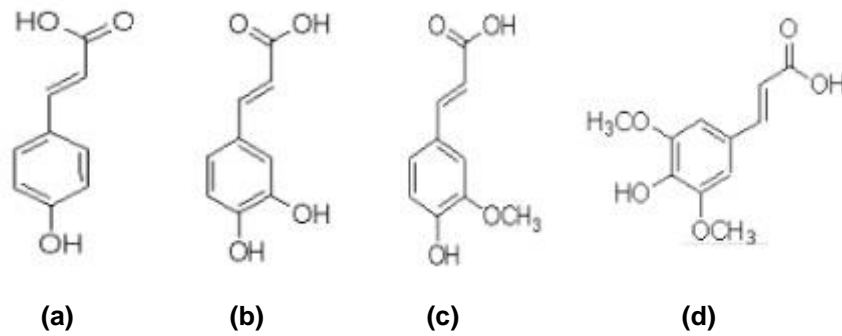
nadir bulunmaktadırlar. En yaygın olanlar; p-hidroksi benzoik asit ve gallik asittir. Salisilik asitle bağlantılı birçok dihidroksibenzoik asit (DHBA) bileşiği vardır. Bazıları; 2,3-DHBA, 2,5-DHBA, 2,4-DHBA, 2,6-DHBA, 3,4-DHBA 3,5-DHBA olarak bildirilmiştir [9, 10]. Bu bileşikler farmakolojik olarak aktiflerdir ve bazıları salisilik asit metabolitidirler. Fitokimyasal olan hidrobenzoik asitler, bazı yiyeceklerde bulunabildikleri gibi gut bakterileri tarafından flavonoidler gibi polifenollerden de oluşturulabilmektedirler [11]. Hidroksi benzoik asitler çoğunlukla bağlı formda bulunurlar ve genelde ligninler ve hidrolizlenebilir tanninler gibi kompleks yapıların bileşenidirler.



Şekil 2.2. Bazı Hidroksibenzoik Asitler (a) gallik (b) protokateşik asit (c) vanilik asit [9]

2.3.1.2. Hidroksisinnamik Asitler

Hidroksisinnamik asitler ise C_6-C_3 iskeletiyle oluşan bileşikler olup; ferulik, kafeik, sinapik ve kumarik asitler bu grupta yer almaktadırlar (Şekil 2.3.). Hidroksisinnamik asitler doğal kaynaklarda kuinik veya tartarik asitler gibi küçük moleküllerle esterleşmiş olarak bulunabilmekle birlikte, selüloz, lignin ve proteinler gibi hücre duvarının yapısal bileşenlerine ester bağlarıyla bağlı olarak da bulunabilmektedirler [12].

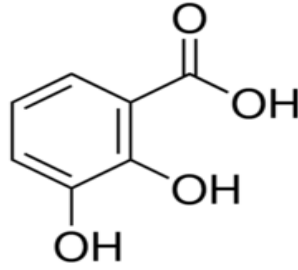


Şekil 2.3. Bazı Hidroksisinnamik Asitler (a) p-kumarik asit (b) kafeik asit (c) ferulik asit (d) sinapik asit [12]

Kafeik asit, birçok bitkide lignin biyosentezinde anahtar ara ürün olarak oldukça yüksek derişimlerde bulunmaktadır. Kafeik asidin farklı türlerdeki kanser hücrelerine karşı antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [13]. Bu özelliğini sağlıklı hücrelere karşı önemli toksisite göstermeden gerçekleştirdiğinden, olası antikanser ajan olarak düşünülmektedir.

2.4. 2,3-Dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA)

2,3-DHBA aspirinin bir metabolitidir ve *Madagascar rosy*, cezayir menekşesi ve *Boreava orientalis* (sarı ot) gibi birkaç şifalı bitkide bulunmakla birlikte Güney ve güney-doğu asyada genellikle konservesi yapılan batoko eriğı, avokado ve yaban mersini gibi birkaç meyve türünde de mevcuttur [15-22]. Ancak esas diyetel kaynağı Japonya da popüler olan aspergillus fermented soya ürünleridir.



Şekil 2.4. 2,3-Dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA) yapısı [9]

İnflamasyonda önemli rol oynayan hidrojen peroksit indüklü nükleer faktör kapp β (NFKβ)'nin transkripsiyon faktörü aktivasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. [23]. Bitki dünyasındaki dağılımı ve törapatik mekanizmaları konularında oldukça az bilgiye sahip olmamız nedeniyle her iki konudaki çalışmalar önem kazanmaktadır. 2,3-DHBA'nın nanofiber yara elbiselerle birleştirilmesi, bakteriyel büyümenin kontrolü ve özellikle diyabetik hastalardaki kronik yaralarda biyofilm oluşumunun sağlanmasında faydalanılmaktadır. Ayrıca nötrofil aktivasyonu ve radikal üretiminden kaynaklanan akut akciğer hasarı tedavisinde de kullanılmaktadır [24, 25]. Hidroksillenmiş fenolik bileşikler olduklarından hidroksil gruplarıyla serbest radikaller gibi oksidanları süpürebilmektedirler. 2,3-DHBA, bitkilerde doğal olarak bulunan bir demir taşıyıcıdır ve aynı zamanda katekolün di-sodyum

tuzlarından kimyasal olarak da sentezlenmektedir. Fe, biyolojik sistemler için hayati öneme sahip bir elementtir. 2,3-DHBA demire, transferrin ve laktoferrinden daha büyük bağlanma afinitesine sahip olduğundan 2,3-DHBA, β -talasemi hastalarda demir-denge sağlayıcı olarak değerlendirilmek amacıyla ağızdan alınan etkili demir-şelat ajanı olarak kullanılmaktadır [26-28].

2.5. Fenolik Bileşiklerin Biyolojik Aktiviteleri

Fenolik asitler, bitki ve yiyeceklerde yaygın olarak bulunmaları, önemli biyolojik ve farmakolojik özellikleri sebebiyle güncel ilgi odağı haline gelmişlerdir. Başlıca sebze ve meyvelerde bulunan besin fenoller; antioksidan anti-radikal, antikanser, antiinflammatuvar, anti-mutajenik, antiproliferatif, antiviral, kemokoruyucu ve/veya kemoterapötik ve bağışıklık güçlendirici aktivitelere sahiptirler [29-35]. Antikanser terapi veya kimyasal koruma uygulamaları için doğal kaynaklardan biyolojik olarak aktif bileşiklerin araştırılması uzun zamandan beri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Flavonoidler ve fenolik asitleri içeren fenolik bileşikler olası diyetel antikarsinojenlerin en umut veren grubu olarak nitelendirilmektedir. Fenolik bileşiklerin sahip oldukları güçlü antioksidan ve anti-radikal aktiviteler aromatik halkaya bağlı hidroksil grup sayısı, bağlanma konumu ve aromatik halkadaki hidroksillerin yerleri gibi birçok faktöre bağlı olarak farklılık göstermektedir [36, 37].

Bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunan antikarsinojen türlere giderek artan bir ilgi vardır. Kemokoruyucu etkiye sahip spesifik aktif bileşenin saptanması, bu bileşiklerce zenginleştirilen yiyeceklerin geliştirilmesine de olanak sağlayacaktır. Fitokimyasallar non-toksik, ekonomik ve kolay bulunabilme gibi faydalı özelliklere sahiptirler. Epidomolojik çalışmalar, sebze ve meyvece zengin beslenmenin kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diabet, Alzheimer ve katarakt gibi bazı kronik hastalıkların gelişme risklerindeki azalışla ilgili olduğunu göstermiştir [38-40]. Değişik fitokimyasallar, kanser hücre çoğalması ve tümör büyümesine karşı; kanser hücrelerinin apoptozonu indükleyerek, hücre döngüsünün belirli bir fazında kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurarak veya hücrel çoğalmayı indükleyen sinyal yollarını inhibe ederek aktivite göstermektedirler. Bu ise bitki kaynaklı fitokimyasalların,

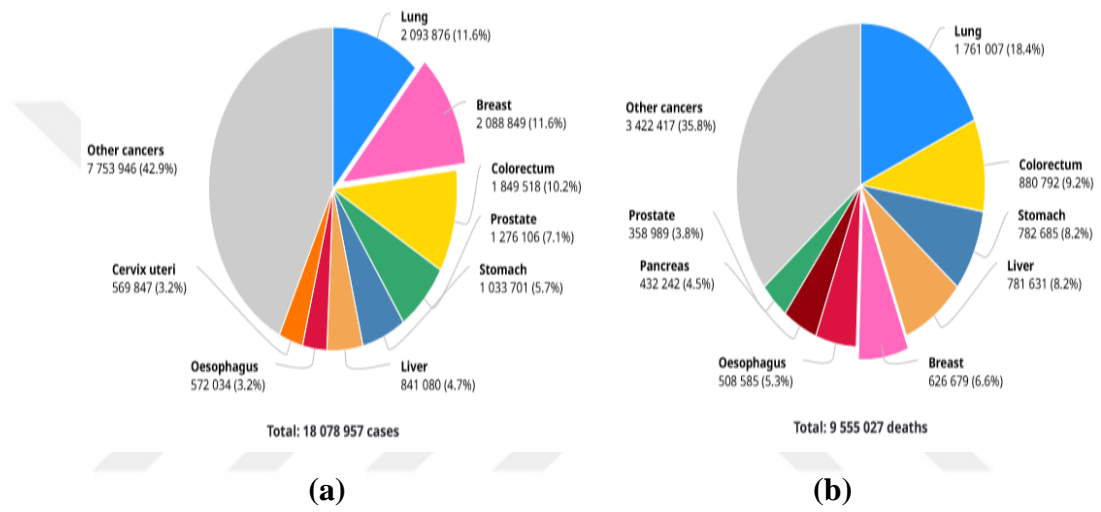
karsinogenezisle ilgili biyokimyasal ve moleküler yolları etkileyerek kanserin başlangıç ve ilerlemesini inhibe ettiklerine işaret etmektedir. Fenolik bileşiklerin antikanser ajan olarak önerildikleri mekanizmalar özellikle faz-II birleşme reaksiyonlarını içeren detoksifikasyon sistemlerinin indüklenmesini içermektedir [41].

2.6. Kanser ve Alternatif Tedaviler

Kanser tedavisi için günümüzde mevcut modern tıbbın pahalı, toksik ve bazan verimsiz olması nedeniyle, olası alternatif ve/veya ilave tıropatik ajanlar olarak geleneksel olarak tarif edilen doğal kaynakların ayrıntılı bir şekilde incelenmesine ihtiyaç vardır. Amerika'da kanser tedavisinde alternatif terapilerin kullanılması hızla artmaktadır ve günümüzde 45 milyon dolarlık bir endüstriye karşılık gelmektedir [42]. Kanser hastalarının % 80 kadarı alternatif veya destekleyici tıp kullandıklarını ifade etmektedirler ve bunların en az üçte biri alternatif ilaçları kemoterapi tedavi ile birlikte kullanmaktadır [43]. Epidemiyolojik çalışmalar yüksek bitki türevli tüketimli yaşamın, kanser gelişim riskini düşürdüğünü göstermektedir ve insan besinlerinde doğal olarak var olan antikanserojen ajanların güvenli, non-toksik ve insan sağlığı üzerine uzun süreli faydalı etkileri olduğu görüşünü desteklemektedir [44-46]. Antikanser ilaç geliştirme çalışmalarının amacı, kanser önlenmesinde kullanılacak yapay ve doğal bileşiklerin keşfedilmesinin yanısıra geliştirilen bileşiklerle ilgili toksisiteyi düşürmek ve etkinliği arttırmaktır. Biyolojik aktif bileşiklerde aranan bir diğer özellik ise kanser hücrelerine karşı seçici toksisite gösterirken normal hücreleri etkilememeleridir. Apoptozis planlanmış hücre ölümüdür ve hücre gelişmesinde birçok fizyolojik süreçte kritik rol oynamaktadır. DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması, membran çıkıntıları, çekirdek çöküşü ve hücre büzüşmesiyle karakterize edilmektedir. Apoptozisteki bozukluk tümör oluşum ve gelişimini kolaylaştırmaktadır. Birçok kemoterapik ilacın, kanser hücrelerini apoptoz yoluyla öldürdükleri gösterilmiştir.

2.7. Kanser

Kanser, hücrelerin artan proliferasyon, azalmış apoptoz ve komşu dokulara geçiş yaparak ve/veya uzak doku ve organlara metastaz kabiliyetlerindeki ilerleme sonucunda artmış göç etme yeteneği ile ilişkili olarak kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. 2018 yılında, tüm dünyada 18.1 milyon yeni kanser teşhis edilmiş ve bunlardan 9.6 milyon vaka ölümlü sonuçlanmıştır (**Şekil 2.5.**) [47]. GLOBOCAN 2018, 185 ülke ve 36 farklı kanser türü ile ilgili veriler göz önüne alınarak oluşturulmuştur [47].



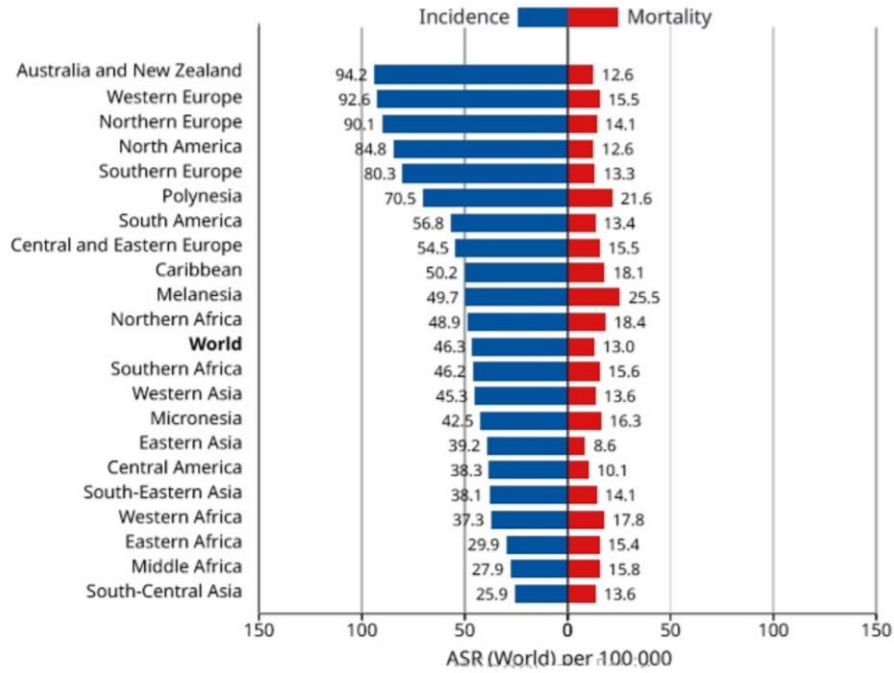
Şekil 2.5. 2018 Yılında dünyada görülen toplam kanser (a) vaka sayıları ve yüzdeleri (b) ölümlü vaka sayısı ve yüzdeleri [47]

En fazla görülen beş kanser türünün vaka sayıları ve yüzdeleri; akciğer kanseri (2 093 876 kişi ve %11.6) meme kanseri (2 088 849 kişi ve % 11.6), kolorektal kanser (1 849 518 kişi ve % 10.2), prostat kanseri (1 276 106 kişi ve % 7.1) ve mide kanseri (1 033 701 kişi ve %5.7) olarak gözlenmiştir (**Şekil 2.5.a.**). Ölümlü vaka sayıları ve oranları göz önüne alındığında ise; yine ilk sırada akciğer kanseri (1 761 007 kişi ve %18.4) gelmekte olup, kolorektal kanseri (880 792 kişi ve % 9.2), mide kanseri (782 685 kişi ve % 8.2), karaciğer kanseri (781 631 kişi ve % 8.2) ve meme kanseri (626 679 kişi ve %6.6) olarak bildirilmiştir (**Şekil 2.5.b.**).

2.8. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

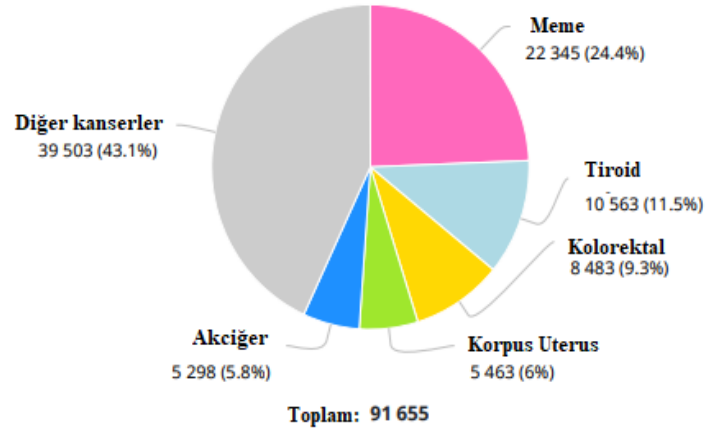
Kanser tüm dünya’da ciddi bir sağlık problemidir. Kanser, dünyada ölüm nedenleri arasında günümüzde ikinci sırayı alsa da 2030’lu yıllara doğru ilk

sırayı alması muhtemel görünmektedir [48]. Meme kanseri, kadınlar da en sık görülen kanser türleri arasında yer almaktadır [47]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenlerinde ilk sırayı meme kanserinin aldığını ve tüm kanser türleri arasında görülme sıklığının % 24.2 olduğunu bildirmiştir [47]. Dünyada, meme kanseri görülme ve ölüm oranlarının coğrafi bölgelere göre dağılımı **Şekil 2.6.**'da gösterilmiştir [47]. 2018 yılında tüm dünya'da 2 milyondan fazla kadına meme kanser tanısı konulmuş ve bunlarda 627 bin vaka ölümle sonuçlanmıştır [47]. Meme kanser tanısı konulan hastalara bakıldığında ise her 4 kadından birinin meme kanseri olduğu ve tüm kanser kaynaklı ölümlerin %15'ini oluşturduğu bildirilmiştir [49].



Şekil 2.6. Meme kanseri görülme oranları ve ölümlü vaka oranlarının coğrafi bölgelerde dağılımı [47]

Türkiye’de de benzer olarak kadınlar arasında en sık ve ilk sırada teşhis edilen kanser türününü meme kanseri olduğu ve %24.4 görülme oranına sahip olduğu raporlanmıştır. 2018 yılında Türkiye’de 22345 kadına meme kanser tanısı konulmuş ve bunlarda 5452 vaka ölümle sonuçlanmıştır (**Şekil 2.7.**) [47]. Ülkemizde meme kanseri tanısı konulan kadınların %44.5’i 50-69 yaş ve %40.6’sı 25-49 yaş aralığında olduğu ve meme kanseri görülme yaşının giderek düştüğü bildirilmiştir [49].



Şekil 2.7. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen beş kanser türünün vaka sayıları ve yüzdeleri [40]

Ayrıca, Türkiye’de meme kanseri sıklığının, doğu bölgelerimizde 20/100 000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100 000 oranında olduğu bildirilmiş olup bu durumun fazla hormon tedavisi görme, emzirme süresinin daha kısa olması, beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar, batı tarzı yaşam şeklini benimseme gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmektedir [50].

2.9. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinin genetik, hormonal, çevresel, psikolojik ya da biyokimyasal gibi birçok etkene bağlı olduğu ancak meme kanserli kadınların çoğunluğunda (%70) bilinen bir risk faktörünün bulunmadığı belirtilmiştir [51]. En önemli risk faktörleri kadın olmak ve yaş olmakla birlikte diğer risk faktörleri demografik özellikler, reproduktif öykü, ailesel/genetik faktörler, çevresel faktörler ve diğer faktörler olarak sıralanmaktadır.

2.9.1. Demografik Özellikler

Cinsiyetin kadın olması en büyük risk faktörüdür. Buna birde yaşın ilerlemesi eklenirse bu risk daha da artmaktadır [52]. Meme kanserinin kadınlarla ilgili bir diğer risk faktörü ise beyaz kadınlarda görülme sıklığının zencilere oranla %20 daha fazla olmasıdır. Fakat mortalite oranlarına bakıldığında zenci ırkında daha fazla olduğu görülmüştür. Yaşam tarzı ve sosyoekonomik durumların etnik farklılıklara yol açtığı düşünülmektedir [52].

2.9.2. Reprodüktif Öykü

Östrojen hormonuna maruz kalınan sürede artış olması (erken menarş [12 yaşından önce], geç menapoz [55 yaşından sonra]), meme kanserine yakalanma artışı ile ilişkilendirilmiştir. Östrojene maruz kalma süresindeki düşüşün koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir [53]. İlk canlı doğumun daha ileri yaşta yapılması ve hiç doğum yapılmamış olunması, meme kanseri riskindeki artışla ilişkilendirilmiştir [54]. İndüklenmiş veya spontan düşük yapmanın meme kanseri ile bir ilişkisi gösterilememiştir [55, 56]. Oral kontraseptif ve hormon replasman tedavisi kullananların, kullanmayanlara oranla daha fazla risk altında olduğu ve emzirmenin koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [57].

2.9.3. Ailesel/Genetik Risk Faktörleri

Ailesel meme kanseri öyküsünün meme kanseri riskini iki ya da üç kat arttırdığı, özellikle *BRCA1*, *BRCA2* ve *p53* mutasyonlarının, meme kanseri için çok yüksek risk oluşturduğu bildirilmiştir [57]. Ailede aynı tip kanser görülmesi kalıtsal kanser, farklı tip kanser görülmesinde ise kanser ailesi olarak tanımlanmaktadır. Bir adet birinci derece akrabada meme kanseri olması, meme kanseri riskini 1.80 kat artırırken iki tane birinci derece akraba varlığında ise bu risk 2.9 kat artmaktadır. Meme kanserine yakalanmış olan akraba 30 yaşından önce tanı konulmuş ise risk 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı konmuş ise risk 1.5 kat artmaktadır [58]. Kalıtımsal aile öyküsü göstergeleri aşağıda sıralanmıştır [59, 60].

- Herhangi bir akrabada meme kanseri öyküsü,
- Herhangi bir akrabada *BRCA1* ya da *BRCA2* gen mutasyonu, meme kanseri görülme yaşı 40/50 yaş altı en az 1 adet birinci derece akrabada meme kanseri görülmesi,
- Ailede birden fazla kişide meme kanseri öyküsü (özellikle aynı tarafta),
- Derecesi ve yaşı ne olursa olsun aynı akrabada meme ve over kanseri görülmesi,
- Yaşı ne olursa olsun, birinci derece akrabada eş zamanlı çift taraflı meme kanseri görülmesi,

- Derecesi ve yaşı ne olursa olsun erkek akrabada meme kanseri görülmesi,
- Ailede etkilenmeyen bireylerin sayısı etkilenmemiş birçok akrabası olan büyük ailelerin, yüksek riskli bir gen mutasyonuna yatkın olma olasılığı düşüktür).

2.9.4. Çevresel Faktörler

2.9.4.1. Beslenme

Tüm dünyada görülme sıklığı artan meme kanserinin ülkeden ülkeye değişkenlik göstermesinin yanı sıra göç eden insanlarda da artış göstermesi, meme kanserinde sadece genetiğin değil çevresel etkilerin özellikle de beslenmenin etkili olduğu göstermektedir [61]. Liftçe zengin gıdalarla beslenmenin meme kanseri oluşumuna karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Hayvan çalışmalarında da liftçe zengin besinlerin meme tümörü sıklığını azalttığı gösterilmiştir. Kafein tüketimi ile meme kanseri riski arasında bir ilişki gösterilememiştir. [62, 63]. Sigara ile meme kanseri arasındaki ilişki ise çelişkilidir. Çalışmalarda çok değişik sonuçlar elde edilmekle birlikte, bazı diğer faktörlerle birlikte riski artırdığı düşünülmektedir [64, 65].

2.9.4.2. Vitaminler

A vitaminin içerdiği karotenoidler antioksidan özelliğe sahiptirler. Bu karotenoidler DNA hasarına yol açan reaktif oksijen radikallerine karşı hücrel savunmayı artırabilirmekte ve meme kanseri oluşumunda koruyucu etki gösterebilmektedirler [66]. Aynı şekilde antioksidan özellikte olan E vitaminin ise meme kanserinde koruyucu bir etkisi gözlenmemiştir [67]. C vitamini ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada meme kanserine karşı koruyucu etkisi gözlenirken, ABD de yapılan bir başka çalışmada ise koruyucu etki gözlenmemiştir [68, 69].

2.9.4.3. Radyasyona Maruz Kalma

Memenin aktif olarak geliştiği 10-14 yaş civarında radyasyona maruz kalınmasının meme kanseri riskini arttırdığı, 45 yaşın üstünde radyasyona maruz kalınmasının ise meme kanseri riskini etkilemediği bildirilmiştir [70]. Tanısal amaçlı yapılan işlemler için radyasyona maruz kalmanın ise meme

kanseri riski ile ilişkisi tartışılmalıdır [71, 72]. Doğum sonrası mastit, akne, hirsutizm gibi nedenlerle radyoterapi alanlarda düşük veya orta derece radyasyon dozlarından sonra meme kanseri gelişme riskinde artış gözlenmiştir [73].

2.9.4.4. Alkol Kullanımı

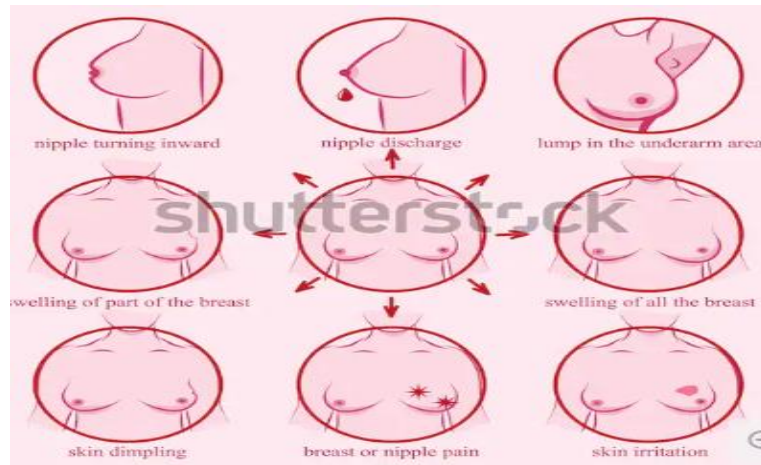
Yapılan farklı çalışmalar sonucunda alkol tüketiminin meme kanseri gelişme riskini artırdığı bildirilmiştir [74]. Alkol tüketiminin östradiol serum düzeylerini yükselttiği bilinmektedir [75]. Bu artış tüketilen alkolün cinsine bağlı olmayıp tüketilen miktarına bağlı olarak değişmektedir. Aynı zamanda erken yaşta alkol tüketimine başlamak da bu riski arttırmaktadır. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, alkol alımına bağlı meme kanseri gelişme riskindeki artışın, folat alımı ile azaltılabileceği gösterilmiştir [74].

2.9.4.5. Diğer Faktörler

Sosyoekonomik düzeyi yüksek olan kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı artış göstermektedir [76]. Bunun yanı sıra yaşam şekline bağlı olarak azalmış fiziksel aktivite, obezite veya hormon terapisi gibi çeşitli faktörlerin de meme kanserine yakalanma riskini arttırdığını bildirilmiştir [77].

2.10. Meme Kanseri Belirti ve Bulguları

Meme kanserinde en sık karşılaşılan belirtiler memede kitle, meme başında retraksiyon, memede çukurlaşma, ağrı, portakal kabuğu görünüm ve lenf nodlarında büyüme olarak sıralanmaktadır (Şekil.2.8.) [78].



Şekil 2.8. Meme kanseri belirtileri [79]

Meme kanserinin memenin kısımlarına göre görülme yüzdeleri; üst dış kadranda %60 (fazla miktarda meme dokusu içerdiği için), meme ucu çevresinde %5, üst iç kadranda %15, alt dış kadranda %15, alt iç kadranda %5 olarak bildirilmiştir [78].

2.11. Meme Kanseri Tanı ve Tedavisi

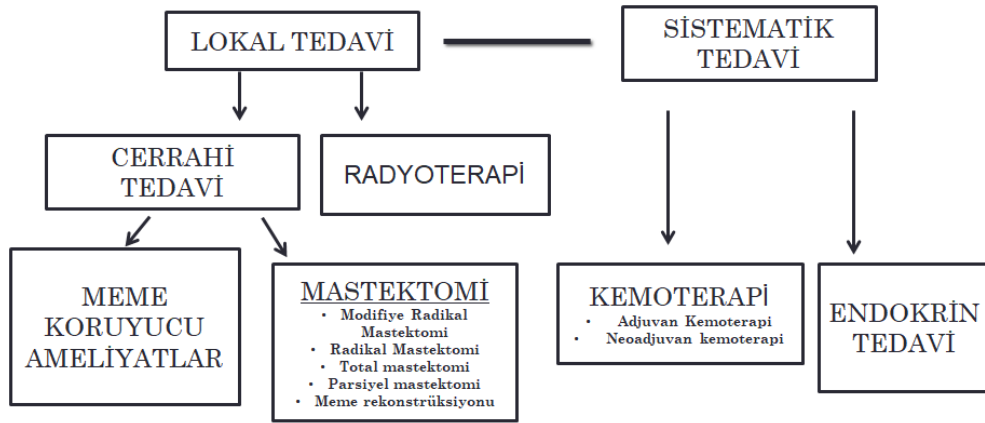
Memede ortaya çıkabilecek herhangi bir patolojik değişim el ve gözle kolay tespit edilebilmektedir. Dolayısıyla da doktorların kolay gözlem yapmasını sağlamaktadır [80]. Meme kanserinde erken tanı hayat kurtarmakta olup tedavinin daha başarılı bir şekilde sürdürülmesinde etkili olmaktadır. Meme kanserinin kesin bir tedavi yöntemi henüz bilinmemektedir dolayısıyla erken dönemde tanı konulması çok önemlidir [81]. Meme kanserinde tarama yöntemleri, insanların kansere karşı farkındalığını arttırmakta, erken evrede tespit edilmesini sağlamakta ve sağkalım süresini arttırabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde erken tanı yöntemlerinin uygulanmasıyla meme kanserine yakalanan hastaların yaşam sürelerinin arttığı bildirilmiştir [82].

Meme kanserinin erken tanısı için tavsiye edilen tarama yöntemleri; kendi kendine meme muayenesi (KKMM), klinik meme muayenesi (KMM) ve mamografidir [82]. Amerikan Kanser Enstitüsü, 20 yaşın üzerindeki kadınların her ay KKMM yapmalarını, 20-40 yaş arasındaki bayanların üç yılda bir KMM yaptırmalarını, 40 yaşından sonra ise yılda bir kez KMM yaptırmalarını ve aynı zamanda iki yılda bir mamografi çektirmelerini tavsiye etmektedir. Ülkemizde de meme kanserinin erken tanı ve tedavisinde, Sağlık Bakanlığı, Üniversiteler ve meme sağlığı ile ilgili kuruluşlar çalışmalarını sürdürmektedirler. 2004 yılında ülkemizde Ulusal Meme Kanseri Tarama Rehberi yayınlanmış ve Kanser Erken Teşhis Tarama ve Eğitim Merkezleri (KETEM) hizmete açılmıştır.

KKMM ve KMM'nin kadınlar için meme kanseri farkındalığını arttırmada çok etkili ve kolay olduğu bilinmektedir [82]. KKMM'nin kolay uygulanabilir olması, acısız ve ekonomik olması bu yönüde üstünlük kazandırmaktadır [83]. KMM ise mamogramda görülemeyen kanserlerin tespit edilmesini sağlayan bir tarama yöntemidir. Klinik muayene ile kanserlerin yaklaşık

%26'sı mamografi ile saptanamayan kitlelerin ise %10-15'i belirlenebilmektedir.

Mamografi meme kanserinin erken tanısında etkili olan bir tarama yöntemi olup, aynı zamanda tanı koymada da etkili bir yöntemdir. Mamografi memede ele gelen lezyonları erken evrede yakalayıp, klinik olarak gizli durumdaki, palpe edilemeyen meme kanserlerini belirlemeye yönelik bir yöntemdir. Mamografi taramasının meme kanseri ölüm riskini % 16-36 arasında azalttığı bildirilmiştir. Türkiye'de meme kanserini evrelere göre tanı yüzdeleri Evre I, II, III ve IV için sırasıyla; % 27, % 44, % 21 ve % 8 olarak bildirilmiştir [84]. Meme kanseri tedavisinde; lokal (cerrahi tedavi, radyoterapi) ve sistemik tedavi (kemoterapi, endokrin tedavi) gibi farklı türde tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Meme kanseri için tedavi yönteminin belirlenmesindeki en önemli etmen hastalığın evresidir.

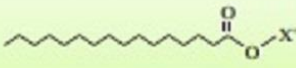

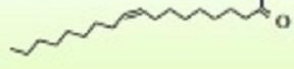
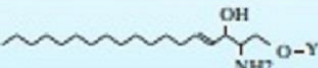
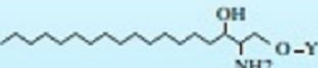
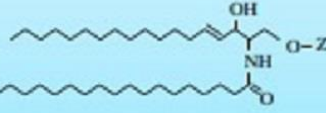
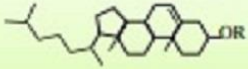
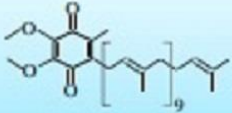


Şekil 2.9. Meme kanser tedavi yöntemleri

2.12. Lipidler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılmaları

Lipidler, eter, kloroform, metanol gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünürken suda çok az çözünebilir heterojenik yapıda bileşiklerdir. Lipidlerin temel yapısında C, H ve O atomlarında oluşan hidrokarbon yapıdaki yağ asitleri yer almaktadır. Lipidler; hücre membranında yapı taşı görevi yapması, metabolizma için gerekli enerjinin depolanması ve taşınması, pek çok canlı organizmanın dışında koruyucu madde oluşturması, hücre yüzey bileşeninde hücrelerin birbirini tanıması..vb. gibi farklı biyolojik süreçlere katılan önemli makro moleküllerdir [85].

Tablo 2.1. Temel lipid sınıfları ve yapıları [86]

Structure	Head group	Lipid
	X: Hydrogen Fatty alcohol Other modifications	FA Wax OH-FA, eicosanoids, fatty amides, fatty alcohols, endocannabinoids, waxes...
	X: Fatty acyl Monogalatosyl Digalatosyl Hydrogen	TAG MGDG DGDG DAG
	P(phosphate) P-choline P-ethanolamine P-serine P-inositol P-glycerol P-PG	PA PC PE PS PI PG CL
	Y: Hydrogen P(phosphate)	Sph S1P
	Y': Hydrogen P(phosphate)	Dihydro-Sph Dihydro-S1P
	Z: Hydrogen P(phosphate) P-ethanolamine P-choline Glucose Galactose Lactose Sulfated galactoside α Neu5Ac(2-3) β DGalp(1-4) β DGlc(1-1)	Cer Cer-1-P PE-Cer SM GluCer GalCer LacCer ST GM3
	R: Hydrogen Fatty acyl Sulfate Other modifications Other sterols	Cho CE CS Oxysterols Ergosterol, sitosterol, etc.
 Coenzymes Q10	Prenol lipids	Quinones, isoprenoids, etc.

Uluslararası Lipid Sınıflandırması ve İsimlendirilmesi LIPID MAPS sponsorluğundaki komite lipidleri sınıflandırmıştır (Fahy ve ark., 2005). Bu sınıflandırma sisteminde lipitler sekiz sınıfa ayrılmıştır (**Tablo 2.1.**). Bu sınıflar; **yağ açilleri** (yağ asitleri, FA; hidroksil-yağ asitleri, OH-FA, vb.), **gliserolipidler** (triaçilgliseritler, TAG; diaçilgliseritler, DAG; monogalaktozildiaçilgliserol, MGDG; digalaktozildiaçilgliserol, DGDG, vb.), **gliserofosfolipidler** (fosfatidik)asitler, PA; fosfatidilkolinler, PC; fosfatidiletanolaminler, PE; fosfatidilserinler, PS; fosfatidilinositoller,

PI;fosfatidilgliseroller, PG; kardiyolipinler, CL; vb.), **sfingolipidler** (sfingozinler, Sph; sfingosin-1-fosfatlar, S1P; seramidler, Cer; sfingomiyelinler, SM; gangliosid mannosid 3, GM3; vb.), **steroller** (kolesteroller, Chol; kolesteril esterleri, CE; kolesteril sülfatlar, CS; vb.), **prenol lipitleri** (izoprenoidler, kinonlar, vb.), **sakkarolipidler** ve **poliketidler** [87, 88].

2.13. Lipidomik

Lipidlerin biyokimyasal özelliklerinin büyük önem taşımasına rağmen, bu bileşik sınıfının kesin fizyolojik fonksiyonları özellikle moleküler düzeyde, tam olarak anlaşılamamıştır. Lipidlerin büyük ölçeklerde toplu olarak karakterize edilmeleri sağlık araştırmalarında yüksek öneme sahiptir. Lipidomik, lipid türlerinin tam karakterizasyonu ve gen regulasyonunu da içeren lipid metabolizma ve fonksiyonlarına katılan protein ekspresyonlarıyla ilgili biyolojik rollerini kapsayan bir bilim alanı olarak kabul edilmektedir [89]. Diğer bir deyişle lipidomik, biyolojik sistemlerdeki lipidleri ve bu lipidlerin miktarlarını belirlemeyi hedefleyen bir alandır [90]. Elde edilen veriler, hücreSEL fizyolojideki lipid metabolik ağlarının etkileşimli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir [91, 92]. Metabolomiksin bir dalı olan lipidomik alanındaki ilk çalışmalar Han ve Gross tarafından yapılmıştır [93, 94]. Daha sonra, farklı fizyolojik ve patolojik durumlar için lipidlerin büyük miktarlarda karakterizasyonu ve nicel miktarlarının belirlenmesi çalışmaları hız kazanmış olup, lipid biyolojisiyle ilgili olarak günümüzdeki bilgilerde ilerlemeye büyük katkı sağlamıştır [95-103].

Kütle spektrometrik tekniklerindeki yıllardır süre gelen gelişmeler, analitik kimya alanına önemli fayda sağlamış olmakla birlikte lipidomik alanında hızlı ilerleme ve gelişmeye de katkı sağlamıştır. Farklı lipidlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla kütle spektrometreleri doğrudan (shotgun lipidomik), veya sıvı-kütle spektrometresi (LC / MS) ve gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC / MS) gibi farklı kromatografik sistemlerle birleştirilerek başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. MS-tabanlı lipidomik yaklaşımların geliştirilmesi için araştırma amaçlarına bağlı olarak hedeflenmemiş ve

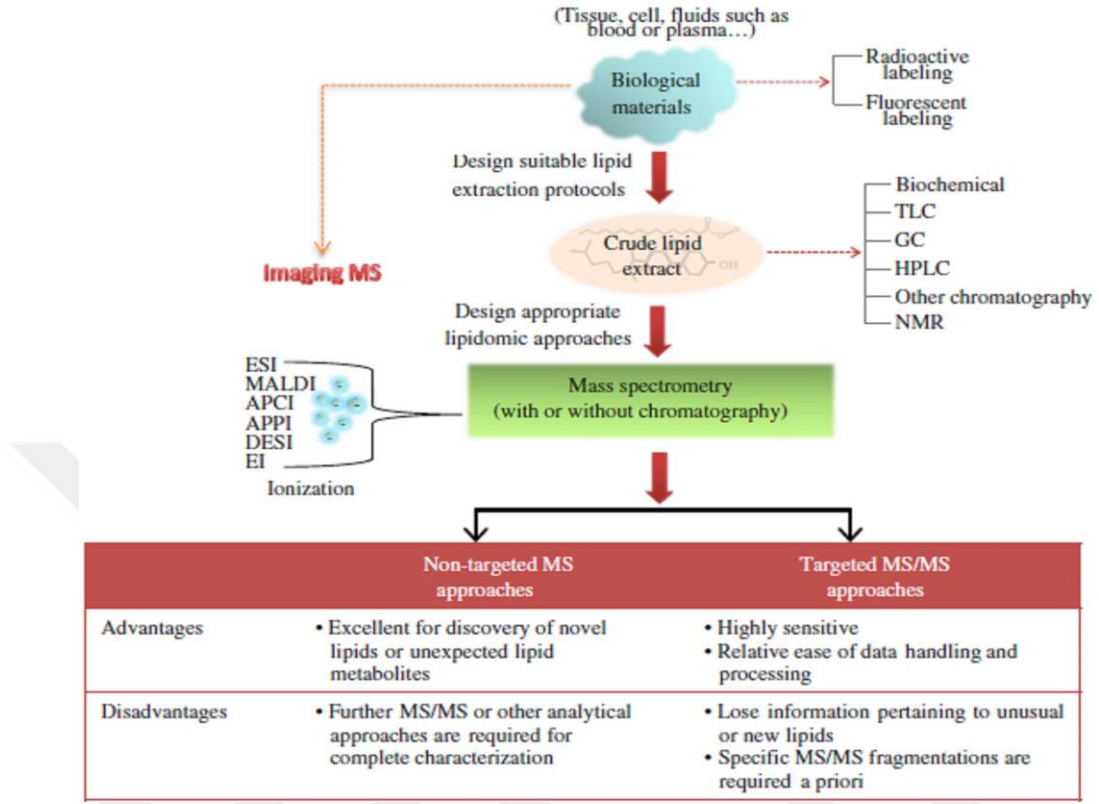
hedeflenmiş lipidomik olmak üzere iki farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Hedeflenmemiş lipidomik yaklaşım, hücre, doku veya diğer vücut sıvılarında bulunan tüm lipidlerin detaylı bir şekilde elde edilmesine, hedeflenmiş lipidomik yaklaşım ise ilgilenilen spesifik lipid türünün karakterizasyonu ve miktar tayinine odaklanılmıştır. Bu nedenle, söz konusu lipidlerin genel olarak gözden geçirilmesi gerektiğinde, örneğin belirli bir organizma için lipidom envanterinin oluşturulması gibi durumlarda hedeflenmemiş lipidomik yöntem yararlı olurken, hedeflenmiş lipidomik biyolojik soruların ele alınmasında daha uygulanabilir olmaktadır. MS teknolojilerindeki hızlı ilerlemenin yanı sıra, biyoinformatik alanındaki gelişmeler de hem hedeflenmemiş hem de hedeflenmiş lipidomik alanlarındaki ilerlemelere önemli katkılar sağlamaktadır [104].

Lipidler arasındaki büyük yapısal çeşitlilikler, çözünürlük ve polarite gibi fiziksel özelliklerin geniş bir aralığa dağılmasına yol açmakta ve bu da biyolojik numunelerde tam bir lipidom elde ederken araştırmacılar için büyük zorluk oluşturmaktadır. Bu nedenle, çeşitli biyolojik sistemlerdeki lipidomların tam karakterizasyonu için daha spesifik, hassas ve kapsamlı analitik/biyokimyasal yaklaşımların geliştirilmesine olan ihtiyaç devam etmektedir.

2.14. Lipidomik Analizler İçin Analitik Yaklaşımlar

Lipitlerin yapısal çeşitliliği, detaylı lipidom analizleri için ciddi zorluklar oluşturmaktadır. Örneğin, çoğu biyolojik numunedeki tüm lipit sınıflarının ekstraksiyonu, kromatografisi ve tayini için tek bir yöntem kullanarak veri toplamak neredeyse imkansızdır. Yeni analitik araçlardaki gelişmeler, çok düşük orandaki belirli lipidlerdeki değişiklikleri takip etme ve lipidomların önemli böümlerinin anlık nicel miktarlarının alınmasına olanak sağlamıştır [86]. Lipit analizi için mevcut analitik stratejilerin çoğu lipit ekstraksiyonu ile başlamakla birlikte radyoaktif türler (örn., ³H, ¹⁴C, başgrup, karbon kaynakları veya yağ asitleri gibi ³²P-etiketli öncüler dahil) ve floresan öncüler (örneğin, 7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol veya NBD) kullanılarak dokulardaki ve

hücrelerdeki lipitleri doğrudan belirlemeyi mümkün kılan yaklaşımlar da bulunmaktadır (Şekil 2.10.) [86].



Şekil 2.10. Biyolojik lipidomların kütle spektrometrik analizinin tipik iş akışı TLC, ince tabaka kromatografisi; GC, gaz kromatografisi; HPLC, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi; NMR, nükleer manyetik rezonans; ESI, elektrosprey iyonizasyonu; MALDI, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu; APCI, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon; APPI, atmosferik basınç fotoiyonizasyonu; DESI, desorpsiyon elektrosprey iyonizasyonu; EI, elektron iyonizasyonu; MS, kütle spektrometrisi [86]

Tipik bir lipidomik çalışma iş akışı Şekil 2.10.'da gösterilmiştir [86]. Kısaca, doku, hücre veya sıvı örneği gibi biyolojik örneklerden lipid izolasyonu, ilgilenilen belirli lipid türleri için optimize edilmiş bir ekstraksiyon işlemi kullanılarak yapılmaktadır. Elde edilen lipid ekstraktı daha sonra ya doğrudan infüzyon yoluya ya da öncesinde kromatografik ayırma yapılarak MS analizine gönderilmektedir. Veriler, farklı örneklerden tam tarama modunda (hedeflenmemiş lipidomik) alınabildiği gibi spesifik polar baş gruplar ve yağ açıl parçalarının yapısına bağlı olarak kimyasal yapıları açısından benzer olan lipid türlerinin nicel tayini için daha uygun olan ve tandem kütle

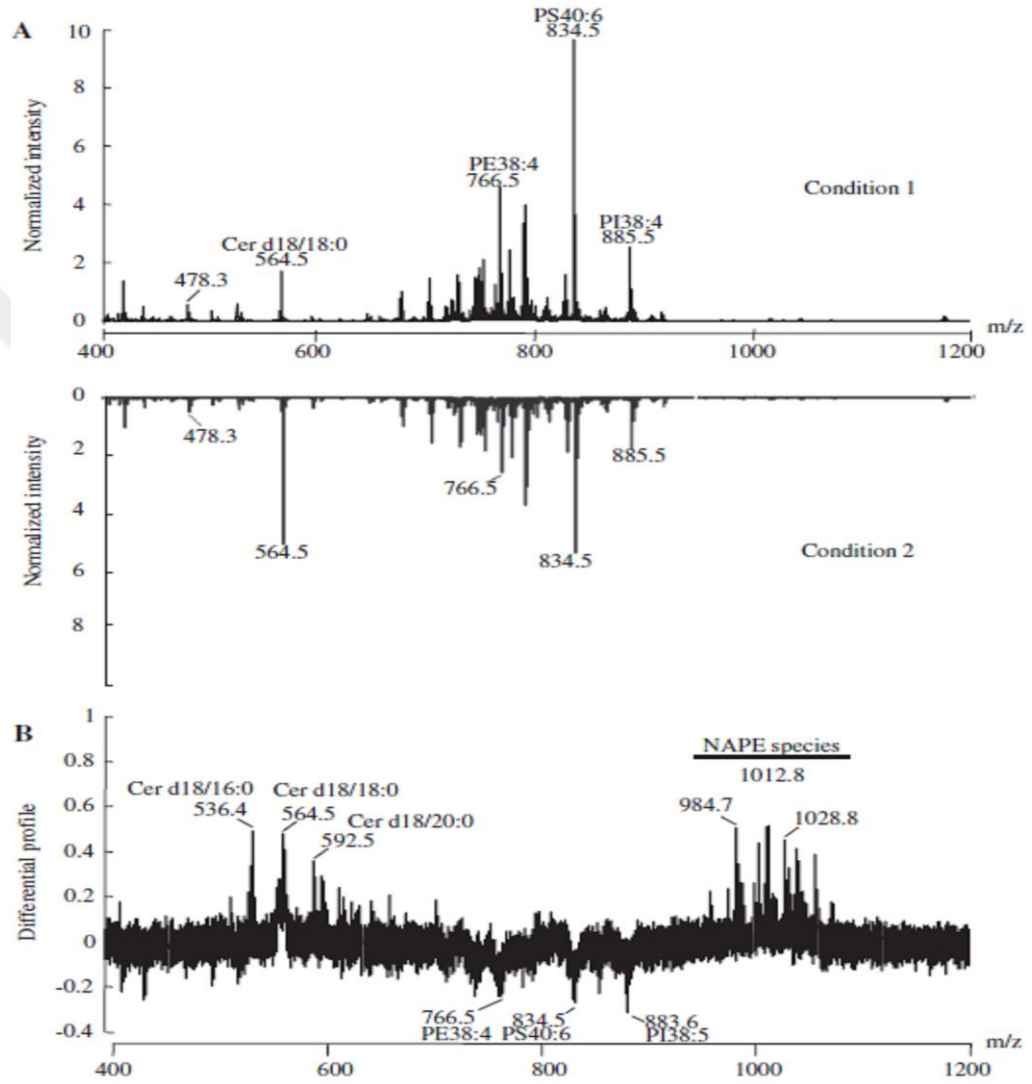
spektrometresine dayanan hedeflenmiş lipidomik yaklaşım kullanılarak elde edilebilmektedir. Bu nedenle, mevcut lipidomik stratejiler, toplanan MS verilerinin niteliğine göre hedeflenmemiş ve hedeflenmiş lipidomik yaklaşımlar olmak üzere iki temel kategoriye ayrılmaktadır.

2.14.1. Hedeflenmemiş Lipidomik Yaklaşımlar

Hedeflenmemiş lipidomik yaklaşımlarda, lipidom olabildiğince geniş bir şekilde ele alınmaktadır. Hedeflenmemiş yaklaşımlar, yeni lipitleri veya beklenmedik lipid metabolitlerini keşfetmede önemli araçlar olmalarına rağmen çok fazla sayıda lipid türü içermeleri nedeniyle, yöntem tasarımı ve veri analizi genellikle hedefli lipidomik yaklaşımlardan daha zordur. Hedeflenmemiş lipidomik yöntemde, biyolojik numunelerden elde edilen lipit ekstraktlarının tam tarama MS profil verileri kaydedilmekte ve doğrudan biyolojik bozulma veya uyarılma sonucunda lipid profillerindeki değişimin veya anormal lipid metabolitlerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu veriler ayrıca, hastalardan ve kontrollerden alınan sıvı örneklerin karşılaştırılarak, hastaların lipid profillerindeki değişimler içerisinde, biyolojik olarak önemli sapmaları belirlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Özellikle elektrosprey iyonizasyonu (ESI), gibi yumuşak iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi, iyonizasyon işleminde kullanılan düşük enerji sayesinde fosfolipitlerin, sfingolipitlerin ve gliserolipitlerin bozulmamış formlarında etkin bir şekilde analiz edilmesini sağlamıştır. Hedeflenmemiş lipidomik yaklaşımların birincil amacı, mevcut analitik işlem ile örnekte doğal olarak bulunan tüm lipit türlerine minimum modifikasyonlarla tam lipit dizisinin kapsamlı profilini ortaya çıkarmaktır. Bu nedenle ESI/MS, hücreli lipitlerin hedeflenmemiş profillenmesi için önemli ve yaygın olarak kullanılan bir iyonizasyon tekniği olarak ortaya çıkmıştır.

Başka bir deyişle, kütle spektrometrik teknolojilerindeki sürekli yenilikler, MS çözünürlüğünde etkili bir artış sağlamış ve buda, tek bir MS profilinde laboratuvar veri işleme süreci gerektiren çok fazla miktarda spektrometrik veri ortaya çıkarmıştır. Bu önemli sınırlama, yüksek verimli küresel analiz için daha verimli lipidomik stratejilerin oluşturulmasını büyük ölçüde engellemiştir. Spektrometrik teknolojilerin gelişmesine ayak uydurabilmek için, büyük

miktarda ham kütle spektral verileri işleyebilecek ve anlamlı bilgilere dönüştürebilecek daha etkili hesaplama araçlarına ihtiyaç duyulmuştur. Bununla birlikte, kemometrik metodlardaki yeniliklerin lipidomik alandaki çalışmalarla zamansal entegrasyonu sayesinde bu büyük sorun aşularak hedefsiz lipidomik alanında benzersiz bir ivme yakalanmıştır [86].



Şekil 2.11. Hedeflenmemiş yaklaşım kullanan karşılaştırmalı lipidomik örneği [98]

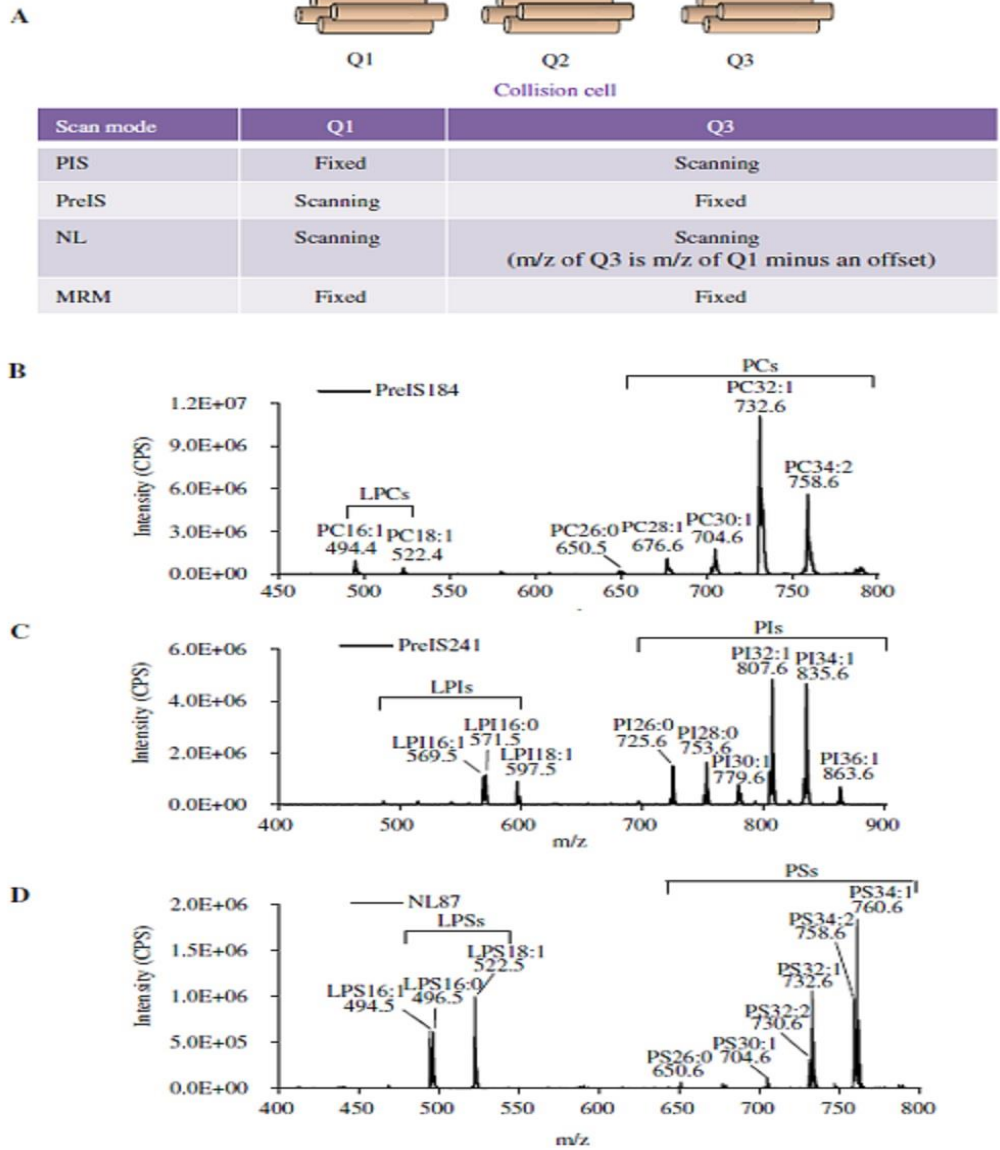
Kainit enjekte edilen sıçanların hipokampus dokularından elde edilen lipid ekstraktlarının kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometresi (QTOF-MS) ile analizi sonucunda bazı lipid türlerinde kontrole göre değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 2.11.A.). Sonuçlar hem majör hemde minör lipid türlerinde artış ve azalışlara işaret etmektedir. Şekil 2.11.B.'de görüldüğü gibi, m/z 536.4, 564.5

ve 592.5 değerlerine sahip olan ve sırasıyla seramid d18/16:0, d18/18:0 ve d18/20'ye karşılık gelen iyon seviyelerinde artışlar gözlenmiştir. Fosfolipit sınıfına ait olan ve m/z 742.5, 834.5 ve 883.6 olan iyonların sinyallerinde azalma gözlenmiştir. N-açıl fosfatidiletanolamin (NAPE) türleri olarak da karakterize edilen ve minör lipit türlerini temsil eden m/z 1004, 1028 ve 1056'daki sinyal seviyelerinde de artış gözlenmiştir [198].

2.14.2. Hedeflenmiş Lipidomik Yaklaşımlar

Hedeflenmiş lipidomik yaklaşımlar ise esas olarak spesifik lipid türlerine odaklanmaktadır. Bu nedenle hedeflenmiş yaklaşımlar genellikle daha spesifik, çok hassastır ve veri işleme açısından göreceli olarak daha kolaydır. Ancak bu yaklaşımlarda yeni lipit türlerine ilişkin bilgi kaybı kaçınılmazdır. Hedeflenmemiş lipidomik çalışmalarda ilgilenilen piklerin, çoğu durumda tandem kütle spektrometresi (MS/MS) kullanılarak daha fazla doğrulanması gerekmektedir. Bunlardan birisi seçilen bir öncü iyondan ayrılan iyon kütlelerinin kaydedildiği ürün iyon taraması (PIS) yöntemidir. Bu yöntem önceden bilinmeyen lipitlerin açık ve kesin olarak tanımlanması için vazgeçilmezdir (**Şekil 2.12.A.**). Çeşitli tandem MS/ MS analizlerinin kurulması ve geliştirilmesi, esasen her biri fosfolipidler ve sfingolipidleri içeren belirli lipitlerin analizine ve tespitine uyarlanan çeşitli sayıda tarama modu elde etmek için üçlü (QQQ) veya dördü (QTOF) kütle analizörlerinin farklı kombinasyonlarının kullanılmasına dayanmaktadır.

Yapısal bilgi taşıyan ve benzersiz iyon çiftlerin izlenmesine izin veren bu MS/MS tekniklerinin anlaşılması, kompleks numunelerin hedeflenmiş lipidomik analizi için; öncü iyon taraması (PreIS), nötral kayıp (NL) taraması ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) taraması gibi çeşitli nicel lipidomik yaklaşımların geliştirilmesini teşvik etmiştir [86, 99-103]. PreIS modunda, ürün iyonu ikinci kütle analizöründe seçilmekte ve öncü kütleler birinci kütle analizöründe taranmaktadır (**Şekil 2.12.A.**). Aynı lipit sınıfındaki üyeler için benzersiz kimyasal yapılar ve spesifik fragmentasyon modelleri PreIS'i, incelenen belirli lipit sınıfına özgü spesifik bir ilişkili iyonu kullanarak aynı lipit sınıfına ait farklı lipit türlerini tanımlamak ve ölçmek için güçlü bir teknik haline getirmiştir.



Şekil 2.12. Hücresel lipitlerin tandem kütle B: Ham bir lipit mayası ekstraktından 184'ün PreIS taraması. C: Mayaların ham bir lipit ekstraktından 241'in PreIS taraması. D: Ham bir lipit mayası ekstraktından 87'nin NL taraması [86]

Örneğin, m/z 184'teki (fosforil kolin) ilişkili iyonlar için öncü iyon taraması PC'nin saptanmasına izin verirken (**Şekil 2.12.B.**), m/z 241'deki (fosforil inositol H_2O) ilişkili iyonlar için PreIS, özellikle *Saccharomyces cerevisiae* mayasında PI türlerine işaret etmektedir (**Şekil 2.12.C.**) [105-107]. PC ve SM'nin lipit sınıfındaki üyeler, negatif ESI modunda PreIS olarak sırasıyla 168 (fosforil kolin- CH_3) ve 224 (gliserol fosforil kolin- H_2O-CH_3) kullanılarak da tespit edilebilmektedirler [108].

PreIS ayrıca diğler fosfolipid ve sfingolipid sınıflarının doğrudan miktarının ölçümü için de kullanılabilir. Örneğin, PreIS iyonu için, m/z 196 (gliserol fosforil etanolamin-H₂O) veya 140 (fosforil etanolamin-H₂O) 'da ilişkili iyonlar PE'nin saptanması için spesifiktir [86]. PreIS genellikle lipit türlerinin kalitatif tanımlanması açısından yüksek özgüllük sunan bir strateji olsa da dikkat edilmesi gereken noktalar bulunmaktadır. Örneğin; PG, CL ve lizosifosfatidik asid (LBPA) gibi lipit sınıflarının analizi için PreIS iyonu olarak m/z 153 (fosforil gliserol-H₂O) iyonu kullanılırsa, bu iyon tüm fosfolipidlerin parçalanması sırasında oluşturulduğundan dolayı bu iyon taraması bu sınıflara özgü olmayacaktır [86]. Bununla birlikte, çoklu PreIS, ilgilenilen lipit (ler) için daha spesifik ilişkili iyonlarının seçimi, nötral kayıp taraması veya MS tespitinin analitlerin ön-uç kromatografik ayrılması ile birleştirilmesi gibi diğler stratejiler, tespit doğruluğunu daha da güçlendirmek için kullanılabilir [86].

NL taramasında, hem ilk kütle analizörü hem de ikinci kütle analizörü tüm kütleleri taramakta ancak ikinci kütle analizörü birinciden farklı bir ayar da çalışmaktadır. Spesifik ayarlar, ilgili özel bileşik sınıfı için yaygın ve tam olarak gözlenen nötral bir kayıpa karşılık gelmektedir. Örneğin, negatif modda 87 amu (serin-H₂O) değeri uygulandığında, *S. cerevisiae*'nin ham lipit ekstraktından sadece PS türleri spesifik olarak tespit edilmiştir (**Şekil 2.12.D.**) [108]. MRM modunda, her iki kütle analizörü de seçilen bir kütleye ayarlanır. Bu mod taban gürültüsünü azaltmakta ve bu nedenle algılama hassasiyetini önemli ölçüde arttırmaktadır (**Şekil 2.12.A.**). PreIS ve NL taramaları çeşitli lipidomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılsa da, doğrudan nicelik için MRM yaklaşımlarının kullanımı da son yıllarda giderek daha fazla ilgi görmektedir [86]. Prensipte olarak, hem PreIS hem de NL taramalarından elde edilen bilgiler, karşılık gelen lipitlerin MRM analizlerine doğrudan uygulanabilir. Bununla birlikte, matris lipit kimyası bilgisinin belirsiz olduğu durumlarda, yanlış sonuçlara neden olabilecek spesifik olmayan MRM geçişlerinden kaçınmak için çok dikkatli olunmalıdır.

MS/MS tabanlı hedefli yaklaşımlara ek olarak, seçilmiş iyon izleme (SIM) gibi tek-aşamalı hedefli MS'de, gliserofosfolipidler (PL_s), sfingolipidler (SPL_s),

munlar, steroller (ST) ve mono-, di- ve tri açilgliseridleri (MAG, DAG, TAG) içeren major hücrese lipit türlerinin eşzamanlı olarak profillenmelerinde başarıyla uygulanmıştır [109]. Bu yaklaşım, *Schizosaccharomyces pombe* hücrese lipidomun dinamik değişimini araştırmak için kullanılmıştır. Lipidomik analiz sonuçları erken durağan fazda DAG birikiminin esas olarak *DplhDdga* double knock-out (DKO) hücrelerinin sabit faza girdikten sonra programlanmış hücre ölümünden sorumlu olduğunu göstermiştir. SIM, diğer organizmalarda çeşitli lipit türlerinin miktarının belirlenmesi için de kullanılmıştır [102, 109-110].

2.15. Biyomedikal Araştırmalar İçin Anahtar Bir Araç Olarak Lipidomik

Lipid homeostazı sağlığın korunması için temel etkenlerden birisidir. Düzensiz lipit metabolizmasının nörodejeneratif hastalıklar, metabolik sendrom (diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar), kanser ve bulaşıcı hastalıklar gibi birçok insan hastalığında önemli bir etkiye sahip olduğu giderek daha da iyi anlaşılmaktadır. Teknolojik gelişmeler, özellikle LC ve MS'de, farklı kimyasal bileşimlere sahip ve kompleks karışımlarda lipitlerin hassas ve oldukça seçici analizine imkan sağlamaktadır. MS teknolojilerindeki ilerlemeler, farklı fizyolojik koşullar altında ve çeşitli hastalıklarda lipitleri ve etkileştiği türlerin sistem-düzeyinde ölçeklendirilmeleri ve anlaşılması için lipidomik alanda yeni bir ufuk açmıştır. Çeşitli fizyolojik olarak bağlantılı durumlarda hem hedeflenmemiş hem de hedeflenmiş lipit profillerinin karşılaştırmalı analizi, lipit hücre biyolojisi çalışmaları ve hastalıklar için yeni ilaç ve biyobelirteçlerin keşfedilmesinde özellikle etkilidir. Bu tür karşılaştırmalı lipidomik yaklaşımlar, farklı patolojik koşullarda spesifik olarak değişen ve önemli biyolojik fonksiyonları kontrol eden kritik lipit metabolitleri ile ilgili lipit-bağılantılı yolların belirlenmesini veya çeşitli hastalıklarda lipogenomik biyobelirteçlerin elde edilmesini sağlayabilecektir. Bu lipogenomik biyobelirteçler, model organizmaları kullanıldığı prelinik çalışmaların yanısıra insanlarda da klinik olarak daha iyi tanı elde edilmesi için yeni bir yol sunmaktadır. Lipidomik yaklaşım, metabolik sendrom (diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar), enfeksiyon hastalıkları ve kanser gibi insan hastalıklarında anormal lipit metabolitlerinin ve biyobelirteçlerin aydınlatılması

çalışmalarının yanısıra, biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan model organizmalar için lipit kütüphanelerinin oluşturulması çalışmalarında da kullanılmaktadır.

2.16. Kütle-Spektrometre Temelli Lipidomik Biyobelirteç Geliştirilmesi

Lipidlerin çok farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri onların özellikle kompleks karışımlardan analizlerini zorlaştırmaktadır. Günümüzde, tek bir deneyde bir hücrenin tüm lipidomunu ortaya koymak için tek bir analitik yöntem bulunmamaktadır. Bununla birlikte, lipidlerin geniş spektrumlu analizleri için birçok yeni analitik teknik geliştirilmektedir. Biyolojik bir kompleks karışımdan birçok lipit türünün eşzamanlı ölçümü elektrosprey iyonizasyonunun (ESI) geliştirilmesi ile mümkün hale gelmiştir. ESI yöntemleri özellikle gliserofosfolipidler ve sfingolipidler gibi polar lipitlerin analizi için tercih edilen bir yöntemdir [111]. ESI-MS ayrıca trigliseritler ve steroller gibi polar olmayan lipitlere de uygulanabilmektedir [111]. Sıvı kromatografi ile önceden ayırma, MS'nin analitik gücünü daha da güçlendirmekte ve iyonizasyonun baskılanması veya pik örtüşmesi gibi yaygın zorlukların giderilmesine katkıda bulunmaktadır. Çoğu yöntemde C₁₈ veya C₈ ters faz sistemleri kullanılmaktadır [111]. Başlıca avantajları duyarlılık, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve uygulanabilirlik olan ESI tabanlı MS yöntemleri son zamanlarda biyobelirteç gelişimi için kullanılmaktadır.

Klinik olarak mevcut belirteçlerin çoğu, kanserin geç evrelerinde tespit edilmekte olup bu durum kullanılmalarını sınırlandırmaktadır. Genel olarak, vakalar erken evrelerde tespit edilirse 5 yıllık sağkalım oranları % 90'ın üzerinde iken geç evrelerde tespit edildiğinde bu oran <%50 olarak bildirilmiştir. Bu nedenle, kanserlerin erken evrede tespiti için için daha iyi teşhis araçlarına ihtiyaç vardır.

Kansere özgü tek bir belirtecin kullanılması yararlı olmamıştır. Tek klinik belirteçlerin çoğu düşük doğruluktadır [111]. Örneğin, prostat kanseri taramasında en yaygın kullanılan prostat spesifik antijen (PSA) testi %35 özgüllüğe ve %65 duyarlılığa sahiptir. Meme kanseri tanısı için yararlanılan CA15.3 markeri %23 duyarlılık ve %69 özgüllük göstermektedir. Benzer

şekilde, yumurtalık tümörünün ilerlemesini izlemek için bir serum biyobelirteç olarak kullanılan CA125, %35 duyarlılık ve %98 özgüllük göstermektedir. Transvajinal ultrason ile birlikte CA125'in izlenmesi, duyarlılığı %70'e kadar çıkarmaktadır. Bu bulgular, birden fazla teşhis aracı kombinasyonunun tahmin doğruluğunu arttırdığını göstermektedir. Bu nedenle, çok-parametrelili belirteçler daha yüksek doğruluk derecelerine sahip gelecekteki teşhis araçları için çok yararlı olacaklardır.

Yeni belirteç geliştirme çalışmaları çeşitli çalışma popülasyonları üzerine ve genellikle vaka-kontrol veya uzatılmış çalışmalar olmak üzere iki farklı şekilde yapılmaktadır [111]. Vaka-kontrol çalışmasında, bir tümör gelişmiş olan hastalar ile şüpheli etiyolojik faktörlere geçmiş maruziyetleri tanımlanmış olan ve hastalığı olmayan kontroller ile karşılaştırılmıştır (**Şekil 2.13.a.**). Vaka ve kontrol grupları örnek toplama, saklama süresi, yaşı ve diğer epidemiyolojik bilgileri açısından, özellikle kontroller başka tipte tümörlere veya aile öyküsüne sahipse, eşleştirilmelidir. Hastalıklı durumu, tümör biyopsilerinin patolojik değerlendirilmesi ve görüntüleme teknikleri gibi diğer yöntemlerle açıkça belirlenmelidir.

Uzun çalışmalar, aynı bireylerin belirli bir süre izlenmelerini içermektedir. Örneğin, kandaki lipit profilleri, ilacın veya tedavi uygulamasından sonraki bir süre boyunca iyileşmenin izlenmesi için belirlenebilmektedir. Uzun çalışmalar ayrıca, belirli hastalıkların öncül habercilerini belirlemek için de kullanılmaktadır. Bu tür çalışmalarda spesifik bir hastalığın başlangıcını görmek için belirli bir süre boyunca büyük bir nüfus topluluğu izlenmektedir. Bu çalışmalarda vakalarla ilgili olarak, belirli bir süre boyunca izlem yapıldığından, erken belirteçler hastalık teorisinden önce bile görülebilmekte ve bir prognostik biyobelirteç oluşturmaya yardımcı olmaktadır.

Kan, idrar ve tükürük gibi biyolojik sıvılar kolayca bulunabilmektedir. Kan, plazma veya serumlar proteinler ve metabolitlerce zengin kaynaklar oldukları için klinik teşhislerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (**Şekil 2.13.b.**). Ekstraksiyon protokollerinin tekrarlanabilirlikleri yüksek ve kantitatif açıdan mümkün olduğunca çok sayıda lipit sınıfını içermelidir (**Şekil 2.13.c.**).

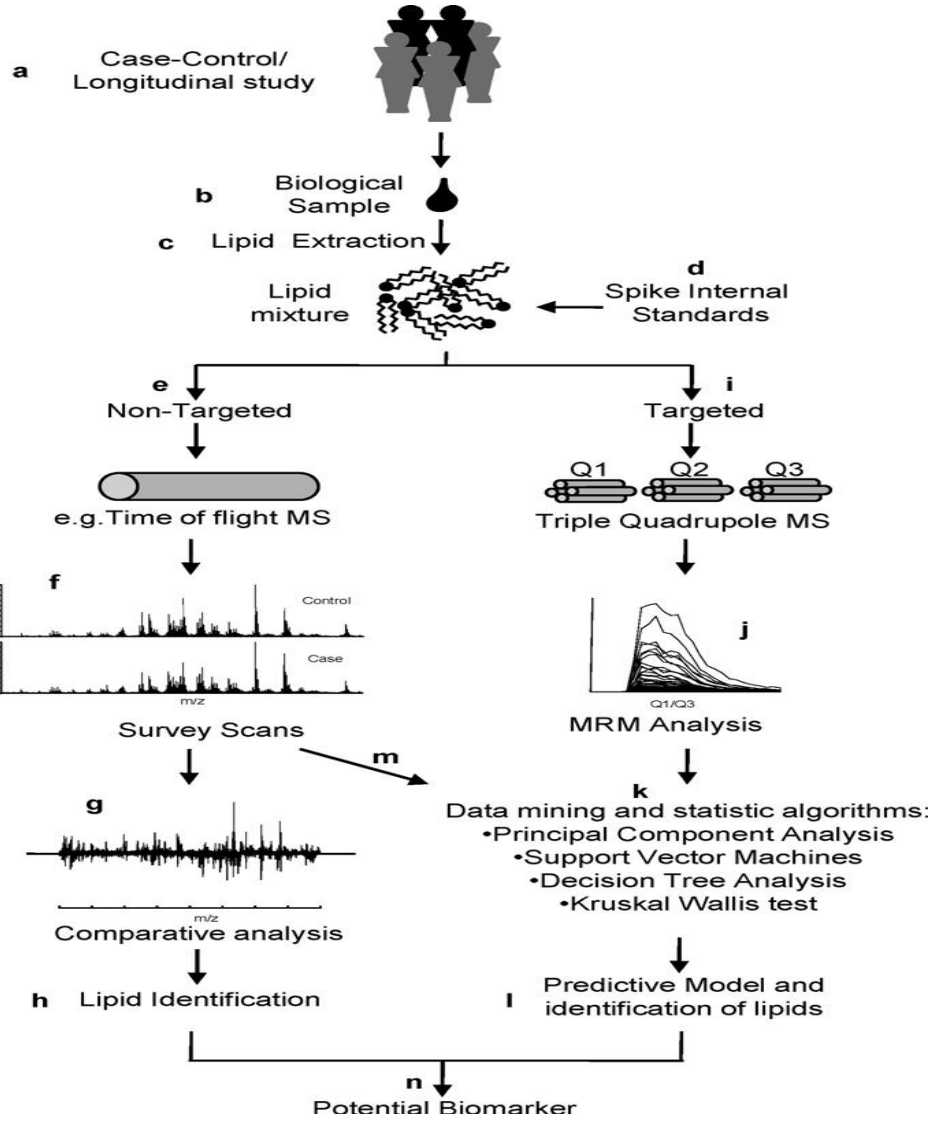
Bununla birlikte lipidlerin çok farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle, ekstraksiyon protokollerinin ilgilenilen lipid sınıfları için optimize edilmeleri gerekmektedir. Geri kazanım oranlarını belirlemek ve kesin miktar tayini yapabilmek için ekstraksiyon örneklerine iç standartlar eklenmesi gerekmektedir (**Şekil 2.13.d.**) [112].

Karışıma daha sonra, "hedeflenmemiş" yaklaşımlar kullanılarak evrensel lipid profili oluşturmak için veya seçilen lipid türlerinin nicel miktarlarının tayinini yapmak üzere işlemler yapılmaktadır. İyonizasyon için, elektrosprey ve daha az bir ölçüde MALDI tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır. 'Hedeflenmemiş' yaklaşımlar genellikle, kontrollere ait lipid profillerinin hastaların lipid profilleri ile karşılaştırılarak lipid türlerinin seviyelerindeki değişiklikleri ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (**Şekil 2.13.f.**) (**Şekil 2.13.g.**) [113]. İlgilenilen herhangi bir türdeki değişiklik daha sonra ürün iyonu analizi ile tanımlanmaktadır (**Şekil 2.13.h.**). Bu yaklaşım, meme kanseri için biyobelirteçlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [114].

Kütle spektrometrisi kullanan hedefli yaklaşımlar, biyobelirteç geliştirmede giderek daha fazla ilgi görmektedir (**Şekil 2.13.i.**). Özellikle göze çarpan bir örnek çoklu reaksiyon izlemidir, MRM. (**Şekil 2.13.j.**). MRM oldukça seçici ve duyarlıdır. Belirli lipid türleri ilk olarak tutulma sürelerine (LC'nin MS analizinden önce kullanılması durumunda) göre belirlenmekte ve daha sonra spesifik bir parçalanma iyonu ile karakterize edilmektedir (ikinci kütle analizöründe, Q2). Bu nedenle, tandem kütle spektrometrisine (MS/MS) dayanan bir yaklaşımdır. Öncü ve ürün iyonlarının m/z değerleri, analitik koşullara (örneğin iyonizasyon, çarpışma kaynaklı ayrışma (CID)) göre optimize edilmesi gereken bir MRM çifti oluşturmaktadır.

Ayrıca, MRM'nin başarılı olması için öncü/ürün iyon çiftlerinin spesifik olması gerektiği unutulmamalıdır. Seçilen izleme yöntemi hassasiyeti de büyük ölçüde arttırmaktadır. MRM, bu nedenle, karmaşık karışımda ilgilenilen ve yüksek hassasiyetin gerekli olduğu lipidlerin hedefli tespiti için yararlıdır. İç standartların eklenmesi molar miktarların ölçülmesine yardımcı olmaktadır. Aynı kimyasal yapının kararlı izotopları (örn. Döteryum etiketli sentetik

standartlar) her zaman bulunmayan ideal bir çözümdür. Ancak, düşük bolluğa sahip yağ açilleri endojen bol miktarda taşıyan lipitler (örn. kısa veya tek zincirler) diğer alternatiflerdir. Onkolojide biyobelirteç gelişimi ile bağlantılı olarak lipit (örn. LPA'lar, fosfatidik asitler, fosfatidilkolinler ve sfingolipidler) miktarlarının belirlenmesinde MRM'ye dayanan bir dizi çalışma bulunmaktadır [111].



Şekil 2.13. Lipid temelli bir biyobelirteç geliştirilmesi için akış şeması [111]

Lipidomik uygulamalar için analitik teknolojilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Ancak verilerin analizine yönelik çalışmalara nispeten daha az önem verilmiştir. Diferansiyel profiller için veri işleme süreçleri genellikle girdi dosyasının işlenmesi, spektral filtreleme, pik

algılama, kromatografik hizalama, normalizyon, görselleştirme ve veri dışı aktarma dahil olmak üzere birkaç aşamada ilerlemektedir. Lipidomik verilerin tanımlanmasına yardımcı olacak kütüphaneler sınırlı olmakla birlikte, günümüzde gittikçe daha yaygın hale gelmektedir (örneğin, LIPID MAPS, Lipid kütüphanesi, Siber Lipid Merkezi, Lipid Bankası, LIPIDAT ve Avrupa Lipidomisi Girişimi).

Veri işleme süreçleri, lipit metabolitleri ve fizyolojik bir fenotip ile ilişkili lipit türleri arasındaki korelasyonların tanımlanmasına yardımcı olan çok değişkenli istatistik alan analizi (örneğin, ana bileşen analizi, diskriminant analizi) içermektedir. İkincisi, lipit bazlı biyobelirteçlerin gelişimi ile özellikle ilgilidir (**Şekil 2.13.k.**). Aynı sınıf içindeki lipitler benzer enzimler tarafından düzenlenebileceğinden, yüksek sınıf-içi-ortak düzenlemeler beklenebilir. Korelasyon ağı analizinin metabolomik verilerin araştırılması ve görselleştirilmesi için değerli bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Denetimli öğrenme algoritmaları gibi diğer yaklaşımlar ise, ham verileri lipit profillerine ve vaka/kontrol koşullarına dayalı kategorilere dönüştürmek için kullanılmaktadır (**Şekil 2.13.l.**). Metin madenciliği ve ontolojiler gibi yapay zeka tekniklerini içeren diğer bilgi keşif sistemleri geliştirilmektedir [127]. Bu tür yaklaşımlar henüz bilinmeyen lipid-protein ve lipit-hastalık etkileşimlerinin belirlenmesine yardımcı olacaklardır.

2.17. İnsan Hastalıklarında Lipidomik Uygulamalar

Gelişen bilgiler göstermektedirki kanser ve farklı insan hastalıkları lipid oranlarındaki değişimle güçlü bir korelasyon göstermektedir. Lipidler farklı kanserlerde, erken karsinogenezis ve kanser ilerlemesiyle de ilişkilendirilmiştir. Prostat kanseri, insan epidermal büyüme faktör reseptör-2 pozitif metastatik meme kanseri, kolorektal kanserleri, alzheimer, şizofreni ve bipolar hastalıklar, multiple skleroz, böbrek rahatsızlığı, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibrozis gibi hastalıkların lipid oranlarındaki değişimle güçlü bir korelasyon gösterdikleri saptanmıştır [89, 116, 117-131]. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla, farklı hastalıklar için farklı lipid türlerindeki

değişimlerin o hastalık için biyomarkır olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

2.17.1. Metabolik Sendrom

Dünyada her beş kişiden birinin metabolik sendromdan (diyabet, kardiyovasküler hastalıklar) etkilendiği tahmin edilmektedir [86]. Artan metabolik sendromlu insan sayısı, yetişkinler arasında obezite oranlarındaki artışla ilişkilendirilmiştir [85]. Hiperlipidemi gibi anormal lipit metabolizmaları, metabolik sendromun ortaya çıkmasında iyi bilinen kritik bir faktördür. Ancak, değişmiş lipit profillerinin potansiyel olarak hastalığın başlamasına nasıl yol açabileceğine dair ayrıntılı mekanik çalışmalar büyük ölçüde dikkate alınmamıştır [86]. Bununla birlikte, serum trigliseritlerinin ve kolesterol düzeylerinin yükselmesinin hücrel lipit metabolizmasında değişime neden olarak hücre içi lipit birikimine yol açacağı ve sonuç olarak diğer organ fonksiyonlarını tehlikeye atacağı gösterilmiştir [132]. Diyabetik plazmanın diğer polar lipit moleküler türlerine ilişkin bilgiler eksiktir ve kapsamlı enstrümantal analiz gerekmektedir. Son zamanlarda insülin direnci ve/veya diyabet ilerlemesinin potansiyel nedenleri olarak çok sayıda mekanizma önerilmiş ve bozulmuş mitokondriyal fonksiyon, diyabetin ilerlemesinde muhtemelen patojenik bir rol oynayabilecek umut verici bir aday olarak ortaya çıkmıştır [86]. Mitokondriyal açıl-CoA açıltransferazın 1 geninin karakterizasyonu (*ACAT1*), mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun düzenlenmesinde ve ayrıca farelerde diyabet kaynaklı obeziteye yatkınlığın yönetilmesinde kardiyolipin türlerine bağlı yağ açıl bileşimlerinin önemini göstermiştir [86]. Diyabetin ilerlemesi sırasında lipotoksisite ve mitokondriyal bozukluk arasındaki ilişkinin anlaşılması için daha fazla lipidomik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmalar, prediyabet biyobelirteçlerin keşfedilmesi ve bu hastalıkların başlangıcını önlemek veya geciktirmek için etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesinde önemli olacaktır. Yapılan bazı çalışmalar, sfingolipid sentezi inhibisyonunun, kültürlenmiş hücrelerde ve kemirgen modellerinde insülin duyarlılığını arttırdığını göstermektedir [86]. GM3 sentaz (GMS) içermeyen farelerde yüksek insülin duyarlılığı bulunmaktadır [86]. “Membran mikroçevre orto-sinyal terapisi” metabolik bozuklukların tedavisi

için yeni bir terapötik yaklaşımdır. Bu yaklaşım; gangliozidlerin anormal ekspresyonu nedeniyle membran mikroçevre bozukluklarının bir sonucu olarak metabolik bozuklukların ortaya çıkabileceğini önermektedir [86]. Ayrıca son zamanlarda yapılan kapsamlı lipidomik analizlerle, diyabetik plazmada gözlenen GM3 seviyelerinin, bağlanan yağ asitlerinin zincir uzunluklarına bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir [133]. Bu bulgular sfingolipidlerdeki kantitatif değişikliklerin potansiyel olarak ilgili insülin işlevinin modülatörleri olabileceğini düşündürmekte ve lipidomik yaklaşımların hastalık patolojisinin anlaşılması ve diyabet gibi metabolik hastalıklar için potansiyel tedaviyi formüle etmek için nasıl yeni yollar sağladığını göstermektedir.

2.17.2. Nörodejeneratif Hastalıklar

Alzheimer hastalığı (AD) yaşlı insanlar arasında en yaygın bunama şekli olup hastalık dünya çapında 35 milyon insanı etkilemektedir [86]. Yaygın olmasına rağmen, AD'nin nedeni ve ilerlemesi, karmaşık ve çok faktörlü doğası nedeniyle henüz tam olarak anlaşılammıştır. AD için önerilen sayısız risk faktörü arasından yaş ve apolipoprotein E (APOE) ϵ 4 aleli en güçlü faktörler olarak kabul edilmektedir. APOE ϵ 4 taşıyıcılarının beyinlerinin, daha büyük ve daha fazla amiloid- β (A β) plaklara sahip oldukları ve bireylerde A β klirensi sorunu olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; AD gelişiminde gözlenen anormal lipit sinyal gelişiminin, A β peptidlerinin patojenik etkileri yoluyla ortaya çıkabileceğini önerilmiş ve fosfolipazların A β etkisi için birincil aracı olarak görev alabilecekleri belirtilmiştir [86]. Kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 γ (iPLA2 γ)'nin genetik olarak çıkarılması, hipokampal mitokondrilerin dejenere olmasına neden olmuş ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynamıştır [86]. İnsan APOE ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 knock-in farelerinden elde edilen veriler spesifik lipit türlerinin, bozulan lipit metabolik yollarıyla açıkça ilişkili olduğunu göstermektedir [110, 134]. Ayrıca, fosfolipaz d2 (*Pld2*) eksikliğinin, İsveç APP'lerinde (SwAPP) önemli A β yüküne rağmen hafıza eksikliğini ve sinaptik koruma sağlayabildiği gösterilmiştir [86]. *Pld2* eksikliği ile sağlanan patojenitenin düzelmesi GM3 düzeylerinin normalleşmesi ile ilişkilendirilmiştir [86]. Ayrıca, APOE ϵ 4 taşıyıcılarında kardiyovasküler hastalık gelişme riskinin daha yüksek olduğu

bildirilmiştir [86]. İlgi çekici bir diğer bulgu, yağ ve kolesterolce yüksek bir diyetin, transgenik farelerde artmış bir A β birikimi ile ilişkili olduğu gözlemdir. Bir diğer çalışmada, APOE ϵ 4 knock-in fareleri yağ ve kolesterol açısından yüksek bir diyetle beslendiklerinde, kontrol diyetle beslenen farelere kıyasla beyin CE seviyelerinde dramatik bir artış olduğu gösterilmiştir [86].

Parkinson hastalığı (PD) motor becerileri, bilişsel süreci ve diğer önemli işlevleri önemli ölçüde etkileyen kronik, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. PD, Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık bir milyon insanı ve dünya çapında ise dört milyondan fazla insanı etkilemektedir. Lipid homeostazının sürdürülmesinin, normal nöronal fonksiyon için hayati öneme sahip bir kriter olduğuna olan inanış gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan birçok çalışma sonucunda serebral lipid metabolizması veya transportunda meydana gelen değişimin PD'nin ilerlemesi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Örneğin, lipitlerin birikmesinden sorumlu bir lipit bağlayıcı protein olan α -syn'nin PD hasta dokularındaki, Lewy-cisimleri ve nöromelanin ile ilişkili olduğu bulunmuştur [86]. Farelerde α -syn'nin genetik olarak silinmesinin, serebral nötral lipit seviyelerinin artmasına neden olduğu, insan α -syn'yi eksprese eden yaşlı transgenik farelerde (fakat genç olmayan) birden fazla fosfolipid sınıfında değişiklikler gözlenmiştir [86]. Ayrıca, α -syn'nin oksitlenmiş lipit metabolitleri ile ilişkisinin PD'de mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açabileceğini düşündürmektedir [86]. Diğer bazı çalışmalar, serebral kolesterol, oksisteroller ve kolesterol hidroperoksitlerdeki değişikliklerin PD ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir [86]. Glukoserebrozidazı kodlayan GBA genindeki mutasyonların artmış PD riskine yol açabileceği bildirilmiştir [86]. Tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, serebral lipit homeostazındaki değişikliklerin PD'deki nörodejeneratif yolaklara önemli ölçüde katkıda bulunabileceği öngörülmektedir.

2.17.3. Bulaşıcı Hastalıklar

Bulaşıcı hastalıklar, küreselleşmeyle birlikte her zaman mevcut olan büyük bir küresel tehdidi temsil etmektedirler. Bulaşıcı hastalıklar, hücre içi patojenler, zarflı virüsler, mikobakteriler ve parazitler gibi farklı ajanlara bağlı olarak

ortya çıkabilmektedirler. Lipidomik'in hücre ve moleküler biyoloji ile birlikte çalışılması sonucunda bulaşıcı hastalıklarda lipitlerin rolleri hakkında daha fazla araştırma için temel bir çerçeve oluşturulmuştur [86]. Çalışmaların sonuçları lipitlerin, konak tanıma, patojen yerleştirme sırasında konakçı-hücre sinyalizasyonu, saldırı ve hücrel değiş tokuş işlemleri, replikasyon ve kalıcılık işlemlerinin yanısıra ayrıca fagolizozomal bileşenler tarafından bozunma gibi konakçı-patojen etkileşimlerinin çeşitli aşamalarında önemli roller oynadığını göstermiştir. Lipidler ayrıca immünomodülatör faktörler olarak da işlev görebilmektedirler. Mikroplar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminde, sonraki fagolizozomal bölmelerde bozundurulmak üzere fagositoz-benzeri bir işlemle tanınmaktadır. Bununla birlikte, bazı patojenler, bağışıklık sisteminden kurtulmakta ve daha sonar hayatta kalmalarına ve çoğalmalarına yardımcı olan hücrel yollarla etkileşmektedirler.

Konak lipitlerin biyosentezi çoğu durumda oldukça iyi anlaşılırken, patojen lipitleri için aynı durum geçerli değildir. Patojenlerde farklı lipid enzimlerini kodlayan çok sayıdaki genin, henüz ayrıntılı tanımlanması ve karakterizasyonları yapılmamıştır. Günümüzde, en son teknoloji ürünü lipidomik yaklaşımlar kullanılarak, bazı patojenlerin hücre duvarı lipit bileşimi ve lipitlerin mikrobiyal patogenezdaki rolü yavaş yavaş çözülmektedir [99, 135]. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), influenza virüsü ve hepatit C virüsü gibi tıbbi olarak önemli birçok virüsü içeren zarflanmış virüslerin replikasyon başarılarının, özellikle membran dinamiği ve lipit metabolizması ile ilgili olanları olmak üzere konakçı hücre mekanizmalarını ele geçirme yetenekleriyle yakından bağlantılı olduğu bildirilmiştir [86]. Viral lipitlerin ve plazma membran lipitlerinin karşılaştırmalı analizi, retroviral zarflar ve plazma membran arasındaki lipit kompozisyonlarındaki çarpıcı benzerlikleri göstermiştir. Hem retroviral zarflarda hem de konakçı plazma zarı üzerindeki CD45-mikroveziküllerde kolesterol, Cer ve GM3 yükselmiştir. İlginç bir şekilde fosfatidilinositol fosfat (PIP) ve fosfatidilinositol bifosfat (PIP₂) düzeyleri, plazma membranı ve mikroveziküllere kıyasla retroviral zarflarda önemli ölçüde artmıştır. Bu veriler retroviral ve mikroveziküllerin lipitlerinin plazma zarı lipitlerine benzer olduğunu ancak fosfoinosititlerin varlığının,

retrovirüslerin zarflarını hem mikroveziküllerden hem de konakçı plazma membranlarından ayırdığını göstermiştir [99].

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), mikolik asitler (ve bunların glikosile edilmiş formları), fosfolipidler (çoğunlukla PE, CL, PG ve PI), TAG ve glikolipidleri gibi çok farklı türde lipid içermektedir. Yeni LC/MS (ve MS/MS) yaklaşımlarının son zamanlardaki gelişimi, diğer önemli mikobakteriyel lipid sınıf mikolik asitler (MA'ların analizini kolaylaştırmış ve patojen sınıflandırmasının yanısıra ilaç tedavisi çalışmaları için bir tarama aracı olarak MA parmakizi potansiyel uygulamaları gösterilmiştir [86].

2.18. Kanser İçin Lipit Temelli Biyobelirteçler

2.18.1. Lipidler ve Kanser

Kanser, oldukça karmaşık yapılu hastalık olup birçok genetik ve çevresel faktöre bağlı olarak gelişebilmektedir. Tümör oluşumu; kontrolsüz hücre büyümesi, bölünmesi ve kanser hücrelerinin bir organdan diğerine taşınmasını (metastaz) içermektedir. Kanser hücreleri, tümör agresifliği, anjiyogenez, hücre sağ kalımı veya proliferasyonundaki artışlarla ilişkili genlerin aktive edilmesi için hücrenin ve çekirdeğin içine iletilen sinyaller almaktadırlar. Metastaz sırasında, kanser hücreleri, bazal lamini parçalayan ve böylece tümör hücrelerini yerinden çıkaran matris metalloproteinazlar da dahil olmak üzere çeşitli faktörler salgılamaktadırlar (**Şekil 2.14.**) [111].

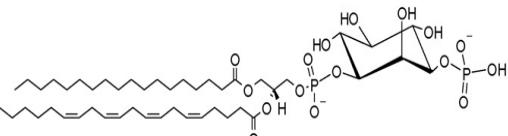
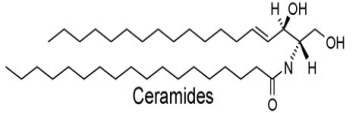
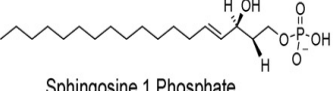
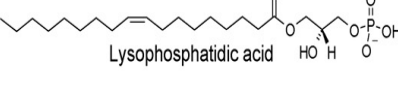
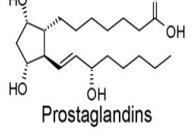
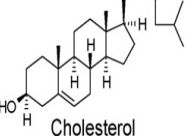
Hücreler daha sonra, kan dolaşımına ulaşmak için endotel hücre kan bariyerini istila etmek üzere metastaz indükleyen moleküller tarafından yönlendirilmektedirler. Vasküler sistem, göç eden hücrelerin tekrar endotel hücre bariyerlerinden geçtikleri bir hedef organa ulaşmaları için bir araç görevi görmektedir. Göç eden hücreler hedef organa girdikten sonra bazal tabakaya yerleştirilmekte ve çoğalarak tümör oluşumuna yol açmaktadırlar. Kanser hücresi fizyolojisinin (ayrılma, istila, göç ve çoğalma) oldukça basitleştirilmiş bu senaryosunda, hücreler büyük morfolojik ve hücresel değişikliklere uğramaktadırlar.

Hücresel biyomembranlar yukarıdaki işlemlerin hepsinde görev almaktadırlar. Bu zarlar, tipik olarak toplam membran kütesinin en az % 50'sine katkıda

bulunan lipitlerden ve proteinlerden oluşmaktadır. Memeli hücrelerinde, membran lipitleri esas olarak steroller (çoğunlukla kolesterol), gliserol bazlı fosfolipidler (fosfatidilkolin (PC), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI), vb.) ve seramid bazlı sfingolipidlerden oluşmaktadır (**Şekil 2.14.**). [136]. Membran akışkanlığı, mikroçevre oluşumu, lipit-lipit ve lipit-protein etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Ligand-reseptör etkileşimleri, endositoz ve antijen varlığı, membran akışkanlığı ve özelleşmiş membran mikroalanlar ile kısmen kontrol edilmektedir. Ayrıca, replikasyon sırasında ilave biyomembranların oluşturulabilmesi için hücrelere çok miktarda lipid sağlamanın gerekliliği çoğu zaman unutulmuş bir konudur.

İkincisi, lipitler enerji depoları olarak görev yapmaktadırlar. Yağ asitleri kimyasal enerjinin en düşük formudur. Bununla birlikte, serbest yağ asitlerinin hücreler için toksik olmaları nedeniyle depolama için genellikle monoaçilgliseroller, diaçilgliseroller (DAG) veya triaçilgliseroller (TAG) gibi nötral lipitler oluşturmak üzere gliserole esterleştirilmektedirler. Bu lipitler belirli steroller, gliserofosfolipidler ve proteinlerle birlikte "lipid damlacıkları" veya "lipid cisimleri" olarak adlandırılan organellerde birlikte bulunmaktadırlar [111]. Yağ asitleri ya enerji kaynağı (beta-oksidasyon yoluyla) olarak yada membran lipitlerinin üretilmesi için yapı taşları olarak bu depolardan elde edilmektedirler.

Üçüncüsü, lipitler, sinyal molekülleri (fosfoinositidler ve seramidler) veya ikinci haberciler (örneğin inositol trisfosfatlar (IP3)/DAG) için öncüler olarak davranarak çeşitli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu fonksiyonlar hücre proliferasyonu, inflamasyon, bağışıklık ve apoptozu içermektedir [111]. Hücre bölünmesi sırasında sitokinez ve hücre iskeleti organizasyonunun son aşamalarında PE bölünme çizgilerinden hücre yüzeyine çıkmaktadır [111].

Lipid/structures	Link to cancer	Functions	
 <p>Phosphoinositides</p>	Increased levels in breast, prostate, ovarian, gastric and lung cancer tissues [22-25]	Signaling function for cell growth, proliferation and motility	Glycerophospholipids
 <p>Ceramides</p>	Decreased levels in breast, ovarian, prostate cancer tissues [27]	Cell cycle arrest, apoptosis and senescence	
 <p>Sphingosine 1 Phosphate</p>	Released from cancerous tissues [36-39]	Potent tumorigenic and angiogenic properties	Sphingolipids
 <p>Lysophosphatidic acid</p>	Increased in serum of patients with ovarian cancer [42-45]	Increases metastasis	Lyso lipids
 <p>Prostaglandins</p>	Secreted by tumor cells; autocrine functions [50]	Angiogenesis, invasion and inhibition of apoptosis	Oxidized fatty acids
 <p>Cholesterol</p>	Alteration in membrane structure and morphology	Regulate membrane structure and microdomains	Sterol

Şekil 2.14. Lipidler ve kanserle ilişkisi [111]

Yukarıdaki bahsedilen; membran dinamiği, enerji homeostazı, replikasyonu belirleyen moleküler mekanizmaların düzenlenmesi gibi faktörler çoğalan hücreler için kritik yönlerdir. Aslında, bu süreçler kontrolsüz hücre büyümesine yol açan kanser hücrelerinde hızlanmaktadır. Sonuç olarak, sıkı moleküler bağlanma nedeniyle, lipidlerin bu hücreler üzerindeki etkileri ve dolayısıyla kanser gelişimi hakkında mükemmel bir bilgi kaynağı olması öngörülmektedir.

2.18.1.1. Fosfoinosititler

Fosfatidilinositol, PI'nın fosforile türevleri olan fosfoinosititler, PIP₃ türevleri, gliserofosfolipidler arasında benzersizdir. PI'nın inozitol baş grubunun geri dönüşümlü olarak kinazlar ve fosfatazlar tarafından fosforile edilmesi sonucunda PI(4)P ve PI(4,5)P₂ olmak üzere doğal olarak bulunan yedi isomer oluşmaktadır. Bu izomerler memeli hücrelerinde dinlenme koşullarında en bol bulunan türleridir. Bu lipidler ikinci haberciler için öncüdür ve fosforile baş

gruplarına bağlanan proteinlerle spesifik etkileşimleri yoluyla hücre büyümesi, proliferasyonu ve motilitesi gibi çeşitli hücresel yanıtların düzenlenmesinde görev almaktadırlar. 3-fosforile fosfoinositidler, tümör biyolojisi alanında büyük ilgi uyandırmıştır. Bu lipitler, onkolojide en umut verici ilaç hedefleri arasında yer alan fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K_s) tarafından oluşturulmaktadır. PI3K sinyalinin aşırı aktivasyonu meme, prostat, kolon, tiroid ve yumurtalık kanserleri de dahil olmak üzere birkaç farklı tümör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. PI3K'nın çeşitli kanserlerde mutasyona uğradığı gösterilmiştir ki buda kinaz aktivitesinin esas aktivasyonuna yol açmaktadır. 3-Fosforile fosfoinositidlerin fosforilasyonundan sorumlu bir lipit fosfataz olan PTEN'in, meme, prostat, endometriyum, yumurtalık, kolon, melanoma, glioblastom ve lenfoma gibi bazı kanser türlerinin geç evrelerinde sıklıkla mutasyona uğradığı gösterilmiştir [136-141]. Bu enzimin mutasyonu genellikle, büyüme faktörü uyarımını taklit eden 3-fosforile lipit seviyelerinin artmasına neden olan fosfataz aktivitesinde inaktiviteye neden olmaktadır. Bu lipitlerin daha yüksek seviyeleri, protein kinaz B (PKB) ve fosfoinositid-bağlı kinazları içeren faktörlerin temel aktivasyonuna neden olmaktadır. Anormal PTEN sinyali, meme ve diğer kanser türlerindeki metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [111]. Bu nedenle, biyokimyasal düzeyde, PI3K ve 3-fosfoinositid fosfataz aktiviteleri arasındaki denge hücresel büyümeyi ve dönüşümü belirlemektedir. 3-fosforile PI'lar tarafından aktive edilen Akt aracılı sinyal karaciğer, yumurtalık, tiroid ve prostat kanseri dokularında yanlış düzenlenmiştir [111]. Ek olarak, Vav gibi Rho GTPazlar için çeşitli guanin nükleotit değişim faktörleri, 3-fosforile PI'lar tarafından düzenlenmekte ve böylece maligniteye geçiş düzenlenmektedir [366]. Bu nedenle, PI'lar ve bunların metabolitler (örneğin DAG ve PA), hücresel sinyalleşme için ilk-basamak indikatörlerdir. Bu türlerin göreceli düzeylerindeki hafif ve kronik dengesizlikler, patolojinin başlamasına katkıda bulunabilecek hücresel fonksiyonların değişmesine neden olmaktadır.

2.18.1.2. Sfingolipidler

Seramid, sfingozin 1-fosfat (S1P), sfingozin ve glukozilseramid gibi biyoaktif sfingolipidler kanser patogenezi ve terapisindeki apoptoz, hücre

proliferasyonu, hücre göçü, yaşlanma veya iltihap gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan efektör moleküller olarak işlev görmektedirler (**Şekil 2.14.**) [142]. Sfingomiyelinler ve çeşitli sfingolipidlerce zengin farklı hücrel membranlar sfingomiyelinazlar için substratlardır. Sfingomiyelinazlar, sfingomiyelin baş grubundan kolini ayırarak memebran seramidlerinin oluşmasına neden olmaktadır.

Bazı tümör düzenleyici fonksiyonlar, sfingolipitlerin proteinlerle etkileşimleri yoluyla kontrol edilebilmektedir. Seramidin hedefleri olan protein fosfatazlar ve kinazlar (örn. Akt, protein kinaz C (PKC), MAP kinazlar ve fosfolipaz D) kanserdeki önemli sinyal yollarını düzenlenmesinde görev almaktadırlar [123]. Günümüzde en iyi karakterize edilmiş seramid transfer proteinlerinden birisi olan CERT, kanser biyolojisi içerisine dahil edilmiştir. CERT'in down-regülasyonu kemoterapötik ajanlara karşı artan duyarlılıkla sonuçlanmaktadır [111]. Bu durum, sfingolipid metabolizmasının CERT aracılı olarak değiştirilmesinin kanser hücrelerine sağkalım avantajı sağladığını ortaya koymaktadır. Seramid, bazı kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen glukozilseramid sentazın (GCS) aktivitesi yoluyla ortaya çıkan glukozilseramid ile metabolik olarak yakından bağlantılıdır [111].

S1P, malign transformasyon, kanser proliferasyonu, inflamasyon, vaskülojenez ve apoptotik hücre ölümüne dahil olması nedeniyle bir 'pro-survival-hayatta kalma yanlısı' faktörü olarak kabul edilmektedir [111]. S1P'nin artan üretimi, esas olarak G-protein-bağlı reseptörlerin üyeleri olan S1P reseptörleri 1-5 (S1PR) ile etkileşime girerek bu sağkalım yanlısı süreçlere aracılık eden sinyal yollarını başlatmaktadır [111]. Artan S1P seviyeleri, insan glioma ve meme kanseri hücrelerinde proliferasyon ve hayatta kalmayı desteklediği bildirilmiştir [143-145]. Yumurtalık kanserli hastaların serum S1P düzeyleri yüksek bulunmuş ve S1PR1'in *in vivo* tümör anjiyogenez için bir gereklilik olduğu keşfedilmiştir [111]. Seramid analogları/mimetikleri tümör ilerlemesinde merkezi role sahip olmala birlikte, anti-kanser terapötiklere yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi ve ayrıca biyobelirteçlerin geliştirilmesi için sfingozin kinaz enzim inhibitörleri veya seramid klerens enzimlerinden

faýdalanılabilmektedir. Seramidlerin proteinler tarafından özgül olarak tanındığı az sayıda örnek bulunmaktadır [111].

2.18.1.3. Lizofosfolipidler ve Yağ Asitleri

Yapısal olarak sfingosin 1-fosfata benzeyen lizofosfatidik asitler (LPA) metastazdaki rolleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedirler (**Şekil 2.14.**) [146]. Bu lipitler hücrelerden salınmakta ve G-protein-bağlı reseptörlere (GPCR_s) bağlanarak otokrin ve parakrin işlevleri yerine getirmektedirler. Yumurtalık tümörü olan hastaların serumunda LPA düzeylerinin arttığı gözlenmiş olduğundan, yumurtalık kanseri için potansiyel biyobelirteçler olarak kabul edilmektedirler [111]. LPA ayrıca PI3K ve fosfolipaz C'yi aktive ederek hücre proliferasyonuna ve hücrenin hayatta kalmasına yol açmaktadır. LPA sinyali, kanser hücresi proliferasyonunu, istilasını, anjiyogenezini ve kemoterapiye ve radyoterapiye bağlı apoptoza karşı biyokimyasal direnci düzenlemektedir [111]. LPA aracılı artmış tümör hücre invazyonu için önerilen mekanizmalardan birisi, aktin hücre iskeleti ve hücre hareketliliğinin düzenlenmesi için gerekli olduğu bilinen Rho ve Rac GTPase yollarının reseptör aracılı aktivasyonudur [111]. İkinci yol ise, metastazda kilit bir süreç olan matris metalloproteinaz aktivitesinin LPA aracılı olarak düzenlenmesidir [111]. LPA'nın ayrıca bir ω6 yağ asidi olan araşidonik asidi prostaglandinlere dönüştüren siklooksijenaz aktivitesini uyardığı da bilinmektedir (**Şekil 2.14.**). Anjiyogenez, artan prostaglandin üretimi ile şiddetlenmektedir [123]. Ayrıca, yüksek tekli doymamış yağ asit seviyelerinin ve ω6/ω3 yağ asitleri oranlarının meme kanseri için koruyucu olduğu bildirilmiştir [147].

2.19. Hücre Kültürü

Hücre, tüm canlıların varolabilmesi için gerekli işlevleri yerine getiren temel yapıdır. Hücre kültürü ise hücrelerin fizyolojisini ve biyokimyasını gözlemlemek için en iyi yöntemdir. Hücre kültürü, canlı bir organizmadan alınan hücre topluluğunun laboratuvar ortamına alınarak yaşatılmasını ve çoğalmasını sağlayacak yöntemdir verilen addır [148]. Vücudumuzdaki hücreler çoğalabilme özelliklerine göre üç grupta incelenebilmektedirler. Birinci grupta yer alan kemik iliği ve gastrointestinal sistemin epitel hücreleri daima çoğalan hücrelerdir. İkincisi grupta bulunan karaciğer, periferik lenfosit ve makrofajlar

ise ancak uyarıldığı zaman çoğalabilen hücrelerdir. Üçüncü grupta bulunan hücreler ise, sinir sistemi ve gözün bazı hücreleri gibi insanın yaşamı boyunca bir kez çoğalabilen hücrelerdir. Hücre kültürü virüslerin incelenmesinde, aşı geliştirilmesinde, organ (doku) yenilenmesinde, gen tedavilerinin geliştirilmesinde, kanserlere karşı ilaç geliştirme vb. alanlarda kullanılmaktadır.

2.20. MTT testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi canlı hücrelerin varlığının tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. MTT testinin en sık kullanım alanları ise, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin besiyeri bileşenlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkilerinin belirlenmesi çalışmalarıdır [149]. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. Fenol kırmızısı içermeyen besiyeri veya tuz solüsyonlarında hazırlanırsa sarımtırak bir solüsyon oluşturmaktadır. Bu yöntem hücrelerin mitokondrial aktivitelerini ölçmeye dayalı olup canlı hücre mitokondrilerindeki süksinat dehidrogenaz enzimlerince tetrazolium halkasının parçalanması sonucunda MTT mor renge dönüşmektedir [149]. Mitokondrial aktiviteleri bozulmuş hücrelerde ise renk değişimi gözlenmemektedir.

Bu yöntem üç basamak şeklinde ilerlemektedir; önce hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu yapılmakta, ardından reaksiyon ürününün çözünebilir hale getirilmesi sağlanmakta ve son olarak reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü yapılmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Malzemeler

Malzeme	Marka
MDA-MB-231 hücre hattı	ATTC (HTB-26)
MCF-7 hücre hattı	ATTC (HTB-22)
L-929 hücre hattı	ECACC (NCTC)
DMEM	Sigma (D6429)
RPMI-1640	ATTC (30-2001)
Fetal bovin serum (FBS)	ATTC (30-2020)
Penicillin-Streptomycin	ATTC (30-2300)
%0.25 Trypsin-EDTA (1X)	Sigma
MTT	Serva
2,3-dihidrobenzoik asit	Merck
Kloroform	Merck
Metanol	Merck
Amonyum molibdat	Merck
Hidrojen peroksit	Merck
Dimetilsülfoksit	Merck
Sülfürik Asit	Merck
Askorbik asit	Sigma
1-heptadekanoil-2-(9Z-tetradesenoyl)-sn-glisero-3-fosfokolin	Avanti® Lipid
1-steroil-2-steroil(d35)-sn-glisero-3-fosfokolin	Avanti® Lipid

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Laminar Kabin	Bilser Biosafety Cabinet (Class II)
CO ₂ İnkübarör	ESCO
ELISA plaka okuyucu	Biotek, Epoch
İğneli evaporatör	Organomation
Hücre görüntüleme cihazı	Juli FL
-80 °C	Nüve
Çeker ocak	Fume
Q-TOF LC/MS kütle spektrometresi	Agilent technologies 6530
Vorteks	Velp
Santrifüj	Sigma
Azot tüpü ve regülatörü	

3.3. Antikanser Aktivite

3.3.1. Besi Yerinin Hazırlanması

DMEM besi yeri, % 10 FBS ve % 1 antibiyotik içerecek şekilde hazırlandı.

3.3.2. Hücrelerin Çözülmesi

-80 °C'den çıkarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve L-929 sağlıklı fare fibroblast hücreleri, 37 °C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü ve üzerine eklenen 1 mL besi yeri ile homojen hale getirilen hücre süspansiyonları 25 mL'lik flasklar içerisine alındı. Flasklar içerisine 8 mL daha besi yeri eklenen canlı hücrelerin varlığı kontrol edildi ve hücreler inkübatör içerisine alındı. Ertesi gün hücrelerin tutunup tutunmadıkları kontrol edildi ve gerekli ise besi yeri değiştirildi.

3.3.3. Hücrelerin Büyütülme Koşulları

İnsan meme kanser hücreleri (MCF-7, MDA-MB-231), 10% (v/v) fetal bovin serum (FBS), 100 Unite/ml penicilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM besi yerinde, L-929 sağlıklı fare fibroblast hücreleri ise 10% (v/v) FBS, 100 Unite/ml penicilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besi yerinde, %5 CO₂ ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde büyütüldü. Hücreler %70–80 büyüme oranına ulaştıklarında tripsin-EDTA kullanılarak pasajlandı

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Sayımı

Hücreler flaskın % 80-90'ını doldurduklarında flasklardaki besi yerleri aspire edildi ve flaskın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde tripsin-EDTA eklendi. CO₂ inkübatöre alınan flasklar 15-20 sn'de bir kontrol edilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Hücreler üzerine 10 mL besi yeri eklendi ve pipetörle yavaşça al-çek işlemi yapılarak hücreler homojen hale getirildi. Bu homojen karışımdan 10 µL endorf tüpe alınarak üzerine 10 µL tripan blue boyasından eklendi ve pipetajlandı. Bu karışımdan 10 µL alınarak gerçek zamanlı hücre görüntüleme cihazında (Julı FL) hücreler sayıldı. İstenilen sayıdaki hücreler diğer flasklara eklendi ve flaskdaki toplam hacim 12-15 mL olacak şekilde besi yeri eklendi. Hücre görüntüleme cihazı ile flasklardaki canlı hücre varlığı ve yoğunlukları kontrol edilerek CO₂ inkübatörü içerisine alındı.

3.3.4. Bileşğin Seyreltik Çözeltilerinin Hazırlanması

2,3-DHBA, DMSO'da çözülerek stok çözeltisi hazırlandı ve besi yeri ile istenilen derişimlere seyreltildi.

3.3.5. Hücrelerin Ekimi ve MTT ölçümü

3.3.3.'de anlatıldığı şekilde sayılan hücreler, DMEM ve RPMI-1640 besi yerleri kullanılarak 100000 hücre/mL olacak şekilde seyreltildi ve 96 kuyulu platelere ekildi. Hücrelerin plakalara yapışmaları için plateler % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saat sonra, bileşiklerin farklı derişimleri hücrelere uygulandı ve 24, 48 ve 72 saat sonra MTT ölçümü yapılarak, hücre canlılıkları belirlendi. Kısaca; zaman bitimlerinde her bir kuyuya 10 µl MTT eklenerek 2 saat %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübe edildi. İki saat sonunda kuyulardaki besi yeri aspire edildi ve 100'er µL DMSO eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra absorbans değerleri Elisa plate okuyucu (BioTek) ile 570 nm dalga boyunda okundu [149]. Her bir bileşğin 24, 48 ve 72 saat için IC₅₀ değerleri (hücre çoğalma kapasitesini %50 oranında düşüren madde derişimi) GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplandı.

3.4. Lipidomiks Analiz

3.4.1. Bligh-Dyer yöntemi ile Lipid izolasyonu

2,3-DHBA'in MCF-7, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde MTT deneyi sonucunda 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişim değeri MCF-7, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine uygulanarak, hücre kültürü ortamından Bligh-Dyer yöntemi ile lipid izolasyonu yapıldı [150]. Flasklarda büyütülen MCF-7, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri 1xPBS ile yıkandıktan sonra metanol:su karışımıyla kazınarak tüplere alındı. Tüplere metanol, kloroform, su ve lipid standartları eklenerek vortekslendi ve santrifüjlenerek kloroform fazı ayrıldı. Tüpler üzerine tekrar kloroform eklenerek vortekslendi, santrifüjlendi ve kloroform fazları birleştirildi. Kloroform, azot gazı altında uzaklaştırıldı. Kalan lipidler metanol:kloroform karışımı ile çözülerek küçük cam tüplere alındı ve fosfor analizi yapılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.4.2. İnorganik Fosfat Tayini

Lipid ekstraktları ve sülfirik asit, 200°C de 1 saat inkübe edildikten sonra hidrojen peroksit eklenip tekrar 1.5 saat inkübe edildi. Tüplere molibdat belirteci ve 100 µL askorbik asit çözeltisi eklenip 100 °C'de 7-10 dk kaynatıldı ve 830 nm dalga boyunda absorbanları ELISA plate okuyucuda (BioTek) belirlendi [151].

3.4.3. Lipid Türlerinin Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometresiyle (ESI-MS) ile Belirlenmesi

Lipit ekstraktlarının ESI-MS analizleri Agilent LC/MSD kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı [152-155]. ESI-MS, analizi Agilent technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS kütle spektrometresi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) kullanılarak; 350 °C'de azot kurutma gazının akış hızı 8 L/dk ve 30 psi'lik nebulizatör basıncında gerçekleştirildi. Örnekler; amonyum format içeren asetonitril: metanol:su mobil faz ile pozitif ve negatif iyon modunda tarandı.

3.4.4. Lipidler için çok değişkenli İstatistik Analizler;

Esas bileşen analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (PLS-DA) gibi çok değişkenli analizler MetaboAnalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) kullanılarak yapıldı [156]. Anlamli olarak değişen m/z değerlerini bulmak için, volcano plots, kat değişimi (fold change) ve t-test sonuçları MetaboAnalyst 4.0. kullanılarak birleştirildi. İstatistiksel olarak anlamlı olan m/z değerlerine karşılık gelen lipid türleri, Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>) kullanılarak belirlendi [157].

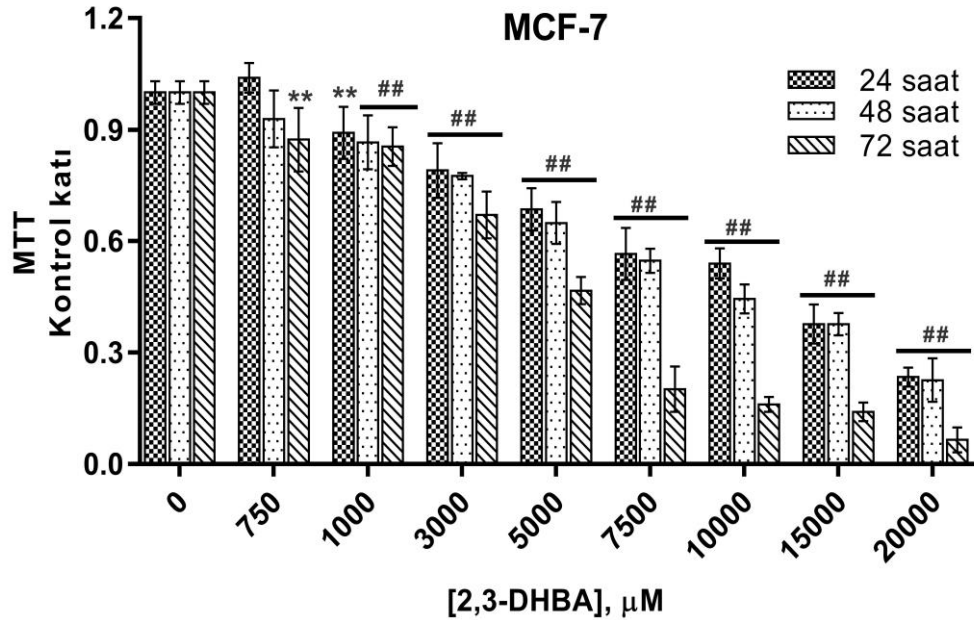
3.5. İstatistik Analiz

Antikanser aktivite deneylerindeki tüm ölçümler dokuz tekrarlı olarak yapıldı (n=9) ve sonuçlar standart sapmalarıyla (\pm SEM) verildi. GraphPad Prism7 grafik ve istatistik programı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak IC₅₀ değerleri saptandı. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması için One Way Anova ve Dunnett's çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve anlamlılık için *p < 0.05, **p < 0.005, #p < 0.0005, ##p < 0.0001 olarak alındı.

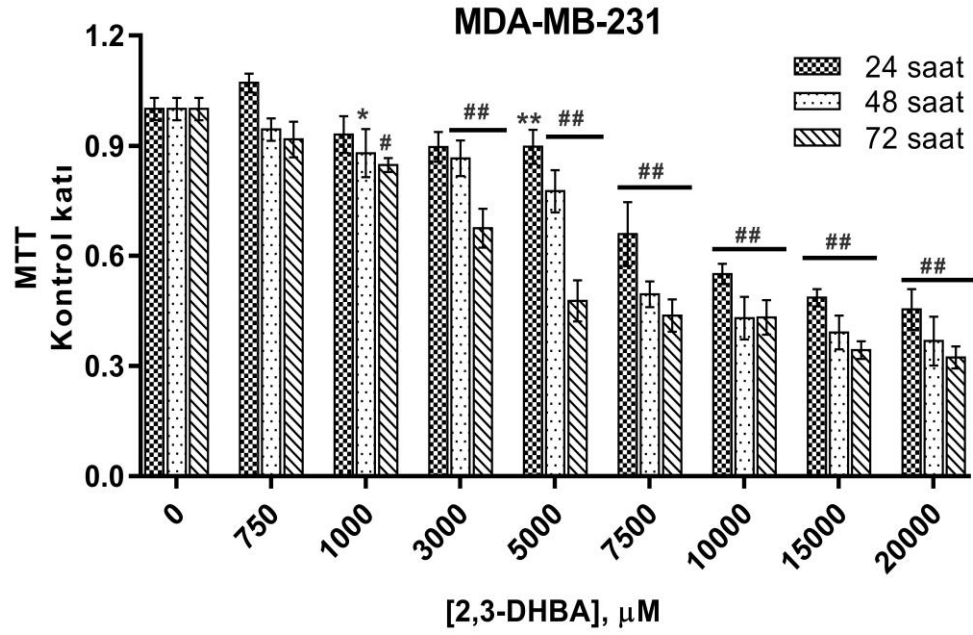
4.BULGULAR

4.1. 2,3-DHBA'in MCF-7 ve MDA-MB-231 İnsan Meme Kanser Hücreleri Üzerine Antikanser Aktivitesi

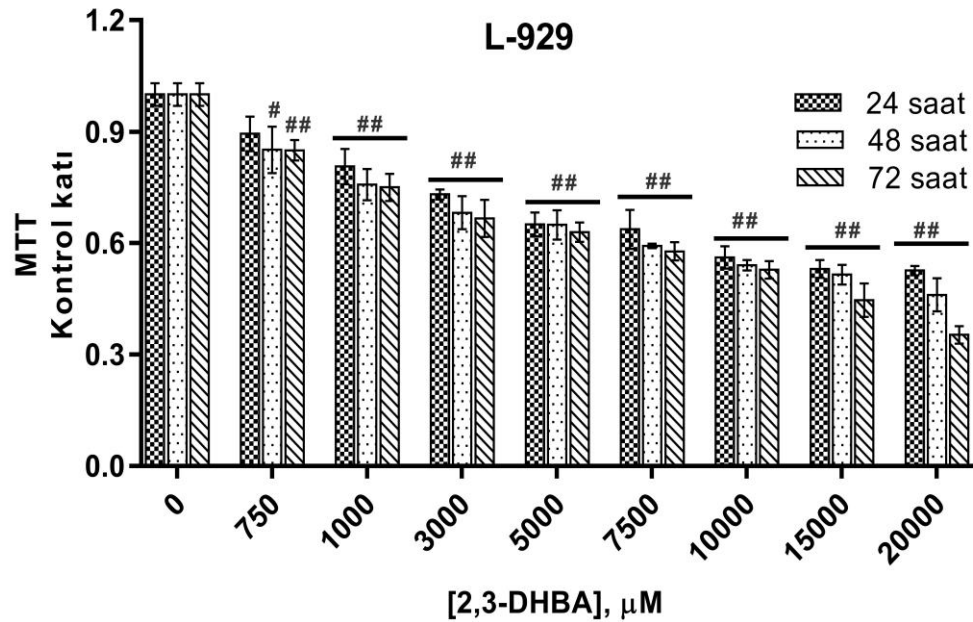
2,3-DHBA'in DMSO'da çözülerek hazırlanan farklı derişimlerdeki (750-20000 μM) örnekleri, 96 kuyucuklu plaklara ekilen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ile L-929 sağlıklı fibroblast hücrelerine (100.000 hücre/ml, 100 μL) uygulandı. 2,3-DHBA uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra, steril PBS içerisinde hazırlanan MTT, 96 kuyulu platalere ilave edilerek, plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA plate okuyucu cihazında (Biotek) 570 nm dalga boyunda okundu. 2,3-DHBA'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları ile L-929 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine antikanser aktiviteleri MTT yöntemi ile 24, 48 ve 72 saatlik uygulama zamanları araştırılarak herbir zaman noktası için IC_{50} derişim değerleri (hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan derişim değeri) belirlendi (Şekil 4.1 - 4.3).



Şekil 4.1. 2,3-DHBA'in MCF-7 insan meme kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış ($n=9$) ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; ** $p<0.005$, ## $p<0.0001$).



Şekil 4.2. 2,3-DHBA'nin MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; *p<0.05, **p<0.005, #p<0.0005, ##p<0.0001).



Şekil 4.3. 2,3-DHBA'nin L-929 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine antikanser aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; #p<0.0005, ##p<0.0001).

Tablo 4.1. 2,3-DHBA'in MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri ve L-929 sağlıklı fare fibroblast hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC₅₀ değerleri

	(IC ₅₀ , µM) ^a		
	24 saat	48 saat	72 saat
MCF-7	13354 ± 0.1427	8614 ± 0.2050	4203 ± 0.1218
MDA-MB-231	10518 ± 0.2022	5838 ± 0.099	4094 ± 0.099
L-929^b	> 20000	16353 ± 0.1303	14512 ± 0.096

^aIC₅₀ değeri, bileşik uygulamalarından 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra yapılan MTT deneyi ile hücre canlılığında % 50 azalmaya neden olan derişim değeri olarak hesaplanmış olup sonuçlar ± SEM olarak verilmiştir (n=9). ^bSağlıklı hücre.

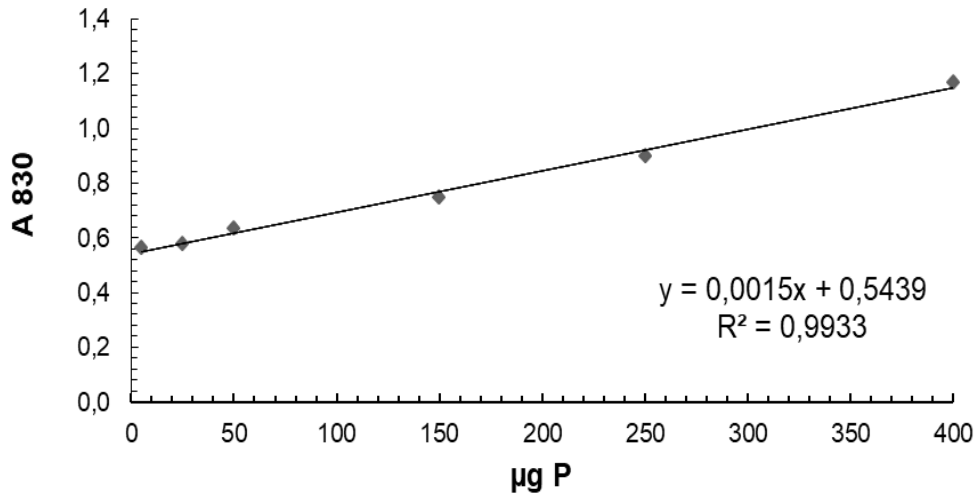
Şekil 4.1 – 4.3'de; x eksenini 2,3-DHBA'in derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Bu grafiklerden yararlanılarak, 2,3-DHBA'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ile L-929 sağlıklı fibroblast hücrelerinin % 50'sini öldürdükleri derişim değerleri (IC₅₀, µM) hesaplanmıştır (**Tablo 4.1.**). **Şekil 4.1 – 4.3**'de görüldüğü gibi 2,3-DHBA'in derişimindeki artışla paralel olarak sitotoksitede de artış gözlenmektedir. Yani; 2,3-DHBA'in derişiminin artmasıyla, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ile L-929 sağlıklı fibroblast hücrelerinin ölüm oranları artış göstermektedir. **Tablo 4.1**'de görüldüğü gibi, 2,3-DHBA'in meme kanser hücreleri ve sağlıklı fibroblast hücreleri için gözlemlenen IC₅₀ değerleri, zamanla azalmıştır. Düşük IC₅₀ değeri yüksek sitotoksiteye işaret etmektedir. Bu nedenle 2,3-DHBA'in antikanser aktivitesi zamana bağlı olarak artmıştır. MDA-MB-231 meme kanser hücresinde 24, 48 ve 72 saat için saptanan IC₅₀ derişim değerleri MCF-7 meme kanser hücresi için saptanan IC₅₀ derişim değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin 2,3-DHBA'e MCF-7 meme kanser hücrelerine göre daha duyarlı olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca 2,3-DHBA için L-929 sağlıklı fibroblast hücreleri için tüm zaman noktalarında gözlenen IC₅₀ değerleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri için gözlenen IC₅₀ değerlerinden daha yüksek bulunduğundan; 2,3-DHBA, L-929 sağlıklı fibroblast hücre

hattında canlı hücre sayısını kanserli hücelere göre daha az etkilediği, yani kanserli hücre ve sağlıklı hücre arasında seçici davrandığı gözlenmiştir.

4.2.Lipidomiks Analiz

4.2.1. İnorganik Fosfat Tayini

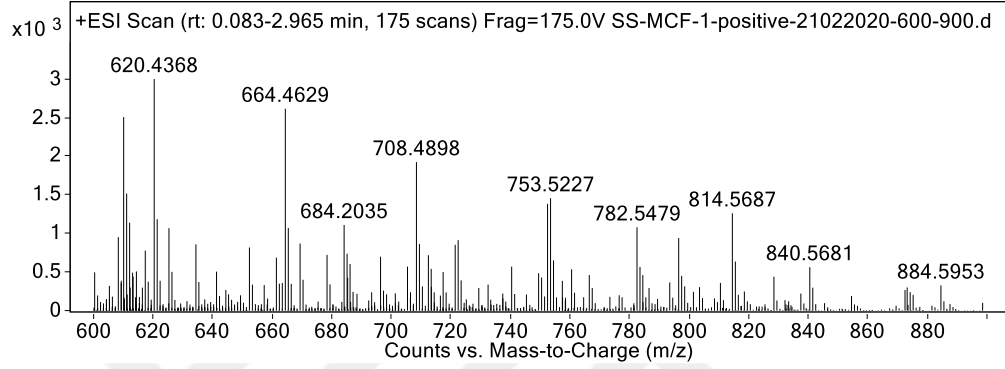
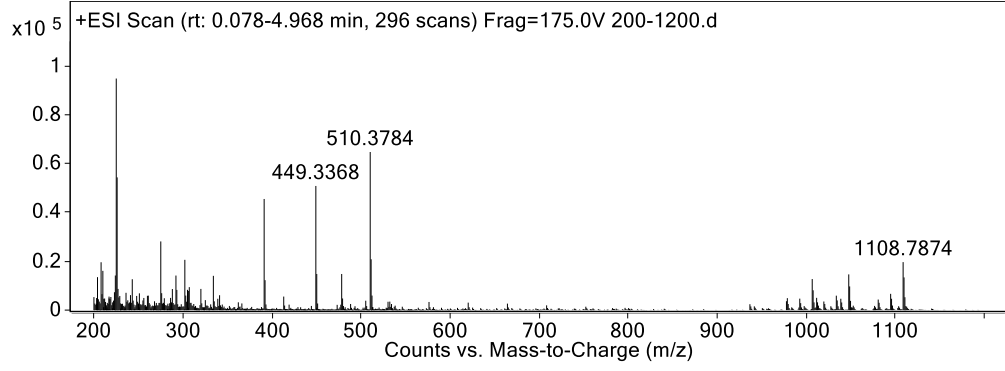
2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişim değerinun uygulandığı MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücelerinden Bligh-Dyer yöntemi ile yapılan lipid izolasyonundan elde edilen örneklerin tamamının derişim normalizasyonunun sağlanması amacıyla, standart fosfor çözeltisi kullanılarak yapılan deney sonucunda aşğıdaki grafik elde edildi (**Şekil 4.4.**). Bu grafikten yararlanılarak örneklerinin fosfor derişimleri normalize edildi ve bir sonraki adımda Q-TOF LC/MS kullanılarak ESI -MS analizleri yapıldı.



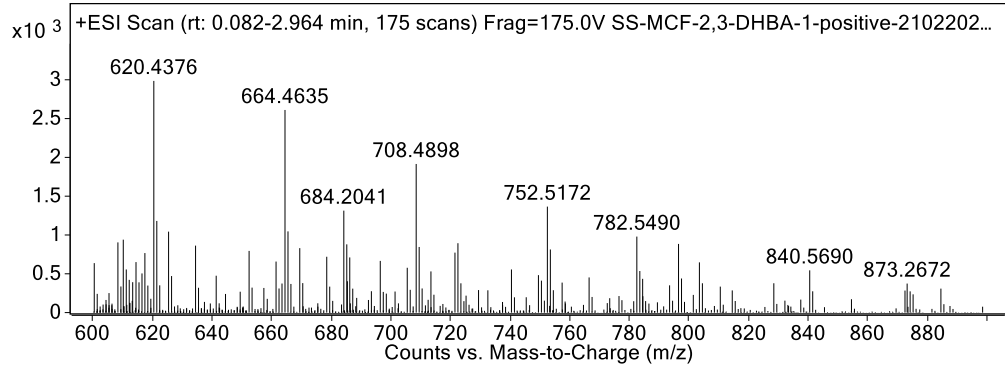
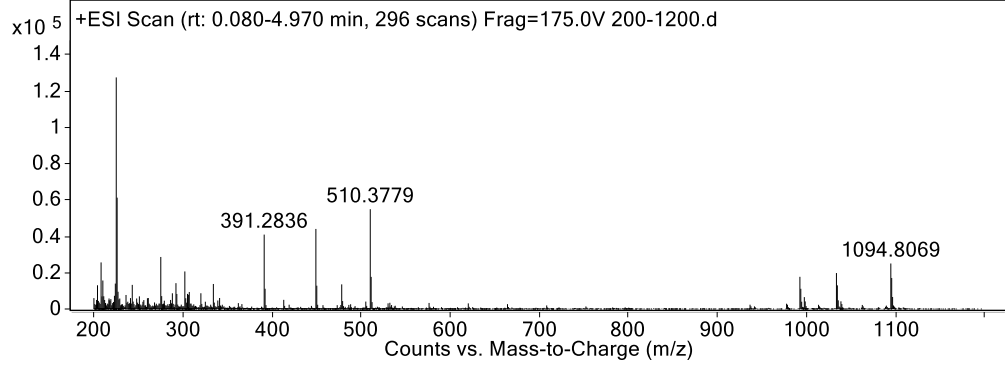
Şekil 4.4. Fosfor standart eğrisi

4.2.2. ESI-MS Analizi

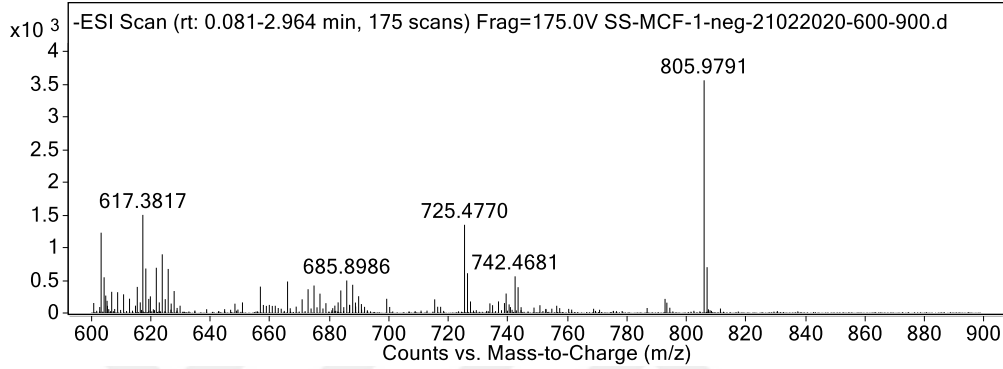
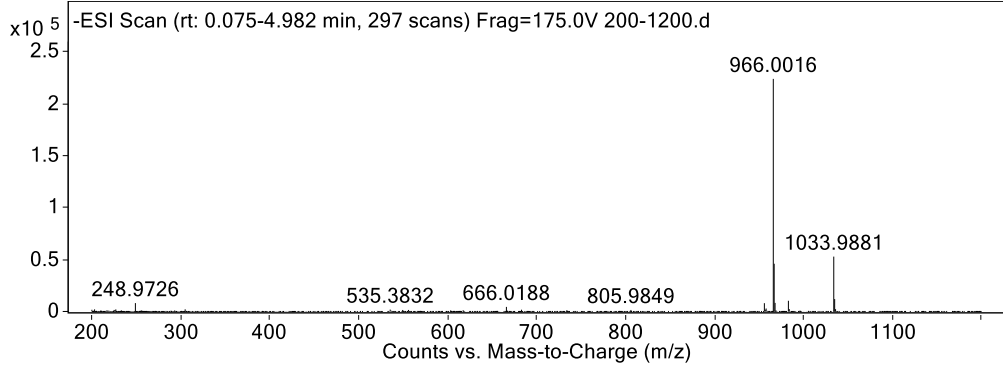
Lipit örnekleri kloroform:metanol içinde hazırlandı. ESI-MS analizi Agilent technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS kütle spektrometresi kullanılarak deneysel kısımda belirtilen koşullarda pozitif ve negatif iyon modunda yapıldı. MCF-7 ve MDAMB-231 meme kanser hüceleri için; **Şekil 4.5., 4.6., 4.9. ve 4.10.**'da pozitif iyon modunda elde edilen **Şekil 4.7., 4.8., 4.11. ve 4.12**'de ise negatif iyon modunda elde edilen spektrumlarına ait bireer adet örnek verilmiştir.



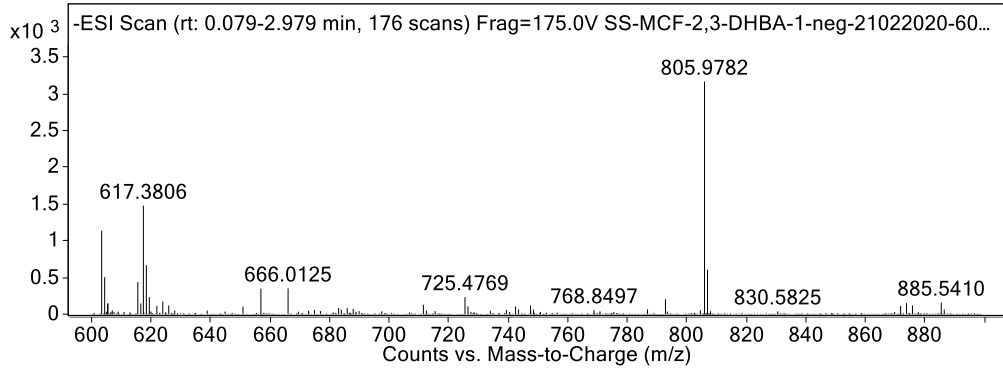
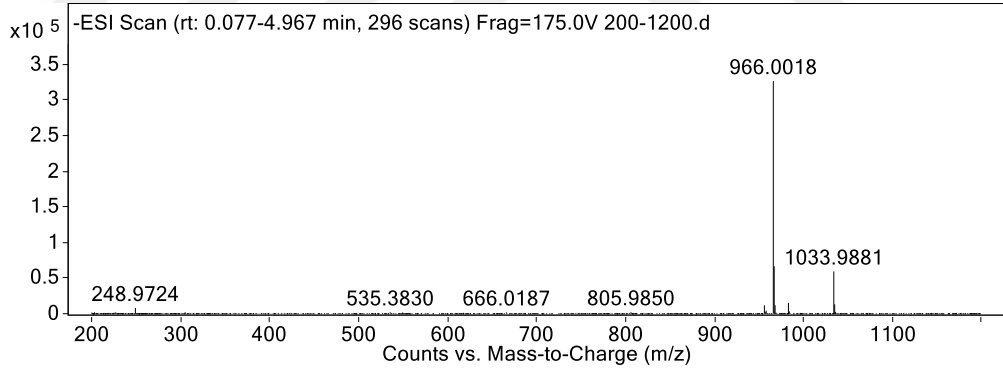
Şekil 4.5. Kontrol MCF-7 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)



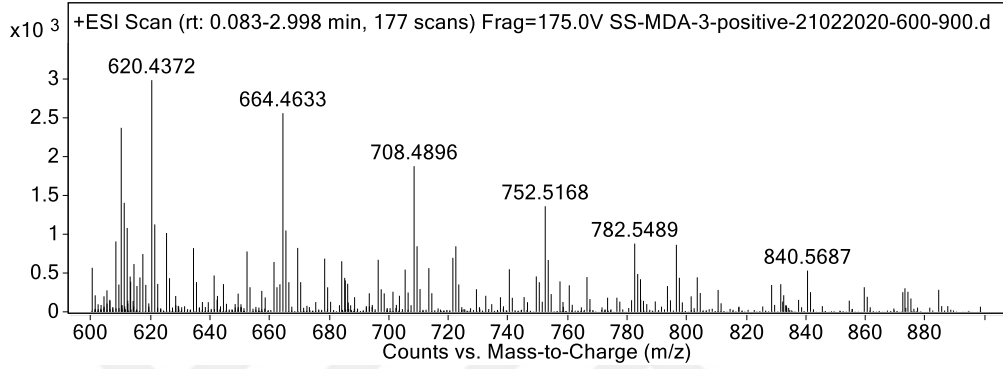
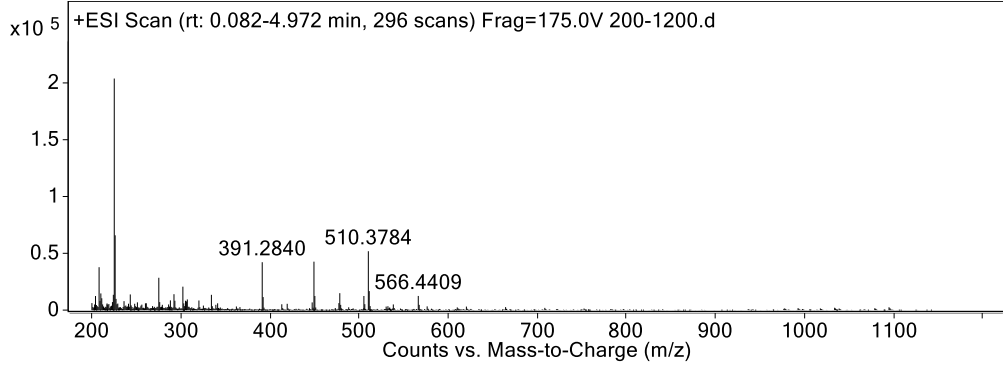
Şekil 4.6. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)



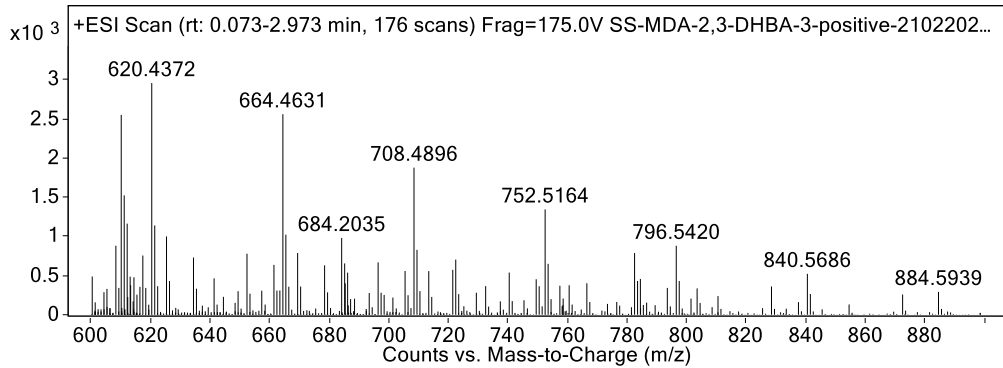
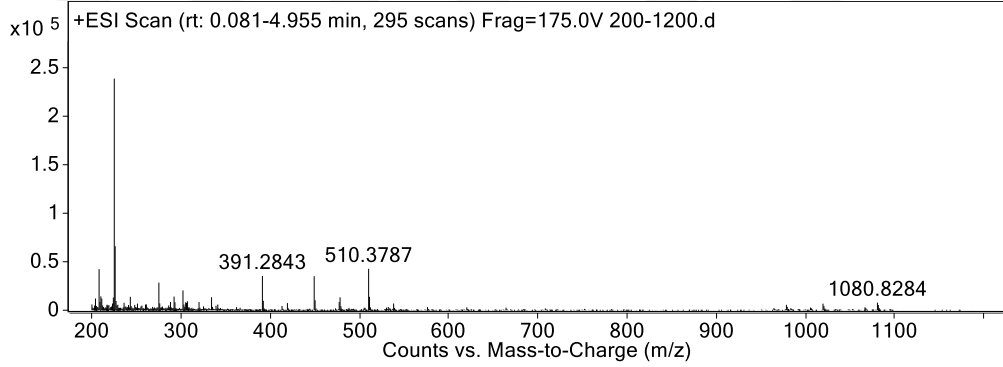
Şekil 4.7. Kontrol MCF-7 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)



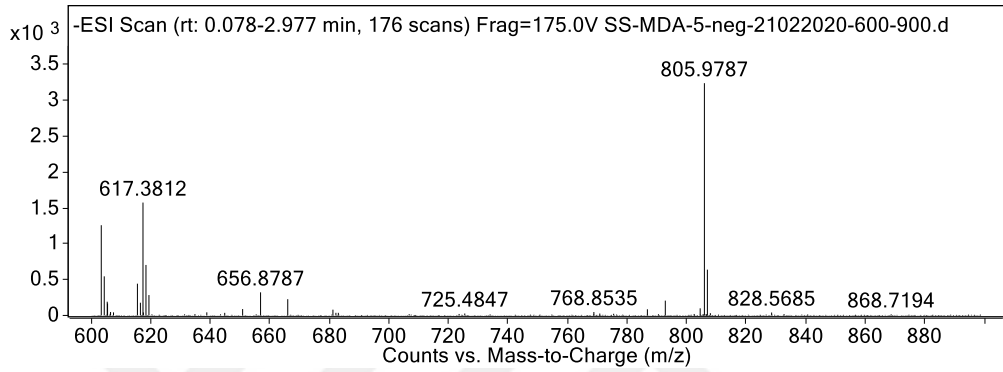
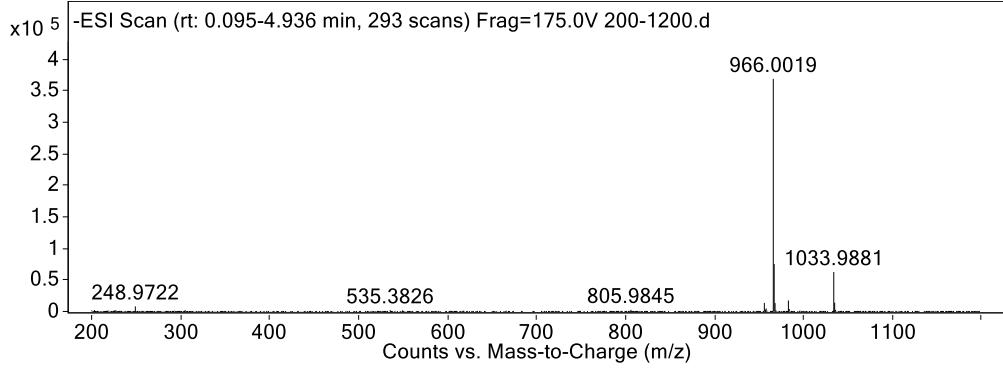
Şekil 4.8. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)



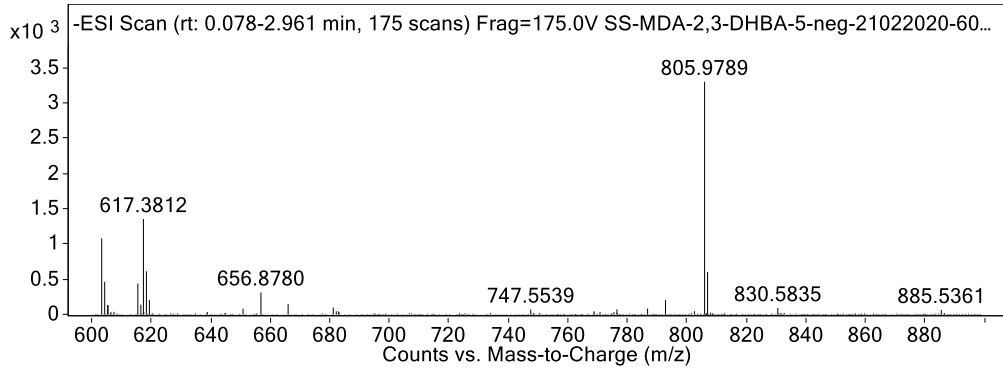
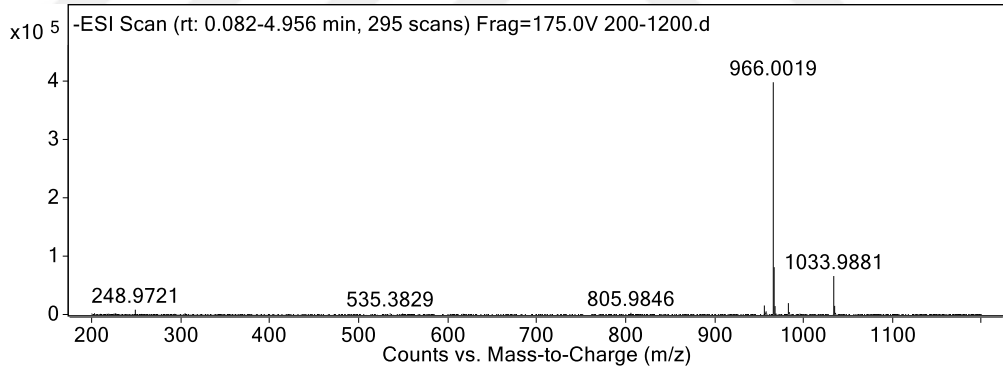
Şekil 4.9. Kontrol MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)



Şekil 4.10. 2,3-DHBA'nin 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)



Şekil 4.11. Kontrol MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin negative iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)

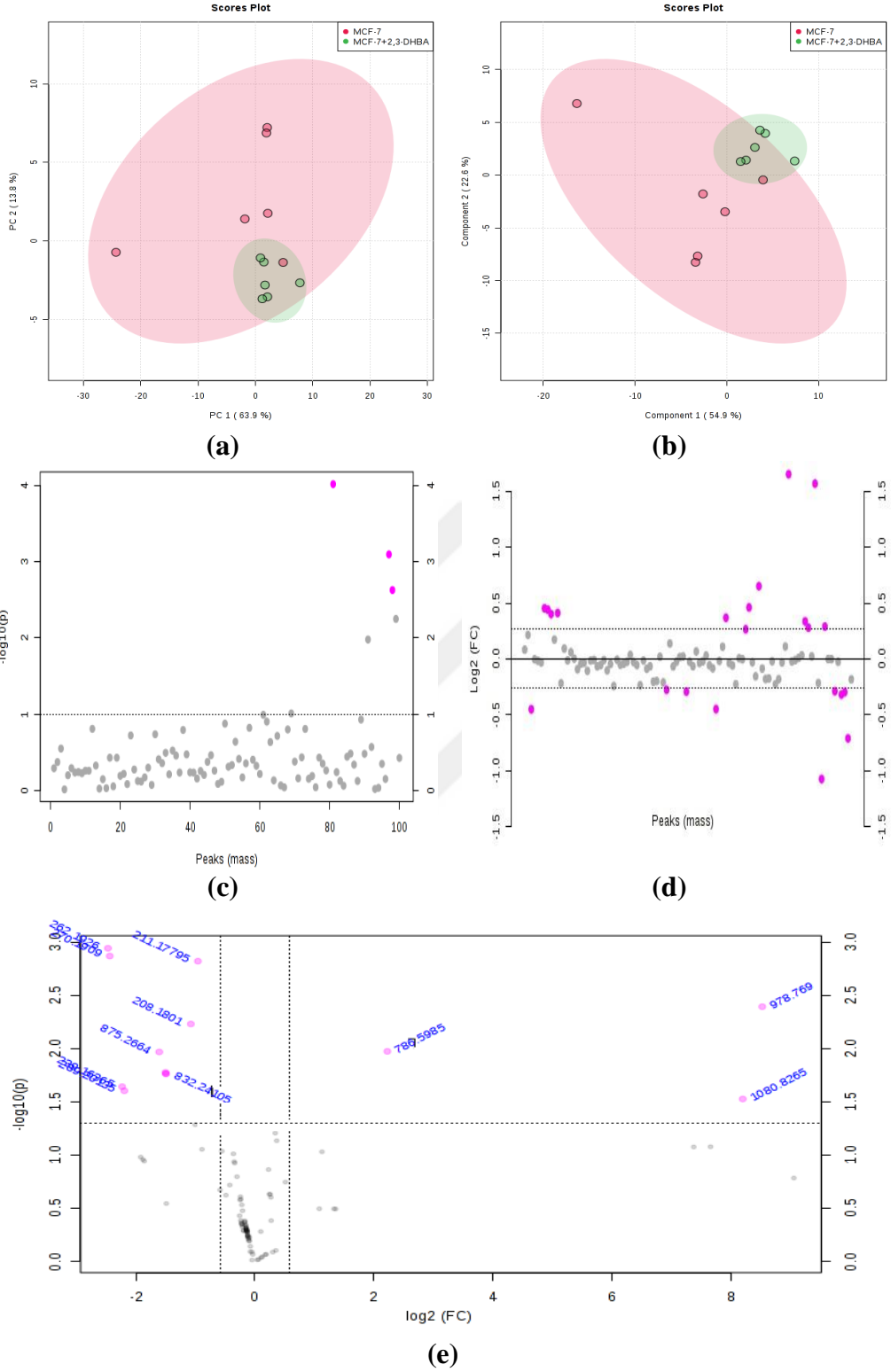


Şekil 4.12. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu spektrumları (m/z 200-1200; m/z 300-600)

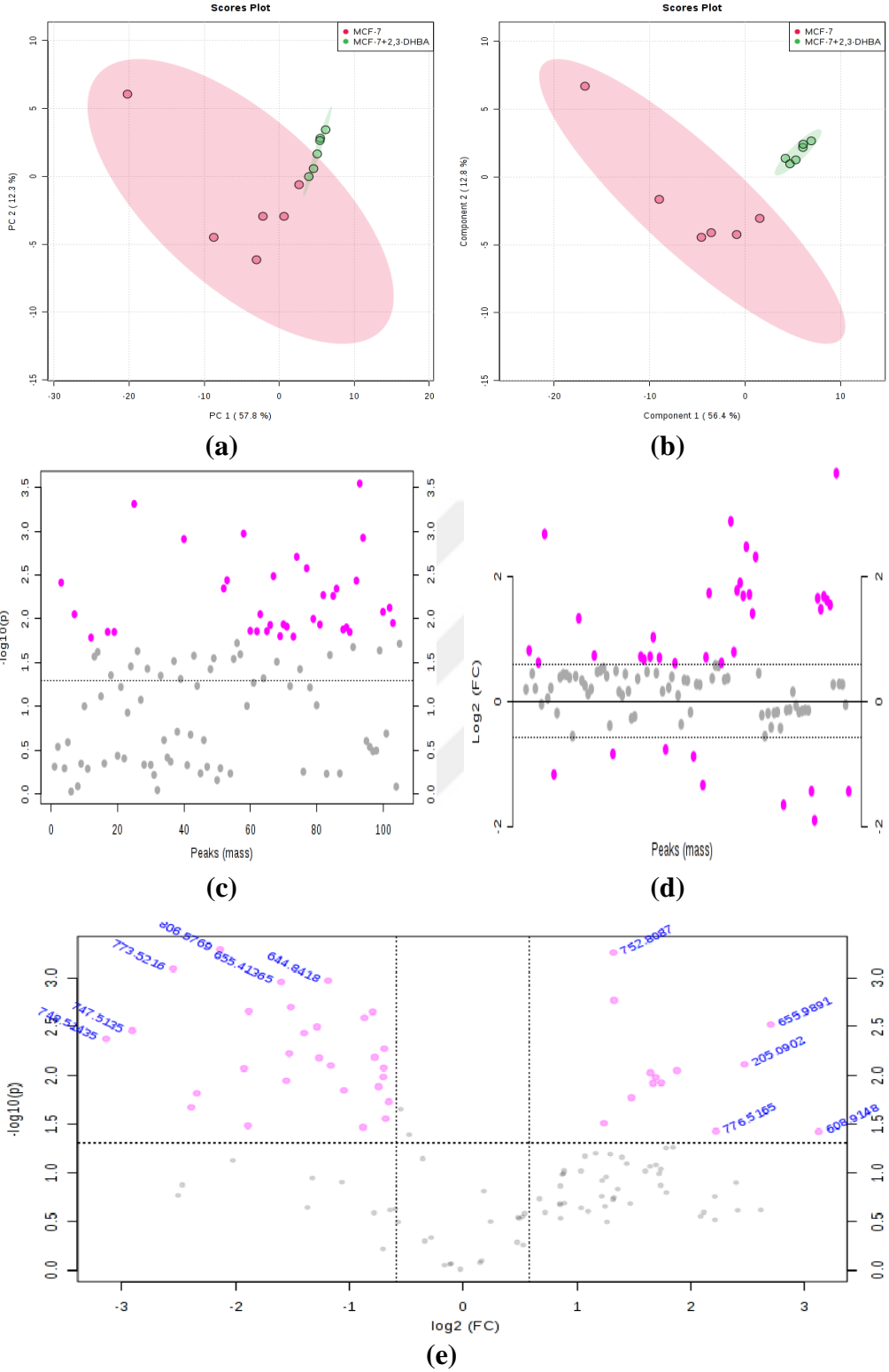
4.2.3.Lipidler İçin ok Değişkenli İstatistik Analizler;

ESI-MS analizi sonucunda elde edilen veriler, deneysel kısımda verilen parametreler kullanılarak MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) ve Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>) veri tabanları yardımıyla analiz edildi.

MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) programı ile öncelikle çalışılan gruplar arasında fark olup olmadığı, **Şekil 4.5 – 4.12**'deki spektrumlardan elde edilen excel verilerine Temel bileşen analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (PLS-DA) gibi çok değişkenli analizler yapılarak belirlendi (**Şekil 4.13(a,b) – 4.14(a,b), Şekil 4.16(a,b) – 4.17(a,b)**). t-testi uygulanarak gruplar arasında farklı olan lipid türlerin ayrımı sağlandı (**Şekil 4.13(c) – 4.14(c), Şekil 4.16(c) – 4.17(c)**). Değişkenlik kat eşiği 1.5 ve p-değeri 0.05 alınarak, gruplar arasında farklı olan lipid türlerinden (t-testi ile saptanan) bu değişkenlik oranına sahip olan lipidler belirlendi (**Şekil 4.13(d) – 4.14(d), Şekil 4.16(d) – 4.17(d)**). t-testi ile kat değişimi grafiklerinin logaritması birleştirilerek gruplar arasında değişen lipid türlerinin kütle/yük (m/z) oranlarını sayısal olarak veren Volcano Plot grafiği (**Şekil 4.13(e) – 4.14 (e), Şekil 4.16(e) – 4.17(e)**) elde edildi. Volcano plot grafiğinden elde edilen m/z değerleri Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>) programı ile analiz edilerek, bu m/z değerlerine karşılık gelen lipid türlerinin MS-MS doğrulanması yapılarak yapıları ve sınıfları belirlendi (**Tablo 4.2. – 4.5.**).



Şekil 4.13. MCF-7 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu (a) Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve (b) Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) (c) t-testi ve (d) Kat değişim (Fold change, FC), (e) Volcano Plot (VC) grafikleri



Şekil 4.14. MCF-7 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin negatif iyon modu (a) Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve (b) Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) (c) t-testi ve (d) Kat değişim (Fold change, FC), (e) Volcano Plot (VC) grafikleri

Tablo 4.2. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi^a [M+H]⁺

m/z	Lipid Sınıf Kodu ^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü ^b
208,18	LMFA08010014	Yağ asidi	C ₈ H ₁₈ NS ₂
	LMFA00000040	Yağ asidi	C ₅ H ₁₂ O ₂ S
	LMFA01030244	Yağ asidi	C ₁₃ H ₂₃ O ₂
	LMFA01030963	Yağ asidi	C ₆ H ₅ O ₄ Cl ₂
211,178	LMFA01150037	Yağ asidi	C ₁₂ H ₁₉ O ₃
	LMFA01170107	Yağ asidi	C ₆ H ₁₁ O ₈
	LMFA07010604	Yağ asidi	C ₁₃ H ₂₃ O ₂
215,151	LMFA01031065	Yağ asidi	C ₁₄ H ₁₅ O ₂
	LMFA01050168	Yağ asidi	C ₁₂ H ₂₃ O ₃
	LMFA01060185	Yağ asidi	C ₁₄ H ₂₃ O ₃
239,164	LMFA01150051	Yağ asidi	C ₁₂ H ₁₅ O ₅
	LMFA12000368	Yağ asidi	C ₁₁ H ₁₁ O ₂ S ₂
	LMFA07070041	Yağ asidi	C ₁₂ H ₂₄ NO ₅
262,193	LMFA07070073	Yağ asidi	C ₁₂ H ₂₄ NO ₅
	LMFA07070081	Yağ asidi	C ₁₁ H ₂₀ NO ₆
	LMFA08030039	Yağ asidi	C ₁₄ H ₁₆ NO ₄
270,191	LMFA01120009	Yağ asidi	C ₁₄ H ₂₄ NO ₄
273,189	LMFA01030510	Yağ asidi	C ₁₈ H ₂₅ O ₂
274,181	LMFA07070065	Yağ asidi	C ₁₂ H ₂₀ NO ₆
289,201	LMFA01031034	Yağ asidi	C ₁₈ H ₂₅ O ₃
	LMFA12000356	Yağ asidi	C ₁₅ H ₁₃ O ₂ S ₂
	LMGP01010764	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈ P
	LMGP01020225	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₈₉ NO ₇ P
786,599	LMGP01080001	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₇ NO ₇ P
	LMGP02010709	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₃ NO ₈ P
	LMGP03010136	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₇ NO ₁₀ P
	LMGP03030066	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₈₁ NO ₉ P
	LMGP01010847	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₈₃ NO ₈ P
832,241	LMGP03010454	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₀ P
	LMGP20010046	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₃ NO ₁₁ P
	LMGP01010663	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₁₀₁ NO ₈ P
875,266	LMGP03010525	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₀ P
	LMSP02040010	Sfingolipid	C ₅₇ H ₁₁₂ NO ₄
	LMGL03011720	Gliserolipid	C ₆₄ H ₁₁₃ O ₆
977,775	LMGL03012263	Gliserolipid	C ₆₅ H ₁₀₁ O ₆
	LMGP06010691	Gliserofosfolipid	C ₅₃ H ₁₀₂ O ₁₃ P ₁₃ P
978,769	LMGP13010007	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₂ N ₃ O ₁₅ P ₂
1080,8265	LMSP0502AA03	Sfingolipid	C ₅₆ H ₁₀₆ NO ₁₈

^aVolcano plot analizi ile; 48 saat süresince 2,3-DHBA uygulanan ve uygulama yapılmayan MCF-7 meme kanser hücrelerinin karşılaştırılmasıyla anlamlı olarak değişen m/z değerlerinin (p < 0.05) karşılaştırılması pozitif iyon modu [M+H]⁺. ^bAnlamlı olarak değişen lipid türlerinin m/z değerlerinin Lipid Maps taraması ile değerlanması

Tablo 4.3. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MCF-7 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi^a [M-H]⁻

m/z	Lipid Sınıf Kodu ^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü ^b	
205,0902	LMFA01050442	Yağ asidi	C ₇ H ₉ O ₇	
	LMFA01070034	Yağ asidi	C ₁₁ H ₉ O ₄	
	LMFA01130001	Yağ asidi	C ₈ H ₁₃ O ₂ S ₂	
	LMFA12000343	Yağ asidi	C ₁₁ H ₉ O ₂ S	
217,1225	LMGL03012615	Gliserolipid	C ₉ H ₁₃ O ₆	
229,1412	LMFA12000352	Yağ asidi	C ₁₃ H ₉ S ₂	
	LMFA01010001	Yağ asidi	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	
255,2317	LMFA01060047	Yağ asidi	C ₁₅ H ₂₇ O ₃	
	LMFA01150060	Yağ asidi	C ₁₂ H ₁₅ O ₆	
	LMFA05000009	Yağ asidi	C ₁₇ H ₃₅ O	
	LMFA06000252	Yağ asidi	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	
	LMFA01030186	Yağ asidi	C ₂₄ H ₃₅ O ₂	
355,0776	LMFA01040040	Yağ asidi	C ₁₉ H ₃₁ O ₆	
	LMFA01050077	Yağ asidi	C ₂₂ H ₄₃ O ₃	
	LMFA01170036	Yağ asidi	C ₂₁ H ₃₉ O ₄	
	LMFA03010069	Yağ asidi	C ₂₀ H ₃₅ O ₅	
	LMFA05000082	Yağ asidi	C ₂₃ H ₄₇ O ₂	
	LMFA06000269	Yağ asidi	C ₂₆ H ₂₇ O	
	LMFA08020219	Yağ asidi	C ₁₉ H ₃₅ N ₂ O ₄	
	LMFA08020264	Yağ asidi	C ₂₀ H ₃₉ N ₂ O ₃	
	539,3697	LMFA03120034	Yağ asidi	C ₂₇ H ₃₆ O ₉ Cl
		LMFA08020206	Yağ asidi	C ₃₀ H ₃₉ N ₂ O ₇
551,3998	LMFA01030844	Yağ asidi	C ₃₈ H ₆₃ O ₂	
	LMGL02010360	Gliserolipid	C ₃₄ H ₆₃ O ₅	
556,0005	LMFA01030830	Yağ asidi	C ₃₈ H ₆₇ O ₂	
	LMGL02030029	Gliserolipid	C ₄₁ H ₆₅ O ₃	
605,4828	LMGP10010048	Gliserofosfolipid	C ₃₂ H ₆₂ O ₈ P	
	LMGP10020004	Gliserofosfolipid	C ₃₃ H ₆₆ O ₇ P	
	LMGP20070024	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₀ P	
	LMGP20070032	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₅₀ O ₁₁ P	
	LMGP20020016	Gliserofosfolipid	C ₂₈ H ₄₉ NO ₁₁ P	
606,3652	LMGP20020023	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₅₃ NO ₁₀ P	
	LMGP20020028	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₅₇ NO ₉ P	
	LMGP20040019	Gliserofosfolipid	C ₂₈ H ₄₉ NO ₁₁ P	
	LMGP01050057	Gliserofosfolipid	C ₃₂ H ₆₅ NO ₇ P	
606,4846	LMGP02010058	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₆₁ NO ₈ P	
	LMSP00000016	Sfingolipid	C ₄₀ H ₈₀ NO ₂	
	LMSP02010017	Sfingolipid	C ₃₉ H ₇₆ NO ₃	
	LMSP02010080	Sfingolipid	C ₃₈ H ₇₂ NO ₄	
	LMGL02010007	Gliserolipid	C ₃₇ H ₆₉ O ₅	
607,4824	LMGL02010329	Gliserolipid	C ₃₉ H ₅₉ O ₅	
	LMGP20060022	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₅₂ O ₁₁ P	
608,9148	LMSP02010072	Sfingolipid	C ₃₈ H ₇₄ NO ₄	
	LMGP03060024	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₅₉ NO ₉ P	
	LMGP20020017	Gliserofosfolipid	C ₂₈ H ₅₁ NO ₁₁ P	
	LMFA08020175	Yağ asidi	C ₂₅ H ₄₇ N ₆ O ₈	
615,5169	LMGL02010063	Gliserolipid	C ₃₉ H ₆₇ O ₅	
	LMGP10010051	Gliserofosfolipid	C ₃₃ H ₆₀ O ₈ P	
	LMGP10030006	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₄ O ₇ P	
	LMSP04000001	Sfingolipid	C ₃₄ H ₆₈ N ₂ O ₅ P	

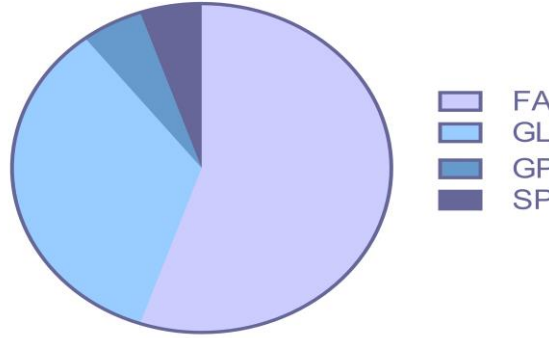
m/z	Lipid Sınıf Kodu^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü^b
616,5143	LMGL02070005	Gliserolipid	C ₄₀ H ₇₁ O ₄
	LMGP20020040	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₅₁ NO ₁₀ P
	LMSP00000022	Sfingolipid	C ₃₄ H ₆₆ NO ₆ S
	LMSP02050002	Sfingolipid	C ₃₄ H ₆₇ NO ₆ P
617,5099	LMGP06050026	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₄₆ O ₁₂ P
	LMGP10020007	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₆ O ₇ P
	LMGP20070002	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₄ O ₁₀ P
	LMSP03020066	Sfingolipid	C ₃₂ H ₆₂ N ₂ O ₇ P
619,3821	LMGL02070007	Gliserolipid	C ₄₁ H ₆₃ O ₄
	LMGP06050006	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₄₈ O ₁₂ P
	LMGP10010890	Gliserofosfolipid	C ₃₃ H ₆₄ O ₈ P
	LMGP10020006	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₈ O ₇ P
	LMGP20070001	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₆ O ₁₀ P
634,8158	LMGP01010001	Gliserofosfolipid	C ₃₃ H ₆₅ NO ₈ P
	LMGP02020022	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₉ NO ₇ P
	LMGP20010012	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₇ NO ₁₀ P
	LMGP20020043	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₅₃ NO ₁₁ P
	LMGP20040010	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₄₉ NO ₁₂ P
	LMSP00000015	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₄ NO ₂
	LMSP02010021	Sfingolipid	C ₄₁ H ₈₀ NO ₃
LMSP02010093	Sfingolipid	C ₄₀ H ₇₆ NO ₄	
638,8238	LMSP02020032	Sfingolipid	C ₄₀ H ₈₀ NO ₄
644,8418	LMGP02010365	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₃ NO ₈ P
	LMGP02030010	Gliserofosfolipid	C ₃₅ H ₆₇ NO ₇ P
655,4137	LMFA13030004		C ₃₆ H ₆₃ O ₁₀
	LMGP06050024	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₆₀ O ₁₂ P
	LMGP10010083	Gliserofosfolipid	C ₃₆ H ₆₄ O ₈ P
	LMGP10020079	Gliserofosfolipid	C ₃₇ H ₆₈ O ₇ P
	LMSP03020033	Sfingolipid	C ₃₆ H ₆₈ N ₂ O ₆ P
656,8771	LMGP02010367	Gliserofosfolipid	C ₃₅ H ₆₃ NO ₈ P
	LMSP00000025	Sfingolipid	C ₃₇ H ₇₀ NO ₆ S
666,0187	LMGP20040007	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₅₃ NO ₁₃ P
	LMGP20040014	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₇ NO ₁₂ P
	LMSP0501AA54	Sfingolipid	C ₃₈ H ₆₈ NO ₈
667,021	LMGP10010065	Gliserofosfolipid	C ₃₇ H ₆₄ O ₈ P
	LMGP20050014	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₆ O ₁₃ P
683,0088	LMGP10010151	Gliserofosfolipid	C ₃₈ H ₆₈ O ₈ P
	LMGP20050015	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₆ O ₁₄ P
706,8112	LMGP02010445	Gliserofosfolipid	C ₃₉ H ₆₅ NO ₈ P
	LMGP03010889	Gliserofosfolipid	C ₃₆ H ₆₉ NO ₁₀ P
	LMGP03020005	Gliserofosfolipid	C ₃₇ H ₇₃ NO ₉ P
	LMSP02020028	Sfingolipid	C ₄₆ H ₉₂ NO ₃
734,0059	LMGP02010533	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₆₉ NO ₈ P
	LMGP03010029	Gliserofosfolipid	C ₃₈ H ₇₃ NO ₁₀ P
747,5135	LMGL03012646	Gliserolipid	C ₄₇ H ₈₇ O ₆
	LMGP04010002	Gliserofosfolipid	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P
	LMGP04020011	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₈₀ O ₉ P
	LMGP10010039	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₇₂ O ₈ P
	LMGP15040002	Gliserofosfolipid	C ₃₂ H ₆₀ O ₁₇ P
748,5144	LMGP20040036	Gliserofosfolipid	C ₃₆ H ₆₃ NO ₁₃ P
	LMGP01010447	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₁ NO ₈ P
750,5376	LMSP03030150	Sfingolipid	C ₃₈ H ₇₃ NO ₁₁ P

m/z	Lipid Sınıf Kodu^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü^b
752,8087	LMGP01010506	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₅ NO ₈ P
	LMGP01020026	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₇₉ NO ₇ P
	LMGP01040092	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₃ NO ₆ P
	LMGP02020037	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₇₉ NO ₇ P
	LMGP03010131	Gliserofosfolipid	C ₄₀ H ₆₇ NO ₁₀ P
768,851	LMSP05010052	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₂ NO ₉
	LMSP0501AA31	Sfingolipid	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈
	LMGP01011423	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₇₉ NO ₈ P
	LMGP01020053	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₃ NO ₇ P
	LMGP03010091	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₇₁ NO ₁₀ P
	LMGP03020031	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₅ NO ₉ P
	LMSP05010070	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₄ NO ₉
770,8552	LMGP01011360	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₈₁ NO ₈ P
	LMGP01020188	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₅ NO ₇ P
	LMGP01040088	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₇ NO ₆ P
	LMGP02080002	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₃ NO ₇ P
	LMGP03010153	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₇₃ NO ₁₀ P
	LMGP03020029	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₇ NO ₉ P
	LMGL00000134	Gliserolipid	C ₄₆ H ₇₆ NO ₈
	LMGP04110002	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₀ O ₉ P
	LMGP06010024	Gliserofosfolipid	C ₃₉ H ₆₆ O ₁₃ P
773,5216	LMGP15040007	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₇ P
	LMSP05010076	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₆ NO ₉
	LMGP10010835	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₄ O ₈ P
	LMGP04100003	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P
	LMGL05010001	Gliserolipid	C ₄₅ H ₇₃ O ₁₀
	LMGP01010401	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₈₅ NO ₈ P
	LMGP01020023	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₉ NO ₇ P
774,7834	LMSP02040003	Sfingolipid	C ₅₀ H ₉₆ NO ₄
	LMGP04110003	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₂ O ₉ P
	LMGP06010022	Gliserofosfolipid	C ₃₉ H ₆₈ O ₁₃ P
775,4956	LMGP15040006	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₄ O ₁₇ P
	LMGP04010037	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₈₀ O ₁₀ P
	LMGP04020033	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₈₄ O ₉ P
775,5	LMGP10010585	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₆ O ₈ P
	LMGP01010512	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₅ NO ₈ P
	LMGP02020104	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₉ NO ₇ P
776,5165	LMGP03010088	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₇₉ NO ₁₀ P
	LMGP03020070	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₈₃ NO ₉ P
	LMGP01010750	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈ P
	LMGP01020208	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₈₉ NO ₇ P
786,8336	LMGP01080003	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₇ NO ₇ P
	LMGP02010767	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₃ NO ₈ P
	LMSP05010044	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₀
	LMGP01011460	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₉ NO ₈ P
	LMGP01020066	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₃ NO ₇ P
792,8503	LMGP03010160	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₇₁ NO ₁₀ P
	LMGP03020088	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₅ NO ₉ P
	LMGP01010645	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₁ NO ₈ P
	LMGP02030091	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₅ NO ₇ P
806,5769	LMGP03010043	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₃ NO ₁₀ P
	LMGP20020004	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₇ NO ₉ P
	LMSP03030154	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₁ P
	LMSP06020001	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ S

m/z	Lipid Sınıf Kodu ^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü ^b
807,981	LMGL03012734	Gliserolipid	C ₅₂ H ₈₇ O ₆
	LMGP04010306	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₀ P
	LMGP04020083	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₀ O ₉ P
	LMGP06010027	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₇₆ O ₁₃ P
	LMGP06020009	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₈₀ O ₁₂ P
807,981	LMGP10010723	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₄ O ₈ P
	LMGP20050035	Gliserofosfolipid	C ₃₉ H ₆₈ O ₁₅ P
	LMSP03030007	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₃ NO ₁₁ P
885,541	LMGP06010010	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P
886,5455	LMGP03010786	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₈₁ NO ₁₀ P
964,7116	LMSP03030023	Sfingolipid	C ₅₂ H ₁₀₃ NO ₁₂ P
1003,977	LMGL03012162	Gliserolipid	C ₆₆ H ₁₁₅ O ₆
	LMGL03012500	Gliserolipid	C ₆₇ H ₁₀₃ O ₆
1033,682	LMGL03012468	Gliserolipid	C ₆₈ H ₁₂₁ O ₆
	LMGL03012580	Gliserolipid	C ₆₉ H ₁₀₉ O ₆
1047,906	LMGL03012466	Gliserolipid	C ₆₉ H ₁₂₃ O ₆

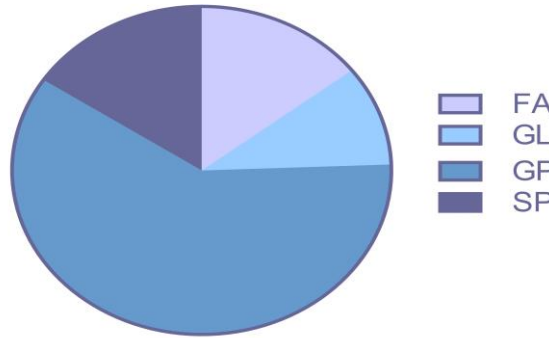
^aVolcano plot analizi ile; 48 saat süresince 2,3-DHBA uygulanan ve uygulama yapılmayan MCF-7 meme kanser hücrelerinin karşılaştırılmasıyla anlamlı olarak değişen m/z değerlerinin (p < 0.05) karşılaştırılması negatif iyon modu [M-H]⁻. ^bAnlamlı olarak değişen lipid türlerinin m/z değerlerinin Lipid Maps taraması ile doğrulanması

MCF-7 + 2,3 DHBA



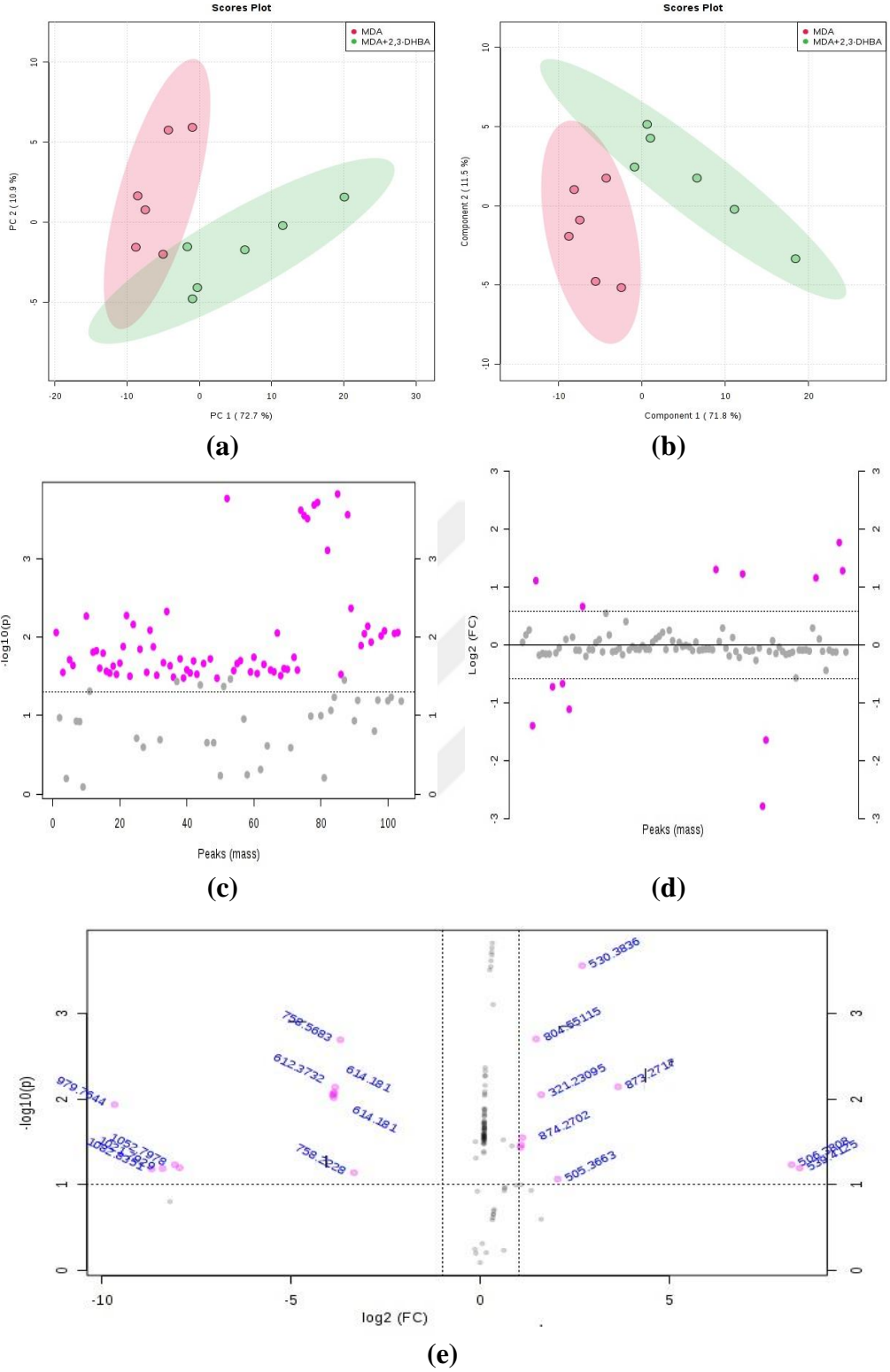
(a)

MCF-7 + 2,3 DHBA

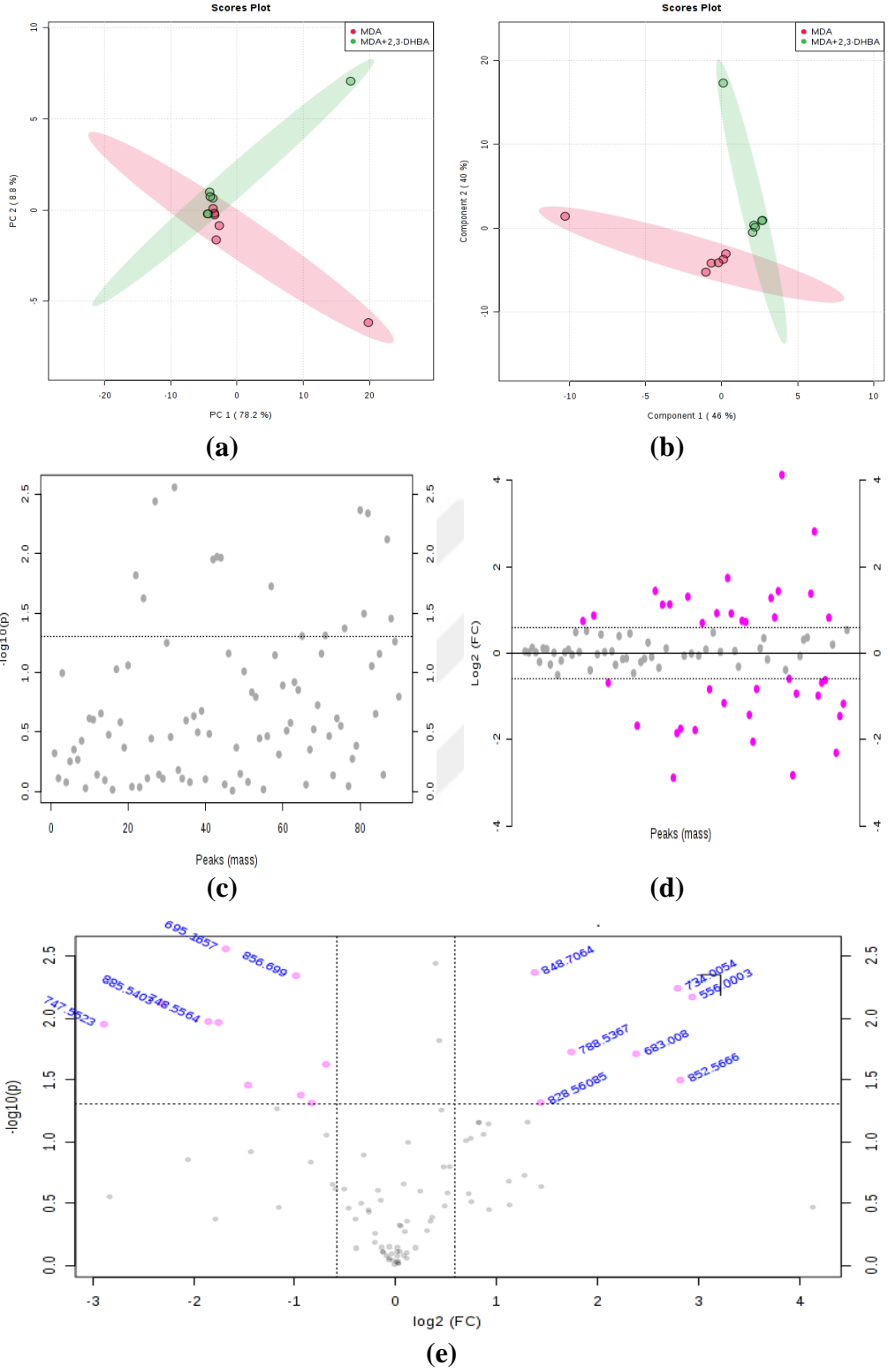


(b)

Şekil 4.15. MCF-7 meme kanser hücrelerine 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişimi uygulanmasında değişen lipid türleri (a) pozitif iyon modu (b) negatif iyon modu (FA:Yağ asidi, GL:Gliserolipid, GP:Gliserofosfolipid, SP:Sfingolipid)



Şekil 4.16. MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'nin 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu **(a)** Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve **(b)** Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) **(c)** t-testi ve **(d)** Kat değişim (Fold change, FC), **(e)** Volcano Plot (VC) grafikleri



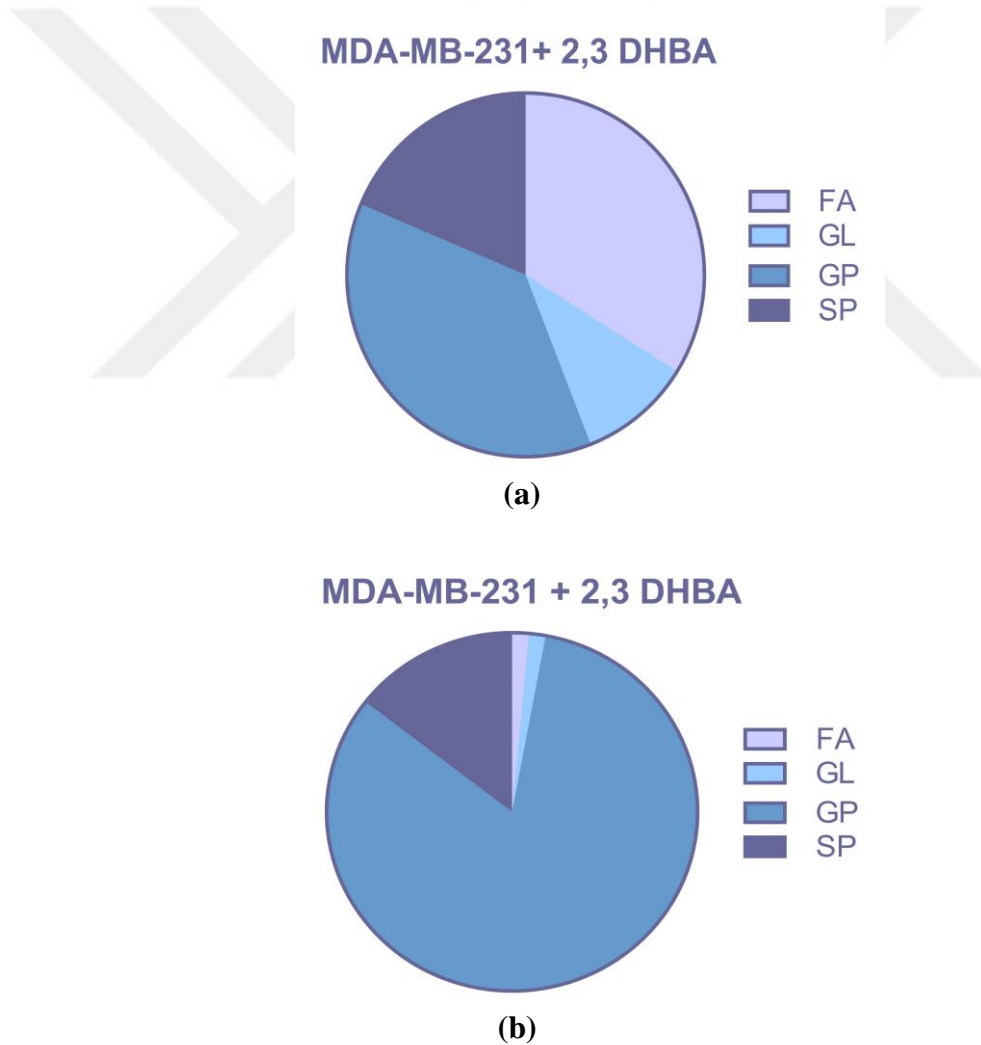
Şekil 4.17. MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'nin 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin pozitif iyon modu (a) Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve (b) Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) (c) t-testi ve (d) Kat değişim (Fold change, FC), (e) Volcano Plot (VC) grafikleri

Tablo 4.4. 2,3-DHBA'in 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi^a [M+H]⁺

m/z	Lipid Sınıf Kodu ^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü ^b
235,1762	LMFA01090008	Yağ asidi	C ₁₂ H ₂₄ O ₂ C ₁
	LMFA01090080	Yağ asidi	C ₉ H ₁₆ O ₂
	LMFA01140064	Yağ asidi	C ₁₅ H ₂₃ O ₂
	LMFA06000156	Yağ asidi	C ₁₄ H ₁₉ O ₃
	LMFA12000354	Yağ asidi	C ₁₂ H ₁₁ OS ₂
245,1809	LMFA00000009	Yağ asidi	C ₁₂ H ₂₅ N ₂ O ₃
	LMFA01030703	Yağ asidi	C ₁₆ H ₂₁ O ₂
	LMFA01050445	Yağ asidi	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₅
	LMFA01150045	Yağ asidi	C ₁₄ H ₁₃ O ₄
	LMFA01170010	Yağ asidi	C ₁₃ H ₂₅ O ₄
	LMFA05000019	Yağ asidi	C ₁₇ H ₂₅ O
285,2044	LMFA01050459	Yağ asidi	C ₁₈ H ₂₁ O ₃
	LMFA01150068	Yağ asidi	C ₁₄ H ₂₁ O ₆
	LMFA12000363	Yağ asidi	C ₁₂ H ₁₃ O ₄ S ₂
321,231	LMFA01030678	Yağ asidi	C ₂₂ H ₂₅ O ₂
	LMFA01090112	Yağ asidi	C ₁₆ H ₁₈ O ₂
511,3819	LMGP20070018	Gliserofosfolipid	C ₂₃ H ₄₄ O ₁₀ P
512,3858	LMGP03010021	Gliserofosfolipid	C ₂₂ H ₄₃ NO ₁₀ P
	LMGP03050030	Gliserofosfolipid	C ₂₃ H ₄₇ NO ₉ P
612,3732	LMGP03060022	Gliserofosfolipid	C ₃₀ H ₆₃ NO ₉ P
	LMGP20040016	Gliserofosfolipid	C ₂₇ H ₅₁ NO ₁₂ P
	LMSP02020031	Sfingolipid	C ₃₈ H ₇₈ NO ₄
614,181	LMSP02030033	Sfingolipid	C ₃₇ H ₇₆ NO ₅
619,443	LMFA00000026	Yağ asidi	C ₂₄ H ₄₄ O ₅ SC ₁₅
	LMFA00000049	Yağ asidi	C ₃₂ H ₅₉ O ₁₁
	LMFA08020171	Yağ asidi	C ₂₇ H ₅₁ N ₆ O ₁₀
	LMFA13010023	Yağ asidi	C ₃₄ H ₆₇ O ₉
	LMGP06050026	Gliserofosfolipid	C ₂₉ H ₄₈ O ₁₂ P
	LMGP10010072	Gliserofosfolipid	C ₃₃ H ₆₄ O ₈ P
	LMGP10020007	Gliserofosfolipid	C ₃₄ H ₆₈ O ₇ P
	LMGP20070002	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₆ O ₁₀ P
	LMSP03020066	Sfingolipid	C ₃₂ H ₆₄ N ₂ O ₇ P
	758,5683	LMGP01010585	Gliserofosfolipid
LMGP01020201		Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₈₅ NO ₇ P
LMGP02040014		Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₇ NO ₆ P
LMGP03030038		Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₇₇ NO ₉ P
LMSP02050010		Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₉ NO ₆ P
LMSP05010059		Sfingolipid	C ₄₃ H ₈₄ NO ₉
LMSP0501AA20		Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈
804,5512		LMGP00000048	Gliserofosfolipid
	LMGP01010696	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₉ NO ₈ P
	LMGP01010975	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₉₁ NO ₈ P
	LMGP01020060	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₉₅ NO ₇ P
	LMGP02030092	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₃ NO ₇ P
	LMGP03020015	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₇ NO ₉ P
	LMSP02040004	Sfingolipid	C ₅₂ H ₁₀₂ NO ₄
	LMSP05010083	Sfingolipid	C ₄₅ H ₉₀ NO ₁₀
	873,2717	LMGL03016884	Gliserolipid

m/z	Lipid Sınıfı ^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü ^b
978,7616	LMGP13010007	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₂ N ₃ O ₁₅ P
	LMGP13010007	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₂ N ₃ O ₁₅ P
979,7644	LMGL03011721	Gliserolipid	C ₆₄ H ₁₁₅ O ₆
	LMGL03012217	Gliserolipid	C ₆₅ H ₁₀₃ O ₆
	LMGL03015976	Gliserolipid	C ₆₄ H ₁₁₅ O ₆
	LMGL03016504	Gliserolipid	C ₆₅ H ₁₀₃ O ₆
	LMGP06010915	Gliserofosfolipid	C ₅₃ H ₁₀₄ O ₁₃ P
1019,787	LMGL03012213	Gliserolipid	C ₆₇ H ₁₁₉ O ₆
	LMSP0601AA02	Sfingolipid	C ₅₃ H ₉₉ N ₂ O ₁₆
1020,79	LMSP05010036	Sfingolipid	C ₅₈ H ₁₀₂ NO ₁₃
1080,829	LMSP0502AA03	Sfingolipid	C ₅₆ H ₁₀₆ NO ₁₈

^aVolcano plot analizi ile; 48 saat süresince 2,3-DHBA uygulanan ve uygulama yapılmayan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin karşılaştırılmasıyla anlamlı olarak değişen m/z değerlerinin ($p < 0.05$) karşılaştırılması pozitif iyon modu [M+H]⁺ ^bAnlamlı olarak değişen lipid türlerinin m/z değerlerinin Lipid Maps taraması ile doğrulanması



Şekil 4.18. MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine 2,3-DHBA'ın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişimi uygulanmasında değişen lipid türleri **(a)** pozitif iyon modu **(b)** negatif iyon modu (FA:Yağ asidi, GL:Gliserolipid, GP:Gliserofosfolipid, SP:Sfingolipid)

Tablo 4.5. 2,3-DHBA'nin 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin lipid profil değişimi^a [M-H]⁻

m/z	Lipid Sınıf Kodu ^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü ^b
556,0003	LMFA01030830	Yağ asidi	C ₃₈ H ₆₇ O ₂
647,2407	LMGP06050013	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₂ O ₁₂ P
	LMGP10010012	Gliserofosfolipid	C ₃₅ H ₆₈ O ₈ P
	LMGP20060025	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₂ O ₁₂ P
	LMSP02010009	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₀ NO ₃
	LMSP03020059	Sfingolipid	C ₃₄ H ₆₈ N ₂ O ₇ P
683,008	LMGP10010151	Gliserofosfolipid	C ₃₈ H ₆₈ O ₈ P
	LMGP20050015	Gliserofosfolipid	C ₃₁ H ₅₆ O ₁₄ P
695,1657	LMGP10010025	Gliserofosfolipid	C ₃₉ H ₆₈ O ₈ P
	LMGP20050022	Gliserofosfolipid	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₄ P
	LMSP02020018		C ₄₄ H ₈₈ NO ₄
734,0054	LMGP02010533	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₆₉ NO ₈ P
	LMGP03010029	Gliserofosfolipid	C ₃₈ H ₇₃ NO ₁₀ P
747,5523	LMGL03012646	Gliserolipid	C ₄₇ H ₈₇ O ₆
	LMGP04010002	Gliserofosfolipid	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P
	LMGP04020011	Gliserofosfolipid	C ₄₁ H ₈₀ O ₉ P
	LMGP10010039	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₇₂ O ₈ P
	LMGP15040002	Gliserofosfolipid	C ₃₂ H ₆₀ O ₁₇ P
748,5564	LMGP20040036	Gliserofosfolipid	C ₃₆ H ₆₃ NO ₁₃ P
	LMGP01010447	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₁ NO ₈ P
750,532	LMSP03030150	Sfingolipid	C ₃₈ H ₇₃ NO ₁₁ P
	LMGP01010006	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₈₇ NO ₈ P
	LMGP01011461	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₅ NO ₈ P
	LMGP01020080	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₉₁ NO ₇ P
788,5367	LMGP01030015	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₉ NO ₇ P
	LMGP03010025	Gliserofosfolipid	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₀ P
	LMGP03020033	Gliserofosfolipid	C ₄₃ H ₈₃ NO ₉ P
	LMSP05010079	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₆ NO ₁₀
	LMGP01010645	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₁ NO ₈ P
	LMGP02030091	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₅ NO ₇ P
806,2032	LMGP03010043	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₃ NO ₁₀ P
	LMGP20020004	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₇₇ NO ₉ P
	LMSP03030154	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₁ P
	LMSP06020001	Sfingolipid	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ S
	LMGP01010947	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₇₉ NO ₈ P
828,5609	LMGP01011518	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₉₁ NO ₈ P
	LMGP01020213	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₉₅ NO ₇ P
	LMGP02010287	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₉₁ NO ₈ P
	LMGP03010246	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₈₃ NO ₁₀ P
	LMGP03010396	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₁ NO ₁₀ P
	LMGP03020039	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₈₇ NO ₉ P
	LMGP20010043	Gliserofosfolipid	C ₄₄ H ₇₉ NO ₁₁ P
	LMGP01010821	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₈₃ NO ₈ P
832,5941	LMGP03010045	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₀ P
	LMGP03010244	Gliserofosfolipid	C ₄₅ H ₈₇ NO ₁₀ P
	LMGP03010395	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₇₅ NO ₁₀ P
	LMGP03020059	Gliserofosfolipid	C ₄₆ H ₉₁ NO ₉ P
	LMSP0501AB12	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₂ NO ₁₃
	LMGP01011785	Gliserofosfolipid	C ₄₉ H ₈₇ NO ₈ P
848,7064	LMGP01030103	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₉₁ NO ₇ P
	LMGP03010479	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₇₉ NO ₁₀ P
	LMGP03020093	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₈₃ NO ₉ P

m/z	Lipid Sınıf Kodu^a	Lipid Sınıf Adı	Formülü^b
	LMGP01011058	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₇₉ NO ₈ P
	LMGP01011784	Gliserofosfolipid	C ₄₉ H ₉₁ NO ₈ P
	LMGP01020252	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₉₅ NO ₇ P
	LMGP03010478	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₃ NO ₁₀ P
852,5666	LMGP03010840	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₇₁ NO ₁₀ P
	LMGP03020068	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₈₇ NO ₉ P
	LMGP04010556	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₈₄ O ₁₀ P
	LMSP03030014	Sfingolipid	C ₄₄ H ₈₇ NO ₁₂ P
	LMGP01011752	Gliserofosfolipid	C ₄₉ H ₉₅ NO ₈ P
	LMGP01011865	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₈₃ NO ₈ P
	LMGP01020241	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₉₉ NO ₇ P
856,699	LMGP03010477	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₇ NO ₁₀ P
	LMGP03010619	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₇₅ NO ₁₀ P
	LMGP03020067	Gliserofosfolipid	C ₄₈ H ₉₁ NO ₉ P
	LMSP05010046	Sfingolipid	C ₄₉ H ₉₄ NO ₁₀
885,5403	LMGP06010010	Gliserofosfolipid	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P
886,5437	LMGP03010786	Gliserofosfolipid	C ₅₀ H ₈₁ NO ₁₀ P

^aVolcano plot analizi ile; 48 saat süresince 2,3-DHBA uygulanan ve uygulama yapılmayan MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin karşılaştırılmasıyla anlamlı olarak değişen m/z değerlerinin ($p < 0.05$) karşılaştırılması negatif iyon modu [M-H]⁻. ^bAnlamlı olarak değişen lipid türlerinin m/z değerlerinin Lipid Maps taraması ile doğrulanması

5.TARTIŞMA

Kanser türlerinin dünyada kadınlar ve erkekler arasında, hem teşhis sıklığı hem de ölüm oranları açısından farklılıklara sahip olduğu görülmektedir. Dünya’da meme kanseri, kadınlarda görülen kanser türleri arasında, en fazla görülen malign tümör olup, kadınlarda oluşan kanserlerin yaklaşık olarak %30’unu oluşturmaktadır. Meme kanserinin görülme sıklığı Dünya genelinde ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Avrupa genelinde yılda yaklaşık 180.000, Birleşik Devletler’ de (ABD) ise yılda yaklaşık 184.000 yeni meme kanseri vakası tespit edilmektedir. Dünya genelinde ortalama yaşam süresinin artması, yaşam biçiminin farklı etkenlerle (çevresel faktörler, egzersiz, stres vs.) değişim geçirmesi, kanser taramalarının yaygınlaşması ve vakaların bildiriminde meydana gelen artışlar meme kanseri görülme sıklığındaki artışa sebep olan başlıca etmenler olarak sayılabilmektedir. Meme dokusunda tümör hücrelerinin oluşmasında, meme hücrelerinin uzun süreli olarak östrojen hormonuna maruz kalması temel sebep olarak ileri sürülmektedir. Tesbit edilen meme kanseri türlerinin yaklaşık olarak %60’ından fazlasının östrojen reseptörü bakımından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu meme kanseri dokularından yaklaşık olarak üçte birinin de endokrin tedavilere yanıt vermediği ortaya konmuştur. Kanser tedavisi çeşitli ilaçlardan oluşmasına rağmen, bu ilaçların ciddi yan etkileri nedeniyle yeni antikanser ilaçların araştırılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır. Son yıllarda doğal ürünlerin kanser tedavilerinde geleneksel olarak kullanımları artış göstermiştir.

Bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunan antikarsinojen türlere giderek artan bir ilgi vardır. Başlıca sebze ve meyvelerde bulunan besin fenollerin antioksidan, anti-radikal, antikanser, antiinflammatuvar, anti-mutajenik, antiproliferatif, antiviral, kemokoruyucu ve /veya kemoterapötik ve bağışıklık güçlendirici gibi biyolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir.

Fenolik asitler, bitki ve yiyeceklerde yaygın biçimde bulunmaları, önemli biyolojik ve farmakolojik özellikleri sebebiyle güncel ilgi odağı haline gelmişlerdir. Kemokoruyucu etkiye sahip spesifik aktif bileşenin saptanması, bu bileşiklerce zenginleştirilen yiyeceklerin geliştirilmesine de olanak sağlayabilecektir. Epidemiyolojik çalışmalar, sebze ve meyvece zengin

beslenmenin kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diabet, Alzheimer ve katarakt gibi bazı kronik hastalıkların gelişme risklerindeki azalışla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Özetle kanser, tüm dünyada başlıca ölüm nedenlerinden birisidir. Kanser, tedavisi için radyoterapi, cerrahi operasyonlar, immunoterapi ve kemoterapi gibi birçok tedavi seçeneği olmasına rağmen, hala ciddi bir klinik problemdir. Ayrıca, sosyal ve ekonomik olarak insan yaşamı üzerine oldukça yüksek negatif etkiye sahiptir. Bu nedenlerden dolayı, kanser tedavisinde kullanılabilecek sentetik ve/veya doğal bileşenlerin keşfedilmesi önem arz etmektedir.

Salisilik asit metabolitleri olan 2,3-DHBA ve 2,5-dihidroksibenzoik asit (2,5-DHBA) ile birlikte 2,4-dihidroksibenzoik asit (2,4-DHBA) ve 2,6-dihidroksibenzoik asit (2,6-DHBA) gibi türevlerinin de siklin-bağlı kinaz 1(CDK1) enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [158]. 2,3-DHBA ve 2,6-DHBA, CDK2 ve 4'ü inhibe etmedikleri ancak CDK-6 aktivitesini inhibe ettikleri gözlenmiştir [158]. Başka bir türev olan 2,4,6-trihidroksibenzoik asit (2,4,6-THBA), CDK1, 2, 4 ve 6 aktiviteleri etkili bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir [158]. Moleküler doking çalışmaları bu bileşiklerin potansiyel olarak CDK1 ile etkileşime girdiğini göstermiştir [158].

Başka bir çalışmada 2,3-DHBA ve 2,5-DHBA metabolitlerin hücre döngüsü regülasyonunda (CDK 1, 2, 4 ve 6) yer alan tüm CDK'lar üzerindeki etkileri HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücreleri, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri olmak üzere üç farklı kanser hücre hattında koloni oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır [159]. 2,3-DHBA ve 2,5-DHBA'nın 500 μ M'de derişimden başlayarak CDK-1 enzim aktivitesini inhibe ettiğini, CDK2 ve CDK4 aktivitesinin ise sadece daha yüksek konsantrasyonlarda (>750 μ M) inhibe ettiği gözlenmiştir. 2,3-DHBA, CDK6 enzim aktivitesini 250 μ M derişimde inhibe ederken 2,5-DHBA'in >750 μ M derişiminde inhibe ettiği gözlenmiştir. 2,5-DHBA'nın HCT-116 ve HT-29 kanser hücre hatlarında 250-500 μ M derişimde ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hattında ~100 μ M derişiminde koloni oluşumunu etkili şekilde inhibe ettikleri bulunmuştur. Buna karşılık 2,3-DHBA sadece MDA-MB-231 hücrelerinde

~500 μM deriminde etkili olduğu gözlenmiştir. Hem aspirinin hem de salisilik asidin, dört CDK'yı ve koloni oluşumunu inhibe edemedikleri belirlenmiştir. Mevcut sonuçlara dayanarak, 2,3-DHBA ve 2,5-DHBA 'nın aspirin kemokoruyucu özelliklerine, CDK'lerin inhibisyonu yoluyla katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir [159].

Kafeik asit ve gallik asidin MCF-7 insan meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak, *p53*, *Mcl-1* ve *p21* gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile araştırılmıştır [160]. 5-200 $\mu\text{g/ml}$ derişim aralığında hazırlanan kafeik asit ve gallik asidin 48 saat için IC_{50} değerleri; 170 $\mu\text{g/ml}$ ve 18.5 $\mu\text{g/ml}$; 72 saat için IC_{50} değerleri ise 159 $\mu\text{g/ml}$ ve 18 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Bir diğer çalışmada ise kafeik asidin (KA) Paklitaksel (PTX) ile birlikte kullanılmasının küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri (H1299) üzerine olası sinerjik etkileri Min ve ark., tarafından araştırılmıştır [161]. KA'in 24 saat uygulama zamanı için, H1299 hücrelerinde normal insan Beas-2b hücrelerine göre daha sitotoksik olduğunu saptanmıştır. Ayrıca, KA'in H1299 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin zaman bağlı olarak (6, 12, 24 ve 48 saat) arttığı gözlenmiştir. KA+PTX uygulanan H1299 hücreleri, sadece PTX tedavisi uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında, 100 μM KA'in H1299 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde PTX'in inhibitör etkisini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiş ve KA'nın, H1299 hücrelerinde PTX kaynaklı anti-proliferasyon üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu belirlenmiştir.

Kanser, hücrelerin artan proliferasyon, azalmış apoptoz ve komşu dokulara geçiş yaparak ve/veya uzak doku ve organlara metastaz kabiliyetlerindeki ilerleme sonucunda artmış göç etme yeteneği ile ilişkili olarak kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. Hücre proliferasyonu, her hücre bölünmesi sırasında tüm makromoleküler bileşenlerin kopyalanmasını gerektirmektedir. Hücre çoğalması, artmış lipit biyosentezini gerektirmekte olup, lipit katabolizması ile kanser metastazının düzenlenmesinde sinyal molekülleri olarak işlev gören biyoaktif moleküller üretilmektedir [89, 162]. Bu nedenle anormal lipit metabolizması, kanser hücrelerinin temel özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir.

Üç klasik lipit sınıfı; yağ asidi, fosfolipid ve kolesterol, kanser hücrelerinde ve tümörlerinde önemli ölçüde artmakta ve aktif olarak biyosentezlenmektedirler. İlk olarak çalışmalar, yağ asidi sentaz ekspresyonunun ve aktivitesinin, nonmalignant olan erişkin dokularında son derece düşük olduğunu, bazı katı ve agresif kanserlerde ise önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir [163]. Yağ asitleri ayrıca gliserolipidler, gliserofosfolipidler ve diğer lipitler için yapı taşlarıdır. İkinci olarak, fosfatidilkolin biyosentezinde anahtar bir enzim olan kolin kinaz ekspresyonunun, çeşitli kanser hücrelerinde ve tümörlerinde arttığı ve *ras* gibi farklı büyüme faktörleri ve onkogen kodlayan proteinler tarafından kolin kinazın aktive edilebileceği gösterilmiştir [164]. Üçüncüsü, aktif sterol biyosentezi hücre proliferasyonunun temel bir metabolik bileşeni olmaya devam etmektedir. Mikroarray ile transkripsiyonel profil oluşturulması sonucunda, tedavisi zor olan kanserlerde kolesterol biyosentez yolundaki bir takım genlerin önemli derecede fazla eksprese edildikleri gösterilmiştir [89]. Kolesterol biyosentezi DNA sentezinden çok daha erken gerçekleşmekte ve kolesterol biyosentezinin inhibe edilmesi hücre büyümesini yavaşlatmakta ve bu da ve kolesterol ile DNA sentetik yolları arasında bir bağlantıya işaret etmektedir [165]. Kanser hücrelerindeki lipit metabolizması hala büyük oranda bilinmezliğini korumaktadır. Son zamanlarda, lipidomik çalışmalarda normal ve kanserli doku ve hücrelerin lipit profillerinin karşılaştırılmasıyla, lipit metabolizması ile ilgili daha fazla ayrıntılı bilgi sağlanmıştır. Bu çalışmalar, erken tanı için klinik biyobelirteçlerin tanımlanmasında ve kanser tedavisinin etkinliğinin belirlenmesinde faydalı olabilecektir [166, 167].

Kanser lipidomiklerinin uygulamaları, tümör hücreleri ve dokularının saptanması, sınıflandırılması ile birlikte antikanser tedavinin değerlendirilmesini kapsamaktadır. Lipidomik stratejilerinin kanser araştırmalarına entegrasyonu, biyolojik numunelerdeki lipitlerin fonksiyonlarının ve hastalık başlangıcında ve gelişiminde moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlamıştır [168]. Ayrıca biyolojik numunelerde değişmiş lipit profilleri kanser araştırmalarında biyobelirteç tanımlanması amacıyla da incelenmiştir [168].

Serbest yağ asitleri (SYA) birçok metabolik yolda anahtar görevler üstlenmektedirler. SYA'leri enerji metabolizmasında substrat olarak davranabilmekte ve sinyal iletiminde ara ürün olarak görev alabilmektedir. Diyabet, Alzheimer, pankreas kanseri ve otizm gibi bazı hastalıklar için periferik kandaki SYA konsantrasyonlarındaki değişikliklere göre çeşitli potansiyel biyobelirteçler öngörülmüştür [169]. 140 adet meme kanser hastası ve 202 sağlıklı kontrol bireye ait serum örneklerinin kullanıldığı çalışmada, meme kanserli hastaların serum SYA derişimlerinin kontrol bireylerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur [169]. Özellikle C_{16:1}, C_{18:3}, C_{18:2}, C_{20:4} ve C_{22:6} yağ asidi türlerinin, meme kanseri ve sağlıklı bireyler arasında önemli oranda farklı olduğu ve meme kanseri tanısı için faydalı yağ aside türleri olabilecekleri öngörülmüştür [169]. Çalışmamızda da MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine 2,3-DHBA uygulaması sonucunda SYA'lerinde, özellikle pozitif iyon modu taramasında önemli değişiklik gözlenmiştir.

Lipitler, özellikle fosfolipidler (PL'ler), hücre zarlarının yapı taşı bileşenleridir. PL'ler çeşitli kimyasal yapılara sahiptirler ve homeostaz, hücre yapışması ve göçü, nörotransmisyon, sinyal iletimi, apoptoz, metabolizma ve translasyon sonrası değişiklikler gibi çeşitli biyolojik süreçler için düzenleyici olarak görev almaktadırlar [168]. PL'ler enerji depolamasında, hücre sel sinyalleşmede, hücre zar ve organellerinde, dokularda hücre-hücre etkileşimlerinde anahtar rol oynamaktadırlar [168]. Kan ve idrar dahil olmak üzere hücre, doku ve vücut sıvılarındaki çeşitli PL'lerin kompozisyonu, dağılımı ve metabolizmasındaki değişiklikler kanser ve diğer hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [168]. GPL'ler genellikle hücre membranlarında bol miktarda bulunmakta olup lipidomik kanser araştırmalarında önemli bir lipid sınıfını oluşturmaktadırlar. SL'ler, sfingoid bazlı bir omurgaya sahip polar lipidler olup sfingomiyelin (SM), sülfatid, seramid, serebrosid ve gangliosid gibi farklı alt gruplar içermektedirler. SL'ler, hücre sel zar bileşenleri olarak ve ayrıca önemli biyolojik fonksiyonlara sahip biyoaktif bileşiklerde önemli rollere sahiptirler. Sfingolipid metabolizmasındaki değişiklikler, kanser hücrelerine hayatta kalma avantajları sağlayabilmektedir [170]. Ek olarak, apoptoz, hayatta kalma ve yer

değiştirmeye yol açan membran sinyalleri, lipit yığınlarındaki göreceli seramid/sfingomiyelin (SM)/kolesterol seviyeleri tarafından modüle edilmekte ve hücre transformasyonu ve tümör ilerlemesini etkileyebilmektedir [170] Bu nedenle, kanser hücrelerinin lipidomundaki değişiklikler, kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili metabolik değişiklikleri yansıtmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, meme kanserinin benign ve sağlıklı kontrollerden ayırt edilmesi amacıyla kullanılabilir olası fosfolipid türlerinin varlığı serum örneklerinde araştırılmıştır [171]. Çalışmada 28 adet meme kanser hastası ve kontrollerin serum örneklerine sıvı kromatografi-çoklu reaksiyon izleme-kütle spektrometrisi uygulanarak fosfolipidlerdeki değişiklikler izlenmiştir. Meme kanseri ile ilişkili fosfolipid değişikliklerini araştırmak amacıyla hem çok değişkenli hem de tek değişkenli istatistiksel analizler uygulanmıştır. Fosfolipid türlerindeki farklılıklar ayrıca sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile doğrulanmıştır. Örneklerde ölçülen 200 fosfolipit arasında, benign ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında meme kanseri olan kadınların serumunda 25 fosfolipidin istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur. Meme kanseri hastalarının serum fosfolipitleri ve sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında toplam 12 fosfolipid türünde anlamlı değişim olduğu ve bunlardan 6 fosfolipidin yukarı ve 6 fosfolipidin ise aşağı regüle edildiği gözlenmiştir. Meme kanseri hasta serumlarının benign serumları ile karşılaştırılması sonucunda ise meme kanser hasta örneklerinde altı fosfolipid konsantrasyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Çalışma bulgularında ayrıca, PE(14:1/16:0), PC(18:0/18:0), LPE 14:0, PE(20:0/22:2) gibi fosfolipid lipid türlerinin meme kanserli hastalar ile benign ve sağlıklı kontroller arasında önemli oranda değiştiği bildirilmiştir. Bu lipid türlerinin, meme kanseri ile benign ve sağlıklı kontrollerin ayırt edilmesinde ve meme kanser ilerlemesinin izlenmesinde kullanılabilir fosfolipid türleri olabilecekleri öngörülmüştür [171].

Meme kanserinin erken teşhisi için yeni biyobelirteçler bulmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada UPLC-QTIF/MS kullanılarak, 78 plazma örneğinden (37 meme kanseri örneği ve 41 sağlıklı kontrol, 321 gliserofosfolipid (GP), 265 gliserolipid (GL), 91 sfingolipid (SP), 77 yağ asidi

(FA), 68 sterol lipit (ST), 18 prenol lipit (PR), 6 poliketid (PK) ve 1 sakkarolipid (SL) olmak üzere toplam 847 lipit türü tanımlanmıştır [172]. Bu lipid türlerinden ise yalnızca altı tanesinin kanserli örneklerle kontrol grup arasında anlamlı olarak değiştiği belirlenmiştir. PC(20:2/20:5), PC(22:0/24:1), TG(12:0/14:1) ve DG(18:1/18:2) lipid türlerinin meme kanseri örneklerinde sağlıklı kontrol örneklerine göre yüksek seviyelere sahipken, PE(15:0/19:1) ve N-palmitoil prolinin ise meme kanseri örneklerinde sağlıklı kontrollere kıyasla düşük düzeylerde olduğu gözlenmiştir [172].

İnsan meme dokusu örneklerindeki (n=29) yapılan başka bir çalışmada, bir tekli doymamış yağ asidi (MUFA) zinciri ve bir doymuş yağ asidi (SFA) zinciri içeren PC(32:1), PC(34:1), PC(36:1) ile iki SFA zinciri bulunan PC(34:0) türünün kanserli bölgelerde daha fazla lokalize olduğu belirtilmiştir [168]. PC(36:1)'in ve PC(36:0) ve LPC(18:0) ile karşılaştırıldığında kanserli bölgelerde önemli ölçüde daha yüksek bulunduğu gözlenmiştir [168]. Bir diğer çalışmada, HER2 pozitif metastatik meme kanserli hastalardan (n=22) toplanan dondurulmuş doku örnekleri üzerinde çalışılmıştır [168]. Ek olarak, 54 yaşındaki bir kadın hastadan bir çift tümör ve bitişik normal doku örneği kanserli ilişkili PL profil değişimlerinin tanımlanması amacıyla toplanmıştır. HER2 pozitif meme kanserinde SM(34:1); PC(32:0), PC(34:1) ve PC(36:2) lipid türlerinin, komşu normal dokuya kıyasla yükseldiği belirlenmiştir. Bu veriler, PL bileşimindeki değişikliklerin meme kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu açıkça göstermektedir [168]. Bazı araştırmacılar PC ve PE konsantrasyonlarındaki değişikliklerin meme kanseri metastazı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [168]. kanser olmayan kontrollerin ve meme kanseri hastalarının ameliyat öncesi ve sonrası idrar numunelerindeki PL'leri nano(n)LC-ESI-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir [168]. Sonuçlar, PC ve PE'lerin toplam konsantrasyonlarının, kanser hastalarında kontrollere kıyasla arttığını göstermiştir. Ameliyattan sonra PC ve PE konsantrasyonları önemli ölçüde azalma gözlenmiştir [168]. Başka bir çalışmada, normal sağlıklı kadınlar ve meme kanserli kadınların idrarlarından liyofilizasyon ile ekstrakte edilen PL'leri nLC-ESI-MS/MS ile incelemiş ve dört farklı kategoriden (12 PS, 12 PI, 4 PG ve 6 PA) toplam 34 üriner PL türünü, kantitatif olarak

belirlemişlerdir [168]. Bunlar arasında, kanser hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla birçok PL'nin toplam miktarları artarken, PI(18:0/20:4) türü sağlıklı örneklerle kıyasla hasta örneklerinde azalmıştır [168]. Negatif iyon MALDI-IMS, insan meme kanserli hastaların (n=9) ve normal meme dokusundan (n=1) alınan örneklerde PI dağılım profillerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır [168]. Kanser dokularında iki farklı PI türü, PI(18:0/18:1) ve PI(18:0/20:3) belirlenmiş ve bunlardan PI(18:0/20:3) türü kanser-ilerlemesi ile ilişkilendirilerek kanserin erken teşhisi için yeni bir biyobelirteç adayı olarak öngörülmüştür [168]. PI'lar, özellikle lipid metabolizması dahil birçok hücreyel fonksiyonu düzenleyen PI3-kinaz yolağında yer alan PI'ler, meme kanseri dokularında sıklıkla mutasyona uğramakta veya active edilmektedirler [168].

İnsanlarda lipit profillerini değerlendirmek için, MCF10A sağlıklı meme epitel hücrelerinden ve iki meme kanseri hücresinden (düşük metastatik potansiyele sahip T-47D epitel hücreleri ve yüksek metastatik potansiyele sahip MDA-MB-231 hücreleri) PL'ler ekstrakte edilmiştir [170]. Sağlıklı ve kanserli hücrelerinin PL profillerinde farklılıkları bulunmuştur. PC(14:0/18:1 ve 16:0/16:1), PI(16:0/18:1 ve 16:1/18:0), PI(18:0/18:1), PC(O-16:0/18:1) ve PC(O-16:0/20:1) ve PI(22:5/18:0) PL türlerinin MDA-MB-231 hücrelerinde önemli ölçüde azaldıkları belirlenmiştir. Ayrıca, toplam PL miktarına göre PE içeriğindeki farklılıklar sağlıklı hücrelerde en yüksek iken, metastatik hücrelerde en yüksek bolluk ise PA türlerinde gözlenmiştir. Ek olarak, göç hücrelerinde daha yüksek seviyelerde alkilakil PC'ler ve PI(22:5/18:0) tespit edilmiştir. Epitel hücrelerin PE ve SM sınıflarında daha az doymamış yağ açıl zincirleri ve daha kısa alifatik zincirleri içerirken, PI(18:0/18:1) türünün sağlıklı hücrelerde kanser hücrelerine göre en düşük miktarda bulunduğu belirlenmiştir [170].

Meme tümör dokularının farklı mikro-çevrelerinden alınan örneklerde PC, LPC, SM ve açilkarnitin türlerinin MALDI-IMS ile görüntülemesini incelemişlerdir [168]. IMS moleküler görüntüleri ile, dört lipit türünün, PC(16:0/16:0), PC(16:0/18:1), PC(18:1/18:1) ve PC'nin(18:0/18:1), tümör bölgelerinde lokalize olurken, NPC-(16:0/0:0) türünün nekrotik tümör bölgelerinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. PC(16:0/22:1) ve SM

(d18:1/16:0) türlerinin hipoksik tümör bölgelerinde heterojen dağılımları da belirlenmiştir [168]. Başka bir çalışmada, insan meme kanseri dokuları ve çevresindeki normal dokulardaki PL'leri karakterize etmek için HILIC/ESI-MS bazlı lipidomik yaklaşımı kullanmıştır [168]. PI(36:4), PI(38:4), SM(36:2 ve SM(40:2) gibi PL türlerinin aşağı regüle edilirken ve PI(34:1), PI(32:1), PI(32:0) ve SM(34:1) türlerinin tümör dokularında çevredeki normal dokulara kıyasla yukarı regüle edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle bu PI ve SM türleri, tümör dokularını normal dokulardan ayırt etmek için spesifik türler olarak öngürülebilmektedir. PL'lerin normal değerlerinde meydana gelen sapmalar, dokulardaki kanser gelişimine duyarlılığının belirteçleri olarak kullanılabilir. Bazı çalışmalarda, meme kanseri hastalarının sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında PC ve metabolitlerinin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [168]. Sağlıklı kadın gönüllüler ve evre-IV meme kanseri hastalarına ait örneklerden izole edilen lipidler mikroTOF kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak karakterize edilmiştir [168]. IV. evre tanısı alan hastalardan alınan serum örnekleri (n=50) sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında (n=25) çeşitli PL'lerde daha yüksek bağıl bolluk oranları gözlenmiştir. Mao ve ark., yeni bir hava akışı destekli iyonizasyon (AFAI) MSI kullanarak meme kanserli hastalarının cerrahi sırasında lipid profillerini üzerinde çalışmışlardır [168]. Meme invaziv duktal karsinom (IDC) ve meme duktal karsinomunun (DCIS) doku örnekleri üzerinde çalışarak IDC ve DCIS'i lipid profilleri açısından ayırımını yapmışlar ve ayrıca meme kanseri dokularında tümör tipini ve derecesini göstermişlerdir [168]. PL türleri, m/z 706'da PC(30:0), m/z718'de PC(32:0) veya PE(35:0), m/z 724'te PE(34:1) ve PC(32:2) m/z 730'da meme kanseri dokuları ile normal meme dokularının ayırt edilmesinde faydalanılmaktadır. Başka bir çalışmada meme kanseri hastalarından (n=55) ve sağlıklı kontrollerden (n=25) alınan plazma örneklerini analiz etmek için MS tabanlı kantitatif metabolomik yöntemi kullanılmıştır [168]. Meme kanseri hastalarından elde edilen plazma örneklerinde sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha düşük LPC seviyeleri ve daha yüksek SM seviyeleri gözlenmiştir. PL metabolit markerleri olan, LPC(16:0), PC(42:5), PC(34:2) ve

SM(20:2) türleri ile meme kanseri hastalarının sağlıklı kontrollerden ayrılmasında başarıyla yapılabilmektedir.

Çalışmamızda hedeflenmemiş lipidomik yaklaşım kullanılarak 2,3-DHBA uygulamasının, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin lipid profillerine etkisi araştırılmıştır. Serbest yağ asitleri (SYA), fosfolipid (PL) ve sfingolipid (SL) türlerinin profillerindeki değişiklikler hastalıkla ilişkilendirilmiş ve spesifik lipitlerin kanserin başlangıcında, ilerlemesinde ve evriminde rol oynayabilecekleri belirtilmiştir. Bununla birlikte, yukarıda özetlenen bazı çalışmalarda yer alan lipid türlerinde meydana gelen değişimlerin kanserde değiştiği bilinen enzimatik ve metabolik faaliyetlerle doğrudan ilişkili hücre morfolojisi, gen ekspresyonu ve kanser ilerlemesi ile ilişkili metabolik değişiklikleri yansıması muhtemeldir. 2,3-DHBA uygulamasının, meme kanser hücrelerinde yağ asitleri, gliserolipidler, gliserofosfolipidler ve sfingolipid gibi lipid gruplarında değişimlere neden olduğu gözlenmiştir. MCF-7 kanser hücresine 2,3-DHBA uygulaması sonucunda 46 adet FA, 30 adet GL, 105 adet GP ve 29 adet SP türünde değişime yol açtığı belirlenmiştir (**Şekil 4.15.**). MDA-MB-231 kanser hücresine 2,3-DHBA uygulaması sonucunda ise 21 adet FA, 7 adet GL, 79 adet GP ve 21 adet SP türünde değişime neden olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.18.**). PL sınıflarının ve yapılarının tanımlanması, kanserdeki lipid profil değişikliklerin araştırılması için yeni araçlar olabilmekte, yeni biyobelirteçler ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için bir temel sağlayabilmektedir. Yaptığımız çalışma; 2,3-DHBA uygulaması sonucunda gözlenen antikanser aktivite ile değişen lipid türlerinden yola çıkılarak yapılacak olan, hedefli lipidomik çalışmaların yanısıra, proteomik ve genomik çalışmalara temel oluşturarak, 2,3-DHBA uygulamasına bağlı olarak meme kanseri tedavisinde lipidomik temelli tedavi stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda yol gösterici olacaktır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda yiyeceklerde doğal olarak bulunan bir fenolik asit türü olan 2,3-DHBA'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitesi MTT yöntemi ile belirlendi. 2,3-DHBA'nın meme kanser hücreleri üzerine doza ve zamana bağlı olarak artış gösteren antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. 2,3-DHBA'nın L-929 sağlıklı hücreler üzerinde 72 saat uygulama zamanında 3 kat kadar seçici aktivite gösterdiği belirlendi. Kanseri de içeren bazı hastalıkların, belirli lipid türlerindeki spesifik değişimlerle ilgili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın son aşamasında ise, 2,3-DHBA'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücre lipid profili üzerine etkisi hedeflenmemiş lipidomik yaklaşım kullanılarak araştırıldı. Yapılan analizler sonucunda 2,3-DHBA uygulamasının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin, yağ asitleri, gliserolipid, gliserofosfolipid ve sfingolipid gibi lipid sınıflarında önemli değişimlere neden olduğu gözlemlenmiştir.

Bir lipit sınıfının veya tek bir lipitin tanımlanması, kanser ve diğer hastalıklar için yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesinde ilk adımdır. Özel olarak yapılandırılmış veya taşınabilir kütle spektrometresi sistemleri gelecekte klinik ortamlarda rutin olarak kullanılacaktır. Alternatif olarak, analiz için kütle spektrometrisi dışındaki teknolojiler uygulanabilecektir. Lipit immünoaktivitelerin varlığının araştırılması için lipid ölçümlerindeki teknolojik ilerleme, tanısal lipitlerin immobilize edildiği ve hasta serumu ile problandığı lipid dizilerinin kullanımıyla başlayacaktır [173].

Lipid metabolizması çok karmaşıktır ve hücrelerdeki karmaşık bir sinyalleşme ağı tarafından düzenlenir. Kanser hücrelerinde lipid metabolizmasının sinyal yollarının anlaşılması ve tanımlanması tedavi için rasyonel hedefler sağlayabilir ve farklı lipit moleküllerinin işlevlerinin belirlenmesi, klinik değerlendirme için yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde kullanılabilir. Kanser tedavisi ve apoptozda lipit metabolizmasının daha iyi anlaşılması, kanser hastalığı için yeni ve daha iyi tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- [1] Mahdi JG, Mahdi AJ, Mahdi AJ, Bowen ID. (2006). The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Prolif.* 39:147-155.
- [2] Bernhard HJ, Juurlink Haya J, Azouz, Alaa MZ Aldalati, Basmah MH, AlTinawi Paul Ganguly. (2014). Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutrition Journal.* 13:63.
- [3] Robbins RJ. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 51(10):2866-2887.
- [4] Dinelli G, Carretero AS, Di Silvestro R, Marotti I, Fu S, Benedettelli S, Ghiselli L, Gutiérrez AF. (2009). Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1216: 7229-7240.
- [5] Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. (2001). Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B Enzym.* 11(4):323-328.
- [6] Sabally K. (2006). Lipase-Catalyzed Synthesis Of Selected Phenolic Lipids in Organic Solvent Media. PhD Thesis, Department of Food Science & Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal, Canada.
- [7] Bacon JR1, Rhodes MJ. (2000). Binding Affinity of Hydrolysable Tannins to Parotid Saliva and to Praline-Rich Proteins Derived from It. *J Agric Food Chem.* 48: 838–843.
- [8] Türk HF. (2009). Bazı sofralık üzüm çeşitlerinde farklı dönemlerde alınan yapraklardaki fenolik ve mineral madde değişimlerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Süleyman Demirel üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta. 2:14.
- [9] Liu D, Su Z, Wang C, Gu M. (2009). Separation of five isomers of dihydroxybenzoic acid by high-speed counter-current chromatography with dual-rotation elution method. *J Chromatogr Sci.* 47:345–348.
- [10] Grootveld M, Halliwell B. (1988). 2,3-Dihydroxybenzoic acid is a product of human aspirin metabolism. *Biochem Pharmacol.* 37:271–280.
- [11] Jiang S, Yang J, Qian D, Guo J, Shang EX, Duan JA, Xu J. (2014). Rapid screening and identification of metabolites of quercitrin produced by the human intestinal bacteria using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-offlight mass spectrometry. *Arch Pharm Res.* 37:204–213.
- [12] Liu R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *The Journal of Nutrition.* 134:3479S-3485S

- [13] Sanderson JT, Clabault H, Patton C, Lassalle-Claux G, Jean-François J, Paré AF, Hébert MJ, Surette ME, Touaibia M. (2013). Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 21:7182–7193.
- [14] Jung BI, Kim MS, Kim HA, Kim D, Yang J, Her S, Song YS. (2010). Caffeic acid phenethyl ester, a component of beehive propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator. *Phytother. Res.* 24:295-300.
- [15] Grootveld M, Halliwell B. (1988). 2,3-Dihydroxybenzoic acid is a product of human aspirin metabolism. *Biochem Pharmacol.* 37:271–280.
- [16] Paterson JR, Blacklock C, Campbell G, Wiles D, Lawrence JR. (1998). The identification of salicylates as normal constituents of serum: a link between diet and health? *J Clin Pathol.* 51: 502–505.
- [17] Muljono RA, Darsono FL, Scheffer JJ, Verpoorte R. (2001). Assay of 2,3- dihydroxybenzoic acid and related compounds in plant materials by highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 927: 39–45.
- [18] Sakushima A, Coskun M, Maoka T. (1995). Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry* 40: 257–261.
- [19] Shibumon G, Benny PJ, Kuriakose S, Cincy G. (2011). Antibiotic activity of 2,3- dihydroxybenzoic acid isolated from *Flacourtia inermis* fruit against multidrug resistant bacteria. *Asian J Pharm Clin Res.* (2011). 4: 126–130.
- [20] Torres AM, Maulastovicka T, Rezaaiyan R. (1987). Total Phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *J Agr Food Chem.* 35: 921–925.
- [21] Zhang K, Zuo Y. (2004). GC-MS determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. *J Agric Food Chem.* 52: 222–227.
- [22] Zuo Y, Wang C, Zhang J. (2002). Separation, Characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *J Agr Food Chem.* 50:3789–3794.
- [23] Sappey C1, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Grady RW, Piette J. (1995). NF-kappa B transcription factor activation by hydrogen peroxide can be decreased by 2,3-dihydroxybenzoic acid and its ethyl ester derivative. *Arch Biochem Biophys.* 321: 263–270.
- [24] Baldwin SR, Simon RH, Boxer LA, Till GO, Kunkel RG. (1985). Attenuation by 2,3-dihydroxybenzoic acid of acute lung injury induced by cobra venom factor in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 132: 1288–1293

- [25] Graziano JH, Miller DR, Grady RW, Cerami A. (1976). Inhibition of membrane peroxidation in thalassaemic erythrocytes by 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Br J Haematol.* 32: 351–356.
- [26] Neilands JB. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270:26723–26726.
- [27] Graziano JH, Miller DR, Grady RW, Cerami A. (1976). Inhibition of membrane peroxidation in thalassaemic erythrocytes by 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Br. J. Haematol.* 32:351–356.
- [28] Blatt J, Taylor SR, Kontoghiorghes GJ. (1989). Comparison of activity of deferoxamine with that of oral iron chelators against human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 49:2925–2927.
- [29] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113: 71-88.
- [30] Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. (2003). Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1400-1408.
- [31] Surh Y. (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* 428:305-327.
- [32] Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 381-406.
- [33] Márquez N1, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Muñoz E. (2004). Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308: 993-1001.
- [34] Terao J, Karasawa H, Arai H, Nagao A, Suzuki T, Takama K. (1993). Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57:1204-1205.
- [35] Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, Mori H. (1993). Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.* 53: 2775-2779.
- [36] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20:933–956.
- [37] Joyeux M, Lobstein A, Anton R, Mortier F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes

- and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med.* 61: 126–129.
- [38] O'Brien PJ, Galati G. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 37(3): 287–303.
- [39] Willett WC. (1994). Diet and health: what should we eat? *Science.* 264: 532–537.
- [40] Willett WC. (1995). Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ. Health Perspect.* 103: 165-170.
- [41] Berdowska I, Zieliński B, Fecka I, Kulbacka J, Saczko J, Gamian A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chem.* 141(2): 1313–1321
- [42] Nutritional Business Journal (NBJ), Integrative Medicine Report, (2009)
- [43] Boon H, Brown JB, Gavin A, Kennard MA, Stewart M. (1999). Breast cancer survivors' perceptions of complementary/alternative medicine (CAM): making the decision to use or not to use. *Qual Health Res.* 9: 639–653.
- [44] Riboli E, Slimani N, Kaaks R. (1996). Identifiability of food components for cancer chemoprevention. *IARC Sci Publ.* 139: 23-31.
- [45] Murillo G, Mehta, RG. (2001). Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr. Cancer.* 41(1-2):17-28.
- [46] van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ. (2000). Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.* 3:103-107.
- [47] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [48] Sağlık Bakanlığı: [http://www.iccp-portal.org/sites/default/files/plans/Ulusal Kanser Kontrol Planı 2013-2018](http://www.iccp-portal.org/sites/default/files/plans/Ulusal_Kanser_Kontrol_Planı_2013-2018). Erişim Tarihi:10.08.2018
- [49] Kara F, İltar E, Keskinçilic B. Türkiye kanser istatistikleri (2015). Ankara: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı; 2018.
- [50] Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E. Türkiye'de Meme Kanseri Erken Tanı ve Tarama Programlarının Hazırlanması: Sağlık Bakanlığı Meme Kanseri Erken Tanı ve Tarama Alt Kurulu Raporu. *Meme Sağlığı Dergisi.* (2009). 5(3):125-134.
- [51] Akyolcu N. (2018). Memenin Cerrahi Hastalıkları ve Bakımı [Surgical diseases and care of breast]. Akyolcu N, Kanan N, Aksoy G, editörler. Cerrahi Hemşireliği II. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 327:76.

- [52] Ozmen V, Fidaner C, Aksaz E. (2009) ve ark. *Meme Sağlığı Dergisi*. 5:12-134.
- [53] Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. (1990). Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*.46: 796-800.
- [54] Rosner B, Colditz GA, Willett WC. (1994). Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 139: 819-835
- [55] Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G. (2004). Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83,000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet*. 363: 1007-1016
- [56] Michels KB, Xue F, Colditz GA, Willett WC. (2007). Induced and Spontaneous Abortion and Incidence of Breast Cancer Among Young Women: A Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 167: 814-82
- [57] World Health Organization. Breast Cancer: Prevention and Control. (Cited: 2018 May 5) Available from: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index2.html>
- [58] Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358: 1389.
- [59] Himes DO, Root AE, Gammon A, Luthy KE.(2016). Breast cancer risk assessment: calculating lifetime risk using the Tyrer-Cuzick Model. *J Nurse Pract*. 12(9): 583-94.
- [60] Coopey SB, Acar A, Griffin M, Cintolo-Gonzalez J, Semine A, Hughes KS. (2018). The impact of patient age on breast cancer risk prediction models. *The Breast Journal*. 24(4): 592-8.
- [61] Topuz E, Aydıner A, Dinçer M. (2003). Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitapevi.
- [62] Ganmaa D, Willett WC, Li TY, Feskanich D, van Dam RM, Lopez-Garcia E, Hunter DJ, Holmes MD.(2008). Coffee, tea, caffeine and risk of breast cancer: a 22-year follow-up. *Int J Cancer*. 122: 2071-2076.
- [63] Ishitani K, Lin J, Manson JE, Buring JE, Zhang SM. (2008). Caffeine consumption and the risk of breast cancer in a large prospective cohort of women. *Arch Intern Med*. 168: 2022-2031
- [64] Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE, Anton-Culver H, Bernstein L, Deapen D, Horn-Ross PL, Peel D, Pinder R, Ross RK, West D, Wright WE, Ziogas A. (2004). Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study. *J Natl Cancer Inst* . 96: 29-37.

- [65] McElroy JA, Shafer MM, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA. (2006). Cadmium exposure and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 98: 869-873
- [66] Jardines L, Haffty GB, Doroshow H, et al. Breast Cancer Overview: Risk factors, screening, genetic testing, and prevention. In Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD. (eds): *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*, 6th edition. New York: NRR Inc, 2002, 149-172
- [67] Rohan TE, Howe GR, Friedenreich CM, Jain M, Miller AB. (1993). Dietary fiber, vitamins A,C and E and risk of breast cancer. A cohort study. *Cancer Causes Control.* 4: 29-35.
- [68] Hunter DJ, Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE, Willett WC. (1993). A prospective study of consumption of vitamin C,E and A and breast cancer risk. *N Engl J Med.* 329: 234-239.
- [69] Graham S, Hellmann R, Marshall J, Freudenheim J, Vena J, Swanson M, Zielezny M, Nemoto T, Stubbe N, Raimondo T. (1991). Nutritional epidemiology of postmenopausal breast cancer in New York. *Am J Epidemiol.* 134: 552-554.
- [70] John EM, Kelsey JL.(1993). Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 15: 157-162.
- [71] Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. (2005). Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 7: 21-32.
- [72] John EM, Phipps AI, Knight JA, Milne RL, Dite GS, Hopper JL, Andrulis IL, Southey M, Giles GG, West DW, Whittemore AS. (2007). Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry. *Int J Cancer.* 121: 386
- [73] Margolese RG, Fisher B, Hortobagyi GN, Bloomer WD. (2000). Neoplasms of The Breast. In Holland FJ, Frei E (eds): *Cancer Medicine*, 5th edition. Ontario: *B.C.Decker Inc.* 1735-1822.
- [74] Margolese RG, Fisher B, Hortobagyi GN, Bloomer WD. (2000). Neoplasms of The Breast. In Holland FJ, Frei E (eds): *Cancer Medicine*, 5th edition. Ontario: *B.C.Decker Inc.* 1735-1822.
- [75] Terry MB, Zhang FF, Kabat G, Britton JA, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD. (2006). Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol.*16: 230-240.
- [76] Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, LiVoisi VA, Mostow ED, Goldenberg IS, White C. (1981). Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 67: 327-333
- [77] Açıkgöz A, Akal-Yıldız E. (2017). Meme Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri. *Ergoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi.* 5(1):45-56.

- [78] Smeltzer SC, Bare, BG.,Hinkle LJ, Cheever KH. (2010). Assessment and Management of Patients with Breast Disorders.In: Brunner & Suddarth's Textbook of Medical-Surgical Nursing, 12th Edition, *Lippincott Williams & Wilkins*. 1471-1501
- [79] <https://www.shutterstock.com/tr/image-vector/symptoms-breast-cancer-medicine-pathology-anatomy-675897694>
- [80] Donegan WL. (2006). History of Breast Cancer in Breast Cancer DJ Winchester, DP Winchester, CA Hudis and L. Norton. Editors. DC Decker Inc. *Ontario*. p.1-14.
- [81] Altunkan H, Akın B, Ege E. (2008). 20-60 Yaş arası kadınların kendi kendine meme muayenesi uygulama davranışları ve farkındalık düzeyleri. *Meme Sağlığı Dergisi*. 4:84-91.
- [82] Açıkgöz A, Çehreli R, Ellidokuz, H. (2015). Hastanede çalışan kadınların meme kanseri konusunda erken tanı yöntemlerine yönelik bilgi ve davranışlarının belirlenmesi, uygulanan planlı eğitimin etkinliğinin incelenmesi. *Meme Sağlığı Dergisi*.11:31-38.
- [83] Kılıç S, Uçar M, Seymen E, İnce S, Ergüvenli Ö, Yıldırım A. (2006). Kendi kendine meme muayenesi bilgi ve uygulamasının GATA Eğitim Hastanesinde görevli hemşire, hemşirelik öğrencileri ve hastaneye müracaat eden kadın hastalarda araştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi*. 48:200-204.
- [84] Özmen V. (2012). Türkiye’de Meme Kanseri http://kanser.org/saglik/upload/20.UKK/Dunyada_ve_Turkiyede_Meme_Kanseri%23Vahit_Ozmen.pdf. (Erişim Tarihi:15.05.2014
- [85] Wenk, MR. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:594-610.
- [86] Lam SM1, Shui G. Lipidomics as a principal tool for advancing biomedical research. *J Genet Genomics*. 2013 Aug 20;40(8):375-90.
- [87] Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy, RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, van Meer G, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum, JL, Dennis EA. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res*. 46:839-861.
- [88] Fahy E, Subramaniam S, Murphy R.C, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJO, Dennis EA. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res*. 50 : 9-14.
- [89] Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L, (2009). From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. *Part II: Analytical lipidomics Trend. Anal. Chem*. 28 (4): 393–403.

- [90] Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, Simons K, Shevchenko A. (2009). Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(7):2136-41.
- [91] Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, Simons K, Shevchenko A. (2009). Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106,:2136-2141.
- [92] Guan XL, Souza CM, Pichler H, Dewhurst G, Schaad O, Kajiwara K, Wakabayashi H, Ivanova T, Castillon GA, Piccolis M, Abe F, Loewith R, Funato K, Wenk MR, Riezman H. (2009). Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol. Biol. Cell*. 20: 2083-2095.
- [93] Han XL, Gross RW. (1990). Plasmenylcholine and phosphatidylcholine membrane bilayers possess distinct conformational motifs. *Biochemistry*. 29: 4992-4996.
- [94] Han XL, Gross RW. (1991). Alterations in membrane dynamics elicited by amphiphilic compounds are augmented in plasmenylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 1069:37-45.
- [95] Montine TJ, Montine KS, McMahan W, Markesbery WR, Quinn JF, Morrow JD. (2005). F2-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Antioxid. Redox Signal*. 7: 269-275.
- [96] van Meer G. (2005). Cellular lipidomics. *EMBO J*. 24: 3159e3165.
- [97] Wenk MR, (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov*. 4: 594e610.
- [98] Guan XL, He X, Ong WY, Yeo WK, Shui G, Wenk MR. (2006). Nontargeted profiling of lipids during kainate-induced neuronal injury. *FASEB J*. 20,:1152-1161.
- [99] Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W, Wenk MR. (2008). Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J. Virol*. 82: 11228-11238.
- [100] Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown AJ, Wenk MR, Parton RG, Yang H. (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J. Cell Biol*. 180: 473-482.
- [101] Kutik S, Rissler M, Guan XL, Guiard B, Shui G, Gebert N, Heacock PN, Rehling P, Dowhan W, Wenk MR, Pfanner N, Wiedemann N. (2008). The translocator maintenance protein Tam41 is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis. *J. Cell Biol*. 183: 1213-1221.

- [102] Low CP, Shui G, Liew LP, Buttner S, Madeo F, Dawes IW, Wenk MR, Yang H. (2008). Caspase-dependent and -independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. *J. Cell Sci.* 121: 2671-2684.
- [103] Lee LHW, Shui G, Farooqui AA, Wenk MR, Tan CH, Ong WY, (2009). Lipidomic analyses of the mouse brain after antidepressant treatment: evidence for endogenous release of long-chain fatty acids? *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12: 953-964.
- [104] Niemela PS, Castillo S, Sysi-Aho M, Oresic M. (2009). Bioinformatics and computational methods for lipidomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877: 2855-2862.
- [105] Lehmann WD, Koester M, Erben G, Keppler D, (1997). Characterization and quantification of rat bile phosphatidylcholine by electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 246: 102-110
- [106] Hsu FF, Turk J. (2003). Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: the fragmentation processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14: 352-363.
- [107] Hsu FF, Turk J. (2000). Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: a mechanistic study. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11: 986-999.
- [108] Kerwin JL, Tuininga AR, Ericsson LH, (1994). Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 35: 1102-1114.
- [109] Shui G, Guan XL, Low CP, Chua GH, Goh JSY, Yang H, Wenk MR. (2010). Toward one step analysis of cellular lipidomes using liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* lipidomics. *Mol. Biosyst.* 6: 1008e1017.
- [110] Sharman MJ, Shui G, Fernandis A.Z, Lim WLF, Berger T, Hone E, Taddei K, Martins IJ, Ghiso J, Buxbaum JD, Gandy S, Wenk MR, Martins RN. (2010). Profiling brain and plasma lipids in human APOE epsilon2, epsilon3, and epsilon4 knock-in mice using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Alzheimers Dis.* 20: 105-111.
- [111] Fernandis AZ, Wenk MR. Lipid-based biomarkers for cancer (2009) . *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877(26):2830.
- [112] Sysi-Aho M, Katajamaa M, Yetukuri L, Oresic M. (2007). Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC Bioinformatics.* 8:93.
- [113] Guan XL, He X, Ong WY, Yeo WK, Shui G, Wenk MR. (2006). Non-targeted profiling of lipids during kainate-induced neuronal injury *FASEB J.* 20:1152.

- [114] Hammad LA, Wu G, Saleh MM, Klouckova I, Dobrolecki LE, Hickey RJ, Schnaper L, Novotny MV, Mechref Y. (2009). Elevated levels of hydroxylated phosphocholine lipids in the blood serum of breast cancer patients. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23:863
- [115] Baker CJ, Kanagasabai R, Ang WT, Veeramani A, Low HS, Wenk MR. (2008). Towards ontology-driven navigation of the lipid bibliosphere. *BMC Bioinformatics* 9 (Suppl. 1) :5.
- [116] Zhang Y, Wang Y, Guo S, Guo Y, Liu H, Li Z. (2013). Ammonia-treated N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride as a novel matrix for rapid quantitative and qualitative determination of serum free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 794: 82–9.
- [117] Zhou X, Mao J, He Z, Henegar J. (2010). Lipidomics in identifying lipid biomarkers of prostate cancer. *FASEB J.* 24: 354-6.
- [118] Zhou X, Mao J, Ai J, Deng Y, Roth MR, Pound C, Henegar J, Welti R, Bigler SA. (2012). Identification of plasma lipid biomarkers for prostate cancer by lipidomics and bioinformatics. *Plos One.* 7 (11):48889.
- [119] Min HK, Lim S, Chung BC, Moon MH. (2011). Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2): 823–830.
- [120] Kim IC, Lee JH, Bang G, Choi SH, Kim YH, Kim KP, Kim HK, Ro J. (2013). Lipid profiles for HER2-positive breast cancer. *Anticancer Res.* 33 (6): 2467–2472.
- [121] Wood PL. (2014). Mass spectrometry strategies for clinical metabolomics and lipidomics in psychiatry, neurology, and neuro-oncology. *Neuropsychopharmacology.* 39 (1): 24–33.
- [122] Astarita G, Piomelli D. (2011). Towards a whole-body systems [multi-organ] lipidomics in Alzheimer's disease. *Prostagl. Leukot. Essent. Fat. Acids.* 85 (5): 197–203.
- [123] Han X. (2010). Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and the altered lipids at the mild cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell. Biol. Lip.* 1801 (8): 774–783.
- [124] Sabbagh MN, Sandhu S, Kolody H, Lahti T, Silverberg NB, Sparks DL. (2006). Studies on the effect of the apolipoprotein E genotype on the lipid profile in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 3 (2): 157–160.
- [125] Touboul D, Gaudin M. (2014). Lipidomics of Alzheimer's disease. *Bioanalysis* 6 (4): 541–561.
- [126] Schwarz E, Prabakaran S, Whitfield P, Major H, Leweke F, Koethe D, McKenna P, Bahn S. (2008). High throughput lipidomic profiling of

schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides. *J. Proteome Res.* 7 (10): 4266–4277.

- [127] Del Boccio, P. Pieragostino, D. Di Ioia, M. Petrucci F, Lugaresi A, De Luca G, Gambi D, Onofri M, Di Ilio C, Sacchetta P, Urbani A. (2011). Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *J. Proteomics.* 74 (12): 2826–2836.
- [128] De Gómez Dumm NT, Giammona AM, Touced LA, Raimondi C. (2001). Lipid abnormalities in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. *Med. (B Aires)* 61 (2): 142–146.
- [129] Jia L, Wang C, Zhao S, Lu X, Xu G. (2007). Metabolomic identification of potential phospholipid biomarkers for chronic glomerulonephritis by using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 860 (1):134–140.
- [130] Ollero M, Astarita G, Guerrero IC, Sermet-Gaudelus I, Trudel S, Piomelli D, Edelman A. (2011). A Plasma lipidomics reveals potential prognostic signatures within a cohort of cystic fibrosis patients. *J. Lipid Res.* 52 (5): 1011–1022.
- [131] Guerrero IC, Astarita G, Jais JP, Sands D, Nowakowska A, Colas J. Sermet-Gaudelus I, Schuerenberg M, Piomelli D, Edelman A, Ollero M. (2009). A novel lipidomic strategy reveals plasma phospholipid signatures associated with respiratory disease severity in cystic fibrosis patients. *Plos One.* 4 (11): e7735.
- [132] Fletcher MJ. (1968). A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta* 22: 393-397.
- [133] Shui G, Lam SM, Stebbins J, Kusunoki J, Duan X, Li B, Cheong WF, Soon D, Kelly RP, Wenk MR, (2013). Polar lipid derangements in type 2 diabetes mellitus: potential pathological relevance of fatty acyl heterogeneity in sphingolipids. *Metabolomics.* 9: 786-799.
- [134] Oliveira TG, Chan R.B, Tian H, Laredo M, Shui G, Staniszewski A, Zhang H, Wang Kim TW, Duff KE, Wenk MR, Arancio O, Di Paolo G. (2010). Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer’s disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *J. Neurosci.* 30: 16419-16428.
- [135] Aloia RC, Tian H, Jensen FC. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5181-5185.
- [136] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella B.C, Iltmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler M.H, Parsons R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275:1943.

- [137] Maxwell GL, Risinger J.I, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A, Futreal P.A. (1998). Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res.* 58: 2500.
- [138] Koul D. (2008). PTEN Signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* 7 : 1321.
- [139] Chen WC, Lin MS, Zhang B.F, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Gao HJ. (2007). Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. *World J. Gastroenterol.* 13:699.
- [140] Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards J.S. (2008) Targeted Disruption of Pten in Ovarian Granulosa Cells Enhances Ovulation and Extends the Life Span of Luteal Cells *Mol. Endocrinol.* 22: 2128.
- [141] Schmitz M, Grignard G, Margue C, Dippel W, Capesius C, Mossong J, Nathan M, Giacchi S, Scheiden R, Kieffer N. (2007). Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis. *Int. J. Cancer* 120 :1284.
- [142] Saddoughi SA, Song P, Ogretmen B. (2008). Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell. Biochem.* 49: 413.
- [143] Nava VE, Hobson J.P, Murthy S, Milstien S, Spiegel S. (2002). Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp. Cell Res.* 281: 115.
- [144] Sarkar S, Maceyka M, Hait NC, Paugh S.W, Sankala H, Milstien S, Spiegel S. (2005). Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer. *FEBS Lett.* 579 : 5313.
- [145] Van BJ, Letterle C, Snyder P, Prior T. (2002). Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through G_i-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase β . *Cancer Lett.* 181 : 195.
- [146] Smicun Y, Gil O, Devine K, Fishman DA. (2007). S1P and LPA have an attachment-dependent regulatory effect on invasion of epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 107 : 298.
- [147] Thiebaut AC, Chajes V, Gerber M, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir G, Berrino F, Riboli E, Benichou J, Clavel-Chapelon F. (2009). Dietary intakes of ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int. J. Cancer* 124:924.
- [148] Baysal K, Serhatlı M, Adıgüzel Z, (2008). ve ark. İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, 12-16 Mayıs (2008). 5:14.
- [149] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. (1990). New colorimetric

cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 182(13):1107-1112.

- [150] Bligh EG, Dyer WJ.(1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37:911-917.
- [151] Robin L, Davis S. (1982) . An organic phosphorus assay which avoids the use of hazardous perchloric acid. *Clin Chem Acta.* 121:111-116.
- Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi Y, Ishida M. (2000). Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 35: 953-966.
- [152] Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi Y, Ishida M. (2000). Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 35, 953-966.
- [153] Zhang L, Peterson BL, Cummings BS. (2005). The effect of inhibition of Ca²⁺- independent phospholipase A2 on chemotherapeutic-induced death and phospholipid profiles in renal cells. *Biochem. Pharmacol.* 70: 1697-1706.
- [154] Kinsey GR, Blum JL, Covington MD, Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. (2008). Decreased iPLA₂γ expression induces lipid peroxidation, cell death, and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J. Lipid Res.* 49:(7) 1477-1487.
- [155] Peterson B, Stovall K, Monian P, Franklin JL, Cummings BS. (2008). Alterations in phospholipid and fatty acid lipid profiles in primary neocortical cells during oxidant induced cell injury. *Chem. Biol. Interact.* 174:163-176.
- [156] MetaboAnalyst <http://www.metaboanalyst.ca/> Son erişim tarihi: 14Ekim 2018.
- [157] LIPID MAPS Databases: LIPID MAPS Lipidomics Gateway <http://www.lipidmaps.org/> Son erişim tarihi: 14Ekim 2018.
- [158] Dachineni R, Kumar DR, Callegari E, Kesharwani SS, Sankaranarayanan R, Seefeldt T, Tummala H, Bhat GJ. (2017). Salicylic acid metabolites and derivatives inhibit CDK activity: Novel insights into aspirin's chemopreventive effects against colorectal cancer. *Int J Oncol.* 51(6):1661.
- [159] Sankaranarayanan R, Valiveti CK, Dachineni R, Kumar DR, Lick T, Bhat GJ. (2020). Aspirin metabolites 2,3-DHBA and 2,5-DHBA inhibit cancer cell growth: Implications in colorectal cancer prevention. *Mol. Med. Rep.* 21:20-34.
- [160] Rezaei-Seresht H, Cheshomi H, Falanji F, Movahedi-Motlagh F, Hashemian M, Mireskandari E. (2019). Cytotoxic activity of caffeic

acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna J Phytomed*, 9(6): 574.

- [161] Min J, Shen H, Xi W, Wang Q, Yin L, Zhang Y, Yu Y, Yang Q, Wang ZN. (2018). Synergistic Anticancer Activity of Combined Use of Caffeic Acid with Paclitaxel Enhances Apoptosis of NonSmall-Cell Lung Cancer H1299 Cells *in Vivo* and *in Vitro*. *Cell Physiol Biochem*. 48:1433.
- [162] Santos CR, Schulze A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *FEBS J*. 279,:2610–2623.
- [163] Lupu R, Menendez JA. (2006). Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN) catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: A new family of anti-cancer agents? *Curr. Pharm. Biotechnol*. 7:483–493.
- [164] Janardhan S, Srivani P, Sastry GN. (2006). Choline kinase: An important target for cancer. *Curr. Med. Chem*. 13:1169–1186.
- [165] Danilo C, Frank PG. (2012). Cholesterol and breast cancer development. *Curr. Opin. Pharmacol*. 12: 677–682.
- [166] Wenk MR. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov*. 4: 594–610.
- [167] Postle AD. (2012). Lipidomics. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 15: 127–133.
- [168] Bandu R, Mok HJ, Kim KP. (2018). Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev*. 37(2):107-138.
- [169] Zhang Y, Song L, Liu N, He C, Li Z. (2014). Decreased serum levels of free fatty acids are associated with breast cancer. *Clin Chim Acta*. 1:437:31-37.
- [170] Dória ML, Cotrim CZ, Simões C, Macedo B, Domingues P, Domingues MR, Helguero LA Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*. 228(2):457-468.
- [171] More TH, Bagadi M, RoyChoudhury S, Dutta M. Uppal A. Mane A, Santra, M.K, Chaudhury K, Rapole S. (2017). Comprehensive quantitative lipidomic approach to investigate serum phospholipid alterations in breast cancer. *Metabolomics*, 13 (3):1-14.
- [172] Jiang N, Zhang G, Pan L, Yan C, Zhang L, Weng Y, Wang W, Chen X, Yang G. (2017). Potential plasma lipid biomarkers in early-stage breast cancer. *Biotechnol Lett*. 39(11):1657-1666.
- [173] Kanter JL, Narayana S, Ho PP, Catz I, Warren KG, Sobel RA, Steinman L, Robinson WH. (2006). Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat. Med*. 12: 138.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Büşra DAŞ
Doğum Yeri ve Tarihi Sivas/17/06/1989
Medeni Hali Evli
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi
E-posta Adresi bsrkaradag@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Halil Rıfat Paşa Lisesi, 2007
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, 2012
Yüksek Lisans Sivas Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2020
Ünvan Kimyager

İş Tecrübesi

Gençlik ve Spor Bakanlığı 2015-

Doküman Görüntüleyici

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme konu: 24-Şub-2020 14:14 +03
 NUMARA: 1263043711
 Kelime Sayısı: 25628
 Gönderildi: 1



MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE 2,3-DİHİDROKSİB...
 Büşra Daş tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%10	Internet Sources: %8 Yayınlar: %2 Öğrenci Ödevleri: %6

alıntıları dahil et
 bibliyografyayı dahil et
 küçük eşleşmeleri çıkar
 mod:
 raporu hızlı görüntüle (klasik)

 yazdır
 yenile
 indir

1% match (23-Kas-2015 tarihli internet) http://pharmacy.erciyes.edu.tr	<input checked="" type="checkbox"/>
1% match (05-Nis-2019 tarihli internet) http://multicongress.net	<input checked="" type="checkbox"/>
1% match (24-Eki-2019 tarihli internet) https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/830715	<input checked="" type="checkbox"/>
1% match (08-Nis-2016 tarihli internet) http://dergipark.ulakbim.gov.tr	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (07-May-2019 tarihli internet) http://adudspace.adu.edu.tr:8080	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (12-Oca-2013 tarihli internet) http://www.thejournalofbreasthealth.com	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (06-Mar-2015 tarihli internet) http://acikerisim.nigde.edu.tr:8080	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (21-Eyl-2017 tarihli internet) http://www.diclemedj.org	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (13-May-2019 tarihli internet) https://mafiadoc.com/bldrler-abstracts_5c156738097c471e288b465b.html	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (27-Ara-2013 tarihli internet) http://istanbulsaglik.gov.tr	<input checked="" type="checkbox"/>
<1% match (02-Şub-2020 tarihli internet) https://www.yumpu.com/tr/document/view/7882045/tc-suleyman-demirel-universitesi-fen-bilimleri-enstitusu-baz-sofralk-	<input checked="" type="checkbox"/>