



**FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARININ
KEMOTERAPİ DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI
VE POTANSİYEL MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

MERVE EROĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

DOÇ. DR. ERCAN ÇAÇAN

Mart - 2021

Her hakkı saklıdır

**T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARININ KEMOTERAPİ
DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE POTANSİYEL
MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

MERVE EROĞLU

TOKAT

Mart - 2021

Her hakkı saklıdır

TEZ BEYANI

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu yüksek lisans tezinin yazılmasında bilimsel etik kurallarına uyulduğunu, başkalarının çalışmalarından yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir referanstan alınmadığını kullanılan verilerde herhangi bir bozma/değıştirme yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

MERVE EROĞLU

16.03.2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARININ KEMOTERAPİ DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE POTANSİYEL MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ERCAN ÇAÇAN

Meme kanseri dünya genelinde kadın ölümlerine sebep olan, kadınlarda en sık görülen kanserler içerisinde yer almaktadır. Tedavi stratejileri moleküler alt türe göre, kanserin türüne ve yaygınlığına bağlı olarak değişmektedir. Meme kanseri tanısı alan kişiler için genellikle tedavi şekli olarak; cerrahi müdahale, kemoterapi, hormonal tedavi, immünoterapi ve radyasyon terapisi kullanılmaktadır. Tedavilere genel yanıt oranı yüksek olsa da, yanıt süresi nispeten kısadır ve başlangıçta yanıt veren tümörleri olan çoğu hasta, ilaca direnç fenotipini yaşamaktadır. Bu nedenle kanser kemoterapisini ve kanser yönetimini iyileştirmek için kemodirenç alanında birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilen meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231'dir. MCF-7, düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen zayıf agresif ve invazif olmayan östrojen reseptör pozitif (ER⁺) ve progesteron reseptörü (PR⁺) pozitifdir ve lüminal A moleküler alt tipine ait bir hücre dizisidir. Östrojen reseptör pozitif meme kanseri, en yaygın meme kanseri alt tipidir. ER⁺ meme kanserinin tedavisi, östrojen üretimini baskılayan ve / veya doğrudan ER'yi hedefleyen müdahaleleri içerir. MDA-MB-231 ise östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunun yanı sıra insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) içermediğinden oldukça agresif, invaziv ve zayıf diferansiye üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Bu çalışma kapsamında, her iki meme kanseri hücre hattı arasındaki kemoterapi duyarlılığı farkını ortaya koymak adına, Sispilatin, Epirubisin, 5-Florouracil, Vorinostat ve 5-Aza-2dC gibi kemoterapi ajanları kullanılarak sitotoksik etki MTT tekniği kullanılarak ortaya konuldu. Sonrasında, immunojenik bir ajan olarak bilinen proteozom inhibitörü, bortezomibin tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesinin üyeleri olan, T hücre yanıtında önemli rol oynayan ve tümör hücresi üzerinde ifade edilebilen 4-1BBL ve OX40L moleküllerinin protein ve mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri flow sitometri ve qRT-PCR ile ortaya konuldu. Elde ettiğimiz bulgular gösterdiği, kullanılan kemoterapi ajanları her iki hücre hattında farklı sitotoksik etki gösterirken, proteozom inhibisyonunun özellikle MDA-MB-231 hücre hattında 4-1BBL ve OX40L ekspresyon seviyelerini artırarak potansiyel bir immunojenik etki oluşturduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, meme kanseri tedavisinde moleküler fenotipe bağlı bir tedavi şeklinin önerilmesi klinikte daha fazla başarı sağlayacağı fikri bizde hasıl olmuştur.

2021, 67 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Meme Kanseri, , MCF-7 Hücre Hattı, MDA-MB-231 Hücre Hattı, Kemoterapi, Immünoterapi, Üçlü Negatif Meme Kanseri, 4-1BBL, OX40L

ABSTRACT

COMPARISON OF CHEMOTHERAPY SENSITIVITY OF DIFFERENT BREAST CANCER CELL LINES AND INVESTIGATION OF POTANTIAL MECHANISMS

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ERCAN ÇAÇAN

Breast cancer is one of the most common and deadly cancers in women. Treatment strategies change depending on molecular subtypes and metastasis status. Standard treatment options for breast cancer patients include surgery, chemotherapy, hormonal treatment, immunotherapy and radiotherapy. Although most patients respond to initial treatment in a relatively short time, most patients ultimately experience chemoresistance, leading to therapeutic failure. Therefore, many studies were carried out to better understand chemoresistance in order to improve chemotherapy and the management of breast cancer. Most frequently used cell lines in these studies are MCF-7 and MDA-MB-231. MCF-7 cell line corresponds to ER (estrogen receptor)- and PR (progesterone receptor)-positive breast cancer which belongs to luminal A molecular subtype and it has low invasion and metastasis potential. ER-positive breast cancer is the most common subtype of breast cancer and its treatment includes interventions to target ER or to limit estrogen production. MDA-MB-231 cell line is a triple negative breast cancer cell line which does not have ER, PR and HER2 expression, and therefore it is highly aggressive, invasive and poorly differentiated. In this study, the cytotoxic effect of several chemotherapy agents such as Cisplatin, Epirubicin, 5-Fluorouracil, Vorinostat and 5-Aza-2dC was determined by MTT assays in order to reveal the differences in chemotherapy sensitivity between both breast cancer cell lines. We also tested protein and mRNA expression levels of two members of the TNF receptor family, 4-1BBL and OX40L, which are known as important molecules for T cell responses following treatment with an immunogenic agent, bortezomib by using flow cytometry and qRT-PCR. Our findings revealed that the chemotherapy agents used showed different cytotoxic effects in both cell lines, while proteasome inhibition was observed to have a potential immunogenic effect by increasing the expression levels of 4-1BBL and OX40L, specifically in the MDA-MB-231 cell line. As a result, we have come up with the idea that recommending a treatment modality depending on the molecular phenotype in breast cancer treatment will provide more clinical success.

2021, 67 PAGE

KEYWORDS: Breast Cancer, MCF-7 Cell Line, MDA-MB-231 Cell Line, Chemotherapy, Immunotherapy, Triple Negative Breast Cancer , 4-1BBL, OX40L

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesini sağlayan, beni başlangıcından son aşamasına kadar her zaman destekleyen, sahip olduğu deneyim ve bilgi birikiminden her daim faydalandığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a sonsuz minnet, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her daim hissettiğim ve çalışmalarımda yardımını asla esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Burak KÜÇÜK'e minnettarlığımı sunarım. İş ve sosyal hayatımda beni yalnız bırakmayan ve desteklerini her koşulda hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Çağlar BERKEL, Esra YILMAZ, Muhsine ÖZEN, Çağla SEVİNÇ ve Fatma Nihan ÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, bu tez çalışmasında katkılarından dolayı tez jüri üyelerim sayın Doç. Dr. Adem KESKİN ve Doç. Dr. Dursun KISA hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında olduğu gibi, tez çalışmamı hazırlarken de desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam, abim, kardeşim, çok kıymetli Hocam Prof. Dr. Uğur KÖLEMEN'e ve eşim Mehmet Can EROĞLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

MERVE EROĞLU

16.03.2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri	4
2.1.1. Meme kanseri insidansı ve epidemiyolojisi	4
2.1.2. Meme kanseri etiyolojisi	5
2.1.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması ve yaygın hücre hatları	7
2.1.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ve özellikleri	11
2.2. Meme Kanserinde Terapötik Yaklaşımlar	15
2.2.1. Kemoterapi	18
2.2.2. İmmünoterapi	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Kullanılan Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi.....	31
3.2. Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi	32
3.3. Total mRNA İzolasyonu	32
3.4. Quantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	34
3.5. Yüzey Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	34
3.6. İstatistiksel Analizler.....	34

4. BULGULAR ve SONUÇ	35
4.1. Hücre Canlılık Testleri	35
4.1.1. Sisplatin'in meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ...	35
4.1.2. Epirubisin'in meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi	36
4.1.3. 5-FU'nun meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	37
4.1.4. Vorinostat'ın meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi	38
4.1.5. 5-Aza-2dC'nin meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi	39
4.2. Gen Ekspresyon Analizleri.....	41
4.2.1. Bortezomib uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 4-1BBL ve OX40L yüzey protein ekspresyonlarının belirlenmesi.....	41
4.2.2. Bortezomib uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 4-1BBL mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi	44
5-TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	47
6. EKLER.....	52
7. KAYNAKLAR.....	57
8. ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik asit
TCR	T Hücre Reseptörü
IL-1	İnterlökin-1
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HIF-1	Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör-1
GHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
GEM	Gemitabin
DOX	Doksorubisin
PTX	Paksitaksel
VNB	Vinorelbin
5-FU	5-Florouracil
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü-2
TNBC	Triple Negatif Meme Kanseri
DYPD	Dihidropirimidin Dehidrogenaz
TS	Timidilat Sentaz
NHEJ	Non Homolog Uç Birleştirme
NER	Nükleik Asit Eksisyon Onarımı
HR	Homolog Rekombinasyon
BER	Baz Eksisyon Onarımı
SSB	Tek İplik Kırıkları
DSB	Çift İplik Kırıkları
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
MMR	Eşleşmeyen Onarım
IKB	KB İnhibitör Proteinleri
FBS	Fetal Sığır Serumı
CXCR4	CXC Kemokin Reseptörü Tip 4
ZO-1	Zona Occuldens Protein 1
CK18	Sitokeratin 18
BTZ	Bortezomib
TNFSF4	Tümör Negrozis Faktör Süperaillesi-4

TNFR	Tümör Negrozis Faktör Reseptörü
ncRNA	Kodlanmayan RNA
DNMT	DNA Metil Transferaz
HAT	Histon Asetil Transferaz
HDACi	Histon De Asetilaz İnhibitörü
TSA	Trichostatin-A
GATA-1	GATA-binding faktör-1
CTLA-4	Sitotoksik T Lenfosit Antijeni-4
NF-κB	Nükleer Transkripsiyon Faktör κ B
ATCC	American Type Culture Collection
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid
DPBS	Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
APC	Antijen Sunan Hücreler
IS	İmmün Sinaps
PD-L1	Programlı Ölüm Ligandı-1
DC	Denridik Hücre
MM	Multiple Miyoloma
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
SMA	Düz Kas Aktin

ŞEKİL LİSTESİ

Sekil

Sayfa

Şekil 2.1. Meme kanseri risk faktörleri.....	4
Şekil 2.2. Meme kanseri hücre dizileri ve tümörler arasındaki mevcut alt tip şemalarının karşılaştırılması.	8
Şekil 2.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre halarının mikroskop görüntüsü.....	14
Şekil 2.4. Kanser immünoterapisinde OX40-OX40L ve 4-1BB-4-1BBL etkileşimi.	30
Şekil 4.1. Artan konsantrasyonlardaki sisplatinin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi.	36
Şekil 4.2. Artan konsantrasyonlardaki epirubisin'in MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi Bortezomib'in Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi	37
Şekil 4.3. Artan konsantrasyonlardaki 5-FU'nun MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi.	38
Şekil 4.4. Artan konsantrasyonlardaki Vorinostatın MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi.	39
Şekil 4.5. Artan konsantrasyonlardaki 5-Aza-2dC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi.	40
Şekil 4.6. Bortezomib uygulamasının, meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-231) hücre yüzeyinde 41BBL protein seviyesi üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.7. Bortezomib uygulamasının, meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-231) hücre yüzeyinde OX40L protein seviyesi üzerine etkisi.	43
Şekil 4.8. 8 ve 24 saat sonunda belirlenen MCF-7 hücrelerindeki 4-1BBL mRNA ve MDA-MB-231 hücrelerindeki 4-1BBL mRNA transkripsiyon seviyeleri.	45

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 1. Meme kanseri hücre dizisi alt tiplerinin moleküler ve morfolojik özellikleri..10



1. GİRİŞ

Meme kanseri dünya genelinde kadın ölümlerine sebep olan, kadınlarda en sık görülen kanserler içerisinde yer almaktadır. Meme kanseri çok etkenli bir hastalık olup, nedenleri içerisinde doğurganlıkla ilişkili, hormonal, genetik ve sosyo-ekonomik faktörler en önemlileridir (Turashvili ve ark., 2017). Meme kanseri teşhisi farklı değişkenler baz alınarak yapılmaktadır ve kanserin safhasına uygun şekilde bir tedavi stratejisi izlenmektedir (Aygüneş, 2014). Meme kanseri erken evre, metastatik olmayan hastalığı olan hastaların ~%70-80'inde tedavi edilebilir. Uzak organ metastazlı ileri meme kanseri, şu anda mevcut tedavilerle tedavi edilemez olarak kabul edilmektedir. Moleküler düzeyde, meme kanseri heterojen bir hastalıktır (Anastasiadi ve ark., 2017). Moleküler özellikler arasında insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin aktivasyonu (ERBB2 tarafından kodlanan HER2), hormon reseptörlerinin aktivasyonu (östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü) ve / veya BRCA mutasyonları bulunur (Baguley ve ark., 2011). Meme kanserinde yanıt oranı yüksek olsada, yanıt süresi nispeten kısadır ve başlangıçta yanıt veren tümörleri olan çoğu hasta ilaca direnç fenotipini yaşamaktadır (Sun ve ark., 2017). Bu nedenle kanser kemoterapisini ve kanser yönetimini iyileştirmek için ilaca direnç alanında birçok çalışma yapılmıştır.

Meme kanseri ile başa çıkmak için sık sık yeni yaklaşımlar ortaya konulmasına rağmen, birçok kişi hala bu hastalık riski altındadır (Ghobrial ve ark., 2005; Yersal ve Barutca, 2014). Tedavi stratejileri moleküler alt türe göre farklılık göstermekte yani meme kanserinin tedavisi multidisipliner olup lokorejyonel (cerrahi ve radyasyon tedavisi) ve sistemik tedavi yaklaşımlarını içerir (Rossi ve ark., 2019). Sistemik tedaviler, hormon reseptörü pozitif hastalık için endokrin terapiyi, kemoterapiyi, HER2-pozitif hastalık için anti-HER2 terapisini, kemik stabilize edici maddeleri, BRCA mutasyon taşıyıcıları için poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörlerini ve son zamanlarda immünoterapiyi içerir (Bonnetterre ve ark., 2001). Hormon reseptörleri ve/veya HER2 pozitif olgularda kemoterapiye ek olarak uygulanabilecek etkin tedavi yöntemleri mevcutken, bu belirteçlerin negatif olduğu triple negatif olgularda sistemik tedavide tek seçenek kemoterapi olarak görülmektedir (He ve ark., 2011). Meme kanserinde gelecekteki terapötik konseptler, tedavinin bireyselleştirilmesinin yanı sıra, tümör biyolojisi ve erken tedavi yanıtına dayalı olarak tedavinin azalması ve artmasını amaçlamaktadır. Daha ileri tedavi yeniliklerinin yanı sıra, terapötik gelişmelere dünya çapında eşit erişim, gelecek

için meme kanseri bakımından küresel zorluk olmaya devam etmektedir (Libson ve ark., 2014).

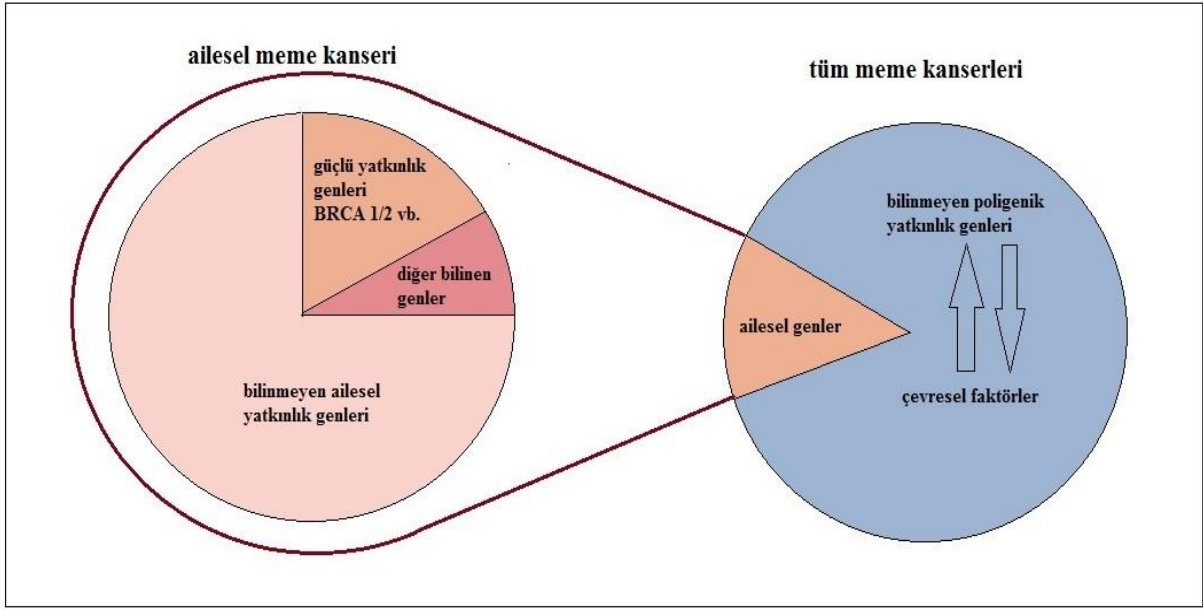
Bu tez çalışmasında, bazı kemoterapötik ajanların iki farklı meme kanseri hücre hattındaki antiproliferatif etkilerini karşılaştırmayı amaçladık. Ayrıca bir kemoterapi ajanı olan, bortezomibin, anti-kanser immünojenik yanıt oluşturmada etkili olan iki gen üzerindeki etkisini ortaya koymayı hedefledik. Bu çalışmada öncelikle meme kanseri tedavisinde kullanılan beş kemoterapötik ajan olan Sisplatin, Epirubisin, 5-FU ve HDAC inhibitörü Vorinostat, ile DNMT inhibitörü, 5-Aza-2dC, çeşitli konsantrasyonlarda kullanılarak çalışmada kullanılan iki hücre hattı üzerindeki etkisi karşılaştırıldı. Bu alışma kapsamında, yukarıda belirtilen ajanlar ayrı olarak kanserli meme hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) zerindeki etkileri MTT test tekniği ile araştırıldı. Ayrıca bu hücre hatlarında; kemoterapötik ve aynı zamanda immünojenik bir ajan olan, yapılan çalışmalar ile kanser hücreleri üzerindeki etkinliği kanıtlanan Bortezomibin, anti-tümör immün yanıtta T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunda önemli rolleri bulunan 4-1BBL ve OX40L moleküllerinin transkript ve protein seviyeleri üzerindeki etkileri ortaya konuldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada en çok gözlenen ikinci kanser türü olup, kadınlarda kanser mortalitesinin önde gelen sebeplerinden bir tanesidir (Ferlay ve ark., 2014). Meme kanserinin 2018 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki vakaların %30'unu oluşturduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra, meme kanserinin görülme sıklığının gün geçtikçe arttığı belirtilmektedir (Rossi ve ark., 2019). ABD'de 2008'de meme kanseri vakaları, kanser kaynaklı ölümlerin %23'ünü oluştururken, Türkiye'de ise kanser kaynaklı ölümlerin %14'ünü oluşturmaktadır. Meme kanserinin, genetik materyalde oluşan mutasyonlar sonucu meydana gelen genetik anormalliklerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Meme kanseri vakalarının %10 ila %15'inde genetik geçiş gözlenirken, %85-90'ına çevresel faktörlerden ve yaşlanmadan kaynaklanan genetik anormalliklerin neden olduğu bildirilmektedir (Çiçekdal, 2018). Meme kanseri hastalarının tedavisindeki yüksek mortalite oranları ve zorlukların sebebinin hastalığın oldukça heterojen doğasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Polyak, 2011).

Meme kanseri oluşumunda yaş, cinsiyet, ırk ve aile hikayesi gibi içsel etkenler ve bununla beraber sigara içme, aşırı alkol kullanımı, yetersiz egzersiz, diyet ve obezite gibi farklı dışsal risk etkenlerinin rol oynadığı bildirilmektedir (Kaminska ve ark., 2015). Bu doğrultuda, yaşam tarzı ile ilgili etkenlerin meme kanseri oluşumu üzerinde genetik etkenlerden daha fazla etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (James ve ark., 2015) (Şekil 2.1). Bu dışsal risk etkenleri detaylı olarak irdelenerek karakterize edilebilirse, meme kanseri oluşumu için daha etkili müdahale yöntemleri geliştirilebilir.



Şekil 2.1. Meme kanseri risk faktörleri (Çiçekdal, 2018).

2.1.1. Meme kanseri insidansı ve epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada ikinci en yaygın kanser olup kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki her kadında yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %12,4 ya da sekiz kadından bir tanesinde meme kanserinin görüldüğü belirtilmektedir (Desantis ve ark., 2017). Kanser dünyanın herhangi bir yerinde olmasına rağmen, gelişmiş ülkelerde insidans oranı daha yüksektir ve meme kanseri insidansının, ırk ve etnik kökene göre büyük ölçüde değişiklikler gösterdiği belirtilmektedir (Desantis ve ark., 2013). Meme kanseri görülme oranı dünyanın farklı bölgelerinde değişmekte olup, Orta Afrika ve Doğu Asya'da 100.000 kişide 27 kişi, Kuzey Amerika'da ise 100.000 kişide 92 kişiye kadar değişiklik göstermektedir (Ferley ve ark., 2013). Meme kanseri insidans oranının 2050 yılına kadar 3,2 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde artan nüfus yaşıyla beraber yaşlı insanlar arasında meme kanseri görülme oranı artmaktadır (Hortobagyi ve ark., 2005). 2017'de ABD'de yaklaşık 252,710 yeni invaziv meme kanseri vakası ve 6,341 invaziv olmayan meme kanseri vakasının teşhis edildiği bildirilmiştir (Williams ve ark., 2018). Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %24'ü Asya-Pasifik bölgesinde görülmekte olup, en yüksek oranların Çin, Japonya ve Endonezya'da görüldüğü belirtilmektedir (Desantis ve ark., 2017). Tarama ve terapötik programlara daha iyi erişim nedeniyle, meme kanserinin sağkalım oranı artmaktadır ve 2005 ile 2011 yılları arasında 5 yıllık sağkalım oranı %89 olarak

bildirilmektedir (Rojas ve Stuckey., 2016). Afrikalı kadınlar arasında meme kanseri teşhisi ve tedavisindeki gecikme nedeniyle, sağkalım oranının oldukça düşük olduğu belirtilmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde meme kanseri insidansı (100.000 başına) aşağıdaki gibidir: gelişmiş bölgeler: 74.1, az gelişmiş bölgeler: 31.3, Batı Avrupa: 96.0, Kuzey Amerika: 91.6, Kuzey Avrupa: 89.4, Avustralya/Yeni Zelanda: 85.8, Güney-Orta Asya: 28.2 ve Doğu Asya: 27.0 olarak bildirilmektedir (Torre ve ark., 2015).

Dünya genelinde 2012 yılında neredeyse 1,7 milyon kişiye meme kanseri teşhisi konulmuş olup bütün kanser olgularının %25'ini oluşturduğu belirtilmektedir. Bu vakaların %53'ü ekonomik yönden gelişim içerisinde olan ülkelerde saptanmıştır. Meme kanseri gelişmekte olan ülkelerde kanserle ilişkili ölümlerin ilk sırasında yer alırken, gelişmiş ülkelerdeyse akciğer kanseri sonrasında 2. sırada bulunduğu belirtilmektedir (Bray ve ark., 2012, Bray ve ark., 2013).

Ülkemiz ele alındığında ise; meme kanseri kadınlarda en fazla gözlenen kanser çeşidi olduğu belirtilmekte ve Sağlık Bakanlığı'nın 2015 yılı verilerine göre her yaştaki kadınlarda kanser türleri içerisinde görülme sıklığının %24,9 olduğuna belirtilmektedir. Ülkemizde meme kanserinin hangi yaş aralığında olduğu irdelendiğinde 60-64 yaş gruplarında meme kanseri hızının 154,3/100000 ile öteki yaş gruplarına kıyasla en çok gözlenen yaş grubu olarak bildirilmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015).

2.1.2. Meme kanseri etiyolojisi

Meme kanserinde etiyoloji tamamıyla anlaşılamamıştır. Genetik, hormonlar, çevre, sosyobiyojoloji ve fizyoloji gibi birbiriyle ilişkili çeşitli faktörlerin, meme kanseri gelişimini etkileyebileceği vurgulanmaktadır. Yapılan çalışmalar, risk faktörleri olarak bilinen birtakım koşulların, birbirini kansere teşvik ettiğini veya yatkın hale getirdiğini göstermiştir. Meme kanseri için tanımlanmış bazı risk faktörleri şunlardır (Angahar, 2017);

- Çevresel faktörler: Nükleer faaliyetler nedeniyle iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, aletlerin kullanımı, tıbbi teşhis veya tedavi prosedürlerinin meme kanserinin gelişme riskini arttırdığı belirtilmektedir (IARC, 2000).

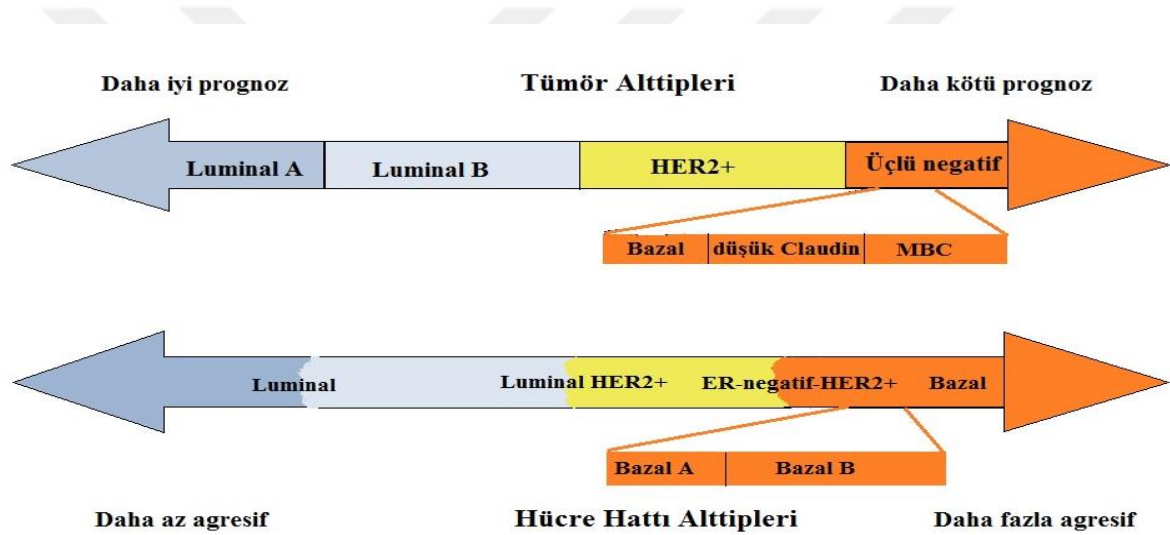
- Sosyobiyojik faktörler: Cinsiyet ve yaş meme kanseri gelişimi için önemli risk faktörleridir. Küresel olarak, yeni vakaların %75'i ve meme kanseri ölümlerinin %84'ü 50 yaş ve üstü kadınlarda görüldüğü belirtilmektedir. Kadınlarda teşhis edilen meme kanseri oranları, kırklı yaşlarda 232'de 1 iken yetmişli yıllarda bu oranın çok daha fazla olduğu belirtilmektedir. Bu artış doğrudan bu yaş grubundaki kadınlarda hormonal değişikliklerle ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (IARC, 2002).
- Beslenme faktörleri: Yüksek miktarda yağ alımı, meme kanseri gelişme riskini artırdığı belirtilmektedir. Yüksek miktarda yağ, kafein ve kırmızı et içeren diyet, meme kanseri için olumlu bir risk faktörüdür. Meyve ve sebze tüketimi meme kanseri gelişme riskini azalttığı belirtilmektedir. Fito-östrojenler ve yüksek miktarda kalsiyum ve D vitamini alımı da meme kanseri risklerini azaltan seçenekler arasında önemli yer tutmaktadır (IARC, 2002).
- Fizyolojik faktörler: Orta derecede fiziksel aktivite veya egzersiz meme kanseri riskini azalttığı belirtilmektedir. Çalışmalar, egzersiz yapılmamasına kıyasla haftada birkaç saat kuvvetli aktivite ile ilişkili risk seviyesinde %30 azalma olduğunu göstermiştir. (Angahar, 2017).
- Genetik faktör: Meme kanserlerinin %10 ile %15'i kalıtsal olarak kabul edilmesine rağmen, genetiğin meme kanserinde bir risk etkeni olarak sınırlı ancak önemli bir rol oynadığı da belirtilmektedir. BRCA-1 ve BRCA-2, kalıtsal meme kanserinin yaklaşık %80'ini oluşturur. BRCA-1 ve / veya BRCA-2 pozitif kadınlarda meme kanseri gelişme riski %50 ile %85 arasında olduğu belirtilirken ve yumurtalık kanserinin gelişme riskin ise %15 ile %65 arasında değiştiği belirtilmektedir (Haber, 2002).
- Aile risk faktörleri: Kanser oluşan bir aile üyeniz var ise bu durumun meme kanserinde bir risk etkeni olduğu kabul edilmektedir. Kanser pozitif bir aile öyküsü meme kanseri için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Green, 2002).
- Bir kadının hormonal geçmişi: Bir kadının ömrü boyunca sahip olduğu adet döngüsü ne kadar fazla olursa, meme kanseri riskinin de o kadar fazla olduğu belirtilmektedir. Meme kanserinin riski göreceli olup, memenin östrojen ve progesterona kümülatif maruziyeti ile ilişkili gibi görüldüğü için hormonal öyküsü bir risk faktörü gibi görünmektedir (Carey, 2010).

- Meme kanseri öyküsü: Meme kanseri tedavisi gören kadınların, tedavi edilen memede veya diğer memede yeni bir ikinci kanser gelişme riski bulunmaktadır (Angahar, 2017).
- Obezite: Obez olan kadınların kan östrojen hormonu seviyelerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Bunun nedeni, yağ hücrelerinin, çoğu meme kanseri tümörünün büyümesini destekleyen östrojen üretmesidir (Byrne ve ark., 1991).
- Bağışıklık sistemi: Bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde, bazı kanser türlerinin gelişme riskinin olduğu belirtilmektedir. Bu, organ nakli sonrasında kullanılan ilaçların etkilerinin yanında HIV veya AIDS gibi hastalıklar sonucu bağışıklığı zayıflayan bireylerde meme kanserinin görülme riskinin olduğu belirtilmektedir (IARC, 2000).
- Sigara: Tütün dumanında 80'den fazla farklı kansere neden olan madde (kanserojen madde) bulunmaktadır. Duman soluduğunda kimyasal maddeler akciğerlere giriş yapar, kan dolaşımına geçer ve vücut boyunca taşınır. Sigara içmek bu nedenle meme, akciğerler ve diğer kanser türleri açısından önemli bir risk etkeni olduğu kabul görmektedir (Angahar, 2017).
- Proliferatif meme bozukluğu: Epidemiyolojik çalışmalar, memedeki değişikliklerin karsinom gelişme riskini artırdığını tespit etmişlerdir (Angahar, 2017). Bu risk, atipi olan veya olmayan hiperplaziden kaynaklanmaktadır. Bu lezyonlara sıklıkla fibrokistik değişiklikler de eşlik etmektedir (IARC, 2002).

2.1.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması ve yaygın hücre hatları

Gen ekspresyon profili, meme kanseri hücre hatlarının sınıflandırması için yaygın biçimde uygulanmış ve farklı kümeler pek çok şema ile eşleştirilmiştir. Birçok araştırmada, lüminal hücre hatları, doku örneği açısından HER2'nin durumuna göre A ve B alt türlerine daha çok ayrıştırılmasa da, birkaç çalışmada MDA-MB-330 gibi ER + HER2 + hücre hatlarını lüminal-ERBB2 + alt tipi olarak sınıflandırmıştır. Bununla birlikte, lüminal-ERBB2+ hücre hatlarının çoğunluğu gibi HCC202, SKBR3, UACC893, SUM190PT, SUM225CWN, HER2 pozitif tümör hastalarına karşılık gelen moleküler düzeyde ER-HER2+ 'dir. Bu hücre hatlarından bazısı lüminal (HCC202, SKBR3, UACC893) olarak isimlendirilirken, bazısı bazal ya da bazal A (SUM190PT, SUM225CWN) olarak isimlendirilmektedir (Neve ve ark., 2006).

HER2+ hücre hatlarına, önemli anlaşmazlıklara rağmen, luminal-ERBB2+, ER-negatif-ERBB2 ve bazal A gibi çeşitli isimler verilmektedir (Riaz ve ark., 2013; Neve ve ark., 2006). ER, PR ve HER2'nin üçlü negatif durumuna sahip hücre hatları, literatürdeki çoğu çalışmada bazal A ve bazal B hücre hatları olarak ayrılmaktadır, bazal A daha luminal benzeri ve bazal B daha bazal benzeri olduğu belirtilmektedir (Lyons, 2019). Literatürlerdeki farklı çalışmalarda hücre hattının alt tip isimlendirmelerini en sık kullanılan meme kanseri sınıflandırma yapısına eşleştirilmiş hali (Şekil 2.2) ve her alt tipin moleküler özellikleri ve morfolojik özellikleri (Tablo 1) ayrıntılı olarak özetlenmiştir. (Neve ve ark., 2006; Kao ve ark., 2009).



Şekil 2.2. Meme kanseri hücre dizileri ve tümörler arasındaki mevcut alt tip şemalarının karşılaştırılması (Dai ve ark., 2017).

ER, PR ve HER2'nin durumuna göre, meme kanseri luminal A, luminal B, HER2 pozitif ve üçlü negatif olarak sınıflandırılır. Burada üçlü negatif tümörler en azından bazal, düşük-claudin, MBC ve interferon açısından zengin olarak ayırt edilebilmektedir. Mevcut literatür genel olarak luminal hücre hatlarını ayırmaz; HER2 pozitif hücre hattı luminal B ve üçlü negatif hücrelere yayılır ve sırasıyla luminal-HER2+ ve ER-negatif-HER2+ olarak adlandırılır. Üçlü negatif hücrelere 'Bazal' alt tipi denir, bazal A ve bazal B sırasıyla bazal tümörler ve claudin düşük ve/veya MBC tümörlerini temsil etmek için daha da ayrıştırılır. İyi prognozlu luminal tümörler ve luminal hücre hatları, üçlü negatif tümörlerden ve hücre hatlarındakilerden daha az agresiftir (Dai ve ark., 2017).

Luminal meme kanseri hücre hattı, PR pozitifliğinin luminal fenotipi yönlendirdiği IBEP-1, 3 gibi istisnai durumlara rağmen, ER pozitifliği ve/veya PR ekspresyonu ile karakterize edilir. Bu tarz hücre hatları, örn; ESR1 (ER α ya da ER), lüminal keratin (KRT8/18/19), GATA3 ve FOXA1 gibi transkripsiyon faktörlerini kapsamak üzere luminal özellikte birleşik gen/protein panelinin yüksek ifadesini göstermektedir. miRNA ekspresyonu profilinde yapılan sistematik bir araştırma, lüminal hücre hatlarında has-miR-501-5p, 202, 760 ve 626'nın belirgin aşırı ifadesini göstermiştir (Riaz ve ark., 2013; Elstrodt ve ark., 2006, Anandaram., 2018). Lüminal hücre hatları daha farklılık göstermekte ve tümör seviyesindekilerle tutarlı biçimde sıkı hücre-hücre bileşimleri sebebiyle daha az göçe eğilim göstermektedir (Dai ve ark., 2017).

Yapılan çalışmaların çoğu, HER2 durumlarına göre luminal hücre hatlarını luminal A ve B alt türlerine daha katmanlaştırmaya da, bu tür bir farklılaşmayı sadece kolay tümör modellemesini kolaylaştırmak ve tümör alt tipi ile tutarlı bir sınıflandırma elde etmek için değil, aynı zamanda son derece önem taşıdığı için benimsenmektedir. Luminal B hücre hatları prensipte, HER2 aşırı ifadesinin düşük-regülasyonu ER ile ilişkili olduğu gösterildiğinden, sonuç olarak luminal A hücrelerine göre daha invaziv ve daha agresif olduğu belirtilmektedir (Lacroix ve ark., 2004). Böylelikle, lüminal B hücreleri lüminal A hücrelerinin fenotip zayıflamasına katıldığından daha uygun biçimde zayıf luminal şeklinde tanımlanabilmektedir (Dai ve ark., 2017).

HER2 pozitif hücre hatları lüminal ve bazal hücre hatları arasındaki boşluğu doldurur ve hem lümen hem de bazal özellikleri içermekte olup heterojen yapıdadır. ER ve HER2 ifadesinin yanı sıra lümen ve bazal belirteçlerin ifadesine göre lüminal-ERBB2+ ve ER-negatif-ERBB2+ olarak gruplandırılırlar (Elstrodt ve ark., 2006). Moleküler niteliklerine uyumlu biçimde, bu alt türdeki hücreler luminal hücrelere oranla hücre göçlerine göre daha agresif özelliktedir, zira aşırı HER2 ifadesi hücre-hücre bağlantılarının parçalanması ile ilintilidir (Lacroix ve ark., 2004).

Üçlü negatif hücre hatları adıyla temsil edilen üç markerin tümü, yani ER-PR-HER2- gibi düşük ekspresyonla veya hiç ekspresyonla gösterilmez (Bergin ve ark., 2016). Tüm alt tipler arasında en heterojen olanlarıdır ve literatürdeki birçok çalışmada bazal A-B hücre hatları

olarak adlandırılmaktadırlar (Kumar ve ark., 2016). Üçlü negatif A (bazal A) hatları, sitokeratin, integrinler ve bazal tümör alt tipine benzeyen bazal markörler ile zenginleştirildikleri için bazal benzeri olarak adlandırılmaktadırlar (Neve ve ark., 2006; Kao ve ark., 2009). Üçlü negatif B (bazal B) hatları, mezenşimal küme veya normal benzeri/düşük-claudin, tümör invaziv ve agresif özellikleri ve CD44 (+) ve CD24 (-) gibi kanser sapması ile ilişkili aşırı eksprese edici genler olarak tanımlanmıştır (Neve ve ark., 2006). Seçilen bir protein paneli (EGFR, CAV1/2, MSN, ETS1), bazal keratinlerle (KRT5/6), CD10 ve MET (mezenkimal epitel geçişi) ve tümör markeri CD44 ile birlikte değerlendirildiğinde üçlü negatif B hücrelerini ortaya çıkmaktadır. Fenotip açısından üçlü negatif A tipi hücreler, üçlü negatif hücre hatları içinde kıyasla daha farklı bir alt tür şeklinde, luminal ya da bazala benzeyen morfolojiye sahip olabilir iken, üçlü negatif B hücreleri daha mezenşimal benzeri bir görüntüye sahiptir ve daha invazivdir (Dai ve ark., 2016).

Tablo 1. Meme kanseri hücre dizisi alt tiplerinin moleküler ve morfolojik özellikleri. Her meme kanseri hücre hattı alt tipinin tanımlanmasında kullanılan mRNA'lar ve protein markörlerinin panelleri ve bunların morfolojik farklılıkları özetlenmiştir. Üçlü negatif hücre dizilerinde, A ve B alt hatları arasında paylaşılan markerler mRNA ve protein sütunlarında ayrı ayrı sunulmaktadır. Meme kanserinin alt tiplendirmesi için konvansiyonel olarak kullanılan 3 önemli reseptör olan östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epitel reseptörü 2'yi (HER2) baz alan 84 hücre hattı karakterize edilmiştir ve bunlar önceki adlandırma kullanılarak sınıflandırılmıştır (Dai ve ark., 2017).

Hücre hattı alt tipi	mRNA	Protein	Morfoloji
Lüminal	ER, GATA3, KRT19/KRT8/KRT18, XBP1, PBX1, ZNF278, SPDEF, CRABP2, MUC1, FOXA1, MYB, RET, EGR3, TFF1, HER3, TOB1, TFF3	ER, GATA3, KRT19	Daha farklı; sıkı hücre-hücre birleşimleri
HER2 pozitif	HER2, GRB7, PERLD1, STARD3, C17ORF37	HER2	Hücre-hücre bağlantılarının parçalanması.
Üçlü negatif	Üçlü negatif A (Bazal A) EGFR CAV1/2 MSN ETS1, KRT4/5/6A/6B/13/14/15/16/17, ITGA6, ITGB4/6, LAMB3, LAMC2, TRIM29, S100A2, SLPI, LYN, ANXA8, COL17A1, BNC1, MET, CD133, GABRK, VTCN1, BST2, FABP7,	EGFR CAV1/2 MSN ETS1 KRT5/6 CD10 MET	Çekirdek bazal benzeri

	CD10/14/58/59, Üçlü negatif B (Bazal B) VIM, SPARC, FN1, FBN1, HAS2, PRG1, COL3A1, COL6A1/2/3, COL8A1, MMP2/14, TIMP1, CTSC, PLAU, PLAUR, AXL, PLAT, CD24(-), CD44, TGFB2, SERPINE1/2, TGFB1,	CD44	En az farklılaşmış, daha mezenkimal benzeri görünüm ve yüksek invaziv
--	---	------	---

2.1.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ve özellikleri

1973 yılında Dr. Soule ve Michigan Kanseri Vakfı'nda meslektaşları tarafından kurulan ve adlarından türetilen MCF-7 hücreleri, metastatik hastalığı olan 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule ve ark., 1973). MCF-7, yıllardır çok sayıda gruptan tarafından yayılan, yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır. Antikanser ilaçları da dahil olmak üzere dünya çapında meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre hattı olduğu kanıtlanmıştır (Kao ve ark., 2009). MCF-7, ER-pozitif ve progesteron reseptörü (PR) pozitif ve lümenal A moleküler alt tipine aittir. MCF-7, normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen zayıf agresif ve invazif olmayan bir hücre hattıdır (Kao ve ark., 2009).

İnsan meme MCF-7 hücre hattı, genellikle tek bir öz olarak muamele görmesine rağmen, çoğu toplam popülasyonun sadece küçük oranlarını oluşturan çok sayıda bireysel fenotip içermektedir (Üstün, 2019). Bu fenotipler gen ekspresyon profili, reseptör ekspresyonu ve sinyal yolunda farklılık göstermektedir. Bireysel fenotiplerin çoğalma oranındaki farklılıklara rağmen, hattın aşamalı kültürlenmesi sırasında, belki de bir tür sinyalleme iş birliği ile, bir şekilde çoklu fenotiplerin dengesi korunmaktadır. İn vitro seçim sürecinin (6 ay veya daha fazla) zaman ölçeği, meme kanseri hastalarında anti-östrojen tedavisine veya aromataz inhibitörlerine direnç geliştirilmesinde klinik olarak ortaya çıkan uzun süre ile tutarlı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tedavi ile ilgili kritik bir soru, ortaya çıkan alt hatların değiştirilmiş reseptörleri ve ilişkili sinyal yollarını ifade edip etmediğidir (Charafe-Jauffret ve ark., 2006).

MCF-7 hücreleri, incelenen varyanta göre 60 ila 140 arasında değişen kromozom sayılarında önemli varyasyonlarla geniş anöploidi sunmaktadır. Diğer sitogenetik farklılıklar, spesifik markör kromozomlarının varlığı veya yokluğu ile ilgilidir. Mevcut veriler, MCF-7 hücrelerinde yüksek seviyede genetik instabilite olduğunu düşündürmektedir. Karyotipik farklılıklar, farklı kültür koşullarına bağlı olarak seçici basınçtaki değişiklikleri yansıtabilir. MCF-7 hücreleri, klonal değişkenlik oluşturabilen bir miktar kök hücre içerir. Bu, bu hücre hattının heterojenitesi için bir açıklama ve meme tümör heterojenliği için bir model olarak önerilmiştir. Farklı MCF-7 varyantları hem genomik hem de RNA ekspresyon seviyelerinde farklılık gösterir (Lacroix ve ark., 2004).

MCF-7 hücreleri, ER-pozitif meme kanseri hücre deneyleri için araştırmalarda her zaman kullanılmaktadır, elde edilen anti-östrojen ilaç direncine yönelik araştırmaların çoğu MFC-7'yi kullanmıştır. MCF-7 hücreleri, kolayca kültürlendikleri ve bu tür bir hedeflenmiş terapi ile tedavi edildiklerinde ER ekspresyonunu korudukları için anti-hormon tedavisine direnç çalışmaları için çok uygundur. Edinilmiş antihormon dirençli meme kanseri hücrelerinin özelliklerini incelemek için, çeşitli anti-hormon ortamlarına uyarlanmış MCF-7 hücrelerinin popülasyonları oluşturulmuştur (Sweeney ve ark., 2012).

MCF-7 meme kanseri hücreleri östrojen (E2) duyarlı hücrelerdir ve çoğalmak için E2'ye bağımlıdır. Yüksek düzeyde ER α transkriptlerini, ancak düşük ER β seviyelerini ifade ederler. Bazı araştırmalar, ER ekspresyonunun ebeveyn hattında tamoksifen dirençli alt hatlarla karşılaştırıldığında zayıf olduğunu öne sürse de, diğerleri MCF-7'nin önemli miktarlarda 17p-östradiol reseptörü içerdiğini göstermiştir. Öte yandan, PR ekspresyonu ebeveyn hattında güçlüdür, ancak tamoksifen dirençli alt hatlarda zayıf veya hatta yoktur (Baguley ve Leung, 2011). MCF-7 hücreleri, östrojen yokluğunda ER ekspresyonunu arttırır. Kısa süreli östrojen yoksunluğu, uzun süreli (altı aydan fazla) östrojen yoksunluğuna kıyasla MCF-7 hücrelerinin farklı tepkilerine neden olur. Azalan proliferasyon oranı östrojen giderilmesinden yaklaşık bir ay sürer, bu süre zarfında MCF-7'nin henüz uyarlanabilir veya telafi edici büyüme mekanizmaları bulamadığını gösterir (Sweeney ve ark., 2012).

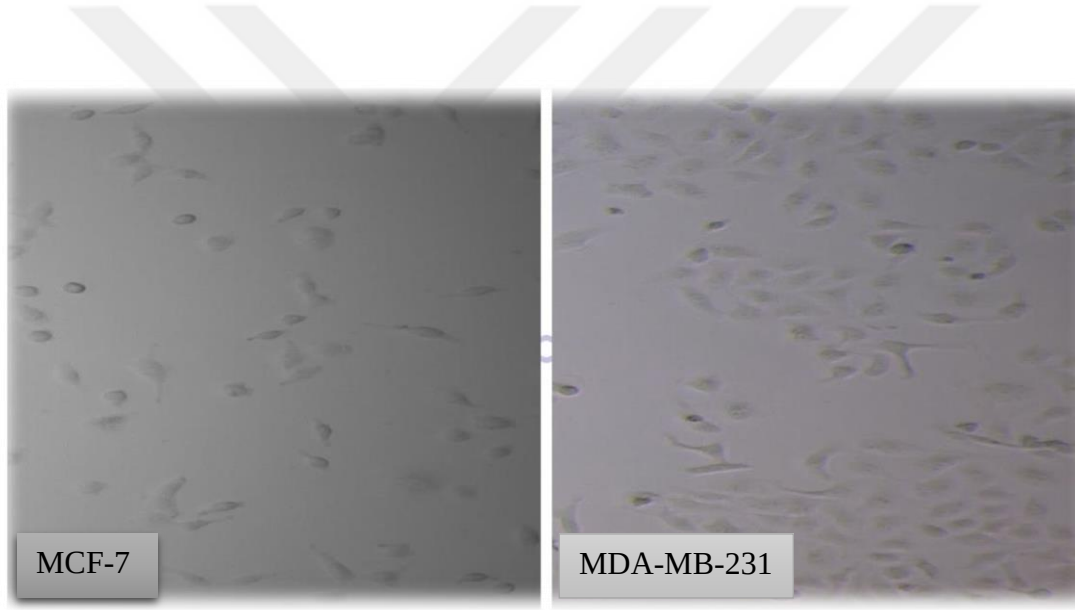
MCF-7 alt hatları, ER, PR ve HER2'nin nispi ifadesinde geniş bir uyumsuzluk göstermektedir. Baskın fenotipin oranı büyüme koşulları ile muhafaza edilebilir, ER-pozitif fenotipin

baskınlığı, fetal sıgır serumunda az miktarda östrojen bulunmasıyla sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, östrojen yokluğunda genişletilmiş büyüme, EGFR, HER2 ve sinyal yollarının diğer uyarıcılarına dayanan varyantları seçmektedir. İlginç bir şekilde, ER-, PR- ve HER2-negatif (üçlü-negatif) alt-hatların da ER-pozitif MCF-7 hücre hattından kaynaklandığı görülmektedir (Comşa ve ark., 2015). Bu, klinik uygulamadaki üçlü negatif meme kanserlerini anlamak için yararlı bir model oluşturabilir. Bu nedenle, tek bir kanser hücre hattının varyantlarının üretilmesi, klinik kanserde çoklu fenotiplerin gelişimini yeniden özetleyebilmektedir (Baguley ve Leung, 2011).

MCF-7 hücreleri farklılaşmış meme epitelinin özelliklerini gösterir; E-cadherin, β -katenin ve sitokeratin 18 (CK18) gibi epitelyal belirteçler için pozitif ve vimentin ve düz kas aktin (SMA) gibi mezenkimal belirteçler için pozitifdir. MCF-7 ebeveyn hücreleri, hücreler arası bağları oluşturan diğer proteinlerin yanı sıra, kladinler ve zona occuldens protein 1 (ZO-1) gibi doğal epitel tabakalarının diğer spesifik moleküler belirteçlerinin ekspresyonunu da muhafaza etmektedir. Öte yandan, MCF-7 hücreleri CD44 yönünden eksiktir (Comşa ve ark., 2015). MCF-7pl (ebeveyn MCF-7 hücreleri) ve MCF-7A3 (interlökin (IL)-1 β uyarısına yüksek hassasiyet, CXCR4 kemokin reseptörü tip 4'ün (CXCR4) homojen ekspresyonu ve interlökin 1 reseptörünün stabilitesi, tip I için seçilen hücreler (IL1RI)), uyarılmamış koşullar altında hücre yüzeyi üzerinde benzer bazal IL-1RI ekspresyonuna sahiptir. Bununla birlikte, IL-1 ile 48 saat boyunca uyarıldığında, MCF-7pl hücreleri, MCF-7A3 hücrelerine kıyasla reseptörü yüzeylerinden kaybetmektedir. Bu sonuçlar IL-1p'nin reseptörün ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyebileceğini veya MCF-7A3 hücrelerinde daha hızlı geri dönüşümü indükleyebileceğini düşündürmektedir (Perez-Yepe ve ark., 2012).

MDA-MB-231 hücre hattı, metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşındaki kadının plevral efüzyonundan izole edilmiş olup epitelyal, insan meme kanseri hücre hattıdır. MDA-MB-231, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunun yanı sıra HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü) içermediğinden oldukça agresif, invaziv ve zayıf diferansiye üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır (Yin ve ark. 2020). Diğer invaziv kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin invazivliğine, hücre dışı matrisin proteolitik degradasyonu aracılık etmektedir (Chavez ve ark., 2010).

ER ve PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonu eksikliğinin bir sonucu olarak, hücre hattı başlangıçta bir bazal meme kanseri hücre hattı olarak sınıflandırılmıştır. Bununla birlikte, artık claudin-3 ve claudinin-4'ün aşağı regülasyonunu, Ki-67 proliferasyon markırının düşük ekspresyonunu, epitelyal-mezenkimal geçişle ilişkili markörler için zenginleştirme sergilediğinden düşük-claudin moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmektedir (Harrell ve ark., 2014). 3D kültürde, hücre hattı endotel benzeri morfolojiyi gösterir ve sıklıkla çoklu hücre kolonilerini köprüleyen yıldız şeklinde çıkıntılara sahip olan invaziv fenotipi ile ayırt edilmektedir (Kenny ve ark., 2007).



Şekil 2.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre halarının mikroskop görüntüsü

Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçeneklerine sahip agresif bir meme kanseri formudur. Bu nedenle, üçlü negatif meme kanserinin moleküler temelini anlamak, etkili yeni ilaç gelişimi için çok önemlidir ve sonuç olarak, bu özel meme kanseri türü için potansiyel olarak aktif ajanlar hakkında MDA-MB-231 hücre hattı kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı, kemik metastazı araştırması için iyi bir araç olarak belirlenmiştir. İntra ventriküler enjeksiyon sonrası farelerin kemik, beyin ve akciğerlerine tercihe bağlı metastaz yapabilen MDA-MB-231 hücrelerinin alt klonları da izole edilmiştir (Denkert ve ark., 2017), böylece bu hücre hatının spesifik bölgelere potansiyel metastaz araçları olan genlerin ve yolların tanımlanmasında kullanılmasına izin verilmiştir (Chavez ve

ark., 2010). MDA-MB-231 hücreleri, 2mM glutamin ve %15 fetal sığır serumu (FBS) ile desteklenen Leibovitz'in L-15 ortamında 37C°de elde edilmektedir. Bu ortam, CO₂ dengesi olmayan ortamlarda hücrelerin büyümesini desteklemektedir.

2.2. Meme Kanseriinde Terapötik Yaklaşımlar

Çoğalan ve farklılaşan hücreler uygun fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için sıkı bir şekilde düzenlenirler. Bunu başaramadıkları zaman kanser gibi kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan ve belirsiz bir seyri bulunan progresif hastalıklara yol açılır (Maughan ve ark., 2010). Meme kanseri kadınlarda en sık tanı alan kanser türü olup, kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Waks ve ark., 2019). Genel yanıt oranı yüksek olsa da, yanıt süresi nispeten kısadır ve başlangıçta yanıt veren tümörleri olan çoğu hasta, ilaca direnç fenotipini yaşamaktadır (Sun ve ark., 2017). Bu nedenle kanser kemoterapisini ve kanser yönetimini iyileştirmek için ilaca direnç alanında birçok çalışma yapılmıştır (Harbeck ve ark., 2017).

Tedavinin hedefi, hastalığı ortadan kaldırmak, tedaviden sonra normal yaşama uyumu kolaylaştırmak ve hastanın hayatını muhafaza etmektir. Hastalığın evresine ve tipine bağlı olarak tedavi değişiklik göstermektedir. Tedavi için hastalığın hangi evrede olduğu son derece önem taşımaktadır. Yapılacak tedavi metodu hastalığın bulunduğu evreye, hastanın içerisinde bulunduğu psikolojik haline ve sosyal haline göre cerrahi, hormonal terapi, immünoterapi radyoterapi ve kemoterapinin farklı kombinasyonlarından oluşmaktadır (Nagini, 2017). Meme kanseri tedavi edilmesinde, tedavinin biçimi, tümörün nitelikleri, tedaviye başlama dönemi ve hastanın tümöre direnci oldukça etkilidir. Bireyler arasında tedaviye direnç bakımından değişimler görülebilmektedir. Hasta için en cazip tedavi metodu seçilerek uygulanması gerekmektedir (Veronesi ve ark., 2005). Meme karsinomu için tedavi seçimi, dozlar, dozlama planı ve tedavi için kullanılan terapötik ajanların tepkileri, risklere göre daha ağır basmalıdır ve düzenli takiplerle izlenmelidir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan terapötik ajanlar, terapötik sonuçlarına ek olarak advers ilaç reaksiyonlarına neden olur ve bu tür advers reaksiyonlar, hastanın tedaviye uyumunu engellemektedir. Bu nedenle, bu tür endikasyonlarla başa çıkabilmek için tedavi öncesi ve sonrası, standart tedavi önerileri ile uyumlu olmalıdır (Peart ve ark., 2015).

Son dönemde yapılan terapötik gelişmelere rağmen, meme kanseri nedeni ile her yıl çok sayıda insan yaşamı ölüm ile sonuçlanmaktadır (Von ve ark., 1992). Bu nedenle, cerrahi sonrası yinelenme riskini azaltmak veya metastatik hastalığı olan hastaların sağkalım süresini uzatmak için terapötik ilerlemeye gerçekten ihtiyaç duyulmaktadır.

Yirminci yüzyılın ilk çeyreğinden günümüze kadar uygulanan antikanser ilaçlar için değişik ölçütlere göre birbirinden ayrı sınıflandırmalar söz konusudur. Örneğin, kimyasal şekillerine, elde edildikleri kaynaklara, etki mekanizmalarına, veya dokusal zayıt kabiliyetlerine göre sınıflandırılmaktadır. Antikanser ilaçlar içerisinde sitotoksik kemoterapötikler, zehirleyici, kimyasal terapötikler hücre siklusunun belirli veya herhangi bir döneminde, bazı hücresel işlevlerin ve böylelikle hücre bölünmesinin önlenmesi, apoptotik veya nekrotik hücre ölümü indüksiyonu gibi mekanizmalar ile hücrelere zarar verebilen maddelerdir (Ricci ve Zong, 2006). Meme kanserlerinin neredeyse %70'i östrojen bağlantılıdır ve hastaların çoğunda östrojen reseptörlerini (ER) eksprese edilmesini sağlamaktadır. ER pozitif meme kanser hücreleri, ER ile regüle edilebilen gen transkripsiyonu aracılığıyla, östrojen ile harekete geçebilen proliferasyon mekanizması gösterebilmektedir. Östrojen ile stimüle olan meme kanser hücrelerinin proliferasyonu durdurulması durumunda, meme kanserinin kontrol altına alınabileceği ileri sürülmektedir. Örneğin, tamoksifen (TAM) meme kanserinde yaygın olarak uygulanan ilaçlardan biridir, tesirini endojen östrojen aktivitesini durdurarak göstermektedir (Osborne ve ark.,1998).

Tamoksifen, östrojen reseptörüne bağlanan ve karışık agonist ve antagonist özelliklere sahip olan seçici bir östrojen reseptör modülatörüdür; yani ana etki mekanizması, östrojen reseptörüne bağlanması ve östrojenin meme epitelyumu üzerindeki proliferatif aktivitelerinin inhibisyonu ile kolaylaştırmaktır (Moo ve ark., 2018). Meme kanseri tedavisinde tamoksifen 20 mg tabletler altın standart olarak belirlenmiştir (Anjum ve ark., 2017). Araştırmalar, menopoz veya lenf nodu durumundan bağımsız olarak tamoksifen kullanımı ile ER+ meme kanseri nüks riskinin %50'ye düşürdüğünü ve morbidite oranlarında yaklaşık %28 azalma meydana getirdiğini belirtilmiştir. Aromataz, menopoz sonrası kadınlarda başlıca östrojen kaynağıdır. Menopoz sonrası kadınlarda (özellikle ER+ meme kanserinde) tamoksifen yerine, genellikle üçüncü nesil aromataz inhibitörleri, yani letrozol, anastrozol ve eksemestan

kullanılmaktadır (Bonneterre ve ark., 2001). İlaçlar menopoz sonrası kadınlarda gelişmiş pozitif sonuçlar göstermiştir ve ayrıca önceki hormonal tedavilere göre daha iyi vücut toleransına sahip oldukları belirtilmiştir (Anjum ve ark., 2017).

Siklofosfamid DNA replikasyonunu ve hücre bölünmesini önler ve meme kanseri metastazının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu pro ilaç hepatik hücre içi enzimler yoluyla aktif metabolitlere yani (4 hidroksi siklofosfamid, aldofosfamid, akrolein ve fosfor amid hardalı) aktif forma dönüşür. İlaç genellikle CMF (siklofosfamid+metotreksat+flourourasil) kombinasyon rejiminde veya meme kanserinin tedavisi için antrasiklin ile adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır (Spring ve ark., 2016). Karboplatin ve cisplatin gibi platin bileşikleri çeşitli kanserlere karşı kullanılır ve meme kanserini tedavi etmek için monoterapi veya kombinasyon rejimi olarak kullanılmaktadır (Anjum ve ark., 2017). Platin bileşiklerinin DNA konformasyonu ve stabilitesi üzerindeki etkisi araştırılmış, in vivo ve in vitro bir dizi platin DNA eklentisi bilinmektedir. Mono tedavi altındaki metastatik meme kanseri hastalarının yaklaşık %20-35'inde karboplatin tedavisine yanıt verildiği bulunmuştur. Gempitabin ve taksanlar genel olarak platin bileşikleriyle kombinasyon halinde kullanılan ilaçlardır (Perez ve ark., 2005). Paklitaksel ve dosetaksel, hücresel mikrotübül elementlerini stabilize ederek mitotik tutuklamaya neden olan en yaygın kullanılan taksanlardır. Bu ajanlar ya monoterapi olarak ya da kombinasyon programında kullanılmıştır. Bu ajanların haftalık yönetim programının meme kanserinde çok az toksisite ile iyi tolere edildiği bildirilmiştir (Anjum ve ark., 2017).

Trastuzumab, HER2/neu pozitif meme kanseri hastaları için hayatta kalma oranlarını iyileştiren biyolojik olarak aktif, insancıllaştırılmış bir monoklonal antikordur. Bu monoklonal antikor klinik olarak güvenli ve 3 haftada bir rejimde etkilidir ve ayrıca paklitaksel, gempitabin, vinorelbin veya karboplatin ile kombinasyon halinde de etkilidir (Shaughnessy ve ark., 2004).

Lapatinib, EGFR ve HER2 tirozin kinazın oral olarak aktif, geri dönüşümlü bir blokeridir ve aktivitesinin esas olarak HER2'ye bağlı olduğu belirtilmektedir. HER2-pozitif meme kanseri hücrelerinin monoport olarak apoptoz indüksiyonunu göstermiştir ve dirençli meme kanseri hücrelerine tamoksifen duyarlılığını yeniden sağladığı belirtilmiştir.

Ayrıca lapatinib ilk basamak tedavi olarak letrozol ile kombinasyon halinde HER2-pozitif metastatik meme kanseri için resmi olarak kullanılmaktadır. Lapatinib ve kemoterapi kombinasyonu %22 yanıt oranı ve %27 klinik değer oranı sağladığı ve monoterapi olarak, daha önce trastuzumab ile tedavi edilen hastalarda ise %12,4 ila %25 klinik değer oranları sergilediği, ancak bazı durumlarda, lapatinib'e karşı sınırlı direnç meydana geldiği belirtilmiştir (Anjum ve ark., 2017).

2.2.1. Kemoterapi

Kemoterapi, doğal veya sentetik kimyasal ya da biyolojik ajanlar ile gerçekleştirilen bir tedavi yöntemidir. Kemoterapi yöntemi ile tedavide ana hedef kişinin tümör hücrelerinin kontrolsüz şekilde büyümesini ve çoğalmasını önlemek ya da tümörü ortadan kaldırmaktır. Kemoterapötik ilaçlar tümör hücrelerini ortadan kaldırırken bununla beraber bireylerin sağlıklı hücrelerinde (bağırsak-ağız mukoza epiteli, testisin germinatif epiteli, kemik iliğinin hematopoetik hücreleri, kıl folikülü, embriyo ve fetüs hücreleri gibi) de zayıflar oluşturabilmektedir ve birtakım yan etkilere sebep olabilmektedir (Pond ve ark., 2019). Kanser türüyle ilişkili olmakla beraber, kanser hastalarının bir kısmında kemoterapiyle tam tedavi ya da uzun bir iyileşme dönemi sağlanabilmektedir (Anjum ve ark., 2017). Günümüz dünyasında, sadece cerrahi ya da radyasyon ile tedavi yaklaşık %20 iken, kemoterapiyle birleşik yapılan tedavinin başarısının neredeyse % 75'lere kadar çıkabildiği belirtilmektedir (Ölgen ve ark., 2002). Bireylerde hem kanser hastalığının kendisi hem de kanser için yapılan tedavi metodları hastaların ciddi sağlık problemlerinin yaşamasına sebep olabilmektedir (Zhang ve ark., 2014). Bu sebeple kanser ve kanser tedavisiyle bağlantılı olarak hastaların hayat kalitesi önemli seviyede düşmektedir (Hindistan ve ark., 2012; Ölgen ve ark., 2002; Altıparmak ve ark., 2011). Vücudumuzdaki hızlı büyüyen hücreleri öldürmek için kullanılan güçlü kemoterapi ajanları mevcuttur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kemoterapi ajanları kullanılarak ubiquitin-proteozom yolunun inhibisyonu hedeflenmektedir. Ubiquitin-proteozom yolu kanser ve çeşitli nörodejeneratif bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (Adams, 2003). Proteinlerin aminoasitlere kadar yıkılmasının dışında bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF- κ B) kısmi yıkılmasında (işlenerek olgunlaşmasında) ve aktivasyonundan sorumludur (Xu ve ark., 2015). Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) tümör oluşumu ile doğrudan ilişkili olan

hücre proliferasyonu, apoptozis, anjiyogenez ve metastazın yanında, bağışıklık sistemi ve inflamasyon gibi birçok önemli olayda rol alan 500'den fazla genin regülasyonunu uyaran bir transkripsiyon faktörüdür (Li ve ark., 2016). NF- κ B bir heterodimerdir ve beş alt birimden meydana gelir. Bu kompleks sitoplazmada öncü (prekürsör) olarak KB inhibitör proteinleri (IKB) ile bağlı olarak inaktif halde bulunur. NF- κ B'nin alt birimlerinin etkinliği proteozom aracılığıyla düzenlenir. Uyarılmayan hücrelerde NF- κ B, IKB ile kompleks oluşturarak inaktif halde bulunur. Hücre uyarı alınca IKB ubiquitinlenerek fosforlanır. Bunun sonucunda sitoplazmada protein degradasyonundan sorumlu proteozom kompleksleri (26S proteozom kompleksi) aktifleşmiş IKB'yi parçalayarak NF- κ B'den ayırır. NF- κ B serbest kalınca aktif bir transkripsiyon faktörü olan hücre nükleusuna geçip DNA'ya bağlanarak, DNA'da canlılığı, proliferasyonu ve apoptotik ilişkili birçok genin ekspresyonunu uyarır (Engür ve Dikmen, 2015). Proteozom aktivitesi, NF- κ B fonksiyonunda aktivite artışına ve buna bağlı olarak da hücrenin kanserleşmesi yönünde birçok gen aktivasyonuna neden olur (Lei ve ark., 2019).

Proteozom tarafından parçalanacak olan katlanmış proteinler ve fonksiyonel proteinler bu mekanizma yoluyla ER lümeninde ve sitozolde birikmektedir. Bu birikim, aşırı ER yüklemesi, aşırı oksijen üretimi ve hücre içi proteinlerin fonksiyonel bir bozukluğu gibi çeşitli stresleri kolaylaştırır ve sonuçta ER stresine bağlı apoptoza ve DNA hasarına bağlı hücre ölümüne sebep olmaktadır (Masaki, 2016). Proteozom inhibitörleri, proteozomların fonksiyonlarını inhibe eder, gen ekspresyonuna bağlı olarak protein yapımını ve çoklu sinyal iletimini engellerler. Sinyal iletimi kesilince kanserli hücreler ölür ve tümörün büyümesi baskılanır (Rastogi ve Mishra, 2012).

Yakın zamanda ubiquitin/proteozom sistemi, hücrenin büyümesi ve ölmesi arasındaki denge, kişilerin malignansilerinin gelişmesi ve kanser hücrelerinde oluşan ilaç direnci gibi mekanizmalar için ihtiyaç olarak geliştirilmiştir (Engür ve Dikmen, 2015). Proteozom işlevinin inhibe edilmesi, anti-kanser terapisi için güçlü bir metot şeklinde ortaya çıkarılmıştır. Proteozomun klinik olarak teyit edilmesinin ardı sıra ilk proteozom inhibitörü olan bortezomib, kanser tedavisinde tercih edilmeye başlanmıştır ve farmakolojik olarak geliştirilmiş olan ikinci nesil proteozom inhibitörlerinin keşfedilmesini hızlandırmıştır (Engür ve Dikmen, 2015). Peptid boronatlar, önceki nesil proteozom inhibitörlerinin eksikliklerinin üstesinden gelir ve bortezomib, ubiquitin-proteozom mekanizmasını etkileyerek kanserli

hücrelerin ölmesini sağlayan ilk FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) onaylı 26S proteozom inhibitörü, klinik deneylere giren ilk peptid boronattır. Bortezomib özellikle 26 S'nin kimotripsin benzeri aktivitesini inhibe etmektedir ve halihazırda multiple miyelom ile mantle hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır (Rastogi ve Mishra, 2012). Klinik öncesi çalışmalar, bortezomib'in geniş antitümör aktivitesine sahip olduğunu ve sayısız klinik çalışmanın tek bir ajan olarak ve çeşitli malignitelere karşı diğer aktif antitümör ajanlarla kombinasyon halinde etkinliğini artırdığını göstermiştir.

Epirubisin, ameliyat sonrası meme kanseri tedavisinde diğer kemoterapötik ilaçlarla da kullanılabilen bir antrasiklin ajan olarak bilinmektedir. Epirubisin antimitotik ve sitotoksik aktiviteye sahiptir. Önerilen bir dizi etki mekanizması yoluyla nükleik asidi (DNA ve RNA) ve protein sentezini inhibe etmektedir. Epirubisin, baz çiftleri arasında interkalasyon ile DNA ile kompleksler oluşturur ve topoizomerez II kompleksini stabilize ederek topoizomerez II katalizörünün religasyon bölümünü inaktive ederek topoizomerez II aktivitesini inhibe etmektedir. Epirubisin ayrıca polimeraz aktivitesini inhibe edebilir, gen ekspresyonunun düzenlenmesini etkileyebilir ve DNA'ya serbest radikal hasarı üretebilir. Epirubisin, geniş spektrumlu tümör hücrelerine karşı anti-tümör etki gösterebilir. Ancak spesifik olmayan bir kemoterapötik ajan olduğundan uygun dozlarda kullanılmadığı takdirde yüksek toksisiteye sebep olabilir. Epirubisin, diğer kemoterapötik ajanlarla kullanıldığında meme kanserindeki anti-tümör etkisinin daha da arttığı gözlemlenmiştir (Khasraw ve ark., 2012).

Etkin maddesi olarak floropirimidini içeren anti-kanser ilacı olan 5-Flourouracil (5-FU) ve kapesitabin çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılan, dünya çapında meme kanserinin tedavisinde birinci sırada uygulanan anti-kanser ilaçları olarak kabul edilmişlerdir (Sahai ve ark., 2002). 5-FU yapısı nedeni ile nükleotid metabolizmasına müdahale eder ve hücrede sitotoksisiteye ve hücre ölümüne yol açmak için tümör hücresinin RNA ve DNA yapısına dahil olabilmektedir. 5-FU'nun direnç mekanizmaları yani timidilat sentaz (TS) ve dihidropirimidin dehidrogenazın (DYPD) artan aktiviteleri, kanser hücreleri ile yapılan in vitro ve klinik çalışmalarda 5-FU'ya direnç kazandırığı tespit edilmiştir (Habibive ark., 2019). Aslında 5-FU bir DYPD inhibitörü olarak 5-kloro 2, 4-dihidroksipiridin ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Buna rağmen kullanılan bu kombinasyon tedavide yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle 5-FU'ya karşı oluşturulan diğer direnç mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir. 5-FU'ya karşı oluşturulan direnç mekanizmalarının

araştırılması 5-FU'ya dirençli hastalar için yeni etkili anti-kanser kemoterapilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir (Ramakers ve ark., 1998).

Triple negatif meme kanseri (TNBC) östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü-2 (HER-2) ekspresyonu olmayan tümör çeşidi olarak tanımlanır. Tüm meme kanserlerinin %11-23'lük kısmını TNBC hastaları oluşturmaktadır (Foulkes ve ark., 2010). TNBC hastaları diğer formlardan farklı olarak daha agresif bir klinik seyreder ve hastalarda kötü prognoza yol açabilir. Ayrıca hormonal tedavi veya anti-HER-2 tedavisi için endikasyonları yoktur (Dent ve ark., 2007). Bu nedenle TNBC hastalarının tedavisi 5-FU, vinorelbin, paksitaksel, doksorubisin, gemitabin gibi sitotoksik ilaçlarla sınırlı kalmaktadır. Bununla birlikte TNBC hastaları bir dizi tedavi aşamasından sonra sitotoksik ilaçlara karşı direç kazanabilirler (Isakoff ve ark., 2010). TNBC hastalarının kemoterapi tedavisinde sitotoksik ilaçlara karşı direnç kazanımının tedavide büyük bir klinik problem haline geldiği görülmüştür.

Sisplatin, 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından klinikte kullanılması onaylanan platin bazlı bir anti-kanser ilacıdır (Makovec, 2019). Günümüzde sisplatin farklı kanser türlerinin tedavisinde yalnız başına ya da diğer ilaçlarla, cerrahi müdahale veya radyasyon terapisi ile kombinasyon halinde hastalara uygulanabilmektedir. Özellikle testis, over, serviks, baş ve boyun ve küçük hücreli akciğer kanserlerinin tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedir (Luo ve ark., 2018). Sisplatin en iyi bilinen mekanizması DNA zincirleri arasına penetrasyon kabiliyetiyle açıklanmaktadır. İlacın bu fonksiyonunu takiben DNA üzerinde oluşan lezyonlar DNA hasar tamirini harekete geçirerek mitokondri aracılı gelişen apoptozisi indüklemektedir. Sisplatin birçok solid tümörün tedavisinde sıklıkla kullanılan platin bileşiği bir kemoterapotik ajandır. Kemoterapotik bir ajan olan sisplatine karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği dirençte çok sayıda moleküler mekanizma rol almakta ve bu direnç farklı tümör tiplerinde farklı özellikler sergilemektedir. Kolon ve KHDAK (Küçük hücreli dışı akciğer kanseri) gibi tümörler sisplatine karşı kendilerine özgül veya yerleşik direnç gösterirlerken, baş ve boyun, testis, over ve KHAK' lerinin (Küçük hücreli akciğer kanseri) çoğunlukla sisplatine duyarlı olduğu bildirilmektedir (Vildan ve Zuhail, 2013). Ancak duyarlı tümörlerin çoğu tedavi başlangıcından sonra kazanılmış direnç geliştirebilmektedir. Sisplatin direnci gelişimindeki mekanizmaların tam olarak anlaşılması, yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesi ve

klirik yanıtın önceden belirlenebilmesi açısından özellikle önem kazanmaktadır. Sisplatinin etki şekli, DNA üzerindeki pürin bazları ile çapraz bağlanma yeteneğiyle bağlantılıdır. DNA onarım mekanizmalarına müdahale ederek, DNA hasarına neden olur ve daha sonra kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Ayrıca, sisplatin diğer ilaçlarla kombinasyon terapilerinin, ilaca karşı direncin üstesinden gelmesi ve toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Moleküler biyolojideki gelişmeler ile sisplatinin, DNA hasarının tanınması ve hasar sinyallerinin iletimi, hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı ve apoptozun indüklenmesi gibi hücre içinde izlediği yollar hakkında daha fazla bilgi birikimi sağlanmıştır. Bu birikim daha etkili kombine tedavi seçeneklerinin oluşturulmasını ve/veya yeni platin bazlı kemoterapotik ilaçların geliştirilmesini kolaylaştıracaktır.

Meme karsinogenezi, hem genetik hem de epigenetik değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreçtir. Epigenetik DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişiklikleri ifade eder (Byler ve ark., 2014). Epigenetik mekanizmalar memelilerde normal gelişim ve doku spesifik ekspresyon için gereklidir. Epigenetik regülasyonun meydana gelen herhangi bir bozulmanın kanser de dahil birtakım hastalıkların patogeneğinde yer aldığı belirtilmektedir. Kanser genetik ya da epigenetik değişimlerin birikimiyle oluşan, çok aşamalı kompleks bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser gelişimi onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybıyla hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve metastatik karakterler kazanması ile karakterize edilmektedir. Kanserde epigenetik düzenlenmenin bozulması erken dönemlerde meydana gelmektedir. Sonuçta gen işlevinin değişmesine, malign dönüşüme sebep olur ve kanserin ilerlemesinde son derece önemli roller oynamaktadır (Kanwal ve Gupta, 2012). Epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kodlamayan RNA'lar (ncRNA) olmak üzere 3 farklı tipte incelenmektedir (Eroğlu, 2018). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, memeli hücrelerinde gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde iki önemli faktördür. DNA metilasyonu tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybına neden olan önemli mekanizmalardan biridir ve kanserde erken tanı ve tedavi stratejisi belirlemede kullanılma potansiyeline sahip bir biobelirteçtir (Fardi ve ark., 2018). CpG dinükleotitlerinde karbon 5 pozisyonunda bir metil grubunun eklenmesine yol açan kovalent bir kimyasal modifikasyon olan DNA metilasyonu, insan kanserlerinde en tutarlı ve en iyi bilinen epigenetik olaylardanır (Gürel ve ark., 2016).

Normal hücrelere kıyasla insan kanseri hücreleri, genomik kararsızlığa yol açabilen DNA hipometilasyonu ve gen susturmaya aracılık eden tümör baskılayıcı genlerin spesifik promoter hipermetilasyonunu sergiler. (Anjum ve ark., 2000). Genetik değişikliklerin aksine, epigenetik değişiklikler farmakolojik müdahale ile tersine çevrilebilir. Birçok çalışma, bu epigenetik işlemlere aracılık eden temel hücresel enzimlerin yapısını ve işlevlerini anlama üzerine ve daha sonra bu proteinleri hedef alan küçük molekül inhibitörleri geliştirmeye odaklanmıştır (Fardi ve ark., 2018). Ek olarak, epigenetik değişiklikler kanser terapilerinin gelişmesi için giderek daha değerli hedefler olarak kabul edilmektedir. Metilasyon DNA baz sekansını değiştirmediğinden, araştırmacılar potansiyel olarak anti-kanser ajanları olarak kullanılabilecek DNMT'lerin küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır (İzmirli, 2013). Kanserde, DNMT'ler meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edilir. DNMT'lerin inhibisyonu, tümör oluşumunda azalma ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun artması ile ilişkilidir (Bird, 2002). Bu nedenle, DNMT'ler spesifik anti-kanser stratejilerinin tasarımı için değerli hedefler olarak kabul edilir. DNMT'lerin en yaygın kullanılan üç katalitik inhibitörü, 5-aza C, 5-aza-2dC ve zebularin olan nükleosid analoglarıdır (Subramaniam ve ark., 2014). Bu ajanlar, DNMT'lerin inhibitörü olarak hareket etmek için DNA'ya bağlanması gereken ilaçlardır. Spesifik bir DNA metiltransferaz inhibitörü olan 5-Aza-2'-deoksisitidinin (5-Aza-2dC) insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Momparker, 2005). Yapılan çalışmalarda, 5-Aza-2dC'nin G(1)/S hücre döngüsü durmasını önemli ölçüde indüklediğini ve hücrelerin apoptoz oranını arttırabildiğini göstermiştir. 5-Aza-2dC'nin, DNA metiltransferaz ekspresyonunu inhibe ederek ve Apaf-1 gen ekspresyonunu tekrar aktive ederek tümör hücrelerinin büyümesini geciktirebileceği ve meme kanseri hücrelerinin apoptozunu arttırabileceği sonucuna varılmıştır (Xiong ve ark., 2009).

Son yıllarda birçok farklı DNMT inhibitörü geliştirilmiştir ve DNMT inhibitörlerinin anti-kanser etkilerini indüklediği çoklu moleküler mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalara kısmen yüksek konsantrasyonlarda belgelenen sitotoksik etkileri olan DNA hipometilasyonu aracılık etmektedir. Net etki apoptoz, sitostaz, farklılaşma ve tümör anjiyogenezi gibi hücresel süreçlerde yer alan spesifik genlerin modülasyonudur. Bu nedenle, DNMT inhibitörlerinin kanser tedavisinde, özellikle diğer ajanlarla veya radyoterapi gibi diğer tedavilerle kombinasyon halinde umut verici bir ilaç sınıfı olarak ortaya çıkması şaşırtıcı

değildir. Bazı DNMT inhibitörleri klinik çalışmalara girmiş olsa da, şu anda, özellikle diğer mevcut tedavilerle kombine edildiğinde, kesin etki mekanizmaları hakkında sınırlı bilgiye sahibiz (Gravina ve ark., 2010).

Kromozomal DNA, kromatin içine paketlenir ve yapısal histon proteinlerinin etrafına sarılır. Histonlar, kromatinin şeklini ve yapısını korumaktan sorumludur (Marino-Ramirez ve ark., 2005). Histon proteinlerinin aminoasit kuyruğunda, kromatinde konformasyonel bir değişikliğe ve dolayısıyla tümör baskılayıcılar gibi önemli genlerin transkripsiyonuna neden olan bir dizi translasyon sonrası değişiklik meydana gelebilir (Byler ve ark., 2014). Bu değişiklikler arasında asetilasyon, metilasyon veya fosforilasyon bulunur. Histon asetilasyonu, histon asetiltransferaz (HAT) ile histon deasetilaz (HDAC) arasındaki aktivite dengesi ile kontrol edilir. Birincisi, gen transkripsiyonunu kolaylaştıran kromatinin çözülmesine veya "açılmasına" neden olan histonlara bir asetil grubu ekler (Bora-Tatar ve ark., 2009). HDAC' ler, asetil gruplarını, transkripsiyonu engelleyen kromatinin sarılmasına veya "kapanmasına" yol açan histonlardan çıkarır ayrıca hücre sağkalımı, çoğalması, farklılaşması ve apoptozis için önemli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir (Orr ve ark., 2007). Bunlara ek olarak tümör baskılayıcılar da dahil olmak üzere genlerin promotör bölgesine transkripsiyon faktörlerinin toplanmasından ve spesifik hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin asetilasyon durumunun düzenlenmesinden sorumlu bir protein kompleksinin üyeleri olarak görev yapar (Butler ve ark., 2000). Histonların asetilasyonu yoluyla transkripsiyondaki rollerine ek olarak, birçok histon dışı hedefin asetilasyonunu da düzenlerler ve böylece gen ekspresyonunun translasyon sonrası regülasyonunda anahtar fonksiyonlar gerçekleştirebilirler (Parbin ve ark., 2014). HDAC'lerin ve HAT'ların bu merkezi düzenleyici rolü, antikanser ajanlar olarak HDAC inhibitörlerinin geliştirilmesi için mekanik bir mantık sağlamıştır. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), DNA sekansında kalıcı değişikliklere neden olmadan, geniş bir dizi geçici gen ekspresyonu değişimini indükleyen yeni bir antikanser ajan sınıfını temsil eder. HDACi'ye hücresel cevap karmaşıktır ve histon ve histon olmayan proteinlerin translasyon sonrası asetilasyonlarını değiştirerek düzenlenmesini içerir, böylece çeşitli kanser yollarında kritik bir rol oynar.

HDAC enzimlerinin potansiyel ilaç hedefi olması sebebiyle bu enzimleri engelleyen ya da bloke eden moleküller dikkat çekmektedir. HDAC inhibitörleri, tümör baskılayıcı proteinlerin, transkripsiyon etkenlerinin ve histonların asetilli kalmasını destekleyerek

biyolojik etkinliklerine tesir edebilmekte ve genlerin ifade şekillerinde değişiklikler meydana getirebilmektedir. Deasetilasyonun önlenmesi vasıtasıyla transkripsiyon etkenleri histonlara bağlanmakta ve transkripsiyonun sürekliliğini sağlamaktadır (Karsli ve ark., 2014). HDAC inhibitörleri yapısal niteliklerine göre hidroksamik asitler, karboksilik asitler, siklik tetrapeptidler, benamidler ve elektrofilik ketonlar olarak beş sınıfa ayrılmaktadır ve I. II. ve IV. sınıf çinko bağımlı HDAC enzimlerini bloke etmektedir (Eot-Houllier ve ark., 2009).

Vorinostat tarafından HDAC aktivitesinin inhibisyonunun birden fazla hücresel etkisi bulunmaktadır. Bu etkiler arasında, histonların ve transkripsiyon faktörlerinin asetilasyonu yoluyla sınırlı sayıda genin transkripsiyonunda (eksprese edilmiş genlerin %2-5'i) bir değişiklik ve ayrıca mitozun inhibisyonu yoluyla hücre döngüsü durması gibi transkripsiyonel olmayan etkiler bulunmaktadır (Richon, 2006). Vorinostatın, bir kısmı bastırılırken indüklenen birkaç genin ekspresyonunu etkilediği belirtilmektedir. Hücre kinaz inhibitörü p21WAF1 için gen ekspresyonunun indüksiyonu, vorinostat dahil olmak üzere birçok HDAC inhibitörü için gösterilmiştir ve bu etki, transforme edilmiş hücrelerin büyümesinin durmasında kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir. Vorinostat, t21 mesane karsinom hücrelerinde p21WAF1 mRNA'da ve proteinde 9 kata kadar artışa neden olmaktadır. Bu etkinin kısmen p21WAF1 promotörü ile ilişkili H3 ve H4 histonlarının asetilasyonu ile ilişkili gen transkripsiyon oranında bir artışa bağlı olduğu belirtilmektedir (Richon, 2000). Vorinostat ayrıca androjen reseptörü, E2F-1, YY1, Smad7, EKLF, p53, BCL-6, HIF-1, NF-Y, NF-kappaB ve GATA-1 dahil olmak üzere çok sayıda transkripsiyon faktörünün asetilasyonunu teşvik edebilmektedir (De Souza ve ark., 2015). Histon asetilasyonu gibi, transkripsiyon faktörü asetilasyonu, belirli genlerin ekspresyonunda bir değişikliğe neden olabilmektedir. Örneğin, p53 transkripsiyon aktivatörünün asetilasyonu, p53'ün DNA'ya daha fazla bağlanmasına yol açar, bu da p53 tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu artırmaktadır (Richon, 2006).

2.2.2. İmmünoterapi

İmmünoterapi bir canlının kendi bağışıklık sistemine ait belirli kısımların kanserde dahil bazı hastalıklarla mücadele edebilmek için uygulanan tedavi yöntemidir. Hedef immün sistem hücrelerinin kanser hücrelerine karşı savaşarak onları ortadan kaldırmaktır. İmmünoterapi değişik yollarla etki gösterebilen tedavi yöntemlerini kapsamaktadır. Kimi

kanser türlerinde tek başına etkili olduğu, kimi kanser türlerinde ise öteki tedavi metotları ile beraber kullanılması durumunda etkinliğinin arttığı belirtilmektedir (Emens ve ark., 2018).

Kanser immünoterapisindeki temel amaç, tümör hücresi tarafından çeşitli yollarla susturulmuş olan immün sistemi yeniden aktive etmek ve tümör hücrelerini tanınır hale getirmektir. Bu konuda üç temel yaklaşım söz konusudur (Katz ve ark., 2018). Bunlardan ilki tümörle ilgili antijenlerin hedef alındığı monoklonal antikor aracılı hücre ölümü, ikincisi non-antijen spesifik immün sistem modülasyonu yapan kontrol noktası inhibitörleri ve üçüncüsü de tümör ilişkili antijenler aracılığıyla immün sistemin T helper, T sitotoksik hücrelerini uyarmayı ve uygun antikor oluşumunun tetiklenmesi hedefleyen terapötik kanser aşılardır (Galvan ve ark., 2020).

Kanser immünoterapisi ayrıca aktif ve pasif olarak da iki gruba ayrılmaktadır. Aktif immünoterapi spesifik ve uzun süreli bir anti-tümör immün yanıtı indüklemeye çalışmaktadır (Baxter, 2014). Başka bir deyişle, aşı bağışıklık sistemini uyarmak için aktif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Tümör aşılması, tümörle ilişkili proteinlerin ve peptitlerin immünojen olarak kullanılmasından dendritik hücre aşılmasına kadar ilerleyebilmektedir (Schuster ve ark., 2006; Baxter, 2014). Aksine, pasif immünoterapi bir bellek yanıtı teşvik etmemektedir ve monoklonal antikorlar ya da donör sitotoksik T hücrelerinin doğrudan kanser hücrelerini hedeflemek ya da konakçı adaptif bağışıklık sistemini aktive etmek için transferini kullanmaktadır (Baxter, 2014). Mevcut kanser tedavilerini değiştiren bir tip monoklonal antikor, kontrol noktası blokaj antikorlarıdır (Bayraktar ve ark., 2019). Bu strateji, T hücreleri üzerinde mevcut olan inhibitör reseptörlerini bloke ederek tümör mikroortamında mevcut immünosupresyonu tersine çevirmeyi ve sonuç olarak, bunların anti-tümör fonksiyonlarını uygulamaya teşvik etmelerini amaçlamaktadır (Khalil ve ark., 2016). Bu yöntem klinikte başarı göstermiş, anti-CTLA-4, anti-PD 1 ve anti-PD-L1 tedavileri FDA tarafından onaylanmıştır. CTLA-4, geçici olarak T hücreleri üzerinde ve yapısal olarak T düzenleyici hücreleri üzerinde eksprese edilen inhibitör reseptördür. T hücreleri, AP28'ler üzerinde CD28 veya CD86'ya bağlanan CD28 ile aktive olduklarında, CTLA-4 aynı ligandlar için yarışarak hücre yüzeyinde ifade edilmektedir. CTLA-4 bağlantısı, T hücresi aktivasyonunun sönmesine neden olup, bağışıklık sisteminin kontrol mekanizması olarak işlev görmektedir (Khalil ve ark., 2016). Bununla birlikte, bir kanser ortamında aynı durum meydana geldiğinde, T hücreleri anti-tümör aktivitelerini ve dolayısıyla CTLA-4 blokaj antikorlarına olan ihtiyacı

gerçekleştirememektedir. Allison (1996) yaptığı çalışmada, bu yöntemi fareler üzerinde denemiş olup, tedavi edilen farelerin tümörlerin reddedilmesine yol açtığı bir murin modelinde göstermeyi başarmıştır (Leach ve ark., 1996). PD-1 ayrıca T hücreleri üzerinde eksprese edilen ve CTLA-4'e benzer şekilde inhibe edici bir reseptör olup, T hücresi fonksiyonunu baskılamaktadır. APC'lerin ve tümör hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen PD-L1 ve PD-L2'ye bağlanır. Bu durumda kanser hücreleri, PD-1'e bağlanarak T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonundan bağışıklıktan kaçabilmektedir. Bazı kanserlerde, bu ligandın ekspresyonu normalde kötü prognoz ile ilişkilidir (Khalil ve ark., 2016). Ancak kontrol noktası tedavileri, T hücrelerinin genel aktivasyonuna bağlı bazı yan etkileri teşvik edebilmektedir (Baxter, 2014).

T hücresi kositimülatör tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) OX40 ve bunun aynı kökenli ligandı OX40L'nin immünoregülasyonda ve özellikle terapötik bir hedef olarak kullanılması revaçtadır. 1994 yılında OX40L, aktive T hücrelerinde düşük seviyeli ekspresyon ile EBV ile dönüştürülmüş bir B hücre hattında tanımlanmıştır (Fang ve ark., 2020). OX40 için bu ligand, bir tip II transmembran proteinidir ve hem mRNA hem de protein, insan T hücresi lösemi virüsü 1 ile enfekte edilmiş hücrelerde belirgin şekilde indüklenmektedir. OX40L trimerik formda eksprese edilir ve üç OX40 molekülünü yüksek afinite ve yavaş ayrılma ile bağlar. Klonlandıktan sonra, OX40L'nin çeşitli standart uyarılara yanıt olarak T hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. OX40 ve OX40L/ ligand-reseptör çifti sadece memeli soyunda mevcuttur ve hafızanın ince ayarına ve plasentasyondan sonra sürekli üreme başarısına izin vermek için yüksek afiniteli antikör üretimine izin verecek şekilde evrimleştiği ileri sürülmüştür (Basile ve ark., 2019).

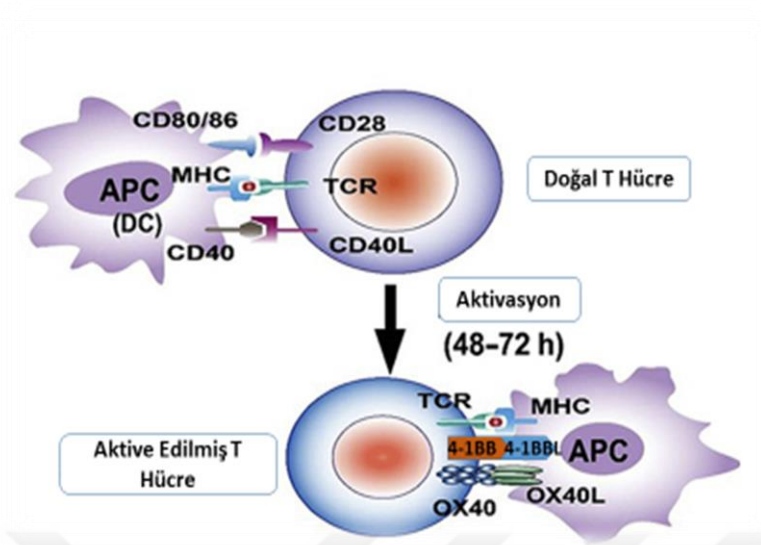
OX40 ile olduğu gibi, OX40L ekspresyonu, antijen sunan çoklu hücrelerde (B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler) antijen sunumuna yanıt olarak yukarı regüle edilmektedir. OX40L'yi eksprese etmek için indüklenebilen hücre repertuarı, OX40'tan daha geniş olduğu ve mast hücreleri, bronşiyal düz kas, maligniteler, vasküler endotel hücreleri ve Langerhans hücreleri üzerinde eksprese edilebildiğini savunan çalışmalar mevcuttur (Byun ve ark., 2013). Aktive edilmiş CD4+ ve CD8+ T hücreleri de OX40L ile eksprese edilebildiği belirtilmektedir (Soroosh ve ark., 2006) OX40L' nin hem aşılama da immün tepkileri teşvik etmek ve kanser immünoterapisinde toleransı kırmak için hem de aşırı duyarlılık,

ateroskleroz, sepsis ve otoimmünitede immün aktiviteyi azaltmak için immün aktiviteyi artırma kapasitesi bulunmaktadır (Basile ve ark., 2019).

OX40 inaktif T hücrelerinde ifade edilmez ancak T hücre aktivasyonundan oldukça geç bir süre sonra ifadesi artar. Aktif T hücreleri antijen sunan hücrelere bağlandığında, OX40 ile OX40L bağlanır. OX40 ilk üç gün CD4⁺ hücrelerin bölünme yetenekleri üzeri bir etkiye sahip değildir. Ancak bu sürenin ardından, proliferasyon yavaşlamaya ve hücreler daha hızlı bir şekilde ölmeye başlar (Arch ve ark., 1998). Bunun sebebi hücrelerin yüksek seviyede PKB (Akt) aktivitesini ve Bcl-2, Bcl-XL ve survivin ifadesini devam ettirememeleridir (survivin proteinleri kaspaz aktivitesini inhibe ederler, bu sebeple apoptozun negatif düzenlenmesine neden olurlar). OX40L, T hücrelerindeki OX40 reseptörlerine bağlanır, bu bağlanma bu hücrelerin ölümünü engeller ve nihai olarak sitokin üretimini artırır. OX40 ilk birkaç gün sonrasında immün yanıtın ve immün hafızasının devam etmesinde önemli bir rol oynar, bunun sebebi hayatta kalımlarını artırma yetenekleridir. Bunun yanı sıra, OX40 Th1 ve Th2-aracılı in vivo reaksiyonlarda da kritik rol oynar. Bu yüzden, antijen spesifik T hücre yanıtlarının kantitatif ve kalitatif tarafları (sitokin üretimi, sitolitik fonksiyon, bölünme, hayatta kalma vs.), OX40-aracılı kostimülatör sinyaller tarafından artırılır. Özellikle, araştırmalar, transplant reddine ait fare modellerinde, CD28 ve CD154 bloklanmasına dirençli donör reaktif hafıza T hücrelerinin OX40 bloklanmasına hassas olduklarını göstermiştir. Bu, OX40 yolağının hafıza T hücre aracılı reddin yavaşlatılması için umut verici bir terapötik hedef olabileceğini desteklemektedir. OX40'ın bir diğer ilginç yanı da, artan miktarda çalışmanın OX40 sinyallerinin Foxp3⁺ Treg hücrelerinin baskılayıcı kapasitelerini kontrol etmede önemli olduğunu göstermesidir. OX40 düzenleyici T hücrelerin gelişimi ve fonksiyonunda önemli bir düzenleyici olarak görev yapar. Örneğin, Foxp3⁺ Treg hücrelerindeki OX40'ın ligasyonu, bu hücrelerin efektör T hücre proliferasyonunu ve IFN- γ üretimini baskılama yeteneklerinin kaybına yol açar ve OX40'ı Foxp3⁺ Treg hücre aktivitesinin negatif düzenleyici olarak ortaya koyar. OX40'ın ligandına bağlanmasında sonra, OX40, TRAF2, TRAF3, TRAF5, PI3K proteinlerini henüz bilinmeyen bir mekanizma aracılığı ile biraraya getirir. Ardından, sinyaller IKK $\alpha/\beta/\gamma$ ve Rel A/B aracılığı ile çekirdeğe iletilir ve ilgili genlerin ifadesini düzenler: örneğin Bcl-2, Bcl-XL ve survivin ifade artışı ve Foxp3 ve CTLA4 ifadelerinin düşüşü gibi. Önceki çalışmalar, TRAF2'nin NF-KB ve hafıza hücre jenerasyonu aracılığı ile hayatta kalım için gerekli olduğunu gösterirken, TRAF5 negatif ya da düzenleyici rol oynar görünür, çünkü knockout'lar yüksek sitokin seviyelerine

sahiptirler ve Th2-aracılı inflamasyona karşı daha hassastırlar. TRAF3, OX40-aracılı sinyal iletiminde kritik rol oynayabilir. CTLA-4'nin ifadesi, OX40 ile ligandının in vivo bağlanmasından sonra düşer ve OX40-spesifik TRAF3 DNA hasarı CTLA-4'ün in vivo bloklanmasının üstesinden kısmen gelir. TRAF3, OX40-aracılı hafıza T hücre artışı ve hayatta kalımı ile ilişkili olabilir ve CTLA-4'ün ifadesindeki düşüşün, OX40 sinyali aracılığı ile erken T hücre artışı sağlayan olası bir kontrol elemanı olduğuna işaret eder (Kawamata ve ark., 1998).

4-1BB, T hücresi belleğinin genişlemesi, efektör fonksiyonunun kazanılması, hayatta kalma ve geliştirilmesinde rolleri olan ortak uyarıcı bir moleküldür. Aktif T hücrelerinde eksprese edilmesine ek olarak, 4-1BB ayrıca hematopoietik soydaki birkaç hücre tipinde ve ayrıca endotelyal ve epitel hücrelerinde eksprese edilir. 4-1BB hücre dışı alanı, kısa bir sarmal transmembran alanı ve bir sitoplazmik sinyalleme alanını oluşturan dört sistein açısından zengin sözde tekrardan (CRD'ler) oluşan bir glikozil tip I membran proteinidir (Kwon, ve Weissman, 1989). T hücresi ortak uyarıcı reseptörü 4-1BB (CD137), T hücreleri antijene özgü sinyaller aldığı anda indüklenmektedir. 4-1BB ligandının (4-1BBL) reseptörü 4-1BB'ye bağlanması, T lenfositine hayatta kalma, proliferasyon ve farklılaşma için birlikte uyarıcı sinyaller sağlar. 4-1BBL (CD137L) ayrıca dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri gibi antijen sunan hücrelerde indüklenmektedir (Pollok ve ark., 1993) 4-1BBL, saf T hücrelerinde eksprese edilmez, ancak T-hücresi reseptörü ile aynı kökenli MHC'lerde eksprese edilen peptid kompleksi ile birleştikten sonra hızla upregüle edilmektedir (Hurtado ve ark., 1997; Pollok ve ark., 1993). 4-1BBL-4-1BB yolu, T hücrelerini, yerleşik tümörlerin yok edilmesi ve birincil ve hafıza CD8 T hücresi yanıtlarının genişletilmesi gibi efektör işlevleri yerine getirmek için birlikte uyarmaktadır. 4-1BB aracılı sinyallerin, güçlü anti-kanser ve anti-otoimmün etkilere sahip yeni bir CD11+ CD8 + T hücreleri alt popülasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Pollok ve ark., 1993).



Şekil 2.4. Kanser immünoterapisinde OX40-OX40L ve 4-1BB-4-1BBL etkileşimi.

4-1BB ligandı 4-1BBL, TNF süper ailesinin bir tip II zar proteinidir. 4-1BB/4-1BBL kompleksi, diğer TNF ailesi üyeleriyle karşılaştırıldığında reseptör ve ligand arasında benzersiz bir etkileşim göstermektedir. Tümör nekroz faktör süper ailesinin (TNFSF) üyeleri tipik olarak bir homotrimerik kompleks olarak bulunur ve genel olarak hücre zarları üzerinde eksprese edilir, ancak bazıları çözünür faktörler olarak salınmalarına izin veren proteolitik işleme yerleri içerir (Chin ve ark., 2018).

4-1BB'nin birincil ligandı olan 4-1BBL (TNFSF9); AKT, p38 MAPK ve ERK sinyel yolları ile NF- κ B'yi etkinleştirmek için TRAF1 ve TRAF2 aracılığıyla sinyal göndermeyi indüklemek için 4-1BB ile bağlanır. Bu sinyalleme yolları, survivin, Bcl-2, Bcl-XL ve Bfl-1 kodlayan hayatta kalma genlerinin ekspresyonunu indükler ve pro-apoptotik Bim ekspresyonunu azaltır. Bu nedenle, 4-1BB / 4-1BBL sinyal yolu, farklı tip hücrelerin yaşamasını teşvik edebilir. İlginç bir şekilde, virüs yüklemesine yanıt olarak fenotip, 4-1BB ve onun ligandı arasında farklılık gösterir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi

Metastatik özelliğe sahip meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattı, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dr. Öğretim Üyesi Tuğba ÖZDEMİR'den ve MCF-7 hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'dan alınmış olup, uygun koşullarda kültüre edilerek aşağıda planlanan deneyler için kullanılmıştır. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde, steril ortamda gerçekleştirildi.

Hücre hatları EMEM besi yeri içeren steril T75'lik hücre kültür flasklarında %5 CO₂ ortamında 37°C de hücrelerin durumuna göre 3-4 gün inkübe edildi. Hücreler konfluent hale geldiğinde, flasklardaki besi yeri dökülecek ve hücreler 10 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra adheren hücreleri flaskların zemininden ayırmak için 3-4 mL %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi. Daha sonra flask el yardımıyla biraz çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanıp, oluşan hücre süspansiyonu 50 mL'lik steril falkon tüplere aktarıldı. Bu falkon tüplere, tripsini nötralize etmek için 10 mL katkılı taze besi yeri eklenip, hücreler 1500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelleti üzerine 4 mL taze besiyeri eklenerek steril bir pastör pipetle hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon haline getirilen ilk kuşak hücreleri eksponansiyel log fazına sokmak için üçer gün arayla dört ekim daha yapıldı. Sonunda eksponansiyel log fazına sokulan hücreler çalışma için uygun hale getirildi. Hücre konsantrasyonunu belirlemek için hücre süspansiyonundan alınan 20 µL hücre ile 20 µL %0,4 (wt/vol) tripan mavisi solüsyonu karıştırılarak, bu karışımın 20 µL'si Thoma lamına pipetlenerek mikroskop altında birinci sayım alanından 5 kare, ikinci sayım alanından 5 kare olmak üzere toplam 10 kare sayıldı [1 mL hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı = 10 karede sayılan toplam hücre sayısı / 10 x 2 (Tripan mavisi seyreltme faktörü) x 16 (bir sayım alanındaki toplam kare sayısı) x 10 000 (katsayı)]. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 mL'lik falkon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu hazırlandı.

3.2. Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan ajanların, ayrı olarak kültüre edilen kanserli meme hücre proliferasyonuna olan etkilerini ve ölçmek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] testi uygulandı. Hücreler farklı dozlarda belirlenen ajanlarla ayrı olarak 24 ya da 48 saat inkübe edildikten sonra MTT test protokolü uygulandı. MTT testi, kolorimetrik bir test olup materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde çok sık kullanılmaktadır. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu çalışmada formazan oluşumu spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesiyle saptandı. Kısaca özetleyecek olursak, muamele edilmiş adherent hücreler kültür ortamından kaldırılarak 96 kuyucuklu pleytte 100 µL taze besi yeri içeren kültür ortamına aktarıldı. Önceden hazırlanmış olan 12 mM MMT stok solüsyonundan 10 µL alınıp her kuyucuğa ilave edildi. Negatif kontrol olarak, yine MMT stok solüsyonundan 10 µL alınıp içerisinde sadece 100 µL media bulunan kuyucuğa ilave edildi. Hücreler daha sonra 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yine önceden hazırlanacak olan 0.01 M SDS-HCl çözeltisinden 100 µL alınıp her kuyucuğa ilave edildi ve tekrar 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra örnekler bir pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra 570 nm'de absorbansları okundu.

Sonuçlar % hücre inhibisyonu olarak rapor edilmekte olup, çözücü ile muamele edilmiş hücrelerin optik densitesi % 100 olarak kabul edildi. Buna göre % inhibisyon $[1 - (A \text{ test maddesi} / A \text{ çözücü kontrol}) \times 100]$ formülüne göre hesaplandı. Tüm maddeler hem normal hemde kanser hücre hatları kullanılarak 3 kez test edildi.

3.3. Total mRNA İzolasyonu

Bortezomib muamelesinin immünojenik hücre ölümünde görev alan bazı genlerin ifadeleri üzerindeki etkileri quantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile belirlendi. OX40L ve 4-1BBL genlerinin kullanılan meme kanseri hücrelerindeki transcript

seviyelerinin nasıl etkilendiğini belirlemek amacıyla qRT-PCR yöntemi uygulandı. Bu amaçla öncelikle hücreler yukarıda belirtildiği gibi 24 saat bortezomib ile muamele edildikten sonra hücreler toplanarak totalRNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyonu için, T25 flasklara 750.000 hücre ekildi ve hücrelerin flaska tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda 10 nM bortezomib flasklara eklendi. Daha sonra 37°C de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu sonrası medium hücrelerden uzaklaştırdı ve pleytler soğuk Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sartorius, Almanya) ile yıkandı. Bu işlem sırasında hücrelerin zarar görmemesine dikkat edildi. Hücreler daha sonra tripsin yardımıyla flaskların yüzeyinden kaldırıldı ve media eklenerek falkon tüplerine aktarıldı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası biriken pelletin üzerine 1 mL QIAZOL lizis reaktifi (Qiagen-Almanya) ilave edili ve oda sıcaklığında 5 dk altüst edildi. Sonrasında 1.5 mL lik steril eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 200 µL kloroform (Amresco, ABD) eklenerek hafifçe alt üst edildi. 12.000 rpm 4 °C, 15 dk santrifüjlendi. Üst faz diğer kısımlara karıştırılmadan mikropipetle dikkatli bir şekilde alınarak yeni steril eppendorflara aktarıldı. Üzerine 500 uL izopropanol (Amresco, ABD) eklendi. Hafifçe alt-üst edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi ve sonrasında 12.000 rpm, 4 °C de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant döküldü (dipte kalan RNA) ve her eppendorfa 1 mL %75'lik ethanol (Isolab) ilave edildi. 3000 rpm'de 4 °C de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant dökülerek pelletler kısa süreli kurumaya bırakıldı. Son olarak RNA peletleri RNAaz-içermeyen saf steril su içerisinde çözdürüldü ve konsantrasyonları Multiskan Go cihazı kullanılarak ölçüldü. İzole edilmiş RNA örnekleri RT-PCR deneylerinde kullanılabilecek kadar – 86 °C muhafaza edildi. RNA kalitesini düşürmemek için yoğun donma-çözülme döngüleri önlemleri.

3.4. Quantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

qRT-PCR deneylerinde, Bioline qRT-PCR (Meridian Bioscience, Tennessee, ABD) kiti kullanılmıştır. Her reaksiyon için verilen şu karışım hazırlanmıştır: 2x MyTaq One-Step miksi (25 ul), forward primer (10 uM, 2 ul), revers primer (10 uM, 2 ul), revers transkriptaz (0.5 ul), RiboSafe RNaz inhibitörü, DEPC-uygulanmış su (toplam 45 ul olacak şekilde), RNA kalıp dizisi (5 ul). Reaksiyon koşulları şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 45 C, 20 min (revers transkripsiyon); 95 C, 1 min (polimeraz aktivasyonu) ve 40 döngü de (95 C, 10 s; 60 C, 10 s; 72 C, 30 s; sırasıyla denatürasyon, bağlanma, uzama). qRT-PCR deneylerinde Roche LightCycler cihazı ve bu cihaza özel capiller tüpler kullanılmıştır.

3.5. Yüzey Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

10 nM bortezomibin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki 4-1BBL ve OX40L yüzey protein seviyelerini belirlemek için flow sitometri kullanıldı. Meme kanseri hücre hatlarının hücre yüzeyi boyaması primer işaretlenmiş antikolar ve uygun isotip kontroller kullanılarak gerçekleştirilmiş (4-1BBL, OX40L). Yüzey boyaması, buzda ve hücre boyama tampon çözeltisinde 45 dakika boyunca bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Boyanan hücrelerin sayısı, flow sitometre cihazında elde edilmiştir. Ölü hücreler, analize dahil edilmemiştir. Flow sitometre analizi, Applied Biosystems™ Attune™ Acoustic Focusing Cytometer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel karşılaştırmalar için ise referans grup ve diğer gruplar arasında *Student's t-test*'i (*two-tailed, unpaired*) uygulandı. *P* değerinin 0.05 ve altında olduğu durum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek yıldız simgeleriyle betimlendi (***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$).

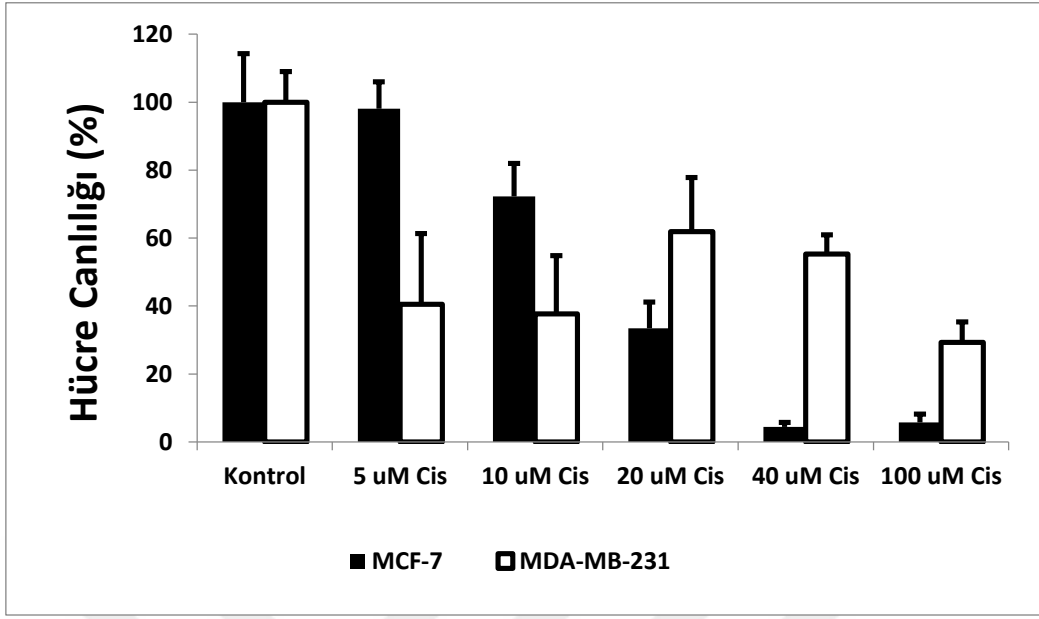
4. BULGULAR ve SONUÇ

4.1. Hücre Canlılık Testleri

4.1.1. Sisplatin'in Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Sisplatin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan önemli bir kemoterapötik ajandır. DNA üzerindeki pürin bazları ile çapraz bağlanma yeteneğiyle bağlantılıdır. DNA onarım mekanizmalarına müdahale ederek, DNA hasarına neden olur ve daha sonra kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Sisplatinin (Koçak Farma, Türkiye) meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini test etmek adına farklı konsantrasyonlarda stoklar hazırlandı. Bu amaçla, ana stoktan toplanan ilaç steril haldeki fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanılarak dilüye edildi. Dilüsyonlar hücre canlılık deneylerinde kullanılmak üzere kuru bir ortamda, oda sıcaklığında ve ışık görmeyecek şekilde muhafaza edildi. Daha sonra artan sisplatin konsantrasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisine bakıldı.

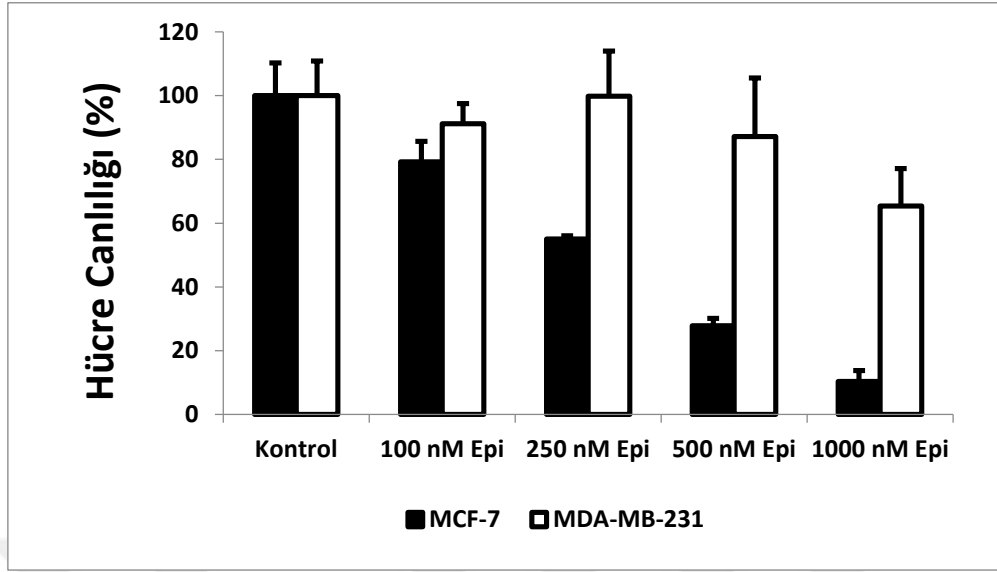
Sonuçlar her iki hücre hattında da sisplatin uygulamasının sitotoksik etkiler sergilediğini gösterdi. MCF-7, artan dozlarla orantılı şekilde azalan bir hücre canlılık grafiği oluşturdu. Özellikle 20 μM 'lık sisplatin uygulamasının ardından canlılığın %40'ın altına düştüğü gözlemlendi. 40 ve 100 μM 'lık konsantrasyonlar ise hücrelerin neredeyse tamamının inhibe olmasına neden oldu. Benzer sonuçlar MDA-MB-231 hücre hattında da tespit edildi. Bununla beraber, MCF-7 ile kıyaslandığında MDA-MB-231 hücreleri yüksek dozdaki sisplatine karşı daha duyarsız bir profil sergiledi. Grafikten de anlaşılacağı üzere, 20 μM 'lık sisplatin uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücrelerindeki canlılık oranı yaklaşık %60 seviyelerinde kaldı (Şekil 4.1). Ek olarak, 40 ve 100 μM 'lık uygulamalar sitotoksiteyi belirli oranda arttırsa da bu değerler MCF-7'ye kıyasla hücre canlılığının yüksek seviyelerde olduğunu temsil etmektedir.



Şekil 4.1. Artan konsantrasyonlardaki sisplatin'in MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi. Sisplatinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri farklı dozlar üzerinden değerlendirildi. Kuyucuk başına 7,500 hücre olacak şekilde ekilen ve bir gecelik inkübasyona bırakılan hücreler ertesi gün 48 saat boyunca 5, 10, 20, 40 ve 100 μM 'lık sisplatin dozları ile muamele gördü. Verilerin kıyaslanması için sisplatinin dahil edilmediği kontrol grubuna yalnızca PBS'in yer aldığı bir uygulama yapıldı.

4.1.2. Epirubisin'in Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

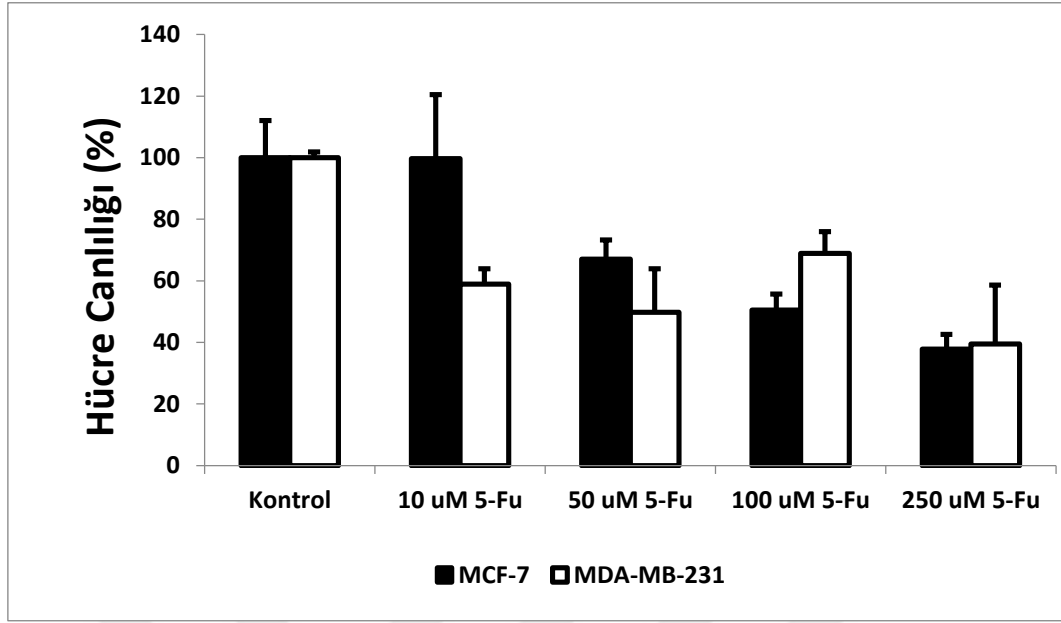
Epirubisin'in kullandığımız hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için artan konsantrasyonlardaki epirubisin (nanomolar aralıkta), meme kanseri (MDA-MB-231 ve MCF-7) hücre hatlarına uygulandı. Epirubisin'in her iki hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi ayrı olarak belirlendi. Epirubisin uygulaması, MCF-7 hücre hatında doza bağlı bir etki gösterirken, aynı etki diğer hücre hattında gözlenmemiştir. 500 nM'dan fazla epirubisin kullanımında, MCF-7 hücre hatında hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür; ancak, MDA-MB-231 hücre hatında hücre canlılığı kullanılan tüm konsantrasyonlarda %50'den fazladır (Şekil 4.2). 1000 nM epirubisin kullanımı MCF-7 hücre hatında hücre canlılığını neredeyse sıfıra düşürmüştür. Aynı konsantrasyonda MDA-MB-231 hücre hatında hücre canlılığı yaklaşık %70'tir. Bu sebeple, epirubisin uygulamasının hücre hattı spesifik bir etki gösterdiği söylenebilir.



Şekil 4.2. Artan konsantrasyonlardaki epirubisin'in MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi. Her iki hücre attı da 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 100, 250, 500, 1000 Nm epirubisin ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon adından MTT testi uygulanarak bir spektrofotometre yardımıyla hücre canlılığı oranları hesaplandı.

4.1.3. 5-FU'nun Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

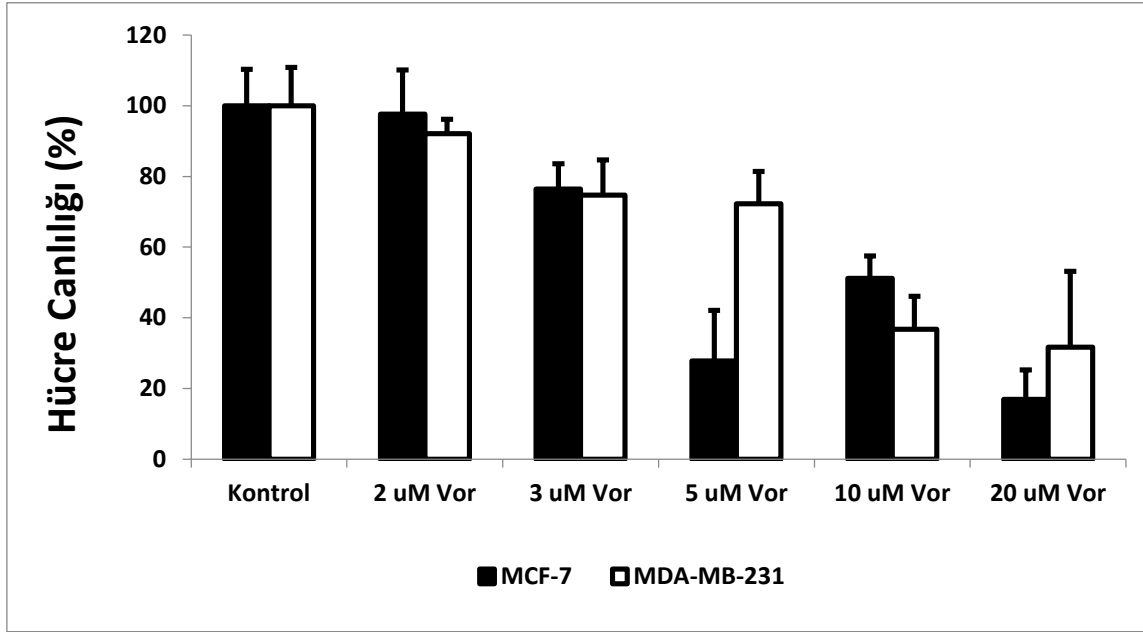
Yapılan çalışmalarda tek bir ajan olarak kullanılan 5-FU'in %25 lik bir yanıt gösterdiği, farklı kemoterapotik ajanlarla kombine halinde kullanıldığında ise %54 oranında yanıt gösterdiği sonucuna varılmıştır. Burada tek ajan olarak 5-FU'nun hücre yaşayabilirliği üzerindeki sitotoksik etkisi, meme kanseri hücre hatlarında MTT deneyi kullanılarak incelendi. 5-FU muamelesi, kullanılan MDA-MB-231 hücre hattında minimum sitotoksisiteyi 10 uM konsantrasyonda gösterirken, bu konsantrasyon MCF-7 hücre hatlarında sitotoksik bir etki oluşturmadi. MCF-7 hücre hattında minimum sitotoksik etki 50 uM konsantrasyon uygulamasında meydana geldi (Şekil 4.3). Sonuç olarak, Artan 5-FU konsantrasyonuna bağlı olarak her iki hücre hattında da hücre canlılığı üzerinde azalan bir etki oluşturduğu tespit edildi.



Şekil 4.3. Artan konsantrasyonlardaki 5-FU'nun MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi. Her iki hücre attı da 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 10, 50, 100, 250 uM 5-FU ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon adından MTT testi uygulanarak bir spektrofotometre yardımıyla hücre canlılığı oranları hesaplandı.

4.1.4. Vorinostat'ın Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

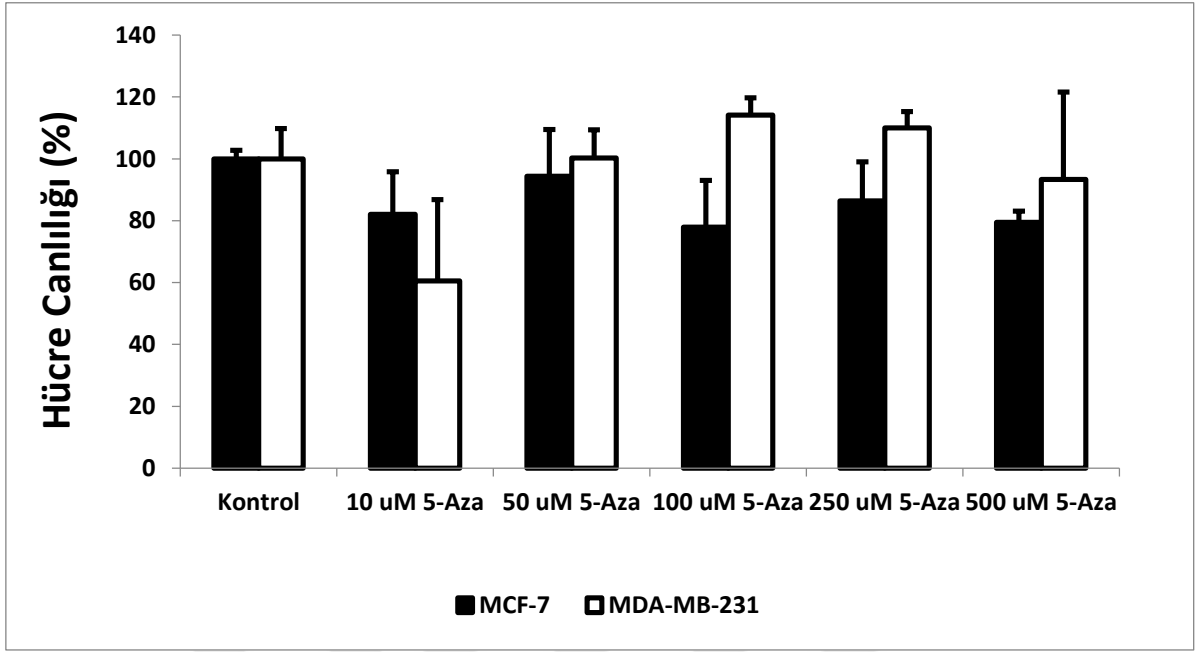
Vorinostat yaygın olarak kullanılan bir HDAC inhibitörüdür. Burada, vorinostat'ın meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Vorinostat'ın kullandığımız hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için artan konsantrasyonlardaki vorinostat (mikromolar aralıkta), meme kanseri (MDA-MB-231 ve MCF-7) hücre hatlarına uygulandı. Vorinostat'ın hücre canlılığı üzerine etkisi her hücre hattı için ayrı olarak belirlendi. Vorinostat, her iki hücre hattında da genellikle doza bağlı bir etki göstermiştir. 20 uM vorinostat kullanımı her iki hücre hattında da hücre canlılığını %50'nin altına düşürdü. Doza bağlı etki MDA-MB-231 hücre hattında daha belirgindir. Hücre canlılığı üzerinde kayda değer bir etki her iki hücre hattı için de 3 uM konsantrasyondan sonra görülmeye başlandı (Şekil 4.4). Bu sonuçlar, vorinostatın genellikle hücre hatlarına spesifik olmayan bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.4. Artan konsantrasyonlardaki vorinostat'ın MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi. Her iki hücre attı da 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 2, 3, 5, 10, 20 uM vorinostat ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon adından MTT testi uygulanarak bir spektrofotometre yardımıyla hücre canlılığı oranları hesaplandı.

4.1.5. 5-Aza- 2dC'nin Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

5-Aza-2dC yaygın olarak kullanılan bir DNMT inhibitörüdür. Burada, 5-Aza-2dC'nin meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. 5-Aza-2dC'nin kullandığımız hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için artan konsantrasyonlardaki vorinostat (mikromolar aralıkta), meme kanseri (MDA-231 ve MCF-7) hücre hatlarına uygulandı. Vorinostat'ın hücre canlılığı üzerine etkisi her hücre hattı için ayrı olarak belirlendi. Sonuç olarak; MDA-MB-231 hücre hattı 5-Aza-2dC'nin artan farklı konsantrasyonlarından etkilenmez iken, MCF-7 hücre hattında az da olsa hücre canlılığı üzerinde olumlu etkiler gözlemlendi (Şekil 4.5).



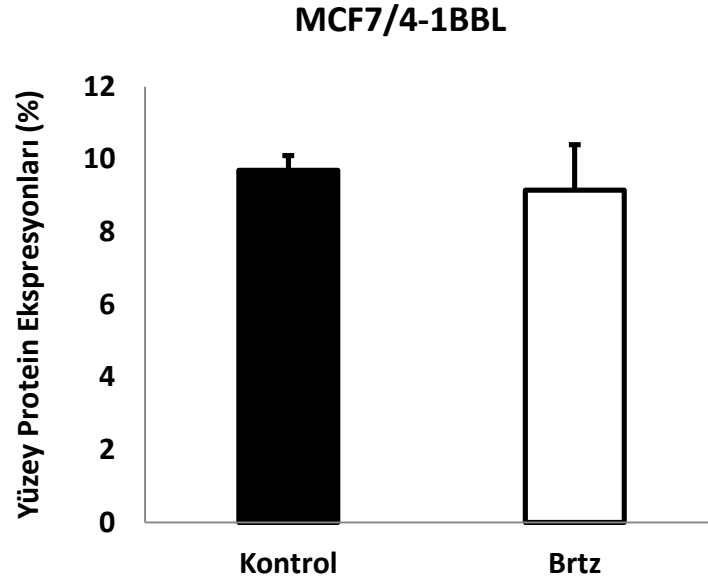
Şekil 4.5. Artan konsantrasyonlardaki 5-Aza-2dC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki etkisi. Ekimi yapılan hücre hatları 24 saat inkübasyon ardından 5-Aza-2dC ile muamele edildi ve takip eden 48 saat ardından MTT testi uygulanarak hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi belirlendi.

4.2. Gen Ekspresyon Analizleri

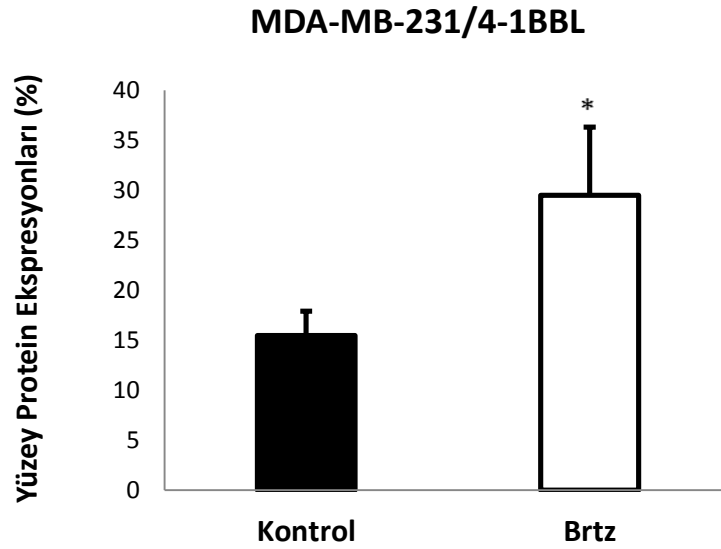
4.2.1. Bortezomib Uygulaması Sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında 4-1BBL ve OX40L Yüzey Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Daha önce yapılan çalışmalarda bortezomibin immunojenik bir ajan olabileceği ve kanser-immünoterapi yaklaşımlarına katkı sağlayacağı ortaya konulmuştur (Cacan ve ark., 2015; Cacan ve Ozmen, 2020; Berkel ve ark., 2020). Bu çalışmalardan yola çıkarak belirli bir dozdaki bortezomib uygulamasının T hücre aktifleşmesinde ve anti-tümör yanıtta önemli rolleri bulunan yardımcı sitümüle moleküller üzerindeki etkisini test etmek istedik. Kullandığımız hücre hatlarındaki farklı bortezomib konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi önceki çalışmalarda ortaya konulduğundan (Codony-Servat ve ark., 2006; Yang ve ark., 2014) tekrara düşmemek adına doğrudan düşük dozdaki bortezomib uygulamasının bu moleküllerin ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek istedik. Bu amaç doğrultusunda, diğer deneylerde de kullandığımız meme kanseri hücre hattı (MCF-7 ve MDA-MB-231) 10 nM bortezomib ile muamele edilerek, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler toplanarak yüzey proteinlerine spesifik antikorlar kullanılarak öncelikli olarak 4-1BBL yüzey ekspresyon seviyesine bakıldı. Sonuç olarak, MDA-MD-231 hücre hattında 4-1BBL protein ifadesi bortezomib uygulaması sonrası 2 kat artış gösterirken, MCF7 hücre hattında proteozom inhibisyonu hücre yüzeyinde 41BBL protein ifadesinde bir değişiklik oluşturmadi (Şekil 4.6). Dolayısıyla meme kanseri hücre hatlarında bortezomib uygulamasının 4-1BBL ifadesi açısından hücre hattı-spesifik bir etki gösterdiğini ortaya konuldu. Daha sonra, her iki hücre hattında diğer çalıştığımız molekül olan OX40L ekspresyon seviyesine bakıldı. Elde edilen bulgulara göre, yine MCF-7 hücre hattında OX40L ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlemlenmezken, ilginç olarak yine MDA-MB-231 hücre hattında 4-1BBL ekspresyonunda gözlemlediğimiz gibi OX40L ekspresyon seviyesinde de anlamlı bir artış gözlenmlendi (Şekil 4.7).

(A)

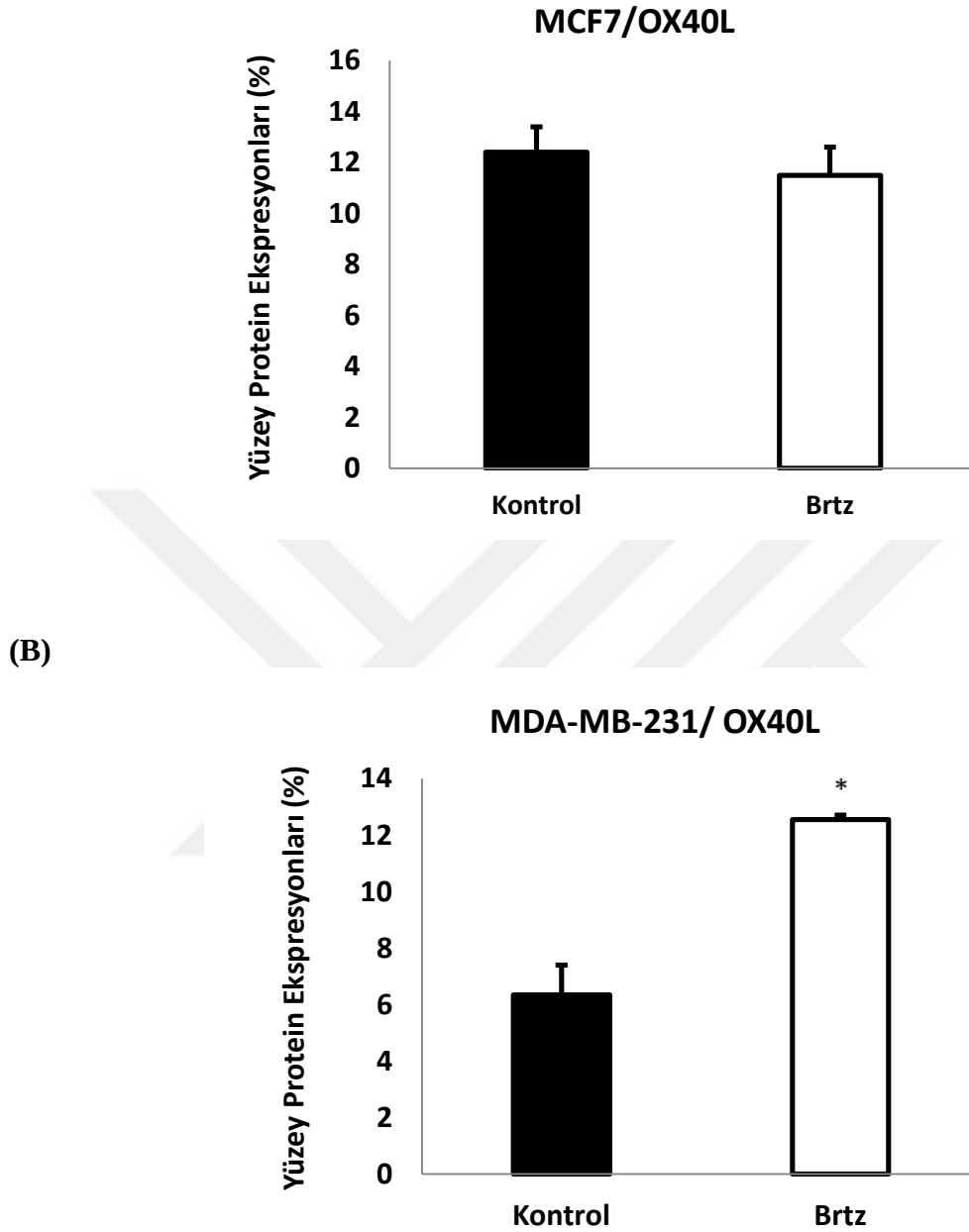


(B)



Şekil 4.6. Bortezomib uygulamasının, 4-1BBL yüzey protein seviyesi üzerine etkisi. A, B sırası ile MCF-7, MDA-MB-231 hücre hatlarına 10 nM bortezomib uygulaması sonrası 4-1BBL yüzey protein ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Analiz için student-t testi kullanıldı (* $p < 0.1$). Hata çubukları SEM değerini göstermektedir.

(A)

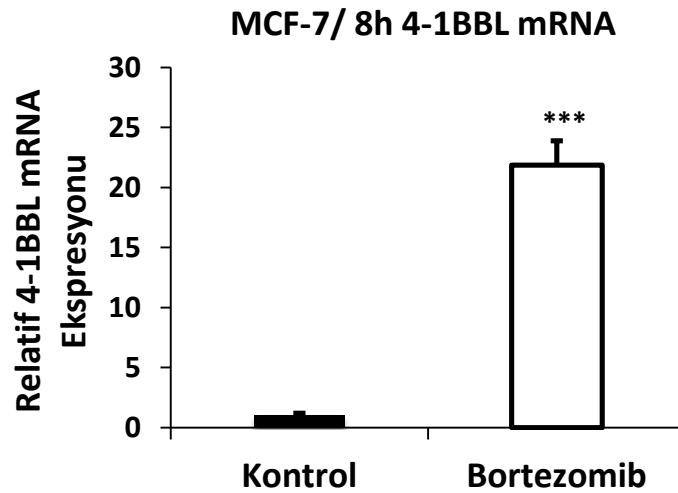


Şekil 4.7. Bortezomib uygulamasının, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki yüzey OX40L protein seviyesi üzerine etkisi. Hücreler 10 nM bortezomib ile muamele edildi ve 48 saat sonra hücreler toplanarak flow sitometri için spesifik antikorlar ile boyandı. Analiz için student-t testi kullanıldı (* $p < 0.1$). Hata çubukları SEM değerini göstermektedir.

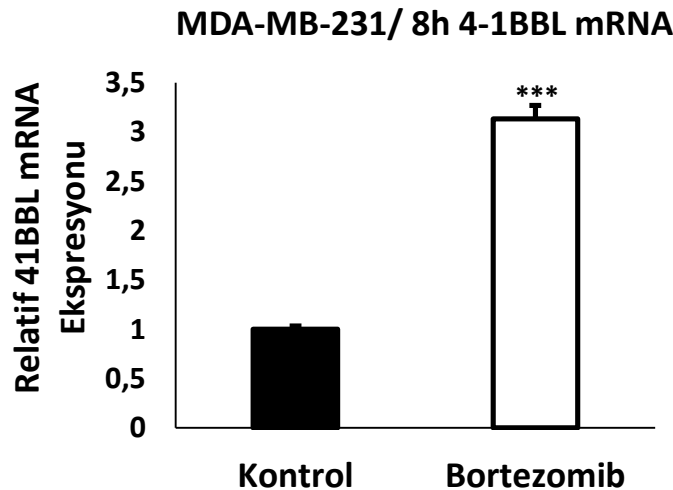
4.2.2. Bortezomib Uygulaması Sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında 4-1BBL mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi

4-1BBL ve OX40L moleküllerinin hücre yüzey ekspresyonları belirlendikten sonra bu moleküllerin transkripsiyon seviyelerinide belirlemek istedik. Bu amaç doğrultusunda, 4-1BBL protein ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde nasıl etkilendiğini ortaya koymak adına her iki tümör hücresi 10 nM bortezomib ile muamele edilerek 4-1BBL transkript ekspresyonları belirlendi. Söz konusu genin transkript ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile ölçüldü. Öncelikli olarak bortezomib uygulamasının ardından 8 saat sonunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 4-1BBL transkripsiyon seviyesine bakıldı.

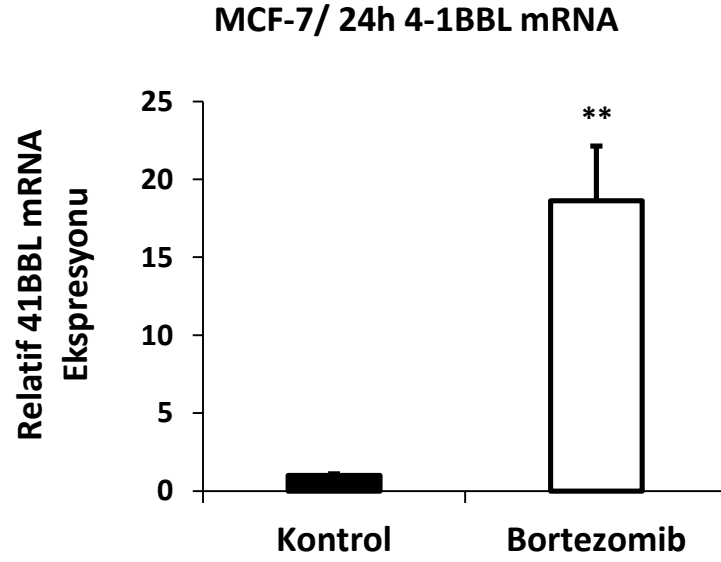
(A)



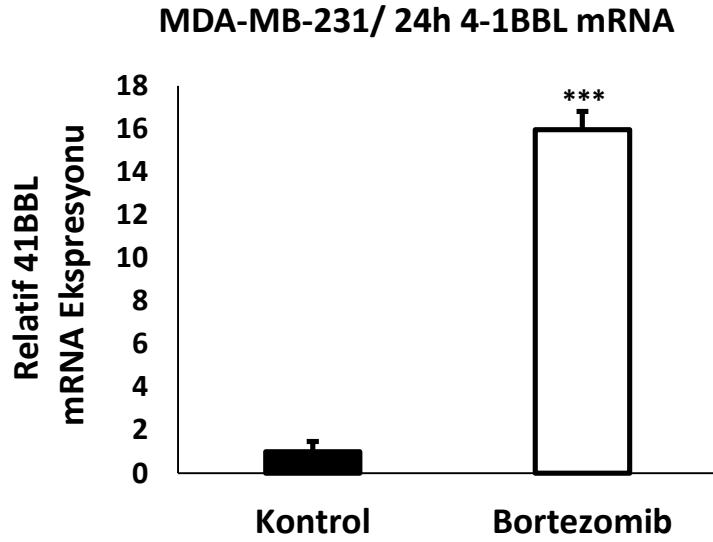
B)



(C)



(D)



Şekil 4.8. 8 ve 24 saat sonunda belirlenen MCF-7 hücrelerindeki (A-C) 4-1BBL mRNA ve MDA-MB-231 hücrelerindeki (B-D) 4-1BBL mRNA transkripsiyon seviyeleri. 10nM Bortezomib uygulaması sonrası, 8 ya da 24 saat sonunda hücreler toplandı, RNA izole edildi. Spesifik primerler kullanılarak qRT-PCR ile veriler elde edildi. Grafiklerdeki veriler birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalamasını göstermektedir. Analiz için student-t testi kullanıldı (**p<0.01, ***p<0.001). Hata çubukları SEM değerini göstermektedir.

Yapılan ilaç muamelesinin ardından 8 saat sonunda her iki hücre hattında da 4-1BBL mRNA ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. MCF-7 hücre hattı da kontrole göre 20 kat artarken MDA-MB-231’de 3 kat artış söz konusudur (Şekil 4.8). 24 saatlik bortezomib uygulamasının sonunda da her iki hücre hattında 4-1BBL mRNA ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, 10 nM bortezomib uygulamasının 4-1BBL mRNA ekspresyon seviyelerinde artışa neden olduğu tespit edildi. Her ne kadar MCF-7 hücre hatlarında 4-1BBL yüzey protein seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmezken, 10nm bortezomib uygulaması sonrasında ilginç olarak mRNA seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi.



5- TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Hücre büyümesini, farklılaşmasını, hareketliliğini ve apoptozu yöneten sinyal mekanizmalarının tanımlanması, karakterizasyonu ve bunların kötü huylu fenotipin gelişimi ile ilgisinin açıklığa kavuşturulmasıyla yeni bir kanser tedavisi dönemi başladı. Normal ve patolojik olarak bozulmuş hücresel sinyal ağlarının moleküler anlayışındaki ilerlemelere dayanarak, tedavi ve önleme için yeni hedef seçici ilaçlar geliştirilmiştir ve dünya çapında klinik etkinliklerini araştırmak için birçok çalışma devam etmektedir, Bu yeni terapötik ajanlar, genel olarak kanser için yeni bir tedavi paradigması oluşturacaktır (Arruebo ve ark., 2011).

Bağışıklık sistemi, konağı sürekli mikroorganizmalara maruz kalmaktan korumak için geliştirilmiştir. Bu biyolojik savunma mekanizması, vücut hücreleri ile mikroorganizmalar veya enfekte hücreler arasında ayırım yapamadığı sürece iyi çalışmaz. Kanser hücreleri, genetik bir değişiklik ile kötü huylu özellikler kazanan vücut hücrelerinden türetilir. Bununla birlikte, kötü huylu hücrelerin yabancılığı çoğu zaman bağışıklık sisteminden kaçabilir ve klinik olarak önemli bir kitleye dönüşebilir. Meme kanserinin, malign melanom ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu dahil olmak üzere yüksek derecede immünojenik kanserlerle karşılaştırıldığında geleneksel olarak zayıf immünojenik olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte tümör infiltre eden lenfositler ve kanser genom dizileri ile ilgili önceki çalışmalar, ER-, HER2+ alt tip ve triple negatif meme kanserinin, ER+ ve HER2- alt tiplerden daha immünojenik olduğunu göstermektedir. Meme kanseri dokusundaki bağışıklık hücreleri esas olarak T lenfositlerden oluşur ve geri kalanı B lenfosit makrofalarından, doğal öldürücü hücrelerden ve antijen sunan hücrelerden (APC) oluşur. T hücreler, APC'ler tarafından sunulan tümör antijenlerinin tanınmasıyla etkinleştirilir ve T hücrelerinin aktivasyon sinyallerinin gücü ve kalitesi çeşitli reseptör-ligand etkileşimleriyle bağlantılıdır (Bayraktar ve ark., 2019).

CD40, 4-1BB ve OX40 gibi stimulator moleküller T hücre yanıtlarının oluşmasında, yanıt süresini belirlemede, programlamada rol alan önemli moleküllerdir. OX40L, OX40'ın ligandıdır (CD134 veya TNFRSF4 olarak da bilinir) ve DC2'ler (dendritik hücrelerin bir alt tipi), makrofajlar ve aktive edilmiş B lenfositleri gibi birçok antijen sunan hücrede kararlı bir şekilde eksprese edilir. OX40-OX40L ligasyonu, T hücreleri için bir hayatta kalma sinyali kaynağıdır ve bellek T hücrelerinin gelişimini sağlar. 4-1BB, T hücresi belleğinin

genişlemesi, efektör fonksiyonunun kazanılması, hayatta kalma ve geliştirilmesinde rolleri olan bir ortak uyarıcı moleküldür (Seong ve ark., 2005; Arch ve ark., 1998; Kumari ve ark., 2013).

Bu bilgilerden yola çıkarak; bu çalışma kapsamında, çeşitli test teknikleri ile kemoterapötik ilaçlara direnç gösteren kanserli meme hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-231)'nın kemoterapötik ajanlara gösterdikleri farklı duyarlılıkların potansiyel mekanizmaları ve immünolojik genlerin (OX40L ve 4-1BBL) ekspresyon seviyeleri araştırıldı.

Çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hattının östrojen reseptör alfa, androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini eksprese etmesi tıbbi araştırmalarda onları değerli araçlar yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda, anti-östrojen kemoterapi ilaçlarıyla yapılan tedavinin MCF-7 hücre hattının proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek kültürlerin büyümesini azaltabildiği gösterilmiştir.

MDA-MB-231, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonundan yoksun olduğundan, tedavi edilmesi en zor olan oldukça agresif, istilacı, metastatik özellik gösteren triple negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Metastatik hastalık için sağkalım oranlarının artırılması yoğun araştırma konusu olmuştur ve yeni ajanlar ve stratejiler aktif olarak değerlendirilmektedir. ER, PR ve HER2 ekspresyonunun olmaması bu kanser hatlarında kemoterapiyi ön plana çıkarmıştır. Kemoterapiye yanıt vermesine rağmen metastatik yeteneği en güçlü olan kanser tipidir. Tüm meme kanseri hücre hatlarına göre tedavi edilmesi zor ve yayılma olasılığı daha yüksektir. Bu nedenle, bu agresif tümör için yeni terapötik ajanlara kritik olarak ihtiyaç duyulmaktadır.

Sisplatin, Epirubisin, 5-FU, Vorinostat, 5-Aza-2dC kemoterapotik ajanları artan konsantrasyonlarda her iki meme kanseri hücre hattına uygulandı ve hücre canlılıkları üzerindeki sitotoksik etkiler MTT deneyi ile belirlendi. Elde ettiğimiz veriler gösterdiği kullanılan her iki hücre hattının bu kemoterapi ajanlarına karşı olan duyarlılıkları farklılık arz etmektedir. Bazı kemoterapötiklere karşı MCF-7 hücre hattı daha duyarlı iken, diğerlerine karşı MDA-MB-231 hücre hattının daha duyarlı olduğu gözlemlendi.

Uygulanan sisplatin konsantrasyonlarının her iki hücre hattında da oldukça etkili hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlendi. Sonuçlar her iki hücre hattında da sisplatin tedavisinin

sitotoksik etkiler sergilediğini gösterdi ancak MCF-7 ile kıyaslandığında MDA-MB-231 hücreleri yüksek dozdaki sisplatine karşı daha duyarsız bir profil sergiledi.

Antrasiklin kemoterapötik ajan ailesinin bir üyesi olan epirubisin, hem erken dönem meme kanserinde hem de metastatik meme kanserinde adjuvan tedavi olarak dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Epirubisin uygulaması, MCF-7 hücre hatında artan doza bir etki gösterirken, aynı etki diğer hücre hattında gözlenmemiştir. Bu sebeple, epirubisin uygulamasının hücre hattı spesifik bir etki gösterdiği söylenebilir. In vivo deneylerde bu farklılık hesaba katılarak deney tasarımları gerçekleştirilebilir.

Vorinostat, histon deasetilazlar (HDAC'ler), östrojen reseptörü (ER) transkripsiyonel kompleksinin önemli bileşenleridir. Preklinik olarak, HDAC inhibitörleri, hormon reseptörü pozitif meme kanserinde tamoksifen / aromataz inhibitörü direncini tersine çevirebilmektedir. HDAC inhibitörleri; tümör baskılayıcı proteinlerin, transkripsiyon etkenlerinin ve histonların asetilli kalmasını destekleyerek biyolojik etkinliklerine tesir edebilmekte ve genlerin ifade şekillerinde değişiklikler meydana getirebilmektedir. Vorinostat, her iki hücre hattında da genellikle artan doza bağlı bir etki göstermiştir. Dolayısı ile bu sonuçlar, her iki meme kanseri tipine sahip farelerde yapılacak in vivo deneylerin de benzer etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir.

Antikanser ajan olarak bilinen 5-Florourasil, kolon, meme ve cilt kanseri dahil olmak üzere birçok yaygın malignitenin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Doğal olarak oluşan pirimidin urasilin bir analogu olan bu ilaç, urasil ile aynı metabolik yollarla metabolize edilir. Birkaç potansiyel antitümör aktivite bölgesi tanımlanmış olmasına rağmen, kesin etki mekanizması ve bu bölgelerin her birinin tümör veya konakçı hücre toksisitesine ne ölçüde katkıda bulunduğu belirsizliğini korumaktadır. 5-FU konsantrasyonuna bağlı olarak her iki hücre hattında da hücre canlılığı üzerinde azalan bir etki oluşturduğu tespit edildi. Epigenetik değişiklikler kanser terapilerinin gelişmesi için giderek daha değerli hedefler olarak kabul edilmektedir.

Metilasyon DNA baz sekansını değiştirmediğinden, araştırmacılar potansiyel olarak anti-kanser ajanları olarak kullanılabilecek DNMT'lerin küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır (İzmirli, 2013). DNMT'ler meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edilir. DNMT'lerin inhibisyonu, tümör oluşumunda azalma ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun artması ile ilişkilidir. Bu nedenle,

DNMT'ler spesifik anti-kanser stratejilerinin tasarımı için değerli hedefler olarak kabul edilir. DNMT'lerin en yaygın kullanılan inhibitörü, 5-aza-2dC artan konsantrasyonda kullanılarak, farklı meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi belirlendi ve sonuç olarak MDA-MB-231 hücre hattı 5-Aza-2dC'nin artan farklı konsantrasyonlarından etkilenmez iken, MCF-7 hücre hattında az da olsa hücre canlılığı üzerinde olumlu etkiler gözlemlendi.

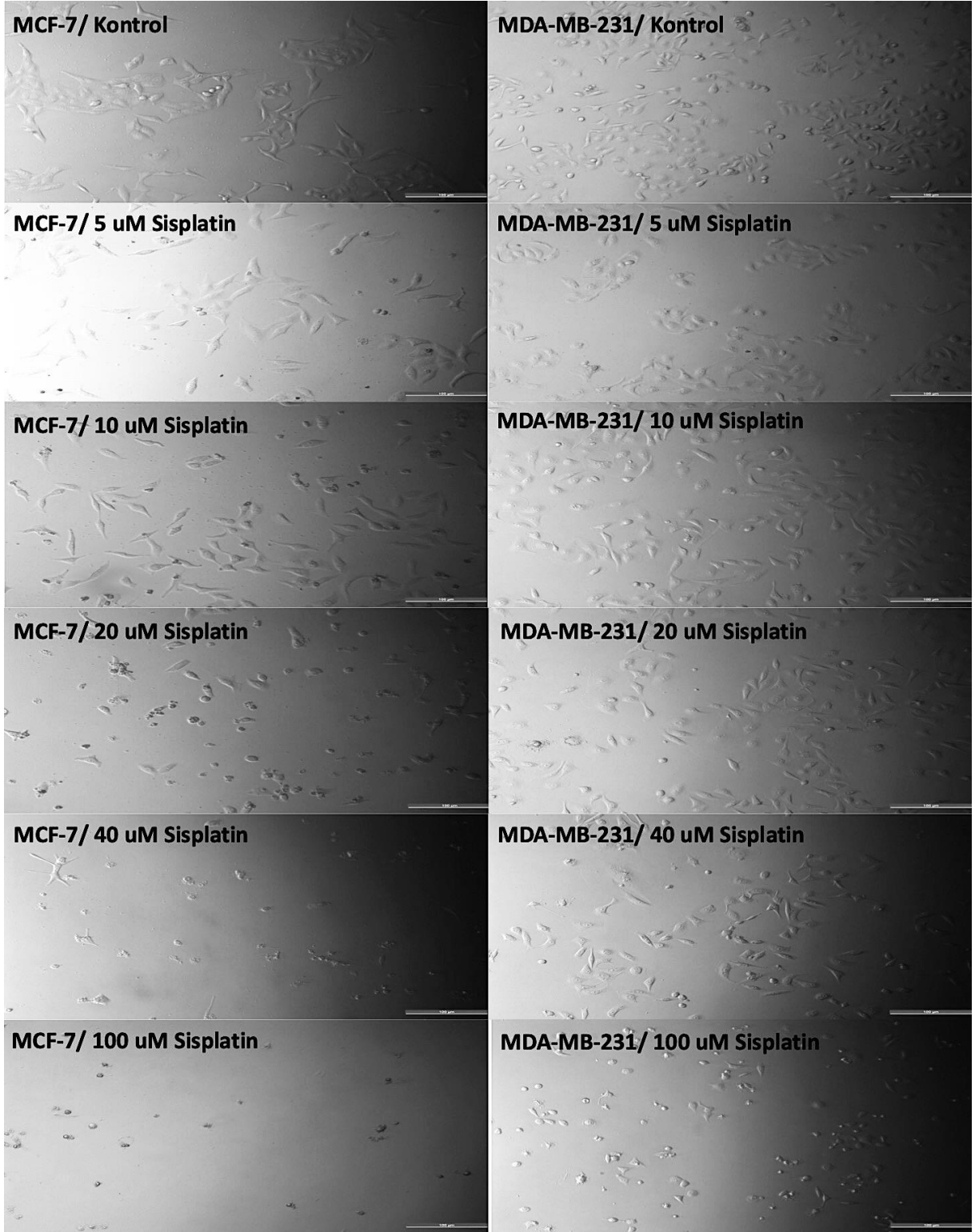
Bu tez çalışmasının ikinci basamağında, immünojenik bir ajan olan Bortezomibin immünolojik bazı genler üzerindeki etkisini araştırmaktı. Seichiro Komatsu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda MD-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları çeşitli konsantrasyonlarda Bortezomib ile muamele edilip ve 48 saatlik inkübasyondan sonra canlı hücre sayıları değerlendirildiğinde 10 nM 'dan büyük olan konsantrasyonlardaki Bortezomib uygulamasının MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde güçlü hücre büyümesi inhibisyonu sergilediği ancak MCF-7 hücre hatlarında daha az etkili olduğu gösterildi. Bu çalışma ile MDA-MB-231 hücreleri için IC50 değeri 17 nM olarak belirlenirken, MCF-7 hücrelerinde 96 saate uzatılmış inkübasyon süresi sonunda 25 nM da %50 hücre büyümesi inhibisyonu gösterdiği belirtildi. Bu çalışmada, Botrezomib uygulamasının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında çeşitli konsantrasyonlarda apoptozu indüklediği sonucuna varıldı (Komatsu ve ark., 2012).

Yine benzer bir çalışmada, Feng Yao ve çalışma arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada da Bortezomibin hücre çoğalması ve proteozom aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi. MCF-7 hücreleri 48 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda bortezomib ile muamele edildikten sonra MTT deneyi ile hücre inhibisyonu değerlendirildi. Sonuç olarak ise MCF-7 hücre proliferasyonunun doza bağımlı şekilde bortezomib tarafından inhibe edildiği sonucuna varıldı. 50 nM dozda bortezomibin MCF-7 hücre hatları ile 48 saatlik muamelesinin ardından MCF-7 proliferasyonunun %32 oranında inhibe edildiği tespit edildi (Sun ve ark., 2011). Bortezomib uygulamasının hücre canlılığı üzerinde öldürücü etkisi olduğu yapılan bu çalışmalar ve bir çok çalışma ile kanıtlanmıştır.

Bortezomibin immünjenik etkisini anlamak adına, OX40L ve 4-1BBL genlerinin tümör hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini araştırdık. Kullanılan uygun bortezomib dozu yapılan çalışmalar baz alınarak 10 nM olarak belirlendi. Bortezomib kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 kanserli hücre hatları üzerindeki 8 saat ve 24 saat sonunda ayrı ayrı 4-1BBL ve OX40L genlerinin ifadelerine bakıldı. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında Bortezomib

uygulamasý sonucu mRNA seviyesinin iki hücre hattında artış gösterdiği tespit edilmesine rağmen, 24 saatin sonunda MDA-MB-231 hücre hattında 4-1BBL yüzey protein ekspresyonu artarken, MCF-7 hücre hattında bu ekspresyonun azaldığı görülmüştür. Yani MCF-7 hücre hattında transkripsiyon seviyesine etki ettiği ancak translasyon aşamasında herhangi bir etkisinin olmadığı anlaşıldı. OX40L için mRNA ifadesine bakılamadı ancak yüzey protein ekspresyonu belirlendi. Sonuç olarak, yüzey protein ekspresyonunun MDA-MB-231 hücre hattında kontrole göre ekspresyonu artarken, MCF-7 hücre hattında ekspresyonun azaldığı görüldü. Sonuç olarak, düşük dozlardaki bortezomibin kanser immünoterapi yaklaşımlarında kullanılmasının faydalı olacağı ve anti-tümör immün yanıtı aktiveştirebileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmaların devamı niteliğinde bortezomib uygulaması sonucunda T hücre aktiveşmesi, canlılığı ya da T hücre ile tümör hücresi inkübasyonu sonucunda tümör hücresindeki apoptoz durumları belirlenebilir.

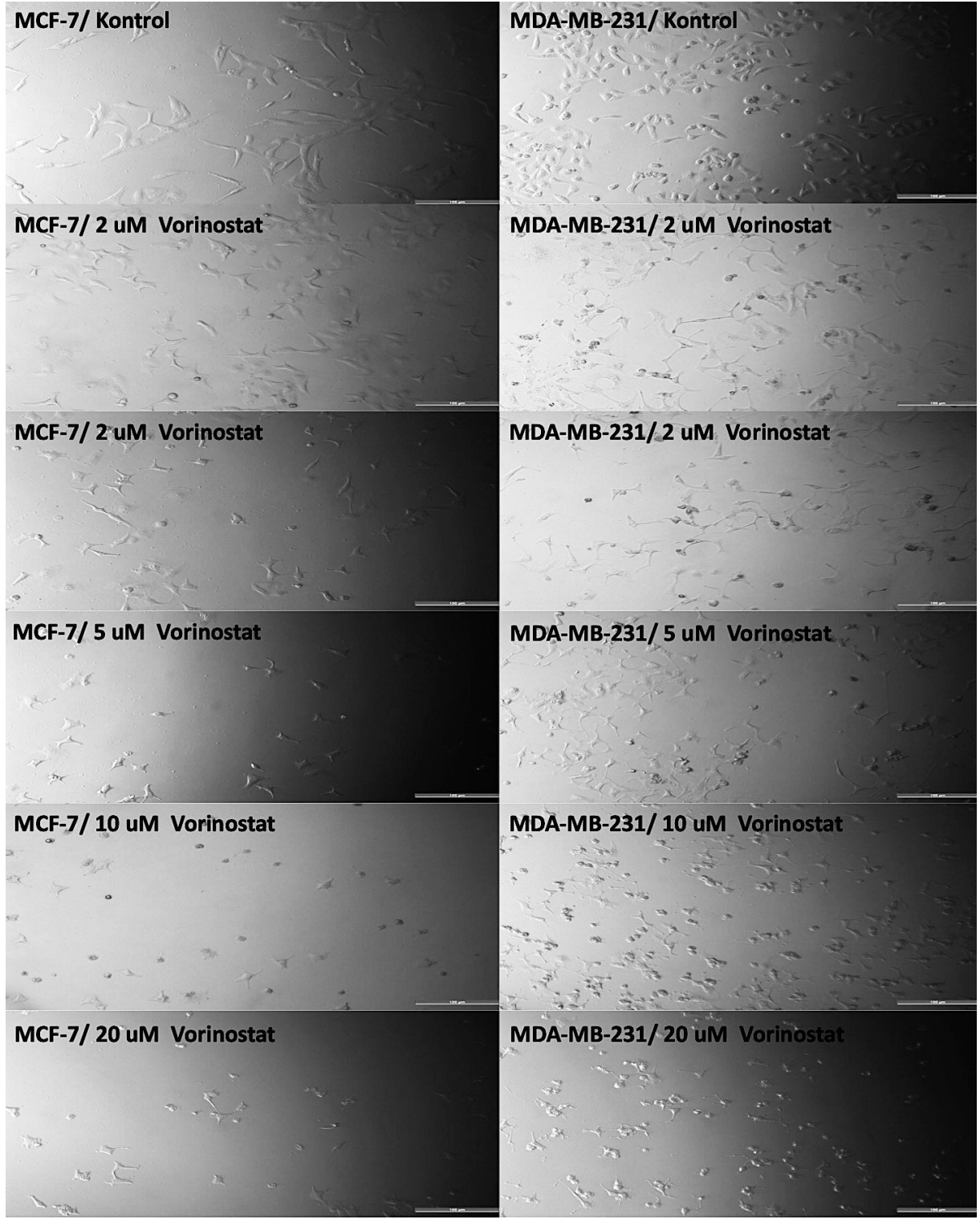
6. EKLER



Şekil. Sisplatin uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.



Şekil. Epirubisin uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.



Şekil. Vorinostat uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.



Şekil. 5-FU uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.



Şekil. 5 Aza-2dC uygulaması sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.

7. KAYNAKLAR

- Adams, J., 2003. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discovery Today*; 8 (7): 307-315.
- Anandaram H. 2018. A computational approach to identify microRNA (miRNA) based biomarker from the regulation of disease pathology. *Biol Med Case Rep*. 2(2):12-25.
- Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M, 2017. Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg*; 69(3):313-317.
- Angahar, L.T., 2017. An overview of breast cancer epidemiology, risk factors, pathophysiology, and cancer risks reduction, *MOJ Biol Med*, 1(4), 92–96.
- Anjum, F., Razvi, N., Masood, M.A., 2017. Breast Cancer Therapy: A Mini Review. *MOJ Drug Des Develop Ther*, 1(2), 1-4.
- Arch RH, Thompson CB. 1998. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and Cellular Biology*. 18 (1): 558–65.
- Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, et al., 2011. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*;3(3):3279-3330.
- Aygüneş, D.A., 2014. Meme Kanseri Hücre Hatlarında Trastuzumab, Dosetaksel Ve Fukoidanın Tek Ajan Ve Kombine Ajanlar Olarak Kullanılmasının Apoptoz Ve Hücre Toksisitesine Etkisi. (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Baguley, B.C., Leung, E., 2011. Heterogeneity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines. In: *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways* (Gunduz M, Gunduz E (eds.). Rijeka, InTech, pp. 245-256.
- Basile MS, Mazzon E, Russo A, et al. 2019. Differential modulation and prognostic values of immune-escape genes in uveal melanoma. *Chammas R, ed. PLoS ONE*;14(1):e0210276.
- Baxter, D., 2014. Active and passive immunization for cancer. *Hum. Vaccin. Immunother*, 10(7), 2123–2129.
- Bayraktar S, Batoo S, Okuno S, Glück S., 2019. Immunotherapy in breast cancer. *J Carcinog*;18(1):2.
- Bergin, A.R.T. ve Loi, S., 2019. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res*; 8: 1342.

- Berkel, C, Kucuk, B, Usta, M, Yılmaz, E, Cacan, E. (2020). The Effect of Olaparib and Bortezomib Combination Treatment on Ovarian Cancer Cell Lines. *European Journal of Biology*, 79 (2), 115-123.
- Bestor, T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*; 9 (16): 2395-2402.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*; 16 (1): 6-21.
- Bonnetterre, J., Buzdar, A., Nabholz, J.M., Robertson, J.F., et al. 2001. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. *Cancer*, 92(9), 2247-2258.
- Bora-Tatar, G., Dayangaç-Erden, D., Demir, A.S., Dalkara, S., Yelekçi, K., Erdem-Yurter, H., 2009. Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17 (14): 5219-5228.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D., 2012. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population based study, *Lancet Oncol*, 13(8), 790-801.
- Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E. ve Ferlay, J., 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*; 132 (5): 1133-1145.
- Butler, L.M., Agus, D.B., Scher, H.I. ve et al., 2000. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*; 60 (18): 5165-5170.
- Byler S, Goldgar S, Heerboth S, et al., 2014. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res*; 34(3):1071-1077.
- Byrne, C., Brinton, L.A, Haile, R.W. ve Schairer, C., 1991. Heterogeneity of the effect of family history on breast cancer risk: *Epidemiology*; 2 (4): 276-284.
- Byun, M., Ma, C.S, Akçay A, ve et al., 2013. Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood. *Journal of Experimental Medicine*; 210 (9): 1743-1759.
- Cacan E, Ozmen ZC., 2020. Regulation of Fas in response to bortezomib and epirubicin in colorectal cancer cells. *J Chemother.* Jul;32(4):193-201. doi: 10.1080/1120009X.2020.1740389. Epub 2020 Mar 12.
- Cacan E, Spring AM, Kumari A, Greer SF, Garnett-Benson C., 2015. Combination Treatment with Sublethal Ionizing Radiation and the Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Enhances Death-Receptor Mediated Apoptosis and Anti-Tumor Immune Attack. *Int J Mol Sci.* Dec 21;16(12):30405-21. doi: 10.3390/ijms161226238.

- Carey, L.A., 2010. Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000-2010. *Clin Breast Cancer*, 10(3), 188–195.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Finetti, P., Adelaide, J., et al., 2006. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*, 25(15), 2273-2284.
- Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S., 2010. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*, 32(1-2), 35-48.
- Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, Albanell J., 2006. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther. Mar*;5(3):665-75.
- Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M., 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research, *Anticancer Research*, 35(6), 3147-3154.
- Çiçekdal, M.B., 2018. Role Of Oxidative Stress In The Preventive Effects Of Calorie Restriction For Breast Cancer Development In Mmtv-Tgf-A Mice, (Yüksek lisans tezi). Yeditepe Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dai XF, Xiang L, Li, T., Bai, V., 2016. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, 7 (10), 1281-1294.
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z, Li, J., 2017. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping, *Journal of Cancer*, 8(16), 3131-3141.
- Dasari, S., Bernard Tchounwou, P., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*; 740: 364-378.
- De Souza, C. ve Chatterji, B.P., 2015. Hdac inhibitors as novel anti-cancer therapeutics. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*; 10 (2): 145-162.
- Denkert., C., Liedtke, C., Tutt, A. ve vonMinckwitz, G., 2017. Molecular alterations in triple-negativebreast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*; 389 (10087): 2430-2442.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I. ve et al., 2007. Triple-negativebreast cancer: clinicalfeatures and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.*; 13 (15): 4429-4434.
- Desantis, C., Ma, J., Bryan, L., Jemal, A., 2014. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 64(1),52–62.

- Desantis, C.E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L.A., Jemal, A., 2017. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin*, 67(6), 439-448.
- Dustin, M.L., 2002. The immunological synapse. *Arthritis Research & Therapy*; 4 (3): S119.
- Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J.H., Gorin, M., Wasielewski, M., et al., 2006. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer research*, 66(1) 41-45.
- Emens LA. Breast cancer immunotherapy: facts and hopes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(3):511-520.
- Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Magnaghi-Jaulin, L., Jaulin, C., 2009. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Lett*, 274 (2), 169-176.
- Eroğlu, O., 2018. Meme kanserinde epigenetic tedavi; 27(3), 346-362.
- Fang J, Chen F, Liu D, Gu F, Chen Z, Wang Y, 2020. Prognostic value of immune checkpoint molecules in breast cancer. *Bioscience Reports*;40(7):BSR20201054.
- Fardi, M., Solali, S. ve Farshdousti Hagh, M., 2018. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes & Diseases*; 5 (4): 304-311.
- Ferlay, J., Soerjomataram I., Dikshit, R. ve et al., 2012- 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN, *Globocan Int J Cancer*; 136 (5): E359-E386.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al., 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359–386.
- Ferley, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., GLOBOCAN 2012 v1. 0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E. ve Reis-Filho, 2010. JS.Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. ; 363 (20): 1938-1948.
- Galván Morales MA, Barrera Rodríguez R, Santiago Cruz JR, Teran LM. Overview of new treatments with immunotherapy for breast cancer and a proposal of a combination therapy. *Molecules*. 2020;25(23):5686.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. ve Adjei, A.A, 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; 55 (3): 178-194.
- Ghoncheh, M., Momenimovahed, Z., Salehiniya, H., 2016. Epidemiology, Incidence and Mortality of Breast Cancer in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(S3),47–52.

- Grakoui, A., 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling t cell activation. *Science*; 285 (5425): 221-227.
- Gravina, G.L., Festuccia, C., Marampon, F., Popov, W.M., et al., 2010. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation, *Molecular Cancer* , 9(305), 1-16.
- Greene, M.H., 2002. Genetics of breast cancer. *Mayo Clin Proc*, 7(2),54– 65.
- Gürel, Ç., Nursal, A.F. ve Yiğit, S., 2016. Epigenetik ve Kanser. *Türkiye Klinikleri J RadiatOncol-Special Topic*; 2 (1): 45-51.
- Haber, D., 2002. Prophylactic Oophorectomy to reduce the risk of Ovarian and the risk of ovarian and breast cancer in carriers of BRC mutations. *N Engl J Med*, 346(40),6160–1661.
- Habibi Jouybari M, Hosseini S, Mahboobnia K, Boloursaz LA, Moradi M, Irani M, 2019. Simultaneous controlled release of 5-FU, DOX and PTX from chitosan/PLA/5-FU/g-C3N4-DOX/g-C3N4-PTX triaxial nanofibers for breast cancer treatment in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*;179:495-504.
- Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Türkiye Kanseri İstatistikleri 2015 <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2015-yili-turkiye-kanser-i-istatistikleri.html> Erişim tarihi: 08.07.2020.
- Hanker, A.B., Sudhan, D.R. ve Arteaga, C.L., 2020. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell*; 37 (4): 496-513.
- Harbeck, N. ve Gnant, M., 2017. Breast cancer. *Lancet*;389 (10074): 1134-1150.
- Harrell, J.C., Pfefferle, A.D., Zalles, N., Prat, A., Fan, C., et al., 2014. Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 31(1):33-45.
- He, J., Wang, X., Guan, H., Chen, W., et al., 2011. Clinical efficacy of local targeted chemotherapy for triple-negative breast cancer. *Radiol Oncol*, 45(2), 123-128.
- Hortobagyi, G.N., de la Garza Salazar, J., Pritchard, K., et al., 2005. ABREAST Investigators. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*, 6(5), 391-401.
- <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00445> Erişim tarihi: 11.07.2020 Erişim Saati: 17:35
- International agency for research on cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ionizing radiation, Part 1. Vol 75, France: International Agency for Research on Cancer Press; 2000.
- International agency for research on cancer. IARC handbooks of cancer prevention. Weight control and physical activity. Vol 6, France: IARC Press; 2002.

- İzmirli, M., 2013. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. 20 (1), 48-51.
- James, F.R., Wootton, S., Jackson, A., Wiseman, M., Copson, E.R., Cutress, R.I., 2015. Obesity in breast cancer-what is the risk factor?. *European Journal of Cancer*, 51(6),705-20.
- Kaminska, M., Ciszewski, T., Lopacka-Szatan, K., Miotla, P., Staroslawska, E., 2015. Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny = Menopause review*, 14(3),196-202.
- Kanwal, R. ve Gupta, S., 2012. Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics*; 81 (4): 303-311.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., et al., 2009. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one*, 4 (7), e6146.
- Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, et al. 2014. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*;6(6):651-664.
- Katz H, Alsharedi M, 2018. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*;35(1):13.
- Kawamata S, *et al.* 1998. Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF-kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (10): 5808–14.
- Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., et al., 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*, 1(1):84-96.
- Khalil, D.N., Smith, E.L., Brentjens, R.J., Wolchok, J.D., 2016. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol*, 13(5), 273–290.
- Khasraw M, Bell R, Dang C, 2012. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast*;21(2):142-149.
- Komatsu S, Miyazawa K, Moriya S, et al., 2012. Clarithromycin enhances bortezomib-induced cytotoxicity via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (Gadd153) induction and autophagy in breast cancer cells. *International Journal of Oncology*;40(4):1029-1039.
- Kumar, P. ve Aggarwal, R., 2016. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*; 293 (2): 247-269.

- Kumari A, Cacan E, Greer SF, Garnett-Benson C. 2013. Turning T cells on: epigenetically enhanced expression of effector T-cell costimulatory molecules on irradiated human tumor cells. *J Immunother Cancer*.
- Lacroix, M., Haibe-Kains, B., Hennuy, B., Laes, J.F., et al., 2004. Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes. *Oncology reports*, 12(4), 701-707.
- Leach, D.R., Krummel, M.F., Allison, J.P., 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.
- Libson, S. ve Lippman, M. A., 2014. Review of clinical aspects of breast cancer. *International Review of Psychiatry*; 26 (1): 4-15.
- Lyons, T.G., 2019. Targeted therapies for triple-negative breast cancer. *Curr Treat Options in Oncol*; 20 (11): 82.
- Marino-Ramirez, L., Kann M.G., Shoemaker, B.A. ve Landsman, D., 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Review of Proteomics*; 2 (5): 719-729.
- Masaki, R.I., 2016. Mechanism of action of bortezomib in multiple myeloma therapy, *International Journal of Myeloma*, 6(1), 1–6.
- Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS, 2010. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*. 81(11):1339-1346.
- Momparler, R.L., 2005. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in Hematology*, 42 (2), 9-16.
- Moo, T-A., Sanford, R., Dang, C. ve Morrow, M., 2018. Overview of breast cancer therapy. *PET Clin*; 13 (3): 339-354.
- Nagini, S., 2017. Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players. *Anticancer Agents Med Chem*; 17 (2): 152-163.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., et al., 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10(6), 515-27.
- Orr, J.A. ve Hamilton, P.W., 2007. Histone acetylation and chromatin pattern in cancer. 29 (1), 17 31.
- Ölgen, S., Biçak, I. ve Nebi Oğlu D., 2002. Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar: angiogenesis and new aspects of cancer chemotherapy. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. Published online: 193-214.
- Parbin, S., Kar, S., Shilpi, A. ve et al., 2014. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *J Histochem Cytochem*; 62 (1): 11-33.

- Peart O. Breast intervention and breast cancer treatment options. *Radiol Technol.* 2015;86(5):535M-558M; quiz 559-562.
- Perez, E.A., Suman, V.J., Rowland, K.M., Ingle, J.N., et al., 2005. Two concurrent phase II trials of paclitaxel/carboplatin/trastuzumab (weekly or every-3-week schedule) as first-line therapy in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer: NCCTG study 983252. *Clin Breast Cancer*, 6(5), 425-432.
- Perez-Yepey, E.A., Ayala-Sumuano, J.T., Reveles-Espinoza, A.M., Meza, I., 2012. Selection of a MCF-7 Breast Cancer Cell Subpopulation with High Sensitivity to IL-1 β : Characterization of and Correlation between Morphological and Molecular Changes Leading to Increased Invasiveness. *Int J Breast Cancer*, 2012, 609148.
- Pollok, K.E., Y.J., Zhou, Z. ve et al., 1993. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol*; 150 (3): 771-781.
- Polyak, K., 2011. Heterogeneity in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3786–3788.
- Ramakers, G.J.A. ve Moolenaar, W.H., 1998. Regulation of astrocytemorphology by rhoa and lysophosphatidic acid. *Experimental Cell Research*; 245 (2): 252-262.
- Riaz, M., van Jaarsveld, M.T., Hollestelle, A., Prager-van der Smitten, W.J., et al., 2013. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast cancer research: BCR*, 15(2), R33.
- Richon, V.M., 2006. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor, *Br J Cancer*, (Suppl 1), 2-6.
- Richon. V.M., 2000. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 60, 5165-5170.
- Rojas, K. ve Stuckey, A., 2016. Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical Obstetrics&Gynecology*; 59 (4): 651-672.
- Rossi L, Mazzara C, Pagani O. 2019. Diagnosis and treatment of breast cancer in young women. *Curr Treat Options in Oncol.* 2019;20(12):86.
- Sahai, E., and Marshall, C.J., 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2: 133–142.
- Schuster, M., Nechansky, A., Kircheis, R., 2006. Cancer immunotherapy. *Biotechnol. J*, 1(2), 138–147.

- Seong-A J., *et al.* 2005. Immunity to melanoma mediated by 4-1BB is associated with enhanced activity of tumour-infiltrating lymphocytes. *Immunology and Cell Biology*, 83: 344–351.
- Shaughnessy, J.A., Vukelja, S., Marsland, T., Kimmel, G., *et al.*, 2004. Phase II study of trastuzumab plus gemcitabine in chemotherapy-pretreated patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 5(2), 142-147.
- Soroosh, P., Ine, S. Sugamura, K. ve Ishii, N., 2006. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity, *J Immunol*; 176 (10): 5975–5987.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51(5), 1409-1416.
- Spring, L.M., Gupta, A., Reynolds, K.L. ve *et al.*, 2016. Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*; 2 (11): 1477-1486.
- Subramaniam, D., Thombr, R., Dhar, A. ve Anant, S., 2014. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*; 4.
- Sun S., 2011. An autophagy inhibitor enhances the inhibition of cell proliferation induced by a proteasome inhibitor in MCF-7 cells. *Mol Med Report*. Published online September 19.
- Sun, Y., Zhao, Z., Yang, Z., Xu, F., *et al.*, 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13(11), 1387-1397.
- Sweeney, E.E., Mcdaniel, R.E., Maximov, P.Y., Fan, P., Craig, V., 2012. Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Significant Clinical Progress despite Limitations. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 9(2), 143-163.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), 87-108.
- Turashvili, G. ve Brogi, E., 2017. Tumor heterogeneity in breast cancer. *Front Med*; 4.
- Üstün, F., 2019. Meme Kanseri Modelleri. *Nucl Med Semin*; 5: 30-39.
- Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *The Lancet*. 2005;365(9472):1727-1741.
- Vildan, B.Ç., Zuhall, E., 2013. Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar. 20 (2), 72-79.

- Waks., A.G. ve Winer, E.P., 2019. Breast cancer treatment: a review. *JAMA*; 321 (3): 288-300.
- Williams, L.J., Fletcher, E., Douglas, A., et al., 2018. Retrospective cohort study of breast cancer incidence, health service use and outcomes in Europe: a study of feasibility. *Eur J Public Health*, 28(2), 327-332.
- Xiong, H., Qiu, H., Zhuang, L., Xiong, H., Jiang, R. ve Chen, Y., 2009. Effects of 5-Aza-CdR on the proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 and on the expression of Apaf-1 gene. *J Huazhong Univ SciTechnol [Med Sci]* ; 29 (4): 498-502.
- Yang X, Shi Z, Zhang N, Ou Z, Fu S, Hu X, Shen Z. 2014. Suberoyl bis-hydroxamic acid enhances cytotoxicity induced by proteasome inhibitors in breast cancer cells. *Cancer Cell Int*.Nov 12;14:107. doi: 10.1186/s12935-014-0107-7.
- Yersal Ö., Barutca, S., 2014. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5(3), 412-424.
- Yin, L., Duan, J-J., Bian, X-W. Ve Yu, S., 2020. Triple-negativebreast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*; 22 (1): 61.
- Zhang, Y., Liu, M., Yang, H. ve et al., 2014. PIK3CA mutations are a predictor of docetaxel plus epirubicinneoadjuvantchemotherapyclinical efficacy in breast cancer. *neo*; 61 (04): 461-467.