



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**M1/M2 MAKROFAJ VE MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE
SELİNEXOR'UN EPİTELYAL MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ**

Halil BALAMUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU

II. TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI

Gaziantep

2025



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**M1/M2 MAKROFAJ VE MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE
SELİNEXOR'UN EPİTELYAL MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ**

Halil BALAMUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU

II. DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI

Gaziantep

2025

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

M1/M2 MAKROFAJ VE MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE
SELİNEXOR'UN EPİTELİYAL MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ
Halil BALAMUR

Tez Savunma Tarihi: 30/10/2025
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Davut Sinan KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans / Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Nuray BOSTANCIERİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans / Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU
Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI
II. Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans / Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Nuray BOSTANCIERİ

Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Hasan ULUSAL

BEYAN

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

24.10.2025

Halil BALAMUR

TEŞEKKÜR

Önsöz Gaziantep Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen konu seçiminden, araştırmanın yürütülmesine dek beni sınırlamayıp özgür bırakan, yüksek lisans öğrencisinin yeterliğini göstermesine olanak tanıyan, tez çalışmamın yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana emek veren hocalarım Gaziantep Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doçent. Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ'ne, Sayın Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ'ye, Sayın Prof. Dr. Serap S. İnalöz'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜRKER'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülüna ERDEM KOÇ'a,

Tez çalışmalarımın uygulama sürecinde katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hülya ÖZTATLICI'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI'ya

Maddi ve manevi anlamda bana destek olan kıymetli aileme, dostum Hasan ERDEM'e ve Harun ÖZGEN'e tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu proje Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB) tarafından (BAP No: TF.YLT.24.39) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	v
TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMALAR VE SEMBOLLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
RESİMLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİ.....	6
2.1 Kanser.....	6
2.1.1. Meme Kanseri.....	6
2.1.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	7
2.1.3 Meme kanseri hücre hatları.....	8
2.2 Meme Kanseri ve Metastaz.....	8
2.3 Tümör Mikro Çevresi (TME).....	10
2.3.2. TME'nin tümör karşıtı bağışıklık gelişimindeki rolü.....	11
2.4. Makrofajlar.....	12
2.5. Epitelyal Mezenkimal Değişim (EMD).....	15
2.6. Nükleer Ekspor.....	18
2.7. Selinexor.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1. Deneyde Kullanılacak Hücreler.....	21
3.2. Hücre Kültürü.....	21
3.2.1. Besiyerlerinin hazırlanması.....	21
3.2.2. Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması.....	21
3.2.3. Hücre sayımı.....	21
3.2.4 Sitotoksite analizi.....	22
3.2.5 Yara modeli.....	23
3.2.6 Koloni oluşturma deneyi.....	23
3.2.7 Makrofaj polarizasyonu.....	24
3.4 RT-qPCR Yöntemi ile Makrofaj Polarizasyonun Belirlenmesi.....	24

3.5 Ko-Kültür	26
3.6 İmmünohistokimyasal (ICC) Boyama.....	28
4. BULGULAR	29
4.1 Selinexor'un MDA-MB-231 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	29
4.2. Raw 264.7 hücrelerinin M1 ve M2 Makrofajlara Polarizasyonu	29
4.3. Koloni oluşturma deneyi bulguları.....	30
4.4. Selinexor inhibitör maddesinin MDA-MB-231 kanser hücresinde in vitro yara kapanma potansiyeli.....	31
4.5. M0 Makrofajın M1/M2 Polarizasyonun RT-qPCR ile Değerlendirilmesi.....	33
4.6. Ko-Kültür Çalışmasında M0, M1 Ve M2 Makrofajının MDA-MB-231 Hücre Hattında İmmünohistokimya Yapılarak EMD Yolağı Üzerindeki Etkisi.....	35
4.6.1. Vimentin.....	35
4.6.2. N-Kaderin.....	39
4.6.3. E-Kaderin	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
KAYNAKÇA	50
ÖZGEÇMİŞ	57

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptör
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
IL	İnterlökin
DMSO	Dimetil sülfoksit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
dk	Dakika
mm	Milimetre
EMD	Epitelyal Mezenkimal Değişim
TAM	Tümörle İlişkili Makrofajların
TEM	Tümör Mikroçevresi
TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri
NPK	Nükleer Por Kompleksi
XPO1	Eksportin 1
CCK-8	Hücre Sayım Kiti-8
ICC	İmmünotokimya

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Meme kanseri metastazlarının en yaygın yerlerini göstermektedir (16).	9
Şekil 2. Tümör mikroçevresindeki farklı hücre tipleri arasındaki iletişim (32)	11
Şekil 3. M1 ve M2 makrofajları arasındaki farklı stimuluslar, yüzey belirteçleri, salgılanan sitokinler ve biyolojik işlevler özetlenmiştir (62).....	15
Şekil 4. EMD ve MED şematik olarak gösterimi (71).	17
Şekil 5. XPO1, kargo proteinlerini çekirdekten sitoplazmaya taşımasını sağlayan nükleer eksport proteinin şematik görüntüsü (79).	19
Şekil 6. Selinexor moleküler yapısı.	20
Şekil 7. Hücre sayımı yapılırken kullanılan, Neubauer lam görüntüsü.	22
Şekil 8. Raw 264.7 makrofaj hücrelerinden M1 ve M2 makrofaj polarizasyonu ve MDA ko-kültür yönteminin şematik olarak gösterilmesi	27
Şekil 9. MDA-MB-231 hücre hattı Selinexor'un IC50 grafiği	29
Şekil 14. MDA ve MDA+SLX istatistiksel sonuçlar	31
Şekil 15. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının kontrol ve MDA-MB-231+Selinexor uygulanmasının ardından,migrasyon yüzdelere ait sonuçlar	33
Şekil 10. LPS ve IFN- γ ile indüklenmiş makrofajların M1 (CD64) ve IL-10 ile indüklenmiş makrofajların M2 (163) için gen ekspresyon grafiği.	34
Şekil 11. MDA hücresinin M0, M1 ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüründe vimentin ekspresyonun kıyaslanması (A), MDA ile Makrofaj hücrelerinin Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında vimentin ekspresyonu (B). Selinexor uygulanan ve uygulanmayan ko-kültür gruplarda vimentin ekspresyonun kıyaslanması (C).	38
Şekil 12. MDA hücresinin M0, M1 ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüründe N-kaderin ekspresyonun kıyaslanması (A), MDA ile Makrofaj hücrelerinin Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında N-kaderin ekspresyonu (B). Selinexor uygulanan ve uygulanmayan ko-kültür gruplarda N-kaderin ekspresyonun kıyaslanması (C).	42
Şekil 13. MDA hücresinin M0, M1 ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüründe E-kaderin ekspresyonun kıyaslanması (A), MDA ile Makrofaj hücrelerinin Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında E-kaderin ekspresyonu (B). Selinexor uygulanan ve uygulanmayan ko-kültür gruplarda E-kaderin ekspresyonun kıyaslanması (C).	46

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. M0 makrofajlarının , LPS ve IFN γ sitokinleriyle M1 ve IL-10 sitokinleriyle M2 polarizasyon gerçekleştirilen makrofajların kültür sürecindeki morfolojik değişikliklere ait görüntüleri: (A) M0 makrofaj, B) M1 makrofaj, C) M2 makrofaj, ölçek çubuğu: 50 μ m.....	30
Resim 2. MDA (A) ve MDA-MB-231+SLX (B)	30
Resim 3. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan Selinexor inhibitörün oluşturulan yara modelin zamana bağlı kapanma etkisini gösteren mikroskop görüntüleri (ölçek: 100 μ m).....	32
Resim 4. MDA-MB-231 hücresinin, M0, M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin ve Selinexor ile Ko-kültür yapılarak ICC ile değerlendirilmesi	37
Resim 5. MDA-MB-231 hücresinin, M0,M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin ve Selinexor ile Ko-kültür yapılarak ICC ile değerlendirilmesi	41
Resim 6. MDA-MB-231 hücresinin, M0,M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin ve Selinexor ile Ko-kültür yapılarak ICC ile değerlendirilmesi	45

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. RT-qPCR reaksiyon bileşenleri.....	26
Tablo 2. RT-qPCR döngü aşamaları.....	26



ÖZET

M1/M2 MAKROFAJ VE MEME KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE SELİNEXOR'UN EPİTELYAL MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Halil BALAMUR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU

II. Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI

Ekim 2025, 69 sayfa

Bu çalışma, MDA-MB-231 hücrelerinde tümör mikroçevresinin (TME) bileşenlerinden biri olan tümörle ilişkili makrofajların (TAM) epitelyal mezenkimal değişim (EMD) süreci üzerindeki etkilerini ve XPO1 inhibitörü Selinexor'un bu süreçteki düzenleyici rolünü araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. TME içerisinde yer alan makrofajlar, fenotipik olarak proinflamatuvar (M1) veya antiinflamatuvar (M2) özellik gösterebilir. M1 makrofajlar anti-tümör, proinflamatuvar ve bağışıklığı destekleyici bir rol oynar, M2 tipi makrofajlar, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, anjiyogenezi, invazyonu ve metastatik kapasitesini artırarak kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Nükleer taşıma proteini XPO1, tümör baskılayıcı proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasında görev alır. XPO1'in aşırı ekspresyonu, bu proteinlerin çekirdek dışına çıkarak fonksiyonlarını kaybetmesine ve apoptozun baskılanmasına neden olur. Selinexor, XPO1'i seçici olarak inhibe ederek tümör baskılayıcı proteinlerin çekirdek içinde tutulmasını sağlar, böylece hücre proliferasyonunu ve metastatik potansiyeli azaltır. Bu çalışmada, MDA hücresi ile M1 ve M2 fenotipine polarize edilmiş RAW 264.7 makrofajlarının ko-kültür modeli oluşturulmuş ve bu ko-kültür modelinde selinexorun EMD belirteçleri üzerindeki etkileri immünohistokimyasal (IHC) yöntemle değerlendirilmiştir. Bulgularda, M1 makrofajların varlığında E-kaderin ekspresyonunda anlamlı bir artma, vimentin ve N-kaderin ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlemlendi. M2 makrofajlarının varlığında ise vimentin ve N-kaderin ekspresyonunda artma, E-kaderin ekspresyonunda azalma gözlemlendi. Selinexor uygulamasının ise bu değişimleri tersine çevirdiği bulundu. Sonuçlar, Selinexor'un TME'yi hedef alarak MDA-MB-231 hücrelerinde EMD'yi ve metastatik potansiyeli baskıladığını göstermektedir. Bu durum, XPO1'in hedeflenmesinin meme kanseri tedavisinde metastatik potansiyelin azaltılmasında umut verici bir strateji olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Epitelyal mezenkimal geçiş, Makrofaj, Meme Kanseri, Selinexor

ABSTRACT

EFFECT OF SELINEXOR ON EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION PATHWAY IN M1/M2 MACROPHAGE AND BREAST CANCER CO- CULTURE MODEL

Halil BALAMUR

Master of Science Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN HALICIOĞLU

Second Thesis Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI

October 2025, 69 pages

This study was conducted to investigate the effects of tumor-associated macrophages (TAMs), one of the main components of the tumor microenvironment (TME), on the epithelial–mesenchymal transition (EMT) process in MDA-MB-231 cells and to evaluate the regulatory role of the XPO1 inhibitor Selinexor in this process. Macrophages within the TME can exhibit distinct phenotypes, displaying either proinflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) properties. M1 macrophages play antitumor, proinflammatory, and immune-supportive roles, whereas M2 macrophages are known to be associated with poor prognosis by enhancing tumor cell proliferation, angiogenesis, invasion, and metastatic capacity. The nuclear transport protein XPO1 is responsible for exporting tumor suppressor proteins from the nucleus to the cytoplasm. Overexpression of XPO1 leads to the translocation of these proteins out of the nucleus, resulting in loss of function and inhibition of apoptosis. Selinexor selectively inhibits XPO1, ensuring the nuclear retention of tumor suppressor proteins and thereby reducing cell proliferation and metastatic potential. In this study, a co-culture model was established using MDA-MB-231 cells and Raw 264.7 macrophages polarized into M1 and M2 phenotypes. The effects of Selinexor on EMT markers were evaluated by ICC analysis. The findings demonstrated a significant increase in E-cadherin expression and a decrease in vimentin and N-cadherin expression in the presence of M1 macrophages. In contrast, co-culture with M2 macrophages resulted in increased vimentin and N-cadherin expression and decreased E-cadherin expression. Selinexor treatment was found to reverse these alterations. Overall, the results indicate that Selinexor suppresses EMT and metastatic potential in MDA cells by targeting the TME, suggesting that XPO1 inhibition may represent a promising therapeutic strategy for reducing metastasis in breast cancer.

Key words: Epithelial-mesenchymal Transition, Macrophages, Breast cancer, Selinexor

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, anormal hücreler kontrolsüzce büyüdüğünde, normal sınırlarının ötesine geçip vücudun diğer bölgelerini istila ettiğinde ve diğer organlara yayıldığında vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda başlayabilen büyük bir hastalık grubudur. Neoplazm ve kötü huylu tümör, kanser için kullanılan diğer yaygın isimlerdir. Kanser, dünya genelinde ikinci önde gelen ölüm nedeni olup, 2018 yılında 9,6 milyon ölüme veya her 6 ölümden 1'ine neden olmuştur. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken, meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türleridir. Bu çalışmada, selinexor'un meme kanseri hücrelerinin metastazı üzerindeki etkileri araştırılacaktır. Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen malignitedir ve dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. 2022'de, dünya çapında 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi kondu ve 670.000 ölüm gerçekleşmiştir. Tıp alanındaki gelişmeler ve hastalara hızlı tanı konulması nedeniyle meme kanseri mortalitesinde önemli bir azalma yaşansa da her geçen gün meme kanseri olguları artmaktadır. Meme kanseri oldukça heterojen bir hastalıktır ve tümör mikro çevresi (TME) bu heterojeniteye katkı sağlar. TME, meme kanserinin malign ilerlemesinin önemli sebeplerindendir, bu nedenle TME'yi hedef alan immünoterapötik yaklaşımlar meme kanseri hastalarının tedavisini kişiselleştirme ve prognozu iyileştirme konusunda çok yüksek bir potansiyele sahiptir. Meme kanseri mikroçevresini oluşturan hücresel ve hücre dışı bileşenler, anti-tümöral bağışıklık yanıtlarını baskılayarak tümör progresyonunu ve metastatik yayılımı destekleyici bir ortam oluşturmaktadır. Bu bağlamda, tümör hücreleri ile bağışıklık hücreleri arasında kurulan karmaşık etkileşimler, özellikle metastazın başlamasında ve sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadır. Literatür incelendiğinde, selinexor adlı ilacın meme kanseri üzerindeki etkilerine dair yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Selinexor, hücre çekirdeğinden protein ve RNA çıkışını düzenleyen taşıyıcı bir protein olan Exportin 1 (XPO1)'i seçici olarak inhibe eden, SINE (Selective Inhibitor of Nuclear Export) sınıfına ait bir inhibitördür. XPO1'in inhibisyonu sonucunda, tümör baskılayıcı proteinlerin çekirdek içinde birikimi sağlanarak hücre döngüsü durdurulur ve apoptoz indüklenir. Kanser hücrelerinde XPO1'in inhibisyonu, tümör baskılayıcı proteinlerin

nükleusta tutulmasını sağlayarak apoptoz, hücre döngüsü duraksaması ve anti-tümöral yanıtların yeniden etkinleştirilmesine katkı sunar. Bu nedenle, selinexor'un birçok solid tümör ve hematolojik malignitede terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak, meme kanseri özelinde özellikle metastaz süreci üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu doğrultuda, planlanan bu çalışma, selinexor'un triple negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinde metastazın önemli bir belirleyicisi olan epitelyal mezenkimal geçiş (EMD) üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. EMD, tümör hücrelerinin invazivlik ve hareketlilik kazanarak çevre dokulara yayılmalarını sağlayan bir biyolojik süreçtir. Selinexor'un bu süreç üzerindeki düzenleyici etkisinin ortaya konulması, hem metastazın önlenmesine yönelik yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir hem de ilaç hedeflerinin daha iyi anlaşılmasına olanak tanıyabilir. Meme kanseri gibi birçok kanser türünde, tümörle ilişkili makrofajların (TAM) kanser hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada, M1 ve M2 fenotipine sahip makrofajlarla ko-kültüre edilen meme kanseri hücrelerinde EMD yolağının nasıl etkilendiği araştırılacaktır. Ayrıca, M1 ve M2 makrofajların EMD yolağı üzerinden metastaz ile olan ilişkisi incelenecektir. Kanser hücrelerinde metastazın inhibe edilmesi, kanser tedavisinde kritik bir adımdır. Bu nedenle, metastazla ilgili araştırmalardan elde edilen bulgular, tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Literatürde, M1 ve M2 makrofajlarının meme kanseri hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmakla birlikte, EMD yolağı üzerindeki etkilerini ele alan araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışma, makrofajlarla ko-kültüre edilen meme kanseri hücrelerinde selinexor'un etkisini değerlendirerek, makrofajlar ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimleri ilk kez ortaya koymayı amaçlamaktadır. Literatürde, selinexor'un bu ko-kültür ortamında makrofajlar ve kanser hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması, araştırmanın özgünlüğünü güçlendirmektedir. Bununla birlikte, selinexor'un tümör mikroçevresindeki immünmodülatör etkileri de bu çalışma kapsamında ele alınacaktır. Selinexor'un kemoterapötik ajanlardan farklı bir etki mekanizmasına sahip olduğu bilinmekte, ancak tümör mikroçevresindeki immün hücreler üzerindeki etkileri henüz tam olarak anlaşılamamaktadır. Bu araştırma, selinexor'un meme kanserinde tümör mikroçevresindeki makrofajlar ve metastazla ilişkisini ilk kez inceleyerek literatüre önemli bir katkı sağlamayı hedeflemektedir. Elde edilecek bulgular,

selinexor'un klinik kullanım potansiyeli ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için temel veriler sunacak ve gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.



2. GENEL BİLGİ

2.1 Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüüp çoğalması sonucu ortaya çıkan ciddi bir hastalıktır. Normal hücreler, vücudun ihtiyaçlarına göre belirli bir döngüde bölünür ve görevlerini yerine getirir. Ancak, hücre döngüsünü düzenleyen mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olur. Bu kontrolsüz büyüme sonucu tümör adı verilen kitleler oluşur. Tümörler ikiye ayrılır: benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu). İyi huylu tümörler yavaş büyür ve genellikle çevredeki dokulara zarar vermez. Ancak malign tümörler hızla büyüüp yayılır, çevre dokulara ve organlara zarar verebilir. Malign tümörler, bulundukları dokudan ayrılarak kan ve lenf sistemi aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. Bu sürece metastaz denir ve yeni bir bölgede tümör oluşumuna yol açar. Kanser, köken aldığı hücre tipine göre farklı türlere ayrılır. Karsinomlar epitel hücrelerden kaynaklanır ve en yaygın kanser türüdür. Sarkomlar ise kemik, kas ve bağ dokusu gibi destekleyici dokulardan gelişir. Lenfomalar ve lösemiler kan ve bağışıklık sistemi hücrelerini etkiler. Kanser tedavisi, tümörün tipi, yayılımı ve hastanın genel sağlık durumuna göre değişir ve genellikle cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi yöntemleri içerir (1).

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusunda yer alan hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu sonucu gelişen ve malign tümör oluşumuna yol açan heterojen bir hastalıktır. Erken evrede lokalize olarak ortaya çıkan bu tümörler, zamanla çevre dokulara invaze olabilir ve sistemik dolaşıma katılarak uzak organlara metastaz yapabilir. Bu süreç, hastalığın klinik seyrini ciddi ölçüde kötüleştirmekte ve tedaviye yanıtı azaltmaktadır. Meme kanseri, genellikle süt kanalları (duktal) veya süt üreten lobüllerde (lobüler) başlar. Erken evre tümörler yaşamı tehdit edici nitelikte olmayabilir ve uygun tanı yöntemleriyle saptanarak tedavi edilebilir. Ancak invaziv özellik kazanan kanser hücreleri, önce komşu meme dokusuna, ardından aksiller lenf düğümleri başta olmak üzere lenfatik sistem ve dolaşım aracılığıyla uzak organlara yayılabilir. Metastatik yayılım, hastalığın en ölümcül formunu oluşturmaktadır. Meme kanserinin tedavi

stratejileri; tümörün biyolojik alt tipine, yayılım derecesine, hastanın yaşı, genel sağlık durumu ve genetik özelliklerine göre bireyselleştirilerek planlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 yılı verilerine göre, dünya genelinde yaklaşık 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konmuş ve hastalığa bağlı olarak 670.000 ölüm bildirilmiştir. Meme kanseri, ergenlik sonrası her yaş grubundaki kadınlarda görülebilmekle birlikte, yaşla birlikte insidansı artan bir hastalık olarak dikkat çekmektedir (2). Meme kanseri, histoloji, hücresel köken, mutasyonlar, metastatik potansiyel, hastalığın ilerlemesi, terapötik yanıt ve klinik sonuç açısından karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri sınıflandırmasının hastanın prognozu üzerinde dikkate değer bir etkisi vardır. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) tanımı klinik olarak mevcut immünohistokimyasal (IHC) boyama yöntemlerine göre östrojen reseptörü (ER) negatif, progesteron reseptörü (PR) negatif ve HER2 negatif olan meme kanseri alt tiplerini tanımlamak için kullanılmaktadır (3). TNBC, hem östrojen reseptörü (ER) hem de progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunun eksikliği ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) yukarı regülasyonunun olmaması ile karakterize olabilen agresif bir meme kanseri alt tipidir (4). TNBC, kemoterapi direnci ve uzak nüks oranı en yüksek olan meme kanseri türüdür. Tıp alanındaki gelişmeler ve hastalara hızlı tanı konulması nedeniyle meme kanseri mortalitesinde önemli bir azalma yaşanmıştır. Meme kanseri hastaları için radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi müdahale gibi bazı tedavi seçenekleri olsa da hastalığın karmaşık mekanizmasından dolayı hala tam anlamıyla etkili tedavi yöntemleri belirlenememiştir (5). Dünya çapında TNBC artışta olup toplam meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini ve diğer alt türlere kıyasla orantısız bir şekilde ölümlerin %83'ünü oluşturmaktadır (6).

2.1.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri gelişme riski, bireyler arasında değişkenlik gösterebilen çok sayıda faktörün etkileşimine bağlıdır. Bu risk faktörleri arasında menarş (ilk adet) yaşı, aile öyküsü ve postmenopozal dönemde uygulanan hormon replasman tedavisi gibi hormonal ve genetik etmenler önemli rol oynamaktadır (6). Yapılan çalışmalar, erken yaşta menarşa giren ve geç yaşta menopoza giren kadınların, üreme dönemi boyunca daha uzun süre endojen östrojen hormonuna maruz kalmaları nedeniyle meme kanseri gelişme riskinin arttığını ortaya koymuştur. Buna karşılık, geç puberteye giren ve erken menopoza ulaşan kadınlarda bu maruziyet süresi daha kısa olduğundan, relatif olarak meme kanseri gelişme riski daha düşüktür. Östrojenin meme dokusu üzerindeki

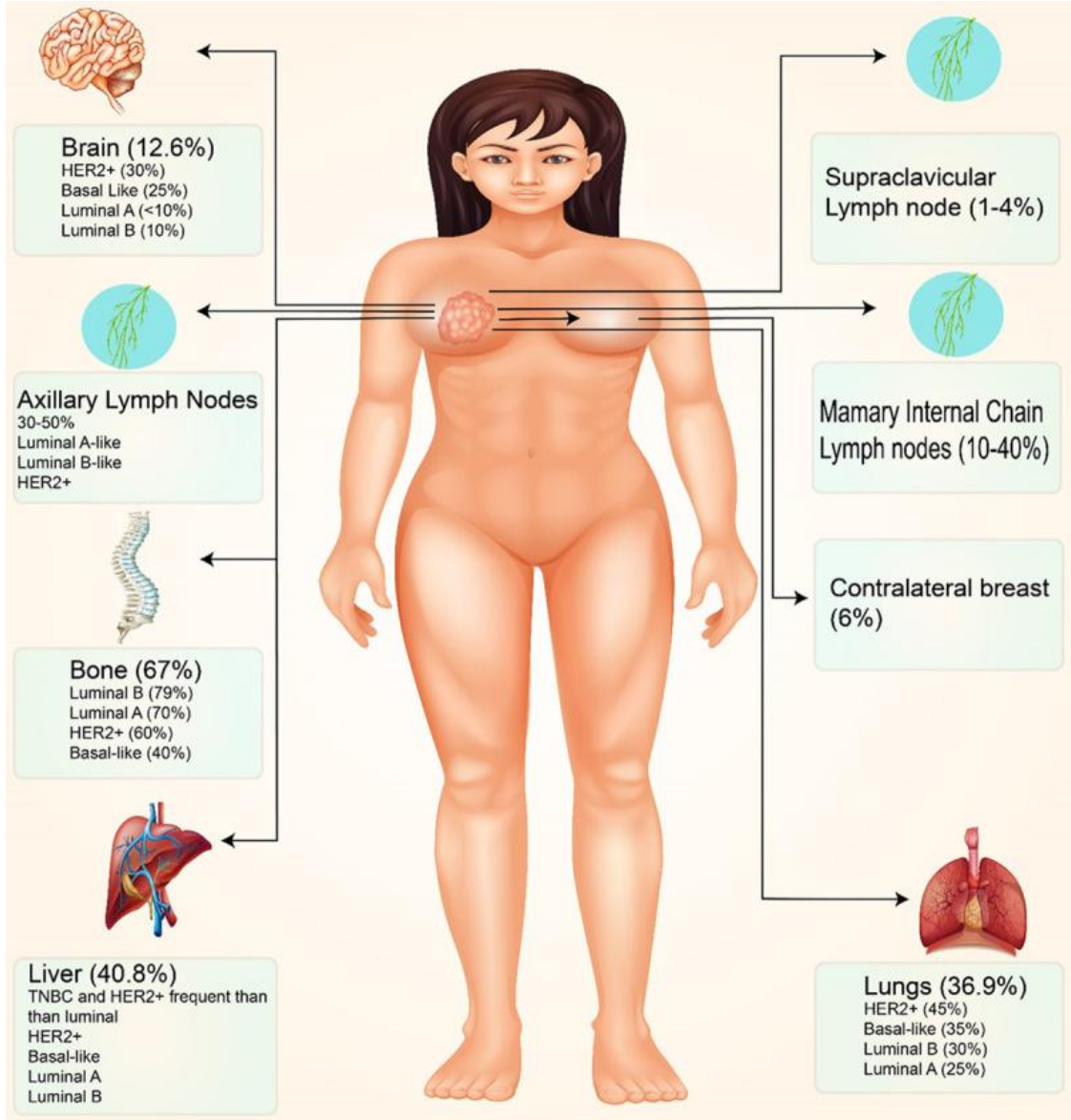
proliferatif etkileri, bu ilişkiyi biyolojik olarak açıklayan temel mekanizma olarak değerlendirilmektedir (7). Ayrıca, menopoza girdikten sonra uzun süreli östrojen tedavisi de riski artırabilir (8).

2.1.3 Meme kanseri hücre hatları

Meme kanserini araştırmak ve çözüm bulmak için birçok çalışma yapılmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları kanser araştırmaları için sıklıkla tercih edilen öncü çalışmalardır. Kanser hücre hatlarının sürekli çoğalma yeteneği vardır ve bu özellikleri nedeniyle kanser araştırmaları günümüzde çok yaygındır. Laboratuvar ortamında bu hücre hatları üzerinde birçok ilaç modeli denenmiş ve kanser tedavisinde yeni ilaçlar ile mekanizmaları üzerine çalışmalar halen devam etmektedir (9). Meme kanseri ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan hücre hatlarının sayısı oldukça sınırlıdır. Literatürde en sık tercih edilen hatlar MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 olup, bu hücre hatları meme kanseriyle ilişkili in vitro çalışmaların üçte ikisinden fazlasında kullanılmaktadır (10). İnsan meme kanseriyle ilgili in-vitro çalışmalarda en çok kullanılan ve adherent özelliği olan MDA-MB-231 meme kanseri; 1973 yılında M.D Anderson kanser merkezinde bir hastadan alınmıştır (11). HER2, PR ve ER ekspresyonundan yoksun olan TNBC hücre hattı, yüksek derecede invaziv ve agresif bir fenotipe sahiptir. TNBC, klinikte sınırlı hedefe yönelik tedavi seçeneği sunması nedeniyle prognozu kötü olan bir alt tip olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle, triple negatif meme kanserinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda, TNBC hücre hatlarıyla gerçekleştirilen in vitro deneysel çalışmalar, hastalığın biyolojik özelliklerini daha iyi anlamak ve potansiyel terapötik hedefleri belirlemek açısından kritik bir rol oynamaktadır (12),(13).

2.2 Meme Kanseri ve Metastaz

İnsan meme kanseri hastalarının %20-30'unun, tanı ve birincil tümör tedavisinin ardından metastaz ile geliştirebileceği ve kanserle ilişkili ölümün ortalama %90'ının metastaza bağlı olduğu rapor edilmiştir (14). Meme kanseri moleküler olarak heterojen bir hastalıktır ve bu durum metastazın farklı organlara yayılmasına neden olur (Şekil 1). Genellikle akciğer, karaciğer, kemikler gibi organlara metastaz yapar. Metastazın yeri, kanserin alt tipine göre değişir ve bu durum tedaviyi zorlaştırır. Bu nedenle, tedavi için tümörün moleküler profili önemlidir (15).



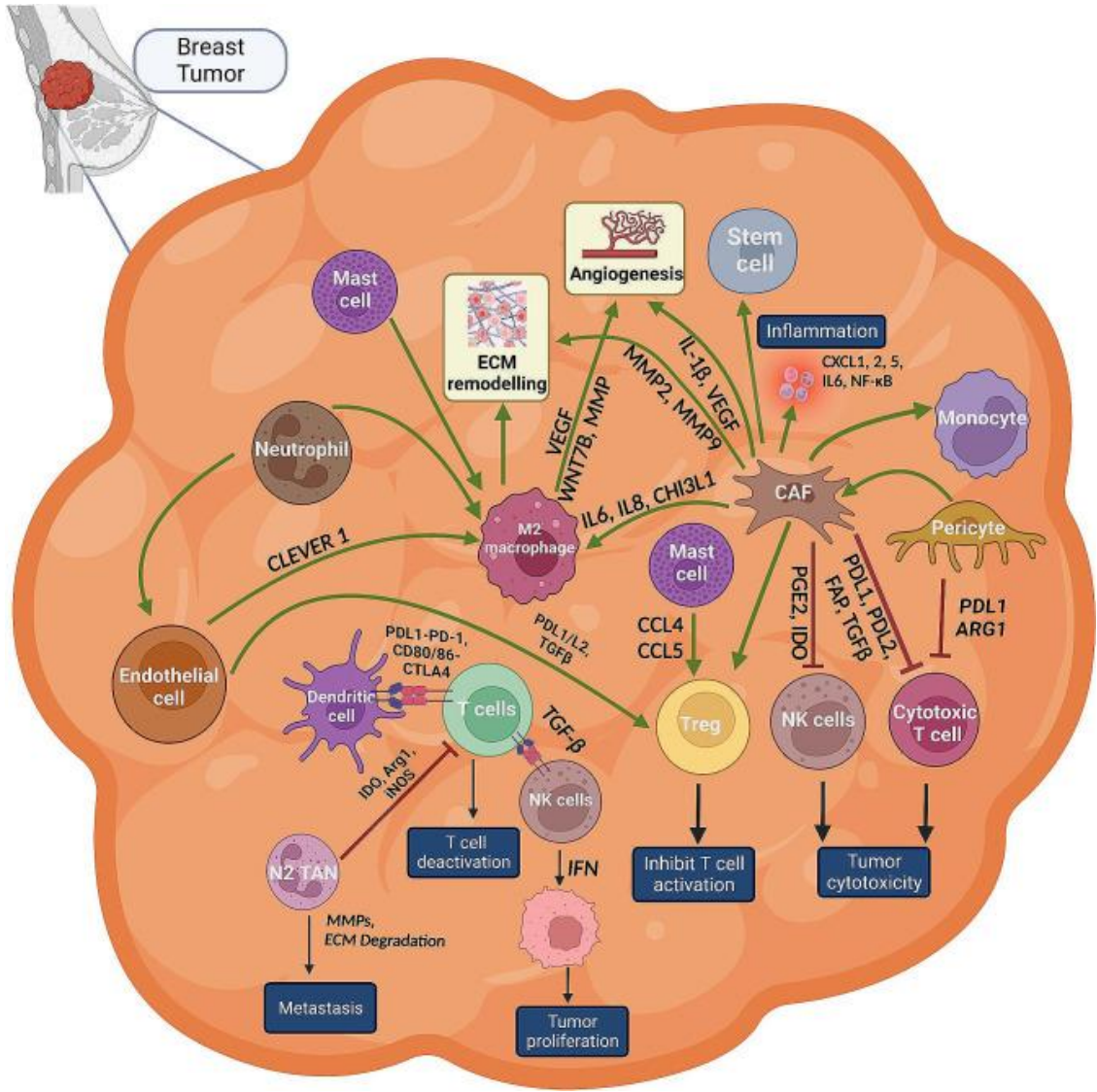
Şekil 1. Meme kanseri metastazlarının en yaygın yerlerini göstermektedir (16).

TME, TNBC'nin başlatılması ve ilerlemesi için çok önemlidir. TME'de proliferasyon, anjiyogenezin uyarılması, apoptozun inhibe edilmesi, bağışıklık sisteminin baskılanması ve bağışıklık gözetiminden kaçınma gibi faktörleri içermektedir (17). TME, TNBC ayırt edici bir özelliği olarak tanımlanabilir. TME, oldukça karmaşık ve heterojen bir yapıya sahiptir (18). Kanser hücrelerinin hızlı çoğalması, hipoksiye yol açar ve bu durum, TME'deki kanser hücrelerinin yeniden programlanmasına neden olur. Tümör hücreleri ile çevresindeki TME, sıklıkla yeni uygun ortama uyum sağlayarak tümör çoğalmasını ve büyümesini destekler. TME, kanser hücrelerinin bulunduğu ve çevredeki endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve fibroblastlarla etkileşime girdiği bir niş

oluşturur (19). Bu da TNBC için potansiyel hedefler sunabilir. Kanser hücreleri ile stromal ve bağışıklık hücreleri arasındaki karşılıklı iletişim, TME'nin hücresel bileşenlerinde değişikliklere neden olarak kanser hücrelerinin metastaza yatkın hale gelmesine yol açar (20). Bunun yanı sıra, TME, epitel hücrelerinin TNBC kök hücrelerine dönüşümünü kolaylaştırır (6). TME'deki bu hücreler arasındaki etkileşimler, kanserin büyümesi, invazyonu, anjiyogenezi ve metastazını destekleyen çeşitli biyolojik süreçleri tetikler (21).

2.3 Tümör Mikroçevresi (TME)

Kanser dokusunda, tümör mikroçevresini (TME) oluşturan ve kanser hücrelerinin büyümesi ve ilerlemesinde yakından rol oynayan çok sayıda bağışıklık hücresi, fibroblast ve epitel hücresi bulunur (22). Kanser hücreleri, monositleri/makrofajları TME'ye çekmek için monosit kemotaktik faktörleri (esas olarak CCL2) salgılar. M1 makrofajları, IFN- γ ve LPS gibi sinyallerle aktive olan, yüksek antijen sunma kapasitesine sahip, IL-12 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler üreten ve tümör mikroçevresinde genellikle anti-tümöral fonksiyon üstlenen makrofaj alt tipidir (23). Birçok durumda, makrofajlar M1 tipi belirteçleri ifade eder ve diğer bağışıklık hücreleriyle anti-kanser etkiler uygular, ancak TME'de alışılmadık bir durumdadırlar (24). Bu makrofajlara TAM adı verilir ve anjiyojenik ve immünoşüpresif faktörler salgırlar ve doku yıkımı ve yeniden şekillenmesi yoluyla tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı teşvik ederler (24),(25). TAM'lar kan monositlerinden oluşur ve tümör veya stromal hücreler tarafından salgılanan faktörler tarafından tümör bölgesine çekilir. Genel olarak, makrofajlar morfolojik olarak M1 ve M2 makrofaj olarak tanımlanabilir. TAM'ların M2 fenotipine doğru eğilimli olduğu ancak hem M1 hem de M2'nin unsurlarını içerdiği söylenmektedir (26). Bu sebepten dolayı, tümör tedavisi için ideal yöntem, M2 fenotipini ve TAM'ları M1 anti-tümör makrofajlarına dönüştürmektir. Meme kanseri hücreleri makrofajları M2 farklılaşmasına doğru yönlendiren faktörler salgılar ve bu etki TNBC hücre tipi MDA-MB-231 hücreleri için en belirginini olandır (27),(28). M2'ye doğru polarizasyon esas olarak IL-4 ve IL-10 sitokinleri, dönüşen büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi anti-inflamatuar sitokinler tarafından etkilenir (29). Diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında, TNBC'ler daha fazla G-CSF salgılar ve böylece M1 hücrelerini anti-inflamatuar bir fenotipe (M2) doğru kaydırarak tümör büyümesini teşvik eder (30),(31)



Şekil 2. Tümör mikroçevresindeki farklı hücre tipleri arasındaki iletişim (32)

2.3.2. TME'nin tümör karşıtı bağışıklık gelişimindeki rolü

Anti-tümör bağışıklığının uyarılması, TME'nin terapötik kullanımı için yakın zamanda tanımlanan yollardan biridir, çünkü bağışıklık hücrelerinde çok iyi bir çeşitlilik gösterir (33),(34). Tümör ilerlemesini engelleyebilir veya destekleyebilirler, bu da TME içindeki sinyallere bağlıdır. Örneğin, tümör hücrelerini çevreleyen ortam inflamatuvar moleküller açısından zenginse, bağışıklık sistemi kanser hücrelerini tanımda ve ortadan kaldırmada başarısız olur (35). Ancak, düzenli olarak TME'ye sızan lenfoid B hücreleri ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), sitokinleri serbest bırakarak ve tümör ilerlemesini destekleyerek immünosupresyona sebep olurlar (36). Tümörler, immün düzenleme ve immünosupresif TME oluşturma yoluyla bağışıklık dağıtımını gerçekleştirir. Ayrıca, genetik veya epigenetik değişiklikler nedeniyle tümörle ilişkili antijenlerin yukarı doğru

düzenlenmeleri, bağışıklık kontrol noktası proteinlerinin düzensiz olması ve bağışıklık sisteminin inhibisyonuna neden olur (37),(38). Bu nedenle, anti-tümör bağışıklığının hedefleri, immünoterapiler ve diğer hedefli terapilerin kombinasyonunda etkili kullanım için uyarlanabilir. TME, farklı türde ilaç direnç mekanizmalarının kurulmasında önemli bir rol oynar. Meme kanseri hücrelerinin ilaçlara verdiği yanıt, büyük ölçüde TME'den sinyaller çekilerek kontrol edilir. Kemoterapi, TME'nin fenotipi değiştirmesini ve ilaçlara direnç geliştirmesini sağlar (39).

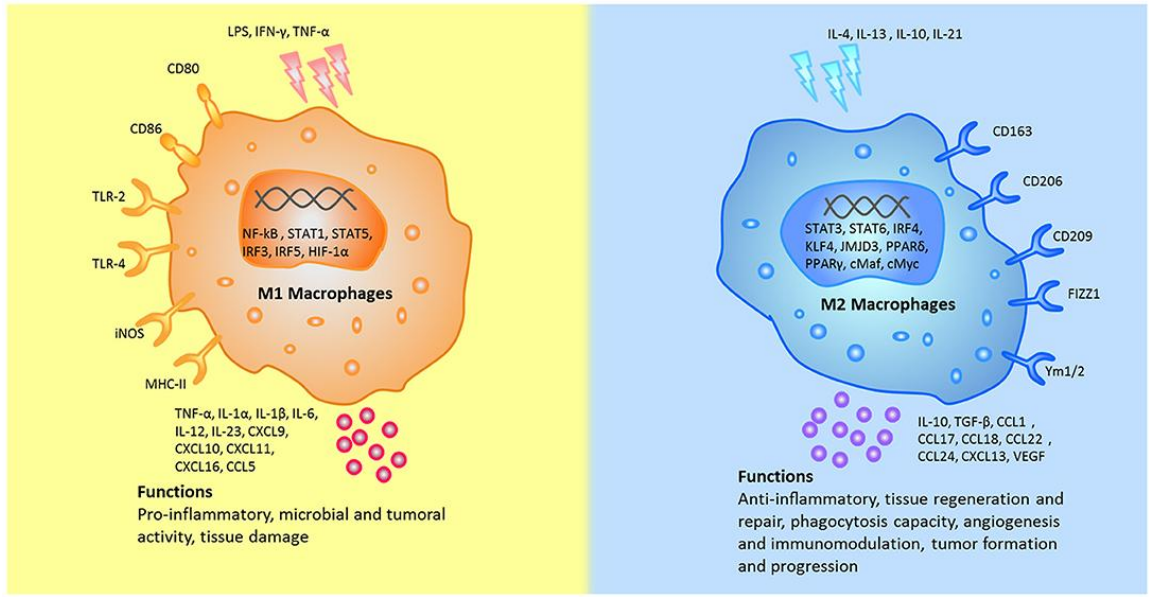
2.4. Makrofajlar

Sağlıklı bir organizmada doğuştan gelen bağışıklık sistemi, hem dış hem de iç tehlike sinyallerine karşı ilk savunma hattını oluşturarak, doku bütünlüğünün bozulması ve yeniden inşası süreçlerini kapsayan koruyucu bir inflamatuvar yanıt başlatır.

İnflamatuvar yanıtın ilk aşaması, patojenlerin ortadan kaldırılmasını ve hasarlı hücrelerin elimine edilmesini amaçlar. Bu evreyi, ölü veya ölmekte olan hücrelerin, hasarlı hücre dışı matriks bileşenlerinin ve hücre kalıntıların temizlendiği ve ardından dokunun yeniden onarıldığı iyileşme aşaması izler. Aslında, çok hücreli organizmalarda bir dokunun nihai amacı, zararlı tehditlere karşı savunma oluştururken doku morfolojisini ve fonksiyonunu koruyarak homeostazisin sürdürülmesini sağlamaktır. (40). Bu bakış açısına göre, muhtemelen inflamasyonun doku hasarına ve homeostatik dengesizliğine karşı adapte bir cevap olarak evrimleştiği varsayılmaktadır (41),(42). Makrofajlar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli üyeleri arasında yer alan miyeloid hücrelerdir (43). Bu hücreler, monosit adı verilen öncüllerden gelişir ve dokulara ulaştıklarında çevresel faktörlerin etkisiyle farklılaşır (44). İnsan vücudundaki hemen hemen tüm dokularda bulunmaları hem anatomik hem de işlevsel açıdan çeşitlilik göstermelerine neden olur (45). Makrofajların temel görevleri arasında, patojenlerin ve yabancı partiküllerin yutulmasını sağlayan fagositoz, dış kaynaklı antijenlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını mümkün kılan antijen sunumu ve bağışıklık yanıtlarını düzenleyen sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanması yer alır. Antijen sunumu, adaptif bağışıklığın aktive edilmesinde kilit bir rol oynar. Bu süreçte makrofajlar, fagosite ettikleri antijenleri sindirir ve majör histokompatibilite kompleksi sınıf II (MHC II) üzerinden sunar. T yardımcı hücreleri, MHC II tarafından sunulan bu antijenleri T hücre reseptörleri (TCR) aracılığıyla tanır, bu da bağışıklık yanıtını güçlendirir(46). Makrofajlar, patojenleri etkili bir şekilde yok ederek inflamatuvar çözülmesini destekler. Ayrıca, nötrofiller gibi ölü konak hücrelerini temizleyerek

dokulardaki inflamasyonun uzun süre devam etmesini önler (47). Bu hücrelerin eksik olduğu durumlarda, nötrofillerin birikimi ve uzun süren inflamasyon gözlemlendi(48). Makrofajlar, yalnızca bağışıklık yanıtlarında değil, aynı zamanda normal doku düzeninin sağlanmasında da görev alır. Hasarlı bölgelerde, anjiyogenez ve yeni dokuların oluşumunu destekleyen süreçlere öncülük eder (45, 49). Apoptotik hücrelerdeki fosfatidilserini tanıyarak bu hücrelerin fagositozunu gerçekleştirir. Fosfatidilserin, normalde hücre zarının iç yüzeyinde bulunurken apoptozis sırasında hücre yüzeyinde yer alır (50). Makrofajlar ayrıca farklı mekanizmalar aracılığıyla anjiyogenezi düzenler. Makrofajlar vasküler endotel hücrelerini tanımlayabilir ve hayatta kalmak için perisitlerden karşı sinyaller almazlarsa apoptoza girmeleri talimatını verebilir. Makrofajların normal damar olgunlaşmasında, yara iyileşmesinde ve gelişimde işlevsel anjiyogenezi ve birçok kanser türünde ve kronik inflamatuvar durumlarda işlevsel olmayan anjiyogenezi yönlendirdiği gösterilmiştir (51). Makrofajların keşfedildikten sonra, makrofajların uzun zamandır yalnızca bir türde var olduğu düşünülüyordu; ancak son araştırma bulguları, makrofajların birden fazla alt türü olduğu öne sürülmektedir (52). 2000'li yıllardan bugüne kadar, M1 makrofajlarının pro-inflamatuvar, M2 makrofajlarının ise doğası gereği anti-inflamatuvar olduğuna inanılmaktadır (53, 54). Makrofajların birçok fenotipi, hücre kültürü deneylerinde in vitro özelliklerine göre karakterize edilmiştir. Öncelikle, M1 ve M2 aktive edilmiş makrofajların, farklı yüzey reseptör ekspresyonu, salgı profilleri ve işlevlerine göre ayırt edilir (55, 56). Makrofaj polarizasyonu, bir makrofajın belirli bir zamandaki aktivasyon durumunu ifade eder, ancak makrofajların esnekliği nedeniyle polarizasyon durumları sabit değildir ve diğer hücrelerden, dokulardan ve patojenlerden gelen birden fazla sinyalin entegrasyonuna bağlı olarak değiştirilebilir (57). M1 makrofajları en klasik olarak bilinen makrofajlardır ve lipopolisakkarit (LPS) ve interferon (IFN)- γ tarafından indüklenir ve tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökin (IL-) ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgıladığı bilinmektedir (54). Bu salgılar bakteri, virüs ve kötü huylu tümör hücreleri gibi enfeksiyöz organizmaları öldürme yeteneğine sahiptir. Ölmüş ve parçalanmış hücreler makrofajlar tarafından fagositoz yoluyla alınır (58, 59). Makrofajlar tarafından alınan yabancı maddeler veziküller olarak lizozomlarla birleşir ve lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimlerin etkisiyle parçalanır (58). Bu nedenle, M1 makrofajlarının enfeksiyon savunması ve kanser karşıtı etkiler yoluyla insan vücudunda homeostazın korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir (60). M2 makrofajları ise doku onarımı ve bağışıklıkta iyi bir etkide rol oynar (52). M2 makrofajları, sinyal

dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 6'nın aktivasyonu yoluyla IL-13 ve IL-4 gibi sitokinler ile indüklenir (61). M2 makrofajları, inflamasyon yanıtını bastırmak için IL-10, arginaz (ARG) ve TGF- β salgılar. M2 makrofajları ayrıca hem hücre döküntülerini temizleyerek ve hem yara iyileşmesini hem de anjiyogenezi indükleyerek etki eden güçlü fagositlerdir (54). Bu nedenle, M2 makrofajları organları ve yumuşak dokuları korumada ve bağışıklık dengesini düzenlemede rol oynar. Bununla birlikte, malignite çalışmalarında, genellikle M2 fenotipine sahip olan tümör ilişkili makrofajların (TAM'lar) tümör ilerlemesini teşvik ettiği bilinmektedir ve bu nedenle, M2 makrofajlarına olumsuz bir yön vardır (24, 59). Makrofajlar, tümör mikroçevresinde en bol bulunan immün hücrelerden biri olup, mikroçevresel sinyallere bağlı olarak farklı fenotiplere polarize olurlar. M1 makrofajları, interferon- γ (IFN- γ), lipopolisakkarit (LPS) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi uyarıcılarla aktive olarak proinflamatuvar ve anti-tümöral özellik kazanır. Bu hücreler, IL-12, IL-23 ve TNF- α gibi sitokinler üretir, nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) sentezleyerek tümör hücrelerinde DNA hasarı ve apoptoz oluşturur; ayrıca MHC sınıf II ve kostimülatör moleküller aracılığıyla T hücrelerini aktive ederek antitümöral immün yanıtı destekler. Buna karşılık, M2 makrofajları IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β ile aktive olur ve anti-inflamatuvar, pro-tümöral bir fenotip gösterir. M2 fenotipi, VEGF, MMP-9 ve Arginaz-1 gibi faktörlerin salınımı ile anjiyogeneze, doku yeniden şekillenmesi ve tümör invazyonunu teşvik eder; aynı zamanda T hücreleri ve NK hücrelerinin aktivitesini baskılayarak tümörün immün kaçışına katkı sağlar. Tümör ilerledikçe mikroçevredeki sinyaller M1'den M2'ye geçişi teşvik eder ve bu durum genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir. Sonuç olarak, M1 ve M2 makrofajlarının dengesi, tümör progresyonu, metastaz ve terapötik yanıt açısından kritik bir belirleyicidir (62).

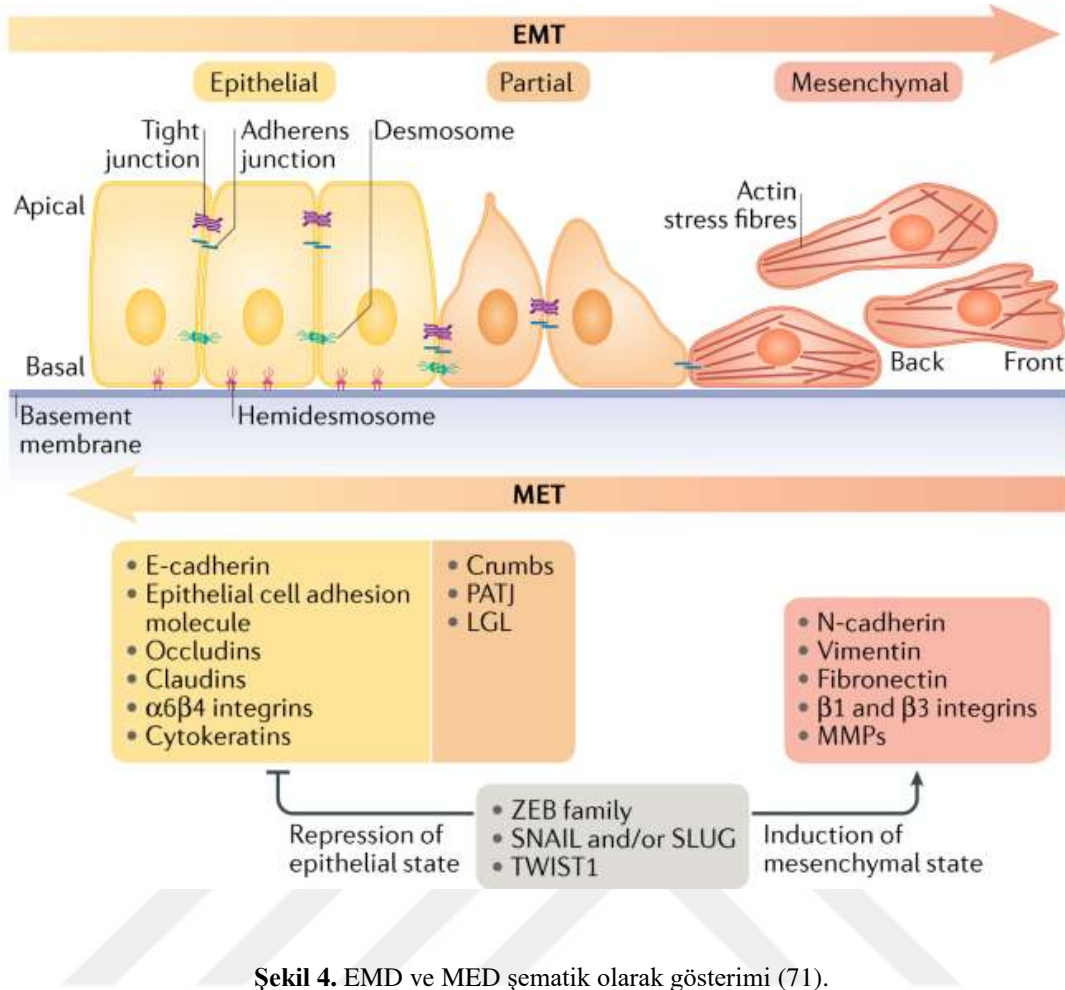


Şekil 3. M1 ve M2 makrofajları arasındaki farklı stimuluslar, yüzey belirteçleri, salgılanan sitokinler ve biyolojik işlevler özetlenmiştir (62).

2.5. Epitelyal Mezenkimal Değişim (EMD)

Epitel-mezenkimal Değişim (EMD), hücrelerin epitel özelliklerini kaybedip mezenkimal özellikler kazandığı hücresel bir süreçtir. EMD, tümör başlangıcı, tümör kök hücreliği, tümör hücre göçü, kana intravazasyon, metastaz ve tedaviye direnç dahil olmak üzere çeşitli tümör fonksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (31, 63). Hücreler epitel durumdayken, kararlı bağlantılar sergiler ve apikal-bazal polariteyi ve bazal membranla aktif etkileşimleri sürdürürler (63). Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümü ise hücrelerin fenotipik değişiklikler geçirmesini sağlar (64). EMD sırasında epitel hücreleri, hücreler arası yapışma azalma, apikal-bazal polaritenin kaybı, hareketlilik ve invaziv kapasitesinin artması, apoptoza karşı gelişmiş direnç ve hücre dışı matris (ECM) artışı ve üretimi gibi özelliklerle daha açık(gevşek) bir şekilde organize olmuş mezenkimal veya fibroblast benzeri bir fenotip alır (65). EMD hem embriyonik gelişim sırasında hem de yetişkinlerde çeşitli patolojik durumlar için kritik bir süreçtir. Bu biyolojik mekanizma, farklı bağlamlarda belirli işlevlere sahip üç ayrı tipe ayrılmaktadır. Tip 1 EMD, gastrulasyon, nöral krest oluşumu ve kalp gelişimi gibi embriyonik süreçlere destek sağlar (66). Tip 2 EMD ise yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve organ fibrozu gibi durumlarla ilişkilendirilir (67). Tip 3 EMD, kanserin ilerlemesiyle doğrudan bağlantılıdır ve epitel kökenli kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yapmasında önemli bir rol oynar (68). EMD süreci geri dönüşüm sağlanabilir

ve hücreler mezenkimal epitelyal geçiş (MET) yoluyla tekrardan epitelyal hücre durumuna dönüşebilir. Mezenkimalden epitelyal durumlara bu geçiş, kanser hücrelerinin metastatik yayılmasında önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir (69, 70), EMD, kanser hücrelerinde metastatik sürecin en kritik aşamalarından biri olarak kabul edilmektedir. EMD, hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal fenotipe geçmesiyle karakterizedir ve bu süreç, hücrelerin hareket kabiliyeti kazanmasına, invazivliklerinin artmasına ve uzak organlara yayılımına olanak sağlar. EMD sürecinin değerlendirilmesinde epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyon düzeyleri önemli rol oynamaktadır. Bu bağlamda, epitelyal markerlardan E-kaderin'in ekspresyonunda azalma, buna karşılık mezenkimal belirteçlerden N-kaderin ve vimentin düzeylerinde artış gözlemlenmesi, hücrenin EMD sürecine girdiğinin önemli bir göstergesidir. Kanser hücrelerinde EMD'nin engellenmesi ya da tersine çevrilerek MED sağlanması, metastazın önlenmesinde etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle EMD, antimetastatik ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir hedef mekanizma olarak ön plana çıkmaktadır. Bu EMD türlerinin daha iyi anlaşılması, farklı biyolojik süreçlerdeki rollerini ve işlevlerini daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koyabilir. Bu derinlemesine bilgi, özellikle kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için tedavide ilerleme sağlamak için önemlidir.



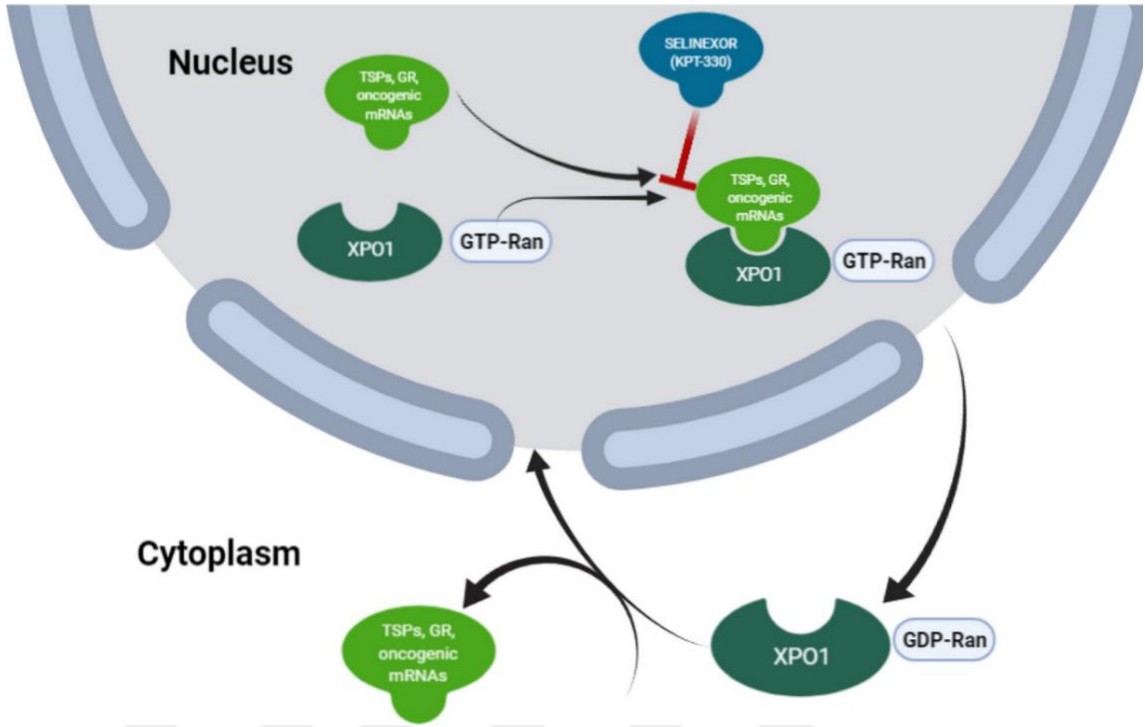
Şekil 4. EMD ve MED şematik olarak gösterimi (71).

EMD geçiren tümör hücreleri, uzak bölgelere yayılmalarını ve metastaz yapmalarını sağlayan artan hareketlilik ve invazivlik ile karakterize edilir. Bu tümör hücreleri apoptoza ve antitümör ilaçlara dirençli hale gelir, dolayısıyla immünosüpresyona katkıda bulunurlar ve kanser kök hücreleri gibi davranırlar (72, 73). EMD ile ilgili tümör hücrelerinin bir diğer özelliği de sınırlı çoğalma potansiyelidir (72, 74). Bununla birlikte, ters sürecin, MET teşvik edilmesi, tümör hücrelerinin epitel özelliklerini yeniden kazanmasını ve ekilen metastatik hücrelerin çoğalmasına ve büyümesine yol açan bir şekilde işlev görmesini sağlar (74). Bu bağlamda, TAM'lara bağlı olumsuz etkileri önlemeye yönelik bir strateji, TAM'lar tarafından aşırı ekspresyon gösteren moleküllere karşı özelleştirilmiş bağışıklık yanıtları geliştirmek olabilir (75). Günümüzde, M2 TAM' lar ile tümör hücreleri arasındaki hücreler arası iletişimin, tümör hücrelerinin EMD' sini indüklemeye ve EMD aracılı metastazı desteklemeye önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (76). Bundan dolayı, bu makrofajları çeken ve işlevlerini düzenleyen tümör mikroçevresinin yeniden şekillendirilmesine destek bulunabilir.

TAM'lerle ilişkili EMD'yi kontrol etmenin bir diğer yolu ise, EMD'yi hedef alarak metastazın baskılanmasına katkıda bulunan bileşiklerle sağlanabilir.

2.6. Nükleer Eksport

Nükleer eksport, ökaryotik hücrelerde proteinler ve RNA gibi moleküllerin çekirdekten sitoplazmaya taşınma sürecidir. Çekirdek, dış ortamdan ayıran ve nükleer zarf adı verilen çift katmanlı bir zarla çevrilidir. Çift katmanlı zarın perinükleer boşluğunu çevreleyen dış yaprağı granüllü endoplazmik retikulumun lümeni ile devamlılık arz ederken, iç yaprak bazı özel nükleer zarf transmembran proteinlerini içerir. Bu zar, moleküllerin çekirdek ile sitoplazma arasındaki geçişini kontrol eder. Nükleer eksport, taşıma işlemi sırasında belirli taşıma proteinlerine ve sinyal dizilerine ihtiyaç duyan karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin temel yapısı, nükleer zarfı saran ve moleküllerin geçişini denetleyen nükleer por kompleksi (NPK) adı verilen bir protein kompleksidir. NPK, bu taşıma işleminin denetlenmesinde kritik bir rol oynar (77). Nükleositoplazmik taşınım, hücresel işleyişin sürekliliği açısından kritik bir süreç olup, nükleer por kompleksi (NPK) aracılığıyla gerçekleştirilir. Sitoplazmada veya çekirdekte bulunan çeşitli makromoleküller, NPK'ye gömülü özel yapılar olan nükleoporin proteinleri tarafından sıkı şekilde denetlenen seçici bir geçirgenlik sistemi ile taşınır. Bu seçici taşınım, hem nükleer giriş (import) hem de çıkış (eksport) yollarını içerir ve hücre döngüsü, gen ekspresyonu ve sinyal iletimi gibi temel biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde belirleyici rol oynar. Bu taşıma sisteminde özellikle Exportin-1 (XPO1) ya da diğer adıyla CRM1, çekirdekten sitoplazmaya protein ihracında görev alan başlıca eksport reseptörlerinden biridir. XPO1, nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) taşıyan proteinleri tanıyan ve RanGTP ile birlikte bir kompleks oluşturarak bu kargoları sitoplazmaya taşıyan kritik bir adaptördür. XPO1 aracılı taşınım, tümör baskılayıcı proteinlerin (örneğin p53, FOXO, p21) nükleus dışına çıkarılmasını da içerdiğinden, kanser hücrelerinde bu mekanizmanın aşırı aktivasyonu hücre proliferasyonuna katkı sağlayabilir. Bu nedenle XPO1, özellikle kanser biyolojisinde hedefe yönelik tedaviler için önemli bir moleküler hedef olarak değerlendirilmektedir (78).

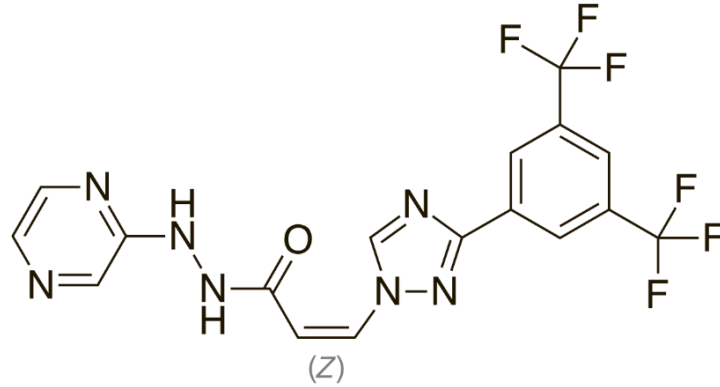


Şekil 5. XPO1, kargo proteinlerini çekirdekten sitoplazmaya taşımasını sağlayan nükleer eksport proteinin şematik görüntüsü (79).

2.7. Selinexor

Selinexor, tümör baskılayıcı proteinlerin ve onkoprotein mRNA'ların nükleustan dışarı çıkmasını inhibe ederek kanser hücrelerinde hücre döngüsünün durdurulmasına ve apoptoza yol açan yeni bir XPO1(nükleer export protein) inhibitörüdür (80). XPO1, tümör baskılayıcı proteinler, glukokortikoid reseptörleri, bağışıklık tepkisi düzenleyicileri ve onkojenik mRNA'lar dahil olmak üzere mRNA'ların ve kargo proteinlerinin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını kolaylaştırır (81). Artan XPO1 ekspresyonunun, çok sayıda katı ve hematolojik malignitede kötü prognozla bağlantılı olduğu görülmüştür ve bu nedenle XPO1 inhibisyonu, kanser tedavisi için umut verici bir hedef olarak takip edilmektedir. Selinexor (KPT-330), XPO1'i inhibe ettiği gösterilen oral bir ajandır ve şu anda hematolojik ve katı malignitelerin tedavisi için klinik çalışmalarda olup umut verici sonuçlar vermektedir (82),(84). Selinexor (eski adıyla KPT-330), multipl miyelomu tedavi etmek için 2020 yılında FDA onayını almıştır (85). Selinexor şu anda multipl miyelomu tedavi etmek için kullanılan bir ilaç olmasına rağmen, etkileyici prelinik çalışmalar selinexor'un sarkom, mide, mesane, prostat, meme, yumurtalık, cilt, akciğer ve beyin kanserleri dahil hematolojik ve hematolojik olmayan malignitelerin tedavisinde etkinliğini ortaya koymaktadır (81). Selinexor,

XPO1'in işlevini bloke ederek, çekirdek içinde spesifik proteinlerin birikmesine neden olarak proteinlerin normal hücresel taşınmasını bozar. Bu yolla taşınan çeşitli tümör baskılayıcı proteinlerin, örneğin p53, p21, BRCA1, adenomatöz polipozis koli (APC), FOXO ve I κ Ba'nın, çekirdekten sitoplazmaya taşınımını engeller. Bu proteinlerin çekirdekte birikmesi, kanser hücresi büyümesi ve hayatta kalması üzerinde ciddi etkileri olan bir dizi hücresel olayı tetikler (86, 87). Selinexor çeşitli hücresel yolları etkileyerek kanser hücresi ölümünü indüklemeyi ve tümör büyümesini engellemeyi amaçlar. Selinexor'un moleküler etkileri, belirli kanser türlerine ve hücresel içeriğe bağlı olarak değişebilir (88, 89). TNBC deneysel modellerinde anti-proliferatif ve anti-tümör etkilerini gösteren çalışmalara rastlanmıştır (80, 89, 90). Selinexor'un XPO1 ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, farklı hormon reseptörlü ve selinexor'a karşı duyarlılık seviyeleri gösteren farklı meme kanseri hücre hatları seçilmiştir. Bunun sonucunda hücreler, farklı (0-800 nM) konsantrasyonlarda selinexor ile 24-72 saat arası boyunca tedavi edildikten sonra analiz edilmiş. XPO1 bantlarının yoğunlukları, ilgili β -aktin bantlarına göre normalize edilerek ölçülmüş. Selinexor tedavisi, tüm hücre hatlarında XPO1 ve survivin seviyelerini düşürdüğü gözlemlendi (80). Selinexor'un özellikle mevcut tedavilerle birlikte çeşitli meme kanserlerinin tedavisinde umut vaat edici olduğu kanısına varılmıştır.



Şekil 6. Selinexor moleküler yapısı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deneyde Kullanılacak Hücreler

Çalışmamızda kullanılacak hücreler MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı ve Raw 264.7 makrofaj hücreleri kullanıldı.

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. Besiyerlerinin hazırlanması

Hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri ve çoğalmalarını sağlayacak ortam sağlamak üzere DMEM (HYCLONE) besiyerine %10 fetal sığır serum (FBS) , %1 penisilin-streptomisin (HYCLONE) ve %1 L-glutamin (HYCLONE) ilave edilerek besiyerleri hazırlandı.

3.2.2. Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması

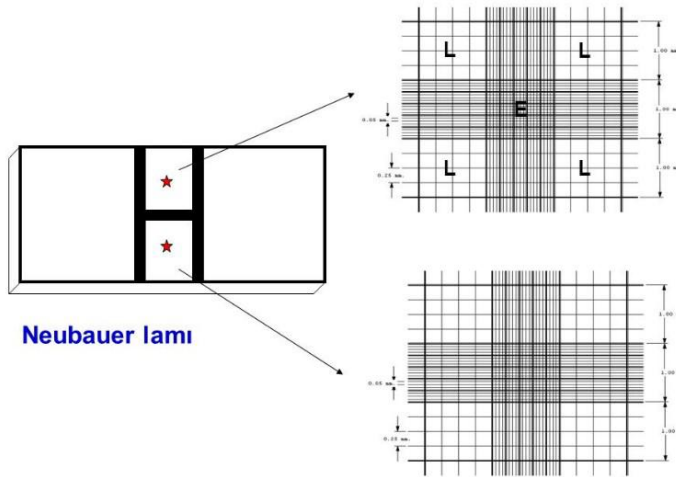
Hücrelerin kültür flaskı yüzeyinin yaklaşık %80'ini kaplamasıyla birlikte pasajlama işlemi gerçekleştirildi. İlk olarak, üstte bulunan eski besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 1x PBS (phosphate buffered saline) ile nazikçe yıkanarak artık besin ve metabolitlerden arındırıldı. Ardından, hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla her bir T75 flaskına 2,5 mL %0,25'lik Trypsin-EDTA (HYCLONE) çözeltisi ilave edildi. Flasklar 37 °C ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde 5 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzer hale geldiği mikroskop altında kontrol edildi, ardından tripsinizasyonu durdurmak için hücre süspansiyonuna 5 mL taze, %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Süspansiyon, 15 mL'lik steril falcon tüplere aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı, elde edilen hücre pelletleri taze besiyeri ile yeniden süspanse edildi. Homojenize edilen hücre süspansiyonu, iki yeni T75 flaskına eşit hacimlerde (10 mL besiyeri içeren) olacak şekilde dağıldı. Flasklar mikroskop altında hücre yoğunluğu açısından kontrol edildi ve daha sonra 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilerek hücrelerin adezyonu ve proliferasyonu için uygun ortam sağlandı.

3.2.3. Hücre sayımı

Trypsinizasyon işlemi ile süspansiyon haline getirilen hücreler, sayım işlemine geçilmeden önce homojenize edildi. Hücre süspansiyonundaki toplam hücre

yoğunluğunu belirlemek amacıyla, canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesini sağlayan Trypan Mavisi (HYCLONE) yöntemi kullanıldı. Bu yöntem doğrultusunda, hücre süspansiyonundan 40 µL alınarak eşit hacimde (%0.4) Trypan mavisi ile karıştırıldı ve karışım Neubauer sayım lamına yüklendi. Lam üzerine örtü lamı yerleştirilerek sayım için hazırlandı. Trypan mavisi, canlı hücre zarının selektif geçirgenliği nedeniyle hücre içine giremezken; zarı bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücrelerin içerisine kolaylıkla difüze olabilir. Bu sayede, boyanmamış hücreler canlı, mavi renkle boyanmış olanlar ise ölü olarak değerlendirildi. Hazırlanan örnek, inverted mikroskop altında incelenmiş ve sayım dört büyük karede (her biri 1 mm²) yapıldı. Sayım sonuçları kullanılarak oransal değerlendirme ile süspansiyon içerisinde mililitre başına düşen toplam hücre sayısı hesaplandı. Bu aşamada yalnızca canlı hücre sayısı dikkate alınarak, sonraki kültürleme ya da deneysel uygulamalar için uygun hücre yoğunluğu belirlendi.

Canlı hücre sayısı = Sayılan hücre x 2 (dilüsyon faktörü) x 10⁴



Şekil 7. Hücre sayımı yapılırken kullanılan, Neubauer lam görüntüsü.

3.2.4 Sitotoksisite analizi

Selinexor (TERGETMOL) MDA-MB-231 hücre hatları ve raw 264.7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini görmek ve hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyon değerini (IC50) belirlemek amacıyla sitotoksisite CCK-8 analizi yapıldı. CCK8 testi, selinexorun hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanıldı. Bu test, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi ölçmedeki yüksek duyarlılığı ve verimliliği nedeniyle seçildi. MDA-MB-231 hücre hatları ve raw 264.7 makrofaj

hücrelerini logaritmik olarak artan ilaç konsantrasyonuna maruz bıraktıktan sonra her bir kuyucuktaki optik yoğunluğu (OD) 450 nm'de ölçüldü. Hücreler 96 kuyulu bir plakaya ekildi ve selinexor'a (0, 20, 40, 80, 160, 240 µM) maruz bırakıldı. İlaç içeren ortam 24 saat inkübatörde bekletildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından her kuyuya 10 µl CCK8 solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 1-4 saat inkübe edildi. OD okumasını engellediği için kuyulara kabarcık girmemesine dikkat edildi. Plakayı okumadan önce, homojen renk dağılımına bakıldı. Göreceli inhibisyon oranını hesaplamak için 450 nm'deki OD değeri ölçüldü. Mikroplaka okuyucu kullanarak 450 nm'de absorbansta ölçüldü. Hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = ((\text{Örnek} - \text{Boş}) / (\text{Kontrol} - \text{Boş})) \times 100$$

3.2.5 Yara modeli

Hücreler MDA-MB-231 hücre hattında, selinexor'un hücre göçü üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yara iyileşme modeli kullanıldı. Hücreler, 24 kuyulu plakalara her kuyuya yaklaşık 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekildi ve %100 konfluens sağlayana kadar inkübe edildi. Daha sonra hücreler, steril 200 µL'lik pipet ucu ile her bir kuyunun ortasından tek çizgi halinde çizilerek hücresiz bir alan (yara) oluşturuldu. Ardından her kuyu 1 kez PBS ile yıkanarak hücre döküntüleri uzaklaştırıldı. Kurduğumuz deney gruplarına, DMSO ile çözülmüş selinexor ilaç çözeltisi eklendi. Deney grupları; kontrol (serumlu besiyeri), IC50 değeri olan 51.90 µM selinexor olacak şekilde düzenlendi. Daha sonra serumlu DMEM ortamı ile birlikte toplam 500 µM olacak şekilde ortam eklendi. Sıfırinci saat (t=0) görüntüleri, faz-kontrast mikroskop kullanılarak kayıt altına alındı. Hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 0, 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. Aynı bölgeler tekrar görüntülenme sağlandı. Scratch alanları, ImageJ yazılımı ve "Wound Healing Tool" eklentisi kullanılarak ölçüldü; yara alanındaki kapanma oranları $\% ((A_0 - A_t) / A_0) \times 100$ formülü ile hesaplandı.

A_0 = Yaranın başlangıçtaki (sıfırinci saat) açık alanı

A_t = Belirli bir sürede (örneğin 24. saat) kalan yara açıklık alanı

3.2.6 Koloni oluşturma deneyi

Koloni oluşturma deneyi kanserli hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin etkilenip etkilenmediğinin tespiti için yapılan bir deneydir. 6'lık well plate'lere her grup için 1000 hücre ekildi besiyeri eklenerek inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda ertesi

gün taze besiyeri ile değişim yapıldıktan sonra deney grubuna MDA-MB 231 hücre hatlarının deney gruplarına belirlenen dozda selinexor uygulaması yapılan hücreler hücreler 14 gün inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkanarak %0,4 PFA ile 10 dakika fikse edildi. Daha sonra 2-3 defa distile su ile yıkandı. Boyama yapmak için, %0,1'lik crystal violet solüsyonu hazırlandı. Bunun için, 0,05 gr crystal violet hassas terazi ile tartılarak 2,5 mL etil alkol (%100'lük) eklendi. 17,5 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Her kuyucuğa 2 mL boya koyulduktan sonra 5 dk bekletildi ve 2 defa distile su ile yıkandı. Boyanan hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri pixel ölçümleri karşılaştırılarak Image J (Colony Count J) yazılımı ile değerlendirildi.

3.2.7 Makrofaj polarizasyonu

Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin M1 ve M2 polarize makrofajlara dönüşümünü indüklemek için hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına $2,5 \times 10^5$ hücre ekildi. Ekimden 1 gün sonra hücrelerin besiyeri çekilip M1 indükdiyonu için LPS (200 ng/ml) ve IFN- γ (50ng/ml) 2,5 mL besiyeri ile içerisinde hazırlanıp makrofaj hücrelerine verildi. M2 indüksiyonu için ise IL-10 (20 ng/ml) 2,5 mL besiyeri içerisinde hazırlanıp hücrelere verildi. Hücreler iki gün boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında kültürlendi. Daha sonra polarizasyonun başarılı olup olmadığını teyit etmek amacı ile M1 ve M2 makrofajlar için yüzey belirteci olan CD-64 (ELABSCIENCE) ve CD-164 (ELABSCIENCE) RT-qPCR ile değerlendirildi.

3.4 RT-qPCR Yöntemi ile Makrofaj Polarizasyonun Belirlenmesi

RNA izolasyonu için İnkübasyon sonrasında üç tekrarlı olacak şekilde M0, M1 ve M2 hücreleri hücre kazıyıcı işlemiyle toplandı ve her bir örnek için 1×10^6 olacak şekilde sayıldıktan sonra, soğutmalı santrifüjde 1000 rpm +4 1°C'de 5 dk santrifüjlendi. Ardından 2 defa 1 ml PBS ile yıkanarak tüm süpernatant uzaklaştırıldı. M0, M1 ve M2 örnekler RNA izolasyonu için hücre peletinin üzerine 1 mL lysis buffer eklendi ve pipetaj yapıldı. Daha sonra ependorfa alındı. 5 dk oda ısısında inkübasyon edildikten sonra 12.000 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant ayrı ependorfa alındıktan sonra 200 μ L kloroform eklendi ve pipetaj yapıldı 2 dk oda ısısında bekletildikten sonra 12.000 g'de +4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra üst faz alınıp ayrı tüpe konuldu aynı miktarda binding buffer eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra kitin içinde bulunan spin columna alındı ve 11.000 g'de +4 °C'de 10 sn santrifüj edildi. Tek örnek için 45 μ L üç örnek için 135 μ L DNASE 1 buffer, tek örnek için 5 μ L

üç örnek için 15 µL DNASE 1 ependorta mix hazırlandı. Örneklerin üzerine (M0, M1 ve M2) 50 µL mix eklendi ve 15 dk boyunca oda ısısında bekletildi. Daha sonra örneklerin üzerine 500 µL wash 1 buffer eklendikten sonra 11.000 g'de 30 sn santrifüj edildikten sonra tüpün altında kalan sıvı boşaltıldı ve her bir örneğe 500 µL wash 2 buffer eklenip 14.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu işlen iki kere yapıldı. Yeni hazırlanan ependorf tüplerine spin columlar alındı ve ve örneklerin üzerine 100 µL olacak şekilde elution buffer eklenip 11.000 g'de 2 dk santrifüj edildi ve RNA hazır hale geldi. RNA miktarını analiz etmek için Thermo scientific multiskan skyhigh cihazı kullanıldı.

RNA örneklerinden cDNA sentezi için her bir örnek için 1 µg RNA alınıp, üretici firmanın protokolüne uygun olarak Solis BioDyne SOLIScript® RT cDNA Synthesis Kit (Solis BioDyne, Estonya) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir reaksiyon için 20 µL'lik toplam hacimde karışım hazırlandı. Reaksiyon karışımı; 0.1–1 µg arasında değişen toplam RNA, 10× RT Reaction Buffer, oligo(dT) primer, dNTP karışımı, SOLIScript Reverse Transcriptase enzimi ve üzerine nülease free water eklenecek şekilde mix hazırlandı. RNA örnekleri, ters transkripsiyon öncesinde 25 °C'de 10 dakika inkübe edilerek ikincil yapıların çözülmesi sağlandı ve ardından hızla buz üzerine alındı. Ters transkripsiyon reaksiyonu için Rotor-Gene Q cihazına aktarıldı ve 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 5 dakika süreyle yürütüldü ve ardından enzimin inaktivasyonu için 85 °C'de 5 dakika en sonda +4 °C'de inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri, RT-qPCR kullanılmak üzere +4 °C'de bekletildi.

Çalışma kapsamında üç deney grubuna ait (M0, M1 ve M2) mRNA gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, ters transkripsiyon ile sentezlenen cDNA örnekleri GAPDH geni referans gen olarak kullanıldı. RT-qPCR'da kullanılacak gen ekspresyonları için kullanılacak reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları tablo 1'de verildi. Amplifikasyon reaksiyonları, üretici firmanın önerilerine uygun olarak qPCR cihazında döngü koşulları altında tablo 2'de verildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 1. RT-qPCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
SYBR Green Reaksiyon Karışımı	4 µl
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl
cDNA	2 µl
ddH ₂ O	13 µl
Total	20 µl

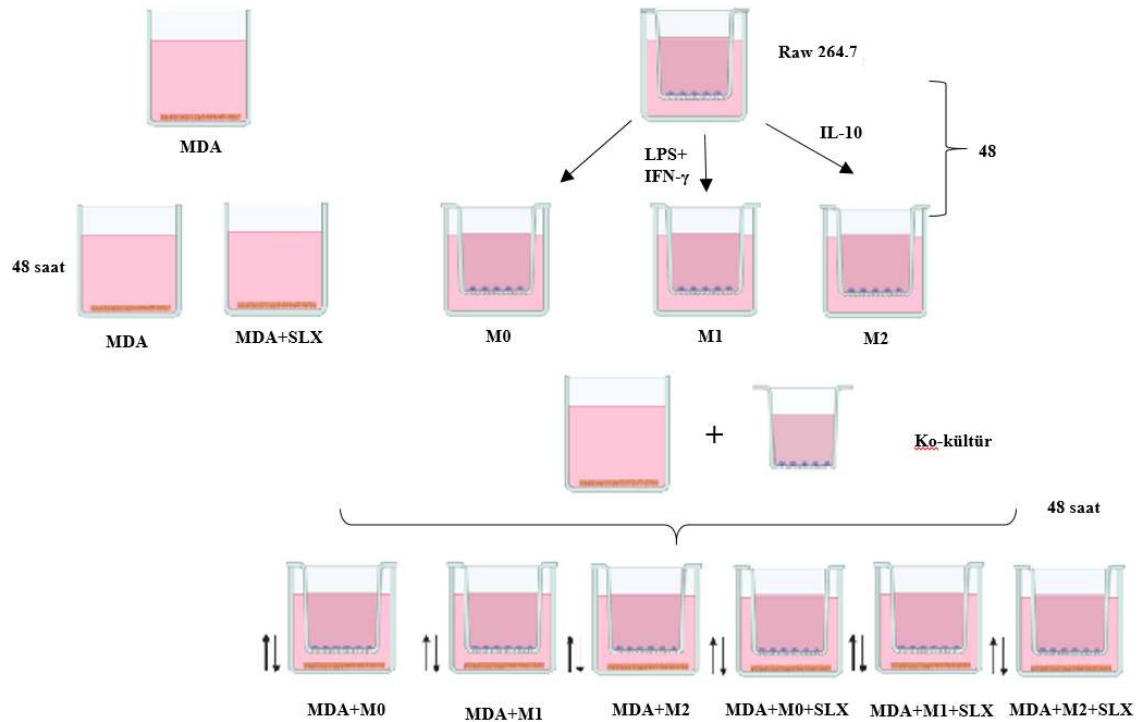
Tablo 2. RT-qPCR döngü aşamaları

Bileşenler	Derece	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denaturation	95 °C	10 saniye	40
Yapışma	60-65 °C	20 saniye	
Uzama	72 °C'	20 saniye	
Melt curve analysis	60-95 °C	various	1

3.5 Ko-Kültür

Raw 264.7 hücrelerinin M1 ve M2 makrofajlara polarizasyonu sağlandıktan sonra, MDA-MB-231 hücreleri ile ko-kültür deneylerine geçildi. İki farklı hücre tipinin aynı ortamda ancak doğrudan temas olmadan birlikte yaşamasını sağlayan, alt ve üst odacıkları 0.4 µm çapında gözeneklere sahip poröz membranla ayrılmış özel tasarlanmış 24 kuyucuklu ko-kültür plakaları (transwell sistem) kullanıldı. Öncelikle, Raw 264.7 fenotipindeki makrofajlar 24 saat süreyle inkübasyona alındı. Bu sürenin ardından: M1 makrofaj polarizasyonu için hücreler %10 FBS içeren farklılaşma besiyeri (DMEM) içerisinde 20 ng/mL IFN-γ ve 20 ng/mL LPS ilavesiyle 24 saat inkübe edildi. M2

makrofaj polarizasyonu için ise aynı başlangıç koşullarındaki M0 hücreleri, %10 FBS içeren farklılaşma besiyeri içerisinde 20 ng/mL IL-10 ilavesiyle 48 saat inkübasyona bırakıldı. Polarizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, M1 ve M2'ye farklılaşmış hücrelerinden her bir üst odacığa 3×10^4 hücre eklenerek ko-kültür sistemleri hazırlandı. Makrofajların ko-kültüre alınmasından 1 gün önce, alt odacıklara 5×10^4 MDA-MB-231 hücresi ekilerek 24 saat boyunca adezyonlarının sağlanması beklendi. Ardından, üst ve alt odacıklar birleştirilerek ko-kültür ortamı oluşturulmuş ve %1 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penicillin/streptomycin içeren DMEM ortamında inkübasyona alındı. Ko-kültür modelinin oluşturulmasının ardından, sitotoksik etkisi daha önce belirlenmiş olan Selinexor'un IC_{50} konsantrasyonları ($51,90 \mu M$) hem ko-kültür plakalarının alt odacıklarındaki MDA-MB-231 hücrelerine hem de tek başına kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerine uygulandı. İlaç uygulamasından sonra hücreler 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 3.6'da anlatıldığı gibi ICC için deneye başlandı (Şekil 8).



Şekil 8. Raw 264.7 makrofaj hücrelerinden M1 ve M2 makrofaj polarizasyonu ve MDA ko-kültür yönteminin şematik olarak gösterilmesi

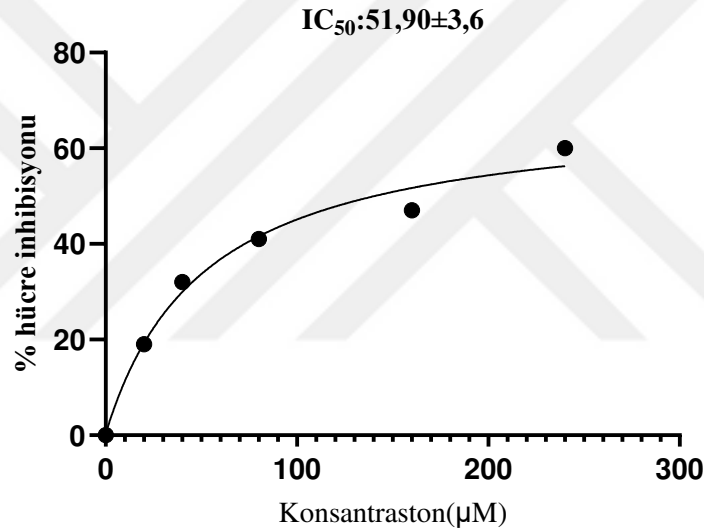
3.6. İmmünohistokimyasal (ICC) Boyama

İndirekt immünohistokimyasal (ICC) boyama için 24 kuyucuklu hücre kültür plağının her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücreler, 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübasyon koşullarında 24 saat boyunca inkübe edildi (ESCO, CCL-170B-8). İnkübasyon süresinin sonunda besiyerleri uzaklaştırılarak hücelere fiksasyon için %0,4'lük paraformaldehit (PFA) (ELABSCIENCE) uygulandı ve bu işlem 10 dakika sürdü. Fiksasyonun ardından, hücreler üç kez PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi hücelere 10 dakika süreyle uygulandı ve ardından tekrar üç kez PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Permeabilizasyon işlemi için %0,1'lik TritonX solüsyonu hazırlandı ve hücelere 15 dakika süreyle uygulandı. Bu işlem tamamlandıktan sonra hücreler üç kez daha PBS ile yıkandı. Bloklama işlemi için bloklama solüsyonu hücelere eklendi ve 10 dakika boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Bloklama solüsyonunun uzaklaştırılmasının ardından yıkama yapılmadan, primer antikorlar hücelere eklendi. Kullanılan primer antikorlar vimentin (Affinity Biosciences), E-kaderin (Affinity Biosciences) ve N-kaderin (Affinity Biosciences) olarak belirlendi. Primer antikorlarla hazırlanan hücreler $+37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücreler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra ticari kitin biotinli sekonder antikor solüsyonu 10 dakika süreyle uygulandı ve ardından tekrar üç kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Devamında, kit içerisinde bulunan streptavidin peroksidaz eklenerek hücreler oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edildi. Bu aşama tamamlandıktan sonra yine üç kez PBS ile yıkama yapıldı. İmmünoreaktiviteyi gözlemek amacıyla hücreler Diaminobenzidin (DAB) (ELABSCIENCE) ile bir dakika süreyle boyandı. DAB boyamasının ardından, hücelere 5 dk boyunca Hematoksilen uygulandı ve distile su ile yıkama işlemi yapıldı. Lamlar, kontrol ve deney gruplarına uygun şekilde isimlendirildi ve hücre plakalarından çıkarıldıktan sonra mounting medium ile kaplandı. Hazırlanan lamlar, kamera entegreli ışık mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1 Selinexor'un MDA-MB-231 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

MDA-MB-231 hücreleri, selinexor'un farklı konsantrasyonları (20, 40, 80, 160, 240 nM) üç tekrarlı olacak şekilde hücre hattına uygulandı ve 48 saat süreyle muamele edildi. Hücre canlılık oranları CCK-8 testi ile değerlendirildi, elde edilen verilere göre doz arttıkça canlılığın azaldığı gözlemlendi. Hücre canlılık verileri doğrultusunda yapılan non-lineer regresyon analizine göre, Selinexor'un MDA-MB-231 hücre hattına %50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri IC_{50} değeri $51,90 \mu M$ Graphpad Prism 10.6.1 analiz programı kullanılarak hesaplandı (Şekil 9).

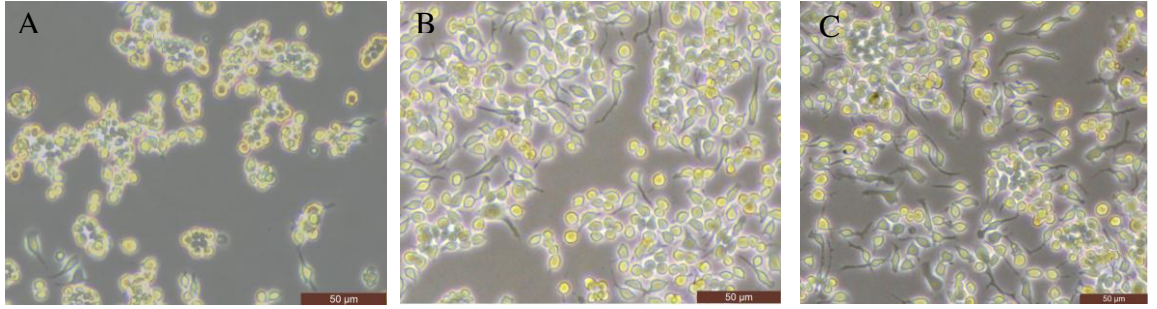


Şekil 9. MDA-MB-231 hücre hattı Selinexor'un IC50 grafiği

4.2. Raw 264.7 hücrelerinin M1 ve M2 Makrofajlara Polarizasyonu

RAW 264.7 hücrelerinin polarizasyonu sonrasında, hücre morfolojilerinde fenotipe özgü farklılıklar gözlemlendi. M0 fenotipindeki hücreler genellikle yuvarlak veya hafif oval şekilli olup, kültür yüzeyine homojen olarak dağılmış ve kompakt bir morfoloji sergilendi (Resim 1A). IFN- γ (20 ng/mL) ve LPS (20 ng/mL) uygulamasıyla M1 makrofajlarda dentrik yapılar görülmektedir (Resim 1B). IL-10 (20 ng/mL) uygulaması ile elde edilen M2 makrofajlar ise M1 makrofajlarına kıyasla uzamış morfolojiler sergilemiştir. M2 makrofajlarda belirgin fibroblastik morfoloji benzeri yapılar gözlemlenmekte (Resim 1C). Elde edilen bu morfolojik bulgular, RAW 264.7

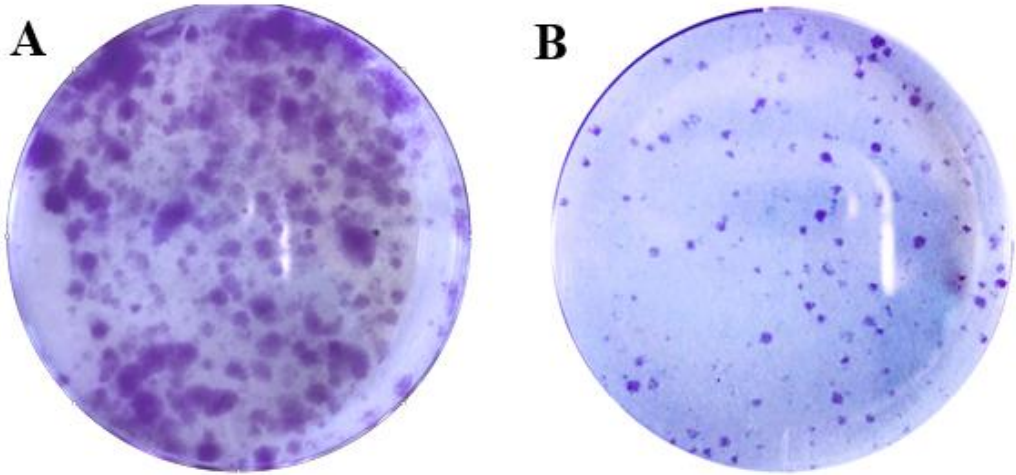
hücrelerinin fenotipik olarak başarılı bir şekilde M1 ve M2 makrofaj alt tiplerine polarize edildiğini göstermektedir.



Resim 1. M0 makrofajlarının , LPS ve IFN γ sitokinleriyle M1 ve IL-10 sitokinleriyle M2 polarizasyon gerçekleştirilen makrofajların kültür sürecindeki morfolojik değişikliklere ait görüntüleri: (A) M0 makrofaj, B) M1 makrofaj, C) M2 makrofaj, ölçek çubuğu: 50 μ m.

4.3. Koloni oluşturma deneyi bulguları

MDA-MB-231 hücrelerinde Selinexor'un uzun dönemli proliferasyon üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla koloni oluşum analizi gerçekleştirildi. Kontrol grubunda hücrelerin yoğun şekilde koloni oluşturduğu gözlemlendi (Resim 2A). Selinexor uygulaması sonrasında ise koloni sayısı ve büyüklüğünde belirgin bir azalma izlenmiştir (Resim 2B).

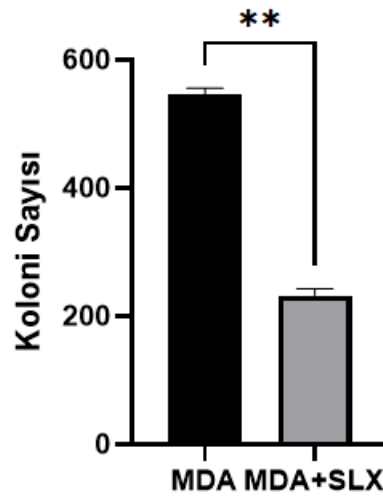


Resim 2. MDA (A) ve MDA-MB-231+SLX (B)

Doz yanıt analizine göre, Selinexor'un MDA-MB-231 hücrelerinde IC_{50} değeri 51.90 μ M olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinin anlamlı biçimde azaldığı tespit edildi. Elde edilen bulgular, Selinexor'un MDA-MB-231

hücre hattında koloni oluşturma kapasiteyi inhibe ederek hücrelerin uzun süreli çoğalma potansiyelini azalttığını göstermektedir.

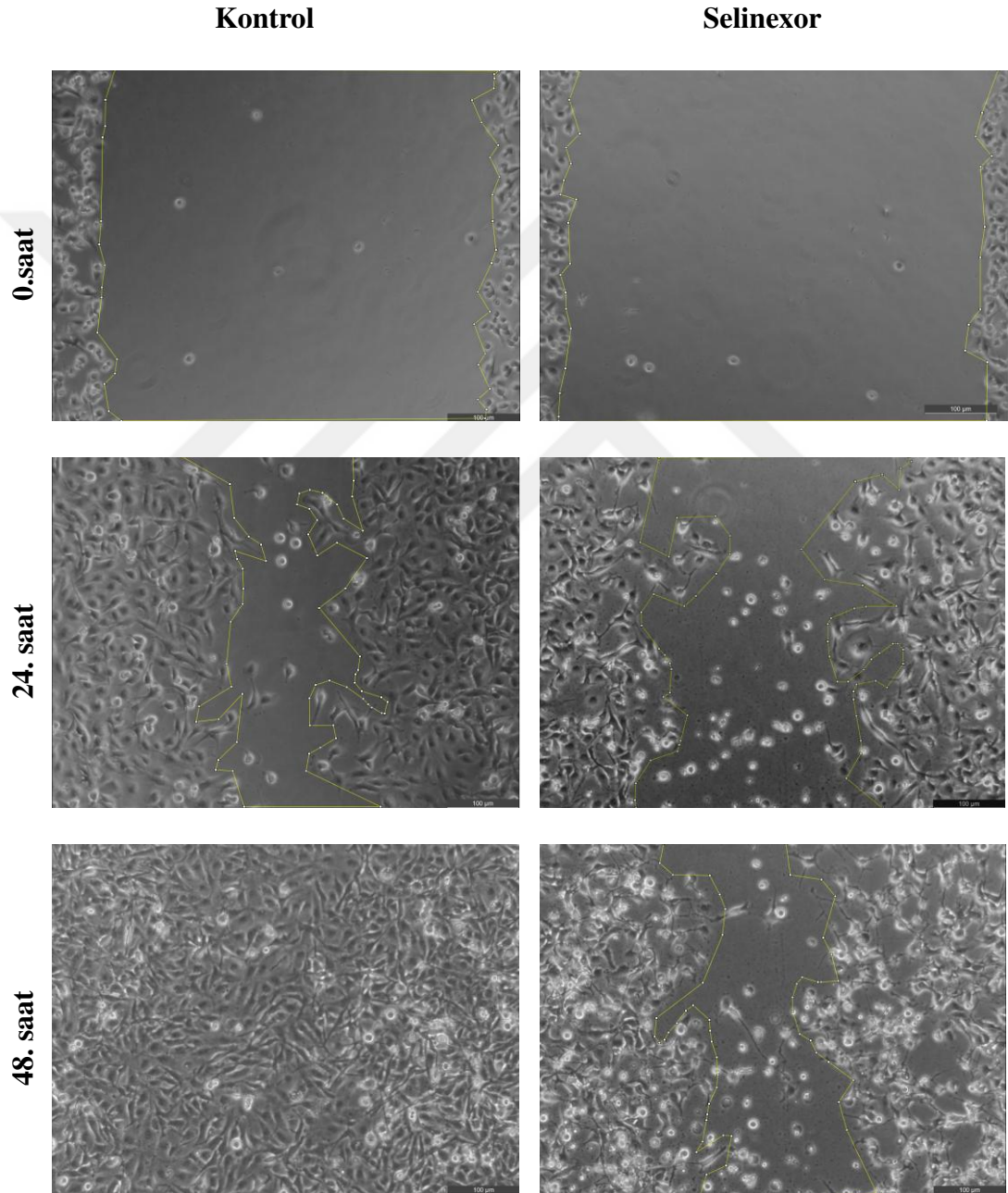
Koloni alanları ImageJ yazılımı kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. Yapılan ölçümler, MDA+SLX deney uygulamasının MDA grubuna kıyasla koloni alanında anlamlı bir azalmaya yol açtığını gösterdi (Resim 2B). Aynı zamanda MDA+SLX grubuyla MDA kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu (Şekil 14).



Şekil 10. MDA ve MDA+SLX istatistiksel sonuçlar

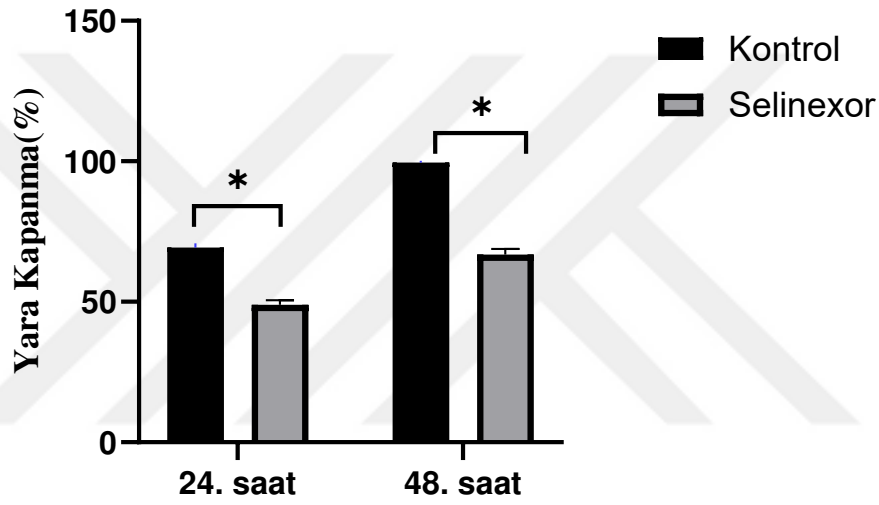
4.4. Selinexor inhibitör maddesinin MDA-MB-231 kanser hücresinde *in vitro* yara kapanma potansiyeli

Selinexor inhibitör maddesinin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki invazif özelliklerinin ve migrasyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla *in vitro* yara kapanma deneyi yapılmıştır. Selinexor'un, oluşturulan suni yaralar üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla belirli saatler aralığındaki (0,24,48 saat) mikroskop görüntüleri (Resim 3) incelenmiştir ve yara modeli Image J programı kullanılarak hesaplama yapılmıştır.



Resim 3. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan Selinexor inhibitörün oluşturulan yara modelin zamana bağlı kapanma etkisini gösteren mikroskop görüntüleri (ölçek: 100 µm)

Oluşturulan yara modellerinde 24 saat sonra MDA kontrol grubundaki yara modelinin MDA+ SLX ile kıyaslandığında %70,34 seviyesinde kapandığı gözlemlenirken, Selinexorun uygulandığı MDA kanser hücresinde ise %50,14 seviye kapanma gözlemlendi. Kontrol grubunun 48.saatinde yara kapanması %100 seviyesine ulaşırken, Selinexor uygulanan grupta ise %70,41 seviyesinde kapanma gözlemlendi. Sonuç olarak, Selinexor inhibitörün MDA-MB-231 hücrelerinin invazif ve migrasyonunu ciddi anlamda baskıladığı gözlemlendi (Resim 3). Bu bulgular MDA grubuyla MDA+SLX grubu kıyaslandığında, istatistiksel olarak yara kapanmada anlamlı azalma bulundu (Şekil 15).

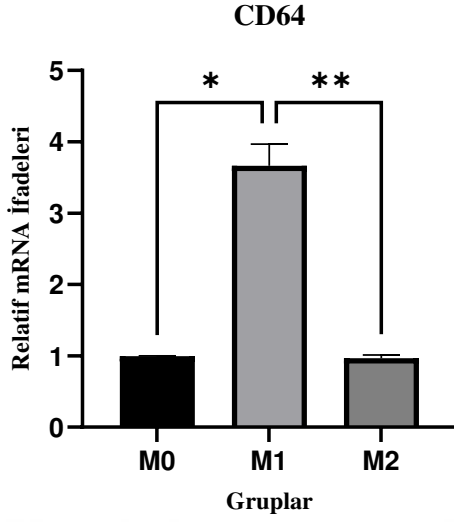


Şekil 11. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının kontrol ve MDA-MB-231+Selinexor uygulanmasının ardından, migrasyon yüzdelere ait sonuçlar

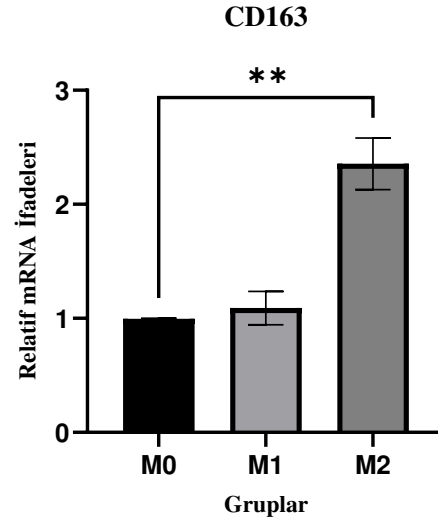
4.5. M0 Makrofajın M1/M2 Polarizasyonun RT-qPCR ile Değerlendirilmesi

M0, M1 ve M2 makrofajların farklılaşmasını teyit etmek amacıyla bazı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerini gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile belirlendi. M0 makrofajların LPS ve IFN- γ etkisiyle M1 fenotipe ve IL-10 etkisi ile M2 fenotipe indüklenmesi spesifik yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarının RT-qPCR ile incelenmesiyle kanıtlandı. Bu amaçla makrofajlar için spesifik olarak M1 için CD64 ve M2 için CD163 analiz edilip sonucu doğrulandı (Şekil 10).

A.



B.



Şekil 12. LPS ve IFN- γ ile indüklenmiş makrofajların M1 (CD64) ve IL-10 ile indüklenmiş makrofajların M2 (163) için gen ekspresyon grafiği.

M0 makrofajların M1 fenotipine polarizasyonu için LPS ve IFN- γ ile, M2 fenotipine polarizasyonu için ise IL-10 ile uyarım yapıldı. M1 fenotipi CD64, M2 fenotipi ise CD163 belirteçleri ile doğrulanmıştır. 48 saatlik inkübasyondan sonra M0, M1 ve M2 makrofajların gen ekspresyonu incelendi. M1 fenotipine özgü belirteç analizlerinde yapılan testte, M1 grubunda CD64 ekspresyonunun anlamlı şekilde yükseldiğini gösterildi (M0 vs. M1, $p = 0.03$). Buna karşılık M0 ile M2 arasında anlamlı bir fark tespit edildi (M0 vs. M2, $p > 0.99$), ancak M1 ile M2 arasında belirgin bir farklılık bulunmaktadır (M1 vs. M2, $p = 0.002$). Bu sonuçlar, CD64'ün M1 makrofaj fenotipine özgü proinflatuar bir belirteç olduğunu ve M1 polarizasyonu ile birlikte ekspresyonunun arttığını gösterildi. Buna karşılık, M2 koşullarında CD64 ekspresyonu kontrol grubu (M0) ile benzer düzeyde kalmıştır (Şekil 10. A). M2 belirteci olan CD163 geninin ekspresyon düzeyi M2 grubunda anlamlı biçimde artmış (M0 ve M2, $p = 0.001$). M0 ile M1 grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlendi (M0 ve M1, $p = 0.76$), ancak M1 ile M2 grupları arasındaki fark sınırda anlamlı bulundu (M1 ve M2, $p = 0.05$). Bu sonuçlar, CD163'ün M2 makrofaj fenotipine özgü bir anti-inflatuar belirteç olduğunu ve M2 polarizasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler M2 grubunda CD163 geninin anlamlı artışıyla birlikte anti-inflatuar fenotipin baskın hale geldiğini, M1 grubunda ise bu yanıtın sınırlı olduğunu göstermektedir (Şekil 10. B).

4.6. Ko-Kültür Modelinde EMD Belirteçlerinin ICC Yöntemiyle Değerlendirilmesi

4.6.1. Vimentin

MDA-MB-231 hücreleri ve farklı fenotipteki makrofajların oluşturduğu ko-kültür modellerinde Selinexor uygulamasının ardından hücre morfolojisi ve immünohistokimyasal belirteç ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlemlendi. MDA hücresinde kontrol grubunda hücreler tipik epitelyal özelliklerini koruyarak poligonal şekilli, sık yerleşimli ve belirgin hücre-hücre bağlantılarına sahip bir morfoloji sergilemiştir ve vimentin ekspresyonu belirgindir (Resim 4A).

MDA ve M0 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerin morfolojilerinde kısmi bir değişim gözlemlenmiştir; hücreler MDA grubuna göre daha düzenli ve epitelyal benzeri bir görünüm sergilemiştir. Bu grupta vimentin ekspresyonunun MDA grubuna kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir olup (Resim 4B), bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 11.A). Bu durum M0 makrofajlarının sınırlı düzeyde EMD baskılayıcı etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MDA ve M1 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda hücrelerin daha epitelyal morfoloji kazandığı, hücre sınırlarının belirginleştiği gözlemlendi. Bu grupta vimentin ekspresyonu azaldı (Resim 4C). MDA grubu ile kıyaslandığında da bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 11.A). M1 fenotipindeki makrofajların anti-tümöral etkileriyle EMD sürecini geriletmediğini düşündürmektedir.

MDA ve M2 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda hücrelerin uzamış, iğsi ve dağınık bir morfoloji sergilediği gözlemlendi. Vimentin ekspresyonu bu grupta yüksek düzeyde gözlemlendi. Bu bulgu, M2 fenotipli makrofajların EMD'yi destekleyici ve invaziv davranışı artırıcı rolünü göstermektedir (Resim 4D). MDA grubuna kıyasla MDA+M2 grubundaki vimentin ekspresyon artışı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 11.A).

MDA ve Selinexor uygulaması sonrasında hücrelerin daha kompakt ve düzensiz bir morfoloji kazandığı, uzantıların azaldığı gözlemlendi ve vimentin ekspresyonunda azalma saptandı (Resim 4E). Bu azalma MDA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 11.C). Bu bulgu, Selinexor'un EMD sürecini baskılayarak hücrelerin daha epitelyal fenotipe dönüşümünü desteklediğini göstermektedir.

MDA ve M0 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında, hücrelerin daha kompakt hale geldiği, uzantıların belirgin şekilde azaldığı ve hücre-hücre bağlantılarının güçlendiği görülmüştür. MDA+M0 grubuna kıyasla Vimentin

boyanma yoğunluğunda belirgin bir azalma saptandı (Resim 4F) ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 11.C). Aynı zamanda MDA+SLXR grubu ile yapılan kıyaslamada da vimentin ekspresyonu anlamlı olarak azaldı (Şekil 11.B).

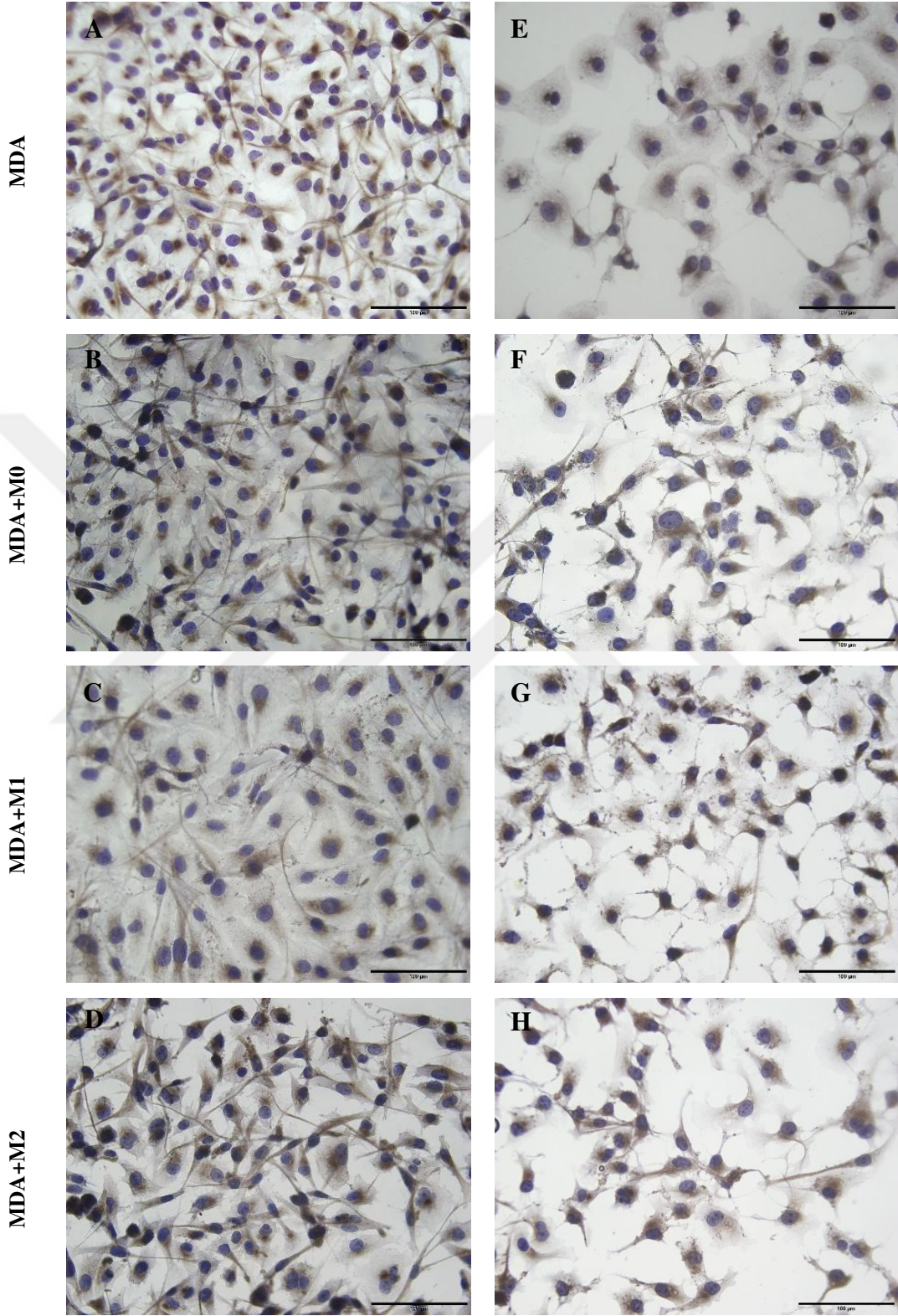
MDA ve M1 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında hücrelerin daha düzenli ve yuvarlak yapıya dönüştüğü, mezenkimal uzantıların kaybolduğu ve vimentin ekspresyonunun en düşük seviyeye indiği belirlendi (Resim 4G). MDA+M1 grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmektedir (Şekil 11.C). MDA+SLXR grubu ile kıyaslandığında da MDA+M1+SLXR grubunda vimentin ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 11.B).

MDA ve M2 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında ise hücrelerin kısmen toparlandığı, uzantıların azaldığı ancak mezenkimal özelliklerin tamamen ortadan kalkmadığı görülmüştür. MDA+M2 grubuna kıyasla Vimentin boyanma yoğunluğu azalmış (Resim 4H) ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 11.C). MDA+SLXR grubu ile yapılan kıyaslamada da vimentin ekspresyonu anlamlı olarak azaldı (Şekil 11.B).

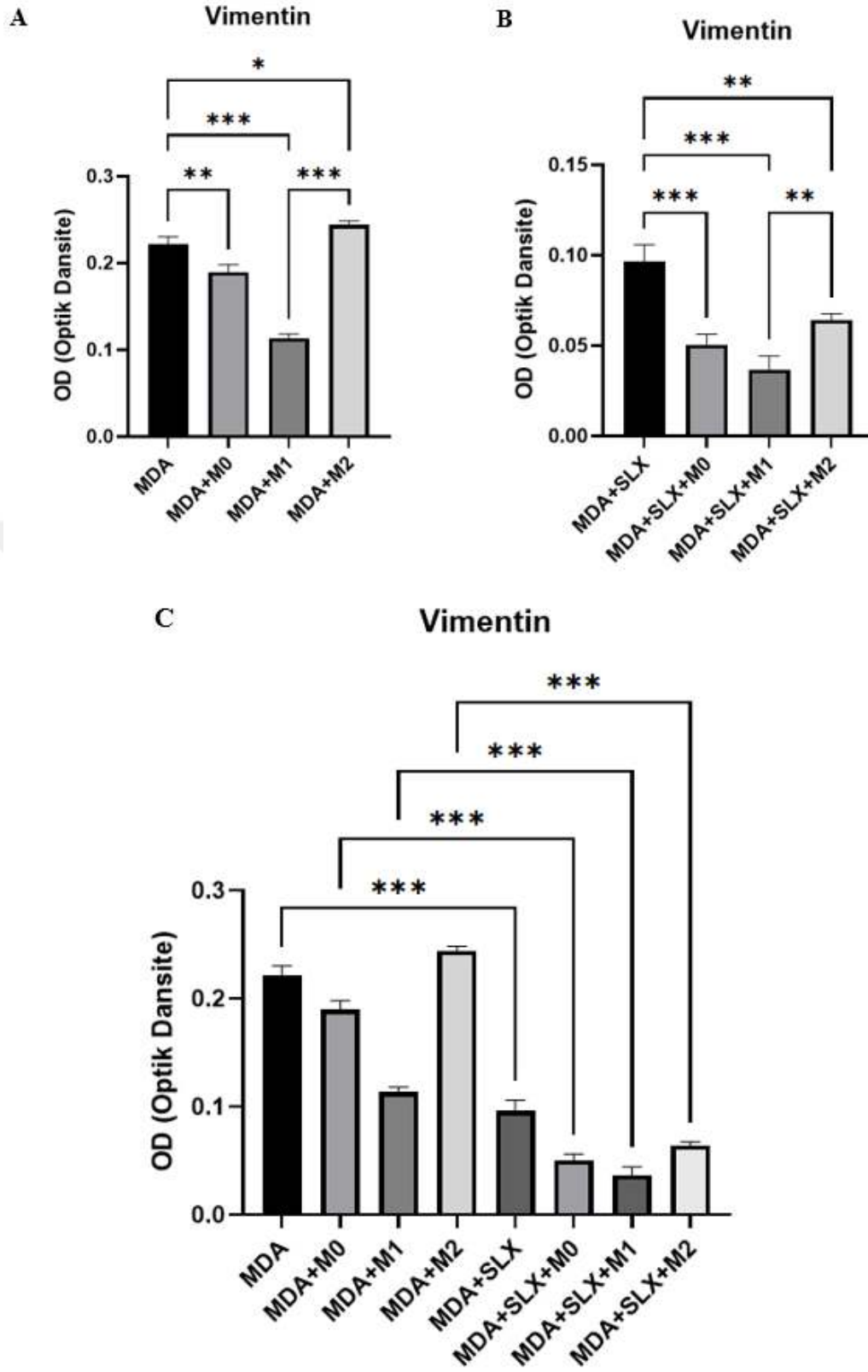
Sonuç olarak Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında (MDA+M0+SLX, MDA+M1+SLX ve MDA+M2+SLX) vimentin ekspresyonunun selinexor uygulanmayan gruplara kıyasla anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 11.C)

VİMENTİN

+ SELİNEXOR



Resim 4. MDA-MB-231 hücresinin, M0, M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin ve Selenexor ile Ko-kültür yapılarak ICC ile değerlendirilmesi



Şekil 13. MDA hücrelerinin M0, M1 ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüründe vimentin ekspresyonunun kıyaslanması (A), MDA ile Makrofaj hücrelerinin Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında vimentin ekspresyonu (B). Selinexor uygulanan ve uygulanmayan ko-kültür gruplarda vimentin ekspresyonunun kıyaslanması (C).

4.6.2. N-Kaderin

MDA-MB-231 hücreleri ve farklı fenotipteki makrofajların oluşturduğu ko-kültür modellerinde Selinexor uygulamasının ardından hücre morfolojisi ve immünohistokimyasal belirteç ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlemlendi. MDA hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun yüksek olduğu gözlemlendi (Resim 5A).

MDA ve M0 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda N-kaderin ekspresyonunun MDA grubuna kıyasla hafif düzeyde azaldığı gözlemlenmiş olup (Resim 5B), bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 12. A).

MDA ve M1 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda hücrelerin daha epitelyal morfoloji kazandığı, hücre sınırlarının belirginleştiği gözlemlenmiştir. Bu grupta N-kaderin ekspresyonu azalmıştır (Resim 5C). MDA grubu ile kıyaslandığında da bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 12.A). M1 fenotipindeki makrofajların anti-tümöral etkileriyle EMD sürecini geriletmediğini düşündürmektedir.

MDA ve M2 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda hücrelerin iğsi uzantılarının arttığı ve N-kaderin ekspresyonunun belirgin biçimde yükseldiği saptandı ve M2 makrofajlarının EMD'yi destekleyici bir mikroçevre oluşturduğunu göstermektedir (Resim 5D). MDA grubuna kıyasla MDA+M2 grubundaki N-kaderin ekspresyonu artışı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 12.A).

MDA hücrelerine Selinexor uygulaması sonrasında hücrelerin sayısının azaldığı ve düzensiz bir morfoloji kazandığı gözlemlendi aynı zamanda N-kaderin ekspresyonunda azalma izlendi (Resim 5E). Bu azalma MDA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 12.C). Bu bulgu, Selinexor'un EMD sürecini baskılayarak hücrelerin epitelyal fenotipe dönüşümünü desteklediğini göstermektedir.

MDA ve M0 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında, uzantıların azaldığı ve hücre-hücre bağlantılarının az da olsa güçlendiği görülmüştür. MDA+M0 grubuna kıyasla N-kaderin ekspresyonunun azalma saptandı (Resim 5F) ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 12.C).

MDA ve M1 makrofajlarıyla ko-kültüre edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında N-kaderin ekspresyonunun azaldığı ve hücrelerin epitelyal fenotipe yöneldiği görüldü (Resim 5G). MDA+M1 grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak N-kaderin ekspresyonunda anlamlı azalma gözlemlendi (Şekil 12.C). MDA+SLX grubu ile

kıyaslandığında da MDA+M1+SLX grubunda N-kaderin ekspresyonundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 12.B).

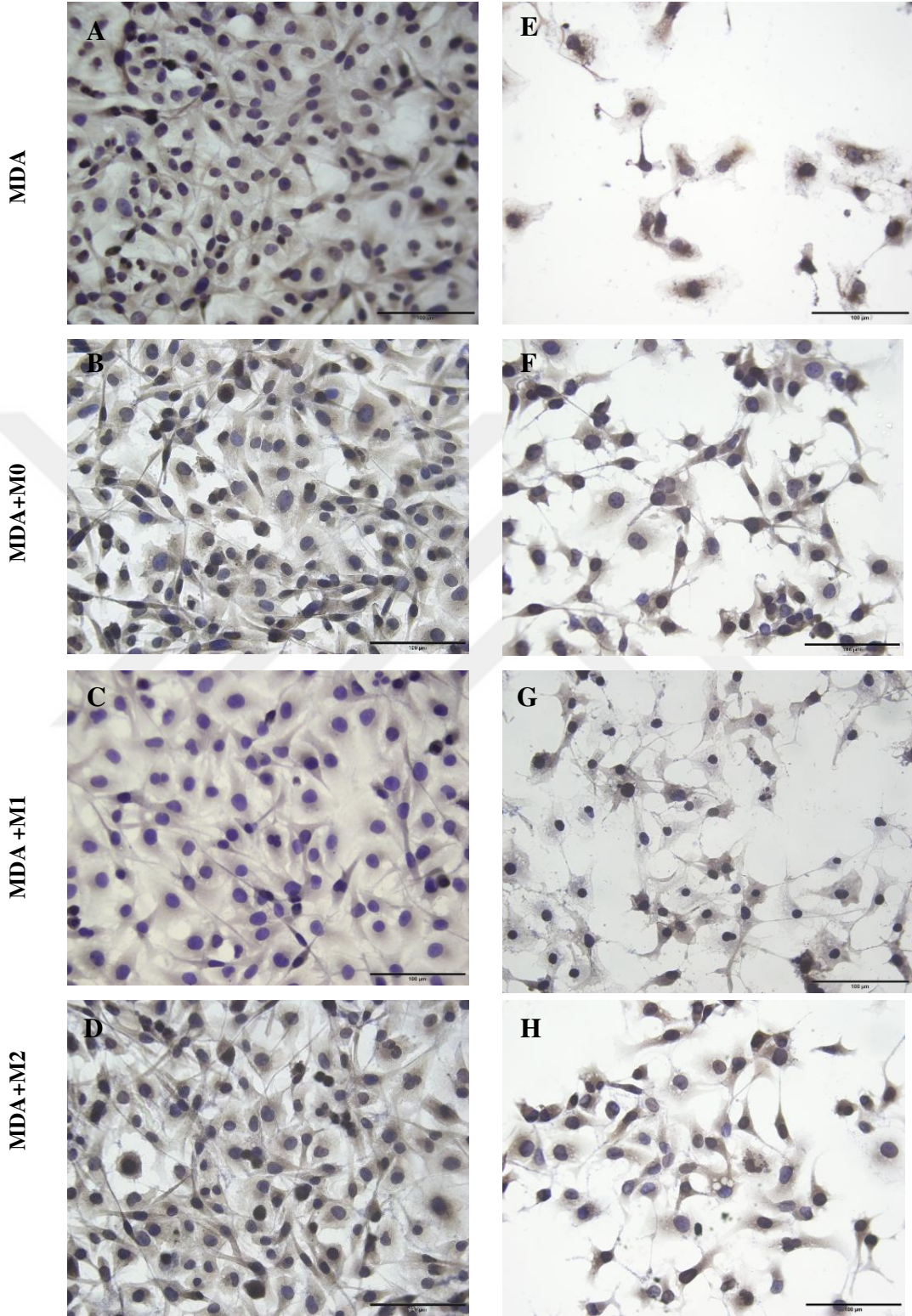
MDA ve M2 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında hücrelerin kısmen toparlandığı, ancak mezenkimal özelliklerin tamamen kalkmadığı görülmüştür. MDA+M2 grubuna kıyasla N-kaderin boyama yoğunluğu artmıştır (Resim 5D) ve bu artış diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 12.B). MDA+SLX grubu ile yapılan kıyaslamada da N-kaderin ekspresyonu anlamlı olarak azaldı (Şekil 12.C).

Sonuç olarak Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında (MDA+M0+SLX, MDA+M1+SLX ve MDA+M2+SLX) N-kaderin ekspresyonunun Selinexor uygulanmayan gruplara kıyasla anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 12.C).

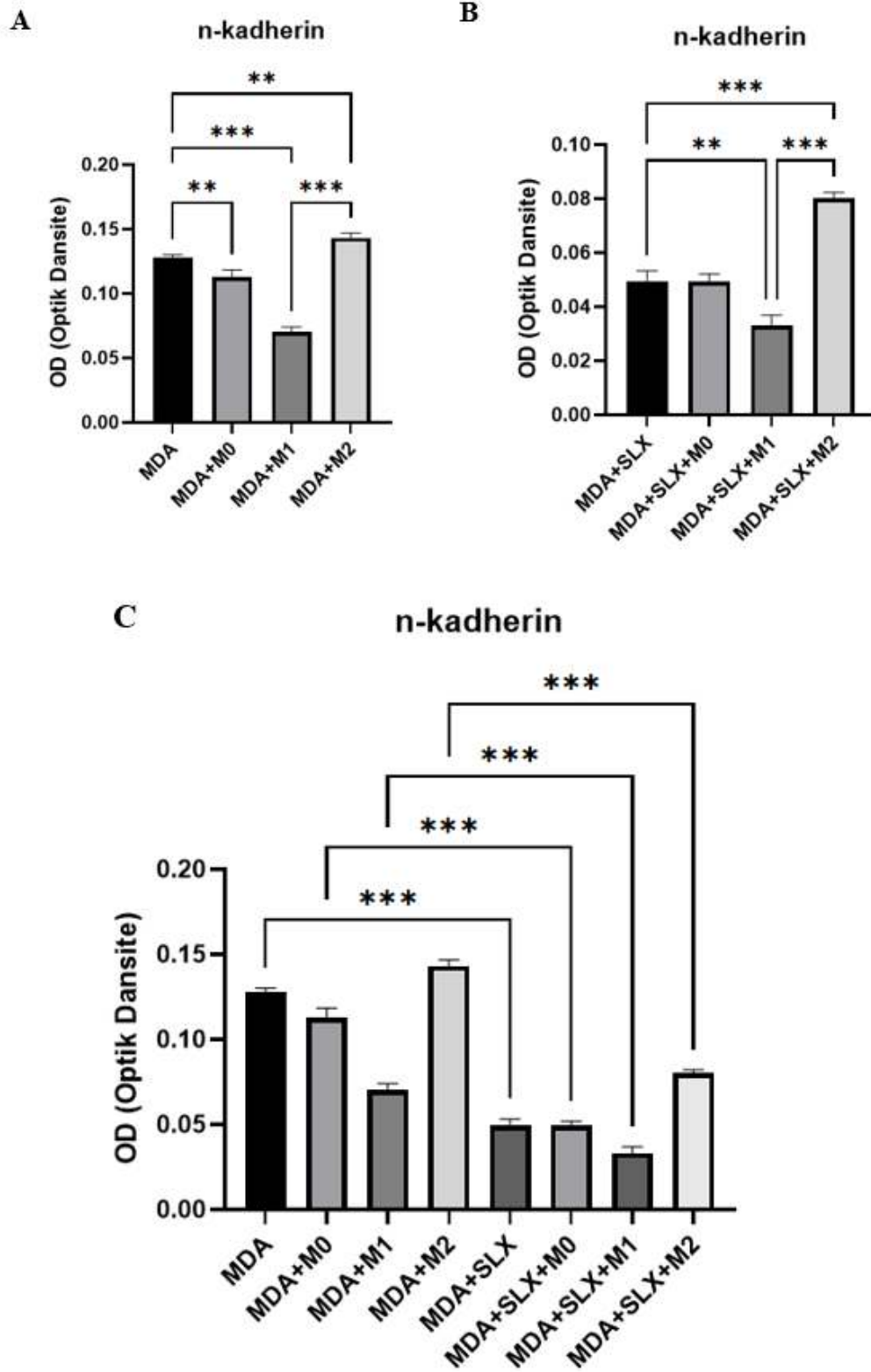


N-kaderin

+ SELİNEXOR



Resim 5. MDA-MB-231 hücresinin, M0,M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin ve Selinexor ile Ko-kültür yapılarak ICC ile değerlendirilmesi



Şekil 14. MDA hücrelerinin M0, M1 ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüründe N-kaderin ekspresyonunun kıyaslanması (A), MDA ile Makrofaj hücrelerinin Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında N-kaderin ekspresyonu (B). Selinexor uygulanan ve uygulanmayan ko-kültür gruplarında N-kaderin ekspresyonunun kıyaslanması (C).

4.6.3. E-Kaderin

MDA-MB-231 hücreleri ve farklı fenotipteki makrofajların oluşturduğu ko-kültür modellerinde Selinexor uygulamasının ardından hücre morfolojisi ve immünositokimyasal belirteç ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlemlendi. MDA hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun zayıf olduğu gözlemlendi (Resim 6A).

MDA ve M0 makrofajlarıyla ko-kültür edilen hücrelerin MDA grubuna kıyasla E-kaderin ekspresyonunun belirli bir düzeyde arttığı gözlemlenmiş olup (Resim 6B), bu artış istatistiksel olarak bulunmuştur (Şekil 13.A). Bu durum M0 makrofajlarının sınırlı düzeyde EMD uyarıcı etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MDA ve M1 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda hücrelerin daha epitelyal morfoloji kazandığı ve E-kaderin ekspresyonunun arttığı belirlendi (Resim 6C). MDA grubu ile kıyasla istatistiksel olarak E-kaderin ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 13A). Bu durum M1 fenotipli makrofajların EMD sürecini belirli bir oranda tersine çevirebilecek etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

MDA ve M2 makrofajları ile oluşturulan ko-kültür grubunda hücrelerin uzamış, morfoloji gösterdiği ve E-kaderin ekspresyonunun düşük seviyede kaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu M2 makrofajlarının EMD'yi desteklediğini göstermektedir (Resim 6D). MDA+M2 grubu ile kıyaslandığında E-kaderin ekspresyonu artışı istatistiksel olarak da anlamlıdır (Şekil 13.A).

MDA hücrelerine Selinexor uygulaması sonrasında hücrelerin daha kompakt bir görünüm kazandığı, hücre-hücre bağlantılarının arttığı ve E-kaderin ekspresyonunun arttığı saptandı (Resim 6E). Bu artma MDA grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 13.C). Bu artış, Selinexor'un EMD sürecini baskılayarak epitelyal özelliklerin yeniden kazanılmasını desteklediğini göstermektedir.

MDA ve M0 makrofajlarıyla ko-kültüre edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında, hücrelerin epitelyal özelliklerini geri kazandığını ve E-kaderin ekspresyonunun MDA+M0 grubuna göre az da olsa arttığı tespit edildi (Resim 6F) ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 13.C). MDA+SLX grubu ile kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 13.B).

MDA ve M1 makrofajlarıyla ko-kültüre edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında hücrelerin E-kaderin ekspresyonunun belirgin artış gösterdiği, hücrelerin epitelyal

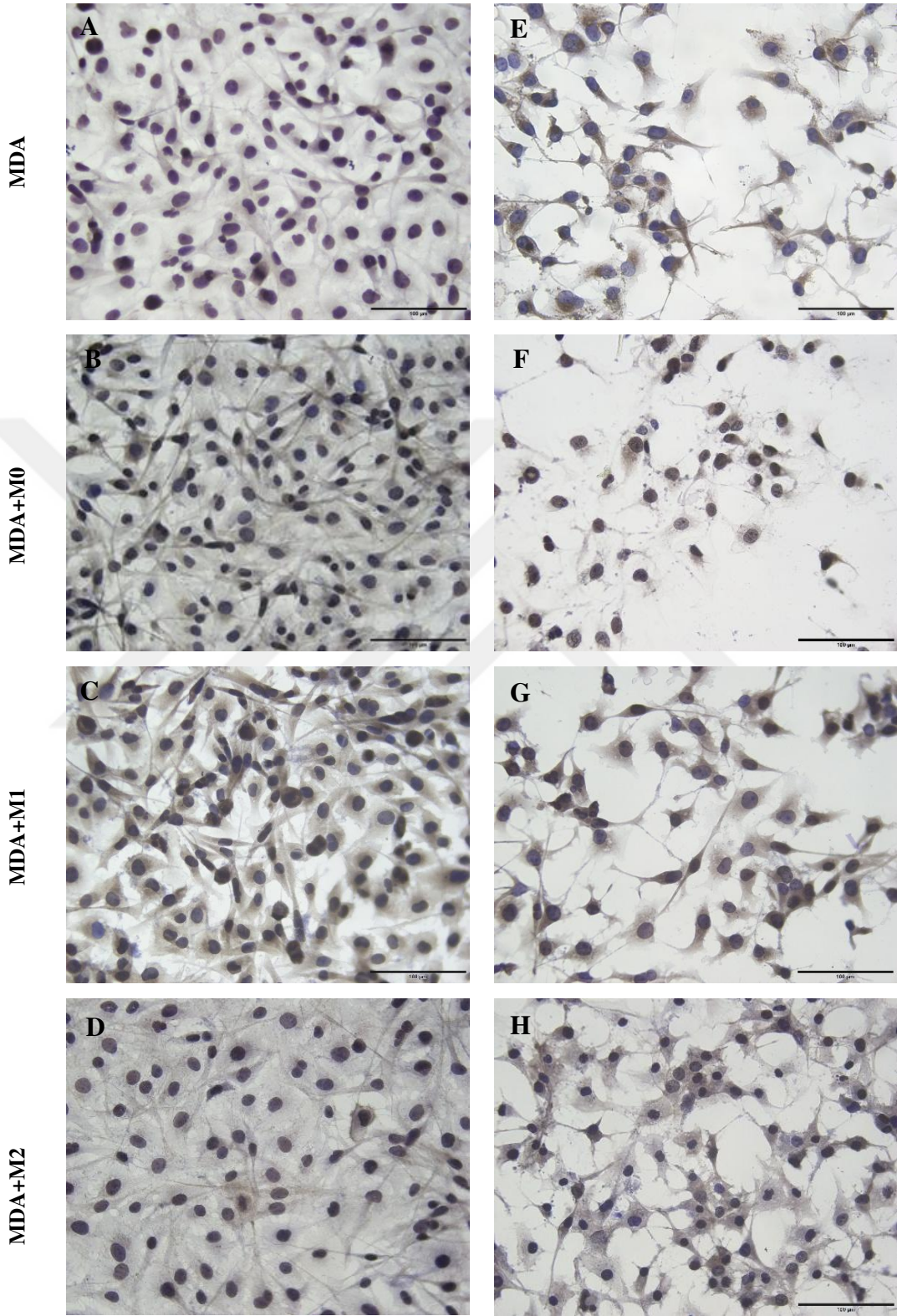
özelliklerini geri kazandığı gözlemlendi (Resim 6G). MDA+M1 grubuyla kıyaslandığında MDA+M1+SLX grubunda E-kadherin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (Şekil 13.C). Aynı zamanda MDA+SLX grubuyla kıyaslandığında MDA+M1+SLX grubunda E-kadherin ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 13.B).

MDA ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüre edilen hücrelerde Selinexor uygulandığında MDA+M2 grubuna göre E-kadherin artışı gözlemlendi (Resim 6H) ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 13.C). MDA+SLX grubu ile kıyaslandığında ise MDA+M2+SLX grubunda E-kadherin ekspresyonundaki bir miktar artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 13.B).

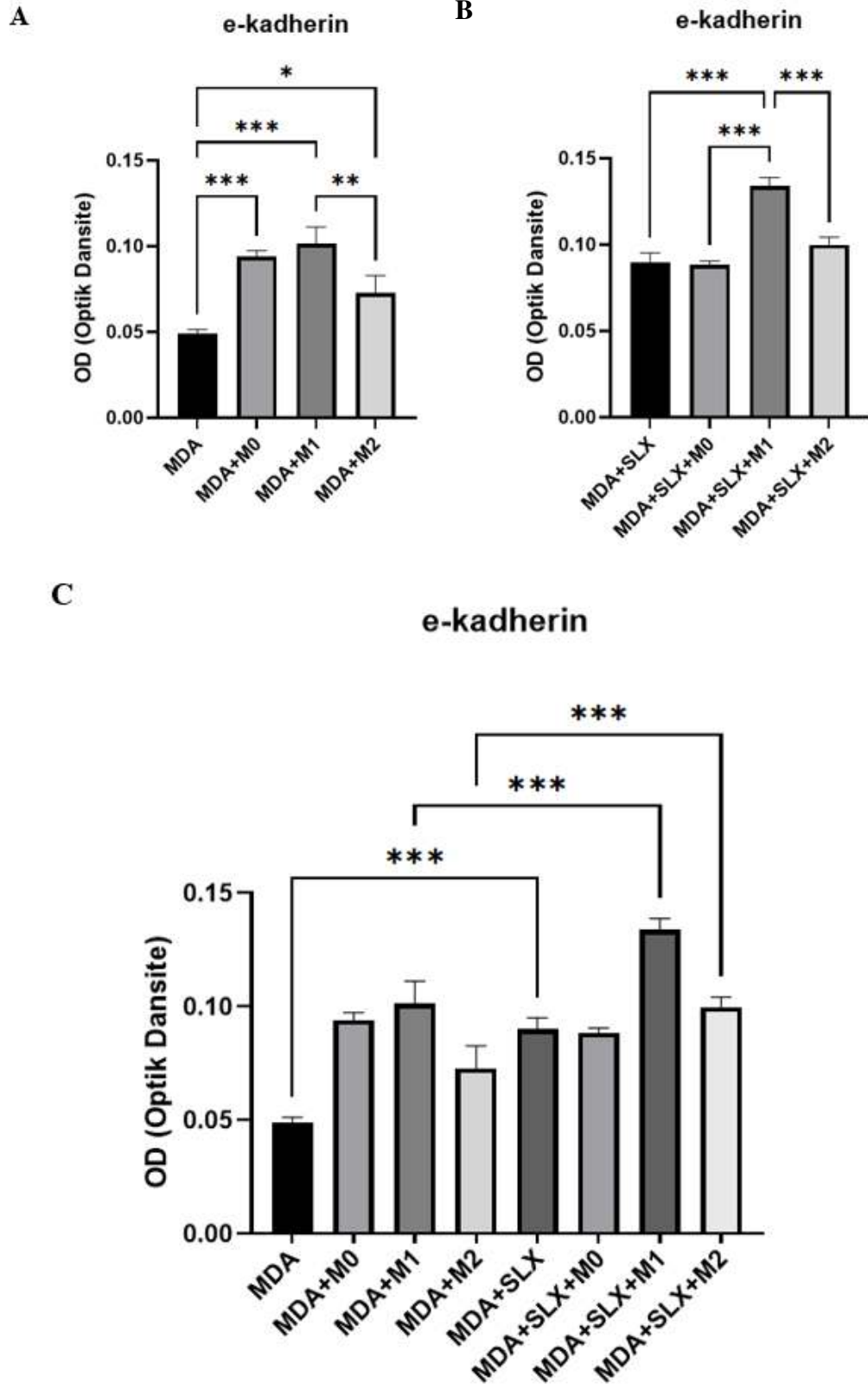
Sonuç olarak selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında (MDA+M0+SLX, MDA+M1+SLX ve MDA+M2+SLX) E-kadherin ekspresyonunun selinexor uygulanmayan gruplara kıyasla arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 13.C).

E-kaderin

+ SELİNEXOR



Resim 6. MDA-MB-231 hücresinin, M0,M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin ve Selinexor ile Ko-kültür yapılarak ICC ile değerlendirilmesi



Şekil 15. MDA hücresinin M0, M1 ve M2 makrofajlarıyla ko-kültüründe E-kaderin ekspresyonunun kıyaslanması (A), MDA ile Makrofaj hücrelerinin Selinexor uygulanan ko-kültür gruplarında E-kaderin ekspresyonu (B). Selinexor uygulanan ve uygulanmayan ko-kültür gruplarda E-kaderin ekspresyonunun kıyaslanması (C).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, XPO1'in seçici inhibitörü Selinexor'un, M1 ve M2 makrofajlarla oluşturulan ko-kültür sisteminde TNBC meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri araştırıldı. TNBC, meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur ve hormon reseptörleri ile HER2 ifadesi bulunmadığından hedefe yönelik tedavi seçenekleri sınırlıdır; bu durum hastalarda kötü prognoza yol açmaktadır (1). MDA-MB-231 hücre hattı, TNBC'nin en yaygın kullanılan in vitro modellerinden biridir. Bu hücreler yüksek invazyon ve metastaz potansiyeline sahip olup, kemoterapiye dirençli bir fenotip gösterir (90). Ayrıca, hücre içi sinyal yollarının (ör. NF- κ B, PI3K/Akt, MAPK) aşırı aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonel kaybı, tedaviye yanıtın düşüklüğü ile ilişkilidir (91). Bu nedenle, bu hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalar, yeni hedef moleküllerin belirlenmesi ve direnç mekanizmalarının anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

TNBC'de metastatik sürecin temel mekanizmalarından biri EMD'dir. EMD sırasında E-kaderin ekspresyonu azalırken, N-kaderin ve vimentin düzeyleri artar; bu değişiklik hücrelerin hareketliliğini, invazyon kapasitesini ve metastatik potansiyelini artırır (92),(93). Tümör mikroçevresinde yer alan makrofajlar, bu sürecin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Fenotiplerine bağlı olarak M1 ve M2 alt gruplarına ayrılan makrofajlar, farklı işlevsel özellikler gösterir. M1 makrofajları pro-inflamatuvar sitokinler salgılayarak tümör baskılayıcı etkiler sergilerken, M2 makrofajları anti-inflamatuvar ve protümöral sinyallerle tümör progresyonunu destekler (94). Literatürde, M2 makrofajlarının tümör hücrelerinde EMD'yi tetikleyerek invazyon ve metastatik potansiyeli artırdığı, M1 makrofajlarının ise tümör baskılayıcı etkiler gösterdiği bildirildi (95). Çalışmamızda, MDA hücrelerinin M1 ve M2 makrofajlarla ko-kültürü sonucunda vimentin ve N-kaderin düzeylerinde artış gözlenmiş ve hücreler daha invaziv fenotipteyken E-kaderin düzeyi azaldı, buna karşın M1 makrofajlarda E-kaderin düzeyi artarken vimentin ve N-kaderin düzeyi azalma gösterdi. Dolayısıyla, makrofaj polarizasyonunun modülasyonu, TNBC'nin invazyonel ve metastatik potansiyelini hedef alan terapötik stratejiler için kritik bir eksen olarak değerlendirilebilir.

Selinexor, XPO1 inhibitörü olarak tümör baskılayıcı proteinlerin (ör. p53, FOXO, I κ B) çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını engeller ve bu proteinlerin çekirdek içinde kalarak

hücre döngüsünü durdurur ve apoptozu indükler (80). Selinexor'un MDA hücrelerinde hücre morfoloji ve protein ekspresyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. XPO1, birçok tümör baskılayıcı ve hücre döngüsü düzenleyici proteinin nükleer exportundan sorumludur (96). Kanseri hücrelerinde XPO1'in aşırı ekspresyonu, bu proteinlerin sitoplazmaya taşınmasına ve fonksiyonlarının kaybına yol açarak apoptozun engellenmesine ve proliferasyonun artmasına katkı sağlar (97). Çeşitli klinik ve preklini çalışmalarda, Selinexor'un hem hematolojik malignitelerde hem de solid tümörlerde antitümör etkileri gösterdiği bildirildi (98). Bu çalışmada da, Selinexor uygulaması sonucunda MDA hücrelerinde hücre yoğunluğunda azalma, sitoplazmik büzülme, uzantı kaybı ve hücreler arası bağlantı kaybı gibi morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Arango ve arkadaşları (80), MDA hücre hattında selinexor için IC₅₀ değerini 44 nM olarak bildirmiştir; Ancak diğer bazı çalışmalarda daha yüksek veya düşük değerler rapor edilmiştir. 2014 yılında yapılan başka bir çalışmada ise Cheng ve arkadaşları MDA-MB-231 hücre hattı için Selinexor'un IC₅₀ değerini MTT yöntemini kullanarak 0.051 µM olarak bulundu (99). Bununla birlikte, Kashyap ve arkadaşları (89) bu değeri 6.5 µM gibi oldukça yüksek bir düzeyde raporlamıştır. Bizim yaptığımız çalışmada, MDA hücre hattına uygulanan selinexor tedavisinin 48. saatteki sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve IC₅₀ değeri 51.90 µM olarak bulunmuştur. Selinexor'un IC₅₀ değeri literatürdeki çalışmalara benzer olup bazı çalışmalara farklı sonuç vermiştir. Bu farklılıklar, hücre kültürü koşullarına, hücre pasaj sayısı farklılıklarına göre, ilacın hazırlanma şekline, kullanılan sitotoksikite analiz yöntemlerine (örneğin MTT, CCK-8 veya xCELLigence gibi) ve inkübasyon sürelerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Yara kapanma ve koloni oluşum analizleri, Selinexor'un MDA hücrelerinde proliferasyonu ve hücre hareketliliğini anlamlı düzeyde baskıladığını gösterdi. Bu sonuç, Selinexor'un hücre çoğalması ve tümör progresyonu üzerindeki inhibitör etkisini destekleyen önceki bulgularla uyumludur. Selinexor'un TNBC hücrelerinde proliferasyonu ve tümör büyümesini azalttığını, apoptoz yolunu aktive ettiği bilinmektedir. Diğer yandan, Selinexor'un MDA hücrelerinde koloni oluşum kapasitesi ve göç potansiyelinin azalması, hücre iskeleti yeniden yapılanması ve EMD süreçlerinin baskılanmasıyla ilişkili bulundu (100). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde yara kapanmada Selinexor'lu (MDA+SLX) grubunun MDA grubuna kıyasla proliferasyon ve migrasyonun anlamlı düzeyde azaltıldığı belirlendi. Koloni oluşum analizinde MDA+SLX grubunun MDA grubuna kıyasla daha az koloni oluşumunu ve klonal büyümeyi azaltarak tümör hücrelerinin yenilenme kapasitesini sınırladığı belirlendi.

Selinexor tedavisi, M0, M1 ve M2 makrofajlarla oluşturulan ko-kültür sistemlerinde EMD belirteçlerini azaldığı gözlemlendi. Bu bulgu, ilacın yalnızca tümör hücresi içi sinyalleri değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinden gelen pro-tümöral uyarıları da baskıladığını düşündürmektedir. Literatürde benzer çalışma doğal flavonoidlerden olan Baicalein'in TAM polarizasyonunu değiştirerek EMD'yi baskıladığı (101), benzer şekilde başka bir çalışmada Selinexor'un XPO1 inhibisyonu aracılığıyla Snail, Slug ve Twist gibi EMD ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini sınırladığı bildirildi (102),(103). Çalışmamızda da, M2 makrofaj varlığında vimentin ve N-kaderin artışı ile E-kaderin azalması gözlemlendi, bu durum Selinexor uygulaması sonrası tersine döndüğü gözlemlendi. M1 makrofaj varlığında ise vimentin ve N-kaderin ekspresyonunda azalma E-kaderin ekspresyonunda ise artma gözlemlendi. Selinexor uygulaması sonrasında ise bu durum daha da desteklendi. Bu sonuç, Selinexor'un makrofaj kaynaklı EMD indüksiyonunu baskıladığını göstermektedir ve ko-kültür sistemi, tümör hücrelerinin immün mikroçevre ile gerçekçi bir şekilde etkileşim kurmasını sağlandı. Bulduğumuz bulgular, Selinexor'un immün baskılayıcı ortamda etkili olabileceğini ve makrofaj kaynaklı tümör destekleyici sinyalleri bloke edebileceğini düşündürmektedir. Selinexor'un, XPO1 inhibisyon yoluyla ve tümör mikroçevresi aracılığıyla dolaylı yoldan TNBC'nin invazyonel ve metastatik etkilerini baskıladığı bu çalışmayla desteklendi.

Sonuç olarak makrofajlar aracılığıyla oluşturulan ko-kültür modelleri tümör mikroçevresinin TNBC hücre davranışları üzerindeki etkilerini incelemek açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışma TNBC'de M1 ve M2 makrofajların EMD üzerindeki karşıt etkilerini ve Selinexor'un bu süreci nasıl düzenleyebildiğini ortaya koyarak literatüre özgün bir katkı sunmaktadır. Bulgular, Selinexor'un yalnızca hücre proliferasyonunu değil, aynı zamanda mikroçevre kaynaklı EMD süreçlerini de hedef alabileceğini ve TNBC tedavisinde immün modülatör ajanlar veya farklı kemoteröpatiklerle kombinasyonlarının geliştirilmesine temel oluşturabileceğini göstermektedir.

KAYNAKÇA

1. Schwartz SM. Epidemiology of Cancer. Clin Chem. 2024;70(1):140-149.
2. Kim J, Harper A, McCormack V, Sung H, Houssami N, Morgan E, Mutebi M, Garvey G, Soerjomataram I, Fidler-Benaoudia MM. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. Nature Medicine. 2025;1-9.
3. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clinical cancer research. 2007;13(15):4429-4434.
4. Ismail-Khan R, Bui MM. A review of triple-negative breast cancer. Cancer control. 2010;17(3):173-176.
5. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nature medicine. 2013;19(11):1423-1437.
6. Deepak K, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, Rao D, Malla RR. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. Pharmacological research. 2020;153:104683.
7. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. Cancer research. 1988;48(2):246-253.
8. Porch JV, Lee I-M, Cook NR, Rexrode KM, Buring JE. Estrogen–progestin replacement therapy and breast cancer risk: the Women's Health Study (United States). Cancer Causes & Control. 2002;13:847-854.
9. Bonanni B, Puntoni M, Cazzaniga M, Pruneri G, Serrano D, Guerrieri-Gonzaga A, Gennari A, Trabacca MS, Galimberti V, Veronesi P. Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. Journal of clinical oncology. 2012;30(21):2593-2600.
10. Lacroix M, Haibe-Kains B, Hennuy B, Laes J-F, Lallemand F, Gonze I, Cardoso F, Piccart M, Leclercq G, Sotiriou C. 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. 2004;12(4):701-707.
11. Dohr O, Vogel C, Abel J. Different response of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. Archives of biochemistry and biophysics. 1995;321(2):405-412.
12. Lokerse WJ, Bolkestein M, Dalm SU, Eggermont AM, de Jong M, Grüll H, Koning GA. Comparing the therapeutic potential of thermosensitive liposomes and hyperthermia in two distinct subtypes of breast cancer. Journal of controlled release. 2017;258:34-42.
13. Swift J, Discher DE. The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. Journal of cell science. 2014;127(14):3005-3015.
14. Fejzullahu A. Metastatik Meme Kanseri Tedavisinde NF-κB Sinyal Yolağı Regülatörlerinin Araştırılması. 2021, Marmara Üniversitesi (Turkey).
15. Tungsukruthai S, Petpiroon N, Chanvorachote P. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis and potential anti-metastatic compounds. Anticancer research. 2018;38(5):2607-2618.

16. Tufail M, Cui J, Wu C. Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches. *American journal of cancer research*. 2022;12(7):2920.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-674.
18. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-322.
19. Willumsen N, Thomsen LB, Bager CL, Jensen C, Karsdal MA. Quantification of altered tissue turnover in a liquid biopsy: a proposed precision medicine tool to assess chronic inflammation and desmoplasia associated with a pro-cancerous niche and response to immuno-therapeutic anti-tumor modalities. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2018;67:1-12.
20. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem cell reports*. 2014;2(1):78-91.
21. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-330.
22. Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei medical journal*. 2016;57(1):5-14.
23. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*. 2019;30(1):36-50.
24. Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1).
25. Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):162-176.
26. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, Kellokumpu-Lehtinen PL, Lauttia S, Tynninen O, Joensuu H, Heymann D, Määttä JA. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):101.
27. Medrek C, Pontén F, Jirstrom K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:306.
28. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, Nikolaou A, Morias Y, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):861-867.
29. Hollmén M, Karaman S, Schwager S, Lisibach A, Christiansen AJ, Maksimow M, Varga Z, Jalkanen S, Detmar M. G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer. *Oncoimmunology*. 2016;5(3):e1115177.
30. Yu T, Di G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chin J Cancer Res*. 2017;29(3):237-252.
31. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*. 2019;29(3):212-226.
32. Kundu M, Butti R, Panda VK, Malhotra D, Das S, Mitra T, Kapse P, Gosavi SW, Kundu GC. Modulation of the tumor microenvironment and mechanism of immunotherapy-based drug resistance in breast cancer. *Mol Cancer*. 2024;23(1):92.

33. Clark DP. Biomarkers for immune checkpoint inhibitors: The importance of tumor topography and the challenges to cytopathology. *Cancer Cytopathol.* 2018;126(1):11-19.
34. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015;368(1):7-13.
35. Helfen A, Roth J, Ng T, Eisenblaetter M. In Vivo Imaging of Pro- and Antitumoral Cellular Components of the Tumor Microenvironment. *J Nucl Med.* 2018;59(2):183-188.
36. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 2018;50(12):1-11.
37. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-264.
38. Gupta MK, Vadde R, Sarojamma V. Curcumin - A Novel Therapeutic Agent in the Prevention of Colorectal Cancer. *Curr Drug Metab.* 2019;20(12):977-987.
39. Velaei K, Samadi N, Barazvan B, Soleimani Rad J. Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *Breast.* 2016;30:92-100.
40. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol.* 2007;8(1):11-13.
41. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435.
42. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:514.
43. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol.* 2014;5:614.
44. Dijkgraaf EM, Heusinkveld M, Tummers B, Vogelpoel LT, Goedemans R, Jha V, Nortier JW, Welters MJ, Kroep JR, van der Burg SH. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013;73(8):2480-2492.
45. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-455.
46. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;66(1):1-9.
47. Gordy C, Pua H, Sempowski GD, He YW. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. *Blood.* 2011;117(2):618-629.
48. Goren I, Allmann N, Yogev N, Schürmann C, Linke A, Holdener M, Waisman A, Pfeilschifter J, Frank S. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol.* 2009;175(1):132-147.
49. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol.* 2018;30(11):511-528.
50. Borisenko GG, Matsura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB, Kagan VE. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys.* 2003;413(1):41-52.
51. Boutilier AJ, Elsaywa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).

52. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanogoh A, Akira S. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*. 2017;541(7635):96-101.
53. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
54. Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm Res*. 2016;65(1):1-11.
55. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
56. Awuh JA, Flo TH. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(9):1625-1648.
57. Saba K, Sameeullah M, Asghar A, Gottschamel J, Latif S, Lössl AG, Mirza B, Mirza O, Waheed MT. Expression of ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis* in broccoli: An edible plant. *Biotechnol Appl Biochem*. 2020;67(1):148-157.
58. Qiu P, Liu Y, Zhang J. Review: the Role and Mechanisms of Macrophage Autophagy in Sepsis. *Inflammation*. 2019;42(1):6-19.
59. Belgiovine C, D'Incalci M, Allavena P, Frapolli R. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(13):2411-2424.
60. Li C, Xu MM, Wang K, Adler AJ, Vella AT, Zhou B. Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl Res*. 2018;191:29-44.
61. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Genderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
62. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*. 2019;10:792.
63. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, Dedhar S, Derynck R, Ford HL, Fuxe J, García de Herreros A, Goodall GJ, Hadjantonakis AK, Huang RYJ, Kalcheim C, Kalluri R, Kang Y, Khew-Goodall Y, Levine H, Liu J, Longmore GD, Mani SA, Massagué J, Mayor R, McClay D, Mostov KE, Newgreen DF, Nieto MA, Puisieux A, Runyan R, Savagner P, Stanger B, Stemmler MP, Takahashi Y, Takeichi M, Theveneau E, Thiery JP, Thompson EW, Weinberg RA, Williams ED, Xing J, Zhou BP, Sheng G. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341-352.
64. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-890.
65. Debnath P, Huiem RS, Dutta P, Palchaudhuri S. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Biosci Rep*. 2022;42(1).
66. Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, Stemmler MP. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *Embo j*. 2021;40(18):e108647.

67. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, Diomede F. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells*. 2021;10(7).
68. Sato R, Semba T, Saya H, Arima Y. Concise Review: Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Targets. *Stem Cells*. 2016;34(8):1997-2007.
69. Kahlert UD, Joseph JV, Kruyt FAE. EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. *Mol Oncol*. 2017;11(7):860-877.
70. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med*. 2015;4:6.
71. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84.
72. Kodama T, Newberg JY, Kodama M, Rangel R, Yoshihara K, Tien JC, Parsons PH, Wu H, Finegold MJ, Copeland NG, Jenkins NA. Transposon mutagenesis identifies genes and cellular processes driving epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(24):E3384-3393.
73. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-715.
74. Marcucci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(5):311-325.
75. Vakili-Ghartavol R, Mombeiny R, Salmaninejad A, Sorkhabadi SMR, Faridi-Majidi R, Jaafari MR, Mirzaei H. Tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition in cancer: Nanotechnology comes into view. *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9223-9236.
76. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1438-1449.
77. Swift J, Discher DE. The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 14):3005-3015.
78. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(7):490-501.
79. Landes JR, Moore SA, Bartley BR, Doan HQ, Rady PL, Tying SK. The efficacy of selinexor (KPT-330), an XPO1 inhibitor, on non-hematologic cancers: a comprehensive review. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(5):2139-2155.
80. Arango NP, Yuca E, Zhao M, Evans KW, Scott S, Kim C, Gonzalez-Angulo AM, Janku F, Ueno NT, Tripathy D, Akcakanat A, Naing A, Meric-Bernstam F. Selinexor (KPT-330) demonstrates anti-tumor efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):93.
81. Marijon H, Gery S, Chang H, Landesman Y, Shacham S, Lee DH, de Gramont A, Koeffler HP. Selinexor, a selective inhibitor of nuclear export, enhances the anti-tumor activity of olaparib in triple negative breast cancer regardless of BRCA1 mutation status. *Oncotarget*. 2021;12(18):1749-1762.

82. Miyake T, Pradeep S, Wu SY, Rupaimoole R, Zand B, Wen Y, Gharpure KM, Nagaraja AS, Hu W, Cho MS, Dalton HJ, Previs RA, Taylor ML, Hisamatsu T, Kang Y, Liu T, Shacham S, McCauley D, Hawke DH, Wiktorowicz JE, Coleman RL, Sood AK. XPO1/CRM1 Inhibition Causes Antitumor Effects by Mitochondrial Accumulation of eIF5A. *Clin Cancer Res.* 2015;21(14):3286-3297.
83. Turner JG, Dawson J, Sullivan DM. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(8):1021-1032.
84. Walker CJ, Oaks JJ, Santhanam R, Neviani P, Harb JG, Ferencak G, Ellis JJ, Landesman Y, Eisfeld AK, Gabrail NY, Smith CL, Caligiuri MA, Hokland P, Roy DC, Reid A, Milojkovic D, Goldman JM, Apperley J, Garzon R, Marcucci G, Shacham S, Kauffman MG, Perrotti D. Preclinical and clinical efficacy of XPO1/CRM1 inhibition by the karyopherin inhibitor KPT-330 in Ph+ leukemias. *Blood.* 2013;122(17):3034-3044.
85. Azmi AS, Uddin MH, Mohammad RM. The nuclear export protein XPO1 - from biology to targeted therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(3):152-169.
86. Shafique M, Ismail-Khan R, Extermann M, Sullivan D, Goodridge D, Boulware D, Hogue D, Soliman H, Khong H, Han HS. A Phase II Trial of Selinexor (KPT-330) for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist.* 2019;24(7):887-e416.
87. Gravina GL, Senapedis W, McCauley D, Baloglu E, Shacham S, Festuccia C. Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. *J Hematol Oncol.* 2014;7:85.
88. Chong S, Sun L, Mu G, Hua M, Xiang Q, Cui Y. Adverse Events of Factor Xa Inhibitors in Pediatric Patients: A Meta-analysis and Pharmacovigilance Study. *Paediatr Drugs.* 2025;27(3):351-366.
89. Soung YH, Kashyap T, Nguyen T, Yadav G, Chang H, Landesman Y, Chung J. Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINE) compounds block proliferation and migration of triple negative breast cancer cells by restoring expression of ARRDC3. *Oncotarget.* 2017;8(32):52935-52947.
90. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease.* 2011;32(1-2):35-48.
91. Lee A, Djamgoz MB. Triple negative breast cancer: emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. *Cancer treatment reviews.* 2018;62:110-122.
92. Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, Uesugi M, Agoulnik S, Taylor N, Funahashi Y. Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial–mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal–epithelial transition (MET) states. *British journal of cancer.* 2014;110(6):1497-1505.
93. Parikh K, Cang S, Sekhri A, Liu D. Selective inhibitors of nuclear export (SINE)--a novel class of anti-cancer agents. *J Hematol Oncol.* 2014;7:78.
94. Lewis, CE ve Pollard, JW (2006). Makrofajların farklı tümör mikro ortamlarındaki farklı rolleri. *Kanser araştırması* , 66 (2), 605-612.
95. Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.
96. Turner JG, Dawson J, Sullivan DM. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology.* 2012;83(8):1021-1032.

97. P Abdul Razak AR, Mau-Soerensen M, Gabrail NY, Gerecitano JF, Shields AF, Unger TJ, Saint-Martin JR, Carlson R, Landesman Y, McCauley D. First-in-class, first-in-human phase I study of selinexor, a selective inhibitor of nuclear export, in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(34):4142-4150. Parikh K, Cang S, Sekhri A, Liu D. Selective inhibitors of nuclear export (SINE)--a novel class of anti-cancer agents. *J Hematol Oncol*. 2014;7:78.
98. Festuccia C, Mancini A, Gravina GL, Colapietro A, Vetusch A, Pompili S, Ventura L, Delle Monache S, Iorio R, Del Fattore A. Dual CXCR4 and E-selectin inhibitor, GMI-1359, shows anti-bone metastatic effects and synergizes with docetaxel in prostate cancer cell intraosseous growth. *Cells*. 2019;9(1):32.
99. Cheng, Y., Holloway, M. P., Nguyen, K., McCauley, D., Landesman, Y., Kauffman, M. G., Shacham, S., & Altura, R. A. (2014). XPO1 (CRM1) inhibition represses STAT3 activation to drive a survivin-dependent oncogenic switch in triple-negative breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 13(3), 675–686
100. Li, Q. H., Liu, Z. Z., Ge, Y. N., Liu, X., Xie, X. D., Zheng, Z. D., ... & Liu, B. (2020). Small breast epithelial mucin promotes the invasion and metastasis of breast cancer cells via promoting epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncology Reports*, 44(2), 509-518. Nadanaka S, Kinouchi H, Kitagawa H. Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/ β -catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion. *J Biol Chem*. 2018;293(2):444-465
101. Nadanaka, S., Kinouchi, H., & Kitagawa, H. (2018). Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/ β -catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 293(2), 444-465.
102. Walker, C. J., Oaks, J. J., Santhanam, R., Neviani, P., Harb, J. G., Ferencak, G., ... & Perrotti, D. (2013). Preclinical and clinical efficacy of XPO1/CRM1 inhibition by the karyopherin inhibitor KPT-330 in Ph+ leukemias. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(17), 3034-3044.
103. Parikh, K., Cang, S., Sekhri, A., & Liu, D. (2014). Selective inhibitors of nuclear export (SINE)--a novel class of anti-cancer agents. *Journal of hematology & oncology*, 7(1), 78.

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve ortaöğrenimimi Mardin’de tamamladım. 2013-2015 yılında Nişantaşı Üniversitesi MYÖ Tıbbi Laboratuvar okudum. 2015-2019 yılında Uşak Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde lisans eğitimime başladım ve 2019 yılında mezun oldum. 2022 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans öğrenimim süresince kanser biyolojisi ve hücre kültürü alanlarında teorik ve uygulamalı çalışmalar yürüttüm.

