

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CDK 4/6 İNHİBİTÖRÜ ABEMASİKLİB'İN TRİPLE
NEGATİF MEME KANSER HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep ÖZMAN

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet Ramazan ŞEKEROĞLU

Ortak Danışman : Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER

Haziran 2020

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CDK 4/6 İNHİBİTÖRÜ ABEMASİKLİB'İN TRİPLE
NEGATİF MEME KANSER HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep ÖZMAN

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

“Bu tez/...../2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ	KANAATI	İMZA
Prof.Dr. Mehmet Ramazan ŞEKEROĞLU		
Doç.Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER		
Prof.Dr. Birsen AYDEMİR		
Prof.Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT		
Dr.Öğr.Üyesi Erdem ÇOKLUK		

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

11/06/2020

İmza

Zeynep ÖZMAN

TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, bana her zaman yol gösteren ve destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Ramazan ŞEKEROĞLU başta olmak üzere tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Tez dönemindeki zorluklarla mücadele ettiğim süreçte hep yanımda olan, maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, ilgisiyle, hoşgörüsüyle, bilime karşı olan sevgisiyle, üstün başarılarıyla ve tecrübesiyle bana ışık tutan, beni yetiştiren sayın eş danışman hocam Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e teşekkürü bir borç bilirim. Sayın jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e, Prof. Dr. Birsen AYDEMİR'e ve Dr. Öğr. Üyesi Erdem ÇOKLUK'a katkılarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.

SAÜ'nün bana kattığı en değerli insanlar, birlikte hem güldüğümüz hem ağladığımız, gece, gündüz, hafta içi veya hafta sonu demeden saatlerce benimle birlikte deneylerin çıkmasını bekleyen, can dostum Merve Almula BAKIRDÖĞEN'e ve en sevdiğim öğrencim Oğuzhan AKTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Akademik hayata ilk adımı attığımda elimden tutan, ondan çok şey öğrendiğim, birlikte çalışmaktan hep mutluluk duyduğum Öğr. Gör. Ayşe ERDOĞAN ÇAKAR'a, iyi ki tanıdığım, bana hep güç veren ve cesaretlendiren sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Fatıma Betül TUNCER'e, Arş. Gör. Meltem BOZ'a, Arş. Gör. Elif ÖNDER'e ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma, Arş. Gör. Ezgi DURMUŞ ve Öğr. Gör. Ebru KANIMDAN başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma tez yazım sürecimde bana destek olup bu süreci kolaylaştırdıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte ve her zaman kahrımı çeken, arkadaştan öte ailem olan canım arkadaşlarım Büşra ÖZKAN'a, Sümeyye BATIHAN'a, Fatih GÖKÇE'ye, Enes TARHAN'a, Emre ARDA'ya ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca kendilerinden çok beni düşünen, her zaman sevgilerini ve desteklerini hissettiğim, koşulsuz sevgiyi öğrendiğim, beni bu günlere getiren canım annem Yurdanur ÖZMAN ve canım babam Zeki ÖZMAN'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması SAÜ-BAP birimince 2019-7-24-254 numaralı proje ile desteklenmiştir, desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MEME KANSERİ.....	3
2.1.1. Meme kanseri alt tipleri.....	4
2.1.2. Triple negatif meme kanseri.....	5
2.1.2.1. Tedavi Yöntemleri	6
2.2. CDK 4/6 İNHİBİTÖRLERİ.....	8
2.2.1. Abemasiklib	9
2.2.1.1. Abemasiklibin farmakodinamiği.....	10
2.2.1.2. Abemasiklibin meme kanserindeki etkisi	12
2.2.2. Etki mekanizmaları	12
2.3. APOPTOZ	13
2.3.1. Apoptozun Morfolojisi	14
2.3.2. Apoptozun moleküler mekanizmaları	17
2.3.2.1. İntrinsik Yolak	17
2.3.2.2. Ekstrinsik Yolak	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. GEREÇ	19
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	19
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	19
3.2. YÖNTEM.....	20
3.2.1. Hücre Kültürü	20
3.2.2. WST-1 Canlılık Analizi.....	21

3.2.3. Annexin V Analizi	23
3.2.4. Hücre Siklusu.....	25
3.2.5. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama	25
3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi.....	26
3.2.6.1. RNA İzolasyonu	26
3.2.6.2. cDNA Sentezi.....	26
3.2.6.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	27
3.2.7. Kaspaz-3 Tayini.....	27
3.2.8. İstatistiksel analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. Abemasiklibin sitotoksik etkisinin WST-1 ile değerlendirilmesi.....	29
4.2. Annexin V analizi ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	31
4.3. Hücre döngüsündeki değişimlerin belirlenmesi	35
4.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama	39
4.5. Bcl2, Bax, Ccnd1 ve Rb1 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	42
4.6. Kaspaz-3 ELISA Sonuçları	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKÇA	50
ÖZGEÇMİŞ.....	61

KISALTMALAR VE SİMGELER

5-FU	: 5-Fluorourasil
ADP	: Adenozin difosfat
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATP	: Adenozin trifosfat
BL-1	: Bazal benzeri-1
BL-2	: Bazal benzeri-2
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbon dioksit
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
ER	: Östrojen reseptörü
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm domaini
FASL	: Fas ligandı
FBS	: Fetal sıgır serumu
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2
HR	: Hormon reseptörü
IM	: İmmünmodülatör
LAR	: Luminal androjen reseptörü
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
M	: Mezenkimal

mL	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MSL	: Mezenkimal kök benzeri
PARP	: Poli (ADP riboz) polimeraz
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFS	: Progresyonsuz sağkalım
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinaz
PR	: Progesteron reseptörü
Rb	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı PCR
TK	: Tirozin kinaz
TN	: Triple negatif
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü- α
TNFR1	: TNF- α reseptörü 1
TNMK	: Triple negatif meme kanseri
TRADD	: TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TRAILR	: TRAIL reseptörü
VEGFR	: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü
WST-1	: Suda çözünür tetrazolyum-1

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1 : TNMK Sınıflandırması Lehmann 2011 ve Lehmann 2016.....	6
Şekil 2 : Abemasiklibin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 3 : CDK4/6 aktivitesinin Rb ve E2F ile ilişkisi.....	13
Şekil 4 : Apoptotik süreçte hücre morfolojisindeki değişimler.....	14
Şekil 5 : Apoptotik iç ve dış yolak.....	18
Şekil 6 : WST-1 mitokondriyal enzimlerle formazana indirgenir.....	22
Şekil 7 : Abemasiklib WST-1 Analizi için 96 kuyucuklu plaka düzeneği.....	22
Şekil 8 : Apoptotik süreçte fosfatidilserin-Annexin V bağlanması.....	23
Şekil 9 : 6 kuyucuklu plaka düzeneği.....	24
Şekil 10 : MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında abemasiklibin sitotoksik etkisi	30
Şekil 11 : 48 saat abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V analizi sonuçları.....	32
Şekil 12 : MCF-10A hücrelerinde 48 saatte abemasiklibin apoptotik etkisini gösteren Annexin V analizi sonuçları	33
Şekil 13 : MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında abemasiklibin neden olduğu erken ve geç apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	34
Şekil 14 : MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları.....	36
Şekil 15 : MCF-10A hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları.....	37
Şekil 16 : MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde abemasiklibe bağlı hücre döngüsü değişimleri.....	38
Şekil 17 : MDA-MB-231 hücrelerinin abemasiklib konsantrasyonuna bağlı olarak morfolojik değişimi.....	40
Şekil 18 : MCF-10A hücrelerinde abemasiklib uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak morfolojik değişimlerin AO boyaması ile değerlendirilmesi	41
Şekil 19 : 48 saat boyunca 0.5, 1, 1.5 ve 2 µM abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde <i>Bcl2</i> , <i>Bax</i> , <i>Ccnd1</i> ve <i>Rb1</i> genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler	43
Şekil 20 : Kaspaz-3 ölçümü için oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiği	44
Şekil 21 : Abemasiklib konsantrasyonuna bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki kaspaz-3 protein miktarları.....	45

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 : Meme kanserinin intrinsik alt tipleri	4
Tablo 2 : Metastatik Meme Kanserinde Abemasiklib ile Yapılan Klinik Faz Çalışmaları.....	11
Tablo 3 : Apoptoz ile nekroz arasındaki farklılıklar	16
Tablo 4 : Annexin V-FITC ve PI ile boyanan hücrelerin özellikleri.....	24
Tablo 5 : Abemasiklibin doza ve zamana bağımlı sitotoksisite sonuçları.....	31
Tablo 6 : Abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde kat değişimleri	42

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Triple negatif meme kanseri (TNMK); östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER-2) gen ekspresyonu olmayan, kötü prognoza sahip ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu bir meme kanseri alt tipidir. Son yıllarda meme kanseri tedavisinde hücre döngüsü kontrolünü sağlayan siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri dikkat çekmektedir. Ancak, CDK inhibitörlerinin TNMK tedavisinde etkisine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, TNMK hücrelerinde bir CDK4/6 inhibitörü olan abemasiklibin sitotoksik ve apoptotik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Abemasiklibin MDA-MB-231 TNMK ve MCF-10A kontrol hücrelerinde terapötik etkisi canlılık (WST-1), apoptoz (annexin V), hücre döngüsü, AO/EB boyama, gen ekspresyonu (RT-PCR) ve kaspas-3 (ELISA) analizleri ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR: Abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak canlılığı anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca abemasiklibin hücrelerde apoptotik ölüme ve G0/G1 fazındaki hücre miktarında artışa neden olduğu saptanmıştır. RT-PCR yöntemiyle apoptoz ile ilişkili (*Bcl2* ve *Bax*) genler ve hücre döngüsü ile ilişkili (*Ccnd1* ve *Rb1*) genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiş olup, abemasiklibin TNMK hücrelerinde özellikle *Bax* geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı artış ile birlikte *Ccnd1* ve *Bcl-2* genlerinin ekspresyon düzeylerinde down-regülasyona neden olduğu analiz edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca ELISA analizi ile abemasiklibin artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde aktif kaspaz-3 miktarının anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.01$).

SONUÇ: Mevcut çalışma ile abemasiklibin TNMK üzerindeki potansiyel terapötik etkisi ortaya konmuştur. Elde ettiğimiz bulgular, ER+ HER2- meme kanseri tedavisinde kullanılan abemasiklibin TNMK hücrelerinde de sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Abemasiklib, Apoptoz, Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri, Triple Negatif Meme Kanseri.

SUMMARY

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Triple negative breast cancer (TNBC) is a breast cancer subtype which lacks of gene expression estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor (HER-2) and has poor prognosis and limited treatment options. In recent years, cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors that regulate cell cycle have attracted attention by researchers. However, there are limited studies on the effect of CDK inhibitors in the treatment of TNBC. Therefore, in this thesis, we aimed to determine the cytotoxic and apoptotic effects of abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, in TNBC cells.

MATERIAL AND METHOD: Viability (WST-1), apoptosis (annexin V), cell cycle, AO/EB staining, gene expression (RT-PCR) and caspase-3 (ELISA) analyzes were performed in MDA-MB-231 TNBC cell line and MCF-10A control cells.

RESULTS: Abemaciclib significantly reduced the viability of MDA-MB-231 and MCF-10A cell lines in a dose- and time-dependent manner ($p < 0.05$). Additionally, abemaciclib induced apoptotic death and increased in the amount of cells in the G0/G1 phase. When expression levels of apoptosis-related (*Bcl2* and *Bax*) genes and the cell cycle-related (*Ccnd1* and *Rb1*) genes were investigated by RT-PCR method, abemaciclib caused down-regulation in the expression levels of *Ccnd1* and *Bcl-2* genes, and also significantly increased the expression level of the *Bax* gene in TNBC cells ($p < 0.05$). Furthermore, we determined that the level of active caspase-3 through ELISA analysis significantly increased in MDA-MB-231 and MCF-10A cells depending on abemaciclib concentration ($p < 0.01$).

CONCLUSION: The potential therapeutic effect of abemaciclib on TNBC has been revealed in the current study. Our findings show that abemaciclib, which is used in the treatment of ER + HER2- breast cancer, also has cytotoxic and apoptotic effects in TNBC cells.

Keywords: Abemaciclib, Apoptosis, Cyclin Dependent Kinase Inhibitors, Triple Negative Breast Cancer.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malign tümörlerden biridir (Ezzati, Yousefi, Velaei and Safa 2020). Ayrıca meme kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 40.000 kişinin ölümüne sebep olmakta ve dünyada kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir (Go, Mehta, Bihun, Carpenter and Ghani 2020). Meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) gibi moleküler belirteçlerin varlığına bağlı olarak 3 ana alt tipe ayrılmaktadır: Hormon reseptörü pozitif (HR+) /HER2 negatif (HER2-) (hastaların %70'i), HER2 pozitif (HER2+) (%15-%20) ve triple negatif (HR-, HER2-) (%15) alt tipleridir (Fragomeni, Sciallis and Jeruss 2018). Triple negatif meme kanseri (TNMK) diğer meme kanseri alt tiplerine göre klinik olarak daha agresiftir ve kötü prognoza sahiptir. Metastatik TNMK için genel sağkalım süresi yaklaşık 1 yıl iken, diğer 2 alt tip için bu süre yaklaşık 5 yıla kadar uzamaktadır (Azzam et al 2020). Ayrıca, TNMK hastalarının tedavisinde sadece kemoterapi kullanılması, tedavi seçeneklerinin kısıtlı olmasına ve hastalarda etkin sonuçların elde edilememesine neden olmaktadır (Waks and Winer 2019). Bu nedenle, hastalarda sağkalım süresinin arttırılması ve daha iyi prognozun sağlanması için yenilikçi tedavi stratejilerine gerek duyulmaktadır.

Hücre döngüsü kontrolünde görev alan siklin-bağımlı kinazların (CDK'ler) aşırı aktivitesi sonucunda kontrolsüz hücre proliferasyonu, kanser gelişmesine neden olmaktadır. CDK4/6 enzimi, siklin D1 ile aktive olmakta ve G1-S geçiş kontrol noktasını regüle etmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarının engellenmesi için siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiş ve CDK4/6 inhibitörlerinin kanser tedavisinde yeni bir hedef olmasını sağlamıştır (Sobhani et al 2019). Bu kapsamda, yeni nesil seçici CDK4/6 inhibitörleri olarak palbosiklib (PD0332991), ribosiklib (LEE011) ve abemasiklib (LY835219) HR+ ileri evre meme kanseri hastalarının tedavisinde birinci basamak tedavide yer almıştır (Clifton et al 2020; Laurentiis et al 2020).

CDK4/6 inhibitörlerinin etki mekanizmasının temelinde, siklin D/CDK/Rb sinyal yolağı üzerinden hücre döngüsünün durmasını sağlayarak hücre proliferasyonunun azalmasına ve tümörün küçülmesine neden olmaktadır (Corona and Generali 2018). Ancak, CDK4/6 inhibitörlerinin TNMK tedavisinde potansiyel etkisine ilişkin yapılan

alışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, TNMK hücrelerinde yeni nesil CDK4/6 inhibitörleri içerisinde en etkili olduğu belirtilen abemasiklibin sitotoksik ve apoptotik etkisinin incelenmesi ve potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en yaygın görülen kanser tipidir ve kansere bağlı ölümlerin başlıca nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Tang et al 2019). İstatistiklere göre 2019 yılında, tüm kanser türleri arasında meme kanseri insidansı %11.6 olup dünyadaki ölümlerin %6.5'ini oluşturmaktadır. Ayrıca, GLOBOCAN 2018'e göre, meme kanseri insidansının 2046 yılında %46'lık bir oranda artış göstereceği belirtilmektedir (Pilaverzadeh et al 2019).

Meme kanseri, memede başlayan bir kanser türü olup meme epitel dokusunda hücrelerin anormal ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterizedir. Meme epitel, yağ ve bağ doku gibi çeşitli dokulardan oluşmaktadır. Memenin dış kısmını epitel dokudan oluşan deri örterken, yağ dokusunun altında süt üreten ve epitel doku kaynaklı süt bezleri yer almaktadır. Birçok süt bezi önce adacık şeklinde bir araya gelerek lobülleri, adacıklar bir araya gelerek lob adı verilen adaları oluşturmaktadır. Meme kanserlerinin çoğu süt bezlerinde ya da süt kanallarında başlayan malignitelerdir (Öztemur, Aydos ve Gür-Dedeoğlu 2014). Meme kanserinin ilk evresinde tümör boyutu küçük olduğundan tedavi bu aşamada daha kolay olmaktadır. Bu nedenle tarama erken teşhis için önem arz etmekte ve aynı zamanda meme kanserinde erken teşhis hayatta kalma şansını %20 arttırmaktadır. (American Cancer Society 2017).

Meme kanseri tedavisindeki ilerlemelere ve ABD'de 5 yıllık genel sağkalım oranı yaklaşık %90 oranında olmasına rağmen, erken evrede teşhis konan hastaların %30'unda metastaz gelişmektedir ve hastaların %6'sı metastatik meme kanseri tanısı almaktadır (Dirix et al 2018). Ayrıca, metastatik meme kanseri nadiren tedavi edilebilmektedir ve hastaların ortalama hayatta kalma süreleri yaklaşık 2 yıldır (NBCC 2001). Ayrıca, Bu nedenle, metastaz meme kanserli hastalarda en önemli ölüm nedenidir (Bertucci et al 2019).

2.1.1. Meme kanseri alt tipleri

Meme kanseri alt tiplerinin belirlenmesinde immünohistokimya ve gen ekspresyon profili tekniklerinden faydalanılmıştır. Bugüne kadar, çeşitli çalışmalarla farklı biyolojik alt tiplerin tedaviye yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri alt tiplerinin tanımlanması ve tümör morfolojisi, tümör boyutu, lenf nodu metastazlarının varlığı ve hormon reseptörlerinin varlığı, HER-2 reseptörünün varlığı gibi çeşitli faktörler tedavi protokolünün oluşturulmasına katkı sağlamıştır (Fragomeni, Sciallis and Jeruss 2018). Günümüzde tümör boyutu, histolojik alt tip, tümör evresi, tümör hücrelerinin lenfovasküler invazyonu ve aksiller lenf nodu durumu gibi meme kanserinin prognozunu etkileyen birçok faktör listelenmiştir ve son 20 yılda bu listeye tümör hücresinin yüzeyinde başka faktörler eklenmiştir. Ayrıca, proliferasyon ve bölünme potansiyelleri rutin olarak incelenip Ki67 değeri olarak belirtilmiştir. Cerrahi olarak tedavi edilen her hastaya şu anda rutin olarak makroskopik ve mikroskopik histolojik analiz, TNM evrelemesi, östrojen reseptörlerinin (ER) progesteron reseptörleri (PR), HER-2 neu reseptörlerinin immünohistokimyasal tanınması ile evreleme ve Ki67 prognostik değer incelemesi yapılmaktadır. Bu parametreler meme kanserinin genetik alt tipini belirleyerek meme kanseri tipini uygun şekilde tedavi etme fırsatı sağlamaktadır (Kondov et al 2018). Meme tümörlerini gruplandırmak için çeşitli sınıflandırmalar geliştirilmiştir. 2000 yılında Perou ve ark. intrinsik sınıflandırma ile meme kanserinin dört alt tipini belirtmiştir: luminal A ve luminal B (ER pozitif), HER2 pozitif ve bazal benzeri.

Tablo 1. Meme kanserinin intrinsik alt tipleri (Perou et al 2000, Feng et al 2018, He, Lv, Song and Zhang 2019).

Alt tipler	Moleküler Özellikler	Ki67	İnsidans
Luminal A	ER+, PR+, HER2- ER-, PR+, HER2- ER+, PR-, HER2-	<%14	%40-70
Luminal B	ER+, PR+, HER2+ ER-, PR+, HER2+ ER+, PR-, HER2+	≥%14	%15-20
HER2+	ER-, PR-, HER2+	≥%14	%5-15
Triple-negatif	ER-, PR-, HER-	≥%14	%15-20

Luminal A alt tipi meme kanserleri arasında en yüksek prevalansa sahiptir. Prognozları çok iyi olup düşük dereceli ve yavaş büyümeye eğilimlidir. Luminal B alt tipi ise genellikle luminal A kanserlerinden daha hızlı proliferasyona ve daha kötü prognoza sahiptir (Ünçel ve ark 2015). HER2+ meme kanseri, meme kanseri hücrelerinin HER2 gen amplifikasyonuna veya aşırı ekspresyonuna sahip bir meme kanseri alt tipidir. HER2 hedefli tedavilerin uygulanmasından önce, tüm meme kanseri alt tiplerinin arasında en kötü prognoza sahip olduğu düşünülmekteydi (Provenzano, Ulaner and Chin 2018). Ancak günümüzde HER2 reseptörünü hedefleyen terapilerle başarıyla tedavi edilebilmektedir.

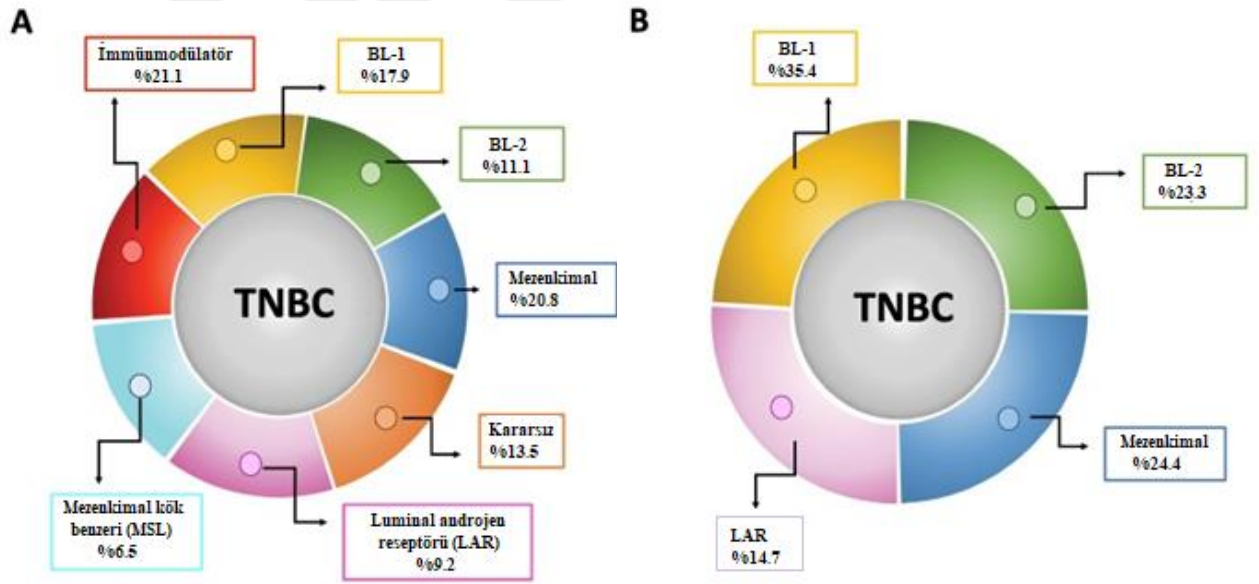
Bazal benzeri meme kanserleri, normal bazal/miyoepitelyal hücrelerde eksprese edilen belirteçlerin ekspresyonu ile karakterize edilen, daha çok genç yaşta ve premenapozal kadınlarda görülen bir meme kanseri alt tipidir. Bazal benzeri meme kanserleri triple-negatif olarak da adlandırılmaktadır ancak tüm bazal benzeri karsinomların triple-negatif olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte bazal benzeri tümörlerin neredeyse %20'si ER+ veya HER2+, triple-negatif meme kanseri (TNMK) alt tipleri arasında yaklaşık %80'inin bazal benzeri alt tipinde olduğu bulunmuştur (Temian, Pop, Irimie and Berindan-Neagoe 2018).

2.1.2. Triple negatif meme kanseri

Tüm meme tümörlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan TNMK ER, PR veya HER2 eksprese etmemesi ile karakterizedir. Triple negatif (TN) tümörler tanıyı izleyen ilk 3 ila 5 yıl içinde uzak nüks riski taşımaktadır (Waks and Winer 2019). Çoğunluğu bazal benzeri fenotipe sahip olan TN tümörlerin diğer alt tiplere göre klinik olarak daha agresif olduğu ve daha kötü prognoza sahip olduğu bilinmektedir (Howlader et al 2014). TNMK 5 yıllık sağkalım oranının %75'ten az olmasıyla birlikte genç ve premenopozal kadınlarda daha sık ortaya çıkmaktadır (Azzam et al 2020). TNMK tümörleri tipik olarak yüksek dereceli büyük boy tümörlerdir. Hastalar sıklıkla III. evrede teşhis edilmektedir (Jitariu, Cimpean, Ribatt and Raica 2017). Ayrıca, çoğu duktal adenokarsinomdur ancak diğer nadir tümörler de (örneğin, metaplastik, medüller ve adenoid kistik tümörler) TN olabilmektedir (Carey, Winer, Viale, Cameron and Gianni 2010). Tümör boyutu, lenf nodu durumu, tümör derecesi, tanı yaşı, cerrahi ve kemoterapi tipi gibi çeşitli klinik-patolojik değişkenlerin TNMK

hastalarında prognozda ve sağkalım sürecinde etkili olduğu gösterilmiştir (Assaker et al 2020). Ayrıca, TNMK hücrelerinin uzak organlara (ağırlıklı olarak kemik, akciğer ve beyin) yüksek metastaz potansiyelinin olması TNMK hastalarının büyük çoğunluğunun temel ölüm nedenidir ve önemli bir klinik problemdir (Neophytou, Boutsikos and Papageorgis 2018).

TNМК'nın, Vanderbilt Sınıflandırması ile mRNA ekspresyon profili yoluyla 6 alt tipi tanımlanmıştır. Bunlar; bazal benzeri-1 (BL-1); bazal benzeri-2 (BL-2); mezenkimal (M); mezenkimal kök benzeri (MSL); immünomodülatör (IM) ve lüminal androjen reseptörü (LAR) alt tipleridir (Şekil 1A) (Lehmann et al 2011). Daha sonra altı farklı alt tip olan bu önceki sınıflandırma dört alt tipe indirgenmiştir (Şekil 1B) (Lehmann et al. 2016). Bu nedenle TN tümörler heterojen yapısı ve agresif seyrinden dolayı diğer meme kanseri alt tiplerine göre dikkat çekmektedir.



Şekil 1. TNМК Sınıflandırması **A)** Lehmann 2011 ve **B)** Lehmann 2016 (Gerratana et al 2018).

2.1.2.1. Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri hastalarının tedavisinde temelde altı farklı standart tedavi kullanılmaktadır. Bunlar; cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapidir (Majeed et al 2014).

Kemoterapi, tek başına ya da cerrahi ve/veya radyoterapi ile kombinasyon halinde TNMK için standart tedavi yöntemidir (Ismail-Khan and Bui 2010). Genellikle TNMK hastaları, özellikle adjuvan ve neoadjuvan tedavi açısından diğer meme kanseri alt tipleri tedavisinde kullanılmakta olan siklofosamid, karboplatin, sisplatin, doksorubisin, 5-fluorourasil (5-FU) gibi kemoterapötik ajanlar ile tedavi edilmektedir (Nofech-Mozes et al 2009).

Taksan ve antrasiklin bazlı kombinasyon kemoterapi erken evre TNMK hastaları için standart tedavi yaklaşımı olmaya devam etmektedir. Antrasiklinler (doksorubisin ve epirubisin) meme kanseri tedavisi için en aktif ilaçlar arasındadır. TNMK hastalarında taksanlarla birlikte antrasiklinler kullanıldığında yüksek etkinlik gözlenmiştir. Taksanların (paklitaksel, dosetaksel, kabazitaksel) TNMK'da reseptör pozitif kanserlerden daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Arslan ve Öksüzoğlu 2019). Ancak, TNMK için etkili, spesifik, hedefli bir terapi mevcut değildir.

TNMK tanısı alan hastalar yaygın olarak tedavide kullanılan kemoterapik ilaçlara karşı dirençlidir ve kötü prognoza sahiptir. Ayrıca, TNMK hücrelerinde hormon reseptörlerinin bulunmaması nedeniyle, bu reseptörleri hedefleyen terapötikler TNMK tedavisinde başarısız olmaktadır. Bu nedenle, TNMK tedavisinde yenilikçi tedavi stratejilerine odaklanılmaktadır (Gomillion 2019).

Son yıllarda TNMK'nin moleküler özelliklerini karakterize etmek ve yeni terapötik seçeneklerin geliştirilmesi amacıyla klinik öncesi ve klinik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu kapsamda özellikle TNMK tedavisinde yenilikçi yaklaşım olarak tirozin kinaz inhibitörleri, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri dikkat çekmektedir.

Tirozin kinazlar (TK'lar), meme kanserinde aşırı eksprese edilmektedir ve metastatik meme kanserinin ilerlemesi ile ilişkilidir. İmatinib, erlotinib, gefitinib, lapatinib, dasatinib ve pazopanib gibi kemoterapik ajanlar TK reseptörlerinin fosforilasyonunu hedefleyerek çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Dasatinib, tek başına veya sisplatin gibi kemoterapötik ajanlarla kombin olarak kullanıldığında TNMK

hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kim, Mueller, Gartner and Boerner 2013).

Diğer yandan, TNMK hastalarının çoğunda yüksek düzeyde EGFR ekspresyonu gözlenmiş, kötü prognoz ve kemoterapiye azalan yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Lapatinib ve setuksimab gibi anti-EGFR ajanların metastatik TNMK’de etkisine yönelik klinik faz II çalışmalar bulunmaktadır (Nabholtz et al 2016). Ayrıca, VEGFR ekspresyonu TNMK’de diğer alt tiplere kıyasla çok daha yüksektir. Bir anti-VEGF monoklonal antikoru olan Bevacizumab (Avastin), TNMK hastalarında yapılan çalışmalarında anti-anjiyogenetik etki göstererek sağkalım süresini uzattığı literatürde belirtilmiştir (Ma et al 2016).

PARP inhibitörlerinin ise, özellikle kalıtsal BRCA mutasyonu taşıyan TNMK hastalarında DNA’da oluşan tek zincir kırıklarının tamir edilmesini engelleyerek hücrelerde apoptotik ölüme yol açtığı belirlenmiştir. Bu kapsamda BRCA1 mutasyonu taşıyan ileri evre meme kanseri tedavisinde klinik faz denemeleri devam eden ve tamamlanarak FDA tarafından onaylanan farklı PARP inhibitörleri bulunmaktadır (Nur Husna, Tan, Mohamud, Dyhl-Polk and Wong 2018).

2.2. CDK 4/6 İNHİBİTÖRLERİ

Hücre döngüsü kontrolünün bozulması ve siklin-bağımlı kinazların (CDK'ler) aktivitesinin aracılık ettiği kontrolsüz hücre proliferasyonu, patolojik bir süreç olarak kanserin temelinde yer almaktadır. Kanser hücrelerinin proliferasyonu inhibe etmek için tasarlanan birinci nesil, seçici olmayan CDK inhibitörlerinin klinik uygulaması, yüksek toksisite riski ve sınırlı etkinliği nedeniyle başarısız olmuştur. Bu nedenle yeni nesil seçici CDK4/6 inhibitörleri olarak palbosiklib (PD0332991), ribosiklib (LEE011) ve abemasiklibin (LY835219) geliştirilmesiyle hücre döngüsünde G1-S-faz geçişinde önemli bir role sahip olduğu bilinen CDK4/6'nın etkin bir şekilde inhibe edilmesi sağlanmıştır (O'Leary, Finn and Turner 2016). Bu üç CDK 4/6 inhibitörü, aromataz inhibitörleri veya fulvestrant ile kombin tedavi şeklinde metastatik meme kanseri tedavisi için günümüzde kullanılmaktadır (Schettini et al 2018). CDK4/6 inhibitörlerinin endokrin tedavisine eklenmesi, ER+ meme kanseri alt tipinde progresyonsuz sağkalım (PFS) süresinde artış ile sonuçlanmıştır (Pernas, Tolaney, Winer and Goel 2018).

Palbosiklib (PD0332991), HER2– metastatik meme kanserine karşı kanıtlanmış etkinliği olan, sınıfının ilk yeni nesil ve seçici CDK4/6 inhibitörüdür. Şubat 2015'te FDA tarafından hormon reseptör pozitif (HR+)/HER2– metastatik meme kanseri hastalarının birinci basamak tedavisinde letrozol ile birlikte kullanımına onay verilmiştir. Şubat 2016'da ise HR+, HER2– ve endokrin tedavisine dirençli metastatik meme kanseri tedavisi için fulvestrant ile birlikte FDA tarafından onaylanmıştır (Concorelli et al 2017).

Ribosiklib (LEE011) de palbosiklib gibi oral olarak alınabilen, seçici, küçük molekülü bir CDK4/6 inhibitörüdür. 13 Mart 2017 tarihinde FDA tarafından postmenapozal, ER+ ve HER2- ileri evre veya metastatik meme kanseri hastalarında, bir aromataz inhibitörü ile kombin başlangıç tedavisi olarak ribosiklibin kullanımı onaylanmıştır (Kwapisz 2017). Ayrıca, ribosiklib'in tek bir ajan olarak veya letrozol ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) inhibitörleri ile kombin halinde ER+ meme kanseri ksenograft tümör modellerinde antitümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Hortobagyi et al 2016). Ribosiklibin MDA-MB-231 TNMK hücre hattında (Li et al 2019) tek başına; HCC70, HCC1806 ve MDA-MB-468 TNMK hücre hatlarında ise PI3K inhibitörü olarak alpelisib (BYL719) ile birlikte apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Teo et al 2017).

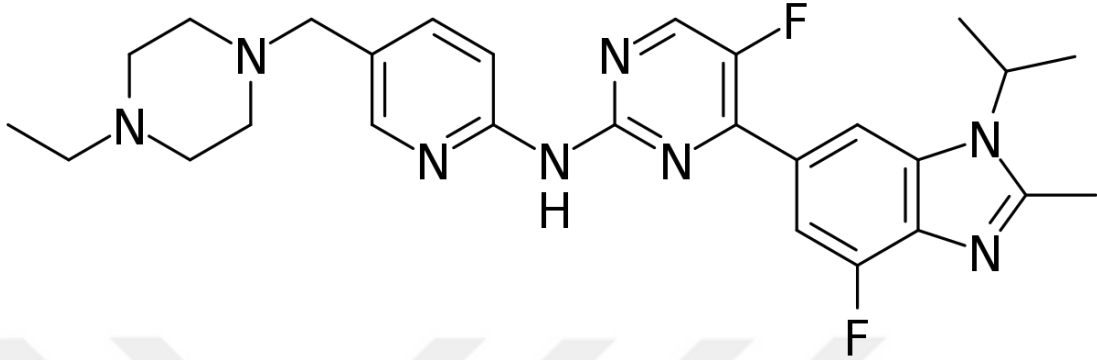
2.2.1. Abemasiklib

Abemasiklib (LY2835219), klinik çalışmalarda HR+ metastatik meme kanseri tedavisinde tek bir ajan olarak aktif, CDK4 ve CDK6 için seçici, ATP-kompetitif ve geri dönüşümlü bir kinaz inhibitörüdür (Torres-Guzman et al 2017).

Klinik olarak abemasiklibin, FDA tarafından onaylanmış diğer CDK4/6 inhibitörleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek tek-ajan aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (O'Brien et al 2018). Üç CDK4/6 inhibitöründen yalnızca abemasiklib, önceden tedavi edilmiş HR+, HER2– meme kanseri için tek ajan olarak onay almıştır, diğer iki inhibitör endokrin ajanlarla birlikte onaylıdır (Liu et al 2020). Ayrıca, abemasiklibin kan-beyin bariyerini yüksek derecede geçme potansiyelinden dolayı, meme kanseri hastalarının yaklaşık %30'unda meydana gelen beyin metastazlarını tedavisinde de potansiyel bir ajan olarak görülmektedir (Nur Husna, Tan, Mohamud, Dyhl-Polk and Wong 2018).

2.2.1.1. Abemasiklibin farmakodinamiği

Abemasiklib, yapısal ve biyolojik olarak palbosiklib ve ribosiklibden farklıdır ve CDK6'ya göre CDK4 için daha fazla seçicidir (Şekil 2).



Şekil 2. Abemasiklibin kimyasal yapısı.

Abemasiklib ileri evre metastatik HR + meme kanserinin tedavisi için etkili ve umut vaat eden bir seçenek olarak görülmektedir. Ayrıca toksisite profili ve oral uygulaması uygun bulunmuştur. Palbosiklib ve ribosiklib tedavisinde hematolojik toksisiteler sıkça görülürken, abemasiklibin diğer CDK4/6 inhibitörlerine göre daha düşük bir nötropeni insidansına sahip olduğu belirtilmektedir. Ancak abemasiklib tedavisi uygulanan hastalarda en sık görülen yan etkilerin başında ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı ve halsizlik yer almaktadır (Eggersmann, Degenhardt, Gluz, Wuerstlein and Harbeck 2019).

Abemasiklib 5 metabolit üretmektedir, fakat sadece abemasiklib ve 3 metabolit - hidroksyabemasiklib (M20), N-desetilabemasiklib (M2) ve hidroksi-N-desetilabemasiklib (M18) - plazma maruziyetinin çoğunu oluşturmaktadır. M2, M20 ve M18 metabolitleri de konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre büyümesini ve hücre döngüsü ilerlemesini inhibe etmektedir. M2 ve M20 metabolitlerinin etkinliği abemasiklibe benzer düzeydeyken M18'in etkinliği 3 ila 20 kat daha az bulunmuştur (Palumbo, Lau and Saraceni 2019).

Abemasiklib ile ilgili devam eden klinik faz çalışmaları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Metastatik Meme Kanserinde Abemasiklib ile Yapılan Klinik Faz Çalışmaları (www.clinicaltrials.gov Erişim Tarihi 11.03.2020).

ID No	Faz	Kombin ilaçlar	Katılımcı Sayısı	Durum
NCT03703466	2	-	72	Yürürlükte, Katılımcı Alınmıyor
NCT02747004	2	Tamoksifen, Proflaktik loperamid	234	Yürürlükte, Katılımcı Alınmıyor
NCT04031885	4	Fulvestrant, Standart kemoterapi	300	Katılımcı Alınmıyor
NCT02102490	2	-	132	Çalışma Tamamlanmış
NCT04188548	1	LY3484356	215	Katılımcı Alınmıyor
NCT03988114	4	Nonsteroidal aromataz inhibitörleri		Geri Çekilmiş
NCT03939897	1/2	Kopanlisib, Kopanlisib Hidroklorür, Fulvestrant	194	Katılımcı Alınmıyor
NCT03130439	2	-	37	Katılımcı Alınmıyor
NCT02675231	2	Trastuzumab, Fulvestrant, Standart kemoterapi	225	Yürürlükte, Katılımcı Alınmıyor
NCT03846583	1	Tukatinib, Trastuzumab, Aromataz Inhibitörleri	53	Henüz Katılımcı Alınmıyor
NCT02057133	1	Letrozol Anastrozol Tamoksifen Eksemestan Everolimus Trastuzumab LY3023414 Fulvestrant Pertuzumab Loperamid Endokrin terapi	198	Katılımcı Alınmıyor
NCT02763566	3	Anastrozol Letrozol Fulvestrant Placebo	463	Yürürlükte, Katılımcı Alınmıyor
NCT02107703	3	Fulvestrant Placebo	669	Katılımcı Alınmıyor

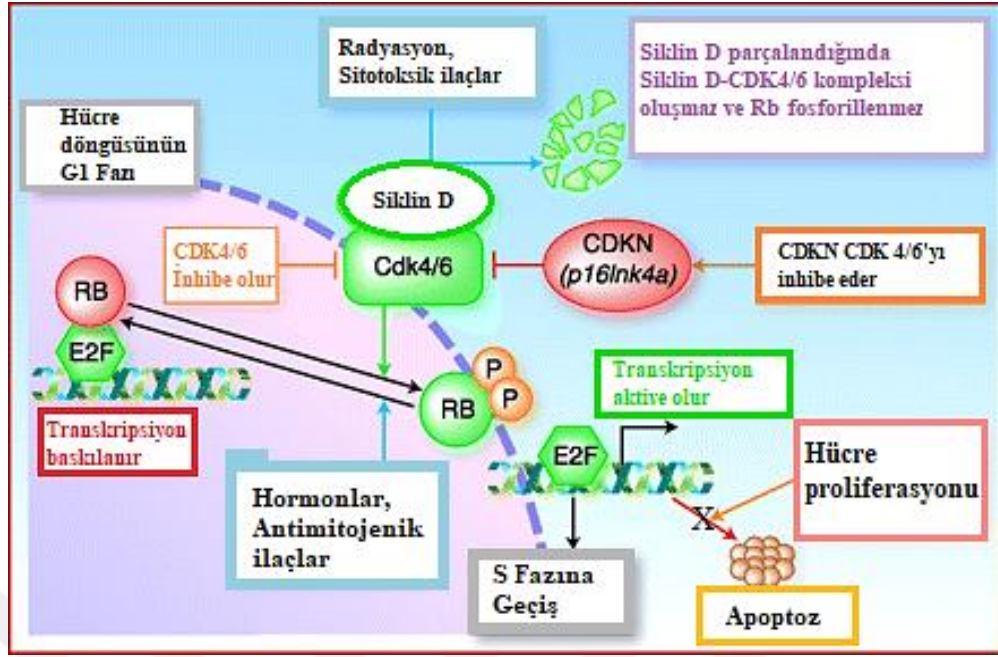
2.2.1.2. Abemasiklibin meme kanserindeki etkisi

Meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli karsinomlar üzerinde CDK4/6 inhibitörleri için çok sayıda klinik çalışma yapılmıştır. Abemasiklib HR+, HER2--meme kanseri tedavisinde potansiyel terapötik etkisi dolayısıyla önemli bir standart tedavi olması beklenmektedir (Kotake and Toi 2018).

Abemasiklib birinci ve ikinci basamak tedavide endokrin terapi ile birlikte HR+ ileri metastatik meme kanseri için FDA onaylı olup, hem endokrin tedavisi hem de kemoterapide ilerlemeyi takiben monoterapi olarak onaylanan tek CDK4/6 inhibitörüdür (Martin and Goldstein 2018). Üç önemli klinik çalışma, MONARCH 1, 2 ve 3, HR+ ve HER2- ileri metastatik meme kanseri tedavisi için abemasiklib'in etkinliğini ve güvenliğini göstermiştir (Dickler et al 2017, Sledge et al 2017, Goetz et al 2017). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* olarak da abemasiklib, retinoblastoma (Rb) fosforilasyonunun inhibisyonunda ve G1 fazında hücre döngüsü durmasında güçlü aktivite göstermiştir (Torres-Guzman et al 2017). Ancak, abemasiklibin TNMK hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkisine dair herhangi bir çalışma henüz mevcut değildir.

2.2.2. Etki mekanizmaları

Çoğu normal hücre (farklılaşmamış ve ölümsüz olmayan hücreler) kendilerini hücre döngüsünün G1/G0 fazına geri dönüşü olmayan bir şekilde kısıtlar ve bu süreç proteininin aktivitesi ve dolayısıyla fosforilasyon durumuna bağlıdır. Rb geni, E2F gen ailesinin transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücre bölünmesini kontrol eden bir tümör süpresör gendir. Kanser hücrelerinde CDK4/6 aktivitesi yaygın olarak yüksektir. Örneğin, siklin D1'in aşırı ekspresyonu meme kanserinde sıklıkla görülmektedir. Siklin D'nin aşırı aktivitesi ile CDK4/6'nın aktivitesinin artması G1-S geçiş kontrol noktasını terapötik bir hedef haline getirir. Sonuç olarak palbosiklib, ribosiklib ve abemasiklib gibi CDK4/6 inhibitörleri, G1 fazındaki hücre döngüsünü bloke ederek kanserin ilerlemesini önlemektedir (Sobhani et al 2019).



Şekil 3. CDK4/6 aktivitesinin Rb ve E2F ile ilişkisi (Knudsen and Wang 2010).

CDK4/6 inhibitörlerinin etki mekanizması incelendiğinde, normal hücrelerde CDK4/6 aktivitesi, hücre döngüsünün G1 evresinden S evresine geçişinde rol almaktadır ve bu geçiş Rb geni tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 3). Rb, E2F gen ailesinin transkripsiyon faktörlerini bağlama kabiliyetine sahiptir. Rb hiper fosforile hale geldiğinde, E2F ve diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi bozulmaktadır. Böylece S fazı için gerekli proteinlerin ilişkili genleri aktif duruma geçmektedir. Bu nedenle, CDK4/6 inhibitörleri, siklin D/CDK/ Rb sinyal yolağını hedefleyerek, hücre döngüsünün durmasını sağlamakla birlikte hücre canlılığının azalmasına ve tümör küçülmesine neden olmaktadır (Corona and Generali 2018).

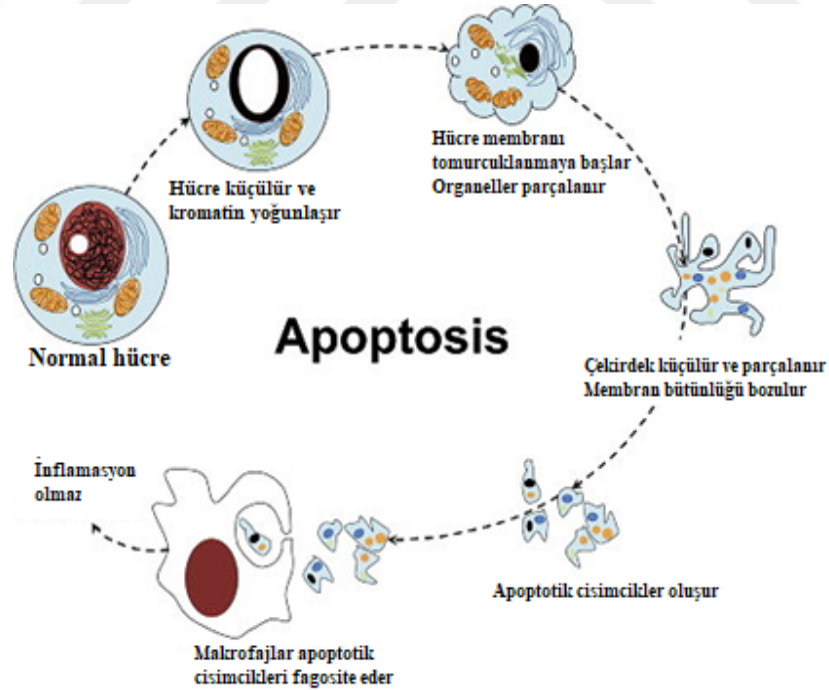
2.3. APOPTOZ

Apoptoz bir programlanmış hücre ölüm şeklidir. Apoptoz terim olarak ilk defa 1972’de J.F.K. Kerr tarafından kullanılmıştır, Yunanca’da apo (=ayrı) ve ptozis (=düşen) kelimelerinin birleşiminden meydana gelmektedir ve sonbaharda yaprakların dökülmesi anlamını taşımaktadır (Aktuğ 2014). Yaşamımızın her dakikasında, vücudumuzdaki milyonlarca hücre, apoptoz ile ölüme gitmektedir (Lopez and Tait 2015). Apoptoz, hücre döngüsünde, bağışıklık sisteminin gelişimi ve işleyişinde, hormona bağlı atrofide, embriyonik gelişimde ve kimyasal ile indüklenen hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerde hayati bir öneme sahiptir (Elmore 2007). Apoptozun

düzensizliği genellikle hastalıklar ile ilişkilidir. Aşırı apoptoz dejeneratif bozukluklara neden olurken, düşük düzeyde apoptoz neoplastik hastalıklara neden olabilmektedir. Bu bağlamda, kanser hücreleri, çeşitli mekanizmalarla hücre ölüm yolunu devre dışı bırakarak apoptozdan kaçınmakta ve böylece kontrolsüz hücre bölünmesi avantajını elde etmektedir (Matsuura, Canfield, Feng and Kurokawa 2016). Bu kapsamda yapılan kanser araştırmalarında apoptotik hücre ölümü ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önem arz etmektedir. Biyolojik önemi ve terapötik uygulamaları nedeniyle, apoptoz son otuz yıldır kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Pena-Blanco and Gracia-Saez 2018).

2.3.1. Apoptozun Morfolojisi

Apoptotik hücre ölümündeki morfolojik değişiklikler, hücre tipleri ve türleri değişse de oldukça benzerlik göstermektedir (Wong 2011). Morfolojik açıdan, apoptotik hücrelerin gösterdiği değişikliklerin arasında kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmentasyon, hücre küçülmesi ve yuvarlaklaşması, membran tomurcuklanması, apoptotik cisimciklerin oluşması ve hücre dışı matrise veya komşu hücrelere adhezyon kaybı yer almaktadır (Goldar, Khaniani, Derakhshan and Baradaran 2015).



Şekil 4. Apoptotik süreçte hücre morfolojisindeki değişimler. (Abou-Ghali and Stiban 2015)

Kromatin yoğunlaşması, nükleer zarın çevresinde başlayarak hilal veya halka benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Kromatin, hücre zarının bütünlüğünü bozmadan parçalanıncaya kadar yoğunlaşmaya devam eder ve bu durum karyoreksis olarak tanımlanmaktadır (Wong 2011). Karyoreksis sonucunda parçalanan çekirdek apoptotik cisimciklere karışabilmektedir (Şekil 4).

Apoptotik hücrelerde fosfatidilserinin hücrenin iç membranından dış membranına translokasyonu sağlanmaktadır. Böylece makrofajlar tarafından tanınma ve fagositoz gerçekleşmektedir Apoptozun son aşamaları ise genellikle membran tomurcuklanması ve tomurcuklanma sürecinin sonunda apoptotik cisim adı verilen küçük veziküllerin ortaya çıkması ile karakterizedir (Hassan, Watari, AbuAlmaaty, Ohba and Sakuragi 2014).

Hücre ölümünün travmatik bir versiyonu olan nekrozun aksine apoptoz, organizmanın daha büyük yarar sağlaması için belirli hücreleri feda etmesi üzerine verdiği rasyonel bir karardır (Xu, Lai and Hua 2019).

Apoptoz ve nekrozun başlıca en belirgin özellikleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklılıklar (Coşkun ve Özgür 2011).

	APOPTOZ	NEKROZ
Nedenleri	Büyüme faktörlerinin eksikliği, Ölüm reseptörü aktivasyonu, Hücre yaşlanması, Radyasyon, Kemoterapik ajanlar, Sitotoksik T lenfositler	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Ağır metaller, Toksik ajanlar, Oksidatif stres
Morfolojik Özellikleri	Hücre küçülmesi, Membran tomurcuklanması, Apoptotik cisimcikler, Kromatin yoğunlaşması, Sağlam organeller, Fosfatidilserin translokasyonu	Hücre şişmesi, Vakuol oluşumu, Hücre lizizi, Membran bütünlüğünün bozulması, Organellerin parçalanması
Biyokimyasal Özellikleri	Programlı hücre ölümü, ATP gereksinimi var, DNA kırıkları merdiven şeklindedir.	İyon dengesinin bozulması, ATP gereksinimi yok, DNA'nın parçalanır
Diğer Özellikler	Hücreler tek başına ya da birkaçı birlikte ölürler, Fizyolojik koşullarda olabilir, Makofajlar ile fagositoz olur, İnflamasyon görülmez.	Hücreler grup halinde ölürler, Patolojik etkiyle gerçekleşir, Lizozomal enzimler salınır, İnflamasyon gerçekleşir.

Apoptoz, otofaji ve nekroz kendilerine özgü morfolojik farklılıkları ve fizyolojik süreçleri ile temelde ayırt edilebilmesine rağmen, bu ölüm tiplerine neden olan moleküler mekanizmalar oldukça karmaşıktır. (Ou, Lin, Song, Liu, Lai and Shao 2017).

2.3.2. Apoptozun moleküler mekanizmaları

Apoptoz, bir hücrede kaspaz aracılı ekstrinsik veya intrinsik yollar aracılığıyla tetiklenebilmektedir. Ancak apoptoz temelde efektör apoptotik kaspazların aktivitesi sonucunda morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile hücre ölümünün gerçekleşmesinde rol almaktadır. Genellikle, pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzenleyicileri arasındaki denge, bir hücrenin apoptoza girip girmediğini belirlemede kritik bir anahtar noktadır (Pistritto, Triscuoglio, Ceci, Garufi and D'Orazi 2016).

2.3.2.1. İntrinsik Yolak

İç yolak ya da mitokondriyal yolak olarak literatürde belirtilen intrinsik apoptotik yolak genellikle hücrede otonom bir şekilde gerçekleşmektedir. DNA hasarı (genotoksik ajanlar veya DNA onarımındaki hatalar), endoplazmik retikulum stresi (katlanmamış proteinlerin birikmesi), büyüme faktörü eksikliği ve oksidatif stress gibi çoğu hücresel stress sonucunda hücrede meydana gelen hasar tamir edilemediğinden dolayı aktif bir şekilde apoptotik hücre ölümünü başlatmaktadır (Green and Llambi 2015).

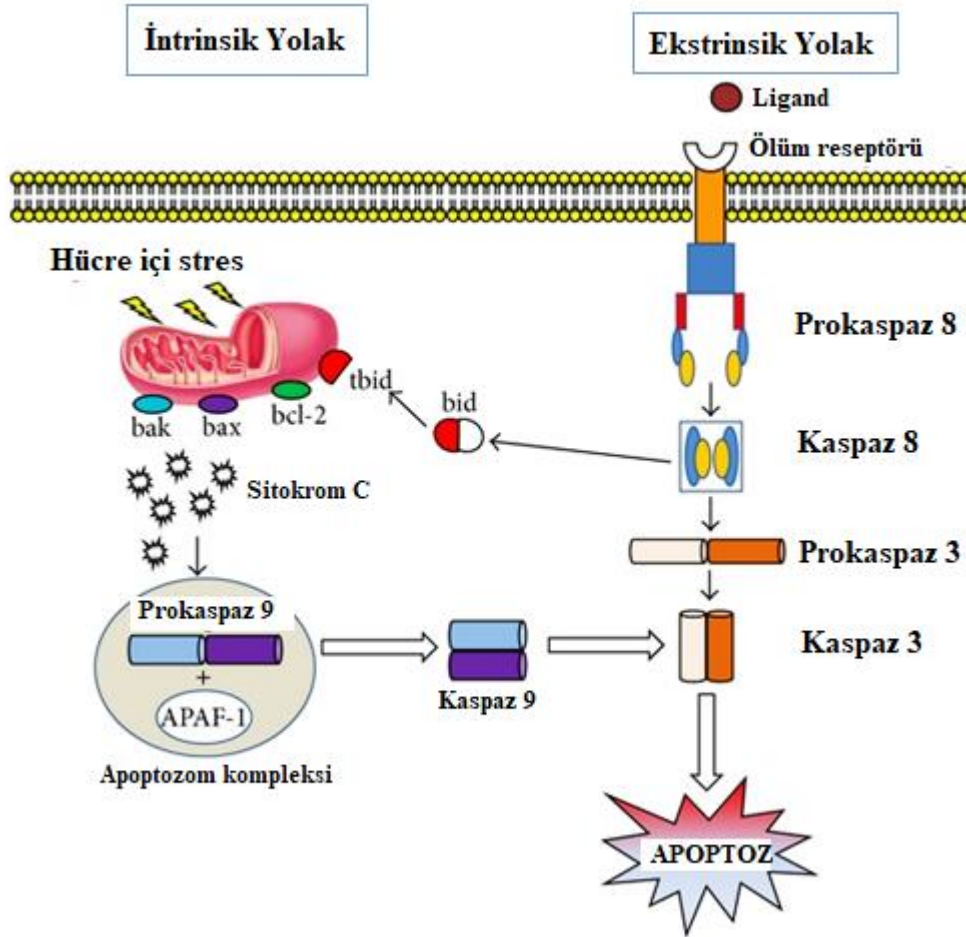
Bax, Bak, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi bir dizi Bcl-2 ailesi üyesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenleyerek mitokondriden sitokrom c'nin salınımını kontrol etmektedir (Su, Yang, Xu, Chen and Yu 2015). Aktif Bak ve Bax, mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu indüklemektedir ve böylece sitokrom c'nin salınmasını tetiklemektedir. Hücrede intrinsik yolak aktive olduğunda, mitokondri membran potansiyelinin bozulması sonucunda mitokondriden sitokrom c salınmaktadır. Sitokrom c, prokaspaz-9 ve apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ile birlikte apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturarak kaspaz-9'un ATP'ye bağlı bir şekilde aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. Aktif kaspaz-9 daha sonra “cellat” kaspazlarını, kaspaz-3 ve kaspaz 7'yi aktive ederek hücrede apoptotik ölümün gerçekleşmesini sağlamaktadır (McArthur and Kile 2018).

2.3.2.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yolda apoptoz, FAS/CD95 ligandı (FASL/CD95L), tümör nekroz faktörü- α (TNF α) ve TNF-ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) gibi ölüm-ligandlarının FAS/CD95, TNF α reseptörü 1 (TNFR1) ve TRAIL reseptörü (TRAILR) 1–2 gibi

çeşitli ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenmektedir (Galuzzi et al 2012). Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) gibi çekirdek proteinlerini harekete geçiren bileşenlere sahiptir. Ligand-reseptör bağlanması sonucunda kaspaz 8'in uyarılmasına neden olan ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşmaktadır. Böylece, kaspaz 8 diğer kaspazları aktive ederek hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda kaspaz 8, Bid (Bcl-2 proteininin proapoptotik bir üyesi) proteinini bölerek sitokrom-c'nin mitokondriden salınmasına neden olarak intrinsik yolağı aktifleştirmektedir (Abraha and Ketema 2016).

Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Apoptotik iç ve dış yolak (Loreto et al 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- -80°C derin dondurucu (Haier, Çin)
- Buzdolabı (Regal, Türkiye)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Stuart, Birleşik Krallık)
- Distile su cihazı (Nüve, Türkiye)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Orbital çalkalayıcı (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Hassas Terazi (Shimadzu, Japonya)
- Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya)
- Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- CO₂ inkübatör (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Inverted mikroskop (BestScope, Çin)
- Countees hücre sayım cihazı (Invitrogen, ABD)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- EVOS Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Qubit 4.0 Flurometer (Invitrogen, ABD)
- StepOnePlus Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD)
- ELISA Plaka Okuyucu (Hangzhou Allsheng, Çin)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck Milipore, Almanya)
- Abemasiklib (Selleck Chemicals, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)

- Tripsin/EDTA (%0.25) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, ABD)
- Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) reaktifi (Biovision, ABD)
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)
- Muse™ Cell Cycle Kiti (Merck Millipore, Almanya)
- Akridin oranj (Sigma Aldrich, ABD)
- Etidyum bromür (Amresco, ABD)
- Etanol (Merck Millipore, Almanya)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- Tripan mavisi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, ABD)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Caspase 3 Human Instant ELISA™ Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) insan triple negatif meme kanseri hücre hattı ve MCF-10A (ATCC® CRL-10317™) insan meme epitel hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak satın alınmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı DMEM besiyerinde %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ve MCF-10A hücre hattı DMEM/F12 besiyerinde 100 mg/mL EGF, 10 mg/mL insülin, 1 mg/mL hidrokortizon, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilerek 37°C'de %5 karbondioksit (CO₂) bulunan inkübatörde kültüre edildi.

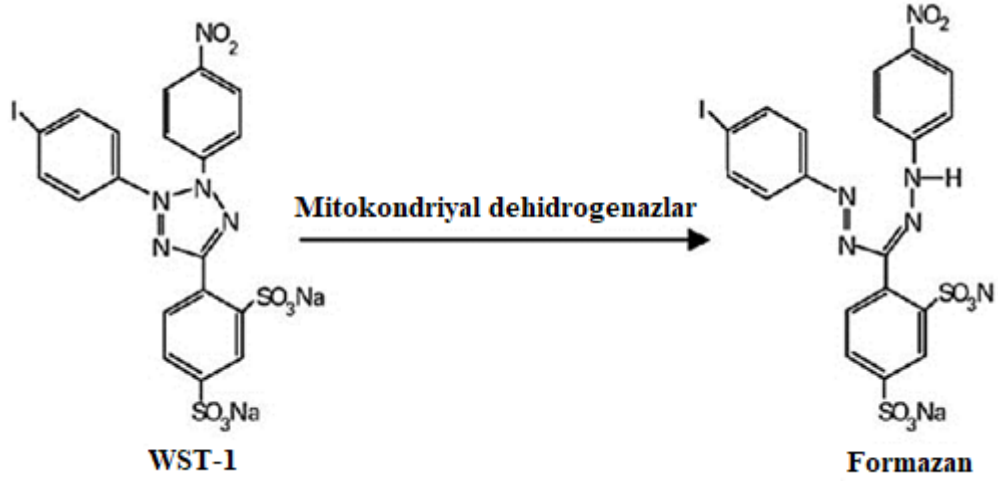
Hücre stokları -80°C'den çıkarılarak 37°C su banyosunda çözöldü. İçerisine hazırlanan besiyeri eklenerek 75 cm² filtreli flasklara ekildi. Hücrelerin çoğalması her gün inverted mikroskop ile kontrol edildi ve besiyerleri yenilendi. Yeterli hücre

yoğunluğuna ulaşıldığında besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve PBS ile 1 kez yıkandı. Flasklara hücrelerin kaldırılması için Tripsin-EDTA (%0.25) eklenerek inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Mikroskopta kontrol edilen hücreler hafifçe çalkalanarak flask yüzeyinden kaldırıldı. Tripsini inaktive etmek amacıyla en az konulan tripsin miktarı kadar hazırlanan besiyeri flasklara eklendi ve hücreler bir serolojik pipet yardımıyla toplandı. Elde edilen hücre süspansiyonu 50 mL'lik steril falkona alındı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında, hücrelerin süpernatantı uzaklaştırılarak hücre pelleti 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Hücrelerin sayılması için, hücre süspansiyonundan bir ependorf tüp içerisine 10 µL alınarak 10 µL tripan mavisi ile pipetlendi. Boyanan hücreler özel bir lam içerisine aktarılarak Countees hücre sayım cihazında (Invitrogen, ABD) sayımı gerçekleştirildi. Stok için ise, hücre pelleti 900 µL besiyeri ile süspanse edildi ve üzerine 100 µL DMSO eklenerek kryotüplere aktarıldı ve hücreler -80°C'de stoklandı.

3.2.2. WST-1 Canlılık Analizi

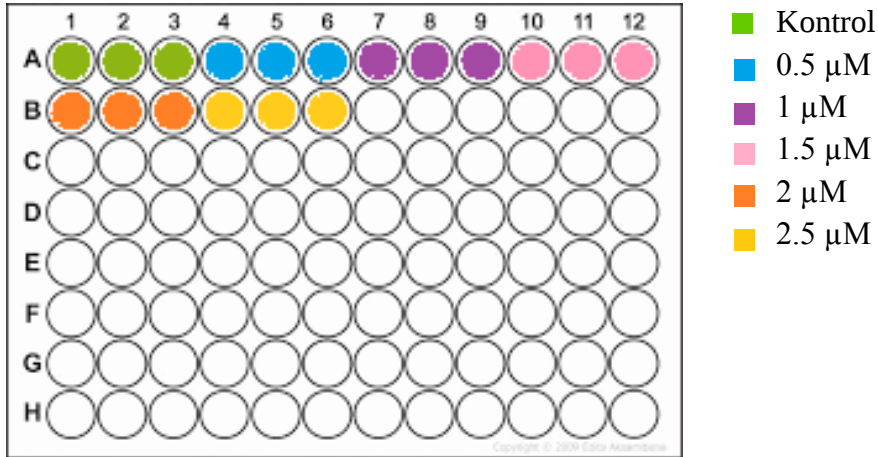
Hücre canlılık analizleri çeşitli hücre tiplerinde sitotoksosite açısından çok sayıda kimyasalın taranmasına olanak sağlarken aynı zamanda kanser kemoterapisinde anti-kanser ilaçların etkin dozlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Tominaga et al. 1999). Canlı ökaryotik hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri olan tetrazolyum indirgeme metodu, canlı hücrelerin bir göstergesi olan enzimatik aktiviteyi ölçmektedir. (Riss et al. 2016).

Abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi için 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) boyası kullanıldı. WST-1 reaktifi açık kırmızı renkli bir tetrozolyumdur ve çalışma prensibi mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri ile reaksiyona girerek formazan oluşumuna dayanmaktadır (Şekil 6). Reaksiyon sonucunda renk değişikliği meydana gelerek oluşan turuncu renk 450 nm dalga boyunda absorbans vermektedir. WST-1 reaktifi suda çözünür bir formazan oluşturduğundan, ilave bir çözündürme aşaması olmadan, absorbans 30 dakika ila 4 saat içerisinde ölçülebilmektedir (Ngamwongsatit, Banada, Panbangred and Bhunia 2008).



Şekil 6. WST-1 mitokondriyal enzimlerle formazana indirgenir (Yin, Wei, Wang, Xu and Yang 2013).

WST-1 deneyi için hücreler 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 2×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ L besiyeri ile birlikte ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, her bir hücre hattı için abemasiklibin Şekil 7’de belirtilen dozları uygulanarak sitotoksik etkisi 24 ve 48 saat için iki ayrı deney kurularak değerlendirildi. Tüm deneyler 3 kez tekrar edildi.



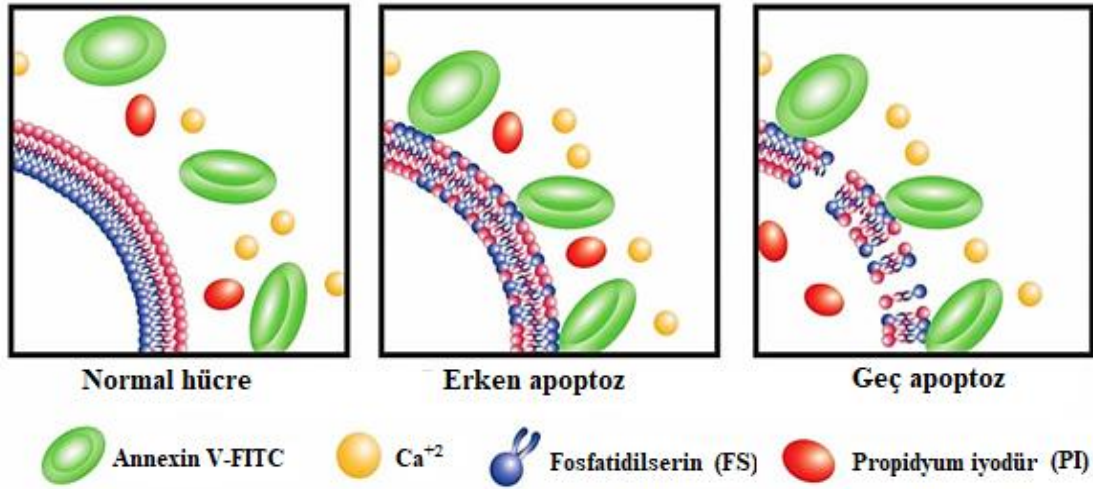
Şekil 7. Abemasiklib WST-1 Analizi için 96 kuyucuklu plaka düzeneği.

Deneylerin inkübasyon süreleri sone erdiğinde her kuyuya 10 μ L WST-1 reaktifi (Biovision, ABD) eklendi. İnkübatörde reaksiyonun gerçekleşmesi için 45 dakika inkübe edildi. Sonrasında ELISA okuyucu cihazında (Allsheng, Çin) 450 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı. Kontrol grubu, doz uygulaması yapılmadığı için

%100 canlı olarak kabul edildi. İlaç uygulanan deney gruplarının canlılık yüzdeleri kontrole kıyasla hesaplandı.

3.2.3. Annexin V Analizi

Normal ve sağlıklı bir hücrede, fosfatidilserin (FS) hücre zarının iç kısmında yer almaktadır. Ancak hücrede apoptotik bir sinyal oluştuğunda FS hücre zarının dış kısmına transloke olarak erken apoptozda fagositik hücrelerin tanıyıp bağlanabileceği bir belirteç görevi alır (Öktem, Özhan ve Özol, 2001). Annexin V, fosfatidilserine yüksek affinite ile bağlanan bir proteindir ve floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlendiğinde akış sitometrisi yöntemi ile erken apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Geç apoptotik evrede ise hücre membranının bütünlüğü bozulduğu için, Annexin V-FITC boyası membrana bağlanarak yeşil floresan verirken, propidyum iyodür (PI) boyası hücre içine girerek kırmızı floresans vermektedir (Şekil 8). Nekrotik hücreler ise sadece PI ile boyanmaktadır.



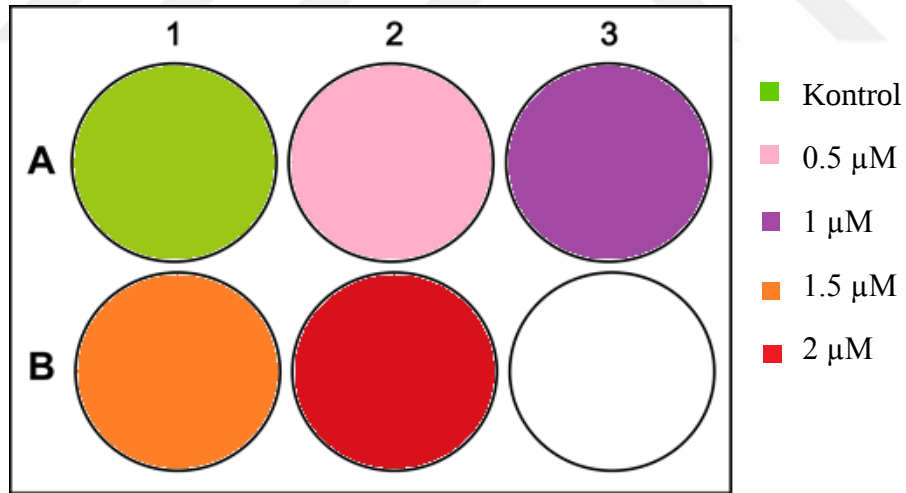
Şekil 8. Apoptotik süreçte fosfatidilserin-Annexin V bağlanması (Zimmermann and Meyer 2011).

Annexin V-FITC ve PI boya lar ıyla işaretlenen hücreler tek tek kolondan geçerek cihaz tarafından karakterize edilmektedir (Tablo 5).

Tablo 4. Annexin V-FITC ve PI ile boyanan hücrelerin  zellikleri.

Hücrelerin �zellikleri	Annexin V-FITC	PI
Canlı	-	-
Erken apoptotik	+	-
Geç apoptotik	+	+
�l� veya nekrotik	-	+

Abemasiklibin etkin olduğu dozlar (0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M, 2 μ M) hücrelere uygulanarak Annexin V analiziyle abemasiklibin apoptotik etkisi belirlenmiştir (şekil 9). Diğer analizlerde abemasiklibin şekil 9’da belirtilen etkin dozlarında gerçekleştirilmiştir.



şekil 9. 6 kuyucuklu plaka düzeneği.

Annexin V analizi için, öncelikle hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildikten 24 saat sonra, abemasiklibin belirlenen etkin konsantrasyonlarıyla 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda tripsin ile hücreler kaldırıldı ve endorf tüplere alınarak 1500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre pelleti PBS ile iki kez yıkandı. PBS ile süspanse edilen hücreler 100 μ L Muse®

Annexin V & Dead Cell Assay Kit ile 30 dakika karanlıkta inkübe edilerek boyandı. Boyanan hücreler Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analize alındı. Deneyler üç kez tekrarlandı.

3.2.4. Hücre Siklusu

Hücre döngüsü analizi, anti-kanser ilaçların hücre döngüsünün hangi fazında etkili olduğunu tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Muse™ Cell Cycle Kiti PI boyası ve RNAaz A içermektedir ve böylece hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücrelerin içerdiği DNA miktarlarının kantitatif ölçülmesini sağlamaktadır.

Abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin hücre siklusu üzerindeki etkisini belirlemek için öncelikle hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde 1 mL besiyeri ile ekildi. Yüzeye tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra abemasiklibin belirlenen etkin konsantrasyonlarıyla 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak ependorf tüplere alındı ve PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler -20 °C'de en az 3 saat boyunca 1 mL %70 etanol ile fiks edildi. Fiksasyon sonrasında, hücreler 200 µL Muse™ Cell Cycle Kiti (Merck Millipore, Almanya) ile boyanarak Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi. Deneyler üç kez tekrarlandı.

3.2.5. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama

Akridin oranj (AO) hem canlı hem de ölü hücreleri boyayabilen bir boyadır. Etidyum bromür (EB) ise sadece membran bütünlüğünü kaybeden hücreleri boyamaktadır. AO/EB çift boyama sonucunda yeşil hücreler canlı, kırmızı hücreler nekrotik, turuncu hücreler ise apoptotik hücrelerdir. Fakat nekrotik hücrelerin aksine, geç apoptotik hücreler yoğunlaşmış ve sıklıkla parçalanmış çekirdeklere sahiptir. Nekrotik hücreler ise kırmızı-turuncu renkte yuvarlak görünümündedir. Ancak nekrotik hücreler yoğunlaşmış kromatin olmadan canlı hücrelerinkine benzeyen bir nükleer morfolojiye sahiptir (Kasibhatla et al., 2006).

Abemasiklibin hücreler üzerindeki morfolojik etkisinin değerlendirilmesi için, AO/EB boyaması yapıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde 1 mL besiyeri ile ekildi. Sonrasında, hücrelere 48 saat boyunca abemasiklib belirlenen etkin konsantrasyonları uygulandı. İnkübasyon sonunda, her bir kuyuya 1

mL %4'lük paraformaldehit eklenerek 30 dakika çalkalayıcıda fiksle edildi. Fiksasyon sonrasında her bir kuyu PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Yıkama sonrasında her bir kuyuya 1 mL AO/EB solüsyonu eklendi ve ışıktan korunarak 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. Boyama işleminden sonra kuyular 3 kez PBS ile yıkandı ve EVOS Hücre Görüntüleme Sisteminde (Thermo Fisher Scientific, ABD) görüntülendi.

3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi

3.2.6.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izole etmek için tek aşamalı RNA izolasyon teknolojisi ve silika-membran teknolojisine sahip olan E.Z.N.A.™ Total RNA Kit I kullanıldı. Bu kit sistemi, HiBind® matriksinin tersinir bağlanma özelliğine dayanarak mini-kolon tüplerin kullanımına dayanmaktadır.

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1×10^6 hücre olacak şekilde 1 mL besiyeriyle ekildi. Sonrasında abemasiklibin belirlenen etkin konsantrasyonları ile 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücreler tripsin ile kaldırılarak 1,5 mL'lik ependorf tüplere alındı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve elde edilen hücre pelleti PBS ile bir kez yıkandı. Pelletin üzerine 350 µL liziz tamponu eklenerek pipetlendi. Elde edilen hücre lizatı, homojenize edici kolonlu tüplere alınarak maksimum yüksek hızda +4 °C'de santrifüj edildi. Kolondan geçen lizata 1 mL %70 etanol eklenerek HiBind® RNA kolonlu tüplere transfer edildi. Tüpler 10.000 g'de 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kolonlar 500 µL yıkama tamponu I ile yıkandıktan sonra 500 µL yıkama tamponu II ile 2 kez yıkandı. Süpernatant atıldı ve tüplerin kuruması amacıyla yüksek hızda santrifüj yapıldı. Kuruyan kolonlar 1,5 mL'lik ependorf tüplere yerleştirildi ve üzerlerine dikkatlice DEPC water eklenerek inkübe edildi. Sonrasında, tüpler maksimum hızda santrifüj edilerek elde edilen total RNA örnekleri -80 °C'de cDNA'ya çevrilmek üzere saklandı.

3.2.6.2. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonu Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazında ölçüldü. RNA örneklerinden 1 µL alınarak içinde 1 µL Qubit® RNA BR Reagent ve 199 µL Qubit® RNA BR Buffer bulunan 500 µL'lik Qubit PCR tüplerine aktarıldı ve inkübasyon sonunda konsantrasyonları ölçüldü.

Ölçülen örneklerin cDNA'ya çevrimi için The Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. İlk olarak PCR tüplerine her örnekten 100 ng alınarak kit protokolüne göre Nuclease-free H₂O, 25X dNTP Mix (100 mM) ve 10X RT Random Primers içeren karışım eklendi. Primer bağlanması için Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) PCR cihazında 5 dakika pre-cDNA programına alınan örnekler sonrasında hemen soğuk bloğa aktarıldı ve 10X RT Buffer ve MultiScribe™ Reverse Transcriptase ilave edildi. PCR cihazına alınan örnekler 42°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk ve 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere Nuclease-free H₂O eklenerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.2.6.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gen ekspresyon analizleri için reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) metodu yaygın olarak kullanılmaktadır. MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerinde abemasiklibin mRNA düzeyinde etkisini belirlemek amacıyla apoptoz ile ilişkili *Bcl2* ve *Bax* genleri, hücre döngüsü ile ilişkili *Ccnd1* ve *Rb1* genleri çalışıldı. İlgili genlerin ve referans geni olan ACTB (β -Aktin) için TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD) primerleri ve buna uygun TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Optik 96 kuyucuklu plakanın kuyularına 10 μ L master mix, 1 μ L primer, 7 μ L nuclease-free H₂O ve cDNA örneğinden 2 μ L eklenerek pipetlendi. Plakanın üzeri kapatılarak StepOnePlus Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazına yerleştirildi ve program 40 siklusa ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.

Elde edilen bulgular RT² Profiler PCR Array Data Analysis programında (<https://dataanalysis.qiagen.com/pcr/arrayanalysis.php>) değerlendirildi. Gen düzeyindeki artış veya azalışlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla kat değişimi (fold-change) olarak belirlendi.

3.2.7. Kaspaz-3 Tayini

Hücrelere abemasiklib uygulanmasının ardından apoptozla ilişkili bir protein olan kaspaz-3 miktarındaki değişimin tespiti için Caspase 3 Human Instant Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA)™ Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Kit sandviç ELISA yöntemi ile eşleşen bir antikor çifti arasında bağlanan hedef proteinin

miktarının ölçülmesini sağlamaktadır. Sandviç ELISA oldukça spesifik olduğundan çeşitli ELISA metotları arasında en sık tercih edilendir.

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1×10^6 yoğunlukta ekildi ve abemasiklibin belirlenen etkin konsantrasyonları ile 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve scraper ile toplanarak ependorf tüplerde 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pellet 1 mL lizis tamponu ile süspanse edildi ve tüpler oda sıcaklığında 60 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra elde edilen deney ve kontrol örneklerinden 10 μ L her bir kuyucuğa eklendi ve çalkalayıcıda 3 saat inkübe edilerek hedef proteinin antikora bağlanması sağlandı. İnkübasyon sonunda, bağlanmamış olan antikorları uzaklaştırmak için her bir kuyu 400 μ L yıkama solüsyonuyla 6 kez yıkandı ve kağıt havluya ters bir biçimde bırakılarak yıkama solüsyonu kalmayınca kadar kurumaya bırakıldı. Sonrasında, her bir kuyuya ölçülebilir bir sinyal üretmek için enzim-antikor-hedef kompleks ile reaksiyona giren 100 μ L of TMB substrat solüsyonu eklendi ve ışıktan korunarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Substrat deteksiyon antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girerek renk değişimine neden olmaktadır. En konsantre standardın rengi koyu maviye ulaştığında 100 μ L stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve hemen ardından ELISA okuyucu cihazında (Allsheng, Çin) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.2.8. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz çalışmaları için GraphPad Prism 6.0 ve SPSS (20.0) programlarından yararlanıldı. Elde edilen verilerin gruplar arası farklılıkları istatistiksel anlamlılık açısından One Way ANOVA (Post-hoc Tukey) analizi ile analiz edildi. Sonuçlar arasından $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler RT² Profiler PCR Array Data Analysis programıyla (<https://dataanalysis.qiagen.com/pcr/arrayanalysis.php>) değerlendirildi.

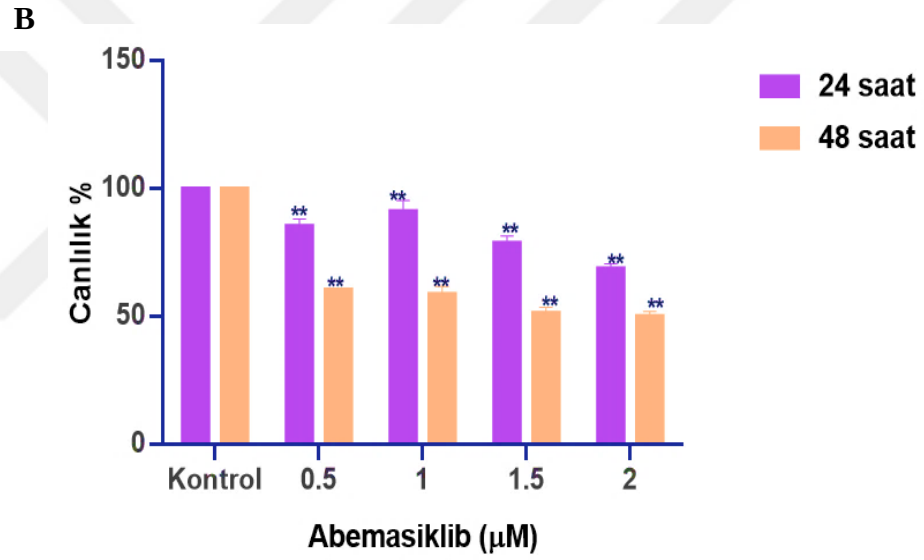
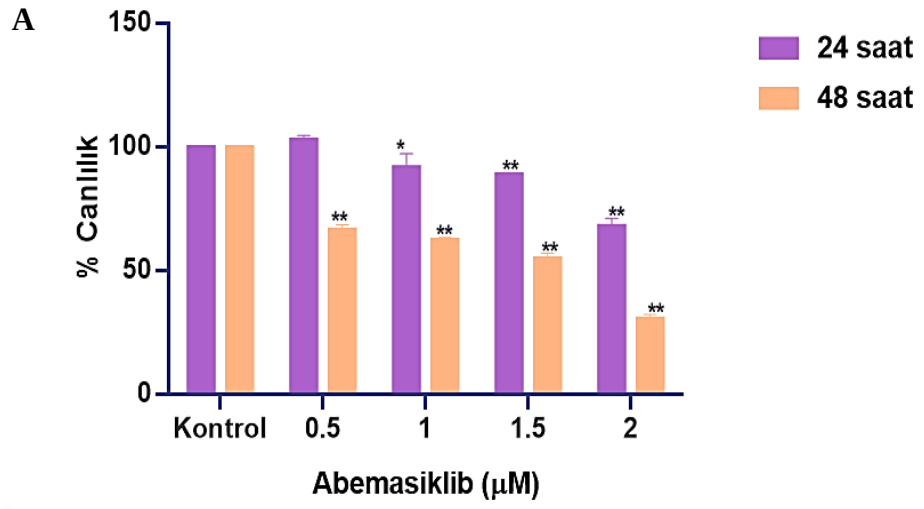
4. BULGULAR

4.1. Abemasiklibin sitotoksik etkisinin WST-1 ile değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında CDK4/6 inhibitörü abemasiklib ve triple negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ile insan meme epitel hücre hattı MCF-10A kullanıldı. Abemasiklibin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen WST-1 canlılık analizi sonuçları şekil 10'da verilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında abemasiklibin 0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M ve 2 μ M konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda 24 saatte canlılık oranları sırasıyla %103.12, %91.92, %89.06 ve %68.13; 48 saatte ise sırasıyla %66.64, %62.55, %55.12 ve %30.69 olarak belirlendi (şekil 10A). MCF-10A hücre hattında uygulamada ise 0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M ve 2 μ M konsantrasyonlarında 24 saatte canlılık oranları sırasıyla %85.45, %91.16, %78.83 ve %60.54'e düşerken, 48 saatte sırasıyla %68.85, %58.85, %51.44 ve %50.23 olarak saptandı (şekil 10B).

Abemasiklibin 48 saat için uygulanan her konsantrasyonunda MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.01$). Özellikle MDA-MB-231 hücre hattında 48 saat boyunca 2 μ M abemasiklib uygulandığında canlılığın önemli ölçüde azalttığı görülmektedir.



Şekil 10. A) MDA-MB-231 hücre hattında abemasiklibin sitotoksik etkisi. B) MCF-10A hücre hattında abemasiklibin sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Tablo 5. Abemasiklibin doza ve zamana bağımlı sitotoksikite sonuçları.

MDA-MB-231			MCF-10A	
Konsantrasyon (µM)	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Kontrol	%100	%100	%100	%100
0.5	%103.12	%66.64	%85.45	%68.85
1	%91.92	%62.55	%91.16	%58.85
1.5	%89.06	%55.12	%78.83	%51.44
2	%68.13	%30.69	%60.54	%50.23

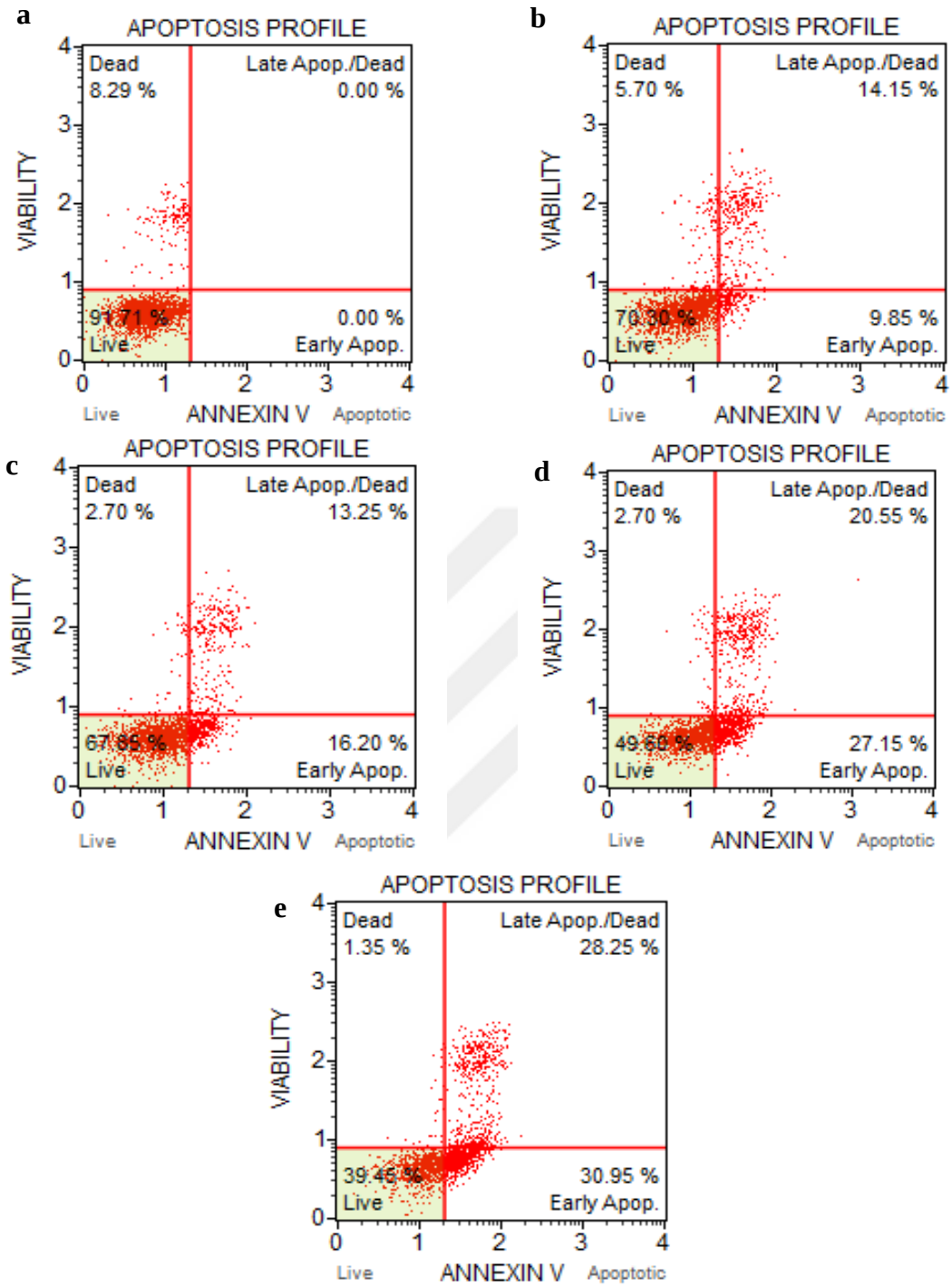
Sonuç olarak, abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca, uygulanan her bir doz ele alındığında, abemasiklibin 24 saate kıyasla 48 saatlik zaman diliminde MDA-MB-231 hücrelerinde daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).

4.2. Annexin V analizi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

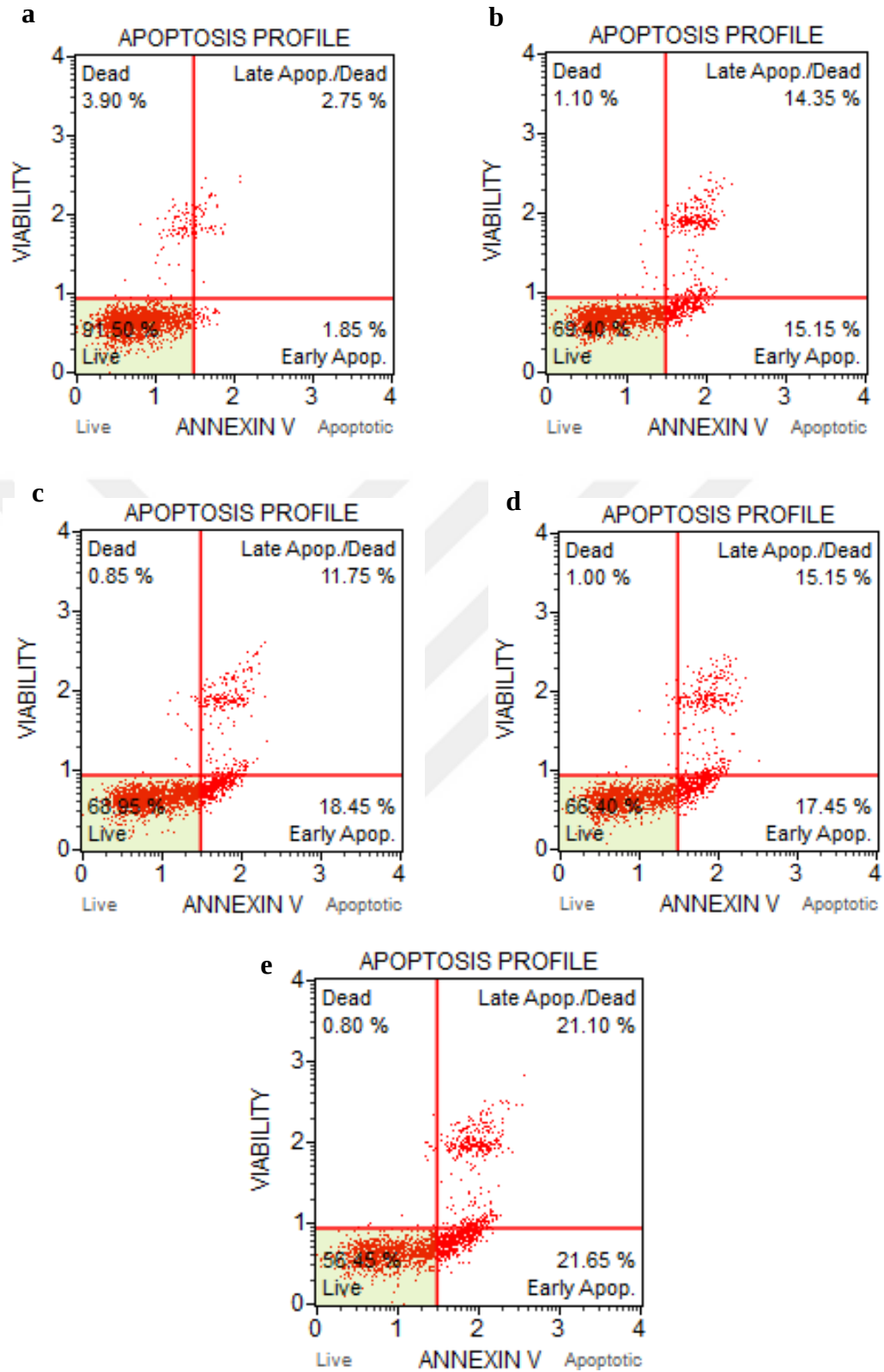
Abemasiklibin apoptotik etkisini incelemek amacıyla Annexin V kullanılarak akış sitometrisi yöntemiyle analiz edilen veriler Şekil 11, 12 ve 13’de sunulmuştur.

MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat abemasiklib uygulandıktan sonra elde edilen toplam apoptotik hücre ölüm oranları 0.5, 1, 1.5 ve 2 µM konsantrasyonlar için sırasıyla %24.62, %29.91, %48.09 ve %59.7 olarak belirlendi ($p<0.01$).

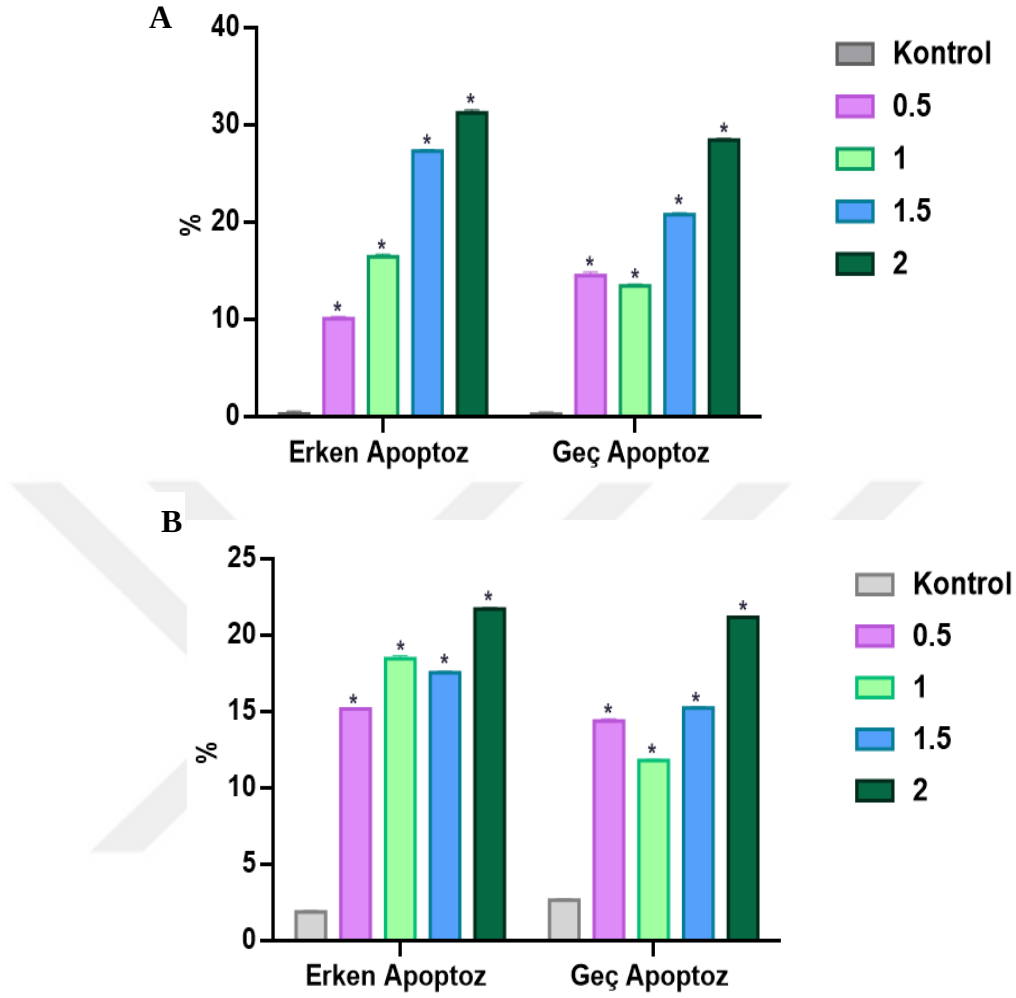
MCF-10A hücrelerinde ise 48. saatte elde edilen veriler ışığında ise, toplam apoptotik hücre ölüm oranları 0.5, 1, 1.5 ve 2 µM konsantrasyonlar için sırasıyla %29.56, %30.28, %32.78 ve %42.9 olarak bulunmuştur ($p<0.01$).



Şekil 11. 48 saat abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V analizi sonuçları **a)** Kontrol **b)** 0.5 μ M **c)** 1 μ M **d)** 1.5 μ M **e)** 2 μ M.



Şekil 12. MCF-10A hücrelerinde 48 saatte abemasiklibin apoptotik etkisini gösteren Annexin V analizi sonuçları **a)** Kontrol **b)** 0.5 μ M **c)** 1 μ M **d)** 1.5 μ M **e)** 2 μ M.



Şekil 13. A) MDA-MB-231 hücre hattı ve B) MCF-10A hücre hattında abemasiklibin neden olduğu erken ve geç apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (*p<0.01).

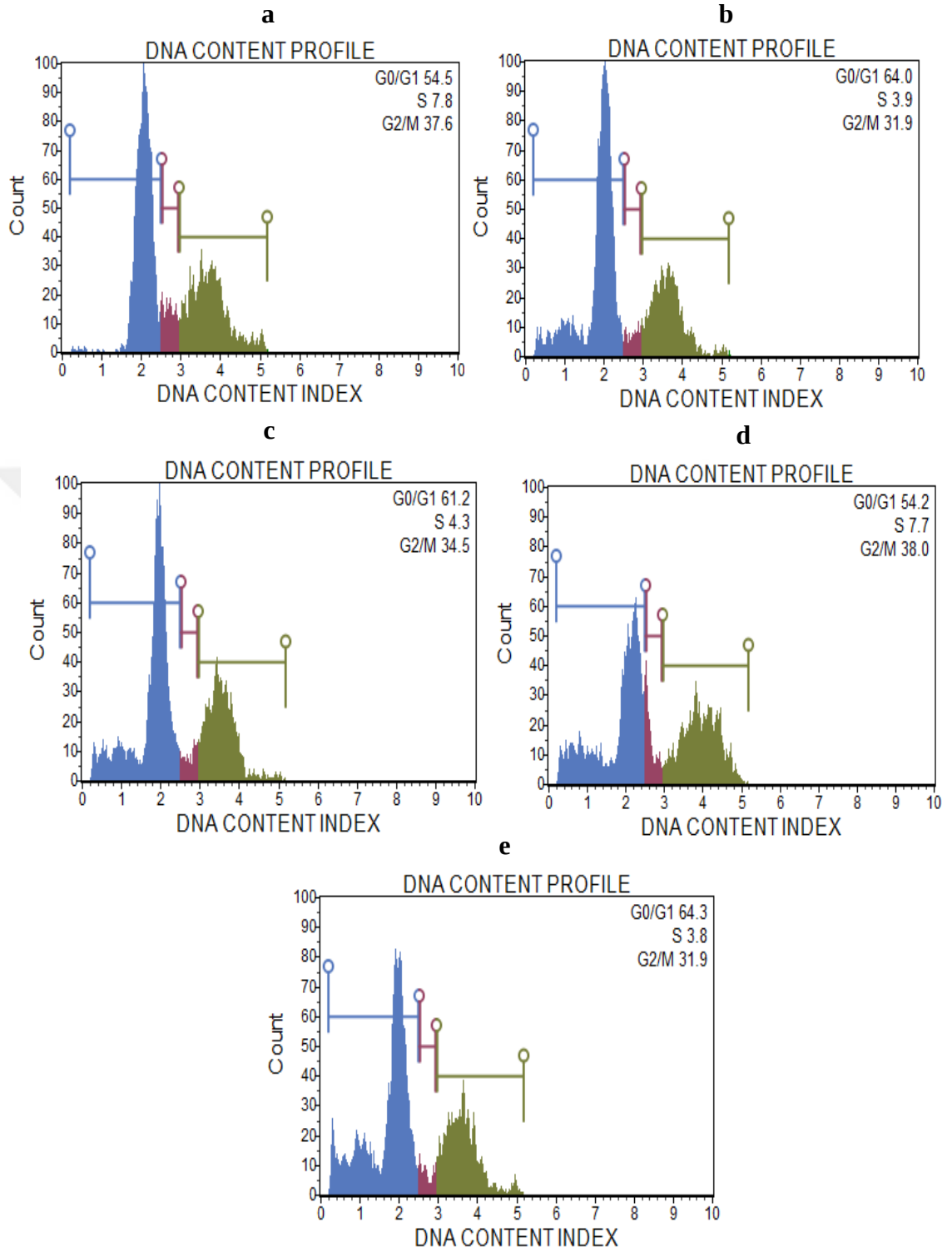
Bu bulgular ışığında abemasiklibin uygulanan doza bağlı olarak MDA-MB-231 hücreleri üzerinde MCF-10A hücrelerine kıyasla daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu görülmektedir.

4.3. Hücre döngüsündeki değişimlerin belirlenmesi

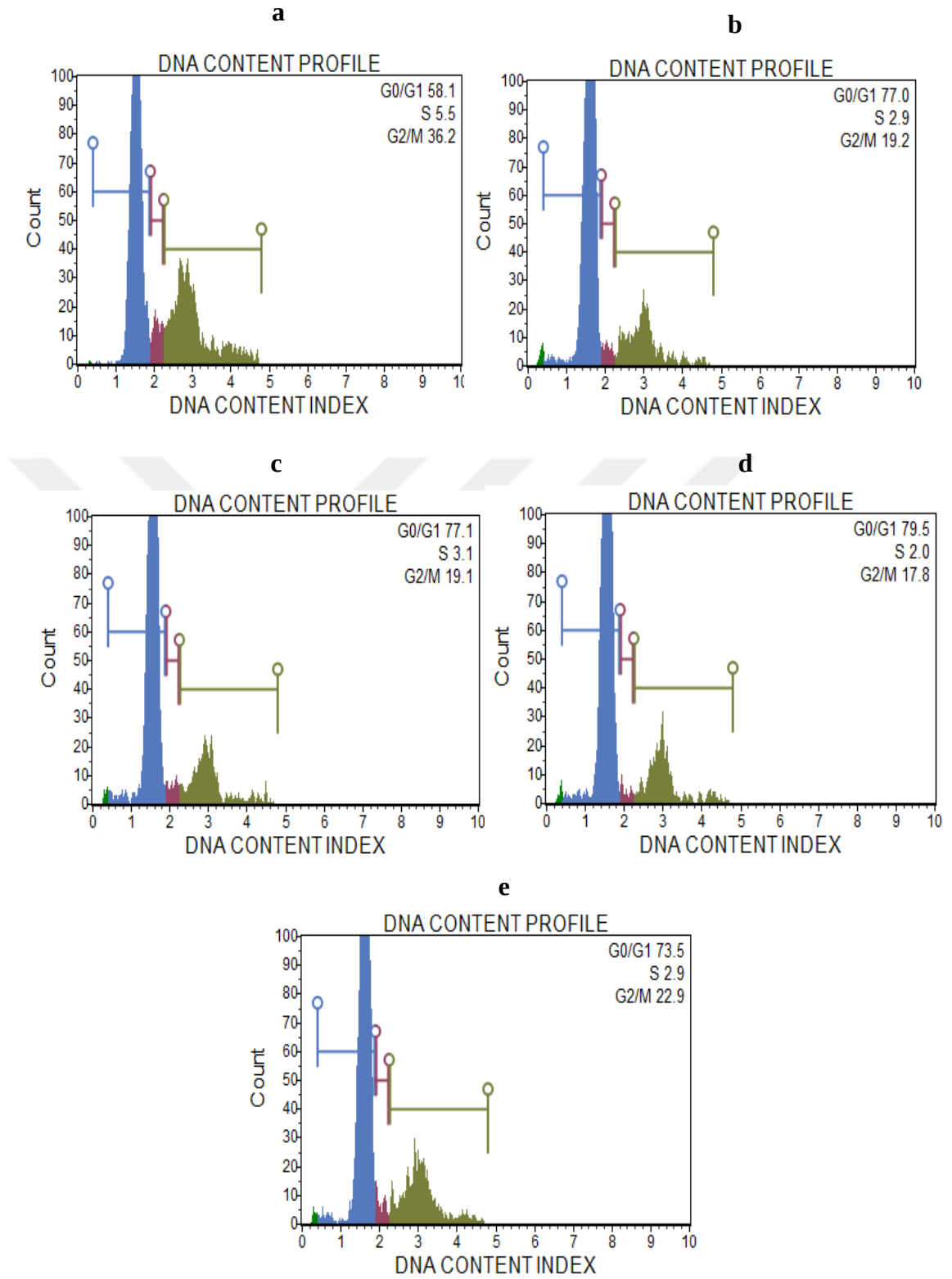
Hücre döngüsü analizinden elde edilen sonuçlar Şekil 14, 15 ve 16'da verilmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubunda G0/G1 fazındaki birikim oranı %54.8 iken; 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M konsantrasyonlarda abemasiklib uygulandığında G0/G1 fazında birikim yüzdeleri sırasıyla %64.2, %61.3, %54.3 ve %64.45 olarak saptanmış olup 1.5 μ M konsantrasyonun dışındaki abemasiklib uygulamalarının tümünde de kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). G2/M evresinde kontrol grubunda hücre miktarı %32.85 iken, 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M konsantrasyonlarda abemasiklib uygulandığında sırasıyla %32.15, %34.65, %38.2 ve %32.2 olarak analiz edildi. S evresinde ise kontrol grubu %7.8 iken, 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M konsantrasyonlarda abemasiklib uygulandığında sırasıyla %3.9, %4.3, %7.7 ve %3.8 olarak belirlendi.

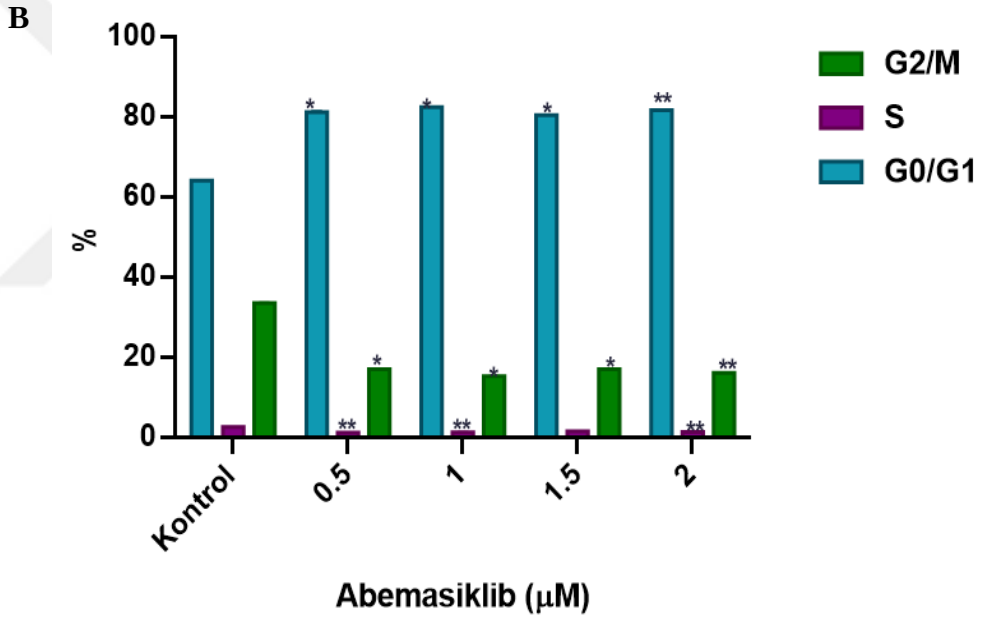
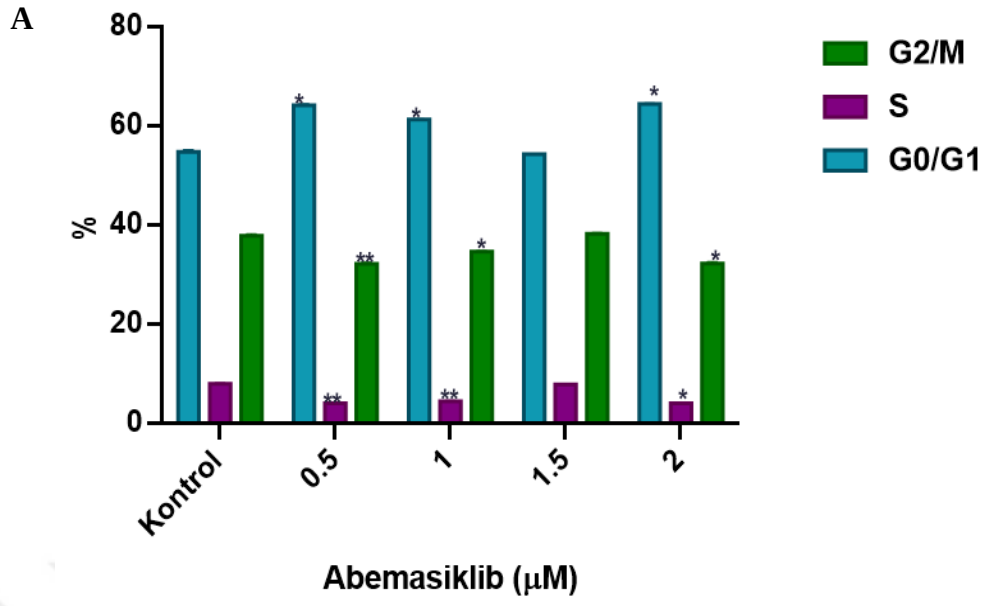
MCF-10A hücrelerinde ise kontrol grubuna (%64.1) kıyasla 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M konsantrasyonlarda abemasiklib uygulandığında G0/G1 fazındaki hücre miktarı sırasıyla %81.2, %82.45, %80.45 ve %81.7'ye yükselmiştir ($p<0.05$). G2/M evresinde 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M konsantrasyonlarda abemasiklib uygulandığında hücre miktarı %35.5'ten (kontrol) sırasıyla %17.05, %15.25, %16 ve %16.1'e azalmıştır. S evresinde kontrol grubunda %5.5 oranında olan hücre miktarının ise, 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M konsantrasyonlarda abemasiklib uygulandığında sırasıyla %2.9, %3.1, %2 ve %2.9 olarak analiz edildi.



Şekil 14. MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları. **a)** Kontrol **b)** 0.5 μ M **c)** 1 μ M **d)** 1.5 μ M **e)** 2 μ M abemasiklib.



Şekil 15. MCF-10A hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonuçları. **a)** Kontrol **b)** 0.5 μ M **c)** 1 μ M **d)** 1.5 μ M **e)** 2 μ M abemasiklib.



Şekil 16. A) MDA-MB-231 ve **B)** MCF-10A hücrelerinde abemasiklibe bağlı hücre döngüsü değişimleri (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

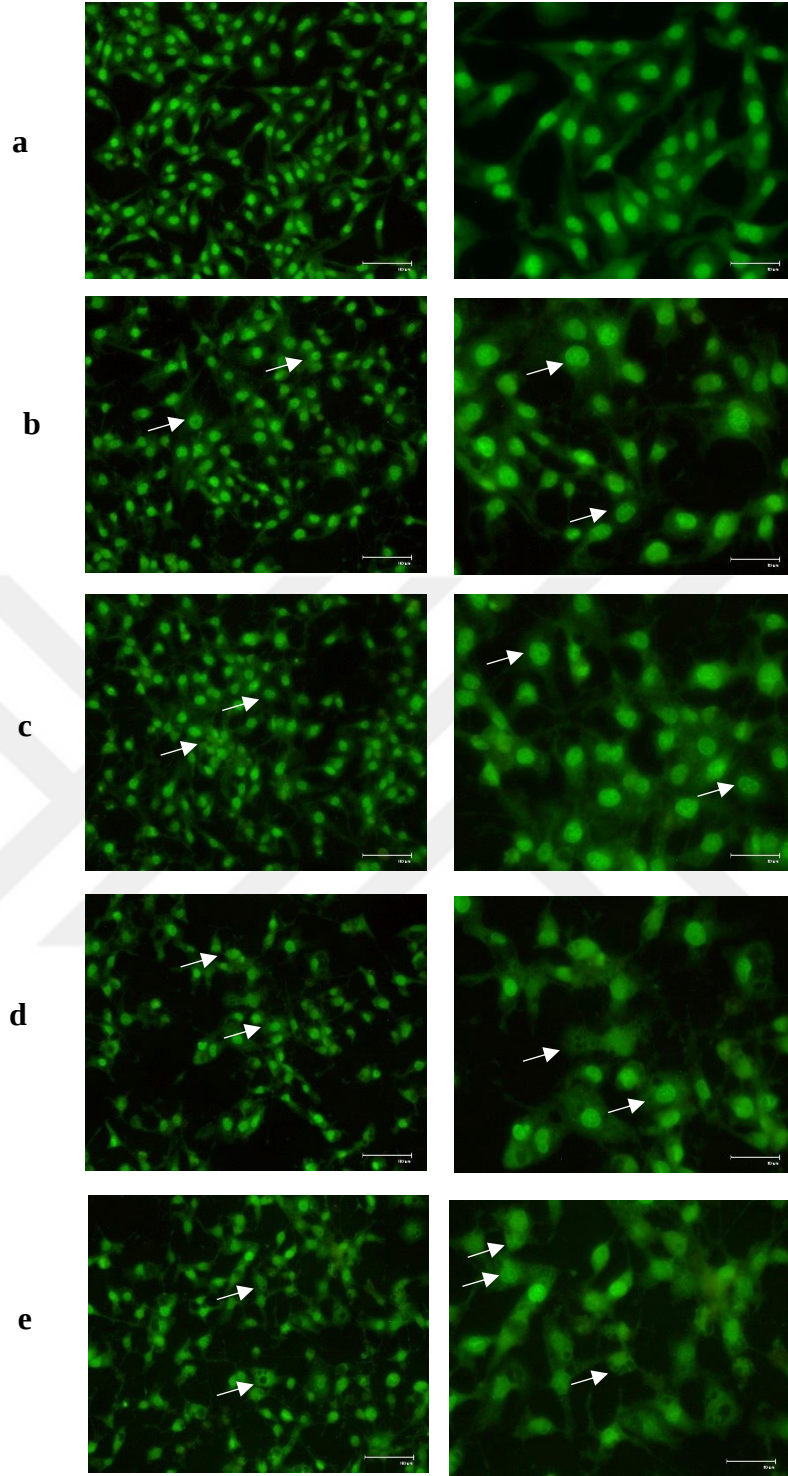
Sonuç olarak, abemasiklibin artan dozuna bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde G0/G1 fazında hücre miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir.

4.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama

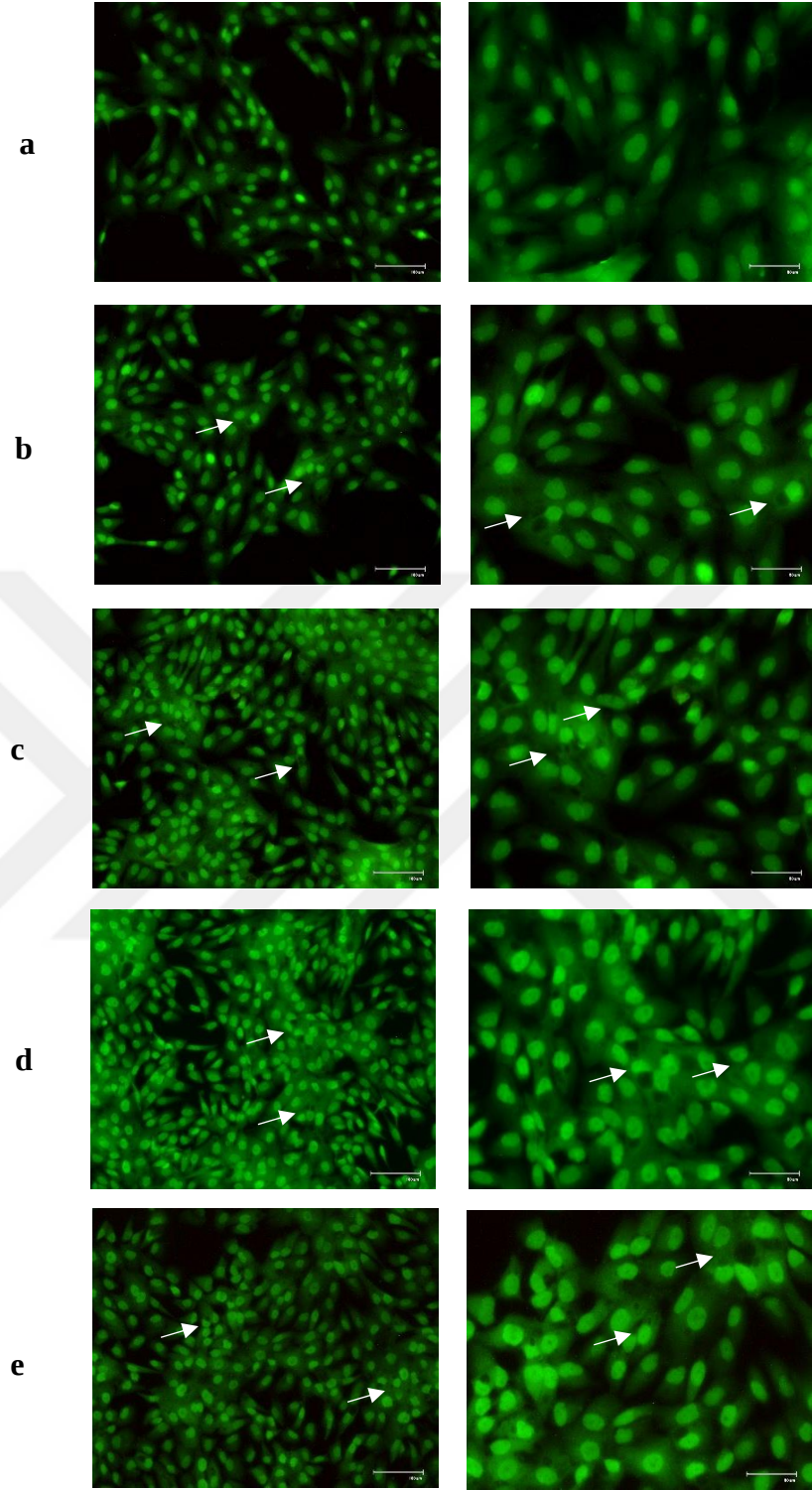
Abemasiklibin hücreler üzerindeki etkisi AO/EB boyaması ile morfolojik olarak değerlendirildi ve elde edilen veriler Şekil 17 ve 18 'de sunulmuştur.

48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde belirgin morfolojik değişimler olduğu görüldü. 0.5 ve 1 μ M konsantrasyonlarında abemasiklib uygulanan hücrelerde çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonlarına rastlanırken, 1.5 ve 2 μ M abemasiklib uygulandığında belirtilen hasarlara ek olarak çekirdek parçalanması ve vakuoler dejenerasyon da gözlemlendi.

MCF-10A hücrelerinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında abemasiklib uygulanan hücrelerde MDA-MB-231 hücrelerinde göre daha az hasar olduğu görüntülenmiştir. Ancak abemasiklibin toksik etkisinden dolayı hücrelerin bazılarında vakuoller ve kromatin yoğunlaşması tespit edildi.



Şekil 17. MDA-MB-231 hücrelerinin abemasiklib konsantrasyonuna bağlı olarak morfolojik değişimi (Oklar kromatin yoğunlaşmasını, DNA fragmentasyonunu ve vakuolleri göstermektedir). **a)** Kontrol **b)** 0.5 μM **c)** 1 μM **d)** 1.5 μM **e)** 2 μM .



Şekil 18. MCF-10A hücrelerinde abemasiklib uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak morfolojik değişimlerin AO boyaması ile değerlendirilmesi (Oklar kromatin yoğunlaşmasını ve vakuolleri işaret etmektedir). **a)** Kontrol **b)** 0.5 μM **c)** 1 μM **d)** 1.5 μM **e)** 2 μM .

4.5. Bcl2, Bax, Ccnd1 ve Rb1 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde abemasiklibin mRNA düzeyinde etkisinin araştırılması için apoptoz ile ilişkili olan *Bcl2* ve *Bax* genleriyle hücre döngüsü ile ilişkili olan *Ccnd1* ve *Rb1* genlerinin ekspresyon seviyeleri Real Time- PCR yöntemi ile belirlendi. Hücrelerde abemasiklib konsantrasyonuna bağlı olarak gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler Şekil 19’da gösterilmiştir.

Her grup için *Actb* geni ile normalizasyon yapıldı ve gen düzeyindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla kat değişimi (fold-change) olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 6’da verildi.

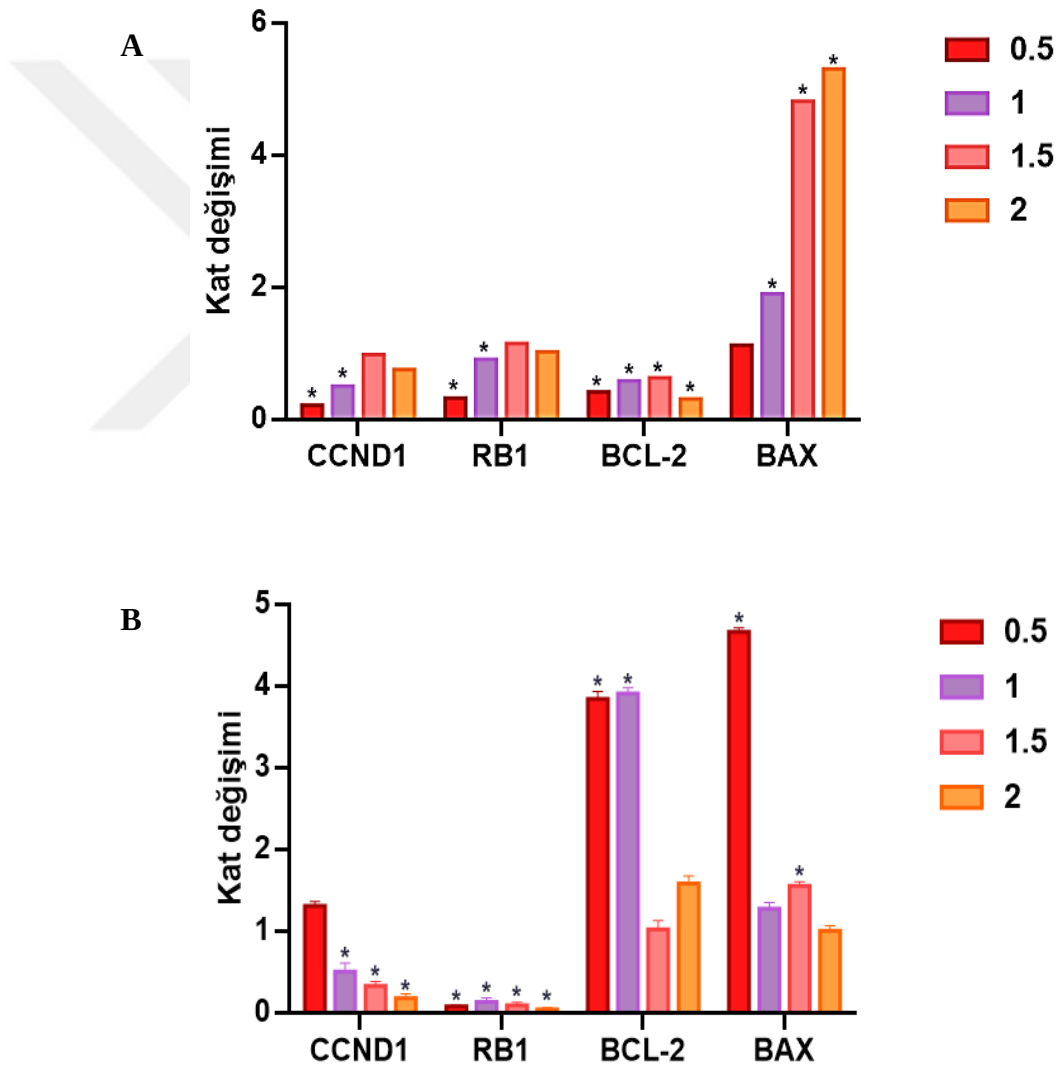
Tablo 6. Abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde kat değişimleri.

CCND1RB1BCL-2BAX													
	Konsantras yon (μM)	2 ^{-ΔΔCT}	Kat değışimi	P	2 ^{-ΔΔCT}	Kat değışimi	P	2 ^{-ΔΔCT}	Kat değışimi	P	2 ^{-ΔΔCT}	Kat değışim i	p
MDA-MB-231	0.5	0.213	0.19	0.001	0.012	0.29	0.001	0.003	0.39	0.001	0.011	1.08	0.442
	1	0.037	0.47	0.002	0.004	0.84	0.016	0.001	0.53	0.001	0.012	1.84	0.001
	1.5	0.105	0.91	0.240	0.011	1.09	0.117	0.002	0.58	0.001	0.022	4.78	0.001
	2	0.210	0.70	0.052	0.013	0.99	0.931	0.002	0.26	0.001	0.063	5.28	0.012
MCF-10A	0.5	0.490	1.27	0.107	0.323	0.07	0.001	0.002	3.91	0.002	0.032	4.70	0.003
	1	0.476	0.43	0.001	0.024	0.10	0.001	0.007	3.96	0.002	0.159	1.22	0.469
	1.5	0.200	0.29	0.001	0.028	0.07	0.001	0.009	0.95	0.898	0.031	1.59	0.011
	2	0.117	0.14	0.001	0.020	0.03	0.001	0.002	1.52	0.059	0.066	0.96	0.699

MDA-MB-231 hücrelerinde 0.5 μM abemasiklibin 48 saatte gen düzeyinde neden olduğu değişimler incelendiğinde; hücre siklusunda yer alan *Ccnd1* ve *Rb1* genleri ile apoptozla ilişkili *Bcl2* ve *Bax* genlerinin ekspresyon kat değişimleri sırasıyla 0.19, 0.29, 0.39 ve 1.08 kat iken; 1 μM için kat değişimleri 0.47, 0.84, 0.53 ve 1.84- kat bulundu. 1.5 μM abemasiklib uygulandığında sırasıyla belirtilen genlerdeki kat

değişimleri 0.91, 1.09, 0.58 ve 4.78 iken, 2 μ M abemasiklib uygulandığında sırasıyla sırasıyla 0.7, 0.99, 0.26 ve 5.28-kat olarak belirlendi ($p<0.01$).

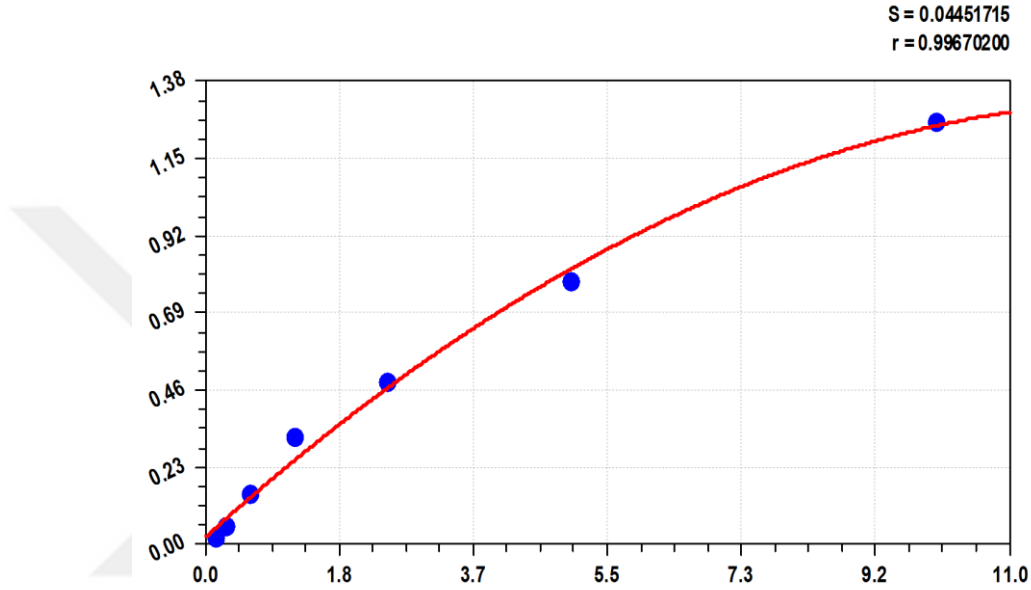
MCF-10A hücrelerinde ise 0.5 μ M abemasiklib uygulanmasının ardından *Ccdn1*, *Rb1*, *Bcl2* ve *Bax* genlerinin mRNA ifadesi sırasıyla 1.27, 0.07, 3.91 ve 4.7- kat artarken, 1 μ M abemasiklib uygulama sonrası 0.43, 0.1, 3.96 ve 1.22-kat artmıştır. 1.5 μ M abemasiklib uygulandığında belirtilen genlerin ekspresyon seviyelerinde kat değişimleri sırasıyla 0.29, 0.07, 0.95 ve 1.59 iken, 2 μ M abemasiklib uygulandığında sırasıyla 0.14, 0.03, 1.52 ve 0.96-kat olarak bulundu.



Şekil 19. 48 saat boyunca 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M abemasiklib uygulanan **A)** MDA-MB-231 ve **B)** MCF-10A hücrelerinde *Bcl2*, *Bax*, *Ccdn1* ve *Rb1* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler (* $p<0.01$).

4.6. Kaspaz-3 ELISA Sonuçları

Apoptotik sürecin bir göstergesi olan aktif kaspaz-3 proteini (cleaved caspase 3) MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde ELISA yöntemiyle ölçüldü. Ölçüm için oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 20’de görülmektedir. Hücrelere 48 saat abemasiklib uygulaması ile elde edilen kaspaz-3 protein miktarına ilişkin bulgular Şekil 21’de sunulmuştur.

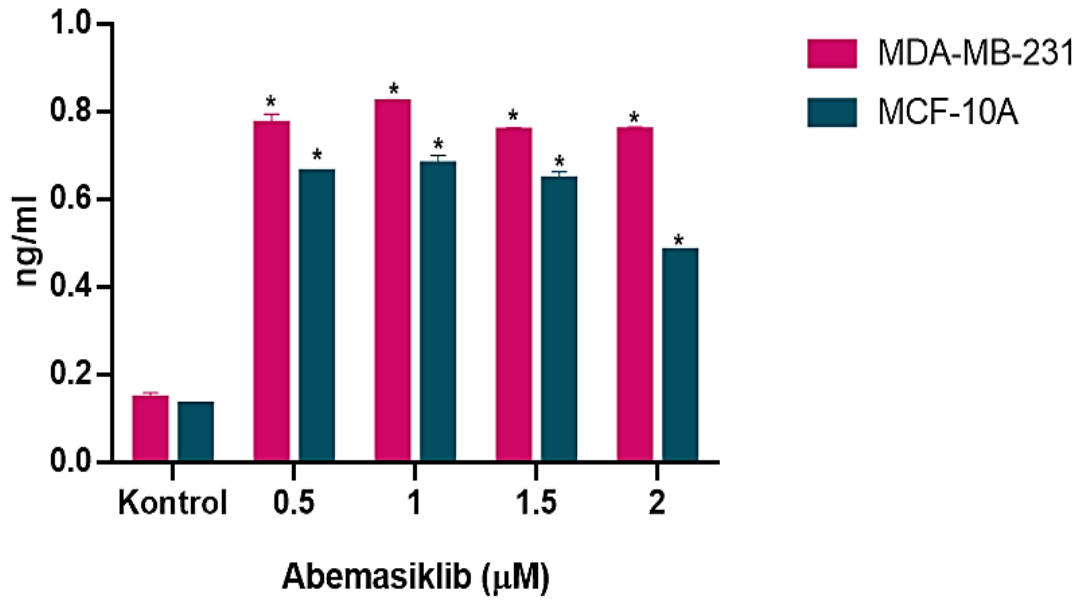


Şekil 20. Kaspaz-3 ölçümü için oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiği.

Abemasiklib uygulanan iki hücre hattında da kaspaz-3 protein seviyesi kontrole göre artış göstermiş olup, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubunda kaspaz-3 protein miktarı 0.145 ng/ml iken; 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M abemasiklib dozları uygulandığında sırasıyla 0.772, 0.821, 0.756 ve 0.757 ng/ml olarak belirlendi ($p < 0.01$).

MCF-10A hücrelerinde ise kontrol grubu 0.132 ng/ml kaspaz-3 içerirken; 0.5, 1, 1.5 ve 2 μ M abemasiklib uygulanan gruplar için protein miktarı sırasıyla 0.662, 0.68, 0.646 ve 0.482 ng/ml olarak belirlendi ($p < 0.01$).



Şekil 21. Abemasiklib konsantrasyonuna bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki kaspaz-3 protein miktarları (*p<0.01).

Sonuç olarak, abemasiklibin artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde aktif kaspaz-3 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artışa neden olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, farklı klinik-patolojik ve moleküler karakteristik özelliklere sahip temelde 4 alt gruba sınıflandırılan heterojen bir kanser tipidir. Bu alt tiplerin tedaviye verdikleri yanıt ve gösterdikleri prognoz birbirinden belirgin bir biçimde ayrılmaktadır (Kondov et al 2018). Meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi ve kemoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde tümörün büyüklüğü, moleküler alt tipi, etkilenen lenf nodülü sayısı, metastaz varlığı ve diğer faktörler (yaş, aile hikayesi, genetik mutasyon vb.) rol almaktadır. Ayrıca, meme kanserinin klinik olarak heterojen yapıya sahip olması da tedavi başarısını önemli ölçüde etkilemektedir (Chhipa and Bhat 2007).

Triple negatif meme kanseri (TNMK) genç yaşta görülen, kötü prognoza sahip ve uzak metastaz yapma potansiyeli yüksek olan heterojen bir tümör grubudur. Tedavi seçeneklerinin ve etkinliğinin oldukça sınırlı olduğu TNMK hastalarında, prognozu ve sağkalım süresini olumlu yönde etkileyebilecek, nüks ihtimalini azaltabilecek daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Assaker et al 2020).

Abemasiklib, CDK4/6 için seçici bir inhibitördür ve HR+ meme kanseri için FDA onayına sahip olmakla beraber akciğer kanseri, özofagus kanseri ve diğer bazı yumuşak doku kanserlerinde etkinlik açısından preklinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir (Dhir et al 2019). Ayrıca abemasiklibin, diğer yeni nesil CDK4/6 inhibitörleri olarak FDA tarafından onaylanan palbosiklib ve ribosiklibe göre daha güçlü *in vitro* inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Dhir et al 2019). Yapılan bir çalışmada, abemasiklibin MCF-7, T47-D ve MDA-MB-361 ER+ meme kanseri hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre döngüsünün G1 evresinde durmasına yol açtığı, Rb fosforilasyonunun inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiş olup, ayrıca hücreleri apoptoza götürdüğü Annexin V ve TUNEL deneyleri ile gösterilmiştir (Torres-Guzman et al 2017). Ancak yaptığımız literatür taramasında abemasiklibin TNMK hücrelerinde apoptotik etkisine dair detaylı bir *in vitro* çalışmaya rastlayamadık. Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında abemasiklibin MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, abemasiklibin TNMK hücrelerinde potansiyel anti-kanser etkisi WST-1 analizi ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler, 48 saat boyunca abemasiklib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde en yüksek konsantrasyonda canlılığın anlamlı bir şekilde %30.69'a kadar azaldığını göstermektedir ($p<0.01$). Bununla birlikte, MCF-10A hücrelerinde aynı zaman dilimi ve konsantrasyonda canlılığın %50.23 oranında bulunması, abemasiklibin kanser hücrelerinde etkin olmasıyla birlikte yüksek konsantrasyonlarda normal meme hücrelerinde toksik etkisi olduğunu göstermektedir.

Literatürde abemasiklibin farklı kanser hücrelerinde apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Tamura 2019). Pankreas kanseri hücre hatlarında (Mia PaCa2, Panc-1 ve HS 766T) yapılan bir çalışmada, 3 gün abemasiklib uygulamasından sonra annexin V/PI boyaması yapılarak apoptotik etki incelenmiş ve tüm hücre dizilerinde kontrole kıyasla apoptotik hücrelerde artış tespit edilmiş, abemasiklibin hücreleri G1-S fazında tuttuğu bulunmuştur (Dhir et al 2019). Ayrıca abemasiklibin serviks kanseri (Liu et al 2020), renal kanser (Small et al 2017), özofagus kanseri (Kosovec et al 2017) ve glioblastoma (Cao et al 2020) hücrelerinde de apoptotik ölüme yol açtığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise, 48 saat boyunca abemasiklib uygulanan hücrelerde doza bağlı olarak apoptotik ölümün anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde G0/G1 fazında tutulmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ancak her bir hücre hattı kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, MCF-10A hücrelerinde G0/G1 fazında hücre miktarındaki artış, MDA-MB-231 hücrelerinde göre daha fazla oranda analiz edilmiştir. Bu durum, normal meme epiteli hücreleri ile TNMK hücrelerinde hücre döngüsünde yer alan kontrol mekanizmalarındaki farklılıklardan veya hücre döngüsü ile ilişkili genlerin farklı düzeyde eksprese olmasından kaynaklanabilir.

Iriyama ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, abemasiklibin multiplmiyelom hücrelerinde apoptotik etkisi Annexin V/PI boyaması ile incelenmiş ve abemasiklib uygulanan hücrelerde kromatin yoğunlaşması veya nükleer parçalanma gibi apoptoza özgü morfolojik değişimler belirgin olmamakla birlikte, hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon gözlemlenmiştir (Iriyama et al 2018). Mevcut tez çalışmasında yapılan morfolojik değerlendirmede de abemasiklib uygulanan TNMK hücrelerinde benzer

apoptotik morfoloji görülmüş olmakla birlikte yüksek konsantrasyonlarda sitoplazmada vakuoler hasar da gözlenmiştir.

Literatürde CDK4/6 inhibitörlerinin meme kanserinde etkisine dair şu ana kadar yapılan en kapsamlı çalışma, O'Brien ve ark. (2018) tarafından abemasiklibin 44 insan meme kanseri hücre hattından oluşan bir panelde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ER+/HER- meme kanseri hücre hatları CDK4/6 inhibisyonuna en duyarlı grup olarak tanımlanmıştır. Yüksek p16 protein seviyesinin veya siklin E amplifikasyonunun TNMK hücrelerinin CDK4/6 inhibitörlerine az duyarlı olmasında rol aldığı belirtilmektedir. Geliştirilen ksenograft meme kanseri modellerinde (MCF-7, BT-474, BT-20, HCC70, MDA-MB-231), yüksek pRb ve düşük p16 seviyesine sahip TNMK hücre dizilerinin ve ksenograft modellerinin abemasiklibe daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, abemasiklibin tamoksifen, dosetaksel, karboplatin ve trastuzumab ile kombin etkisi değerlendirilmiştir. Mevcut tez çalışmasında seçilen MDA-MB-231 TNMK hücrelerinin yüksek Rb ekspresyonuna (Liu et al 2017) ve p16 delesyonuna (Milde-Langosch et al 1999) sahip olduğu literatürde gösterilmiş ve bundan dolayı abemasiklibe karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir (O'Brien et al 2018). Dolayısıyla, bizim çalışmamızda da MDA-MB-231 hücreleri abemasiklibe karşı duyarlı bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkisi ile hücre döngüsü üzerindeki etkisi moleküler düzeyde de analiz edilmiştir.

Anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada abemasiklibin, anti-apoptotik gen ekspresyon seviyelerini (*Bcl2* ve *cMyc*) azaltırken, *Bax* ve *p21* gibi apoptotik genlerin ekspresyonlarını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (Abutorabi, Irani, Yaghmaie and Ghaffari 2020). Tez çalışmamızda da abemasiklibin TNMK hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin moleküler mekanizmalarını incelemek üzere pro-apoptotik ve anti-apoptotik genler ile hücre döngüsü kontrolünde rol alan genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. 1.5 ve 2 µM abemasiklib uygulanan TNMK hücrelerinde *Bax* ekspresyon seviyesinin anlamlı olarak arttığı ($p<0.01$) belirlenmesine rağmen, *Bcl2* seviyesinde aynı şekilde belirgin bir azalma tespit edilmemiştir. *Ccnd1* ve *Rb1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise abemasiklib uygulandığında artış gözlemlenmesine rağmen, kat değişim oranı 1-kat altında analiz edilmiştir. Germ tümörü hücrelerinde yapılan bir çalışmada da benzer şekilde

palbosiklibin *Ccdn1* seviyesini arttırdığı bulunmuştur (Skowron et al 2020). Ayrıca, CDK4/6 inhibisyonuna yanıt olarak *Ccnd1*'in up-regülasyonu çeşitli çalışmalarda belirlenmiş ve bu artışın, siklinD1-CDK2 aracılı S-fazına geçişte ve kazanılmış direnç ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Dean et al 2010, Paternor et al 2014, Herrera-Abreu et al 2016). Bu nedenle TNMK hücrelerinde abemasiklibin etkisinin hem gen hem de protein düzeyinde daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir.

Literatürde çeşitli kanser hücrelerinde kaspaz-3 seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi ile apoptotik ölümün gerçekleştiği desteklenmektedir (Zhu et al 2018, Maher et al 2019). Çalışmamızda da abemasiklib uygulaması yapılarak TNMK ve kontrol hücrelerinde kaspaz-3 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Abemasiklib uygulanan hücrelerde, kontrole kıyasla aktif kaspaz-3 seviyelerinde önemli bir artış tespit edilmiş ve apoptotik sürecin varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca, düşük konsantrasyonlarında (0.5 ve 1 μ M) abemasiklibin daha yüksek kaspaz-3 aktivitesine neden olduğu analiz edilmiştir. Bu durum 48 saatin sonunda yüksek konsantrasyonlarda apoptotik sürecin çoğunlukla sonlanmış olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle, 12 ve 24 saat zaman dilimlerinde yüksek konsantrasyonlarda abemasiklibin kaspaz-3 seviyesinde neden olduğu değişimlerin belirlenmesi daha uygun olabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda abemasiklibin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde *in vitro* olarak sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmış ve TNMK üzerindeki potansiyel terapötik etkisi ortaya konmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda HR+, HER2- ileri evre meme kanseri için FDA onayı bulunan abemasiklibin TNMK hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalar kapsamında, abemasiklibin TNMK hücrelerindeki potansiyel terapötik etkisinin artırılması için diğer kemoterapik ajanlarla veya bitkisel etken maddelerle birlikte kombin etkileri araştırılabilir. Ayrıca abemasiklibin belirlenen *in vitro* etkisinin *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Son olarak abemasiklibin TNMK hücrelerinde ileri moleküler analizler (western blot, immünfloresans vb.) ile hücre siklusundaki etkisinin araştırılmasıyla mevcut tez bulguları daha da desteklenebilir ve geliştirilebilir.

KAYNAKÇA

- Abou-Ghali, M., & Stiban, J. (2015). Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi journal of biological sciences*, 22(6), 760-772.
- Abraha, A. M., & Ketema, E. B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World journal of gastrointestinal oncology*, 8(8), 583.
- Abutorabi, E. S., Irani, S., Yaghmaie, M., & Ghaffari, S. H. (2020). Abemaciclib (CDK4/6 Inhibitor) Blockade Induces Cytotoxicity in Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 438-445.
- Aktuğ, H. (2014). Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi*, 53(1), 60-64.
- Arslan, UY. & Oksuzoglu, B. (2019). Current Treatment Options and New Developments in Metastatic Breast Cancer. *Acta Oncol Tur*, 2019; 52(2): 336-347
- Assaker, G., Camirand, A., Abdulkarim, B., Omeroglu, A., Deschenes, J., Joseph, K., ... & Sabri, S. (2020). PTHrP, A Biomarker for CNS Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer and Selection for Adjuvant Chemotherapy in Node-Negative Disease. *JNCI Cancer Spectrum*, 4(1), pkz063.
- Azzam, H., Kamal, R., El-Assaly, H., & Omer, L. (2020). The value of dynamic contrast-enhanced MRI in the diagnosis and management of triple-negative breast cancer. *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, 51(1), 1-6.
- Bertucci, F., Ng, C. K., Patsouris, A., Droin, N., Piscuoglio, S., Carbuccia, N., ... & Garnier, S. (2019). Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature*, 569(7757), 560.
- Cao, Y., Li, X., Kong, S., Shang, S., & Qi, Y. (2020). CDK4/6 inhibition suppresses tumour growth and enhances the effect of temozolomide in glioma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(9), 5135-5145.

- Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., & Gianni, L. (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(12), 683.
- Cheang M.C., Chia S.K., Voduc D., et al: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: pp. 736-750
- Chhipa R. R., & Bhat, M. K. (2007). Bystander killing of breast cancer MCF- 7 cells by MDA- MB- 231 cells exposed to 5- fluorouracil is mediated via Fas. *Journal of cellular biochemistry*, 101(1), 68-79.
- Clifton, K. K., Raghavendra, A. S., Yi, M., Litton, J., Tripathy, D., & Karuturi, M. (2020). Abstract P5-11-03: Practice patterns and outcomes of post progression treatment after CDK 4/6 inhibitors.
- Condorelli, R., Spring, L., O'shaughnessy, J., Lacroix, L., Bailleux, C., Scott, V., ... & Andre, F. (2017). Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 29(3), 640-645.
- Corona, S. P., & Generali, D. (2018). Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer. *Drug design, development and therapy*, 12, 321.
- Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
- Dean, J. L., Thangavel, C., McClendon, A. K., Reed, C. A., & Knudsen, E. S. (2010). Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene*, 29(28), 4018-4032.
- Dhir, T., Schultz, C. W., Jain, A., Brown, S. Z., Haber, A., Goetz, A., ... & Jiang, W. (2019). Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with HuR and YAP1 inhibition. *Molecular Cancer Research*, 17(10), 2029-2041.
- Dickler, M. N., Tolaney, S. M., Rugo, H. S., Cortés, J., Diéras, V., Patt, D., ... & Yardley, D. A. (2017). MONARCH 1, a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and

- CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR+/HER2– metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(17), 5218-5224.
- Dirix, L. Y., Takacs, I., Jerusalem, G., Nikolinakos, P., Arkenau, H. T., Forero-Torres, A., ... & Emens, L. A. (2018). Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast cancer research and treatment*, 167(3), 671-686.
- Eggersmann, T. K., Degenhardt, T., Gluz, O., Wuerstlein, R., & Harbeck, N. (2019). CDK4/6 inhibitors expand the therapeutic options in breast cancer: palbociclib, ribociclib and abemaciclib. *BioDrugs*, 33(2), 125-135.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Ezzati, M., Yousefi, B., Velaei, K., & Safa, A. (2020). A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. *Life Sciences*, 117463.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Liu, B. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 27(1), 95-120.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... & Gottlieb, E. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120.
- Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., ... & De Laurentiis, M. (2018). Androgen receptor in triple negative breast cancer: a potential target for the targetless subtype. *Cancer treatment reviews*, 68, 102-110.
- Go, A., Mehta, M., Bihun, T., Carpenter, D., & Ghani, S. (2020). Metastatic Breast Cancer Presenting as a Gastric Primary with Linitis Plastica: a Case Report and Review of Literature. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 1-5.

- Goetz, M. P., Toi, M., Campone, M., Sohn, J., Paluch-Shimon, S., Huober, J., ... & Freedman, O. C. (2017). MONARCH 3: abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35(32), 3638-3646.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2129-2144.
- Gomillion, C. T. (2019). Assessing the Potential of Chitosan/Poly lactide Nanoparticles for Delivery of Therapeutics for Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 5(1), 61-73.
- Green, D. R., & Llamby, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*, 2014.
- He, L., Lv, Y., Song, Y., & Zhang, B. (2019). The prognosis comparison of different molecular subtypes of breast tumors after radiotherapy and the intrinsic reasons for their distinct radiosensitivity. *Cancer Management and Research*, 11, 5765.
- Herrera-Abreu, M. T., Palafox, M., Asghar, U., Rivas, M. A., Cutts, R. J., Garcia-Murillas, I., ... & Bellet, M. (2016). Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer research*, 76(8), 2301-2313.
- Hortobagyi, G. N., Stemmer, S. M., Burris, H. A., Yap, Y. S., Sonke, G. S., Paluch-Shimon, S., ... & Janni, W. (2016). Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(18), 1738-1748.
- Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A., & Cronin, K. A. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(5).

- Iida, M., Toyosawa, D., Nakamura, M., Tsuboi, K., Tokuda, E., Niwa, T., ... & Hayashi, S. I. (2020). Decreased ER dependency after acquired resistance to CDK4/6 inhibitors. *Breast Cancer*, 1-10.
- Iriyama, N., Hino, H., Moriya, S., Hiramoto, M., Hatta, Y., Takei, M., & Miyazawa, K. (2018). The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytocidal effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. *Leukemia & lymphoma*, 59(6), 1439-1450.
- Ismail-Khan, R., & Bui, M. M. (2010). A review of triple-negative breast cancer. *Cancer control*, 17(3), 173-176.
- Jitariu, A. A., Cîmpean, A. M., Ribatti, D., & Raica, M. (2017). Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget*, 8(28), 46652.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2006). Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(3), pdb-prot4493.
- Kim, E. M., Mueller, K., Gartner, E., & Boerner, J. (2013). Dasatinib is synergistic with cetuximab and cisplatin in triple-negative breast cancer cells. *journal of surgical research*, 185(1), 231-239.
- Knudsen, E. S., & Wang, J. Y. (2010). Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 16(4), 1094-1099.
- Kondov, B., Milenkovikj, Z., Kondov, G., Petrushevska, G., Basheska, N., Bogdanovska-Todorovska, M., ... & Ivkovski, L. (2018). Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 6(6), 961.
- Kosovec, J. E., Zaidi, A. H., Omstead, A. N., Matsui, D., Biedka, M. J., Cox, E. J., ... & Jobe, B. A. (2017). CDK4/6 dual inhibitor abemaciclib demonstrates compelling preclinical activity against esophageal adenocarcinoma: a novel therapeutic option for a deadly disease. *Oncotarget*, 8(59), 100421.

- Kotake, T., & Toi, M. (2018). Abemaciclib for the treatment of breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 19(5), 517-524.
- Kwapisz, D. (2017). Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast cancer research and treatment*, 166(1), 41-54.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750-2767.
- Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., ... & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PloS one*, 11(6), e0157368.
- Li, T., Xiong, Y., Wang, Q., Chen, F., Zeng, Y., Yu, X., ... & Zhou, Y. (2019). Ribociclib (LEE011) suppresses cell proliferation and induces apoptosis of MDA-MB-231 by inhibiting CDK4/6-cyclin D-Rb-E2F pathway. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 4001-4011.
- Liu, C. Y., Lau, K. Y., Hsu, C. C., Chen, J. L., Lee, C. H., Huang, T. T., ... & Tseng, L. M. (2017). Combination of palbociclib with enzalutamide shows in vitro activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells. *PloS one*, 12(12).
- Liu, Y., Zhao, R., Fang, S., Li, Q., Jin, Y., & Liu, B. (2020). Abemaciclib sensitizes HPV- negative cervical cancer to chemotherapy via specifically suppressing CDK4/6- Rb- E2F and mTOR pathways. *Fundamental & Clinical Pharmacology*.
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957-962.

- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., ... & Djinovic, R. (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *BioMed research international*, 2014.
- Ma, X., Wang, X., Huang, J., Chen, Y., Zhang, J., Zhang, B., ... & Liu, L. (2016). Bevacizumab addition in neoadjuvant treatment increases the pathological complete response rates in patients with HER-2 negative breast cancer especially triple negative breast cancer: a meta-analysis. *PloS one*, 11(8).
- Maher, M., Kassab, A. E., Zaher, A. F., & Mahmoud, Z. (2019). Novel pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines: design, synthesis, anticancer activity, dual EGFR/ErbB2 receptor tyrosine kinases inhibitory activity, effects on cell cycle profile and caspase-3-mediated apoptosis. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 532-546.
- Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., & Raza, A. (2014). Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(8), 3353-3358.
- Martin, J. M., & Goldstein, L. J. (2018). Profile of abemaciclib and its potential in the treatment of breast cancer. *OncoTargets and therapy*, 11, 5253.
- Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., & Kurokawa, M. (2016). Metabolic regulation of apoptosis in cancer. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 327, pp. 43-87). Academic Press.
- McArthur, K., & Kile, B. T. (2018). Apoptotic caspases: multiple or mistaken identities?. *Trends in cell biology*, 28(6), 475-493.
- Milde-Langosch, K., Riethdorf, L., Bamberger, A. M., & Löning, T. (1999). P16/MTS1 and pRB expression in endometrial carcinomas. *Virchows Archiv*, 434(1), 23-28.
- Nabholtz, J. M., Chalabi, N., Radosevic-Robin, N., Dauplat, M. M., Mouret-Reynier, M. A., Van Praagh, I., ... & Bahadoor, M. R. K. (2016). Multicentric neoadjuvant pilot Phase II study of cetuximab combined with docetaxel in

operable triple negative breast cancer. *International journal of cancer*, 138(9), 2274-2280.

National Breast Cancer Centre. Management of advanced breast cancer. *Clinical Practice Guidelines* 2001:13- 19.

Neophytou, C., Boutsikos, P., & Papageorgis, P. (2018). Molecular mechanisms and emerging therapeutic targets of triple-negative breast cancer metastasis. *Frontiers in oncology*, 8, 31.

Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W., & Bhunia, A. K. (2008). WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of microbiological methods*, 73(3), 211-215.

Nofech-Mozes, S., Trudeau, M., Kahn, H. K., Dent, R., Rawlinson, E., Sun, P., ... & Hanna, W. M. (2009). Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast cancer research and treatment*, 118(1), 131.

Nur Husna, S. M., Tan, H. T. T., Mohamud, R., Dyhl-Polk, A., & Wong, K. K. (2018). Inhibitors targeting CDK4/6, PARP and PI3K in breast cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758835918808509.

O'Brien, N., Conklin, D., Beckmann, R., Luo, T., Chau, K., Thomas, J., ... & Hurvitz, S. (2018). Preclinical activity of abemaciclib alone or in combination with antimetabolic and targeted therapies in breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 17(5), 897-907.

O'Leary, B., Finn, R. S., & Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(7), 417.

Ou, L., Lin, S., Song, B., Liu, J., Lai, R., & Shao, L. (2017). The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *International journal of nanomedicine*, 12, 6633.

- Öztemur, Y., Aydos, A., & Gür-Dedeoğlu, B. (2014). Meme kanseri mikrodizin verilerinin biyoinformatik yöntemler ile bir araya getirilmesi-Meta-analiz yaklaşımları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*.
- Paternot, S., Colleoni, B., Bisteau, X., & Roger, P. P. (2014). The CDK4/CDK6 inhibitor PD0332991 paradoxically stabilizes activated cyclin D3-CDK4/6 complexes. *Cell cycle*, 13(18), 2879-2888.
- Peña- Blanco, A., & García- Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), 416-431.
- Pernas S, Tolaney SM, Winer EP, Goel S. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions. *Ther Adv Med Oncol*. 2018 Jul 17;10:1758835918786451.
- Perou, C. M., Sørle, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Fluge, Ø. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406(6797), 747.
- Pilevarzadeh, M., Amirshahi, M., Afsargharehbagh, R., Rafiemanesh, H., Hashemi, S. M., & Balouchi, A. (2019). Global prevalence of depression among breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 1-15.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Palumbo, A., Lau, G., & Saraceni, M. (2019). Abemaciclib: the newest CDK4/6 inhibitor for the treatment of breast cancer. *Annals of Pharmacotherapy*, 53(2), 178-185.
- Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S. F. (2018). Molecular classification of breast cancer. *PET clinics*, 13(3), 325-338.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual* [Internet].

Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Schettini, F., De Santo, I., Rea, C. G., De Placido, P., Formisano, L., Giuliano, M., ... & Del Mastro, L. (2018). CDK 4/6 inhibitors as single agent in advanced solid tumors. *Frontiers in oncology*, 8, 608.

Skowron, M. A., Vermeulen, M., Winkelhausen, A., Becker, T. K., Bremmer, F., Petzsch, P., ... & Nettersheim, D. (2020). CDK4/6 inhibition presents as a therapeutic option for paediatric and adult germ cell tumours and induces cell cycle arrest and apoptosis via canonical and non-canonical mechanisms. *British Journal Cancer*, 1-14.

Sledge Jr, G. W., Toi, M., Neven, P., Sohn, J., Inoue, K., Pivot, X., ... & Koh, H. (2017). MONARCH 2: abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2- advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *Journal of clinical oncology*, 35(25), 2875-2884.

Small, J., Washburn, E., Millington, K., Zhu, J., & Holder, S. L. (2017). The addition of abemaciclib to sunitinib induces regression of renal cell carcinoma xenograft tumors. *Oncotarget*, 8(56), 95116.

Sobhani, N., D'Angelo, A., Pittacolo, M., Roviello, G., Miccoli, A., Corona, S. P. et al. (2019). Updates on the CDK4/6 inhibitory strategy and combinations in breast cancer. *Cells*, 8(4), 321.

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, 14(1), 48.

Tamura, K. (2019). Differences of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, palbociclib and abemaciclib, in breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology*, 49(11), 993-998.

Tang, Y., Fu, F., Gao, H., Shen, L., Chi, I., & Bai, Z. (2019). Art therapy for anxiety, depression, and fatigue in females with breast cancer: A systematic review. *Journal of psychosocial oncology*, 37(1), 79-95.

- Temian, D. C., Pop, L. A., Irimie, A. I., & Berindan-Neagoe, I. (2018). The epigenetics of triple-negative and basal-like breast cancer: current knowledge. *Journal of breast cancer*, 21(3), 233-243.
- Teo, Z. L., Versaci, S., Dushyanthen, S., Caramia, F., Savas, P., Mintoff, C. P., ... & Phillips, W. A. (2017). Combined CDK4/6 and PI3K α inhibition is synergistic and immunogenic in triple-negative breast cancer. *Cancer research*, 77(22), 6340-6352.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., & Watanabe, M. (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*, 36(2), 47-50.
- Torres-Guzmán, R., Calsina, B., Hermoso, A., Baquero, C., Alvarez, B., Amat, J., ... & de Dios, A. (2017). Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*, 8(41), 69493.
- Ünçel, M., Aköz, G., Yıldırım, Z., Pişkin, G., Değirmenci, M., Solakoğlu Kahraman, D., ... & Diniz, G. Meme Kanserinin Klinikopatolojik Özelliklerinin Moleküler Alt Tipe Göre Değerlendirilmesi (2015). 151-156.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992.
- Yin, L. M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y. D., & Yang, Y. Q. (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International journal of medical sciences*, 10(1), 68.
- Zhu, J., Xin, Y., Liu, X., Wang, Y., & Liu, Y. (2018). Nimotuzumab enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to tumor necrosis factor- α by

inhibiting the nuclear factor- κ B signaling pathway. Experimental and therapeutic medicine, 15(4), 3345-3351.

Zimmermann, M., & Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. In Mammalian Cell Viability (pp. 57-63). Humana Press.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Zeynep Özman

İletişim Bilgileri : zeynepozman54@gmail.com

2. Doğum Tarihi : 24.02.1996

3. Unvanı : Arş.Gör.

4. Öğrenim Durumu : Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013-2017
Y. Lisans	Tıbbi Biyokimya	Sakarya Üniversitesi	2017-2020

5. Akademik Unvanlar

Araştırma Görevlisi- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1. Yüksek Lisans Tezleri

6.2. Doktora Tezleri

7. Yayınlar

7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- Eskiler G.G., Bezdegumeli E., **Ozman Z.**, Ozkan A.D., Bilir C., Kucukakca B.N., Ince M.N., Men A.Y., Aktas O., Horoz Y.E., Akpınar D., Genc I., Kaleli S. (2019). IL-6 mediated JAK/STAT3 signaling pathway in cancer patients with cachexia. Bratisl Lek Listy. 2019;66(11):819-826. doi: 10.4149/BLL_2019_136. PMID: 31747761. (SCI-E)

7.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

- Güney Eskiler G., **Özman Z.** (2020). Impact of BRCA1 mutation status on the therapeutic efficacy of CDK4/6 inhibitors in triple negative breast cancer. European Human Genetics Virtual Conference 2020. E-Poster presentation. June 6-9.

- Şahin E.*, Güney Eskiler G., Özbek İpteç B., Deveci Özkan A., Bakırdöğen M.A., **Özman Z.** (2019). Anti-cancer activity of valproic acid in triple negative breast cancer cells. Cell Death: Degeneration and Regeneration Symposium. Poster presentation. Abstract book page 49. 3-5 October. İstanbul.
- Deveci Özkan A.*, **Özman Z.**, Güney Eskiler G. (2019). Evaluation of Menopausal Hormone Replacement Therapy in Breast Cancer. ERPA International Congresses on Education. Oral presentation. Book of abstracts page 95. 19-22 June. Sakarya.
- Küçükakça B.N.*, İnce M.N., **Özman Z.**, Aktaş O., Bezdegümel E., Men A.Y., Deveci Özkan A., Güney Eskiler G., Kaleli S. (2019). Toll-like Receptor (TLRs) Activity in Metastatic Prostate Cancer and Association with Apoptosis. I. International / IV. National Future of Medical Congress. Poster presentation. Abstract book page 208-209. 20-22 April. Sakarya.
- Cinemre F.B., Bahtiyar N., **Özman Z.**, Shundo H.*, Kahyaoğlu B., Ağaç M.T., Aydemir B., Cinemre H. (2018). The Importance Of Pro And Anti-inflammatory Cytokines In Grading Of Essential Hypertension. Union of Thrace Universities 2nd International Health Sciences Congress. Oral presentation. Abstract book page 3. 15-17 November. Tekirdağ.
- Shundo H.*, Erdoğan A., **Özman Z.**, Cinemre F.B., Bahtiyar N., Kahyaoğlu B., Ağaç M.T., Aydemir B., Cinemre H. (2018). Role Of Ischemia-modified Albumin In Essential Hypertension. Union of Thrace Universities 2nd International Health Sciences Congress. Oral presentation. Abstract book page 4. 15-17 November. Tekirdağ.
- Karacaer C., Bahtiyar N.*, Erdoğan A., Aydın S., **Özman Z.**, Cinemre F.B., Cinemre H., Aydemir B. (2018). The Role Of Trace Elements Status In Patients With Gastrointestinal Bleeding. Union of Thrace Universities 2nd International Health Sciences Congress. Oral presentation. Abstract book page 5. 15-17 November. Tekirdağ.
- Cinemre F.B., Bahtiyar N.*, **Özman Z.**, Ağaç M.T., Kahyaoğlu B., Aydemir B., Cinemre H. (2018). The Relationships Between Oxidative Stress, Inflammation, Trace Elements And Cardiometabolic Parameters In The Etiopathogenesis Of Essential Hypertension. Union of Thrace Universities 2nd International Health Sciences Congress. Oral presentation. Abstract book page 6. 15-17 November. Tekirdağ.

7.3. Yazılan Uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler.

7.4. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- Cinemre F.B., **Özman Z.**, Dilaveroğlu N., Cinemre H., Kaçal Z., Aydemir B. (2018). Sakarya İlinde Yapılan Toplum Sağlığı Taramalarında Beslenme Alışkanlığının İncelenmesi. Sakarya Tıp Dergisi, 2018, 8(2):336-343. (TR-Dizin)

7.5. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

- Bilir C.*, Güney Eskiler G., **Özman Z.** (2019). Metastatik prostat kanserinde nobiletin ve sorafenib kombin uygulamasının EMT üzerindeki etkisi. 3. Ulusal Ürogenital Kanserler Kongresi. Poster bildiri. Bildiri kitapçığı sayfa 21. 24-27 Ekim. K.K.T.C.
- **Özman Z.***, Güney Eskiler G., Bilir C., Deveci Özkan A., Bakırdöğen M.A., İnce M.N., Bezdegümel E., Aktaş O., Kaleli S. (2019). Kanser hastalarında AKT-temelli GSK3 β 'nın kaşeksi gelişiminde rolünün belirlenmesi. 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Poster bildiri. Bildiri kitapçığı sayfa 183. 27 - 30 Ekim. Muğla.
- Bakırdöğen M.A.*, Güney Eskiler G., Deveci Özkan A., **Özman Z.**, Bezdegümel E., İnce M.N., Şahin E., Bilir C., Kaleli S. (2019). Pankreas Kanseri Hastalarında İrinotekan Direncinde GSK3 β ve SMAD4'ün Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi. 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Poster bildiri. Bildiri kitapçığı sayfa 182. 27 - 30 Ekim. Muğla.
- İnce M.N.*, Güney Eskiler G., Deveci Özkan A., Bezdegümel E., **Özman Z.**, Bakırdöğen M.A., Şahin E., Men A.Y., Bilir C., Kaleli S. (2019). Gastrointestinal kanser hastalarında İrinotekan ve Oksaliptatin direncinde IL-6/JAK/STAT3 sinyal yolağının etkisi. 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Poster bildiri. Bildiri kitapçığı sayfa 181. 27 - 30 Ekim. Muğla.
- Men A.Y.*, İnce M.N., Bezdegümel E., Küçükakça B.N., **Özman Z.**, Güney Eskiler G., Deveci Özkan A., Kaleli S., Bilir C. (2019). Gastrointestinal Kanser Hastalarında Oksaliptatin ve İrinotekan Direnci: Gsk3 β -Temelli EMT Mekanizması. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi 19. Ulusal Tıp Öğrencileri Kongresi. Sözlü bildiri. Bildiri Kitapçığı sayfa 68. 3-5 Mayıs. İstanbul.
- Shundo H.* ,Erdoğan A., **Özman Z.**, Cinemre F.B., Kahyaoğlu B., Ağaç M.T., Aydemir B., Cinemre H. (2018) Hipertansiyonda iskeminin ve oksidatif stresin rolü. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi 18. Ulusal Tıp Öğrencileri Kongresi. Poster bildiri. Bildiri Kitapçığı sayfa 47. 11-13 Mayıs. İstanbul.

7.6 Diğer Yayınlar

8.Projeler

- CDK 4/6 İnhibitörü Abemasiklib'in Triple Negatif Meme Kanser Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tez Projesi)
- Türkiye'de Bazı Otokton Üzüm Çeşitlerinden ve Fermente Hallerinden Elde Edilecek Ekstraktların Parkinson Hastalığı in vitro Modelinde Rejeneratif ve Nöro-koruyucu Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması (Uludağ Üniversitesi BAP OUAP(Z) 2017/5).
- TUBITAK SBAG-1001 (119O383). Köpek Meme Tümörü Hücrelerinde Fotodinamik Tedavi (FDT) Etkinliğinin Değerlendirilmesi (Bursiyer).

