

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(ANADOLU ÜNİVERSİTESİ İLE YÜRÜTÜLEN ORTAK PROGRAM)

**MEME KANSERİ TÜMÖR MODELİNDE CAPECİTABİNE VE MOCETİNOSTAT
(HDAC İNHİBİTÖRÜ)'İN KOMBİNE UYGULANMASININ APOPTOZ
MEKANİZMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİVO VE İN VİTRO OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HACER KAYA ÇAKIR

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2022

10491532

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(ANADOLU ÜNİVERSİTESİ İLE YÜRÜTÜLEN ORTAK PROGRAM)

**MEME KANSERİ TÜMÖR MODELİNDE CAPECİTABİNE VE MOCETİNOSTAT
(HDAC İNHİBİTÖRÜ)'İN KOMBİNE UYGULANMASININ APOPTOZ
MEKANİZMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİVO VE İN VİTRO OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HACER KAYA ÇAKIR

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2022
10491532

BEYAN

Meme Kanseri Tümör Modelinde Capecitabine ve Mocetinostat (HDAC İnhibitörü)'ün Kombine Uygulanmasının Apoptoz Mekanizması Üzerindeki Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro Olarak Araştırılması adlı doktora tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)		2018-02. BŞEÜ.01-01	
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		09/02/2022 / 2022-02	

Hacer Kaya Çakır

Tarih

İmza

ÖN SÖZ

Bu çalışma Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Kanseri Tümör Modelinde Capecitabine ve Mocetinostat (HDAC inhibitörü)'ın Kombine Uygulamasının Apoptoz Mekanizması Üzerindeki Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro Olarak Araştırılması amacıyla yapılmıştır. Araştırma süresince elde edilen veriler nitel olarak değerlendirilmiş ve tüm sonuçlar bulgulara paylaşılmıştır.

Tez çalışmamın ortaya çıkmasında, tüm tecrübelerini ve deneyimlerini aktaran, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Onur EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan ve desteğini esirgemeyen lisansüstü eğitim gören tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca benimle birlikte aynı yolda yürüyen ve bana maddi manevi destek olan babam Ali Osman KAYA'ya, annem Emine KAYA'ya, ablalarım Seyhan KAYA ve Serap YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süresince yanımda olan ve desteğini bir an bile esirgemeyen sevgili eşim Tarık Furkan ÇAKIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Hacer Kaya Çakır

2022

ÖZET

MEME KANSERİ TÜMÖR MODELİNDE CAPECİTABİNE VE MOCETİNOSTAT (HDAC İNHİBİTÖRÜ)'İN KOMBİNE UYGULANMASININ APOPTOZ MEKANİZMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİVO VE İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

TNBC (triple negative breast cancer)'nin zayıf prognoza sahip olması, agresif özellik göstermesi ve hedefe yönelik tedaviden yoksun olması nedeniyle hala klinik öneme sahiptir. TNBC tedavisi için yeni tedavi stratejilerini destekleyen yeni verilere ihtiyaç vardır. Kanseri tedavi etmenin yollarından biri, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini kontrol altına almak veya hücre büyümesini sonlandırmaktır. Apoptoz kanserin önlenmesinde etkili olan mekanizmalardan birisidir. Apoptoz, meme kanseri tedavisi dahil olmak üzere tüm kanser tedavilerinde oldukça etkin bir yoldur. İki veya daha fazla ilacın kombine uygulanması meme kanseri tedavisinde yeni bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Kombine tedavi ile kullanılan ilaçlar hücreyi farklı mekanizmalarla etkilediğinden, monoterapi ile karşılaştırıldığında kombine tedavide, terapötik etki artmakta ve yan etkiler azalmaktadır. Capecitabine, DNA/RNA sentez inhibitörü olmakla birlikte birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Mocetinostat ise bir HDACi olmakla birlikte apoptoz, farklılaşma, hücre siklusu tutulumu, DNA onarımının inhibisyonu, oksidatif stres ve otofaji üzerinde etkilidir. 4T1 meme kanseri hücre hattı insan TNBC'ne oldukça benzediğinden, in vivo meme kanseri araştırmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat meme kanseri tedavisinde kullanımının apoptoz mekanizması üzerindeki etkisini hem in vivo hem de in vitro olarak araştırmaktır. Bu nedenle çalışmanın in vitro kısmında tekli ve kombine uygulanan ilaç dozları IC₅₀ değeri belirlenmiş ve survival, DNA laddering, yara iyileşme ve apoptotik proteinlerin seviyesini incelemek için western blot testi yapılmıştır. Çalışmanın in vivo kısmında ise 4T1 hücreleri BALB/c farelere enjekte edilerek meme tümörü oluşturulmuştur. Hayvanlardan alınan meme ve akciğer dokuları histolojik ve immünokimyasal olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kombine tedavi tekli tedaviye göre düşük dozda daha etkin olmuş ve hücreler üzerinde oldukça güçlü sitotoksik etki gözlemlenmiştir. Ayrıca apoptotik yolda görevli olan Bcl-2, HDAC1, AKT, PI3K, C-myc, HDACIII proteinlerinin seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı ve Bax, Kaspaz-3, PTEN, Kaspaz-7, Kaspaz-9, p53 protein seviyelerinin Capecitabine ve Mocetinostat'ın birlikte uygulanması ile önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Capecitabine, Kombine Tedavi, Meme Kanseri, Mocetinostat, 4T1 Hücre Hattı.

ABSTRACT

THE EFFECT OF COMBINED TREATMENT WITH CAPECITABINE AND MOCETINOSTAT (HDAC INHIBITOR) ON APOPTOSIS MECHANISM IN BREAST CANCER TUMOR MODEL: IN VIVO AND IN VITRO INVESTIGATION

TNBC (triple negative breast cancer) is still of clinical importance due to its poor prognosis, aggressive nature and lack of targeted therapy. New data are needed to support new treatment strategies for the treatment of TNBC. One of the ways to treat cancer is to control the uncontrolled growth of cancer cells or to terminate cell growth. Apoptosis is one of the effective mechanisms in the prevention of cancer. Since apoptosis is not specific to the cause and type of cancer, it is a highly effective way to treat all cancers, including breast cancer treatment. Combined administration of two or more drugs is a new strategy in the treatment of breast cancer. Comparing combination therapy to monotherapy, the therapeutic effect is greater and the side effects are less because the drugs used in combination therapy affect the cell through various mechanisms. Capecitabine is a DNA/RNA synthesis inhibitor and is used in many cancer treatments. Mocetinostat is an HDACi and has effects on apoptosis, differentiation, cell cycle involvement, inhibition of DNA repair, oxidative stress and autophagy. The aim of this study is to investigate the effect of using Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat in the treatment of breast cancer on the mechanism of apoptosis both in vivo and in vitro. 4T1 breast cancer cell line is very similar to human TNBC, it is widely used in in vivo breast cancer research. In the in vitro part of the study, the IC₅₀ value of single and combined drug doses was determined. Then survival, DNA laddering, wound healing and western blot testing were performed. In the in vivo part of the study, 4T1 cells were injected into BALB/c mice to form mammary tumors. Tumor and lung tissues taken from animals were examined histologically and immunochemically. According to the results obtained, the combined treatment was more effective at low doses than the single treatment and showed a very strong cytotoxic effect on the cells. In addition, the level of Bcl-2, HDACI, AKT, PI3K, C-myc, HDACIII proteins, which are involved in the apoptotic pathway, were significantly decreased and the level of Bax, Caspase-3, PTEN, Caspase-7, Caspase-9, p53 proteins was increased by combine treatment of Capecitabine and Mocetinostat.

Keywords: Apoptosis, Capecitabine, Combine Therapy, Breast Cancer, Mocetinostat, 4T1 Cell Line.

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xi
GİRİŞ.....	1

BİRİNCİ BÖLÜM

KANSER

İKİNCİ BÖLÜM

MEME KANSERİ

1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	6
1.1. Luminal Meme Kanseri	7
1.2. HER2 ile Zenginleştirilmiş Meme Kanseri	7
1.3. Claudin-Düşük Meme Kanseri	7
1.4. Vekil Belirteçleri ile Sınıflandırılması	8
1.4.1. KI 67	8
2. Meme Kanserinin Evrelemesi	9
3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	10
4. Meme Kanseri Risk Faktörleri	11
4.1. Genetik Risk Faktörleri	11
4.2. Genetik Olmayan Risk Faktörleri.....	12
5. Meme Kanserinde Moleküler Prognostik Biyobelirteçler	14
5.1. Oncotype DX Testi	14
5.2. MammaPrint Testi	14
5.3. uPA ve PAI-1 Testi	14
6. Diğer Prognostik Biyobelirteçler	14
6.1. Öngörücü Biyobelirteçler	15
6.1.1. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri	15
6.1.1.1. HER2.....	15

6.1.1.2. MIB-1	16
6.1.1.3. E-Kadherin	16
6.1.1.4. P53	16
6.1.1.5. MikroRNA	16
6.2. Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAMS)	17
7. Bazal Benzeri/Üçlü Negatif Meme Kanseri	17
8. Meme Kanseri Tedavisinde Kombine Terapi	18
9. Epigenetik Mekanizmalar	19
9.1. DNA Metilasyonu	19
9.2. Kodlanmayan RNAlar	20
9.3. Histon Modifikasyonları.....	20
9.3.1. Histon Asetilasyonu.....	20
9.3.2. Histon Metilasyonuna.....	21
9.3.3. Histon Fosforilasyonu	22
9.3.4. Histon Ubikitinasyonu.....	22
10. Histon Deasetilazlar ve Kanser	22
11. Kombine Terapide Histon Deasetilaz İnhibitörleri	23
12. Meme Kanserinde Apoptoz Mekanizması	25
12.1. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı	26
12.2. İntrinsik Apoptoz Yolağı	26
12.3. Kaspazlar	28
13. Kullanılan İlaçlar ve Mekanizmaları.....	28
13.1. Capecitabine Mekanizması.....	28
13.2. Mocetinostat Mekanizması.....	32
14. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattı Özellikleri	33

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Gereçler	35
1.1. Cihazlar.....	35
1.2. Kimyasallar.....	36
1.3. Sarf Malzemeler	37
1.4. Tamponlar.....	37
1.5. Kullanılan Hücre Hattı.....	40
2. Yöntemler.....	40

2.1. Hücre Kültürü	40
2.2. Kimyasalların Hazırlanması	41
2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi, MTT Analizi.....	42
2.4. Hücre Morfolojisi Analizi	42
2.5. Hücre Sağkalım Tayini.....	42
2.6. DNA Fragmentasyon Analizi	43
2.7. Yara İyileşme Deneyi	43
2.8. Koloni Oluşum Deneyi.....	43
2.9. Western Blot Deneyi	44
2.9.1. Total Protein İzolasyonu.....	44
2.9.1.1. Protein Konsantrasyonlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi.....	44
2.9.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi.....	45
3. İn Vivo Çalışmalar	46
3.1. Deneysel Meme Kanseri Oluşturma.....	46
3.1.1. Deney Hayvanları.....	46
3.1.2. 4T1 Meme Kanseri Hücresinin İnokulasyonu.....	46
3.1.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	46
3.1.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü	49
3.1.5. Dokuların Alınması	49
3.1.6. Tümör Ağırlıklarının Ölçümü	49
3.1.7. Dokuların Hematoksilen-Eozin (H+E) Boyanması.....	49
4. İstatistiksel Değerlendirme.....	50

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

1. İn Vitro Bulgular	51
1.1. Mocetinostat'ın 4T1 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	51
1.2. Capecitabine'nin 4T1 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	51
1.3. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Kombine Uygulamasının 4T1 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	52
1.4. Hücre Morfolojisi Analizi	54
1.5. Hücre Sağkalım Tayini.....	54
1.6. DNA Laddering Deneyi.....	56
1.7. Koloni Oluşum Deneyi.....	56

1.8. Yara İyileşme Deneyi	57
1.9. Western Blot Analizi	58
2. İn Vivo Deney Sonuçları.....	62
2.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	62
2.2. Tümör Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	62
2.3. Dokuların Hematoksilen-Eozin (H+E) ile Boyanması.....	63

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE TARTIŞMA

1. Sonuç	66
2. Tartışma.....	67
KAYNAKÇA	78
EKLER.....	98

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplemesi	9
Tablo 2.2. Toksisiteyi Öngörmek Amacıyla Kullanılan Moleküler Yapılar	31
Tablo 3.1. Laboratuvarında Kullanılan Cihazların Adı ve Markaları	35
Tablo 3.2. Laboratuvarında Kullanılan Kimyasalların Adı ve Markası	36
Tablo 3.3. Laboratuvarında Kullanılan Sarf Malzemeler ve Markası	37
Tablo 3.4. PBS Tampon İçeriği	38
Tablo 3.5. Coomassie Brilliant Blue İçeriği.....	38
Tablo 3.6. Destaining Solüsyon İçeriği	39
Tablo 3.7. Ayırıcı Tampon İçeriği.....	39
Tablo 3.8. %4'lük SDS Poliakrilamid Yükleme Jeli İçeriği	39
Tablo 3.9. %12,5'luk SDS Poliakrilamid Ayırma Jeli İçeriği	40
Tablo 3.10. 10X Transfer Tamponu İçeriği.....	40
Tablo 3.11. İn Vivo Deney Grupları.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Birleşik Devletler’de 2022 Yılında Görülen On Ana Kanser Türünün ve Ölüm Oranlarının Cinsiyete Göre Dağılımları	4
Şekil 1.2. Türkiye’de Erkeklerde (A), Kadınlarda (B) ve Toplumda (C) Cinsiyet Ayrısız ve Yaşa Bağımsız Görülen Kanser Oranları	5
Şekil 2.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri Karşı Histon Deasetilazları Hedefleyen Terapötik Strateji ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri Sınıflandırması	21
Şekil 2.2. Kanser Mekanizmasında Histon Deasetilazların Görevleri	23
Şekil 2.3. HDACi ve Kanser Tedavisi	24
Şekil 2.4. Apoptoz Yolağı.....	26
Şekil 2.5. Capecitabine’nin Kimyasal Yapısı	29
Şekil 2.6. Capecitabine’nin Etki Mekanizması	30
Şekil 2.7. Mocetinostat Kimyasal Yapısı.....	32
Şekil 2.8. 4T1 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü	33
Şekil 3.1. Thoma Lamı ve Sayım Alanı.....	41
Şekil 3.2. Western Blot Yönteminde Kullanılan Protein Marker	45
Şekil 3.3. İn Vivo Deney Süreci	48
Şekil 3.4. BALB/c Dişi Farelerde Meme Kanseri Oluşturma.....	48
Şekil 3.5. Deney Hayvanlarının Hassas Terazide Tartılması.....	49
Şekil 4.1. Mocetinostat’ın Farklı Dozlarının (1,675 µM-25µM) 4T1 Hücre Hattında 48 Saatteki Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	50
Şekil 4.2. Capecitabine’nin Farklı Dozlarının (800- 2000 µM) 4T1 Hücre Hattında 48 Saatteki Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	51
Şekil 4.3. Capecitabine ve Mocetinostat’ın Farklı Dozlarının 4T1 Hücre Hattında 48 Saatteki Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	52
Şekil 4.4. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerinde Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat İlaç Uygulanması İle Hücrelerin Zaman Bağlı Olarak Değişen Morfoloji Görüntüleri	54
Şekil 4.5. Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat Uygulanması Sonucu 4T1 Meme Kanser Hücrelerinin Zamana Bağlı Hücre Sayısı (A) ve Canlı Hücre Sayısı Grafiği(B).....	55

Şekil 4.6. Kontrol, Capecitabine, Mocetinostat ve Capecitabine+Mocetinostat Uygulanan Hücrelerden Elde Edilen DNA Jel Görüntüsü	56
Şekil 4.7. Capecitabine ve Mocetinostatın 4T1 Meme Kanseri Hücre Hatlarının Metastaz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	57
Şekil 4.8. Capecitabine Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat Uygulamasının Hücre Göçü Üzerine Etkisi.....	58
Şekil 4.9. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat Uygulamasıyla Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-7 Protein Seviyeleri	59
Şekil 4.10. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat Uygulamasıyla Kaspaz-9, PTEN, P53 ve HDACIII Protein Seviyeleri.....	60
Şekil 4.11. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat Uygulamasıyla PI3K, AKT, HDACI ve C-myc Protein Seviyeleri	61
Şekil 4.12. NK (Negatif kontrol), PK (Pozitif kontrol), Mocetinostat, Capecitabine, Mocetinostat+Capecitabine Uygulanan Gruplardaki Hayvanların Vücut Ağırlıkları Değişimi	61
Şekil 4.13. PK (Pozitif Kontrol), Mocetinostat, Capecitabine, Mocetinostat+Capecitabine Uygulanan Gruplardaki Tümörlü Meme Dokusunun Gözlemlenmesi.....	62
Şekil 4.14. PK (Pozitif Kontrol), Mocetinostat, Capecitabine, Mocetinostat+Capecitabine Uygulanan Gruplardaki Oluşan Tümör Ağırlıkları Değişim Grafiği.....	62
Şekil 4.15. 4T1 Meme Kanseri Hücreleri ile Oluşturulan Kitlenin Işık Mikroskop Görüntüsü.....	63
Şekil 4.16. Akciğer Dokusunun Makroskopik Görüntüsü.....	64
Şekil 4.17. Akciğer Dokusunun Işık Mikroskop Görüntüsü.....	64
Şekil 4.18. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Kombine Uygulanmasının Apoptotik Proteinler Üzerindeki Etkisi.....	73
Şekil 4.19. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Kombine Uygulanmasının In vivo ve In vitro Etkisi.....	74

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1

APS: Amonyum Persülfat

ATP: Adenozin Tri Fosfat

Bak: Bcl-2 Antagonist/öldürücü 1

Bax: Bcl-2 ilişkili X Proteini

Bcl-2: B Hücreli Lenfoma-2

BH: Bcl-2 Homoloji Domaini

Bid: BH-3 ilişkili Domain Ölüm Agonisti

Bim: Bcl-2 ile Etkileşen Protein

Bok: Bcl-2 ilişkili Ovaryan Öldürücü

CAD: Kaspaz ile Aktive Olan DNaz

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

DISC: Ölüm İndükleyen Sinyal Kompleksi

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

Endo G: Endonükleaz G

FBS: Fetal Dana Serum

HDAC: Histon Deasetilaz

HDACi: Histon Deasetilaz İnhibitörü

HRP: Horseradish Peroksidaz

ml: Mililitre

mM: Milimolar

MOM: Mitokondri Dış Membranı

MOMP: Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonu

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PVDF: Poliviniliden Diflorid

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TP53: Tümör Protein p53

TRAIL: Tümör Nekrozis

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

%: Yüzde

°C: Santigrat Derece

DMSO: Dimetil Sülfoksit

ECL: Güçlendirilmiş Kemilüminesans

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2

IC50: Yarı-Maksimal İnhibitör Konsantrasyon

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. Tüm meme kanserlerinin %10-20'sini temsil eden triple negatif breast cancer (TNBC), östrojen steroid reseptörü (ER), progesteron steroid reseptörü (PR) ve tirozin kinaz insan epidermal büyüme faktörünün (HER2) ekspresyon eksikliği ile karakterizedir. TNBC'nin tedavisi için şu anda etkili bir hedefe yönelik tedavi mevcut değildir.

Kanser, artık sadece proliferasyon sorunundan ziyade apoptoz eksikliği olarak kabul edildiğinden, yeni antikanser ilaçları apoptozu indükleme veya geri yükleme yetenekleri ile değerlendirilmektedir. Proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengenin sağlanması için; kemoterapi, radyoterapi ve daha yakın zamanda hormonal tedaviler kullanılmaktadır.

Kombine tedavi, ilaçların farklı etki mekanizmalarının belirlenmesi gibi birden çok hedefe ulaşma konularında avantaj sağlamaktadır. Terapötik etkinliği artırmak ve tümör direncini atlatmak için ilaç kombinasyonlarının kullanımı, kanser tedavisinin iyi bilinen ilkesidir. Kanser biyolojisinin anlaşılması ve çözüm üretilebilmesi açısından in vivo çalışmalar, klinik öncesi araştırmalarda önemli yer tutmaktadır.

Mocetinostat (MGCD0103), özellikle Sınıf I (izoform 1, 2 ve 3) ve Sınıf IV (izoform 11) HDAC'leri inhibe eden HDAC inhibitörüdür. Kesin mekanizması henüz tanımlanmamış olmasına rağmen, apoptoz, farklılaşma, hücre siklusu tutulumu, DNA onarımının inhibisyonu, oksidatif stres ve otofaji üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Tek başına ve kombinasyon halinde kullanımı hematolojik malignitelerin ve ilerlemiş solid tümörlerin tedavisi için klinik olarak değerlendirilmektedir.

Capecitabine, DNA /RNA sentez inhibitörü olan tümör hücrelerinde timidin fosforilaz (TP) enzimi tarafından dönüştürülen ve antitümör etkileri olan 5 Fluorourasil (5-FU) ilaçlarının bir öncüsüdür 5-FU'nun bir ön ilacı olarak geliştirilmiştir. Capecitabine tek ajan olarak aktiftir, aynı zamanda diğer sitotoksik ajanlarla kombine edilebilir (taksan, sisplatin gibi).

Yaptığımız bu çalışmada; 4T1 meme kanseri hücre hattı ve 4T1 meme kanseri ile indüklenmiş meme kanseri modelinde, Capecitabine ve Mocetinostat'ın tekli ve kombine kullanımının, 4T1 hücreleri üzerinde sitotoksik, antiproliferatif etkisini ve apoptotik süreçte, yer alan Bcl-2, HDACI, AKT, PI3K, C-myc, HDACIII, Bax, Kaspaz-3, PTEN, Kaspaz-7, Kaspaz-9, p53 protein seviyelerinin ilaç uygulamalarıyla ilişkisini araştırmayı amaçladık.

BİRİNCİ BÖLÜM

KANSER

Kanser, günümüzde en çok karşılaşılan ve modern yaşamı olumsuz yönde etkileyen insan patolojilerinin en yıkıcı sınıflarından birisidir. Kanser, ilk zamanlarda vücut hastalığı olarak tanımlansa da yirminci yy. başlarında bir doku hastalığı olarak adlandırılmış ve günümüzde ise hücrelerin düzensiz çoğalması ile meydana geldiği gösterilmiştir (Smith vd., 2019: 188). Aslında kanser, genetik veya epigenetik değişimlerin genler üzerindeki etkisiyle kontrolsüz hücre proliferasyonunun komşu dokulara invazyon ve metastaz yapmasıyla karakterize edilen kompleks bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (American Cancer Society, 2021:3). Çoğu durumda, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin deaktivasyonu, kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesine ve apoptotik mekanizmaların inaktivasyonuna yol açmaktadır (Sarkar, 2013: 289).

Kanser oluşum mekanizması ve tedavisi tam olarak aydınlatılmamış olması birçok ülkede araştırma konusu olmaktadır (Elmas, 2011: 4). Buna rağmen, kanser hücresinin doğal oluşum sürecinde biriken mutasyonlarla birlikte heterojenik yapı göstermesi, hastaların tedaviye direnç göstermesi, hastalığın tekrar etmesi ve yaşam süresinin kısa olması gibi etkenler kanser tedavisindeki ilerleyişi olumsuz yönde etkilemektedir (Douglas, 2022: 31).

Kanser, vücuttaki farklı hücre türlerinin herhangi birinin anormal çoğalmasından kaynaklandığı için kanser hücrelerinin davranışları ve tedaviye yanıtları büyük ölçüde değişebildiğinden yüzden fazla farklı kanser türü mevcuttur. DNA da meydana gelen mutasyonlar ile kanser hücreleri, intrinsik (sinyal yolları, mutasyonlar, transkripsiyon faktörleri gibi) veya ekstrinsik (mikroçevre, immun yanıt) faktörlerine karşı yanıtlarını değiştirerek kendi hayatta kalma sistemlerini oluşturmaktadır (Dick, 2008: 4793).

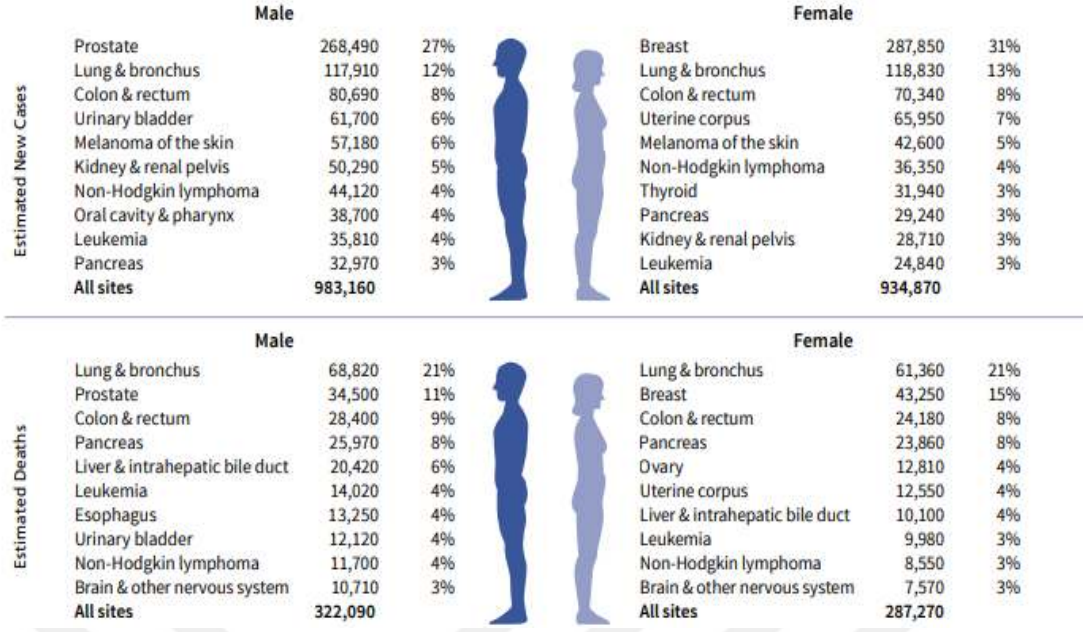
Kanser patolojisinde en önemli konu iyi huylu (benign) ve kötü huylu tümörün (malign) ayırt edilmesidir. Tümör, iyi huylu veya kötü huylu olabilen hücrelerin anormal çoğalmasıdır. Benign olarak tanımlanan tümörler, orijinal konumuyla sınırlı kalarak ne onu çevreleyen normal dokuya ne de uzak vücut bölgelerindeki dokulara yayılmaktadır. Bununla birlikte kötü huylu bir tümör, hem çevredeki normal dokuyu istila edebilir hem de dolaşım veya lenfatik sistemler (metastaz) yoluyla tüm vücuda yayılabilmektedir (Ameli vd., 2021: 2605).

Kanserler, köken aldığı hücreye göre karsinom, sarkoma ve lösemi olarak üç ana başlık altında sınıflandırılmaktadır. Karsinom, deride veya iç epitel hücrelerde gelişmekte ve kanserin en yaygın formu olarak bilinmektedir (%80-%90). Sarkoma ise; insanlarda görülme sıklığı az

olmasına rağmen kemik, kıkırdak, yağ, kas veya kan damarları gibi bağ veya destekleyici dokularda başlamaktadır. Lösemi ise insanlarda görülme sıklığı %8 olmakla birlikte kan hücrelerini yapan dokulardan köken almaktadır (Juliussen, 2016: 90).

Kanser, ölüm nedenlerinde ikinci sırayı aldığı için dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. 2020 yılında yaşanan 2019 koronavirüs hastalığı (COVID-19) pandemisinden, kanser tanısı ve tedavisi olumsuz etkilenmiştir. COVID-19'a maruz kalma korkusu nedeniyle sağlık hizmeti ortamlarının kapanması ve hasta bakımına erişimin azalması, teşhis ve tedavide gecikmelere neden olmuştur. Yaşanan pandemi nedeniyle kanser insidansında kısa süreli bir düşüş yaşanmış, ardından ileri evre hastalıkta bir artış gözlemlendiği için 2019 verileri verilmekte, 2022 verileri ise tahmin edilmektedir (Yabroff, 2021: 907). 2022 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.918.030 yeni kanser vakası ve 609.360 kanser ölümünün meydana geleceği tahmin edilmektedir. Erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektal kanserlerinden; kadınlarda ise akciğer, meme ve kolorektal kanserlerinden kaynaklı en fazla ölüm gerçekleşmektedir (Şekil 1.1.). Her ne kadar herkes kansere yakalanma riskiyle karşı karşıya olsa da artan yaş, tütün ve alkol kullanımı, sağlıksız beslenme programı gibi etkenler kanser oluşumunu tetiklemektedir.

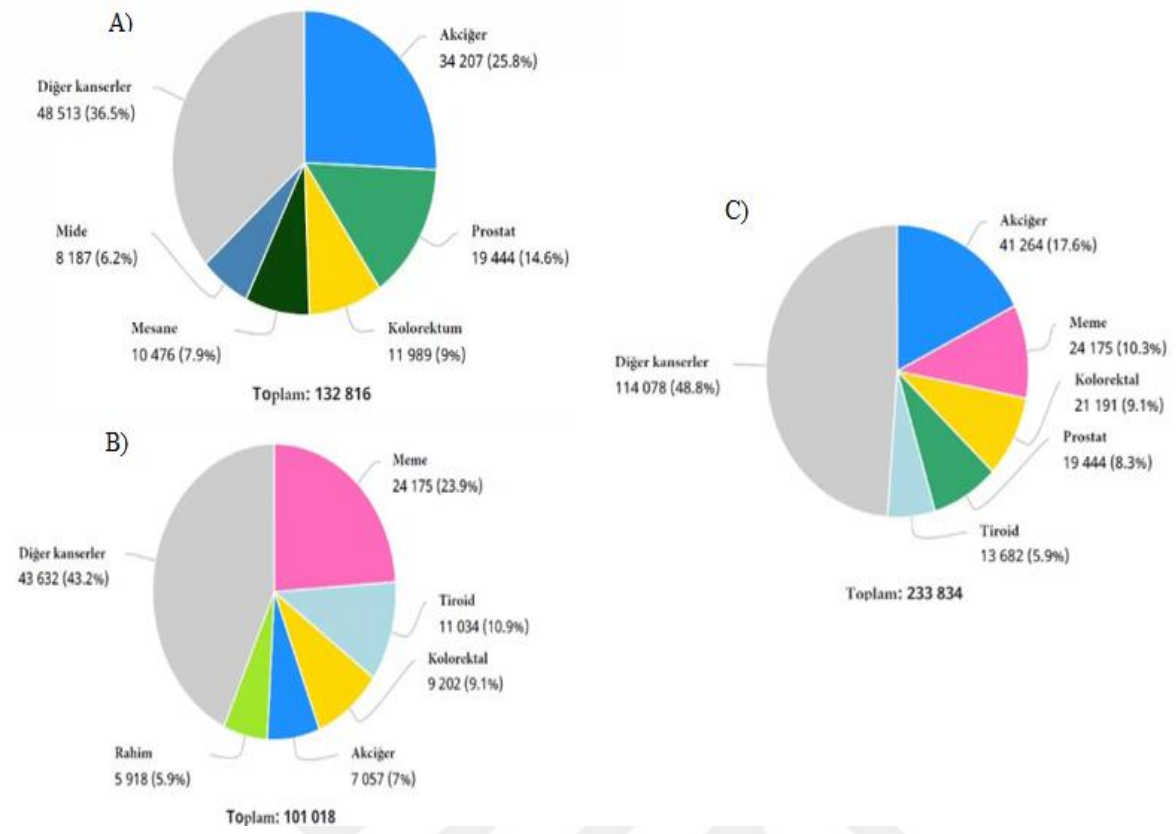
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde erkeklerde 983,160 olguda ilk iki sırayı %27'lik oranla prostat, %12'lik oranla akciğer kanseri almakta iken kadınlarda ise 934,870 olguda ilk iki sırada %30'luk oran ile meme, %12'lik oran ile akciğer kanseri yer almaktadır. Kansere bağlı ölümlerde ise en çok ölüm oranı erkeklerde ve kadınlarda akciğer kanserinde görülmektedir.



Şekil 1.1. Birleşik Devletler’de 2022 Yılında Görülen On Ana Kanser Türünün ve Ölüm Oranlarının Cinsiyete Göre Dağılımları

Kaynak: (Cancer Facts and Figures Yabroff, 2021)

Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) verilerine göre Türkiye’de 2020 yılında 233 bin kişiye kanser tanısı konduğunu, bunun da 132 bininin erkek (%56,6), 101 bininin kadın (%43,4) olduğu açıklanmıştır. 2020 yılında Türkiye nüfusu 84.339.067 iken, yıllık yeni kanser vaka sayısı 233.834 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 126.335 olarak bildirilmiştir (Globacan 2020). Ayrıca, Türkiye’de 2020 yılında en sık görülen ilk 5 kanser grubunu; akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal (kalın bağırsak) kanser, prostat kanseri ve tiroid kanseri oluşturmaktadır (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Türkiye’de Erkeklerde (A), Kadınlarda (B) ve Toplumda (C) Cinsiyet Ayrımsız ve Yaşa Bağımsız Görülen Kansere Oranları

Kaynak: (WHO-World Health Organization-GLOBOCAN (IARC), 2022)

İKİNCİ BÖLÜM

MEME KANSERİ

Meme kanseri, melanom dışı cilt kanserinden sonra kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. Kadınların yaklaşık %12'sini etkilemektedir. Meme kanseri, tarama yoluyla birçok kadında erken dönemde saptanabilmesine rağmen, kadınlarda kanser ölümlerinde ikinci sırada (Shiovitz, 2015: 1292), dünya çapında ise birinci sırada yer almaktadır (DeSantis, 2015: 1496).

Meme kanseri, memede bulunan epitel hücre kökenli olup, süt bezlerinde ya da süt kanallarında bulunan hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasından kaynaklanmaktadır. Normal meme dokusu gelişiminde birçok parakrin ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF), progesteron, epidermal büyüme faktörü (EGF)/transforme edici büyüme faktörü α (TGF- α) östrojen, androjen, tiroid gibi otokrin hormonlar rol almaktadır. Memenin gelişiminde ve büyümesinde etkin olan bu hormonlar, bazı genlerin ekspresyon seviyelerini artırırken, bazılarını azaltarak hem normal meme dokusunun gelişimine hem de meme dokusunda bulunan malign hücrelerin gelişimine katkı sağlamaktadır. Ayrıca sinyal iletim yollarında meydana gelen bozukluklar, kanser gelişimine zemin hazırlamaktadır (Eroğlu, 2011: 5). Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinde genetik ve çevresel faktörlerin oldukça etkin olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmaktadır.

1. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanseri, östrojen reseptörü pozitif (ER+), progesteron reseptörü pozitif (PR+), HER2 pozitif ve üçlü (triple) negatif meme (TNBC) olmak üzere gen ekspresyon paternlerine dayalı olarak moleküler alt tiplere ayrılmaktadır (Perou, 2000: 749).

ER+ meme kanser tipi, tüm tümörlerin %60-70'ini oluşturan en yaygın meme kanseri türüdür. Bu tip meme kanserinin hücreleri, büyümek için östrojen hormonunu kullanmalarına izin veren reseptörlere sahiptir. Anti-östrojen hormonu (endokrin) tedavisi ile tedavi edilmesi kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir (Brufsky, 2018: 528).

PR+ meme kanser tipi, progesterona duyarlıdır ve hücreler, büyümek için bu hormonu kullanmalarına izin veren reseptörlere sahiptir. Endokrin tedavisi ile tedavi edilmesi kanser hücrelerinin büyümesini engellemektedir (Rojas, 2016: 652).

HER2+ meme kanser tipi, HER2 adı verilen büyümeye teşvik eden proteini çok fazla üretir. HER2 ile zenginleştirilmiş tümörler, tüm meme kanserlerinin %12-20'sini oluşturur (Johnson 2021: 13). ER+ ve PR+ tipi meme kanseri tipi gibi HER2+ meme kanser tipi hormon tedavisine cevap vermektedir.

1.1. Luminal Meme Kanseri

Luminal meme kanserleri, batı toplumlarındaki tüm meme kanseri vakalarının neredeyse %70'ini oluşturan ER-pozitif tümörlerdir [Howlader,2014:106 N). Luminal benzeri kanserler, özel bir alt tipi olmayan invazif meme kanseri olarak sunulmakta, ancak nadiren invaziv lobüler, tübüler, invaziv kribriform, müsinöz ve invaziv mikropapiller karsinomlara farklılaşabilmektedirler (Weigelt, 2008: 142). Luminal benzeri tümörleri farklı klinik sonuçlara sahip olmalarından dolayı luminal A ve B alt tiplerine ayrılmaktadır.

Luminal A tümörlerinin dağılımı %71 oranında olmakla birlikte östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) varlığı ve HER2'nin yokluğu ile karakterize edilmektedir. Diğer tümörlere göre iyi prognoza sahiptir ve daha az agresif özellik göstermektedir.

Luminal B tümörleri daha yüksek derecelidir ve daha kötü prognoza sahiptir. ER pozitifler ve PR negatif ve/veya HER2 pozitif olabilirler. Ek olarak, proliferasyonla ilişkili genlerin (Ki67) yüksek ekspresyonuna sahiptir (Ades, 2014: 2796).

1.2. HER2 ile Zenginleştirilmiş Meme Kanseri

HER2 ile zenginleştirilmiş grup, meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturmaktadır. ER ve PR yokluğunda HER2'nin yüksek ifadesi ile karakterize edilmektedir. HER2 ile zenginleştirilmiş kanserler, lümen kanserlerinden daha hızlı büyür ve alt tiplerin en kötü prognozuna sahiptir (Desai, 2018: 75).

1.3. Claudin-Düşük Meme Kanseri

Claudin-düşük (CL) meme kanserleri, çoğunlukla ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olan kötü prognozlu tümörlerdir. CL tümörleri, tüm invaziv meme kanserlerinin %7-14'ünü oluşturur. Claudin-düşük tümörler ve diğer kötü prognozlu alt tipler (Luminal B, HER2 ile zenginleştirilmiş ve Bazal benzeri) arasında hayatta kalma oranlarında hiçbir fark gözlenmemektedir. CL alt tipi, claudin 3, 4 ve 7, okludin ve E-cadherin gibi hücre-hücre adezyonunda yer alan genlerin düşük ekspresyonu ile karakterize edilmektedir (Fougner, 2020: 2).

1.4. Vekil Belirteçleri ile Sınıflandırılması

Belirli tedavilerden fayda sağlayan hastalar için kullanılan belirteçlerdir. Moleküler tahlillerin yüksek maliyetli olması nedeniyle, vekil belirteçler tercih edilmektedir. Patolojik morfoloji için ER, PR ve HER2'nin bir kombinasyonu tümörleri intrinsik alt tiplere sınıflandırmak için kullanılırken (Parise, 2009: 593), Ki-67 ve PR 'nin yarı niceliksel değerlendirmesi, Luminal alt tipinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Carey, 2006: 2493). TNBC ve Bazal benzeri meme kanserini tanımlamak için sitokeratin 5/6 ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün kullanılmaktadır (O'Brien, 2010: 6101) (Tablo 2.1.).

1.4.1. Ki 67

Ki-67, 359 kDa ağırlığında histon olmayan nükleer DNA'ya bağlanan bir proteindir. Tümör derecelendirmesi için yaygın olarak kullanılan bir hücre çoğalma belirteçidir (M. Sobecki). İnsan Ki-67 proteininin ekspresyonu, hücre proliferasyonu ile sıkı bir şekilde ilişkilidir. Ki-67, esas olarak G1' fazında perinükleolar bölgede lokalizedir. Yapılan birçok çalışmada Ki-67'nin hücre döngüsünün G1, S ve G2 fazlarında varlığını gösterdiği ve G0 fazında ekspresyonu gözlenmemektedir. Klinik durumlarda yüksek Ki-67 indeksi genellikle kötü prognozu göstermektedir Ki-67 antijeni tüm çoğalan hücrelerde (normal ve tümör hücreleri) mevcut olduğundan, Ki-67 proteinine karşı antikorlar, farklı neoplazma türlerinde teşhis için oldukça sık kullanılmaya başlandı (Perou, 1999: 9214).

Tablo 2.1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tiplemesi **Kaynak:** (Nascimento ve Otoni, 2014)

Moleküler alt tipi	Luminal A	Luminal B		HER2 (+)	TNBC
		HER2 (-)	HER2(+)		
Biyomarker	ER (+)	ER (+)	ER (+)	ER (-)	ER (-)
	PR (+)	PR (-)	PR (-)	PR (-)	PR (-)
	HER2 (-)	HER2 (-)	HER2 (-)	HER2 (+)	HER2 (-)
	Ki67 düşük	Ki67 yüksek	Ki67 düşük/yüksek	Ki67 yüksek	Ki67 yüksek
Vakalarda görülme sıklığı (%)	40-50		20-30	15-20	10-20
Histolojik derecesi	Grade I		Grade II	Grade III	Grade III
Prognoz	İyi		Orta	Zayıf	Zayıf
Tedaviye yanıtı	Endokrin	Endokrin Kemoterapi	Endokrin Kemoterapi Hedefe yönelik Tedavi	Kemoterapi Hedefe yönelik Tedavi	Kemoterapi Parp İnhibitörleri

2. Meme Kanserinin Evrelemesi

Meme kanserli hastaların olası prognozunu değerlendirmek için AJCC derecelendirmesi kullanılmaktadır. Bu sistem, immünohistokimya biyobelirteçlerini ve hastalığın anatomik ilerlemesini içermektedir. 2018 yılında Amerikan Kanser Ortak Komisyonu'nun (AJCC) Evreleme kılavuzunun 8. baskısına kadar, klinik ve patolojik değerlendirmelere dayalı primer tümör (T) boyutu, nodal (N) tutulumu ve metastaz (M) değerleri ile anatomik bir evreleme yöntemi kullanılmıştır. 2018 yılında AJCC Evreleme kılavuzunun 8. Baskısında meme kanseri prognostik evreleme sistemine, anatomik özelliklere ek olarak biyolojik faktörler (ER, PR, HER2, Ki67 derece ve multigen) de dahil edilmiştir. Evreleme sisteminde yapılan en son

güncelleme ile anatomik evreleme, tümör derecesi, hormon reseptörleri, onkogen ekspresyonu ve multigen testi kullanılarak prognostik evreleme ile bütünleşmiştir (Hortobagyi, 2017). Prognostik evreyi meme kanseri evreleme sistemine dahil etmek, doktorların hasta prognozunu bireyselleştirmesine izin vererek daha optimal bir prognoz tahminine yol açmaktadır. Evre 0- Karsinomu in situ gösterirken, Evre I- lokalize kanseri, Evre II- lokal olarak ilerlemiş kanseri, erken evreler, Evre III- lokal olarak ilerlemiş kanser, Evre IV- metastatik kanser, geç evreleri temsil etmektedir (Rosen, 2022).

3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Meme kanseri her yıl dünya çapında 2,3 milyon yeni vaka teşhis edilmekte ve kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerinden biridir (Ferlay J, 2020). Meme kanserindeki risk faktörü profillerindeki değişim, son otuz yılda hastalığın insidansını ve hastalığa bağlı ölüm oranları arttırmaktadır. Meme kanserli hastaların, hastalık evresine, hayatta kalma özelliğine ve moleküler alt tipine bağlı olarak yaklaşık %80'i 50 yaş üstü bireyler oluşturmaktadır (Sung 2021: 212). Meme kanseri, 2020 yılında 684.996 ölümden sorumludur. İnsidans oranları gelişmiş bölgelerde en yüksek olmasına rağmen, Asya ve Afrika'daki ülkelerde 2020 yılında toplam ölümlerin %63'ünü oluşturmaktadır. 1987 yılları arasında meme kanseri insidansı her yıl %3,7 seviyesine artarken, postmenopozal dönemde hormon replasman tedavisinin rutin uygulamadan çıkarılması ve sağlıklı yaşam şartlarının artması ile 2020 yılında meme kanseri ölüm-insidans oranı (MIR), 5 yıllık sağkalım oranlarının 0.30 seviyesine geriletmiştir. Meme kanserinin klinik yaygınlığı göz önüne alındığında, gelişmiş sağlık hizmeti verilen yerlerde (Hong-Kong, Singapur, Türkiye) 5 yıllık sağkalım lokalize kanser için %89,6 ve bölgesel kanser için %75,4 'lük kısmı oluşturmaktadır. Daha az gelişmiş ülkelere (Kosta Rika, Hindistan, Filipinler, Suudi Arabistan, Tayland) lokalize %76,3 ve bölgesel meme kanseri %47,4 oranların da olmakta ve sağkalım oranları gelişmiş ülkelere göre daha düşük seyretmektedir (Łukasiewicz, 2021: 4287).

Meme kanseri etiyolojisi birçok faktöre bağlı olarak farklılık göstermektedir. Genetik faktörler gibi bazı faktörler meme kanseri riski için değiştirilemeyen faktörler sınıfında yer alırken beslenme, fiziksel aktivite ve davranışları içine alan çevresel ve davranışsal faktörler değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer almaktadır. Meme kanseri riskinin ana belirleyicilerini yaş, coğrafi yerleşim alanı, ilk doğum yaşı, yumurtalık aktivitesinin belirli göstergeleri, iyi huylu meme hastalığı öyküsü ve ailede meme kanseri öyküsü olmak üzere sıralayabiliriz. Düşük seviyelerde androjen metabolitlerinin atılımının, meme kanseri riskini arttırmasıyla ilişkilendirebiliriz (MacMahon, 1973: 25).

4. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri tedavisi için birçok epidemiyolojik ve klinik araştırmalara rağmen, meme kanseri insidansı hala artmaya devam etmektedir. Meme kanseri insidansını azaltmak hem değiştirilebilir risk faktörlerine maruz kalmayı azaltan nüfus temelli bir yaklaşım ile hem de yüksek risk altındaki kadınların belirlenmesi ve onların risk azaltıcı ilaçlarla muamele edilmesiyle mümkün olabileceği düşünülmektedir. Hem genetik hem de genetik olmayan risk faktörleri meme kanseri gelişimini etkilemektedir. Kansere yatkınlık genleri olarak bilinen BRCA1 veya BRCA2 ve kontrol noktası kinaz 2 (CHEK2) genlerinde meydana gelen patojenik mutasyonlar ve meme kanseri ile ilişkili tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) genetik faktörleri içermektedir (Britt, 2020:418). Genetik olmayan risk faktörleri arasında ise artan yaş, kişisel meme patolojileri öyküsü (atipik hiperplazi ve lobüler karsinoma in situ gibi), yüksek mamografik yoğunluk (MD), terapötik göğüs radyasyonuna maruz kalma (örneğin, Hodgkin hastalığının tedavisi için), yüksek vücut kitle indeksi (BMI), ekzojen kadın hormon kullanımı, alkol kullanımı, yetersiz beslenme, fiziksel aktivite ve üreme faktörleri (erken menarş, düşük doğum, daha kısa emzirme süreleri ve geç menopoz) yer almaktadır (Bucholc, 2001: 1462).

4.1. Genetik Risk Faktörleri

1866 yılında bazı ailelerde meme kanseri insidansı kaydedilmiş; fakat 1994-1995 yılında en yaygın meme kanseri duyarlılık geni olan BRCA1 ve BRCA2 geni Mary-Claire King tarafından keşfedilmiştir (Hurst, 2014: 4149). BRCA-1 ve BRCA2 genleri homolog rekombinasyon yoluyla DNA çift zincir kırıklarının onarımında rol oynamaktadır. Bu genlerdeki kalıtsal mutasyonlar, tüm meme kanserinin yaklaşık %2,5'ini oluşturmaktadır (Ligtenberg, 1999: 1476). Yüksek ve orta penetrasyonlu meme kanseri yatkınlık genleri arasında kaderin 1 (E-kaderini kodlayan CDH1), PTEN, serin/treonin protein kinaz 11 (STK11; LKB1 olarak da bilinir), TP53, CHEK2, ataksi telenjiyektazi mutasyona uğramış (ATM), nibrin (NBN) ve BRCA2'nin ortağı ve lokalizörü (PALB2) bulunmakta fakat bu genlerdeki mutasyonlar meme kanserinde nadir olarak gözlenmektedir (Easton, 2015: 2252).

Düşük penetrasyonlu SNP'ler de meme kanseri riskini etkilemektedir. Meme kanseri ile ilişkili SNP'lerden etkilenen gerçek genleri tanımlamak için kromatin organizasyonunu değerlendirmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir (French, 2013: 492).

4.2. Genetik Olmayan Risk Faktörleri

Cinsiyet: Kadınlarda, artan hormonal uyarım nedeniyle, meme kanseri riski artmakta iken düşük östrojen seviyeleri sergileyen erkeklerde ise meme kanseri riski görülme sıklığı %1 den daha azdır. Endojen seks hormonlarının fizyolojik seviyelerindeki değişimler, premenopozal ve postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskinin daha yüksek olmasına neden olmaktadır (Zhang X., 2013: 890).

Menarş ve menopoz yaşı: Yaş ile kanser olma riski arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Yaşa bağlı olarak meme kanseri riski ve insidansı artış göstermektedir. Bir kadının menarşta olduğu her yıl için meme kanseri riski %5 artış göstermektedir. Menarş yaşı ile kanser riski arasında ters orantı bulunmaktadır. Menarş yaşını, gebelikte sigara dumanına maruz kalma, diyet, psikolojik durum, annede kilo alımı gibi etkenler düşürmektedir ve menarş kanser riskini artırmaktadır. Menopozda ileri yaş, ortalama doğal menopoz yaşı ile karşılaştırıldığında, gecikme başına yıllık %2,9'luk meme kanseri riskini artırmaktadır (Jarrett, 1198: 2011).

Çocuk doğurma: Kadınların az çocuk sahibi olması meme kanser riskini artırmaktadır. 35 yaşından önce çocuk doğurmak, meme kanserine karşı daha uzun süreli koruma sağlamaktadır. 35 yaşından sonra çocuk doğurmaya başlayan kadınlar için meme kanseri riski, hiç doğum yapmamış kadınlara göre daha yüksektir (Albrektsen, 2005: 167).

Mamografik yoğunluk (MD): Birçok çalışmada, MD'nin meme kanseri için bağımsız bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Düşük MD'li (LMD) kadınların meme kanseri riski olasılığı düşük iken, yüksek MD (HMD) olan kadınlarda 1.8 ila 6 arasında değişen bir meme kanseri risk oranı olduğu gösterilmiştir. Hamile veya emzirme döneminde olan ve hormonal replasman tedavisi alan genç yaştaki BMI (vücut kitle indeksi)'si daha düşük olan kadınlarda meme yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlenmektedir (Kim, 2020: 4693).

İrk: Beyaz ırktan olan kadınlarda, meme kanseri insidansı yüksek orandadır. Siyah ırktan olan kadınlar arasında, meme kanserine bağlı ölüm oranı önemli ölçüde daha yüksektir ve siyah kadınların malignite için en düşük sağkalım oranlarına sahip olduğu düşünülmektedir (Hill, 2019: 6).

Ailesel meme kanseri riski: Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık dörtte biri aile öyküsü ile ilgilidir. Annesi veya kız kardeşi meme kanseri olan kadınlar bu hastalığa yatkındır. 2017 yılında Birleşik Krallık'ta 113.000'den fazla kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, birinci dereceden akrabasında meme kanseri olan kadınların herhangi bir akrabası olmayan kadınlara

göre hastalığa yakalanma riskinin 1,75 kat daha yüksek olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, meme kanseri iki veya daha fazla birinci derece akrabası olan kadınlar meme kanser riskini 2,5 kat veya daha yüksek oranda taşımaktadır (Sun, 2017: 1390). Meme kanserine kalıtsal yatkınlık, kısmen BRCA1 ve BRCA2 gibi meme kanseri ile ilgili genlerin mutasyonlarına da bağlıdır (Çelik 2015: 3080).

Fazla kilo ve obezite: Yüksek vücut kitle endeksi (BMI), premenopozal kadınlarda meme kanserine karşı koruyucu olsa da postmenopozal kadınlarda risk oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada, en yüksek vücut ağırlığına sahip postmenopozal kadınların, en düşük vücut ağırlığına sahip olanlara kıyasla ER⁺ meme kanser riskini %82 oranında artırmıştır (Suzuki, 2019:699). Artmış inflamasyon ve fibroz ile karakterize olan işlevsiz yağ dokusu, obezite ile ilişkili kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Yağ dokusunun tümör hücreleri üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca, yağ dokusundan sitokinlerin ve yağ asitlerinin salgılanması tümörün ilerlemesini de teşvik etmektedir (Gallagher, 2020: 629).

Yaşam tarzı ve beslenme: Alkol tüketimi, kandaki östrojenle ilgili hormonların seviyesini yükseltmekte ve östrojen reseptör yollarını tetiklemektedir. Aşırı alkol tüketimi ve çok fazla yağ alımı gibi modern yaşam tarzları meme kanseri riskini artırabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, alkol alımının meme kanseri riskini %32 artırabildiğini göstermiştir (Jung, 2016: 919). Ayrıca çalışmalar, özellikle erken yaşta sigara içmenin meme kanseri oluşumunda daha yüksek risk taşıdığını göstermektedir (Knight, 2017: 917).

Radyasyon: 30 yaşından önce radyasyon tedavisi alan hastalarda, meme kanseri riski daha yüksektir. Ayrıca radyoterapi alan hastalarda ailede meme kanseri öyküsü olması da kanser oluşum riskini artırmaktadır (Ng, 2014: 2).

Fiziksel hareketsizlik: Dünya Kanser Araştırma Fonu, fiziksel aktivitenin meme kanserine karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (World Cancer Research Fund, 2018). Fiziksel aktivite yapan kadınların meme kanseri olma riski, yapmayan kadınlara göre %20 daha azdır. Fiziksel aktivitenin, östrojen metabolizmasına, insülin duyarlılığına, kronik düşük seviyeli inflamasyona, oksidatif strese ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde etkileri bulunmaktadır (Neilson, 2017: 330).

5. Meme Kanserinde Moleküler Prognostik Biyobelirteçler

Yeni tanı konmuş meme kanserli hastalarda; lenf nodu metastazlarının sayısı, tümör boyutu ve tümör derecesi bağımsız prognostik bilgi sağlamasına rağmen, bu faktörlerin tek başına hasta değerlendirme için yetersiz olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Duffy, 2016: 195). Geleneksel prognostik belirteçlerinin yeterli olmamasından dolayı, tedaviye yanıtı tahmin edebilen moleküler biyobelirteçlerin geliştirilmesine ve doğrulanmasına yönelik önemli araştırmalar yapılmıştır. Bu nedenle son on yılda meme kanseri için birkaç yeni prognostik test önerilmiştir (Senkus, 2015: 298).

5.1. Oncotype DX Testi

Oncotype DX'in meme kanserinde 2 ana kullanımı vardır; bunlar, hastalığın tekrarlama olasılığını tahmin etmek ve adjuvan kemoterapiden fayda görmesi muhtemel olanları belirlemektir (Syed, 2020: 621).

5.2. MammaPrint Testi

Oncotype DX gibi, hastalığın tekrarlama olasılığını tahmin etmek ve meme kanserli hastalarda tedavi kararını vermeye rehberlik etmek için yapılan testtir. Bu testte, kanserin tüm temel özelliklerinden sorumlu olan 70 genin ekspresyonunu ölçmek için mikrodizi kullanır. Bu genlerin ekspresyon seviyelerine göre meme kanseri hastaları, hastalığın tekrarlama riski düşük veya yüksek olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Goncalves, 2013: 175).

5.3. uPA ve PAI-1 Testi

uPA ve PAI-1 testi ise diğer testlere oranla daha uygun bir testtir. Bu test, taze veya dondurulmuş meme kanseri dokularında ELISA ile 2 proteinin ölçülmesini içerir. Bu 2 proteinin yüksek seviyelerine sahip hastalar, düşük seviyelere sahip olanlardan önemli ölçüde daha kötü bir sonuca sahiptir (Look, 2002: 117).

6. Diğer Prognostik Biyobelirteçler

Biyobelirteçlerin en yaygın kullanılanlarından biri Ki67'dir. Ki67, hücre çoğalmasının değerlendirilmesi için iyi bilinen belirteçtir. Ki67, interfaz sırasında esas olarak nükleolar kortekste bulunur ve mitoz sırasında yoğunlaştırılmış kromozomlara alınır. Ki67 proteini G1, S, G2 fazında ve mitozda hücrelerin çekirdeklerinde saptanırken, G0 fazında hücrelerin çekirdeklerinde bulunmamaktadır. Bu nedenle Ki67 ekspresyon seviyesi hücre proliferasyonunun durumunu gösterir. Ki67 geni, kromozom 10q25-ter üzerinde bulunur ve sırasıyla 345 ve 395 kDa' luk iki Ki67 izoformunu kodlar (Visapää, 2003: 846). Ki67, kanser

hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Ki67'nin belirlenmesinde metodolojik sorunlar olmasına rağmen açıkça belirlenmiş klinik değeri, geniş kullanılabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle Ki67 birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Yang, 2018: 572).

6.1. Öngörücü Biyobelirteçler

Prognostik biyobelirteçler hastalığın tekrarlama riskini belirlerken, öngörücü biyobelirteçler, belirli tedavilere yanıt vermesi veya dirençli olması muhtemel hastaları önceden belirlemeye yardımcı olmaktadır.

6.1.1. Östrojen ve Progesteron Reseptörleri

Meme kanserinde endokrin tedavisine yanıt östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) durumu ile ilişkilidir. Östrojen meme kanserinin gelişmesinde ve büyümesinde ana uyarıcıdır. Östrojen reseptörleri alfa (ER α) ve beta (ER β), insanlarda birçok karmaşık fizyolojik sürecin düzenlenmesinde yer alan nükleer transkripsiyon faktörleridir. Östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu invaziv meme karsinomlarında yaklaşık %70-75 oranında önemli ölçüde arttığından, önemli bir tanısal belirleyicidir. ER α 'nın ekspresyon seviyesinin yüksek olması meme kanseri riskinin arttığını göstermektedir (Paterni, 2014: 2).

Progesteron, birincil fizyolojik fonksiyonlarını progesteron reseptörleri A ve B'ye (PR-A ve PR-B) bağlanarak uygulayan, hedeflenen genlerin transkripsiyonunu başlatan ve endometriumun sekretuvar endometriuma dönüştürülmesiyle sonuçlanan 21 karbonlu bir steroiddir (Trabert, 2020: 322). Sağlıklı meme dokusunda eşit miktarlarda PR-A ve PR-B bulunmakta iken meme kanserinde bu oran değişmektedir. Meme dokusunda progesteronun, parakrin mekanizma yoluyla normal insan göğüs epitelini uyardığı ve meme kanseri için bir risk faktörü olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Conneely, 2000: 339). Ayrıca progesteronun, olgun meme epitelindeki meme kök hücre havuzlarında bulunan veya gizli tümör başlatan hücrelerin döngüsel proliferasyonu arttırdığı gözlenmiştir. Bu bağlamda, kanserin ilerlemesinin progesteron/PR sinyalinin ve parakrin proliferasyonun otokrin düzenlemesine geçişin bir sonucu olduğu ileri sürülmektedir (Obr, 2012: 5).

6.1.1.1. HER2

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER) çoklu sinyal iletim yolları aracılığıyla hücre büyümesini, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını düzenleyerek, hücresel çoğalmayı sağlamaktadır. İnsan kanserinin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Meme kanserleri, HER2 geninin 25-50 kopyasına ve HER2 proteininde 40-100 kata kadar artışa sahip olabilir ve tümör hücresi yüzeyinde yaklaşık 2 milyon reseptör eksprese etmektedir. Böylelikle, meme

kanserlerinin yaklaşık %15-30'unda HER2 geninin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu mevcuttur (Iqbal, 2014: 2).

6.1.1.2. MIB-1

MIB-1 monoklonal antikoru, Ki-67 antijeni boyamak için sıklıkla kullanılmaktadır. MIB-1 boyaması, iyi bilinen bir proliferasyon belirteçidir ve meme kanserlerini karakterize etmek için kullanılmaktadır. MIB1 (Ki-67'ye karşı antikor) proliferasyon indeksi, Ki-67'ye benzer şekilde meme kanserinin güvenilir bir tanısal biyobelirteci olmaya devam etmektedir (Amatya, 2001: 972).

6.1.1.3. E-Kadherin

E-kadherin proteini (CDH1 geni), epitelyal polarizasyon ve farklılaşma süreci için önemli bir proteindir. E-kadherin proteini tümörün duktal mı yoksa lobüler mi olduğunu belirlemeye yardımcı olması için kullanılmaktadır. E-kadherin fonksiyonunun deregülasyonu, kötü prognoz ile ilişkilidir (Singhai, 2011: 230).

6.1.1.4. P53

P53, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genlerden biridir. Genel olarak P53, DNA hasarı, hipoksi, onkogen aktivasyonu ve besin yoksunluğu gibi çeşitli genotoksik ve hücrel stres sinyalleri tarafından stabilize edilen ve aktive edilen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir. P53'ün hem normal hücrelerin hem de kanser hücrelerinin metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. P53 genindeki heterozigosite kaybı (LOH), çok sayıda kanser (osteosarkomlar, lösemi, beyin tümörleri, adrenokortikal karsinomlar ve meme kanserleri) türünde gözlenmiştir (Ozaki, 2011:9).

6.1.1.5. MikroRNA

miRNA'lar, çeşitli fizyolojik ve gelişimsel süreçlerde gen ekspresyonunu kontrol eden kodlama yapmayan kısa, tek iplikli RNA dizileridir (19-25 nükleotid). Bu miRNA'ların anormal ekspresyonu, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıkları ile etiyolojik olarak bağlantılıdır. Hücre proliferasyonu, apoptotik yanıt, metastaz, kanser nüksü ve kemorezistans gibi meme kanseri gelişimi farklı hücrel yollar, onkogenik miRNA (oncomiR) veya tümör baskılayıcı miRNA (tsmiR) tarafından düzenlenir. Bazı miRNA'lar (miR21, miR195, miR199, miR145) meme tümörünün gelişimi, ilerlemesi ve tedaviye yanıtı ile ilişkilendirilmektedir (Loh, 2019: 4940). miRNA'lar, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) ile çift yönlü bir ilişki sergilemektedir. Bazı miRNA'lar metilasyon sürecini geliştirirken, bazı DNMT'ler bu

miRNA'ların biyogenezi düzenleyebilir. Epigenetik modifikasyonları düzenleyen bu tür miRNA'lara epi-miR'ler denir. miR-9-1, miR-124a3, miR-148, miR-152 ve miR-663 Epi-miR örnekleri olarak verilebilir. MiR-9, miR-21, miR-93, miR-181a/b, miR-182, miR-155, miR-21 dahil olmak üzere çeşitli miRNA'lar TNBC'de oncomiR'ler olarak işlev görmekte ve karsinogenez sürecini koordine etmektedir eder (Jank, 2016: 96).

6.2. Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAMS)

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAMS), tümör mikro ortamının bir parçasıdır. TAM' lar, çevredeki mikro ortamdan gelen sinyallere bağlı olarak fenotiplerini değiştirerek, tümör hücrelerini öldürebilmektedir. TAM' ların yoğunluğu; hormon reseptör durumu, tümörün evresi, histolojik derecesi, lenf nodu metastazı ve vasküler invazyonu ile ilişkili olduğu göstermektedir. TAM' lar ayrıca meme kanseri modellerinde çoklu tedavi türlerine direnç sağlamaktadır (Laoui, 2011: 862).

7. Bazal Benzeri/Üçlü Negatif Meme Kanseri

Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC), ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olarak karakterize edilen heterojen bir meme kanserleri topluluğudur. TNBC, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Newman, 2014: 875). TNBC' nin yaklaşık %80' ninde BRCA1 germ hattı mutasyonu ortaya çıkmaktadır. TNBC'ler gen ekspresyon profiline göre, bazal benzeri (BL1 ve BL2), mezenkimal (M), mezenkimal kök benzeri (MSL), immünomodülatör (IM) ve luminal androjen reseptörü (LAR) ve ayrıca belirtilmemiş bir grup (UNS) olmak üzere altı alt tipe ayrılmaktadır. Bununla birlikte, alt tiplerinin klinik önemi hala belirsizdir ve TNBC tedavi kararları üzerindeki etkisini netleştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Lehmann, 2019: 2750).

TNBC'li hastalar kötü prognoza sahiptir ve ölüm oranı yüksektir. Diğer alt tiplerin aksine, TNBC gelişimi menopoz öncesi kadınlarda yaşamın erken döneminde daha sık görülmektedir (Badowska, 2019: 2056). TNBC'de p53 ve Ki67 ekspresyonu yüksek, düşük BCL-2 ekspresyonu ile agresif bir ekspresyon profiline, büyük tümör boyutuna ve yüksek mitotik dereceye sahiptir (Costa, 1992: 956). TNBC hastalarının 4 yıllık sağkalım oranı %85,5 'tir ve hastalığın nüks etme yılı (1-2 yıl) diğer kanser türlerine göre daha kısadır (Pistelli, 2013). TNBC (triple negative breast cancer), zayıf prognoza sahip olması, agresif özellik göstermesi ve hedefe yönelik tedaviden yoksun olması nedeniyle hala klinik önem taşımaktadır (Won, 2020: 1245).

8. Meme Kanseri Tedavisinde Kombine Terapi

Meme kanseri tedavisi; cerrahi, radyoterapi, neoadjuvan ve adjuvan tedaviyi içeren multidisipliner bir yaklaşımı içermektedir. Meme kanseri tedavisinin etkin olması için istenmeyen etkilerin minimuma düşürülmesinin yanı sıra maksimum terapötik etkinlik beklenmektedir (Moo, 2018: 340).

Kemoterapi ve radyoterapi, kanser hastalarının çoğu için ilk tedavi hattı olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte, çoğu hasta bu terapötik modalitelere direnç geliştirmekte ve hastalığın ilerlemesine yol açmaktadır (Kesson, 2012: 5). Moleküler olarak tanımlanmış tümörleri olan hastalar için kullanılan tek ajan hedefli tedaviler, kanser tedavisinin seyrini değiştirmektedir. İlaça karşı kazanılmış direnç, en gelişmiş ilaçların bile klinik faydasını sınırlamaktadır. Yapılan çalışmalar ile tüm malignite türlerinde mortalite oranları azalmaktadır. Yeni farmasötik anti-kanser ajanları geliştirilmesine rağmen, bu ajanların maliyeti yüksektir. Ayrıca piyasaya girmesi yaklaşık 15 yıl sürdüğü için, kanser tedavisinde var olan ilaçların birbiriyle kullanılması tercih edilmektedir (DiMasi, 2003: 155).

Kombine tedavi ilk kez 1965 yılında, Emil Frei, James F. Holland tarafından akut lösemi tedavisi için kullanılmıştır (Frei, 1965:642). Kansere neden olan yolları spesifik olarak hedefleyen iki veya daha fazla terapötik kombinasyonu, kombine tedaviyi tanımlamakta ve kanser tedavisinin temel taşını oluşturmaktadır (Yap, 2013: 1593). Genel olarak, ilaç kombinasyonları: her ilacın uygun dozda uygulanabilmesi için toksisiteni az olması, geniş spektrumlu ilaç direncini bastırmak için farklı terapötik mekanizmalar ve minimum çapraz direnç sağlaması, sinerjik terapötik etkiler için optimize edilmiş doz oranları, ilaçların benzer çözünürlük ve geçirgenlik sağlaması ile hücre içi yüksek seviyede olması prensiplerini içermektedir (Wang, 2015: 1252).

Birçok farklı kanser formları için monoterapi kullanımı halen devam etse de bu geleneksel yöntemin, genellikle kombine terapiden daha az etkili olduğu kabul edilmektedir. Monoterapi seçici olmayan teknikler ile çoğalan hücreleri hedeflemektedir. Kombine tedavide ise çoğalan hücreleri azaltmak için farklı yollar hedeflendiğinden, kombine tedavi toksik etkiyi önemli ölçüde azaltmakta ve önlemektedir (Huang, 2021: 1). Ayrıca, monoterapide sürekli ve tek bir bileşik kullanılması, kanser hücrelerini ilaç direncine karşı daha duyarlı olmasını sağlamaktadır. Kombine tedavi daha etkili bir tedavi yanıtı üretebildiğinden, kanser hücrelerinin direnç insidansını azaltmaktadır. Sonuç olarak, kombine terapi tedavi direncini sınırlamakta, toksisiteyi düşürmekte ve ilaç etkinliğini arttırmaktadır (Mokatri, 2017: 38022).

9. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik, DNA dizisini değiştirmeden gen aktivitesini değiştiren ve yeni nesile iletilen modifikasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Aslında epigenetik DNA kromatin dinamiğinin incelenmesidir. Epigenetik, hücrel bir homeostatik ortam üretmek için genomun yapısını düzenlemekte, belirli genlerin ekspresyonunu ve susturulmasını açıklamaktadır. DNA metilasyonu, histon asetilasyonu, histon fosforilasyonu, histon ubiquitinasyonu, post transkripsiyonel değişiklikler gibi birçok epigenetik süreç türü tanımlanmıştır (Eroğlu, 2018: 348). Epigenetik süreçler doğaldır ve birçok organizma işlevi için gereklidir. Ancak uygunsuz bir şekilde gerçekleşirse, sağlık ve davranış üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Epigenetik modülasyon yolu, mutasyonlar ve stres gibi etkenler sonucu proliferatif aktivitenin artması ile kansere yol açacak şekilde değişebilmektedir (Weinhold, 2006: 163).

Epigenetik modifikasyonlar tarafından yönlendirilen gen ekspresyonundaki farklılıklar, hücre tiplerinin farklı işleviyle sonuçlanmaktadır. DNA kalıpları ve histon modifikasyonları erken gelişim sırasında oluşmakta ve çoklu hücre bölünmeleri boyunca korunmaktadır. Kanserde, normal epigenetik modeller bozulmakta anti-apoptotik ve proliferatif genlerin ekspresyonuna değişmektedir. Genlerde meydana gelen bu değişim, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olmaktadır (Perrault, 2019: 267).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA (ncRNA) olmak üzere üç farklı epigenetik mekanizma tanımlanmıştır.

9.1. DNA Metilasyonu

DNA metiltransferaz enzimleri tarafından katalize edilen DNA metilasyonu, genellikle bir CpG adası oluşturan diğer CpG'lerle çevrili bir sitozin-guanin dizisi (CpG) içindeki sitozin nükleotidine doğrudan bir metil grubunun eklenmesini içermektedir. CpG adaları, özellikle promotör bölgelerindeki CpG adaları olmak üzere, epigenetik DNA metilasyonu için ortak hedeflerdir. Gen promotör bölgelerinin yaklaşık %70'inin CpG adaları içinde olduğu bildirilmiştir. Bir promotör bölgesindeki metillenmiş sitozinler, gen baskılayıcı proteinleri alır ve DNA ile transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimi azaltmaktadır (Kulis, 2010: 28).

Bir promotör bölgesindeki metillenmiş sitozinler, DNA ile transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimi azaltır. Sitozin metilasyonu ayrıca heterokromatin oluşumunu da yönlendirmektedir. Bu nedenle, promotör bölgelerdeki DNA metilasyonu, gen sessizleşmesine neden olur. Tümör baskılayıcı genlerin belirgin hipermetilasyonu ve proto-onkogenlerin hipometilasyonu tümör karsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Bu epigenetik mekanizma aynı

zamanda dokuya özgü gen regülasyonu, genomik damgalama ve X kromozomu inaktivasyonunda da önemli bir rol oynar (McMahon, 2017: 2).

9.2. Kodlanmayan RNAlar

Kodlamayan bir RNA (ncRNA), proteinlere çevrilmeyen fonksiyonel bir RNA molekülüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ncRNA moleküllerinin epigenetik gen ekspresyonunda çok önemli bir rol üstlendiğini bulunmuştur. Önemli ncRNA molekülleri, 30'dan az nükleotit içeren mikroRNA'ları (miRNA) ve kısa enterferans yapan RNA'ları (siRNA) ve 200 nükleotit veya daha uzun olan uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA) içerir. Epigenetikteki rollerinin tam kapsamı hala belirleniyor olsa da ncRNA'ların gen susturmaya ek olarak DNA metilasyonuna ve histon modifikasyonlarına katıldığını gösteren kanıtlar vardır. siRNA'ların ve lncRNA'ların heterokromatin oluşumuyla gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Esteller, 2011: 864).

9.3. Histon Modifikasyonları

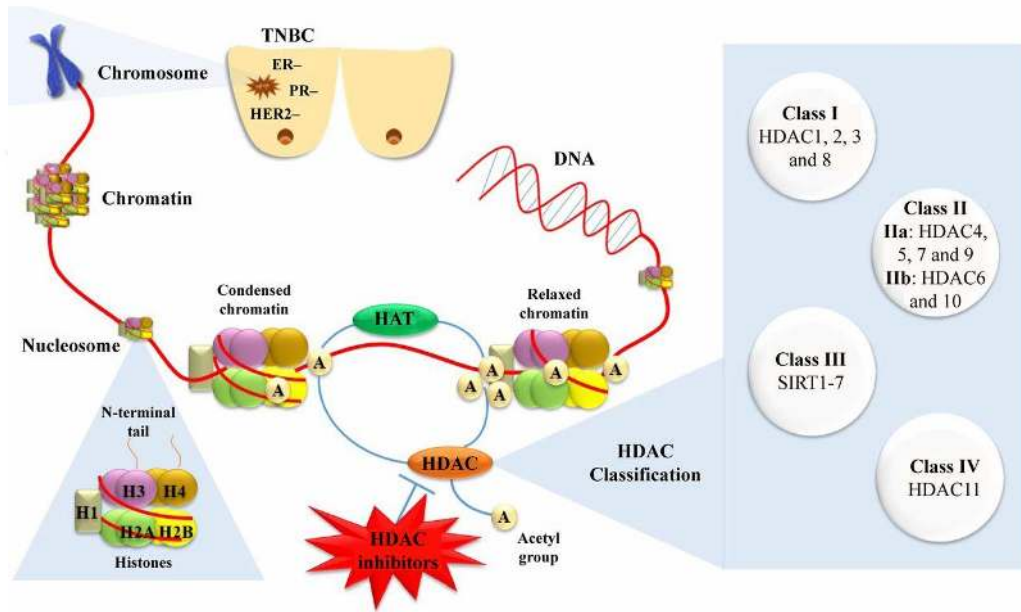
Histonlar, genellikle ökaryotik hücrelerde bulunan, DNA'yı saran, küçük ağırlıklı bazik proteinlerdir. Histon proteinleri artı yüklü lizin ve arjinin proteini içerdiğinden DNA'ya sıkıca bağlanmaktadır. Histonlar; fosforilasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon ve metilasyon dahil olmak üzere birçok yolla kovalent olarak modifiye edilir (Alaskhar, 2018: 2).

9.3.1. Histon Asetilasyonu

DNA-histon etkileşimlerini zayıflatan, böylece kromatini açan ve transkripsiyonu kolaylaştıran pozitif yüklü lizin kalıntıları meydana gelmektedir. Histon asetilasyon durumu, histon asetiltransferazlar (HAT'lar) ve histon deasetilazlar (HDAC'lar) olmak üzere zıt etkiler uygulayan iki grup enzim tarafından düzenlenmektedir. HAT'lar, asetil-CoA'dan aldığı asetil grubunu histon kuyruklarındaki hedef lizin amino asidine transferini katalize ederek, histonlar üzerindeki pozitif yükün çıkarılmasına yol açmaktadır (Holgate, 2015: 1). Böylelikle histonlar ve negatif yüklü fosfat arasındaki etkileşimi zayıflatmakta, kromatin daha az kompakt olmakta ve dolayısıyla transkripsiyonel olarak aktif hale gelmektedir. HDAC'lar, asetil gruplarını histon kuyruk lizin kalıntılarından uzaklaştırır ve böylece gen ekspresyonunun baskılayıcıları olarak çalışmaktadırlar (Fierz, 2012: 3).

HAT'lar beş (veya bazen altı) aileye ayrılmaktadırlar. GCN5 ile ilgili N-asetiltransferaz (GNAT) ailesi, KAT2A ve KAT2B enzimlerini içerir. Histonların ve transkripsiyon faktörlerinin asetilasyonunda, dolayısıyla hücre döngüsü düzenlemesinde ve DNA replikasyonu- onarımında yer almaktadırlar (Cieniewicz, 2014: 2896).

HDAC süper ailesine ait on sekiz enzim tanımlanmıştır. Bunlar ayrıca; sınıf I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8), sınıf IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 ve HDAC9), sınıf IIb (HDAC6 ve HDAC10), sınıf III ve sınıf IV (HDAC11) sirtuinler olarak adlandırılan dört sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I HDAC'lar, tüm dokularda, her yerde bulunan bir nükleer ekspresyon ile karakterize edilirken, sınıf IIb HDAC'lar hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunmaktadır. Sınıf IIa HDAC'lar esas olarak sitozolik lokalizasyon göstermektedir. Çekirdekte, sitozolde ve mitokondride lokalize olan HDAC11 ve sirtuinler hakkında fazla bilgi yoktur (Hull, 2016: 2).



Şekil 2.1. Histon Deasetilaz İnhibitörleri Sınıflandırması

Kaynak: (Garmpıs, 2017: 301)

TNBC: Üçlü Negatif Meme Kanseri; HAT: Histon Asetiltransferazlar; HDAC: Histon Deasetilazlar

9.3.2. Histon Metilasyonuna

Lizin metiltransferazlar (KMT'ler) ve arginin metiltransferazlar (PRMT'ler) histon demetilasyonuna histon metiltransferazlar (HMT'ler) ve histon demetilazlar (HDM'ler) aracılık etmektedir. Histon lizinin asetilasyonu, histonların elektrik yükünü ve dolayısıyla DNA ile etkileşimlerini etkilerken, histon lizin veya argininin metilasyonu bu elektrostatik bağı etkilememektedir. Bunun yerine dolaylı olarak farklı düzenleyici proteinlerin kromatine alınmasını ve bağlanmasını etkiler (Kaniskan 2017: 102). Histonların metillenmesiyle, gen ifadesi açık ya da kapalı konuma gelmektedir.

9.3.3. Histon Fosforilasyonu

Histona negatif bir yük vererek daha açık bir kromatin konformasyonu ile sonuçlanır. Fosforillenmiş histonlar DNA hasar onarımı ve mitoz- mayoz ile ilişkili kromatin sıkışmasının kontrolünü ve transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesini sağlamaktadır. Histon asetilasyonu ve metilasyonu ile karşılaştırıldığında, histon fosforilasyonu diğer histon modifikasyonları ile birlikte çalışarak aralarında karşılıklı etkileşimler için bir platform oluşturmaktadır (Rossetto, 2012: 1099).

9.3.4. Histon Ubikitinasyonu

Protein ubikitasyonu, ökaryotlarda birçok hücre sinyal yolundaki hücre fonksiyonunun hemen hemen her yönünü düzenleyen önemli bir transasyon sonrası modifikasyondur. Ubikitin, ubiquitin-proteazom sistemi tarafından substrat proteinlerine konjuge edilen ve böylece hedef proteinlerin stabilitesini ve dönüşümünü düzenleyen 8.5 kD'lik bir proteindir. Monoubikitinasyon, protein translokasyonu, DNA hasar sinyali ve transkripsiyonel düzenlemede kritik bir role sahiptir (Schwertman, 2016: 380.).

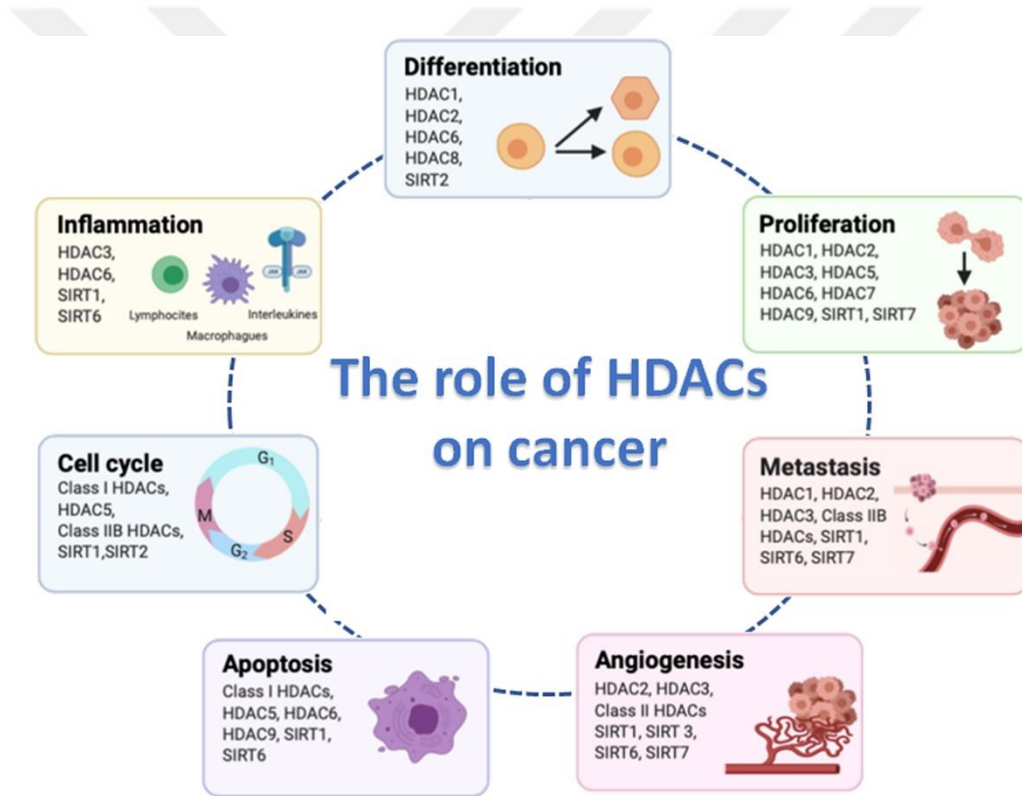
10. Histon Deasetilazlar ve Kanser

HDAC'lar, tümör hücresi proliferasyonu, metastaz, anjiyogenez, apoptoza direnç ve hücre döngüsünün değiştirilmesi dahil olmak üzere kanser gelişiminde birçok önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.2.). Bu işlevlerle ilişkili belirli HDAC substratlarını tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Histon deasetilazlar, farklılaşma, anjiyogenez ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik hücre fonksiyonlarda önemli asetilasyon seviyelerini korumaktadır (Fajas, 2002: 904).

HDAC aktivitesinin değişmesi, birçok katı tümör ve hematolojik malignite türü ile ilişkilendirilmektedir (Adams, 2010: 577). HDAC'ların kansere katkıda bulunma mekanizmaları çeşitlidir. Çoğu tümörde, HDAC'ların anormal ekspresyonu, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunu susturarak veya onkogenik yolları düzenleyen hedef gen ekspresyonunu değiştirerek onkogenik sinyali uyarmaktadır (Ashraf, 2006: 1057). HDAC'ların hücre fonksiyonları içeren birçok görevi bulunmaktadır. HDAC3, hücre çoğalmasını teşvik etmektedir. HDAC8'in nöroblastom, rahim ağzı kanseri ve özofagus skuamöz hücreli karsinomda aşırı ekspresyonu, hastalarda kötü prognoz ile önemli ölçüde ilişkilendirilmektedir (Vannini, 2004: 15065). HDAC11, nöroblastom hücre hatlarında hücre döngüsünü, apoptozu ve sağkalımı düzenlemektedir. İnsan meme kanseri hücre hatlarında HDAC1, HDAC6 veya HDAC8'in aşırı ekspresyonu, artan metalloproteinaz-9 (MMP-9) ekspresyonu yoluyla a

metastaza katkıda bulunmaktadır (Park, 2020: 205). Ayrıca, HDAC6 ve HDAC8'in a-tubulin asetilasyonu yoluyla kanser hücre göçünü ve istilasını düzenlemektedir.

Kanser hücrelerinin HDACi'lerine karşı artan duyarlılığı, kanser hücrelerinde spesifik HDAC izoformunun veya HDAC grubunun aşırı ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Buna göre, HDAC'ların değiştirilmiş aktivitesi veya ekspresyonu, onları HDAC inhibisyonuna, hücre proliferasyonunun durmasına ve hücre ölümünün indüklenmesine karşı daha duyarlı hale getirmektedir. HDAC'lar gen ekspresyonunu geri dönüşümlü bir şekilde modüle etmekte ve çok sayıda kanserin tedavisi için yeni hedef olarak araştırılmaktadır. HDAC'ların hangi kanserde ve hangi histopatolojik aşamada eksprese edildiğini bilmek kanser tedavisine önemli katkı sağlayacaktır (Kim, 2001: 438).



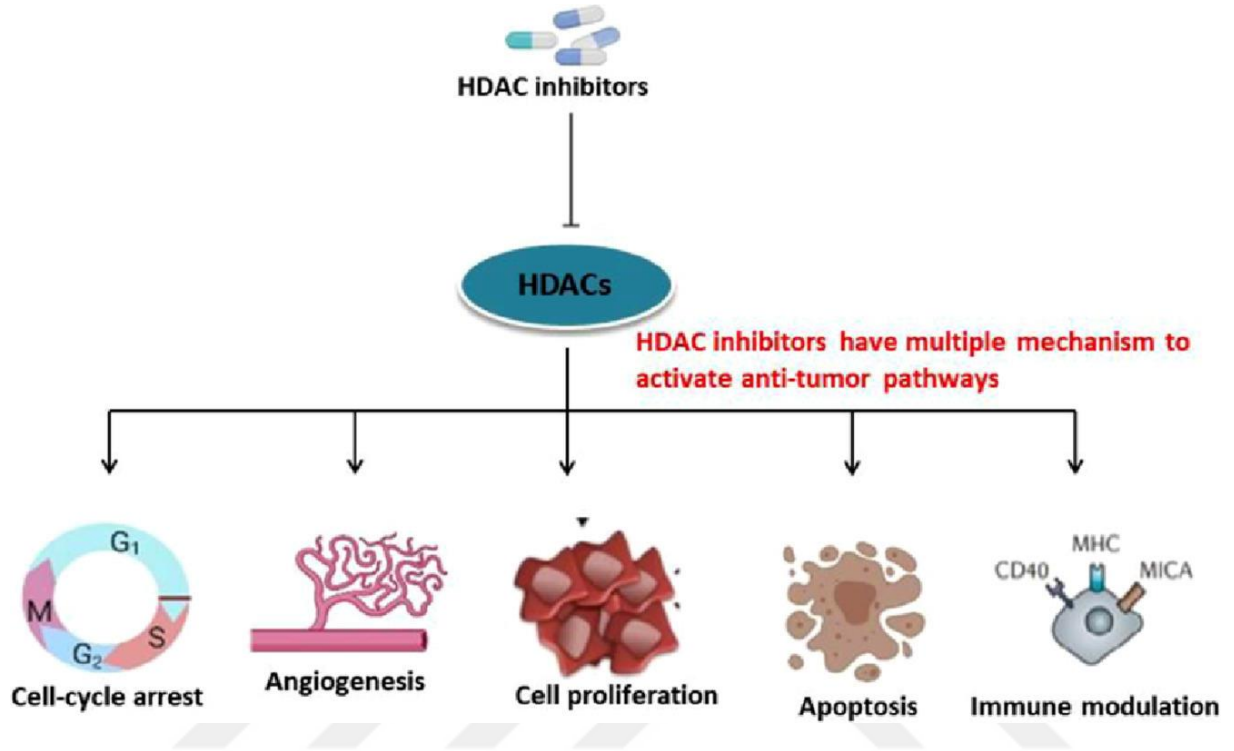
Şekil 2.2. Kanser Mekanizmasında Histon Deasetilazların Görevleri

Kaynak: (Hontecillas, 2020: 3)

11. Kombine Terapide Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Epigenomu düzenleyen enzimlerde (histon asetilaz, HDAC ve transkripsiyon faktörleri) meydana gelen mutasyonlar, genlerin regülasyonunu değiştirerek farklı gen ürünlerini ortaya çıkarmakta ve kansere yol açmaktadır. Bu sebeple epigenetik değiştiriciler, birçok önemli

kanser tedavisi için hedef olmaktadır (Lodish, 2000). Özellikle son 10 yılda histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) hücre döngüsünü durdurma, apoptozu indükleme ve anjiyogenezi inhibe edici özellikleriyle, kanseri tedavi etmede önemli ajanlar olarak kabul edilmektedir.



Şekil 2.3. HDACi ve Kanser Tedavisi

Kaynak: (West)

HDAC inhibitörleri enzimlerin aktif bölgelerine bağlanmasıyla, histonların asetil formda kalmasını sağlayarak gen ifade değişikliğine neden olmaktadır (Phiel, 2001: 276). HDAClar kromatini kompakt hale getirdiği için, hücrelerin kanser hücresi oluşuna yardım etmektedir. HDAC inhibitörleri, hücrelerdeki histon ve histon olmayan proteinlerde hiperasetilasyonu indükleyerek hareket ederek hem tümörlü hemde tümör olmayan hücreleri etkilemektedir. Histonların hiperasetilasyonu, tümör hücrelerinde epigenetik olarak bastırılmış genlerin ekspresyonunu değiştirir, hücre döngüsü durması, apoptoz, yaşlanma, farklılaşma ve ayrıca anjiyogenezin inhibisyonuna neden olmaktadır (Falkenberg, 2014: 675). Ayrıca tümör hücreleri normal hücrelere göre HDACi kaynaklı apoptoza daha duyarlıdır (Gryder, 2012: 4).

Farklı endikasyonların tedavisi için doğrulanmış HDAC aracılı etki mekanizmasına sahip, vorinostat, belinostat, romidepsin, tucidinostat ve panobinostat olmak üzere beş ajan bulunmaktadır (Jones, 2012: 481). HDACi'leri başka ajanlarla kombinasyon halinde yeniden tasarlanmış ve klinik deneylerde test edilmiştir. Preklinik çalışmalarda valporik asit ile

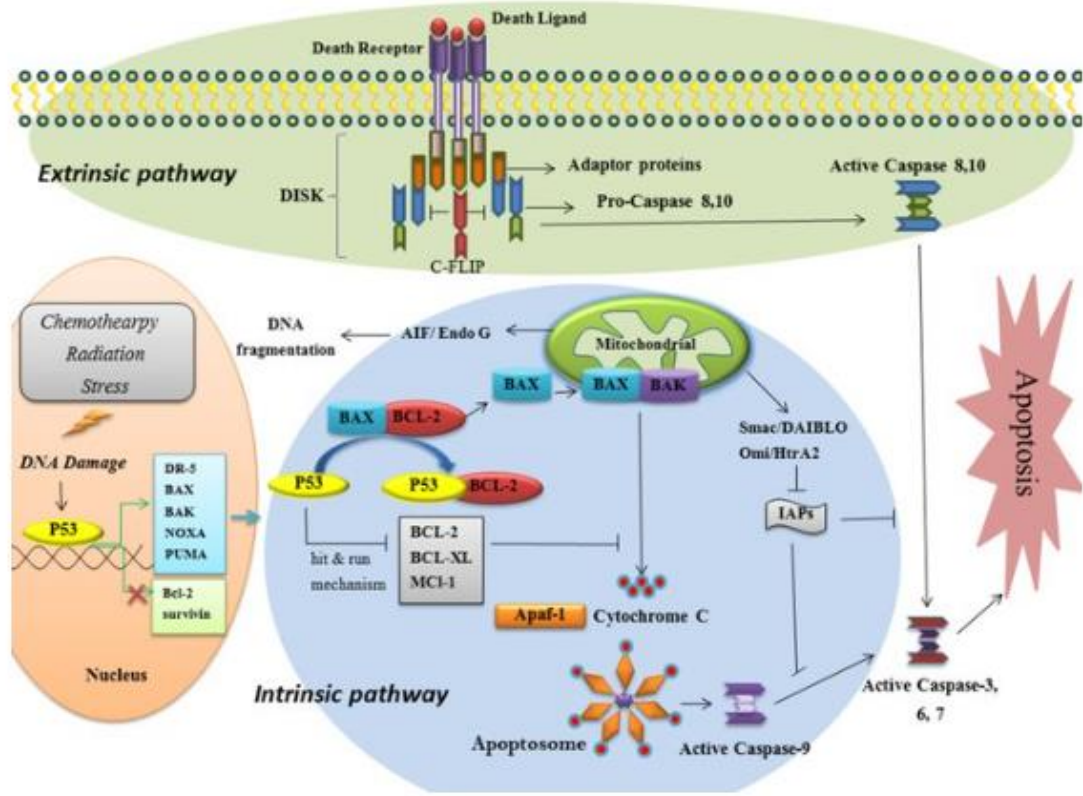
desitabinin kombine kullanılması olumlu sonuç vermekte ve kombine terapinin monoterapiye oranla etkin olduğunu göstermektedir (Tassara, 2014: 123). Romidepsin, gemsitabin ile kombinasyon halinde pankreas, meme, küçük hücreli olmayan akciğer tümörleriyle ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. Marizomib ve vorinostatın kombine uygulanması tümör büyümesini %37 oranında düşürmüştür (Millward, 2012: 2316). Sentetik bir benzamid HDACi olan MS-275 (entinostat veya SNDX-275), 5-azacytidine ile kombine kullanımı kanser hücre sayısını, proliferasyonunu ve canlılığını olumsuz yönde etkilemiştir (Ryan, 2005: 3915). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) FDA onaylı HDACi 'lerin diğer terapötik ajanlarla kombinasyon halinde değerlendirilmesi oldukça umut verici yaklaşım olarak görülmektedir. HDACi' ler ile yapılan kombinasyonların, genel sağkalım oranını iyileştirmektedir. Özetle, HDACi gelecek vaat eden bir hedef teşkil etmektedir ve bu alanda daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

12. Meme Kanseri Apoptoz Mekanizması

Apoptoz, hücrelerin biyolojik görevlerini yerine getirdikten sonra hücrenin kontrollü ölümüyle gerçekleşen bir süreçtir. Apoptoz, hücre proliferasyonu arasındaki denge ile kontrol edilir. Aradaki denge bozulduğunda hücreler kanser hücrelerine dönüşmeye başlamaktadır. Tümör büyümesinin sadece kontrolsüz proliferasyonun değil, aynı zamanda azalmış apoptozun sonucu olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (Tamm, 2001: 34). Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge, tümörün genel büyümesini veya gerilemesini belirlemede önem taşımaktadır.

Kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedaviler apoptozu indüklemektedir. Bu nedenle, apoptozun kontrolü ve düzenlenmesi incelenerek, tümörlerin biyolojisini moleküler ve biyokimyasal düzeyde tanımlanabilir. Bu tanımlamaların yapılması ile, tümör gerilemesi ve tedavinin etkinliğini en üst düzeye çıkarılması sağlanarak, tedaviye yanıt vermeyen tümörler için yeni ilaç geliştirme yollarına yön gösterebilecektir (Ellis, 1997: 608).

Apoptozun regülasyonu, DNA hasarı, ER stresi, hipoksi ve metabolik stres gibi hücre içi yollar tarafından başlatılan içsel yollar (intrinsik) ve TRAILR ve FAS ölüm reseptörü aktivasyonu tarafından başlatılan dışsal yollar (ekstrinsik) olmak üzere iki ana yoldan düzenlenmektedir. İntrinsik yolun tetiklediği apoptoz daha çok mitokondri üzerinden gelen sinyalleri işlerken, ekstrinsik yolda ölüm reseptörleri aracılığıyla ölüm sinyallerinin alınması ve işlenmesiyle olmaktadır (Elmore, 2007: 495).



Şekil 2.4. Apoptoz Yolağı

Kaynak: (Goldar, 2015)

12.1. Ekstrinsik Apoptoz Yolağı

Ölüm reseptörü yolu olarak da bilinen ekstrinsik yol (Igney ve Krammer, 2002), TNF, FAS-L veya TRAIL ölüm ligandlarının hedef hücre zarında bulunan kendi reseptörlerine bağlanmalarıyla apoptozu tetiklemektedir (Obeng, 2021: 35). Bu bağlanmanın gerçekleşmesi ile adaptör protein FADD ile prokaspaz- 8 proteinlerini bir araya gelerek bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumunu tamamlamaktadır. Böylelikle DISC içerisinde Kaspaz 8 aktive olmaktadır. Aktif kaspaz-8 öncelikle prokaspaz-3,-6,7' ninde aktifleşmesinin sağlandığı kaskadı başlatır (Şekil 2.4.). FLICE inhibitör proteini (FLIP), Kaspaz 8 in aktivasyonuna müdahale ederek, Prokaspaz 8 in DISC kompleksine bağlanmasını engellemekte ve TRAIL aracılı hücre ölümünü güçlü bir şekilde bloke etmektedir (Roth, 2004: 189).

12.2. İntersik Apoptoz Yolağı

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen içsel yol, hücre içinde birden fazla hedef üzerine hareket eden çeşitli uyarınları içermektedir. Bu apoptoz formu, mitokondriden

salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif bir yoldan başlatılmaktadır. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin yokluğundan kaynaklanmaktadır (D'Arcy, 2019: 6). Apoptozu başlatan diğer faktörler pozitif sinyal olarak adlandırılır ve hipoksiye, toksinlere, radyasyona, reaktif oksijen türlerine, virüslere ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmayı içermektedir (Brenner, 2009: 875).

Hücre içinde meydana gelen DNA hasarı, oluşan metabolik stres gibi sinyaller tespit edildiğinde mitokondriden sitokrom c salınır. Mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) ve sitoplazmaya sitokrom c salınımı, apoptozu tetiklemek için kritik gereksinimlerdir. Mitokondriden sitokrom c'nin salınımı BAX (BCL-2 ile ilişkili X proteini), BAK (BCL-2 antagonist katil 1), BIM, BID, PUMA gibi proapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri tarafından pozitif olarak düzenlenirken BCL-2, BCL-XL, Bcl-w, A1 ve MCL1 gibi anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri negatif olarak düzenlenir (Nijhawan,2003:1475). Sitokrom c salınmasıyla APAF1 proteinine bağlanarak, ADP molekülü ATP ye dönüşür ve heptamerik apoptozom kompleksi oluşturur. Oluşan bu komplekse prokaspaz 9 bağlanarak kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9' un aktifleşmesiyle prokaspaz -3,-6 ve -7'nin kesilimleri gerçekleşmektedir. Bu sinyal yolağında kaspaz 3' ün aktivasyonu sonrasında geri dönüşüm olmamaktadır (Bhola 2016, 696).

BCL-2 protein ailesi üyelerinin düzeyi, hücre çekirdeğinde meydana gelen genomik değişiklikler ile artmaktadır. Her bir BCL-2 proteini apoptozdan sorumlu evrimsel süreçte korunmuş homoloji alanları (BH1, BH2, BH3 ve BH4) içermektedir. BCL-2 ailesi BH alanlarına göre üç alt bölgeye ayrılmaktadır. 4BH bölgesi içeren anti-apoptik BCL-2 proteinleri (BCL-2, BCL- XL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1), mitokondri membranındaki BAX ve BAD pro-apoptotik proteinleri bloke etmekte, 3H bölgesi içeren pro-apoptik BCL-2 proteinleri (BAX, BAK, BOK) dış mitokondriyal zardaki geçirgenliğin artmasını sağlamaktadır. Sadece BH3 içeren pro-apoptik BCL-2 proteinleri (BIK, BIM, NOXA, BİD, BAD, BFK, EGI-1, BNIP3, Beclin-1) ise mitokondriyal BAX veya BAK ile etkileşime girerek yapısal değişikliklere neden olmaktadır (Kvansakul, 2017:290). BCL-2 ailesinde bulunan BCL-2 ve BCL-XL anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik proteinler olan BAX ve BAK'ın aktivasyonunu engellemektedir. BAX ve BAK, mitokondri dış zarında MOMP'a neden olan makro gözenekler oluşturdukları için apoptozun merkezi efektörleridir. Aktivatör proteinler BIM, BID ve PUMA, BAX ve BAK'ı doğrudan aktive etmekte iken; BAD, NOXA, BIK, BMF, HRK proteinleri

BAX ve BAK'ı doğrudan aktive etmemektedir. Fakat, bu proteinler anti-apoptotik proteinleri (yani, BCL-2, BCL-XL, MCL1) inhibe ederek önemli düzenleme sağlamaktadır.

BAD proteini BCL-2, BCL-W, BCL-XL'ye bağlanmak için daha güçlü bir afinite gösterirken MCL1 proteini ise daha zayıf bir afiniteye sahiptir (Tsujimoto, 1998: 701).

Tümör baskılayıcı protein olan P53; DNA hasarı, hipoksi ve onkogen aktivasyonu gibi hücre streslere yanıt olarak hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonu sınırlamaktadır. P53 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenen apoptozla ilişkili birçok gen tanımlanmıştır. Bu genler P53 için efektör işlevini görmektedir (Aubrey, 2018: 105) B). P53 DNA'ya bağlandığında, P21 proteini uyarılır, P21 proteini sikline bağımlı kinaz 2 cycline dependent kinase 2 (CDK2) ile kompleks oluşturarak hücre bölünmesini durdurmaktadır. P53 geninde mutasyon gerçekleşirse bu bağlanma oluşmadığından hücre kontrolsüzce çoğalır. Onkogen aktivasyonuna yanıt olarak, P53, BAX trans aktivasyonunu, sitozolden membranlara mitokondriden sitokrom c salınımını ve kaspaz-9 aktivasyonunu içeren lineer bir yol aracılığıyla apoptoza aracılık etmektedir (Shen, 2001: 56).

12.3. Kaspazlar

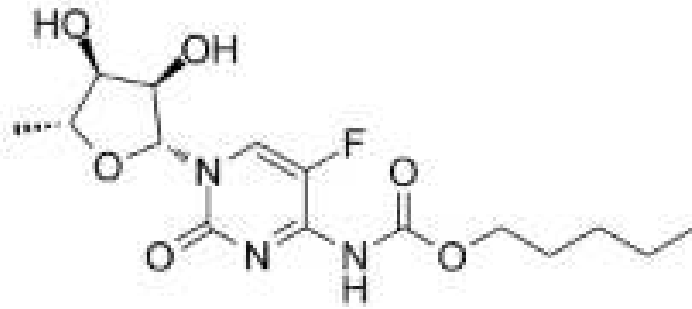
Kaspazlar, hücre ölümü ve iltihaplanma tepkilerinde merkezi olarak yer alan, evrimsel olarak korunmuş bir sistein proteaz ailesidir. İsimlerini, aspartik asit rezidülerini kesmek için sistein rezidülerini kullanmalarından dolayı almışlardır (Crawford, 2011: 155). İnsanlarda 14 kaspaz keşfedilmiş ve fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılmıştır. İnflamasyon kaspazları olarak bilinen birinci grup kaspazlar, Kaspaz-1,-4,-5 ve-12'dir. En iyi bilinen Kaspaz -1 proteini, inflamasyon sürecinde IL-1 β ve ile 18 'i aktive etmektedir. Efektör kaspazlar olarak bilinen ikinci grup kaspazları, apoptoz sırasında hücredeki hedefleri kesmekten sorumlu olan kaspaz-3,-6 ve 7 oluşturmaktadır. Grup üç ya da öncü kaspazlar olan kaspaz-2,-8,-9 ve -10 protein etkileşim bölgesine sahip (CARD) ve efektör kaspazda bulunan EXD sekansını kesmektedir (Nagata, 2018: 490).

13. Kullanılan İlaçlar ve Mekanizmaları

13.1. Capecitabine Mekanizması

5-florourasil (5-FU), güçlü bir antimetabolittir ve ilk olarak Heidelberger tarafından 1950' li yıllarda sentezlenmiştir. Capecitabine (Xeloda, Roche), antineoplastik aktiviteye sahip bir floropirimidin karbamattır (Şekil 2.5). Capecitabine hem kolorektal kanserli hem de meme kanserli hastalarda tekli ve kombine kullanımıyla Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Capecitabine'in kimyasal adı 5'-deoksi-5-floro-N-[(pentiloksi) karbonil] -sitidindir (C₁₅H₂₂FN₃O₆) ve moleküler ağırlığı 359.35 g/mol dür (Schuller, 2000: 292)

Urasil ve timin içeren Capecitabine, birçok insan tümöründe yüksek konsantrasyonda timidin fosforilaz enzimi bulunması durumundan yola çıkılarak geliştirilmiştir. Capecitabine, uygulama kolaylığı sağlamakta ve düşük toksisite özelliği göstermektedir (Miwa, 1998: 1276). Birçok tümörde daha yüksek konsantrasyonlarda eksprese edilen enzimler tarafından fluorourasil'e dönüştürülene kadar çok az farmakolojik aktiviteye sahip olan, FU' e alternatif olarak geliştirilmiş bir ön ilaçtır.



Şekil 2.5. Capecitabine'nin Kimyasal Yapısı

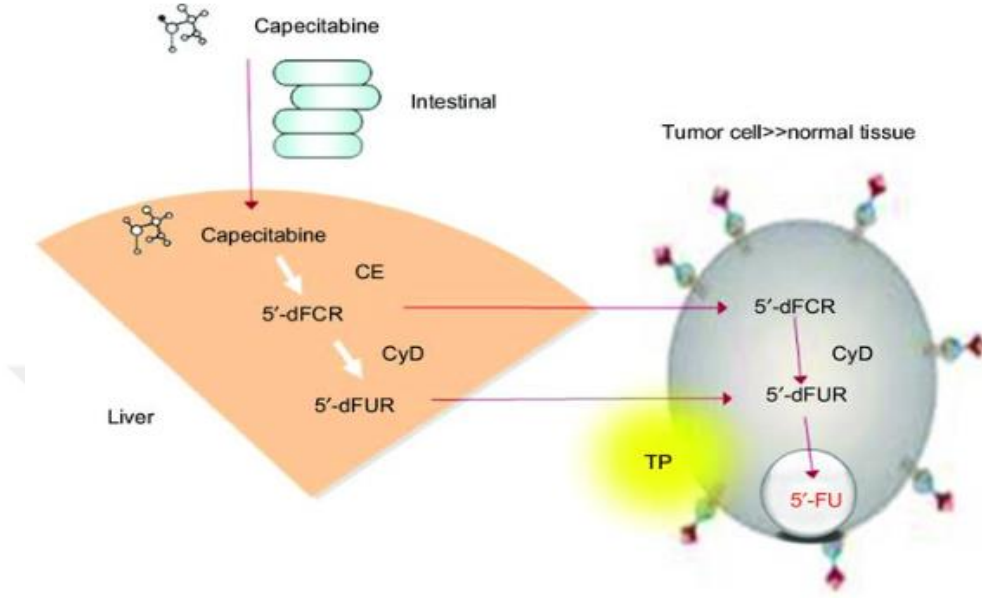
Kaynak: (Desmoulin, 2002)

Etki Mekanizması

5-Fluorourasil (5-FU), hücre döngüsünün S fazı boyunca timidilat mevcudiyetini kısıtlayarak DNA sentezini inhibe etmekte ve hücreleri apoptoza indüklemektedir. Pirimidin katabolizmasında rol oynayan DPD (dihidroprimidin dehidrojenaz) ve Capecitabine'nin 5FU dönüşmesinde rol oynayan CDA, Capecitabine metabolizması açısından oldukça önemlidir (Baskın, 2011). Capecitabine, bağırsak duvarından bozulmadan emilmekte ve daha sonra üç reaksiyon şeklinde farklı enzimler tarafından katalize edilmektedir. Birinci reaksiyonda, Capecitabine karaciğerde bulunan karboksilesteraz ile aktif olmayan bir ara madde 5'-deoksi-5'fluorositidine dönüştürülür. 5'-DFCR karaciğerde, sitidin deaminaz ile 5p-deoksi-5-fluorouridin (5'-DFUR) 'e dönüştürülür. Üçüncü reaksiyon sırasında, 5'-deoksi-5-florouridin dokudaki timidin fosforilaz (TP) enzimi tarafından 5-FU'ya dönüştürülür (Siddique, 2019: 402) (Şekil 2.6.).

Sağlıklı doku ile tümörlü doku karşılaştırıldığında, TP enziminin aktivitesi, tümör dokusunda daha yüksek seviyededir (Karakulak vd., 2016: 73). Primidin metabolizmasında yer

alan TP ve timidilat sentaz (TS) enzimlerinin ekspresyon düzeyi kanser hücrelerinin ilaca hassasiyetiyle ilişkilendirilmektedir (Tablo 2.2). Antikanser ilaçlara duyarlılığı öngören bu moleküler belirteçler, yalnızca potansiyel yanıt verenlerin seçilmesinde değil, aynı zamanda yeni kombinasyonların geliştirilmesinde de önemlidir (Mohammadian vd., 2019: 442).



Şekil 2.6. Capecitabine'nin Etki Mekanizması CE: Karboksil Esteraz, CD: Sitidin De Aminaz
Kaynak: (Wang, 2014: 503)

Tablo 2.1. Toksisiteyi Öngörmek Amacıyla Kullanılan Moleküler Yapılar **Kaynak:** (Baskın, 2011)

Kimyasal Adı	Biyobelirteç	Rolü	Sonuçla ilişkisi
5-Flourourasil	DPD	5-FU metabolizmasındaki hız sınırlandırıcı	DPD enzimindeki defekt ölümcül toksisitelere sebep olabilir.
Capecitabine (5-FU oral analogu)	TS	5-FU metabolizmasında dUMP'nin metillenerek dTMP'e dönüşümünü katalizler	Enzimin ekspresyon düzeyleri tümörün 5-FU hassasiyeti ile ilişkilendirilmektedir
	TP	5-FU metabolizmasındaki ilk enzimdir	Enzimin ekspresyon düzeyi kanser hücrelerinin, ilaca hassasiyetiyle ilişkilendirilmektedir
	DPD	Pirimidin katabolizmasında rol oynamaktadır.	Enzimin eksikliği ciddi toksisite durumlarıyla ilişkilendirilmektedir

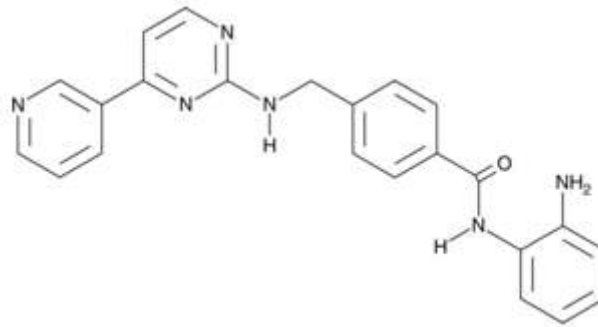
Capecitabine, vücutta hızla emilir ve doruk konsantrasyonuna 2 saat için de ulaşmaktadır. 0,55 ila 0,89 saat gibi kısa bir yarı ömre sahiptir. Capecitabine ve metabolitler ilk 12 saatte %2,64 oranında dışkı ile %95 oranında idrarla tamamen vücuttan atılmaktadır.

Capecitabine hem tek bir ajan olarak hem de diğer ilaçlarla kombine olarak meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Capecitabine; dosetaksel, paklitaksel, mitomisin gibi çeşitli kemoterapötikler ile kombine olarak uygulandığında kanser hücreleri üzerinde daha fazla

etki göstermektedir (Joensuu, 2017: 293). Tümör üzerine uygulanan, Capecitabine ve trifluridin / tipiracil kombinasyonu antitümör etkinliği arttırmıştır (Raedler, 2016: 98).

13.2. Mocetinostat Mekanizması

Mocetinostat (MGCD0103), özellikle Sınıf I (izoform 1, 2 ve 3) ve Sınıf IV (izoform 11) HDAC (Histon de-asetiltransferaz) 'ları inhibe eden Kanadada MethylGene tarafından geliştirilen HDAC inhibitörüdür. Bir benzamid olan Mocetinostat'ın moleküler formülü $C_{23}H_{20}N_6O$ iken moleküler ağırlığı 396.4 g/mol'dür (Luger, 2013:31) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Mocetinostat Kimyasal Yapısı

Kaynak: (Marson, 2015: 6804)

Etki Mekanizması

Mocetinostat, HDACI, HDACII, HDACII ve HDAC11'i seçici olarak inhibe etmektedir. Böylelikle, tümör hücrelerinde epigenetik değişiklikler meydana gelmekte ve dolayısıyla tümör hücresi ölümüne neden olmaktadır. Mocetinostat, miyeloid tedavisi için Faz I aşamasında olup, diğer kanserlerin tedavisi için klinik denemeleri hala devam etmektedir. Katı tümörler ve hematolojik maligniteler için Faz I/II denemelerinde çalışılmaktadır. Mocetinostat'ın, mide, kolon, meme, prostat kanser hücreleri üzerinde uzun süreli inhibe edici aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Fournel, 2008: 760). MGCD0103'ün yarı ömrünün 6,7 ila 12,2 saat arasında değişmekte ve tekrarlanan dozlardan sonra dokularda birikme gözlemlenmemektedir. Mocetinostat, hepatik metabolizmaya uğramakta ve fekal yollarla elimine edilmektedir.

Mocetinostat'ın hücreler üzerinde kesin mekanizması henüz tanımlanmamış olmasına rağmen; apoptoz, farklılaşma, hücre siklusu tutulumu, oksidatif stres ve otofaji üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Mocetinostat'ın katı tümörlerin tedavisi için diğer antitümör ajanlarla

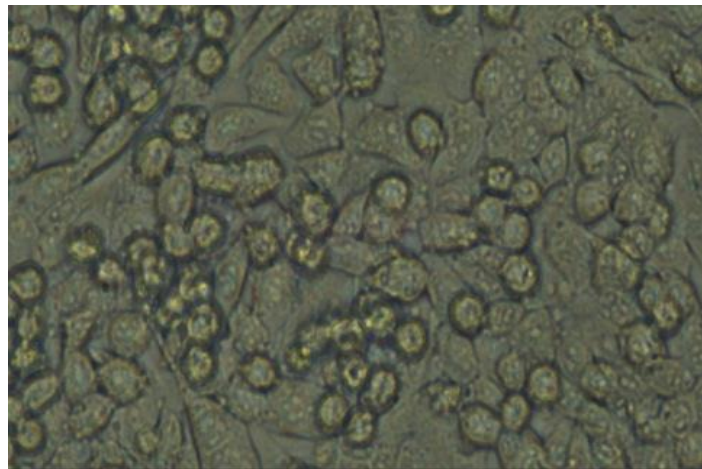
birleştirilmesi umut verici ek bir yaklaşımdır ve klinik olarak değerlendirilmektedir (Cai, 2015.). Mocetinostat Mcl-1 proteininin ekspresyonu azaltarak ve Bax translokasyonunu uyarak hücreleri apoptozise yönlendirmiştir (El-Khoury vd. 2010). Ayrıca mocetinostat tümör hücrelerinde immün ile ilişkili genleri ve ayrıca tümör mikro çevresindeki immün hücre tiplerini kontrolünü sağladığı gösterilmiştir (Brierre, 2018: 382).

14. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattı Özellikleri

4T1 fare meme kanseri hücre hattı çalışmanın hem in vivo hemde invitro kısmında deney sonuçlarının paralellik sağlaması açısından seçilmiştir. 4T1 meme karsinomu, yüksek oranda tümörjenik ve invaziv özellik göstermesiyle çoğu tümör modelinin aksine, meme bezindeki birincil tümörden lenf düğümleri, kan, karaciğer, akciğer, beyin, dokularına metastaz yapmaktadır (Plaski, 2011: 2). 4T1 fare meme kanseri hücre hattı, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu olmadığı için insan metastatik üçlü negatif meme kanserine (TNBC) benzemektedir. 4T1 meme karsinomu hücre hattı, ilk olarak Fred Miller ve Karmanos Kanseri Enstitüsü'ndeki çalışma arkadaşları tarafından izole edilmiştir (Miller, 1983: 22).

4T1 fare meme kanseri hücre hattı 6-tioguanine karşı dirençlidir. Bu özelliği ile yayıldıklarında bile submikroskopik seviyelerde metastatik hücrelerin kesin olarak ölçülmesini sağlamaktadır.

4T1 hücrelerinin bölünme süreleri ortalama 14 saattir (Şekil 2.8). 4T1 hücre hattı kolayca meme bezine nakledilmekte, anatomik olarak doğru bölgede büyümektedir. 4T1 aynı zamanda ve immün alıcılara, hedefleme ve terapötik maddelere verilen cevabı doğru şekilde taklit edebilmektedir (Francia vd., 2011: 136).



Şekil 2.8. 4T1 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü

Yaptığımız bu çalışmada; 4T1 meme kanseri hücre hattı ve 4T1 meme kanseri ile indüklenmiş meme kanseri modelinde, Capecitabine ve Mocetinostat'ın tekli ve kombine kullanımının, 4T1 hücreleri üzerinde sitotoksik, antiproliferatif etkisini ve apoptotik süreçte, yer alan Bcl-2, HDACI, Akt, PI3K, C-myc, HDACIII, Bax, Kaspaz-3, PTEN, Kaspaz-7, Kaspaz-9, p53 protein seviyelerinin birbiri ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Gereçler

1.1. Cihazlar

Tablo 3.1. Laboratuvarda Kullanılan Cihazların Adı ve Markaları

Cihaz Adı	Cihaz Markası
Buz Makinası	Biobase
Buzdolabı (+4 °C/-20 °C /-80 °C)	Regal/Bosch/Panasonic
Etüv	Jeio Tech-IB-E
CO ₂ 'li İnkübatör	Memmert
Hassas Terazı	Ohaus
Dikey Elektroforez Sistemi	Cleaver
Distile Su Cihazı	Mes
Western Transfer Sistemi	Biorad
ELISA	ThermoFisher Scientific
Jel Görüntüleme Sistemi	TS100 Gel Logic-212 Pro
Laminar Flow (Steril Kabin)	Scanlaf-Mars
Neubauer Tip Thoma Lamı	Marienfeld Superior
Invert Mikroskop	Nikon Eclipse Safety Classe 2
Manyetik Karıştırıcı	Mtops MS300Hs
Su Banyosu	Nüve- NF-800
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Thermo Scientific-Micro CL 21R
Yatay çalkalayıcı (Shaker)	Lab Companion SK-300
Rotatör	BioSan Multi Bio RS-24
pH Metre	İnolab-PH 7110
Pasteur Fırını	Jeio Tech-ON-12
Otomatik Pipet/Pipet Seti	Nichiryo/ Thermo Scientific
Otoklav Cihazı	HMC Hiclave HG-80
Vorteks	Jeio Tech, Lab Companion

1.2. Kimyasallar

Tablo 3.2. Laboratuvarda Kullanılan Kimyasalların Adı ve Markası

Kimyasal adı	Markası
MTT Reagent	Glenthams Life Sciences
Sodyum Klorür	CalbioChem
Glasiyal Asetik Asit-2X Laemmli- Acr/Bisacrilamid- Coommasie Brilliant Blue Broadford Reagent- Metanol- Tripsin-EDTA- SDS	Sigma
Penicilin/Streptomycin- FBS	Biological Industries
2- Propanol	Merck Millopore
Protein Marker (11-250 kDa)	Invitrogen
%5'lik Yağsız Süt- 10X TBS/10X TBS-T- Sekonder antikor(fare)- Ripa Buffer- PMSF	CST
BSA	Carlo Erba
Mocetinostat- Capecitabine	MedChem
APS- ECL	Thermo Scientific
DMEM-F12	Gibco
DMSO	Merck Millopore
Tripan Blue Solüsyonu (%0,4)	Amresco
Primer Antikor	CST/ Santa Cruz

1.3. Sarf Malzemeler

Tablo 3.3. Laboratuvarda Kullanılan Sarf Malzemeler ve Markası

Sarf adı	Markası
T75 cm ² - T25 Flask	Thermo Scientific
1,5 ml Toplama Tüpü- 2 ml Toplama Tüpü Cryo Tüp (2 ml)- Cam Şişe-	Isolab
6 Kuyucuklu Petri	SPL
PVDF Membran	Merk Millopore
Whatman Kâğıdı	Biorad
Enjektör (10 ml)	Ayset
5 ml -10 ml Serolojik Pipet- 15 ml Falcon 50 ml Falcon	Euro clone

1.4. Tamponlar

MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) Solüsyonu:

10 ml PBS içerisinde 0,05 g MTT kimyasalı tartılmış ve oluşan karışım, filtreden geçirildikten sonra -20 °C’de saklandı.

Hücre dondurma ortamı: Filtreden geçirilen, 9 ml fetal sığır serumu (FBS) ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırıldıktan sonra -20’ °C de saklandı.

APS (%10): 100 mg amonyum persülfat, 1 ml dH₂O’da çözülürülerek hazırlandı.

Transfer (Towbin) Tamponu (1X): 10X Transfer tamponundan 100 ml alınıp üzerine 200 ml metanol eklenerek distile su ile 1000 ml’ye tamamlanarak hazırlandı.

Tris-HCl (10 mM/pH:8): 0,0121 g Tris 10 ml dH₂O’da çözülürüldükten sonra pH:8’e ayarlandı.

Yağsız süt (%5): 5 g yağsız süt tozu 100 ml TBS-T (1X) tamponunda çözülürülerek hazırlandı.

TBS solüsyonu: 6.05 g Tris ve 8.76 g NaCl 800 mL H₂O içinde çözdürüldü. 1 M HCl ile pH'ı 7.5'e ayarlanıp üzeri 1 litre H₂O ya tamamlandı.

TBST solüsyonu: TBS solüsyonuna %1' lik tween 20 eklenmesiyle elde edildi.

1X PBS tamponu: Miktarları ile birlikte verilen kimyasallar, distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmış ve otoklavlandıktan sonra +4 °C'de saklandı (pH 7.4) (Çizelge 3.4.).

Tablo 3.4. PBS Tampon İçeriği

İçerik	Miktar
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Coommasie Brilliant Blue: Miktarları ile birlikte verilen kimyasallar distile su ile 250 ml ye tamamlandıktan sonra +4 °C'de saklandı (Çizelge 3.5.).

Tablo 3.5. Coommasie Brilliant Blue İçeriği

İçerik	Miktar
Coommasie	0,25 g
dH ₂ O	125 ml
Glasiyal asetik asit	25 ml
Metanol	100 ml

Destaining Solüsyonu: Miktarları ile birlikte verilen kimyasallar distile su ile 250 ml ye tamamlandıktan sonra +4 °C'de saklandı (Çizelge 3.6.).

Tablo 3.6. Destaining Solüsyon İçeriği

İçerik	Miktar
dH ₂ O	50 ml
Glasiyal asetik asit	10 ml
Metanol	90 ml

Ayırıcı Tampon (1,5 M): Miktarları ile birlikte verilen kimyasallar distile su ile 1000 ml' ye tamamlandıktan sonra +4 °C'de saklandı(pH:8,8) (Çizelge 3.7.).

Tablo 3.7. Ayırıcı Tampon İçeriği

İçerik	Miktar
Tris	181,5 g
SDS	4 g

Yükleme Tamponu (0,5 M): Miktarları ile birlikte verilen kimyasallar distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra, sonra +4 °C'de saklandı (pH:6,8) (Çizelge 3.8-9).

SDS Poliakrilamid Jel

Tablo 3.8. %4'lük SDS Poliakrilamid Yükleme Jeli İçeriği

İçerik	Miktar
dH ₂ O	1,15 ml
Tris-HCl-SDS	290 µl (0,5 M pH: 6,8)
Acr/Bis (%30, %0,8 w/v)	300 µl
APS	11,25 µl
TEMED	3,75 µl

Tablo 3.9. %12,5'luk SDS Poliakrilamid Ayırma Jeli İçeriği

İçerik	Miktar
dH ₂ O	1,78 ml
Tris-HCl-SDS	1,445 ml (1,5M pH:8,8)
Acr/Bis (%30, %0,8 w/v)	2,340 ml
APS	32 µl
TEMED	9,5 µl

Transfer (Towbin) Tamponu (10X): Miktarları ile birlikte verilen kimyasallar distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra, sonra +4 °C'de saklandı (pH:8,3) (Çizelge 3.10).

Tablo 3.10. 10X Transfer Tamponu İçeriği

İçerik	Miktar
Tris	30,25 g
Glisin	144g

1.5. Kullanılan Hücre Hattı

4T1 fare meme kanseri hücre hattı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY tarafından temin edilmiştir.

2. Yöntemler

2.1. Hücre Kültürü

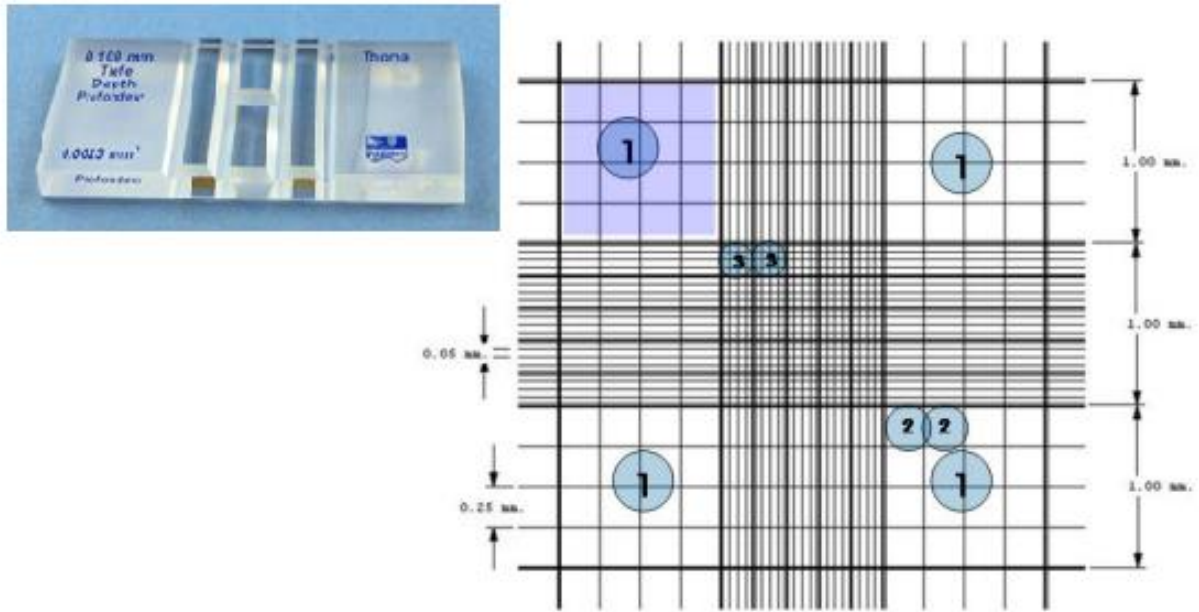
4T1 fare meme kanseri hücre hattı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY tarafından temin edilmiştir. 4T1 meme kanseri hücresi için kullanılan medyanın temel içeriği DMEM F12 olmakla birlikte, besiyerine %10 oranında FBS ve mikrobiyal enfeksiyon gelişmesini engellemek için %0,1 oranında penisilin-streptomisin eklenmiştir. Hücre hattının kültürü %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklık şartlarını sağlayan karbondioksitli inkübatörde (Mettler) steril şartlarda yapılmıştır. Hücrelerin pasajlanması aşağıdaki işlemleri takip ederek yapılmıştır;

1. Hücrelerin T25/75 flasklara ekimi yapılmıştır.
2. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında, flasktaki eski besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenerek üç kez yıkama işlemi yapılmıştır.

3. Daha sonra PBS flasklardan uzaklaştırılıp, hücreler üzerine 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek flask yüzeyinden ayrılması için inkübatörde 3- 5 dk bekletilmiştir.
4. Tripsin inaktivasyonu için eklenilen miktar kadar besi yeri eklendi ve hücreler 15' lik falkona alınmıştır. Santrifüj işlemi 1200 rpm'de 3 dk yapılmıştır.
5. Süpernatant atılarak, pellet üzerine 1ml taze besi yeri eklenmiştir ve hemositometrede hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı belirlenen alanlarda yapılmıştır (Şekil 3.1.).

Hücre sayımı için, Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml) = Hücre sayısı x 10.000/ Dilüsyon faktörü X Alan sayısı formülü kullanılmıştır.

6. Sayılan hücreler, yapılacak deneylere göre ayrılmak üzere T25/T75 flasklara yeniden ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Thoma Lamı ve Sayım Alanı
(Sayım 1 olarak adlandırılan 4 büyük karede yapıldı)

2.2. Kimyasalların Hazırlanması

Mocetinostat (Ma: 396,454 g/mol) ve Capecitabine (Ma: 359,35 g/mol) Medchem Express (New York, USA) firmasından temin edilmiştir. Kimyasalların stok çözeltileri sırası

ile 1mM ve 5mM olmak üzere DMSO (Dimethyl sulfoxide) ile hazırlanmıştır. Hazırlanan kimyasallar 0.22 µm steril filtreden geçirilmiştir. Çalışma stokları besiyeri ile dilüe edilmiştir.

2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi, MTT Analizi

MTT analizi, hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücrel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılmıştır. MTT, canlı hücrelerin mitokondrilerinde meydana gelen dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum bileşiğinin suda çözünmeyen formazan kristallerine enzimatik dönüşümü prensibine dayanan kalorimetrik bir ölçüm yöntemidir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra, 96 kuyucuklu petrilere her kuyucukta 6×10^5 hücre olacak şekilde 4T1 hücrelerinin ekimi gerçekleştirilmiş ve 24 saat hücrelerin plate yapışması için beklenilmiştir. Hücrelere Mocetinostat'ın (1,675 µM- 25µM) ve Capecitabine'nin (800 µM- 2000 µM) belirlenen doz aralıklarında uygulaması yapılmıştır. 48 saatin ardından hücreler üzerine 10 µl MTT eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT eklenen besiyeri uzaklaştırılıp, yerine 100 µl DMSO eklenmiştir ve 5 dk karanlıkta bekletilmiştir. ELİZA (Multiskan™ FC Microplate Photometer, ThermoFisher Scientific, Multiskan FC China) okuyucuda 590 nm' de ölçüm gerçekleştirilmiştir.

İnhibisyon sonuçlarının yüzdesi (IC_{50}), $Y = mx + C$ ($Y =$ İnhibisyon, $x =$ Konsantrasyon, $C =$ Sabit, $m =$ Katsayısı) formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

2.4. Hücre Morfolojisi Analizi

Hücre morfolojisi analizi, uygulanan kimyasalların hücreler üzerindeki morfolojik değişimleri gözlemlemek için yapılmıştır. 4T1 hücreleri, her kuyucukta 1×10^3 hücre yoğunluğunda olmak üzere 6 kuyucuklu petrilere ekimi yapılmıştır. Hücreler flask yüzeyine yapıştıktan sonra, tüm kimyasallar IC_{50} değerlerinde kuyucuklara eklenmiştir. 0, 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücrelerin morfolojileri inverted mikroskopta incelenmiştir.

2.5. Hücre Sağkalım Tayini

Hücre sağkalım deneyi, hücrelere kimyasal uygulandıktan sonra, canlı hücre yüzdesini ölçmek için tripan blue boyası kullanılarak yapılan deneydir. Canlı hücreler, membran bütünlüğü bozulmadığından tripan blue ile boyanmazken, membran bütünlüğü bozulan ölü hücreler ise boyanmaktadır. Hücre canlılığı, boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile yüzde olarak hesaplanabilmektedir. Öncelikle, 6 kuyucuklu petri içerisine 5×10^4 hücre 2 ml besiyeri ile kuyucuklara ekimi yapılmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilerek, hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından kuyucuklar

içerisindeki besiyeri pipetle uzaklaştırılmıştır. MTT testi sonucunda belirlenen IC₅₀ değerleri, Mocetinostat için 3,125 µM, Capecitabine için 1700 µM. Capecitabine +Mocetinostat için 50 µM +1,5 µM hücrelere uygulanmıştır. Hücreler Mocetinostat, Capecitabine ve kombine gruplar olacak şekilde ayrıldı ve hücreler 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayımları yapılmak üzere inkübe edilmiştir. Belirlenen saatlerde hücrelere tripsinizasyon işlemi yapılmış ve toplama tüpüne hücreler alınmıştır. 2000 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 50 µl besiyeri ve 50 µl tripan mavi boyası eklenerek hemositometrede sayımı yapılmıştır.

2.6. DNA Fragmentasyon Analizi

Apoptoz yoluyla hücre ölümünü doğrulamak için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak DNA laddering analizi yapılmıştır. 4T1 hücreleri (1x10⁶), T75 flasklara ekilerek ve 24 saat inkübe edildi. Hücrelere Mocetinostat (3,125 µM), Capecitabine (1700 µM), Capecitabine+Mocetinostat (1,5 µM +50 µM) uygulanmıştır. 48 saat inkübasyondan sonra gruplardaki hücrelerin DNA izolasyonu gerçekleştirilerek, 0.1 ug/mL etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde görüntüsü analiz edilmiştir.

2.7. Yara İyileşme Deneyi

Capecitabine (1700 µM), Mocetinostat (3,125 µM), Capecitabine +Mocetinostat (1,5 µM +50 µM)'ın hücreler üzerine uygulanmasının, lateral hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerinin incelenebilmesi için yara iyileşmesi (wound-healing) deneyi gerçekleştirilmiştir. 5x10⁴ hücre 2 ml besiyeri ile hazırlanıp 6 kuyucuklu petrilere ekimi yapılmıştır. Hücreler flask yüzeyine yapıştıktan sonra, yapışan hücreler üzerine 200 µl'lik pipet ucu ile düz bir hat oluşturulmuştur. Yüzeyden ayrılan hücreler, PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası kontrol grubuna sadece besiyeri eklenirken, diğer kuyucuklara IC₅₀ değerinde Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat eklenmiştir. Belirlenen saatlerde yara genişliği inverted mikroskop ile kaydedilmiştir. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

2.8. Koloni Oluşum Deneyi

Capecitabine ve Mocetinostat'ın hücrelerdeki metastatik etkisini gösterme ve bu ilaçlara maruz kalan tek hücrelerin koloniler halinde büyüebilme yeteneğine dayanan deneydir. Hücreler 6 kuyucuklu petrilere 1X10⁴ hücre ekilmiştir. 24 saat sonra belirlenen ilaç dozları hücreler üzerine uygulanmış ve yaklaşık 12 gün boyunca %5 CO₂ içeren nemli 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin üç günde bir besiyeri değiştirilerek yaklaşık 12 gün sonra hücreler mikroskop altında incelenmiştir. Hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler, 15

dakika boyunca metanol ile sabitlenerek Giemsa Boyası ile boyanmış ve inverted mikroskop altında incelenmiştir.

2.9. Western Blot Deneyi

Western Blot Deneyi, 4T1 meme kanseri hücrelerine uygulanan Capecitabine (1700 μ M), Mocetinostat (3,125 μ M) ve Capecitabine 50 μ M+ Mocetinostat'ın (1,5 μ M) apoptotik sinyal yolu üzerinde yer alan proteinler üzerindeki etkisini incelemek için gerçekleştirilmiştir.

2.9.1. Total Protein İzolasyonu

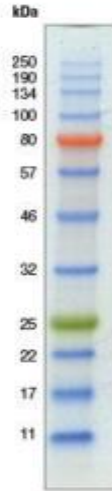
Hücrelerden protein izole etmek için, 1×10^6 hücre T25 flask içerisine ekildi ve hücrelerin flask yüzeyine yapışması için 24 sa. 37C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Flasklar kontrol Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine + Mocetinostat grubu, olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece besiyeri eklenirken; diğer gruplara belirlenen ilaçlar eklenmiştir. 24 saat sonunda eski besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 2ml soğuk 1X PBS ile yıkanarak scraper ile hücreler flask yüzeyinden ayrılmıştır. Toplama tüpüne alınan hücreler, 13200 rpm'de +4C'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Pellete proteaz aktivitesini inhibe eden ve verimli hücre lizisi sağlayan 50 μ l RIPA solüsyonu (sodyum deoksikolat, %10 SDS, 10 mM Tris-HCl pH: 7.5, 2 mM EDTA 150 mM NaCl, NP 40) eklenmiştir. Örnekler, 5 dk. buz üzerinde, daha sonra oda sıcaklığında 15 dk. bekletilmiştir. Hücreler 13200 rpm'de 15 dk. +4°C' de santrifüj edilmiş ve örnekler -80 C' ye kaldırılmıştır.

2.9.1.1. Protein Konsantrasyonlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Bradford protein testi, çeşitli protein konsantrasyonlarına yanıt olarak bir boyanın farklı renk değişimine dayanan bir boya bağlama testidir. Bradford yöntemi konsantrasyonu bilinen BSA (Bovine Serum Albumine) değerini baz alarak konsantrasyonu bilinmeyen protein değerinin hesaplanması amacıyla yapılmaktadır. Öncelikle BSA, 0.025 g tartılarak 1 ml suda çözülerek hazırlanmış ve dilüe edilmiştir. 96 kuyucuklu petrilere 1, 2, 3, 4, 5'er μ l BSA üzerine 200 μ l bradford reaktifi eklenmiştir. Diğer kuyucuklara Kontrol, Mocetinostat, Capecitabine ve Capecitabine+Mocetinostat gruplarından 1 μ l örnek alınarak üzerine 200 μ l bradford reaktifi eklenmiştir. Her örnekten 3 kuyucuk hazırlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra ELISA Reader'da 595 nm'de ölçümü yapılmıştır. Excel programına veriler kaydedilmiş ve ortalamaları (AV) alınmıştır. $y=ax$ denklemine göre jele yüklenecek protein miktarı (μ l) hesaplanmıştır. Proteinler jele yüklenmeden önce, 1:1 oranında 2X Laemmli ile süspanse edilip su banyosunda 96 °C' de 5 dk bekletilerek denatüre edilmiştir

2.9.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi

β -aktin (CST-4967), Bcl2(sc-7382), HDACI(sc-81598), Akt(sc-5298), PI3K(sc-1637), C-myc(sc-40), HDACIII(sc-376957), Bax(sc-20067), kaspaz-3(CST-9662), PTEN(sc-7974), Parp(sc-8007), kaspaz7(CST-9492), kaspaz-9(CST-9508), p53(sc-126) proteinleri için %12,5'lük ayırıcı jel ve %4'lük yükleme jeli hazırlanmış ve 250 kDa'luk protein marker kullanılmıştır (Şekil 3.2.) Kuyucuklara 30 μ g protein olacak şekilde yükleme yapılarak örnekler akrilamid jele yüklenmiştir. Örnekler 90 V'ta 1 sa. ve 120 V'ta 2 sa. yürütülmüştür. Proteinler akrilamid jelden PVDF membrana 100 V'ta 90 dk. da wet transfer sistemi kullanılarak aktarılmıştır. Bloklama işlemi için membran %5'lik yağsız süt içerisinde 1 saat boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Antikorların membrana nonspesifik olarak bağlanmasını önlediğinden, bloklama western blotlamanın çok önemli bir adımıdır. Bloklamadan sonra membranlar +4C'de 24 saat önce uygun primer (1:100) de sonra ise sekonder antikorlar (1:1000) ile muamele edilmiştir. Membran yıkama işlemi için TBS-T ve TBS solüsyonları kullanılmıştır. Membranlar kemilüminesans ajanlar (ECL) ile muamele edilerek protein görüntülenmesi sağlanmıştır. ECL immüno blotlar üzerinde HRP tespiti için oldukça hassas, radyoaktif olmayan, geliştirilmiş luminol bazlı kemilüminesans substrat olarak kullanılmıştır. Protein bantları, Image J programı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Western Blot Yönteminde Kullanılan Protein Marker

Kaynak: (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26616>)

3. İn Vivo Çalışmalar

3.1. Deneysel Meme Kanseri Oluşturma

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, 8 haftalık 25-30 g ağırlığında toplam 35 adet BALB/c dişi fare kullanıldı. Hayvanlar uygun refah koşullarında; 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda sıkıca kapatılabilen, saydam, sert plastik kafesler içinde barındırılarak serbestçe beslenmeleri ve su içmeleri sağlanmıştır. Deney başlamadan önce hayvanlar bir hafta boyunca bekletilerek ortama alıştırmıştır. Çalışmamızda yapılan tüm işlemler Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) 09/02/2022 tarihli ve 2022-02 karar numarası ile onaylanmıştır.

3.1.2. 4T1 Meme Kanseri Hücresinin İnokulasyonu

Capecitabine ve Mocetinostat'ın tekli ve kombine etkisinin in vivo olarak incelenmesi için 4T1 meme kanseri hücreleri belirtilen şartlarda çoğaltılmıştır. Her bir fareye meme kanseri modeli için $1,5 \times 10^6$ 4T1 fare meme tümör hücresi 200 µl steril PBS çözeltisi ile hazırlanmış ve 4. meme çifti yağ dokusuna ortotopik yöntem ile hayvanlara enjekte edilmiştir. Bu modelde, meme tümör hücreleri, birincil tümör nodüllerini oluşturmak için meme yağ dokusuna nakledilmektedir. Primer tümör daha sonra insan meme kanseri hastalarında olduğu gibi cerrahi olarak çıkarılmaktadır (Pascall, 2016).

3.1.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Kimyasalların in vivo antitümör etkinliğini belirlemek için her grupta 7 fare olmak üzere, 5 gruba toplamda 35 BALB/c dişi fare olmak üzere ayrılmıştır (Şekil 3.3.).

- 1. Negatif Kontrol Grubu:** Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına %0,1 DMSO (Mocetinostat ve Capecitabine çözücüsü olduğundan) ip. (intraperitoneal) olarak verilmiştir.
15. gün sonunda 4T1 hücreleri verilen ve tümör oluşumu (200 mm^3) gözlenen hayvanlar tekrar 4 alt gruba ayrılmıştır (Tablo 3.1.);
- 2. Pozitif kontrol grubu:** Bu grubu oluşturan deney hayvanlarına %0,1 DMSO (Mocetinostat ve Capecitabine çözücüsü olduğundan) i.p (intraperitoneal) olarak verilmiştir.
- 3. Capecitabine Uygulanan grup:** Bu gruptaki deney hayvanlarına 21 gün boyunca günde bir kez Capecitabine DMSO içinde çözülerek 90 mg/kg i.p olarak verilmiştir.

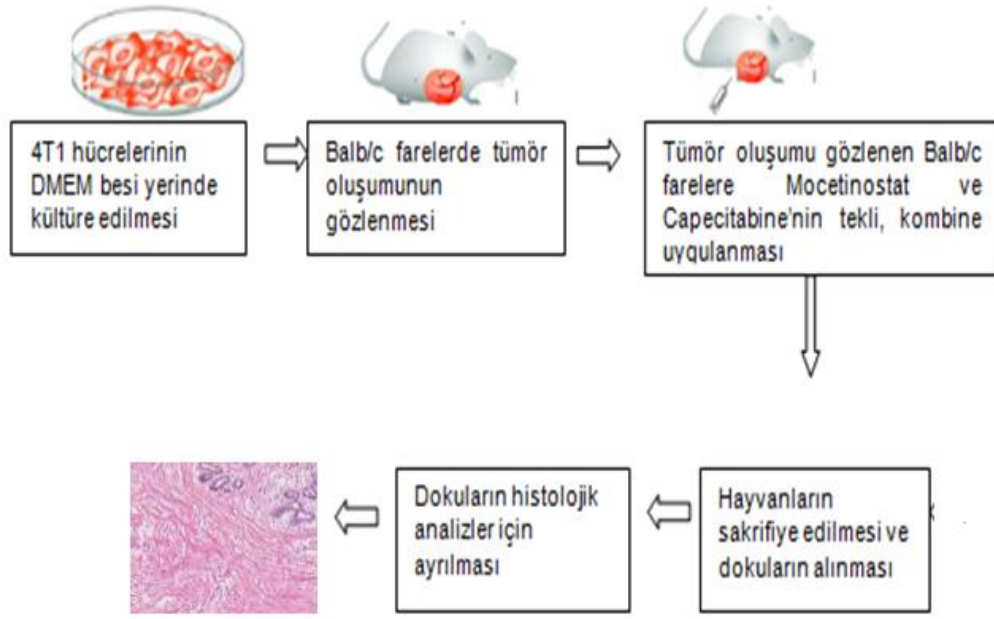
4. Mocetinostat Uygulanan Grup: Bu gruptaki deney hayvanlarına 21 gün boyunca günde bir kez Mocetinostat DMSO içinde çözülerek 50 mg/kg i.p olarak verilmiştir.

5. Mocetinostat+ Capecitabine Uygulanan Grup: Bu gruptaki deney hayvanlarına 21 gün boyunca günde bir kez Mocetinostat, Capecitabine DMSO içinde çözülerek Capecitabine (90 mg/kg i.p) + Mocetinostat (50 mg/kg i.p) olarak verilmiştir.

Hayvanlara uygulanan tedavi, belirtilen gruplar ve dozlar halinde her gün aynı saatte 21 gün boyunca uygulanmıştır.

Tablo 3.1. İn Vivo Deney Grupları

Tümör inokülasyonu	Tümör oluşumu (~ 200mm ³)	Tedavi süreci	Ötanazi
4T1 fare meme kanseri hücre hattı	Kontrol grubu %0,1 DMSO	21. gün	21. gün sonu
	Capecitabine 90 mg/kg i.p		
	Mocetinostat 50 mg/kg i.p		
	Mocetinostat (50 mg/kg i.p) + Capecitabine (90 mg/kg i.p)		



Şekil 3.3. İn Vivo Deney Süreci

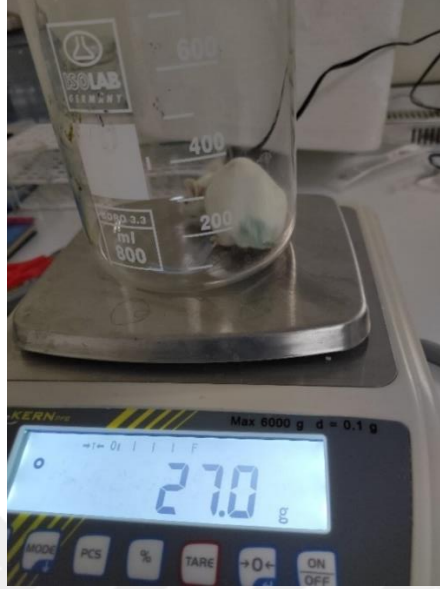


Şekil 3.4. BALB/c Dişi Farelerde Meme Kanseri Oluşturma

Her bir fareye (BALB/c) meme kanseri modeli için $1,5 \times 10^6$ 4T1 fare meme tümör hücresi 200 μ l steril PBS çözeltisi içerisinde 4. meme çifti yağ dokusuna ortotopik yöntem ile enjekte edilmiştir. İnokülasyondan yaklaşık 15 gün sonra tümör oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.4).

3.1.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Hayvanların vücut ağırlıkları, tüm gruplarda deney başlamadan ve 21 günlük deney süresi boyunca hassas terazi yardımıyla ölçülüp, değerler kaydedilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Deney Hayvanlarının Hassas Terazide Tartılması

3.1.5. Dokuların Alınması

Hayvanların Ketamin (90 mg/kg) + ksilazin-hidroklörür (10 mg/kg) verilerek anestezisi sağlanmıştır. Daha sonra servikal dislokasyon uygulanmıştır. Deney için gerekli olan tümör dokusu ve meme kanserinin en çok metastaz yaptığı bilinen akciğer dokusu çıkarılmıştır.

3.1.6. Tümör Ağırlıklarının Ölçümü

Kontrol, Mocetinostat, Capecitabine ve Capecitabine+Mocetinostat şeklinde gruplandırılan hayvanların tümör ağırlıkları 21. gün sonunda ölçülüp, kaydedilmiştir.

3.1.7. Dokuların Hematoksilen-Eozin (H+E) Boyanması

Primer tümörlerin ve metastazların histolojik incelemesi için parafine gömülü dokunun standart H+E boyaması kullanılmıştır. Dokular, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra %10'luk nötral formalin fiksatifine konulmuştur. Dokular bloklanarak, mikrotom cihazında 4 mm kalınlığında kesitleri alınmıştır. Preparatlar H+E boyası ile boyanarak, ışık mikroskobu ile histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Microsoft Excel 2010 (Microsoft, ABD) ve GraphPad Prism, versiyon 5.0 (GraphPad, ABD) programları kullanıldı. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki önemli farklılıkları netleştirmek için tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Western-blot deney sonuçları “Image G” programı ile analiz edildi. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.



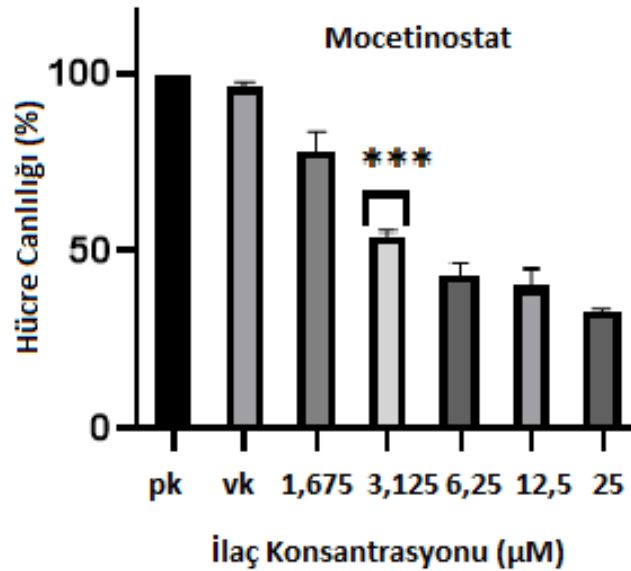
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

1. İn Vitro Bulgular

1.1. Mocetinostat'ın 4T1 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Mocetinostat'ın 4T1 hücre hattında doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenebilmesi amacıyla MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için 4T1 hücrelerine artan konsantrasyonlarda Mocetinostat (1,675 μ M- 25 μ M) 48 saat boyunca uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde Mocetinostat'ın artan dozlarıyla birlikte 4T1 hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi ve IC₅₀ değeri 3,125 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.).



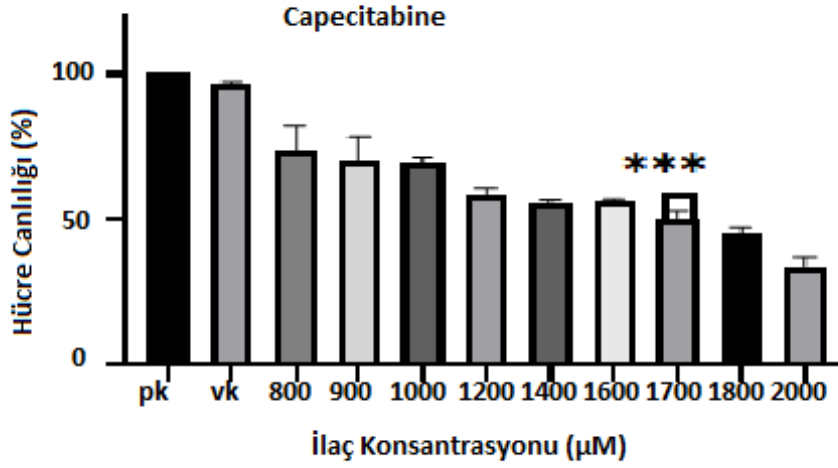
Şekil 4.1. Mocetinostat'ın Farklı Dozlarının (1,675 μ M- 25 μ M) 4T1 Hücre Hattında 48 Saatteki Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

(İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu (pk), negatif kontrol grubunda (vk) ise besi yerinde %0,1 DMSO çözündürülmüştür.)

1.2. Capecitabine'nin 4T1 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Capecitabine'nin 4T1 hücre hattında doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenebilmesi amacıyla MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için 4T1 hücrelerine artan konsantrasyonlarda Capecitabine (800 μ M- 2000 μ M) 48 saat boyunca uygulanmıştır. Elde

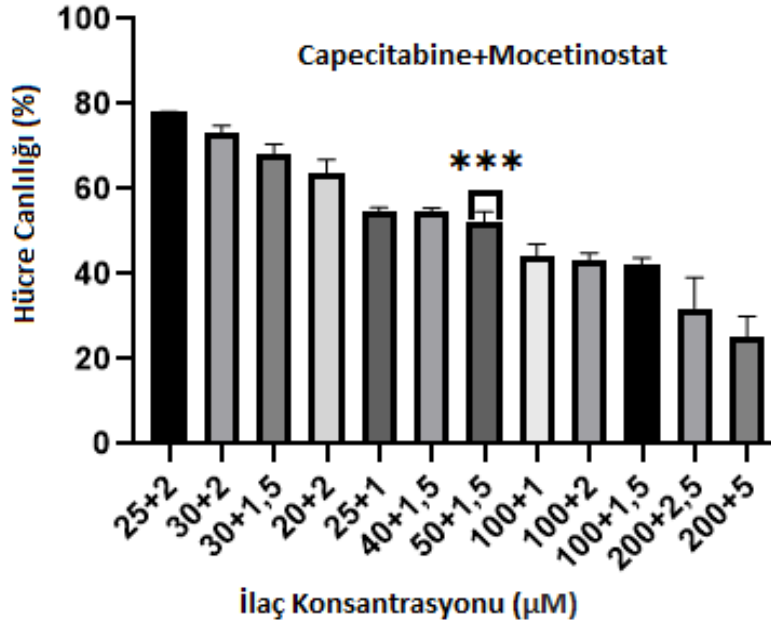
edilen sonuçlar neticesinde Capecitabine'nin artan dozlarıyla birlikte 4T1 hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir ve hücrelerdeki yarı-maksimal (%50) inhibitör konsantrasyonu 1700 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Capecitabine'nin Farklı Dozlarının (800- 2000 μ M) 4T1 Hücre Hattında 48 Saatteki Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi
(İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu (pk), negatif kontrol olarak(vk) ise besi yerinde ise %0,1 DMSO çözdürüldü)

1.3. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Kombine Uygulamasının 4T1 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine uygulamasının 4T1 hücre hattında doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenebilmesi amacıyla MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için 4T1 hücrelerine Capecitabine ve Mocetinostat konsantrasyonları sırasıyla 25 μ M+2 μ M, 30 μ M +2 μ M,30 μ M +1,5 μ M, 20 μ M +2, 25 μ M +1 μ M, 40 μ M +1,5 μ M, 50 μ M +1,5 μ M, 100 μ M +1 μ M, 100 μ M +2 μ M, 100 μ M +1,5 μ M olarak belirlendi ve hücrelere 48 saat boyunca uygulanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Farklı Dozlarının 4T1 Hücre Hattında 48 Saatteki Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

(İlaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu (pk), negatif kontrol olarak (vk) ise besi yerinde ise %0,1 DMSO çözdürüldü)

Elde edilen sonuçlar neticesinde Capecitabine ve Mocetinostat'ın birlikte uygulanması ile 4T1 hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir ve hücrelerdeki inhibitör konsantrasyonları 50 µM Capecitabine+1,5 µM Mocetinostat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Deneyler üç tekrarlı yapıldı.

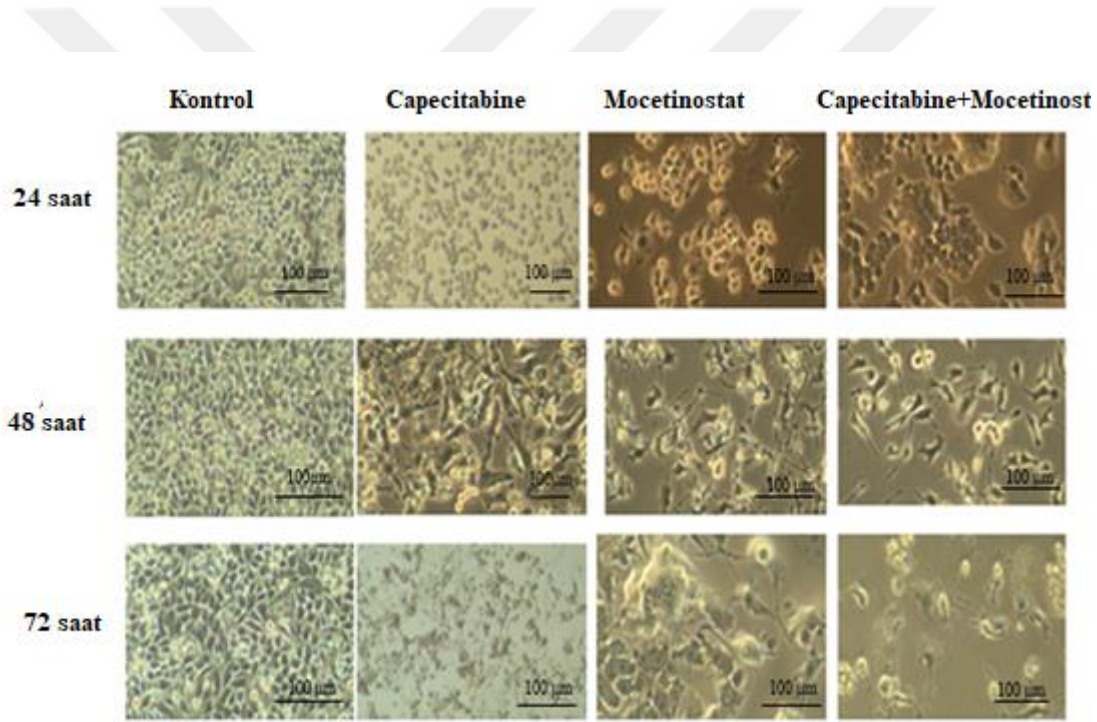
Yapılan MTT sonuçları değerlendirildiğinde, 48 saatlik deney süresi sonunda Capecitabine ve Mocetinostat'ın artan konsantrasyonlarının 4T1 meme kanser hücreleri üzerinde yüksek toksik etki gösterdiği bulunmuştur. 4T1 meme kanser hücrelerinde Mocetinostat 25 µM'da, Capecitabine ise 1800 µM da oldukça yüksek toksisite gösterdiği ve hücre canlılığının yaklaşık %70 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Özetle, kimyasalların tekli ve kombine sonucu elde edilen IC₅₀ değerlerine bakılacak olursa, tekli uygulanan ilaçlar yüksek konsantrasyonda hücre hattı üzerine etkiliyken, kombine uygulamada ilaçların düşük konsantrasyonunun hücreler üzerinde etkisi gözlenmiştir.

1.4. Hücre Morfolojisi Analizi

4T1 hücrelerinin morfolojilerini incelemek için kontrol grubu, Mocetinostat, Capecitabine uygulanan grup ve Capecitabine +Mocetinostat uygulanan grubun zamana bağlı değişimleri (24 saat, 48 saat, 72 saat) inverted mikroskopta incelenmiştir.

4T1 hücreleri üzerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat ilaç uygulamasıyla birlikte hücrelerde; hücre çekirdeğinde yoğunlaşma, hücre yoğunluğu ve sayısında azalma, hücre boyutunda küçülme ve hücre uzantılarının kaybolup hücrelerin yuvarlak şekle dönüşmesi gibi anormal değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 4.4.). Bu sonuçlar ile uygulanan kimyasalların zamana ve konsantrasyonuna bağlı olarak, 4T1 hücre hattı üzerinde etkin olduğu gösterilmiştir.

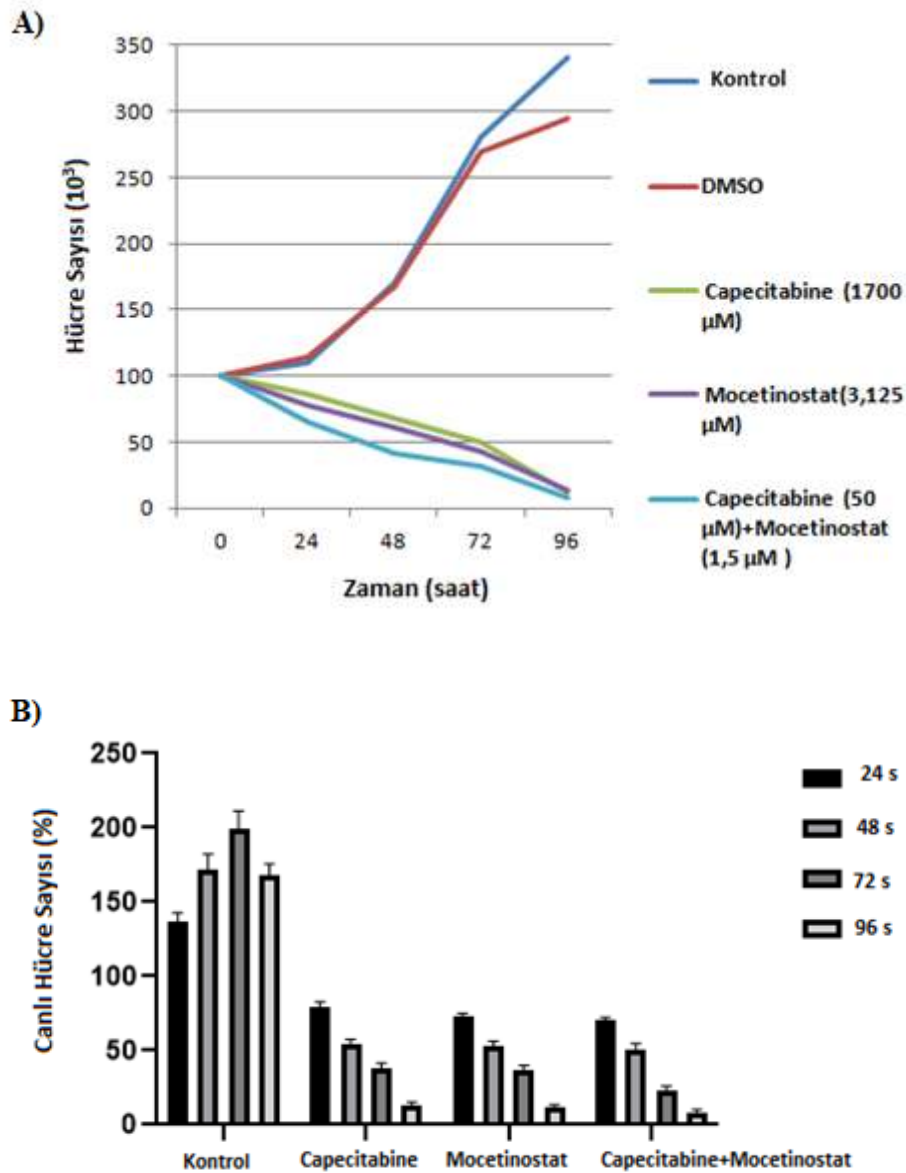


Şekil 4.4. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerinde Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat İlaç Uygulanması İle Hücrelerin Zaman Bağlı Olarak Değişen Morfoloji Görüntüleri

1.5. Hücre Sağkalım Tayini

4T1 hücre hattı kültüre edildikten sonra 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat uygulanmıştır. Kontrol grubunda hücre sayısı zaman bağlı olarak artış gösterirken, Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat uygulanan hücre gruplarında hücre proliferasyonunda önemli bir azalma gözlemiştir. Sayımlar

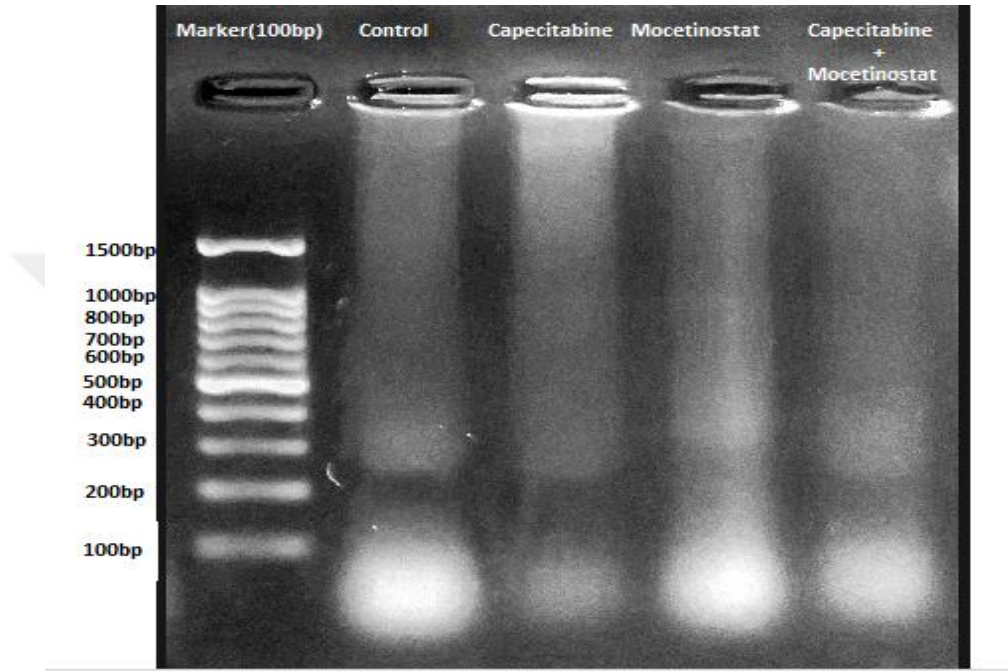
sonucunda tüm gruplarda ölü ve canlı hücre oranları hesaplanmıştır. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Capecitabine uygulanan grupta zamana bağlı olarak hücre sayısı %24, %45,2, %69,1 ve %86,6 oranında, Mocetinostat uygulanan grupta %28, %42, %61,5 ve %77,8 oranında, Capecitabine ve Mocetinostat uygulanan grupta ise %16, %34,3, %51,5 ve %88,2 oranında artan bir öldürücü etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 19). İlaçların kombine uygulamasında, ilaçlar düşük doz konsantrasyona sahip olmasına rağmen öldürücü etkisi, yüksek konsantrasyonlu tekli uygulamaya yakın olduğunu düşünmekteyiz



Şekil 4.5. Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat Uygulanması Sonucu 4T1 Meme Kanseri Hücrelerinin Zamana Bağlı Hücre Sayısı (A) ve Canlı Hücre Sayısı Grafiği (B)

1.6. DNA Laddering Deneyi

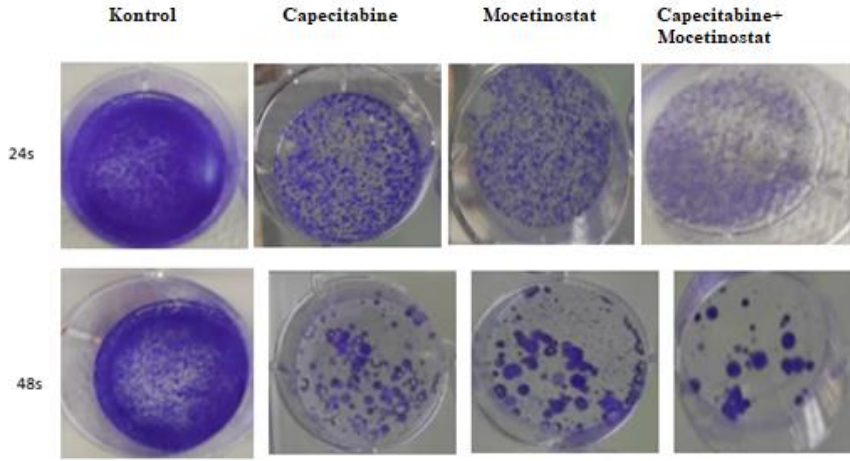
Capecitabine, Mocetinostat ve Capecitabine+Mocetinostat'ın antitümör aktivitesi, DNA laddering deneyi ile doğrulanmıştır. DNA laddering deneyi kaspaz-3'ün aktive olmasıyla hücreler apoptoza gitmektedir. Kimyasalların kullanılmasıyla meme kanseri hücrelerinde DNA hasarı oluşmuştur ve bu hasar jelde fragmentasyon şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kontrol, Capecitabine, Mocetinostat ve Capecitabine+Mocetinostat Uygulanan Hücrelerden Elde Edilen DNA Jel Görüntüsü

1.7. Koloni Oluşum Deneyi

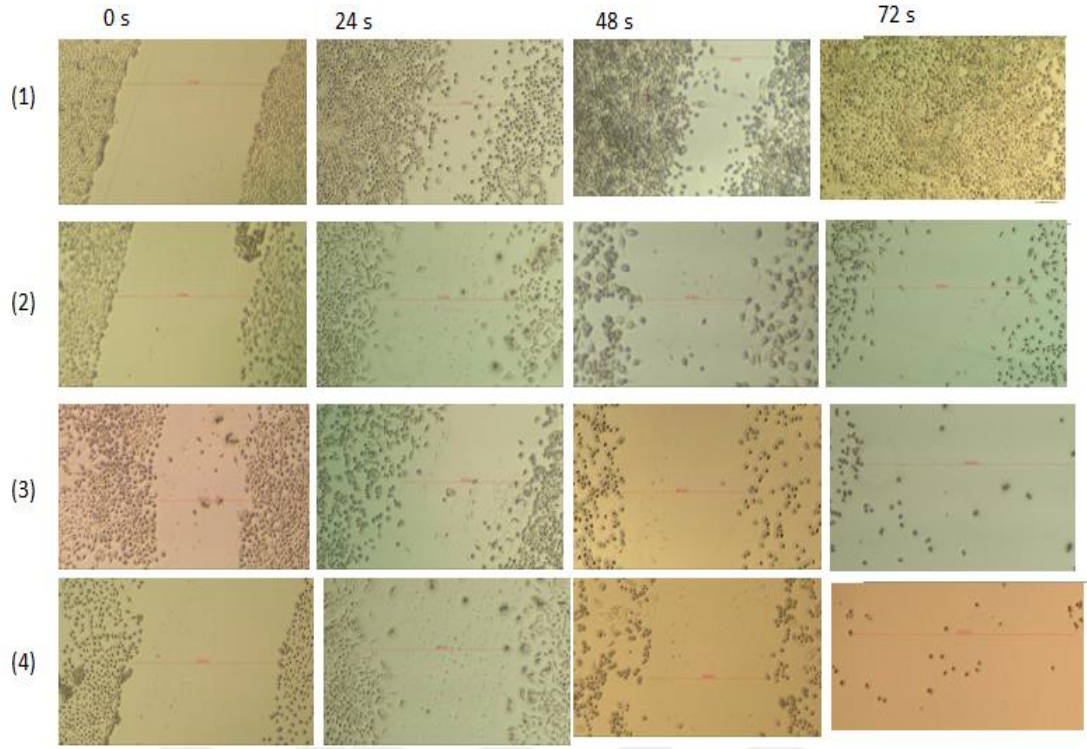
Capecitabine ve Mocetinostat'ın hücrelerdeki metastatik etkisini ve tek hücrelerin koloniler halinde büyüebilme yeteneğine dayanan bir in vitro hücre hayatta kalma deneyidir. Mocetinostat, Capecitabine ve kombine ilaç uygulanan 4T1 meme kanseri hücre proliferasyonu zaman bağlı olarak kontrol grubuna göre azalmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Capecitabine ve Mocetinostatın 4T1 Meme Kanseri Hücre Hatlarının Metastaz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

1.8. Yara İyileşme Deneyi

Hücre-hücre etkileşimi ve migrasyonu için yapılan bu deneyde 4T1 meme kanseri hücrelerinin Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine +Mocetinostat tedavisinden 24 saat, 48 saat, 72 saat sonra yara genişliğinde olan hücre yoğunluğu kaydedilmiştir. Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine +Mocetinostat tedavi edilen hücrelerin göç hızı, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücrelerin göç hızının oldukça azaldığı gözlenmiştir. Kontrol grubunun yara genişliği 0. saatte ortalama 851,7 μm olarak kaydedilmiş olup, 72. saat sonunda yara genişliğinin tamamen kapandığı gözlenmiştir. 48 saatte ise kontrol grubu 456,05 μm , Capecitabine 866,50 μm , Mocetinostat 825,17 μm , Capecitabine+Mocetinostat 856,14 μm olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.8.). Bu sonuçlar 4T1 hücrelerinde zamana bağlı olarak ilaç tedavisi ile hücre proliferasyonunun azalması ve yara genişliğinin artması gözlemlenmiştir.

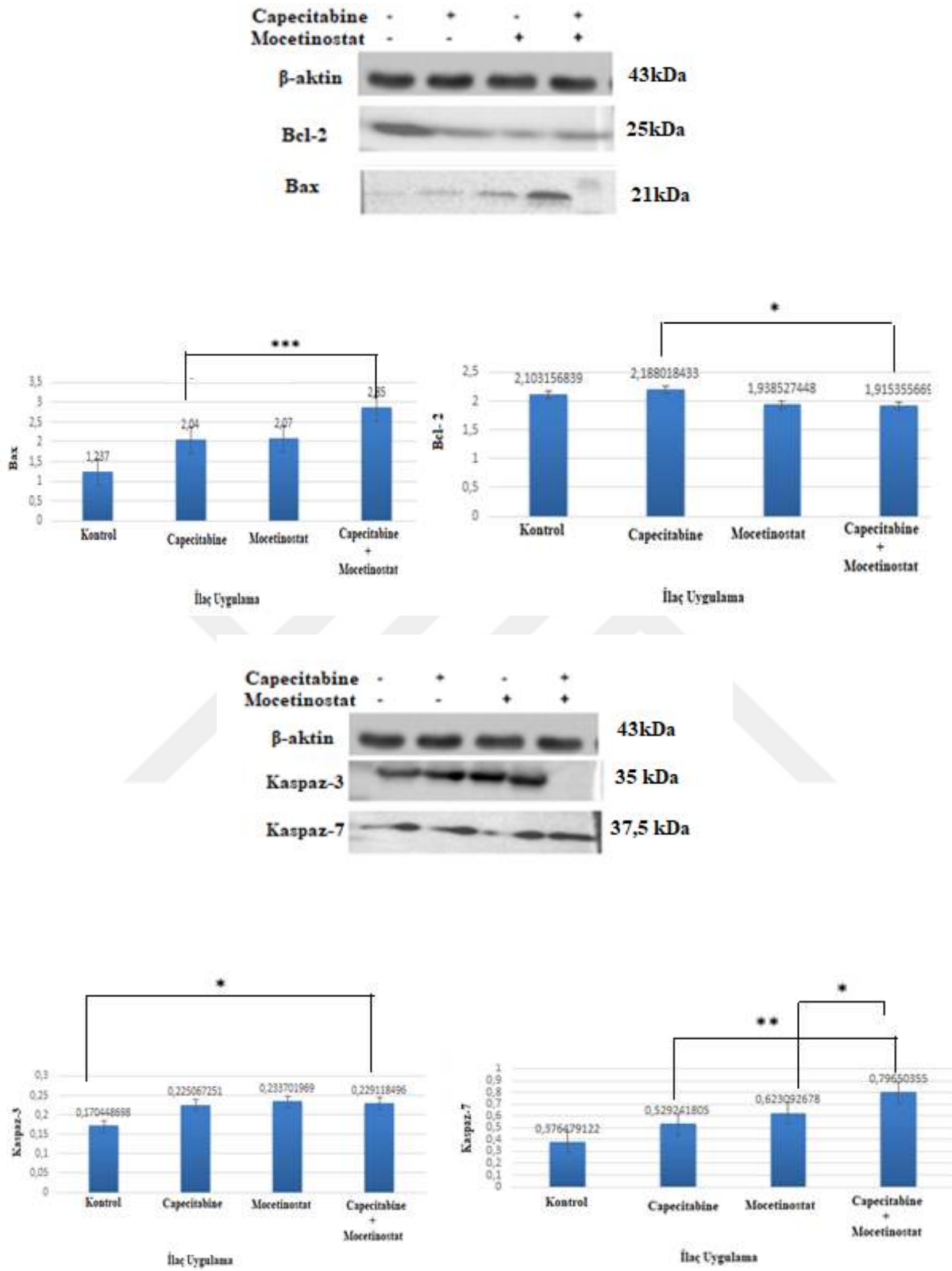


Şekil 4.8. Capecitabine Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat Uygulamasının Hücre Göçü Üzerine Etkisi

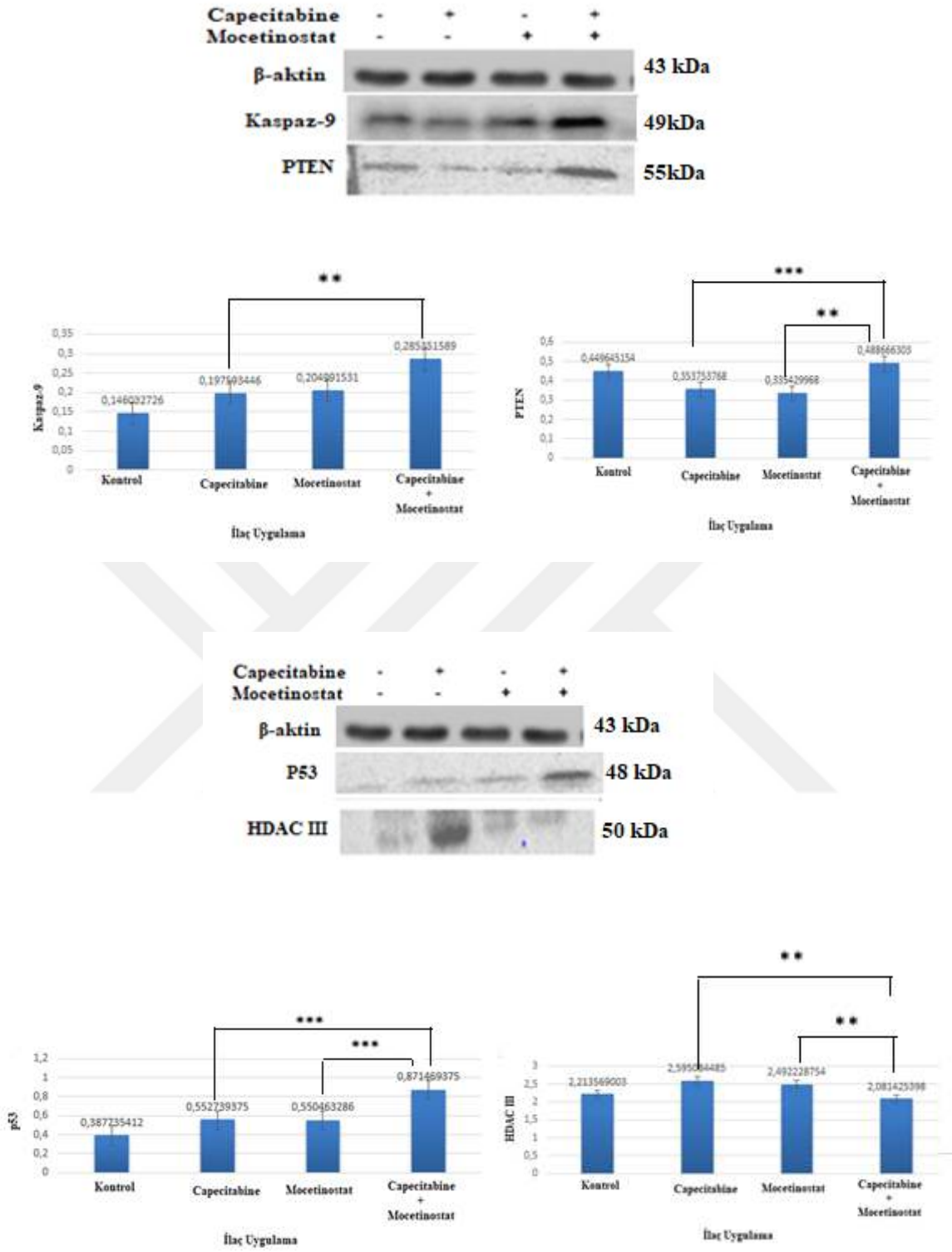
1. Kontrol grubu; 2. Capecitabine uygulanan grup 3. Mocetinostat uygulanan grup 4. Capecitabine+Mocetinostat uygulanan grup; s: saat (4X-Nikon Eclipse TS100)

1.9. Western Blot Analizi

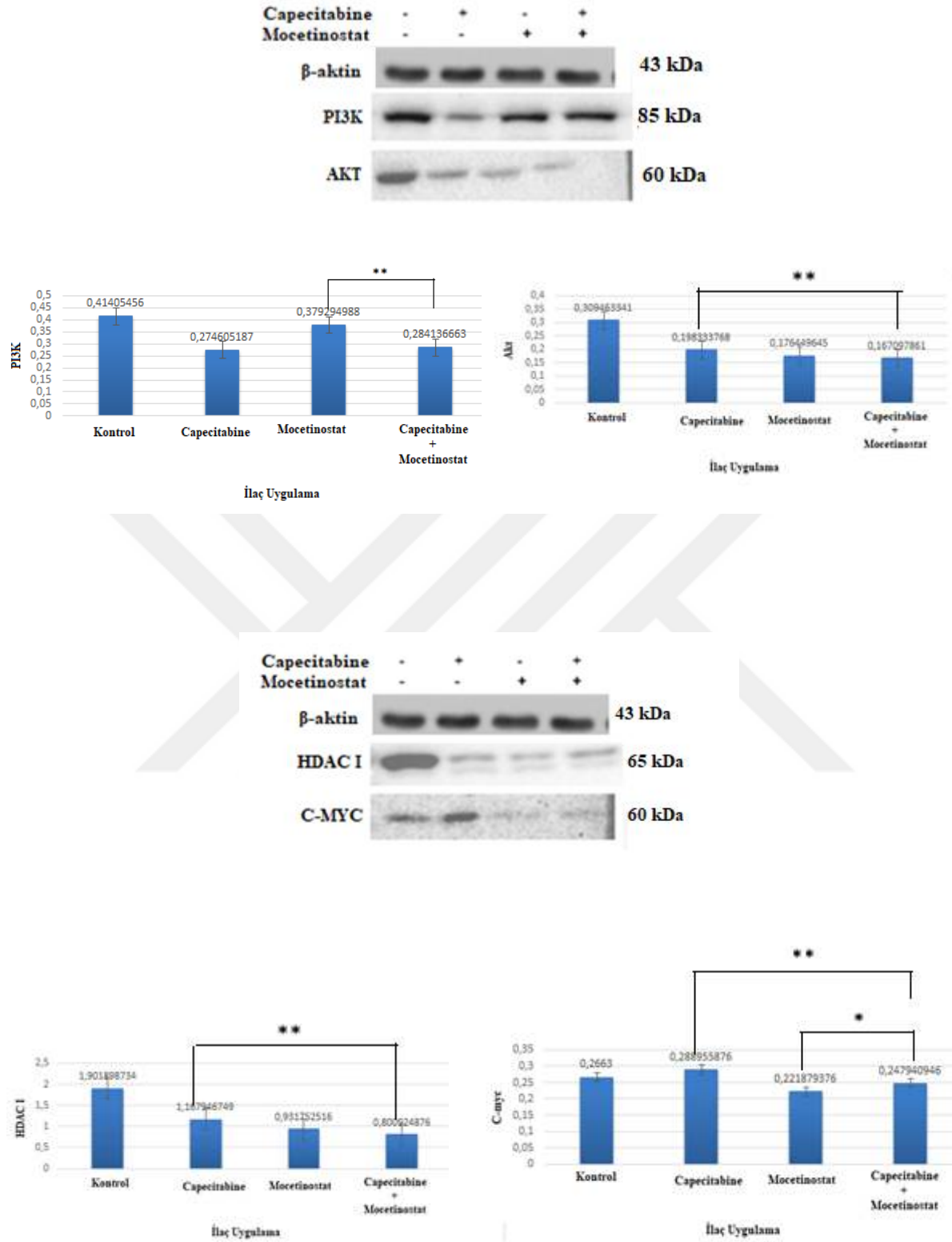
4T1 meme kanseri hücrelerine, Capecitabine (1700 μ M), Mocetinostat (3,125 μ M) ve Capecitabine (50 μ M) +Mocetinostat (1,5 μ M) 'ın apoptotik sinyal yolu üzerindeki etkilerini incelemek için, ilaç uygulamasından 48 saat sonra western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizi sonuçlarına göre; Bcl2, HDACI, AKT, PI3K, C-myc, HDACIII proteinlerinin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı ve Bax, kaspaz-3, PTEN, kaspaz-7, kaspaz-9, p53 protein ekspresyonu, Capecitabine ve Mocetinostat' ın birlikte uygulanması ile birlikte önemli ölçüde arttı gözlemlenmiştir (*p <0.05, **p <0.001, <0.05, **p < 0.0001) (Şekil 4.9.-4.11.).



Şekil 4.9. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat Uygulamasıyla Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-7 Protein Seviyeleri



Şekil 4.10. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat Uygulamasıyla Kaspaz-9, PTEN, P53 ve HDACIII Protein Seviyeleri

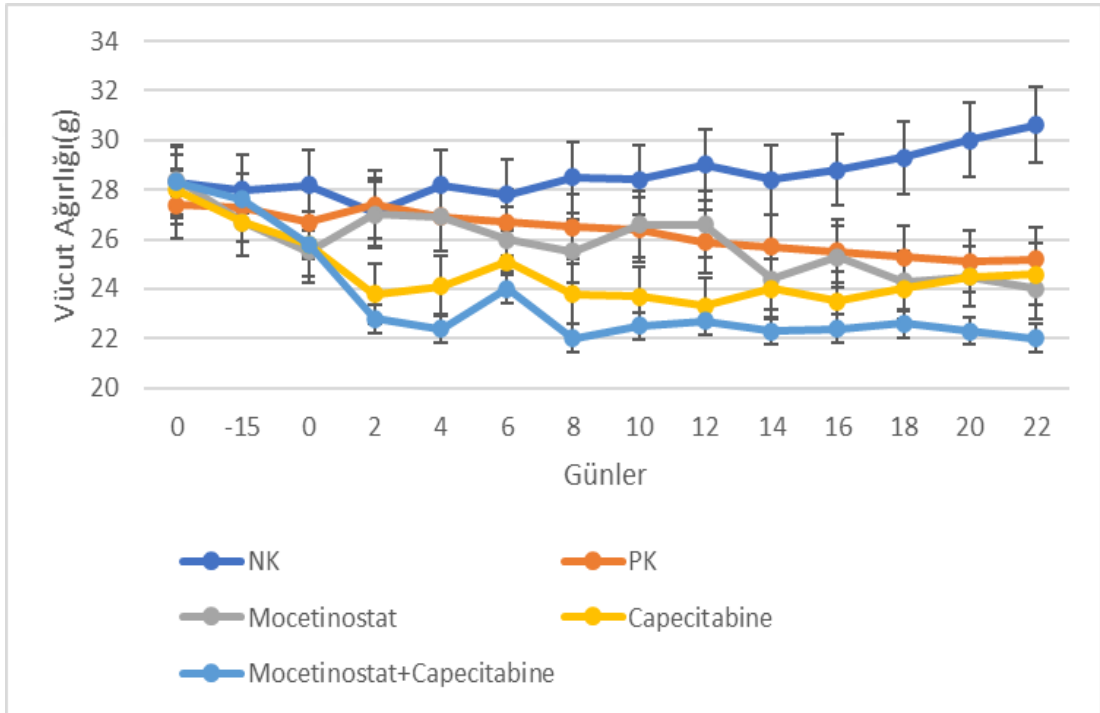


Şekil 4.11. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerine; Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+ Mocetinostat Uygulamasıyla PI3K, AKT, HDAC I ve C-myc Protein Seviyeleri

2. İn Vivo Deney Sonuçları

2.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

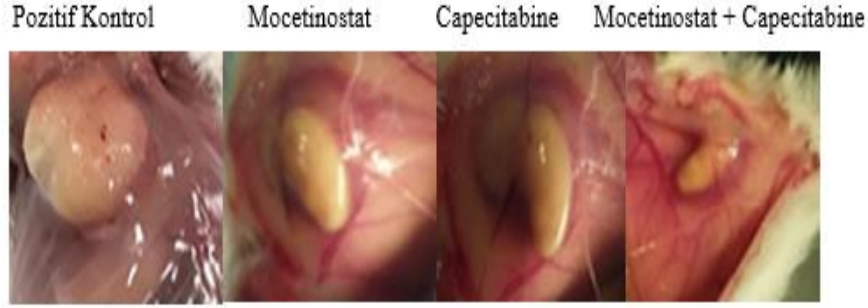
Deney hayvanları ilk alındığında vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar gruplandırılmıştır (~ 28-30 g). Tümör oluşturulmadan önce hayvanların vücut ağırlıklarında bir değişim gözlenmemişken, tümör oluştuktan ve tedaviye başlandıktan sonra vücut ağırlıkları zamanla azalmıştır. NK grubunda vücut ağırlıkları zamana bağlı artış gösterirken diğer gruplarda azalış göstermiştir. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla Mocetinostat ve Capecitabine uygulanan grupta yaklaşık %18 oranında vücut ağırlığında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.12).



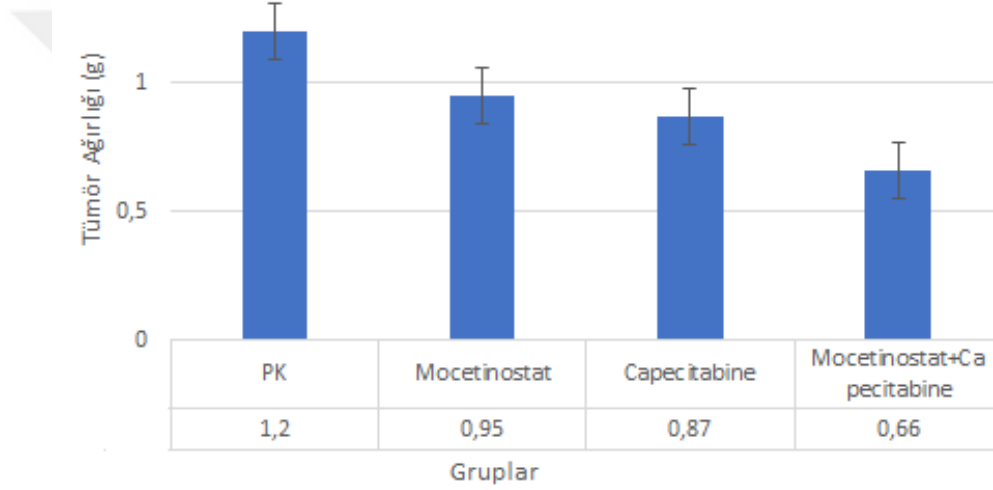
Şekil 4.12. NK (Negatif kontrol), PK (Pozitif kontrol), Mocetinostat, Capecitabine, Mocetinostat+Capecitabine Uygulanan Gruplardaki Hayvanların Vücut Ağırlıkları Değişimi

2.2. Tümör Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Disseksiyon işleminden sonra her gruptaki hayvanlardan tümörlü meme dokusu alınıp hassas terazi ile tartılmıştır. Pozitif kontrol grubunda tümör ağırlığı 1,2 g iken tedavi uygulanan diğer gruplarda tümör dokusu ağırlığı azalmıştır (Şekil 4.13. ve 4.14.).



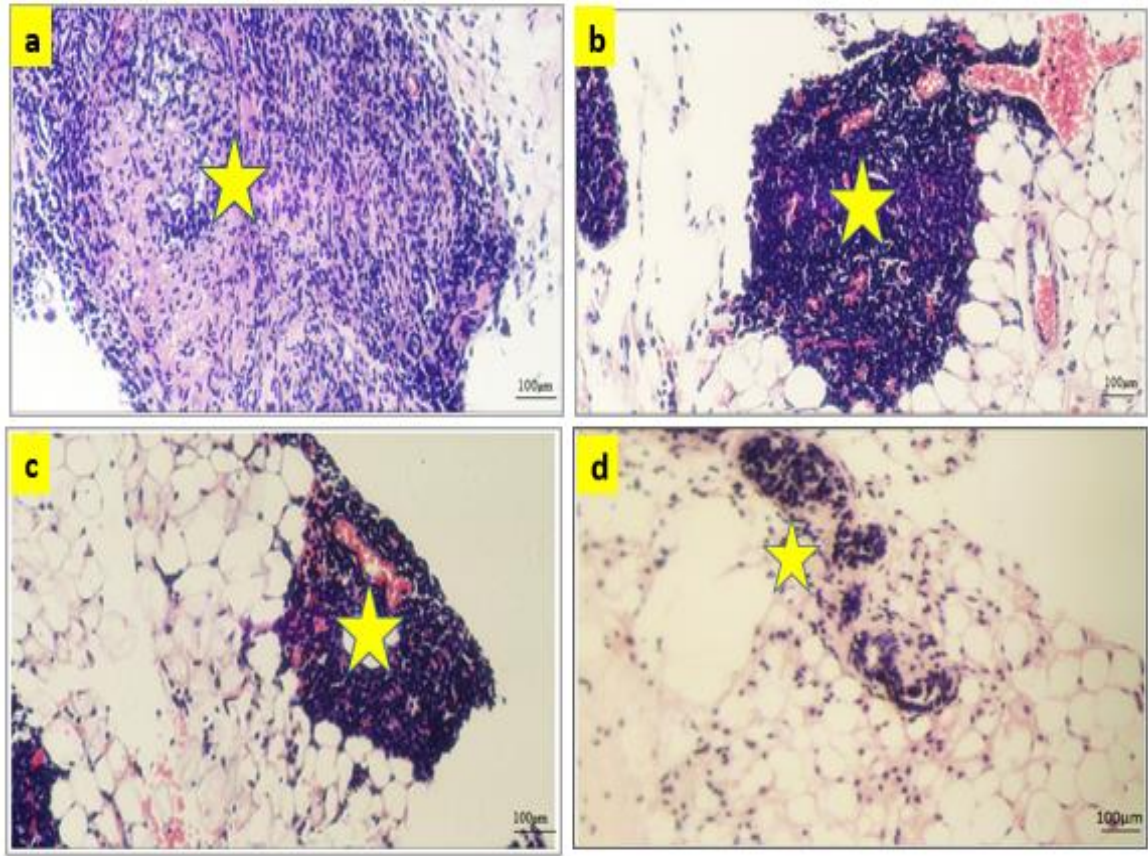
Şekil 4.13. PK (Pozitif Kontrol), Mocetinostat, Capecitabine, Mocetinostat+Capecitabine Uygulanan Gruplardaki Tümörlü Meme Dokusunun Gözlemlenmesi



Şekil 4.14. PK (Pozitif Kontrol), Mocetinostat, Capecitabine, Mocetinostat+Capecitabine Uygulanan Gruplardaki Oluşan Tümör Ağırlıkları Değişim Grafiği

2.3. Dokuların Hematoksilen-Eozin (H+E) ile Boyanması

Alınan meme tümör dokusu ve en çok metastaz yaptığı akciğer dokuları standart hematoksilen-eozin (H+E) boyama ile incelenmiştir (Şekil 4.15.- 4.17.)



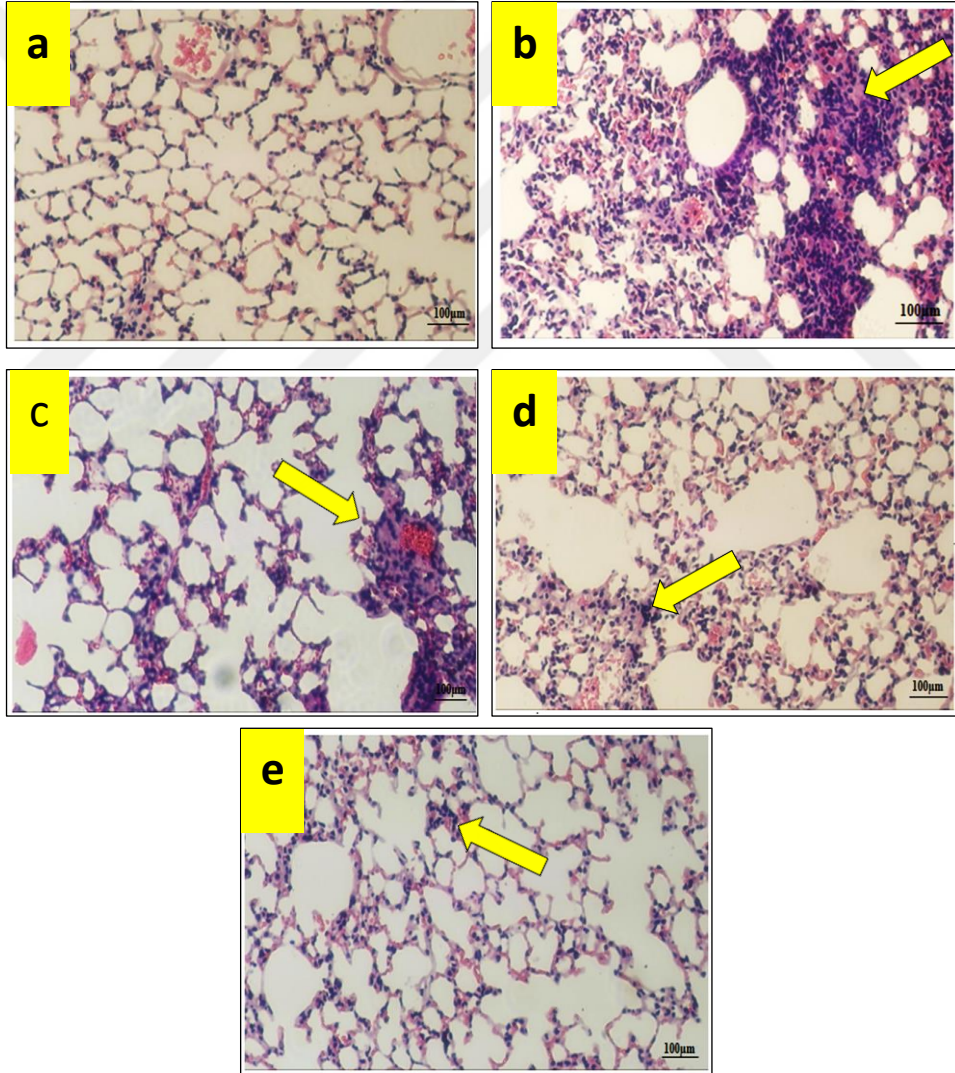
Şekil 4.15. 4T1 Meme Kanseri Hücresi ile Oluşturulan Kitlenin Işık Mikroskop Görüntüsü.

- a) Pozitif Kontrol Grubu, b) Capecitabine Uygulanan Grup, c) Mocetinostat Uygulanan Grup, d) Capecitabine+Mocetinostat Uygulanan Grup. Kanser kitlesi (yıldız)'nin büyüklüğü Capecitabine+Mocetinostat uygulanmasıyla birlikte anlamlı bir şekilde azalmıştır. (Bar:100µm)



Şekil 4.16. Akciğer Dokusunun Makroskopik Görüntüsü

(Akciğer üzerinde koyu lekeler halinde metastaz yapmış 4T1 hücre kitleleri (ok) gözlenmiştir.)



Şekil 4.17. Akciğer dokusunun ışık mikroskop görüntüsü. a) Negatif Kontrol Grubu, b) Pozitif Kontrol Grubu, c) Capecitabine, d) Mocetinostat, e) Capecitabine+Mocetinostat Grubu. Metastatik kanser kitlesinin (ok) kombine grupta küçüldüğü görüldü. (Bar:100 µm.)

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE TARTIŞMA

1. Sonuç

Yaptığımız doktora tez çalışmasında in vitro ve in vivo olarak 4T1 meme kanseri hücre hattı üzerinde Capecitabine ve Mocetinostat'ın tekli ve kombine kullanımının antiproliferatif etkisini ve apoptotik süreçte yer alan β -Actin (kontrol olmak üzere), Bcl-2, Akt, PI3K, C-myc, Bax, Kaspaz-3, PTEN, kaspaz-7, kaspaz-9, p53, HDAC1 ve HDAC3 proteinlerinin ilaçlar ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Yaptığımız çalışmayı özetleyecek olursak;

- Capecitabine 1700 μ M, Mocetinostat 3,125 μ M, 50 μ M Capecitabine+1,5 μ M Mocetinostat konsantrasyonlarında 4T1 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanmasıyla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.
- Yapılan canlılık analizi ile Capecitabine, Mocetinostat ve ilaçların kombinasyonları zamana bağlı olarak apoptotik hücre sayısının arttığı gözlemlendi. Capecitabine uygulaması zamana bağlı olarak %24, %45,2, %69,1 ve %86,6 oranında, Mocetinostat %28, %42, %61,5 ve %77,8 oranında, Capecitabine+Mocetinostat %16, %34,3, %51,5 ve %88,2 4T1 hücreleri üzerinde artan öldürücü etkiye neden olduğu ve hücreleri apoptoza indüklediği belirlenmiştir.
- 4T1 hücreleri üzerine uygulanan Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat'ın hücre çekirdeğinde yoğunlaşma, hücre yoğunluğu ve sayısında azalma, hücre boyutunda küçülme ve hücre uzantılarını kaybederek hücrelerin yuvarlak şekle dönüşmesi gibi anormal değişiklikler gözlemlenmiştir.
- Yara iyileşme deneyi ile ilaç uygulanan gruplar kontrol ile karşılaştırıldığında yara aralığının kapanmadığı, Capecitabine +Mocetinostat uygulamasının koloni oluşumunu %65 oranında azalttığı belirlenmiştir.
- Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat uygulamasının hücreleri apoptoza indüklediği, hücre DNAlarında fragmentasyon olduğu, DNA laddering deneyi ile belirlenmiştir.
- Capecitabine ve Mocetinostat'ın birlikte uygulanması ile 4T1 meme kanseri hücreleri üzerinde hücre sağkalımını, proliferasyonunu, Bcl-2, AKT, PI3K, C-myc, protein seviyelerini azalttığı, ayrıca Bax, kaspaz-3, PTEN, kaspaz-7, kaspaz-9, p53 protein seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.

- Kanser hücrelerinde HDACI seviyesi oldukça yüksek iken Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine kullanımı HDACI ve HDACIII protein seviyesi ise kombine uygulamayla birlikte çok azaldığı belirlenmiştir.
- Deneysel olarak oluşturulan meme kanseri modelinde kombine uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör ağırlığı yaklaşık olarak %55 oranında azaldığı ve vücut ağırlıklarının %18 oranında azaldığı belirlenmiştir.

Araştırmamız sonucunda Mocetinostat ve Capecitabine'nin kombine kullanımının meme karsinomu hücrelerine karşı yararlı bir antitümör ajan olabileceği ve hücre proliferasyonunun inhibisyonunu apoptoz indüksiyonu ile gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Ayrıca Capecitabine uygulanması ile ilaca bağlı olası yan etkilerinin aza indirilmesi kombine kullanım ile mümkün olabilir. Bu sonuçlar, düşük konsantrasyonlu kombine tedavinin, tek başına yüksek konsantrasyonlu ilaç tedavisine göre daha etkili olduğunu göstermiştir.

Capecitabine ve Mocetinostat'ın 4T1 hücrelerine ve 4T1 ile oluşturulan meme tümörüne kombine olarak uygulanması ve bu uygulamanın apoptotik yolaktaki genlerin üzerindeki etkisi ilk kez doktora tez araştırmamızla gösterilmiştir. Elde ettiğimiz veriler ile Capecitabine'nin Mocetinostat ile kombine tedavisi ile ilaç konsantrasyonları tekli kullanıma göre azalmıştır. Konsantrasyon azalmasına bağlı Capecitabine'nin oluşturduğu yan etkilerin azaldığı kanısındayız. Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine uygulanması diğer çalışmalar için zemin oluşturacaktır.

2. Tartışma

TNBC, invaziv meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturmaktadır. Kemoterapi, TNBC tedavisinin temelidir. İlaçların kombinasyonunun kullanılması, kanser hücrelerinin yok edilme şansını artırmaktadır (Buvoskova, 2015: 352).

Capecitabine, timidilat mevcudiyetini kısıtlayarak DNA sentezini inhibe etmektedir. Capecitabine tekli kullanımında özellikle metastatik meme kanseri için etkin olmakla birlikte, kombine kullanımında diğer kanser türleri üzerinde de etkinlik göstermektedir (Miwa,1998: 1274).

Mocetinostat benzamidler grubunda yer alan izotip bir HDACi olmakla birlikte, Sınıf I ve IV HDAC inhibitörleri için oldukça spesifik özellik göstermektedir. Mocetinostat, dokularda çok az miktarda birikmesine rağmen kanser hücreleri üzerinde oldukça uzun inhibe edici özelliğe sahiptir (Buglio vd., 2010: 387).

Yaptığımız bu çalışmada; 4T1 meme kanseri hücre hattı ve 4T1 meme kanseri ile indüklenmiş meme kanseri modelinde, Capecitabine ve Mocetinostat'ın tekli ve kombine kullanımının, 4T1 hücreleri üzerinde sitotoksik, antiproliferatif etkisini ve apoptotik süreçte, yer alan Bcl-2, HDACI, AKT, PI3K, C-myc, HDACIII, Bax, Kaspaz-3, PTEN, Kaspaz-7, Kaspaz-9, p53 protein seviyelerinin birbiri ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda yapılan MTT testi sonucunda ilaçların hücreler üzerine 48 saat süreyle uygulanmasıyla, IC₅₀ değerleri sırasıyla; Capecitabine 1700 µM, Mocetinostat 3,125 µM ve Capecitabine 50 µM + Mocetinostat 1,5 µM olarak bulunmuştur. Bulgularımıza göre 4T1 hücrelerinin canlılığı konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde azalmıştır. Ayrıca, 4T1 hücreleri üzerine Capecitabine'nin yüksek dozda kullanılmasına rağmen, Mocetinostat'ın oldukça düşük dozda hücre canlılığını azaltması dikkat çekici olduğu görülmektedir.

Literatür çalışmalarına baktığımızda, Capecitabine ile ilgili yapılan tekli çalışmalarda Capecitabine'nin IC₅₀ değeri genellikle 1000 µM 'dan büyük olduğu gösterilmiştir. Capecitabine'nin IC₅₀ değeri farklı hücre hatlarında 24 saatlik uygulama ile 800-1600 µM aralığında değişim göstermektedir (HCT116: 2850 µM, HT29 :1590 µM, SW620: 4190 µM, HCT8: 5957 µM, HCT15 :5840 µM, COLO205: 863 µM) (Guichard, 2008: 310).

Zhang vd. yaptıkları çalışmada Capecitabine'nin 4T1^{LUC} hücre hattı üzerine %35,5 oranında inhibitör etki göstermiştir (Zhang, 2013:780). Yapılan başka bir çalışmada, Capecitabine'nin meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 üzerindeki 48 saatlik IC₅₀ değeri 1147.91 µg/ml dir ve öldürücü dozu 1600 µg/ml olarak belirtilmiştir (Akbari 2013: 84).

Y Gu vd. 2021 yılında yaptıkları çalışmada, Capecitabine'nin MCF-7 meme kanseri hücre hattında 72 saatlik IC₅₀ değerini 101.2 µmol olarak bulunmuştur (Gu,2021:401). MCF-7 hücre hattı ile yapılan başka bir çalışmada Capecitabine 24 saat etkinlikteki IC₅₀ değeri 31.25 µg/mL olarak bulunmuştur (Zhang, 2013: 777).

Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında, Mocetinostat'ın meme kanseri üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmaların artmış olduğunu görmekteyiz. Mocetinostat'ın düşük doz (>10 µM) kullanımı olmasına rağmen hücre döğüsünü durdurmada ve hücreleri apoptoza indüklemekte oldukça etkilidir (Le Tourneau, 2008: 1247). Mocetinostat'ın in vitro olarak kolon (HCT116, SW48, Colo205), küçük hücreli olmayan akciğer (A549), prostat (DU145), pankreas (PANC1) ve vulval epidermal (A431) kanseri hücrelerinde önemli bir antitümör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Fournel, 2008: 730).

Mocetinostat'ın kanser hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyonunu değerlendirdiğimizde, Mocetinostat, MDA-MB-231 hücrelerine 72 saat süreyle uygulandığında IC₅₀ değeri 1 µM olarak bulunmuştur (Meidof, 2015: 834). Başka bir çalışmada, Mocetinostatın etkisi HCC1937 ve SUM149 meme kanseri hücre hatlarında incelenmiş ve Mocetinostat konsantrasyonu sırasıyla 0,6 µM ve 2,6 µM olarak bulunmuştur (Shan, 2017: 1220). Mocetinostat 2 µM ve 5 µM konsantrasyonda prostat kanseri hücre hatlarında oldukça etkin olduğu gösterilmiştir (Zhang, 2016: 2).

Bizde yaptığımız çalışmada Capecitabine'nin ve Mocetinostat'ın IC₅₀ değerini literatür bilgisiyle paralel olarak sırasıyla 1700 µM ve 3,125 µM olarak bulduk. Yapılan literatür çalışmaları ile yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında, 4T1 meme kanseri hücre hattına uygulanan Mocetinostat ve Capecitabine'nin IC₅₀ değerinin artması söz konusu olmuştur. İlaçların yüksek konsantrasyonda olma nedeni 4T1 hücre hattının TNBC özellik taşımasıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca IC₅₀ değeri, ilaçların değişen konsantrasyona sahip olması, farklı hücre hatlarının kullanılması ve farklı zamanlarda alınan deney sonuçları ile değişebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamıza başlamadan önce Capecitabine ve Mocetinostat'ın birlikte kullanımının sinerjistik olarak inhibe edici etkisini analiz etmek için ilaç etkileşimi formülü (CDI) [(CDI= AB/(A×B)] kullanmıştır. Yapılan hesaplama göre ilaçların kombine kullanımının sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir (CDI= 0,96) (CDI <1 sinerjiyi gösterir, CDI <0.7, önemli ölçüde sinerjik bir etki gösterir, CDI=1 toplamsallığı, CDI >1 ise antagonizmi belirtmektedir) (Xu, vd., 2007).

Literatür taramalarında 4T1 hücre hattı üzerine Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine etkisi bulunmadığından, Capecitabine'nin diğer HDACi ve diğer ilaçlar ile olan kombinasyonunun verileri değerlendirilmiştir.

Barberio vd. 2017 yılında yaptıkları çalışmada valporik asit ve 5'-DFUR kullanımının 96 saatlik etkisini HT29 SW620, HCT-116 ve HCT-116 p53^{-/-} hücre hatlarında araştırmış ve ilaçların IC₅₀ değerlerini sırasıyla 3.35 µM- 9.88 µM; 2,01 µM- 35,31 µM; 1,41 µM- 2,16 µM; 2,35 µM, 3,41 µM olarak bulmuştur. Kombine tedavi için, valporik asit ve 5'-DFUR'un eşdeğer dozları (50:50 sitotoksik oran) ile 96 saat boyunca uygulanmış ve sinerjistik antiproliferatif etki ile sonuçlanmıştır (CDI <1). Ayrıca, valporik asit ve 5'-DFUR kombine kullanımda IC₅₀ değeri, ilaçların tekli kullanımındaki IC₅₀ değerinden düşük çıkmıştır (Barberio 2017:177).

Barberio vd 2016 yılında Capecitabine ve valporik asit 96 saat boyunca kombine uygulanmasının MCF-7, SKBR3 ve MDA-MB46 meme kanseri hücre hatları üzerine antiproliferatif ve anti apoptotik etkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda, MCF-7, SKBR3 ve MDA-MB46 hücreleri üzerine Capecitabine'nin IC₅₀ değeri sırasıyla 2,03µM, 1,99 µM, 10,04 µM, 12,14 µM, HDACi olan valporik asidin IC₅₀ değerleri sırasıyla: 2,2µM, 1,69 µM, 1,60 µM, 3,19 µM olarak bulunmuştur. Capecitabine ve valporik asidin kombine uygulanmasıyla bu değerler HDACi için ortalama 1,46'dan 4,58 katına ve Capecitabine için 2,44'ten 14,5 katına düşmüştür. Böylelikle, Capecitabine ve valporik asitin kombine kullanımı meme kanseri hücre hatları üzerine antiproliferatif etki göstermiştir. Ayrıca, TP seviyesi kanser hücrelerinde oldukça yüksek seviyede iken ilaçların kombine kullanımı TP ekspresyon seviyesi azaltmıştır (Barberio, 2016: 7716).

GU 'nun yaptığı bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine 72 saat boyunca Capecitabine ve eksemestan uygulanmıştır. İlaçların IC₅₀ değerleri sırasıyla Capecitabine için 101,2 µmol/L ve eksemestan için 60.6 µmol/L olarak bulunmuştur. Kombine tedavide 30 µmol/L Eksemestan ile 50, 33 ve 17 µmol/L Capecitabine grubu kullanılmış ve ilaçların 24 saat ve 48 saat sonrasında değerleri kaydedilmiştir. Yapılan deney sonrasında kombine tedavide MCF-7 hücrelerinin proliferasyon inhibisyon hızı, 30 µmol/L eksemestan grubuna göre daha yüksek seviyede bulunmuştur (P<0.01) (Gu 2021). Ayrıca, eksemestan grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, G2 fazındaki MCF-7 hücrelerinin oranı artarken (%16,7±2.6) G1 fazındaki hücrelerin oranı azalmıştır (%10,6±2.2).

Borbely vd. 2015 yılında BT549, MCF-7, T47D, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile yaptıkları bir çalışmada, Mocetinostat'ın hücreler üzerindeki IC₅₀ değeri ER+ hücrelerde (BT549 ve MDA-MB-231) 1.17 µM ve 0.67 µM iken, TNBC hücre hatları için IC₅₀ değerleri 4.38 µM ve 3.04 µM olarak bulunmuştur. ER+ hücrelerin, Mocetinostat tedavisine karşı duyarlılığının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Borberly, 2015: 33625).

Yaptığımız çalışmada, Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine tedavisi ile belirlenen IC₅₀ değeri Capecitabine 50 µM + Mocetinostat 1,5 µM olarak belirlenmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda, Mocetinostat'ın hücreler üzerinde antiproliferatif etki değeri ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında yaklaşık olarak paralel sonuç elde etmiş bulunmaktayız. Ayrıca, TNBC hücrelerinin ilaç hassasiyeti daha yüksek olmasıyla kullanılan ilaçların konsantrasyonunun arttığını söyleyebiliriz.

Capecitabine'nin tümör hücreleri üzerindeki etkinliğinin oldukça yüksek olması, kemotörapi ilaçlarla çapraz direnç göstermemesi, Mocetinostat'ın ise biyoyararlı, toksik etkileri aza indirmesi ve kanser hücreleri üzerinde uzun süreli etki göstermesiyle kombine tedavi için bu iki ilacın kullanımının uygun olacağı kanısındayız.

Araştırmamızda hücre canlılığını, proliferasyonunu ve migrasyon oranını ölçmek için farklı deneyler kullanılmıştır. Capecitabine+Mocetinostat'ın birlikte kullanımı hücre sayısını 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca sırasıyla %16, %34,3, %51,5 ve %88,2 azaltmış ve hücreleri apoptoza indüklemiştir. Capecitabine ve Mocetinostatın tekli uygulama sonuçlarına bakılırken Capecitabine'nin yüksek konsantrasyonda gösterdiği etkiyi HDACi olan Mocetinostat düşük dozda göstermiş olması oldukça dikkat çekicidir. Ayrıca kombine kullanımda, kanser hücrelerini apoptoza indükleme oranı oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında, Mocetinostat'ın uygulandığı doza bağlı olarak hücre canlılığını yaklaşık %75 oranında azalttığı gösterilmiştir (Fournel). Apoptoza giden hücreler şekillerini değiştirerek yuvarlak halini alır, çekirdek yoğunlaşması ve hücre uzantılarını kaybetmektedir (Hasan, M2014). Yaptığımız çalışmada; 4T1 hücreleri üzerine uygulanan Capecitabine, Mocetinostat, Capecitabine+Mocetinostat'ın hücre çekirdeğinde yoğunlaşma, hücre yoğunluğu ve sayısında azalma, hücre boyutunda küçülme ve hücre uzantılarını kaybederek hücrelerin yuvarlak şekle dönüşmesi gibi anormal değişiklikler gözlemlendi. Hücrelerde meydana gelen bu değişimler, apoptotik hücrelerde meydana gelen değişimler ile benzer olduğundan, uygulanan ilaçların kanser hücrelerini apoptoza sürüklediğini söyleyebiliriz.

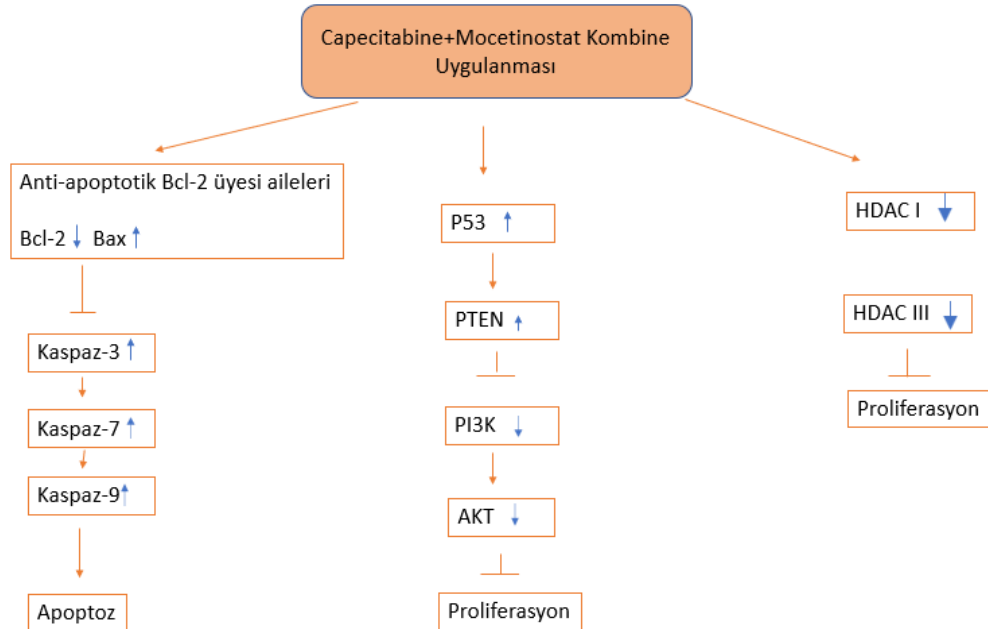
Bu çalışmada, yara iyileşme ve koloni oluşturma deneyi ile hücrelerin maruz bırakıldıkları ilaçların etkisine göre oluşturulan yaranın kapanması ve tek bir hücrenin koloni oluşturma yeteneği değerlendirilmiştir. Yara iyileşme deneyinde kontrol grubunda yara genişliği (851,772 μm) 72.saatte tamamen kapanırken, Mocetinostat, Capecitabine ve kombine uygulamada 48 saatlerde yara genişliği 825,17 μm , 866,5 μm , 856,14 μm olarak bulunmuştur. Koloni oluşum deneyinde ise Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine etkisi, kontrol grubuna göre kıyaslandığında %65 oranında azalmıştır. Deney sonuçlarına göre ilaçların kombine ve tekli kullanımda 4T1 meme kanseri hücrelerin canlılığını, hücre- hücre etkileşimini azaltarak hücrelerin göç yeteneğini ve koloni oluşturma yeteneği azalttığını söylemek mümkün olabilir.

Kanser hücreleri çeşitli yollar kullanarak apoptozdan kaçmaktadır. Meme kanseri tedavisinde, apoptotik yolda etkinliği bilinen ilaçların kullanılması meme kanseri tedavisini kolaylaştıracaktır. Yaptığımız çalışmada, apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan DNA laddering deneyi kullanılmıştır. DNA fragmentasyonu, DNA'nın DNase (CAD)

tarafından parçalanması ve hücrelerin kaspaz aktivitesini başlatarak apoptoza gitmesidir. CAD, genomik DNA'yı internükleozomal bağlayıcı bölgelerde parçalayarak, uzunluğu 180-185 baz çiftinin katları olan DNA parçalarına neden olur. Yaptığımız çalışmada, ilaç uygulaması ile birlikte kanser hücrelerinin DNAlarında fragmentasyon meydana gelmiş ve jel görüntüsünde bant yerine smear görüntüsü elde edilmiştir.

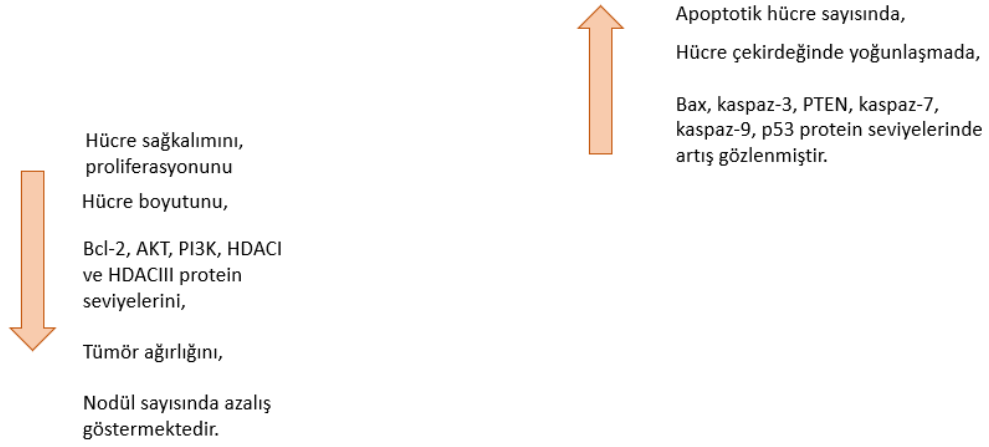
Kanser tedavisinde apoptozun uyarılması için kullanılan en iyi strateji kemoteropik ajanların tek başına veya kombine olarak kullanılmasıdır. Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w (apoptozu bloke eden), Bax, Bak, Mtd (apoptoz tetikleyici), Bim, Bid, Bad (bh3 bölgesi bulunduran) ve prokaspaz 8, kaspaz 9-3,7,6,12, p53 gibi çok sayıda protein apoptotik yolak düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Yaptığımız in vitro çalışmada, Capecitabine ve Mocetinostat' ın birlikte uygulanması ile 4T1 meme kanseri hücreleri üzerinde hücre sağkalımını, proliferasyonunu, Bcl-2, HDACI, AKT, PI3K, C-myc, HDACIII proteinlerinin seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı ve Bax, kaspaz-3, PTEN, kaspaz-7, kaspaz-9, p53 protein seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (*p<0.05, **p <0.001, <0.05, **p <0.0001).



Şekil 4.18. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Kombine Uygulanmasının Apoptotik Proteinler Üzerindeki Etkisi

Capecitabine+Mocetinostat'ın Kombine Uygulanması



Şekil 4.19. Capecitabine ve Mocetinostat'ın Kombine Uygulanmasının In vivo ve In vitro etkisi

Bir kontrol noktası geni olarak P53, ilgili genlerin transkripsiyonel regülasyonu yoluyla hücre döngüsü durması ve apoptozun indüklenmesi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarda yer almaktadır. P53, hayatta kalmayı destekleyen bir anti-apoptotik proteindir ve Bax ve Bcl-2 genlerini hedeflemektedir. Diğer tarafta Bax, sitokrom C'nin salınmasında ve kaspaz bağımlı apoptotik yolağın indüklenmesinde rol oynayan proapoptotik bir proteindir (Srinivasula, 1998: 450). Bu yolda kaspaz-3 proteaz, çeşitli önemli hücre proteinlerinin spesifik bölünmesini katalize ederek kilit bir rol oynar. 4T1 meme kanseri hücre hattı üzerine yaptığımız çalışma Bax ve kaspaz-3 ile birlikte p53'ün protein seviyesinin artması, Bcl-2'nin ifadesinin ise azaldığını desteklemektedir. Bu nedenle, verilerimiz kanser hücre hattında Capecitabine ve Mocetinostat'ın anti-kanser toksisitesinin kaspaz kaskadı ve p53/Bax/Bcl-2 aracılığıyla gerçekleştirildiğine dair kanıt sağlayabilir. Ayrıca intrinsik yolda görevli kaspaz-7, kaspaz-9 proteinlerinin seviyelerinin artmış olmasıyla apoptotik yolağın uyarıldığı söylenebilir. PTEN tümör baskılayıcı aktivitesi, büyük ölçüde PI3K/AKT aktivasyonuna karşı olan lipid fosfatase aktivitesine bağlıdır. PTEN ekspresyonu, PI3K/AKT aktivitesini inhibe eder, hücre apoptozunu destekler ve hücre proliferasyonunu azaltır. Yaptığımız çalışmada, PTEN protein seviyesinin arttığını, PI3K/AKT protein seviyesinin azaldığını görmekteyiz. İlaçların kombine olarak kullanılmasıyla PTEN/PI3K/AKT yolağı hücre ölümüne katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

Elde edilen bulgulara göre, 4T1 hücrelerinde Capecitabine ve Mocetinostat birlikte uygulanması ile intrinsik yolda görevli kaspaz-3 ve kaspaz-7 proteinlerinin seviyelerinin artmış olmasıyla apoptotik yolağın uyarıldığını söylemek mümkündür.

Capecitabine'nin tekli ve kombine uygulanması, kanser hücrelerinde kaspaz-3 proteinin ekspresyon seviyesini arttırdığına yönelik birçok çalışma mevcuttur. Singh vd. 2019 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri hücre hatlarına Capecitabine ve Capecitabine yüklü nanopartikül uygulamışlar ve Capecitabine'nin intrinsik apoptotik yol ile ilişkili olan ROS seviyelerini artırarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Bax, kaspaz 3, kaspaz-9'un protein seviyesi artarken, Bcl-2 proteininin protein seviyesi düşmüştür (Sing, 2019: 24989). Yapılan bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde Capecitabine ve valporik asidin kombine uygulanmasıyla kaspaz-3 ve PARP protein seviyesi artmıştır (Barberio, vd., 2016.) Leiomyosarkom (LMS) hücreleri üzerine Mocetinostat ve gempitabine kombine olarak uygulanmış ve kaspaz 3, -9, -7 proteinlerinin ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Lopez, 2017).

Mocetinostat (5 µM), prostat kanseri hücre hattına (DU14, PC3) 24 saat süreyle uygulandığında Kaspaz 3 ve Bad protein ekspresyon seviyesi artarken, Bid, Bax puma protein seviyeleri azalmıştır. Aynı çalışmada Mocetinostat, (3 µmol/L) lösemi hücrelerine uygulanmış ve kaspaz kaskadını aktive ederek kaspase- 9,-8, prokaspaz- 6 ve -10 proteinlerinin ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. Mcl-1 protein ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bcl-2 ve Bcl-XL protein seviyelerinde ise değişim gözlenmemiştir (Zhang, 2016: 16036). Bizde yaptığımız çalışmada Mocetinostat'ın tekli kullanımında Bcl-2 protein seviyesi artmakta iken kombine ilaç uygulanmasında protein seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bcl-2 proteininin bloke edilmesi, tümör hücrelerinde apoptotik süreci geri yüklemektedir.

Pro-kaspaz 9 bölünmesiyle mitokondriyal apoptoz yolunun Bcl-2 ve Bax proteinleri seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. C-myc onkogeni, insan kanserlerinin çoğunda aşırı eksprese edilir ve tümörlerin en az %40'ının nedenine katkıda bulunmaktadır. Tekli ve kombine ilaç uygulamalarında C-myc protein seviyesinde azalma gözlenmiştir. PI3K ve PTEN, hücre büyümesini, hayatta kalmasını ve proliferasyonu düzenleyen PI3K yolunun sırasıyla başlıca pozitif ve negatif düzenleyicileridir. Yaptığımız çalışmada, ilaç uygulamalarıyla birlikte PTEN protein seviyesi artarken, PI3K protein seviyesi azalmış ve hücre proliferasyonu olumsuz yönde etkilenmiştir.

Bo Liao vd 2020, yaptıkları çalışmada, karaciğer kanseri hücre hatlarına Mocetinostat uygulanmasıyla, kaspaz-9, -3, -7 ve PARP, Bim ve Bax gibi proteinlerin seviyesi artarken, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinlerin seviyeleri ise azalmıştır (Bo Liao, vd., 2020, 1918).

HDAC inhibitörleri, kanser hücresi döngüsü durmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü indüklemekte, anjiyogenezi azaltmakta ve bağışıklık tepkisini modüle etmektedir. Mocetinostat'ın HDACI, HDACII ve HDACIII ve HDAC11 protein seviyelerini inhibe ettiği bilinmektedir (Batlevi, C.104). Yaptığımız western blot analiz sonuçlarına göre kanser hücrelerinde HDACI seviyesi oldukça yüksek iken Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine kullanımı HDACI protein seviyesini düşürdüğünü gözlemlemekteyiz. HDACIII protein seviyesi ise kombine uygulamayla birlikte çok az miktarda azalma göstermiştir. Capecitabine ve Mocetinostat'ın birlikte kullanılması HDACI proteini üzerinde oldukça etkin olduğunu ve Mocetinostat'ın aktivitesini arttırdığını söyleyebiliriz. HDAC inhibitörleri, proapoptotik ve anti-apoptotik regülasyonu ile tümör hücrelerinde apoptozu indüklediğini söylenebiliriz.

4T1 meme hücre hattı meme dokusuna kolayca implante edilmektedir. Yüksek oranda tümörjenik ve invaziv özellik göstermesiyle, çoğu tümör modelinin aksine, meme bezindeki birincil tümörden lenf düğümleri, kan, karaciğer, akciğer, beyin, kemik dokusuna kadar metastaz yapabilme özelliğine sahiptir (Pulaski,2000:4). 4T1 tümörü, tercih edilme sebebi ilk olarak, tümör hücreleri meme bezine kolayca nakledilir, böylece birincil tümör bu ünite tarif edildiği gibi anatomik olarak doğru bölgede büyür. İkincisi ise, insan meme kanserinde olduğu gibi, 4T1 primer tümörden kendiliğinden gelişir ve metastaz yaptığı için meme kanseri oluşturmada birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (Dexter, 1978: 3176).

Yaptığımız çalışmada, 4T1 meme hücre hattı BALB/c farelere ortotopik olarak enjekte edildi ve yaklaşık 15 gün sonra farelerde tümör oluşumu gözlemlendi. Tümör oluşumunu gözlenmesinin ardından fareler kontrol grubu ve Capecitabine (90 mg/kg), Mocetinostat (50 mg/kg), Capecitabine (90 mg/kg) + Mocetinostat (50 mg/kg) olmak üzere gruplara ayrıldı. Deney sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubunu oluşturan farelerde vücut ağırlığı değişmemişken, ilaç uygulanan gruplarda farelerin vücut ağırlığı yaklaşık %18 oranında azalmıştır. Tümör ağırlıkları değerlendirildiğinde ise, Kontrol grubunda tümör ağırlığı 1,2 g iken Capecitabine 0,87g Mocetinostat 0,95g Capecitabine+Mocetinostat grubunda ise 0,66 g olmuştur. Kombine uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör ağırlığı yaklaşık olarak %55 oranında azalmıştır. Capecitabine ve Mocetinostat'ın kombine kullanımının, tekli kullanıma göre tümör boyutunu küçültme daha etkin olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan literatür araştırmalarında 4T1 hücreleri kullanılarak in vivo tümör modelinde Capecitabine ve Mocetinostat'ın tekli uygulanmasıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma varken kombine uygulanması ile ilgili çalışma henüz bulunmamaktadır. Mocetinostat tümör hücrelerinde histon asetilasyonunu uyardığı için, yapılan in vivo çalışmalar ile antitümör aktivitesi ve düşük toksisite gösterdiği kanıtlanmaktadır (Li, 2004: 83). Ayrıca Mocetinostat'ın Faz II çalışmaları devam etmektedir.

Yapılan bir çalışmada, Lopez vd. Scid farelerine SKLMS1 hücreleri vererek (1×10^6) LMS (Leiomyosarkom) oluşturduğu kanser modelinde, Mocetinostat 50 mg/kg olarak, gempitabin 20 mg/kg olarak farelere uygulanmıştır. Mocetinostat, LMS hücre büyümesini ve klonojenik potansiyeli ortadan kaldırmış, LMS hücre hatlarında apoptoza indüklemiştir.

Mocetinostat +gempitabin kombinasyonu, in vivo olarak LMS hücrelerinde sinerjistik bir etki sergilemiştir. Ayrıca Mocetinostat, LMS hücrelerinde gempitabin direnç belirteçleri RRM1, RRM2'nin ekspresyonunu azaltmış ve gempitabin-duyarlılık belirteci hENT1'in ekspresyonunu arttırmıştır (Lopez, 2017). CD1 fareleri SW48 ve HCT116 hücreleri ile kolon kanseri oluşturulmuş gavaj yoluyla 90 mg/kg Mocetinostat uygulanmış ve Mocetinostat'ın hastalarda dahil olmak üzere tüm tümör gruplarında H3 hiperasetilasyonunu indüklediği gözlenmiştir (Bonfils, 2008: 342). Yaptığımız çalışma sonucunda Mocetinostat'ın antitümör etkinliği ile tümör boyutunu küçülttüğü söylenebilir.

Capecitabine hem tekli uygulamalarda hem de kombine uygulamalarda meme kanseri için oldukça etkin tedavi sunmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçların düşük dozda ve kombine kullanılması meme kanseri tedavisini kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Böylelikle Capecitabine, oksaliptatin, irinotekan, doksataksel gibi birçok ilaç ile birlikte kullanılmaktadır (Lee, 2014: 3750).

Yapılan bir çalışmada, 4T1 meme kanseri hücre hattı ile yaklaşık 10 gün sonra BALB/c farelerde meme kanseri oluşturulmuş ve Capecitabine günlük 359 mg/kg oral yol ile farelere verilmiştir. Kontrol grubundaki hayvanların tümör boyutunda önemli bir artış gözlenmiştir. Sadece Capecitabine uygulanan grupta ise tümör büyüme oranı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %76,6 azalış sağlamıştır. Hayvanlardan alınan karaciğer ve akciğer dokuları histopatajenik olarak değerlendirilmiş ve kontrol grubunda, karaciğerin santral veni ve alveollerin interstisyel boşluğu çevresinde adenokarsinom hücrelerinin oldukça yaygın metastazı görülmüştür. Ayrıca, Capecitabine uygulanan grupta, karaciğer ve akciğer

dokularında hafif metastaz adenokarsinom ve karaciğerde hepatosit nekroz ve akciğer venülünde hiperemi gözlenmiştir (Taleblou, 2020: 76).

Sim J. J yaptıkları çalışmada, Capecitabine ve kalsiyum laktatı kombine olarak kolon kanseri hücreleri verilen tümör modelinde uygulamışlardır. Capecitabine grubu ($2,999.87 \pm 917.47 \text{ mm}^3$) kontrol grubu ($2,085.39 \pm 491.16 \text{ mm}^3$) tümör hacmiyle karşılaştırıldığında önemli bir değişiklik olmaz iken, kombine uygulanan grupta ($1,201.86 \pm 42.94 \text{ mm}^3$) tümör hacminde çok ciddi düşüş olmuştur. Ayrıca tümör inokülasyonu sağlandıktan sonra hayvanların vücut ağırlıklarında düşme yaşanmamıştır (Sim, 2018: 4669). Yaptığımız deney sonucu değerlendirildiğinde, Capecitabine uygulanan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör boyutunun %79 oranında azalmış olduğunu görmekteyiz. Bu sonuçlarla birlikte, Capecitabine'nin tümör hücre sayısını azalttığı ve tümör üzerinde oldukça etkin olduğunu söyleyebiliriz. Yine aynı çalışma ile paralel olarak yaptığımız çalışmada tümör uygulanması üzerinde iki ilaç etkin olmuş, fakat tedavi süreciyle birlikte farelerin vücut ağırlığında azalma gözlenmiştir.

Anand vd. yaptıkları çalışmada 4T1 meme kanseri ile tümör oluşturulduktan sonra hayvanlara 3 günde bir olmak üzere 600 mg/kg olmak üzere Capecitabine uygulanmıştır. Capecitabine ile tedavi edilen akciğer dokusu incelendiğinde Ki67 ekspresyonu ve hücre proliferasyonu %70 oranında azalmıştır (Anand, 2019: 5). Salem ve ark. (2018) arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 4T1 meme kanseri hücre hatlarıyla oluşturulan modelde, EphA2 uygulanmasıyla birlikte ilaç uygulanan grupta %75 oranında nodüllerin azaldığı gözlenmiştir (Salem, 2018: 2056). Yapılan başka bir çalışmada ise 4T1 meme kanseri modelinde akciğer metastazı, arjinazın VEGF/VEGFR-2 yolunu inhibe etmesi ile engellenmiştir (Secondini, 2017). 4T1 meme kanseri hücre hattıyla oluşturulan kanser modelinde benzil-izotiyosiyanat kullanılmıştır. Benzil-izotiyosiyanatın akciğerdeki nodul sayısını ve ağırlığını azaltmıştır (Kim, 2011: 64). Yaptığımız çalışmada, ilaçların tekli ve kombine uygulanmasının hem tümör dokusunda hem de akciğer metastazında kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda ilaç uygulanan gruplarda etkin olduğunu görmekteyiz. Yapılan H-E boyama sonrası tümör grubunda fazla sayıda nodül gözlenmiş tekli gruplarda nodul sayısı azalırken kombine grupta nodül dağılmaya başlamıştır.

KAYNAKÇA

- Adams, H., Fritzsche, F. R., Dirnhofer, S., Kristiansen, G., & Tzankov, A.** (2010). Class I Histone Deacetylases 1, 2 and 3 are Highly Expressed in Classical Hodgkin's Lymphoma. *Expert Opin. Ther. Targets*, 14, 577–584. DOI: 10.1517/14728221003796609
- Ades, F., & Luminal B.** (2014). Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *J. Clin. Oncol*, 32, 2794–2803.
- Akbari, R., Javar H.** (2013). Efficacy of Capecitabine and 5-Fluorouracil (5-FU) on the Human Breast Cancer Cell Line (MCF7) –Effect of Concentration. *American Journal of Research Communication*, 6, 75-91
- Alaskhar Alhamwe B., Khalaila R., Wolf J., von Bülow V., Harb H., Alhamdan F., Hii, C. S., Prescott, S. L., Ferrante A., Renz H., Garn H., & Potaczek, D. P.** (2018). Histone Modifications and their role in Epigenetics of Atopy and Allergic Diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14, 39.
- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S. & Kvale, G.** (2005). Breast Cancer Risk by Age at Birth, Time Since Birth and Time Intervals Between Births: Exploring Interaction Effects. *Br. J. Cancer*, 92, 167–175.
- Amatya V. J., Takeshima Y., Sugiyama K., Nishisaka T., Fuku T., & Inai K.** (2001). Immunohistochemical Study of Ki-67 (MIB-1), p53 Protein, p21WAF1, and p27KIP1 Expression in Benign, Atypical, and Anaplastic Meningiomas. *Hum Pathol.*, 32(9), 970-975.
- Ameli, F., Ghafourina Nassab, F., Masir, N., & Kahtib, F.** (2021). Tumor-Derived Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) Expression in Benign and Malignant Breast Lesions. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 22(8), 2603–2609.
- American Cancer Society** (2021). Cancer Facts & Figures, ACS, Atlanta, s. 1-72
- Anand, S., Yasinchak, A., Bullock, T., Govande, M., & Maytin, E. V.** (2019). A non-toxic Approach for treatment of Breast Cancer and its Metastases: Capecitabine Enhanced Photodynamic Therapy in a Murine Breast Tumor Model. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 5, 6.
- Ashraf, N., Zino, S., Macintyre, A., Kingsmore, D., Payne, A. P., George, W. D., et al.** (2006). Altered Sirtuin Expression is Associated with Node-Positive Breast Cancer. *Br. J. Cancer*, 95, 1056–1061. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603384

Aubrey, B., Kelly, G., Janic, A. et al. (2018). How does p53 Induce Apoptosis and how does this Relate to p53-mediated Tumour Suppression?. *Cell Death Differ*, 25, 104–113.

Badowska-Kozakiewicz, A. M., Budzik, M. P., Liszcz, A., Sobieraj, M. T., Czerw, A. I., Sobol, M., Patera, J., & Deptała, A. (2019). Clinicopathological Factors Associated with Novel Prognostic Markers for Patients with Triple Negative Breast Cancer. *Archives of Medical Science: AMS*, 15(6), 1433–1442. DOI: 10.5114/aoms.2018.79568

Baskın, Y., & Çalıbaşı, G. (2011). Kanser Hastalarında Farmakogenetik Uygulamaları ve Farmakoekonomi. *Türk Hij Den Biyol Dergisi*, 68(3), 152-64.

Batlevi, C. L., Crump, M., Andreadis, C., Rizzieri, D., Assouline, S. E., Fox, S., van der Jagt, R., Copeland, A., Potvin, D., Chao, R., & Younes, A. (2017). A Phase 2 Study of Mocetinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor, in Relapsed or Refractory Lymphoma. *British Journal of Haematology*, 178(3), 434–441.

Bayat Mokhtari, R., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination Therapy in Combating Cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022–38043.

Bergin, A., & Loi, S. (2019). Triple-negative Breast Cancer: Recent Treatment Advances. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1342. DOI: 10.12688/f1000research.18888

Bhola, P. D., & Letai, A. (2016). Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Mol Cell* 61, 695–704, DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.019

Blagosklonny M. V. (2004). Analysis of FDA Approved Anticancer drugs Reveals the Future of Cancer Therapy. *Cell Cycle*., 3, 1035-42.

Bonfils, C., Kalita, A., Dubay, M., Siu, L. L., Carducci, M. A., Reid, G., Martell, R. E., Besterman, J. M., & Li, Z. (2008). Evaluation of the Pharmacodynamic Effects of MGCD0103 from Preclinical Models to Human Using a Novel HDAC Enzyme Assay. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(11), 3441–3449.

Borbely, G., Haldosen, L. A., Dahlman-Wright, K., & Zhao, C. (2015). Induction of USP17 by Combining BET and HDAC Inhibitors in Breast Cancer Cells. *Oncotarget*, 6(32), 33623–33635. DOI: 10.18632/oncotarget.5601

Boynton-Jarrett, R. et al. (2011). Gestational Weight Gain and Daughter's age at Menarche. *Journal of Womens Health*, 20, 1193–1200.

Brenner, D., & Mak, T. W. (2009) Mitochondrial Cell Death Effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21(6), 871–7.

Brian MacMahon, M. D., Philip Cole, M. D., Brown, J., Ph.D. (1973). Etiology of Human Breast Cancer: A Review, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 50(1), 21–42, DOI: 10.1093/jnci/50.1.21

Briere, D., Sudhakar, N., Woods, D. M., Hallin, J., Engstrom, L. D., Aranda, R., Chiang, H., Sodr , A. L., Olson, P., Weber, J. S., & Christensen, J. G. (2018). The Class I/IV HDAC Inhibitor Mocetinostat Increases Tumor Antigen Presentation, Decreases Immune Suppressive Cell Types and Augments Checkpoint Inhibitor Therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 67(3), 381–392.

Britt, K. L., Cuzick, J. & Phillips, K. A. (2020). Key Steps for Effective Breast Cancer Prevention. *Nat Rev Cancer*, 20, 417–436. DOI: 10.1038/s41568-020-0266-x

Brufsky, A. M., & Dickler, M. N. (2018). Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. *The Oncologist*, 23(5), 528–539. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0423

Bucholc M, Lepecka-Klusek C, Pilewska A, Kanadys K. (2001). Women's Opinion of the Risk of Breast Cancer. *Ginekol Pol.* 72(12A), 1460-1456.

Buglio D., Mamidipudi V., Khaskhely N. M., Brady H., Heise C., Besterman J., et al. (2010). The Class-I HDAC Inhibitor MGCD0103 Induces Apoptosis in Hodgkin Lymphoma Cell Lines and Synergizes with Proteasome Inhibitors by an HDAC6-Independent Mechanism. *Br. J. Haematol*, 151, 387–396. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08342.x

Bukowska, B., Gajek, A., & Marczak, A. (2015). Two Drugs are better than One. A Short History of Combined Therapy of Ovarian Cancer. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 19(5), 350-353.

C. E. DeSantis, F. Bray, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, B. O. Anderson, A. (2015). Jemal International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(10), 1495-1506.

Cai J, et al. (2015): The Effect of MGCD0103 on CYP450 Isoforms Activity of Rats by Cocktail Method. *Biomed Res Int.*, 2015, 517295.

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., et al. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295, 2492–2502.

Catsburg C., Miller A. B., & Rohan T. E. (2015). Active Cigarette Smoking and Risk of Breast Cancer. *Int J Cancer*, 136, 2204-2209.

Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., et al. (2009). Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst*, 101, 736–750.

Cieniewicz, A. M., Moreland, L., Ringel, A. E., Mackintosh, S. G., Raman, A., Gilbert, T. M., et al. (2014). The Bromodomain of Gcn5 Regulates Site Specificity of Lysine Acetylation on Histone H3. *Mol Cell Proteom*, 13, 2896–910.

Clinton SK. 2020. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity and Breast Cancer. [Erişim:10.07.2022 <https://www.wcrf.org/sites/default/files/Summary-of-Third-Expert-Report-2018.pdf>]

Close M. J. Duffy, N. O'Donovan, McDermott, E., Crown, J. (2016). Validated Biomarkers: the key to Precision Treatment in Patients with Breast, *Cancer Breast*, 29, 192-201.

N Hamajima, K Hirose, K Tajima, T Rohan. (2001). Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Familial breast cancer. *Lancet*. ;358: 1389–1399.

Conneely O. M., Lydon J. P., De Mayo F., & O'Malley B. W. R. (2000). Eproductive Functions of the Progesterone Receptor. *J Soc Gynecol Investig*, 7(1 Suppl), S25–S32.

Costa, R., Oliveira F. T. R., Araújo, A. L. N., & Vieira, S. C. (1992). Prognostic Factors in Triple-negative Breast Cancer: A Retrospective Cohort. *Rev Assoc Med Bras*, 67(7), 950-957. DOI: 10.1590/1806-9282.20210249.

Costa, R., Oliveira, F., Araújo, A., & Vieira, S. C. (2021). Prognostic Factors in Triple-negative Breast Cancer: A Retrospective Cohort. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992), 67(7), 950–957. DOI: 10.1590/1806-9282.20210249

Crawford, E. D., & Wells, J. A. (2011). Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annu. Rev. Biochem.*, 80, 1055–87.

Çalıbaşı Koçallı, G., & Baskın, Y. (2011). Kanser Hastalarında Farmakogenetik Uygulamaları ve Farmakoekonomi. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 68(3), 152-164.

- D'Arcy, M. S.** (2019). Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- Deardorff, J. et al.** (2013). Maternal Pre-Pregnancy BMI, Gestational Weight Gain, and Age at Menarche in Daughters. *Matern. Child. Health J.* 17, 1391–1398.
- Desai, N. V., Torous V., Parker J., Auman J. T., Rosson G. B., Cruz C., et al.** (2018). Intrinsic Molecular Subtypes of Breast Cancers Categorized as HER2-Positive Using an Alternative Chromosome 17 Probe Assay. *Breast Cancer Res*, 20(1), 75. DOI: 10.1186/s13058-018-1005-z
- Desmoulin, F., Gilard, V., Malet-Martino, M., & Martino, R.** (2002). Metabolism of Capecitabine, an Oral Fluorouracil Prodrug: (19)F NMR Studies in Animal Models and Human Urine. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 30(11), 1221–1229.
- Dexter, D. L., Kowalski, H. M., Blazar, B. A., Fligiel, Z., Vogel, R., & Heppner, G. H.** (1978). Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor. *Cancer Res.* 38, 3174-3181.
- DiMasi J. A., Hansen R. W., Grabowski H. G.** (2003). The Price of Innovation: New Estimates of drug Development Costs. *J Health Econ.*, 22, 151-85.
- Duffy, M. J., Harbeck, N., Nap, M., Molina, R., Nicolini, A., Senkus, E., et al.** (2017). Clinical use of Biomarkers in Breast Cancer: Updated Guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM) *Eur. J. Cancer*, 75, 284-29.
- Dumas, J. F., & Brisson, L.** (2021). Interaction between Adipose Tissue and Cancer Cells: Role for Cancer Progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 40(1), 31–46.
- Easton, D. F. et al.** (2015). Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N. Engl. J. Med.*, 372, 2243–2257.
- Elik A., Acar M., Erkul C.M., Gunduz E., & Gunduz M.** (2015). Relationship of Breast Cancer with Ovarian Cancer. *Concise Rev. Mol. Pathol. Breast Cancer*, 87–202. DOI: 10.5772/59682.
- El-Khoury, V., Moussay, E., Janji, B., Palissot, V., Aouali, N., Brons, N. H., Van Moer, K., Pierson, S., Van Dyck, E., & Berchem, G.** (2010). The Histone Deacetylase Inhibitor MGCD0103 Induces Apoptosis in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells through a Mitochondria-Mediated Caspase Activation Cascade.

Ellis, P. A., Saccani-Jotti, G., Clarke, R., Johnston, S. R., Anderson, E., Howell, A., et al. (1997). Induction of Apoptosis by Tamoxifen and ICI 182780 in Primary Breast Cancer. *Int J Cancer*, 72, 608–613.

Elmas L. (2011). *Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Kras Gen Mutasyonlarının Realtime PCR Yöntemi ile Tespiti ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Denizli.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

Engelbraaten, O., Volland, H. K., & Børresen-Dale, A. L. (2013) Triple-negative Breast Cancer and the need for New Therapeutic Targets. *Am J Pathol* 183, 1064–1074.

Eroğlu O. (2018). Meme Kanserinde Epigenetik Tedavi. *Aktd.*, 27(3), 346-362.

Eroğlu O. (2011). Meme kanseri hastalarında TWIST, RAR β 2 ve ESR1 genlerinin metilasyon durumlarının Metilasyon Spesifik HRM (MS-HRM) yöntemiyle incelenmesi. (Doktora Tezi). Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Hansen, J., Kristiansen, K., Debril, M. B., et al. (2002). The Retinoblastoma-Histone Deacetylase 3 Complex Inhibits PPAR γ and Adipocyte Differentiation. *Dev. Cell*, 3, 903–910. DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00360-x

Falkenberg, K. J., & Johnstone, R. W. (2014). Histone Deacetylases and their Inhibitors in Cancer, Neurological Diseases and Immune Disorders. *Nat Rev Drug Discov.*, 13(9), 673-691.

Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., & Bray F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France.

Fierz B., & Muir, T. W. (2012). Chromatin as an Expansive Canvas for Chemical Biology. *Nat Chem Biol.*, 8, 417–27.

Fournel M, Bonfils C, Hou Y, et al. (2008). MGCD0103, a Novel Isotype-Selective Histone Deacetylase inhibitor, has a Broad-Spectrum Antitumor Activity in Vitro and in Vivo. *Mol Cancer Ther*, 7, 759-68.

Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S. et al. (2011). Mouse Models of Advanced Spontaneous Metastasis for Experimental Therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 11, 135–141. DOI: 10.1038/nrc3001

Frei E., Karon M., Levin R. H., Freireich E. J., Taylor R. J., Hananian J., Selawry O., Holland J. F., Hoogstraten B., Wolman I. J., Abir E., Sawitsky A., Lee S., et al. (1965). The Effectiveness of Combinations of Antileukemic Agents in Inducing and Maintaining Remission in Children with Acute Leukemia. *Blood*, 26, 642-56.

French, J. D. et al. (2013). Functional Variants at the 11q13 Risk Locus for Breast Cancer Regulate Cyclin D1 Expression Through Long-Range Enhancers. *Am. J. Hum. Genet.*, 92, 489–503.

Gallagher E. J., & LeRoith D. (2020). Hyperinsulinaemia in Cancer. *Nat Rev Cance*, 20(11), 629–44. DOI: 10.1038/s41568-020-0295-5

Globacan (2020). [Erişim:10.07.2022, [https //gco.iarc.fr/](https://gco.iarc.fr/)]

Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(6), 2129–2144.

Gryder, B. E., Sodji, Q. H., & Oyelere, A. K. (2012). Targeted Cancer Therapy: Giving Histone Deacetylase Inhibitors all They need to Succeed. *Future Med Chem.*, 4, 505-24.

Guichard S. M., Macpherson J. S., Mayer I., Reid E., Muir M., Dodds M., et al. (2008). Gene Expression Predicts Differential Capecitabine Metabolism, Impacting on both Pharmacokinetics and Antitumour Activity. *Eur J Cancer*, 44, 310-317.

Guo, J., Duan, Z., Zhang, C., Wang, W., He, H., Liu, Y., Wu, P., Wang, S., Song, M., Chen, H., Chen, C., Si, Q., Xiang, R., & Luo, Y. (2020). Mouse 4T1 Breast Cancer Cell-Derived Exosomes Induce Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages via miR-183. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 205(10), 2916–2925.

Hanahan, D. (2022). *Cancer Discov.* Hallmarks of Cancer: New Dimensions, 12, 31–46.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, 150845. DOI: 10.1155/2014/150845

Hepokur, C., Kariper, İ. A., Mısır, S., Ay, E., Tunoğlu, S., Ersez, M. S., Zeybek, Ü., Kuruca, S. E., & Yaylım, İ. (2019). Silver Nanoparticle/Capecitabine for Breast Cancer Cell Treatment. *Toxicology In Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA*, 61, 104600.

- Hill, D. A., Prossnitz, E. R., Royce, M., & Nibbe, A.** (2019). Temporal Trends in Breast Cancer Survival by Race and Ethnicity: A Population-Based Cohort Study. *PLoS One* 14, e0224064. DOI:10.1371/journal.pone.0224064
- Hiraga, T., Hata, K., Ikeda, F., Kitagaki, J., Fujimoto-Ouchi, K., Tanaka, Y., & Yoneda, T.** (2005). Preferential Inhibition of Bone Metastases by 5'-Deoxy-5-Fluorouridine and Capecitabine in the 4T1/luc Mouse Breast Cancer Model. *Oncology Reports*, 14(3), 695–699.
- Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., & Sly, P. D.** (2015). Asthma. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15025.
- Hontecillas-Prieto, L., Flores-Campos, R., Silver, A., de Álava, E., Hajji, N., & García-Domínguez, D. J.** (2020). Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Frontiers in Genetics*, 11, 578011.
- Hortobagyi G. N., Connolly J. L., D'Orsi C. J., Edge S. B., Mittendorf, E. A., et al.** (2017). Breast. Amin M. B., Edge S., Greene F., et al (Eds.), *American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual*. 8th ed. New York, NY: Springer.
- Howlander, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., & Cronin, K. A.** (2014). US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *J. Natl. Cancer*, 106, dju055.
- Huang, L., Zhao, S., Fang, F., Xu, T., Lan, M., & Zhang, J.** (2021). Advances and Perspectives in Carrier-free Nanodrugs for Cancer Chemo-monotherapy and Combination Therapy. *Biomaterials*, 268, 120557.
- Hull, E. E., Montgomery, M. R., & Leyva, K. J.** (2016). HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *Biomed Res Int.*, 2016, 8797206.
- Hurst J. H.** (2014). Pioneering geneticist Mary-Claire King receives the 2014 Lasker-Koshland Special Achievement Award in Medical Science. *The Journal of clinical investigation*. 124, 4148-4151
- Idikio, H. A.** (2011). Human Cancer Classification: A Systems Biology-Based Model Integrating Morphology, *Cancer Stem Cells, Proteomics, and Genomics*. 107-115
- Iqbal, N., & Iqbal, N.** (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*, 852748. DOI: 10.1155/2014/852748

J. Wang, W. Ma, P. T. (2015). Synergistically Improved Anti-Tumor Efficacy by Co-Delivery Doxorubicin and Curcumin Polymeric Micelles, *Macromol. Biosci*, 15, 1252-1261.

Joensuu, H., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Huovinen, R., Jukkola-Vuorinen, A., Tanner, M., Kokko, R., Ahlgren, J., et al. (2017). Adjuvant Capecitabine in Combination With Docetaxel, Epirubicin, and Cyclophosphamide for Early Breast Cancer: The Randomized Clinical FinXX Trial. *JAMA Oncology*, 3(6), 793–800.

John E. (2008). Dick, Stem Cell Concepts Renew Cancer Research. *Blood*, 112(13), 4793-4807

Johnson, K. S., MD, Conant, MD, E. F., & Soo, M. S. , MD. (2021). Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists, *Journal of Breast Imaging*, 3(1), 12–24.

Jones, S. F., Infante, J. R., Spigel, D. R., Peacock N. W., Thompson, D. S., Greco, F. A., McCulloch, W., & Burris, H. A. (2012). Phase 1 results from a Study of Romidepsin in Combination with Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Invest.*, 30, 481-6.

Jung S, Wang M, Anderson K. et al. (2016). Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk by Estrogen Receptor Status: in a Pooled Analysis of 20 Studies. *International Journal of Epidemiology*, 45, 916-928.

Kaniskan, H. Ü., Martini, M. L., & Jin, J. (2017). Inhibitors of Protein Methyltransferases and Demethylases. *Chem Rev*.

Karakulak, U. N., Aladağ, E., Maharjan, N., & Övünç, K. (2016). Capecitabine-induced Coronary Artery Vasospasm in a Patient Who Previously Experienced a Similar Episode with Fluorouracil Therapy. *Turk Kardiyol Dern Ars.*, 44(1), 71–74. DOI:10.5543/tkda.2015.36005

Kaya Çakir, H., & Eroglu, O. (2021). In Vitro Anti-proliferative Effect of Capecitabine (Xeloda) Combined with Mocetinostat (MGCD0103) in 4T1 Breast Cancer Cell Line by Immunoblotting. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(11), 1515–1522.

Kesson E. M., Allardice G. M., George W. D., et al. (2012). Effects of Multidisciplinary Team Working on Breast Cancer Survival: Retrospective, Comparative, Interventional Cohort Study of 13 722 Women. *BMJ*, 344, e2718.

Kim E.Y., Chang Y., Ahn J., Yun J., Park Y.L., Park C.H., Shin H., & Ryu S. (2020). Mammographic Breast Density, its Changes, and Breast Cancer Risk in Premenopausal and Postmenopausal Women. *Cancer*, 126, 4687–4696. DOI: 10.1002/cncr.33138

- Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J. E., Lee, S. W., et al.** (2001). Histone Deacetylases Induce Angiogenesis by Negative Regulation of Tumor Suppressor Genes. *Nat. Med.*, 7, 437–443. DOI: 10.1038/86507
- Knight J. A., Fan J., Malone K. E. et al.** (2017). Alcohol Consumption and Cigarette Smoking in Combination: A Predictor of Contralateral Breast Cancer Risk in the WECARE Study. *Int J Cancer*, 141, 916-924.
- Kuchenbaecker, K. B. et al.** (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA*, 317, 2402–2416.
- Lane, D.** (2006). Designer Combination Therapy For Cancer. *Nat Biotechnol* 24, 163–164.
- Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., Van den Bossche, J., Schouppe, E., Mommer, C., Nikolaou, A., Morias, Y., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A.** (2011). Tumor-associated Macrophages in Breast Cancer: Distinct Subsets, Distinct Functions. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-9), 861–867.
- Le Tourneau, C., & Siu, L. L.** (2008). Promising Antitumor Activity with MGCD0103, a Novel Isotype-Selective Histone Deacetylase Inhibitor. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(8), 1247–1254.
- Lee C. S., Ryan E. J., & Doherty G. A.** (2014). Gastro-intestinal Toxicity of Chemotherapeutics in Colorectal Cancer: The Role of Inflammation. *World J Gastroenterol* 20, 3751-3761.
- Lehmann, B., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & PiTENpol, J. A.** (2011). Identification of Human Triple-negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies. *J. Clin. Investig.*, 121, 2750–2767.
- Li Z., Zhou N., Fournel M., et al.** (2004). Antitumor Activities of MGCD0103, a Novel Isotype-Selective Histone Deacetylase Inhibitor. 16th EORTC-NCI-AACR Symp Mol Targets Cancer Ther. *Eur J Cancer Suppl*, 2, A83.
- Liao B, Sun Q, Yuan Y, Yin Y, Qiao J, Jiang P.** (2020). Histone Deacetylase Inhibitor MGCD0103 Causes Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy in Liver Cancer Cells. *J Cancer*, 11(7), 1915-1926. DOI:10.7150/jca.34091.
- Ligtenberg, M. J. et al.** (1999). Characteristics of Small Breast and/or Ovarian Cancer Families with germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Br. J. Cancer*, 79, 1475–1478.

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000).** *Tumor Cells and the Onset of Cancer. Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York: W.H. Freeman.
- Loh, H. Y., Norman, B. P., Lai, K. S., Rahman, N., Alitheen, N., & Osman, M. A. (2019).** The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4940. DOI: 10.3390/ijms20194940
- Loh, H. Y., Norman, B. P., Lai, K. S., Rahman, N., Alitheen, N., & Osman, M. A. (2019).** The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4940. DOI: 10.3390/ijms20194940
- Loo, W. T., Sasano, H., & Chow, L. W. (2007).** Effects of Capecitabine and Vinorelbine on Cell Proliferation, Metabolism and COX2 and p16 Expression in Breast Cancer Cell Lines and Solid Tumour Tissues. *Biomedicine & Pharmacotherapy=Biomedecine & Pharmacotherapie*, 61(9), 596–600.
- Look, M. P., van Putten, W. L. J., Duffy, M. J., Harbeck, N., Christensen, I. J., Thomssen, C., et al. (2002).** Pooled Analysis of Prognostic Impact of Tumor Biological Factors uPA and PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94, 116-128.
- Lopez, G., Braggio, D., Zewdu, A., Casadei, L., Batte, K., Bid, H. K., Koller, D., Yu, P., Iwenofu, O. H., Strohecker, A., Choy, E., Lev, D., & Pollock, R. (2017).** Mocetinostat Combined with Gemcitabine for the Treatment of Leiomyosarcoma: Preclinical Correlates. *PloS One*, 12(11), e0188859.
- Lopez, G., Braggio, D., Zewdu, A., Casadei, L., Batte, K., Bid, H. K., Koller, D., Yu, P., Iwenofu, O. H., Strohecker, A., Choy, E., Lev, D., & Pollock, R. (2017).** Mocetinostat Combined with Gemcitabine for the Treatment of Leiomyosarcoma: Preclinical Correlates. *PloS One*, 12(11), e0188859.
- Lowe, S. W. (2000).** Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495. DOI:10.1093/carcin/21.3.485
- Lu, H. P., Ma, F. F., Gong, J. R., & Wang, B. (2017).** Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 97(46), 3647–3651. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.46.011
- Luger, S. M., O'Connell, C. L., LKlimek, V., Cooper, M. A., Besa, E. C., Rossetti, J. M., et al. (2013).** A Phase II Study of Mocetinostat, an Oral Isotype-selective Histone Deacetylase

(HDAC) Inhibitor, in Combination with 5-azacitidine in Patients with Myelodysplastic Syndrome (MDS). *J Clin Oncol*, 31(suppl), abstr 7116.

Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. DOI: 10.3390/cancers13174287

Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. DOI: 10.3390/cancers13174287

Lyons, T. G. (2019). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(11), 82. DOI: 10.1007/s11864-019-0682-x

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin. Med. Insights Pathol*, 8, 23–31.

Marson, C. M., Matthews, C. J., Atkinson, S. J., Lamadema, N., & Thomas, N. S. (2015). Potent and Selective Inhibitors of Histone Deacetylase-3 Containing Chiral Oxazoline Capping Groups and a N-(2-Aminophenyl)-Benzamide Binding Unit. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(17), 6803–6818.

Meidhof, S., Brabletz, S., Lehmann, W., Preca, B. T., Mock, K., Ruh, M., Schüler, J., Berthold, M., Weber, A., Burk, U., Lübbert, M., Puhr, M., Culig, Z., Wellner, U., Keck, T., Bronsert, P., Küsters, S., Hopt, U. T., Stemmler, M. P., & Brabletz, T. (2015). ZEB1-Associated Drug Resistance in Cancer Cells is Reversed by the Class I HDAC Inhibitor Mocetinostat. *EMBO Molecular Medicine*, 7(6), 831–847.

Miller, F. R., Miller, B. E., & Heppner, G. H. (1983). Characterization of Metastatic Heterogeneity among Subpopulations of a single Mouse Mammary Tumor: Heterogeneity in Phenotypic Stability. *Invasion Metastasis*, 3(1), 22-31.

Millward, M., Price, T., Townsend, A., Sweeney, C., Spencer, A., Sukumaran, S., Longenecker, A., Lee, L., Lay, A., Sharma, G., Gemmill, R. M., Drabkin, H. A., Lloyd, G. K., et al. (2012). Phase 1 Clinical Trial of the Novel Proteasome Inhibitor Marizomib with the Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat in Patients with Melanoma, Pancreatic and Lung Cancer based on In Vitro Assessments of the Combination. *Invest New Drugs*, 30, 2303-17.

- Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I., & Ishitsuka, H.** (1998). Design of a Novel Oral Fluoropyrimidine Carbamate, Capecitabine, which Generates 5-Fluorouracil Selectively In Tumours by Enzymes Concentrated in Human Liver and Cancer Tissue. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 34(8), 1274–1281. DOI: 10.1016/s0959-8049(98)00058-6
- Mohammadian, M., Zeynali-Moghaddam, S., Khadem Ansari, M. H., Rasmi, Y., Fathi Azarbayjani, A., & Kheradmand, F.** (2019). Dihydropyrimidine Dehydrogenase Levels in Colorectal Cancer Cells Treated with a Combination of Heat Shock Protein 90 Inhibitor and Oxaliplatin or Capecitabine. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(3), 439–444.
- Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M.** (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, 13(3), 339–354.
- Nagata, S.** (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, 36, 489–517.
- Nascimento, R. G., & Otoni, K. M.** (2014). Histological and Molecular Classification of Breast Cancer: What Do We Know? West AC, Johnstone RW. New and Emerging HDAC Inhibitors For Cancer Treatment. *J Clin Invest*, 124, 30-9.
- Neilson, H. K. et al.** (2017). Moderate–vigorous Recreational Physical Activity and Breast Cancer Risk, Stratified by Menopause Status: A Systematic Review and Meta-analysis. *Menopause*, 24, 322–344.
- Newman, L. A., Reis-Filho, J. S., Morrow, M., Carey, L. A., King, T. A.** (2014). The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: Triple-Negative Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 22, 874–882.
- Ng J., & Shuryak I.** (2014). Minimizing Second Cancer Risk Following Radiotherapy: Current Perspectives. *Cancer Manag. Res.*, 7, 1–11. DOI: 10.2147/CMAR.S47220.
- Nijhawan, D., et al.** (2003). Elimination of Mcl-1 is Required for the Initiation of Apoptosis Following Ultraviolet Irradiation. *Genes Dev.*, 17, 1475–1486, DOI: 10.1101/gad.1093903
- O'Brien, K. M., Cole, S. R., Tse, C. K., Perou, C. M., Carey, L. A., Foulkes, W. D., Dressler, L. G., Geradts, J., & Millikan, R. C.** (2010). Intrinsic breast Tumor Subtypes, Race, and Long-Term Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin. Cancer Res.*, 16, 6100–6110.

- O'Shaughnessy J.** (2002). Capecitabine and docetaxel in Advanced Breast Cancer: Analyses of a phase III Comparative Trial. *Oncology (Williston Park)*, 16, 17–22.
- Obeng, E.** (2021). Apoptosis (Programmed Cell Death) and its Signals - A Review. *Brazilian Journal of Biology=Revista Brasileira de Biologia*, 81(4), 1133–1143.
- Obr A. E., & Edwards D. P.** (2012). The Biology of Progesterone Receptor in the Normal Mammary Gland and in Breast Cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 357(1–2), 4–17.
- Ozaki, T., & Nakagawara, A.** (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, 3(1), 994–1013.
- Parise, C. A., Bauer, K. R., Brown, M. M., & Caggiano, V.** (2009). Breast Cancer Subtypes as Defined by the Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Among Women with Invasive Breast Cancer in California, 1999–2004. *Breast J.*, 15, 593–60.
- Park, S. Y., & Kim, J. S.** (2020). A Short Guide to Histone Deacetylases Including Recent Progress on Class II Enzymes. *Exp. Mol. Med.*, 52, 204–212. DOI: 10.1038/s12276-020-0382-4
- Paschall, A. V., & Liu, K.** (2016). An Orthotopic Mouse Model of Spontaneous Breast Cancer Metastasis. *Journal of Visualized Experiments:JoVE*, (114), 54040. DOI: 10.3791/54040
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F.** (2014). Estrogen Receptors Alpha (ER α) and Beta (ER β): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids*, 90, 13–29. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.
- Perou C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., et al.** (2000). Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752.
- Petrelli, F., Viale, G., Cabiddu, M., Barni, S.** (20015). Prognostic Value of Different Cut-off Levels of Ki-67 in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of 64, 196 Patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 153, 477-491.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S.** (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem.*, 276, 36734-41.

- Pistelli, M., Pagliacci, A., Battelli, N., Santinelli, A., Biscotti, T., Ballatore, Z., Berardi, R., & Cascinu, S.** (2013). Prognostic Factors in Early-stage Triple-negative Breast Cancer: Lessons and Limits from Clinical Practice. *Anticancer Research*, 33(6), 2737–2742.
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S.** (2001). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology, Chapter 20*, DOI: 10.1002/0471142735.im2002s39
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S.** (2001). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology, Chapter 20*.
- Raedler L. A.** (2016). Lonsurf (Trifluridine plus Tipiracil): A New Oral Treatment Approved for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *American Health & Drug Benefits*, 9 (Spec Feature), 97–100.
- Reichardt P., Von Minckwitz G., Thuss-PatiencePC, et al.** (2003). Multicenter Phase II Study of Oral capecitabine (Xeloda(®)) in Patients with Metastatic breast Cancer Relapsing after Treatment with Ataxane-Containing Therapy. *Ann Oncol*, 14(8), 1227-1233.
- Rojas, K., & Stuckey, A.** (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 651–672. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000239
- Rosen, R. D., & Sapra, A.** (2022) TNM Classification. StatPearls,
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J.** (2012). Histone Phosphorylation: A Chromatin Modification Involved in Diverse Nuclear Events. *Epigenetics*, 7, 1098–108.
- Roth, W., & Reed, J. C.** (2004). FLIP Protein and TRAIL-induced Apoptosis. *Vitamins and Hormones*, 67, 189–206. DOI: 0.1016/S0083-6729(04)67011-7
- Ryan, Q. C., Headlee, D., Acharya, M., Sparreboom, A., Trepel, J. B., Ye, J., Figg, W. D., Hwang, K., Chung, E. J., & Murgo, A.** (2005). Phase I and Pharmacokinetic Study of MS-275, a Histone Deacetylase Inhibitor, in Patients with Advanced and r-Refractory Solid Tumors or Lymphoma. *J Clin Oncol.*, 23, 3912-22
- Salem, A. F., Wang, S., Billet, S., Chen, J. F., Udompholkul, P., Gambini, L., Baggio, C., Tseng, H. R., Posadas, E. M., Bhowmick, N. A., & Pellecchia, M.** (2018). Reduction of Circulating Cancer Cells and Metastases in Breast-Cancer Models by a Potent EphA2-Agonistic Peptide-Drug Conjugate. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(5), 2052–2061.

- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M.** (2013). Cancer Development, Progression, And Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087–21113.
- Schuller, J., Cassidy, J., Dumont, E., et al.** (2000). Preferential Activation of Capecitabine in Tumor Following Oral Administration to Colorectal Cancer Patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 45, 291.
- Schwertman, P., Bekker-Jensen, S., & Mailand, N.** (2016). Regulation of DNA Double-Strand Break Repair by Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 17, 379–94.
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., et al.** (2015). Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up ESMO Guidelines Committee Ann. *Oncol.*, 26 (Suppl. 5), v8-v30.
- Shan, W., Jiang, Y., Yu, H., Huang, Q., Liu, L., Guo, X., Li, L., Mi, Q., Zhang, K., & Yang, Z.** (2017). HDAC2 Overexpression Correlates with Aggressive Clinicopathological Features and DNA-damage Response Pathway of Breast Cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), 1213–1226.
- Shen, Y., & White, E.** (2001). p53-dependent Apoptosis Pathways. *Advances in Cancer Research*, 82, 55–84.
- Siddiqui, N. S., Godara, A., Byrne, M. M., & Saif, M. W.** (2019). Capecitabine for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(4), 399–409.
- Sim, J. J., Park, M. H., Baek, J. H., Lee, H., Jeong, K. Y., & Kim, H. M.** (2018). Investigation into Enhancing Capecitabine Efficacy in Colorectal Cancer by Inhibiting Focal Adhesion Kinase Signaling. *Anticancer Research*, 38(8), 4667–4676.
- Singh, M. K., Pindiprolu, S., Reddy Sanapalli, B. K., Yele, V., & Ganesh, G.** (2019). Tumor Homing Peptide Modified Liposomes of Capecitabine for Improved Apoptotic Activity and HER2 Targeted Therapy in Breast Cancer: In Vitro Studies. *RSC Advances*, 9(43), 24987–24994.
- Singhai, R., Patil, V. W., Jaiswal, S. R., Patil, S. D., Tayade, M. B., & Patil, A. V.** (2011). E-Cadherin as a Diagnostic Biomarker in Breast Cancer. *North American Journal of Medical Sciences*, 3(5), 227–233.

- Smith, R. A., Andrews, K. S., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D., & Wender, R. C.** (2019). Cancer Screening in the United States, 2019: A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Current Issues in Cancer Screening. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 69(3), 184–210.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S.** (1998). Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-Mediated Oligomerization. *Mol Cell*, 1(7), 949-957.
- Sterner, D. E., Berger, S. L.** (2000). Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors Microbiol. *Mol Biol Rev*, 64, 435-459.
- Sun Y. S., Zhao Z., Yang Z. N., Xu F., Lu H. J., Zhu Z. Y., Shi W., Jiang J., Yao, P. P., & Zhu H. P.** (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*, 13(11):1387-1397.
- 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 Cancer J. Clin.*, 71, 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- Suzuki, R., Orsini, N., Saji, S., Key, T. J. & Wolk, A.** (2009). Body Weight and Incidence of Breast Cancer Defined by Estrogen and Progesterone Receptor Status-A Meta-Analysis. *Int. J. Cancer*, 124, 698–712.
- Taleblou, N., Sirousazar, M., Hassan, Z. M., & Khaligh, S. G.** (2020). Capecitabine-loaded Anti-cancer Nanocomposite Hydrogel Drug Delivery Systems: *in Vitro* and *in Vivo* Efficacy Against the 4T1 Murine Breast Cancer Cells. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 31(1), 72–92.
- Tamm, I., Schrieffer, F., & Dorken, B.** (2001). Apoptosis: Implications of Basic Research for Clinical Oncology. *Lancet Oncol.*, 2, 33–42.
- Tassara, M., Döhner, K., Brossart, P., Held, G., Götze, K., Horst, H. A., Ringhoffer, M., Köhne, C. H., Kremers, S., Raghavachar, A., Wulf, G., Kirchen, H., & Nachbaur, D.** (2014). Valproic Acid in Combination with All-trans Retinoic Acid and Intensive Therapy for Acute Myeloid Leukemia in Older Patients. *Blood*, 123, 4027-36.
- Terranova-Barberio, M., Pecori, B., Roca, M. S. et al.** (2017). Synergistic Antitumor Interaction between Valproic Acid, Capecitabine and Radiotherapy in Colorectal Cancer: Critical role of p53. *J Exp Clin Cancer Res*, 36, 177.

Terranova-Barberio, M., Pecori, B., Roca, M. S., Imbimbo, S., Bruzzese, F., Leone, A., Muto, P., Delrio, P., Avallone, A., Budillon, A., & Di Gennaro, E. (2017). Synergistic Antitumor Interaction Between Valproic Acid, Capecitabine and Radiotherapy in Colorectal Cancer: Critical Role Of p53. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 36(1), 177.

Terranova-Barberio, M., Roca, M. S., Zotti, A. I., Leone, A., Bruzzese, F., Vitagliano, C., Scogliamiglio, G., Russo, D., D'Angelo, G., Franco, R., Budillon, A., & Di Gennaro, E. (2016). Valproic acid potentiates the Anticancer Activity of capecitabine in vitro and in vivo in Breast Cancer Models Via induction of Thymidine Phosphorylase Expression. *Oncotarget*, 7(7), 7715–7731. DOI: 10.18632/oncotarget.6802

Trabert, B., Sherman, M. E., Kannan, N., & Stanczyk, F. Z. (2020). Progesterone and Breast Cancer. *Endocrine Reviews*, 41(2), 320–344. DOI: 10.1210/endrev/bnz001

Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 Family Proteins in Apoptosis: Apoptosomes or Mitochondria?. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 3(11), 697–707.

Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E. C., Brunetti, M., Renzoni, D., et al. (2004). Crystal Structure of a Eukaryotic Zinc-Dependent Histone Deacetylase, Human HDAC8, Complexed with a Hydroxamic Acid Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15064–15069. DOI: 10.1073/pnas.0404603101

Visapää H., Bui M., Huang Y., Seligson D., Tsai H., Pantuck A., et al. (2003). Correlation of Ki-67 and Gelsolin Expression to Clinical Outcome in Renal Clear Cell Carcinoma. *Urology*, 61(4), 845–50.

Vona-Davis, L., Rose, D. P., Hazard, H., Howard-McNatt, M., Adkins, F., Partin, J., & Hobbs, G. (2008) Triple-negative Breast Cancer and Obesity in a Rural Appalachian Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 3319–3324.

Wang, D-Y., Jiang, Z., Ben-David, Y., Woodgett, J. R., & Zacksenhaus, E. (2019). Molecular Stratification within Triple-negative Breast Cancersubtypes. *Sci. Rep.*, 9, 19107.

Wang, F., Wang, F. H., Bai, L., & Xu, R. H. (2014). Role of Capecitabine in Treating Metastatic Colorectal Cancer in Chinese Patients. *OncoTargets and Therapy*, 7, 501–511.

Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological Types of Breast Cancer: How Special are They? *Mol. Oncol.* 2010, 4, 192–208.

Weigelt, B., Horlings, H. M., Kreike, B., Hayes, M. M., Hauptmann, M., Wessels, L. F. A., De Jong, D., van de Vijver, M., Veer, L. J. V., & Peterse, J. L. (2008). Refinement of Breast Cancer Classification by Molecular Characterization of Histological Special Types. *J. Pathol*, 216, 141–150.

Weinhold B. (2006). Epigenetics: the Science of Change. *Environ Health Perspect*, 114, A160-7.

Won, K-A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative Breast Cancer Therapy: Current and Future Perspectives. *Int. J. Oncol.* 57(6), 1245–1261. DOI:10.3892/ijo.2020.513

Won, K-A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative Breast Cancer Therapy: Current and Future Perspectives. *Int. J. Oncol.* 57(6). 1245–1261. DOI:10.3892/ijo.2020.513

Wooster, R. et al. (1995). Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *Nature*, 378, 789–792.

Yabroff, K. R., Wu, X. C., Negoita, S., Stevens, J., Coyle, L., Zhao, J., Mumphrey, B. J., Jemal, A., Ward, K. C. (2021). Association of the COVID-19 Pandemic with Patterns of Statewide Cancer Services. *J Natl Cancer Inst.* June 28.

Yang, C., Zhang, J., Ding, M., et al. (2018). Ki67 Targeted Strategies for Cancer Therapy. *Clin Transl Oncol*, 20, 570–575. DOI: 10.1007/s12094-017-1774-3

Yap T. A., Omlin, A., de Bono, J. S. (2013). Development of Therapeutic Combinations Targeting Major Cancer Signaling Pathways. *J Clin Oncol.*, 31, 1592-605.

Yulan G. U., & Jinlian Z. H. U. (2021). Trial study of Capecitabine Metronomic Chemotherapy Combined with Exemestane inhibit Proliferation of Breast Cancer Cells by PI3K-AKT Signaling Pathway. *Cancer Research and Clinic*; 6, 401-407.

Zhang SH, Zhang H, He HW, Li L, Li XQ, Zhang YP, et al. (2013). Lidamycin Up-regulates the Expression of Thymidine Phosphorylase and Enhances the Effects of Capecitabine on the Growth and Pulmonary Metastases of Murine Breast Carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 72, 777-788.

Zhang X., Tworoger S., Eliassen A. H., Hankinson S. E. (2013). Postmenopausal Plasma Sex Hormone Levels and Breast Cancer Risk Over 20 Years of Follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.*, 137, 883–892. DOI: 10.1007/s10549-012-2391-z.

Zhang, Q., Sun, M., Zhou, S., & Guo, B. (2016). Class I HDAC Inhibitor Mocetinostat Induces Apoptosis by Activation of miR-31 Expression and Suppression of E2F6. *Cell Death Discovery*, 2, 16036.





EKLER

EK-1: MEME KARSİNOMUNDA TNB EVRELEME SİSTEMİ (HORTOBAGYI, 2017)

Evre 0	T is	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N0	M0
	T3	N0	Mo
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangi T	N3	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1