

Sendegül YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

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

**MEME KANSERİ AKCİĞER METASTAZININ
MODELLENMESİNDE, TAS-115 İNHİBİTÖRÜNÜN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sendegül YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

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

MEME KANSERİ AKCİĞER METASTAZININ
MODELLENMESİNDE, TAS-115 İNHİBİTÖRÜNÜN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sendegül YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

Bu çalışma “TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı”
ve “Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TDK-2023-6270” proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Saffet ÖZTÜRK
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU
(Ege Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Özgür DANDİN
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER
(Sakarya Üniversitesi)

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 beyan ederim.

Sendegül YILDIRIM

Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimime başladığım günden bu yana desteğini, sevgisini, özverisini esirgemeyen, yürüdüğüm bu yolda bana ışık olan, yanımda olduğunu her daim gönülden hissettiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Sayın Gamze TANRIÖVER'e,

Doktora tezim için beni Pennsylvania State Üniversitesi'ndeki laboratuvarına kabul eden ve laboratuvarındaki tüm imkanları bana sunan, tüm sürecimde yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen Prof. Dr. Sayın İbrahim Tarık ÖZBOLAT'a

Amerika'da hayatımın her alanında yanımda olduğunu hissettiren ve çalışmalarım boyunca bana destek olan tüm Ozbolat Lab. ekibine,

Bilgi ve tecrübesi ile yolumda bana her daim destek olan Doç. Dr. Sayın Özgür DANDİN'e,

Lisansüstü eğitim sürecim boyunca akademik ve bilimsel bilgi ve tecrübeleriyle beni eğiten ve yanımda olan değerli Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve aynı yolda yürüdüğüm asistan arkadaşlarıma,

Her biri birbirinden kıymetli ve ıslıl ıslıl parlayan canım G-Team üyeleri; Aleyna ŞİŞANECİ, Ece OYLUMLU, Emine YAZICI, Merzuka KALAY ve Sayra DİLMAÇ'a,

Lisansüstü eğitim sürecim boyunca güler yüzleri ile tüm soru ve sorunlarıma içtenlik ve sabırla yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli tüm çalışanlarına,

Hayatım boyunca ideallerim ve eğitimim için bana maddi ve manevi destek olan, bu yola başlarken benimle aynı heyecan ve isteği paylaşan, bana güç veren ve her daim beni destekleyen canım babam Bahadır YILDIRIM, annem Gül YILDIRIM, kardeşim Hande YILDIRIM ve Pamuk ananeme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK); yapısında östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'yi bulundurmaması nedeniyle hedefe yönelik tedavisi olmayan en agresif meme kanseri türüdür. ÜNMK hastalarında mortalitenin asıl sebebi, primer tümörün yanı sıra gelişen metastazlardır. TAS-115, c-MET ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerini (VEGFR) inhibe ettiği bilinen çoklu reseptör tirozin kinaz inhibitörü olup; c-MET/HGF ve VEGFR'nin otofosforilasyonunu engellemekte ve c-MET/HGF ile VEGFR aracılı hücre içi sinyal yollarını inhibe ederek kanser hücrelerinin sağkalımı azalmaktadır. Literatürde TAS-115'in ÜNMK üzerine etkinliğinin gösterildiği herhangi bir çalışma yer almamaktadır. Bu doğrultuda "c-MET yolağının inhibisyonu alt yolların çalışmasına bağlı olarak, kanser hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu yavaşlatır" hipotezini kurguladığımız doktora tez projemde; TAS-115 inhibitörünün bireysel ve kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin (DOXO) ile birlikte uygulanmasının c-MET/HGF ilişkili yolağı ne derece inhibe edebileceği ve takiben de PI3K/Akt/mTOR bağımlı yolağı nasıl aktive edeceğinin 3B *in vitro* ortamda sorgulanması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmamızda insan ÜNMK hücre hattı GFP⁺MDA-MB-231 ve insan akciğer fibroblast hücre hattı NHLF ile heterotipik sferoid modeli oluşturuldu. TAS-115 inhibitörünün sferoidler üzerine etkinliği; sağkalım, proliferasyon ve sitokin yanıtları açısından 3B ortamda değerlendirildi. TAS-115'in c-MET/HGF ve aracılı PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının son üyesi p-mTOR üzerine etkisi belirlendi. Bunlara ek olarak; 3B biyobasım sonrası sferoidlerde TAS-115'in invazyon ve metastaz potansiyeli üzerine etkisi değerlendirildi.

Bulgular: Oluşturulan heterotipik sferoid modelinde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası kanser hücrelerinde sağkalım ve proliferasyonun azaldığı, c-MET, p-c-MET, p-mTOR ekspresyonlarının ve pro-inflamatuvar sitokin yanıtlarının azaldığı görüldü. 3B biyobasım sonrası sferoidlerin invazyon ve metastaz potansiyelinde belirgin bir azalış olduğu görüldü ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamız ile TAS-115 inhibitörünün 3B *in vitro* ortamda ÜNMK ve akciğer fibroblast hücreleri üzerine olası etkisi, bireysel ve kemoterapötik ile birlikte uygulanması sonucu hem tümör gelişimi, yayılımı hem de tümör mikroçevredeki sitokin yanıtlarının değerlendirilmesi açısından ciddi veriler sunmaktadır. Çalışmamız ile meme kanserinde TAS-115'in c-MET/HGF aracılı etkisi ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: ÜNMK, c-MET, HGF, TAS-115, 3B biyobasım

ABSTRACT

Objective: Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive breast cancer subtype, lacking targeted therapies due to the absence of ER, PR, and HER2 expression. TAS-115, a multi-receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks autophosphorylation of c-MET/HGF and VEGFR, inhibiting associated signaling pathways such as PI3K/Akt/mTOR, thereby reducing cancer cell survival. No studies to date have evaluated TAS-115's efficacy in TNBC. This study hypothesizes that "Inhibition of the c-MET pathway decreases cancer cells proliferation and migration through downstream pathway modulation." We aim to investigate the effects of TAS-115, both individually and in combination with doxorubicin (DOXO), on the c-MET/HGF and PI3K/Akt/mTOR pathways in a 3D *in vitro* model.

Method: A heterotypic spheroid model was generated using GFP+MDA-MB-231 (TNBC) and NHLF (lung fibroblast) cells. The impact of TAS-115 on spheroids was assessed in a 3D environment, evaluating cell survival, proliferation, and cytokine responses. TAS-115's influence on c-MET/HGF signaling and the downstream PI3K/Akt/mTOR pathway, with emphasis on *p*-mTOR, was determined. The effects of TAS-115 on spheroid invasion and metastasis potential following 3D bioprinting were also investigated.

Results: In the formed heterotypic spheroid model, following the treatment with TAS-115 both individually and in combination with DOXO, a decrease in cancer cell survival and proliferation was observed. Additionally, the expression of c-MET, *p*-c-MET, and *p*-mTOR, as well as pro-inflammatory cytokine responses, were significantly reduced. After 3D bioprinting, a marked reduction in the invasion and metastasis potential of the spheroids was also observed ($p < 0.05$).

Conclusion: Our study provides critical insights into the effects of TAS-115 on TNBC and lung fibroblast cells in a 3D *in vitro* environment, evaluating tumor growth, spread, and cytokine responses within the tumor microenvironment. This is the first study to elucidate the c-MET/HGF-mediated effects of TAS-115 in breast cancer, supporting its potential application in TNBC therapy.

Key words: TNBC, c-MET, HGF, TAS-115, 3D bioprinting

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri	4
2.2.1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	6
2.2.2. Meme Kanseri Metastazı	8
2.2.3. Meme Kanserinin Akciğere Metastazı	11
2.3. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK'ler): Hücrel Sinyal İletiminde Temel Düzenleyiciler	13
2.3.1. c-MET Reseptör Tirozin Kinaz	15
2.3.2. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	16
2.3.3. Normal Hücrelerde c-MET/HGF Aracılı Sinyalizasyon Mekanizması	18
2.3.4. Kanser hücrelerinde c-MET/HGF Aracılı Sinyalizasyon Mekanizması	19
2.4. TAS-115 (Pamufetinib)	21
2.5. 3-Boyutlu <i>In Vitro</i> Deney Modeli	23

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. MDA-MB-231 (İnsan Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Hattı) ve NHLF (Normal İnsan Akciğer Fibroblast Hücre Hattı)'nin Kültürasyonu ve Deneye Hazır Hale Getirilmesi	26
3.1.1. NHLF Hücrelerinin Görünür Hale Getirilmesi	28
3.1.2. GFP ⁺ MDA-MB-231 ve Red ⁺ NHLF Hücreleri ile Sferoid Oluşturulması	29
3.2. MDA-MB-231 ve NHLF Hücreleriyle Sferoid Oluşturulması ve Hücrel Mimarinin Doğrulanması	31
3.2.1. Heterotipik Sferoid Oluşumu	31
3.2.2. Sferoidlerde Hücrel Yapının Alfa-Düz Kas Aktin (α -SMA) ile Değerlendirilmesi	32
3.3. MDA-MB-231 ve NHLF Heterotipik Sferoidlerinde TAS-115 ve DOXO'nun Etkinliğinin Değerlendirilmesi	33
3.3.1. TAS-115'in Hazırlanması ve Sferoidlere Eklenmesi	33
3.3.2. TAS-115'in Oluşturulan Sferoidler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	34
3.3.3. DOXO'nun Hazırlanması ve Sferoidlere Eklenmesi	35
3.3.4. DOXO'nun Oluşturulan Sferoidler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	36
3.4. 3B Sferoid Modeline (GFP ⁺ MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sağkalım Yanıtlarının Değerlendirilmesi	36
3.4.1. Kaspaz 3/7 Ekspresyon Analizi	36
3.4.2. Ki67 İmmünohistokimya/İmmünofloresan (ISK/IF) Analizi	38

3.5. 3B Sferoid Modeline (GFP ⁺ MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası c-MET/HGF Aracılı mTOR Sinyalizasyonunun İmmünohistokimyasal/İmmünofloresan Olarak Değerlendirilmesi	39
3.5.1. c-MET/HGF İmmünohistokimyası	39
3.5.2. p-c-MET/HGF İmmünohistokimyası	40
3.5.3. p-mTOR İmmünohistokimyası	40
3.6. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sitokin Yanıtları Üzerine Etkisinin İnsan Luminex (R) Buluş Analizi ile Değerlendirilmesi	41
3.6.1. Örnek Toplama ve Depolama	41
3.6.2. Kit Bileşenleri ve Örneklerin Analiz için Hazırlanması	42
3.6.3. Kit Analizi	44
3.7. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere Hücrelerinin İnvazyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3B Ortamda Değerlendirilmesi	45
3.7.1. 3B İnvazyon Analizi için Cihaz Yapımı	45
3.7.2. 3B İnvazyon Analizi için Hidrojel Hazırlığı	46
3.7.3. 3B İnvazyon Analizi için Sferoid Deney Modelinin Oluşturulması	47
3.7.4. Sferoidlerin Cihazlara Aspirasyon Destekli 3B Biyobasımı ve TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması	47

3.8. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere hücrelerinin Migrasyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3BVaskülerize Ortamda Değerlendirilmesi	49
3.8.1. 3B Perfüzyon Sistemi için Cihaz Yapımı	49
3.8.2. 3B Perfüzyon Sistemi için Hidrojel Hazırlığı	50
3.8.3. tdTomato ⁺ HUVEC Hücrelerinin Kültürasyonu ve Deneye Hazır Hale Getirilmesi	50
3.8.4. Sferoidlerin Perfüzyon Cihazına Aspirasyon Destekli 3B Biyobasımı	51
4. BULGULAR	
4.1. GFP ⁺ MDA-MB-231 ve Red ⁺ NHLF Hücreleri ile Sferoid Oluşturulması	55
4.2. Sferoidlerde Hücresel Yapının Alfa Düz Kas Aktin (α -SMA) ile Değerlendirilmesi	55
4.3. GFP ⁺ MDA-MB-231 ve NHLF Heterotipik Sferoidlerinde TAS-115 ve DOXO'nun Etkinliğinin Değerlendirilmesi	56
4.3.1. TAS-115'in Oluşturulan Sferoidler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	56
4.3.2. DOXO'nun Oluşturulan Sferoidler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	60
4.3.3. TAS-115 ve DOXO'nun Sferoidler Üzerine Birlikte Etkisinin Belirlenmesi	62
4.4. 3B Sferoid Modeline (GFP ⁺ MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sağkalım Yanıtlarının Değerlendirilmesi	64
4.4.1. Kaspaz 3/7 Ekspresyon Analizi	64
4.4.2. Ki67 İmmünohistokimya/İmmünofloresan (ISK/IF) Analizi	65

4.5. 3B Sferoid Modeline (GFP ⁺ MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası c-MET/HGF Aracılı mTOR Sinyalizasyonunun İmmünohistokimyasal/İmmüno Floresan (ISK/IF) Olarak Değerlendirilmesi	67
4.5.1. c-MET/HGF İmmünohistokimyası	67
4.5.2. p-c-MET/HGF İmmünohistokimyası	70
4.5.3. p-mTOR İmmünohistokimyası	72
4.6. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sitokin ve Kemokin Yanıtları Üzerine Etkisinin İnsan Luminex (R) Buluş Analizi ile Değerlendirilmesi	73
4.6.1. HGFR/c-MET Analizi	73
4.6.2. VEGF- α Analizi	74
4.6.3. TNF- α ve IL-6 Analizi	75
4.6.4. IL-1 α Analizi	77
4.7. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere hücrelerinin İnvazyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3B Ortamda Değerlendirilmesi	78
4.8. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere hücrelerinin Migrasyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3BVaskülerize Ortamda Değerlendirilmesi	79
5. TARTIŞMA	82

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	99



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	İnsan PMA Kiti içerisinde yer alan Standart Kokteyl bileşenleri ve Kalibratör Seyreltici ile Standart-1 oluşturulması için gereken miktarlar	42
Tablo 3.2.	Kit analizi oluşturulan 96-kuyucuklu tabaklarda standart ve örnekler için deney planı	44



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Meme dokusuna ait yapılar	5
Şekil 2.2.	Normal ve malign hücre bölünmesi	6
Şekil 2.3.	Meme kanserinin moleküler alt tiplerine sınıflandırılması	8
Şekil 2.4.	Tümör metastazındaki adımları özetleyen akış diyagramı	10
Şekil 2.5.	Kanser hücrelerinin primer tümörden akciğere metastazı	12
Şekil 2.6.	Fizyolojik ve onkojenik RTK aktivasyon mekanizmaları	14
Şekil 2.7.	c-MET reseptörünün yapısı	16
Şekil 2.8.	HGF'nin yapısı ve olgunlaşması	17
Şekil 2.9.	Sağlıklı hücrelerde HGF'nin dimerizasyonunun ardından c-MET'in otoposforilasyonu ve devamında yer alan sinyal yollarının aktivasyonunun şematik diyagramı	18
Şekil 2.10.	c-MET/HGF aracılı sinyal yolları	20
Şekil 2.11.	c-MET/HGF aracılı sinyal yollarının terapötik hedeflenmesi ve TAS-115 gibi inhibitör ajanların yolak üzerine etkisi	22
Şekil 3.1.	GFP+MDA-MB-231 hücrelerinin ışık ve konfokal mikroskoptaki görüntüsü	26
Şekil 3.2.	NHLF hücrelerinin morfolojik görüntüsü	27
Şekil 3.3.	CellTracker Red CMTPX floresan boya kullanılarak kırmızı işaretlenen NHLF hücreleri	29
Şekil 3.4.	Thoma lamında canlı hücre sayımı	30

Şekil 3.5. GFP+MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin sferoid oluşturmak üzere birlikte kültürasyonu	31
Şekil 3.6. GFP+MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin 1. ve 2. gün görüntüsü	32
Şekil 3.7. Sferoidlerin oluşturulmasının ardından farklı konsantrasyonlarda TAS-115'in uygulanması ve alamar mavisi canlılık testi ile doz taramalarına ait deney basamakları	34
Şekil 3.8. Caspase-Glo® 3/7 3D kit protokolünün şematik diyagramı	37
Şekil 3.9. Standart kokteylleri ve standartların hazırlanışı	43
Şekil 3.10. Ultimaker 2 ile 3B olarak basılan cihazlar	46
Şekil 3.11. 3B biyobasım için DMEM içerisinde hazırlanan sferoidlerin bulunduğu petri kabı ve hidrojel ile kaplı cihaz	48
Şekil 3.12. 3B biyobasım sonrası sferoidden ayrılan hücreler tarafından işgal edilen toplam alan ve invazyon derecesinin hesaplanması	49
Şekil 3.13. 3B perfüzyon sistemi için hazırlanan perfüzyon cihazları	50
Şekil 3.14. Aspirasyon destekli biyobaskı kullanılarak oluşturulan 3B perfüze edilebilir heterotipik tümör modeli	52
Şekil 3.15. Perfüzyon cihazları için oluşturulan harici pompa sistemi	53
Şekil 4.1. GFP+MDA-MB-231 (yeşil) ve NHLF (kırmızı) hücrelerinin birlikte kültürasyonu sonucu oluşan heterotipik sferoidin 1. ve 3. gününe ait görüntü	55
Şekil 4.2. GFP+MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin α -SMA (kırmızı) ve Hoechst (mavi) immünofloresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri	56

- Şekil 4.3.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat TAS-115 uygulaması sonrası ZEISS Axio floresan mikroskopuyla alınan beyaz alan ve GFP görüntüleri 58
- Şekil 4.4.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat TAS-115 uygulaması sonrası alınan sferoid görüntülerinde kontrol grubu ile normalize edilmiş GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analiz grafikleri 59
- Şekil 4.5.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleriyle oluşturulan sferoidlerde farklı konsantrasyonlarda TAS-115'in 24, 48 ve 72 saat sonundaki etkisinin kontrol grubuna oranlanarak belirlenen canlı hücre oranları 60
- Şekil 4.6.** Sferoidlerin oluşturulmasının ardından farklı konsantrasyonlarda TAS-115 uygulaması ve alamar mavisi canlılık testi sonucunda TAS-115'in en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 212.5 µM olduğunu belirten grafik 60
- Şekil 4.7.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat DOXO uygulaması sonrası ZEISS Axio floresan mikroskopuyla alınan beyaz alan ve GFP görüntüleri 61
- Şekil 4.8.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat DOXO uygulaması sonrası GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analiz grafikleri 62
- Şekil 4.9.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat TAS-115 ve 1.5 µM DOXO uygulaması sonrası ZEISS Axio floresan mikroskopuyla alınan beyaz alan ve GFP görüntüleri 63

- Şekil 4.10.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda TAS-115 ve 1.5 µM DOXO'nun 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonrası GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analiz grafikleri 64
- Şekil 4.11.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere TAS-115 ve DOXO'nun etkin dozlarının 24 saat uygulanması sonrası yapılan kaspaz 3/7 aktivite testi sonucu istatistiksel analiz grafikleri 65
- Şekil 4.12.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin Ki67 ve Hoechst immünofloresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri 66
- Şekil 4.13.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası Ki67 immünofloresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler sonucu elde edilen grafik 67
- Şekil 4.14.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin c-MET, HGF ve Hoechst immünofloresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri 68
- Şekil 4.15.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası c-MET immünofloresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafikler 69
- Şekil 4.16.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası c-MET ile eş zamanlı yapılan HGF immünofloresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafikler 69

- Şekil 4.17.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin p-c-MET, HGF ve Hoechst immünofloresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri 70
- Şekil 4.18.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası p-c-MET immünofloresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik 71
- Şekil 4.19.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası p-c-MET ile eş zamanlı yapılan HGF immünofloresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik 71
- Şekil 4.20.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin p-mTOR ve Hoechst immünofloresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri 72
- Şekil 4.21.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası p-mTOR immünofloresan reaksiyonunun ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik 73
- Şekil 4.22.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki c-MET seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik 74
- Şekil 4.23.** GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki VEGF- α seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş

analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değ erlendirilmeler sonucu elde edilen grafik 75

Şekil 4.24. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki TNF-  seviyesinin İnsan Luminex (R) Bulu  analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değ erlendirilmeler sonucu elde edilen grafik 76

Şekil 4.25. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki IL-6 seviyesinin İnsan Luminex (R) Bulu  analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değ erlendirmeler sonucu elde edilen grafik 76

Şekil 4.26. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki IL-1  seviyesinin İnsan Luminex (R) Bulu  analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değ erlendirmeler sonucu elde edilen grafik 77

Şekil 4.27. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası kanser hücrelerinin ECM invazyonuna karşı etkisinin çoklu foton mikroskop görüntüleri 78

Şekil 4.28. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası invazyon alanı ile sferoid alanı arasındaki fark alınarak belirlenen invazyon derecesinin grafiği 79

Şekil 4.29. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte perfüzyonu sonrası kanser

hücrelerinin migrasyon ve metastaz potansiyeline karşı etkisinin çoklu
foton mikroskop görüntüleri 80

Şekil 4.30. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin,
TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte perfüzyonu sonrası
migrasyon ve metastaz potansiyelinin belirlenmesi için hesaplanan
GFP yoğunluğunun grafiği 81



SİMGELER ve KISALTMALAR

Akt	: Protein Kinaz B (PKB)
ATM	: Ataksi Telenjiaktazi Mutasyona Uğramış Gen
ATR	: Ataksi Telenjiaktazi ve Rad3 İlişkili Protein
BRCA1	: Meme Kanseri Geni 1
BRCA2	: Meme Kanseri Geni 2
BSA	: Sığır Serum Albumin
CHK2	: Kontrol Noktası Kinaz 2
DMEM	: Dulbelco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOXO	: Doksorubisin
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGM-2MV	: Mikrovasküler Endotelyal Hücre Büyüme Medyumu
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ECM	: Hücre Dışı Matriks
ER	: Östojen Reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GFP	: Yeşil Floresan Protein
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HGFR	: Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü
IDC	: İnvaziv Duktal Adenokarsinom
IL-1α	: İnterlökin-1 α

IL-6	: İnterlökkin-6
MAPK	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
MRS	: MET ile İlişkili Dizi Alanı
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
NGS	: Normal Keçi Serumı
NHLF	: Normal İnsan Akciğer Fibroblast Hücresi
PDGFR	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PDL	: Poli-D-Lizin Hidrobromid
PI3K	: Fosfoinozid-3-Kinaz
PLA	: Poli Laktik Asit
PR	: Progesteron Reseptörü
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SEMA	: Semaforin Alanı
SPH	: Serin Proteaz Homoloji Alanı
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
TME	: Tümör Mikroçevresi
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
TP53	: Tümör Protein 53
ÜNMK	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenini oluşturmaktadır (Wilkinson ve Gathani, 2022). Meme kanserinde hastaların mortalitesini etkileyen ana etken, primer tümörden ziyade metastazlardır. Metastaz, tümör mikroçevresinin (TME) önemli katkıda bulunduğu çok faktörlü bir süreçtir. TME'yi ekstraselüler matriks (ECM), fibroblastlar, adipositler, endotelial hücreler ve immün hücreleri oluşturmaktadır. TME, tümör invazyonu, anjiyogenez, stromal hücrelerdeki genetik değişiklikler ve immün hücrelerinin aktivasyonu gibi süreçlerde aktif rol oynamaktadır (Habanjar ve ark., 2023). Kanser hastaları için hastalığın en tehlikeli ve ölümcül evreleri, invazyon ve metastaz aşamalarıdır. Tümör infiltrasyon yeteneği kazandığında, hızla yeni odaklar oluşturup vücut geneline yayılabilmektedir (Gkretsi ve Stylianopoulos, 2018). İnvazyon-metastaz yolları; kanser hücreleri ile stromal kökenli sitokinler arasındaki etkileşimleri de içeren, çeşitli yolları ve çok sayıda protein ile sinyal molekülünü içermektedir. Bu karmaşık süreçlerin her biri, gen ekspresyonundaki değişimlerle şekillenmekte olup, kanserin ilerleyişi ve metastazında kritik bir rol oynamaktadır (Petri ve Klinge, 2020). Bu süreçte öne çıkan önemli faktörlerden biri, hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR) olarak da bilinen ve pro-onkogenik bir protein olan c-MET'tir (Jabbarzadeh Kaboli ve ark., 2024). c-MET'in hücre yüzey reseptörü için ligandı olan hepatosit büyüme faktörü (HGF), güçlü bir mitojenik düzenleyici olarak işlev görür. Kanser hücrelerinde, hücreler veya çevredeki interstisyel dokudan salgılanan HGF'nin reseptöre bağlanması, c-MET'in fosforilasyonunu indükler. Fosforile c-MET, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 gibi birçok hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedir. Bu yollar, kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve anjiyogenez gibi işlevlerini tetiklemektedir (Cheng ve Guo, 2019; Hu ve ark., 2018; Navis ve ark., 2015). PI3K/Akt/mTOR yolunun anormal aktivasyonu, meme kanserinde kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını desteklemektedir (Massihnia ve ark., 2016).

c-MET'in kanser progresyonundaki rolü göz önüne alındığında, bu proteinin hedeflenmesi kanser tedavisinde önemli bir odak haline gelmektedir. 2013 yılında geliştirilen ve kimyasal olarak pamufetinib olarak bilinen TAS-115®, c-MET, vasküler

endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörlerini (PDGFR) inhibe eden çoklu reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörü olarak tanımlanmaktadır (Doi ve ark., 2020). TAS-115, c-MET, VEGFR, PDGFR ve diğer reseptörlerin fosforilasyonunu engelleyerek ilgili hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu bloklar ve bu durum, kanser hücresi proliferasyonunun ve dolayısıyla invazyon ve metastazın baskılanmasına yol açmaktadır (Silva Paiva ve ark., 2020; S. Yamada ve ark., 2017). TAS-115'in, insan gastrik kanseri (Doi ve ark., 2020; L. Zhao ve ark., 2013), akciğer kanseri (Kunii ve ark., 2015) ve sinovyal sarkomda anti-tümör etkileri olduğu bilinmektedir (S. Yamada ve ark., 2017). Bununla birlikte, TAS-115'in c-MET/HGF etkileşimi aracılı meme kanseri ve metastazı üzerinde etkilerine dair bir veri henüz literatürde yer almamaktadır.

Kanser araştırmalarında klinik çalışmalar, kanser hücrelerini incelemek ve anti-kanser ilaçları test etmek için en etkili yöntemlerden biri olsa da etik ve güvenlik kısıtlamaları bu yöntemin yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle, kanser araştırmalarında pre-klinik tümör modelleri sıklıkla tercih edilmekte ve *in vitro* kültür modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, iki boyutlu (2B) hücre kültürlerinde morfoloji ile hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinden elde edilen yanıtların değerlendirilmesi, *in vivo* tümör büyüme ortamını tam olarak yansıtmamaktadır. 2B tek tabakalı hücresel modeller, *in vivo* ortamdaki doğal 3-boyutlu (3B) mikroçevresel özelliklerden yoksundur (Dey ve ark., 2022) ve bu durum pre-klinik çalışmalarda potansiyel olarak çelişkili sonuçlara yol açabilmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, oldukça özgün olan çalışmamızda, c-MET yolak inhibisyonunun, aşağı akış yollarını etkileyerek kanser hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu yavaşlattığı hipotezine dayanarak, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajan olan DOXO ile birlikte veya yalnız başına TAS-115 inhibitörünün etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Bu araştırma, kanser hücreleri ve akciğer fibroblast hücreleri ile oluşturulmuş heterotipik sferoidlerde *in vivo* akciğer metastazını taklit ederek 3B *in vitro* üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) modelinde gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

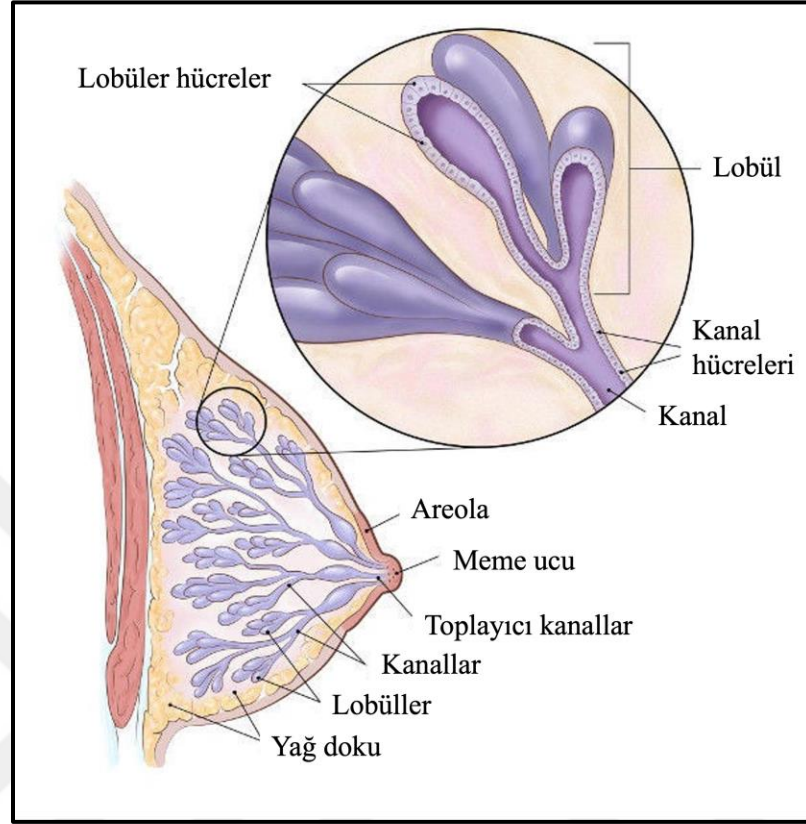
Kanser, hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrol edildiği mekanizmalarda meydana gelen mutasyonlar sonucunda, hücrenin proliferasyonu ve apoptozu arasındaki homeostatik dengenin kaybolması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu mutasyonlar, tümörögenez olarak adlandırılan kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünme sürecini başlatmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücrelerinin özellikleri, bu mutasyonlar tarafından belirlenmektedir. Apoptoz, hücre döngüsü ve DNA onarımı mekanizmalarında kritik rol oynayan genlerde, tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar; hücrelerde malign fenotipin oluşumunu tetiklemektedir (Liu ve ark., 2022). Bununla birlikte; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, mitojenik aktivite gibi hücresel sinyal iletim yollarında değişimler de tümörögenez sürecinde önemli rol oynamaktadır (Cheung ve Vousden, 2022).

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak, hücre siklusunda büyüme baskılayıcı uyarılardan kaçabilmekte ve döngüde kontrol kaybına yol açabilmektedir. Normal hücreler, hücre hasarı veya genetik bozulmalar durumunda apoptoz sürecine girerken, kanser hücreleri apoptozu engelleyerek sınırsız replikasyon yoluyla kontrolsüz bir şekilde varlıklarını sürdürebilmektedir. Kanser hücreleri ayrıca immün sisteme karşı direnç geliştirme, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyon moleküllerinin ifadesinin kaybolması sonucunda, normal dokulara invazyon ve metastaz yapma potansiyeline sahiptir. Bu hücreler, anjiyogenezi uyarak, daha fazla besin ve oksijen temin eder; böylece hayatta kalma sürelerini uzatırlar (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu özellikler, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine, çoğalmasına ve vücutta yayılmasına olanak tanır. Bu nedenle, kanser hücrelerinin bu özellikleri, kanser araştırmaları ve tedavi stratejilerinin odak noktası haline gelmiştir.

2.2. Meme Kanseri

Meme bezi, toraksın ön duvarında yer alan modifiye t b loalveolar apokrin ter bezleridir ve aktif yağ dokusu içinde bulunan çift katmanlı epitelyal hücrelerden oluşmaktadır. Bu epitelyal tabaka, Cooper ligamentleri olarak bilinen yoğun fibröz bağ dokusu tarafından desteklenmektedir (Hassiotou ve Geddes, 2013; Macias ve Hinck, 2012; Musumeci ve ark., 2015). Epitelyal tabaka, luminal küboidal hücreler ve miyoepitelyal hücreler olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşur. Luminal küboidal hücreler; epitelin iç kısmında yer almakta ve laktiferöz kanalları döşemektedir. Bu kanallar, meme ucundan yayılarak areolanın hemen altında bulunan laktifer sinüslere kadar genişler. Laktiferöz kanalların daha fazla dallanmasıyla loblar ve lobüller oluşur. Her lobül, terminal duktal lobüler üniteler olarak bilinen küçük ampül şeklindeki bezlerle sonlanır ve burada prolaktine yanıt olarak süt üretilir. Epitelyal tabakanın dış kısmı, miyoepitelyal hücrelerden oluşmaktadır. İç şeklindeki bu hücreler, düz kas hücresi özellikleri gösterir ve laktasyon sırasında sütün dışarı atılması sürecinde önemli rol oynamaktadır (**şekil 2.1.**).

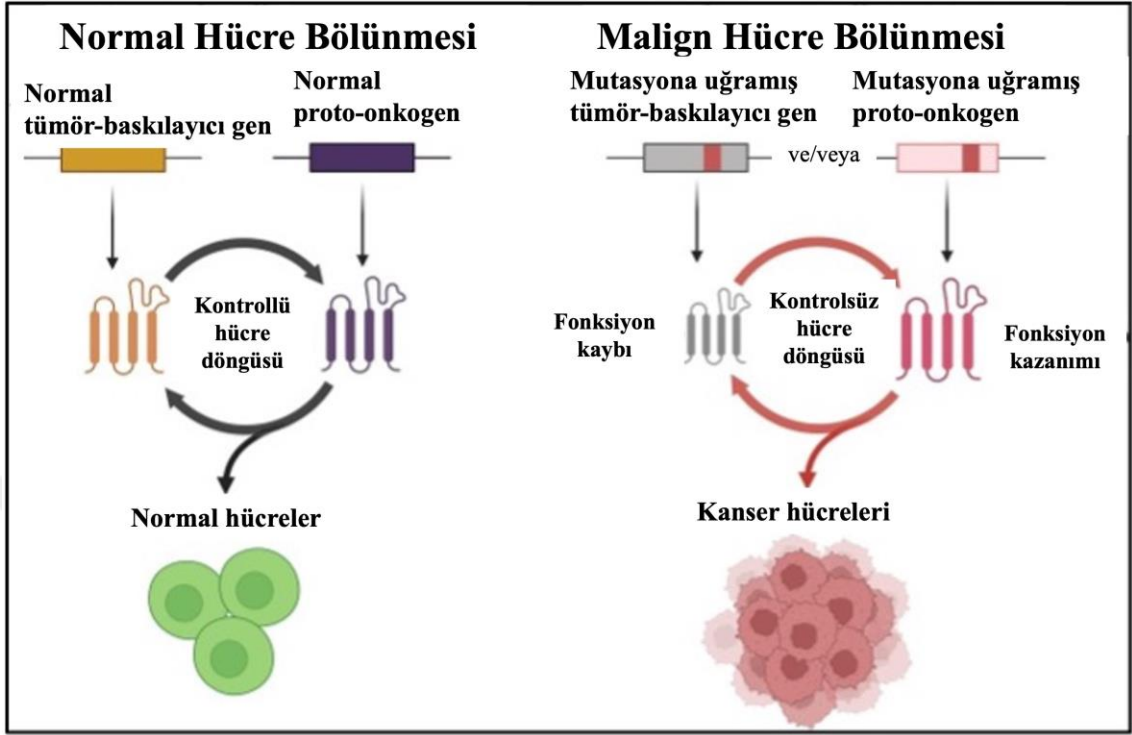
Meme kanallarında ve lob llerinde meydana gelen anormal hücresel değişimler ve kontrolsüz proliferasyon, meme kanserinin gelişimine yol açmaktadır.



Şekil 2.1. Meme dokusuna ait yapılar gösterilmektedir (cancer.org | 1.800.227.2345).

Meme kanseri, tüm kanser vakalarının %30'unu oluşturan ve kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (Hong ve Xu, 2022). Yaş ilerledikçe kanser riski artmakta ve bazı genetik olmayan faktörler geniş varyasyonlara neden olabilmektedir (Britt ve ark., 2020).

Malignite, germinal veya somatik hücrelerdeki anormal ve/veya kalıtsal genetik mutasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal meme kanserine yol açan en yaygın mutasyonlar arasında DNA hasar onarım genlerini etkileyen; *BRCA1*, *BRCA2* ve *TP53* genleri yer almaktadır (Feng ve ark., 2018; Sung ve ark., 2021). *BRCA1* geni, hücre döngüsünün geç G1 fazında ve S fazı sırasında transkribe edilir. DNA hasarına yanıt olarak, tümör baskılama yollarında yer alan Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) ve Ataksi telejiaktazi ve Rad3 ilişkili (ATR) proteinleri fosforilasyon yoluyla hızla aktive ederler. Bu aktivasyonun ardından, *BRCA1* hücre bölünmesinden önce S ve G2/M kontrol noktalarında hücre döngüsünü durdurur. Bu nedenle *BRCA1*'in genel işlevi, onkogenlerin inhibisyonu ve tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonudur (**Şekil 2.2.**).



Şekil 2.2. Normal ve malign hücre bölünmesi gösterilmektedir. Normal hücre bölünmesinde, hücre döngüsü kontrol altındadır. Hücreler, büyük ve yoğunlaşmış nükleusları ile iyi farklılaşmıştır. Malign hücre bölünmesinde ise mutasyonlar sonucunda hücre döngüsünde kontrol noktaları çalışmamaktadır (Karim ve ark., 2023).

2.2.1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanseri, *in situ* karsinom ve invaziv (infiltratif) karsinom olmak üzere iki ana histolojik alt tipe ayrılır. İnvaziv olmayan meme kanseri olarak bilinen *in situ* karsinom, kaynaklandığı bölgeye göre duktal ya da lobüler olarak sınıflandırılır. Duktal karsinomlar meme kanallarından, lobüler karsinomlar ise meme dokusunun lobüllerinden kaynaklanmaktadır. İnvaziv karsinomlar arasında ise infiltrate duktal, duktal/lobüler, invaziv lobüler, tübüler, kolloid, medüller ve papiller karsinom gibi alt tipler yer alır. Tanı konulan meme kanseri vakalarının yaklaşık %70-80'ini oluşturan invaziv duktal adenokarsinom (IDC), en yaygın invaziv meme kanseri alt tipidir (Almansour, 2022).

Meme kanseri, moleküler düzeyde heterojen bir kanser tipi olarak kabul edilmektedir ve gen ifadesi profili analizleri, kanserin farklı alt tiplerini ortaya çıkarmıştır. Bu sınıflandırma, daha etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

Önemli moleküler belirteçler arasında östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), hücre proliferasyon belirteci (Ki67) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) bulunur (Chen ve ark., 2018).

Meme kanseri 4 farklı alt tipe ayrılmaktadır:

Luminal A: Meme kanserlerinin %50-60'ını oluşturur ve en sık görülen alt tiptir. ER+, PR+, düşük Ki67 ve HER2- indeksine sahiptir. Bu hastalarda hormon tedavisi yaygın olarak kullanılır (Łukasiewicz ve ark., 2021a; Zubair ve ark., 2021) (**Şekil 2.3.**).

Luminal B: Meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturur. İmmünohistokimyasal olarak ER+, HER2- ve yüksek Ki67 veya ER+ ve HER2+ tümörlerdir. Luminal A tipine göre daha agresiftir ve nüks oranı daha yüksektir. Hormon tedavisi ve kemoterapi bu tip kanser hastalarında kullanılır (Łukasiewicz ve ark., 2021a; Zubair ve ark., 2021) (**Şekil 2.3.**).

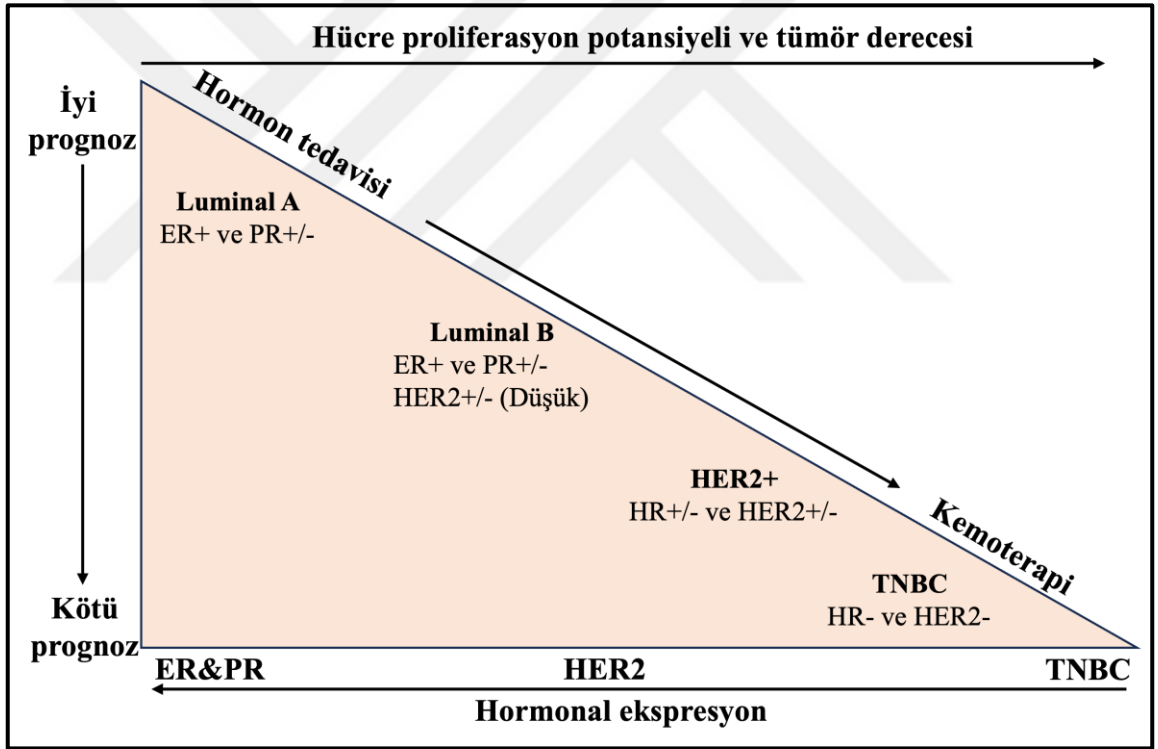
HER2 (+) Meme Kanseri: Meme kanserlerinin %15-20'sinde görülür. ER-, PR- ve HER2+ tümörlerdir. Yüksek farklılaşma yeteneği ve hızlı metastaz yapma eğilimi nedeniyle prognozu kötüdür, ancak anti-HER2 tedavisine iyi yanıt verir (Waks ve ark., 2019; Zubair ve ark., 2020) (**Şekil 2.3.**).

Bazal Benzeri (Üçlü Negatif Meme Kanseri- ÜNМК- TNBC): En agresif tip olan ÜNМК, tüm meme kanseri tiplerinin %15-20'sini oluşturmaktadır ve BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarıyla sıkça ilişkilidirler (Łukasiewicz ve ark., 2021a).

ÜNМК'li hastaların sağkalım süresi diğer meme kanseri alt tiplerinden daha kısa olup; tanıdan sonraki ilk 5 yıl içinde ölüm oranı %40'tır. Oldukça invaziv bir kanser türü olan ÜNМК hastalarının yaklaşık %46'sında metastaz görülmekte ve metastaz sonrası ortalama sağkalım süresi ise yaklaşık 13 ayla sınırlı kalmaktadır (Yin ve ark., 2020). ÜNМК, ER, PR ve HER2'yi ekspre etmediği için hormonal ya da hedefe yönelik tedavisi olmayan tek meme kanseri türüdür (Shi ve ark., 2018; Zagami ve Carey, 2022a; Zubair ve ark., 2021) (**Şekil 2.3.**).

Günümüzde ÜNМК için kullanılan mevcut tedavi diğer meme kanseri alt tiplerinde olduğu gibi tümörün ve bölgesel metastaz alanlarının cerrahi rezeksiyonu, paklitaksel ve

dosetaksel gibi taksan bazlı terapötikler ve DOXO gibi antrasiklin gruplarını içeren kemoterapi ile sınırlı kalmaktadır. ÜNMK'li hastalarda cerrahi rezeksiyon sonrası nüks oranı %25 olup; bu hastaların kemoterapiye yanıtı diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla çok daha kötüdür (Yin ve ark., 2020). ÜNMK'de tedavi seçeneklerinin sınırlı olması, ÜNMK'yi kötü prognoza yönlendiren durumu, tümörün oldukça agresif, invaziv ve metastatik bir karakter kazanmasına sebep olmaktadır (Griffiths ve Olin, 2012; Zagami ve Carey, 2022a). ÜNMK'de hormonal ve hedefe yönelik tedavilerin eksikliği, kemoterapötiklere karşı düşük yanıt alınması, hızlı ve yüksek nüks oranlarına sahip olması nedeniyle, günümüzde ÜNMK tedavisi için yeni ajanlar ve tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Y. Li ve ark., 2022).



Şekil 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tiplerine sınıflandırılması gösterilmektedir. Meme kanseri hormon ekspresyonu, tümör derecesi ve hücresel proliferasyon ile ters orantılıdır. Luminal A alt tipi endokrin tedaviye olumlu yanıt vererek daha iyi bir prognoz sergilemektedir. Buna karşılık, TNBC hormonal ekspresyon göstermemekte, yoğun mitotik aktiviteye sahip daha yüksek evreli ve nükleer dereceli tümör ve kötü prognoz göstermektedir. (ER; östrojen reseptörü, HER2; insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2, PR; progesteron reseptörü, TNBC; üçlü negatif meme kanseri) (Zubair ve ark., 2021).

2.2.2. Meme Kanseri Metastazı

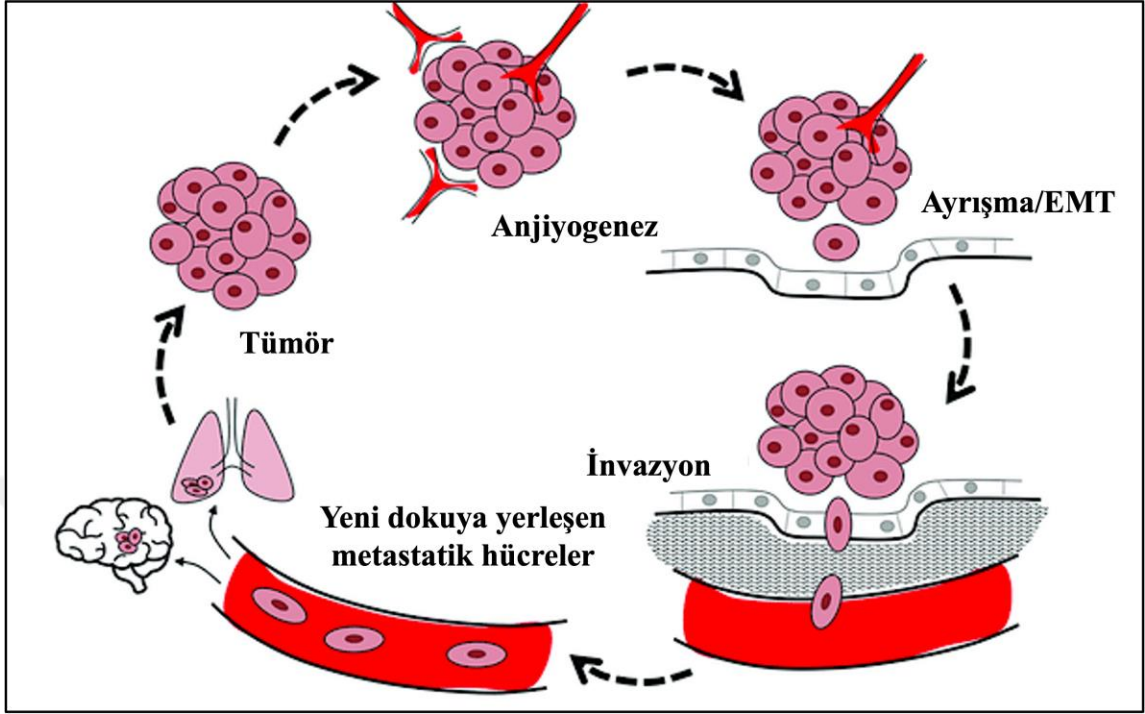
Meme kanserinde metastaz, hastalığın en ölümcül aşamasını oluşturmakta ve hasta mortalitesinin %90'ından fazlasına neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Meme Kanserinde Metastaz: Klinik Önemi ve Mekanizmalar

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak uzak organlara yayılmasıyla tanımlanan oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte metastatik potansiyelin belirleyicileri olarak; epitel-mezenkimal geçiş (EMT), anjiyogenez, hücre dışı matriksin yeniden şekillendirilmesi, mikroRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar gibi genetik ve epigenetik düzenleyiciler ve immün sistem ile etkileşimler öne çıkmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Metastazın Başlangıcı

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılmasını ve dolaşıma katılmasını sağlayan EMT ile başlamaktadır. EMT, kanser hücrelerinin epitel özelliklerini kaybederek daha hareketli ve invaziv bir mezenkimal fenotip kazanmasını sağlamaktadır. Bu süreç, TGF- β , Wnt, ve Notch gibi çeşitli sinyal yolları tarafından indüklenir ve bu yolla kanser hücreleri, primer tümörden ayrılarak stromal dokuya göç etmektedir. EMT'nin indüksiyonu, aynı zamanda metastatik hücrelerin immün sistemden kaçışını da kolaylaştırmakta, bu da metastazın başarısında kritik bir rol oynamaktadır. EMT sonrasında, kanser hücreleri stromaya göç ederek lokal invazyon gerçekleştirmektedir (Wang ve Zhou, 2011) (**Şekil 2.4.**).



Şekil 2.4. Tümör metastazındaki adımları özetleyen akış diyagramı gösterilmektedir. Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden uzak organlara göçüdür. Doku hipoksisi olan büyük tümörler, besin ve atıkların vasküler değişimi için anjiyogeneze ihtiyaç duymaktadır. Primer kanser hücreleri, tümör kitlesinden ayrılarak, hücre dışı matrikse (ECM) invazyon ve kan veya lenf sistemlerine intravazasyon sağlayan hücre-hücre adezyonlarının kaybı da dahil olmak üzere fenotipik değişikliklere uğrarlar. Dolaşımdaki kanser hücreleri, sürecin yeniden meydana gelebileceği ikincil bölgelere yayılmak için ekstravazasyon yapmaktadır (De Ieso ve ark., 2018).

Kanser Hücrelerinin Dolaşıma Katılımı ve Uzak Organlara Yerleşimi

Vasküler sisteme giriş, metastatik hücrelerin hayatta kalabilmesi için bir diğer önemli adımdır. Bu süreçte, kanser hücreleri primer tümörden ayrılarak ECM ile olan etkileşimlerini kaybederek kan dolaşımına katılmaktadır. Dolaşımdaki bu hücreler, metastaz yapacakları organlara ulaşarak endotel hücreleriyle etkileşime girer ve yeni bir mikroniş oluşturmak için yapısal bağlantılarını yeniden düzenlerler. Bunu takiben metastatik hücreler, sekonder alanlarda sağkalım ve proliferasyonları için anjiyogenez süreçlerini başlatarak yeni damar oluşumunu tetiklemektedirler (Fares ve ark., 2020)) (Şekil 2.4.).

Mikroçevresel Faktörler ve Metastatik Nişin Oluşumu

Meme kanserinin invazyon ve metastaz süreçleri, kanser hücreleri ile çevresindeki stromal hücreler arasında gerçekleşen karmaşık etkileşim ve sinyal iletimleriyle şekillenmektedir. Bu etkileşimler, sitokinler ve diğer sinyal moleküllerinin etkisiyle gen ekspresyonunda

değişikliklere neden olmakta ve kanser hücrelerinin metastatik yeteneklerini artırmaktadır (Gkretsi ve ark., 2018). Ayrıca, metastatik hücrelerin yerleştikleri organların mikroçevresel faktörleri bu hücrelerin hayatta kalmasını ve metastatik tümörler oluşturmalarını sağlamakta kritik bir rol oynar (Jiang ve ark., 2015; Petri ve ark., 2020).

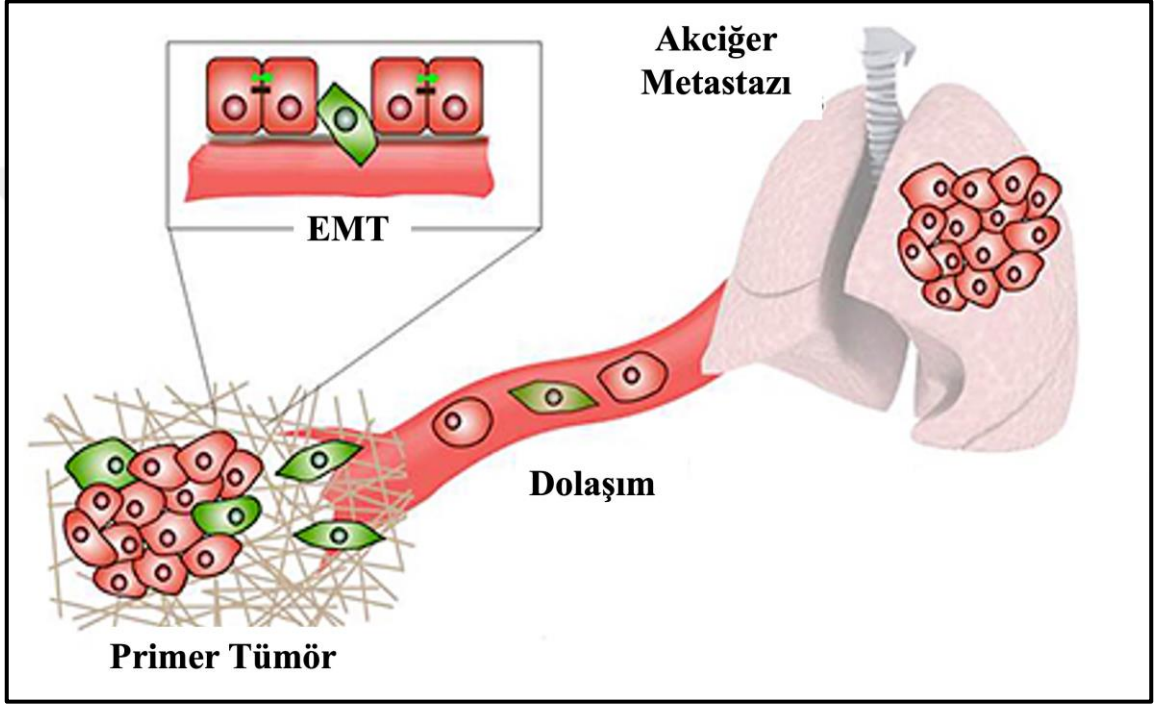
Metastatik meme kanseri; iskelet sistemi (%50-65), akciğer (%21-32), karaciğer (%15) ve beyin (%4-10) gibi organlara yayılma eğilimindedir ve bu yayılım, hastalığın agresifliği ve tedaviye yanıtı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Tungsukruthai ve ark., 2018; Madu ve ark., 2020). Ancak, hangi organın metastaza uğrayacağını belirleyen faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle, akciğere metastaz meme kanserinin yaygın bir özelliği olup, bu metastazın moleküler ve hücrel mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, hedef organların spesifik mikroçevresel faktörlerinin, dolaşımdaki kanser hücreleri için bir “niş” oluşturduğu düşünülmektedir. Bu yeni mikroçevrede metastatik hücrelerin hayatta kalabilmesi ve proliferasyonu, büyük ölçüde bu hücrelerin metastatik nişlerle olan etkileşimlerine bağlıdır. Ayrıca, son yıllarda tümör heterojenitesi ve klonal evrim teorileri, metastatik süreçlerin anlaşılmasında yeni perspektifler sunmaktadır.

Meme kanserinin farklı histolojik ve moleküler alt tipleri, belirli metastaz bölgelerine yönelik eğilimler gösterir. İnvaziv duktal adenokarsinom (IDC), genellikle akciğerler ve lenf düğümlerine metastaz yapma eğilimindeyken, invaziv lobüler adenokarsinom (ILC) daha çok ovaryum ve gastrointestinal sisteme metastaz yapar (Chen ve ark., 2018). Ayrıca, meme kanserinin moleküler alt tipleri arasında metastaz bölgeleri açısından belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) tabanlı analizler, ÜNМК hastalarının daha yüksek oranda akciğer metastazı (%32.09) gösterdiğini, HER2+ alt tiplerin ise luminal A ve B alt tiplerine kıyasla beyin ve karaciğer metastazına daha yatkın olduğunu ortaya koymuştur (%31,72) (Wu ve ark., 2017).

2.2.3. Meme Kanserinin Akciğere Metastazı

Meme kanserinin akciğere metastazı, özellikle ÜNМК alt tipinde sıkça gözlenen ve ciddi klinik sonuçlara yol açan bir durumdur. Akciğerler, meme kanseri hücreleri için yaygın bir metastatik hedef olup; bu sürecin mekanizmaları oldukça karmaşık ve çok yönlüdür (Wu ve ark., 2017).

Metastatik süreç, genellikle tümör mikroçevresindeki hücreler ile akciğer stroması arasındaki etkileşimler aracılığıyla başlamaktadır. Meme kanseri hücreleri, primer tümörden ayrıldıktan sonra venöz dolaşıma katılır ve kalp üzerinden pulmoner dolaşıma ulaşır. Bu hücreler, akciğerlerdeki mikroçevre ile etkileşime girerek invazyon ve kolonizasyon süreçlerini başlatır (Fischer ve ark., 2015)(Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Kanser hücrelerinin primer tümörden akciğere metastazı gösterilmektedir. Primer meme tümörlerindeki epitelyal (kırmızı) ve mezenkimal (yeşil) kanser hücrelerini göstermektedir. Bu tümörler, akciğerlere metastaz yaparak kırmızı nodüller oluşturur (Fischer ve ark., 2015).

Akciğerin zengin vasküler yapısı ve immün sistem ile etkileşimleri, metastatik hücrelerin metastazı için uygun bir ortam sunmaktadır. Akciğerde başarılı bir metastatik kolonizasyonun gerçekleşmesi, tümör mikroçevresinin ve akciğer stromasının destekleyici rolü ile doğrudan ilişkilidir. Akciğer stromal hücreleri, fibroblastlar, immün hücreler ve endotel hücreleri, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi moleküller metastatik hücrelerin akciğere yerleşimi ve sağkalımı için destek sağlamaktadır (Madu ve ark., 2020).

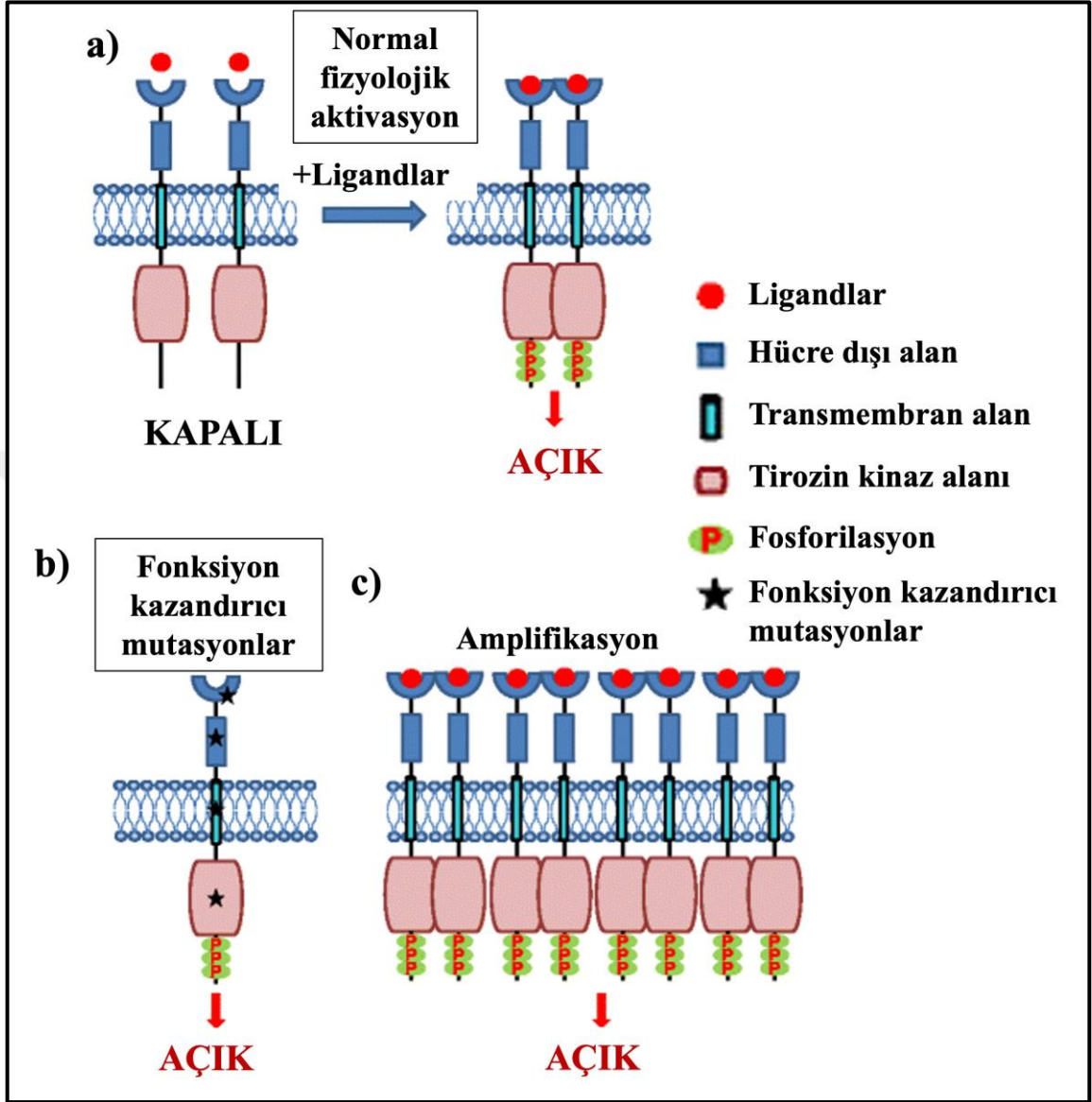
Akciğerlere metastaz, genellikle kötü prognoz ve yüksek hasta mortalitesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, metastaz süreci başlamadan erken teşhis edebilmek, hastaların yaşam süresini

uzatmak açısından kritik bir öneme sahiptir. Erken tanıya yönelik etkili yöntemlerin geliştirilmesi; metastazı önleme veya yavaşlatmaya yönelik her türlü yaklaşım hastalığın tedavisinde önem taşımaktadır. Bu bağlamda, tümör ve mikroçevresinde yer alan moleküler mekanizmaların nasıl işlediğini anlamak, ileride tedavi yaklaşımlarının şekillenmesi ve gelişmesine olanak tanıyacaktır.

2.3. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK'ler): Hücrel Sinyal İletiminde Temel Düzenleyiciler

Tirozin kinaz; ATP'deki fosforun hedef proteine transferini sağlayarak protein fosforilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bu fosforilasyon, hücreler arası sinyal iletiminde, hücrel proliferasyonda ve farklılaşmada, hücrenin canlılığı ve hareketi gibi süreçlerde anahtar rol oynamaktadır (L. Huang ve ark., 2020).

Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK'ler), hücre yüzeyinde yer alan ve hücre dışı uyarılara yanıt olarak çeşitli hücre içi sinyal yollarını tetikleyen integral membran reseptör ailesini oluştururlar (Lemmon ve Schlessinger, 2010; Trenker ve Jura, 2020). İnsan genomunda 58 farklı RTK bulunmaktadır ve bunların tümü hücre dışı ligand bağlanma alanı, tek geçişli alfa-sarmal transmembran alanı ve sitozolik proteinin tirozin kinaz alanından oluşan üç parçalı bir yapıya sahiptir. Hücre dışı ligand bağlanma alanı reseptör alt ailesine göre farklılık göstermektedir. Çoğu RTK için, özgül ligand genellikle büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çözünebilen moleküllerdir (Butti ve ark., 2018; Du ve Lovly, 2018) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Fizyolojik ve onkojenik RTK aktivasyon mekanizmaları gösterilmektedir. a) Normal fizyolojide RTK aktivasyonunun şematik gösterimidir. RTK'ler ligandların varlığında moleküller arası dimerizasyon oluşumu yoluyla aktive edilir, bu da kinaz aktivasyonu ve reseptör C-terminal kuyruğunun fosforilasyonu ile sonuçlanır. b) Bir RTK'nın çeşitli alt alanlarındaki potansiyel işlev kazanımı mutasyonlarının şematik gösterimidir. Mutasyonlar, tipik olarak ligand yokluğunda RTK'nin yapısal aktivasyonuna yol açar. c) RTK'lerin aşırı ekspresyonu (genellikle RTK geninin genomik amplifikasyonunun bir sonucu olarak) reseptörlerin yerel konsantrasyonunun artmasına yol açmaktadır (Du ve Lovly, 2018).

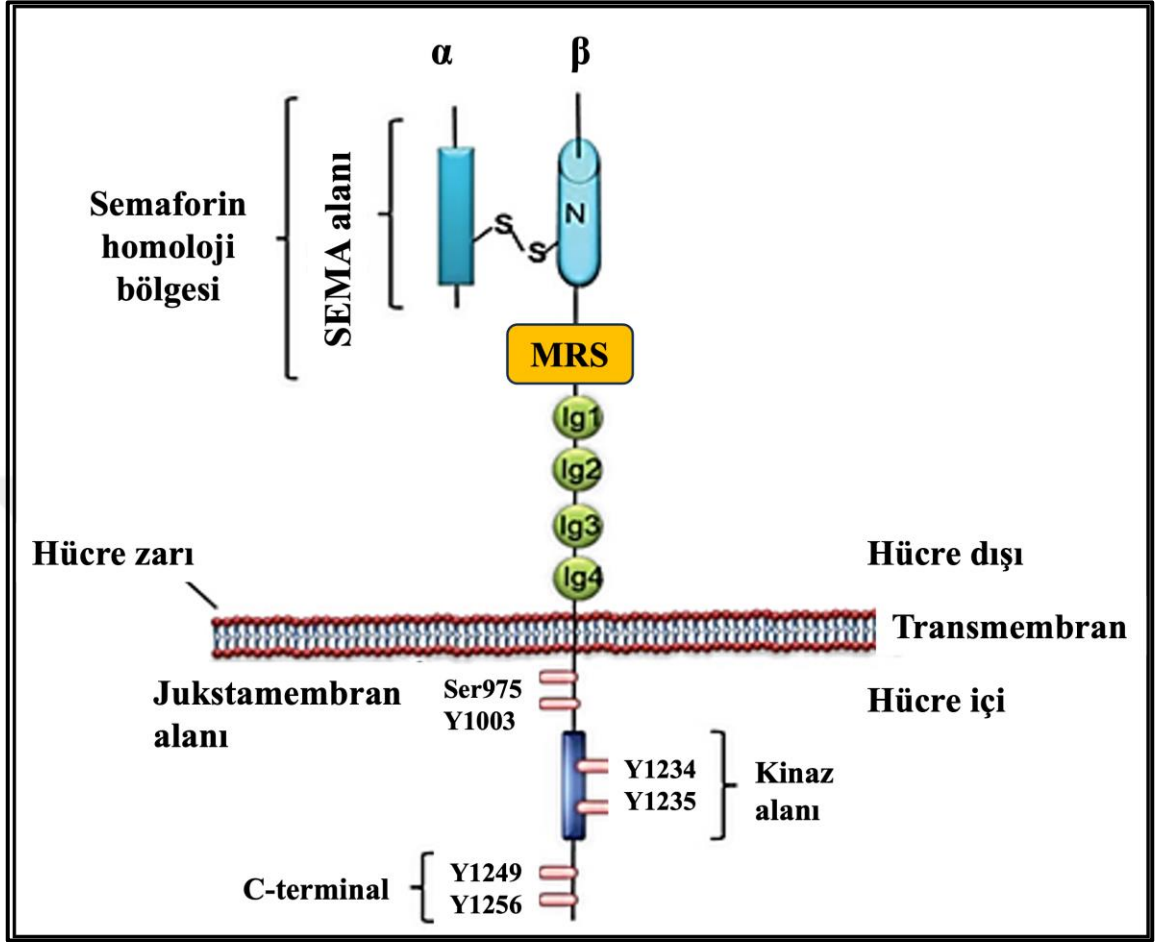
Normal hücrelerde RTK'ler, hücre büyümesi, farklılaşması, doku onarımı ve homeostazında rol oynayan temel reseptörlerdir. Dinlenme anındaki normal hücrelerde, RTK'lerin inaktif ve aktif konformasyonları dengededir. Ligand bağlanması, RTK'lerin dimerizasyonu ve otofosforilasyonunu tetikleyerek, devamındaki sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (Ebrahimi ve ark., 2023; Wintheiser ve Silberstein, 2019). Normal

fizyolojideki önemine ek olarak; RTK'lerin anormal ekspresyonu, birçok kanser türünün gelişiminde ve ilerlemesinde aktif rol oynamaktadır. Özellikle bu reseptörlerin ekspresyonlarındaki kontrolsüz artışın hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olarak kanserleşmesine neden olduğu bilinmektedir (Du ve Lovly, 2018). Bu bağlamda; tümör yüzeyinde yer alan RTK'lerin hücrenin nasıl bir hareket izleyeceğine karar verme mekanizmasına sahip olması nedeniyle değerlendirilmesi ve araştırılması oldukça önemlidir.

2.3.1. c-MET Reseptör Tirozin Kinaz

Mezenkimal-epitelyal geçiş tirozin kinaz reseptörü (c-MET) veya hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR); insan kromozomu 7 (7q21-31) üzerinde bulunan MET proto-onkogeni tarafından kodlanan RTK'dir (Ho-Yen ve ark., 2015; Van Der Steen ve ark., 2016; Y. Zhang ve ark., 2018). c-MET epitelyal, endotelyal, hematopoietik hücreler, nöronlar, hepatositler, melanositler ve kardiyomiyositler gibi çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilmektedir (Sierra ve Tsao, 2011).

c-MET, proteolitik bölünmeye uğrayan 170 kDa tek zincirli öncü protein olarak sentezlenir ve büyük hücre dışı, transmembran ve sitoplazmik parçalara sahiptir. c-MET'in hücre dışı kısmı semaforin alanı (SEMA), Met ile ilgili dizi alanı (MRS) ve immünoglobulin alanı (Ig) olmak üzere üç alan içermektedir (Baldanzi ve Graziani, 2015; Thewke ve ark., 2018). SEMA alanı, 50 kDa ekstraselüler α -alt birimi ve 145 kD transmembran β -alt biriminin N-terminal kısmından oluşmakta ve α -alt birimi (N-terminal peptidi) β -alt birimine bir disülfid köprüsü ile bağlanmaktadır. Bu alt birimler protein-protein etkileşimini kontrol etmektedir. SEMA alanını, sistein açısından zengin ve HGF reseptörü ile bağlanma sırasında reseptörün doğru yerleştirilmesinde rol oynayan MRS alanı takip etmektedir. Bu iki alan, yaklaşık 500 amino asit içeren semaforin homoloji bölgesini oluşturmaktadır. Bu parça hemen hemen tüm Met reseptör alt ailesinde bulunur. Dört Ig alan da (Ig1, Ig2, Ig3, Ig4), hücre dışında yer almaktadır. c-MET'in sitoplazmik kısmı; jukstamembran alan, tirozin kinaz alan ve C-terminal kısmını içermektedir (Kozlov ve ark., 2004). C-terminal kısmı sinyal iletimini düzenlemektedir (Maulik ve ark., 2002)(Şekil 2.7.).

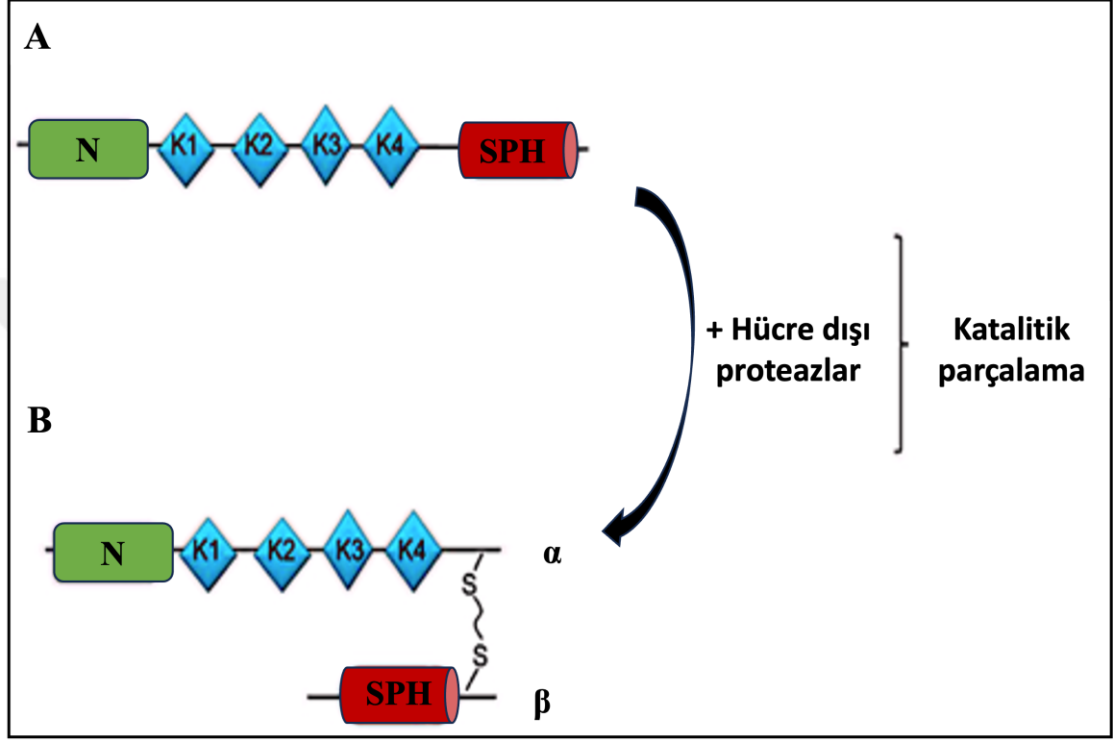


Şekil 2.7. c-MET reseptörünün yapısı görülmektedir. c-MET, hücre dışı α zinciri ve transmembran β zincirinden oluşmaktadır. Hücre dışı kısım semaforin homoloji bölgesi ve dört Ig (Ig1, Ig2, Ig3, Ig4) tekrarından oluşur. Semaforin homoloji bölgesi, SEMA alanını ve sistein açısından zengin Met ilişkili diziyi (MRS) kapsar. SEMA alanı, β zincirlerinin tüm α ve N-terminal kısmını içermektedir. Hücre içi kısım; Ser975 ve Y1003 ile Jukstamembran alanından, Y1234 ve Y1235 ile kinaz alanından; Y1249 ve Y1256 bölgeleri ile C-terminal kuyruğundan oluşmaktadır (Samra Gafarlı ve ark., 2017).

2.3.2. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

HGF, üç bağımsız araştırmacı grubu tarafından hepatosit proliferasyonu ve rejenerasyonunun bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Michalopoulos ve ark., 1984; Nakamura ve ark., 1984; Russell ve ark., 1984). Saçılma faktörü (SF) olarak da bilinen HGF; serin proteaz ailesine ait bir sitokindir ve c-MET hücre yüzey belirtecinin ligandı olarak bilinmektedir. Gen 70 kb uzunluğunda 7q21.1 kromozomu bölgesinde yer almaktadır (Ma ve ark., 2003). HGF'nin aktif bir formuna karşılık gelen 69 ve 34 kDa'lık α ve β zincirlerine sahiptir. Ağır α zinciri N-terminal alanı ve dört özel alan (K1, K2, K3, K4) olmak üzere beş alan içermektedir. Bu özel alanlar, protein-protein etkileşiminden sorumludur (Maulik ve ark., 2002). Hafif β zinciri, bir serin proteaz homoloji (SPH) alanı

oluşturmaktadır ve katalitik özelliğe sahiptir. HGF'nin N-terminal alanı ve birinci özel alanı (NK1 bölümü), reseptör-ligand bağlantısını düzenleyen temel reseptör bağlayıcı fragmandır (Graveel ve ark., 2013; Sierra ve Tsao, 2011) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. HGF'nin yapısı ve olgunlaşması gösterilmektedir. A) HGF'nin inaktif hali, B) HGF'nin olgun halidir. İnaktif tek zincirli HGF, hücre dışı bir alanda bölünme işlemi ile iki zincirli aktif formuna dönüştürülmektedir. Olgun HGF, sırasıyla 69 ve 34 kDa olmak üzere N-terminali ve dört özel alanı (K1, K2, K3, K4) ağır α zincirinden ve serin proteaz homoloji (SPH) alanı da hafif β zincirlerinden oluşmaktadır (Samra Gafarlı ve ark., 2017).

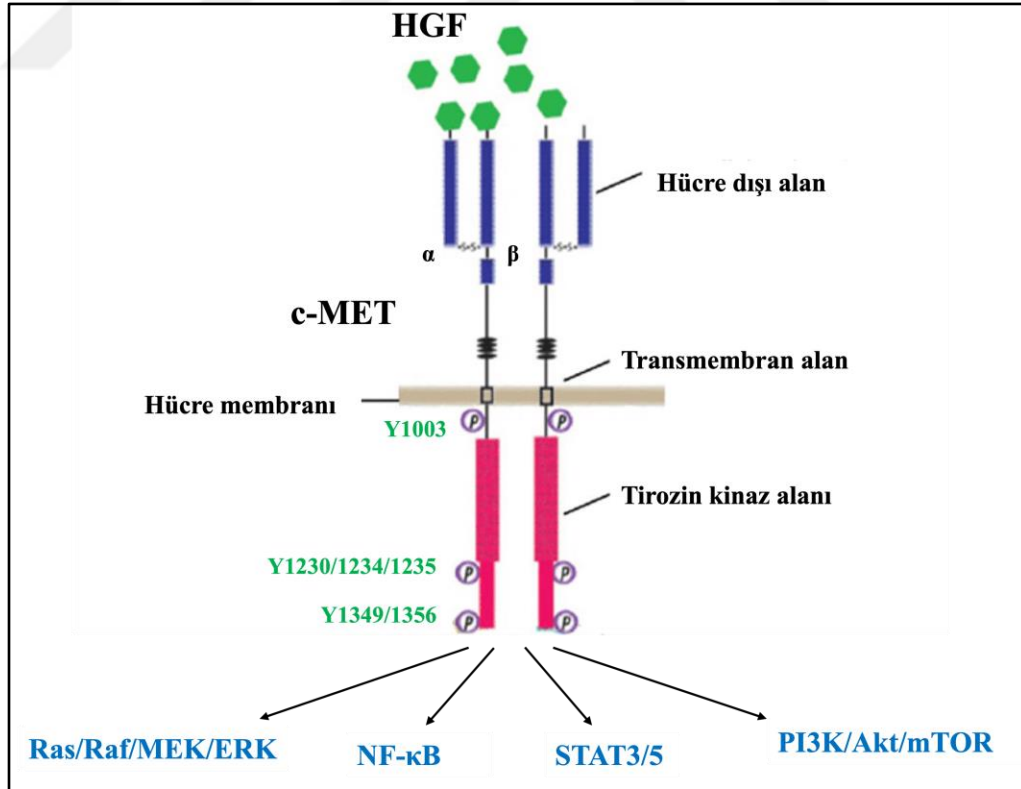
HGF, mezankimal hücrelerde inaktif tek zincirli protein olarak sentezlenmekte, hücre dışı ortamda serin proteazlar tarafından parçalanma kataliziyle aktif heterodimer formunu almakta ve takiben epitelyal ve endotelyal hücrelerdeki MET reseptörüne bağlanmaktadır (Chopra ve ark., 2018).

HGF, potansiyel bir mitojen düzenleyici olarak hareket etmekte olup; DNA replikasyonunu uyarmakta, organogenezi ve organ rejenerasyonunu kontrol etmektedir (Chopra ve ark., 2018). HGF'nin sayısız rolü sadece hepatositlerde değil, aşağı akıştaki birçok sinyal yolağında akciğer, duodenum, ovaryum, meme ve deri gibi birden fazla organa ait doku ve hücre tipinde de görülmektedir (Meng ve Chen, 2021).

2.3.3. Normal Hücrelerde c-MET/HGF Aracılı Sinyalizasyon Mekanizması

HGF'nin c-MET reseptörüne bağlanması, iki c-MET molekülünün stabil dimerizasyonuna yol açmaktadır. Bu durum, Y1230/Y1234/Y1235 tirozin kinaz alanının otofosforilasyonunu ve takiben C-terminal bölgesindeki Y1349/Y1356'nın fosforilasyonunu sağlamaktadır (Gherardi ve ark., 2012). Bu iki tirozin, c-MET ailesinin üyelerine özgü olan çok-substratlı bir yerleştirme bölgesi oluşturmaktadır.

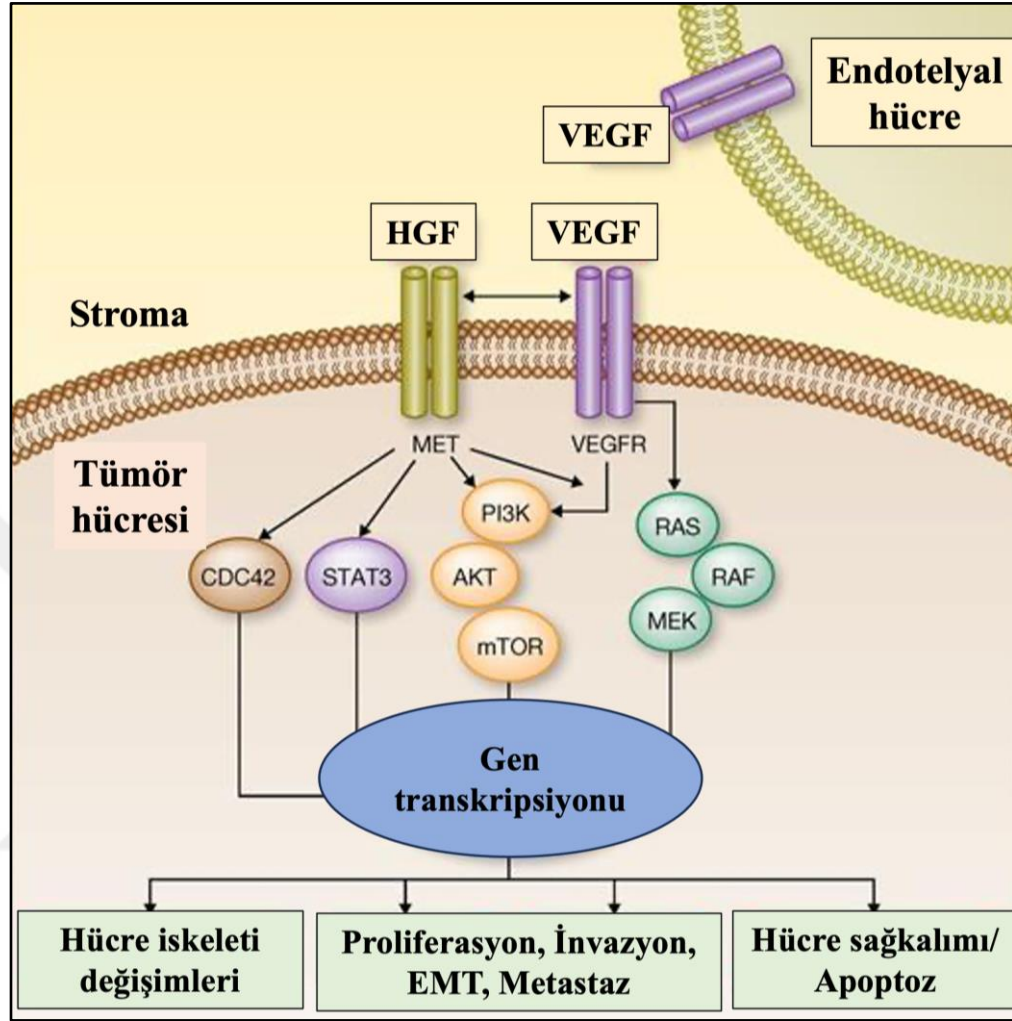
HGF c-MET'e bağlandığında önce proteinin hücre dışı alanının dimerizasyonu gerçekleşmekte olup (Orian-Rousseau ve ark., 2002, 2007; Ponta ve ark., 2003); takiben hücre içi kısmı fosforillenerek katalitik kinaz alanının ve C-terminal kısmının fosforilasyonuna yol açmaktadır (Sheth ve ark., 2008; Smyth ve ark., 2014). Fosforilasyon, Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, NF-κB ve STAT3/5 gibi hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu tetiklemektedir (Bardelli ve ark., 1994; Imura ve ark., 2016; Liang ve ark., 2017; Ponzetto ve ark., 1994; H. Zhang ve ark., 2018) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Sağlıklı hücrelerde HGF'nin dimerizasyonunun ardından c-MET'in otofosforilasyonu ve devamında yer alan sinyal yollarının aktivasyonunun şematik diyagramı gösterilmektedir (Lam ve ark., 2016).

2.3.4. Kanser hücrelerinde c-MET/HGF Aracılı Sinyalizasyon Mekanizması

Tümör mikroçevresi, hücre bölünmesi, büyümesi, hareketliliği ve morfolojisinin ana düzenleyicileri olan stroma kaynaklı faktörlerin salgılanması yoluyla karsinogenezi teşvik etmektedir (Parikh ve ark., 2014). HGF, tümör stroması tarafından salgılanan ve tümör oluşumunu tetikleyen başlıca bileşenlerden biridir (Eterno ve ark., 2014; Owusu ve ark., 2017; Parikh ve ark., 2014). c-MET ve ligandı HGF keşfedildiğinden bu yana, bu reseptör/ligand çiftinin tümör büyümesi ve metastazındaki rolünü anlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Kanser hücrelerinde c-MET/HGF sinyalizasyonu, glikolitik enzimleri, amino asit metabolizmasını, pentoz fosfatı modüle etmek ve metabolik yeniden programlamadan sorumlu PI3K/Akt/mTOR, Ras/MAPK ve STAT3 dahil olmak üzere aşağı akış sinyal yollarını indüklemek için diğer tirozin kinazlarla etkileşime girmektedir. Bu sinyal yolları kanser hücrelerine; sağkalım, proliferasyon, invazyon, migrasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş, metastaz ve anjiyogenez için ortam sağlamaktadır (Hughes ve ark., 2016; Kuang ve ark., 2017; Leung ve ark., 2017; Safaie Qamsari ve ark., 2017) (**Şekil 2.10.**).



Şekil 2.10. c-MET/HGF aracılı sinyal yolları gösterilmektedir (H. Zhang ve ark., 2018).

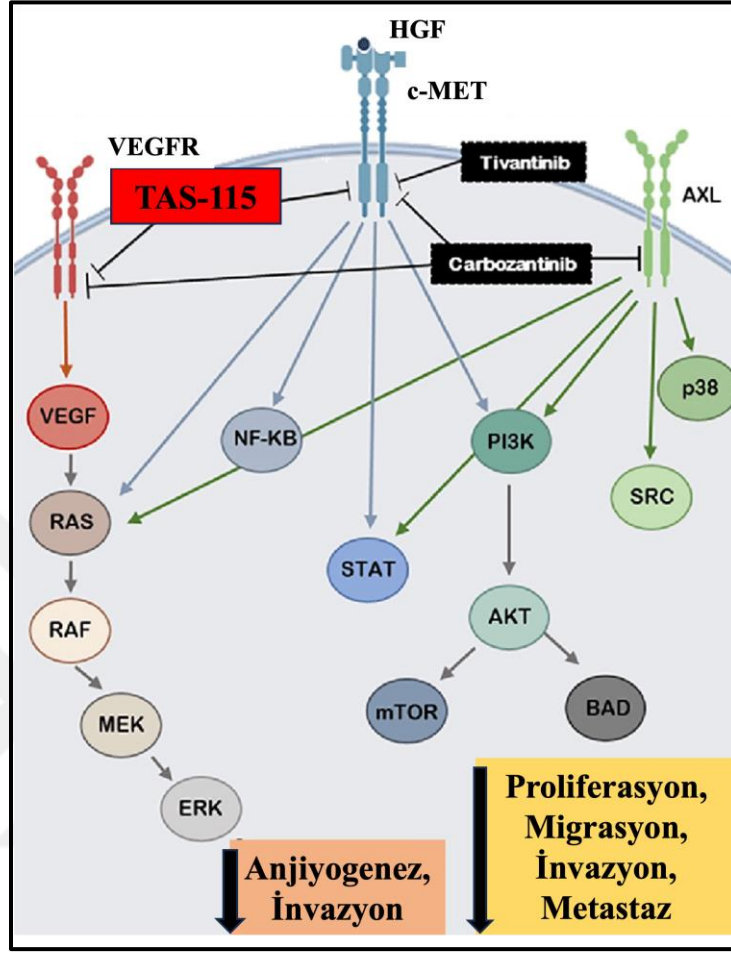
Meme kanseri hücrelerinde HGF'nin, reseptörü c-MET'e bağlanması yoluyla HGF yolağının aktivasyonu hücre sağkalımının, proliferasyonunun ve kanser inhibitörlerine karşı direncin artmasına neden olmaktadır (Parikh ve ark., 2014) Meme kanseri hücrelerinde HGF'nin aşırı ekspresyonun meme dokusunda neoplazmalara yol açtığı bilinmektedir. Yapılan klinik çalışmalarda, meme tümörlerinde HGF yolağının aktivasyonunda; tümör boyutunun büyüdüğü ve uzak metastaz ile ilişkilendirildiği dikkat çekmektedir (Oliveres ve ark., 2020).

Kanser Hücrelerinde c-MET/HGF Aracılı PI3K/Akt/mTOR Sinyalizasyon Mekanizması

mTOR (Rapamisin'in Memeli Hedefi), hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli role sahip olan serin/treonin kinazdır. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağı; hücre büyümesi, proliferasyonu, metabolizması, motilitesi, sağkalımı ve apoptozunu içeren normal hücresel süreçlerin anahtar düzenleyicisidir. c-MET/HGF etkileşmesi sonucu PI3K fosforillenerek aktive olmakta ve fosfolipitlerin üretilmesini sağlamaktadır. PI3K'nın fosforilasyonu ile birlikte mTOR'u düzenleyen Akt de aktive olmaktadır (Xu ve ark., 2020). PI3K/Akt yolağının anormal aktivasyonu, pek çok kanser türünde kanser hücrelerinin sağkalımını ve proliferasyonunu desteklemektedir (Hervieu ve Kermorgant, 2018; Y. Zhang ve ark., 2018). Kanser hücrelerinden veya hücreyi çevreleyen interstisyel dokudan salgılanan HGF'nin reseptörüne bağlanması ile c-MET otofosforilasyonu indüklenmektedir. Fosforile olmuş c-MET (p-c-MET) mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) ve PI3K/Akt'yi içeren hücre içi sinyal yollarını aktive etmekte ve bu aktivasyon kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve devamında metastazına yol açmaktadır (Hervieu ve Kermorgant, 2018). Kanserde c-MET/HGF sinyal aktivasyonunun prevalansı göz önüne alındığında, yolağın aydınlatılması ve devamında inhibisyonu için anti-kanser ilaç çalışmaları önem kazanmaktadır.

2.4. TAS-115 (Pamufetinib)

2013 yılında geliştirilen ve kimyasal adı pamufetinib olan TAS-115; c-MET, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörlerini (PDGFR) inhibe ettiği bilinen çoklu RTK inhibitörüdür (Fujita ve ark., 2013). TAS-115; c-MET, VEGFR, PDGFR ve diğer reseptörlerin otofosforilasyonunu engellemektedir. Fosforilasyon gerçekleşmediğinde PI3K/Akt/mTOR, Ras/MAPK, STAT3 gibi hücre içi sinyal yolları inhibe olmakta ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve devamında metastaz kapasitesini baskılamaktadır (Silva Paiva ve ark., 2020; S. Yamada ve ark., 2017) (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. c-MET/HGF aracılı sinyal yollarının terapötik hedeflenmesi ve TAS-115 gibi inhibitör ajanların yolak üzerine etkisi gösterilmektedir (Silva Paiva ve ark., 2020).

TAS-115'in insan mide kanserinde (Fujita ve ark., 2013; L. Zhao ve ark., 2013), akciğer kanserinde (Nakade ve ark., 2014; S. Yamada ve ark., 2017) ve sinoviyal sarkomda (S. Yamada ve ark., 2017) anti-tümör etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Oldukça yeni olan TAS-115'in, c-MET/HGF etkileşimi aracılı meme kanseri ve metastazı üzerine olan etkisi henüz literatürde yer almamaktadır.

Karsinogenez çalışmalarında kanser hücrelerini incelemenin ve TAS-115 gibi anti-kanser ilaçları test etmenin en etkili yolu klinik deneyler olsa da etik ve güvenlik sınırlamaları bu yöntemin yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle, kanser araştırmalarında sıklıkla pre-klinik tümör modelleri tercih edilmekte ve *in vitro* kültür modelleri yoğun olarak kullanılmaktadır.

2.5. 3-Boyutlu *In vitro* Deney Modeli

Geleneksel 2B *in vitro* kanser araştırmalarında; morfoloji, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinden kaynaklanan yanıtların değerlendirilmesi için planlanan deneylerin sonuçları *in vivo* bir tümör büyüme ortamına birebir benzerlik göstermemektedir (Y. Zhao ve ark., 2014). Plastik petri kaplarında veya şişelerde kültürlenен hücreler, yumuşak dokularda bulunan sertlik aralığına (~ 2 ile 10^2 kPa) kıyasla, tipik olarak sabit yüksek sertlikteki (plastik petri kabı için $\sim 10^5$ kPa) yüzeylere maruz kalmaktadır (Skardal ve ark., 2013). Petri kaplarında kültürlenен hücrelerin karşılaştığı bu sabit yüksek sertlik, hücresel morfolojilerini, gen ifadesi profillerini ve ilaç duyarlılığını etkilemektedir. Her ne kadar 2B hücre kültürleri; meme kanseri ilerlemesindeki genetik ve epigenetik değişikliklere ışık tutmuş olsa da (Berdasco ve Esteller, 2010; Y. Huang ve ark., 2011) oldukça heterojenik olan tümör mikroçevresini içermemesi nedeniyle çalışmalarda yetersiz kalmaktadır. 2B tek katmanlı hücresel modeller, doğal 3B dokuların *in vivo* mikroçevre özelliklerinden yoksundur. Ayrıca, petri kaplarında kültürlenен hücreler, tümör kütlesinin boyutuna ve şekline bağlı olarak bir besin ve sinyal molekülleri gradyanının bulunduğu doğal bir tümör mikroçevresinin aksine aynı miktarda besin ve oksijene maruz kalmaktadır (Siemann ve Horsman, 2015).

Tek katmanlı hücre kültürü ile canlı arasındaki boşluğu doldurmak için 3B *in vitro* kültür, *in vivo* hücre büyüme ortamını taklit eden üçüncü bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Ritter ve ark., 2007; K. M. Yamada ve Cukierman, 2007). 3B kültürler, 2B sistemlerle test edilemeyen parametreler ve terapötik ajanları taramak için bir araç olarak ilgi görmekte ve günümüzde de yoğun olarak kullanılmaktadır. 3B kültürler hücre-hücre etkileşimlerini ve *in vivo* tümör ortamında bulunan topografıyı daha yakından taklit etmekte olup (Pampaloni ve ark., 2007); özellikle tümör çalışmalarında *in vivo* benzeri apikal ve bazolateral polariteyi oluşturmak için tercih edilmektedir (Inman ve Bissell, 2010).

Farelerde kanser ya cerrahi implantasyon ya da genetiğiyle oynanmış farelerin geliştirilmesi yoluyla indüklenir. Bu tip modeller terapötiklerin gelişimini kolaylaştırmak için insan hastalıklarını uygun şekilde taklit edememekte; tümör gelişimi ve progresyonu üzerinde yanlış etkiler gösterebilmektedir. Fare tümör mikroçevresi, insan tümör

mikroçevresinin heterojenliği ve genetik çeşitliliğinden yoksun olduğu için insan tümör mikroçevresiyle tam olarak örtüşmemektedir. Dolayısıyla mevcut senaryo, tümör stroması etkileşimlerini yakından taklit edebilecek ve ilaç sonuçlarının daha iyi öngörülebilir olmasını sağlayacak fizyolojik olarak ilgili organotipik platformların veya tümör modellerinin geliştirilmesini gerektirmektedir.

Tümör araştırmaları için kullanılan 3B modeller; hücrel multi-tabakalar, matriks gömme kültürleri, içi boş fiber biyoreaktörler, *ex vivo* kültürler, çok hücreli sferoidler ve sferoid aracılığıyla oluşturulan 3B biyo-basım dokulardır (Kang ve ark., 2020). En yaygın kullanılan 3B tümör modelleri, kendi ECM'sini üreten çok hücreli sferoidlerdir. Sferoidler, kültürde sabit veya ko-kültür hücrelerin spontan agregasyonu veya hücrelerin matrijel gibi bir substrat üzerine ekilmesiyle oluşturulmaktadır (Breslin ve O'Driscoll, 2013; Burdett ve ark., 2010; Mehta ve ark., 2012). Hücre-hücre etkileşim sinyali veya parakrin sinyalleme mekanizmaları, tümörü baskılayan mikroçevreyi yavaş yavaş tümörü destekleyen bir ortama dönüştürür ve tümör progresyonunu artırarak metastaz yapma potansiyelini desteklemektedir. Bu nedenle, fizyolojik olarak ilgili bir 3B tümör modeli oluşturarak bu mekanizmaların arka planındaki hücrel karmaşayı anlamak giderek önemli bir hal almıştır.

İnsan vücudundaki bir tümör 3B olarak büyüdüğünden, 3B tümör modelleri doğal tümörlerin gen ifadesine (Ghosh ve ark., 2005), protein ifadesine (Ridky ve ark., 2010), hücre sinyalizasyonuna (Kim ve ark., 2013), ilaç yanıtına (Loessner ve ark., 2010), canlılığına ve çoğalmasına yakından benzedikleri için doğal tümör mikroçevresini taklit etmede daha iyi bir sonuç ortaya koymaktadır. Bu nedenle son yıllarda, insan kanser dokularının özelliklerini doğru şekilde taklit eden ve tümörün fizyolojik ve histolojik yapısını benzer şekilde yansıtan 3B tümör modellerinin kullanılması önem kazanmıştır.

3B meme tümörü modelleri kanser ilerlemesinin çeşitli yönlerini incelemek için geliştirilmiş olsa da bu çalışmaların neredeyse hiçbiri stromal ve matriks bileşenlerinin yoğunluğunun değiştirilmesinin kanser hücrelerinin sağkalımı, proliferasyonu, invazyonu ve metastazına nasıl etkileyeceğine dair bilgi içermemektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamız; c-MET'in uyarımına odaklanarak karsinogenik yanıtların değişebileceği bilgisinden yola çıkarak; "c-MET yolağının inhibisyonu alt yolların çalışmasına bağlı olarak, kanser hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu yavaşlatır" hipotezini kurguladığımız projemizde; TAS-115 inhibitörünün bireysel ve kemoterapötik bir ajan olan DOXO ile birlikte uygulanmasının c-MET/HGF ilişkili yolağı ne derece inhibe edebileceği ve takiben de PI3K/Akt/mTOR bağımlı yolağı nasıl aktive edeceğini 3B *in vitro* ortamda sorgulamayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızın ilk hedefini; 3B heterotipik meme tümörü sferoidlerinin oluşturulması ve bu sferoidlerin 3B biyoyazıcılarla basılarak sferoidleri oluşturan meme kanser hücreleriyle akciğer fibroblast hücrelerinin birbirleri arasındaki etkileşim ve metastazın 3B ortamda taklit edilmesi olarak belirledik. Takiben bir diğer hedefimiz; 3B heterotipik sferoidlerde TAS-115 inhibitörünün bireysel ve kematerapötik ajan olan DOXO ile birlikte etkisini değerlendirmektir. Bu doğrultuda çalışmamızda, ÜNMK hücre hattı olan ve agresif karakteriyle bilinen MDA-MB-231 hücre hattı ve insan akciğer fibroblast hücreleri (NHLF) kullanılarak heterotipik sferoidler oluşturuldu. Oluşturulan sferoidlere, TAS-115 inhibitörünün bireysel ve kemoterapötik ajan DOXO ile birlikte uygulanmasının ardından, sferoidlerde meydana gelen morfolojik ve histolojik değişimlerin değerlendirilmesi ve 3B biyo-basım deneyleri ile bu ilişkinin ortaya konulması sağlandı. 3B bu deney modeli ile kanser hücrelerinin proliferasyon, apoptoz, invazyon, migrasyon ve metastaz yeteneklerindeki değişimler değerlendirildi. Literatürde meme kanserinin akciğere metastazı *in vivo* mikrometastaz analizleri ile gösterilmiş fakat karşılıklı etkileşimleri 3B sferoid ve 3B biyo-basım çalışmalarında değerlendirilmemiştir. Buna benzer çalışmalar ekibimiz tarafından birçok defa meme kanseri ortotopik fare modelinde denenmiş ve farklı değerlendirmeler ile yorumlanmıştır (Karadas ve ark., 2021; Tanrıover ve ark., 2021). Tüm bu deneylerin devamında TAS-115'in c-MET/HGF ilişkili yolağını ne derece inhibe edebildiği ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağında protein ekspresyonlarındaki değişimlerin değerlendirilmesiyle; TAS-115'in meme kanseri üzerine etkisi 3B ortamda ilk kez çalışılmıştır.

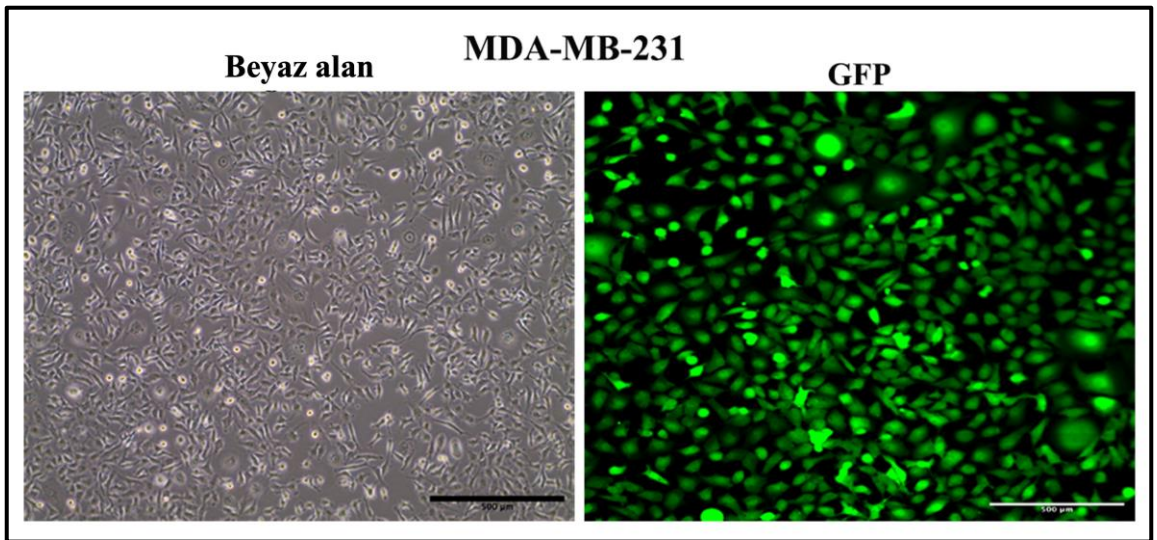
3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerin tamamı TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında ABD Pennsylvania State Üniversitesi Mühendislik Bilimi ve Mekanik Bölümü Prof. Dr. İbrahim Tarık Özbolat'ın laboratuvarında ve danışmanlığında gerçekleştirildi.

3.1. MDA-MB-231 (İnsan Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Hattı) ve NHLF (Normal İnsan Akciğer Fibroblast Hücre Hattı)'nin Kültürasyonu ve Deneye Hazır Hale Getirilmesi

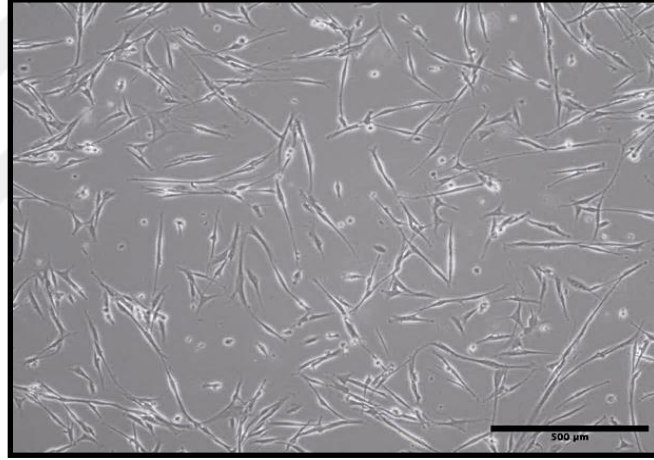
MDA-MB-231 (İnsan üçlü negatif meme kanseri hücre hattı): Oldukça agresif ve invaziv karakterde, epitelyal hücre tipinde, karaciğer, akciğer, lenf nodları ve beyine metastaz yapma yeteneğine sahip, meme kanserinin tedaviye en zor cevap veren alt tipi olan üçlü (ER, PR ve HER2) negatif meme kanseri hücre hattıdır. İleri evre meme kanserini modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Arroyo-Crespo ve ark., 2019; Grist ve ark., 2022; Jost ve ark., 2020).

Yeşil floresan protein (GFP) takılı; GFP⁺MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri Dr. Danny Welch tarafından (Kansas University, KS, ABD) Dr. Özbolat'ın laboratuvarına hediye edilmiş ve aktif olarak çalışılmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. GFP⁺MDA-MB-231 hücrelerinin ışık ve konfokal mikroskoptaki görüntüsü gösterilmektedir. (Ölçüm çubuğu 500 µm'dir).

NHLF (Normal insan akciğer fibroblast hücre hattı): 14 haftalık erkek fetüsün normal akciğer dokusundan elde edilmiş fibroblastlardan oluşmaktadır. Meme kanserinin akciğere metastazında; meme kanseri hücrelerinin akciğer fibroblastlarında fenotipik değişiklikler yarattığı ve kanser hücreleri için destekleyici bir metastatik niş oluşturduğu bilinmektedir (Subia ve ark., 2021). HGF, başta fibroblastlar ve nötrofiller olmak üzere farklı hücre tipleri tarafından salgılanan, epitel ve endotel hücreleri için bir büyüme faktörüdür (Desole ve ark., 2021). Literatürde sağlıklı akciğer dokusunun modellendiği çalışmalarda genel olarak NHLF hücreleri tercih edilmiştir (Grist ve ark., 2022; Jost ve ark., 2020). Bu nedenle literatürle uyumlu olarak çalışmamızda; IV. evre meme kanserinin akciğer metastaz profilinin 3B *in vitro* modellenmesi için NHLF hücrelerinin kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. NHLF hücrelerinin morfolojik görüntüsü gösterilmektedir (Ölçüm çubuğu 500 µm'dir).

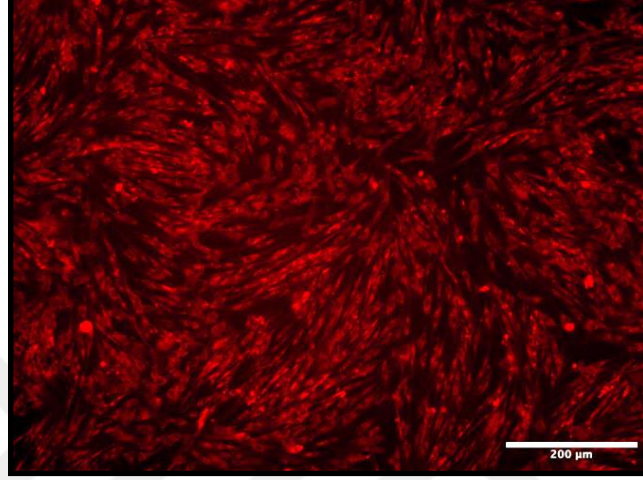
Her iki hücre hattı da %10 fetal sıgır serumu (FBS) (Life Technologies, Grand Island, NY, ABD), %1 penisilin-streptomisin (Life Technologies, Carlsbad, CA, ABD) ve %1 sodyum piruvat ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium'da (DMEM, Corning Cellgro, Manassas, VA, ABD) 25 mm² flasklarda 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde kültüre edildi. Hücreler %80 konfluensiye ulaştıktan sonra medyumları uzaklaştırıldı ve hücreleri flasklardan uzaklaştırmak için %0.25 tripsin-%0.1 etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (Life Technologies) kullanıldı. Flasklara 1 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve inkübatörde 5 dk bekletildi. Takiben flasklara 1 ml DMEM eklenerek tripsinin aktivasyonu nötralize edildi. Kültür kabında yüzer hale gelen hücreler ve medyum toplanarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. 1600 rpm'de 5

dk santrifüjlenerek hücrelerin tüplerin dibine çökmesi sağlandı. Hücrelerin üzerindeki tripsin-DMEM karışımı medyum uzaklaştırıldı ve sonrasında hücrelerin 1 ml yeni besiyeri ile yavaşça dağılması sağlandıktan sonra bu süspansiyondan 250 µl alınarak yeni bir 25 mm² flaska aktarıldı. Üzerine flaskların tabanını kaplayacak şekilde 4-5 ml DMEM eklendi ve hücrelerin büyümeleri takip edildi. Hücrelerin pasajlanması işlemine proliferasyon hızlarına bağlı olarak 2-3 günde bir olacak şekilde devam edildi. Hücrelerin karakterlerini koruduklarına emin olmak adına her pasaj sonrası hücrelerin morfolojileri ve canlılıkları kontrol edildi. 3. kez pasajlanması yapılan hücreler *in vitro* deneylerde kullanılmak üzere hazırlandı.

3.1.1. NHLF Hücrelerinin Görünür Hale Getirilmesi

CellTracker™ floresan problemleri hücrenin hareketini, konumunu, proliferasyonunu, migrasyonunu, kemotaksisini ve invazyonunu izlemek için kullanılmaktadır. Bu problemler hücre membranından serbestçe geçmekte; ancak hücre içine girdikten sonra hücre-geçirmeyen reaksiyon ürünlerine dönüşmektedir. CellTracker™ floresan problemleri glutatyon S-transferaz aracılı bir reaksiyon kullanarak tiyol gruplarıyla reaksiyona giren bir klorometil veya bromometil grubu içermektedir. Çoğu hücrede glutatyon seviyeleri yüksektir (10 mM'ye kadar) ve glutatyon transferaz her yerde bulunur. Geçici ürünlere dönüştürüldükten sonra CellTracker™ floresan problemleri canlı hücrelerde birkaç nesil boyunca korunmaktadır. Problemler yavru hücrelere aktarılmakta, ancak bir popülasyondaki komşu hücrelere aktarılmamaktadır. CellTracker™ floresan problemleri ile yüklenen hücreler en az 72 saat boyunca floresan ışığa yaymakta ve ideal izleme boyası özellikleri sergilemektedir, yani; kararlıdır, çalışma konsantrasyonlarında toksik değildir, hücrelerde iyi tutulurlar ve fizyolojik pH'da parlak floresan verirler. Çalışmamızda, GFP⁺MDA-MB-231 hücrelere ilaveten ko-kültürasyonda NHLF hücrelerini görebilmek amacıyla CellTracker Red CMTPX floresan boya (Invitrogen™ CellTracker™ Red CMTPX Dye; C34552) kullanılarak NHLF hücrelerinin kırmızı floresan problemlerle işaretlenmesi sağlandı. Bir önceki basamakta pasajlanan NHLF hücrelerinin %80 konfluensiye ulaşması beklendi. Daha sonra flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. 5 ml DMEM içerisine 5 µl kırmızı floresan boya eklenerek hazırlanan boyama solüsyonu flaska eklendi. Hücreler 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 30 dk inkübe edildi. Inkübasyonun ardından solüsyon ortamdan uzaklaştırıldı ve ortama

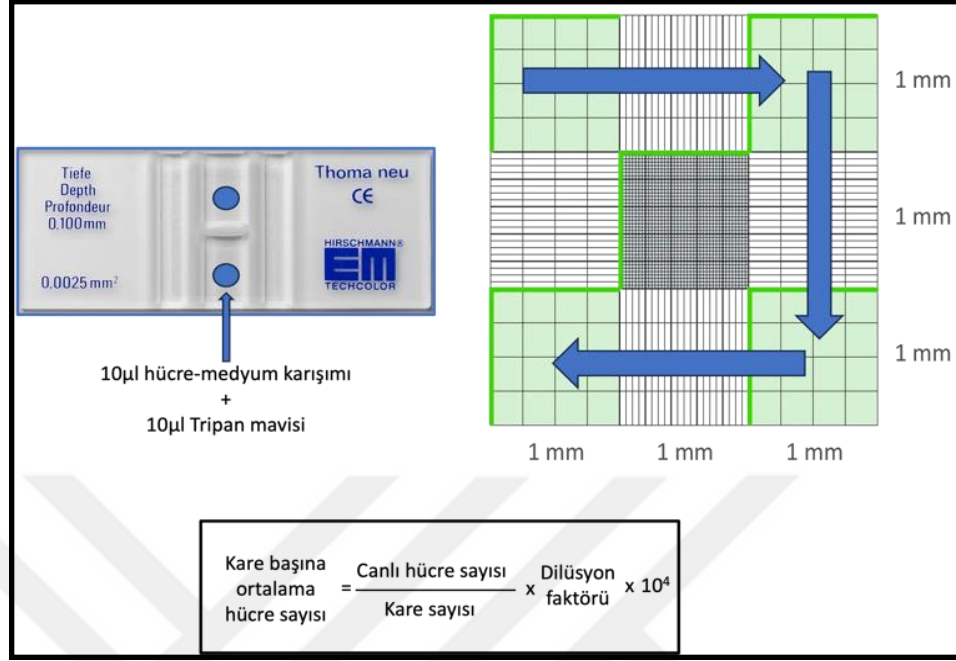
DMEM eklenerek ZEISS Axio Observer floresan mikroskop (Thornwood, NY, ABD) ile kırmızı boyanan hücreler görüntülendi (**Şekil 3.3.**). Görüntülemenin ardından hücreler sferoid kültürasyonunda kullanılmak üzere gece boyu inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.3. CellTracker Red CMTPX floresan boya kullanılarak kırmızı işaretlenen NHLF hücreleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu 200 µm'dir).

3.1.2. GFP⁺ MDA-MB-231 ve Red⁺ NHLF Hücreleri ile Sferoid Oluşturulması

GFP⁺MDA-MB-231 ve Red⁺NHLF hücreleri ayrı ayrı tripsinize edildi. Flasklara 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve inkübatörde 5 dk bekletildi. Takiben flasklara 1 ml DMEM eklenerek tripsinin aktivasyonu nötralize edildi. Hücrelerin medyum içerisinde homojen dağılması sağlandıktan sonra bu karışım içerisinde ependorfa 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi (Thermo Fisher, #T10282) ile karıştırıldı. Bu karışım içerisinde de hücre sayımı için 10 µl alınarak thoma lamına bırakıldı. Takiben 1 ml hücre süspansiyonunda bulunan canlı hücre sayısı belirlendi (**Şekil 3.4.**).



Şekil 3.4. Thoma lamında canlı hücre sayımı gösterilmektedir.

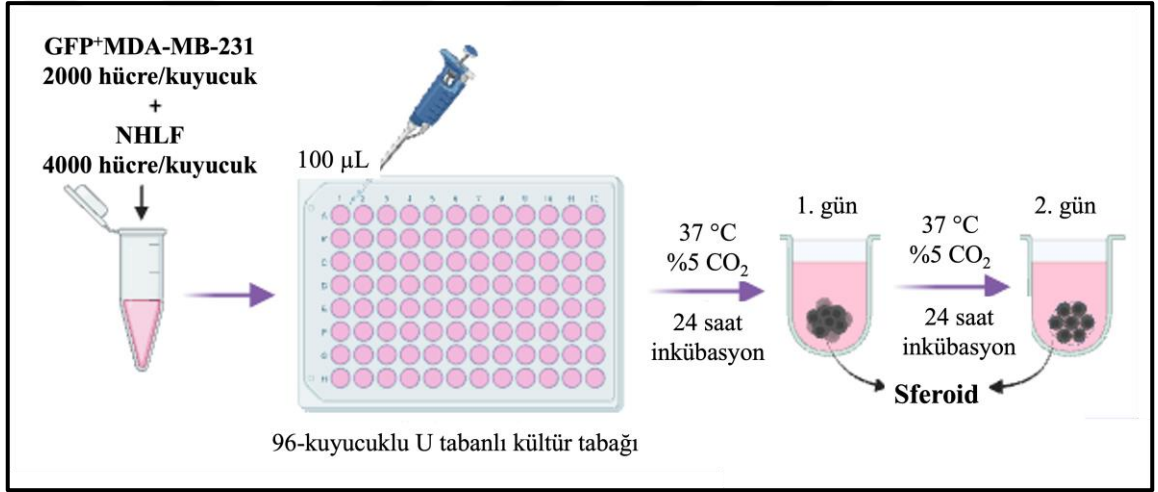
Hücre canlılıkları saptanan GFP⁺MDA-MB-231 ve Red⁺ NHLF hücreleri, 3B heterotipik sferoid kültürasyonu için hazır hale geldikten sonra, 96-kuyucuklu U tabanlı kültür tabağında (Greiner Bio-One; #650970) her bir kuyucukta 2000 MDA-MB-231 ve 4000 NHLF hücresi (1:2) olacak şekilde hangi oranda eklenecekleri hesaplandı. Hücreler %10 FBS'li DMEM'le birleştirilerek kuyu başına 100 µl olacak şekilde 96-kuyucuklu U tabanlı kültür tabağına ekildi ve takiben sferoid oluşturmak üzere 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 24-72 saat arası bekletildi. 24. ve 72. saatte sferoidler %4 paraformaldehit ile fikse edildi ve ardından Leica SP8 DIVE çoklu foton mikroskop (Leica Mikrosistemleri, Almanya) ile görüntülendi.

İş paketinin bu kısmı kırmızı işaretli NHLF hücrelerinin sferoid içerisinde varlığını ve kanser hücrelerinin NHLF hücreleri üzerine etkisini görmek için yapıldı. Deneylerimizin devam eden basamaklarında doz taraması ve immüno Floresan boyamalar yapılacağı için sonuçları etkilememesi açısından kırmızı işaretli olmayan NHLF hücrelerinin kullanılmasına karar verildi.

3.2. MDA-MB-231 ve NHLF Hücreleriyle Sferoid Oluşturulması ve Hücresel Mimarinin Doğrulanması

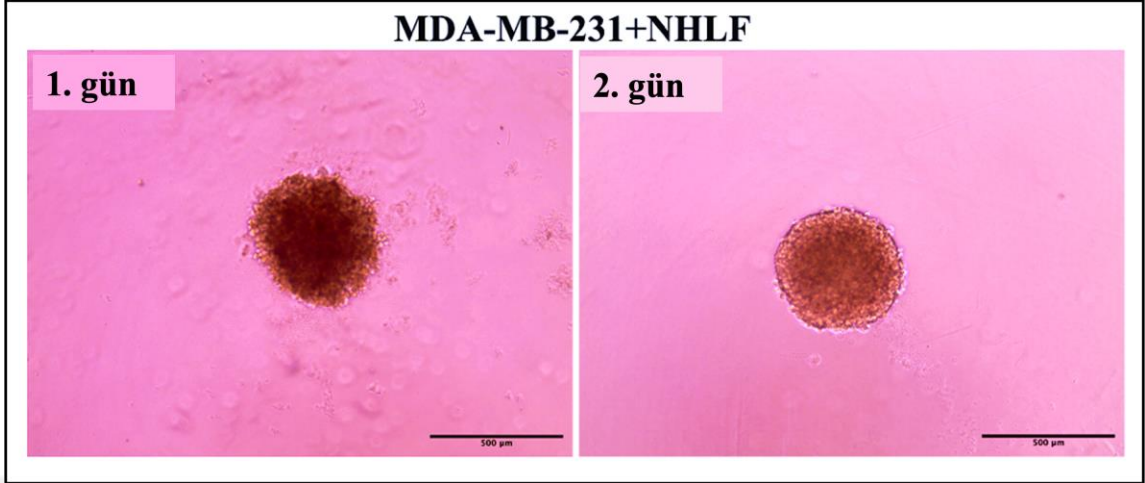
3.2.1. Heterotipik Sferoid Oluşumu

GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin tripsinize edilmesinin ardından 3.1.2’de yapıldığı şekilde canlı hücre sayısı belirlendi ve hücreler 1:2 oranında (2000 MDA-MB-231:4000 NHLF) DMEM’de birleştirilerek 96-kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağında (Greiner Bio-One; #650970) kuyu başına 100 µl olacak şekilde ekildi. Hücreler sferoid oluşturmak üzere 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde bekletildi (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin sferoid oluşturmak üzere birlikte kültürasyonu Biorender yazılımı kullanılarak şematize edilmiştir.

GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin 3B kültürasyonu sonrası 24. saatte küre yapısının oluştuğu ancak henüz kompaksiyonun tam olarak sağlanmadığı görüldüğü için hücreler bir gün daha inkübe edildi. 48 saat sonrası kontrol edildiğinde kompaksiyonun sağlandığı ve sferoid yapısının oluştuğu görüldü (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin 1. ve 2. gün görüntüsü gösterilmektedir (Ölçüm çubuğu 500µm'dir).

3.2.2. Sferoidlerde Hücresel Yapının Alfa-Düz Kas Aktin (α -SMA) ile Değerlendirilmesi

GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin 3B kültürasyonunu takiben 48. saatin sonunda kuyucuklardaki sferoidlerin yapısı bozulmayacak şekilde pipetle çekilerek ependorflara alındı ve sferoidlerin ependorfun dibine çökmesi için beklendi. Daha sonra üst kısımda kalan medyum sferoidlere değmeyecek şekilde alındı. Takiben sferoidleri yıkamak amacı ile 1 ml DPBS (1X) damla damla tüpe bırakıldı ve sferoidlerin ependorfun dibine çökmesi için beklendi. Yıkama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra ortama 1 ml %4 paraformaldehit eklenerek sferoidler gece boyu 4 °C'de fikse edildi. Fiksasyonu takiben paraformaldehit ortamdan uzaklaştırıldı, ardından sferoidler 1 ml DPBS (1X) ile yıkandı ve immüno Floresan boyama için 4 °C'de bekletildi.

Sferoidlerde hücresel mimarinin belirlenmesi için; α -SMA (miyofibroblast belirteci) ve Hoechst (nucleus boyamak için) immüno Floresan boyama (ISK/IF) yapıldı. Sferoidler 15 dk boyunca %0.1 Triton-X100 (Sigma Aldrich, Burlington, MA, ABD) kullanılarak permeabilize edildi. Ardından permeabilizasyon solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve takiben sferoidler 1 saat boyunca 0.3 M glisin (Sigma-Aldrich), %0.1 Tween-20 (Sigma-Aldrich), %10 normal keçi serum (NGS) ve %1 BSA (Sigma Aldrich) kullanılarak DPBS (1X) içerisinde hazırlanan bloklama solüsyonu ile bloklandı. Sferoidler daha sonra bloklama solüsyonu içerisinde 1:100 dilüsyonda hazırlanan fare monoklonal anti- α -SMA antikoru (Invitrogen; #14-9760-82) ile gece boyu 4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonu

takiben sferoidler DPBS (1X) ile iki kez yıkandı ve 1:1000 dilüsyonda keçi anti-fare IgG (H+L)-Alexa Fluor 647 (Invitrogen; #A-21235) ve 1:200 dilüsyonda Hoechst 33 258 (Sigma; #94401) DPBS (1X) içerisine eklenerek sekonder antikor hazırlandı. Hazırlanan sekonder antikor sferoidlere eklendi ve sferoidler oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası DPBS (1X) ile yıkamanın ardından sferoidlere 100 µl fruktoz-glisin karışımı eklendi ve sferoidlerin sabitlenmesi sağlandı. Lam üzerine alınan sferoidler Leica SP8 DIVE çoklu foton mikroskop (Leica Microsystems, Almanya) ile görüntülendi.

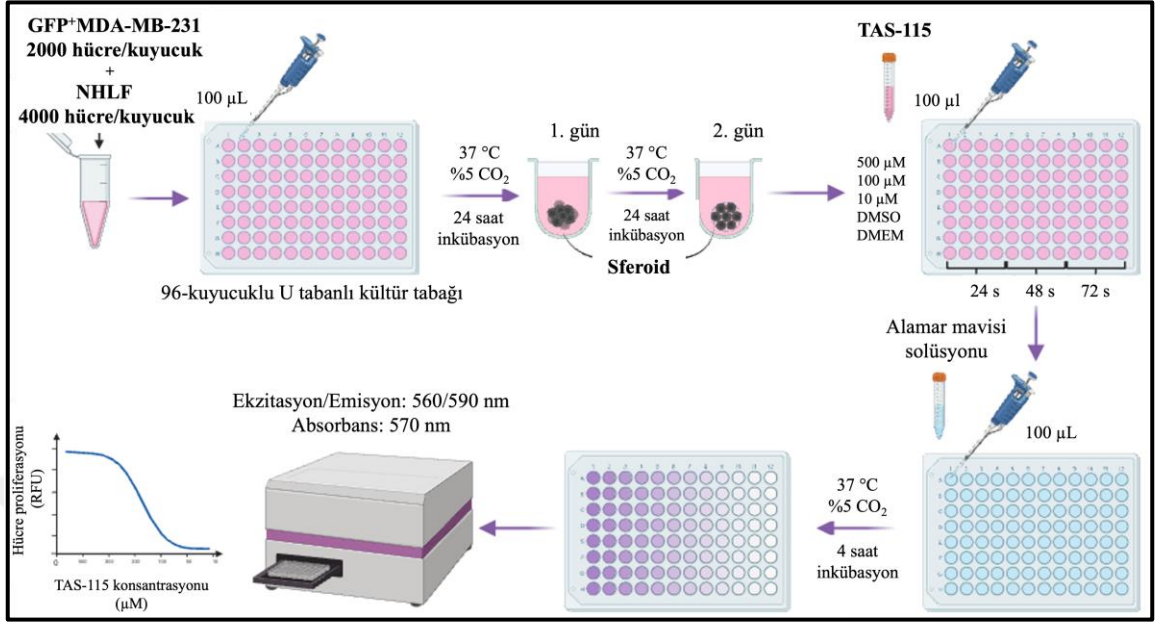
3.3. MDA-MB-231 ve NHLF Heterotipik Sferoidlerinde TAS-115 ve DOXO'nun Etkinliğinin Değerlendirilmesi

3.3.1. TAS-115'in Hazırlanması ve Sferoidlere Eklenmesi

Literatürde meme kanseri hücreleri için TAS-115 uygulamasını içeren ve inhibitörün etkin değerini belirten herhangi bir yayın yer almadığından, farklı kanser hücreleri için belirlenen TAS-115 etkin doz aralığı referans alınarak; 10-50-100-200-300-500 µM aralığındaki dozların denenmesine karar verildi (Fujita ve ark., 2013; Kunii ve ark., 2015).

Moleküler ağırlığı 518.56 g/mol ve 5 mg olan TAS-115'e (Selleckchem; #S6764) alıcı firmanın önerdiği şekilde çözücüsü DMSO'dan 1 ml ilave edilerek 1 mM ana stok konsantrasyonu hazırlandı. Homojen şekilde çözünmüş TAS-115; 500 µM, 100 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda %10 FBS'li DMEM besiyeri içerisinde 15 ml'lik falkonlara hazırlandı. Ek olarak TAS-115, DMSO'da çözündüğü için deney grupları arasına DMSO'nun olası etkisini ortadan kaldırmak için çözücü grubu da eklendi. Bu grup TAS-115'in en yüksek konsantrasyonuna (500 µM) göre hazırlandı.

Sferoid yapımı için GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin tripsinizasyonunun ardından canlı hücre sayısı hesaplandı. 3.2.1'de yapıldığı şekilde 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde MDA-MB-231 ve her kuyucuğa 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde NHLF hücreleri DMEM'de birleştirilerek 96-kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağına kuyu başına 100 µl olarak ekildi. Hücreler sferoid oluşturmak üzere 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 48 saat bekletildi. Daha sonra sferoidlere farklı konsantrasyonlarda (500-100-10 µM) hazırlanan TAS-115 uygulandı ve sferoidler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi (**Şekil 3.7.**).



Şekil 3.7. Sferoidlerin oluşturulmasının ardından farklı konsantrasyonlarda TAS-115'in uygulanması ve alamar mavisi canlılık testi ile doz taramalarına ait deney basamakları Biorender yazılımı kullanılarak şematize edilmiştir.

3.3.2. TAS-115'in Oluşturulan Sferoidler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

TAS-115'in sferoid hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen; #DAL1015) kullanıldı. Bu yöntem alamar mavisi (resazurin) adlı bileşiğin, canlı hücreler tarafından Resofurin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Resazurin, oksidatif formda bulunan koyu mavi renkte bir redoks boyasıdır. Bileşen nükleusa girdiğinde indirgenerek floresans özellikteki pembe renkli resofurin bileşiğine dönüşmektedir. Oluşan sinyal, floremetre kullanılarak tespit edilmekte ve canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenmektedir. Ölü hücreler metabolik aktivitelerini kaybettikleri için resazurini indirgeyememekte ve floresans sinyali oluşturamamaktadır.

TAS-115 IC₅₀ değerinin belirlenmesi için kit protokolünde belirtildiği şekilde 1 ml DMEM içerisinde 10 μl alamar mavisi (%10) olacak şekilde solüsyon hazırlandı. 96 kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağındaki sferoid medyumları sferoidlere zarar vermeyecek şekilde pipetle çekildi. Takiben her bir kuyucuğa 100 μl alamar mavisi solüsyonu eklendi ve alüminyum folyo ile sarılan kültür tabağı 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 4 saat bekletildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki

solüsyon yeni bir 96-kuyucuklu kültür tabağına aktarılarak deney sonlandırıldı. Ardından 560/590 nm eksitasyon/emisyon aralığı ve 570 nm absorbanstaki floresan mikropate okuyucuda okundu (**Şekil 3.7.**). Okumalar sonrası her biri kendi içinde 4 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu, istatistiksel olarak değerlendirilip kontrol grubu (TAS-115 uygulanmamış sferoid grubu) ve DMSO grubu ile karşılaştırılarak GraphPad 10.0.3 programı ile istatistiksel analiz ve hesaplamalar gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde ortalama hesaplandı. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı ve p değerleri hesaplandı.

Takiben farklı dozlarda TAS-115 uygulaması sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğu hesaplanarak TAS-115'in farklı dozlarının sferoidler üzerine etkisi GraphPad 10.0.3 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3.3. DOXO'nun Hazırlanması ve Sferoidlere Eklenmesi

DOXO'nun meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda (Almansour, 2022; Dey ve ark., 2022) kullanılan ideal doz aralıkları referans alınarak konsantrasyon aralığı 25-6.25-1.5 μ M olacak şekilde seçildi.

Moleküler ağırlığı 579.98 g/mol ve 5 mg olan DOXO (Selleckchem; #S1208) alıcı firmanın önerdiği şekilde çözücüsü DMSO'dan 1 ml ilave edilerek 1 mM ana stok konsantrasyonu hazırlandı. Homojen şekilde çözünmüş DOXO; 25, 6.25 ve 1.5 μ M konsantrasyonlarda %10 FBS'li DMEM besiyeri içerisinde 15 ml'lik falkonlara hazırlandı. Ek olarak DOXO, DMSO'da çözündüğü için deney grupları arasına DMSO'nun olası etkisini ortadan kaldırmak için çözücü grubu da eklendi. Bu grup DOXO'nun en yüksek konsantrasyonuna (25 μ M) göre hazırlandı. Sferoid yapımı için GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin tripsinizasyonunun ardından canlı hücre sayısı hesaplandı. 3.2.1'de yapıldığı şekilde 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde MDA-MB-231 ve her kuyucuğa 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde NHLF hücreleri DMEM'de birleştirilerek 96-kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağına kuyu başına 100 μ l olacak şekilde ekildi. Hücreler sferoid oluşturmak üzere 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 48 saat bekletildi.

3.3.4. DOXO'nun Oluşturulan Sferoidler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Sferoidlere farklı konsantrasyonlarda (25-6.25-1.5 μ M) DOXO uygulandı ve sferoidler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. DOXO'nun etkin dozunun belirlenmesi için alamarBlue canlılık testi yapıldı ancak ilacın renginin yoğun kırmızı olması ve alamarBlue testinde canlı hücrelerde oluşan pembe renk ile absorbans aralığının çakışması nedeniyle anlamlı sonuçlar alınamadı. Bu nedenle 3.3.2'de yapıldığı şekilde her bir inkübasyon süresi sonrası ZEISS Axio Observer floresan mikroskobu (Thornwood, NY, ABD) kullanılarak sferoid görüntüleri alındı. Takiben farklı dozlarda DOXO uygulaması sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğu hesaplanarak DOXO'nun farklı dozlarının sferoidler üzerine etkisi değerlendirildi.

Her biri kendi içinde 4 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu, istatistiksel olarak değerlendirilip kontrol grubu (DOXO uygulanmamış sferoid grubu) ve DMSO grubu ile karşılaştırılarak GraphPad 10.0.3 programı ile istatistiksel analiz ve hesaplamalar gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde ortalama hesaplandı. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı ve *p* değerleri hesaplandı.

3.4. 3B Sferoid Modeline (GFP⁺MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sağkalım Yanıtlarının Değerlendirilmesi

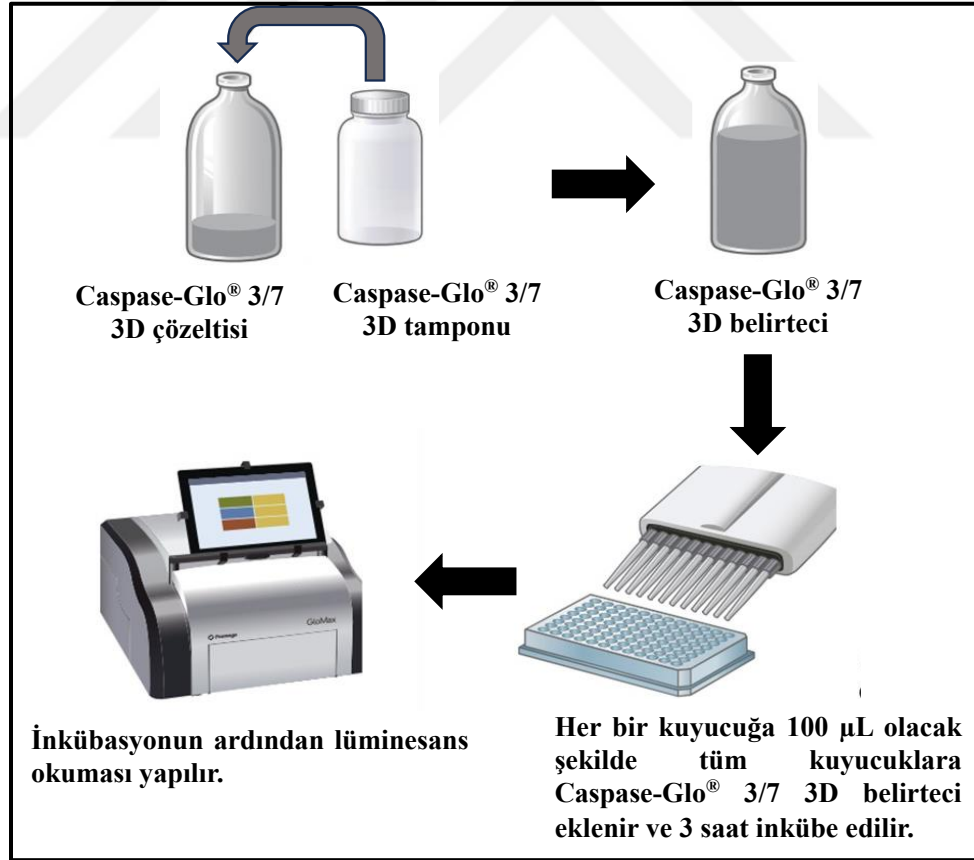
3.2.1'de yapıldığı şekilde hücreler 1:2 oranında (2000 MDA-MB-231:4000 NHLF) DMEM'de birleştirilerek 96-kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağında (Greiner Bio-One; #650970) heterotipik sferoidler oluşturuldu. TAS-115 ve DOXO'nun uygun dozları sferoidlere eklendikten sonra, hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesi için Caspase 3/7 apoptoz kiti ile hücre canlılığı ve Ki67 (Invitrogen; #14-5698-82) immünositokimya/immünofloresan (ISK/IF) deneyleri ile proliferasyon dereceleri değerlendirildi.

3.4.1. Kaspaz 3/7 Kiti Analizi

Caspase-Glo[®] 3/7 3D Assay; 3B sferoidlerde bulunan kaspaz-3 ve -7 aktivitelerini ölçen homojen, lüminesan bir testtir. Test, kaspaz aktivitesi, lusiferaz aktivitesi ve 3B hücre lizizi için optimize edilmiş bir reaktif içinde DEVD tetrapeptid dizisini içeren lüminojenik

bir kaspaz-3/7 substratı bulunmaktadır. Caspase-Glo® 3/7 3D Reaktifinin “ekle-karıştır-ölç” formatında eklenmesi hücre lizisine, ardından substratın kaspaz bölünmesine ve lusiferaz tarafından üretilen “ışık tipi” bir lüminesans sinyalinin oluşmasına neden olmaktadır. Lüminesans, mevcut kaspaz aktivitesi miktarıyla orantılıdır.

TAS-115 ve DOXO uygulanmasının ardından sferoidlerin kaspaz-3/7 aktivitelerini ölçmek için Caspase-Glo® 3/7 3D Assay (Promega, Madison, WI, ABD), üretici protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. İlk olarak kitte hazır şekilde bulunan Caspase Glo 3/7 3D tamponu ve substratı birlikte karıştırıldı. Sulandırılan Caspase-Glo® 3/7 3D belirtecinden her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde alınarak, 24 saat boyunca TAS-115 ve DOXO ile muamele edilen sferoidlere eklendi. Oda sıcaklığında 3 saatlik inkübasyondan sonra lüminesans bir mikropłaka okuyucu (Tecan, Morrisville, NC, ABD) ile ölçüm yapıldı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Caspase-Glo® 3/7 3D kit protokolünün şematik diyagramı gösterilmektedir.

3.4.2. Ki67 İmmünohistokimya/İmmüno Floresan (ISK/IF) Analizi

3.2.1’de yapıldığı şekilde hücreler 1:2 oranında (2000 MDA-MB-231:4000 NHLF) DMEM’de birleştirilerek 96-kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağında (Greiner Bio-One; #650970) heterotipik sferoidler oluşturuldu. TAS-115 ve DOXO’nun uygun dozları sferoidlere eklendikten sonra, kuyucuklardaki sferoidler yapısı bozulmayacak şekilde pipetle çekilerek ependorflara alındı ve sferoidlerin ependorfun dibine çökmesi için beklendi. Daha sonra üst kısımda kalan medyum sferoidlere değmeyecek şekilde alındı. Takiben sferoidleri yıkamak amacı ile 1 ml DPBS (1X) damla damla tüpe bırakıldı ve sferoidlerin ependorfun dibine çökmesi için beklendi. Yıkama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra ortama 1 ml %4 paraformaldehit eklenerek sferoidler gece boyu 4 °C’de fiks edildi. Fiksasyonu takiben paraformaldehit ortamdan uzaklaştırıldı, ardından sferoidler 1 ml DPBS (1X) ile yıkandı ve immüno floresan boyama için hazır hale getirildi.

Sferoidler 15 dk boyunca %0.1 Triton-X100 (Sigma Aldrich, Burlington, MA, ABD) kullanılarak permeabilize edildi. Ardından permeabilizasyon solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve takiben sferoidler 1 saat boyunca 0.3 M glisin (Sigma-Aldrich), %0.1 Tween-20 (Sigma-Aldrich), %10 normal keçi serum (NGS) ve %1 BSA (Sigma Aldrich) kullanılarak DPBS (1X) içerisinde hazırlanan bloklama solüsyonu ile bloklandı. Sferoidler daha sonra bloklama solüsyonu içerisinde 1:100 dilüsyonda hazırlanan sıçan monoklonal Ki67 antikor (Invitrogen; #14-5698-82) ile gece boyu 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben sferoidler DPBS (1X) ile iki kez yıkandı ve 1:1000 dilüsyonda keçi anti-sıçan IgG (H+L)-Alexa Fluor 594 (Abcam; #ab150160) ve 1:200 dilüsyonda Hoechst 33 258 (Sigma; #94401) DPBS (1X) içerisine eklenerek sekonder antikor hazırlandı. Hazırlanan sekonder antikor sferoidlere eklendi ve sferoidler oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası DPBS (1X) ile yıkamanın ardından sferoidlere 100 µl fruktoz-glisin karışımı eklendi ve sferoidlerin sabitlenmesi sağlandı. Lam üzerine alınan sferoidler Leica SP8 DIVE çoklu foton mikroskop (Leica Mikrosistemler, Almanya) ile görüntülendi. Alınan sferoid görüntülerinde proliferasyon belirteci Ki67 ekspresyon dereceleri hesaplanarak TAS-115’in bireysel ve DOXO ile birlikte sferoidler üzerine etkisi değerlendirildi. ISK/IF boyanmalarını değerlendirmek, her antikorun ekspresyon derecesini bir diğeri ile kıyaslamak ve kantitatif bir değer belirlemek gerektiğinden; tüm boyanma reaksiyonları gruplara göre ImageJ (Image

Processing and analysis in Java–NIH) analizleri yapılarak değerlendirildi. Her grup için ayrı ayrı hesaplanan ImageJ verileri her biri kendi içinde 4 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu, istatistiksel olarak değerlendirilip kontrol grubu (TAS-115 ve DOXO uygulanmamış sferoid grubu) ve DMSO grubu ile karşılaştırılarak 10.0.3 programı ile istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel analizlerde ortalama hesaplandı. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı ve $p < 0.05$ bulunan değerler anlamlı kabul edildi.

3.5. 3B Sferoid Modeline (GFP⁺MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası c-MET/HGF Aracılı mTOR Sinyalizasyonunun İmmünositokimyasal/İmmünofloresan Boyanmalar ile Değerlendirilmesi

TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası sferoidlerde 3.4.2'de yapıldığı şekilde immünositokimya/immünofloresan (ISK/IF) analizi ile c-MET (Invitrogen; #PA5-85951), p-c-MET (Invitrogen; #PA5-118762), HGF (Invitrogen; #MA5-14160) ve PI3K/Akt/mTOR yolağının son proteini olan p-mTOR (Invitrogen; #44-11256) ekspresyonları değerlendirildi.

3.5.1. c-MET/HGF İmmünohistokimyası

Çalışmamızda; GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan heterotipik sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte c-MET/HGF protein ekspresyonları üzerine etkisini değerlendirmek için; oluşturulan sferoidler 15 dk boyunca %0.1 Triton-X100 (Sigma Aldrich, Burlington, MA, ABD) kullanılarak permeabilize edildi. Ardından permeabilizasyon solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı ve takiben sferoidler 1 saat boyunca 0.3 M glisin (Sigma-Aldrich), %0.1 Tween-20 (Sigma-Aldrich), %10 normal keçi serum (NGS) ve %1 BSA (Sigma Aldrich) kullanılarak DPBS (1X) içerisinde hazırlanan bloklama solüsyonu ile bloklandı. Sferoidler daha sonra bloklama solüsyonu içerisinde 1:100 dilüsyonda hazırlanan tavşan poliklonal c-MET (Invitrogen; #PA5-85951) ve fare monoklonal HGF (Invitrogen; #MA5-14160) antikorları ile gece boyu 4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben sferoidler DPBS (1X) ile iki kez yıkandı ve 1:1000 dilüsyonda keçi anti-tavşan IgG (H+L)-Alexa Fluor 568 (Invitrogen; #A11011), 1:1000 dilüsyonda keçi anti-fare IgG (H+L)-Alexa Fluor 647 (Invitrogen; #A32728) ve

1:200 dilüsyonda Hoechst 33 258 (Sigma; #94401) DPBS (1X) içerisine eklenerek sekonder antikor hazırlandı. Hazırlanan sekonder antikor sferoidlere eklendi ve sferoidler oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası DPBS (1X) ile yıkamanın ardından sferoidlere 100 µl fruktoz-glisin karışımı eklendi ve sferoidlerin sabitlenmesi sağlandı. Lam üzerine alınan sferoidler Leica SP8 DIVE Çoklu foton Mikroskop (Leica Mikrosistemler, Almanya) ile görüntülendi. Ardından alınan sferoid görüntülerinde c-MET ve HGF ekspresyon dereceleri 3.4’de olduğu şekilde hesaplanarak TAS-115’in bireysel ve DOXO ile birlikte sferoidler üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.5.2. p-c-MET/HGF İmmünohistokimyası

HGF’nin reseptörüne bağlanması ile c-MET otofosforilasyonu indüklenmektedir. Fosforile olmuş c-MET (p-c-MET) alt sinyal yollarını aktive ederek kanser hücrelerinin yaşam döngüsünü şekillendirmektedir.

Çalışmamızda; GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan heterotipik sferoidlerde TAS-115’in bireysel ve DOXO ile birlikte p-c-MET/HGF protein ekspresyonları üzerine etkisini değerlendirmek için sferoidlerde ISK/IF analizler gerçekleştirildi. 1:100 dilüsyonda hazırlanan tavşan poliklonal p-c-MET (Invitrogen; #PA5-118762) ve fare monoklonal HGF (Invitrogen; #MA5-14160) antikorları ile gece boyu 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben sferoidler DPBS (1X) ile iki kez yıkandı ve 1:1000 dilüsyonda keçi anti-tavşan IgG (H+L)-Alexa Fluor 568 (Invitrogen; #A11011), 1:1000 dilüsyonda keçi anti-fare IgG (H+L)-Alexa Fluor 647 (Invitrogen; #A32728) ve 1:200 dilüsyonda Hoechst 33 258 (Sigma; #94401) DPBS (1X) içerisine eklenerek hazırlanan sekonder antikor kullanılarak 3.4.2’de olduğu şekilde immünositokimyasal analizler gerçekleştirildi.

3.5.3. p-mTOR İmmünohistokimyası

Fosforile olmuş c-MET (p-c-Met) mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) ve PI3K/Akt’yi içeren hücre içi sinyal yollarını aktive etmekte ve yolağın son proteini olan mTOR’un fosforillenmesine neden olmaktadır. Fosforile mTOR (p-mTOR) kanser hücrelerinin proliferasyonu ve metastazına yol açmaktadır.

GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan heterotipik sferoidlerde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte p-mTOR ekspresyonu üzerine etkisini değerlendirmek için sferoidlerde 1:100 dilüsyonda hazırlanan tavşan poliklonal p-mTOR (Invitrogen; #44-11256) primer antikor ve 1:1000 dilüsyonda keçi anti-tavşan IgG (H + L)-Alexa Fluor 568 (Invitrogen; #A11011) 1:1000 ve 1:200 dilüsyonda Hoechst 33 258 (DAPI) (Sigma; #94401) DPBS (1X) içerisine eklenerek hazırlanan sekonder antikor kullanılarak ISK/IF analizler gerçekleştirildi ve ekspresyon dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.6. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sitokin Yanıtları Üzerine Etkisinin İnsan Luminex (R) Buluş Analizi ile Değerlendirilmesi

İnsan Luminex (R) Buluş Analizi/ İnsan Premixed Çoklu Analiz Kiti (bio-technie RveD Systems; # LXXAHM-07); hücre kültürü süpernatantı, serum ve plazma örneklerinde, çoklu sandviç ELISA'lar kullanarak 50'ye kadar insan biyobelirteçlerini taramak için gereken bileşenleri içermektedir. Luminex® Buluş Testleri, seçilen biyobelirteçlerin seviyelerini tek bir örnekte değerlendirmek için kullanılabilir.

Çalışmamızda; meme kanser hücreleri ve akciğer fibroblastları ile hazırlanan sferoidlere TAS-115 ve DOXO'nun etkin süre ve dozda eklenmesi sonrası kontrol grubuna kıyasla HGFR/c-MET, TNF- α , IL-6 ve IL-1 α /IL-1F1 pro-inflamatuvar sitokinlerindeki değişimler İnsan Luminex (R) Buluş Analizi Kiti ile değerlendirildi.

3.6.1. Örnek Toplama ve Depolama

3.2.1'de yapıldığı şekilde hücreler 1:2 oranında (2000 MDA-MB-231: 4000 NHLF) DMEM'de birleştirilerek 96-kuyucuklu U-tabanlı kültür tabağında (Greiner Bio-One; #650970) heterotipik sferoidler oluşturuldu. TAS-115 ve DOXO'nun 3.3'de belirlenen uygun dozları sferoidlere eklendikten sonra, süpernatantlar toplanarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet kısım İnsan Luminex (R) Buluş Analizi için -80 °C dolapta muhafaza edildi.

3.6.2. Kit Bileşenleri ve Örneklerin Analiz için Hazırlanması

Dondurulmuş tüm örnekler kullanımdan hemen önce 16.000 x g hızla 4 dk santrifüj edildi. İnsan Premixed Çoklu Analiz Kiti içerisinde yer alan tüm reaktifler kullanım öncesi oda sıcaklığına getirildi. Tüm solüsyonlar kit protokolüne göre hazırlandı.

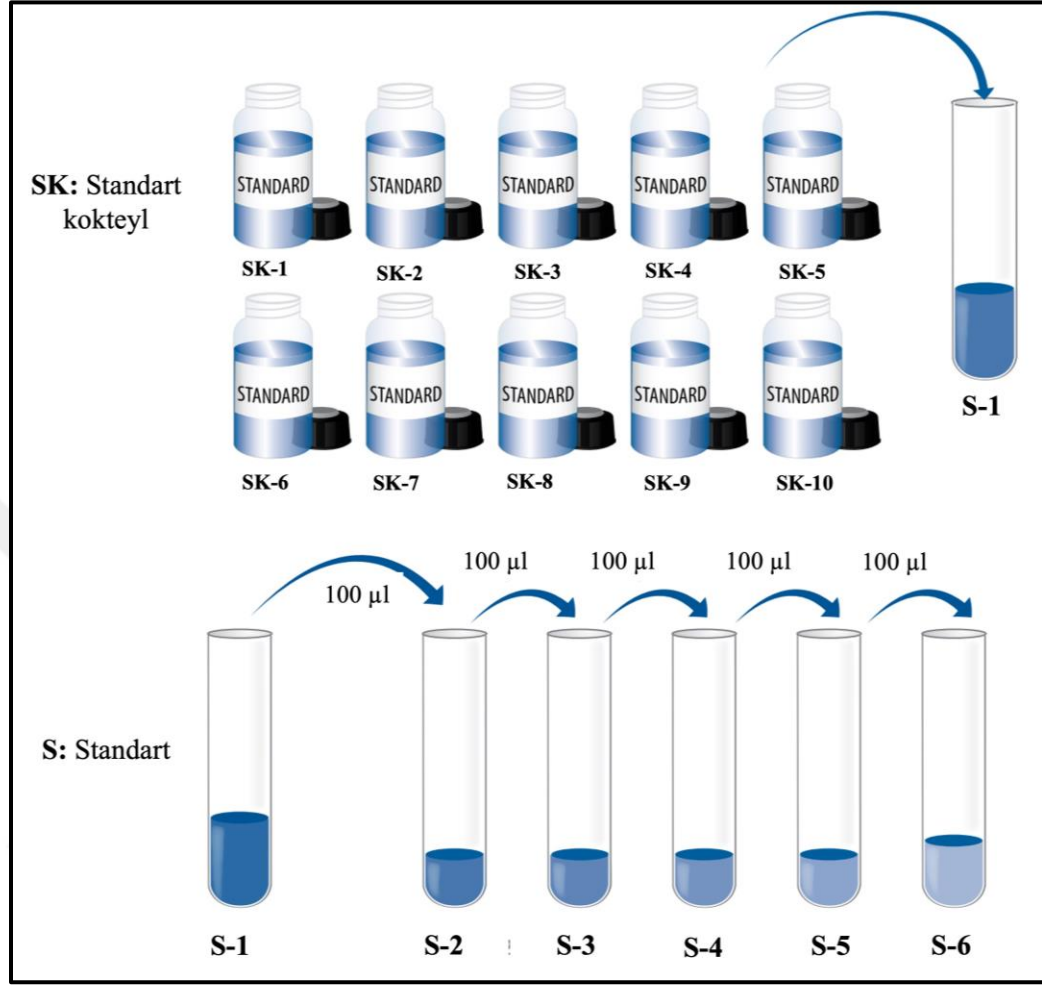
Yıkama tamponu: Kit içerisinde konsantre formda bulunmaktadır. Kristalize bir yapıda olduğu için kullanım öncesi oda sıcaklığına getirildikten sonra yavaşça karıştırılarak kristallerin çözülmesi sağlandı. 20 ml yıkama tamponu konsantresi ve 480 ml deiyonize suyla karıştırılarak 500 ml yıkama tamponu hazırlandı.

Standartlar: Kite bulunan İnsan Standart Kokteyller Kalibratör Seyreltici RD6-52 ile ayrı ayrı çözüldü. Standart 1'i oluşturmak için, **Tablo 3.1.'de** belirtildiği şekilde her bir standart kokteylden 100 µl ve her bir standart kokteyline göre farklı miktarda Kalibratör Seyreltici RD6-52, standart 1 tüpüne eklendi.

Tablo 3.1. İnsan Premixed Çoklu Analiz Kiti içerisinde yer alan standart kokteyl bileşenleri ve kalibratör seyreltici ile standart-1 oluşturulması için gereken miktarlar gösterilmektedir.

Standart Kokteyller	Tek Bir Tüpte Birleştirmek İçin Kullanılan Hacim (µl)	Gerekli Kalibratör Seyreltici Hacmi (µl)	Standart-1'in Toplam Hacmi (µl)
Standart Kokteyl-1	100 µl	900 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-2	Her birinden 100 µl	800 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-3	Her birinden 100 µl	700 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-4	Her birinden 100 µl	600 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-5	Her birinden 100 µl	500 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-6	Her birinden 100 µl	400 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-7	Her birinden 100 µl	300 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-8	Her birinden 100 µl	200 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-9	Her birinden 100 µl	100 µl	1000 µl
Standart Kokteyl-10	Her birinden 100 µl	0 µl	1000 µl

Standart-1 oluşturulduktan sonra her bir tüpe 200 µl kalibratör seyreltici RD6-52 eklendi ve diğer 5 test tüpü Standart 2-6 (S1-S6) olarak isimlendirildi. Standart-2 için Standart-1'den 100 µl alınarak 2. tüpe eklendi ve karıştırıldı. Standart-3 için Standart-2 tüpünden 100 µl alındı ve 3. tüpe eklendi. Bu işlem tüm standartlar için yapıldı (**Şekil 3.9.**)



Şekil 3.9. Standart kokteylleri ve standartların hazırlanışı şematize edilmiştir.

Seyreltilmiş mikropartikül kokteyli: Kokteyl şişesi 30 sn boyunca 1000 x g hızda santrifüj edildi ve ardından yavaş yavaş karıştırıldı. Mikropartikül kokteyli (500 µl) verilen karıştırma şişesinde diluent RD2-1 kullanılarak seyreltildi. HGFR/c-MET, VEGF- α , TNF- α , IL-6 ve IL-1 α /IL-1F1 mikropartikül konsantreleri seyreltilen mikropartiküllere ayrı ayrı eklendi. Işıktan korunacak şekilde karanlıkta muhafaza edildi.

Seyreltilmiş biotin-antikor kokteyli: Kokteyl şişesi 30 sn boyunca 1000xg hızda santrifüjlendi ve ardından yavaş yavaş karıştırıldı. Mikropartikül kokteyli verilen karıştırma şişesinde diluent RD2-1 kullanılarak seyreltildi.

Streptavidin-PE: Streptavidin-PE şişesi 30 sn boyunca 1000xg hızda santrifüjlendi ve ardından yavaş yavaş karıştırıldı. Streptavidin-PE konsantresi yıkama tamponu içerisinde seyreltildi. Işıktan korunacak şekilde karanlıkta muhafaza edildi.

3.6.3. Kit Analizi

96-kuyucuklu tabaklarda 50 µl standartlar ve örnekler eklendi (**Tablo 3.2.**).

Tablo 3.2. Kit analizi için oluşturulan 96-kuyucuklu tabaklarda standart ve örnekler için deney planı gösterilmektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Standartlar		Örnekler						
A	1 (Yüksek)		Kont-1	Kont-9	DMSO-5	TAS115-4	TAS115-12	DOXO-7	TAS115+DOXO-4
B	2		Kont-2	Kont-10	DMSO-6	TAS115-5	DOXO-1	DOXO-8	TAS115+DOXO-5
C	3		Kont-3	Kont-11	DMSO-7	TAS115-6	DOXO-2	DOXO-9	TAS115+DOXO-6
D	4		Kont-4	Kont-12	DMSO-8	TAS115-7	DOXO-3	DOXO-10	TAS115+DOXO-7
E	5		Kont-5	DMSO-1	DMSO-9	TAS115-8	DOXO-4	DOXO-11	TAS115+DOXO-8
F	6		Kont-6	DMSO-2	TAS115-1	TAS115-9	DOXO-5	TAS115+DOXO-1	TAS115+DOXO-9
G	7 (Düşük)		Kont-7	DMSO-3	TAS115-2	TAS115-10	DOXO-6B	TAS115+DOXO-2	
H	Zemin/Boş		Kont-8	DMSO-4	TAS115-3	TAS115-11	DOXO-6R	TAS115+DOXO-3	

Ardından her bir kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş mikropartikül kokteyli eklendi. 96-kuyucuklu tabak alüminyum folyo ile sıkıca sarıldı ve oda sıcaklığında 800 ± 50 rpm hızındaki çalkalayıcıda 2 saat inkübe edildi. 96-kuyucuklu tabakları kaplayacak şekilde mıknatıs problu cihaz tabakların alt kısmına yerleştirildi ve bu sayede mikropartiküller mıknatısla dibe çekildi. Ardından kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl yıkama tamponu eklendi, 1 dk bekletildi ve sıvı aynı şekilde uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş biotin-antikör kokteyli eklendi. 96-kuyucuklu tabak alüminyum folyo ile yeniden sıkıca sarıldı ve oda sıcaklığında 800 ± 50 rpm hızındaki çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Önceki basamakta yapıldığı şekilde Yıkama tampon ile yıkama yapıldı. Takiben her bir kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş Streptavidin-PE eklendi. 96-kuyucuklu tabak alüminyum folyo ile sıkıca sarıldı ve oda sıcaklığında 800 ± 50 rpm hızındaki çalkalayıcıda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından yıkama yapıldı. Yıkama sonrası 90 dk içerisinde Bio-Rad® analizörü kullanarak okuma yapıldı.

Her bir standart ve örnek için ikili okuma değerlerinin ortalamasını alındı ve ortalama Medyan Floresan Yoğunluğu (MFI) değeri oluşturuldu. Bio-Techne® Quantist™ ile her analit için bir standart eğri oluşturuldu. Her grup için ayrı ayrı hesaplanan veriler her biri

kendi içinde 4 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız deneylerin sonucu, istatistiksel olarak değerlendirilip kontrol grubu (TAS-115 ve DOXO uygulanmamış sferoid grubu) ve DMSO grubu ile karşılaştırılarak GraphPad 10.0.3 programı ile istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel analizlerde, ortalama hesaplandı. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı ve *p* değerleri hesaplandı.

3.7. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere hücrelerinin İnvazyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3B Ortamda Değerlendirilmesi

Kanser tedavilerine yönelik yeni adımlar atılmasına rağmen, standartlaştırılmış ve fizyolojik olarak ilgili *in vitro* test platformlarının eksikliği, anti-kanser ajanların etkinliğinin değerlendirilmesiyle ilgili süreci sınırlamaktadır. Bunun üstesinden gelebilmek için, Prof. Dr. İbrahim Tarık Özbolat'ın laboratuvarında kemoterapötik ve immünoterapötiklere yanıt veren dinamik akış tabanlı 3B biyoyazıcı ile çok ölçekli vaskülarize meme tümörü modeli geliştirilmiştir. Bu model sayesinde tümör invazyon ve migrasyonu *in vitro* ortamda taklit edilmiş; DOXO'nun tümör mikroçevresindeki davranışı değerlendirilmiştir (Dey ve ark., 2022).

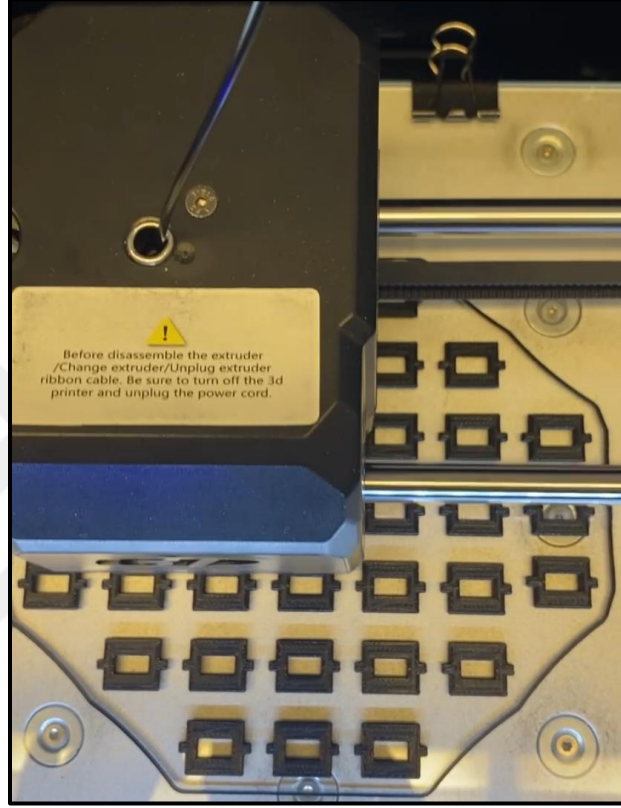
Çalışmamızda bu tekniği kullanarak; GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin *in vivo* tümör mikroçevresine benzer bir ECM ortamındaki invaziv davranışı ve bu davranışta TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte etkisinin değerlendirilmesi sağlandı.

3.7.1. 3B İnvazyon Analizi İçin Cihaz Yapımı

Cihaz; 2022 yılında Prof. Dr. İbrahim Tarık Özbolat ve ekibi tarafından poli-laktik asit (PLA) bazlı bir yapı ile karşılıklı duvarlarda delikler bulunan ve biyolojik maddeleri içerecek bir hazne şeklinde Autodesk Inventor yazılımı (Autodesk, San Rafael, CA, ABD) kullanılarak tasarlanmıştır (Dey ve ark., 2022).

Çalışmamızda da aynı cihaz, Ultimaker 2 (Ultimaker, Almanya) ile 3B olarak basıldı (Şekil 3.10.). Basılan cihazların tabanı lamelle kaplandı ve cihazlar gece boyu 75 °C sıcaklığa sahip inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından 3B baskılı cihazlar UV ışını ile 1 saat boyunca sterilize edildi. Sterilizasyonu takiben cihazlar 1mg/ml poli-D-

lizin hidrobromid (PDL) (Sigma; # P7886-50MG) ile kaplandı ve gece boyu 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde bekletildi. Cihazlar daha sonra fazla PDL'yi uzaklaştırmak için steril distile su ile durulandı ve baskıdan önce kuruması sağlandı.



Şekil 3.10. Ultimaker 2 ile 3B olarak basılan cihazlar görülmektedir.

3.7.2. 3B İnvazyon Analizi için Hidrojel Hazırlığı

Hidrojel yapısının ana bileşenleri, sıçan kuyruklarından ekstrakte edilen tip-1 kolajen (Dey ve ark., 2022), fibrinojen (Sigma; #F8630-56) ve trombin (Sigma; #T4648)'dir.

Eşit hacimlerde 4 mg/ml tip I kolajen ve 6 mg/ml fibrin karıştırılarak sırasıyla 2 mg/ml kolajen ve 3 mg/ml final fibrin konsantrasyonu elde edildi. Bu kompozit hidrojel 'C2F3' olarak adlandırılmaktadır (Dey ve ark., 2022). Her bir cihazda kullanılacak hidrojel yapımı için; sırasıyla 5 µl DPBS (10X), 0.51 µl sodyum hidroksit (1N NaOH), 22.4 µl DMEM, 50 µl fibrinojen (6 mg/ml), 22.2 µl kolajen (9 mg/ml) ve 1,5 U/ml trombin (50 U/ml) tüp içerisinde karıştırıldı. Fibrinojen hariç tüm solüsyonlar karıştırılmadan önce buz üzerinde bekletildi. Cihazı yarıya kadar doldurmak için kolajen-fibrin bazlı kompozit

hidrojelden yaklaşık 60 µl alınarak cihaza yavaş yavaş bırakıldı ve cihaz aspirasyon destekli biyobasım için hazır hale getirildi.

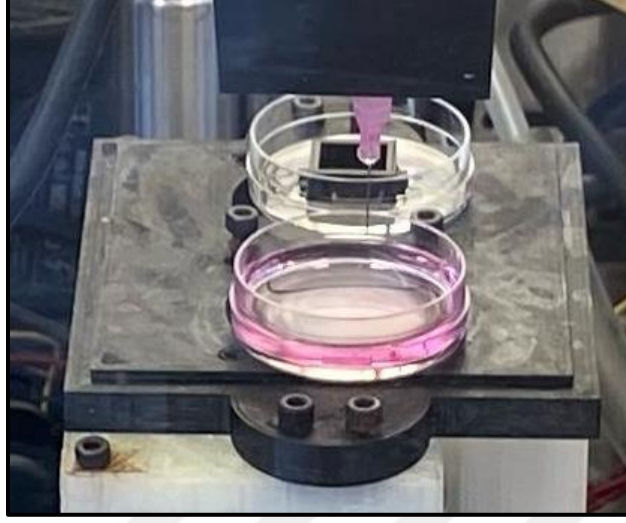
3.7.3. 3B İnvazyon Analizi için Sferoid Deney Modelinin Oluşturulması

3.2.1’de olduğu şekilde GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile çapı ortalama 200 µm olan heterotipik sferoidler oluşturuldu. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücrelerinin 3B kültürasyonunu takiben 48. saatin sonunda kuyucuklardaki sferoidlerin yapısı bozulmayacak şekilde pipetle çekilerek ependorflara alındı ve sferoidlerin ependorfun dibine çökmesi için beklendi. Daha sonra üst kısımda kalan medyum sferoidlere değmeyecek şekilde alındı. Ependorfa 1 ml DMEM besiyeri eklenerek sferoidlerin tamamı besiyeri ile birlikte 35 mmX10 mm petri kabına alındı. Petriye 2 ml daha DMEM besiyeri eklendi ve sferoidler hidrojel içesine aspirasyon destekli biyobasım için hazır hale getirildi.

3.7.4. Sferoidlerin Cihazlara Aspirasyon Destekli 3B Biyobasımı ve TAS-115’in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması

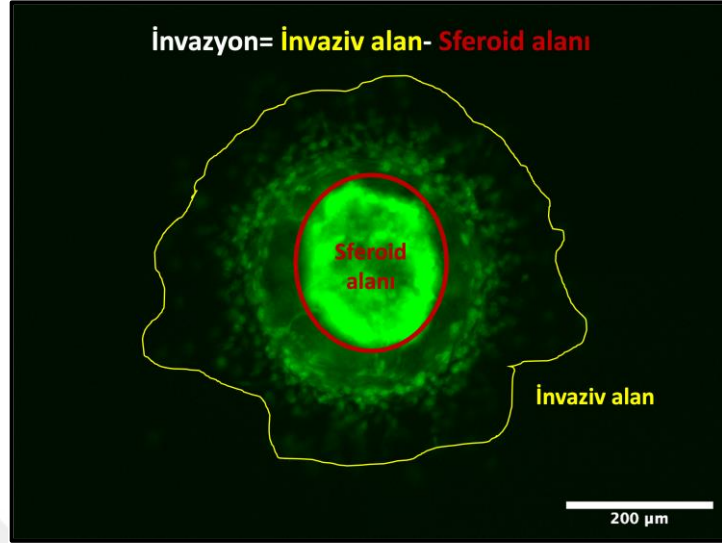
TAS-115’in bireysel ve DOXO ile birlikte tümör invazyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için 3B bir ECM ortamı oluşturuldu.

Hazırlanan heterotipik sferoidler çapı ≈150 µm ve vakum basıncı ≈20 mmHg olan 30G bir nozul kullanılarak fibrinojenden ayrı ayrı aspire edildi. Sferoidler daha sonra yarı çapraz bağlı C2F3 matriksine 5 mm/sn hızında aspirasyon destekli biyobaskı kullanılarak perfüzyon cihazındaki kanaldan ~100 µm (proksimal) ve ~500 µm (distal) mesafede 1 dk çapraz bağlanma için oda sıcaklığında tutulan hidrojel içerisine basıldı (**Şekil 3.11.**).



Şekil 3.11. 3B biyobasım için DMEM içerisinde hazırlanan sferoidlerin bulunduğu petri kabı ve hidrojel ile kaplı cihaz gösterilmektedir.

Biyobasım sonrası, cihazlar 20-30 dk bekletilerek sferoidlerin ilk hidrojel tabakasına sabitlenmesi sağlandı. Daha sonra kolajen-fibrin bazlı kompozit hidrojelden 60 μ l alınarak sferoidlere zarar vermeyecek şekilde yavaş yavaş cihaza bırakıldı ve ikinci hidrojel tabakası oluşturuldu. Takiben cihaz, 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 30 dk bekletildi ve hidrojel çapraz bağlanması sağlandı. Ardından cihaza, cihazın iç kısmını tamamen kaplayacak şekilde DMEM eklendi ve cihazlar 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Kanseri hücrelerinin invazyon potansiyelini değerlendirmek için TAS-115 ve TAS-115+DOXO grubu cihazlara TAS-115'in IC₂₅ değeri eklendi ve 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Her inkübasyon zaman noktasında sferoid görüntüleri floresan mikroskobu (AxioObserver, Zeiss, Oberkochen, Almanya) kullanılarak sferoid görüntüleri alındı. ImageJ programı kullanılarak invaziv alan ve sferoid alanı hesaplandı ve ikisi arasındaki fark ile invazyon derecesi (μ m²) belirlendi (Berens ve ark., 2015)(**Şekil 3.12.**).



Şekil 3.12. 3B biyobasım sonrası sferoidden ayrılan hücreler tarafından işgal edilen toplam alan ve invazyon derecesinin hesaplanması gösterilmektedir.

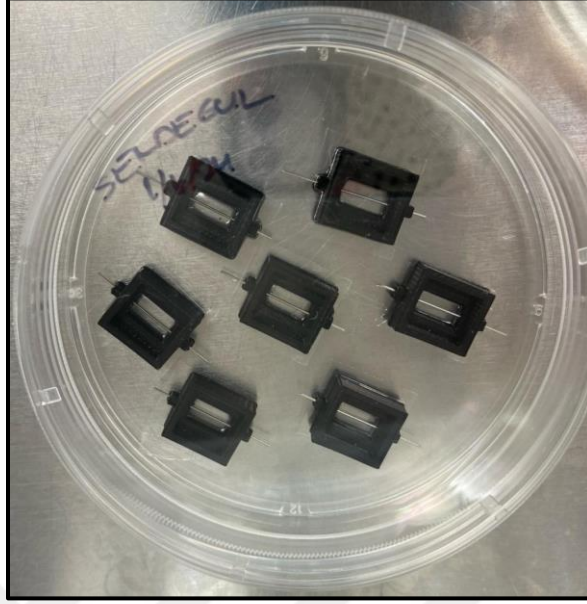
İnvazyon analizinden elde edilen veriler kontrolle kıyaslanarak gruplar arasında ortalama olarak ifade edildi. Sonuçların istatistiksel analizi, parametrelerin uygunluğuna göre ANOVA veya *Student t-testi* kullanılarak yapıldı. ANOVA analizlerinden sonra uygun post-hoc analizler gerçekleştirildi ve $p < 0.05$ bulunan değerler anlamlı kabul edildi.

3.8. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere hücrelerinin Migrasyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3B Vaskülerize Ortamda Değerlendirilmesi

Kanser hücrelerinin penetre ve perfüze edilen bir kan damarından uzaklığı, tümörün hayatta kalması için kritik bir önem taşıyan oksijen ve besin maddelerinin difüzyon profillerini etkilemektedir. Tümör dokularında ilaç taşınması ve dağılımı da tümörlerin etrafındaki damar yapısına, çözünen maddelerinin penetrasyon mesafesine ve plazma farmakokinetiğine bağlıdır (Dey ve ark., 2022).

3.8.1. 3B Perfüzyon Sistemi için Cihaz Yapımı

Perfüzyon sistemi için 3.7.1'de gösterilen cihazlar kullanıldı. PDL ile kaplamayı takiben cihazların duvar deliklerinden paslanmaz steril çelik teller yerleştirildi ve cihaz hidrojel ortamı için hazır hale getirildi (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. 3B perfüzyon sistemi için hazırlanan perfüzyon cihazları gösterilmektedir.

3.8.2. 3B Perfüzyon Sistemi için Hidrojel Hazırlığı

3.7.2.'de yapıldığı şekilde kompozit hidrojel (C2F3) hazırlandı. Her bir cihazda kullanılacak hidrojel yapımı için; sırasıyla 5 µl DPBS (10X), 0.51 µl sodyum hidroksit (1N NaOH), 22.4 µl EGM-2MV besiyeri (Mikrovasküler Endotel Hücre Büyüme Besiyeri-2 BulletKit™), 50 µl fibrinojen (6 mg/ml), 22.2 µl kolajen (9 mg/ml) ve 1.5 U/ml trombin (50 U/ml) tüp içerisinde karıştırıldı. Kolajen-fibrin bazlı kompozit hidrojelden yaklaşık 60 µl alınarak cihaza yavaş yavaş bırakıldı ve cihaz aspirasyon destekli biyobasım için hazır hale getirildi (Şekil 3.14-A1).

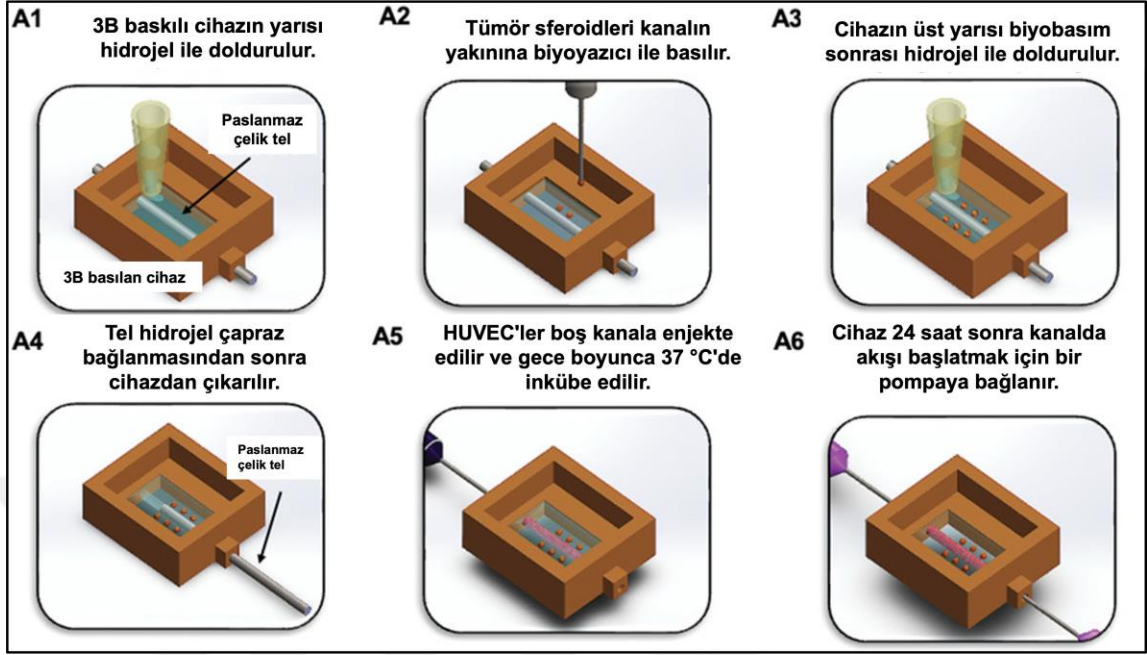
3.8.3. tdTomato⁺HUVEC Hücrelerinin Kültürasyonu ve Deneye Hazır Hale Getirilmesi

tdTomato lentiviral vektör ile kırmızı işaretlenmiş insan göbek toplardamar endotel hücreleri (tdTomato⁺HUVEC) (Lonza; #C2519A); 500 ml EBMTM-2 Bazal Ortam, 25 ml FBS, 0.2 ml Hidrokortizon, 2 ml hFGF-B, 0.5 ml VEGF, 0.5 ml R3-IGF-1, 0.5 ml askorbik asit, 0.5 ml hEGF, 0.5 ml GA-1000 bileşenleri ile hazırlanan EGM2-MV besiyerinde ve 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde kültüre edildi. Hücreler %80 konfluensiye ulaştıktan sonra medyumları uzaklaştırıldı ve hücreleri flasklardan uzaklaştırmak için %0.25 tripsin-%0.1 EDTA çözeltisi (Life Technologies) kullanıldı. Flasklara 1 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve inkübatörde 5 dk bekletildi.

Takiben flasklara 1 ml EGM2-MV eklenerek tripsinin aktivasyonu nötralize edildi. Kültür kabında yüzer hale gelen hücreler ve medyum toplanarak 1.5 ml'lik tüplere alındı. 1600 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek hücrelerin tüplerin dibine çökmesi sağlandı. Hücrelerin üzerindeki Tripsin-DMEM karışımı medyum uzaklaştırıldı ve sonrasında hücrelerin 1 ml yeni besiyeri ile yavaşça dağılması sağlandıktan sonra bu süspansiyondan 250 µl alınarak yeni bir 25 mm² flaska aktarıldı. Üzerine flaskların tabanını kaplayacak şekilde 4-5 ml EGM2-MV eklendi ve hücrelerin büyümeleri takip edildi. Hücrelerin pasajlanması işlemine proliferasyon hızlarına bağlı olarak 2-3 günde bir olacak şekilde devam edildi. Hücrelerin karakterlerini koruduklarına emin olmak adına her pasaj sonrası hücrelerin morfolojileri ve canlılıkları kontrol edildi. 2. kez pasajlanması yapılan hücreler *in vitro* deneylerde kullanılmak üzere hazırlandı.

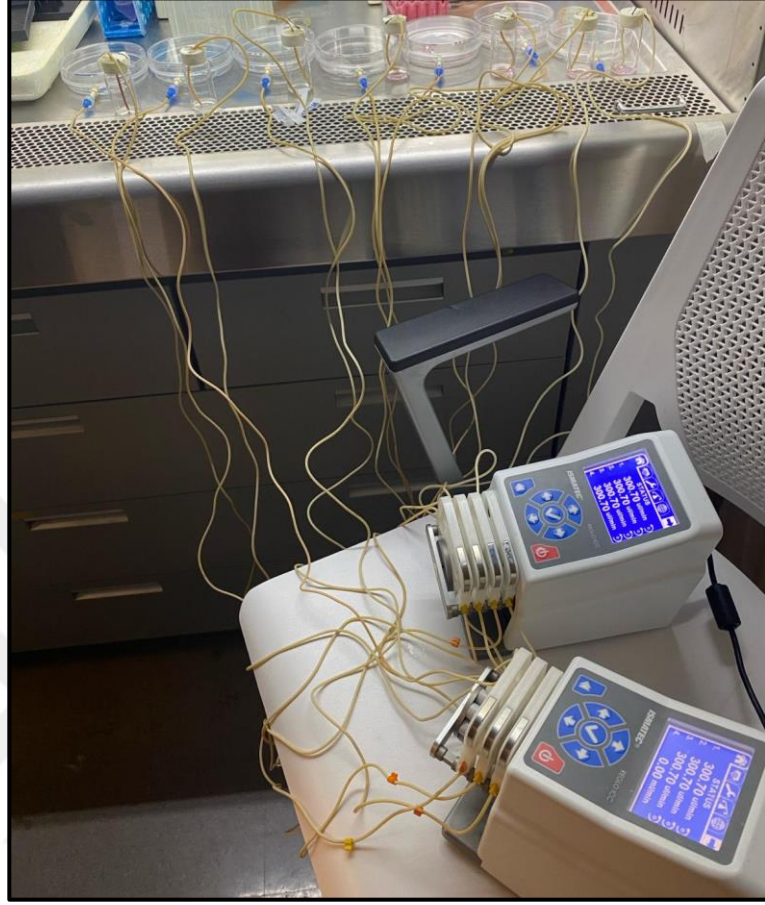
3.8.4. Sferoidlerin Perfüzyon Cihazına Aspirasyon Destekli 3B Biyobasımı

3.7.3'deki ile aynı şekilde hazırlanan heterotipik sferoidler, aspirasyon destekli biyo-baskı kullanılarak perfüzyon cihazındaki kanaldan ~100 µm (proksimal) ve ~500 µm (distal) mesafede hidrojel içerisine basıldı (Şekil 3.14-A2). Biyobasım sonrası cihazlar 20-30 dk bekletilerek sferoidlerin ilk hidrojel tabakasına sabitlenmesi sağlandı. Daha sonra 3.7.4'de olduğu şekilde C2F3 kompoziti ile hidrojel tabakaları oluşturuldu. Takiben cihaz, 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 30 dk bekletildi ve hidrojel çapraz bağlanması sağlandı (Şekil 3.14-A3). Hidrojelin tamamen çapraz bağlanmasından sonra paslanmaz çelik tel cihazdan dikkatlice çıkarıldı ve bu sayede *in vitro* ortamda damar yapısını taklit etmek için açık bir kanal oluşturuldu (Şekil 3.14-A4). Ardından, oluşturulan kanala EGM-2MV besiyeri içerisinde kültüre edilen 25-30 milyon hücre/ml konsantrasyonunda tdTomato⁺HUVEC hücresi kanalın tamamını kaplayacak şekilde eklendi ve cihaz 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 30 dk önce ters, sonra düz pozisyonda bekletildi. Ardından cihaza, cihazın iç kısmını tamamen kaplayacak şekilde EGM-2MV besiyeri eklendi. Perfüzyon cihazları 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde gece boyu inkübe edildi (Şekil 3.14-A5).



Şekil 3.14. Aspirasyon destekli biyobaskı kullanılarak oluşturulan 3B perfüze edilebilir heterotipik tümör modeli şematik olarak gösterilmektedir. **A1.** 3B basılmış perfüzyon cihazının yarısı hidrojel ile kaplanmıştır, **A2.** heterotipik sferoidler kanalın yakınına basılmıştır, **A3.** Perfüzyon cihazının üst yarısı sferoid basımı sonrası hidrojel ile doldurulmuştur, **A4.** hidrojel çapraz bağlanmasının ardından paslanmaz çelik tek perfüzyon cihazından çıkarılmıştır, **A5.** HUVEC'ler boş kanal içerisine bırakılmış ve cihaz 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir, **A6.** Ertesi gün, endotelize kanaldan perfüzyonu başlatmak için cihaz, harici bir pompaya bağlanmıştır (Dey ve ark., 2022).

HUVEC kanal duvarlarına tutunduktan sonra cihaz harici bir pompaya (Reglo Ismatec, MasterFlex, Radnor, PA, ABD) bağlandı. Pompanın perfüzyonu sağlayıp sağlamadığını test etmek ve akış borularından sıvının geçişini kolaylaştırmak için pompanın DPBS (1X) ile 300.70 µl/dk perfüzyon hızında yıkanması sağlandı (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Perfüzyon cihazları için oluşturulan harici pompa sistemi gösterilmektedir.

Ardından perfüzyon cihazları EGM-2MV besiyeri ile 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde 24 saat perfüze edildi. Perfüzyon hızı 0.7 µL/dk olacak şekilde sabitlendi. Besiyeri ile inkübasyonun ardından cihaz EGM-2MV besiyeri içerisinde hazırlanan TAS-115 (212.5 µM) ve DOXO (1.5 µM)'nun 3.3'de belirlenen uygun dozları ile 24 saat 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarına sabitlenmiş inkübatörde perfüze edildi (**Şekil 3.14-A6**).

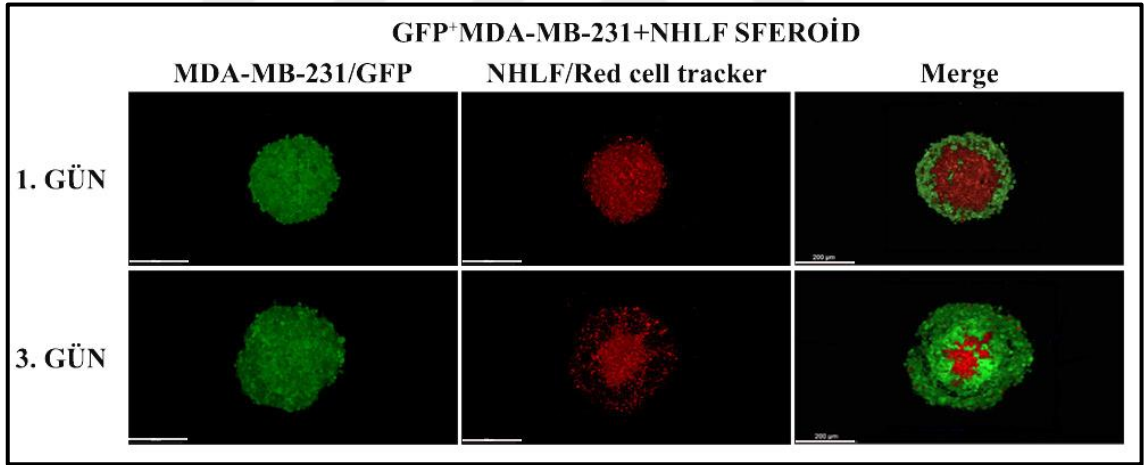
Perfüzyonun ardından cihazlardan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra ortama 1 ml %4 paraformaldehit eklenerek sferoidler gece boyu 4 °C'de fiksede edildi. Fiksasyonu takiben paraformaldehit ortamdan uzaklaştırıldı, ardından sferoidler 1ml DPBS (1X) ile yıkandı ve Leica SP8 DIVE çoklu foton mikroskobunda 16x immersiyon lensi kullanılarak görüntüledi. Cihazlardaki sferoidler dahil tüm bölgeyi görüntülemek için Leica yazılım arayüzünde Z yığınlarının (Z-stack imaging) ayrı ayrı tanımlanmış bölgelerden toplandı

ve ardından ‘mozaik birleştirme’ yapılarak tüm görüntülerin birleştirildiği bir görüntüleme akışı ayarlandı. Alınan sferoid görüntülerinde MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğu hesaplanarak TAS-115 ve DOXO’nun etkin dozlarının *in vitro* taklit edilen tümör mikroçevresindeki olası etkileri değerlendirildi. Her grup için ayrı ayrı hesaplanan ImageJ verileri her biri kendi içinde 4 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu, istatistiksel olarak değerlendirilip kontrol grubu (TAS-115 ve DOXO uygulanmamış sferoid grubu) ile karşılaştırılarak GraphPad 10.0.3 programı ile istatistiksel analiz ve hesaplamalar gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde, ortalama hesaplandı. Çoklu karşılaştırmada post-hoc Tukey testi kullanıldı ve p değerleri hesaplandı. $p < 0.05$ bulunan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. GFP⁺MDA-MB-231 ve Red⁺ NHLF Hücreleri ile Sferoid Oluşturulması

Yapılan *in vivo* meme kanseri çalışmalarında, kanser hücrelerinin akciğere metastaz yaptığı ve burada proliferen olan kanser hücrelerinin akciğer alveolar hücrelerinin canlılığını kaybetmesine neden olduğu bilinmektedir (Dilmac ve ark., 2022). 3B sferoid kültürasyonunda 24. saatte alınan sferoid görüntüsüne kıyasla 72. saatte yeşil floresan işaretli MDA-MB-231 hücrelerinin proliferen olarak sayıca arttığı; kırmızı işaretli NHLF hücrelerinde ise ilk güne kıyasla hücre sayısının azaldığı ve küre formunu kaybetmeye başladığı görüldü (Şekil 4.1.). Bu bulgu, *in vivo* metastatik meme kanseri modeli ile benzer nitelikte olup; kanser hücrelerinin akciğer fibroblast hücrelerine olumsuz etki yarattığının 3B ortamda *in vitro* ortamda görülmesidir.

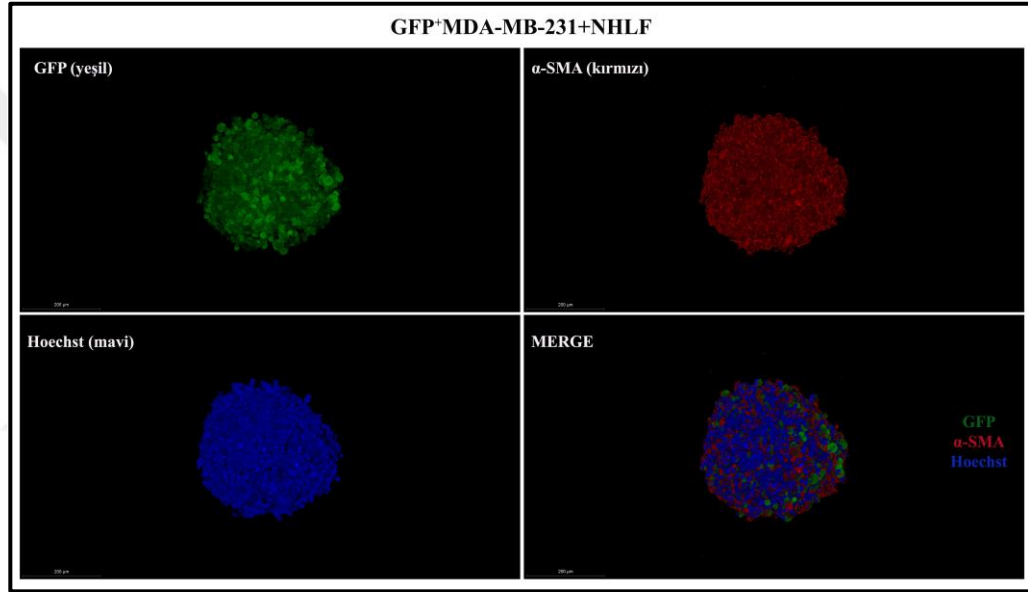


Şekil 4.1. GFP⁺MDA-MB-231 (yeşil) ve NHLF (kırmızı) hücrelerinin birlikte kültürasyonu sonucu oluşan heterotipik sferoidin 1. ve 3. gününe ait görüntü gösterilmektedir (Ölçüm çubuğu 200 μ m'dir).

4.2. Sferoidlerde Hücresel Yapının Alfa-Düz Kas Aktin (α -SMA) ile Değerlendirilmesi

Sferoid kompaksiyonu, 3B hücre kültürlerinde hücrelerin sıkı bir şekilde bir araya gelerek kompakt bir yapı oluşturmasıdır (Z. Huang ve ark., 2020). α -SMA, doku fibrogenezinin önemli efektör hücreleri olarak kabul edilen aktif fibrojenik hücrelerin bir alt kümesi olan miyofibroblastların belirteci olarak kullanılmaktadır. α -SMA, özellikle fibroblastlar, miyofibroblastlar ve vasküler düz kas hücreleri gibi hücrelerde, hücresel kontraktiletiyi artırarak matriks düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. α -SMA'nın ekspresyonu,

kompaksiyonun dolaylı bir göstergesidir (Yakavets ve ark., 2020). MDA-MB-231 hücreleri, EMT göstermeye eğilimlidirler. EMT ile α -SMA ekspresyonu artmakta bu da sferoid yapısının kompaksiyonuna katkı sağlamaktadır (Franchi-Mendes ve ark., 2021). Çalışmamızda morfolojik değerlendirmeyi takiben oluşturulan heterotipik sferoidlerde hücresel mimarinin belirlenmesi için yapılan α -SMA ISK/IF boyamaları sonrası görülen yoğun ekspresyon sonucunda; sferoid yapısının oluştuğu ve bağ dokusunun temel bileşeni olan miyofibroblastların sferoid kompaksiyonunu sağladığı görüldü (Şekil 4.2.).

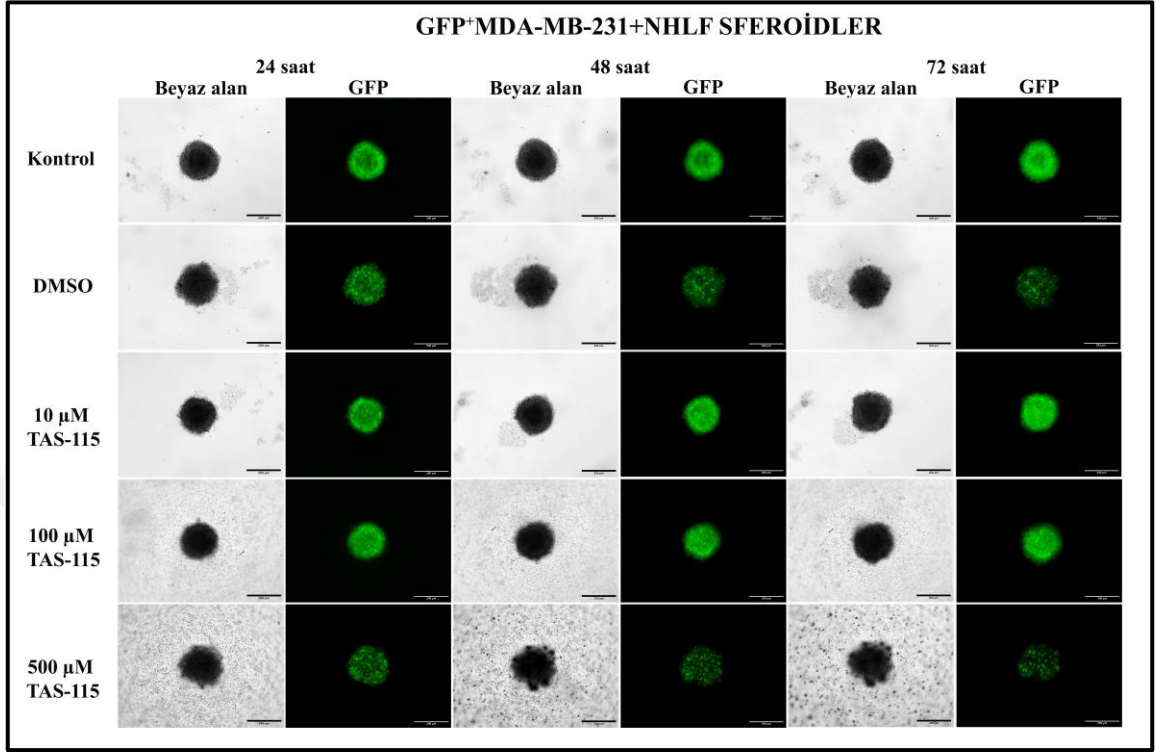


Şekil 4.2. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin α -SMA (kırmızı) ve Hoechst (mavi) immüno Floresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu 200 μ m'dir).

4.3. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF Heterotipik Sferoidlerinde TAS-115 ve DOXO'nun Etkinliğinin Değerlendirilmesi

4.3.1. TAS-115'in Oluşturulan Sferoidler Üzerine Bireysel Etkisinin Belirlenmesi

Sferoidlere farklı dozlarda TAS-115 uygulamasının ardından 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası alınan sferoid görüntülerinde yeşil floresan işaretli MDA-MB-231 hücrelerinin yüksek dozlarda TAS-115 uygulamasına bağlı olarak sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın zamanla doğru orantılı olarak ilerlediği görüldü. Beyaz alan sferoid görüntüsünde sferoid kompaksiyonun korunduğu ancak 500 μ M TAS-115 uygulaması sonrası bu kompaksiyonun kanser hücreleri kaynaklı bozulmaya başladığı görüldü (Şekil 4.3.).

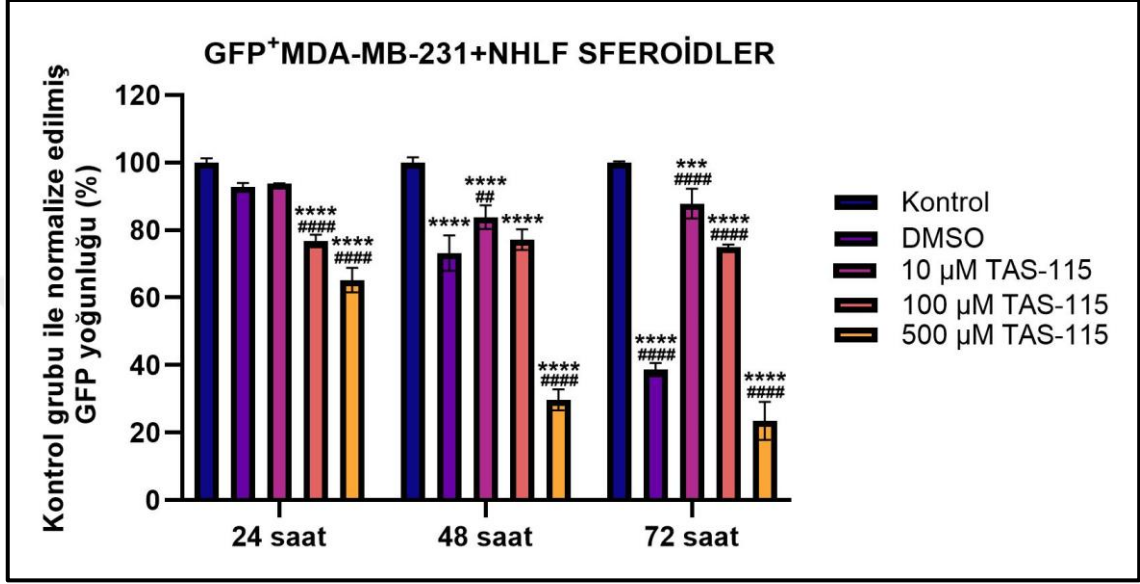


Şekil 4.3. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat TAS-115 uygulaması sonrası ZEISS Axio floresan mikroskopuyla alınan beyaz alan ve GFP görüntüleri gösterilmektedir (Ölçüm çubuğu 200 µm'dir).

TAS-115 uygulaması sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğu ve MDA-MB-231+NHLF hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin boyutları hesaplandı.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; 24 saatlik inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde GFP yoğunluğunun 100 µM ve 500 µM TAS-115'in uygulandığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma yarattığı görüldü ($p<0.0001$). DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında benzer şekilde 100 µM ve 500 µM TAS-115 gruplarında GFP yoğunluğu da anlamlı şekilde azaldı ($p<0.0001$) (Şekil 4.4.). 48 saat inkübasyon sonrası yapılan GFP yoğunluk analizi sonucunda; kontrole kıyasla tüm gruplarda anlamlı bir azalış mevcuttu ($p<0.0001$). Bununla birlikte DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında 500 µM TAS-115 grubunda GFP yoğunluğunun anlamlı şekilde azaldığı ($p<0.0001$) görüldü (Şekil 4.4.). Son olarak 72 saatlik inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde GFP yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.0001$). TAS-115'in çözücüsü DMSO grubu ile

diğer gruplar kıyaslandığında GFP yoğunluğunun diğer saatlerde olduğu gibi 10 μ M ve 100 μ M TAS-115 uygulanan gruplarda arttığı ancak 500 μ M TAS-115 uygulanan grupta ise anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat TAS-115 uygulaması sonrası alınan sferoid görüntülerinde kontrol grubu ile normalize edilmiş GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analiz grafikleri yer almaktadır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

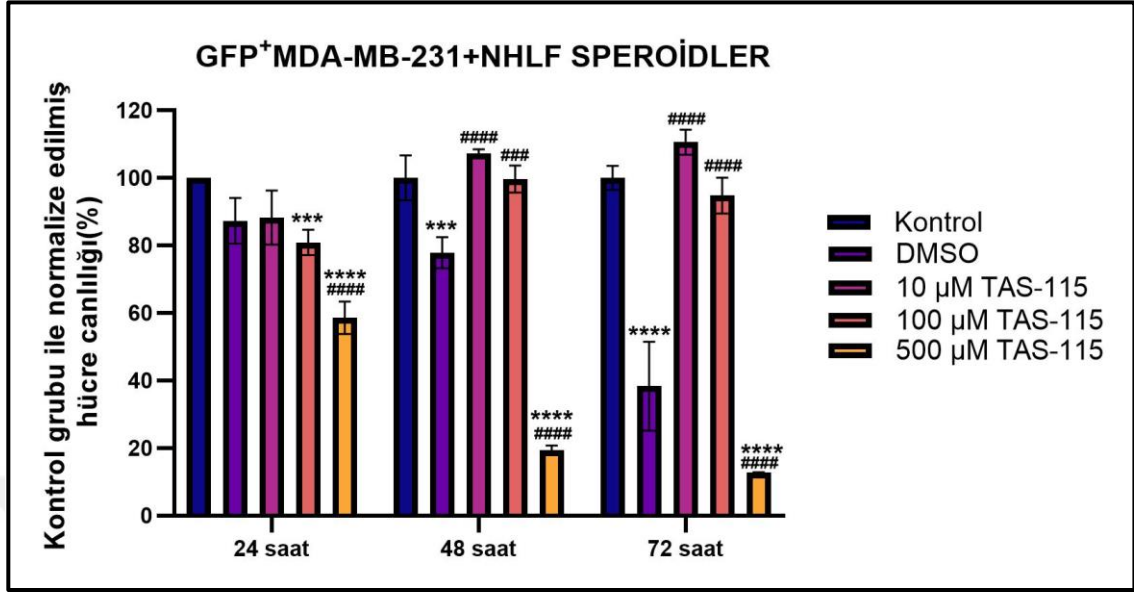
Bu bulgular doğrultusunda TAS-115 uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci olan GFP yoğunluğunun azalmasına sebep olduğu; yani, meme kanseri hücrelerinin canlılığını olumsuz yönde etkilediği ilk kez çalışmamız ile gösterilmiş oldu.

Sferoidlere farklı dozlarda TAS-115 uygulaması sonrası 24 saatlik inkübasyonun ardından kontrol grubuna oran olarak yapılan istatistiksel analizler sonucunda; 100 μ M ($p<0.001$) ve 500 μ M TAS-115 ($p<0.0001$) dozlarının uygulandığı gruplarda canlılık oranında kontrol grubu sferoid hücrelerine kıyasla anlamlı bir azalma olduğu görüldü. TAS-115'in çözücüsü DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında 500 μ M ($p<0.0001$) TAS-115 dozlarında canlılığın azaldığı görüldü (Şekil 4.5.). Bu durum canlılıktaki azalışın DMSO değil yüksek dozlu TAS-115 uygulaması kaynaklı olduğunu göstermektedir.

48 saatlik inkübasyonun ardından yapılan istatistiksel analizler sonucunda; 10 μ M ve 100 μ M TAS-115 uygulanan grupların canlılık seviyesi kontrole benzer şekildeydi ($p>0.05$).

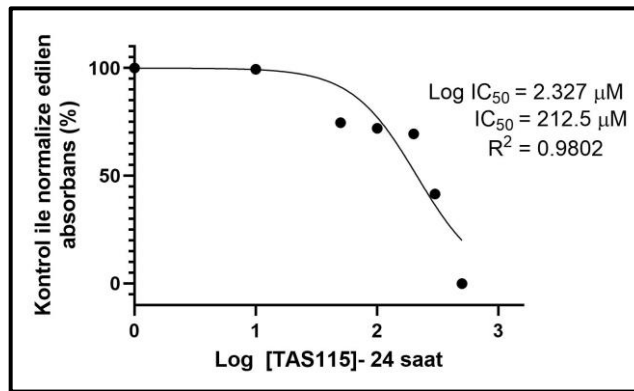
Bu durum bize her iki hücre hattının da hücre sayısının iki katına çıkma zamanının (doubling time) 24-36 saat olması nedeniyle 48. saate hücrelerin proliferere olduğu ancak yine de bu proliferasyonun iki kat hücre seviyesinde olmadığı ve TAS-115'in etkinliğinin devam ettiğini düşündürdü. DMSO ($p<0.01$) ve 500 μ M TAS-115 ($p<0.0001$) gruplarında ise kontrole kıyasla canlılığın anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Özellikle 500 μ M TAS-115 uygulaması sonrası bu azalış oldukça dikkat çekiciydi. DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında 10 μ M ve 100 μ M grubunda canlılık oranı DMSO grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.0001$) ancak; 500 μ M TAS-115 uygulanan grupta anlamlı şekilde azalma olduğu görüldü ($p<0.0001$) (**Şekil 4.5.**).

72 saatlik inkübasyonun ardından yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise DMSO ve 500 μ M TAS-115 uygulanan gruplarda kontrole kıyasla canlılığın anlamlı şekilde azaldığı görüldü. DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında 10 μ M ve 100 μ M gruplarında canlılık oranı DMSO grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti ancak; 500 μ M TAS-115 uygulanan grupta anlamlı şekilde azalma olduğu görüldü ($p<0.0001$) (**Şekil 4.5.**). Bu sonuç ile 500 μ M TAS-115 dozu ile aynı oranda kullanılan DMSO'nun etkisinin, 500 μ M TAS-115 uygulamasına göre daha düşük olduğu ve TAS-115'in bireysel etkisinin canlı sağkalımındaki rolünün sadece çözücüsü DMSO'dan kaynaklanmadığı gösterilmiş oldu.



Şekil 4.5. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleriyle oluşturulan sferoidlerde farklı konsantrasyonlarda TAS-115'in 24, 48 ve 72 saat sonundaki etkisinin kontrol grubuna oranlanarak belirlenen canlı hücre oranları gösterilmektedir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$, #### $p < 0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

Elde edilen bulgular doğrultusunda TAS-115'in etkin değeri (IC_{50}) GraphPad 10.0.3 programı ile analiz edildi ve TAS-115 için 24 saat inkübasyon sonucuna göre bu değer 212.5 μM olarak belirlendi (Şekil 4.6.).

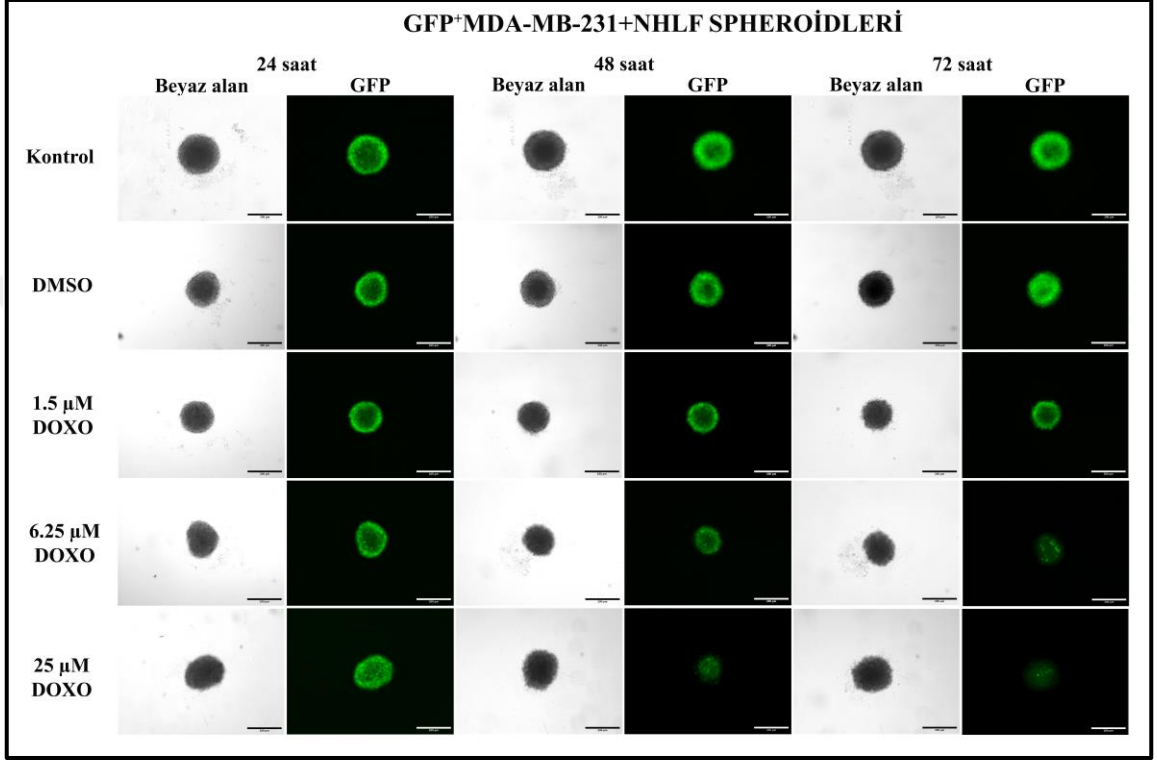


Şekil 4.6. Sferoidlerin oluşturulmasının ardından farklı konsantrasyonlarda TAS-115 uygulaması ve alamar mavisi canlılık testi sonucunda TAS-115'in en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC_{50} değeri de 212.5 μM olduğunu belirten grafik gösterilmektedir.

4.3.2. DOXO'nun Oluşturulan Sferoidler Üzerine Bireysel Etkisinin Belirlenmesi

Sferoidlere farklı dozlarda DOXO uygulamasının ardından 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası alınan sferoid görüntülerinde; yeşil floresan işaretli MDA-MB-231 hücrelerin

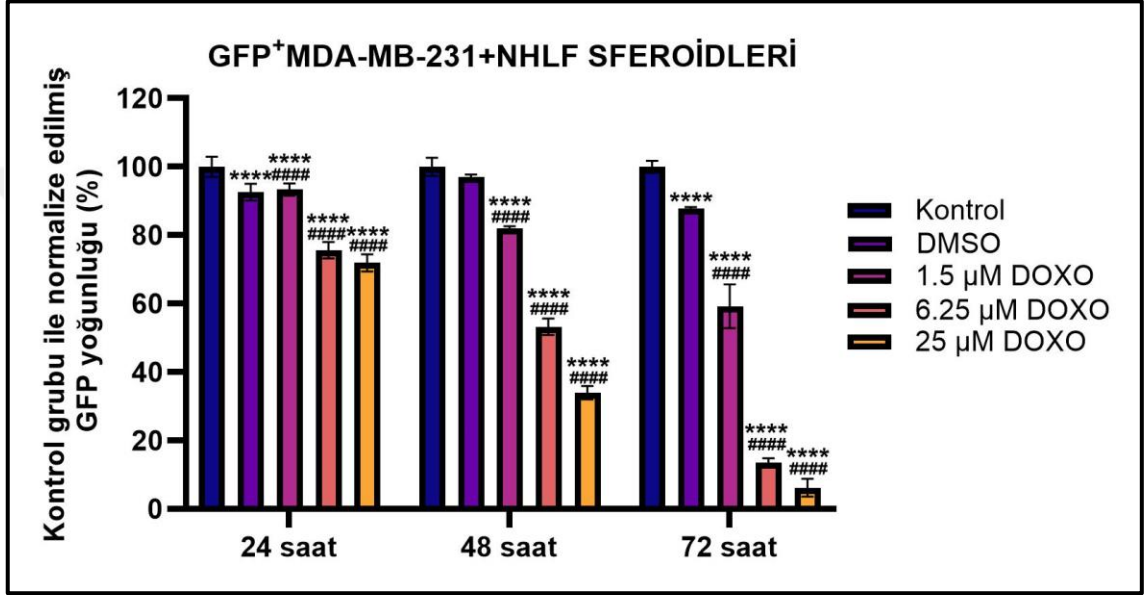
yüksek dozlarda DOXO uygulamasına bağlı olarak sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın zamanla doğru orantılı olarak ilerlediği, beyaz alan sferoid görüntüsünde ise sferoid kompaksiyonun korunduğu görüldü (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat DOXO uygulaması sonrası ZEISS Axio floresan mikroskobuyla alınan beyaz alan ve GFP görüntüleri gösterilmektedir (Ölçüm çubuğu 200 µm'dir).

DOXO uygulaması sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğu hesaplandı. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; 24 saatlik inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde GFP yoğunluğunun; kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı şekilde bir azalma sergilediği görüldü ($p < 0.0001$) (Şekil 4.8.). 48 saat inkübasyon sonrası kontrole kıyasla 1.5 µM DOXO, 6.25 µM DOXO ve 25 µM DOXO uygulanan gruplarda GFP yoğunluğu anlamlı şekilde azaldı ($p < 0.0001$) (Şekil 4.8.). 72 saatlik inkübasyonun ardından GFP yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Özellikle 48 saat sonrası itibarıyla DOXO uygulanan tüm gruplarda bu azalış oldukça arttı. 72 saatin sonunda 25 µM DOXO uygulanan grupta kanser hücrelerinin floresan ışımasının yok denecek kadar azalışı dikkati çekmekteydi (Şekil

4.8.). DOXO'nun çözücüsü DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında GFP yoğunluğunun anlamlı şekilde azaldığı görüldü (Şekil 4.8.). Bu sonuç ile 25 µM DOXO dozu ile aynı oranda kullanılan DMSO'nun etkisinin, 25 µM DOXO uygulamasına göre daha düşük olduğu ve DOXO'nun bireysel etkisinin canlı sağkalımındaki rolünün sadece çözücüsü DMSO'dan kaynaklanmadığı gösterilmiş oldu.

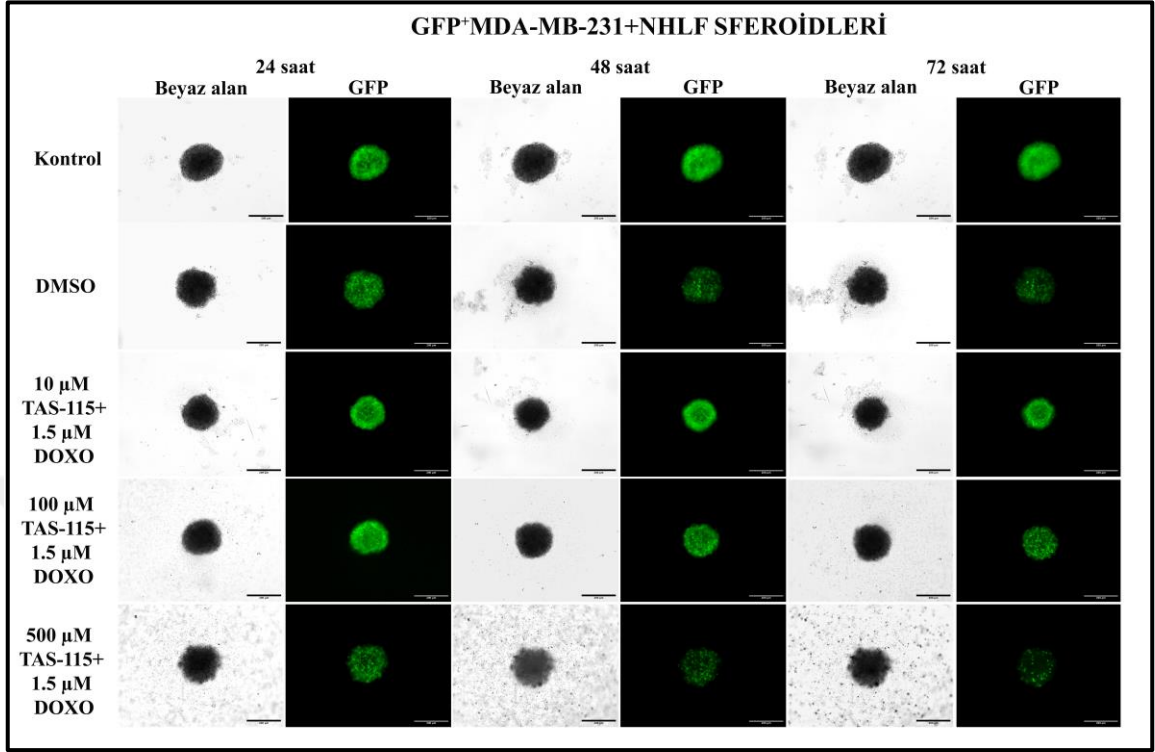


Şekil 4.8. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat DOXO uygulaması sonrası GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analiz grafikleri yer almaktadır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

Tüm bulgular sonucunda TAS-115'in bireysel etkisi de göz önüne alınarak DOXO'nun en düşük dozu olan 1.5 µM ile deneylere devam edilmesine karar verildi.

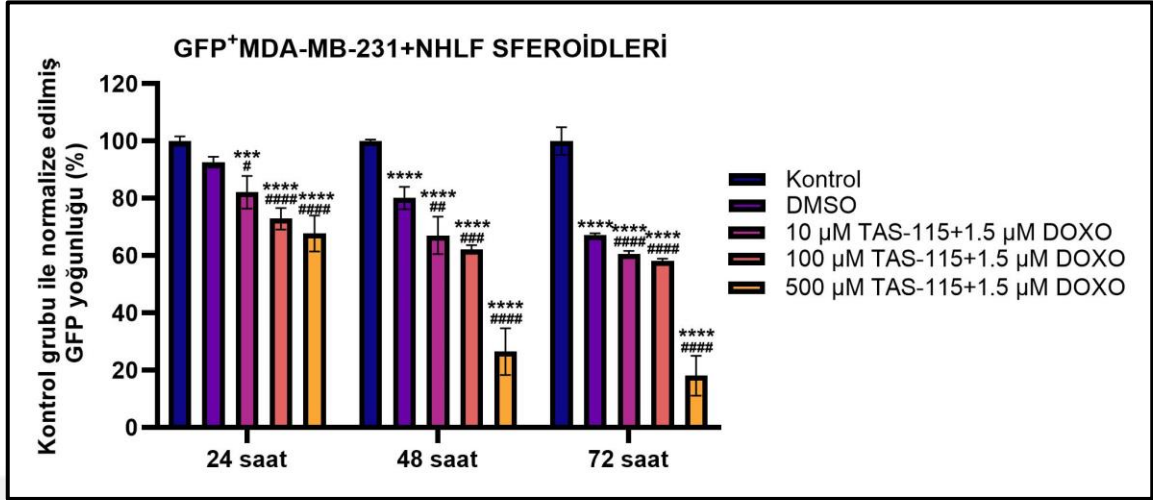
4.3.3. TAS-115 ve DOXO'nun Sferoidler Üzerine Birlikte Etkisinin Belirlenmesi

Sferoidlere TAS-115'in farklı dozlarının (10 µM, 100 µM ve 500 µM) ve DOXO'nun (1.5 µM) etkin dozunun eş zamanlı uygulanmasının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında alınan sferoid görüntülerinde; TAS-115 ve DOXO'nun birlikte uygulanmasına bağlı olarak GFP yoğunluğunun azaldığı ve bu azalmanın da zamanla doğru orantılı olarak ilerlediği görüldü (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat TAS-115 ve 1.5 µM DOXO uygulaması sonrası ZEISS Axio floresan mikroskobuyla alınan beyaz alan ve GFP görüntüleri gösterilmektedir (Ölçüm çubuğu 200 µm'dir).

TAS-115 ve DOXO'nun birlikte uygulanması sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından alınan sferoid görüntülerinde hesaplanan GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analizler sonucunda; 24 saatlik inkübasyonun ardından kontrol grubuna kıyasla 10 µM TAS-115+1.5 µM DOXO ($p<0.001$), 100 µM TAS-115+1.5 µM DOXO ve 500 µM TAS-115+1.5 µM DOXO ($p<0.0001$) gruplarında anlamlı bir azalma olduğu görüldü (**Şekil 4.10.**). 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası kontrole kıyasla tüm gruplarda GFP yoğunluğunun anlamlı şekilde azaldığı belirgindi ($p<0.0001$) (**Şekil 4.10.**). TAS-115 ve DOXO'nun çözücüsü olan DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında tüm gruplarda anlamlı şekilde azalma olduğu görüldü (**Şekil 4.10.**). Bu sonuç ile 500 µM TAS-115 dozu ile aynı oranda kullanılan DMSO'nun etkisinin, tüm TAS-115+DOXO uygulamasına göre daha düşük olduğu ve TAS-115'in bireysel etkisinin canlı sağkalımındaki rolünün sadece çözücüsü DMSO'dan kaynaklanmadığı bu deneyde de gösterilmiş oldu.



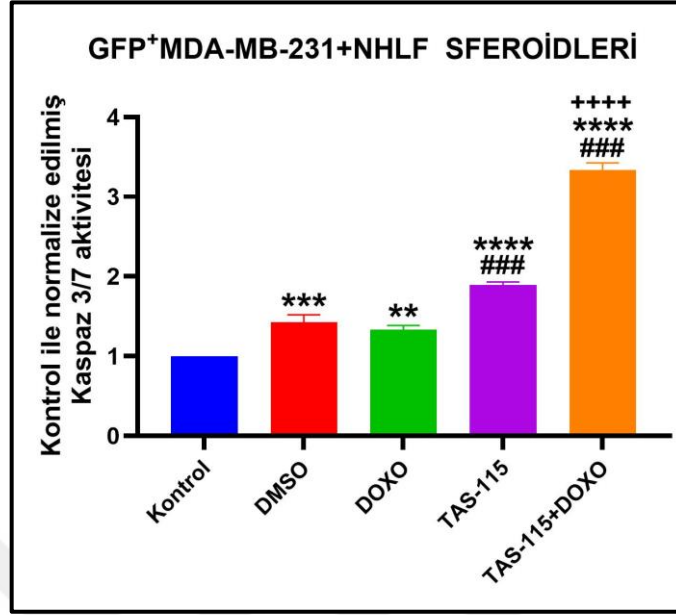
Şekil 4.10. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere farklı konsantrasyonlarda TAS-115 ve 1.5 µM DOXO'nun 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonrası GFP yoğunluğuna ait istatistiksel analiz grafikleri yer almaktadır. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.4. 3B Sferoid Modeline (GFP⁺MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Etkin Dozunun Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sağkalım Yanıtlarının Değerlendirilmesi

4.4.1. Kaspaz 3/7 Kiti Analizi

TAS-115 ve DOXO'nun belirlenen etkin dozlarının 24 saat uygulanmasının ardından sferoidlerin apoptotik aktivitelerini ölçmek için Caspase-Glo® 3/7 3D kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanıldı.

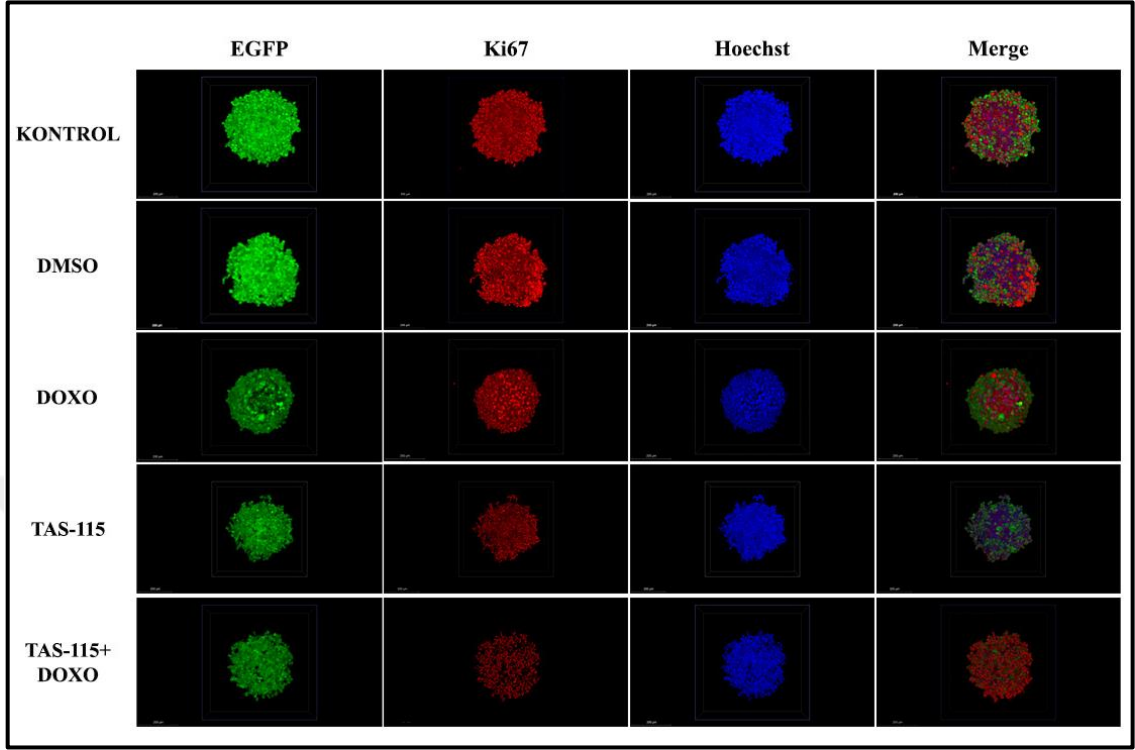
Kontrol grubuna oran olarak yapılan istatistiksel analizler sonucunda; kontrol grubuna kıyasla DMSO ($p<0.001$), DOXO ($p<0.01$), TAS-115 ($p<0.0001$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.0001$) gruplarında hücre ölümünün anlamlı şekilde arttığı görüldü. DMSO grubu ile diğer gruplar TAS-115 ($p<0.0001$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.0001$) gruplarında anlamlı artış mevcuttu. TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte apoptotik etkisini karşılaştırdığımızda; TAS-115 grubuna kıyasla TAS-115+DOXO grubunda kaspaz-3/7 aktivasyonu oldukça yüksek bulundu ($p<0.0001$). Bu durum, TAS-115'in bireysel etkisine ilaveten kemoterapötik ajan ile kullanımında etkisinin daha da arttığını gösterdi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlere TAS-115 ve DOXO'nun etkin dozlarının 24 saat uygulanması sonrası yapılan kaspaz 3/7 aktivite testi sonucu istatistiksel analiz grafikleri yer almaktadır (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, +++ $p<0.0001$; TAS-115 grubu ile TAS-115+DOXO grubu kıyaslıığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

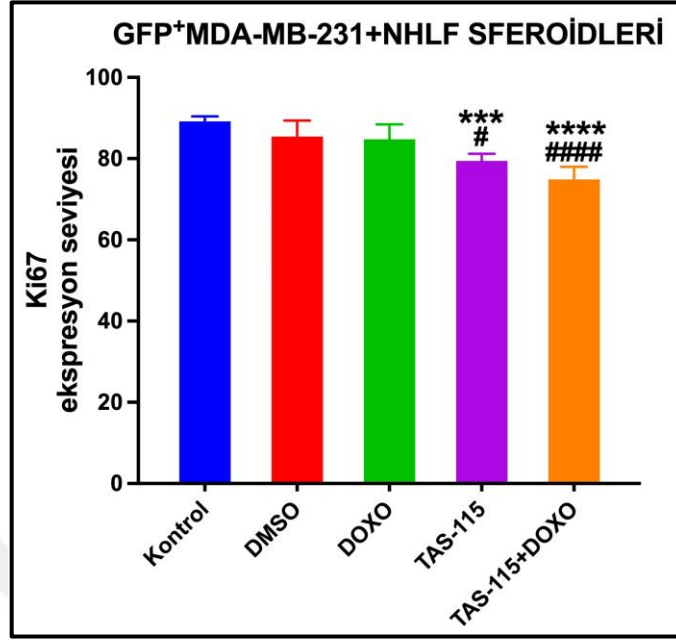
4.4.2. Ki67 İmmünohistokimya/İmmünofloresan (ISK/IF) Analizi

TAS-115 ve DOXO'nun belirlenen etkin dozlarının 24 saat uygulanmasının ardından yapılan Ki67 boyamaları sonrasında çoklu foton mikroskop ile sferoid görüntüleri alındı. Ki67 belirteci olarak kırmızı ışımaya veren hücrelerin kontrolde oldukça yoğun ancak, TAS-115 ve TAS-115+DOXO gruplarında ışımının daha az olduğu görüldü (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin Ki67 ve Hoechst immüno Floresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu 200 µm'dir) (EGFP: yeşil, Ki67: kırmızı, Hoechst: mavi işaretlidir).

Yapılan analizler sonucunda; Ki67 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla DMSO ve DOXO grubunda azaldığı ama anlamlı olmadığı ($p>0.05$), TAS-115 ($p<0.001$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.0001$) grubunda ise ekspresyonun anlamlı şekilde azaldığı görüldü. DMSO grubuna kıyasla TAS-115'in bireysel ($p<0.05$) ve DOXO ile birlikte uygulandığı tedavi gruplarında ($p<0.0001$) ekspresyonun anlamlı şekilde düşük olması inhibitör ve kemoterapötüğün bireysel etkisinin DMSO kaynaklı olmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.13).

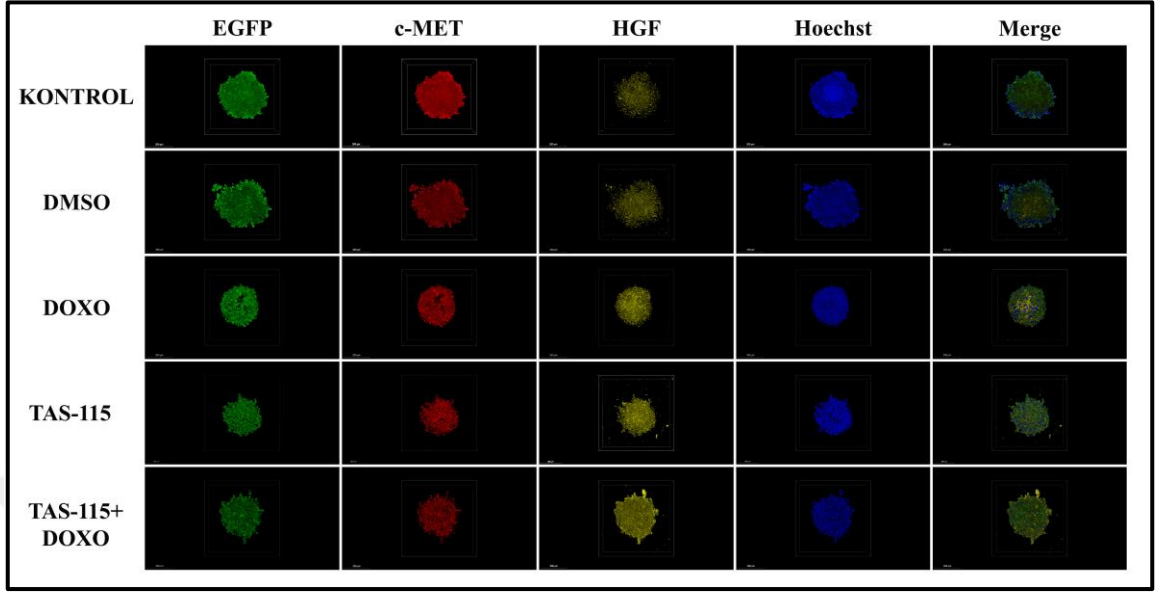


Şekil 4.13. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası Ki67 immüno Floresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir. Analizler sonucu kontrol ve DMSO grubuna kıyasla Ki67 yanıtının TAS-115 ve TAS-115+DOXO gruplarında anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$, #### $p < 0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.5. 3B Sferoid Modeline (GFP⁺MDA-MB-231+NHLF) TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası c-MET/HGF Aracılı mTOR Sinyalizasyonunun İmmünohistokimyasal/İmmüno Floresan (ISK/IF) Olarak Değerlendirilmesi

4.5.1. c-MET/HGF İmmünohistokimyası

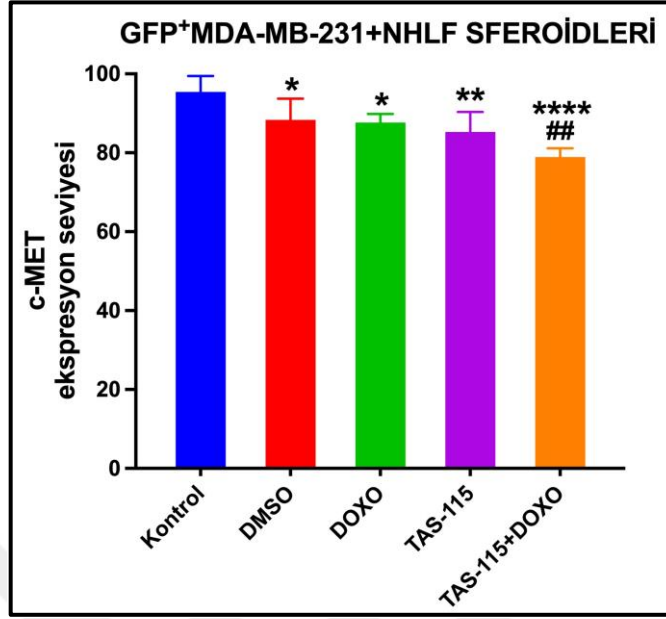
MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte c-MET/HGF protein ekspresyonları üzerine etkisini değerlendirmek için yapılan ISK/IF analizleri sonucu alınan görüntülerde kanser hücreleri tarafından ekspre olduğu bilenen c-MET'in kontrol grubuna kıyasla azaldığı, HGF'nin ise arttığı görüldü (Şekil 4.14.).



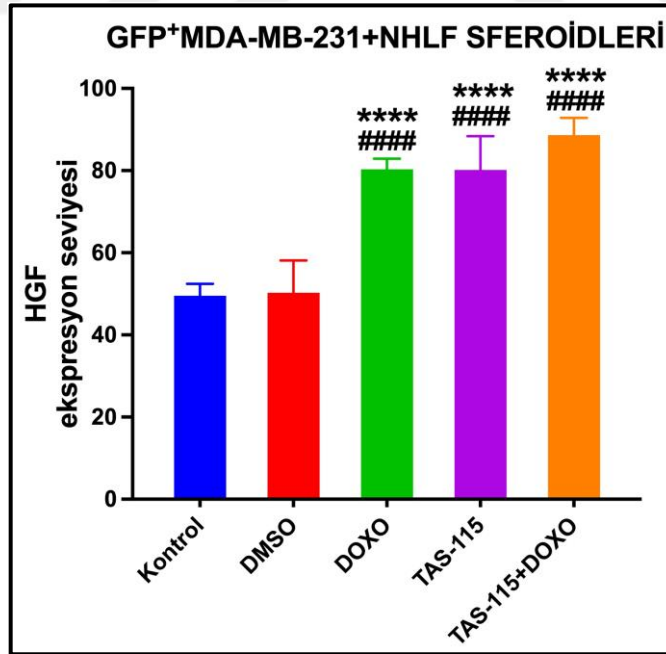
Şekil 4.14. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin c-MET, HGF ve Hoechst immüno Floresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu 200µm'dir) (EGFP: yeşil, c-MET: kırmızı, HGF: sarı, Hoechst: mavi işaretlidir).

Kullanılan inhibitör ve kemoterapötiklerin kanser hücrelerinin sağkalımını olumsuz etkilediği ve kanser hücrelerinin azalışına bağlı olarak NHLF hücrelerinin sağkalımını devam ettirdiği 4.3'de ortaya kondu. Bu bulguyu destekler şekilde, yapılan analizler sonucunda kanser hücrelerinden ekspresyon olduğu bilinen c-MET ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla DMSO ($p<0.05$), DOXO ($p<0.05$), TAS-115 ($p<0.01$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.0001$) gruplarında ekspresyonun anlamlı şekilde azaldığı görüldü (**Şekil 4.15.**). TAS-115 ve DOXO'nun çözücüsü DMSO grubunun diğer gruplarla kıyaslanması sonucunda c-MET ekspresyonunun tedavi gruplarında azaldığı ve TAS-115+DOXO grubunda bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.01$) (**Şekil 4.15.**).

Kontrol ($p<0.0001$) ve DMSO ($p<0.0001$) gruplarına kıyasla tedavi gruplarında NHLF'in sağkalımının artmasına bağlı olarak HGF ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı görüldü (**Şekil 4.16.**).



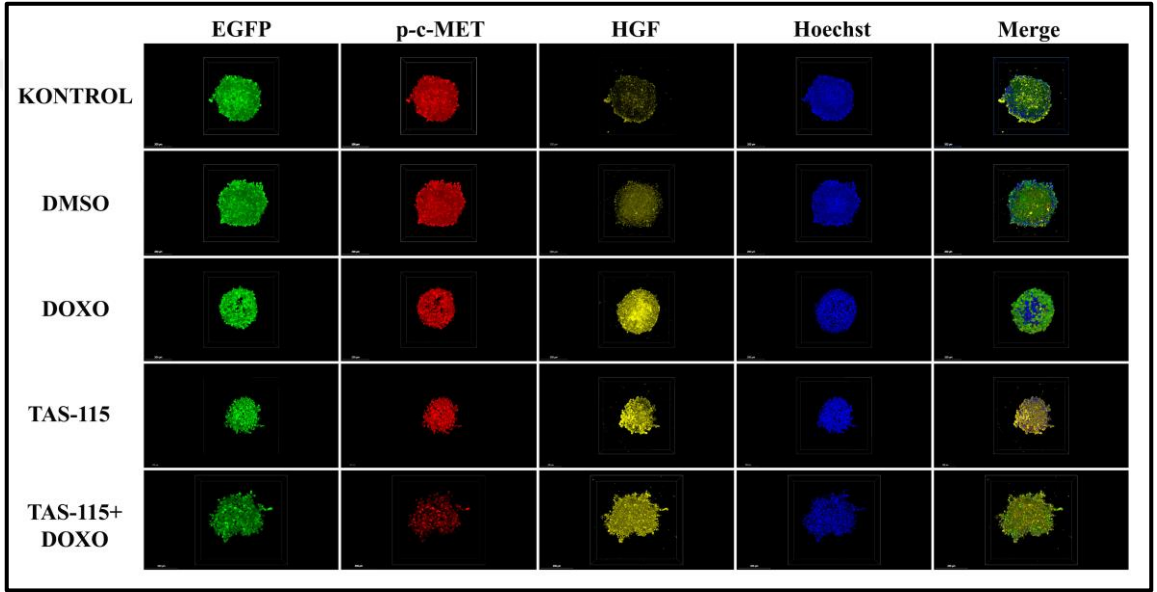
Şekil 4.15. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası c-MET immüno Floresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafikler gösterilmektedir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).



Şekil 4.16. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası c-MET ile eş zamanlı yapılan HGF immüno Floresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafikler gösterilmektedir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.5.2. p-c-MET/HGF İmmünohistokimyası

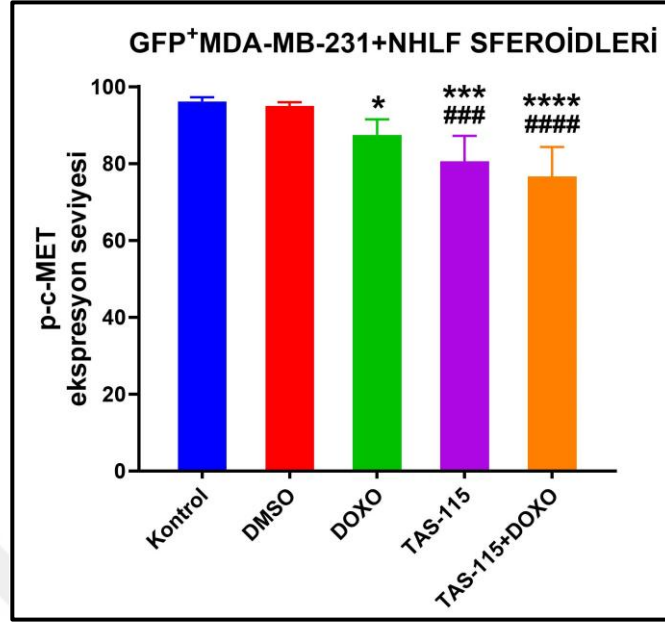
HGF'nin kanser hücrelerinde ekspre olan c-MET'e bağlanması ile c-MET otofosforilasyonu indüklenmekte ve p-c-MET ekspresyonu artmaktadır. Sferoidlerde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte p-c-MET/HGF protein ekspresyonları üzerine etkisini değerlendirmek için yapılan ISK/IF analizleri sonucu alınan görüntülerde, kontrol grubuna kıyasla tedavi gruplarında c-MET ekspresyonundaki azalmayla paralel olarak p-c-MET ekspresyonunda da azalma olduğu görüldü (Şekil 4.17.).



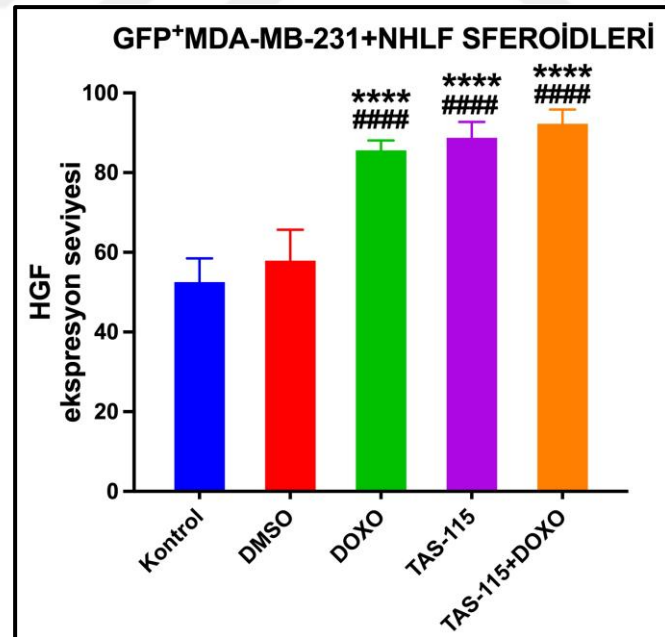
Şekil 4.17. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin p-c-MET, HGF ve Hoechst immüno Floresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu 200µm'dir) (EGFP: yeşil, p-c-MET: kırmızı, HGF: sarı, Hoechst: mavi işaretlidir).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; p-c-MET ekspresyonun kontrol grubuna kıyasla DOXO ($p<0.05$), TAS-115 ($p<0.01$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.001$) tedavi gruplarında anlamlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.18.). TAS-115 ve DOXO'nun çözücüsü DMSO grubunun diğer gruplarla kıyaslanması sonucunda p-c-MET ekspresyonun TAS-115 ($p<0.05$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.001$) grubunda bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.18.).

Kontrol ($p<0.0001$) ve DMSO ($p<0.0001$) gruplarına kıyasla tedavi gruplarında c-MET/HGF boyanması ile aynı şekilde HGF ekspresyonun anlamlı şekilde arttığı görüldü (Şekil 4.19.).



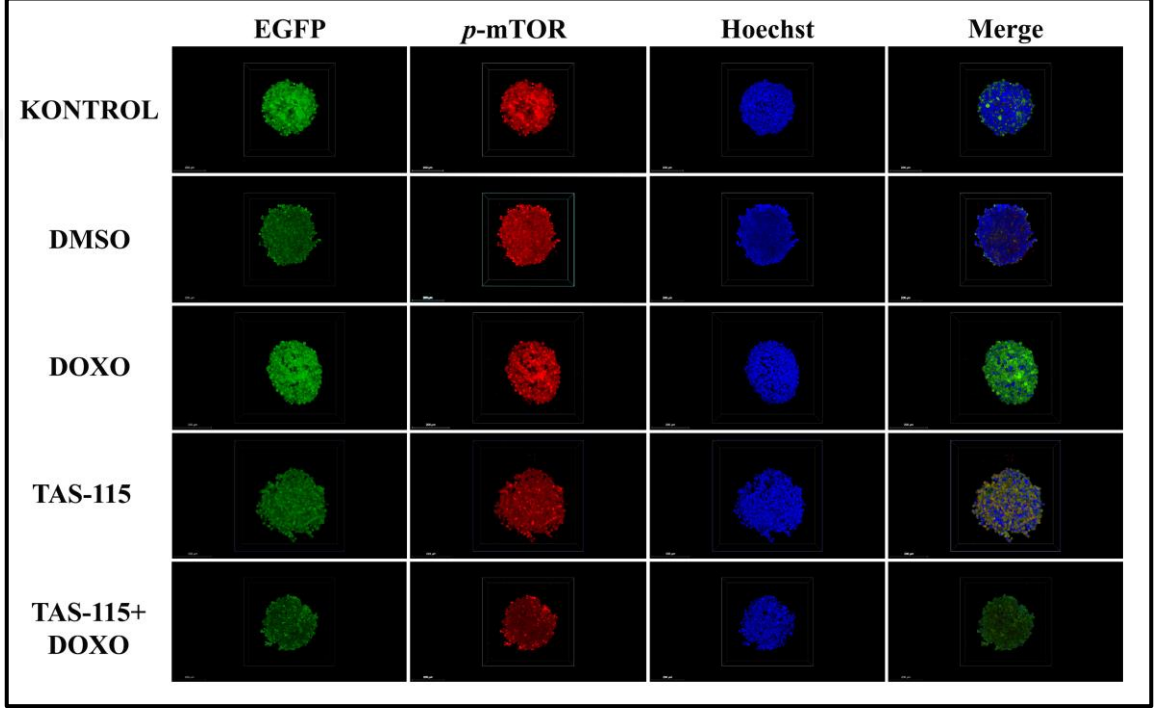
Şekil 4.18. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası p-c-MET immüno Floresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).



Şekil 4.19. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası p-c-MET ile eş zamanlı yapılan HGF immüno Floresan reaksiyonlarının ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.0001$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

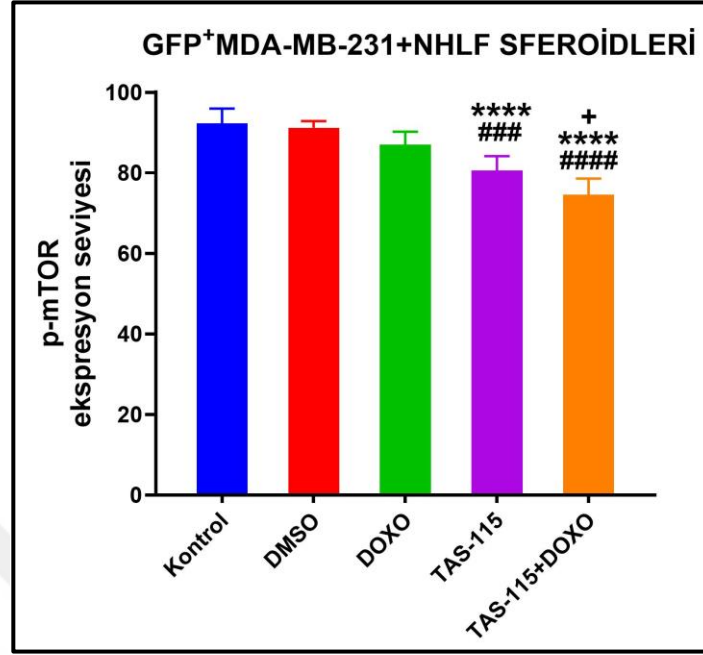
4.5.3. p-mTOR İmmünositokimyası

Sferoidlerde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte p-mTOR protein ekspresyonları üzerine etkisini değerlendirmek için yapılan ISK/IF analizleri sonucu alınan görüntülerde, p-c-MET'in aktivasyonuna bağlı olarak fosforillenen mTOR'un ekspresyonunun da kontrol grubunda yüksek olduğu; DOXO, TAS-115 ve TAS-115+DOXO gruplarında ise bu ekspresyonun azaldığı dikkati çekti (Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin p-mTOR ve Hoechst immünofloresan boyamaları sonrası çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir. Ölçüm çubuğu 200µm'dir. (EGFP: yeşil, p-mTOR: kırmızı, Hoechst: mavi işaretlidir).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; kontrol ve DMSO gruplarına kıyasla TAS-115 ve TAS-115+DOXO tedavi gruplarında fosforile mTOR ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 4.21.). TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte p-mTOR ekspresyon seviyelerini karşılaştırdığımızda; TAS-115 grubuna kıyasla TAS-115+DOXO grubunda ekspresyonun daha az olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerde, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası p-mTOR immüno Floresan reaksiyonunun ImageJ analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$, #### $p < 0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, + $p < 0.05$; TAS-115 grubu ile TAS-115+DOXO grubu kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

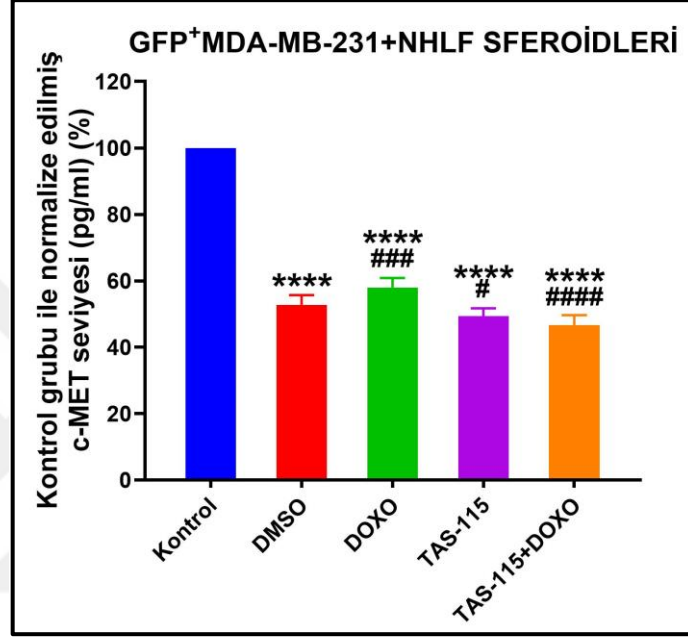
4.6. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanması Sonrası Sitokin Yanıtları Üzerine Etkisinin İnsan Luminex (R) Buluş Analizi ile Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, meme kanser hücreleri ve akciğer fibroblastları ile hazırlanan sferoidlere TAS-115 ve DOXO'nun etkin süre ve dozda uygulanması sonrasında; toplanan supernatantların, kontrol grubuna kıyasla HGFR/c-MET, VEGF- α , IL-6, TNF- α , IL-1 α /IL-1F1, IL-8/CXCL8 sitokin ve kemokinlerdeki değişimleri İnsan Luminex (R) Buluş analizi kiti ile değerlendirildi.

4.6.1. HGFR/c-MET Analizi

Yapılan analizler sonucunda; kontrol grubu ile normalize edilen HGFR/c-MET seviyesinde kontrole kıyasla tüm gruplarda anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p < 0.0001$). Bu azalma TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulandığı gruplarda neredeyse yarı yarıyaydı (Şekil 4.22.). c-MET seviyesindeki bu azalışın heterotipik sferoidlerdeki MDA-MB-231 hücrelerinin azalmasıyla bağlantılı olabilmesi mümkündür.

TAS-115'in çözücüsü DMSO grubunun diğer gruplarla kıyaslanması sonucunda c-MET seviyesinin TAS-115 ($p<0.05$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.0001$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalışının olduğu görüldü. Bu durum TAS-115'in etkisinin sadece çözücüsü DMSO'dan kaynaklanmadığını göstermektedir (Şekil 4.22.).

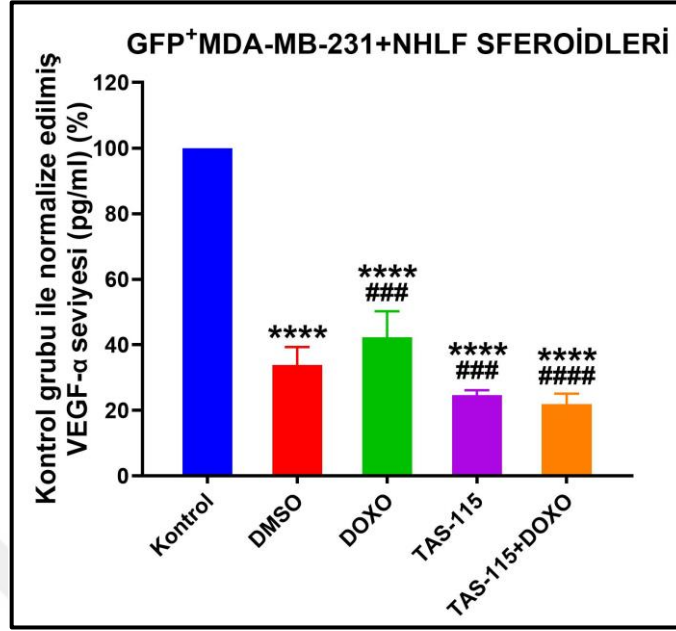


Şekil 4.22. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki c-MET seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (**** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, # $p<0.05$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.6.2. VEGF- α Analizi

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) güçlü bir anjiyogenik faktördür. VEGF meme kanseri hücrelerinde tümör anjiyogenezinde indükleyicidir. TAS-115, c-MET/HGF ve VEGF aracılı yolları inhibe etmektedir. Yapılan analizler sonucunda; kontrol grubu ile normalize edilen VEGF- α seviyesinde c-MET ile benzer şekilde kontrole kıyasla tüm gruplarda ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($p<0.0001$) (Şekil 4.23.).

TAS-115'in çözücüsü DMSO grubunun diğer gruplarla kıyaslanması sonucunda c-MET seviyesinin TAS-115 ($p<0.001$) ve TAS-115+DOXO ($p<0.0001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalışı dikkati çekmekteydi (Şekil 4.23.).



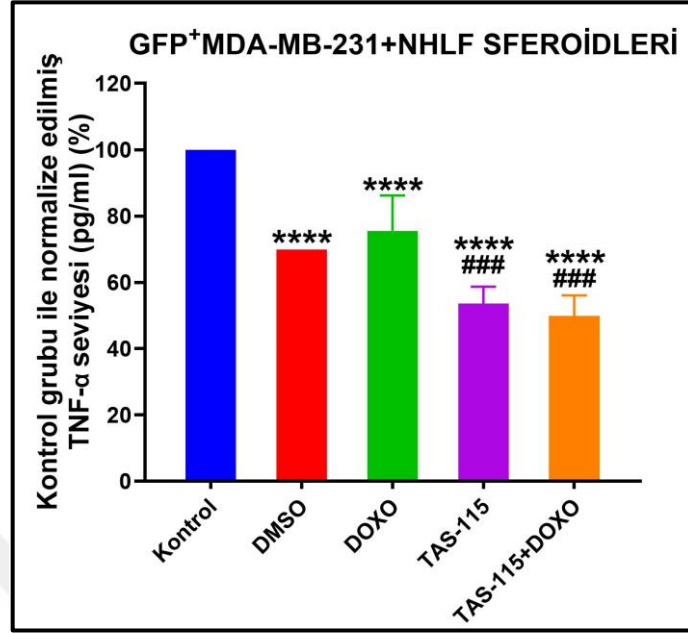
Şekil 4.23. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki VEGF- α seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirilmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (**** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.6.3. TNF- α ve IL-6 Analizi

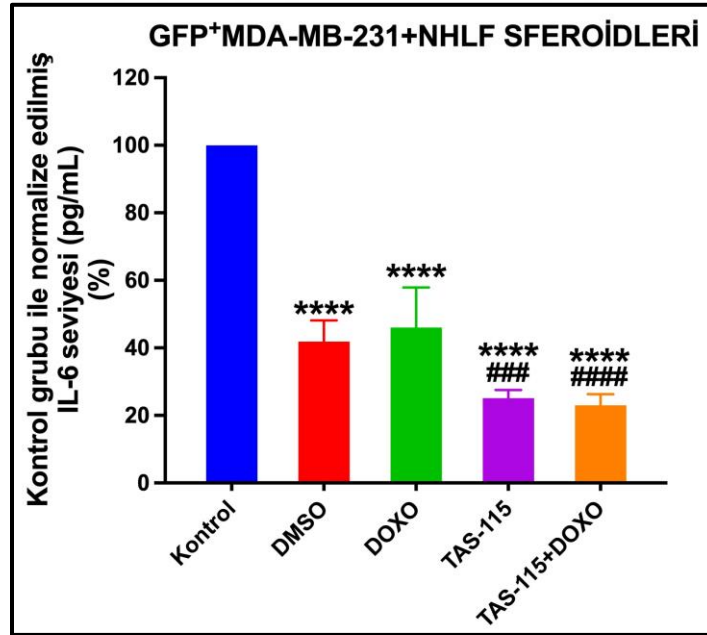
TNF- α ve IL-6 tümör mikroçevresinde inflamasyonu tetikler ve bu durum meme kanseri hücrelerinin proliferasyon ve metastazı için elverişli bir ortam sağlar.

Yapılan analizler sonucunda, kontrol grubu ile normalize edilen TNF- α (Şekil 4.24.) ve IL-6 (Şekil 4.25.) seviyesinde tüm gruplarda anlamlı şekilde azalma olduğu, TAS-115'in de bu azalışta anlamlı bir etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.0001$). TNF- α ve IL-6 seviyesi, TAS-115'in DOXO ile birlikte uygulandığı grupta bireysel uygulanmasına oranla daha düşüktü ancak bu düşüş anlamlı değildi.

TAS-115'in etkisinin çözücüsü DMSO kaynaklı olup olmadığını değerlendirmek için oluşturduğumuz DMSO grubuyla TAS-115 ve TAS-115+DOXO grubunu kıyasladığımızda TNF- α (Şekil 4.24.) ve IL-6 (Şekil 4.25.) seviyelerinin bu gruplarda daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.001$).



Şekil 4.24. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki TNF- α seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (**** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, ### $p < 0.001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, belirtilen istatistiksel değerlerdir).

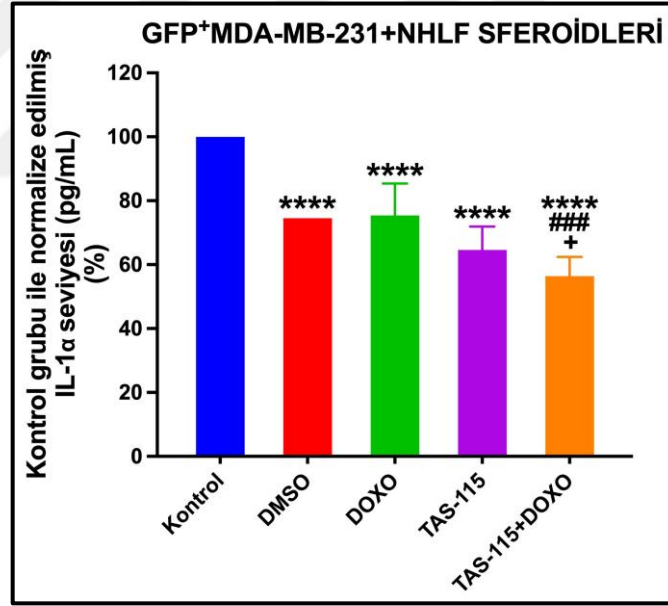


Şekil 4.25. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki IL-6 seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (**** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.6.4. IL- 1 α Analizi

IL-1 α , immün hücreler ve kanser hücreleri tarafından salgılanan güçlü bir pro-inflamatuvar sitokindir. İnflamasyonu indükleyerek meme kanseri hücrelerinin büyüme ve progresyonu için uygun bir mikroçevre sağlamaktadır. Kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimi artırarak tümör gelişimini de desteklemektedir.

Yapılan analizler sonucunda; kontrol grubu ile normalize edilen IL-1 α seviyesinde tüm gruplarda anlamlı şekilde azalma olduğu görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 4.26.) IL-1 α seviyesinin TAS-115'in hem bireysel hem de DOXO ile birlikte uygulandığı gruplarda azalış oldukça belirgin bir seviyede idi ($p<0.0001$). Ayrıca, IL-1 α seviyesinde azalış TAS-115'in bireysel uygulanmasına kıyasla TAS-115+DOXO grubunda daha fazla düzeyde azalmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.26.).

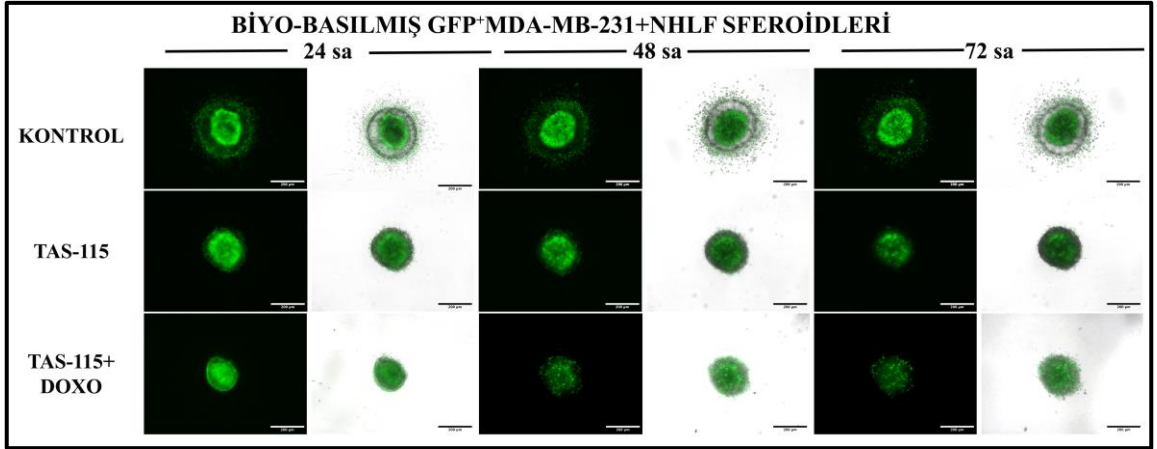


Şekil 4.26. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası süpernatantlarındaki IL-1 α seviyesinin İnsan Luminex (R) Buluş analizi sonrası gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler sonucu elde edilen grafik gösterilmektedir (**** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, ### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, + $p<0.05$; TAS-115 grubu ile TAS-115+DOXO grubu kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.7. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kansere Hücrelerinin İnvazyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3B Ortamda Değerlendirilmesi

GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan heterotipik sferoidlerin *in vivo* tümör mikroçevresine benzer bir ECM ortamındaki invaziv davranışı ve bu davranışta TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte etkisinin değerlendirilmesi sağlandı. Bunun için GFP⁺MDA-MB-231 hücrelerinin sferoid alanından ayrılarak yayıldığı alan (invazyon alanı) hacmi ve sferoid alan hacmi arasındaki fark hesaplanarak kanser hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonrası invazyon potansiyeli değerlendirildi.

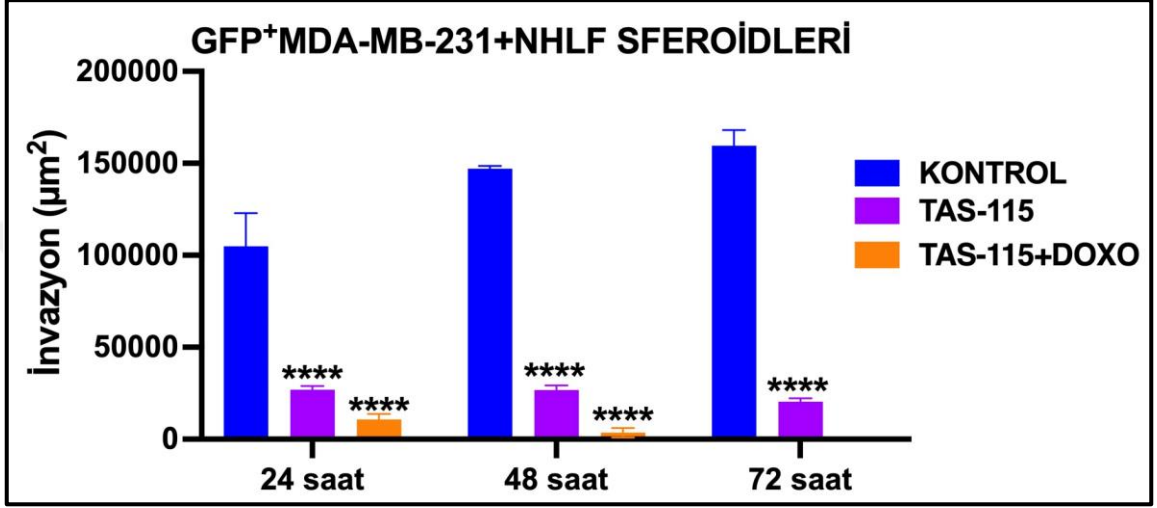
Oluşturulan heterotipik sferoidlerde kompaksiyonun korunduğu, kontrol grubundaki kanser hücrelerinin biyobasım sonrası 24 saat inkübasyonun ardından invazyonunun başladığı ve 48 ve 72. saatlerde hücrelerin daha çok yayıldığı görüldü (Şekil 4.27.). TAS-115 uygulanan grupta sferoid kompaksiyonunun korunduğu ancak kanser hücrelerinin invazyonunun oldukça az olduğu görüldü (Şekil 4.27.). TAS-115 ve DOXO'nun birlikte uygulandığı grupta ise sferoid kompaksiyonunun kısmen bozulduğu ve invaziv davranış gösteren kanser hücrelerinin neredeyse olmadığı görüldü (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası kanser hücrelerinin ECM invazyonuna karşı etkisinin çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu; 200 μ m'dir).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; kontrol grubuna kıyasla TAS-115 ve TAS-115+DOXO tedavi gruplarının invazyon potansiyelinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 4.28.). TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte invazyon derecelerini

karşılaştırdığımızda, TAS-115 grubuna kıyasla TAS-115+DOXO grubunda kanser hücrelerinin invazyonun daha az olduğu, hatta 72. saatin sonunda invazyonun olmadığı görüldü (Şekil 4.28.). Bu durum, TAS-115 ve DOXO'nun varlığına bağlı olarak kanser hücrelerinin canlılığını ve invazyon potansiyelini kaybettiğini göstermektedir.

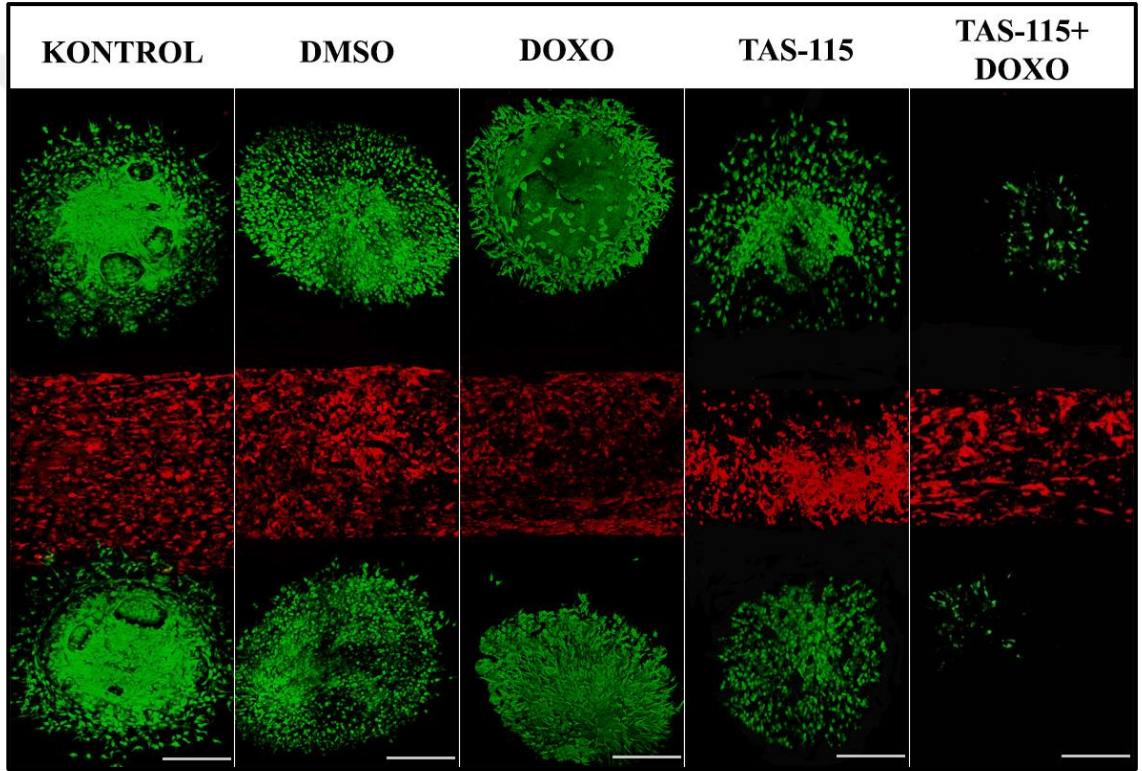


Şekil 4.28. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası invazyon alanı ile sferoid alanı arasındaki fark alınarak belirlenen invazyon derecesinin grafiği gösterilmektedir (**** $p < 0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

4.8. Heterotipik Sferoid Modelinde Etkin Dozu Belirlenen TAS-115'in Bireysel ve DOXO ile Birlikte Uygulanmasının Kanser hücrelerinin Migrasyon Potansiyeline Olası Etkisinin 3B Vaskülerize Ortamda Değerlendirilmesi

GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan heterotipik sferoidlerin *in vivo* perfüze ECM ortamındaki migrasyon ve metastatik davranışı ve bu davranışta TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte etkisi değerlendirildi. Bunun için sferoidlerin biyobasımı sonrası kontrol grubu için sadece EGM-2MV, TAS-115 grubu için TAS-115'in etkin dozu ve TAS-115+DOXO grubu için TAS-115 ve DOXO'nun etkin dozlarının vaskülerize kanaldan 24 saat perfüzyonunun ardından sferoid görüntüleri alındı. MDA-MB-231 hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğu hesaplanarak TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte migrasyon ve metastatik davranışı üzerine etkisi değerlendirildi.

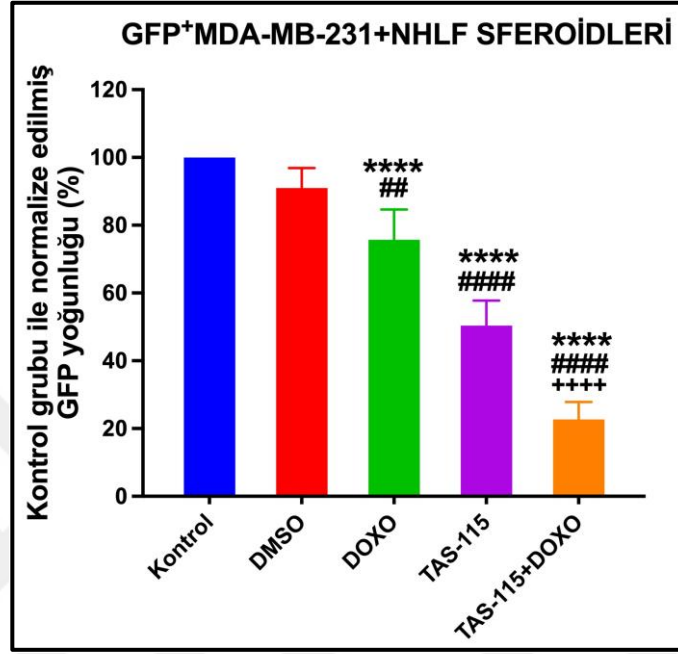
Kontrol grubunda sferoidlerin diğer gruplara kıyasla oldukça kompakt olduğu ve bazı kanser hücrelerinin vaskülerize yapay damar ortamına göç ettiği görüldü. Kontrol grubuna kıyasla TAS-115 ve TAS-115+DOXO gruplarında sferoid kompaksiyonunun bozulduğu ve GFP⁺ kanser hücrelerinin azaldığı görüldü. Kontrol grubunda vaskülerize yapay damar ortamında kırmızı işaretli HUVEC hücrelerinin oldukça yoğun olduğu görüntülenmesine rağmen, tedavi gruplarında kırmızı hücre yoğunluğunda azalma olduğu dikkat çekti (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte perfüzyonu sonrası kanser hücrelerinin migrasyon ve metastaz potansiyeline karşı etkisinin çoklu foton mikroskop görüntüleri görülmektedir (Ölçüm çubuğu; 200 µm'dir) (Yeşil: GFP⁺ kanser hücreleri, Kırmızı: tdTomato⁺ HUVEC hücreleri).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; kanser hücrelerinin belirteci GFP yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla tedavi gruplarında anlamlı şekilde azaldığı yani hücrelerin canlılığını kaybettiği görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 4.29.). TAS-115 ve TAS-115+DOXO grubu kıyaslandığında TAS-115+DOXO grubundaki GFP yoğunluğunda anlamlı bir azalma mevcuttu ($p<0.0001$) (Şekil 4.29.). Bu durumda TAS-115'in kanser hücrelerinin

proliferasyon ve devamında metastatik fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu, DOXO ile bu etkisinin de arttığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.30. GFP⁺MDA-MB-231 ve NHLF hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte perfüzyonu sonrası migrasyon ve metastaz potansiyelinin belirlenmesi için hesaplanan GFP yoğunluğunun grafiği gösterilmektedir (**** $p<0.0001$; kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, ## $p<0.01$, #### $p<0.0001$; DMSO grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında, +++ $p<0.0001$; TAS-115 grubu ile TAS-115+DOXO grubu kıyaslığında belirtilen istatistiksel değerlerdir).

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, dünyada akciğer kanserinden sonra en yaygın ölüm sebebidir (Hong ve Xu, 2022). ÜNМК, ER ve PR reseptörleri gibi hormon reseptörlerinin yokluğu ve HER2 reseptörünün eksprese edilmemesi ile karakterize olan bir meme kanseri alt türüdür (Łukasiewicz ve ark., 2021b). Oldukça invaziv bir kanser türü olan ÜNМК 5 yıllık genel sağkalım %11 civarındadır ve ortalama sağkalım yaklaşık 11 ile 13 aydır (Skinner vd., 2021). Hücrelerin metastaz sürecinde, tümör mikroçevresi ve stromal türevli sitokin/kemokin arasındaki etkileşim de dahil olmak üzere bir dizi yolak ve çok sayıda protein ve sinyal molekölü rol oynamaktadır. Bu karmaşık süreçlerin her biri, gen ifadelerindeki değışikliklerle şekillenmektedir (Jiang ve ark., 2015; Petri ve Klinge, 2020).

ÜNМК, ER, PR ve HER2'yi ekspre etmediğı için hormonal ya da hedefe yönelik tedavisi olmayan tek meme kanseri türüdür. Günümüzde ÜNМК için kullanılan mevcut tedavi diğer meme kanseri alt tiplerinde olduğı gibi tümörün ve bölgesel metastaz alanlarının rezeksiyonu, paklitaksel ve dosetaksel gibi taksan bazlı terapötikler ve DOXO gibi antrasiklin gruplarını içeren kemoterapi ile sınırlı kalmaktadır. ÜNМК'li hastalarda rezeksiyon sonrası nüks oranı %25 olup, bu hastaların kemoterapiye yanıtı diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla çok daha kötüdür (Yin ve ark., 2020). ÜNМК'de tedavi seçeneklerinin sınırlı olması, ÜNМК'yi kötü prognoza yönlendiren durumu, bu tümörün oldukça agresif, invaziv ve metastatik bir karakter kazanmasına sebep olmaktadır (Griffiths ve Olin, 2012; Zagami ve Carey, 2022b). ÜNМК'de hormonal ve hedefe yönelik tedavilerin eksikliği, kemoterapötiklere karşı düşük yanıt alınması, hızlı ve yüksek nüks oranlarına sahip olması nedeniyle, günümüzde giderek artan bir ihtiyaçla ÜNМК tedavisi için yeni ajanlar ve tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (H. Li ve ark., 2007).

Tirozin protein kinaz-MET veya HGFR olarak da adlandırılan c-MET, pro-onkogenik bir protein ve MET geni tarafından kodlanan bir transmembran tirozin kinazdır (Ho-Yen ve ark., 2015). HGF, serin proteaz ailesine ait bir sitokindir ve c-MET hücre yüzey belirtecinin ligandı olarak bilinmektedir. Kanser hücrelerinde c-MET/HGF

sinyalizasyonu; glikolitik enzimleri, amino asit metabolizmasını, pentoz fosfatı modüle etmek ve metabolik yeniden programlamadan sorumlu ERK1/2, MAPK, PI3K/ Akt, STAT ve NF- κ B alt sinyal yollarını indüklemek için, diğer tirozin kinazlarla etkileşime girmektedir (Imura ve ark., 2016; Liang ve ark., 2017; Y. Zhang ve ark., 2015). Bu sinyal yolları kanser hücrelerine; proliferasyon, migrasyon, metastaz, epitelyal-mezenkimal geçiş ve anjiyogenez için ortam yaratırlar (Hughes ve ark., 2016; Kuang ve ark., 2017).

2013 yılında geliştirilen ve kimyasal adı pamufetinib olan TAS-115; c-MET, VEGFR ve PDGFR inhibe ettiği bilinen çoklu RTK inhibitörüdür (Fujita ve ark., 2013). TAS-115; c-Met, VEGFR, PDGFR ve diğer reseptörlerin otofosforilasyonunu engellemektedir. Fosforilasyon gerçekleşmediğinde PI3K/Akt/mTOR, Ras/MAPK, STAT3 ve NF- κ B gibi hücre içi sinyal yolları aktive olamamakta ve kanser hücrelerinin proliferasyonu ve metastazı inhibe edilmektedir (Silva Paiva ve ark., 2020; Yasuda ve ark., 2020). TAS-115'in insan mide (Fujita ve ark., 2013; Y. Zhao ve ark., 2014) ve akciğer kanserinde (Kunii ve ark., 2015; Nakade ve ark., 2014), sinoviyal sarkomda (S. Yamada ve ark., 2017) anti-tümör etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

Literatürde yer alan bilgilere dayanarak, çalışmamızda, bir RTK inhibitörü olan TAS-115'in bireysel ve klinikte yaygın olarak kullanılan DOXO ile birlikte uygulanmasının ÜNMK kanser hücreleri ve akciğer fibroblastları ile oluşturduğumuz heterotipik tümör sferoidlerinin sağkalımı, proliferasyonu, invazyonu ve metastazı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

Literatürde oldukça yeni olan TAS-115'in farklı kanser hücreleri üzerinde etkinliğinin değerlendirildiği sayılı *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar bulunmasına rağmen TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte etkinliğinin c-MET/HGF etkileşimi aracılı meme kanseri ve metastazı üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu açığı kapatmak amacıyla kurguladığımız çalışmamızda; insan ÜNMK hücre hattı olan GFP⁺MDA-MB-231 hücreleri ve insan akciğer fibroblast hücre hattı olan NHLF hücreleri birlikte kanser hücrelerinin akciğere metastazını *in vivo* ortama benzer şekilde taklit etmek için 3B *in vitro* heterotipik sferoid deney modeli oluşturulmuştur.

Literatürde meme kanseri hücreleri için TAS-115 uygulamasını içeren ve inhibitörün etkin değerini belirten herhangi bir yayın yer almadığından, çalışmamızda öncelikle kliniğe benzer bir bakış açısı ile farklı kanser hücreleri için belirlenen TAS-115 etkin doz aralığı referans alınarak (Fujita ve ark., 2013; Kunii ve ark., 2015) TAS-115'in hem bireysel hem de DOXO ile birlikte hücre sağkalımı üzerine olası etkileri heterotipik sferoidlerde değerlendirildi.

TAS-115'in anti-tümör etkisinin değerlendirildiği Shutaro Yamada ve arkadaşlarının yaptığı 2B *in vitro* çalışmada; c-MET bağımlı Yamato-SS ve PDGFR α bağımlı SYO-1 ve HS-SY-II sinoviyal sarkoma hücre hatlarında WST-1 ile yapılan sağkalım ve proliferasyon analizlerinde TAS-115'in her üç sinoviyal sarkoma hücre hattının proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir . Çalışmamızda da literatürdeki bu yayına benzer şekilde, TAS-115'in GFP⁺ ÜNМК hücrelerinde alamar mavisi analizi ve Ki67 immünositokimyasal boyamalar sonucunda hücre canlılığı ve proliferasyonun doz ve zamana bağlı olarak anlamlı derecede azaldığı, DOXO ile birlikte kullanımda bu azalışın daha fazla olduğu gösterilmiştir. Literatürde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanmasının meme kanserindeki etkisini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmaması nedeniyle; elde ettiğimiz bu veriler doğrultusunda TAS-115'in meme kanser hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi ilk kez ortaya konmuştur.

Aynı çalışmada TAS-115'in c-MET'in fosforilasyonu ve c-MET ve PDGFR α aracılı sinyal yolları üzerindeki etkileri *in vitro* immünoblot analizleriyle de araştırılmış ve c-MET fosforilasyonunun Akt ve ERK 1/2 fosforilasyonunun güçlü bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir (Yamada ve ark., 2017). Kunii ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, c-MET inhibitörü olan TAS-115'in farklı akciğer kanseri hücrelerinin (NSCLC, PC6 ve PC9) sağkalım ve proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve c-MET ve p-c-MET aktivasyonunun inhibe edildiği, bu inhibisyona bağlı olarak sağkalım ve proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir (Kunii ve ark., 2015). İnsan mide adenokarsinomu hücre hattı (MKN45) ile yapılan başka bir çalışmada, Yamada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (Yamada ve ark., 2017) benzer şekilde TAS-115'in c-MET fosforilasyonunun Akt, ERK 1/2 ve STAT3 fosforilasyonunu güçlü bir şekilde

inhibe ettiği imm noblott analizleriyle gösterilmiştir (Fujita ve ark., 2013). Çalışmamızda 3B heterotipik tümör sferoidlerinde yaptığımız c-MET, p-c-MET ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının son basamağı p-mTOR immünositokimya boyamaları sonucunda TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanmasının c-MET, p-c-MET ve p-mTOR ekspresyonlarında azalışa sebep olduğu gösterilmiştir.

TAS-115'in farklı solid tümörler üzerine etkisinin değerlendirildiği bir faz I çalışmasında; tümör boyutlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Doi ve ark., 2020). Aynı çalışmada sadece 1 hastada meme tümörünün bulunduğu ve bu hastada da tümörün gerilediği ancak sadece tek bir hastadan elde edilen veri olduğu için araştırmacılar TAS-115'in meme kanseri açısından etkinliğini net şekilde belirtmediklerini dile getirmişlerdir (Doi ve ark., 2020). Çalışmamız her ne kadar *in vivo* olmasa da aslında tümör dokusunda meydana gelen azalma, *in vivo*'ya benzer şekilde oluşturduğumuz sferoidlerin TAS-115 uygulaması sonrası kanser hücrelerinin sağkalımlarında azalmaya bağlı olarak kompaksiyonlarını kaybetmeleri ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda, heterotipik tümör sferoidlerinden elde edilen supernatantlarda İnsan Luminex Buluş analizi ELISA yöntemiyle pro-inflamatuvar (TNF- , IL-1 , IL-6) sitokinlerin seviyeleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanmasıyla inflamatuvar yanıtların azaldığı g r lm ştir. Literatürde TAS-115'in proinflamatuvar sitokin yanıtları üzerine etkisi hiç değerlendirilmemiş ve çalışmamızla TAS-115'in hem bireysel hem de DOXO ile birlikte inflamasyon üzerine etkisi ilk kez değerlendirilmiştir.

Literatürde BT549 ve MDA-MB-231 (ÜNMK hücre hatları) ile c-MET ve HGF aktivasyonu aracılı anjiyogenez, invazyon ve metastaz potansiyelleri matrijel tabanlı *in vitro* ortamda değerlendirilmiş ve invazyon, anjiyogenez ve c-MET aktivasyonunda artış olduğu gösterilmiştir (Parr ve Ali, 2018)). Çalışmamızda ise 3B biyoyazıcılarla kolajen ve fibrinojen tabanlı vaskülerize ECM ortama basılan heterotipik tümör sferoidlerinin TAS-115'in bireysel ve DOXO ile uygulanması sonrası kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz potansiyellerinin azaldığı gösterilmiştir.

Tüm bu bulgular doğrultusunda TAS-115'in hem bireysel hem de DOXO ile birlikte meme kanseri ve akciğere metastazı üzerinde etkisi 3B *in vitro* ortamda ilk kez çalışmamızla ortaya konmuştur.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında; oluşturulan 3B *in vitro* heterotipik tümör sferoid modeli ile TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanmasının kanser hücrelerinin sağkalımı ve proliferasyonu, hareket ve anjiyogenez potansiyeli, apoptozu ve bu mekanizmaların düzenlenmesine bağlı c-MET/HGF ve VEGFR aracılı PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin yorumlanması sağlandı.

Çalışmamızda oluşturulan heterotipik sferoidlerde TAS-115'in bireysel ve DOXO ile birlikte uygulanması sonrası kontrol gruplarına kıyasla;

- Sferoid kompaksiyonunun bozulduğu,
- Kanser hücrelerinin sağkalım ve proliferasyonun azaldığı ve bu bulguyu destekler şekilde apoptozun arttığı,
- c-MET/HGF ve VEGFR aracılı fosforilasyonun azaldığı ve aracılı mTOR sinyal yolağının inhibe edildiği,
- Pro-inflamatuvar sitokin yanıtlarında azalmaya sebep olarak inflamasyonun baskılandığı,
- Vaskülerize ECM ortamda kanser hücrelerinin invazyon, migrasyon ve metastatik potansiyellerinin azaldığı görüldü.

İlk defa 3B modelde tanımlanmış olan bu mekanizmalar TAS-115'in etkinliğini ilk kez ortaya koymuştur. Bu doğrultuda çalışmamız TAS-115 ile c-MET/HGF ve VEGFR aracılı hücre içi sinyal yolaklarının inhibisyonunun, ÜNMK ve NHLF hücreleri ile tümör mikroçevresi üzerine etkisinin değerlendirildiği ilk çalışma olma niteliğindedir. Ayrıca, literatürde meme kanserinde TAS-115'in DOXO kemoterapötöğü ile birlikte kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda çalışmamızla elde ettiğimiz bulguların literatüre yansıma potansiyeli, yeni çalışmaların önünü açma ve yeni projeleri şekillendirme potansiyeli oldukça yüksek olup; ileriye yönelik fonksiyonel çalışmaların da planlanmasıyla kliniğe yansıma ihtimalinin olabileceği kanaatindeyiz.

Olası mekanizmayı doğrulamak, mekanizmaya ait diğ er etkenleri değerlendirmek ve TAS-115'in etkili olduğu tüm yolaklarda tümör mikroçevresindeki değişimleri de açığa çıkarmak için ileri moleküler teknikler kullanılarak daha kapsamlı deneyler içeren gelecek  alışmalara gereksinim duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- Almansour, N. M. (2022). Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. İçinde *Frontiers in Molecular Biosciences* (C. 9). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.836417>
- Arroyo-Crespo, J. J., Armiñán, A., Charbonnier, D., Deladriere, C., Palomino-Schätzlein, M., Lamas-Domingo, R., Forteza, J., Pineda-Lucena, A., & Vicent, M. J. (2019). Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *International Journal of Cancer*, 145(8). <https://doi.org/10.1002/ijc.32270>
- Baldanzi, G., & Graziani, A. (2015). Physiological signaling and structure of the HGF receptor MET. İçinde *Biomedicines* (C. 3, Sayı 1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines3010001>
- Bardelli, A., Ponzetto, C., & Comoglio, P. M. (1994). Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *Journal of Biotechnology*, 37(2). [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90002-7)
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. İçinde *Developmental Cell* (C. 19, Sayı 5). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Berens, E. B., Holy, J. M., Riegel, A. T., & Wellstein, A. (2015). A cancer cell spheroid assay to assess invasion in a 3D setting. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(105). <https://doi.org/10.3791/53409>
- Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. İçinde *Drug Discovery Today* (C. 18, Sayı 5-6). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
- Britt, K. L., Cuzick, J., & Phillips, K. A. (2020). Key steps for effective breast cancer prevention. İçinde *Nature Reviews Cancer* (C. 20, Sayı 8). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>
- Burdett, E., Kasper, F. K., Mikos, A. G., & Ludwig, J. A. (2010). Engineering tumors: A tissue engineering perspective in cancer biology. İçinde *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (C. 16, Sayı 3). <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0676>
- Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V. P., Yadav, A. S., Kumar, D., & Kundu, G. C. (2018). Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: Signaling, therapeutic implications and challenges. İçinde *Molecular Cancer* (C. 17, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0797-x>
- Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., & Liu, X. (2018). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. İçinde *npj Precision Oncology* (C. 2, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0>
- Cheng, F., & Guo, D. (2019). MET in glioma: Signaling pathways and targeted therapies. İçinde *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (C. 38, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1269-x>
- Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2022). The role of ROS in tumour development and progression. İçinde *Nature Reviews Cancer* (C. 22, Sayı 5). <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>

- Chopra, T., Balogun, R. A., & Okusa, M. D. (2018). Pharmacological Interventions in Acute Kidney Injury. İçinde *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation: A Companion to Brenner and Rector's The Kidney*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52978-5.00048-3>
- Desole, C., Gallo, S., Vitacolonna, A., Montarolo, F., Bertolotto, A., Vivien, D., Comoglio, P., & Crepaldi, T. (2021). HGF and MET: From Brain Development to Neurological Disorders. İçinde *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (C. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.683609>
- Dey, M., Kim, M. H., Dogan, M., Nagamine, M., Kozhaya, L., Celik, N., Unutmaz, D., & Ozbolat, I. T. (2022). Chemotherapeutics and CAR-T Cell-Based Immunotherapeutics Screening on a 3D Bioprinted Vascularized Breast Tumor Model. *Advanced Functional Materials*, 32(52). <https://doi.org/10.1002/adfm.202203966>
- Dilmac, S., Kuscu, N., Caner, A., Yildirim, S., Yoldas, B., Farooqi, A. A., & Tanriover, G. (2022). SIRT1/FOXO Signaling Pathway in Breast Cancer Progression and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810227>
- Doi, T., Matsubara, N., Kawai, A., Naka, N., Takahashi, S., Uemura, H., & Yamamoto, N. (2020). Phase I study of TAS-115, a novel oral multi-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 38(4). <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00859-4>
- Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. İçinde *Molecular Cancer* (C. 17, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>
- Ebrahimi, N., Fardi, E., Ghaderi, H., Palizdar, S., Khorram, R., Vafadar, R., Ghanaatian, M., Rezaei-Tazangi, F., Baziya, P., Ahmadi, A., Hamblin, M. R., & Aref, A. R. (2023). Receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer. İçinde *Cellular and Molecular Life Sciences* (C. 80, Sayı 4). <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04729-4>
- Eterno, V., Zambelli, A., Pavesi, L., Villani, L., Zanini, V., Petrolo, G., Manera, S., Tuscano, A., & Amato, A. (2014). Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget*, 5(3). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1359>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. İçinde *Signal Transduction and Targeted Therapy* (C. 5, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. İçinde *Genes and Diseases* (C. 5, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T. C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V., & Gao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579). <https://doi.org/10.1038/nature15748>
- Franchi-Mendes, T., Lopes, N., & Brito, C. (2021). Heterotypic Tumor Spheroids in Agitation-Based Cultures: A Scaffold-Free Cell Model That Sustains Long-Term

- Survival of Endothelial Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.649949>
- Fujita, H., Miyadera, K., Kato, M., Fujioka, Y., Ochiiwa, H., Huang, J., Ito, K., Aoyagi, Y., Takenaka, T., Suzuki, T., Ito, S., Hashimoto, A., Suefuji, T., Egami, K., Kazuno, H., Suda, Y., Nishio, K., & Yonekura, K. (2013). The novel VEGF receptor/MET-Targeted kinase inhibitor TAS-115 has marked in vivo antitumor properties and a favorable tolerability profile. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(12). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0459>
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., & Woude, G. Vande. (2012). Targeting MET in cancer: Rationale and progress. İçinde *Nature Reviews Cancer* (C. 12, Sayı 2). <https://doi.org/10.1038/nrc3205>
- Ghosh, S., Spagnoli, G. C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., & Reschner, A. (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2). <https://doi.org/10.1002/jcp.20320>
- Gkretsi, V., & Stylianopoulos, T. (2018). Cell adhesion and matrix stiffness: Coordinating cancer cell invasion and metastasis. İçinde *Frontiers in Oncology* (C. 8, Sayı MAY). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00145>
- Graveel, C. R., Tolbert, D., & Vande Woude, G. F. (2013). MET: A critical player in tumorigenesis and therapeutic target. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009209>
- Griffiths, C. L., & Olin, J. L. (2012). Triple negative breast cancer: A brief review of its characteristics and treatment options. İçinde *Journal of Pharmacy Practice* (C. 25, Sayı 3). <https://doi.org/10.1177/0897190012442062>
- Grist, J. T., Collier, G. J., Walters, H., Kim, M., Chen, M., Abu Eid, G., Laws, A., Matthews, V., Jacob, K., Cross, S., Eves, A., Durrant, M., McIntyre, A., Thompson, R., Schulte, R. F., Raman, B., Robbins, P. A., Wild, J. M., Fraser, E., & Gleeson, F. (2022). Lung Abnormalities Detected with Hyperpolarized 129Xe MRI in Patients with Long COVID. *Radiology*, 305(3). <https://doi.org/10.1148/radiol.220069>
- Habanjar, O., Bingula, R., Decombat, C., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2023). Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 24, Sayı 4). <https://doi.org/10.3390/ijms24044002>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. İçinde *Cell* (C. 144, Sayı 5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. İçinde *Clinical Anatomy* (C. 26, Sayı 1). <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- Hervieu, A., & Kermorgant, S. (2018). The role of PI3K in Met driven cancer: A recap. İçinde *Frontiers in Molecular Biosciences* (C. 5, Sayı NOV). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00086>
- Hong, R., & Xu, B. (2022). Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. İçinde *Cancer Communications* (C. 42, Sayı 10). <https://doi.org/10.1002/cac2.12358>
- Ho-Yen, C. M., Jones, J. L., & Kermorgant, S. (2015). The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: A review. İçinde *Breast Cancer Research* (C. 17, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0547-6>

- Hu, H., Mu, Q., Bao, Z., Chen, Y., Liu, Y., Chen, J., Wang, K., Wang, Z., Nam, Y., Jiang, B., Sa, J. K., Cho, H. J., Her, N. G., Zhang, C., Zhao, Z., Zhang, Y., Zeng, F., Wu, F., Kang, X., ... Jiang, T. (2018). Mutational Landscape of Secondary Glioblastoma Guides MET-Targeted Trial in Brain Tumor. *Cell*, 175(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.038>
- Huang, L., Jiang, S., & Shi, Y. (2020). Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001–2020). İçinde *Journal of Hematology and Oncology* (C. 13, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00977-0>
- Huang, Y., Nayak, S., Jankowitz, R., Davidson, N. E., & Oesterreich, S. (2011). Epigenetics in breast cancer: What's new? İçinde *Breast Cancer Research* (C. 13, Sayı 6). <https://doi.org/10.1186/bcr2925>
- Huang, Z., Yu, P., & Tang, J. (2020). Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. *OncoTargets and Therapy*, 13. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>
- Hughes, P. E., Rex, K., Caenepeel, S., Yang, Y., Zhang, Y., Broome, M. A., Kha, H. T., Burgess, T. L., Amore, B., Kaplan-Lefko, P. J., Moriguchi, J., Werner, J., Damore, M. A., Baker, D., Choquette, D. M., Harmange, J. C., Radinsky, R., Kendall, R., Dussault, I., & Coxon, A. (2016). In vitro and in vivo activity of AMG 337, a potent and selective MET kinase inhibitor, in MET-dependent cancer models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(7). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0871>
- Imura, Y., Nakai, T., Yamada, S., Outani, H., Takenaka, S., Hamada, K., Araki, N., Itoh, K., Yoshikawa, H., & Naka, N. (2016). Functional and therapeutic relevance of hepatocyte growth factor/c-MET signaling in synovial sarcoma. *Cancer Science*, 107(12). <https://doi.org/10.1111/cas.13092>
- Inman, J. L., & Bissell, M. J. (2010). Apical polarity in three-dimensional culture systems: Where to now? İçinde *Journal of Biology* (C. 9, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/jbiol213>
- Jabbarzadeh Kaboli, P., Chen, H. F., Babaeizad, A., Roustai Geraylow, K., Yamaguchi, H., & Hung, M. C. (2024). Unlocking c-MET: A comprehensive journey into targeted therapies for breast cancer. İçinde *Cancer Letters* (C. 588). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216780>
- Jiang, W. G., Sanders, A. J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S. K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., Sliva, D., Subbarayan, P. R., Sarkar, M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., ... Santini, D. (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. İçinde *Seminars in Cancer Biology* (C. 35). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.008>
- Jost, P., Muckova, L., & Pejchal, J. (2020). In vitro stress response induced by sulfur mustard in lung fibroblasts NHLF and human pulmonary epithelial cells A-549. *Archives of Toxicology*, 94(10). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02845-9>
- Kang, Y., Datta, P., Shanmughapriya, S., & Ozbolat, I. T. (2020). 3D Bioprinting of Tumor Models for Cancer Research. İçinde *ACS Applied Bio Materials* (C. 3, Sayı 9). <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00791>
- Karadas, A. K., Dilmac, S., Aytac, G., & Tanriover, G. (2021). Melatonin decreases metastasis, primary tumor growth and angiogenesis in a mice model of breast cancer. *Human and Experimental Toxicology*, 40(9). <https://doi.org/10.1177/09603271211002883>

- Karim, A. M., Eun Kwon, J., Ali, T., Jang, J., Ullah, I., Lee, Y. G., Park, D. W., Park, J., Jeang, J. W., & Kang, S. C. (2023). Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. *İçinde Biochemical Pharmacology* (C. 212). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115545>
- Kim, B. J., Hannanta-anan, P., Chau, M., Kim, Y. S., Swartz, M. A., & Wu, M. (2013). Cooperative Roles of SDF-1 α and EGF Gradients on Tumor Cell Migration Revealed by a Robust 3D Microfluidic Model. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068422>
- Kozlov, G., Perreault, A., Schrag, J. D., Park, M., Cygler, M., Gehring, K., & Ekiel, I. (2004). Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.132>
- Kuang, W., Deng, Q., Deng, C., Li, W., Shu, S., & Zhou, M. (2017). Hepatocyte growth factor induces breast cancer cell invasion via the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways to up-regulate the expression of COX2. *American Journal of Translational Research*, 9(8).
- Kunii, E., Ozasa, H., Oguri, T., Maeno, K., Fukuda, S., Uemura, T., Takakuwa, O., Ohkubo, H., Takemura, M., & Niimi, A. (2015). Reversal of c-MET-mediated resistance to cytotoxic anticancer drugs by a novel c-MET inhibitor TAS-115. *Anticancer Research*, 35(10).
- Lam, B. Q., Dai, L., & Qin, Z. (2016). The role of HGF/c-MET signaling pathway in lymphoma. *İçinde Journal of Hematology and Oncology* (C. 9, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0366-y>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *İçinde Cell* (C. 141, Sayı 7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Leung, E., Xue, A., Wang, Y., Rougerie, P., Sharma, V. P., Eddy, R., Cox, D., & Condeelis, J. (2017). Blood vessel endothelium-directed tumor cell streaming in breast tumors requires the HGF/C-Met signaling pathway. *Oncogene*, 36(19). <https://doi.org/10.1038/onc.2016.421>
- Li, H., Fan, X., & Houghton, J. M. (2007). Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *İçinde Journal of Cellular Biochemistry* (C. 101, Sayı 4). <https://doi.org/10.1002/jcb.21159>
- Li, Y., Zhang, H., Merkhher, Y., Chen, L., Liu, N., Leonov, S., & Chen, Y. (2022). Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *İçinde Journal of Hematology and Oncology* (C. 15, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01341-0>
- Liang, Y., Liu, J., Liu, T., & Yang, X. (2017). Anti-c-met antibody bioconjugated with hollow gold nanospheres as a novel nanomaterial for targeted radiation ablation of human cervical cancer cell. *Oncology Letters*, 14(2). <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6383>
- Liu, J., Peng, Y., & Wei, W. (2022). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *İçinde Trends in Cell Biology* (C. 32, Sayı 1). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001>
- Loessner, D., Stok, K. S., Lutolf, M. P., Hutmacher, D. W., Clements, J. A., & Rizzi, S. C. (2010). Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials*, 31(32). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.064>

- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021a). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. *Içinde Cancers* (C. 13, Sayı 17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021b). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. *Içinde Cancers* (C. 13, Sayı 17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., & Salgia, R. (2003). c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Içinde Cancer and Metastasis Reviews* (C. 22, Sayı 4). <https://doi.org/10.1023/A:1023768811842>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Içinde Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (C. 1, Sayı 4). <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Massihnia, D., Galvano, A., Fanale, D., Perez, A., Castiglia, M., Incorvaia, L., Listì, A., Rizzo, S., Cicero, G., Bazan, V., Castorina, S., & Russo, A. (2016). Triple negative breast cancer: Shedding light onto the role of pi3k/akt/mtor pathway. *Içinde Oncotarget* (C. 7, Sayı 37). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10858>
- Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C., Morrison, P. T., & Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Içinde Cytokine and Growth Factor Reviews* (C. 13, Sayı 1). [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00029-6)
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(2). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
- Meng, W., & Chen, T. (2021). Association between the HGF/c-MET signaling pathway and tumorigenesis, progression and prognosis of hepatocellular carcinoma (Review). *Oncology Reports*, 46(3). <https://doi.org/10.3892/or.2021.8142>
- Michalopoulos, G., Houck, K. A., Dolan, M. L., & Luetke, N. C. (1984). Control off Hepatocyte Replication by Two Serum Factors. *Cancer Research*, 44(10).
- Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Szychlinska, M. A., Aiello, F. C., Vecchio, G. M., Salvatorelli, L., Magro, G., & Imbesi, R. (2015). Mammary gland: From embryogenesis to adult life. *Içinde Acta Histochemica* (C. 117, Sayı 4-5). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.013>
- Nakade, J., Takeuchi, S., Nakagawa, T., Ishikawa, D., Sano, T., Nanjo, S., Yamada, T., Ebi, H., Zhao, L., Yasumoto, K., Matsumoto, K., Yonekura, K., & Yano, S. (2014). Triple inhibition of EGFR, met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(6). <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000170>
- Nakamura, T., Nawa, K., & Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(3). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91253-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91253-1)
- Navis, A. C., van Lith, S. A. M., van Duijnhoven, S. M. J., de Pooter, M., Yetkin-Arik, B., Wesseling, P., Hendriks, W. J. A. J., Venselaar, H., Timmer, M., van Cleef, P., van Bergen en Henegouwen, P., Best, M. G., Wurdinger, T. D., Tops, B. B. J., &

- Leenders, W. P. J. (2015). Identification of a novel MET mutation in high-grade glioma resulting in an auto-active intracellular protein. *Acta Neuropathologica*, 130(1). <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1420-5>
- Oliveres, H., Pineda, E., & Maurel, J. (2020). MET inhibitors in cancer: pitfalls and challenges. İçinde *Expert Opinion on Investigational Drugs* (C. 29, Sayı 1). <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1699532>
- Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P., & Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes and Development*, 16(23). <https://doi.org/10.1101/gad.242602>
- Orian-Rousseau, V., Morrison, H., Matzke, A., Kastilan, T., Pace, G., Herrlich, P., & Ponta, H. (2007). Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Molecular Biology of the Cell*, 18(1). <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-08-0674>
- Owusu, B. Y., Galembo, R., Janetka, J., & Klampfer, L. (2017). Hepatocyte growth factor, a key tumor-promoting factor in the tumor microenvironment. İçinde *Cancers* (C. 9, Sayı 4). <https://doi.org/10.3390/cancers9040035>
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. İçinde *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (C. 8, Sayı 10). <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
- Parikh, R. A., Wang, P., Beumer, J. H., Chu, E., & Appleman, L. J. (2014). The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment. İçinde *OncoTargets and Therapy* (C. 7). <https://doi.org/10.2147/OTT.S40241>
- Parr, C., & Ali, A. Y. (2018). Boswellia frereana suppresses HGF-mediated breast cancer cell invasion and migration through inhibition of c-Met signalling. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1660-y>
- Petri, B. J., & Klinge, C. M. (2020). Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. İçinde *Cancer and Metastasis Reviews* (C. 39, Sayı 3). <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09905-7>
- Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. İçinde *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (C. 4, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/nrm1004>
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., & Comoglio, P. M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, 77(2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90318-2)
- Ridky, T. W., Chow, J. M., Wong, D. J., & Khavari, P. A. (2010). Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. *Nature Medicine*, 16(12). <https://doi.org/10.1038/nm.2265>
- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A., & Arteaga, C. L. (2007). Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clinical Cancer Research*, 13(16). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0701>
- Russell, W. E., McGowan, J. A., & Bucher, N. L. R. (1984). Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *Journal of Cellular Physiology*, 119(2). <https://doi.org/10.1002/jcp.1041190207>

- Safaie Qamsari, E., Safaei Ghaderi, S., Zarei, B., Dorostkar, R., Bagheri, S., Jadidi-Niaragh, F., Somi, M. H., & Yousefi, M. (2017). The c-Met receptor: Implication for targeted therapies in colorectal cancer. İçinde *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* (C. 39, Sayı 5). <https://doi.org/10.1177/1010428317699118>
- Samra Gafarli, C., Gafarli, S., Tian, M., & Rückert, F. (2017). Hepatocyte Growth Factor Signaling Pathway as a Potential Target in Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas. İçinde *REVIEW ARTICLE JOP. J Pancreas* (C. 18, Sayı 6).
- Sheth, P. R., Hays, J. L., Elferink, L. A., & Watowich, S. J. (2008). Biochemical basis for the functional switch that regulates hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activation. *Biochemistry*, 47(13). <https://doi.org/10.1021/bi701892f>
- Shi, Y., Jin, J., Ji, W., & Guan, X. (2018). Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. İçinde *Molecular Cancer* (C. 17, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0850-9>
- Siemann, D. W., & Horsman, M. R. (2015). Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. İçinde *Pharmacology and Therapeutics* (C. 153). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.06.006>
- Sierra, J. R., & Tsao, M. S. (2011). c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. İçinde *Therapeutic Advances in Medical Oncology* (C. 3, Sayı 1). <https://doi.org/10.1177/1758834011422557>
- Silva Paiva, R., Gomes, I., Casimiro, S., Fernandes, I., & Costa, L. (2020). c-Met expression in renal cell carcinoma with bone metastases. İçinde *Journal of Bone Oncology* (C. 25). <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2020.100315>
- Skardal, A., Mack, D., Atala, A., & Soker, S. (2013). Substrate elasticity controls cell proliferation, surface marker expression and motile phenotype in amniotic fluid-derived stem cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.10.001>
- Skinner, K. E., Haiderali, A., Huang, M., Schwartzberg, L. S., & Skinner, K. E. (2021). Real-world effectiveness outcomes in patients diagnosed with metastatic triple-negative breast cancer. *Future Oncology*, 17(8). <https://doi.org/10.2217/fon-2020-1021>
- Smyth, E. C., Sclafani, F., & Cunningham, D. (2014). Emerging molecular targets in oncology: Clinical potential of MEET/hepatocyte growth-factor inhibitors. İçinde *OncoTargets and Therapy* (C. 7). <https://doi.org/10.2147/OTT.S44941>
- Subia, B., Dahiya, U. R., Mishra, S., Ayache, J., Casquillas, G. V., Caballero, D., Reis, R. L., & Kundu, S. C. (2021). Breast tumor-on-chip models: From disease modeling to personalized drug screening. İçinde *Journal of Controlled Release* (C. 331). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.057>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tanriover, G., Dilmac, S., Aytac, G., Farooqi, A. A., & Sindel, M. (2021). Effects of Melatonin and Doxorubicin on Primary Tumor And Metastasis in Breast Cancer Model. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22(10). <https://doi.org/10.2174/1871520621666211213094258>

- Thewke, D. P., Kou, J., Fulmer, M. L., & Xie, Q. (2018). *The HGF/MET Signaling and Therapeutics in Cancer*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7296-3_8
- Trenker, R., & Jura, N. (2020). Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. İçinde *Current Opinion in Cell Biology* (C. 63). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.016>
- Van Der Steen, N., Giovannetti, E., Pauwels, P., Peters, G. J., Hong, D. S., Cappuzzo, F., Hirsch, F. R., & Rolfo, C. (2016). CMET Exon 14 Skipping: From the structure to the clinic. İçinde *Journal of Thoracic Oncology* (C. 11, Sayı 9). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.005>
- Wang, Y., & Zhou, B. P. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. İçinde *Chinese Journal of Cancer* (C. 30, Sayı 9). <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10226>
- Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. İçinde *British Journal of Radiology* (C. 95, Sayı 1130). <https://doi.org/10.1259/BJR.20211033>
- Wintheiser, G. A., & Silberstein, P. (2019). Physiology, Tyrosine Kinase Receptors. İçinde *StatPearls*.
- Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2020). Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. İçinde *Cell and Bioscience* (C. 10, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0>
- Yakavets, I., Francois, A., Benoit, A., Merlin, J. L., Bezdetnaya, L., & Vogin, G. (2020). Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78087-7>
- Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. İçinde *Cell* (C. 130, Sayı 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>
- Yamada, S., Imura, Y., Nakai, T., Nakai, S., Yasuda, N., Kaneko, K., Outani, H., Takenaka, S., Hamada, K., Myoui, A., Araki, N., Ueda, T., Itoh, K., Yoshikawa, H., & Naka, N. (2017). Therapeutic potential of TAS-115 via c-MET and PDGFR α signal inhibition for synovial sarcoma. *BMC Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3324-3>
- Yasuda, N., Takenaka, S., Nakai, S., Nakai, T., Yamada, S., Imura, Y., Outani, H., Hamada, K., Yoshikawa, H., & Naka, N. (2020). TAS-115 inhibits PDGFR α /AXL/FLT-3 signaling and suppresses lung metastasis of osteosarcoma. *FEBS Open Bio*, 10(5). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12827>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. İçinde *Breast Cancer Research* (C. 22, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022a). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. İçinde *npj Breast Cancer* (C. 8, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022b). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. İçinde *npj Breast Cancer* (C. 8, Sayı 1). <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>
- Zhang, H., Feng, Q., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2018). HGF/c-MET: A promising therapeutic target in the digestive system cancers. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 19, Sayı 11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113295>

- Zhang, Y., Xia, M., Jin, K., Wang, S., Wei, H., Fan, C., Wu, Y., Li, X., Li, X., Li, G., Zeng, Z., & Xiong, W. (2018). Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. İçinde *Molecular Cancer* (C. 17, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0796-y>
- Zhang, Y., Yu, Y., Akkouch, A., Dababneh, A., Dolati, F., & Ozbolat, I. T. (2015). In vitro study of directly bioprinted perfusable vasculature conduits. *Biomaterials Science*, 3(1). <https://doi.org/10.1039/c4bm00234b>
- Zhao, L., Yasumoto, K., Kawashima, A., Nakagawa, T., Takeuchi, S., Yamada, T., Matsumoto, K., Yonekura, K., Yoshie, O., & Yano, S. (2013). Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. *Cancer Science*, 104(12). <https://doi.org/10.1111/cas.12301>
- Zhao, Y., Yao, R., Ouyang, L., Ding, H., Zhang, T., Zhang, K., Cheng, S., & Sun, W. (2014). Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication*, 6(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035001>
- Zubair, M., Wang, S., & Ali, N. (2021). Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. İçinde *Frontiers in Pharmacology* (C. 11). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SENDEGÜL	Uyruğu	T.C.
Soyadı	YILDIRIM	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Aydınlıkevler Anadolu Lisesi	2006
Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2014
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji YL programı	2017-2020
Doktora	Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Doktora programı	2020- 2025

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Antalya Medikal Park Hastanesi	2014-2016
Biyoloji öğretmeni	Konyaaltı Sanat ve Eğitim merkezi ve Elit Etüt Merkezi	2016-2017

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yök-Dil	86

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Meme Kanseri Akciğer Metastazının Modellenmesinde TAS-115 İnhibitörünün Etkisinin Değerlendirilmesi	TÜBİTAK 2214-A (Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu) Bursiyer, BAP Doktora Tez Projesi (TDK-2023-6270)	2023- 2024
Deneyisel Subaraknoid Kanama Sonrası Erken Beyin Hasarı Sürecinde Adropinin Etkilerinin Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TSA-2022-5792) Araştırmacı	2022-2024
Adiposit Kökenli Kök Hücrelerin Çinko Etkisiyle Oluşturacağı Yanıtların Deneyisel Parkinson	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TSA-2022-5710)	2022

Hastalığı Modelinde Değerlendirilmesi	Araştırmacı	
Hipotermik Oksijenli makine Perfüzyonu (HOMP) Yapılan Domuz Karaciğerlerinde Perfüzyon Sıvısı Olarak Amniyotik Sıvının Etkisi	TÜBİTAK 1001 (121S699) Bursiyer	2021-2023
Fare Meme Kanseri Modelinde Rottlerin Eef2 Kinaz Üzerine Etkisinin İmmün ve Metastatik Yanıtlar Açısından Değerlendirilmesi	TÜBİTAK 1001 (119S564) Bursiyer	2019-2021
Rotenon ile Oluşturulmuş Parkinson Hastalığı Modelinde Vortiksetinin Nörodejenerasyon ve Bilişsel Disfonksiyon Üzerine Etkilerinin <i>In vivo</i> Olarak İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TDK-2019-4412) Araştırmacı	2019-2021
PKA Aracılı E2F1'in Post-Translasyonel Modifikasyonlarının Kansere Proliferasyonu ve Metastaz Üzerine Etkilerinin Araştırılması	TÜBİTAK-1002 (119S338) Bursiyer	2019-2021
Fare Meme Kanseri Modelinde Karsinogenik Yanıtlara Karşı Ortaya Çıkacak Anksiyete ve Depresyonun Düzenlenmesinde Melatonin Etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TKA-2018-3808) Araştırmacı	2018-2020
Sıçanlarda Metilglioksal ile İndüklenen Endotel Disfonksiyonuna Melatonin Etkisinin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TYL-2018-3801) Araştırmacı	2018-2020
E2F1 ve Post-Translasyonel Modifikasyonlarının Adipoz Kökenli Kök Hücrelerin Nöronal Hücrelere Farklılaşmasına Olan Etkilerinin Araştırılması	TÜBİTAK-1001 (118S328) Bursiyer	2018-2020
Prilokain Toksisitesinde Timokinonun Koruyucu Etkinliği	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TTU-2017-2551) Araştırmacı	2017-2019
Rotenonla İndüklenen DeneySEL Parkinson Hastalığı Modelinde Metforminin Olası Etkileri ve Etki mekanizmaları	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TSA-2017-2392) Araştırmacı	2017-2019

Fare Meme Kanseri Modeli Metastatik ve Non Metastatik Tümörlerde ve Hücre Hatlarında SIRT1 ile FoxO Proteinlerinin Ekspresyonlarının <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TSA-2017-2088) Araştırmacı	2017-2019
--	---	-----------

Burslar-Ödüller:

1. Yildirim S, Dandin O, Karacayli D, Yilmaz C, Canpolat M, Aydın Aslan M, Tanrioer G. Assessment of the impact of Amniotic Fluid (AF) as a perfusion solution in pig livers experiencing Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion (HOMP). 16th National and 2st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2024, Sakarya/ TURKEY Third prize of the oral presentation
2. Yildirim S, Tanrioer G, Ozkan A, Sinen O, Ertosun G, Goksu E.T. The effect of melatonin on TLR4 related inflammatory pathway in the Parkinson's disease model. 15th National and 1st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2022 Online Congress, Third prize of the oral presentation
3. TÜBİTAK, 2214A-Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Bursu, ABD Pennsylvania State Üniversitesi Mühendislik Bilimi ve Mekanik Bölümü, 2023-2024

Yayınlar ve Bildiriler:

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Inan SY, Yildirim S, Tanrioer G, Ilhan B. P/Q type (Cav2.1) Calcium Channel Blocker ω -Agatoxin IVA Alters Cleaved Caspase-3 and BDNF Expressions in the Rat Brain and Suppresses Seizure Activity. PMID: 37798599 DOI: 10.1007/s12035-023-03678-0, Molecular Neurobiology, 2024 Apr;61(4):1861-1872.
2. Yildirim S, Oylumlu E, Ozkan A, Sinen O, Bulbul M, Goksu E.T, Ertosun M.G, Tanrioer G. Zinc (Zn) and adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) on F MPTP-induced Parkinson's disease model: A comparative evaluation of

behavioral and immunohistochemical results. PMID: 37146888 DOI: 10.1016/j.neuro.2023.05.002, Neurotoxicology, 2023 Jul;97:1-11.

3. Dilmac S, Kuscu N, Caner A, Yildirim S, Yoldas B, Tanrioer G. SIRT1/FoxO Signaling Pathway in Breast Cancer Progression and Metastasis. PMID: 36142156 DOI: 10.3390/ijms231810227, Int J Mol Sci. 2022 Sep 6;23(18):10227.
4. Yildirim S, Ozkan A, Aytac G, Agar A, Tanrioer G. Role of Melatonin In TLR4-Mediated Inflammatory Pathway In MPTP Induced Mouse Model Of Parkinson's Disease. PMID: 34808223 DOI: 10.1016/j.neuro.2021.11.011, Neurotoxicology, 2022 Jan;88:168-177.
5. Nemutlu-Samur D, Akcay G, Yildirim S, Ozkan A, Ceker T, Derin N, Tanrioer G, Aslan M, Agar A, Ozbey G. Vortioxetine ameliorates motor and cognitive impairment in the rotenone-induced Parkinson's disease via targeting TLR-2 mediated neuroinflammation. PMID: 35092748 DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.108977, Neuropharmacology. 2022 May 1;208:108977.
6. Akgul B, Aycaan I.O, Hıdısoğlu E, Afsar E, Yildirim S, Tanrioer G, Coskunfirat N., Sanlı S., Aslan M. Alleviation of prilocaine-induced epileptiform activity and cardiotoxicity by thymoquinone. PMID: 33469802 DOI: 10.1007/s40199-020-00385-2, Daru, 2021 Jun;29(1):85-99.
7. Ozbey G, Nemutlu-Samur D, Parlak H, Yildirim S, Aslan M, Tanrioer G, Agar A. Metformin protects rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration by reducing lipid peroxidation. PMID: 32207092 DOI: 10.1007/s43440-020-00095-1. Pharmacol Rep., 2020 Oct;72(5):1397-1406.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

1. Yildirim S, Dandin O, Karacayli D, Yilmaz C, Canpolat M, Aydin Aslan M, Tanrioer G. Assessment of the impact of Amniotic Fluid (AF) as a perfusion solution in pig livers experiencing Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion (HOMP). 16th National and 2st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2024, Sakarya/ TURKEY, Oral presentation
2. Oylumlu E, Yildirim S, Sisanci A, Yazici E, Kalay M, Dilmac S, Guney Eskiler G, Tanrioer G. Indoximod and Melatonin regressed tumor progression and metastasis synergistically restricting immunosuppressive tumor microenvironment. 16th National and 2st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2024, Sakarya/ TURKEY, Oral presentation
3. Sisanci A, Yazici E, Kalay M, Oylumlu E, Yildirim S, Tanrioer G. Evaluation of Tap73 pathway in Temozolomide resistant cell line in view of cell proliferation and apoptotic pathways. 16th National and 2st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2024, Sakarya/ TURKEY, Oral presentation
4. Yazici E, Sisanci A, Kalay M, Oylumlu E, Yildirim S, Tanrioer G. Evaluation of the effect of Donafenib and radiotherapy for the survival potential of temozolomide-sensitive and resistant GBM cells. 16th National and 2st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2024, Sakarya/ TURKEY, Oral presentation
5. Yildirim S, Tanrioer G, Ozkan A, Sinen O, Ertosun G, Goksu E.T. The effect of melatonin on TLR4 related inflammatory pathway in the Parkinson's disease model. Evaluation of the Zinc-induced responses of Adipocyte-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) in an experimental Parkinson's disease

model. 15th National and 1st International Histology ve Embryology Congress. 26-28 May 2022 Online Congress, Oral presentation

6. Yildirim S. Tanrioer G, Ozkan A, Agar A. The effect of melatonin on TLR4 related inflammatory pathway in the Parkinson's disease model. 1st International Microscopy ve Spectroscopy Congress. 22-24 September 2021 Online Congress, Oral presentation
7. Dilmac S, Yildirim S. Tanrioer G The effect of melatonin on primary tumor growth, metastasis and MDSCs in a mouse breast cancer model with circadian rhythm impairment. 1st International Microscopy ve Spectroscopy Congress. 22-24 September 2021 Online Congress, Oral presentation
8. Yildirim S. Tanrioer G, Akgul B, Aycan I.O, Hıdısoğlu E, Afsar E, Aslan M. Prilocaine induced epileptiform activity and cardiac toxicity is alleviated by thymoquinone treatment. 17th Turkish Neuroscience Congress. 4-7 Nisan 2019 Trabzon/Türkiye, Sözlü Sunum
9. Yildirim S. Ertosun G, Tanrioer G. Sox2 and Nanog Expressions in GBM. 17th Turkish Neuroscience Congress. 4-7 Nisan 2019 Trabzon/Türkiye. Poster sunum
10. Yildirim S. Aytac G, Parlak H, Agar A, Tanrioer G. Responses to TLR4 increase triggers inflammatory pathway in a mouse model of Parkinson's disease. 17th Turkish Neuroscience Congress. 4-7 Nisan 2019 Trabzon/Türkiye. Poster sunum
11. Yildirim S. Aytac G, Parlak H, Agar A, Tanrioer G. “Farelerde oluşturulan deneysel Parkinson hastalığı modelinde Toll like reseptör-4 (TLR4) Ekspresyonu” 04-05 Mayıs 2018 Tuzla, Hücre Ölümü Araştırma Derneği Uluslararası Katılımlı Nörodejenerasyon/Nörorejenerasyon Çalıştayı, Poster Sunum.

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Yildirim S., Dilmac S, Kuscü N, Adıgüzel D, Yoldaş Ş.B, Erin N, Tanrıöver G. Sirt1 özel bir yolak ile FoxO proteinlerinin hedefini metastazı tetikleyecek şekilde etkileyebilir mi? 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018 Antalya. Sözlü Sunum.
2. Yildirim S., Tanrioever G, Inan S. Antiepileptic effect of Agatoxin IVA in Pentylenetetrazol (PTZ)-induced epilepsy model. 18th Turkish Neuroscience Congress. 21-23 Kasım 2021 Online Congress, Sözlü sunum
3. Ozbey G, Nemutlu-Samur D, Parlak H, Yildirim S., Gamze Tanrıöver, Aysel Ağar. Metformin dopaminerjik nöronlarda rotenonla indüklenen dejenerasyonu azaltmaktadır 20-23 Mayıs 2018 İstanbul, 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sözlü Sunum.