T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN VE ABEMACİCLİBİN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK İRDELENMESİ

Tuğçe Nur ERALP

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ

Mart, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN VE ABEMACİCLİBİN MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK İRDELENMESİ

Tuğçe Nur ERALP tarafından hazırlanan tez çalışması 11.03.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ İzmir Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Fatıma YÜCEL, Üye
TÜBİTAK MAM Yaşam Bilimleri BKTM _____

Dr. Öğr. Üyesi Cüneyd YAVAŞ, Üye
Biruni Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Doksorubisin ve Abemaciclibin Meme Kanseri Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Olarak İrdelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tuğçe Nur ERALP

İmza

Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FDK-2020-3814” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Babanneme

TEŞEKKÜR

Doktora yolculuğum süresince bu zorlu ve gelgitli yolda ilerlememde hep yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Banu Mansuroğlu' na sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Yıldız Teknik Üniversitesi'nde çalışmalarımı gerçekleştirmekte olduğum süreç boyunca destek olan bütün hocalarım ve asistan arkadaşlarıma da teşekkürlerimi paylaşmak isterim

Bu süreçte projelerinde çalıştığım ve laboratuvar imkanlarından yararlandığım eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Akın Sevinç' e ve İzmir Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezindeki bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yıldız Teknik Üniversitesi'ndeki doktora sürecim boyunca her daim sevgi, saygı ve desteğini hissettiğim Cansu Tatar, Gülşah Akbaş, Sultan Cansu Gönenç, Serra Çilem Ercan ve Yunus Emre Arvas'a teşekkür ederim.

Benim bu eşsiz yolda her zor anımda yanımda olan, bitmeyen arkadaşlığımız ve mutluluk kaynaklarım olduğu için; güzel yüreklim Ayşe SAYMAZ, Büşra ALPER' e, yeri her zaman ayrı olacak olan Gözde DİNÇ' e, Harbiye HACIBEKTAŞOĞLU' na, Mir Aykan Akkaya'ya, Sinem GÜNERİ' ye, Sinem KADIOĞLU' na, Zeynep DURDU' ya teşekkür ediyorum.

Lise yıllarımda beni tavsiyeleri ve desteği ile hep iyiye ve güzele yönlendiren, vatan ve iş sevgisi ile beraber; bana Biyoloji dersini de sevdiren, manevi desteğini 2005' ten beri esirgemeyen, yollarımız ayrılsa da kalplerimizin bir olduğunu bildiğim lise Biyoloji öğretmenim Yıldırım Beyazıt BOZKURT' a da büyük bir teşekkür borçluyum.

Sağladıkları imkân ile Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2020-3814 doktora çalışmama büyük katkısı bulunan YTÜ BAP Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince beni destekleyen, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan tüm aile bireylerime; mesafeler uzak da olsa desteğini her daim hissettiren ve engin hayat bilgisi ile ufkumu açan, sorgulatan ve düşündüren babama, hayatı öğreten,beni koşulsuz destekleyen ve hep güzeli ve iyiyi gösteren anneme, her daim arkamda olan ve sırtımı dayadığım Tuğba Ece Eralp' e ve aklına, zekasına,

öngörüsüne ve sohbetine hayran olduğum Mehmet Oğuzhan Eralp' e, ne kadar büyüseler dahi halen benim miniklerim olan İdil Tuna Eralp ve Halilkaan İltöre Eralp' e teşekkür ederim. Bir de evimizin neşesi Gece ve Munis'e varlıkları için minnettarım.

Tuğçe Nur Eralp

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR **v**

SİMGE LİSTESİ **viii**

KISALTMA LİSTESİ **ix**

ŞEKİL LİSTESİ **ixv**

TABLO LİSTESİ **xxxix**

ÖZET **xx**

ABSTRACT **xxxii**

1 GİRİŞ **1**

1.1 Kanser 1

1.1.1 Meme Kanseri 4

1.2 Apoptoz 11

1.3 Hücre Döngüsü 16

1.4 Doksorubisin 25

1.5 CDK4/6 İnhibitörleri 34

2 MATERYAL METOD **45**

2.1 Materyal 45

2.2 Metod 54

3 BULGULAR VE TARTIŞMA **64**

3.1 Abemaciclib ve Doxorubicin tek tek ve kombine uygulaması MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında doza bağlı olarak sağkalımı etkiler 65

3.2 DOX ve ABE kombinasyon terapisi MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etki eder 83

3.3 MDA-MB-231 hücre hattının DOX ve ABE ile muamele edilmesi Antioksidatif Özelliklerini Değiştirmektedir 86

3.4 Abemaciclib ve Doxorubicin uygulamasını MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümüne sebep olur 90

3.5 Abemaciclib ve Doxorubicinin MDA-MB-231 TNBC hatta Uygulanması Hayatta Kalma ve Apoptotik Yollarda Rol Alan Proteinlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etki Gösterir 91

4 SONUÇ **94**

KAYNAKÇA **97**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **109**

SİMGE LİSTESİ

α	alfa
β	Beta
rpm	dakikada rotasyon sayısı
δ	Delta
γ	Gama
Rcf	Göreceli santrifüj gücü
g	Gram
k	kilo
l	litre
m	mili
mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
M	Molar
N	normal
V	Volt
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

Abe	Abemaciclib
Abs	Absorbans
AC	Adenocarcinoma
ADH	Atypic Ductal Hyperplasia
Akt	Protein kinase B (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)
APC	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APS	Amonyum Persülfat
AR	Androjen Reseptörü
ARF	Alternative reading frame
ATCC	American Type Culture Collection
ATF4	Activating Transcription Factor-4
ATM	Ataxia-Telangiesctasia Mutated
ATR	Ataxia-Telangiesctasia and Rad3 related protein
Bak	Bcl2 antagonist killer-1
Bax	Bcl2 associated X protein
Bcl2	B cell lymphoma 2
Bcl-Xl	B cell lymphoma extralarge (B2CL1)
BH3	Bcl2 homoloji
BMI	Beden Kitle İndeksi
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovine Serum Albumin
CCND	Cyclin
CCND1	Cyclin D1

CDC	Hücre bölünme döngüsü
CDC25	Coiled-coil domain containing 25
CDH	Kaderin
Cdk	Siklin Bağımlı Kinaz
CDT1	Kromatin lisanslaması ve DNA replikasyon faktörü 1
CHK	Checkpoint kinase 2
CHOP	C/EBP Bağlayan Protein
c-Kit	Cellular homologue of the viral oncogene v-kit
CLB	Hücre Lizis Tamponu
CO_2	Karbon Di Oksit
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DCIS	Ductal Carcinoma *In Situ*
ddH2O	Çift distile su
DEN	Dietilnitrozamin
dH2O	Distile su
Dioc-6	3,3'-Dihexyloxacarbocyanine
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ F12
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Dox	Doksorubisin
DR	Death Receptor
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epitelyal Büyüme Faktörü
EGFR	Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGTA	Etilen Glikol Tetra Asetik Asit

ER	Östrojen Reseptörü
ER-	Östrojen Reseptörü Negatif
ER+	Östrojen Reseptörü Pozitif
ERBB1	Human Epidermal Growth Factor Receptor 1-erb-b2 receptor tyrosine kinase 1- v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 1
ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERS1	Estrogen Receptor 1 kodlayan gen
EtOH	Etil Alkol
FADD	Fas associated Death Domain
FBS	Fetal Bovine Serum
FGFR1	Fibroblast Growth Factor receptor 1
FHS	Fetal Horse Serum
G1	Gap1
G2	Gap2
GES	Gene Expression Signature
GRB7	Growth factor receptor bound protein 7
GSH	Glutatyon
HCl	Hidroklorik Asit
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IBC	Invasive Breast Cancer
IC50	Hücre Büyümesini %50 inhibe eden konsantrasyon veya Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
IGF	İnsulin like growth factor
ILC	Lobular carcinoma

JAK	Janus Kinaz
kDa	KiloDalton
Ki67	Marker of proliferation
LCIS	Luminal Carcinoma *In Situ*
LT	Long Term
MAD2L1	MAD2 mitotik tutuklama eksikliği benzeri 1
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCC	Mutated in Colorectal Cancer
MCF-10A	Michigan Cancer Foundation-10A
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MCl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MCM	minikromozom bakım kompleksi bileşeni
MDA-MB-231	MD Anderson Metastatic Breast 231
MEGM	Mammary Epithelial Cell Growth Medium
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MET	Mesenchymal Epithelial Transition
MetOH	Metil Alkol
MOMP	Mitochondiral Outer Membrane Permeabilisation
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
Myc	myelocytomatosis
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-kappa Beta
NKC	Doğal Katil Hücreleri
Notch	Neurogenic locus notch homolog protein 1
Noxa	Latince hasar,zarar

NST	Nonspesifik Tip
OD	Optical Density
PAGE	Poli Akrilamit Jel Elektroforezi
PAM50	Prediction Analysis of Microarray 50
PARP	Poly (ADP) Ribose Polymerase
pBcl2	phospharylated B cell lymphoma 2
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PE	Plevral Efüzyon
PI	Propidium İodide
PIK3ca alpha	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit
PLK1	polo benzeri kinaz 1
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florit
PPARγ	Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma
PR	Progesteron Reseptörü
PR-	Progesteron Reseptörü Negatif
PR+	Progesteron Reseptörü Pozitif
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polivinilidin Florid
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat associated sarcoma
Rb	Retinoblastoma
RIPK 1	Receptor interacting serine/threonine kinase 1
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türevi

RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
SOD	Süperoksit Dismutaz
Src	Sarkoma
ST	Short Term
STAT	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris Tamponlu Tuz
TBS-T	Tris Tamponlu Tuz ve Tween 20 birleşimi
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TDLU	Terminal Ductal Lobular Unit
TEMED	N,N,N′,N′ -Tetramethylethylenediamine
TME	Tümör Mikroçevresi
TNBC	Triple Negatif Meme Kanseri
Topo2	Topoizomeraz
tp53	tumor protein 53
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Factor
UV	Ultra Violet
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XBP1	X-box binding protein 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Kanserin belirtileri (Hanahan, 2022'den uyarlanmıştır). **3**

Şekil 1.2 Meme kanseri biyolojisi. a) Meme kanseri genetik ve genomik olarak heterojen bir hastalıktır. b) Şematik olarak meme kanserinin ilerlemesi. c) Kanser hücreleri ile normal meme kök hücresi veya öncül hücrelerinin benzerlikleri (Vargo-Gogola ve Rosen; 2007' den uyarlanmıştır). **6**

Şekil 1.3 Meme kanseri sınıflamasında intrinsik, taşıyıcı ve histolojik alt tipler (Harbeck vd.,2019' dan uyarlanmıştır). **7**

Şekil 1.4 Apoptoz yolu aktivasyonunun moleküler mekanizmaları. a) İntrinsik-İçsel apoptotik yol. b) Ekstrinsik yol (Bedoui vd., 2020' den uyarlanmıştır). **14**

Şekil 1.5 CDK yapıları ve hücre siklusunun ilerlemesi (Ashgar vd., 2015'ten uyarlanmıştır). **18**

Şekil 1.6 G1–S geçişini düzenleyen yollar ve kanser ile bu yolların etkileşimi (Ashgar vd., 2015' ten uyarlanmıştır). a| Mitojenik sinyaller, birçok mekanizma yoluyla CDK4 veya CDK6 aktivitesini etkiler. Bütün bu yollar antagonize de edilebilir veya INK4lerin indüksiyonunu sağlama, karmaşık birleşmeyi önleme ve birleşmiş kompleksleri engelleme işlevi görebilir. b | CDK4 ve CDK6'nın net aktivasyon durumu, E2F transkripsiyon faktörleri ailesinin aktivasyonuna ve salınmasına katkıda bulunan tümör baskılayıcı retinoblastoma proteininin (RB) fosforilasyonunu başlatır. c | E2F proteinleri ve diğer sinyallerreplikasyon ve RB hiperfosforilasyonuna katkıda bulunur. S fazı ve G2-M geçişini kontrol eder. Bu aktivitenin serbestleştirilmesi, kanserde E-tipi siklinlerin amplifikasyonu veya CDK inhibitörlerinin kaybı yoluyla gerçekleşir. CCN, siklin; CDC, hücre bölünme döngüsü; CDT1, kromatin lisanslaması ve DNA replikasyon faktörü 1; CIP, CDK ile etkileşime giren protein; KIP, kinaz inhibitör proteini; MAD2L1, MAD2 mitotik tutuklama eksikliği benzeri 1; MCM, minikromozom bakım kompleksi bileşeni; PLK1, polo benzeri kinaz 1. ..... **21**

Şekil 1.7 CDK yapılarının hücredeki fonksiyonları (Ashgar vd., 2015' ten uyarlanmıştır. CDK–Cyc yeşil renkle gösterilen kompleksler hücre döngüsünün ilerlemesini desteklerken, yeşil renkle gösterilen kompleksler hücre döngüsünün ilerlemesini destekler. Mavi genellikle transkripsiyon süreçlerinde yer alır. Gösterilen CDK5 komplekslerinden kırmızı olanlar hem nöronal canlılığın kontrolünde hem de teşvikinde rol oynarlar.. ..... **23**

Şekil 1.8 Doksorubisinin kimyasal yapısı (U.S. National Library of Medicine. (n.d.). Doxorubicin).. ..... **24**

Şekil 1.9 (A) Hücrelerin DOX ile muamelesi ardından DNA hasarının tetiklenmesi. (B) DDR yolunun aktive olması. (C) DOX muamelesi ile apoptotik

programlı hücre ölümünün veya hücre döngüsü durmasının tetiklenmesi (Kciuk vd., 2023' den uyarlanmıştır). **27**

Şekil 1.10 DOX' un ROS indüksiyonu ve apoptoza katkısı (Kciuk vd., 2023' den uyarlanmıştır). **30**

Şekil 1.11 Sikline bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve CDK6 (CDK4/6) inhibitörlerine yanıt, bağlamla ilintili tümör hücresinin içsel ve dışsal özellikleri de dahil olmak üzere nihai sonucu etkileyen birçok faktöre bağlıdır. a) RB' ye bağımlı E2F hedef tükenmesi. b) Senesens. c) Apoptoz ve sitostaz. d) Non-canonical Rb fonksiyonları. e) Rb substratı olmayanlar. f) CDK4/6 inhibitörlerinin, lenfositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri dahil olmak üzere tümör mikro ortamında normal olarak bulunan birden fazla hücre tipi üzerinde doğrudan etki gösterdiği gösterilmiştir (Salvador-Barbero B. vd., 2020'den uyarlanmıştır). **37**

Şekil 1.12 Sikline bağımlı kinaz (CDK) 4/6 inhibitörlerinin büyüme, yaşlanma ve apoptoz üzerindeki etkisi (Torres-Guzman vd; 2017'den uyarlanmıştır) Veriler, CDK4 ve CDK6 inhibitör tedavisi için 2 deneyin ve kontrol grupları için için 6 deneyin ortalaması (±SD) olarak çizilmiştir. β-gal= β-galaktosidaz; DMSO = dimetil sülfoksit; TUNEL=terminal deoksinükleotidil transferaz deoksiüridin trifosfat çentik ucu etiketlemesi. **39**

Şekil 1.13 Abemaciclib, ribociclib ve palbociclib ajanlarının CDK ve siklin hedefleri (Johnston ve ark.,2023'ten uyarlanmıştır). Abemaciclib, ribociclib ve palbociclib ajanları için CDK/siklin komplekslerinin yarım maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri, in vitro saflaştırılmış kinazlar kullanılarak ölçüldü.. ..... **40**

Şekil 1.14 Hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişin düzenlenmesi ve CDK4/6 inhibitörlerine karşı oluşan direncin yolları (Johnston vd., 2023'den uyarlanmıştır).. ..... **41**

Şekil 1.15 Abemaciclibin kimyasal yapısı (Abemaciclib, 2024) **43**

Şekil 3.1 DOX ve ABE uygulamasının doza bağlı olarak MDA-MB-231 hücre hattının sağkalımı üzerindeki etkilerini incelemek için MTT Hücre Canlılık Testi uygulanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattının belirtilen konsantrasyonlarda (a) DOX ve (b) ABE ajanları ile ayrı ayrı muamele edilmesinin etkileri grafikte sunulmuştur. Grafikteki veriler; 4 ölçümün (n = 4) ortalama değerleri dikkate alınarak ve standart sapmada hesaba katılarak sunulmuştur.. ..... **65**

Şekil 3.2 DOX ve ABE uygulamasının doza bağlı olarak MCF-7 hücre hattının sağkalımı üzerindeki etkilerini incelemek için MTT Hücre Canlılık Testi uygulanmıştır. MCF-7 hücre hattının belirtilen konsantrasyonlarda (a) DOX ve (b) ABE ajanları ile ayrı ayrı muamele edilmesinin etkileri grafikte sunulmuştur. Grafikteki veriler; 4 ölçümün (n = 4) ortalama değerleri dikkate alınarak ve standart sapmada hesaba katılarak sunulmuştur.. ..... **66**

Şekil 3.3 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının kombinasyon kullanımı ile meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanılarak uygulanmış MTT Hücre Sağkalım Analiz sonuçları. MCF-7 hücreleri 0.25 µM DOX ve 0.25 µM

ABE ile tek başına ve değişen DOX + ABE kombinasyon konsantrasyonlarında (0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0,5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.1 µM ABE, 0.25 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.25 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.25 µM DOX + 0.1 µM ABE) 4 farklı denemede ve 4 tekrarlı olarak kuyucuklarda 24 saat inkübe edildiğinde hücrelerin sağkalımlarında doza bağlı olan istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Grafik sunumunda 4 farklı analizde 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilen toplam 16 ölçüm ortalaması ve standart sapmalar kullanılmıştır. **67**

Şekil 3.4 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının kombinasyon kullanımı ile meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 kullanılarak uygulanmış MTT Hücre Sağkalım Analiz sonuçları. MDA-MB-231 hücreleri 0.1 µM DOX ve 0.5 µM ABE ile tek başına ve değişen DOX + ABE kombinasyon konsantrasyonlarında (0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 1 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE) 4 farklı denemede ve 4 tekrarlı olarak kuyucuklarda 24 saat inkübe edildiğinde hücrelerin sağkalımlarında doza bağlı olan istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Grafik sunumunda 4 farklı analizde 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilen toplam 16 ölçüm ortalaması ve standart sapmalar kullanılmıştır. **73**

Şekil 3.5 DOX ve ABE kombinasyon terapisi için CompuSyn analizleri gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri 24 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda DOX ve ABE ajanları ile muamele edilmiştir (0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 1 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE) ve elde edilen sonuçlar doza bağlı olarak hücre sağ kalım oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşme paterni tespit edilmiştir. Veriler 4 farklı ölçümden elde edilen değerlerin ortalaması ve ve standart sapmaları ele alınarak hesaplanmıştır.. ..... **75**

Şekil 3.6 DOX ve ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin kontrol ve DOX ve ABE ajanları ile teker teker muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerine nazaran sonuçları açısından ComBenefit analizleri. Mavi ve yeşil bölgeler sinerjistik etkileşimi gösterir, Kırmızı ile sarı arasındaki alanlar ile analizler sonucunda antagonistik etkiyi göstermektedir. Veriler 4 farklı ölçümündeki değerlerin ortalama değerleri ve ilgili standart sapma değerleri olarak kullanılmıştır. **76**

Şekil 3.7 MCF-7 hücrelerinde DOX ve ABE kombinasyon terapisi için CompuSyn analizleri gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücreleri 24 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda DOX ve ABE ajanları ile muamele edilmiştir (0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX +

0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE). Veriler 4 farklı ölçümden elde edilen değerlerin ortalaması ve ve standart sapmaları ele alınarak hesaplanmıştır.. ..... **77**

Şekil 3.8 DOX ve ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin; kontrol,DOX ve ABE ajanları ile teker teker muamele edilen MCF-7 hücrelerine nazaran sonuçları açısından ComBenefit analizleri. Mavi ve yeşil bölgeler sinerjistik etkileşimi gösterir, Kırmızı ile sarı arasındaki alanlar ile analizler sonucunda antagonistik etki göstermektedir. Veriler 4 farklı ölçümdeki tüm değerlerin ortalama değerleri ve ilgili standart sapma değerleri ele alınarak hesaplanmıştır.. ..... **79**

Şekil 3.9 MDA-MB-231 hücre hattında DOX ve ABE ajanlarının tekli ve kombinasyon terapisi şeklinde uygulanmasının kanser hücrelerinin koloni oluşturma etkinliği üzerindeki etkilerinin gösterilmesi. Veriler 3 farklı ölçüm sonucunda belirlenen koloni sayısı, hesaplanan koloni ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanan koloni oluşturma etkinliği (CFE) ve relatif koloni oluşturma etkinliği (RCFE) olarak sunulmuştur. **81**

Şekil 3.10 MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan her iki kemoterapötik ajanın (ABE ve DOX) teker teker ve kombine uygulamasının SOD seviyelerine etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$)..... **83**

Şekil 3.11 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının teker teker ve kombinasyon uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında GSH seviyelerinin kontrol hücrelerine nazaran etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$)..... **84**

Şekil 3.12 . DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının teker teker ve kombinasyon uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında MDA seviyelerinin kontrol hücrelerine nazaran etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$)..... **85**

Şekil 3.13 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının teker teker ve kombinasyon uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında MDA (a), GSH (b), ve SOD (c) seviyelerinin kontrol hücrelerine nazaran etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$). **86**

Şekil 3.14 Dioc-6 (yeşil) ile PI (kırmızı)boyama ile sırasıyla MOMP (Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği) ile Hücre Ölümünün MDA-MB-231 hücre hattında DOX, ABE ve DOX-ABE Kombinasyon Tedavisini takiben gerçekleştirildi. **87**

Şekil 3.15 DOX, ABE ve DOX+ABE muamelesinin apoptozu Kaspaz-3, PARP ve Bax yoluyla modüle etmesinin western blot ile gösterilmesi. İmmünoblotlama tahlili için ImageJ ve GraphPad V10 veri analizi, MDA-MB-231 hücrelerindeki her protein için sütun grafikleri olarak verildi.Tüm gruplardan elde edilen sonuçlar kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($p<0,05$)..... **89**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları. **44**

Tablo 2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar **48**

Tablo 2.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Canlı Materyaller **50**

Tablo 2.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler. **51**

Tablo 2.5 SDS PAGE alt jel içeriği **55**

Tablo 2.6 SDS PAGE üst jel içeriği. **56**

Tablo 3.1 MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin değişken konsantrasyonlarda Doxorubicin ve Abemaciclib ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre sağkalım değerleri. **68**

Tablo 3.2 Kombinasyon terapisi sonucunda elde edilen Absorbance ortalamaları, standart sapmalar ve her kombinasyon için herhangi bir ajanın kullanılmadığı kontrol hücrelerinin büyüme değerine yüzdelik oranları. **72**

Tablo 3.3 Herhangi bir kemoterapötik ajan ile muamele edilmemiş kontrol grubu MDA-MB-231 hücre hattının, 0.1 μM DOX ile muamele edilmiş hücre grubu, 0.5 μM ABE ile muamele edilmiş hücre grubu, ve 0.1 μM DOX + 0.5 μM ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilmiş hücre grubu için koloni sayıları, koloni oluşturma etkinliği (CFE) ve relatif koloni oluşturma etkinliği (RCFE) değerleri **82**

ÖZET

Doksorubisin ve Abemaciclibin Meme Kanseri Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Olarak İrdelenmesi

Tuğçe Nur ERALP

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türü olup kadınlarda en sık görülen kanser türü olarak akciğer kanserinin yerini almaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde cinsiyet değişkenine göre kansere bağlı ölümlerin en önemli nedeni meme kanseri olarak belirtmek gerekmektedir.Diğer yandan meme kanseri alt tiplerinden olan Triple Negatif Meme Kanserleri (TNBC); moleküler olarak, kötü prognoza sahip ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu bir meme kanseri alt tipi olup tedavi seçenekleri diğer moleküler alt tipteki meme kanserlerine göre sınırlı kalmaktadır. Klinik olarak onaylanmış biyobelirteçlerin TNBC' lerde kesin olarak bulunmaması nedeniyle mevcut tedavi seçenekleri, sıklıkla etkisiz hale gelen sitotoksik kemoterapiye dayanmaktadır. TNBC kanser tedavisinde rutin olarak kullanılan doksorubisin (DOX) ise hem beklenen etkiyi tam

da bu sebepten ötürü yeterince sağlayamamakta hem de DOX gibi Topoizomeraz II inhibitörleri ilişkili direnç mekanizmaları nedeniyle ilaçtan istenen etki alınamamaktadır. Bu durumlarda direnç oluşumundan ötürü yeni kanser terapötiklerinin kombine şekilde kullanılması ise son anti- kanser stratejilerdendir. Bu çalışmada ABE ile DOX' un kanser hücrelerinde farklı etki mekanizmaları yoluyla çalıştığının bilinmesi sebebiyle ABE, DOX ile birlikte ele alınmıştır. Bu çalışmada hem MCF-7; hem de TNBC özellikte olan MDA-MB-231 hücrelerinde bir CDK4/6 inhibitörü olan ABE ve DOX kombinasyon etkisinin olup olmadığını görebilmek, sitotoksik, apoptotik etkisinin belirlenmesi, antioksidan değişimlerin gösterilmesi ve bunun hangi moleküler yollarla gerçekleştiğini saptayabilmek amaçlanmıştır.

Mevcut çalışma ile geleneksel bir ajan olan DOX ile bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü ulan ABEnin bir TNBC hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki potansiyel terapötik etkisi ortaya konulmuştur. Elde ettiğimiz bulgular, ER+ HER2- meme kanseri tedavisinde kullanilan ABE ajanının TNBC hücre hattı olan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğunu ve kombinasyon etkisinin TNBC hücre ölümünü sinerjistik olarak artırdığını göstermektedir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarla ek moleküler yolakların etkileşiminin incelenmesi, hayvan deneyleri ve faz çalışmaları sayesinde TNBC hastaların klinik durumu daha da iyileştirme olasılığı ortaya çıkabilir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, kombinasyon terapisi, Cdk inhibitörü.

ABSTRACT

Molecular Investigation of the Effects of Doxorubicin and Abemaciclib on Breast Cancer

Tuğçe Nur ERALP

Department of Molecular Biology and Genetics

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Co-supervisor: Asst. Prof. Dr. Akın SEVİNÇ

Breast cancer is the second most common type of cancer after lung cancer and replaces lung cancer as the most common type of cancer in women. It should be noted that the most important cause of cancer-related deaths, especially in developing countries, according to gender variable, is breast cancer. On the other hand, Triple Negative Breast Cancers (TNBC), which is one of the breast cancer subtypes; Molecularly, it is a breast cancer subtype with a poor prognosis and limited treatment options, and treatment options are limited compared to breast cancers of other molecular subtypes. Due to the definitive lack of clinically validated biomarkers in TNBCs, current treatment options rely on cytotoxic chemotherapy, which is often ineffective. Doxorubicin (DOX), which is routinely used in TNBC cancer treatment, cannot provide the expected effect sufficiently for this reason, and the desired effect cannot be obtained from the drug due to the resistance mechanisms associated with Topoisomerase II inhibitors such as DOX. In these cases, due to the formation of resistance, the combined use of new cancer therapeutics is one of the last anti-cancer strategies. In this study, ABE was discussed together with DOX since it is known that ABE and DOX work through

different mechanisms of action on cancer cells. In this study, both MCF-7; It was aimed to see whether the combination of ABE and DOX, a CDK4/6 inhibitor, has an effect on MDA-MB-231 cells with TNBC properties, to determine its cytotoxic and apoptotic effects, to show antioxidant changes and to determine which molecular pathways this occurs.

The current study revealed the potential therapeutic effect of DOX, a conventional agent, and ABE, a cyclin-dependent kinase inhibitor, on the MDA-MB-231 cell line, a TNBC cell line. Our findings show that the ABE agent used in the treatment of ER+ HER2- breast cancer has a cytotoxic and apoptotic effect on the TNBC cell line, MDA-MB-231 breast cancer cell line, and the combination effect synergistically increases TNBC cell death. With future studies, examining the interaction of additional molecular pathways, animal experiments and phase studies, the possibility of further improving the clinical condition of TNBC patients may emerge.

Keywords: Breast cancer, combination therapy, Cdk inhibitor.

1
GİRİŞ

1.1 Kanser

Bizler gibi çok hücreli olan canlıların vücudundaki birçok hücre türü, eksiksiz bir organizmayı oluşturabilecek genomu taşır. Aslında bu durum, bu hücrelerin herhangi birinin ihtiyaç duyacağından çok daha fazla bilgidir. Aynı zamanda vücuttaki birçok hücre, organizma gelişimi tamamladıktan sonra da çeşitli mekanizmalar aracılığıyla bile büyüme ve bölünme yeteneğini korur. Bu çoğalma ve morfogeneze katılma yeteneği, bir organizmanın ömrü boyunca yetişkin dokularının korunmasını mümkün kılan asıl mekanizmadır. Bu mekanizma, yara onarımı ve uzun süreli hizmet sonrasında yıpranmış hücrelerin apoptozunu veya değişim ile dönüşümünü de içine alır. Bununla beraber bu çok yönlülüğün tehlikeli bir tarafı da bulunmaktadır. Her bir hücrede mevcut olan total genomik bilgiye erişimin varlığı, var olan dokuların ve hücrelerin kendi yapı ve işlevine uygun olmayan spesifik özellikler kazanmasına sebep olabilir ve bu durum çok hücreliler için zaman zaman tehlike oluşturabilmektedir; çünkü bu genomik dizilimler genom yapısı ve genetik bilgi içeriğini değiştirebilen mekanizmaların aktifleşmesi ile bozulmaya veya mutasyona uğrayabilir. Mutant genler ve dolayısıyla mutant hücrelerde anormal genotip ve fenotip oluşmasına sebebiyet verebilir ve bu roller hücrenin spontan rolüyle uyumsuz da olabilir. Eğer bu değişimler hücre ile doku yapımı,bakımı,kontrolü,çoğalması ile ilgili yapılarda değişime sebep olursa artık homeostaza uymayan yapıların ve hatta oldukça büyük hücre popülasyonlarının ortaya çıkmasına sebep olabilir (Weinberg 2014).

İşte bu durumda kanser bir fenomen olarak düzensiz hücre büyümesi ve hücrelerin kökenlendikleri bölgelerinden veya birincil bölgelerinden vücudun diğer bölgelerine istilası ve yayılmasıyla karakterize edilen bir grup hastalık için kullanılan bir terimdir. Kanser bir grup hastalık olarak kabul edilmekte olup şimdiye kadar yüzden fazla kanser türü sınıflanmıştır. Özellikle köken aldığı doku bize kanserin ayırt edici özellikleri konusunda birçok ayırt edici bilgi verir. Günümüzde bu vakaların yaklaşık %85'i epitel oluşup karsinom olarak adlandırılırken, mezoderm hücrelerinden kökenlenen malign yapılara sarkom denir.

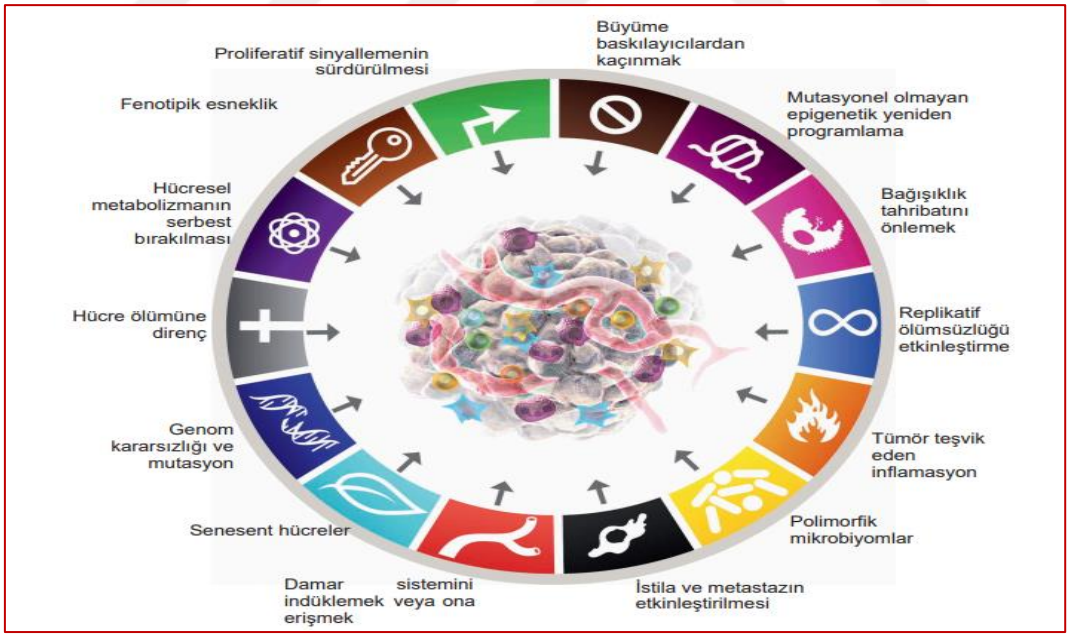
Diğer yandan meme gibi glandüler doku kanserleri ise adenokarsinom olarak adalndırılır. Farklı kökenlerden gelen kanserlerin farklı özellikleri olmakla beraber altta yatan hücresel ve moleküler yollar farklı olsa dahi nihai sonuç aynıdır (Pecorino,2012).

2000 yılında kanser alanında yaptıkları uzun süreli çalışmalar sonucunda Hanahan ve Weinberg, hepsi olmasa da çoğu kanserin altı ayırt edici özelliğini tanımlamıştır (Hanahan Weinberg 2000). Otonom büyüme sinyalleri yeteneğinin kazanılması, büyümeyi inhibe eden sinyallerden kaçınma, apoptotik hücre ölümünden kaçınma, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezin aktifleştirilmesi, invazyon ve metastazın karsinogenez için gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir. 2011 yılında ise bu konsepti, kanserin altı ayırt edici özelliğinin kazanılması için çok önemli olan, genom istikrarsızlığı ve tümörü teşvik eden inflamasyon gibi iki etkinleştirici özelliği içerecek şekilde değiştirip enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık tahribatının önlenmesi olarak ortaya çıkan iki özelliğin altını çizmişlerdir. Son iki süreç sonyıllarda, yeni ortaya çıkan ayırt edici özellikler olarak kabul edilmiş olup daha önce sözü edilen yerleşik altı özellik ile olan ilişkileri, karsinojenezdeki önemlerine dair kanıtlar olmasına rağmen, daha fazla araştırma gerektirdiği belirtilmiştir. Bu belirteçlerin her biri, yeni terapötiklerin tasarımı sratejisinde potansiyel bir hedeftir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanserin ayırt edici özellikleri, hücrelerin normal durumlarından neoplastik büyüme durumlarına doğru ilerlerken insan hücreleri tarafından edinilen bir dizi fonksiyonel yetenek, daha spesifik olarak kötü huylu tümörler oluşturma yetenekleri için çok önemli olan yetenekler olarak önerilmişken 2022 yılında Douglas Hanahan tarafından yayımlanan son çalışmada bu ayırt edici özelliklerin, kendi başlarına, kanser patogenezinin karmaşıklığını; yani gelişen preneoplastik hücrelerin tümör gelişimi ve malign ilerlemeye gelişim sürecinde bu anormal fenotipik yetenekleri geliştirmesine ve kazanmasına izin veren kesin moleküler ve hücresel mekanizmaları ele almakta yetersiz kaldığını belirtmişlerdir. Buna göre, kanser hücrelerinin ve tümörlerin bu fonksiyonel özellikleri benimseyebilmesini sağlayan araçları sağlayan neoplazinin anormal durumunun sonuçları olan "etkinleştirici özellikler" olarak tasvir edilen başka bir kavram da bu tartışmaya eklenmiştir. Yukarıda belirtilen sekiz yeteneğin kendisinden ziyade, ayırt edici

özelliklerin elde edildiği moleküler ve hücresel mekanizmalara yansıyan kolaylaştırıcı özellikler olarak etkinleştirici özellikleri tanımlayabiliriz. Bu iki etkinleştirici süreç, genom kararsızlığı ve tümörü teşvik eden enflamasyondur. Ayrıca, burada heterojen ve etkileşimli kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri popülasyonlarının yanı sıra çok sayıda yerleşimli stromal hücre tipinden (dönüştürülmüş parankim ve ilişkili stroma) oluştuğu tanımlanan tümör mikroçevresinin (TME) tümör oluşumunda ve malign ilerlemede artık yaygın olarak tamamlayıcı bir rolde kabul edildiği görülmüştür.

Bu kavramsal kanserin temel özellikleri modeli ihtiyacına dahil edilebilecek ek özellikler de var mı sorusundan yola çıkarak bunların insan kanserleri yelpazesinde geniş çapta uygulanabilir olmasını sağlamak için; zamanla kanser kavramsallaştırmasının temel bileşenleri olarak dahil edilebilecek birkaç olası yeni kolaylaştırıcı özellik 2022 yılında Hanahan tarafından önerilmiştir. Bu yeni temel parametreler "fenotipik plastisitenin kilidini açmak", "mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama", "polimorfik mikrobiyomlar" ve "yaşlanan hücreler" olarak ortaya atılmıştır.



Şekil 1. 1 Kanserin belirtileri (Hanahan, 2022'den uyarlanmıştır).

Kanserin sekiz ayırt edici özelliğinin ve bunlara son olarak eklenen etkinleştirici iki özelliğin, kanserin kavramsallaştırılmasında kalıcı buluşsal değere sahip olduğu kanıtlamış olsa da, bazı genellemelere yeni yönlerinde eklenebileceğini ve dolayısıyla karmaşıklıkların, mekanizmaların ve kanserlerin daha iyi anlaşılmasında da etkili olabileceğini ortaya koymuştur (Şekil 1.1).

1.1.1 Meme Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün altında bir kurum olan olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) dünya çapında kansere dair yapılan araştırmalarda ortaya çıkan verilerson olarak Aralık 2020'de tüm dünyada yayınlanmıştır. GLOBOCAN 2020 veritabanına bakıldığında, dünya üzerindeki 185 ülkede 36 tip kanser türü için ölüm oranları, rastlanma sıklığı ve ölüm oranlarıyla ilişkili tahminler bu belgede görülmektedir. Küresel kanser yükünün artması geçmiş GLOBOCAN verilerine bakıldığında daha açık şekilde görülmektedir. 2012'de yeni kanser vakası 14.1;2018'de 18,1;2020'de ise 19.3 milyon olarak açıklanmıştır. Kanserden hayatını kaybedenlerin sayısı bu 3 veri sunumunda sırasıyla 8.2, 9.6 ve 10 milyon kişi olarak açıklanmıştır (GLOBOCAN,2020).

Türkiye için tahminlerde ise 83 milyonu aşan nüfus için o yıl 233. 000'den fazla yeni kanser tanısı ve 126 000'den fazla kanser nedenli ölüm tahmini yapılmıştır. Veriler hazırlanırken Ankara, Antalya, Bursa, Edirne, Erzurum, Eskişehir, İzmir, Samsun, Trabzon illerinden alınan verilerden 2020 nüfusuna uygulanan en güncel yerel oranların ağırlıklı/basit ortalaması alınarak yararlanılmıştır. Dönem (2006-2015) için Kuzey ülkelerinden 1,3 ve 5 yıllık yaygınlık oranlarına göre cinsiyete, bölgeye ve yaşa özel görülme sıklığı kullanılarak hesaplanmıştır ve İnsani Gelişme Endeksi (İGE) oranları kullanılarak ölçeklendirilmiştir. Bu tabloya göre; her iki cinsiyette de en sık görülen kanser tipi akciğer iken; kadınlarda sırasıyla meme, tiroid, kolorektal, akciğer ve korpus uteri ilk 5 sırayı almaktadır. Kanser tanısı konulan 101.018 kadından 2475'i meme kanseri tanısı almıştır (GLOBOCAN,2020).

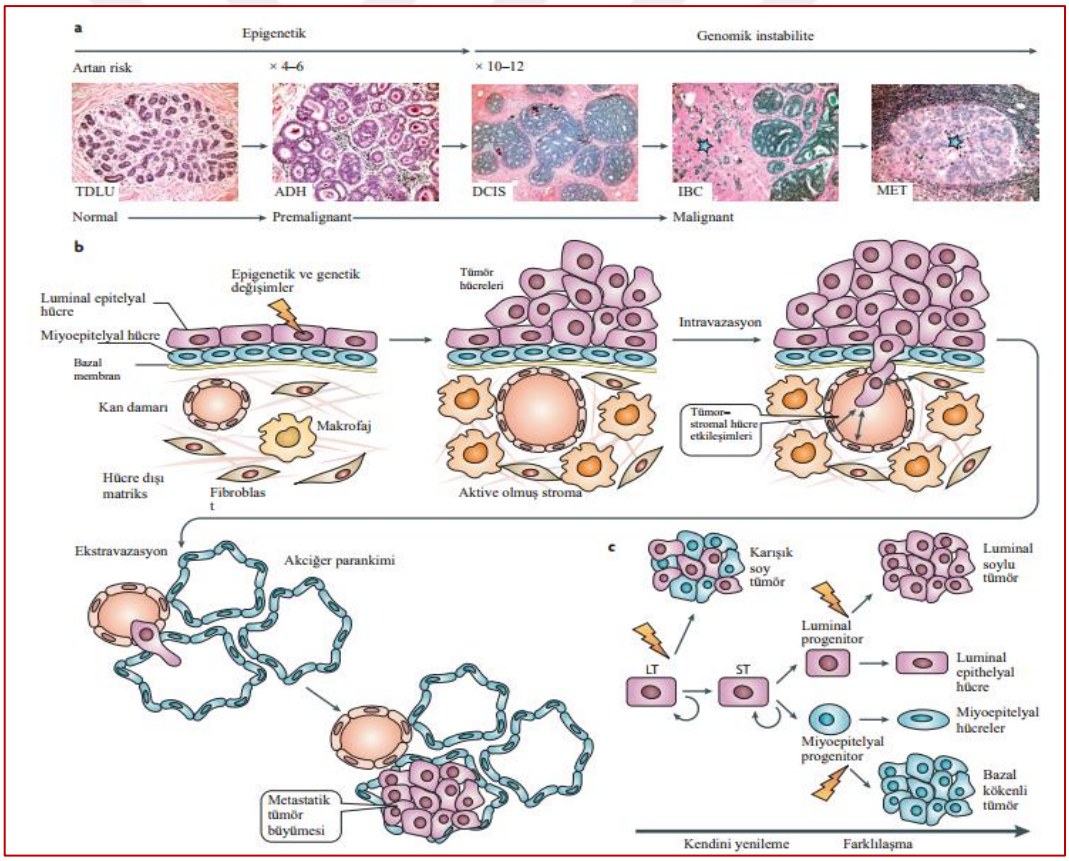
Global kanser yükü göz önüne alındığında kanser; kadınlar ise meme kanseri oldukça büyük bir yük oluşturmaktadır.Diğer yandan klinik olarak meme kanseri erkeklerde, meme kanserli kadınlara göre daha ileri yaşta (60-70 yaş) ve daha yüksek evrede teşhis edilmektedir. Memede invaziv özellik sergileyen duktal karsinom tipi büyük çoklukla gözlemlenen tipidir.

İkinci sırada ise histolojik sınıflandırmada en sık rastlanan tip ise papiller karsinom olarak adlandırılır. İçsel tiplemeye bakıldığında ise, erkeklerde görülen meme kanserlerinin >%90'ını luminal A veya luminal B tiplerinin oluşturduğu görülmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2(HER2)-pozitif olan veya üçlü negatif meme kanseri(TNBC) erkeklerde oldukça nadir şekilde görülür. AR (Androjen Reseptörü) yapısının ise erkeklerde görülen meme kanserinde aşırı ifade olduğu saptanmıştır. Erkeklerde görülen meme kanserlerinde anlatılan bu moleküler değişimlerle beraber luminal genlerin anlatımları da saptanmıştır. fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KCA) yolu ile beraber Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2) yollarının da devreye girmesi, erkeklerde görülen meme kanserleri için potansiyel ilaç hedefleridir. Erkeklerde saptanan meme kanseri hastalığının seyri, aynı evredeki meme kanserli kadınlara benzer; ancak genel sağkalım kadınlara nispeten daha azdır. Bu durumun sebepleri şu şekilde açıklanabilir: Meme kanseri olgusuna sahip erkek hastalar genelde daha yaşlıdır, daha fazla tedavisi yapılan hastalığın iyileşme sürecini olumsuz anlamda etkileyen eşzamanlı hastalığa sahiptir ve yaşam beklentisi daha düşüktür. Erkek meme kanserine ilişkin verilerin daha az olması sebebiyle erkek meme kanserlerinin tedavi süreci kadınlarınki gibi seyreder. Erkeklerde seyreden meme kanserlerinin büyük bir kısmı lümen tipli olup endokrin tedavisi burada seçenk olarak ele alınır. Cerrahi sonrası mikrometastazları yok etmeye yönelik yardımcı tedavide, tamoksifen kullanımı standart bir tedavi sürecidir. Ne yazık ki aromataz inhibitörleri meme kanserinde daha kötü hayatta kalımla ilişkili olduğundan tek başlarına tedavide hedef olarak alınmamalıdır (Harbeck vd., 2019). Kesin bir şekilde tamoksifen kullanımı gerektiğinde ise, tamoksifen ile beraber kemoterapötik ajan olarak aromataz inhibitörü ve bir luteinizan hormon salgılayan hormon agonisti kombinasyonu eklenmektedir. Her ne kadar bu kombinasyon mantıklı gibi görünse de bu kombinasyon terapisi yaklaşımı hep daha yüksek toksisite ile ilişkilendirilir. İlerlemiş meme kanserlerinde tedavi seçenekleri ile luminal meme kanserine sahip kadınlardaki terapi önerileri oldukça benzerdir (Harbeck vd., 2019).

Meme kanseri tıpkı diğer kanser tiplerinde de olduğu gibi tek bir hastalık olmayıp bir grup değişimle karakterize ve ifade edilir. Bu açıdan meme kanseri farklı

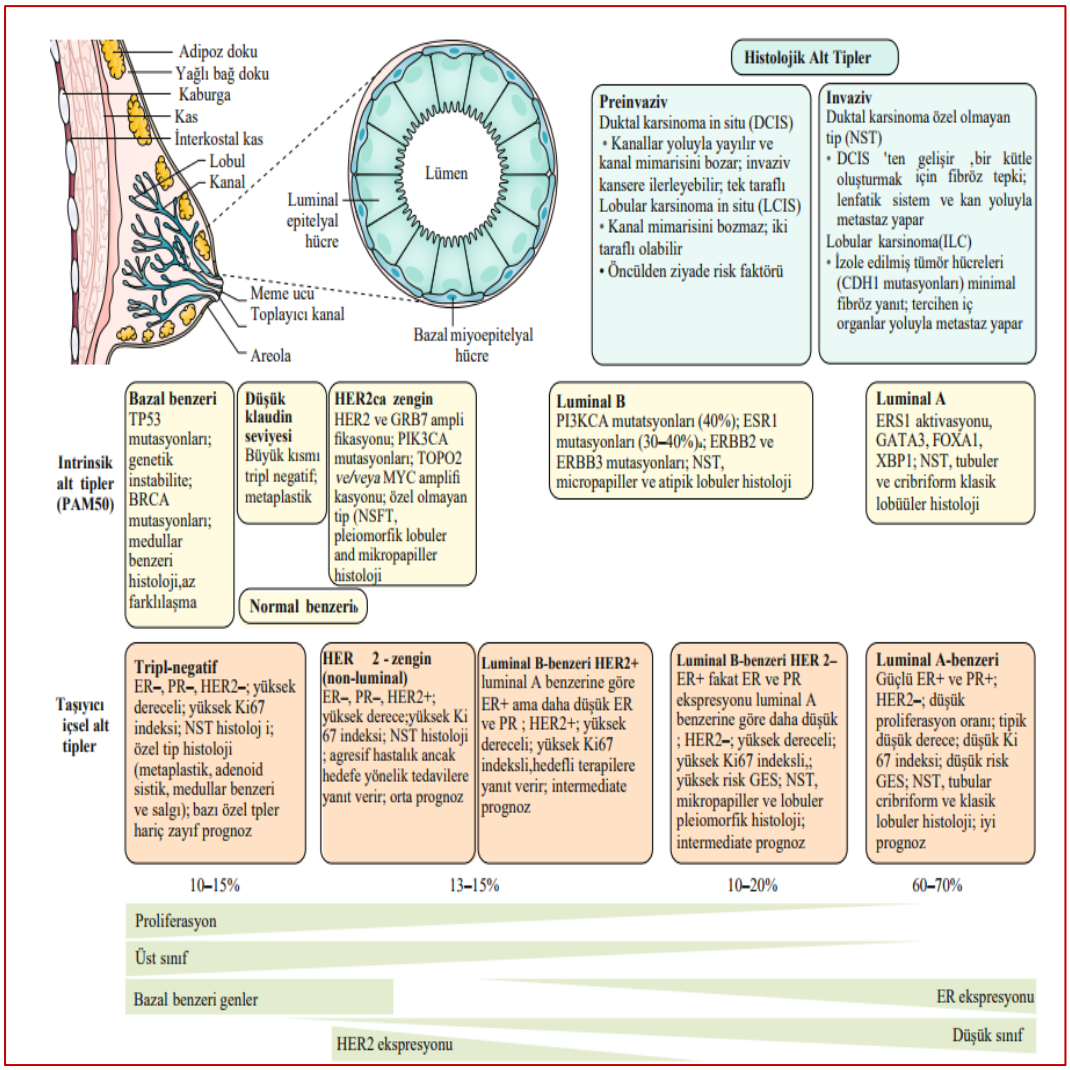
histopatolojilere, genetik ve genetik varyasyonlara ve klinik sonuçlara sahip meme hastalıklarının bir birikimi şeklinde tanımlanabilir (Şekil 1.2).

Meme kanseri heterojen bir genotipe sahip malignitedir. Normalde bir memenin terminal yapısı duktal lobüler ünitesi (TDLU), luminal ve miyoepitelyal hücreleri içeren iki katmanlı bir epitelden oluşan lobüller ve kanallardan oluşmaktadır. Tipik olmayan duktal hiperplazi (ADH) ise malignite öncesini temsil eden bir durumdur. ADH yapısı TDLU yapısından, meme kanalları veya meme lobülleri içindeki anormalleşmiş hücre katmanları sayesinde farklılık gösterir. ADH' nin, anormal hücreler içeren ama kanser gibi istilacı olmayan bir tip olan duktal karsinoma *in situ*'nun (DCIS) öncüsü olduğu düşünülmektedir. Sırayla anlatılan her aşamada kanserleşmenin ve malignitenin artışı görülür ve invaziv meme kanseri riski (IBC) de her aşamada artmaktadır (Vargo-Gogola ve Rosen; 2007).



Şekil 1. 2 Meme kanseri biyolojisi. **a)** Meme kanseri genetik ve genomik olarak heterojen bir hastalıktır. **b)** Şematik olarak meme kanserinin ilerlemesi**. c)** Kanser hücreleri ile normal meme kök hücresi veya öncül hücrelerinin benzerlikleri (Vargo-Gogola ve Rosen; 2007' den uyarlanmıştır).

DCIS, IBC' ye yol açabilir (DCIS lezyonunun yanındaki mavi yıldızla gösterilir), ancak hangi lezyonların hangi yönde ilerleyeceği ne yazık ki öngörülememektedir. Hücreler istilacı bir hal aldıktan ve karakter değiştirdikten sonra edildikten sonra önemli ölçüde bu yapılarda metastaz oluşma riski artar. Lenf düğümleri diğer birçok kanser tipinde olduğu gibi meme kanseri metastazı için ilk bölgedir (MET; mavi yıldızla gösterilir), (Şekil 1.2.a.)



Şekil 1.3 Meme kanseri sınıflamasında intrinsik, taşıyıcı ve histolojik alt tipler (Harbeck vd.,2019' dan uyarlanmıştır).

Şu anda, meme kanserinin klinik uygulamalarda genellikle histolojik ve moleküler temele göre beş alt tipi şeklinde yapılan bir sınıflandırma kullanılmaktadır. ER ve/veya PR eksprese eden tümörler, hormon reseptörü pozitif meme kanseri olarak kabul edilirken; ER, PR veya HER2'yi eksprese etmeyen tümörler üçlü negatif meme kanseridir (TNBC). Bununla beraber uzman multidisipliner bir ekip tarafından yapılan tedavi, meme kanserinin erken aşamalarında veya metastatik

meme kanseri hastalarında, yüksek kaliteli kılavuzlara göre tedavide olduğu gibi, hayatta kalma ve yaşam kalitesini artırır. Meme kanseri alanında özellikle uzmanlığı olan gruplarca kurulacak olan merkezler Avrupa Parlamentosu en başta olmak üzere dünya çapında öncelik olarak durmaktadır (Cardoso F. vd., 2017).

Meme kanserini başlatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir; ancak meme kanserini moleküler olarak karakterize etmek ve oluşumunu ve ilerlemesini tanımlamak için bilim dünyası halen çaba sarf etmektedir. Köken hücre seviyesinde, klonal evrim modeli (mutasyonların biriktiği, tümör hücrelerinde epigenetik değişikliklerin meydana geldiği ve 'en uygun' hücrelerin hayatta kaldığı) ve kanser kök hücre modeli (sadece öncü kanser hücrelerinin başlattığı ve ilerlemeyi sürdürdüğü) kanser kök hücrelerinin de klonal tarzda evrimleşebilmesi gerçeğiyle daha da karmaşık hale gelmektedir (Bombonati, A. ve Sgroi, DC, 2011).

Morfolojik açıdan bakıldığında memedeki kanserleşme sürecinde; normal homeostaz gösteren bir meme bezinden kanser oluşumuna kadar meme lezyonları oluşumu ve genetik değişimlerin bir sürekliliği ile karakterize edilir. Moleküler olarak baktığımızda ise; meme kanserinin, temelde ER ekspresyonu ve tümörün derecesi ve çoğalması ile ilişkili iki farklı moleküler yol boyunca geliştiğini gösteren çalışmalar vardır. Yapılan çalışmalarla beraber meme kanserine yatkınlıüa sebebiyet veren genlerin ve yapıların tanımlanması, hem sporadik gerçekleşen hem de kalıtsal olan meme kanserinin patogenezinin bazı yönlerine açıklık getirmiştir. Açığa çıkarılan iik yol, düşük gradeli yol olarak adlandırılır. Bu yolda genetik olarak; 1q’ nun kazancı, 16q yapısının kaybı, 17q12 yapısının seyrek de olsa amplifiye olması görülür. Ayrıca; ER fenotipi, diploid veya diploide yakın karyotipler ve düşük tümör derecesi ile ilişkili genlerin çoğunluğunu içeren bir gen ekspresyon imzası (GES) ile de bu ilk yol karakterize edilir. Luminal A grubu ve bir aşamasına kadar ise luminal B grubu da bu sınıflandırmaya girer. İkinci yol ise 13q bölgesinin kaybı, 11q13 kazanımı, 17q12 amplifiyesi ve hücre döngüsü ve hücresel proliferasyonda yer alan genlerin ekspresyon karakteristiği ile ifade edilir. HER2(+) olan meme tümörleri ve TNBC’yi de içine alacak şekilde orta ve yüksek dereceli tümörler bu genetik değişim yoluna girerler (Lopez-Garcia vd., 2010).

1.1.1.1 Meme Kanseri Hücre Hatları

Oluşturulan ilk meme kanseri hücre dizisi 1958 yılında BT-20 olmuştur (Lasfargues ve Ozzello, 1958). Bununla birlikte, MD Anderson serisi ve halen dünyada en

yaygın kullanılan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) de dahil olmak üzere meme kanseri hücre dizilerinin daha yaygın hale gelmesi için 20 yıl daha geçmesi gerekmiştir (Cailleau vd., 1978; Soule vd., 1973).

MCF-7'nin bu kadar yaygın kullanılıyor olmasının sebebi büyük ölçüde ER ekspresyonu yoluyla edindiği hormon duyarlılığından kaynaklıdır. Bu ER duyarlılığı hormon tepkisini incelemek için bu hattı ideal bir model haline getirmektedir (Levenson ve Jordan, 1997).

Bu erken başarılara rağmen, yakın geçmişte nispeten az sayıda meme kanseri hücre dizisi oluşturulmuştur; bunun temel nedeni, önemli stromal kontaminasyon olmaksızın homojen popülasyonların kültürlenmesindeki zorluklar ve birçok ülkede araştırma amaçlı insan dokularının elde edilmesini çevreleyen sıkı etik düzenlemelerdir (Human Tissue Authority [http://www.hta.gov.uk/). Bahsettiğimiz bu hatlar dışında; memdeki öncül malignitelerden, kan veya malignitenin lenfin plevra boşluğuna sızan yapılarından veya meme kanserli bazı hastalardaki farklı metastatik bölgelerden elde edilen SUM serisi yer almaktadır (Ethier vd., 1993). Bu hücre hatları uzun zamandan beri artık ticari hücre bankaları aracılığıyla yaygın şekilde mevcuttur.

Meme kanseri ele alındığında her alt malignant tipin farklı prognozu ve tedavi yanıtı vardır (Sørlie vd., 2001). ER meme kanseri tedavisinde terapötik bir hedef olduğundan, luminal A ve luminal B olarak adlandırılan meme kanseri alt tipleri hormon tedavisine uygunluk gösterir. Benzer şekilde HER2 grubu da trastuzumab tedavisi için potansiyel adaylardır. Bilinen bir terapötik hedefin ekspresyonunun mevcut yokluğu nedeniyle, bazal tümörlerin tedavisi zordur. Bu tipler biyolojik olarak daha agresiftir ve sıklıkla kötü prognoza sahiptir.

Bazal fenotip ise; ER alfa, PR ve HER2'nin ekspresyonunun eksikliği ile karakterize edilir, bazen triple negatif meme kanseri (TNBC) olarak anılır. Bazal ve üçlü negatif fenotiplerde benzerlikler olmasına rağmen terimler kesinlikle birbirinin yerine kullanılamaz. (Badve vd., 2011).

Daha yakın zamanlarda, claudin-düşük meme kanseri alt tipi, yerleşik insan ve fare veri kümelerinin sorgulanmasıyla tanımlanmıştır. Başlangıçta ER alfa, PR ve HER2 ekspresyonunun eksikliği ve ilişkili kötü prognozun bir sonucu olarak bazal

alt tip başlığı altında kümelenmiş olan bu tümörlerin, claudin-3 ve claudin-4'ün ek downregülasyonu, Ki67 proliferasyon markırının düşük ekspresyonu ile benzersiz olduğu gösterilmiştir (Herschkowitz vd., 2007; Prat vd., 2010).

Meme kanseri hücre dizileri bu hastalığın anlaşılması amacıyla en sık kullanılan modeldir. Proliferasyonun, kanserin ilerlemesinin ve apoptoz gibi birçok hücresel mekanizmada rol alan genler ve sinyal yolları ve bu süreçlerin düzenlenmesinin nasıl gerçekleştiğini araştırmak için bu modeller yeterince uzun zamandır kullanılmaktadır. İnsan meme kanseri hücre dizileri de bu amaçla kullanılan meme kanseri araştırmaları için temel modeller olup genetik manipülasyona nispeten daha açıktır ve iyi tanımlanmış deneysel koşullar altında genellikle tekrarlanabilir ve ölçülebilir sonuçlar verir (Vargo-Gogola ve Rosen;2007).

Meme kanseri halen en yaygın kanser tiplerinden biri olmasına rağmen esas olarak kanser tanısındaki gelişmelere bağlı olarak yıllar içinde ölüm oranlarında azalma vardır. Fakat bununla beraber meme kanserinin teşhis edilmesi ve tedavi süreci, farklı coğrafi alanlar arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Erken evrede saptanabilen meme kanseri için tedavide büyük bir yol kat edilmiş olmasına rağmen, metastatik meme kanserinin tedavisi hala oldukça zor ve çetrefilli bir yoldur (Correia vd., 2021). Aslında metastaz, büyük bir genetik karmaşıklığın mevcut olduğu meme kanseri hastalarında en önemli ölüm nedenidir. Meme kanseri için tedavi rejimlerinin seçimi iu durumlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir: meme kanserinin hangi evrede olduğu, malignitedeki hormon reseptör durumu, meme kanserinin alt tipi, tümörün HER2 ekspresyon durumu, hasta kişide kanserden ayrı olarak başka rahatsızlıkların varlığı veya primerden farklı bölgelerde olan kanserlerin varlığı veya yokluğu, kadının menopoza girip girmeme durumu. Tedavi rejimleri her hasta için bu durumlar göz önüne alınarak ve meme kanseri sahip bireyin de verilecek tedaviye müsamaha göstermesine de bağlı olarak kanser terapisinin ayarlanması gerçekleştirilebilir (Correia vd., 2021).

Tezde kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, meme kanseri araştırmalarında *in vitro* modeller olarak onlarca yıldır kullanılmaktadır. Bu iki hücre hattı, ER + ve ER – genetik ve proteomik yapısına olarak iki farklı moleküler alt tipte maligniteyi temsilen kullanılır (Nehdi vd., 2019).

MCF-7 hücre hattı fonksiyonel ER ve EGFR'a sahip olan bir yapı özelliğinde olup, büyüme için östrojen ve EGF' ye bağımlıdır ve invaziv değildir. MDA-MB-231 TNBC hücreleri ise daha agresif, hormondan bağımsız meme kanseri için hücresel bir model olarak önümüze çıkmaktadır (Nohara ve Spiegel; 1998).

1.2 Apoptoz

İşlevsel olarak vazgeçilebilir, enfekte olmuş veya potansiyel olarak neoplastik hücrelerden kurtulmanın yolu programlanmış hücre ölümü (PCD) yolları tarafından yönlendirilmekte olan süreçler olup PCD; homeostazi ayarlanmasında, patojenlere, kansere ve bir dizi başka patolojiye karşı konak savunmasında oldukça önemli roller oynar. Apoptoz, nekroptoz ve piroptoz dahil olmak üzere çeşitli PCD yolakları tanımlanmış olup her bir hücre programlanmış hücre ölüm yolu tipi farklı moleküler ve hücresel süreçler kullanırlar ve her birinin sonuçları farklılık gösterir (Bedoui vd., 2020).

Apoptotik hücre ölüm süreci, ölmek üzere olan çeşitli hücrelerin parçalanmasını ve tipik olarak sessiz immünolojik şekilde uzaklaştırılmasını temsil eder. Diğer bhücre ölüm süreçleri olan piroptoz ve nekroptoz süreçleri ise, ölmek üzere olan hücrenin patlaması ve güçlü enflamasyon tetikleyicilerinin salınması ile kendini gösteren nispeten 'şiddetli' hücre ölümü yolak türleri olarak kendilerini gösterirler. Enfekte olmuş hücreler açısından bakılma durumunda ise bu ölüm yolakları çeşitli patojenleri ve antijenler gibi bu enfektif yapıların birçok bileşenlerini de içerir. Yapılan birçok genetik ve biyokimyasal çalışmalar programlı hücre ölüm yollarının; hücre homeostazında değişiminde ve aynı zamanda moleküler düzenlemelerinde önemli derecede esneklik olduğunu açığa çıkarmıştır. Örnek olarak; birincil bir role sahip olmasına rağmen piroptozu indükleyen inflamatuar kaspazlar aynı zamanda apoptozu da indükleyebilir ve tersine apoptotik uyaranlar piroptozu tetikleyebilir. Hücre ölüm yolları arasında açığa çıkan bu esneklik durumu şaşırtıcı bir şekilde en çok da hücresel tepkilerde açığa çıkar. Her üç ölüm süreci açısından baktığımızda ise apoptotik hücre ölümü, malignite gelişimini önlemek amaçlı kullanılan baskın programlı hücre ölümü süreci olarak kendini gösterir. Bu nedenle apoptoz mekanizmalarının kanser süreci ve ilerisinde anlaşılması oldukça büyük önem arz etmektedir (Bedoui vd., 2020).

Farklı türlerde de evrim bıyunca korunmuş biyolojik bir süreç olan birçok hücre ölümü süreci, apoptozun olgun organizmalarda normal gelişim ve doku homeostazisini sağladığını ispatlamıştır. Piroptotik ve nekroptotik ölüm yolları , konak hücreyi patojenlerden ve diğer dış tehditlerden korumayı sağlayan yollardır (Green, 2019). Bu görüş, farklı PCD yollarında genetik bozulma olan fare deneylerinin sonuçları ile desteklenmektedir (Ke vd.,2000; Lindsten vd., 2010).

Apoptotik hücre ölümü devam ederken, hücrenin yıkımı sürecine aspartata özgü sisteinil proteazlar olan kaspaz adı verilen ve evrim boyunca yüksek derecede korunmuş olan protein yapıları aracı olur. Kaspaz proteini yapıları, aktif olmayan zimojen molekülleri olarak en başta üretilir (Van Opdenbosch, N. & Lamkanfi, M., 2019). Birçok hücre ölümü sinyalleşme süreci, hücrenin yıkılmasında rol oynayan farklı süreçleri başlatabilen veya tetikleyen farklı kaspazların ardışık aktivasyonuna yani kaspaz kaskadına sebep olur (Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.; 1972; Boatright, K. M. & Salvesen, G. S 2003). Kromatin yapısının yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşumu, membran kabarcıklarının oluşumu ve DNAazlar tarafından DNA parçalanması bu süreçlerden bazılarıdır(Segawa, K. et al., 2014).

Birbirine yakın olsa da iki farklı yolak apoptoza yol açabilir (Şekil 1.4). Büyüme faktörü veya besin eksikliği/yokluğu, bir dokunun yeniden düzenlenmesi veya hücre bağlanmasının kaybı ile ilişkili gelişimsel ipuçları ve steroid hormonları veya çeşitli sitotoksik ajanlarla tedavi, endoplazmik retikulum stresi, büyüme faktörü yoksunluğu veya DNA hasarı, içsel apoptoz yolu (mitokondriyal,intrinsik veya BCL olarak da bilinir) tetikleyebilir (Şekil 1.4). İntrinsik denilen apoptotik yol, sağlıklı hücrelerde apoptozun efektörlerini tutan inaktif BAX ve BAK proteinine yüksek bir afinite ile bağlanma gösteren pro-apoptotik BH3-only proteinlerinin ekspresyonu veya aktivitesi ile beraber; transkripsiyon sırasında ve/veya translasyon sonrasındaki artışlarını da içine alan bir süreci ifade eder (Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M., 2014; Singh, R., Letai, A. & Sarosiek, K., 2019).

BCL-2 ailesinin pro apoptotik üyeleri olan ve BIM, PUMA, BAD veya NOXA proteinlerini de içine alan yalnızca BH3 proteinleri (BH3-only) olarak adlandırılan grup transkripsiyonel ve/veya translasyon sonrası olarak apoptozu indükler. Yalnızca BH3 proteinleri, BCL-2, BCL-XL, MCL-1 ve BCL-2 ile ilişkili protein A1 (BCL-2A1; insanlarda BFL-1) gibi hayatta kalma yanlısı BCL-2 proteinlerine

bağlanır ve nötralize edilir, böylece kritik apoptoz efektörleri BAK ve BAX (BCL-2 ailesinin ikinci bir proapoptotik alt grubunun üyeleri), daha sonra mitokondriyal dış membranda (mitokondriyal dış membran geçirgenliği veya MOMP) ihlallere neden olan büyük kompleksler halinde birleşir. Bu durum ise sonuç olarak, mitokondriden sitokrom c ve SMAC gibi apoptozu da uyaran bileşenlerin salınmasına sebebiyet verir (Bedoui vd., 2020).

Hücrede var olan ve yalnızca sağ kalımı sağlayan BCL-2 ailesi proteinleri, yalnızca BH3 domainini taşıyan BCL-2 ailesi proteinleri tarafından görevsel olarak nötralize edildiği zaman, BAK proteini ve BAX proteini salıverilir. Oligomerize etmek ve yapılar halinde birleştirmek için dış mitokondri zarının geçirgenliğinin değişmesine neden olur, böylece mitokondriyal dış membran geçirgenliğini (MOMP) indükler (Cosentino, K. & Garcia-Saez, A. J., 2017; O'Neill, K. vd., 2016).

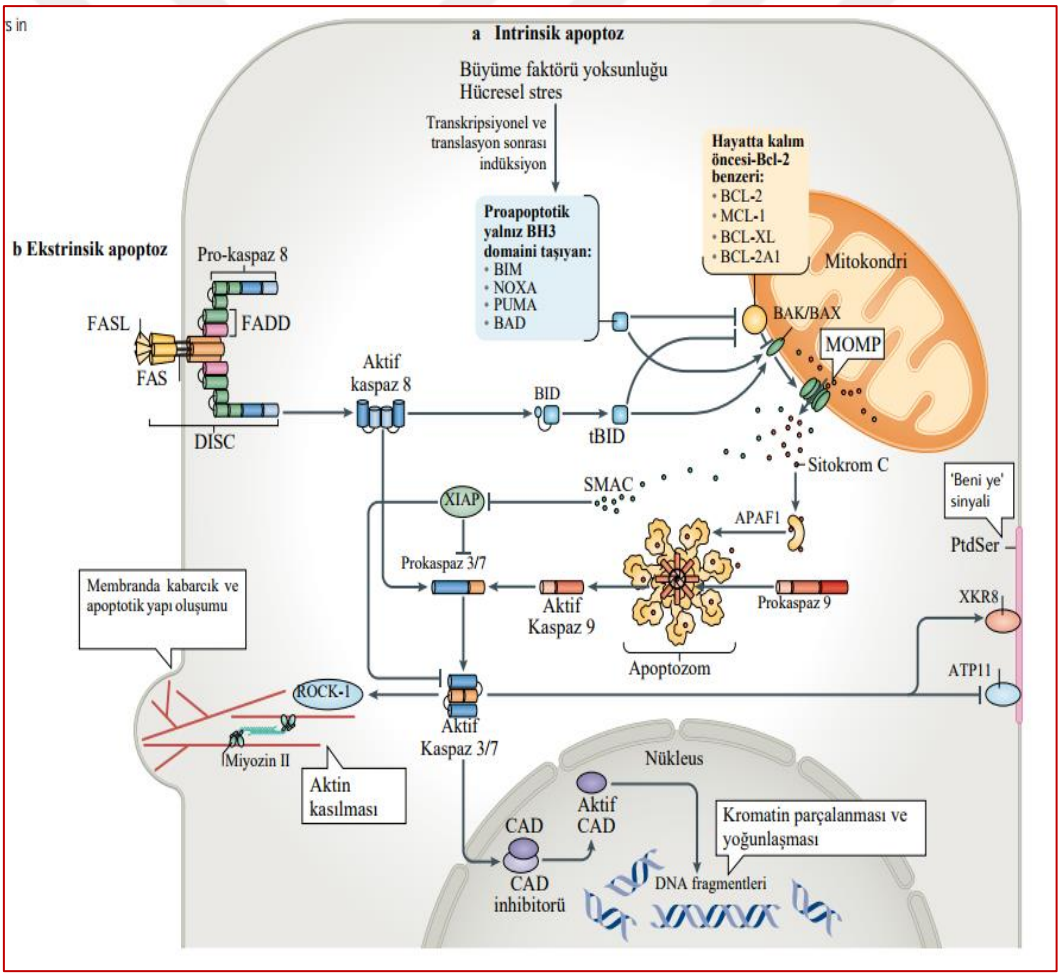
MOMP, apoptotik hücre ölümü sürecinde oldukça önemli roller oynayan ve onları yönlendiren bir çok mitokondriyal proteinin serbest kalmasına sebep olur (Şekil 1.4). Bu duruma bir örnek vermek gerekirse sitokrom c proteini, mitokondriden çıkıp sitozole transloke olmasının hemen ardından APAF-1 yapısına bağlanıp apoptozom oluşumunu uyarır. Başlatıcı kaspaz 9'un monomerik, enzimatik olarak aktif olmayan pro-formları apoptozom içine alındığında kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşir ve böylece efektör kaspaz 3 ve 7'nin aşağı yönde proteolitik aktivasyonunu teşvik eder(Salvesen, G. S. & Dixit, V. M., 1999).

Kaspazların sıralı aktifleşmesi ve birbirlerini etkilemesi XIAP aracılı olarak zayıflatılabilir. XIAP proteini, proteazomal yıkım için bazı kaspazları sürece hazırlayabilir (Galban, S. & Duckett, C. S., 2010). Mitokondrinin dış membranının potansiyel değişimi; her ikisi de XIAP'ı bloke edebilen ve dolayısıyla kaspazları inhibe etmesini önleyebilen SMAC (kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü, aynı zamanda DIABLO olarak da bilinir) ve HTR2'nin (HTRA serin peptidaz 2) salınmasına neden olur (Ekert, P. G. & Vaux, D. L., 2005).

BIM ve PUMA gibi yalnızca BH3 içeren bazı proteinlerin, MOMP' yi indüklemek için BAK ve BAX' a doğrudan bağlanıp aktive ettiği de rapor edilmiştir. Sitokrom c, apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1'e (APAF1) bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur. Başlatıcı kaspaz 9, bu komplekste aktive edilir ve kaspaz 9

daha sonra efektör kaspaz 3 ve 7'yi proteolitik olarak aktive eder. SMAC, kaspaz inhibitörü XIAP'ın aktivitesini bloke eder (Bedoui vd., 2020).

Apoptotik hücre ölümü süreci intrinsik yoldan farklı olarak; hücre yüzeyinde bulunan ve ölüm reseptörleri olarak sınıflandırılan ve aynı zamanda dışsal veya ekstrinsik olarak da bilinen bir yol vasıtasıyla başlatılabilir (Şekil 1.4). FAS ve TNFR1 gibi tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesinin hücre içi ölüm alanlarını içeren bu üyelerinin uyarılması, adaptör protein FADD'nin (ölüm alanıyla ilişkili FAS) ve bazı reseptörler için ayrıca TRADD'nin (TNFRSF1A) toplanmasıyla sonuçlanır. Bu yolak hem reseptörlerde hem de bunların adaptörlerinde mevcut olan ölüm alanlarının etkisi yoluyla ölüm alanı aracılığıyla ilişkilendirilir (Bedoui vd., 2020).



Şekil 1.4 Apoptoz yolu aktivasyonunun moleküler mekanizmaları. **a)** İntrinsik-İçsel apoptotik yol. **b)** Ekstrinsik yol (Bedoui vd., 2020' den uyarlanmıştır).

Ölüm reseptörünün sebep verdiği ekstrinsik veya dışsal apoptotik ölüm süreci (Şekil 1.4), apoptoz ile ölecek hücreye komşu olan hücresel yapılardaki mevcut olan FAS ligandı (FASL) tarafından FAS'ın aktivasyonu gibi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile tetiklenir. Bu, öncül (pro) kaspaz 8'in hücre içi bölgesine toplanmasına yol açar. adaptör proteini FADD (ölüm alanı yoluyla ilişkili FAS) yoluyla ölüm reseptörü, kaspaz 8'in aktivasyonunu katalize eden ölümü indükleyen sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasıyla sonuçlanır (Ashkenazi, A. & Dixit, V. M., 1998).

Ölüm efektör alanları arasındaki homotipik etkileşimler (hem FADD hem de pro kaspaz 8'de mevcuttur), prokaspaz 8'in ölüme neden olan sinyal kompleksine (DISC) alımını teşvik ederek bu başlatıcı kaspazın aktivasyonuna yol açar (Kischkel, F. C. et al., 1995). Kaspaz 8'in aktivite olma durumu cFLIP tarafından da düzenlenebilir (Kataoka, T, 2005). Kaspaz 8 yapısı, apoptotik hücre ölümünün aşağı yöndeki hücresel dağılma ve yıkılma süreçlerini aktifleştirmek ve serbest bırakmak için asıl kesici kaspazları proteolitik olarak aktifleştirebilir. Kaspaz 8 yapısı bunların yanında yalnızca BH3 proteini yapısı olan BID'yi pro-apoptotik formu olan tBID' ye de çevirebilir. tBid oluşumu ise BAK veya BAX aracılığıyla MOMP' yi ve sonuçta intrinsik yol aracılığıyla gerçekleşen apoptotik ölümü de tetikler. Bu, prokaspaz 8'in, adaptör protein FADD (ölüm alanı yoluyla ilişkili FAS) aracılığıyla ölüm reseptörünün hücre içi bölgesine toplanmasına yol açar ve bunun sonucunda ölüme neden olan sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasına neden olur ve son durumda kaspaz 8'in aktivasyonu gerçekleşir (Billen, L. P., Shamas-Din, A. & Andrews, D. W.,2008).

Aktifleşmiş olan kaspaz 8 yapısı, efektör kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz 3 ve 7'nin doğrudan proteolitik aktivasyonunu sağlayabilir. İkinci olarak ise BH3-only proteini BID'nin tBID'ye proteolitik aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü indükler ve böylece içsel apoptotik yolu devreye sokar. Her iki yol tarafından da efektör kaspaz yapıları aktifleşebilir. Tipik apoptotik morfolojiyi indüklemek ve inflamatuar tepkilere yol açacak hücre içi hasarla ilişkili moleküler modellerin (DAMP' ler) sızmasını önlemek için yüzlerce hücre içi proteini parçalar (Bedoui vd., 2020).

Bu efektör kaspazlar, doğrudan veya dolaylı olarak ROCK-1 kinazı aktive eder; bu, aktin kasılması ve kaspaz ile aktive edilen DNAz (CAD) (inhibitörü ICAD' yi parçalayarak) yoluyla plazma zarının taşmasını indükler, bu da internükleozomal DNA bölünmesine ve kromatin yoğunlaşmasına yol açar. Kaspaz 3 ve kaspaz 7 yapıları; ATP11 gibi lipit flippazları proteolitik yolla etkisiz hale getirir. Yine bu efektör kaspazlar lipit scramblase yapısı olan XKR8 yapısını da proteolitik olarak aktifleştirir. Her iki hücresel değişim de, hücre zarının dış bölgesinde fosfatidilserinin (PtdSer) açığa çıkmasına neden olur. PtdSerin açığa çıkması ise immün sistemdeki fagositik hücreler için 'beni ye' sinyalidir. Fagositik hücreler de bu süreçte apoptoza uğrayan hücrelerin yutulmasını teşvik eder (Bedoui vd., 2020).

Apoptotik hücre süreci kanserleşme açısından bakıldığında temel olarak, organizmaların kanser gelişimini önlediği baskın hücre ölümü sürecidir. Bu nedenle apoptoz mekanizmalarının kanser süreci ve ilerisinde anlaşılması oldukça büyük önem arz etmektedir (Bedoui vd., 2020).

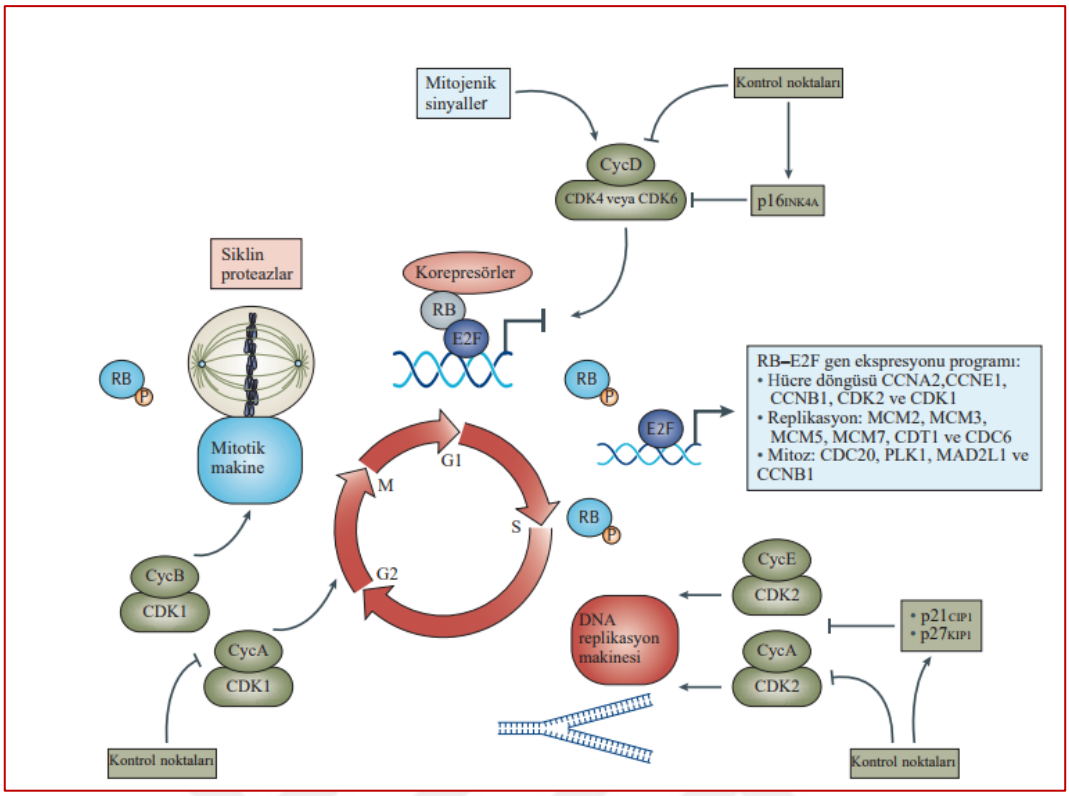
1.3 Hücre Döngüsü

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesinin patolojik bir tezahürünü temsil eden bir süreç olup; bu nedenle hücre döngüsü kontrolünün temel prensiplerini anlamamızın etkili kanser tedavileriyle sonuçlanacağı uzun zamandır beklenen bir fenomen olarak bilim dünyasının önünde durmaktaydı. Özellikle, hücre döngüsü boyunca geçişi destekleyen sikline bağımlı kinazların (CDK' lerin), temel terapötik hedefler olması beklenmekteydi; çünkü birçok tümörojenik olay, hücre döngüsünün G1 fazındaki CDK4 veya CDK6 komplekslerine etki ederek sonuçta proliferasyonu tetiklemektedir. Ayrıca, kromozomal stabilitedeki bozulmalar ve CDK2 ve CDK1'in aracılık ettiği S fazı ve G2/M kontrolünün özellikleri, önemli tümörojenik olaylardır. Bu bilgiyi CDK inhibitörlerinin başarılı klinik gelişimine dönüştürmek, tarihsel olarak oldukça zorlu olmuştur ve çok sayıda CDK inhibitörü, klinik deneylerde ne yazık ki hayal kırıklığı yaratan sonuçlar göstermiştir.

Temel olarak, hücre döngüsü süreci; tek hücreli ökaryotlardan karmaşık metazoanlara kadar korunur ve hücre döngüsünün farklı aşamaları, hücre bölünmesinin uygunluğunu belirleyen fizyolojik ipuçlarına yanıt verir. Sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler), tüm hücre döngüsü geçişlerini yönlendiren kritik düzenleyici enzimlerdir ve başarılı hücre bölünmesini sağlamak için etkinlikleri sıkı

bir şekilde kontrol altındadır (Lim ve Kaldis, 2013). Mitotik hücre bölünmesi, DNA replikasyonunun S fazında gerçekleşmesini ve kromozomları bölmek için gerekli mekanizmanın mitoz sırasında mevcut olmasını ve böylece yavru hücrelerin üretilmesini gerektirir. Tek hücreli ökaryotlarda hücre döngüsü ilerlemesi, başarılı kopyalamanın tamamlanmasını sağlamak için ağırlıklı olarak besinlerin mevcudiyeti tarafından kontrol edilir. Tek hücreli ökaryotlarda hücre döngüsünün ilerlemesi, yavru hücrelerin yaşayabilirliğini engelleyecek genetik hasarın bulunmamasına da bağlıdır. Çok hücreli organizmalarda ise hücre döngüsü sisteminin düzenlenmesi, hücre-hücre iletişimini yansıtan daha karmaşık düzenleyici mekanizmalar şeklinde kendini göstermektedir (Ashgar vd., 2015).

CDK biyolojisinin anahtar kavramlarının çoğu, 20 yıldan uzun bir süre önce, embriyo ekstraktlarında görülen maya ve eşzamanlı bölünme döngülerinin incelenmesi yoluyla keşfedilmiştir (Şekil 1.5). Gerçekten de, çalışmalardan elde edilen bulgular bu araştırmacılara Nobel Ödülü verilmesini sağlamıştır (Nurse, 2002; Hunt T., 2002). Özellikle CDK1'in mitotik ilerlemenin temel belirleyicisi olduğu ortaya çıktı ve CDK2'nin yüksek ökaryotlarda DNA replikasyonu ile daha alakalı olduğu ortaya çıktı. Metazoanlarda, hücre döngüsü girişi üzerindeki kontrolün büyük bir kısmı, çok sayıda büyüme düzenleyici sinyale yanıt veren CDK4 ve CDK6 seviyesinde ortaya çıkar. Daha sonra, hücre döngüsü ilerlemesini doğrudan destekleyen CDK' lere (örneğin, CDK4, CDK6, CDK2 ve CDK1) ek olarak, transkripsiyonu düzenleyen CDK7, CDK8 ve CDK9'u içeren ek bir CDK ailesi tanımlanmıştır. CDK5 gibi özel doku ortamlarında postmitotik işlevlere sahip CDK' lar da tanımlanmıştır. CDK'lerın hücre bölünmesinin kontrolündeki merkezi rolü nedeniyle, tüm kanserlerin hücre döngüsü üzerindeki normal kontrolleri bozan bazı özellikler sergilemesi belki de şaşırtıcı değildir ve son 20 yılda CDK aktivitesini hedef alan çok sayıda ilaç ortaya çıkmıştır ve klinikte test edilmiştir (Malumbres, M. & Barbacid, M, 2001). CDK'lerın biyolojisinin anlaşılması, özellikle biyobelirteç ve kombinasyon stratejilerinin belirlenmesi açısından ve CDK inhibitörleri ile görülen klinik sonuçların çözülmesi açısından kritik öneme sahiptir. Yetişkin dokularının birçoğunda, hücrelerin çoğunluğu hücre döngüsünden diploid DNA içeriğiyle çıkar ve hücre hareketsiz bir G0 durumunda tutulur. Doku bakımı, fizyolojik olarak hücre döngüsü girişini yüksek düzeyde düzenlenmiş bir şekilde indükleyen ipuçlarını içerir (Ashgar vd., 2015).



Şekil 1.5 CDK yapıları ve hücre siklusunun ilerlemesi (Ashgar vd., 2015'ten uyarlanmıştır).

Hücrelerin hücre döngüsüne girişi başlattığı mekanizmalar kapsamlı bir şekilde açıklanmıştır. Hücre dışı sinyaller - peptit büyüme faktörleri (örneğin, RAS, mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) ve rapamisinin memeli hedefi (mTOR)) ve nükleer reseptörler (örneğin, meme epitelindeki östrojen reseptörü (ER)) tarafından aktive edilenler dahil — metazoanlara özgü CDK4 veya CDK6 kompleksinin düzenlenmesi yoluyla G0 veya G1 fazından S fazına ilerlemeyi yönlendirmek için hücre döngüsünde birleşir. CDK4 ve CDK6, çok hücreli organizmaların ortaya çıkmasıyla filogenetik olarak ortaya çıkmıştır ve S fazına geçişi kontrol etmek için çok sayıda düzenlemeye tabi tutulur. CDK4 ve CDK6, birçok biyokimyasal ve biyolojik benzerliği barındıran yapısal olarak ilişkili proteinlerdir; ancak yayınlanan çalışmaların çoğu CDK4'e odaklanmıştır (Ashgar vd., 2015). CDK6 hematolojik öncüllerin çoğalmasının desteklenmesinde özellikle önemlidir (Malumbres, M vd., 2004; Hu, M. G. vd., 2009).

CDK4 ve CDK6'nın aktivitesi öncelikle D tipi siklinlerle (yani siklin D1, siklin D2 ve siklin D3) olan ilişkileriyle kontrol edilir (Diehl, J. A; 2005). Bunlar arasında siklin D1 en iyi karakterize edilmiş olan Siklin D'dir. Siklin D1'in ifade ediliyor

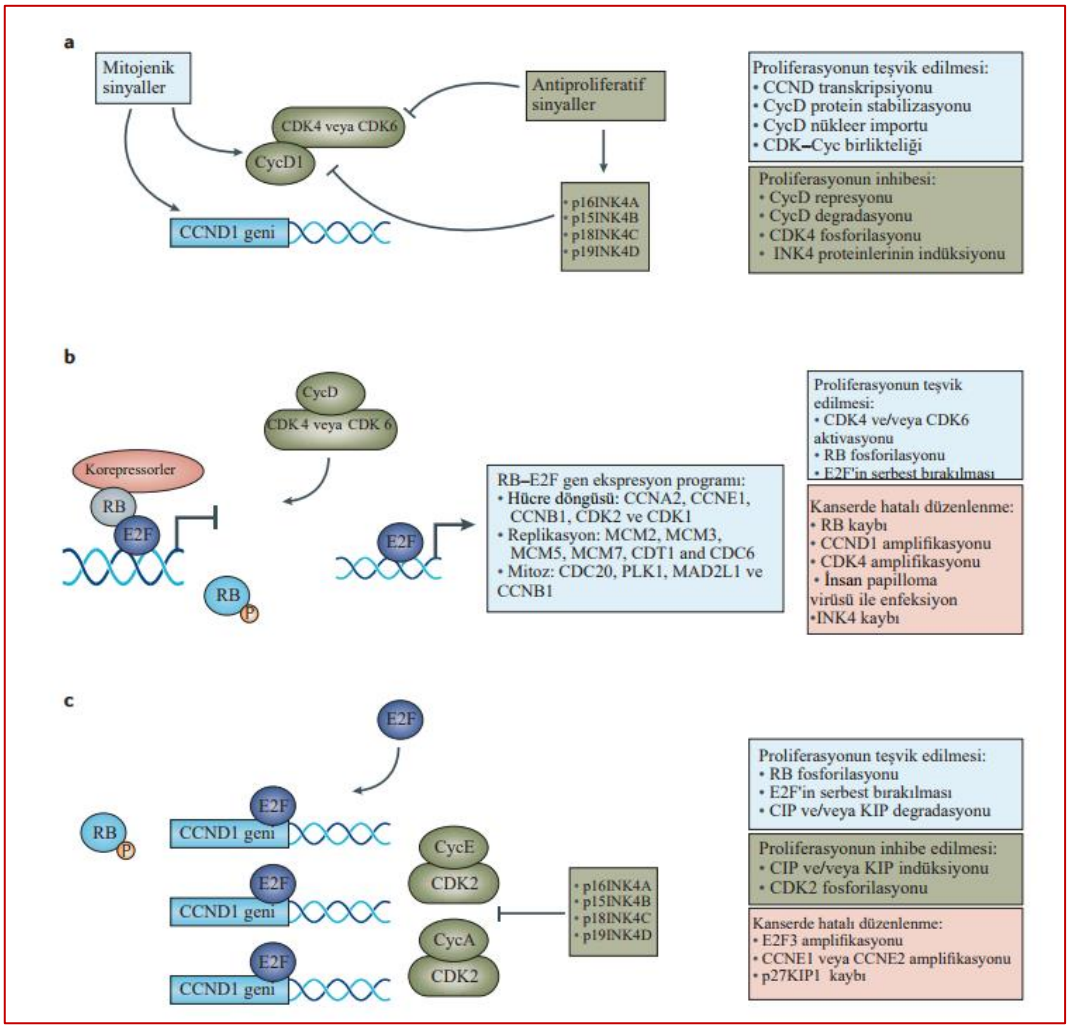
olması, mitojenik sinyalleşmeye 'gecikmiş-erken' bir yanıt olarak karakterize edilir ve karmaşık promoter ve güçlendirici etkileşimler, bunun transkripsiyonunu kontrol eder (Matsushime, H vd., 1991). Daha az çalışılmış olmasına rağmen, siklin D3, siklin D1 ile benzer bir modele uymaktadır. Siklin D2'nin düzenlenmesi ise halen araştırılmaya devam edilmektedir; ancak siklin D2'nin aynı zamanda belirli bağlamlarda proliferasyonu da tetiklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Cooper, A. B, 2006). D tipi siklinlerin paraloglarının farklı ekspresyonunun, normal fizyolojinin dokuya özgü yönlerini yansıtması da muhtemeldir; burada farklı D tipi siklinler, CDK4 veya CDK6 aktivasyonunu desteklemek için eksprese edilirler (Ciemerych, M. A vd., 2002).

Mitojenik sinyaller, CDK4 ile CDK6'yı uyarır. Bu da hücre döngüsüne girişi tetikler. Proliferasyonu engelleyen kontrol noktaları ise CDK4 ve CDK6 aktivitesini inhibe eder. Yine bu kontrol noktaları CDK4 ve CDK6 inhibitörlerinden olan p16INK4A'nın ekspresyonunu tetikler. Aktif CDK4 ve CDK6 kompleksleri ise, tümör baskılayıcı retinoblastoma proteini (RB) dahil olmak üzere anahtar substratların fosforilasyonunu (P) başlatır, böylece E2F transkripsiyon faktörleri ailesi tarafından koordine edilen bir gen ekspresyon programını serbest bırakır. Bu bağlamda CDK4 ve CDK6, E tipi ve A tipi siklinlerin (sırasıyla CycE ve CycA) transkripsiyonunu ve stabilitesini başlatır ve ardından RB'nin daha fazla fosforilasyonuna ve DNA replikasyonunun başlatılmasına katkıda bulunan CDK2'nin aktivasyonunu başlatır. Diğer kontrol noktaları, CDK2 aktivitesini doğrudan inhibe edebilir veya CDK2-siklin komplekslerine bağlanan ve bunları inhibe eden CDK-etkileşimli protein/kinaz inhibitör protein (CIP/KIP) sınıf inhibitörlerini (p21CIP1 ve p27KIP1) indükleyebilir. DNA replikasyonunun tamamlanmasıyla birlikte G2 fazındaki hedefleri fosforile etmek için CDK1-Cyc A ve CDK1-Cyc B kompleksleri oluşur. DNA hasarının yokluğunda ve kromozomal ayrışma için uygun hazırlıkların ardından hücresel varsayılan, CDK1-CycB komplekslerini aktive etmek ve mitoza ilerlemektir. Ancak CDK1 aktivitesini sınırlayan ve mitotik ilerlemeyi durduran güçlü kontrol noktaları vardır. Anafaz ilerlemesi ve hücre döngüsünün G1 fazında iki yavru hücrenin üretimi için CycB'nin daha sonra bozunması gereklidir. M fazından tekrar G1 fazına geçiş sırasında, RB defosforile edilir ve döngü bir kez daha mitojenik ve antiproliferatif sinyallemeye duyarlı hale gelir (Ashgar vd., 2015).

CDK4 ve CDK6'nın transkripsiyonel olarak düzenlemesine ek olarak siklin D yapısının stabilizasyonu, hücre içindeki lokalizasyonu ve CDK4 ve CDK6 ile olan ilişkisi sıkı bir şekilde düzenlenme gösterir (Şekil 1.6.a). Siklin D1 yapısı normal şartlarda oldukça kararsız bir yapıdır ve sitoplazma ile çekirdek arasında aktif olarak mekik dokur. Siklin D1 yapısındaki Treonin 286'nın fosforilasyonu, Siklin D1'in çekirdekten sitoplazmaya çıkışını ve ayrıca ubikuitinlenme ve bu yol aracılı bozunmasını da aktif olarak teşvik eder (Diehl, J. A., 1998). Siklin ilişkisinin nispeten kendiliğinden ortaya çıktığı diğer CDK'ların aksine, CDK4 ve CDK6 için bu süreç birden fazla mekanizma tarafından düzenlenir. p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C ve p19INK4D'yi içeren CDK4 (INK4) proteinlerinin inhibitörü, yalnızca CDK4 ve CDK6 inhibitörleri olarak işlev görüyor gibi görünen CDK4 ve CDK6 ile etkileşime giren proteinleri temsil eder (Witkiewicz, A. K vd., 2011). INK4 protein yapısı, D tipi siklin proteinlerin; G1-S'deki CDK4 ve CDK6 proteinlerine bağlanmasını zayıflatır. INK4 yine kinaz aktivitesini inhibe etmek için CDK4 ve CDK6'nın katalitik bölgeleriyle etkileşir (Jeffrey, P. D., vd., 2000).

Bu protein yapıları stres koşullarına cevapolarak CDK4 ve CDK6'yı negatif olarak düzenler. p16INK4A adlı inhibitör yapı, bu dönüşümü engellemek için birden fazla onkogen tarafından indüklenir. Ayrıca, hücresel yaşlanma ile ilişkili stres koşulları altında, p16INK4A'nın aşırı ekspresyonu, hücre döngüsünde derin bir G1 durmasına neden olur (Serrano, vd., 1997). p15INK4B INK proteini de, epitelyal hücrelerin proliferasyonunun TGF-β yolu ile de baskılanmasıyla indüklenir. Diğer CDK proteinlerine benzer şekilde CDK4 ve CDK6 da fosforilasyon düzenlemesine tabi tutulur (Bertero, T vd., 2013). Bu nedenle, CDK4 ve CDK6, birden fazla sinyal yolunun aşağı yönündeki entegrasyonun anahtar düğümleri olarak görev yapar; bunların aktivasyonu, hücre döngüsüne ilerlemeyi başlatır (Şekil 1.6.a).

D tipi siklin proteinlerinin; CDK4 ve CDK6 ile olan ilişkisi, diğer CDK protein yapıları ile karşılaştırıldığı zaman eşsiz çoklu substrat yapılarıyla kinaz aktivitesini indükleyebilir (Anders, L, vdi, 2011). Özellikle CDK4 ve CDK6, tümör baskılayıcı retinoblastoma proteininin (RB) ve ilgili proteinler olan ve RBL1 olarak da bilinen p107 yapısının ve RBL2 olarak da bilinen p130'un fosforilasyonuna yönelik spesifik bir tercihe sahiptir (Şekil 1.6.b).



Şekil 1.6 G1–S geçişini düzenleyen yollar ve kanser ile bu yolların etkileşimi (Ashgar vd., 2015' ten uyarlanmıştır). **a|** Mitojenik sinyaller, birçok mekanizma yoluyla CDK4 veya CDK6 aktivitesini etkiler. Bütün bu yollar antagonize de edilebilir veya INK4lerin indüksiyonunu sağlama, karmaşık birleşmeyi önleme ve birleşmiş kompleksleri engelleme işlevi görebilir. **b |** CDK4 ve CDK6'nın net aktivasyon durumu, E2F transkripsiyon faktörleri ailesinin aktivasyonuna ve salınmasına katkıda bulunan tümör baskılayıcı retinoblastoma proteininin (RB) fosforilasyonunu başlatır. **c |** E2F proteinleri ve diğer sinyallerreplikasyon ve RB hiperfosforilasyonuna katkıda bulunur. S fazı ve G2-M geçişini kontrol eder. Bu aktivitenin serbestleştirilmesi, kanserde E-tipi siklinlerin amplifikasyonu veya CDK inhibitörlerinin kaybı yoluyla gerçekleşir. CCN, siklin; CDC, hücre bölünme döngüsü; CDT1, kromatin lisanslaması ve DNA replikasyon faktörü 1; CIP, CDK ile etkileşime giren protein; KIP, kinaz inhibitör proteini; MAD2L1, MAD2 mitotik tutuklama eksikliği benzeri 1; MCM, minikromozom bakım kompleksi bileşeni; PLK1, polo benzeri kinaz 1.

Tanımlanan ilk tümör baskılayıcı protein yapısı olan RB çok ayrıntılı incelenmiş bir protein yapısıdır (Burkhart, D. L. & Sage, J., 2008). RB proteini katalitik aktiviteye sahip bir protein yapısı değildir; ancak hücre döngüsünü kontrol etmek için çoklu protein komplekslerinin bir araya getirilmesi yoluyla hücrede işlevini

görür. RB yapısı; E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanabilir. Rb yapısı yine ortak baskılayıcı yapıları toplayabilir. Aynı zamanda yine E2Fler tarafından düzenlenen hedef genlerin transkripte olmasını da baskılayabilir (Şekil 1.6.b).

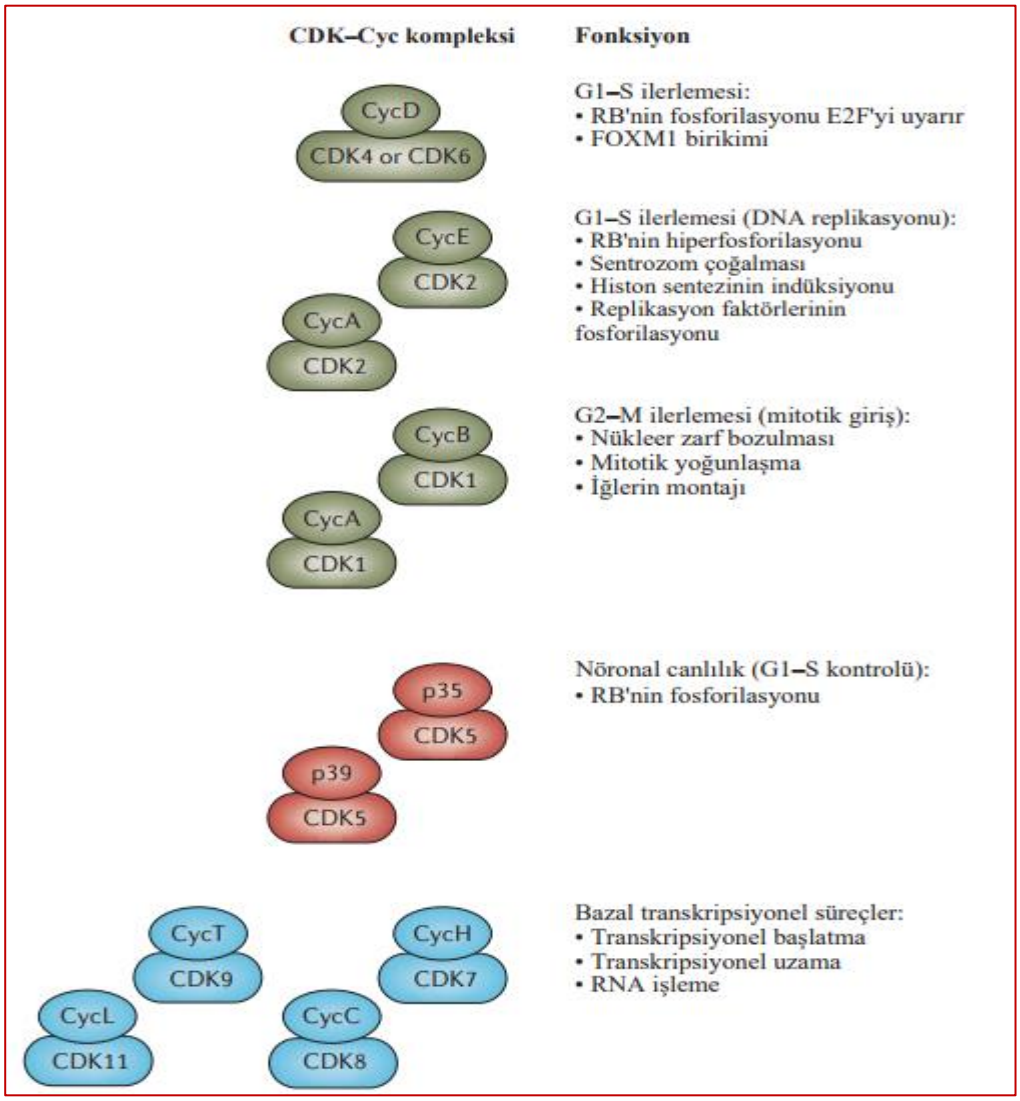
E2F'ler, hücre döngüsü kontrolünde (örneğin, siklin E (CCNE), CCNA ve CCNB1), dNTP biyosentezinde (örneğin; dihidrofolat redüktaz (DHFR), ribonükleotid redüktaz M1 (RRM1) ve RRM2) yer alan bir dizi genin ekspresyonunu düzenler) ve mitotik ilerleme (örneğin; polo benzeri kinaz 1 (PLK1), BUB1 mitotik kontrol noktası serin/treonin kinaz (BUB1) ve iğ iplikçiği kontrol noktası proteini MAD2 (MAD2)). RB proteinin CDK4 ve CDK6 tarafından fosforile edilmesi, E2F yapısını serbest bırakan ve hücre döngüsünde ilerlemeyi başlatan RB fonksiyonunun bozulmasına ilişkin bir yolu başlatır (Şekil 1.6.c).

CDK4 ve CDK6 yapıları FOXM1'i fosforiller (Şekil 1.7). Bu CDK'lar tarafından fosforillneme olayı; mitoz yoluna giriş için elzem olan genlerin ekspresyonunda görev alan FOXM1 yapısının stabilizasyonunu sağlar (Anders, L., vd, 2011).

Siklin D – CDK4 / 6 ekseninin normalden fazla derecede aktive olmasını artırdığı tahmin edilen değişiklikler kanserlerde oldukça yaygındır. CCND1'in amplifikasyonları, CDK4 ve CDK6'nın yanı sıra (INK4A'yı kodlayan) CDKN2A'nın homozigot silinmesi de çeşitli tümör tiplerinde rapor edilmektedir. 'D-siklin aktive edici özellikler' (DCAF) olarak tanımlanan bir kısım seyrek genetik değişiklik, kanser yapısının CDK4/6 eksenine bağımlılığını da belirgin olarak artırabilir (Gong vd., 2017).

Bunlar, mantle hücreli lenfomanın klasik t11:14 translokasyonunu (CCND1'in immunoglobulin ağır zincir (IGH) lokusu ile yan yana getirilmesi), CCND2 ve CCND350'nin fokal amplifikasyonlarını, 3'-çevrilmemiş bölgedeki (3') kayıp ve/veya mutasyonları içerir. Son olarak, siklin D genlerinde, siklin D'nin yaygınlaşmasını ve bozunmasını ya da nükleer eksportunu önleyen mutasyonlar, çeşitli tümör tiplerinde rapor edilmiştir (Gong vd., 2017). Kanserde CDK4/6 yapısının aşırı derecede aktivasyonunun itici güçleri ise siklin D-CDK4/6 yolundaki genlerde belirli genetik değişikliklerin yokluğunda siklin D upregülasyonunun altında yatan her yerde bulunan mekanizmalardır (Şekil 1.7.). Bu yolların büyük kısmı; tipik olarak G1/S fazı sırasında görülen siklin D seviyelerinin hassas şekilde ayarlanan artma ve azalmasını bozan, uygunsuz

derecede yüksek seviyelerde mitojenik sinyallenme ile desteklenmektedir (Choi YJ & Anders L, 2014). Kanser hücreleri açısından bakıldığında MAPK yolu sinyalleşmesinde meydana gelen artış doğrudan CCND1 transkripsiyonunu yönlendirebilir. PI3K-AKT sinyal yolu da; siklin D gen transkripsiyonunun baskılanmasının engellenmesini de sağlar. Diğer yandan mRNA translasyonunun artması ve nükleer eksportun azalması ve protein bozunması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla siklin D'yi artırır (Diehl vd., 1998).

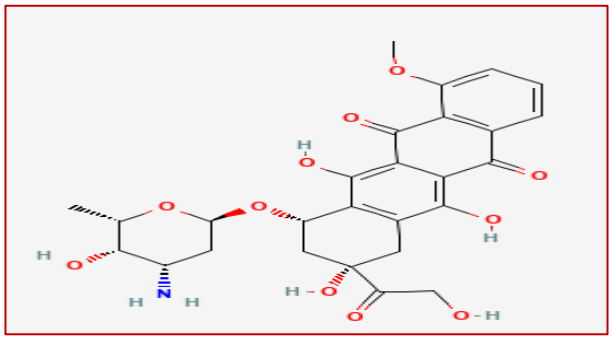


Şekil 1.7 CDK yapılarının hücredeki fonksiyonları (Ashgar vd., 2015' ten uyarlanmıştır. CDK–Cyc yeşil renkle gösterilen kompleksler hücre döngüsünün ilerlemesini desteklerken, yeşil renkle gösterilen kompleksler hücre döngüsünün ilerlemesini destekler. Mavi genellikle transkripsiyon süreçlerinde yer alır. Gösterilen CDK5 komplekslerinden kırmızı olanlar hem nöronal canlılığın kontrolünde hem de teşvikinde rol oynarlar.

Ayrıca mTOR kompleksi 1 (mTORC1) yapısı; siklin D mRNA translasyonunu özel olarak da MAPK yolu ve PI3K-AKT yolakları düzeyinde artırabilir. Kanser hücrelerinde çeşitli sinyal yollarındaki değişimler veya mekanizmalar aracılığı ile de CDK4/6 yapılarının aktivitesi artabilektedir. Buna örnekler vermek istersek; (i) östrojen reseptörü (ER) yoluyla steroid hormon sinyali, meme karsinomu gibi östrojene duyarlı kanserlerde CCND1 transkripsiyonunu arttırır. Diğer bir steroid hormon sinyalleşmesinden etkilenen kanser tipi olan prostat kanserinde ise androjen reseptörü (AR) yoluyla sinyal, mTORC166 yoluyla siklin D mRNA translasyonunu artırır; (ii) β-katenin, CCND1 promotöründen transkripsiyonu aktive eder; (iii) CCND2, MYC68'in doğrudan hedef genidir; (iv) Notch hücre içi alanı üzerinden sinyalleme CCND1 ve CCND3 transkripsiyonunu yönlendirebilir ve (v) Hippo yolu üyeleri hem CCND1 hem de CDK671-73'ün transkripsiyonunu artırabilir (Goel vd., 2022).

1.4 Doksorubisin

Kanserin kemoterapisinde kullanılan kimyasal yapılar, çeşitli kriterlere göre birçok gruba ayrılabilir. Etki şekline bağlı olarak bu terapötikler; alkilleyici yapılar, antimetabolitler, topoizomeraz inhibitörleri, mitotik iğ ipliklerinin inhibitörleri ve diğer yapılar olarak ayrılabilir (Mohseni vd., 2016; Dallavalle vd., 2020; Bukowski, K vd., 2020).



Şekil 1.8 Doksorubisinin kimyasal yapısı (U.S. National Library of Medicine. (n.d.). Doxorubicin).

Topoziomeraz I inhibitörleri olan İrinotekan ve topotekan yapıları ile etoposid ve teniposid DNA çift zincirinde kırılmalara sebebiyet verir. antrasiklinler Topoizomeraz II inhibitörleri olan idarubisin, daunorubisin ve doksorubisin

(DOX)) yapıları da yine, DNA yapısını oluşturan zincirlerde kırılmalara neden olur. Bunun yanında doksorubisin yapısı DNA zincirinde yer alan topoizomerazların etkisini DNA replikasyonu ve yine transkripsiyon sürecinde engeller. (Bukowski, K vd., 2020).

DOX, *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen bir antibiyotik antrasiklindir (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin), (Şekil 1.8). 1960'lı yıllardan beri kemoterapötik ajan olarak yaygın kullanıma sahip olmakla beraber yumuşak doku ve kemik sarkomlarının, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Hodgkin lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanserini ve meme, yumurtalık, mesane ve tiroid kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Johnson-Arbor ve Dubey, 2023).

DOX' un önemli terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir ve meme kanseri, karsinomlar, sarkomlar ve hematolojik maligniteler gibi çeşitli kanserlerin tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan en etkili kemoterapi ilaçlarından biri olarak kabul edilmektedir (Kciuk vd., 2023).

Doksorubisin antrasiklin yapılı bir antibiyotiktir ve yaygın olarak kullanılan bir antitümör terapötiktir. Doksorubisin duyarlılığı, ilacın çekirdeğe difüzyonunun ve doksorubisinin DNA ile etkileşimi ile başlatılan bir dizi sinyal olayının sonucudur. DOX uygulaması ise programlı hücre ölümü olan apoptoza yol açar. DOX'un bir çok antitümör etkileri vardır ama bunlardan en iyi anlaşılan yol topoizomeraz IIα (TOP2A) ile olan etkileşimi ile ilişkilidir. Bu enzim DNA iplikçiklerinin ayrılmasında rol oynar ve işlevinin bir parçası olarak da proteine bağlı çift sarmallı DNA kırılmalarını (DSB' ler) onarır. DOX ise, çok sayıda proteine bağlı DSB ile sonuçlanan sürecin tamamlanmasını baskılayarak, kesilmiş protein bağlı ara ürünü bu süreçte stabilize eder (Cox J, ve Weinman S., 2016).

Çift zincir kırıklarının sağlıklı hücreler için birçok olumsuz sonucu vardır. DSB'lerde temel düzenleyiciler olan p53 ve FOXO3 yapılarını aktive ettiği ve bu yapıların aktivasyonu arından da apoptozda önemli roller üstlenen Bcl-2 ailesi proteinlerinin oranında değişikliklere yol açan sinyal yollarının baskılanmasını içeren kaspaz bağımlı apoptoz programlarını tetikler. Bu DNA hasarı tepkisi, DOX' un anti-tümör etkisinden sorumlu birincil faktördür ve DNA hasarına karşı sadece

bu aşağı yönlü tepkinin bloke edilmesi, DOX toksisitesini azaltmak için yeterlidir (Cox J, ve Weinman S., 2016).

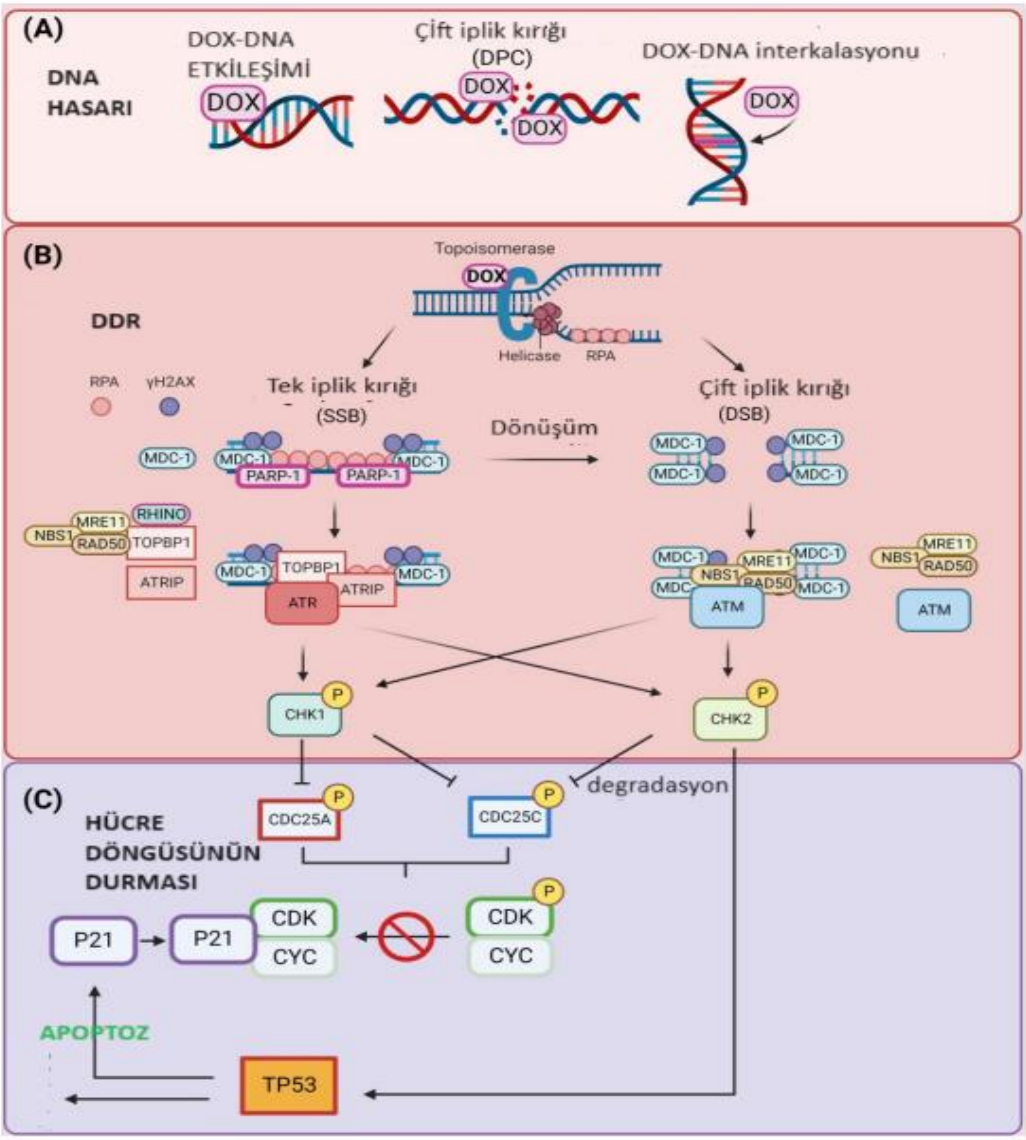
DOX'un hücrede meydana getirdiği toksisitede anlatılan bu yollardan başka birçok mekanizmanın da rol oynadığı gözlemlenmiştir. TOP2A'dan bağımsız DNA eklentilerinin oluşumu, transkripsiyon ve replikasyonun inhibe olması ve mitokondride ROS oluşumu ve eşlik eden apoptotik süreç de yer almaktadır (Swift vd., 2006).

Diğer antrasiklinler gibi DOX da, bitişik GC baz çiftlerindeki guaninlerle hidrojen bağları oluşturarak DNA'yı birleştirir (Lipscomb vd., 1994); ancak bu etkileşimin kesin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Şekil 1.9.A). DOX' un kanser hücreleri üzerindeki mekanizmasını açıklamak için öne sürülen mekanizmalardan bir diğeri de, DOX' un kanser hücrelerine uygulanmasını takiben DOX'un DNA'ya interkale olması ve bu yolla DNA'nın bükülmesini çözmesi ve yine bu uygulamanın DNA sarmalının pozitif aşırı sarılmasıyla sonuçlanmasıdır (Yang vd., 2013). DOX'un interkalasyonundan dolayı aktif genlerin promotörlerini çevreleyen nükleozomların dönüşümünü artırdığına ve DNA topolojisinde değişikliklere neden olduğuna dair kanıtlar da vardır (Salerno vd., 2010).

DOX'un nukleustaki DNA'ya interkalasyonunun sonucunda oluşan DNA çözülmesi ve yine DOX uygulamasının nükleozomları dengesizleştiren önemli miktarda pozitif burulma gerilimi sağlamasının da mümkün olduğu düşünülmektedir (Yang vd., 2014). Ayrıca DOX-DNA eklentilerinin oluşumunun, DOX'un topoizomeraz II üzerindeki etkisinden bağımsız olarak DNA hasar tepkisi (DDR) yolunu da aktive edebildiği açığa çıkarılmıştır. Önemli olarak, DOX-DNA eklentilerinin klinik uygulamaya uygun ilaç dozlarında tespit edilebilmesi, kemoterapi uygulandığında DOX-DNA eklentilerinin oluşabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, ek yapıların oluşumu da DOX' un etki mekanizmalarından biri gibi görünmemektedir (Forrest vd., 2012).

DNA'nın replike olması ve transkripsiyonu sırasında topoizomeraz yapıları, normal bir DNA yapısının korunmasında oldukça önemli roller alır. Yukarıda belirtilen işlemler sırasında ortaya çıkan aşırı sarmal DNA, sırasıyla topoizomeraz tip I ve II enzimleri tarafından tek veya çift iplikçik kırılmalarının (SSB'ler veya DSB'ler) eklenmesi üzerine gevşeyebilir ve etkili bir şekilde bir şablon olarak işlev görebilir.

Topoizomeraz II enzimi yapısı büyük ihtimalle DOX' un asıl hedefidir. Bir diğer yandan topoizomeraz I'in inhibisyonunun da DOX sitotoksisitesinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir (Şekil 1.9.b). DOX' un 1 µM' dan daha düşük dozlarının, çift iplikte kırılması olan DNA bölgelerinde DNA'ya kovalent olarak bağlı topoizomeraz II'yi yakaladığı ve DNA düşmesini engellediğine inanılmaktadır. Ayrıca, kanser hücrelerinin DOX ile tedavisi, DNA molekülünde SSB'lerin ve DSB'lerin indüksiyonunun bir sonucu olarak DDR yolu genlerinin upregülasyonunu indükler (Pommier vd., 2010).



Şekil 1.9 (**A)** Hücrelerin DOX ile muamelesi ardından DNA hasarının tetiklenmesi. **(B)** DDR yolunun aktive olması. **(C)** DOX muamelesi ile apoptotik programlı hücre ölümünün veya hücre döngüsü durmasının tetiklenmesi (Kciuk vd., 2023' den uyarlanmıştır).

1996 yılında Mec1 olarak da bilinen mitotik giriş kontrol noktası proteini 1'in memeli ortoloğu olan ataksi telenjiektazi ve Rad3 ile ilişkili (ATR) yapısı keşfedilmiştir. Normalde Mec1 yapısı, tomurcuklanan mayada DNA hasarlarının kontrol edildiği noktalarının koordinasyonunda görevli primer kinaz yapısıdır. Yapısal olarak ATR ise, replikasyon stres yanıtında yer alan yolların koordinasyonundaki ana rolü nedeniyle hücre canlılığı için gerekli olan bir fosfoinositid 3-kinazla (PI3K) ilişkili protein kinazdır (PIKK). Hücrelerin DOX ile muamelesi, Ser-1981'de ATM otofosforilasyonunu, bunun aktivasyonunu ve NBS1, CHK1 ve CHK2 dahil olmak üzere birçok hedefin ATM aracılı fosforilasyonunu indükler. Askorbik asit muamelesi, DOX' un neden olduğu TP53 fosforilasyonunu ve birikimini etkilemezken, hücrelerin hidroksil radikal temizleyici N-asetilsistein ile muamelesi; TP53, H2AX, NBS1, CHK1 ve CHK2'nin DOX aracılı fosforilasyonunu hafifletir. Bu, hidroksil radikallerinin, ATM'ye bağımlı yolların DOX kaynaklı aktivasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (Kurz vd., 2004).

DOX ile muamale edilen hücrelerde CHK2'nin aktive olması DDR yolu üyelerinden olan, ATM ve ATR yapılarının aktive olmasından bağımsız bir şekilde de gerçekleşebilir (Şekil 1.9.c). Örneğin; akut lenfoblastik lösemide uygulanan DOX, ATR-CHK1 yolunun aktivasyonu yoluyla hücre döngüsünün G2/M fazında durmasıyla sonuçlanan bir yoldan etkisini gösterir. ATR-CHK1 inhibisyonu ile beraber DOX muamelesi yapıldığında ise, akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde anormal kromozom ayrımı ve mitotik iğ ipliklerinde bozulmalar olur (Ghelli Luserna Di Rorà vd., 2021).

Ayrıca; ATM, ATR, CHK1/2, DNA-PKC,PARP-1 gibi DDR yolu bileşenlerinin bu hücrelerde inhibe olması, kanser hücrelerini DOX ile tedaviye duyarlı hale getirir ve bu durum hücre döngüsünü etkiler (Şekil 1.9.c). Topoizomeraz II inhibisyonunun neden olduğu DNA hasarı, DNA hasarının indüksiyonuna, G1 ve G2 hücre döngüsünün durmasına ve sonunda apoptoz sürecinin başlamasına yol açar (Correia vd., 2021).

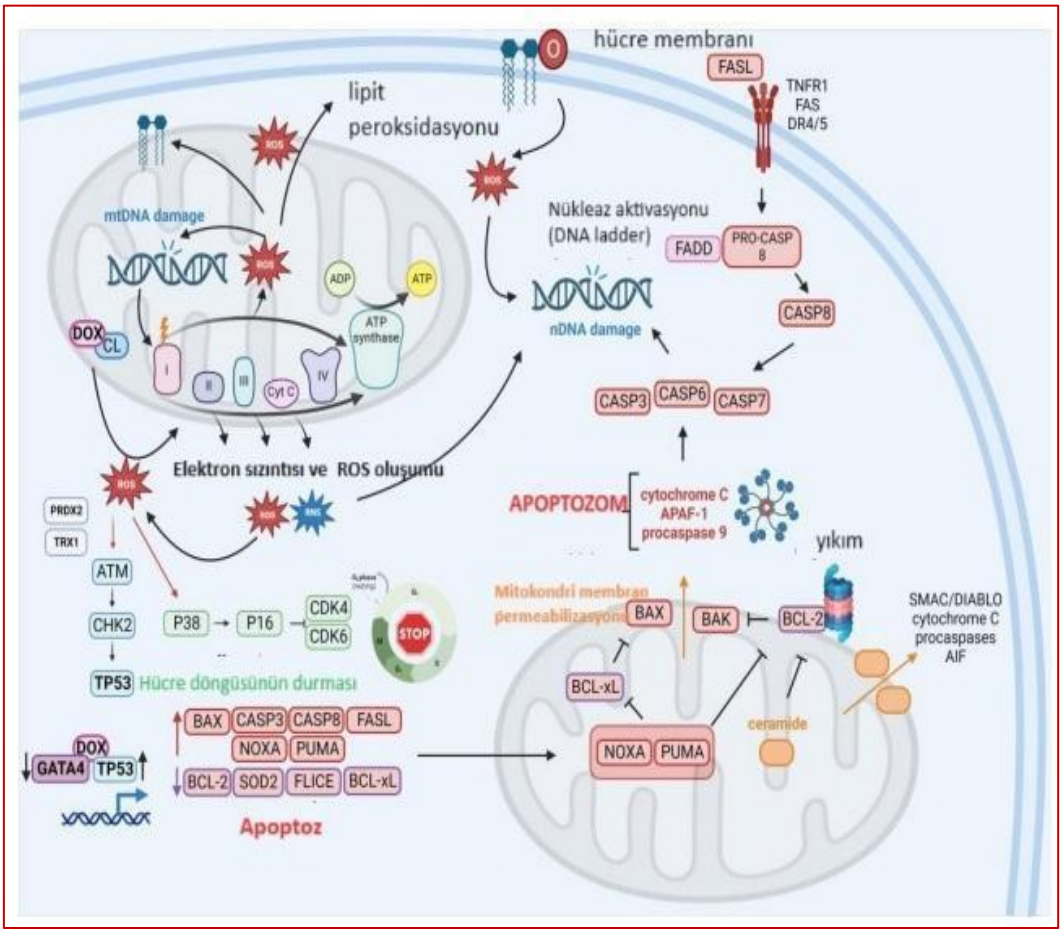
Diğer bir DOX etki mekanizmasında Reaktif oksijen türleri (ROS)nin etkinliği de mevcuttur (Şekil 1.10). ROS; aerobik organizmalarda elektron taşıma zinciri (ETC), katabolik oksidazların etkisi ve peroksizomların metabolizması yoluyla üretilebilir. ROS normalde konsantrasyonları nispeten düşük tutulduğunda redoks

sinyalleme olaylarında hücresel haberciler olarak işlev görür. Bununla birlikte, aşırı ROS üretimi, DNA bazları ve şeker-fosfat omurgası üzerindeki radikallerin etkisi yoluyla DNA hasarına katkıda bulunabilir. Onarılmayan hasar apoptoza, hücre döngüsü durmasına ve yaşlanmaya yol açabilir (Correia vd., 2021). DOX, iç mitokondriyal membran üzerindeki kardiyolipine doğrudan bağlanır ve burada ROS üretim sürecini başlatır. Çok yüksek seviyede reaktif oksijen türevlerinin varlığı, hücrede mitokondride harabiyet oluşturur ve bu durum hücrenin apoptozu ile sonuçlanır (Gorini vd., 2018).

Kalp hücrelerinde mitokondriden türetilen ROS ve kalsiyum, DOX'un indüklediği içsel ve dışsal apoptoz formlarının uyarılmasında önemli bir rol oynar. Diğer yandan ATM, hidrojen peroksite maruz kalan hücrelerde belirlendiği gibi, MRN komplekslerinin katılımı olmadan ve DSB'lerin yokluğunda ROS tarafından da etkinleştirilebilir (Şekil 1.10). Kalp hücrelerinde ise bu reaktif türlerin birikmesiyle ATM'nin aktivasyonu meydan agelir ve bu durum klasik DDR yanıtı ile ilintili bir durum değildir. Peroksiredoksin-2 (PRDX2) ve tiyoredoksin-1 (TRX1) gibi bazı enzimler ise, reaktif oksijen türlerinin miktarı kısmi bir eşik noktasına erdiği zaman ATM proteinindeki sistein (Cys-2991) kalıntılarını kimyasal olarak değiştirebilir. ATM proteinindeki sistein kalıntılarındaki bu değişim süreci ise, moleküller arasında disülfit bağlarının oluşmasına ve ATM protein dimerlerinin aktivasyonuna sebebiyet verir. Eğer hücrede ATM proteininde mutasyon olursa ve bu disülfit bağ oluşumu önüne geçilirse, reaktif oksijen türevleri tarafından aktive edilen ATM proteinin miktarı hücrede azalır. Bunun yanında, MRN kompleksinin aracılık ettiği aktivasyon yolu etkilenmeyebilir. Hücredeki reaktif bu türevlerin, MRN kompleksleri üzerinde ATM proteinini bağımsız olarak aktive edebildiği fikri, ATM'nin ROS tarafından aktivasyonunun, bir indirgeyici ajanın eklenmesiyle engellenebileceği bulgusu ile de desteklenen bir hipotezdir (Sarkar vd., 2021). ROS maruziyetine yanıt olarak üretilen ATM dimerleri CHK2'nin fosforilasyonu ve nihai olarak da apoptoz yolunun aktivasyonuna katkıda bulunabilir (Xie vd., 2021).

DOX uygulaması yoluyla meydana gelen apoptotik mekanizmaların yanında reaktif oksijen türevlerinin apoptotik sinyalleşmeye katkısı; Saos-2 osteosarkoma hücrelerinde yapılan bir çalışma sonucunda açığa çıkarılmıştır. Hücrelerin 48 saat boyunca DOX ile muamele edilmesi, hücresel yapıların G1 öncesi fazda birikmesine yol açmıştır. Ayrıca Saos-2 hücrelerinde DNA kırılması da

tetiklenmiştir. DOX uygulaması sonucu ortaya çıkan bu iki süreç de apoptotik hücre ölümünün karakteristik özellikleridir. Bunların yanında Saos-2 hücrelerine DOX uygulaması, bu hücrelerde hidrojen peroksit ve süperoksit üretiminde artışa sebep olmuştur. DOX uygulaması ile bu spesifik osteosarkom hattında; mitokondriyal membrandepolarizasyonuna, sitokrom c salınımı ve kaspaz-3 enziminin aktivasyonuna da neden olmuştur. Yine DOX muamelesi proapoptotik BAX proteini seviyelerinde artışa, antiapoptotik BCL-2 proteini seviyelerinde ise azalmaya neden olduğu da gösterilmiştir (Tsang vd., 2003).



Şekil 1.10 DOX' un ROS indüksiyonu ve apoptoza katkısı (Kciuk vd., 2023' den uyarlanmıştır).

Katalazın değişimi, Saos-2 hücre hattında DOX tarafından indüklenen reaktif oksijen türleri oluşumunu, mitokondriden sitokrom c salınımını, öncül kaspaz-3 kesilmesini ve apoptozu inhibe edebilmesi gibi hedeflerinin açığa çıkarılması ile ROS oluşumunun DOX tarafından indüklendiği ve bu yolun kanser hücresi ölümünde rol oynadığına dair daha fazla kanıt açığa çıkarılmıştır. Yukarıda belirtilen araştırmanın bulguları, reaktif okisjen türevlerinin DOX kaynaklı hücre

ölümü için sinyal molekülleri olarak işlev görebileceğini açığa çıkarmıştır. Açığa çıkan ikinci bir mekanizma ise TP53 olmamasına rağmen DOX'un ROS aracılı olarak yine işlevsel olabileceğini ortaya çıkarmıştır (Tsang vd., 2003).

Diğer yandan DOX' un neden olduğu hücre ölümü mekanizması, TP53'ün yokluğuna rağmen işlevsel olabilir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir; yapılan bir çalışmada da DOX muamelesi, BAX protein ekspresyonunu, beraberinde kaspaz-8 ve kaspaz-3 yükselmesini ve BCL-2 proteininin aşağı regülasyonunu indüklemiştir. Aynı zamanda DOX ile muamele, NF-κB (nükleer faktör kappa-hafif zincir) ekspresyonunun güçlendiricisinde bir azalmayla birlikte hidrojen peroksit oluşumunu arttırmıştır. Buna karşılık, süperoksit dismutaz (SOD2) ekspresyonundaki artış, NF-κB proteinindeki azalmayla birlikte hidrojen peroksit üretiminin azalmasına katkıda bulunmuştur (Pilco-Ferreto, N.; Calaf, G.M., 2016). MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinde ekspresyonlara bakıldığında ise DOX uygulaması sırasında tespit edilen daha yüksek miktardaki süperoksitin, süperoksitin ayrışmasından sorumlu olan SOD2 ve katalazlar gibi enzimlerin aktivitesindeki bir azalmadan kaynaklandığı varsayılmaktadır (Navarro vd., 2006).

Lipid membranlarının oksidatif yıkımı sonucu oluşan lipitlerin peroksidasyon reaksiyonları, oksidatif stresle alakalı yollardır. Lipid membranlarının oksidatif yıkımı, büyük kısmı oldukça reaktif olan yaklaşık 200 değişik türde aldehit üretimine sebebiyet verir. Oluşan aldehit yapılarının hücredeki mutajenik ve karsinojenik etkileri, DNA ile reaksiyona girme veya hem DNA replikasyonunu hem de transkripsiyonunu durdurabilen pro-mutajenik ekzosiklik eklentiler ve protein-DNA çapraz bağları oluşturma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır (Nakamura, J.; Nakamura, M; 2020). DOX uygulamasını takiben lipit peroksidasyonu daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir; ancak lipid peroksidasyonunun DOX sitotoksisitesine katkısı daha önce incelendiği gibi tartışmalıdır (Minotti vd., 2004).

Seramidlerin, proapoptotik proteinlerin (sitokrom c, prokaspazlar, apoptoz indükleyici faktör (AIF), ısı şok proteinlerinin, ikincil mitokondri türevi dahil) geçtiği geniş protein geçirgen kanalların geliştirilmesi yoluyla mitokondriden kaspaz aktivatörü (SMAC)/direkt düşük pl'li apoptoz bağlayıcı proteinin inhibitörü

(DIABLO) ve endonükleaz G gibi proapoptotik proteinlerin salınmasını tetiklediği rapor edilmiştir (Mullen, T.D.; Obeid, L.M; 2012).

Antrasiklinlerin yaygın kullanımına rağmen, bu ilaçların toksik etkileri çok yönlü olup birçok araştırmacı tarafından gözden geçirildiği gibi, kardiyotoksisite en iyi bilinen ve en kapsamlı şekilde incelenen yan etkidir (Kciuk vd., 2023). Diğer yandan beyin, karaciğer ve böbrekler dahil olmak üzere diğer organlarda hasar da meydana gelebilir. DOX' un DNA'ya interkalasyon yapma, topoizomeraz II'yi inhibe etme, mitokondri fonksiyonunu bozma ve serbest radikal oluşumunu ve oksidatif hasarı güçlendirme yeteneğine atfedilebilen antikanser aktivitesinin olduğu zaten bilinmektedir. Ancak DOX' un kesin etki mekanizmaları oldukça çetrefillidir ve halen net olarak bilinmemektedir (van der Zanden, S.Y.; Qiao, X.; Neefjes, J., 2021). Antioksidan ve/veya antiapoptotik aktiviteye sahip maddelerin kullanımı, etkili dağıtım sistemlerinin oluşturulması, ve DOX analoglarının geliştirilmesi ve ön ilaçlar da dahil olmak üzere DOX' un olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik birçok girişimde bulunulmuştur (Kciuk vd., 2023).

DOX ajanının güçlü kemoterapötik etkilerini korurken veya DOX'un etkilerini güçlendirirken ne yazık ki toksisitesi ile mücadele de oldukça önemlidir. Diğer yandan kanser, farklı ilaçların eşzamanlı etkisine karşı büyük bir duyarlılığa sahip olan, birbirine bağlı bir grup moleküler yol olarak yorumlanabilir. Bu, ilaç kombinasyonlarının daha ayrıntılı olarak araştırılmasını mümkün kılar. Bu anlamda ilaç kombinasyonunun birçok avantajı vardır: daha az toksisite, artan ilaç etkinliği, eşit veya artan etkinlik düzeyinde dozajın azaltılması ve onkolojik tedavide ilaç direncini antagonize etme olasılığı. Öne çıkan bu yolaklar sayesinde kemoterapötik ajanların kombinasyonu; bulaşıcı hastalıklar, virütik hastalıklar ve kanserlerin tedavisinde yaygın ve önemli bir tedavi yöntemini temsil etmektedir (Correia vd., 2021).

Kemoterapi, kemik iliği hücrelerini etkileyerek bağışıklığı kuvvetli bir şekilde azaltarak ve konakçı hastalıklara karşı duyarlılığı artırarak, aktif olarak çoğalan hücreleri seçici olmayan bir şekilde hedefleyerek yalnızca neoplastik değil, aynı zamanda hücrelerin de yok edilmesine yol açan çeşitli olumsuz etkiler ve risklerle birlikte hasta için çok toksik olabilir. Dolayısıyla kombinasyon terapisi yine de toksik olabilse de, farklı kemoterapötik ajanları aracılı olarak farklı sinyal yollarının hedeflenmesi nedeniyle bu hücresel toksisite daha az belirgin olabilmektedir.

Ayrıca monoterapi genel olarak kombinasyon terapisi yönteminden daha az etkilidir, ancak hala çok yaygın bir tedavi yöntemidir. Kombinasyon terapisinin en büyük avantajı, ilaçların sinerjistik olarak çalışmasıdır. Bu nedenle daha düşük dozlarda eş zamanlı olarak iki ilacın kullanımı eş zamanlı olarak neoplastik hücreler üzerinde sitotoksik etkiyi daha iyi gösterebilir. Kombinasyon terapisinin bir diğer olumlu sayılabilecek özelliği de aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerinde bu kemoterapötik ajanların toksik etkilerinin önlenmesini sağlayabilecek olmasıdır. Bu durum, kombinasyon terapisindeki bir ilacın hücreyi öldürme açısından, sağlıklı hücrelerdeki başka bir ilaca karşı antagonist olması durumunda açığa çıkar. Hem farklı amaçlara yönelik hem de kemoterapötik ajanların birleştirilmesi de çok ilginç sonuçlar vermiştir; bu, olağan anti-kanser monoterapisinin onkolojik hastaların güvenliği ve tolere edilebilirliği açısından başarısızlıklar gösterdiği durumlarda önemlidir (Correia vd., 2021).

Yaptığımız çalışmada bu amaçla DOX ve hücre döngüsü inhibitörü olan Abemaciclibin kombinasyonunun farklı moleküler alt tiplere sahip hücre hatlarında etkileri görülmeye çalışılmıştır.

1.5 CDK4/6 İnhibitörleri

Hücre döngüsünde rol alan CDK' lerın inhibitörlerine olan ilgi, CDK4 ve CDK6'nın oldukça spesifik, güçlü ATP rekabetçi inhibitörlerinin geliştirilmesiyle yeniden canlanmıştır. CDK4 ve CDK6 inhibitörlerinin bilim dünyasına ve kanser tedavisine açılması açısından en büyük adım, CDK4 ve CDK6 için maksimum spesifite sağlamada öne çıkan, C-5 pozisyonuna bir metil ikame edicisinin dahil edilmesiyle mümkün olmuştur. Bu şekilde pirido[2,3-d]pirimidin kimyasal yapısnın optimizasyonu mümkün olmuştur. Bu sayede, Pfizer'in palbociclib ajanı (PD-0332991) geliştirilmiştir. Hemen ardından Novartis'teki bilim adamları da benzer bir kimaysal iskele kullanarak ribociclib ajanını geliştirmesinin önü açılmıştır. Bu arada, Lilly' deki tıbbi kimyagerler abemaciclib'i (ABE) geliştirmek için 6-pirimidin benzimidazol çekirdeğini kullanmışlardır (Goel vd., 2022).

Palbociclib, ribociclib ve abemaciclib ajanların her üçü de oral yoldan kullanılmakta ve ilerlemiş HR + meme kanserli hastaların tedavisi için onaylı kemoterapötik ajanlardır. Yakın zamanda onaylanmış dördüncü bir CDK inhibitörü olan Trilaciclib ise, intravenöz enjeksiyon yoluyla verilen trisiklik laktam iskelesine

dayanmaktadır ve küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hastalarında kemoterapinin neden olduğu kemik iliği baskılanmasını azaltmak için onaylanmıştır (Goel vd., 2022).

Dikkat çekici bir şekilde, şu anda onaylanmış olan CDK4/6 inhibitörlerinin hücresel proliferasyonu baskıladığının kesin moleküler mekanizmaları ucu açık bir soru olmaya devam etmekle beraber; bu alanda yapılan son çalışmalar bu ilaçların hücrelerde CDK4/6'yı doğrudan inhibe edip etmediğini tam olarak anlayamayabileceğimizi ve eğer öyleyse, ne ölçüde olabileceğini belirlemeye çalışmaktadır. Palbociclib, ribociclib ve abemaciclib ajanların her üçü de CDK4 ve CDK6'nın ATP cebi ile etkileşime girmektedir. Bu mekanizmanın, aktif CDK4/6 kinazların rekabetçi inhibisyonuna sebep olduğu varsayılır. Canlı hücrelerde ise bu durumda aktif CDK4/6 kompleksi büyük çoğunlukla; siklin D ve p21 ve/veya p27 içeren bir trimerdedir. Abemaciclib, palbociclib ve ribociclibin *in vitro* daki güçleri siklin D-CDK4/6 dimerleri kullanılarak belirlenir (Bisi vd., 2016).

Aynı zamanda;palbociclib, ribociclib ve abemacilibin *in vitro* olarak aktif trimerik kompleksleri inhibe etmediği de görülmektedir. Bu olumsuz olarak düşünülen durumda da bu 3 ajanın hücrelerde aktif CDK4/6'yı doğrudan inhibe edip etmediği sorusunu düşündürmektedir. Bir diğer modelde ise, CDK4/6 inhibitörlerinin inaktif CDK4/6'yı bağladığı ve hücrede tecrit ettiğini göstermektedir. Yine bu yolla holoenzim trimerlerinin toplanmasını önlediği ve bu durumda da CDK2'yi inhibe etmek üzere p21'in serbest kalmasını sağladığı belirtilmektedir (Guiley vd., 2019).

CDK4/6 inhibitörlerinin etkilerini esasen dolaylı CDK2 inhibisyonu yoluyla gösterdiği düşüncesi merak uyandırıcıdır, bir ölçüde açık bir soru olmaya devam etmektedir ve CDK4/6 inhibitörüne duyarlı kanser hücrelerinin CDK2 kinaz fonksiyonunun bozulmasına hassas oldukları da gösterilmiştir, hatta CDK4 ve CDK6 kinazların bozulmasından daha fazlasının bu yolla olabileceği düşünülmektedir (Pennycook ve Barr, 2021). Başka bir karmaşıklık katmanı, CDK6'nın hem ısıya dayanıksız (HSP90-CDC37'ye bağlı) hem de ısıya dayanıklı (HSP90-CDC37 bağlanmamış) formlarda mevcut olması gerçeğinden kaynaklanmaktadır; ikincisi mevcut farmakolojik CDK4/6 inhibitörlerine direnç göstermektedir (Wu vd., 2021).

Yapılan *in vitro* kinaz çalışmalarda palbociclib, ribociclib ve abemaciclib ajanların her üçünün de bu hedefleri dışında farklı kinaz hedeflerinin olduğunu da göstermiştir. Yine yapılan kemoproteomik çalışmalarda da aynı durum ispatlanmıştır. Bu özellikle; CDK9, PIM1, homeodomain ile etkileşime giren protein kinaz 2 (HIPK2), çift özgüllüklü tirozin fosforilasyonu ile düzenlenen kinaz 2 (DYRK2), glikojen sentaz kinaz-3β (GSK3β) ve glikojen sentaz kinaz-3β'yi (GSK3β) inhibe ettiği bildirilen ABE için geçerlidir (Gelbert vd., 2014). Her ne kadar bu hedefler ABEnin farklı toksisite ve etkinlik profillerini açıklamak için önerilmiş olsa da bunların tümör hücrelerinde fizyolojik ilaç konsantrasyonları tarafından ne ölçüde inhibe edildiği belirsizliğini korumaktadır. Geniş bir kanser hücre hattı panelinde yapılan çalışmada palbociclib ve ABE' ye duyarlılık arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, palbociclib ve abemaciclibin aynı yolları inhibe ederek etki mekanzimalarını gösterdiğini düşündürmektedir. Son olarak, CDK4/6 inhibitörlerinin CDK4/6'yı doğrudan inhibe edip etmediği sorusuna bakmak istediğimizde ise, palbociclib, ribociclib ve abemaciclib ajanlarının her üçünün de CDK4 ve CDK6'ya yönelik inhibisyon güçlerinin de birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir (Gong vd., 2017).

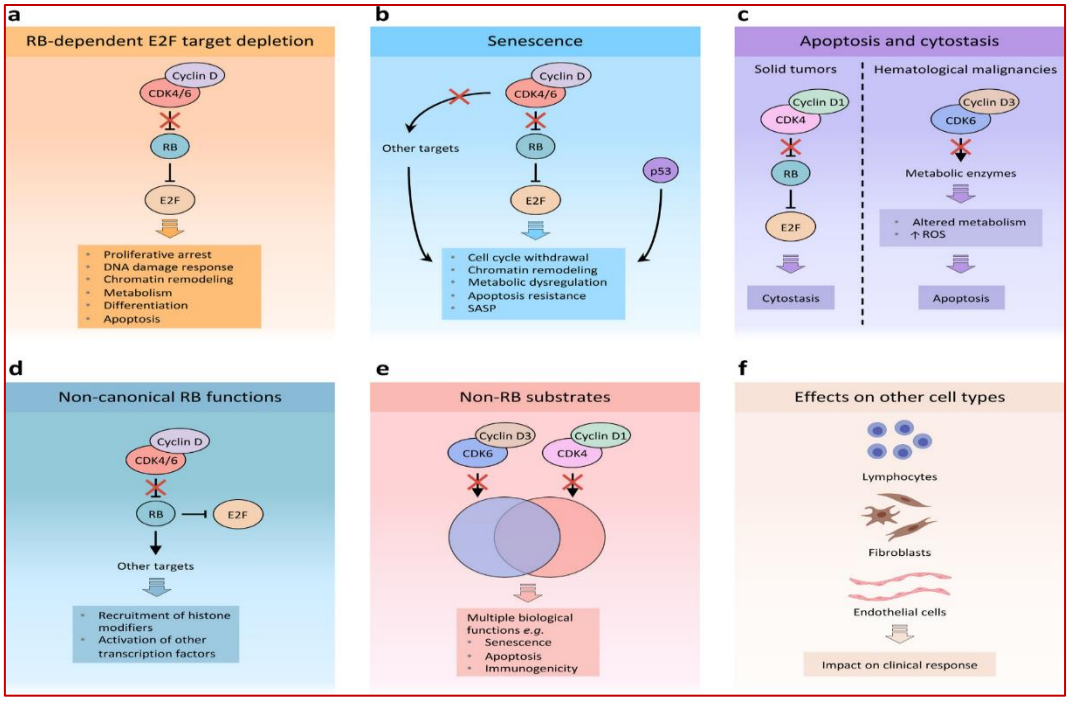
Gelecekte CDK4/6 inhibitörlerinin klinik gelişim için alanların başarılı bir şekilde önceliklendirilmesi, CDK4/6 inhibitörlerinin kanserde etkilerini gösterdiği mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasını gerektirecektir., Bunu kolaylaştırmak için, CDK4/6 inhibisyonuna fenotipik tepkileri belirleyen hücresel ve moleküler süreçlerin çeşitliliğini sıralayan belirli özellikler mevcuttur.

E2F transkripsiyonel aktivitesinin CDK4/6 inhibitörünün aracılık ettiği inhibisyonunun en iyi karakterize edilen sonucu, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda belgelenen RB' ye bağlı proliferatif tutulmadır (Şekil 11). Bu sitostatik etkinin tümör büyümesini en iyi şekilde stabilize etmesi beklenir ve CDK4/6 inhibitör monoterapi denemelerinde görülen objektif klinik tepkileri (yani tümörün küçülmesini) tek başına açıklayamaz. Daha da önemlisi, E2F hedefleri, tedaviye verilen fenotipik yanıtları etkileyecek şekilde replikasyon kökenli lisanslama, DNA onarımı, DNA metilasyonu ve kromatin yoğunlaşması, hücresel metabolizma, hücresel farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere S fazı girişi dışındaki süreçleri düzenler ve CDK4/6 inhibisyonu da RB yeterliliğindeki hücrelerde bu süreçleri etkileyebilir (Salvador-Barbero B. vd., 2020).

RB' ye bağımlı E2F transkripsiyonel hedefinin tükenmesi: RB fosforilasyonunun siklin D-CDK4/6 kompleksleri tarafından blokaja uğraması, E2F'nin RB tarafından sürekli bağlanmasına yol açar. Bu da inhibisyonun önünü açar. RB tarafından E2F'nin etkisizleştirilmesinin belki de en önemli sonucu hücrelerde meydana gelen proliferatif tutulmadır. E2F hücrede bunun yanında, DNA'da meydana gelen hasara karşı tepkide, kromatinin yeniden şekillenmesi, metabolizma, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere CDK4/6 inhibisyonundan etkilenen çeşitli yolaklarda da görev alır (Şekil 1.11). CDK4/6 inhibitörleri; hücre döngüsünün geri çekilmesi, kromatinlerin yeniden yapılanması, metabolik düzensizlik, düzensizlik, apoptoza direnç ve yaşlanmayla ilişkili salgı fenotipi (SASP) ile karakterize edilen RB'ye bağımlı yaşlanan fenotipi indükleyebilir. FOXM1 ve DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) gibi diğer CDK4/6 hedeflerinin downregülasyonunun proliferatif fenotipi güçlendirdiği düşünülmektedir. Ek olarak p53, yaşlanmanın tetiklenmesinde RB ile farklı ve örtüşen roller oynar. Mevcut kanıtlar, p53 fonksiyon kaybının, CDK4/6 inhibitörleri tarafından indüklenen yaşlanmayı önemli ölçüde etkileyebileceğini öne sürmektedir; ancak ilave çalışmalar, CDK4/6 inaktivasyonunun, doğal tip p53 yokluğunda hala yaşlanan fenotipleri indükleyebildiğini göstermiştir (Goel vd., 2022).

CDK4/6 inhibitörleri tarafından başlatılabilen programlı hücre ölümü apoptozun veya sitostazın uyarımı daha çok hücre tipine bağımlı bir değişken gibi görünmektedir. Apoptoz veya sitostaz yönelimli bu farklılıkların CDK4 ile CDK6 arasındaki sinyalleşme farklılıklarına bağlı olabileceği üzerinde durulmaktadır. Hematolojik kanserlerde CDK6-siklin D3 komplekslerinin inhibe edilmesi durumu, apoptozla sonuçlanan yolakların aktifleşmesini sağlamaktadır. Diğer yandan, meme kanseri gibi solid malignitelerin çoğalması çoğu zaman CDK4-siklin D1 aktivitesine bağlı görünmektedir. Bu durumda CDK4/6 inhibitörlerinin tekli kemoterapisi, sürekli E2F inhibisyonuna ve bunun da doğal bir sonucu olarak RB' ye bağımlı proliferatif durmaya neden olabileceği düşünülmektedir (Şekil 1.11). CDK4/6 inhibitörleri; RB'nin, E2F' yi inhibe etmesinin yanında, kromatin yapısının yeniden modellenmesine aracılık ettiği ve diğer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gibi farklı rolleri olduğu da gösterilmiştir. CDK4 ve CDK6 yapıları; RB' yi fosforile etmenin ve inhibe etmenin yanında bir çok hücresel sürece de katkıda bulunur. Katkıda bulundukları bu süreçler; senesens, programlı

hücre ölümü ve immünojenitedir. Bu hücresel yolları da içine alacak şekilde bu biyolojik süreçlerdeki önemli işlevler oynayan bir dizi benzersiz ve örtüşen hedefi fosforile ederek hücrede etkisini gösterir. CDK4/6 inhibitörleri; en başta lenfositler olmak üzere, fibroblast hücreleri ve endotel hücrelerini de içine alacak şekilde TMEde birden çok hücre tipinde doğrudan etkiler gösterdiği ispatlanmıştır (Goel vd., 2022).



Şekil 1.11 Sikline bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve CDK6 (CDK4/6) inhibitörlerine yanıt, bağlamla ilintili tümör hücresinin içsel ve dışsal özellikleri de dahil olmak üzere nihai sonucu etkileyen birçok faktöre bağlıdır. a) RB' ye bağımlı E2F hedef tükenmesi. b) Senesens. c) Apoptoz ve sitostaz. d) Non-canonical Rb fonksiyonları. e) Rb substratı olmayanlar. f) CDK4/6 inhibitörlerinin, lenfositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri dahil olmak üzere tümör mikro ortamında normal olarak bulunan birden fazla hücre tipi üzerinde doğrudan etki gösterdiği gösterilmiştir (Salvador-Barbero B. vd., 2020'den uyarlanmıştır).

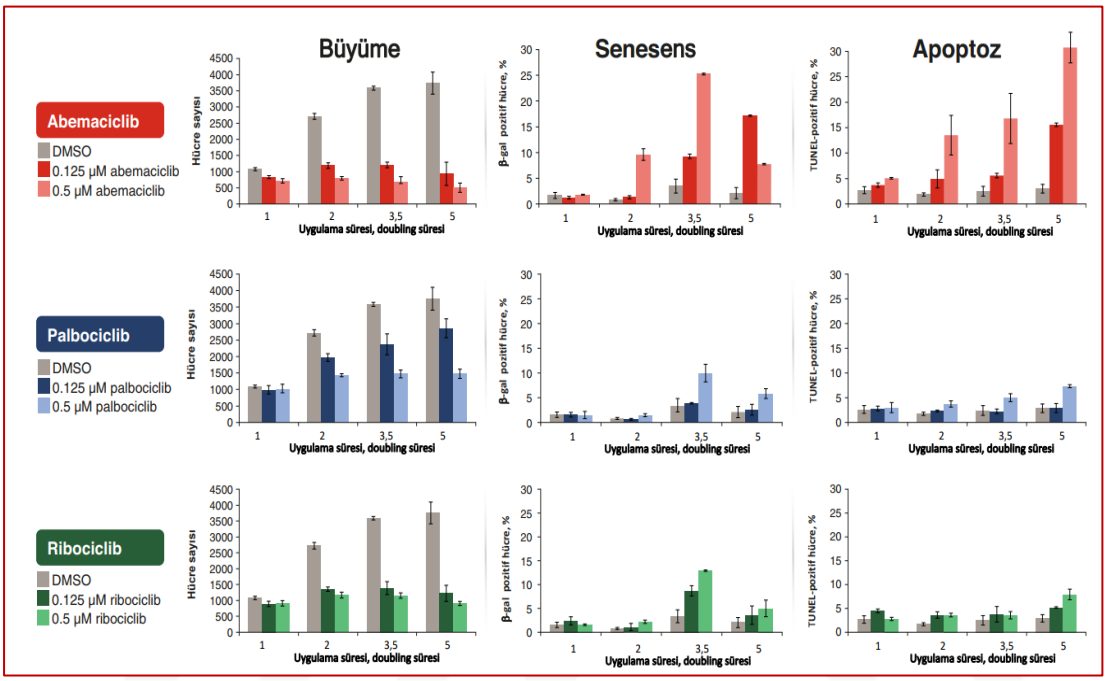
Yapılan birçok çalışma, CDK4/6 inhibitörlerinin doğrudan ve dolaylı olarak anti-tümör immünojenitede rol oynayan T lenfositlerin efektör fonksiyonunu destekleyebildiğini göstermiştir. Bu etkisinin beraberinde immün baskılayıcı ve düzenleyici T (Treg) hücrelerini de inhibe edebildiği açığa çıkarılmıştır. CDK4/6 inhibitörlerinin bir diğer etki mekanizmaları ise fibroblastlar üzerinedir. CDK4/6 inhibitörleri fibrosblast hücrelerinde senesens fenotiplerini de tetikleyebilme özelliği gösterir. Ne yazık ki bu durum, tümör büyümesini teşvik ederek tedaviye yanıtı potansiyel olarak bozabilir. Bu durumda da endotel hücrelerinde hücre döngüsünün blokajını etkileyebilir (Goel vd., 2022).

CDK4/6 inhibitörleri olan palbociclib, ribociclib ve abemaciclib ajanları, etkinlikleri her üç tip hasta grubunda da da ilerlemesiz sağkalımın arttığını gösteren randomize çalışmalara dayanan kanıtlarda HR + olan ve ilerlemiş veya metastatik olan meme kanseri hastaları için artık standart kemoterapötik tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır. Erken meme kanserine ilişkin sonuçlara bakıldığında ise ribociclib ve abemaciclib ajanları için sonuçların ilaçlar ve genel sağkalım açısından uyumsuz olduğu ve abemaciclib için invaziv hastalıksız sağkalımdaki sürekli iyileşme gösterildiği ispatlanmıştır (Şekil 1.12); ancak bugüne kadar diğer CDK4/6 inhibitörleri için bu durum gösterilmemiştir (Johnston vd., 2023).

Palbociclib, ribociclib ve abemaciclib, değişen potenslerle hedefledikleri CDK4 ve CDK6'nın inhibisyonu yoluyla hücre döngüsü sırasında G1'den S fazına geçişi engeller. Palbociclib ajanı, CDK4/siklin D3 kompleksi ve CDK6/siklin D1 kompleksi için birbirine yakın bağlanma afinitesine sahiptir. Bu açıdan bakıldığında ribociclib ve abemaciclib ajanları ise, CDK4/siklin D3 kompleksi için daha büyük bağlanma afinitesi ile kendini gösterir. Abemaciclib için bu etkinin 9 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Abemaciclib, CDK4 için en güçlü inhibitör kapasiteyi ve en yüksek CDK4'ten CDK6'ya inhibisyon oranını (Torres-Guzmán vd., 2022; Chen vd., 2016) sergiler. Palbociclib ve ribociclibe kıyasla abemaciclibin göreceli olarak daha düşük CDK6 inhibisyonu yapması, aralıklı uygulama yerine sürekli uygulamaya izin vermekte ve miyelosupresyon insidansının diğer 2 ajana göre daha az olmasını açıklamaktadır (Goel vd., 2022). Hormon reseptörü pozitif MCF-7 hücre hattında yapılan bir klinik öncesi deneyde; abemaciclib, palbociclib ve ribociclib uygulaması sonucu benzer hücre büyümesi inhibisyonu saptanırken (Şekil 1.12); abemaciclibin palbociclib veya ribociclib ile karşılaştırıldığında yaşlanma ve apoptoz üzerinde gözlemlenenden daha erken ve daha belirgin etkiler gösterdiği açığa çıkmıştır (Torres-Guzmán vd., 2017).

Abemaciclib ve diğer CDK4/6 inhibitörleri arasındaki en büyük etkinlik farkı, daha yüksek CCNE1 (palbosiklib direncinde rol oynayan siklin El'i kodlayan), CDKN1A (p21, bir CDK2/4/6 inhibitörü) ile karakterize edilen transkripsiyon profiline sahip hücre hatlarında görülmüştür. CDK4/6 inhibitörleri arasındaki *in vivo* ve kliniüe gelmeden önceki ayrımların, abemaciclibce hedeflenen genlerin ekspresyon seviyeleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Hafner vd., 2019).

Aynı zamanda Abemaciclib ajanı, diğer CDK yapılarını, siklinleri ve CDK/Siklin komplekslerini ribociclib ve palbociclib ajanlarına göre daha iyi inhibe etmektedir (Şekil 1.13). Abemaciclib ajanının sekonder hedefleri arasında hücre döngüsünde S fazından G2 fazına geçişte etkisi olan CDK1/siklin B ve CDK2/siklin A/E kompleksleri de bulunmaktadır (Hafner vd., 2019).

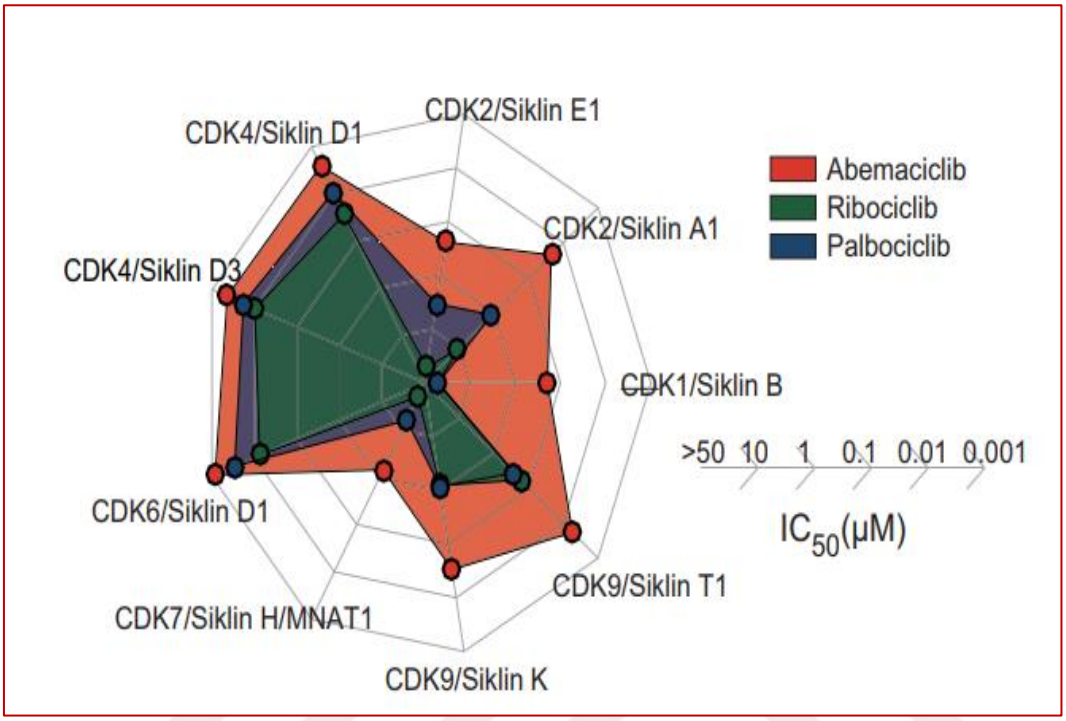


Şekil 1.12 Sikline bağımlı kinaz (CDK) 4/6 inhibitörlerinin büyüme, yaşlanma ve apoptoz üzerindeki etkisi (Torres-Guzman vd; 2017'den uyarlanmıştır) Veriler, CDK4 ve CDK6 inhibitör tedavisi için 2 deneyin ve kontrol grupları için için 6 deneyin ortalaması (±SD) olarak çizilmiştir. β-gal= β-galaktosidaz; DMSO = dimetil sülfoksit; TUNEL=terminal deoksinükleotidil transferaz deoksiüridin trifosfat çentik ucu etiketlemesi.

Diğer siklin bağımlı kinazları inhibe etmenin kanserdeki klinik etkisi büyük oranda bilinmemektedir. Bununla beraber CDK4/6 inhibitörlerleri arasında Abemaciclibin sadece aktivite ve azalan hematolojik toksisite açısından değil aynı zamanda birincil (içsel) veya ikincil (edinilmiş) direnç açısından farklılıklara katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Wander vd., 2022; Jeselsohn vd., 2021), (Şekil 1.13).

CDK4/6 inhibitörlerine direnç, retinoblastoma tümör baskılayıcı proteinin (pRb) CDK2'ye bağımlı fosforilasyonunu destekleyen siklin E'nin amplifikasyonu, CDK6 amplifikasyonu ve pRb fonksiyonunun kaybını içeren çoklu genomik değişikliklerle ilişkilidir (Ashgar vd., 2015). CDK2/siklin E kompleksinin varlığı, CDK4/6 inhibitörleri için potansiyel bir direnç yolu olarak göze çarpmaktadır (Asghar vd., 2022b). CDK4/6 inhibitörleri, p21 proteininin; CDK4/siklin D1

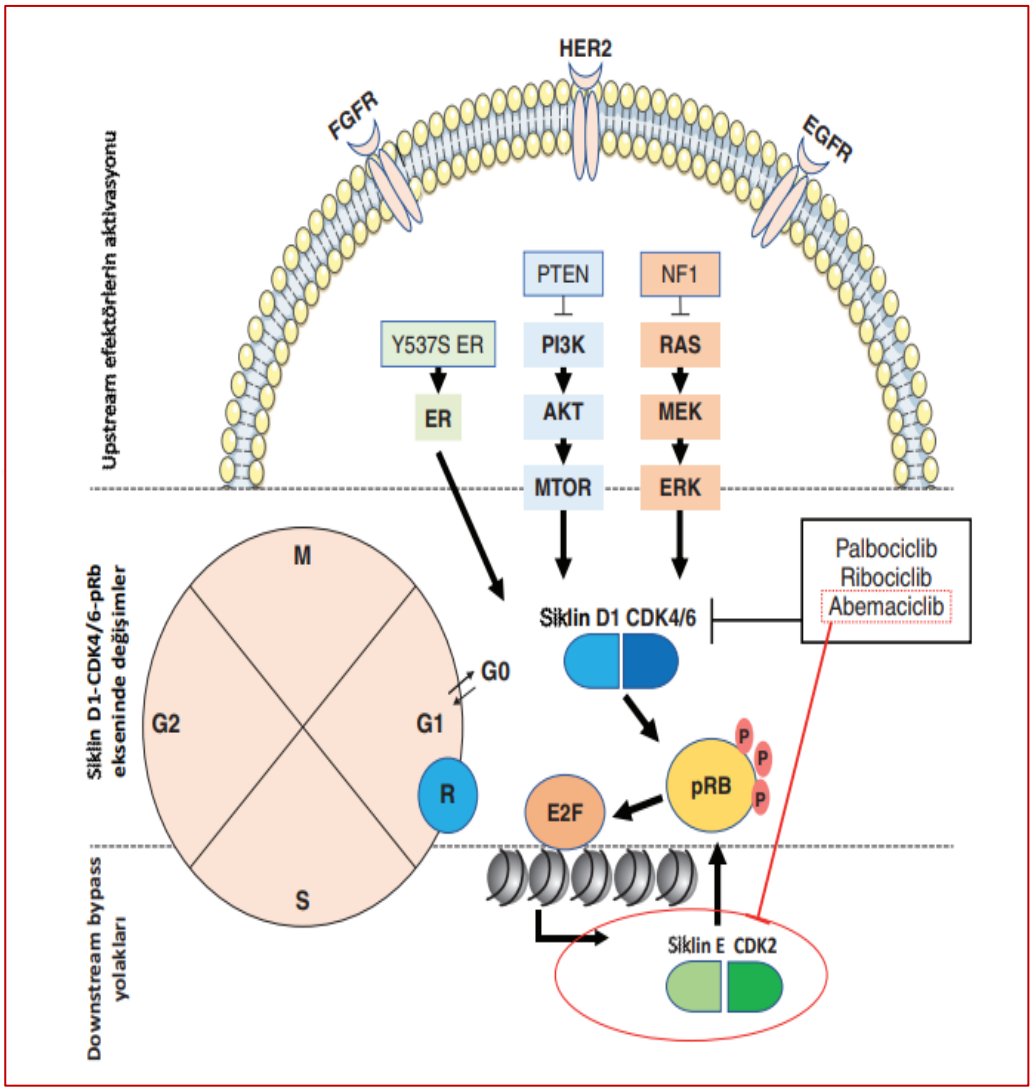
kompleksine bağlanmasını azaltarak doğrudan hücre proliferasyonunu inhibe edebilmektedir. Diğer bir proliferasyon inhibisyonu ise dolaylı olarak gerçekleşmekte olup; p21 salınımı yoluyla CDK2/siklin E inhibisyonu aracılığıyladır (Johnston vd., 2023).



Şekil 1.13 Abemaciclib, ribociclib ve palbociclib ajanlarının CDK ve siklin hedefleri (Johnston ve ark.,2023'ten uyarlanmıştır). Abemaciclib, ribociclib ve palbociclib ajanları için CDK/siklin komplekslerinin yarım maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri, *in vitro* saflaştırılmış kinazlar kullanılarak ölçüldü.

ER+ meme kanserleri gibi proliferasyon yolu CDK4'e de bağlı olan hücre tiplerinde, abemaciclib, ribociclib ve palbociclib, p21'i CDK4/siklin D1 kompleksinden çıkarır (ancak CDK6/siklin D1'den CDK6'yı değiştirmez) (Pack vd., 2021). Serbest kalan p21 yapısı bunun ardından CDK2/siklin El kompleksine bağlanır ve ardından da CDK2 sinyalininin inhibisyonunu gerçekleştirir. Bu nedenle, CDK4'ün CDK6'ya inhibisyonu oranı, ilaç duyarlılığını ve direncini belirleyebilir (Pack vd., 2021). Spesifik CDK' lere bağımlılık özellikle kanser hücrelerinde, hücre döngüsünde rol alan gen yapılarındaki genetik değişimler tarafından farklılığa uğrayabilir (Goel vd., 2022). Siklin-CDK ağındaki fazlalıklar

ve Siklin-CDK birleşmelerinin esnekliği, CDK4/6 veya CDK2 yapılarının belirli durumlarda proliferasyonu da uyarabileceği manasına gelmektedir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14 Hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişin düzenlenmesi ve CDK4/6 inhibitörlerine karşı oluşan direncin yolları (Johnston vd., 2023'den uyarlanmıştır).

FGFR, HER2- ve EGFR aracılı sinyalleşmelere ve yolaklara; fosfoinositid 3 kinaz (PI3K) yolağı elemanları ve MAPK yolağı elemanları aracılık eder. Bu 2 yolak da Siklin D1'i doğrudan ER sinyali yolu aracılığıyla ve sonuçta da siklin D1-CDK4/6 kompleksini de upregüle ederek düzenler. Siklin D1-CDK4/6 kompleksi, pRB yapısını fosforiller ve bu yoldaki inhibisyonunu kaldırır. Ardından E2F aracılı inhibisyon serbest kalır. pRB'yi daha da fosforile eden siklin E ile CDK2 kompleksinin aktivasyonuna yol açar. Bu da bu hücrelerin S fazında ilerlemesini , ardından da hücrenin çoğalmasını tetikler. Abemaciclib ise bu CDKların dışında, çok küçük miktarda da olsa CDK2 proteinini de inhibe etmektedir. Abemaciclibe

direnç mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir: RAS, PTEN, NF1 gibi upstream efektörlerinin aktivasyonu. Siklin D1 ile CDK4/6'da meydana gelen değişiklik le *RB1* geninde meydana gelen etkisizleştirici mutasyonlar. pRb ekseninde CDK6'nın aşırı ekspresyonunu içerek şekilde değişmesi. Siklin E yapısının aşırı eksprese edilmesi ve CDK2/siklin E kompleksinin aktivasyonu.

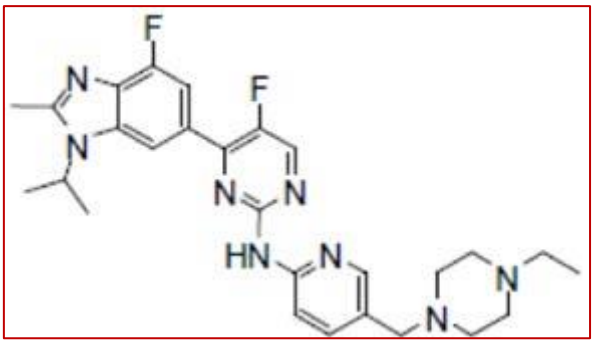
CDK4/6 inhibitörü ajanların HR + ve HER2 - metastatik meme kanserinin tedavisine eklenmesi; meme kanseri tedavisi için büyük bir ilerlemedir. Endokrin tedaviye CDK4/6 inhibitörlerinin eklenmesi; FDA tarafından önerildiği gibi, HR + ve HER2 - metastatik meme kanseri olan tüm klinik ve patolojik alt gruplara fayda sağladığı görsterilmiştir. CDK4/6 inhibitörlerinin kanser tedavisinde yaygın olarak kliniğe girmesi ve HR + ve HER2 - metastatik meme kanserinin en baştaki tedavisinde standart kemoterapi olarak ortaya çıkması şaşırtıcı değildir.

Ticari adı ile VERZENIO yani abemaciclib aşağıdaki durumlarda endikedir (Şekil 1.15):

a-Menopoz sonrası tedavisinde endokrin bazlı başlangıç tedavisi olarak bir aromataz inhibitörü ile kombinasyon halinde hormon reseptörü (HR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatif olan kadınlar ve erkeklerdeki ilerlemiş veya metastatik meme kanseri.

b-Hormon reseptörü (HR)-pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)-negatif ilerlemiş veya metastatik meme kanseri olan ve endokrin tedavisi sonrasında hastalık ilerlemesi gösteren yetişkin hastaların tedavisinde fulvestrant ile kombinasyon halinde.

C- Hormon reseptörü eksprese eden ama HER2 negatif olan malignitesi ilerlemiş veya metastatik olan meme kanseri durumunda; endokrin tedaviyi ve metastatik ortamda önceden kemoterapiyi takiben yine de kanserde ilerleme olan hastaların tedavisinde tek başına terapi ajanı olarak (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/208716s006s007s008lbl.pdf).



Şekil1 1.15. Abemaciclibin kimyasal yapısı (Abemaciclib, 2024).

Meme kanserli hastalarda CDK4/6 inhibitörlerinin optimal kullanımı hakkında öğrenilecek halen çok şey olmakla beraber devam eden bir dizi klinik ve translasyonel çalışma, CDK4/6 inhibisyonuna yanıt ve direnç, tedavi sıralaması ve ilaç sekansının meme kanseri üzerindeki etkisi, kombinasyon stratejileri ve CDK4/6'nın diğer alt tiplerdeki rolü hakkındaki önemli soruların yanıtlanmasına yardımcı olacaktır. Diğer yandan CDK4/6 inhibitörlerinin birçok farklı moleküler yolağı aktifleşmiş farklı meme kanseri alt tiplerinde meme kanseri tedavisinin alternatifi olarak belirleyebilmemize de yol açacaktır.

2
MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Tablo 2.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
+4°C Dolap	Bosch
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	CAPP
-20°C Dolap	Bosch
300 µl 'lik çok kanallı pipetler	CAPP
50 cc şişe	Schott
250 cc şişe	Schott
500 cc şişe	Schott
1000 cc şişe	Schott
1000-5000 µl pipet ucu	Eppendorf
50-1000 µl pipet ucu	Eppendorf
10-200 µl pipet ucu	Eppendorf
0,1-10 µl pipet ucu	Eppendorf

Tablo 2.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
Blotlama cihazı	Thermo Fisher
Buz makinesi	Scotsman AF100
Çalkalayıcı	BioSan
ELISA 96 kuyulu plakları	Nunc
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre)	BioTek Instruments
Güç kaynağı	Thermo Fisher
Hassas terazi	Shimadzu
Hava akımlı kabinler	Hedlab XPROII
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica
Jel Elektroforez Sistemi	Thermo Fisher
Lateks eldiven	Broche
Liyofilizatör	Martin Christ
Manyetik karıştırıcı	Sigma- Aldrich
Masaüstü Santrifüj	Eppendorf
Mini masaüstü santrifüj	LMS Harmony

Tablo 2.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
Otoklav	Hermle
pH metre	Hanna
Pudrasız Eldiven	Broche
Saf Su Cihazı	Sartorius
Santrifüj	Beckman Coulter
Sonikatör	Bandelin Sonoplus
PVDF membran	Thermo
Santrifüj tüpü 0,2 ml	Eppendorf
Santrifüj tüpü 1,5 ml	Eppendorf
Santrifüj tüpü 2 ml	Eppendorf
Sıcak su banyosu	Nüve
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
Tek kullanımlık pipet uçları	Eppendorf
Vorteks	Velp Scientifica

Tablo 2.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
Mini Gel Tank	Thermo Fisher Scientific
XCell SureLock™ Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific
Mini Gel Tank Base	Thermo Fisher Scientific
Empty Gel Cassette Combs, mini, 1.0 mm, 10 well	Thermo Fisher Scientific
Empty Gel Cassette Combs, mini, 1.0 mm, 12 well	Thermo Fisher Scientific
Novex™ Power Supply Adapters	Thermo Fisher Scientific
Power Blotter Station 1 unit	Thermo Fisher Scientific
Power Blotter Cassette 1 cassette	Thermo Fisher Scientific
Power Blotter Select Transfer Stacks, PVDF, mini	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen™ Power Blotter System	Thermo Fisher Scientific
PowerEase™ 90W Power Supply	Thermo Fisher Scientific
SureCast™ Glass Plates	Thermo Fisher Scientific
SureCast™ Sealing Pads	Thermo Fisher Scientific

Tablo 2.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
SureCast™ Gel Spacers	Thermo Fisher Scientific
SureCast™ 10-well Multi-Use Tool	Thermo Fisher Scientific
SureCast™ 12-well Multi-Use Tool	Thermo Fisher Scientific
Gel Runner Tank	Thermo Fisher Scientific
Cassette Clamp (Left)	Thermo Fisher Scientific
Cassette Clamp (Right)	Thermo Fisher Scientific
Mini Gel Tank Lid	Thermo Fisher Scientific

Tablo 2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar.

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
+4°C Dolap	Bosch
0,1-10 ul pipet ucu	Eppendorf
0,22 µm şırınga filtresi	Millipore veya ISOLAB
1 ml enjektör	SET
1,8 ml kriyotüp	VWR veya TPP
10 ml serolojik pipet	NEST
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	CAPP

Tablo 2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
1000 cc şişe	Schott
1000-5000 µl pipet ucu	Eppendorf
10-200 µl pipet ucu	Eppendorf
1-2,5-5-10-50 cc'lik enjektör	Ayset
15 ml falkon	NEST
175 cm2 hücre petrisi	TPP
2 ml serolojik pipet	NEST
-20 Dolap	Bosch
20 ml enjektör	SET
25 cm hücre kazıyıcı	ISOLAB
25 cm2 filtreli hücre petrisi	TPP
250 cc şişe	Schott
30 cm hücre kazıyıcı	TPP
300 µl 'lik çok kanallı pipetler	CAPP
40 cm hücre kazıyıcı	ISOLAB
5 ml serolojik pipet	NEST
50 cc şişe	Schott
50 ml enjektör	SET

Tablo 2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
50 ml falkon	NEST
500 cc şişe	Schott
50-1000 µl pipet ucu	Eppendorf
75 cm^2 filtreli hücre petrisi	NEST
96 kuyucuklu hücre plağı	NEST
Hemasitometre	ISOLAB
Inverted Mikroskop	Olympus

Tablo 2.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Canlı Materyaller.

Hücre Hattı	Üretici Firma
MCF-7	ATCC
MDA-MB-231	ATCC

Tablo 2.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler.

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
Abemaciclib	Selleckchem
Acrylamide	Thermo Fisher
Albumin, Bovine	Sigma
Amonyum PerSülfat	Thermo Fisher
Asetik asit	Merck
Blocker BSA	Thermo Scientific
Bis-N,N'-Methylene Bis-Acrylamide	Thermo Fisher
Cdk2 antikoru	CusaBio
ECL Substrate (Clarity MAX)	Bio Rad
DMEM	Gibco
DMSO	Sigma- Aldrich
Doxorubicin Hydrochloride	Cayman Chemicals
Etanol	Merck
FCS	Gibco
Gentamycin	Gibco

Tablo 2.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
Glacial Asetik Asit	Merck
Glukoz	Sigma
Invitrogen SureCast Acrylamide Solution (40%)	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen SureCast TEMED	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen SureCast™ APS	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen SureCast™ Resolving Buffer	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen SureCast™ Stacking Buffer	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Fisher Scientific
HCl	Merck
KOH	Sigma
Methanol	Merck
NaCl	Sigma
NaOH	Merck

Tablo 2.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı).

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
SDS	Sigma
Skim Milk powder	Fluka
Trisma Base	Sigma
Trypan Blue	Sigma
Tween 20	Sigma
Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo
Tripsin-EDTA	Thermo
Penisilin/Streptomisin	Thermo
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Salt	Sigma

2.2. Metod

***DMEM Hazırlanması**

500 ml full DMEM içeriğini hazırlayabilmek için 50 ml DMEM; DMEM negatif olarak ayrıldı ve kalan 450 ml saf DMEM içerisine 50 ml FBS, 5 ml Penisilin/Streptomisin eklenip ardından filtrelenip 50 ml lik falkonlara her birinde 45 ml hücre büyüme ortamı olacak şekilde bölündü.

***Dondurma Medyumu Hazırlanması**

% 10 FBS, %80 DMEM ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek hazırlandı.

***Bloklama Solüsyonunun Hazırlanması**

%1' lik çözeltinin hazırlanması için 20 ml PBS içerisine 0,2gram yağsız süt tozu eklenip vortekslenerek hazırlandı.

***1X PBS Hazırlanması**

8 gram NaCl, 0.2 gram KCl, 1,44 gram NaH2PO4, 0,24 gram KH2PO4 800 ml ddH2O içerisinde çözdürülür ve pH:7,4' e ayarlanır. Ardından son hacim 1 lt' ye ayarlanır.

***Fosfat tamponu Hazırlanması**

Genel amaçlı kullanılan fosfat tamponunun hazırlanması için 150 mM KH_2PO_4 ve 150 mM K_2HPO_4 çözeltileri hazırlandı. KH_2PO_4 çözeltisinin pH ayarlaması ise K_2HPO_4 ile 7,2 olacak şekilde yapıldı.

***Stripping Buffer Hazırlanması**

67,5 ml ddH2O, 12.5 ml Tris HCl (pH:6,8), 20 ml %10 SDS çözeltisinin karıştırılmasının ardından 600 µL Beta merkaptoetanol eklendi.

***20X Transfer Buffer Hazırlanması**

250 ml, pH:8,3 olan 20X Transfer Buffer hazırlanması için 6.05 g Tris Base ile 37,525 gram Glisin tartıldı. Ardından 200 ml ddH2O eklendi ve pH:8.3 olacak şekilde ayarlanıp son hacim ddH2O ile 250 ml' ye tamamlandı.

***10X Running Buffer Hazırlanması**

pH:8.3 olan 400 ml 10X Running Buffer hazırlayabilmek için 11,6 gram Tris Base, 57,6 gram Glisin ve 0,4 g SDS tartıldı ve 300 ml ddH2O eklendi. Ardından pH:8,3'e ayarlanıp son hacme kadar ddH2O ile tamamlandı.

***10X TBS Hazırlanması**

pH:7,6 olan 500 ml 10X TBS hazırlayabilmek için 12 g Tris Base ile 44 gram NaCl tartıldı. 400 ml ddH2O ekleyip çözündürme ve karıştırma işlemi ardından pH:7.6'ya ayarlandı ve son hacim 500 ml' ye tamamlandı.

***%10 SureCast Amonyum PerSülfat Hazırlanması**

300 mg SureCast APS; 3 ml ddH2O' da çözdürüldü ve her jel dökümünden önce taze hazırlandı.

***SureCast Resolving Buffer Hazırlanması**

Bir paket SureCast™ Resolving Tamponu paketinin içeriği ddH2O'da 500 mL'lik son hacme kadar çözdürüldü.

***SureCast Stacking Buffer Hazırlanması**

Bir paket SureCast™ Stacking Tamponu paketinin içeriği ddH2O'da 500 mL'lik son hacme kadar çözdürüldü.

SDS PAGE jel içeriklerinin hazırlanması:

***Alt (resolving) jel içeriğinin hazırlanması**

Tablo 2.5 SDS PAGE alt jel içeriği.

Alt Jel içeriği	**%10' luk jel**		**%12' lik jel**	
Toplam Hacim	**8 ml**	**16 ml**	**8 ml**	**16 ml**
H_2O	3,9 ml	7,8 ml	3,5 ml	7 ml
%40 SureCastAkrilamid/Bisakrilamid Karışımı	2 ml	8 ml	5 ml	10 ml
SureCast Resolving Buffer	2 ml	4 ml	2 ml	4 ml
%10 Surecast APS	80 µL	160 µL	80 µL	160 µL
TEMED	8 µL	16 µL	8 µL	16 µL

SDS PAGE alt jeli dökülürken bütün çözeltiler sırayla eklendi ve TEMED eklemesi en son gerçekleştirildi. Alt jelin dökülmesinin ardından jel üzerine izopropanol eklendi. Jelin donmasının ardından izopropanolden arındırılıp üst jel döküldü.

Tablo 2.6 SDS PAGE üst jel içeriği.

%4 Üst Jel içeriği	3 ml	6 ml
H_2O	1,92 ml	3,84 ml
%40 Surecast Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	0,3 ml	0,6 ml
SureCast Stacking Buffer pH: 6.8	0,75 ml	1,5 ml
%10 SureCast Amonyum Persülfat	30 µL	60 µL
TEMED	3 µL	6 µL

Hücre Hatlarının Büyütülmesi

MCF-7 (HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) meme kanseri hücre hattı(Dulbecco's Modified Eagle Medium besiyerinde %10 sığır fetüsü serumu (FBS) ve 10 U/ml penisilin/ streptomisin antibiyotik katkısıyla %5 CO2 içeren 37 ^{o}C derecelik inkübatörde büyütüldü. Her gün hücreler kontrol edildi. Hücreler %85' ten fazla konfluensiye ulaştıklarında pasajlandı. Bu amaçla PBS ile yıkamanın ardından T25' lere 1 ml, T75 hücre büyütme kaplarına ise 2 ml tripsin eklendi. İnkübatörde 3 dakika inkübasyonun ardından eklenen tripsinin 2 katı kadar besiyeri eklenip kalkan hücreler falkonda toplandı. 5 dakika boyunca 1000 rpm' de santrifüjlenen hücreler ardından uygun miktarda besiyerine alındıktan sonra örnekten 10 µl alınarak Thoma lamında sayıldı. Sayımın ardından hücreler ardından yapılacak deneyler ve şartlara göre uygun hücre büyütme kaplarına (6'lık plakalar, 96'lık plakalar, T25 ve T75' lere) alındı(https://www.atcc.org/~/media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx).

Dondurulmuş Hücrelerin Açılması

-196ºC'de sıvı azot tanklarındaki dondurulmuş hücreler; 37 ºC'de çözülerek üzerine önceden hazırlanmış uygun sıcaklıktaki PBS' in eklenmesinin ardından santrifüj tüplerine alındı. 1000 rpm' de 7 dakika tüpler santrifüj edildi. Ardından çöken hücreler %10 FBS içeren hücre besi yeri ile birlikte T25 içerisindeki hücre kültürü ortamına alındı.

Hücrelerin Sayımı

PBS yardımı ile yıkanan ve belli bir hacimde steril santrifüj tüpünde mevcut olan hücrelerden mikro pipet yardımı ile 10-20 µl alındı. 1:1 oranında tripan blue ile seyreltme ardından hemositometreye dikkatlice konularak 25 kareye düşen hücre miktarı sayıldı. 104 X hücre hacmi (ml) X sayılan hücre miktarı kullanılarak hücre sayısı hesaplandı ve ardından uygulamaları yapıldı.

MTT Hücre Canlılık Testi

MCF-7 ve MDAMB-231 hücrelerinin %5 CO2 içeren 37ºC'de nemli inkübatörde büyütülmesinin ardından, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol–2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromür) testi uygulanarak abemaciclib ve doksorubisinin (herbirinin stok konsantrasyon 1 mM) değişik konsantrasyonlarda zamana bağlı sitotoksik etkisi bu hücre hattında gösterildi. $1x10^4$ hücre/kuyu/96 kuyucuklu petri kaplarında ekildikten sonra gece boyunca yapışmaları beklendi ve ardından hücreler 0- 5µM Dox ve 0- 5µM Abemaciclib doz aralıklarında ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edildi. https://www.cancerrxgene.org/compound/Doxorubicin/133/overview/lc5050), (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/208855s000lbl.pdf). 10 µl MTT tetrazolium tuzu (3-(4,5-dimethylthiazol–2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromür) eklendikten sonra 4 saat 37 °C' de %5 CO2'li inkübatörde bekletildi. Bu süre süre sonunda MTT çözeltisi (son konsantrasyon, 5 mg/ml) çekildi ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Petri, spektrofotometrede okutulmadan önce 5 dakika karanlıkta bekletildi. Örneklerin spektrofotometrik okuma sonucundan (Abs 570 nm), ilaç uygulanmamış kontrol örneklere göre oranlama yapılarak abemaciclib ve doksorubisinin bağıl hücre canlılığına etkisi belirlendi. Yapılan her deney en az 3 defa tekrar edecek şekilde gerçekleştirildi. Analizleri GraphPad V10 da yapıldı.

Kombine İlaç Etkisinin Ölçülmesi:

DOX ve ABE'nin kombinasyon etkisini göstermek amacıyla CompuSyn ve ComBenefit yazılımlarından yararlanıldı. Her iki kombinasyon yazılımı için kullanılan MTT deneylerinde doz tepki kareleri oluşturularak deney tasarımları yapıldı.

İlaç sinerjisini belirlemek için en başta, ComboSyn yazılımı kullanmıştır. Bu yazılımın temel prensibi Chou ve Talalay'ın ortanca etki prensibinden yola çıkarak oluşturulan kombinasyon indeksi metodu yoluyla yapılan değerlendirmelerdir (Chou TC., 2010). MTT deneylerinden elde edilen veriler; DOX, ABE ve her iki ajan için elde edilen verilerden yola çıkarak deney tasarımları yapıldı. IC50 değeri, kombinasyon indeksi (CI) ve doz azaltma indeksi (DRI) değerlerinin hesaplanmasında CalcuSyn yazılımı kullanıldı (Combo Syn, Inc., Paramus, NJ, ABD). Combo Syn yazılımındaki analizin sonucunda ortaya çıkan; 1'den küçük olan kombinasyon indeksi değerleri sinerjistik olan etkiyi göstermektedir. Yine yazılımdaki hesaplamalar sonucunda ortaya çıkan değerin 1'e eşit bir kombinasyon indeksi göstermesi ilave bir etkiyi gösterirken; kombinasyon indeksi değerinin (CI) 1'den büyük olması ise antagonizmi simgeler. Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesinin ardından uygun dozda ilaç kombinasyonları MDA-MB-231 hücrelerine uygulandı.

İkinci olarak ise, doz tepki karesi metoduyla oluşturulan kombinasyon denemeleri sonucunda MTT testinden elde edilen hücre canlılığı ve proliferasyon değerleri kullanılarak, bu maddelerin sinerjistik, antagonistik veya aditif etkileri Combenefit yazılımı (Cambridge, UK) kullanılarak belirlendi. Combenefit programında sinerji ve antagonizm etkilerini eş zamanlı olarak değerlendiren Bliss modeli kullanılarak sonuçlar analiz edildi. Combenefit yazılımı MDA-MB-231 hücrelerinde her bir ilaç ve doz tepki karesi için seçilen kombinasyon dozlarının her biri için bir sinerji skoru hesapladı. Combenefit yazılımında elde edilen pozitif bir skorlama iki ilacın sinerjisini göstermektedir. Yine Combenefit yazılımında elde edilen 0 skorlaması ise aditif etkiyi ve 0'dan küçük olan bir skorlama ise antagonizmi simgelemektedir. 'Kontur' ve 'matriks' görünümlerinde, sinerji/antagonizm dağılımı için elde edilen grafikler değerlendirildi. Bu grafikte, en önemli görülen sinerjiler yeşil mavi renklerle gösterilmekte ve sinerji skorları 25-50'nin üzerinde olan alanlar işaretlenmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda Combenefit yazılımı ile elde edilen

tüm veriler bir arada değerlendirilerek DOX ve ABE için hem tekli hem de kombine uygulamalarında kullanılacak dozlara karar verildi. Sonuçta, MDA-MB-231 hücre hattında CompuSyn ve ComBenefit yazılımları aracılığıyla belirlenen DOX ve ABE kombine olarak uygulamasına ait en belirgin sinerjistik etkiyi gösteren dozların yapılacak moleküler çalışmalarda kullanılması uygun görüldü. Combenefit yazılımı sonuçları, Chou ve Talalay'ın ortanca etki prensibinden türetilen kombinasyon indeks metodu ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Colony Forming Assay

Deney Franken ve ark., 2006 yayınına göre yapıldı. Deney 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve 14 gün sonunda oluşan koloniler +4 ºC'de MetOH ile sabitlendi, kristal viyole (%0,5) ile boyandı ve koloni sayımı Image J ile gerçekleştirilirken; MDA-MB-231 kanser hücrelerinde ilaç uygulamaları ile değişen Koloni Sayıları ve Rölatif Koloni Oluşturma Etkinlikleri(RCFE)'nin istatistiki değerlendirmesi Graphpad Prism V10 ile yapıldı.

Floresan Mikroskopisi

1x105 hücre/ kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere (TPP, Sweden) ekilen MDA-MB-231 hücrelerinin yapışması için uygun inkübasyon koşullarında 24 saat boyunca büyütülüp 24 saat ardından MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat boyunca 0.1 µM DOX, 0.5 µM ABE ve 0.025 µM DOX ile 0.25 µM ABE kombinasyonu 24 saat boyunca uygulandı. uygulandı. Dioc-6 (Invitrogen-USA) ve PI (Applichem,USA) belirlenen kuyulara karanlıkta uygulandı ve spesifik substratlarına bağlanacakları uygun zamana kadar karanlıkta % 5 CO2 içeren 37ºC'de nemli inkübatörde inkübe edildi. (PI (propidium iyodür) için 30 dakika, Dioc-6 (3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide) için 15 dakika, inkübasyon gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler ışık ve floresan mikroskobunda (ZEISS AxioVert01)'te 4x, 10x,20x ve 40x büyütme ile görüntülendi.

Oksidatif Stres Tayini

DOXun kinon kısmı semikinon serbest radikalini oluşturmaktadır ve bu da hipoksik ortamda kanser hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olabilmektedir. Aerobik şartlarda semikinon radikalleri süperoksit anyon radikalleri oluşturmakta ve bu radikaller hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüşüp DNA, RNA, yağ ve proteinlere hücrede direkt olarak hasar vermektedir (Dam, 2013).

Uygulayacağımız ABE ile DOXun bu etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinde nasıl değişeceği oksidatif stres tayini deneylerinde gözlemlendi.

Bu amaçla; MDA-MB-231 hücrelerinde değişen oksidatif stress belirteçlerinden peroksidasyon son ürünü olan MDA ve SOD ile antioksidan GSH aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Bu aşamada öncelikle hücre lizatları elde edildi. Bu amaçla MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat için belirlenmiş olan DOX, ABE ile DOX+ABE IC50 dozları uygulandı. İzolasyonun hemen öncesi ilaç ygulaması yapılan grupların üst sıvısındaki hücreleri de kazanabilmek amacıyla öncelikle bu gruplarda besiyerleri de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından hücrelerin besiyeri çekilip tripsin-EDTA eklerek yapışan hücreler kaldırıldı. Kalkan hücreler 15ml' lik falkonlara alınarak üzerlerine 5ml PBS eklendi. Pipetaj ve vortex süreçleri ardından +4 ºC' de 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantı atılarak pelletlere 1'er ml PBS eklenerek elde edilen lizatlar -80°C'de muhafaza edildi.

MDA-MB-231 hücrelerinde DOX, ABE ve DOX+ABE uygulaması ile değişen oksidatif stresi göstermek için kullanılan yukarıdaki paremetrelerin birim miktar ölçülerini göstermek için hücre lizatlarından protein miktar tayini Lowry yöntemi ile yapıldı. Örnekler 500-700 nm aralığında spektrofotometrik olarak tayin edildi. Ölçümler bovin serum albumin ile hazırlanmış standartlara göre hesaplandı. SOD aktivitesinin ölçümünde, Sun'un metodu kullanıldı. Kontrol grubu, DOX grubu,ABE grubu ve DOX+ABE uygulanan hücrelerden elde edilen lizatlardan her bir örnek üzerine 2900 ml reaktif karışımı, 50 µl ksantin oksidaz eklendi. Kör olarak kullanılan tüpe 1425 ml reaktif karısımı, 50 µl distile su ve 25 µl ksantin oksidaz eklendi ve ardından tüm örnekler 25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 0,5 ml CuCl2 eklenip 560 nm' de distile suya karsı absorbans ölçüldü. 1 ünitelik aktivitenin %50 inhibisyon yaptığı düşünülerek hesaplama yapıldı. Aktivite Lowry yöntemiyle elde edilen proteine göre ünite/mg protein olarak hesaplandı.

Redükte Glutatyon düzeyinin Tayini: DTNB ile yapılacaktır (Shetab-Boushehri SV, 2018). Bu yöntem, hafif alkali ortamda, 5,5 dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman reaktifi), örneklerdeki alifatik tiyol bileşiklerle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan, p-nitrofenol anyonunun miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. MDAMB-231 lizatından 0.2 ml örnek, 0.1 ml distile su, 0.3 ml fosfat tamponu, 2.4 ml Ellman

reaktifi konulup karıştırılarak, 410 nm' de kör tüpüne karsı, absorbans ölçüldü. Bu değerlerin µg GSH karşılıkları belirli miktarlarda (5, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 30 mg) GSH içeren çözeltilerin 412 nm' deki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla 3 kez tekrarlanan deneylere ait ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı ve farklı örneklerin GSH içeriği protein derişimleri de hesaba katılarak mgGSH/mg protein cinsinden ifade edildi ve histogramda karşılaştırıldı.

Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini: TBARS yöntemi ile yapıldı (Hasanzadeh vd, 2017). TBARS için öncelikle; 1 ml TBA reaktifi [0.25 M HCl; %15 (w/v) trikloroasetik asit (TCA); %0.375 (w/v) tiyobarbitürik asit (TBA)] ile karıştırıldı. Bütün örneklerin üzerine bu karışım eklendikten sonra 15 dakika kaynar su banyosunda örnekler inkübasyona bırakıldı. Sıvı fazın absorbansı 1 ml TBA reaktifi ve 0.5 ml distile deiyonize sudan oluşan kör örnek kullanılarak, 535 nm dalga boyunda ölçüldü. Örneklerin TBARS içeriği belirli miktarlarda (0,82; 1,23; 1,64; 2,46; 3,28 µg) malondialdehit (MDA, 1,1,3,3-tetrametoksipropan) içeren çözeltilerin deney sonundaki absorbans değerlerine göre çizilen standart grafik yardımıyla hesaplandı.

GSH Düzeylerinin Belirlenmesi: GSH aktivite ölçümüyle yapıldı. Bu amaçla 200 µL hücre lizatına 300 µL proteinsizleştirme çözeltisi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 2000 g'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatantlardan 50 µL alınarak kuyucuklara koyulur. Üzerlerine 200 µL fosfat çözeltisi ve 25 µL Ellman reaktifi eklendi. ELISA Reader ile 412 nm' de absorbans değerleri ölçüldü. Örneklerdeki redükte glutatyon miktarları standart eğri grafiği kullanılarak µg glutatyon cinsinden bulundu.

Antioksidan düzeyi ölçümü gerçekleştirilen tüm deneylerin analizi GraphPad Prism V10 ile yapıldı.

Western Blot

MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat boyunca 0.1 µM DOX, 0.5 µM ABE ve 0.025 µM DOX ile 0.25 µM ABE kombinasyonu uygulandı. Daha sonra hücreler buzda tutulan 1X PBS ile yıkandı ve ekildiği plaklardan kazınarak veya tripsinle kaldırıldı. Üst sıvıların santrifüjü ardından pellet üzerine RIPA (Biosolution,Kore) ve proteaz inhibitörü kokteyli (Thermo Fisher,USA) karışımı ile muamele gerçekleştirildi. Lizis işleminin ardından elde edilen hücreler 15 dakikalık işlem sürecinde 13200

rpm' de santrifüj edildi. Kontrol grubu, 0.1 µM DOX, 0.5 µM ABE ve 0.025 µM DOX uygulanan lizat gruplarındaki toplam protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile tayin edildi. Bradford yöntemi ile Bovine Serum Albumin standartları üzerinden çizilen standart grafiğe göre proteinlerin miktarları ölçüldü (Biorad, Bradford çözeltisi) ve total protein özütlerinin miktarı 595 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak tespit edildi.

Ardından Mini Gel Tank and Blot Module sisteminde SureCast Handcast Sistemine (Thermo Fisher,USA) %12'lik SDS-PAGE jel dökülerek toplamda 30 µg toplam protein yüklemesi yapıldı. 125V'ta 90 dk protein yürütmesi gerçekleştirildi. Transfer Semi Dry olarak Thermo Power Blotterde 1 saat boyunca 1.3 A 25V' ta PVDF membrana (Roche, USA) yapıldı.

Tris tamponuyla membranların yıkanmasının ardından %5 yağsız süt (%95 TBS+%5 Nonfat Milk) ile bloklandı ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Hemen ardından 5 dk boyunca TBS-T yıkaması gerçekleştirildi ve sırasıyla 1:1000 dilüe edilmiş cleaved Caspase 3 (CST, USA), PARP (CST, USA), Cleaved PARP (CST, USA), Bax (CST, USA), Cdk2(Cusabio,USA) ve β-aktin (CST, USA) antikorlarıyla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranların 3 kere TBS-T ile yıkanmasının ardından yaban turpu peroksidazı ile (HRP)-konjuge sekonder antikorlar (anti tavşan IgG veya anti-fare IgG (CST, USA) ile 1 saat inkübe edildi. 3 kez TBS-T,1 kez TBS ile yıkama ardından membranlar Lumi-LightPLUS Western Blot substratı,Roche, ABD) ile muamele edildi ve Hyperfilm-ECL' ye (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Almanya) maruz bırakıldı. Tüm proteinlerin ekspresyon seviyeleri yükleme kontrolü β-aktin temel alınarak görüntülerin Image J analizi ile beraber 3 tekrarlı deneylerin istatistiği GraphPad Prism V10 ile gerçekleştirildi.

İstatistiki Analizler

Her deney 3, farklı biyolojik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Biyolojik tekrarlar, tekrarlanan deneylere ait ölçüm arasındaki farklar deney sonuçlarının matematiksel ortalaması alındıktan sonra ifade edildi ve standart sapma değeri ile birlikte sunuldu. Her ajanın IC50'si ve kombine ajanların sinerjik sitotoksik etkileri, Biosoft CalcuSyn 2.1 ve ComBenefit yazılımı kullanılarak belirlendi. Farklı ilaç grupları üzerindeki etkilerin analizi ANOVA ile yapıldı ve ardından Dunnet'in

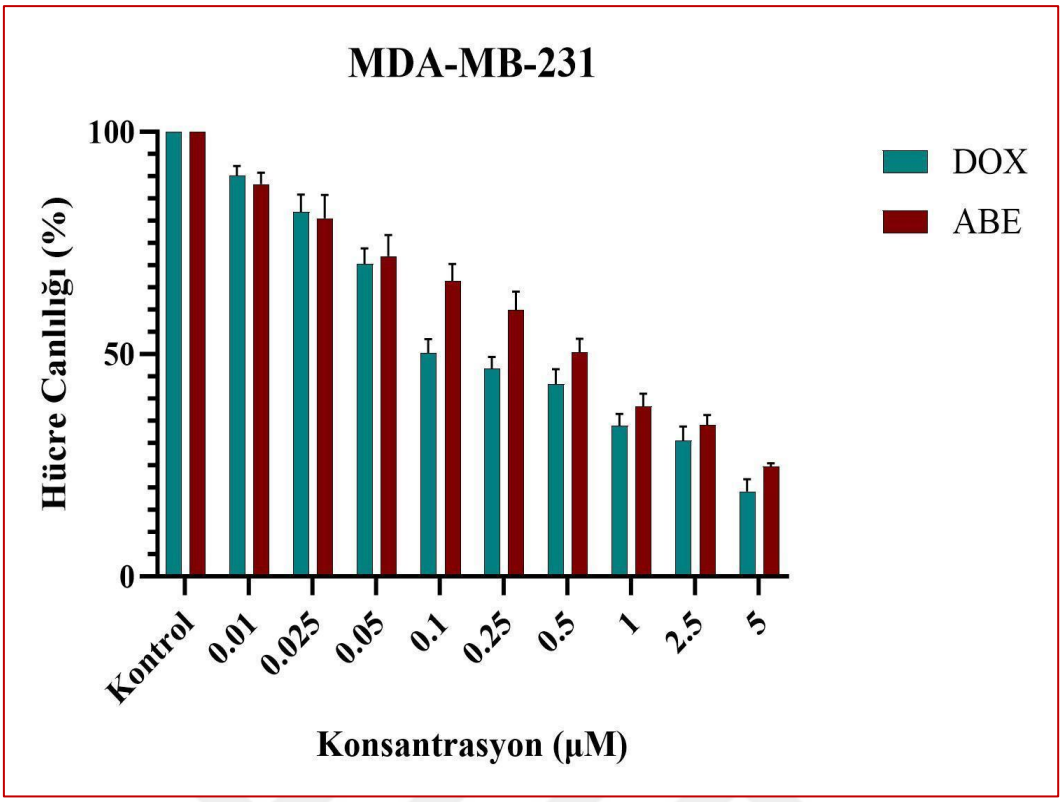
çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Yapılan her bir istatiksel analizde P değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı kabul edilmiş ve tüm istatistiksel işlemlerde GraphPad Prism V10’dan yararlanılmıştır.

3
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Abemaciclib ve Doxorubicin tek tek ve kombine uygulaması MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında doza bağlı olarak sağkalımı etkiler

Abemaciclib ve Doxorubicin uygulamasının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında sağkalımı üzerine etkilerini araştırmak için MDA-MB-231 hücre hattına DOX ajanının 0.01 µM ile 5 µM arasında, ABE ajanının 0.01 µM ile 5 µM dozları arasında değişen konsantrasyonları; MCF-7 hücre hattına DOX ajanının 0.001 µM ile 2 µM arasında, ABE ajanının 0.00025 µM ile 1 µM dozları arasında değişen konsantrasyonları eklenmiş ve MTT sağkalım testi uygulanmıştır. Her hücre hattının, her ilaç ile belirli konsantrasyonda muamele edilen ve 4 kuyucukta büyütülen hücrelerin 4 farklı deneyinden elde edilen 16 ölçümün ortalaması standart sapmaları ve kontrol hücrelerine oranları Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Doxorubicin ajanı için, farklı denemede ve her bir deneme için 4 kuyucukta büyütülen MDA-MB-231 hücre hattında yapılan 16 ölçümün ortalama değerleri ve standart sapmaları; herhangi bir ajan uygulamasına maruz kalmayan kontrol hücrelerinde 0,812 (±0,054), 0,01 µM DOX uygulamasında 0,732 (±0,038), 0,025 µM DOX uygulamasında 0,666 (±0,059), 0,05 µM DOX uygulamasında 0,570 (±0,041), 0,1 µM DOX uygulamasında 0,408 (±0,041), 0,25 µM DOX uygulamasında 0,380 (±0,046), 0,5 µM DOX uygulamasında 0,352 (±0,042), 1 µM DOX uygulamasında 0,275 (±0,038), 2,5 µM DOX uygulamasında 0,248 (±0,035) ve son olarak da 5 µM DOX uygulamasında 0,156 (±0,028) olarak belirlenmiştir. Bu Absorbance değerlerinin, kontrol ölçümüne yüzdesel olarak ifadeleri ise, sırası ile, %90,13, %81,98, %70,26, %50,27, %46,81, %43,28, %33,84, %30,52 ve %19,16 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.1).



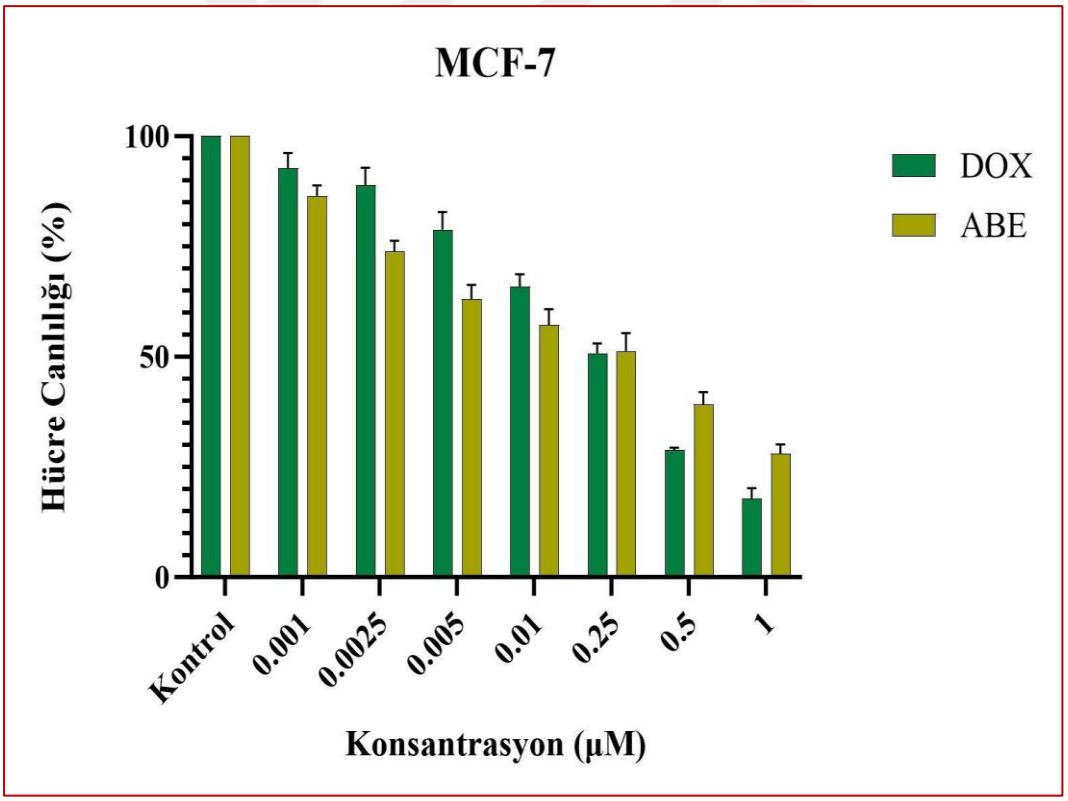
Şekil 3.1 DOX ve ABE uygulamasının doza bağlı olarak MDA-MB-231 hücre hattının sağkalımı üzerindeki etkilerini incelemek için MTT Hücre Canlılık Testi uygulanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattının belirtilen konsantrasyonlarda (a) DOX ve (b) ABE ajanları ile ayrı ayrı muamele edilmesinin etkileri grafikte sunulmuştur. Grafikteki veriler; 4 ölçümün (n = 4) ortalama değerleri dikkate alınarak ve standart sapmada hesaba katılarak sunulmuştur.

Abemaciclib ajanı için, farklı denemede ve her bir deneme için 4 kuyucukta büyütülen MDA-MB-231 hücre hattında yapılan 16 ölçümün ortalama değerleri ve standart sapmaları; herhangi bir ajan uygulamasına maruz kalmayan kontrol hücrelerinde 0 µM ABE uygulamasında 0,843 (±0,031), 0,01 µM ABE uygulamasında 0,744 (±0,036), 0,025 µM ABE uygulamasında 0,679 (±0,045), 0,05 µM ABE uygulamasında 0,607 (±0,051), 0,1 µM ABE uygulamasında 0,560 (±0,045), 0,25 µM ABE uygulamasında 0,505 (±0,047), 0,5 µM ABE uygulamasında 0,425 (±0,042), 1 µM ABE uygulamasında 0,323 (±0,038), 2,5 µM ABE uygulamasında 0,287 (±0,037) ve son olarak da 5 µM ABE uygulamasında 0,208 (±0,012). Bu Absorbance değerlerinin, kontrol ölçümüne yüzdesel olarak ifadeleri ise, sırası ile, %88,22, %80,51, %71,98, %66,36, %59,86, %50,42, %38,26, %34,01 ve %24,68 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.1).

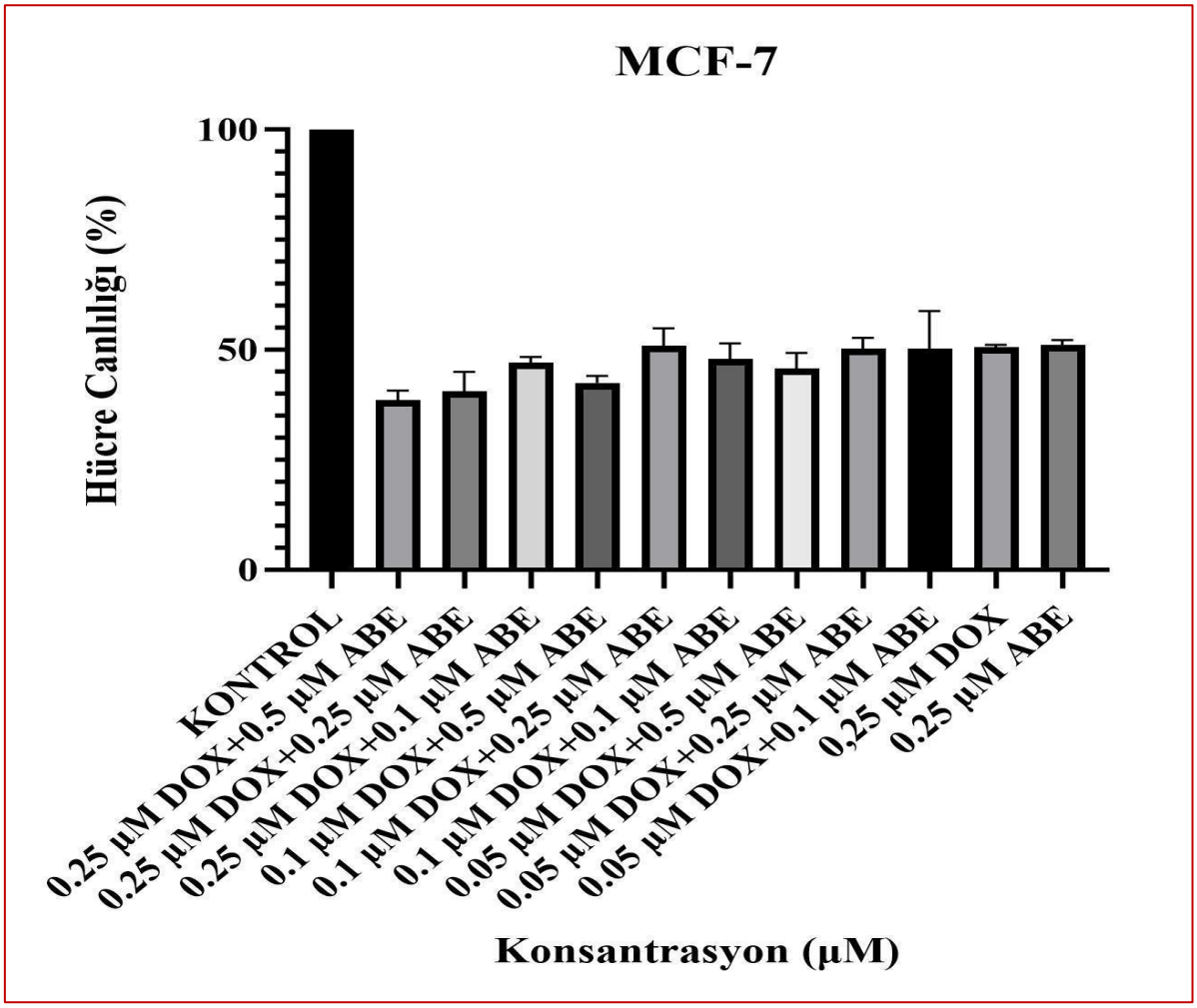
Analizlerimizde, DOX ya da ABE ajanlarının ikisi de eklenmemiş kontrol hücrelerine göre karşılaştırıldığında, 0.1 µM DOX ve 0.5 µM ABE

konsantrasyonları IC50 olarak da ifade edilen, MDA-MB-231 hücre hattının sağkalımı üzerinde %50 etkisinin olduğunu konsantrasyonlar olarak değerlendirilmiştir ($P < 0,05$) (Şekil 3.1).

Doxorubicin ajanı için, farklı denemede ve her bir deneme için 4 kuyucukta büyütülen MCF-7 hücre hattında yapılan 16 ölçümün ortalama değerleri ve standart sapmaları; herhangi bir ajan uygulamasına maruz kalmayan kontrol hücrelerinde 0,867 (±0,029), 0,001 µM DOX uygulamasında 0,749 (±0,029), 0,0025 µM DOX uygulamasında 0,640 (±0,039), 0,005 µM DOX uygulamasında 0,546 (±0,046), 0,01 µM DOX uygulamasında 0,496 (±0,045), 0,25 µM DOX uygulamasında 0,445 (±0,043), 0,5 µM DOX uygulamasında 0,340 (±0,056), 1 µM DOX uygulamasında 0,243 (±0,035), ve son olarak da 2 µM DOX uygulamasında 0,162 (±0,034) olarak belirlenmiştir. Bu Absorbance değerlerinin, kontrol ölçümüne yüzdesel olarak ifadeleri ise, sırası ile, %86,46, %73,89, %63,04, %57,23, %51,33, %39,23, %28,02 ve %18,76 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 DOX ve ABE uygulamasının doza bağlı olarak MCF-7 hücre hattının sağkalımı üzerindeki etkilerini incelemek için MTT Hücre Canlılık Testi uygulanmıştır. MCF-7 hücre hattının belirtilen konsantrasyonlarda (a) DOX ve (b) ABE ajanları ile ayrı ayrı muamele edilmesinin etkileri grafikte sunulmuştur. Grafikteki veriler; 4 ölçümün (n = 4) ortalama değerleri dikkate alınarak ve standart sapmada hesaba katılarak sunulmuştur.



Şekil 3.3 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının kombinasyon kullanımı ile meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanılarak uygulanmış MTT Hücre Sağkalım Analiz sonuçları. MCF-7 hücreleri 0.25 µM DOX ve 0.25 µM ABE ile tek başına ve değişen DOX + ABE kombinasyon konsantrasyonlarında (0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0,5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.1 µM ABE, 0.25 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.25 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.25 µM DOX + 0.1 µM ABE) 4 farklı denemede ve 4 tekrarlı olarak kuyucuklarda 24 saat inkübe edildiğinde hücrelerin sağkalımlarında doza bağlı olan istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Grafik sunumunda 4 farklı analizde 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilen toplam 16 ölçüm ortalaması ve standart sapmalar kullanılmıştır.

Abemaciclib ajanı için, farklı denemede ve her bir deneme için 4 kuyucukta büyütülen MCF-7 hücre hattında yapılan 16 ölçümün ortalama değerleri ve standart sapmaları; herhangi bir ajan uygulamasına maruz kalmayan kontrol hücrelerinde 0,824 (±0,039), 0,00025 µM DOX uygulamasında 0,787 (±0,041), 0,0005 µM DOX uygulamasında 0,783 (±0,056), 0,001 µM DOX uygulamasında 0,764 (±0,051), 0,0025 µM DOX uygulamasında 0,732 (±0,024), 0,005 µM DOX uygulamasında 0,649 (±0,047), 0,01 µM DOX uygulamasında 0,542 (±0,032), 0,25 µM DOX uygulamasında 0,418 (±0,029), 0,5 µM DOX uygulamasında 0,237 (±0,024) ve son olarak da 1 µM DOX uygulamasında 0,146 (±0,034) olarak belirlenmiştir. Bu Absorbance değerlerinin, kontrol ölçümüne yüzdesel olarak ifadeleri ise, sırası ile, %95,56, %95,04, %92,80, %88,98, %78,81, %65,87, %50,76, %28,80 ve %17,75 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.3).

Analizlerimizde, DOX ya da ABE ajanlarının ikisi de eklenmemiş kontrol hücrelerine göre karşılaştırıldığında, 0.25 µM DOX ve 0.25 µM ABE konsantrasyonları IC50 olarak da ifade edilen, MCF-7 hücre hattının sağkalımı üzerinde %50 etkisinin olduğunu konsantrasyonlar olarak değerlendirilmiştir ($P < 0,05$) (Şekil 3.3).

Tablo 3.1 MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin değişken konsantrasyonlarda Doxorubicin ve Abemaciclib ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre sağkalım değerleri.

(a) MDA-MB-231 hücrelerinin Doxorubicin ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre sağkalım değerleri.

	Doxorubicin Konsantrasyonu (µM)									
	0	**0,01**	**0,025**	**0,05**	**0,1**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2,5**	**5**
Ortalama	0,812	0,732	0,666	0,570	0,408	0,380	0,352	0,275	0,248	0,156
Standart Sapma	0,054	0,038	0,059	0,041	0,041	0,046	0,042	0,038	0,035	0,028
Yüzde	100,00	90,13	81,97	70,26	50,27	46,81	43,28	33,84	30,52	19,16

Tablo 3. 1 (b) MDA-MB-231 hücrelerinin Abemaciclib ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre sağkalım değerleri.

	Abemaciclib Konsantrasyonu (µM)									
	0	**0,01**	**0,025**	**0,05**	**0,1**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2,5**	**5**
Ortalama	0,843	0,744	0,679	0,607	0,560	0,505	0,425	0,323	0,287	0,208
Standart Sapma	0,031	0,036	0,045	0,051	0,045	0,047	0,042	0,038	0,037	0,012
Yüzde	%100	%88,22	%80,51	%71,98	%66,36	%59,86	%50,42	%38,26	%34,01	%24,68

Tablo 3. 1. (c) MCF-7 hücrelerinin Doxorubicin ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre sağkalım değerleri.

	Doxorubicin Konsantrasyonu (µM)								
	0	**0,001**	**0,0025**	**0,005**	**0,01**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**
Ortalama	0,867	0,749	0,640	0,546	0,496	0,445	0,340	0,243	0,162
Standart Sapma	0,029	0,029	0,039	0,046	0,045	0,043	0,056	0,035	0,034
Yüzde	%100	%86.46	%73.89	%63.04	%57.23	%51.33	%39.23	%28.02	%18.76

Tablo 3. 1 (d) MCF-7 hücrelerinin Abemaciclib ile muamelesi sonucunda elde edilen hücre sağkalım değerleri.

	Abemaciclib Konsantrasyonu (µM)									
	0	**0,00025**	**0,0005**	**0,001**	**0,0025**	**0,005**	**0,01**	**0,25**	**0,5**	**1**
Ortalama	0,824	0,787	0,783	0,764	0,732	0,649	0,542	0,418	0,237	0,146
Standart Sapma	0,039	0,041	0,056	0,051	0,024	0,047	0,032	0,029	0,024	0,034
Yüzde	%100	%95.56	%95.04	%92.80	%88.98	%78.81	%65.87	%50.76	%28.80	%17.75

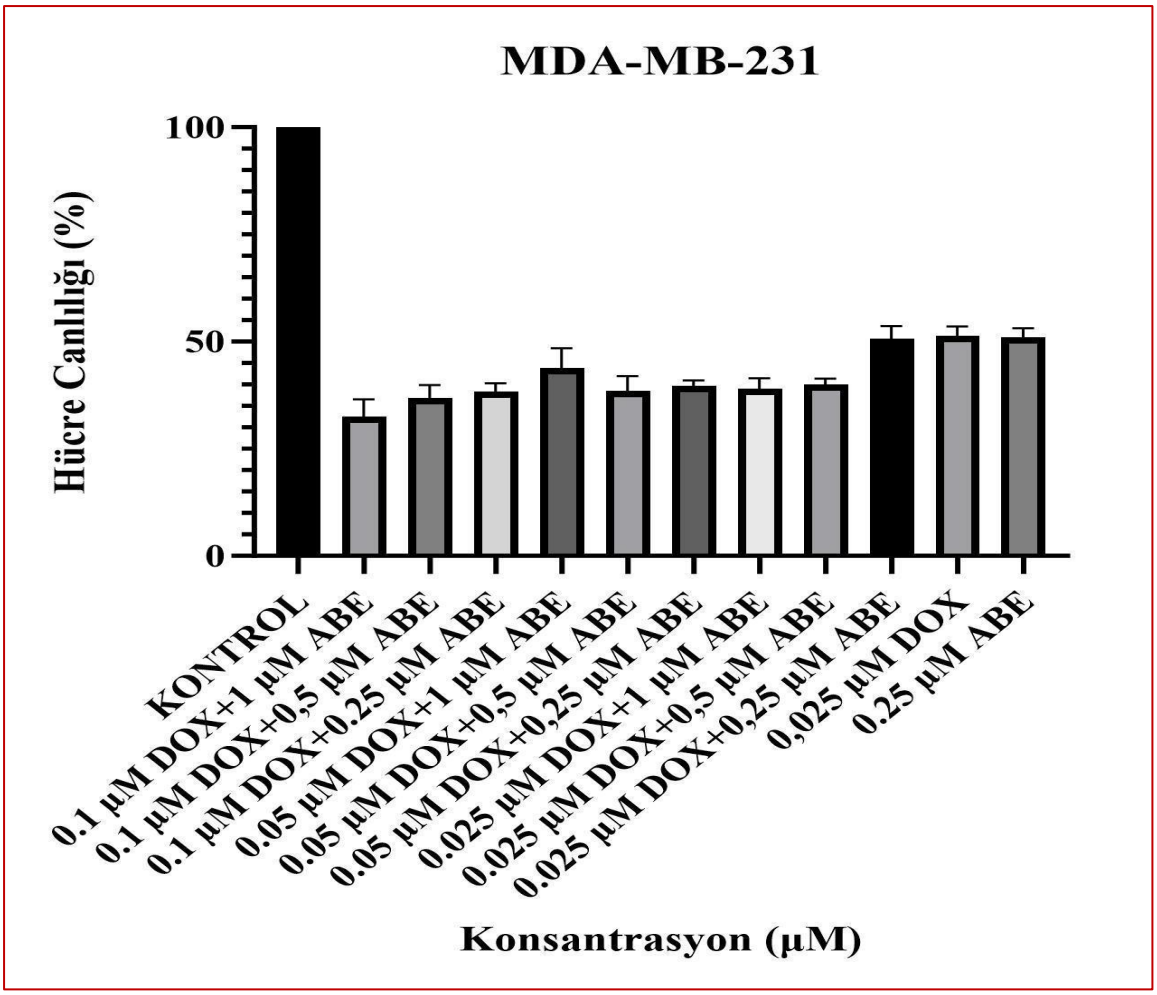
ABE ve DOX ajanlarının MDA-MB-231 hücre hattına birleşik (kombinasyon terapisi) uygulaması, bu iki ajanın hücre hattı üzerinde sinerjik etki gösterdikleri yönünde veriler sunmaktadır. ABE ve DOX ajanları için IC50 dozlarını belirledikten sonra, CompuSyn ve ComBenefit programlarını kullanarak bu ajanların teker teker uygulamalarından elde edilen verileri kullanarak kombinasyon terapisinde maksimum sinerjik etkiyi almak için kullanılacakları optimal dozları belirledik. Bu amaçla ABE ve DOX ajanları 0.1 µM Doxorubicin (DOX), 0.5 µM Abemaciclib (ABE) teker teker, ve 0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 1 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyonları şeklinde ve 0.025 µM DOX ve 0.25 µM ABE teker teker uygulanmıştır (Tablo 3.2).

Herhangi bir ajan eklemesi olmaksızın büyütülen MDA-MD-231 hücreleri için gerçekleştirilen 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 1.148 (± 0.079) dur. 0.1 µM DOX + 1 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.373 (± 0.059) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %32.466 olarak hesaplanmıştır. 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen

Absorbans ortalaması 0.424 (± 0.048) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %36.911 olarak hesaplanmıştır. 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.440 (± 0.035) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %38.378 olarak hesaplanmıştır. 0.05 µM DOX + 1 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.500 (± 0.031) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %43.754 olarak hesaplanmıştır. 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.442 (± 0.058) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %38.480 olarak hesaplanmıştır. 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.456 (± 0.041) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %39.706 olarak hesaplanmıştır. 0.025 µM DOX + 1 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.449 (± 0.044) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %39.073 olarak hesaplanmıştır. 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.459 (± 0.044) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %39.946 olarak hesaplanmıştır. 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon konsantrasyonları ile büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.581 (± 0.047) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %50.691 olarak hesaplanmıştır. 0.025 µM DOX tekil uygulamasında büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.588 (± 0.045) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %51.286 olarak hesaplanmıştır. Son olarak, 0.25 µM ABE tekil uygulamasında büyütülen hücreler için 4 deneydeki 4 ölçümden elde edilen Absorbans ortalaması 0.586 (± 0.046) olmuştur, bu da kontrol hücrelerine yüzde olarak belirtildiğinde %51.068 olarak hesaplanmıştır. Tüm bu değerler kullanılarak Şekil 3.4'teki grafik elde edilmiştir.

Tablo 3.2 Kombinasyon terapisi sonucunda elde edilen Absorbance ortalamaları, standart sapmalar ve her kombinasyon için herhangi bir ajanın kullanılmadığı kontrol hücrelerinin büyüme değerine yüzdelik oranları.

	Kontrol	**0.1 µM DOX +1 µM ABE**	**0.1 µM DOX +0.5 µM ABE**	**0.1 µM DOX +0.25 µM ABE**	**0.05 µM DOX +1 µM ABE**	**0.05 µM DOX +0.5 µM ABE**	**0.05 µM DOX +0.25 µM ABE**	**0.025 µM DOX +1 µM ABE**	**0.025 µM DOX +0.5 µM ABE**	**0.025 µM DOX +0.25 µM ABE**	**0,025 µM DOX**	**0.25 µM Abe**
Absorbans ortalaması	1.148	0.373	0.424	0.440	0.500	0.442	0.456	0.449	0.459	0.581	0.588	0.586
Standart Sapma	0.079	0.059	0.048	0.035	0.031	0.058	0.041	0.044	0.044	0.047	0.045	0.046
Kontrole göre yüzde	%100.00	%32.466	%36.911	%38.378	%43.754	%38.480	%39.706	%39.073	%39.946	%50.691	%51.286	%51.068

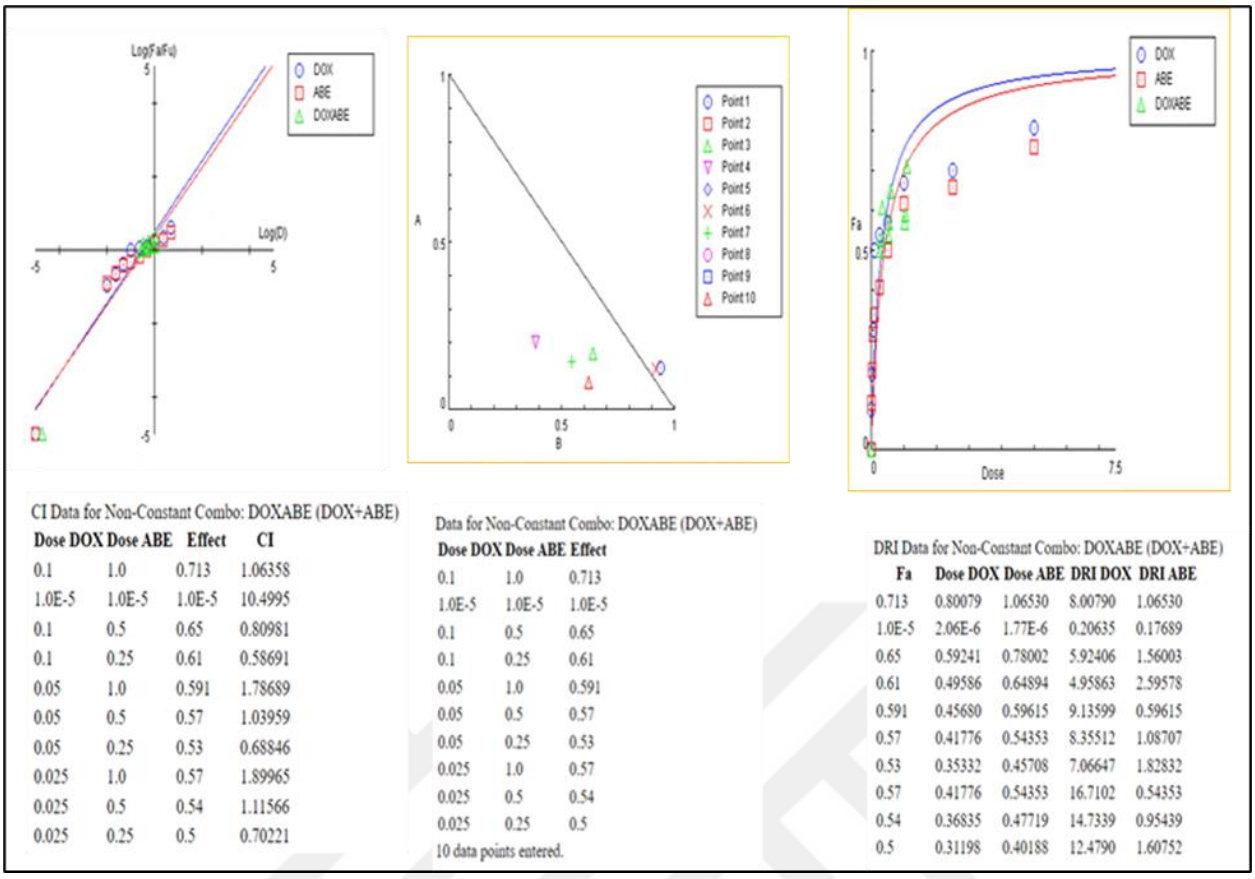


Şekil 3.4 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının kombinasyon kullanımı ile meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 kullanılarak uygulanmış MTT Hücre Sağkalım Analiz sonuçları. MDA-MB-231 hücreleri 0.1 µM DOX ve 0.5 µM ABE ile tek başına ve değişen DOX + ABE kombinasyon konsantrasyonlarında (0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 1 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE) 4 farklı denemede ve 4 tekrarlı olarak kuyucuklarda 24 saat inkübe edildiğinde hücrelerin sağkalımlarında doza bağlı olan istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Grafik sunumunda 4 farklı analizde 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilen toplam 16 ölçüm ortalaması ve standart sapmalar kullanılmıştır.

MDA-MB-231 hücre hattında CompuSyn programı (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA) kullanılarak hesaplanan Combinatorial Index (CI) ve Dose Reduction Index (DRI) değerleri incelendiğinde, 1 den küçük CI değeri DOX ve ABE ajanları arasında sinerjik etki, 1 den büyük değerler antagonistik etkiyi ve 1 değeri ise küçük bir ek etkiyi göstermektedir. 0.025 microM DOX ve 0.25 µM ABE uygulamasından elde edilen değerler, güçlü bir sinerjik etkileşimi göstermektedir (Şekil 3.5).

DOX ve ABE ajanının 0.1 µM DOX + 1 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1.06358, 0.713 ve 1.06530 olarak belirlenmiştir. 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 0.80981, 0.65 ve 1.56003 olarak belirlenmiştir. 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 0.58691, 0.61 ve 2.59578 olarak belirlenmiştir. 0.05 µM DOX + 1 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 1.78689, 0.591 ve 0.5961 olarak belirlenmiştir. 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 1.03959, 0.57 ve 1.08707 olarak belirlenmiştir. 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 0.68846, 0.53 ve 1.82832 olarak belirlenmiştir. 0.025 µM DOX + 1 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 1.89965, 0.57 ve 0.54353 olarak belirlenmiştir. 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 1.11566, 0.54 ve 0.95439 olarak belirlenmiştir. 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant ve DRI değerleri sırasıyla, 0.70221, 0.5 ve 1.60752 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5).

Combinatorial Index (CI), Isobologram ve Non-Constant Combo verileri de kombinasyon terapisi için benzer önemli sinerjistik etkiye işaret etmiştir. Tablo 2'deki veriler kullanılarak analizler gerçekleştirildiğinde 0.025µM DOX ve 0.25 µM ABE kombinasyon terapisinden elde edilen etkinin 0.5 µM ABE ve 0.1 µM DOX ajanlarının yüksek konsantrasyonlarının tekil etkilerine istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde denk olduğunu göstermiştir ($P < 0.05$) (Şekil 3.5).



CI Data for Non-Constant Combo: DOXABE (DOX+ABE)

Dose DOX	Dose ABE	Effect	CI
0.1	1.0	0.713	1.06358
1.0E-5	1.0E-5	1.0E-5	10.4995
0.1	0.5	0.65	0.80981
0.1	0.25	0.61	0.58691
0.05	1.0	0.591	1.78689
0.05	0.5	0.57	1.03959
0.05	0.25	0.53	0.68846
0.025	1.0	0.57	1.89965
0.025	0.5	0.54	1.11566
0.025	0.25	0.5	0.70221

Data for Non-Constant Combo: DOXABE (DOX+ABE)

Dose DOX	Dose ABE	Effect
0.1	1.0	0.713
1.0E-5	1.0E-5	1.0E-5
0.1	0.5	0.65
0.1	0.25	0.61
0.05	1.0	0.591
0.05	0.5	0.57
0.05	0.25	0.53
0.025	1.0	0.57
0.025	0.5	0.54
0.025	0.25	0.5

10 data points entered.

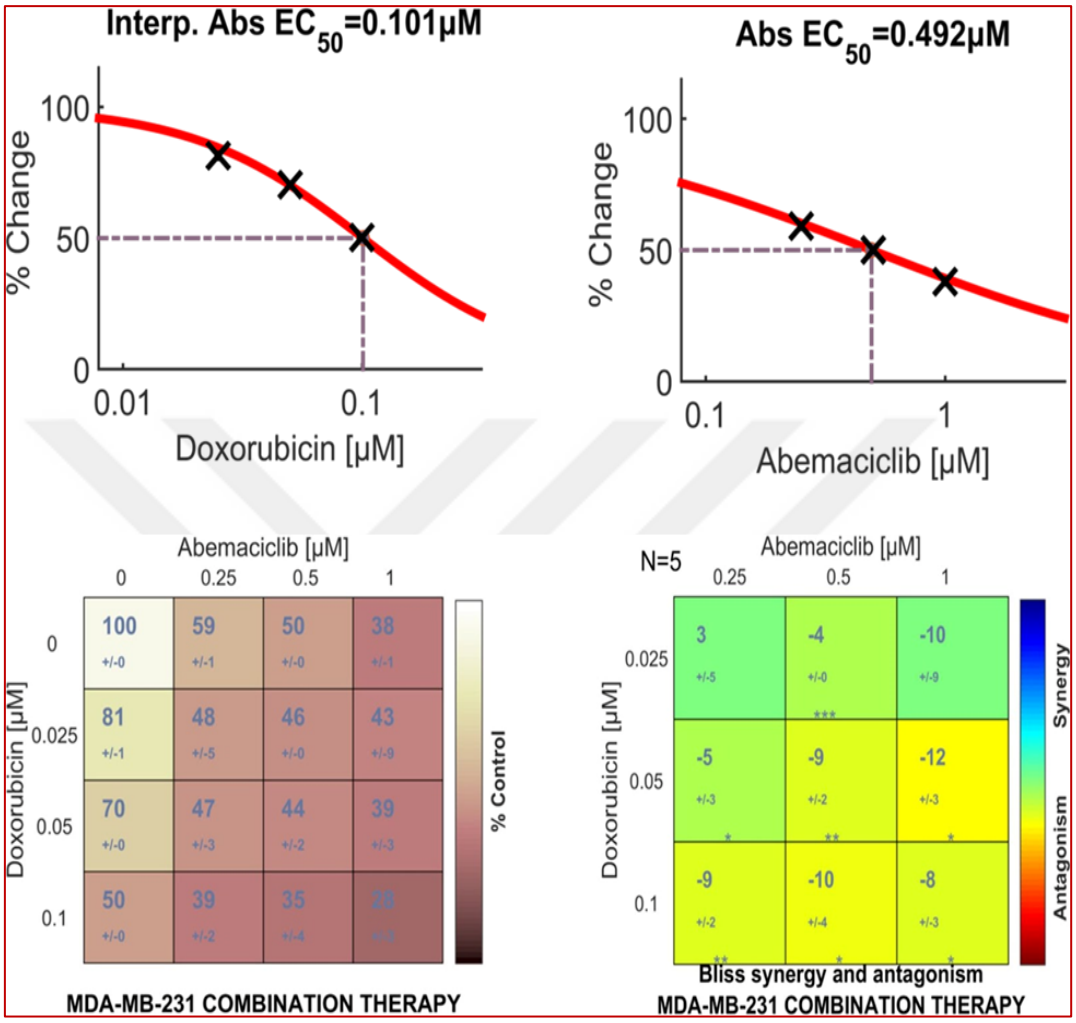
DRI Data for Non-Constant Combo: DOXABE (DOX+ABE)

Fa	Dose DOX	Dose ABE	DRI DOX	DRI ABE
0.713	0.80079	1.06530	8.00790	1.06530
1.0E-5	2.06E-6	1.77E-6	0.20635	0.17689
0.65	0.59241	0.78002	5.92406	1.56003
0.61	0.49586	0.64894	4.95863	2.59578
0.591	0.45680	0.59615	9.13599	0.59615
0.57	0.41776	0.54353	8.35512	1.08707
0.53	0.35332	0.45708	7.06647	1.82832
0.57	0.41776	0.54353	16.7102	0.54353
0.54	0.36835	0.47719	14.7339	0.95439
0.5	0.31198	0.40188	12.4790	1.60752

Şekil 3.5 DOX ve ABE kombinasyon terapisi için CompuSyn analizleri gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri 24 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda DOX ve ABE ajanları ile muamele edilmiştir (0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 1 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE) ve elde edilen sonuçlar doza bağlı olarak hücre sağ kalım oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşme paterni tespit edilmiştir. Veriler 4 farklı ölçümden elde edilen değerlerin ortalaması ve ve standart sapmaları ele alınarak hesaplanmıştır.

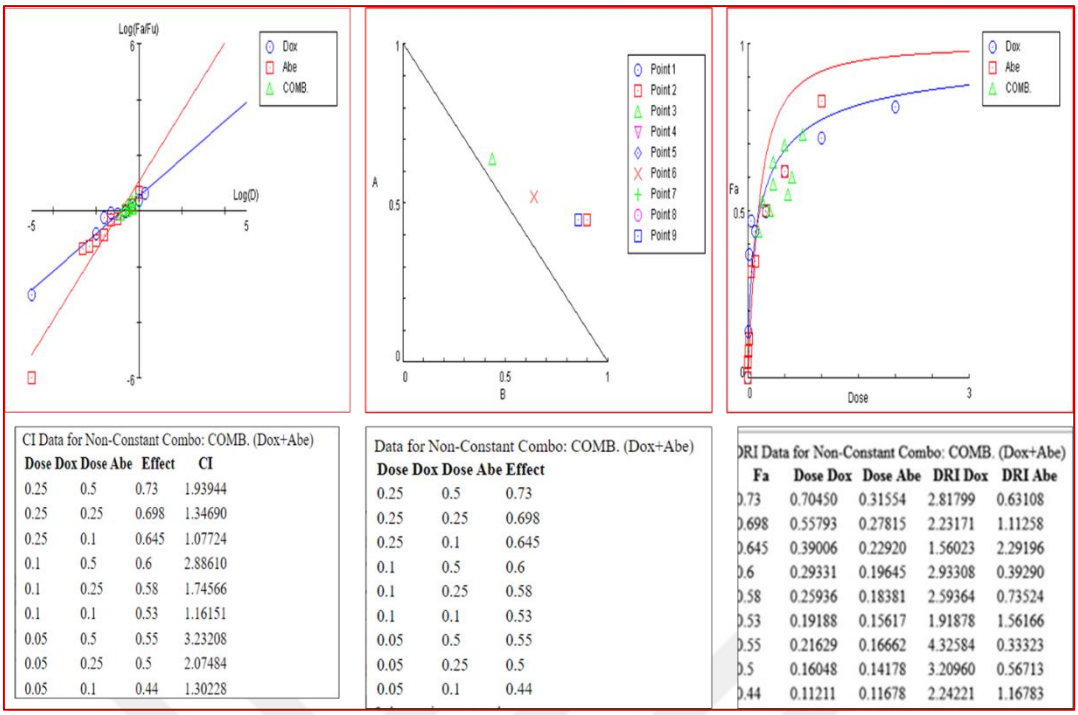
DOX ve ABE kemoterapik ajanlarının teker teker ve kombinasyon şeklinde uygulamaları sonucunda elde edilen IC50 değerleri, ComBenefit programı olan Bliss Synergy ve Antagonism olayı ile incelenmiştir (Şekil 3.6). Hesaplanan IC50 değerleri ABE için 0.498 µM , DOX için 0.101 µM ve kombinasyon terapisi için 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE olarak belirlenmiştir. Dolayısı yla, ComBenefit ve CompuSyn hesaplamalarından elde edilen hesaplamaların sonucunda, DOX ve ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları olarak DOX kemoterapik ajanı için 0.025 µM ve ABE kemoterapik ajanı için 0.25 µM olarak belirlenmiştir ve bundan sonraki deneylerde kombinasyon terapi etkilerini araştırdığımız çalışmalarda

kombinasyon terapisini oluşturan DOX ve ABE konsantrasyonları olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.6 DOX ve ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin kontrol ve DOX ve ABE ajanları ile teker teker muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerine nazaran sonuçları açısından ComBenefit analizleri. Mavi ve yeşil bölgeler sinerjistik etkileşimi gösterir, Kırmızı ile sarı arasındaki alanlar ile analizler sonucunda antagonistik etkiyi göstermektedir. Veriler 4 farklı ölçümündeki değerlerin ortalama değerleri ve ilgili standart sapma değerleri olarak kullanılmıştır.

CompuSyn programı (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA) kullanılarak hesaplanan Combinatorial Index (CI) ve Dose Reduction Index (DRI) değerleri incelendiğinde, 1 den küçük CI değeri DOX ve ABE ajanları arasında sinerjik etki, 1 den büyük değerler antagonistik etkiyi ve 1 değeri ise küçük bir ek etkiyi göstermektedir. MCF-7 hücre hattı için neredeyse bütün kombinasyon uygulamalarından elde edilen değerler, antagonistik etkileşimi göstermektedir (Şekil 3.7).



CI Data for Non-Constant Combo: COMB. (Dox+Abe)

Dose Dox	Dose Abe	Effect	CI
0.25	0.5	0.73	1.93944
0.25	0.25	0.698	1.34690
0.25	0.1	0.645	1.07724
0.1	0.5	0.6	2.88610
0.1	0.25	0.58	1.74566
0.1	0.1	0.53	1.16151
0.05	0.5	0.55	3.23208
0.05	0.25	0.5	2.07484
0.05	0.1	0.44	1.30228

Data for Non-Constant Combo: COMB. (Dox+Abe)

Dose Dox	Dose Abe	Effect
0.25	0.5	0.73
0.25	0.25	0.698
0.25	0.1	0.645
0.1	0.5	0.6
0.1	0.25	0.58
0.1	0.1	0.53
0.05	0.5	0.55
0.05	0.25	0.5
0.05	0.1	0.44

DRI Data for Non-Constant Combo: COMB. (Dox+Abe)

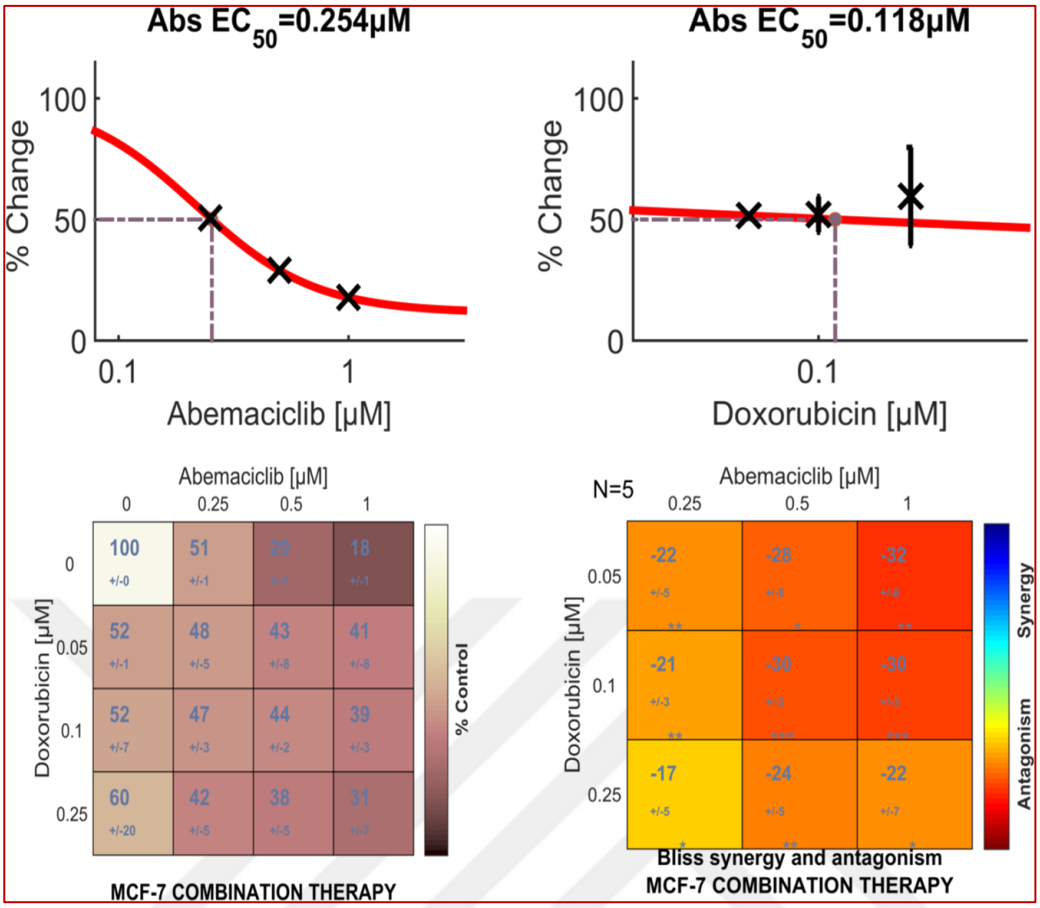
Fa	Dose Dox	Dose Abe	DRI Dox	DRI Abe
0.73	0.70450	0.31554	2.81799	0.63108
0.698	0.55793	0.27815	2.23171	1.11258
0.645	0.39006	0.22920	1.56023	2.29196
0.6	0.29331	0.19645	2.93308	0.39290
0.58	0.25936	0.18381	2.59364	0.73524
0.53	0.19188	0.15617	1.91878	1.56166
0.55	0.21629	0.16662	4.32584	0.33323
0.5	0.16048	0.14178	3.20960	0.56713
0.44	0.11211	0.11678	2.24221	1.16783

Şekil 3.7 MCF-7 hücrelerinde DOX ve ABE kombinasyon terapisi için CompuSyn analizleri gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücreleri 24 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda DOX ve ABE ajanları ile muamele edilmiştir (0.1 µM DOX + 1 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE, 0.05 µM DOX + 1 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.5 µM ABE, 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE). Veriler 4 farklı ölçümden elde edilen değerlerin ortalaması ve ve standart sapmaları ele alınarak hesaplanmıştır.

DOX ve ABE ajanının 0.1 µM DOX + 0,5 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 2,88610, 0.6 ve 0,39290 olarak belirlenmiştir. 0.1 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1,74566, 0.58 ve 0,73524 olarak belirlenmiştir. 0.1 µM DOX + 0.1 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1.16151, 0.53 ve 1,56166 olarak belirlenmiştir. 0.05 µM DOX + 0,5 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 3.23208, 0.55 ve 0.33323 olarak belirlenmiştir. 0.05 µM DOX + 0.25 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 2.07484, 0.5 ve 0.56713 olarak belirlenmiştir. 0.05 µM DOX + 0.1 µM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1.30228, 0.44 ve 1.16783 olarak belirlenmiştir. 0.25

μM DOX + 0,5 μM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1.93944, 0.73 ve 0.63108 olarak belirlenmiştir. 0.25 μM DOX + 0.25 μM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1.34690, 0.698 ve 1.11258 olarak belirlenmiştir. 0.25 μM DOX + 0.1 μM ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları için CI, Non-Constant etki ve DRI değerleri sırasıyla, 1,07724, 0.645 ve 2,29196 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).

MCF-7 hücre hattında yapılan CompuSyn analizi sonucunda Combinatorial Index (CI), Isobologram ve Non-Constant Combo verileri de kombinasyon terapisi için antagonistik etkiye işaret etmiştir. Tablo ’deki veriler kullanılarak analizler gerçekleştirildiğinde 0.025μM DOX ve 0.25 μM ABE kombinasyon terapisinden elde edilen etkinin 0.5 μM ABE ve 0.1 μM DOX ajanlarının yüksek konsantrasyonlarının tekil etkilerine istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde denk olduğunu göstermiştir ($P < 0.05$) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 DOX ve ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin; kontrol,DOX ve ABE ajanları ile teker teker muamele edilen MCF-7 hücrelerine nazaran sonuçları açısından ComBenefit analizleri. Mavi ve yeşil bölgeler sinerjistik etkileşimi gösterir, Kırmızı ile sarı arasındaki alanlar ile analizler sonucunda antagonistik etkiyi göstermektedir. Veriler 4 farklı ölçümdeki tüm değerlerin ortalama değerleri ve ilgili standart sapma değerleri ele alınarak hesaplanmıştır.

MCF-7 hücre hattında; DOX ve ABE kemoterapik ajanlarının teker teker ve kombinasyon şeklinde uygulamaları sonucunda elde edilen IC50 değerleri, ComBenefit programında Bliss Synergy ve Antagonism açısından incelenmiştir (Şekil 8). Mavi ve yeşil bölgeler sinerjistik etkileşimi gösterir, Kırmızı ile sarı arasındaki alanlar ile analizler sonucunda antagonistik etkiyi göstermektedir. Sonuçlara bu şekilde bakıldığında yapılan dozlardaki uygulamanın sinerjistik değil aksine antagonistik hatta güçlü bir antagonistik etki gösterdiğini açığa çıkarmıştır. Hesaplanan IC50 değerleri ABE için 0.254 µM DOX için 0.118 µM ve kombinasyon terapisi için 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE olarak belirlenmiştir. Dolayısı ile, ComBenefit ve CompuSyn hesaplamalarından elde edilen hesaplamaların sonucunda, DOX ve ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları olarak DOX kemoterapik ajanı için 0.025 µM ve ABE kemoterapik ajanı için 0.25

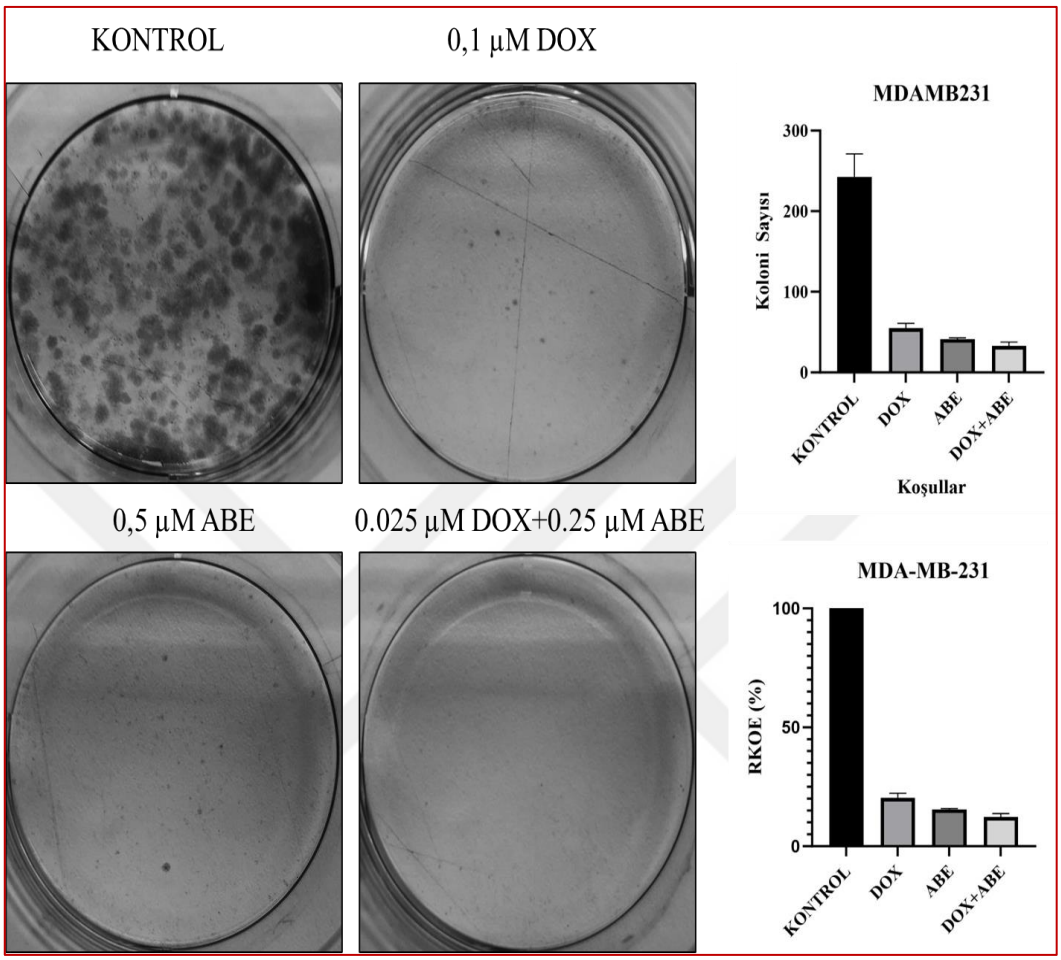
μM olarak belirlenmiştir;ancak görülen etki sinerjistik değil antagonistik olduğundan ve farklı moleküler profillere sahip meme kanseri hücre hatlarındaki sinerjik etkinin mekanizması net olarak saptanmaya çalışıldığından bundan sonraki aşamalarda yalnızca kombine uygulamanın sinerjistik etki gösterdiği MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde çalışmalar devam etmiştir.

3.2 DOX ve ABE kombinasyon terapisi MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etki eder

DOX ve ABE uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının koloni oluşturma performansı üzerindeki etkileri Relatif Koloni Oluşturma Etkinliği (Relative Colony Forming Efficiency, RCFE) üzerindeki etkisini standart koloni büyüme analizleri ile araştırdık. Koloni oluşturma etkinliği hesaplamasında "CFE (%) = (colonies counted/cells inoculated) x 100" formülü, RCFE hesaplamasında ise "RCFE (%) = (average number of colonies in treatment plate/average number of colonies in negative control) x 100" formülü kullanıldı. Herhangi bir kemoterapik ajanla muamele edilmemiş kontrol MDA-MB-231 hücrelerinin, 0.1 μM DOX ile muamele edilmiş hücrelerin, 0.5 μM ABE ile muamele edilmiş hücrelerin ve kombinasyon terapisi ile muamele edilmiş hücrelerin CFE ve RCFE değerleri aşağıdaki Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Herhangi bir kemoterapik ajanla muamele edilmemiş kontrol MDA-MB-231 hücrelerinin inkübasyon sonucunda 3 ölçümde 268, 212 ve 248 koloni oluşturdukları (ortalama koloni sayısı 242.67) ve 3 ölçümün sonunda hesaplanan ortalama CFE değerlerinin 4.85 olduğu hesaplanmıştır. 0.1 μM DOX ile muamele edilmiş hücre grubu için koloni sayılarının 48, 60 ve 56 (ortalama 54.67) olduğu gözlemlenmiş ve ortalama ortalama CFE 1.09 ve ortalama RCFE ise %20.40 olarak hesaplanmıştır. 0.5 μM ABE ile muamele edilmiş hücre grubunda koloni sayılarının 43, 41 ve 40 (ortalama 41.33) olduğu gözlemlenmiş, ortalama CFE 0.83 ve RCFE ise %15.42 olarak hesaplanmıştır. 0.1 μM DOX + 0.5 μM ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilmiş hücre grubunda ise koloni sayıları 27, 35 ve 36 (ortalama 32.67) olarak gözlemlenmiş, ortalama CFE değeri 0.65 ve RCFE değeri ise %12.19 olarak hesaplanmıştır.

MDA-MB-231 hücreleri RCFE değerlerindeki azalma 0.1 µM DOX ile muamele edildiğinde %80, 0.5 µM ABE ile muamele edildiğinde %85, kombinasyon terapisi ile muamele edildiğinde ise bu değer %88'e yükselmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 MDA-MB-231 hücre hattında DOX ve ABE ajanlarının tekli ve kombinasyon terapisi şeklinde uygulanmasının kanser hücrelerinin koloni oluşturma etkinliği üzerindeki etkilerinin gösterilmesi. Veriler 3 farklı ölçüm sonucunda belirlenen koloni sayısı, hesaplanan koloni ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanan koloni oluşturma etkinliği (CFE) ve relatif koloni oluşturma etkinliği (RCFE) olarak sunulmuştur.

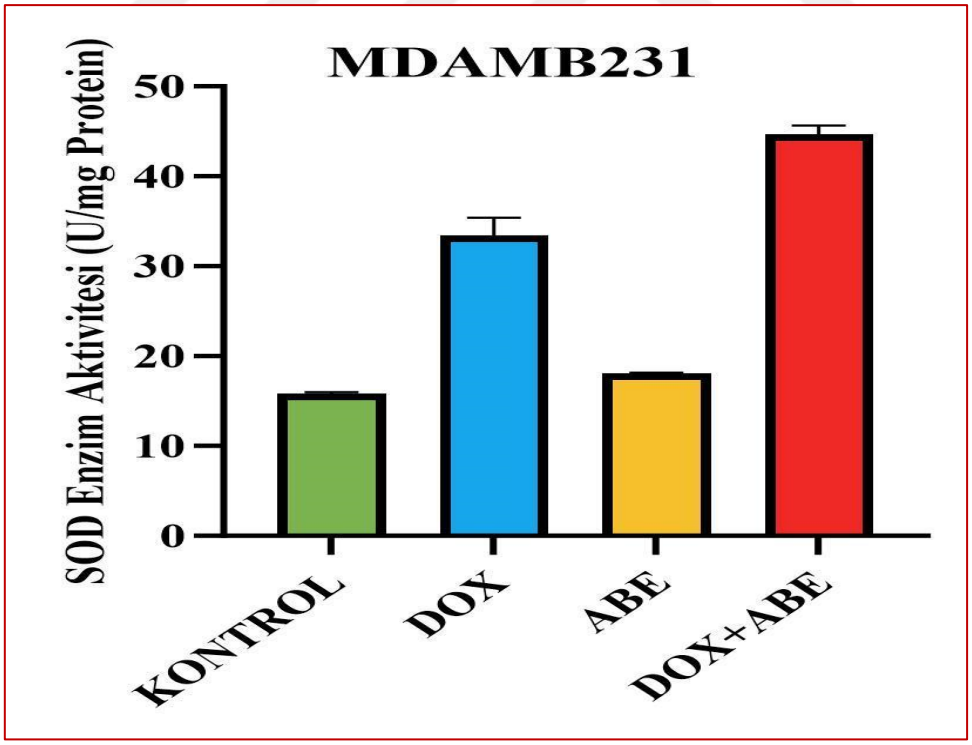
Tablo 3.3 Herhangi bir kemoterapik ajan ile muamele edilmemiş kontrol grubu MDA-MB-231 hücre hattının, 0.1 μM DOX ile muamele edilmiş hücre grubu, 0.5 μM ABE ile muamele edilmiş hücre grubu, ve 0.1 μM DOX + 0.5 μM ABE kombinasyon terapisi ile muamele edilmiş hücre grubu için koloni sayıları, koloni oluşturma etkinliği (CFE) ve relatif koloni oluşturma etkinliği (RCFE) değerleri.

	KONTROL	**DOX GRUBU**	**ABE GRUBU**	**DOX+ABE**
1. ölçüm	268	48	43	27
2. ölçüm	212	60	41	35
3. ölçüm	248	56	40	36
Ortalama koloni sayısı	**242.67**	**54.67**	**41.33**	**32.67**
CFE1	5.36	0.96	0.86	0.54
CFE2	4.24	1.2	0.82	0.7
CFE3	4.96	1.12	0.8	0.72
Ortalama CFE	**4.85**	**1.09**	**0.83**	**0.65**
RCFE1	%100	%17.91	%16.04	%10.07
RCFE2	%100	%22.39	%15.30	%13.06
RCFE3	%100	%20.90	%14.93	%13.43
Ortalama RCFE	**%100**	**%20.40**	**%15.42**	**%12.19**

3.3 MDA-MB-231 hücre hattının DOX ve ABE ile muamele edilmesi Antioksidatif Özelliklerini Değiştirmektedir

Meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin 0.1 µM DOX ve 0.25 µM ABE ile teker teker ve kombinasyon terapisi kapsamında muamele edilmesi sonucunda kontrol grubuna kıyasla MDA protein miktarında, GSH protein miktarında ve Superoxide Dismutase (SOD) seviyelerindeki değişimleri inceledik. Protein Miktar Tayininde kullandığımız standardizasyon değerleri ve diğer ölçümlerden elde edilen ilk sonuçlar Tablo 3.4'te sunulmuştur.

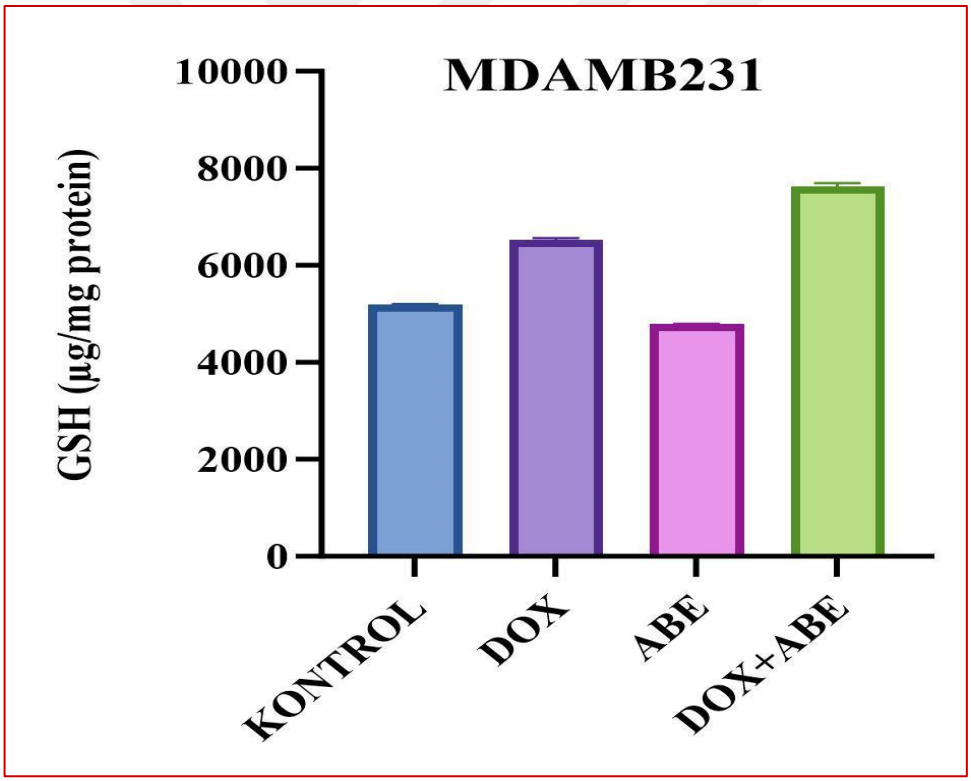
Protein miktarına ait korelasyon çalışmasını gerçekleştirdiğimiz birinci ölçümlerde 10 örnek ve boş ölçüm için değerler 1.921, 1.036, 1.389, 1.258, 0.918, 1.973, 1.282, 1.889, 1.056, 1.093 ve 0.408 olmuştur. Boş ölçümü diğer 10 ölçümden çıkardığımızda elde ettiğimiz değerler ise 1.513, 0.628, 0.981, 0.850, 0.510, 1.565, 0.874, 1.481, 0.648 ve 0.685 olmuştur. Bu değerlere göre hesaplanan protein miktarları ise 1208.177, 501.078, 783.359, 678.751, 407.251, 1249.301, 697.916, 1182.624, 517448 ve 546.594 µg olmuştur.



Şekil 3.10 MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan her iki kemoterapötik ajanın (ABE ve DOX) teker teker ve kombine uygulamasının SOD seviyelerine etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$).

SOD Aktivitesinin belirlenmesinde yapılan ölçümler 10 örnek ve blank için UV değerleri 0.147, 0.150, 0.157, 0.167, 0.144, 0.149, 0.148, 0.228, 0.204, 0.199 ve 0.162 olmuştur. Bunlara bağlı olarak hesaplanan % inhibisyon 9.568, 7.407, 3.086, -2.778, 11.420, 8.333, 8.951, -40.432, -25.617 ve -22.531 olmuştur. Bunlara bağlı olarak belirlenen Spesifik Aktivite ise 2.640, 4.928, 1.313, -1.364, 9.347, 2.223, 4.275, -11.396, -16.502 ve -13.740 U/mg protein olarak belirlenmiştir. 3 deneyden elde edilen verilerin ortalamasına ait analizler ise Şekil 3.10' da sunulmuştur.

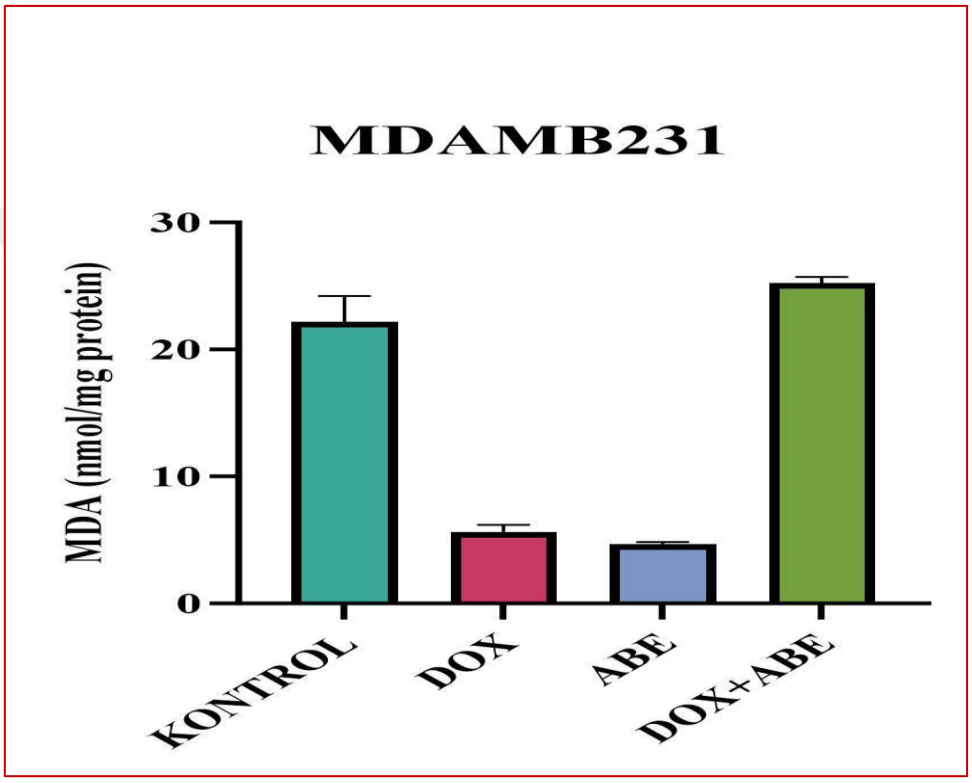
Glutatyon miktar hesaplamasında ise 10 örnek ve blank için elde edilen UV değerleri 0.081, 0.150, 0.069, 0.096, 0.076, 0.066, 0.117, 0.122, 0.114, 0.085 ve 0.059 olarak ölçülmüştür. Buna bağlı olarak örneklerde hesaplanan Glutatyon miktarları ise 1.009, 4.103, 0.448, 1.682, 0.785, 0.336, 2.601, 2.848, 2.466 ve 1.188 µg olarak hesaplanmıştır. 3 deneyden elde edilen verilerin ortalamasına ait analizler ise Şekil 3.11' de sunulmuştur.



Şekil 3.11 DOX ve ABE kemoterpik ajanlarının teker teker ve kombinasyon uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında GSH seviyelerinin kontrol hücrelerine nazaran etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$).

MDA miktar ölçümlerinde ise 10 örnek ve blank için elde edilen UV değer ortalamaları 0.040, 0.046, 0.039, 0.041, 0.040, 0.045, 0.038, 0.045, 0.039, 0.045 ve

0.037 olarak hesaplanmıştır. Buna bağlı olarak mg protein başına MDA miktarı ise 0.022, 0.159, 0.023, 0.052, 0.076, 0.057, 0.013, 0.064, 0.043 ve 0.130 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar 0.1 µM DOX uygulamasının SOD aktivitesini 2 kez, 0.25 µM ABE uygulamasının ise SID aktivitesini 1.14 kez ve kombinasyon uygulamasının ise 2.8 kat artırdığını göstermiştir. Bu veriler 10'uncu şekilde sunulmaktadır. 3 deneyden elde edilen verilerin ortalamasına ait analizler ise Şekil 3. 12' de sunulmuştur.

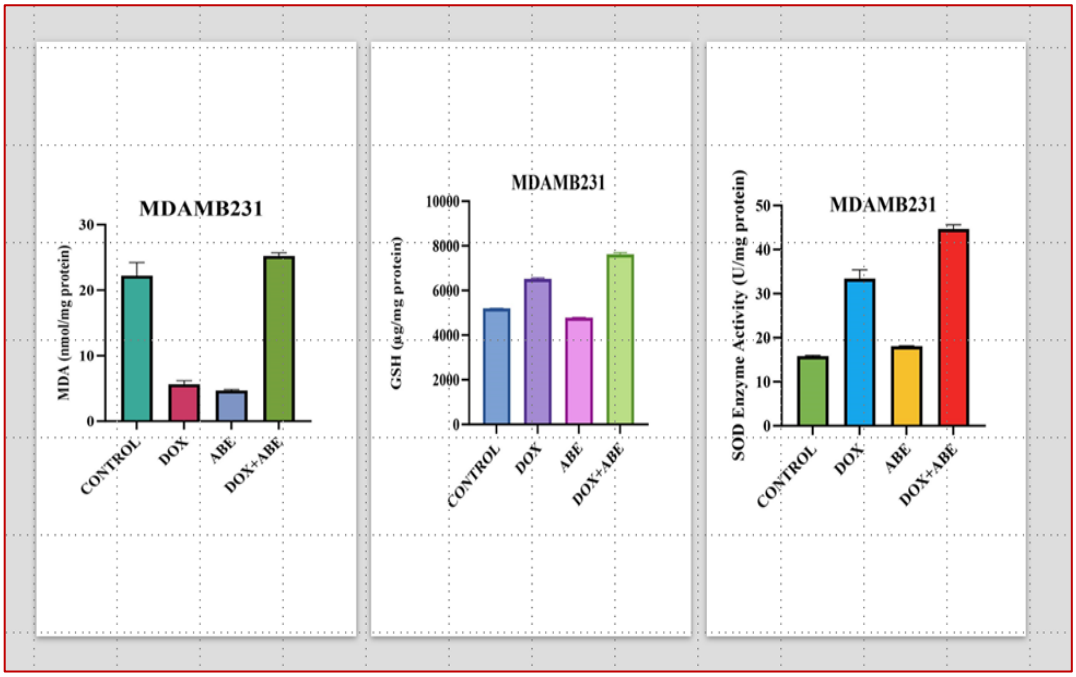


Şekil 3.12 DOX ve ABE kemoterapötik ajanlarının teker teker ve kombinasyon uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında MDA seviyelerinin kontrol hücrelerine nazaran etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$).

MDA, hücre içerisinde konsantrasyonu artan ROS moleküllerinin neden olduğu oksidatif stres sonucunda oksitlenen lipit moleküllerinin peroksidasyon son ürünü olan karakteristik bir moleküldür. DOX ve ABE moleküllerinin ayrı ayrı uygulamaları MDA moleküllerinde, sırası ile, %25 ve %21 azalmaya neden olurken, DOX ve ABE moleküllerinin kombinasyon olarak uygulamaları %113 düzeyinde bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.13).

GSH homeostazının kanser gelişimini kanser gelişiminin başlangıcı öncesinde engelleme yönünde ve kanser gelişiminin başlangıcı sonrasında hızlandırma

yönündeki etkileri ve hatta bunlara ek olarak kanser hücrelerinin terapötik ajanlara karşı geliştirdikleri direncin oluşmasındaki metabolik yolaklar üzerindeki etkilerinde büyük önemi bulunmaktadır. Bu nedenle biz de MDA-MB-231 hücrelerinin içerisinde bulunan total GSH protein miktarını ölçtük. Meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde bulunan GSH protein miktarları 0.1 µM DOX uygulamasının akabinde kontrol grubuna göre %25 artmış, ABE uygulamasının akabinde ise kontrol grubuna nazaran %92 seviyesine azalmıştır. DOX ve ABE'nin kombinasyon şeklinde uygulanması ise GSA protein miktarında kontrol grubuna göre %46 azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 DOX ve ABE kemoterpik ajanlarının teker teker ve kombinasyon uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattında MDA (a), GSH (b), ve SOD (c) seviyelerinin kontrol hücrelerine nazaran etkileri. Tüm uygulama grupları istatistiksel olarak anlamlı değişimler göstermektedir ($P < 0.05$).

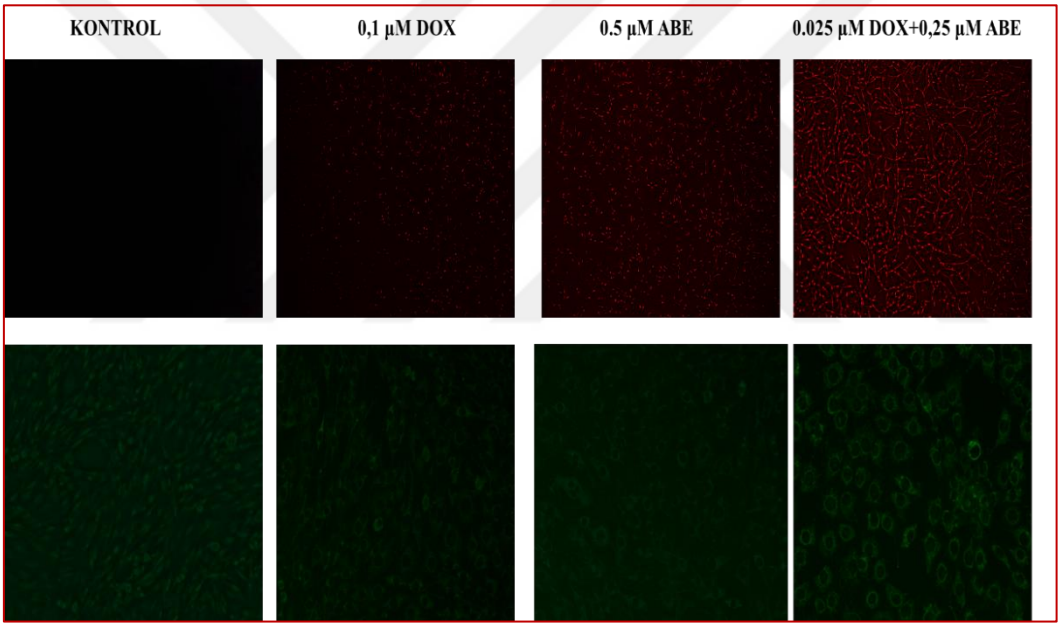
3.4 Abemaciclib ve Doxorubicin uygulamasını MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümüne sebep olur

DOX ve ABE moleküllerinin ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanmasının meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinin morfoloji ve sağkalım özellikleri üzerindeki etkilerini incelemek için PI ve Dioc6 boyamaları ile Floresan Mikroskop incelemesi yaptık (Şekil 3.14).

Normal hücre zarlarının PI boyasına karşı geçirgen olmadığı, oysa PI boyamasının apoptoz öncesi hücrelere kolayca nüfuz edebildiği iyi bilinmektedir ve bu nedenle

DOX ve ABE ile muamele sonrasında PI boyaması için pozitif olan hücrelerin yüzdesini değerlendirdik. Tek başına uygulandığında sırasıyla 0,1 µM ve 0,5 µM konsantrasyonlarda tedavi veya 0,025 µM DOX ve 0,25 µM ABE olacak şekilde kombinasyon terapisi olarak ilaç uygulaması gerçekleştirilip ardından PI boyama yapılmıştır.

Hücrenin mitokondriyal bütünlüğü tehlikeye girmişse Dioc6 mitokondri zarlarını bağlayamadığı için, ilaçlarla muamele sonrasında hücrelerin mitokondriyal bütünlüğünü değerlendirmek için Dioc6 boyaması yapıldı. Hem tekil hem de kombinasyonel konfigürasyonda DOX ve ABE ile muamele sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyal bütünlüğünün açık bir şekilde bozulduğunu gözlemlerimiz arasındadır.



Şekil 3.14 Dioc-6 (yeşil) ile PI (kırmızı)boyama ile sırasıyla MOMP (Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği) ile Hücre Ölümünün MDA-MB-231 hücre hattında DOX, ABE ve DOX-ABE Kombinasyon Tedavisini takiben gerçekleştirildi.

3.5 Abemaciclib ve Doxorubicinin MDA-MB-231 TNBC hatta Uygulanması Hayatta Kalma ve Apoptotik Yollarda Rol Alan Proteinlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etki Gösterir

Bcl-2 protein ailesi ve aynı zamanda içsel apoptotik proteinlerin ekspresyon profillerindeki değişiklikleri değerlendirmek için Western Blot analizi yapıldı (Şekil 3.15). Sırasıyla 0,5 µM ABE, 0,1 µM DOX ve 0,025 µM ve 0,25 µM

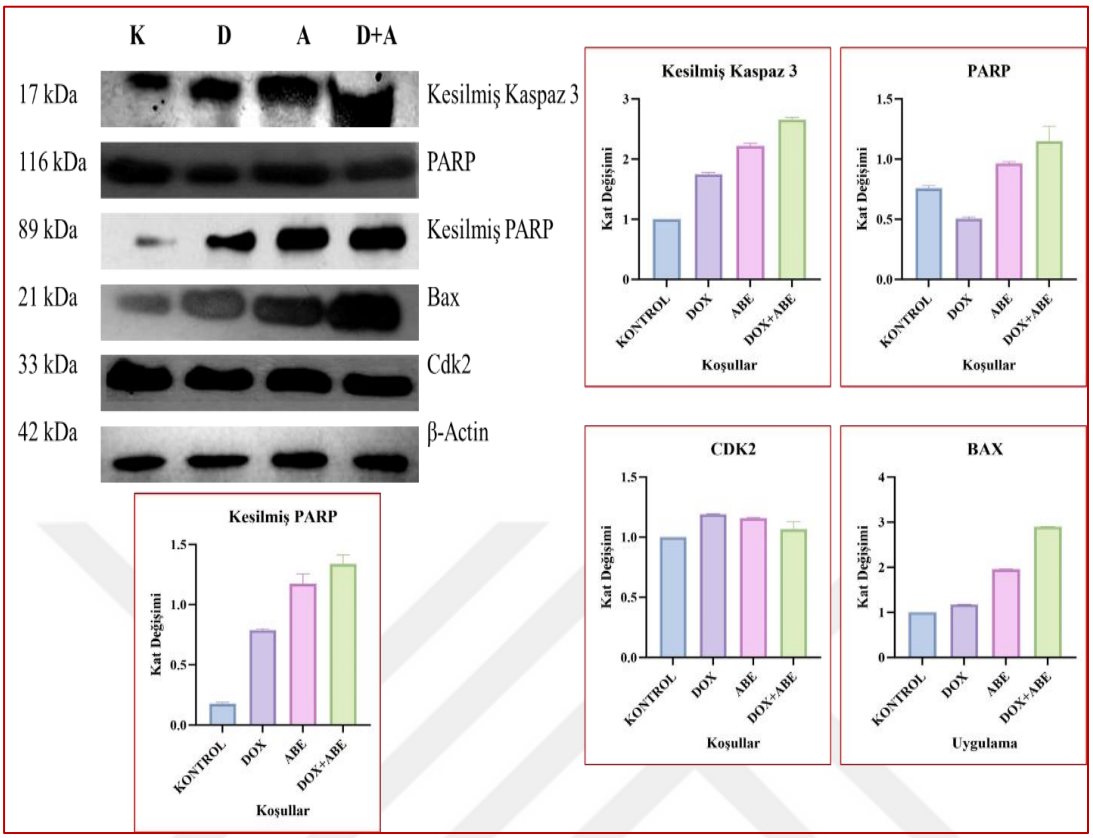
konsantrasyonlu ABE ve DOX kombinasyonu ile 24 saat tedaviye tabi tutulan MDA-MB-231 hücreleri, kesilmiş Kaspaz 3, PARP ve kesilmiş PARP proteinleri seviyelerindeki değişiklikler açısından araştırıldı (Şekil 3.15).

Bölünmüş Kaspaz 3 ekspresyonu, tüm DOX, ABE ve kombinasyon terapisi için sırasıyla 1,75 kat, 2,2 kat ve 2,6 kat seviyelerine kadar önemli bir artış gösterdi. Benzer şekilde PARP ekspresyonu DOX, ABE ve kombinasyon tedavisi için sırasıyla 4,5 kat, 7,0 kat ve 8,0 kat arttı ($P < 0,05$). Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik üyeleri arasında yer alan Bax proteini, DOX, ABE ve MDA-MB-231 hücrelerinin kombinasyonel tedavisi üzerine ekspresyonlarında da önemli bir artış göstermiştir.

Bir diğer önemli apoptotik biyobelirteç olan cleaved PARP' ın da ekspresyonunda önemli bir artış olduğu görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde DOX uygulaması 4,5 kat, ABE uygulaması 7 kat, kombinasyon tedavisi uygulanması ise 8 kat artışa neden olmuştur.

Bax ekspresyonu, hücrelere DOX, ABE ve kombinasyonel uygulamada %17, %95 ve %190 artış gösterdi. Kötü ekspresyon, hücrelere DOX, ABE ve kombinasyonel uygulamada %20, %25 ve %40 artış gösterdi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CDK2 düzeyindeki değişim şu şekildeydi: DOX uygulamasıyla ifadede sadece %19, ABE uygulamasıyla ise %15'lik bir artış gözlenirken; DOX+ABE kombinasyonuyla bu değişiklik yalnızca %6 civarında olmuştur.



Şekil 3.15 DOX, ABE ve DOX+ABE muamelesinin apoptozu Kaspaz-3, PARP ve Bax yoluyla modüle etmesinin western blot ile gösterilmesi. İmmünoblotlama tahlili için ImageJ ve GraphPad V10 veri analizi, MDA-MB-231 hücrelerindeki her protein için sütun grafikleri olarak verildi.Tüm gruplardan elde edilen sonuçlar kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($p<0,05$).

4
SONUÇ

TNBC kanser yapıları, hali hazırda var olan meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Bunun yanında ne yazık ki meme kanserine bağlı olarak gerçekleşen ölümlerinin yaklaşık olarak %50'sinden sorumlu olan meme kanseri alt tipidir. TNBC tipi hem oldukça agresif bir meme kanseridir hem de ne yazık ki klinik olarak sınırlı tedavi yolları mevcuttur. Bu bağlamda TNBC özelliğe sahip meme kanseri, ER/PR/HER2 negatiftir ve sonuç olarak hem endokrin bazlı tedavilere hem de HER2 hedefli ajanlara beklenen yanıtı vermez. Bu nedenle TNBC tipi büyük çoğunlukla sitotoksik kemoterapötik stratejiler aracılığıyla olan bir tedaviye yönlendirilir. Bu tedavilerin en sık uygulananları şunları içerir: Hem mevcut sağlık sorunları olan hastaların tedavisini engelleyen hem de yaşam kalitesini daha da tehlikeye sokan önemli yan etkilere neden olabilen antrasiklinler. Günümüzde meme kanseri tedavisinde en yaygın şekilde kullanılan Antrasiklinlerden birisi olan DOXun terapötik etkinliği, önlenemeyen olumsuz yan etkileri nedeni ile sonuçlardaki fayda/zarar oranında problemler yaşasa da, bu yan etkileri hafifletmesi açısından kombinasyon terapisi yaygın bir klinik kullanım bulacağını düşündüğümüz bir uygulamadır. Meme kanseri tedavi yaklaşımlarında sık kullanılan ilaçlardan biri olan doksorubisinin DNA interkalasyon oluşturarak topoizomeraz II enzimini baskılayıp replikasyona engel olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Kanser tedavisi açısından etkin ve etkili bir strateji olan bu mekanizmanın temelinde özellikle hücre döngüsü durdurularak hücreyi apoptozise yönlendirilmesi bulunmaktadır. Bu da yapılan birçok çalışmada kanser tedavilerinin önündeki en büyük engellerden birisi olan, kanser hücrelerinin apoptozise gitmeye karşı oluşturdukları direnci kırması açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak belirtmek gerekir ki, bu stratejinin etkilerinin yanı sıra, fizyolojik metabolizmalarda neden olduğu etkiler açısından hastaların yaşam koşullarını negatif etkileyen birçok yan etkileri de yukarıda da belirttiğimiz şekilde ortaya çıkarmakta ve bu yan etkiler de son yıllarda yayımlanan birçok çalışmada yerini almaktadır.

Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) temsil edebilecek hücre hatları arasında yer alan MDA-MB-231 hücre hattı ER, PR, insan Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

2 (HER-2) ve E-cadherin negatif, Rb pozitif ve mutant bir p53 proteini eksprese etmektedir (Welsch, 2013; Flesicher vd., 2021). Meme Kanseri olan kadınların %10-20'sine TNBC alt tipi tanısı konulduğunu ve Doksorubisin gibi bir antrasiklin veya siklofosfamid ve taksan grubu ajanları içeren kemoterapötik bir tedavi gördüklerini belirtmek önemlidir (Inao vd., 2019).

Diğer yandan Doksorubisin TNBC için öne çıkan bir kemoterapötik ajan olup lösemi ve lenfoma dahil; ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere bir dizi kanser için yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok kanserin tedavisindeki önemli potansiyeline rağmen, etkinliği derin ve istenmeyen sitotoksik yan etkilerinin yanı sıra kanser hücrelerinin ajana karşı kazanılmış direnci nedeniyle sekteye uğramaktadır. Her ne kadar bu direncin altında yatan mekanizmalar bütünüyle belgelenmemiş olsa da (bu problemin üstesinden gelmek için mantıklı bir strateji), birçok araştırmacı, temel olarak yan etkileri en aza indirmeyi ve dirence yol açan mekanizmaları hedeflemeyi amaçlayan kombinasyon terapisi stratejilerini formüle etmeyi öne sürmektedir.

Bu amaçla yapılan son çalışmalarda, Retinoblastoma yolunun hücredeki aktivasyonu için bu yolu da tetikleyebilecek spesifik CDK4/6 inhibitörleri piyasaya sürülmüştür. Bu inhibitörlerin tamamı, CDK4/6 yapısnı inhibe eder ve inhibisyon ardından hücre siklusunun G1 fazından S fazına ilerlemesini inhibe eder. Sonuç olarak da DNA sentezi bloke olur. CDK4/6 inhibitörlerinin uygulanması, fonksiyonel bir RB yoluna bağlı olarak güçlü bir sitostatik süreç oluşturarak etkisini gösterir. CDK4/6 inhibitörlerinin uygulanması ile meydan agelen bu hücresel yanıt hem malign hem de tümör dışı hücrelerle beraber tümör ksenograftlarında ve transgenik fare modellerinde de benzer özellikler sergilemektedir. Daha da önemlisi, abemaciclib şu anda klinikte hem tek bir ajan olarak hem de diğer hedeflenen ajanlar (örn. letrozol) ve sitotoksik bileşikler (örn. paklitaksel, 5-FU) ile kombinasyon halinde test edilmeye devam etmektedir. Bununla birlikte bugüne kadar, Abemaciclibin, kanser hücrelerinin antrasiklinler gibi genotoksik ajanlara karşı sitotoksik tepkisi üzerindeki mekanik etkisini inceleyen ve muhtemelen etkinlik için hücre çoğalmasını gerektiren herhangi bir klinik öncesi çalışma oldukça azdır.

Bu nedenle, moleküler biyolojik teknikler kullanılarak elde edilecek bulgular, abemaciclibin anti-kanser fonksiyonlarının detaylarını ortaya çıkarmanın yanı sırasında protein metabolizması üzerindeki etkilerini anlamak açısından da oldukça

faydalı olacaktır. Protein metabolizmasındaki değişimlerin ve antioksidan aktivitelerin tespiti ve kombinasyon terapisinin verilen hücre hattı üzerindeki etkilerin protein ve yolak seviyesinde belirlenmesi, ileride meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek olan protein hedeflerinin belirlenmesi konusunda yol gösterici olacaktır.

Kaldı ki, doksorubisin ve abemaciclib gibi iki gelecek vaat eden ilacın kombinasyon terapisi şeklinde kullanılması her birinin ayrı ayrı barındırdıkları avantajların öne çıkarılması sayesinde konsantrasyonların azaltılması ve bu sayede de ilaçların neden oldukları yan etkileri azaltma olanağı sunması açısından kombinasyon terapisi olarak da büyük bir avantaj sunmaktadırlar.

Tez çalışmamızda uyguladığımız her 2 kemoterapötik ajanın meme kanserinde farklı moleküler alt tipleri temsil eden MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda MDA-MB-231 hücre hattında IC50 dozlarının DOX için 0,1 μM, ABE için 0,5 μM olduğunu tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada araştırmacılar IC50 dozlarını MDA-MB-231 hücre hattında DOX ve ABE için sırasıyla 0,565 μM ve 1,61 μM olarak bulmuşlardır (Fleischer vd., 2021). Diğer taraftan DOX ve ABE kemoterapik ajanlarının teker teker ve kombinasyon şeklinde uygulamaları sonucunda elde edilen IC50 değerleri, ComBenefit programı olan Bliss Synergy ve Antagonism olayı ile incelendiğinde hesaplanan IC50 değerleri ABE için 0.498 μM , DOX için 0.101 μM ve kombinasyon terapisi için 0.025 μM DOX + 0.25 μM ABE olarak belirlenmiştir. Dolayısı ile, ComBenefit ve CompuSyn hesaplamalarından elde edilen verilerin ışığında, DOX ve ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları olarak DOX kemoterapik ajanı için 0.025 μM ve ABE kemoterapik ajanı için 0.25 μM olarak belirlenmiştir ve bundan sonraki deneylerde kombinasyon terapi etkilerini araştırdığımız çalışmalarda kombinasyon terapisini oluşturan DOX ve ABE konsantrasyonları olarak belirlenmiştir.

Bu değerleri CompuSyn yazılımındaki kombinasyon terapisi için kullandığımızda, bu kombinasyonun DOX için Sinerjistik Etkiyi arttırmak için en uygun doz olduğunu bulduk. Bu dozların kombinasyon etkisini DOX ve ABE arasındaki ilişki açısından daha ayrıntılı olarak analiz ettiğimizde, Kombinatoryal İndeksi (CI) 1'den düşük olarak hesapladık; bu, iki ajan arasında istenen sinerjistik etkiyi göstermektedir. Bu, araştırmacıların ABE için 1 ila 6 μM arasındaki dozlar için aynı

hesaplamayı yaptığı, DOX konsantrasyonunu 0,565 µM'de tuttuğu ve CI değerlerinin tamamının 1'den küçük olduğunu bulduğu ve istenen sinerjistik ilişkiyi gösteren 2019 çalışmasında hesaplanan değerlerle uyumludur (Fleischer vd., 2021). Bu nedenle MTT, CompuSyn ve CompBenefit olmak üzere üç ayrı analizimizin, kabul edilebilir varyasyon dahilinde ve literatürde bildirilen sinerjistik değerlere uygun olarak aynı sonuçları vermiştir. Her ne kadar literatürde karşılaştırılabilir bir doz kombinasyonu bulamasak da mevcut sonuçlara göre Sinerjistik etkiyi ComBenefit analizini güvenli bir değişim marjıyla kullanarak hesaplanmıştır.

Kombinasyon terapisinde DOX için önemli ölçüde daha düşük bir doza rağmen hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MDA-MB-231 hücreleri için farklı olmadığını belirtmek de önemlidir, bu da kombinasyon terapisine atfedilebilir. Bu durum tedavinin verimliliğini ve etkinliğini büyük ölçüde azaltan DOX ile ilişkili kardiyotoksisite göz önüne alındığında özellikle önemlidir (Dulf vd., 2023).

Bu nedenle yüksek doz tedavi planına devam edemeyen hastalar için ABE'nin tedavi planına eklenmesiyle daha düşük dozda DOX uygulamasının büyük önem taşıyabileceğine dikkat edilmelidir. Son olarak, daha düşük bir dozun aynı zamanda kemoterapi rejimine direnç gelişimini de geciktirebileceği de göz önünde bulundurulması gereken oldukça önemli bir faktördür.

MCF-7 hücre hattı içinse hesaplanan IC50 değerleri ABE için 0.254 µM , DOX için 0.118 µM ve kombinasyon terapisi için 0.025 µM DOX + 0.25 µM ABE olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, ComBenefit ve CompuSyn hesaplamalarından elde edilen hesaplamaların sonucunda, DOX ve ABE kombinasyon terapi konsantrasyonları olarak DOX kemoterapik ajanı için 0.025 µM ve ABE kemoterapik ajanı için 0.25 µM olarak belirlenmiştir;ancak görülen etki sinerjistik değil antagonistik olduğundan ve farklı moleküler profillere sahip meme kanseri hücre hatlarındaki sinerjik etkinin mekanizması net olarak saptanmaya çalışıldığından bundan sonraki aşamalarda yalnızca kombine uygulamanın sinerjistik etki gösterdiği MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde çalışmalar devam etmiştir.

Deney gruplarının MDA-MB-231 hücrelerinde floresan mikroskobik analizine göz attığımızda ise, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması üzerinde, DOX ve ABE'nin tek başına etkisine kıyasla kombinasyon terapisinin, daha önemli bir

etkiye sahip olduğunu ve aynı zamanda PI boyamada da gözlemlendiği gibi daha yüksek bir hücresel ölüm yüzdesine yol açtığını gösterilmiştir.

Hücrelerdeki antioksidan seviyelerini incelediğimizde SOD'un indüksiyon gösterdiği, MDA'nın azaldığı ve GSH seviyelerinin arttığı görülmüştür. Bu da ajanların tek başına uygulandığında hem tedavi etkinliğini artırdığını hem de etkisinin daha da arttığını gösteriyor. kombinasyon halinde uygulandığında.

MDA-MB-231 hücre hattında gerçekleştirilen floresan mikroskopisi,colony forming assay ve antioksidan aktivite deneyleri sonucunda da açığa çıkarılan verilerle beraber yaptığımız bu başlangıç analizler ve ileride yapılacak daha ileri moleküler analizlerden de elde edilecek bulgular ışığında DOX ve ABE kombinasyon terapisinin klinik kullanıma uyarlanması sırasında gerekli protein, yolak ve moleküler seviyede bilgiyi sağlaması açısından önemli bir özgün değer taşımaktadır. Bu amaçla MDA-MB-231 hücreleri kullanılarak gerçekleştirdiğimiz immünoblotlama analizleri yoluyla bu fenomenin daha ileri analizi, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında kombinasyon terapisinin etkinliğindeki bu artışın, kesilmiş Kaspaz 3, PARP ve kesilmiş PARP seviyelerindeki değişiklikler yoluyla olduğunu göstermiştir. Diğer yandan tekil ve kombine ilaç uygulamalarına Bax ekspresyonunda değişime baktığımızda Bax ekspresyonunda önemli bir artış gösterilmiştir. Bax proteini, Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik üyeleri arasında yer aldığından, hücresel fizyolojideki değişikliklerin altında yatan neden bu olabilir.

Apoptozun bir diğer önemli biyolojik belirteci olan bölünmüş PARP markırı da, MDA-MB-231 hücrelerinin kombinasyon terapisi ile muamelesi üzerine, ajanların tek başına uygulanmasına kıyasla önemli bir artış göstermiştir. Tüm bu artışlar, kanser hücrelerinde proapoptotik üyelerin, apoptotik mekanizmaların ve hücresel ölümün uyarılmasında kombinasyon tedavisinin önemine işaret etmektedir.

Önemli ölçüde daha düşük bir dozda daha iyi bir etki elde etmenin, kombinasyon terapisinin önemli bir faydası olduğuna inanılmaktadır. Kombinasyon terapisinde uygulanan strateji sayesinde tedavi planına uyma süreci artmakta ve hastanın yaşam kalitesi de bu şekilde daha hızlı yükselebilmektedir. Bu bakımdan bu düşük dozun klinik açıdan büyük önem taşıyacağına inanıyoruz. Bu sonuçlara dayanarak, kombinasyon tedavisinin artan etkisinin araştırılmasının klinik uygulama için iyi bir aday olabileceğini öne sürmek mantıklıdır.

Diğer yandan CDK4/6 inhibitörlerinin kullanımı TNBC'de daha zordur; çünkü daha sık RB1 kaybı görülür. Hasta alt gruplarına bakıldığında, AR ekspresyonu ile RB1 ekspresyonu arasında bir ilişki sebebiyle özellikle androjen reseptörü (AR) pozitif TNBC olan hastalar bu terapiye daha hassas olabilir.

Yaptığımız çalışma ile ilk defa doksorubisin ve abemaciclib ajanlarının kombinasyon terapisinin belirlediğimiz hücre hattındaki moleküler etkileri araştırılmış ve bu kombinasyonun sitotoksik ve apoptotik bazı moleküler yolları ortaya konulmuştur. Yapılan çalışma çok küçük bir adım olsa bile yapılacak hayvan deneyleri ve ileri çalışmalar yoluyla halen kadınlar arasında çok önemli bir sağlık sorunu olan meme kanserinin tedavisi için kombinasyon terapi denemelerindeki faz çalışmalarının önü açılacaktır. Kavramsal olarak ilk kez bu iki ajanın moleküler etkileri; belirlediğimiz hücre hatlarında halen protein ekspresyonu çalışmalarında devamlılığını koruyan immünoblotlama metoduyla denenmiş olup çalışmadan elde edilen bulgular, ABE ve DOX.kombinasyon terapisinin klinik kullanımına yönelik verileri sağlamak ile kalmayıp, bu amaç ile bir sonraki basamakta hazırlanacak doku veya hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi için gerekli moleküler bilgileri tamamlayacaktır.

Mevcut çalışma, farmakolojik CDK4/6 ile doksorubisinin MDA-MB-231 hücrelerinde kombine etkisinin, TNBC'nin antrasiklin bazlı kemoterapiye i*n vitro* yanıtı üzerindeki etkisini belirlemeye çalışılırken 3 boyutlu hücre kültürü ile de bu etkinin varlığı denenebilir. Diğer yandan daha fazla sayıda farklı moleküler profile sahip meme kanseri hücre hatları, farklı tümör hatları ve hayvan deneylerinde ileride yapılacak olan çalışmalarla *in vitro* ve *in vivo* olarak da bu etki belirlenebilecektir.

CDK4/6 inhibitör yapılarında kanser malignitesinin yol almasını geciktirme yolları açısından bakıldığında; ilk düşünüldüğünden çok daha fazla yolak ve süreç olduğu ortadadır. CDK4/6 yapısının *in vivo* süreçte inhibisyonu ile alakalı yapılan çalışmalarda bu inhibitörlerin sitostazı tetiklemesi dışında birçok moleküler mekanizmayı tetiklediği de açığa çıkarılmıştır. Zaten kanserde tek bir ilacın alternatif mekanizmaları devreye soktuğunu düşünmek de tedavi açısından oldukça caziptir. Bu nedenle farklı meme kanseri alt tiplerinde abemaciclib ve doksorubisin kombinasyonunun farklı etkilerinin belirlenmesi insanlarda tedavinin önünü açmak açısından oldukça faydalı olacaktır.

Dolayısıyla, analizlerimiz sonucunda abemaciclib ve doksorubisin kombinasyon formunda uygulamasının üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) gibi hem moleküler mekanizmaları, hem tedavi stratejileri geliştirilmesi, hem de sağkalım oranlarının iyileştirilmesi açısından zorluklar taşıyan bir kanser türü için önemli sonuçlar elde edeceğini göstermiş bulunmaktayız. Sonuç olarak, doksorubisin ve abemaciclib tek başına kullanımlarında etkili ancak yan etkileri nedeni ile kolay kullanıma uygun olmayan karakterlerini, bu iki ilacın kombinasyon formunda kullanımı ile daha etkin ve etkili hale getirdiğimizi hücre proliferasyonunu daha etkin bir şekilde baskılaması, apoptozise direnci azaltması ve apoptozise yatkınlığı artırması ile gözlemlemiş bulunmaktayız.

KAYNAKÇA

Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y. J., Widlund, H. R., Chick, J. M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S. P., Braun, P., & Sicinski, P. (2011). A systematic screen for CDK4/6 substrates links foxm1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. Cancer Cell, 20(5), 620–634. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.001

Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., & Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. Nature Reviews Drug Discovery, 14(2), 130–146. https://doi.org/10.1038/nrd4504

Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. Science, 281(5381), 1305–1308. https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305

Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, *24*(2), 157–167. https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200

Bedoui, S., Herold, M. J., & Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21(11), 678–695. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0270-8

Billen, L. P., Shamas-Din, A., & Andrews, D. W. (2008). Bid: A Bax-like BH3 protein. Oncogene, 27(S1). https://doi.org/10.1038/onc.2009.47

Bisi, J. E., Sorrentino, J. A., Roberts, P. J., Tavares, F. X., & Strum, J. C. (2016). Preclinical characterization of g1t28: A novel cdk4/6 inhibitor for reduction of chemotherapy-induced myelosuppression. Molecular Cancer Therapeutics, 15(5), 783–793. https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-15-0775

Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. Current Opinion in Cell Biology, 15(6), 725–731. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.009

Bombonati, A., & Sgroi, D. C. (2010). The molecular pathology of breast cancer progression. The Journal of Pathology, 223(2), 308–318. https://doi.org/10.1002/path.2808

Cailleau, R., Olivé, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. In Vitro, 14(11), 911–915. https://doi.org/10.1007/bf02616120

Cardoso, F., Cataliotti, L., Costa, A., Knox, S., Marotti, L., Rutgers, E., & Beishon, M. (2017). European breast cancer conference manifesto on Breast Centres/units. European Journal of Cancer, 72, 244–250. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.023

Chen, P., Lee, N. V., Hu, W., Xu, M., Ferre, R. A., Lam, H., Bergqvist, S., Solowiej, J., Diehl, W., He, Y.-A., Yu, X., Nagata, A., VanArsdale, T., & Murray, B. W. (2016). Spectrum and degree of CDK drug interactions predicts clinical performance. Molecular Cancer Therapeutics, 15(10), 2273–2281. https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-16-0300

Choi, Y. J., & Anders, L. (2013). Signaling through cyclin D-dependent kinases. Oncogene, 33(15), 1890–1903. https://doi.org/10.1038/onc.2013.137

Chou, T.-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. Cancer Research, 70(2), 440–446. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1947

Ciemerych, M. A., Kenney, A. M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R. T., Rowitch, D. H., Gardner, H., & Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. Genes & Development, 16(24), 3277–3289. https://doi.org/10.1101/gad.1023602

Conn, P. M. (2017). Animal models for the study of human disease. Academic Press is an imprint of Elsevier. Chapter 40 - Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer, Editor(s): P. Michael Conn, Animal Models for the Study of Human Disease, Academic Press, 2013,p.: 997-1018,ISBN 9780124158948.

Cooper, A. B., Sawai, C. M., Sicinska, E., Powers, S. E., Sicinski, P., Clark, M. R., & Aifantis, I. (2006). A unique function for cyclin D3 in early B cell development. Nature Immunology, 7(5), 489–497. https://doi.org/10.1038/ni1324

Correia, A. S., Gärtner, F., & Vale, N. (2021). Drug combination and repurposing for cancer therapy: The example of breast cancer. Heliyon, 7(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05948

Cosentino, K., & García-Sáez, A. J. (2017). Bax and Bak pores: Are we closing the circle? Trends in Cell Biology, 27(4), 266–275. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.004

Cox, J., & Weinman, S. (2016). Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. Hepatic Oncology, 3(1), 57–59. https://doi.org/10.2217/hep.15.41

Cultivation of human breast carcinomas2. (1958). JNCI: Journal of the National Cancer Institute. https://doi.org/10.1093/jnci/21.6.1131

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2013). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(1), 49–63. https://doi.org/10.1038/nrm3722

Dallavalle, S., Dobričić, V., Lazzarato, L., Gazzano, E., Machuqueiro, M., Pajeva, I., Tsakovska, I., Zidar, N., & Fruttero, R. (2020). Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. Drug Resistance Updates, 50, 100682. https://doi.org/10.1016/j.drup.2020.100682

Di Veroli, G. Y., Fornari, C., Wang, D., Mollard, S., Bramhall, J. L., Richards, F. M., & Jodrell, D. I. (2016). Combenefit: An interactive platform for the analysis

and visualization of drug combinations. Bioinformatics, 32(18), 2866–2868. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw230

Diehl, J. A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. Cancer Biology & Therapy, 1(3), 226–231. https://doi.org/10.4161/cbt.72

Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes & Development, 12(22), 3499–3511. https://doi.org/10.1101/gad.12.22.3499

Dulf, P. L., Mocan, M., Coadă, C. A., Dulf, D. V., Moldovan, R., Baldea, I., Farcas, A.-D., Blendea, D., & Filip, A. G. (2023). Doxorubicin-induced acute cardiotoxicity is associated with increased oxidative stress, autophagy, and inflammation in a murine model. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 396(6), 1105–1115. https://doi.org/10.1007/s00210-023-02382-z

Ekert, P. G., & Vaux, D. L. (2005). The mitochondrial death squad: Hardened killers or innocent bystanders? Current Opinion in Cell Biology, 17(6), 626–630. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.001

Ethier SP, Mahacek ML, Gullick WJ, Frank Tja ND Weber BL. (1993). Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Research*, 53:627-635.

Fleısher, B., Werkman, C., Jacobs, B., Varkey, J., Taha, K., & Aıt-Oudhıa, S. (2022). Kifc1: A reliable prognostic biomarker in RB-positive triple-negative breast cancer patients treated with doxorubicin in combination with Abemaciclib. Cancer Diagnosis & Prognosis, 2(5), 525–532. https://doi.org/10.21873/cdp.10137

Fleisher, B., Lezeau, J., Werkman, C., Jacobs, B., & Ait-Oudhia, S. (2021). In vitro to clinical translation of combinatorial effects of doxorubicin and Abemaciclib in RB-positive triple negative breast cancer: A systems-based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling approach. Breast Cancer: Targets and Therapy, Volume 13, 87–105. https://doi.org/10.2147/bctt.s292161

Forrest, R. A., Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Kimura, K.-I., Phillips, D. R., & Cutts, S. M. (2012). Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. Biochemical Pharmacology, 83(12), 1602–1612. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.026

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nature Protocols, 1(5), 2315–2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

Galbán, S., & Duckett, C. S. (2009). Xiap as a ubiquitin ligase in cellular signaling. Cell Death & Differentiation, 17(1), 54–60. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.81

Gelbert, L. M., Cai, S., Lin, X., Sanchez-Martinez, C., del Prado, M., Lallena, M. J., Torres, R., Ajamie, R. T., Wishart, G. N., Flack, R. S., Neubauer, B. L., Young, J., Chan, E. M., Iversen, P., Cronier, D., Kreklau, E., & de Dios, A.

(2014). Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor ly2835219: In-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. Investigational New Drugs, 32(5), 825–837. https://doi.org/10.1007/s10637-014-0120-7

Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17(sup3), 43–46. https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.43

Goel, S., Bergholz, J. S., & Zhao, J. J. (2022). Targeting CDK4 and CDK6 in cancer. Nature Reviews Cancer, 22(6), 356–372. https://doi.org/10.1038/s41568-022-00456-3

Gong, X., Litchfield, L. M., Webster, Y., Chio, L.-C., Wong, S. S., Stewart, T. R., Dowless, M., Dempsey, J., Zeng, Y., Torres, R., Boehnke, K., Mur, C., Marugán, C., Baquero, C., Yu, C., Bray, S. M., Wulur, I. H., Bi, C., Chu, S., … Buchanan, S. G. (2017). Genomic aberrations that activate D-type cyclins are associated with enhanced sensitivity to the CDK4 and CDK6 inhibitor abemaciclib. Cancer Cell, 32(6). https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.006

Gorini, S., De Angelis, A., Berrino, L., Malara, N., Rosano, G., & Ferraro, E. (2018). Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: Focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 1–15. https://doi.org/10.1155/2018/7582730

Green, D. R. (2019). The Coming Decade of Cell Death Research: Five riddles. Cell, 177(5), 1094–1107. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.024

Guiley, K. Z., Stevenson, J. W., Lou, K., Barkovich, K. J., Kumarasamy, V., Wijeratne, T. U., Bunch, K. L., Tripathi, S., Knudsen, E. S., Witkiewicz, A. K., Shokat, K. M., & Rubin, S. M. (2019). P27 allosterically activates cyclin-dependent kinase 4 and antagonizes palbociclib inhibition. Science, 366(6471). https://doi.org/10.1126/science.aaw2106

Hafner, M., Mills, C. E., Subramanian, K., Chen, C., Chung, M., Boswell, S. A., Everley, R. A., Liu, C., Walmsley, C. S., Juric, D., & Sorger, P. K. (2019). Multiomics profiling establishes the polypharmacology of FDA-approved CDK4/6 inhibitors and the potential for differential clinical activity. Cell Chemical Biology, 26(8). https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.05.005

Hanby, A. M., & Hughes, T. A. (2007). in situ and invasive lobular neoplasia of the breast. Histopathology, 52(1), 58–66. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02891.x

Hasanzadeh, D., Mahdavi, M., Dehghan, G., & Charoudeh, H. N. (2017). Farnesiferol C induces cell cycle arrest and apoptosis mediated by oxidative stress in MCF-7 cell line. Toxicology Reports, 4, 420–426. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.07.010

Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., … Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, *8*(5). https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76. Genome Biol 2007, 8:R76.

Hu, M. G., Deshpande, A., Enos, M., Mao, D., Hinds, E. A., Hu, G., Chang, R., Guo, Z., Dose, M., Mao, C., Tsichlis, P. N., Gounari, F., & Hinds, P. W. (2009). A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis. Cancer Research, 69(3), 810–818. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2473

Human Tissue Authority. (n.d.). *Home*. Home | Human Tissue Authority. https://www.hta.gov.uk/

Hunt, T. (2002). Nobel lecture: Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions. Bioscience Reports, 22(5–6), 465–486. https://doi.org/10.1023/a:1022077317801

Inao, T., Kotani, H., Iida, Y., Kartika, I. D., Okimoto, T., Tanino, R., Shiba, E., & Harada, M. (2019). Different sensitivities of senescent breast cancer cells to immune cell-mediated cytotoxicity. Cancer Science, 110(9), 2690–2699. https://doi.org/10.1111/cas.14116

Jeffrey, P. D., Tong, L., & Pavletich, N. P. (2000). Structural basis of inhibition of CDK–cyclin complexes by INK4 inhibitors. Genes & Development, 14(24), 3115–3125. https://doi.org/10.1101/gad.851100

Jeselsohn, R., Schiff, R., & Grinshpun, A. (2021). Restoring order at the cell cycle border: Co-targeting CDK4/6 and cdk2. Cancer Cell, 39(10), 1302–1305. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.007

Jiang, Z., Jones, R., Liu, J. C., Deng, T., Robinson, T., Chung, P. E. D., Wang, S., Herschkowitz, J. I., Egan, S. E., Perou, C. M., & Zacksenhaus, E. (2011). RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. Cell Cycle, 10(10), 1563–1570. https://doi.org/10.4161/cc.10.10.15703

Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/.

Johnston, S., Emde, A., Barrios, C., Srock, S., Neven, P., Martin, M., Cameron, D., Janni, W., & Gnant, M. (2023). Cyclin-dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) inhibitors: Existing and emerging differences. JNCI Cancer Spectrum, 7(4). https://doi.org/10.1093/jncics/pkad045

Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023). Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. Cells, 12(4), 659. https://doi.org/10.3390/cells12040659

Ke, F. F. S., Vanyai, H. K., Cowan, A. D., Delbridge, A. R. D., Whitehead, L., Grabow, S., Czabotar, P. E., Voss, A. K., & Strasser, A. (2018). Embryogenesis and adult life in the absence of intrinsic apoptosis effectors bax, Bak, and bok. Cell, 173(5). https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.036

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 26(4), 239–257. https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent apo-1 (FAS/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (disc) with the

receptor. The EMBO Journal, 14(22), 5579–5588. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x

Knudsen, E. S., & Wang, J. Y. (2010). Targeting the RB-pathway in cancer therapy. Clinical Cancer Research, 16(4), 1094–1099. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-0787

Kurz, E. U., Douglas, P., & Lees-Miller, S. P. (2004). Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. Journal of Biological Chemistry, 279(51), 53272–53281. https://doi.org/10.1074/jbc.m406879200

Levenson AS, Jordan VC. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57:3071-3078.

Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2023). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. Journal of Clinical Oncology, 41(10), 1809–1815. https://doi.org/10.1200/jco.22.02572

Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and ckis: Roles beyond cell cycle regulation. Development, 140(15), 3079–3093. https://doi.org/10.1242/dev.091744

Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W.-X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., … Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. Molecular Cell, 6(6), 1389–1399. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00136-2

Lipscomb, L. A., Peek, M. E., Zhou, F. X., Bertrand, J. A., VanDerveer, D., & Williams, L. D. (1994). Water ring structure at DNA interfaces: Hydration and dynamics of DNA-anthracycline complexes. Biochemistry, 33(12), 3649–3659. https://doi.org/10.1021/bi00178a023

Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. Histopathology, 57(2), 171–192. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03568.x

Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2018). Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. BMC Cancer, 18(1). https://doi.org/10.1186/s12885-017-3953-6

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. Nature Reviews Cancer, 1(3), 222–231. https://doi.org/10.1038/35106065

Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaría, D., Galán, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., & Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6. Cell, 118(4), 493–504. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.002

Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., & Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. Cell, 65(4), 701–713. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90101-4

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and Cardiotoxicity. Pharmacological Reviews, 56(2), 185–229. https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6

Mohseni, M.; Samadi, N.; Ghanbari, P.; Yousefi, B.; Tabasinezhad, M.; Sharifi, S.; Nazemiyeh, H. (2016). Co-Treatment by Docetaxel and Vinblastine Breaks down P-Glycoprotein Mediated Chemo-Resistance. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 19, 300–309.

Mullen, T. D., & Obeid, L. M. (2012). Ceramide and apoptosis: Exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 12(4), 340–363. https://doi.org/10.2174/187152012800228661

Nakamura, J., & Nakamura, M. (2020). DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. DNA Repair, 88, 102806. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102806

Navarro, R., Busnadıego, I., Ruız-Larrea, M. B., & Ruız-Sanz, J. I. (2006). Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced Erk activation in hepatocyte cultures. Annals of the New York Academy of Sciences, 1090(1), 419–428. https://doi.org/10.1196/annals.1378.045

Nebreda, A. (2020). Faculty opinions recommendation of CDK4/6 inhibitors impair recovery from cytotoxic chemotherapy in pancreatic adenocarcinoma. Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature. https://doi.org/10.3410/f.737443896.793573028

Nehdi, A., Ali, R., Alhallaj, A., Alzahrani, H., Samman, N., Mashhour, A., Baz, O., Barhoumi, T., Alghanem, B., Khan, A., Alriyees, L., & Boudjelal, M. (2019). Nuclear receptors are differentially expressed and activated in Kaimrc1 compared to MCF7 and MDA-MB231 breast cancer cells. Molecules, 24(11), 2028. https://doi.org/10.3390/molecules24112028

Nohara, K., Wang, F., & Spiegel, S. (1998). Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. Breast Cancer Research and Treatment, 48(2), 149–157. https://doi.org/10.1023/a:1005986606010

Nurse, P. M. (2002). Nobel lecture: Cyclin Dependent Kinases and cell cycle control. Bioscience Reports, 22(5–6), 487–499. https://doi.org/10.1023/a:1022017701871

O'Neill, K. L., Huang, K., Zhang, J., Chen, Y., & Luo, X. (2016). Inactivation of prosurvival bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. Genes & Development, 30(8), 973–988. https://doi.org/10.1101/gad.276725.115

Pack, L. R., Daigh, L. H., Chung, M., & Meyer, T. (2021). Clinical CDK4/6 inhibitors induce selective and immediate dissociation of p21 from cyclin D-

CDK4 to inhibit CDK2. Nature Communications, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-23612-z

Palumbo, A., Lau, G., & Saraceni, M. (2018). Abemaciclib: The newest cdk4/6 inhibitor for the treatment of breast cancer. Annals of Pharmacotherapy, 53(2), 178–185. https://doi.org/10.1177/1060028018795146

Pandey, K., An, H., Kim, S. K., Lee, S. A., Kim, S., Lim, S. M., Kim, G. M., Sohn, J., & Moon, Y. W. (2019). Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A Review. International Journal of Cancer, 145(5), 1179–1188. https://doi.org/10.1002/ijc.32020

Pennycook, B. R., & Barr, A. R. (2021). Palbociclib-mediated cell cycle arrest can occur in the absence of the CDK inhibitors p21 and p27. Open Biology, 11(11). https://doi.org/10.1098/rsob.210125

Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. International Journal of Oncology, 49(2), 753–762. https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chemistry & Biology, 17(5), 421–433. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012

Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the Claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Research, 12(5). https://doi.org/10.1186/bcr2635

Robinson, T. J., Liu, J. C., Vizeacoumar, F., Sun, T., Maclean, N., Egan, S. E., Schimmer, A. D., Datti, A., & Zacksenhaus, E. (2013). RB1 status in triple negative breast cancer cells dictates response to radiation treatment and selective therapeutic drugs. PLoS ONE, 8(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078641

Rorà, A. G., Ghetti, M., Ledda, L., Ferrari, A., Bocconcelli, M., Padella, A., Napolitano, R., Fontana, M. C., Liverani, C., Imbrogno, E., Bochicchio, M. T., Paganelli, M., Robustelli, V., Sanogo, S., Cerchione, C., Fumagalli, M., Rondoni, M., Imovilli, A., Musuraca, G., … Simonetti, G. (2021). Exploring the ATR-Chk1 Pathway in the Response of Doxorubicin-Induced DNA Damages in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-483365/v1

Salerno, D., Brogioli, D., Cassina, V., Turchi, D., Beretta, G. L., Seruggia, D., Ziano, R., Zunino, F., & Mantegazza, F. (2010). Magnetic tweezers measurements of the nanomechanical properties of DNA in the presence of drugs. Nucleic Acids Research, 38(20), 7089–7099. https://doi.org/10.1093/nar/gkq597

Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 10964–10967

Sarkar, A., & Gandhi, V. (2020). Activation of ATM kinase by Ros generated during ionophore-induced mitophagy in human T and B cell malignancies. Molecular and Cellular Biochemistry, 476(1), 417–423. https://doi.org/10.1007/s11010-020-03917-1

Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. Science, 344(6188), 1164–1168. https://doi.org/10.1126/science.1252809

Shetab-Boushehri SV. (2018). Ellman's method is still an appropriate method for measurement of cholinesterases activities". *EXCLI Journal*, 13;17:798-99.

Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: The Balancing Act of bcl-2 family proteins. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20(3), 175–193. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8

Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeff rey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:10869-10874.

Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma 2. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 51(5), 1409–1416. https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409.

Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clinical Chemistry, 34(3), 497–500. https://doi.org/10.1093/clinchem/34.3.497

Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D. R., & Cutts, S. M. (2006). Doxorubicin-DNA adducts induce a Non-Topoisomerase II–mediated form of Cell Death. Cancer Research, 66(9), 4863–4871. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-3410

Tam, K. (2013). The roles of doxorubicin in hepatocellular carcinoma. ADMET & DMPK, 1(3). https://doi.org/10.5599/admet.1.3.7

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways. Pharmacogenetics and Genomics, 21(7), 440–446. https://doi.org/10.1097/fpc.0b013e32833ffb56

Torres-Guzmán, R., Calsina, B., Hermoso, A., Baquero, C., Alvarez, B., Amat, J., McNulty, A. M., Gong, X., Boehnke, K., Du, J., de Dios, A., Beckmann, R. P., Buchanan, S., & Lallena, M. J. (2017). Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. Oncotarget, 8(41), 69493–69507. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17778

Torres-Guzmán, R., Ganado, M. P., Mur, C., Marugan, C., Baquero, C., Yang, Y., Zeng, Y., Bian, H., Du, J., de Dios, A., Puig, O., & Lallena, M. J. (2022). Continuous treatment with abemaciclib leads to sustained and efficient inhibition of breast cancer cell proliferation. Oncotarget, 13(1), 864–875. https://doi.org/10.18632/oncotarget.28249

Tsang, W. P., Chau, S. P. Y., Kong, S. K., Fung, K. P., & Kwok, T. T. (2003). Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. Life Sciences, 73(16), 2047–2058. https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00566-6

U.S. National Library of Medicine. (n.d.). Doxorubicin. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/208716s006s007s008lbl.pdf

van der Zanden, S. Y., Qiao, X., & Neefjes, J. (2020). New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. The FEBS Journal, 288(21), 6095–6111. https://doi.org/10.1111/febs.15583

Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in cell death, inflammation, and disease. Immunity, 50(6), 1352–1364. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020

Vargo-Gogola, T., & Rosen, J. M. (2007). Modelling breast cancer: One size does not fit all. Nature Reviews Cancer, 7(9), 659–672. https://doi.org/10.1038/nrc2193

VERZENIO® (abemaciclib) tablets, for oral use. (n.d.-a). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/208716s006s007s008lbl.pdf

Wander, S. A., O'Brien, N., Litchfield, L. M., O'Dea, D., Morato Guimaraes, C., Slamon, D. J., & Goel, S. (2022). Targeting CDK4 and 6 in cancer therapy: Emerging preclinical insights related to Abemaciclib. The Oncologist, 27(10), 811–821. https://doi.org/10.1093/oncolo/oyac138

Witkiewicz, A. K., Knudsen, K. E., Dicker, A. P., & Knudsen, E. S. (2011). The meaning of p16ink4aexpression in tumors. Cell Cycle, 10(15), 2497–2503. https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16776

Wu, X., Yang, X., Xiong, Y., Li, R., Ito, T., Ahmed, T. A., Karoulia, Z., Adamopoulos, C., Wang, H., Wang, L., Xie, L., Liu, J., Ueberheide, B., Aaronson, S. A., Chen, X., Buchanan, S. G., Sellers, W. R., Jin, J., & Poulikakos, P. I. (2021). Distinct CDK6 complexes determine tumor cell response to CDK4/6 inhibitors and degraders. Nature Cancer, 2(4), 429–443. https://doi.org/10.1038/s43018-021-00174-z

Wyld, L., Cutress, R., & Morgan, J. (2024). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *50 Landmark Papers Every Breast Surgeon Should Know*, 107–110. https://doi.org/10.1201/b23352-20

Xie, X., Zhang, Y., Wang, Z., Wang, S., Jiang, X., Cui, H., Zhou, T., He, Z., Feng, H., Guo, Q., Song, X., & Cao, L. (2021). ATM at the crossroads of reactive oxygen species and autophagy. International Journal of Biological Sciences, 17(12), 3080–3090. https://doi.org/10.7150/ijbs.63963

Yang, F., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2013). Doxorubicin enhances nucleosome turnover around promoters. Current Biology, 23(9), 782–787. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.043

Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1845(1), 84–89. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Eralp, T. N., Sevinc, A., & Mansuroğlu, B. (2022). Doksorubisin ve Abemaciclib Kombinasyon Terapisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Canlılığına Etkisi. International Conference On Emerging Sources In Science. İstanbul. Bildiri Tarihi:27.05.2022

Makaleler

1. Eralp, T. N., Sevinc, A., & Mansuroğlu, B. (2024). Combination therapy application of Abemaciclib with Doxorubicin in triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Cellular and Molecular Biology, 70(2), 169–177. https://doi.org/10.14715/cmb/2024.70.2.24

Projeler

1. YTÜ BAP FDK-2020-3814. Doksorubisin ve Abemaciclibin Meme Kanseri Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Olarak irdelenmesi.