



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**PROTEİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN İBRUTİNİB VE TACC3
İNHİBİTÖRÜ OLAN BO-264'ÜN KOMBİNE KULLANIMININ
MEME KANSERİ ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİSİ**

İrem KARA DÖNE

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Rifkı TOPÇUL

Şubat, 2023

İSTANBUL

Bu alışma, 27.03.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2022-38489 numaralı projesi ile desteklenmiştir. |

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

1. ÖNSÖZ

Çalışmamda bana rehberlik eden sayın danışmanım Doç. Dr. Mehmet Rıfki TOPÇUL'a ve sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN'e çok teşekkür ederim.

Aynı zamanda yardımları için aynı laboratuvarı paylaştığım sayın arkadaşlarım Ercan PULAT ve Eda Nur AVŞAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her döneminde güçlü kişiliğiyle bana muhteşem bir örnek olan sevgili annem Şadiye KARA'ya; bana her zaman inandığı ve sabır gösterdiği için sevgili yoldaşım ve eşim Ali Rıza DÖNE'ye; beni girdiğim her yolda, ortaya attığım her uçuk fikirde ve her kararsızlığımda destekleyen sevgili kız kardeşlerim İzel ŞAHİN ve Gizem KARA'ya; ufkumu açtığı ve muhteşem bir arkadaş olduğu için sevgili Aysen ÇELİKTAŞ'a canı gönülden teşekkür ederim.

Fakat en çok bu tezi yazma sebebim olan sevgili babam İbrahim KARA'ya teşekkür ediyorum. Tezimi sana adıyorum baba, senin için yazdım. İyi ki vardın. |

Şubat 2023

İrem KARA DÖNE

2. İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖNSÖZ	iv
2. İÇİNDEKİLER	v
3. ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
4. TABLO LİSTESİ.....	ix
5. SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
6. ÖZET	xii
7. SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1 Meme Kanseri ve Moleküler Alt Tipleri.....	2
2.1.1. Bazal Benzeri: Üçlü Negatif Meme Kanseri.....	3
2.1.2. Luminal B Meme Kanseri.....	3
2.1.3. Claudin-low Meme Kanseri.....	4
2.1.4 Luminal A Meme Kanseri.....	4
2.1.5 HER2 ⁺ Meme Kanseri.....	5
2.2. İbrutinib ve Etki Mekanizması.....	6
2.3. BO-264 ve Etki Mekanizması.....	7
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	9
3.1. Hücre Soyları.....	9
3.2. Hücrelerin Pasaj İşlemi.....	9
3.3. Hücrelerin Ekim İşlemi.....	9
3.4. İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması.....	10

3.4.1. İbrutinib (Imbruvica 140 mg)	10
3.4.2. BO-264.....	10
3.4.3. İlaç Dozlarının Uygulanması.....	10
3.5. Hücre Kinetiği Parametreleri.....	10
3.5.1. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA).....	10
3.5.2. Mitotik Aktivite Analizi.....	11
3.5.3. BrdU Hücre Proliferasyon Analizi.....	12
3.5.4. Kaspaz 3,7 Aktivitesi Analizi.....	13
3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. XCELLigence RTCA Sistemi Bulguları	15
4.2. Mitotik Aktivite Analizi Bulguları	21
4.3. BrdU Hücre Proliferasyon Analizi Bulguları	24
4.4. Kaspaz 3,7 Aktivitesi Analizi Bulguları	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	28
6. KAYNAKLAR	32
7. ÖZGEÇMİŞ	38

3. ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 4.1:** İbrutinib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,5 μ M, -- 40 μ M, -- 50 μ M).....**15**
- Şekil 4.2:** BO-264 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,5 μ M, -- 40 μ M, -- 50 μ M).....**16**
- Şekil 4.3:** İbrutinib uygulanan MCF-7 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,5 μ M, -- 5 μ M, -- 30 μ M).....**16**
- Şekil 4.4:** BO-264 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,5 μ M, -- 10 μ M, -- 30 μ M).....**17**
- Şekil 4.5:** İbrutinib uygulanan SKBR3 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,5 μ M, -- 40 μ M, -- 50 μ M)....**18**
- Şekil 4.6:** BO-264 uygulanan SKBR3 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,5 μ M, -- 5 μ M, -- 40 μ M).....**18**
- Şekil 4.7:** Kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 10 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264, -- 20 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264, -- 40 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264).....**19**
- Şekil 4.8:** Kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 1,25 μ M İbrutinib + 1,25 μ M BO-264, -- 0,5 μ M İbrutinib + 1,25 BO-264, -- 2,5 μ M İbrutinib + 5 μ M BO-264).....**20**

Şekil 4.9: Kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 0,125 μ M İbrutinib + 0,5 BO-264, -- 0,5 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264, -- 0,25 μ M İbrutinib + 1,25 μ M BO-264).....	21
Şekil 4.10: 10 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik aktivite - zaman grafiği.....	22
Şekil 4.11: 1,25 μ M İbrutinib ve 1,25 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik aktivite - zaman grafiği.....	23
Şekil 4.12: 0,5 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait mitotik aktivite - zaman grafiği.....	23
Şekil 4.13: 10 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait BrdU aktivitesi - zaman grafiği.....	24
Şekil 4.14: 1,25 μ M İbrutinib ve 1,25 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait BrdU aktivitesi - zaman grafiği.....	25
Şekil 4.15: 0,5 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait BrdU aktivitesi - zaman grafiği.....	25
Şekil 4.16: 10 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi - zaman grafiği.....	26
Şekil 4.17: 1,25 μ M İbrutinib ve 1,25 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi - zaman grafiği.....	27
Şekil 4.18: 0,5 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi - zaman grafiği.....	27

4. TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Meme kanseri moleküler alt tipleri (Holliday ve Speirs, 2011).....	2
Tablo 4.1: 24, 48 ve 72 saat boyunca, kombin doz uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3 hücrelerine ait mitotik aktivite değerleri	22
Tablo 4.2: 24, 48 ve 72 saat boyunca, kombin doz uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri.....	24
Tablo 4.3: 24, 48 ve 72 saat boyunca, kombin doz uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi değerleri.....	26
Tablo 5.1: İbrutinib'in çeşitli hücre hatları üzerine etkisi.....	28

5. SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
CO ₂	: Karbondioksit
g	: Dönme hızı
kDa	: Kilodalton
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
NaHCO ₃	: Sodyum Bikarbonat
nM	: Nanomolar
pH	: Potansiyel Hidrojen
°C	: Santigrat

Kisaltmalar	Açıklama
AKT	: Protein Kinaz B
BLBC	: Bazal Benzeri Meme Kanseri
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoksiüridin
BTK	: Bruton's Tirozin Kinaz
CI	: Kombinasyon İndeksi
CL	: Claudin-low
CLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Östrojen Reseptörü
ERBB	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERBB2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
HER3	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 3
HER4	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 3

IC₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MDSC	: Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PD-L1	: Programlanmış Ölüm Proteini Ligandı 1
PIP3	: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfat
PR	: Progesteron Reseptörü
SLL	: Küçük Lenfositik Lenfoma
TACC3	: Asidik Sarmal Bobin 3
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
xCelligence RTCA-DP	: xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi-Dual Purpose

6. ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[PROTEİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN İBRUTİNİB VE TACC3 İNHİBİTÖRÜ OLAN BO-264'ÜN KOMBİNE KULLANIMININ MEME KANSERİ ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİSİ]

[İrem KARA DÖNE]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Biyoloji Anabilim Dalı]

Danışman : [Doç. Dr. Mehmet Rıfki TOPÇUL]

[Bu çalışmada Bruton Tirozin Kinaz'ın kuvvetli bir inhibitörü olan ve B lenfosit hücrelerine ait malign hastalıkların bir kısmı üzerine kullanımı için FDA'dan onay almış İbrutinib ile, henüz yeni keşfedilen bir TACC3 inhibitörü olan BO-264'ün tek tek ve kombine kullanımının çeşitli meme kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla MDA-MB-231, SKBR3 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmış ve kombin dozların değerlendirilmesi için xCELLigence tabanlı analiz sistemi, mitotik aktivite testi, BrdU proliferasyon testi ve kaspaz 3,7 aktivitesi testi uygulanmıştır.

Hem İbrutinib hem de BO-264'ün tek tek uygulanması kanser hücreleri üzerinde azaltıcı bir etki göstermekle birlikte kombin kullanımının en etkili olduğu hücre hattı MCF-7 olmuştur. İbrutinib ve BO-264 düşük bir kombinasyon dozuyla ve CI 0,4 değeriyle MCF-7 hücre hattı üzerinde sinerjistik etki yaratmış ve bulgulara göre bu etkiyi mitotik aktiviteyi azaltıp, kaspaz aktivitesini artırarak hücreyi apoptoza yönlendirmesiyle sağladığı sonucuna varılmıştır.]

Şubat 2023, [51] sayfa.

Anahtar kelimeler: [BO-264, HER2, İbrutinib, Meme Kanseri, Tirozin Kinaz, xCELLigence]

7. SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

**[ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF COMBINATION OF PROTEIN
KINASE INHIBITOR IBRUTINIB AND TACC3 INHIBITOR BO-264 ON
BREAST CANCER]**

[İrem KARA DÖNE]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor : [Assoc. Prof. Dr.] [Mehmet Rifkî TOPÇUL]

[This study aimed to investigate the antiproliferative effects of combined use of BO-264 which a newly discovered TACC3 inhibitor with Ibrutinib which a potent inhibitor of Bruton Tyrosine kinase and approved by the FDA for use on some of the malignant diseases of B lymphocyte cells. For this purpose, MDA-MB-231, MCF-7, SKBR3 cell lines were used and xCELLigence-based analysis system, mitotic activity test, BrdU proliferation test and caspase 3,7 activity test were applied for the evaluation of combined doses.]

The use of both Ibrutinib and BO-264 alone showed a reducing effect on cancer cells. The combination of Ibrutinib and BO-264 is most effective in the cell line MCF-7. Ibrutinib and BO-264 showed a synergistic effect on the MCF-7 cell line with a low combination dose and a CI 0.4 value. According to the findings, it was concluded that this effect was achieved by reducing mitotic activity and increasing caspase activity by directing the cell to apoptosis.]

February 2023, [51] pages.

Keywords: [BO-264, HER2, Ibrutinib, Breast cancer, Tyrosin kinase, xCELLigence]

1. GİRİŞ

Kanser; insan hayatını tehdit eden, farklı dokulara metastaz yapabilen, temelde anormal hücre bölünmelerinin oluşturduğu bir hastalıktır (Siegel ve diğ., 2019). Kanser tedavisi için, kemoterapi, radyoterapi, cerrahi gibi birçok yol olmasına rağmen tam bir başarı sağlanamamıştır (Battle ve Clevers, 2017). Meme kanseri dünyanın gelişmiş ülkelerinde kadınlarda en sık görülen kanserlerden biri olup tüm kadınların yaklaşık %20'sinde ölüm nedenidir (Macdonald ve diğ., 2004; Beiki ve diğ., 2012).

Çoğunlukla meme kanseri için sistemik tedaviler oldukça etkilidir ve sonuçlara göre adjuvan endokrin tedavisi ve kemoterapi meme kanseri mortalitesini birbirinden bağımsız olarak yaklaşık üçte bir gibi ciddi bir oranda azaltmakla birlikte (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2011; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2012) tedavi başarısı moleküler alt tipe, mutlak tekrarlama riskine ve tümör yüküne bağlıdır (Scully ve diğ., 2012).

Meme kanseri; histoloji, hücresel köken, mutasyonlar, metastatik potansiyel, hastalık ilerlemesi, terapötik yanıt ve klinik sonuç açısından karmaşık ve heterojen bir hastalıktır (Ossovskaya ve diğ., 2011). Bu sebeple kombinasyon tedavileri faydalı olabilir.

Kombinasyon tedavisi farklı mekanizmalara sahip iki veya daha fazla farmakolojik ajanın tedavi sürecinde aynı anda uygulanmasıdır. Kombinasyon tedavisi uzun süredir birincil kanser tedavisi olarak benimsenmiştir (Pritchard ve diğ., 2012). Tek ilaç tedavisine bakarak kombine tedavi, farklı sinyal yollarını hedefleyerek ilaç direncini azaltma yeteneğine sahiptir (Fodale ve diğ., 2011).

2. GENEL KISIMLAR

2.1 Meme Kanseri ve Moleküler Alt Tipleri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignite olmakla beraber moleküler düzeyde heterojen ve karmaşık bir hastalıktır. Son yıllarda tedavi süreçleri bu heterojenliği dikkate alarak gelişmiştir. Meme kanseri sürecindeki temel tedavi yöntemi bölgesel tedavi ve sistemik tedavidir -ki meme kanserinin moleküler ve histolojik özellikleri tedavi kararının ne yönde olacağını büyük ölçüde etkiler. Meme karsinogenezini yönlendiren moleküler değişiklikler çok çeşitlidir ve tümörleri bunu dikkate alarak sınıflandırmak gerekmiştir (Harbeck ve diğ., 2019.)

Perou ve Sorlie'nin içsel sınıflandırmasına göre meme kanseri: luminal A ve luminal B, bazal benzeri ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ile zenginleştirilmiş olmak üzere ayrılmıştır (Perou ve diğ., 2000) fakat şu anda histolojik ve moleküler özellikler dikkate alınarak oluşturulan beş alt tipten oluşan bir sınıflandırma kullanılır (Tablo 2.1). ER, PR ya da her ikisini de ifade eden tümörler hormon reseptörü pozitif meme kanserleri olarak; ER, PR veya HER2 ifade etmeyen tümörler ise üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak kabul edilir (Harbeck ve diğ., 2019).

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Holliday ve Speirs, 2011).

Sınıflandırma	İmmunoprofil	Örnek Hücre Dizileri
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	BT474, ZR-75
Bazal (TNBC)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-düşük	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	SKBR3, MDA-MB-453

2.1.1 Bazal Benzeri: Üçlü Negatif Meme Kanseri

Üçlü negatif meme kanseri, ER, PR ve HER2'nin eksprese edilmediği bir meme kanseri türüdür (Wolff ve diğ., 2013) ve genellikle bazal benzeri meme kanserinin (BLBC) bir alt tipi olarak sınıflandırılır. Gen ekspresyon profillerinin benzerlik oranı TNBC ve BLBC arasında %60-90 kadar yüksekken, TNBC olmayan ve BLBC arasında yalnızca %11,5 kadardır (Perou ve diğ., 2000; Prat ve diğ., 2015).

TNBC, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini temsil eder ve TNBC'li hastaların diğer meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında daha kötü bir prognozu vardır (Anders ve Carey 2009). Tüm meme kanseri hastalarının %15-20 kadarı 40 yaşın altındadır ve verilere göre TNBC çoğunlukla bu gruptaki kadınlarda görülmektedir (Morris ve diğ., 2007). Diğer meme kanserleriyle karşılaştırıldığında TNBC hastalarının tanıyı almalarından sonraki 5 yıl içinde ölüm oranı %40'tır (Dent ve diğ., 2007). TNBC oldukça agresiftir ve hastalarının yaklaşık %46'sında metastaz görülmekle beraber metastaz çoğunlukla tanıdan sonraki 3. yılda ortaya çıkar (Lin ve diğ., 2008). Metastaz sonrasında sağkalım süresi ortalama 13,3 aydır ve TNBC olmayan hastalarda ortalama nüks süresi 35-67 ay olmasına rağmen TNBC hastalarında bu süre 19-40 ay kadardır ve TNBC hastalarının nüksten sonraki 3 ay içindeki ölüm oranı %75'tir (Zhang ve diğ., 2015; Gluz ve diğ., 2009). Üstelik TNBC birçok geni eksprese etmemesi sebebiyle endokrin tedaviye veya moleküler hedefli tedaviye duyarlı değildir fakat bazal benzeri TNBC örneklerinin yaklaşık %70-78'inin yüksek oranda EGFR ifade etmesi sebebiyle, EGFR'nin TNBC'de hedef olabileceği tahmin edilmektedir (Chaudhary ve diğ., 2018; Livasy ve diğ., 2006).

2.1.2 Luminal B Meme Kanseri

Meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturan ve daha agresif bir fenotipe, dolayısıyla daha kötü prognoza ve yüksek histolojik dereceye sahip olan luminal B tümörler (Creighton, 2012); proliferasyonu artmış ER+ meme kanseri olarak tanımlanabilir (Wirapati ve diğ., 2008) ve luminal B meme kanserinin, luminal A'ya göre daha kötü prognozunun olması en belirgin özelliğidir (Perou ve diğ., 2000). Tedavi edilmemiş luminal B tümörlerinde genel sağkalım yüksek riskli olarak kabul edilen bazal benzeri ve HER2+ gruplara benzer sonuçlar gösterir (Tran ve Bedard, 2011).

Luminal B tip meme kanserinde gözlenen artmış nüks oranları tanıdan sonraki ilk 5 yılla sınırlıdır ve 5 yıldan sonra uzak nükslerde fark yoktur (Ignatiadis ve diğ., 2009). Luminal meme kanserlerinin kemik ve plevraya metastaz eğilimi olduğu bilinmekle beraber; bir çalışmada, luminal A ve luminal B meme kanserleri arasında metastaz bölgelerinde fark gözlenmemiştir (Smid ve diğ., 2008).

2.1.3 Claudin-low Meme Kanseri

2007'de Herschkowitz ve arkadaşları, claudin-low (CL) adını verdikleri meme kanserinin yeni bir moleküler alt tipini tanımladılar ve buna göre bu alt tip; claudin 3, claudin 4 ve claudin 7, okcludin ve E-kadherin dahil olmak üzere sıkı bağlantılarda ve epitelyal hücre-hücre yapışmasında yer alan genlerin düşük ekspresyonu ile karakterizedir (Herschkowitz ve diğ., 2007).

CL meme kanseri, tüm invaziv meme kanserlerinin %7-14'ünü oluşturan ve kötü bir prognozla ilişkilendirilmiş bir alt tiptir (Prat ve diğ., 2010; Prat ve Perou, 2011). CL tümörlerin tercihen üçlü negatif bir fenotip gösterdiği kabul edilmiş olmasına rağmen üçlü negatif meme kanserlerinin küçük bir azınlığı CL'dir (Dias ve diğ., 2017). Genel olarak, CL tümörler en az görülen alt tip olmakla birlikte çoğunlukla bazal benzeri alt tipe benzer şekilde hormon reseptörleri negatif tümörlerdir. Bununla birlikte, Claudin-low tümörlerin yaklaşık %15-25'inin ve bazal benzeri tümörlerin yaklaşık %10'unun hormon reseptörleri pozitifdir (Prat ve Perou, 2011).

Yapılan bir çalışmaya göre Claudin-low tümörleri olan hastalar, luminal A tipi meme kanseri olan hastalarla karşılaştırıldığında daha kötü bir genel sağkalıma sahiptir fakat bununla birlikte bu tümörler, meme koruyucu tedaviyi takiben düşük bir lokal nüks oranı ile ilişkilendirilmiştir (Dias ve diğ., 2017).

2.1.4 Luminal A Meme Kanseri

Meme kanserlerinin %50-60'ını oluşturan ve en sık görülen alt tip olan luminal A meme kanserleri (Carey, 2010); östrojen ve progesteron reseptörü pozitif tümörlerin çoğunluğunu temsil eder (Perou ve diğ., 2000). Luminal A tümörleri endokrin terapilere genelde yüksek oranda yanıt verse de önemli bir kısmı intrinsik ve/veya kazanılmış direnç sahiptir (Higgins ve Stearns, 2009; Ring ve Dowsett, 2004). Görece daha iyi karakterize edilmiş olan bu alt tipte

bile hormon reseptör ekspresyonu, tedavi yanıtı ve genetik değişkenlik düzeylerinde heterojenliğe sahiptir ve bu da daha fazla araştırma gerektirir (Poudel ve diğ., 2019).

2.1.5 HER2⁺ Meme Kanseri

Hastaların yaklaşık %15'inde gözlemlenen HER2⁺ meme kanseri ilk olarak 1980'lerin sonlarında Slamon ve meslektaşları tarafından tanımlandı ve daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirildi (Slamon ve diğ., 1987; Slamon ve diğ., 1989).

HER2 geni; EGFR, HER2, HER3 ve HER4 dahil olmak üzere büyüme faktörleri için transmembran reseptörlerini kodlayan gen ailesinin bir üyesi olmakla birlikte hücrelerin fizyolojisi, farklılaşması ve büyümesinin önemli yönlerini düzenleyen tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (Yarden ve Sliwkowski, 2001; Cho ve diğ., 2003). Aynı zamanda HER2 proteininin hücre dışı etkileşimine bakıldığında, HER ailesi üyeleriyle etkileşime girerek, HER2'nin bir koruyucu olmasına ve sinyal iletimini kolaylaştırmasına izin verdiği görülmektedir (Burstein, 2005).

HER2 onkogeninin ve ilgili genetik yapıların 17. kromozom üzerindeki amplifikasyonu, meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde HER2 ekspresyonunda normal seviyenin 100 katına kadar artışa neden olur. HER2'nin aşırı ekspresyonu, kültürlenmiş hücreleri malign bir fenotipe dönüştürüp tümör artışını hızlandırabilir ve bu aşırı ekspresyon, tümör gelişiminin henüz lokal kaldığı zaman diliminde meydana gelir (Slamon ve diğ., 1987 ve Burstein, 2005).

HER2⁺ meme kanserleri, bu kanserleri diğer meme kanseri türlerinden ayıran bir moleküler imzaya sahiptir (Perou ve diğ., 2000). HER2'nin aşırı ekspresyonunun; yüksek dereceli tümörler, yüksek hücre proliferasyonu ve lenf düğümü tutulumu oranları ve bazı kemoterapi türlerine görece direnç ile ilişkili olumsuz bir prognozla ilgili olduğu söylenebilir. HER2⁺ meme kanserlerinin neredeyse yarısı östrojen, progesteron veya her ikisine sahip hormon reseptörlerini ifade eder ve sonuç olarak; HER2⁺ meme kanserli kadınlar arasında, HER2⁻ meme kanserli kadınlara göre daha fazla nüks riski söz konusudur. HER2 gen amplifikasyonu meme kanseri dışında nadirdir; HER2 pozitifliği olan meme kanseri dışındaki tümörler meme kanserlerinden çok daha az HER2 ifade eder (Burstein, 2005).

Sonuç olarak son yıllarda HER2+ hastaların tedavisinde ve sonuçlarında önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, nüks riski sebebiyle yeni hedefli tedavilere ve terapötik stratejilere ihtiyaç vardır (Figueroa-Magalhães ve diğ., 2014).

2.2 İbrutinib ve Etki Mekanizması

İbrutinib, kronik lenfositik lösemi (CLL), marjinal bölge lenfoması, küçük lenfositik lenfoma (SLL), mantle hücreli lenfoma ve Waldenström makroglobulinemisi dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan, oral yolla uygulanan, Bruton tirozin kinazın (BTK) kuvvetli bir inhibitörüdür (Woyach ve diğ., 2012; Smith, 2015).

BTK, T ve plazma hücreleri hariç tüm hematopoietik hücrelerde eksprese edilen (Smith ve diğ., 1994), 659 amino asite sahip ve 76 kDa'lık ağırlığı olan (Wu ve diğ., 2016), Tec ailesinden sitoplazmik bir tirozin kinazdır (Schwartzberg ve diğ., 2005). BTK, B hücrelerinin çoğalma, olgunlaşma, farklılaşma, apoptoz ve hücre migrasyonu dahil olmak üzere birçok işlevinde etkili bir moleküldür (Niir ve Clark, 2002) ve aynı zamanda BTK çeşitli antiapoptotik yolları da aktive eder (Mahajan ve diğ., 2001; Glassford ve diğ., 2003; Bajpai ve diğ., 2000).

BTK'nın ekspresyonu sitoplazmik olmasına rağmen B hücresi aktivasyonu sürecinde PIP3 etkileşimleri yoluyla plazma zarına geçiş yapar (Li ve diğ., 1997). BTK, B hücresi reseptörü sinyal yolunda önemli bir rol oynayan proinflamatuvar sinyallerin bir aracısıdır (López-Herrera ve diğ., 2014) dolayısıyla BTK'nın inhibisyonu, B hücre maligniteleri ve otoimmün hastalıkların tedavisi için kullanılabilecek bir yöntemdir (Buggy ve Elias, 2012; Hendriks ve diğ., 2014).

İbrutinib, BTK'nın ATP bağlama bölgesinde sistein-481 tortusuna kovalent olarak bağlanarak kinaz aktivitesinin güçlü bir şekilde inhibisyonuna neden olur (Brown, 2013). Dolayısıyla İbrutinib ERBB ailesi (EGFR, ERBB2) gibi sistein-481 kalıntısını koruyan tirozin kinazlarla beraber, ek bağlanma bölgeleri ve enzimler üzerindeki etkinliği nedeniyle hematolojik olmayan bazı kanserler için de potansiyel göstermektedir ve İbrutinib'in toksisitesi esas olarak ilgili kinazları inhibe etmesiyle açıklanmaktadır (Chen ve diğ., 2016).

Yapılan bir araştırmaya göre İbrutinib, çok düşük konsantrasyonlarda bile 16 farklı kinazı %95 oranında inhibe edebilir (Uitdehaag ve diğ., 2019). Dolayısıyla farklı tip kanserlerde tirozin kinaz reseptörlerinin ekspresyonundaki veya yapısındaki değişiklikler de yaygın olduğundan,

ilaç etkileşimi için bu bölgeler hedeflenebilir (Grabinski ve Ewald, 2014). İbrutinib bu hedeflere bağlanarak tirozin kinazların fosforilasyonunun azalmasına yol açar, ayrıca sitokin üretimini, PD-L1 ekspresyonunu ve MDSC'lerin ve diğer miyeloid hücrelerin hareket yeteneğini azaltır - ki sonuç olarak tümör mikroçevresini etkiler ve azalan tümör damarlanması ile bağlantılıdır (Molina-Cerrillo ve diğ., 2017).

Meme kanseri tipik olarak hormon reseptörlerinin ve HER2/ERBB2 ifadesine bağlı olarak alt tiplere ayrılır. Hormon reseptörü pozitif/HER2-negatif kanserler genel olarak meme kanserinin %70'lik bir kısmı oluştururken, HER2-pozitif kanserler %15-20 ve üçlü negatif kanserler %15'lik bir payda sahiptir ve bu alt tipler hedefe yönelik veya sistemik tedavi için farklı seçenekler sunar (Waks ve Winer, 2019).

Kanser tedavisindeki terapötik seçenekler arasında hormon reseptör pozitif tipler için endokrin tedavisi ve sikline bağımlı kinaz inhibitörleri; HER2-pozitif olanlar için HER2 hedefli antikörler, antikör bileşikler veya tirozin kinaz inhibitörleri ve kemoterapi mevcuttur (Metzler ve diğ., 2020) ve İbrutinib'in de bu sebeple etkili olması beklenir.

2.3 BO264 ve Etki Mekanizması

TACC3, mikrotübüllere bağlanmak için gerekli olan TACC alanı adı verilen korunmuş bir C-terminal motifi ile karakterize edilen transforme edici asidik sarmal (TACC) ailesine mensup (Gergely ve diğ., 2000), sentrozomlarda ve mitotik iğciklerde lokalize olan (Nwagbara ve diğ., 2014); tükenmesi sonucunda sentrozomlarda mikrotübül çekirdeklenmesini engellediği, bölünme esnasında sentrozomun kümelenmeden ayrılması üzerine çok kutuplu iğcikler oluşturduğu (Fielding ve diğ., 2011) ve apoptoza yol açtığı bildirilen (Schneider ve diğ., 2007) bir moleküldür. Ayrıca, TACC3 inhibisyonu mitojenik sinyalleşmeyi azaltabilir (Petschnigg ve diğ., 2013) ve mitotik sonrası G1 fazı durmasını tetikler (Schneider ve diğ., 2008).

Yüksek TACC3 seviyeleri çeşitli kanserlerde gözlemlenmiştir ve TACC3'ün yıkılması, renal hücreli karsinomda tümör gelişimini ve hücre büyümesini baskılamıştır (Guo ve Liu, 2018) dolayısıyla TACC3'ü aşırı eksprese eden kanserlerde TACC3'ü hedeflemek doğru bir yol olabilir.

Yapılan bir çalışmanın sonucuna göre BO-264, kanser hücrelerinin canlılığını inhibe eder ve çok güçlü sitotoksikite gösterir. BO-264 ile TACC3 inhibisyonunun, mitotik tutuklamayı,

apoptozu ve DNA hasarını indüklediği, anormal iđ oluşumuna neden olduğu ve TACC3'ün sentrozomal lokalizasyonunu azalttığı ve dolayısıyla; tümör büyümesini önemli ölçüde bozarak yüksek bir toksisite olmadan hayatta kalmayı iyileştirdiği bildirilmiştir (Akbulut ve diğ., 2020). |



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE SOYLARI

Çalışmada SKBR3, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmıştır ve kullanılan bu hücre hatları laboratuvarımızda rutin olarak çoğaltılmaktadır.

SKBR3 hücre hattı genellikle HER2 hedeflemesinde kullanılmakla birlikte ilk defa 1970 yılında radyasyon, steroidler, sitoksan ve 5-fluorourasil ile tedavi edilmiş; kan grubu A+ olan 43 yaşındaki adenokarsinomlu kadın hastanın plevral efüzyon hücrelerinden izole edilmiştir.

MCF7 hücre hattı 1973 yılında, metastatik hastalığı olan 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan elde edilmiştir ve hormon reseptörleri pozitifdir.

MDA-MB-231 ise Kafkas kökenli bir kadının plevral efüzyonundan elde edilmiş olup üçlü negatif olarak bilinmektedir, hormon reseptörleri negatiftir.

Hücre hatlarının tamamı %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco lab.), 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amhotericine B (Sigma) ve içeren pH'sı % 4,4'lük NaHCO₃ ile 7.2'ye ayarlı yüksek glikozlu DMEM besiyerinde yaşatılmıştır.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Hücrelerin pasajı tek tabaka haline geldiklerinde yapılmış ve hücreleri kaldırmak için %0,25'lik tripsin (Gibco Lab.) kullanılmıştır. Süspanse edilerek santrifüj tüpüne aktarılan hücrelere 2 ml DMEM eklenerek tripsin aktivitesinin devam etmesi engellenmiş ve hücreler 1500 g dönme hızında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatant atılmış ve pellet yeni kültür kaplarına besiyeri eşliğinde ekilmiştir.

3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ

Mitotik aktivite analizi için her bir kuyucukta 15×10^4 hücre/ml besiyeri; BrdU hücre proliferasyonu analizi için her bir kuyucukta 2×10^4 hücre/ml besiyeri ve kaspaz 3-7 aktivite analizi için 24 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğunda 5×10^5 hücre/ml besiyeri; gerçek zamanlı hücre analizi için 16 kuyucuklu E-plate'in her bir kuyucuğuna 4×10^3 hücre/ml besiyeri

olacak şekilde SKBR3; 10×10^3 hücre/ml besiyeri olacak şekilde MCF-7 ve 5×10^3 hücre/ml besiyeri olacak şekilde MDA-MB-231 ekimi yapılmıştır ve 24 saat boyunca, 37°C 'de %95 hava ve %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. Hücrelerin deney öncesindeki durumlarının değerlendirilmesi için mikroskop altında morfolojik analizleri yapılmıştır.

3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

3.4.1. İbrutinib (IMBRUVICA 140 mg)

İbrutinib stok solüsyonu $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilerek tüm deneyler boyunca aynı stok kullanılmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere İbrutinib'in stok solüsyonu DMEM ile seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlar elde edilmiştir.

3.4.2. BO-264

BO-264 stok solüsyonu $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilerek tüm deneyler boyunca aynı stok kullanılmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere BO-264 stok solüsyonu DMEM ile seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlar elde edilmiştir.

3.4.3. İlaçların Uygulanması

İlaçlar tek tek ve kombin dozlar şeklinde uygulanmıştır. Deney grupları:

- MCF-7: İbrutinib
- MCF-7: BO-264
- MCF-7: İbrutinib + BO-264
- SKBR3: İbrutinib
- SKBR3: BO-264
- SKBR3: İbrutinib + BO-264
- MDA-MB-231: İbrutinib
- MDA-MB-231: BO-264
- MDA-MB-231: İbrutinib + BO-264 şeklinde belirlenmiştir.

3.5. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ

3.5.1. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA)

Hücrelerdeki çoğalma ve ölümleri, devamlı ve gerçek zamanlı şekilde, hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin belirlenmesiyle gerçekleştiren xCELLigence RTCA-DP sisteminin çalışma prensibine göre; cihaz için özel olarak kullanılan ve yüzeyinde altın elektrotlar bulunan E-plate'in alt yüzeyine yapışan hücre sayısı arttıkça direnç artmakta ve hücre sayısı azaldıkça direnç de azalmaktadır. Bu sayede hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gerçek zamanlı olarak kaydedilebilmekte ve kaydedilen veriler grafikler halinde bilgisayar aracılığıyla görüntülenebilmektedir.

XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilecek hücre indeksinin değerlendirilebilmesi için toplamda 16 kuyucuğu bulunan E-Plate'in her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklenmiş ve cihazda backgroundu alınarak; MDA-MB-231 hattı için 100 µl/5000 hücre, MCF-7 hattı için 100 µl/10000 hücre ve SKBR3 hattı için 100 µl/4000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bu işlemin ardından E-Plate'ler steril kabin içerisinde 20 dakika kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve daha sonra cihazdaki yerlerine yerleştirilerek 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. E-Plate'lere hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra cihaza her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verilmiştir.

Hücre ekiminden yaklaşık 24 saat sonra E-Plate'lerdeki besiyeri ilaçlı besiyeri ile değiştirilerek 72 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edilmiştir ve sonuçlar grafik şeklinde görüntülenmiştir.

3.5.2 Mitotik Aktivite Analizi

Her üç hücre hattı için 96 kuyucuklu kabin her bir kuyusunda 15×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve hücreler 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ortamına sahip etüv içerisinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Daha sonra mevcut besiyeri atılıp hücrelere MCF-7 için 1,25 µM İbrutinib + 1,25 µM BO-264, SKBR3 için 0,5 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264, MDA-MB-231 için 10 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264 kombinasyonlu ilaç ekimleri yapılmış ve yine aynı şartlar altında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

24 saat sonrasında ilaçlı besiyeri atılıp, platelere 100 µl %4 formaldehit içeren 10X PBS'den 1:9 oranında dH₂O ile seyreltilmiş PBS eklenip parafilmle kapatılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında formaldehitli PBS atılıp

hücreler 3 kez 5 dakika boyunca yıkama tamponuyla muamele edilmiştir. Ardından yıkama tamponu atılıp ve kuyucuklara 100 µl Quenching Buffer eklenmiş ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki Quenching Buffer atılıp 2 kez 5 dakika 200 µl yıkama tamponu ile hücreler yıkanmış ve yıkama tamponu atılıp, 100 µl Antibody Blocking Buffer eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Antibody Blocking Buffer atıldıktan sonra 2 kez 200 µl yıkama tamponu ile hücreler yıkanmıştır ve 100 50 µl primer antikor eklenerek parafilmelenen plate, 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda primer antikor atılmış hücreler 3 kez 5 dakika boyunca 200 µl yıkama tamponuyla yıkanmış, ardından 100 µl sekonder antikor eklenmiş ve parafilmelenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında sekonder antikor atılıp hücreler 3 kez 5 dakika boyunca 200 µl yıkama tamponu, daha sonrasında 2 kez 5 dakika 200 µl 1X PBS ile yıkandıktan sonra platelere 100 µl Developing Solution eklenmiştir. Oda sıcaklığında doğrudan ışıktan koruyarak 2-20 dakika inkübasyona bırakılmış ve mavi renk değişimi mevcut olduğunda 100 µl Stop Solution eklenerek rengin sarıya dönmesi beklenmiştir. Sarı renk değişimi görüldükten sonra plate, Reader plate (Flx-800, Bio-Tek Instruments Inc.) okuyucuda 450-655 nm’de 5 dakika içinde ölçüme alınmıştır. Bu işlemler MCF-7, SKBR3 ve MDA-MB-231 hücre hattında 24, 48 ve 72. saatlerde tekrarlanmıştır.

3.5.3 BrdU Hücre Proliferasyon Analizi

96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra mevcut besiyeri atılıp hücrelere MCF-7 için 1,25 µM İbrutinib + 1,25 µM BO-264, SKBR3 için 0,5 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264, MDA-MB-231 için 10 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264 kombinasyonlu ilaç ekimleri yapılmış ve bu işlemten 3-4 saat sonra 20 µl BrdU (Millipore 2750) eklenmiş ve 37°C’de %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüvde inkübasyona devam edilmiştir.

İnkübasyon sonunda, kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µl sabitleme solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmış; ardından sabitleme solüsyonu uzaklaştırılarak yıkama tamponuyla 3 kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında yıkama

tamponu uzaklaştırılarak her kuyuya 100 µl Anti-BrdU antikoru eklenmiş, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir ve yıkama aşaması tekrar edilmiştir.

2000x Goat anti-mouse IgG, Peroksidaz konjugatı 1:2000 oranında seyreltilmiş ve her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmış ve 100 µl TMB Peroksidaz Substrat eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında Anti-stop Solution'dan her kuyuya 100 µl eklenmiş ve 450-550 nm çift dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu işlemler MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hattında 24, 48 ve 72. saatlerde tekrarlanmıştır.

3.5.4 Kaspaz 3,7 Aktivitesi Analizi

Hücre hatlarındaki kaspaz aktivasyonunun tespiti Kaspaz 3/7 deney kiti (CaspasTag™ Caspase-3,7 In Situ Assay Kit, Fluorescein Millipore, APT423) kullanılarak belirlenmiştir. 24 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüvün içinde inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında mevcut besiyeri atılıp hücrelere MCF-7 için 1,25 µM İbrutinib + 1,25 µM BO-264, SKBR3 için 0,5 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264, MDA-MB-231 için 10 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264 kombinasyonlu ilaç ekimleri yapılmış ve inkübasyona devam edilmiştir.

İnkübasyon sonrası besiyeri atılarak hücreler tripsin eriyiği ile plateden kaldırılmıştır ve 800 g hızda 5 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 3 ml medyum eklenerek iyice karıştırılmış ve ardından hücre süspansiyonundan 300 µl steril tüplere aktarılmıştır. Tüplere 30XFLICA reaktifinden 10 µl eklenerek 37°C'de %5 CO₂ bulunan karanlık ortam 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda yıkama tamponundan 2 ml eklenerek 400 g hızda 5 dakika santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant atılıp yıkama tamponundan 1 ml eklenerek tekrar 400 g hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 1 ml 1X PBS'den eklenmiş ve karıştırılmıştır. Ardından süspansiyondan 50 µl alınarak steril tüpe aktarılmış ve üzerine 450 µl PBS eklenmiştir. 400 g hızda 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant atılarak üzerine 400 µl PBS eklenmiş ve tüplerden hücreler alınarak siyah kültür kaplarına her bir deney grubundan 100 µl olacak şekilde ekim yapılmıştır. Floresan Plate Reader (Flx-800, Bio-Tek Instruments Inc.) kullanılarak 490 nm eksitasyon - 520 nm emisyon

dalga boyunda (λ_{ex} 490, λ_{em} 520) ölçümler yapılmıştır. Bu işlemler her bir hücre hattı için 24, 48 ve 72. saatlerde tekrar edilmiştir.

3.5.5 İstatiksel Değerlendirme

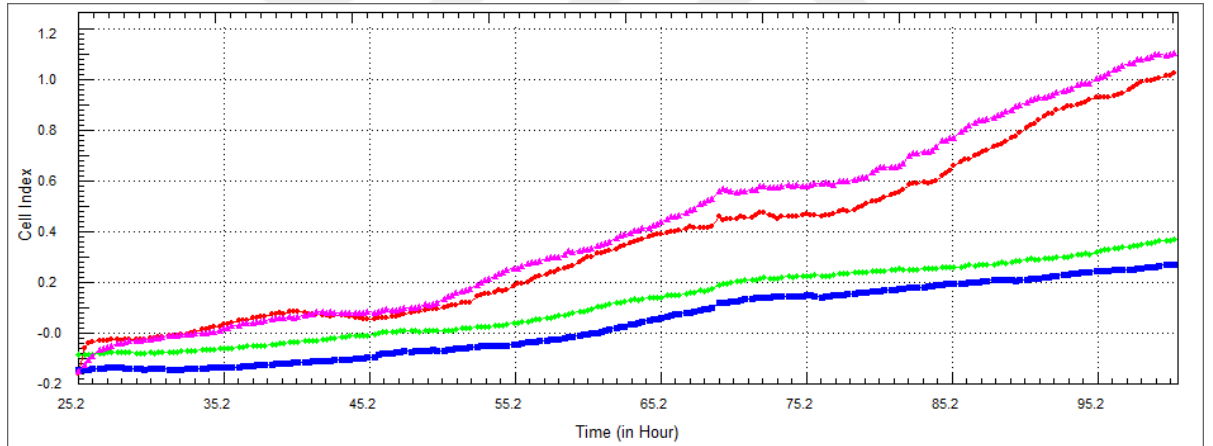
Deney gruplarının tamamında uygulanan konsantrasyon ve zamana göre saptanan hücre kinetiği parametre değerleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve bu amaçla tüm deney gruplarından saptanan değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Grupların kontrole göre anlamlılıkları DUNNETT'S testi ile değerlendirilmiştir. Grupların birbirleri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0.05$ anlamlılık seviyesi baz alınmıştır. |

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Bruton Tirozin Kinaz inhibitörü olan ve çeşitli lenfomaların tedavisinde kullanılan İbrutinib ve yeni tanımlanan TACC3 inhibitörü BO-264'ün kombin halde kullanımının MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkilerinin gerçek zamanlı hücre analizi, kaspaz 3-7 aktivite analizi, mitotik aktivite analizi ve BrdU hücre proliferasyon analizi yöntemleriyle in vitro koşullarda hücresel seviyede meydana getirdiği etkiler araştırılmıştır.

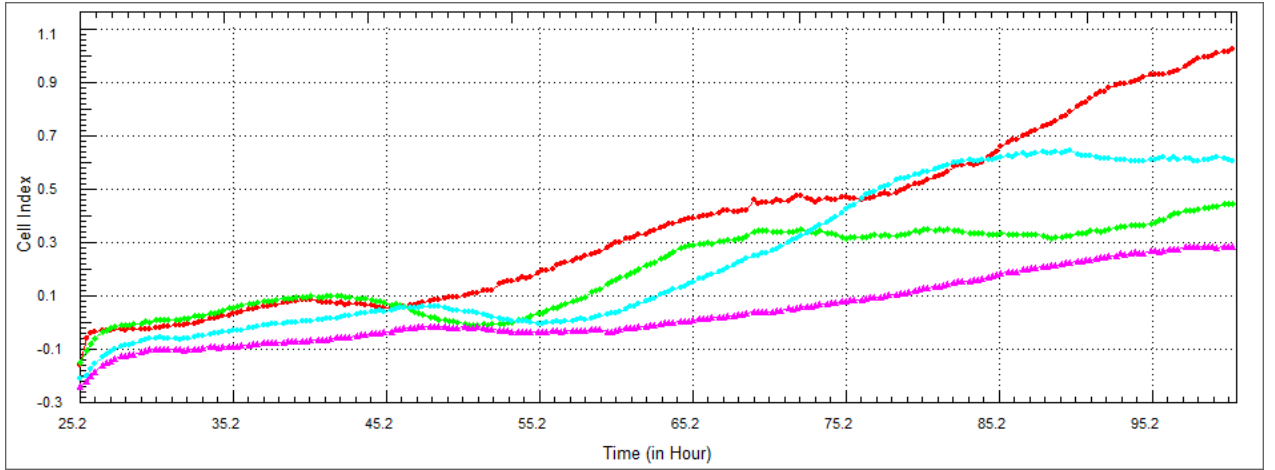
4.1 xCELLigence RTCA Sistemi Bulguları

MCF-7, SKBR3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında çeşitli İbrutinib ve BO-264 dozları uygulanarak IC₅₀ değerleri saptanmış ve ardından bu değerlere uygun çeşitli kombin dozlar hücrelere uygulanmıştır. Uygulanan bazı dozlara ait değerler grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.1: İbrutinib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, --- 0,5 μM, --- 40 μM, --- 50 μM)

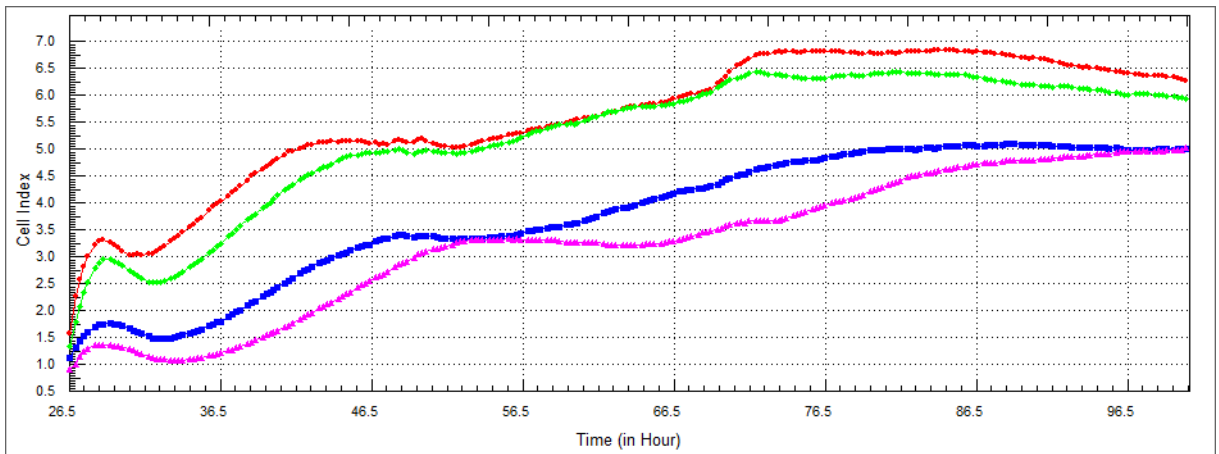
MDA-MB-231 hücreleri üzerine 0,5 μM İbrutinib uygulaması hücre indeksini kontrol değerinin de üzerine çıkarırken, 50 μM değeri hücre indeksini yüksek oranda azalttı. IC₅₀ değeri 40 μM olarak belirlendi.



Şekil 4.2: BO-264 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, --- 0,5 μ M, --- 40 μ M, --- 50 μ M)

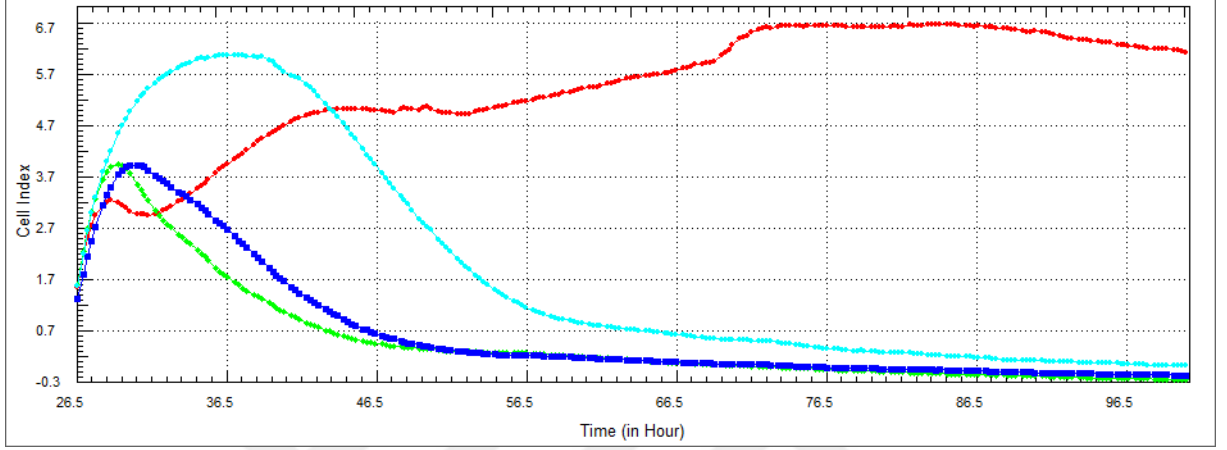
MDA-MB-231 hücreleri üzerine 40 μ M BO-264 uygulaması bir noktadan sonra hücre indeksini kontrol değerinin de üzerine çıkarırken, 50 μ M değeri hücre indeksini yüksek oranda azalttı. IC_{50} değeri 0,5 μ M olarak belirlendi.

Grafikteki eğrilere bakılarak, elde edilen elde edilen değerlerin anlamlandırılması için standart eğrilere bakıldığında; MDA-MB-231 hücre hattında 40 μ M İbrutinib'in sitostatik, 0,5 μ M BO-264'ün ise anti-mitotik etki gösterdiği söylenebilmektedir.



Şekil 4.3: İbrutinib uygulanan MCF-7 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, --- 0,5 μ M, --- 5 μ M, --- 30 μ M).

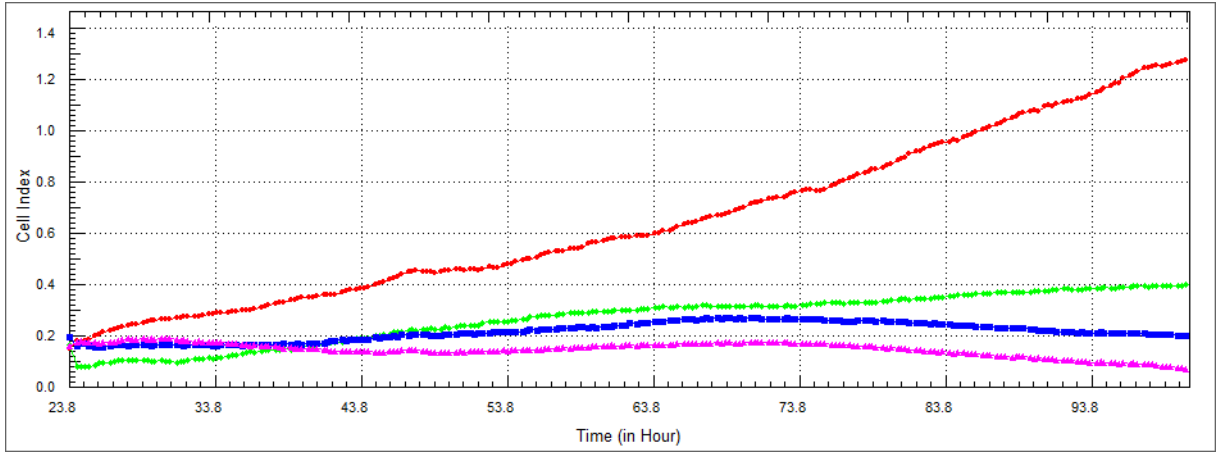
MCF-7 hücreleri üzerine 0,5 μM İbrutinib uygulaması kontrole kıyasla hücre indeksine bir katkıda bulunmadı, sonuçlar kontrol grubuna paraleldi. 30 μM ise fazla toksisite gösterdi. IC_{50} değeri 5 μM olarak belirlendi.



Şekil 4.4: BO-264 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (- - Kontrol, - - 0,5 μM , - - 10 μM , - - 30 μM).

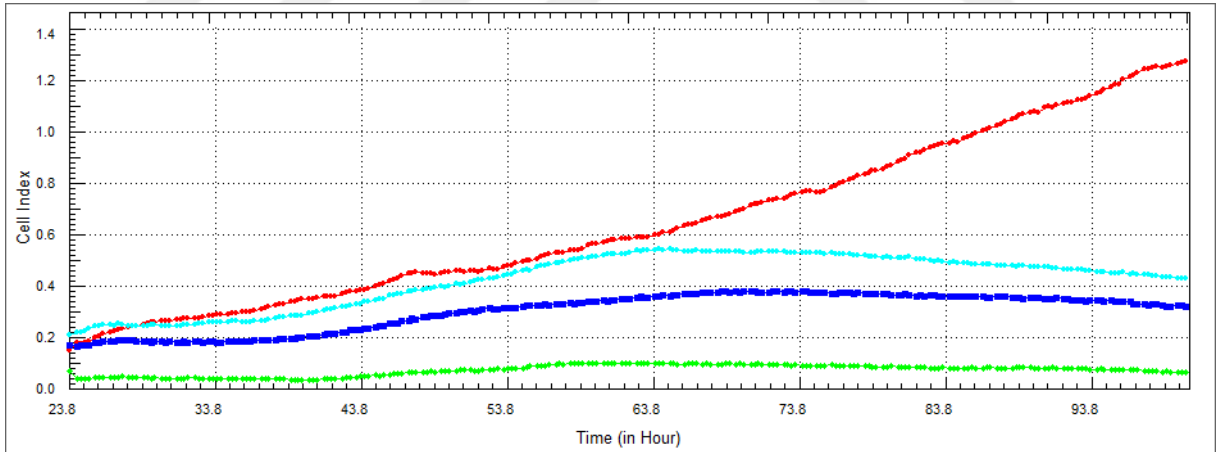
MCF-7 hücreleri üzerine 0,5 μM BO-264 uygulaması IC_{50} değerine göre daha yüksek toksisite gösterirken 30 μM değeri hücreleri kontrole kıyasla ilk önce hücre indeksini kuvvetli bir şekilde artırırken sonrasında kuvvetli bir şekilde azaltıcı etki gösterdi. IC_{50} değer 10 μM olarak belirlendi.

Grafikteki eğrilere bakılarak; elde edilen elde edilen değerlerin anlamlandırılması için standart eğrilere bakıldığında; MCF-7 hücre hattında 5 μM İbrutinib'in anti-mitotik, 10 μM BO-264'ün ise hücrede DNA hasarı yaratarak etki gösterdiği söylenebilmektedir.



Şekil 4.5: İbrutinib uygulanan SKBR3 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (— Kontrol, — 0,5 μ M, — 40 μ M, — 50 μ M).

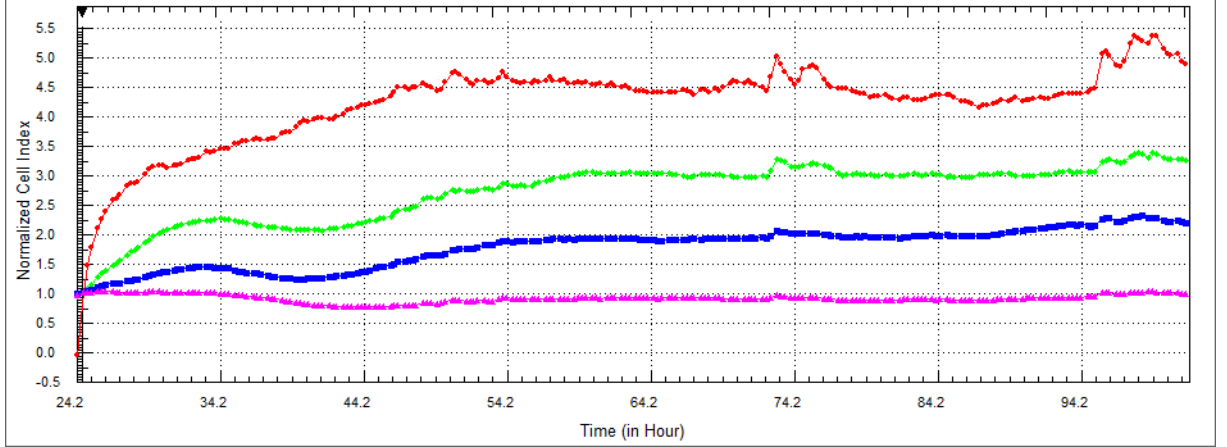
SKBR3 hücreleri üzerine 40 ve 50 μ M İbrutinib uygulaması hücre indeksini kuvvetli bir biçimde azalttı, IC_{50} değeri, 0,5 μ M olarak belirlendi.



Şekil 4.6: BO-264 uygulanan SKBR3 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (— Kontrol, — 0,5 μ M, — 5 μ M, — 40 μ M).

SKBR3 hücreleri üzerine 0,5 μ M BO-264 uygulaması hücre indeksini kuvvetli bir biçimde düşürürken, çok daha yüksek dozda uygulanan 40 μ M BO-264 ilk 60 saat kontrole paralel bir eğri gösterdi. Düşük değerde yüksek toksisite gösteren BO-264'ün yüksek dozlarda kontrole paralel sonuç vermesi düşündürücüdür. Sonuç olarak IC_{50} değeri 5 μ M olarak belirlendi.

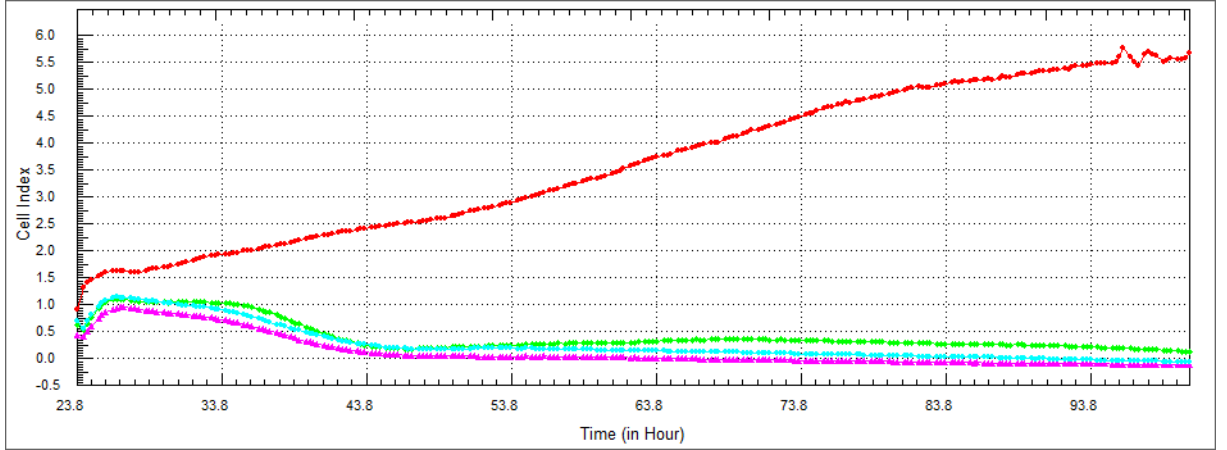
Grafikteki eğrilere bakılarak, elde edilen elde edilen değerlerin anlamlandırılması için standart eğrilere bakıldığında; SKBR3 hücre hattında hem 0,5 μ M İbrutinib'in hem de 5 μ M BO-264'ün sitostatik etki gösterdiği söylenebilmektedir.



Şekil 4.7: Kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (— Kontrol, — 10 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264, — 20 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264, — 40 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264).

MDA-MB-231 hücreleri için IC_{50} değeri 10 μ M İbrutinib + 0,5 μ M BO-264 olarak belirlendi. BO-264 miktarı sabit tutulup İbrutinib'in artırıldığı diğer dozlarda hücre indeksinde kuvvetli bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum kombinasyonun İbrutinib'in artan dozlarına bağlı olarak etkisinin arttığını göstermektedir.

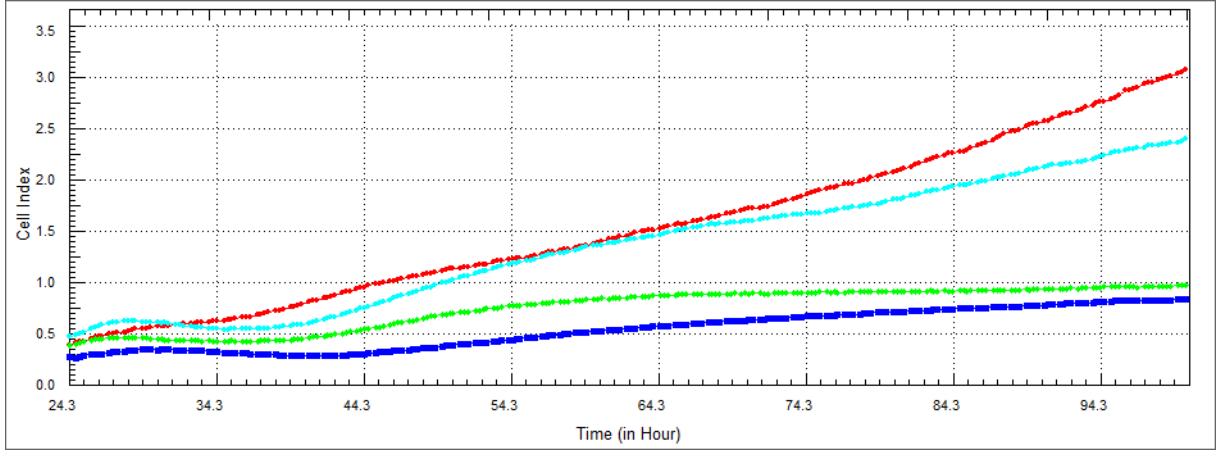
MDA-MB-231 hücre hattında 40 μ M İbrutinib'in sitostatik, 0,5 μ M BO-264'ün ise anti-mitotik etki gösterdiği daha önce belirtilmekle birlikte, standart eğrilere bakılarak 10 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264'ün kombin etkisinin de sitostatik olduğu söylenebilir.



Şekil 4.8: Kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, --- 1,25 μ M İbrutinib + 1, 25 μ M BO-264, --- 0,5 μ M İbrutinib + 1,25 μ M BO-264, --- 2,5 μ M İbrutinib + 5 μ M BO-264)

Aslında uyguladığımız birçok kombin dozda MCF-7 hücreleri üzerinde benzer şekilde hücre indeksinde kararlı bir azalma gözlemlendi fakat IC₅₀ değeri 1,25 μ M İbrutinib ve 1, 25 μ M BO-264 olarak belirlendi.

MCF-7 hücre hattında tek 5 μ M İbrutinib uygulamasının anti-mitotik, tek 10 μ M BO-264 uygulamasının hücrede DNA hasarı yaratarak etki gösterdiği daha önce belirtilmiş olmasına rağmen; 1,25 μ M İbrutinib + 1,25 μ M BO-264 kombin dozu için elde edilen hücre indeksi eğrisinin, standart eğrilerle karşılaştırıldığında hücrede sitoskeletal etki gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.9: Kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait XCELLigence RTCA sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, --- 0,125 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264, --- 0,5 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264, --- 0,25 µM İbrutinib + 1,25 µM BO-264).

Kombin uygulamada SKBR3 hücre hattı için en etkili değer 0,5 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264 olarak belirlendi. Aynı miktarda BO-264 ve $\frac{3}{4}$ oranında azaltılmış İbrutinib uygulaması kontrole kıyasla anlamlı bir fark vermezken; kombin uygulamada İbrutinib'in daha da azaltılıp BO-264'ün artırılması (0,25 µM İbrutinib + 1,25 µM BO-264) daha da toksik bir etki gösterdi. Bu durum, kombinasyonda BO-264 etkisinin daha kuvvetli olduğunu düşündürmektedir.

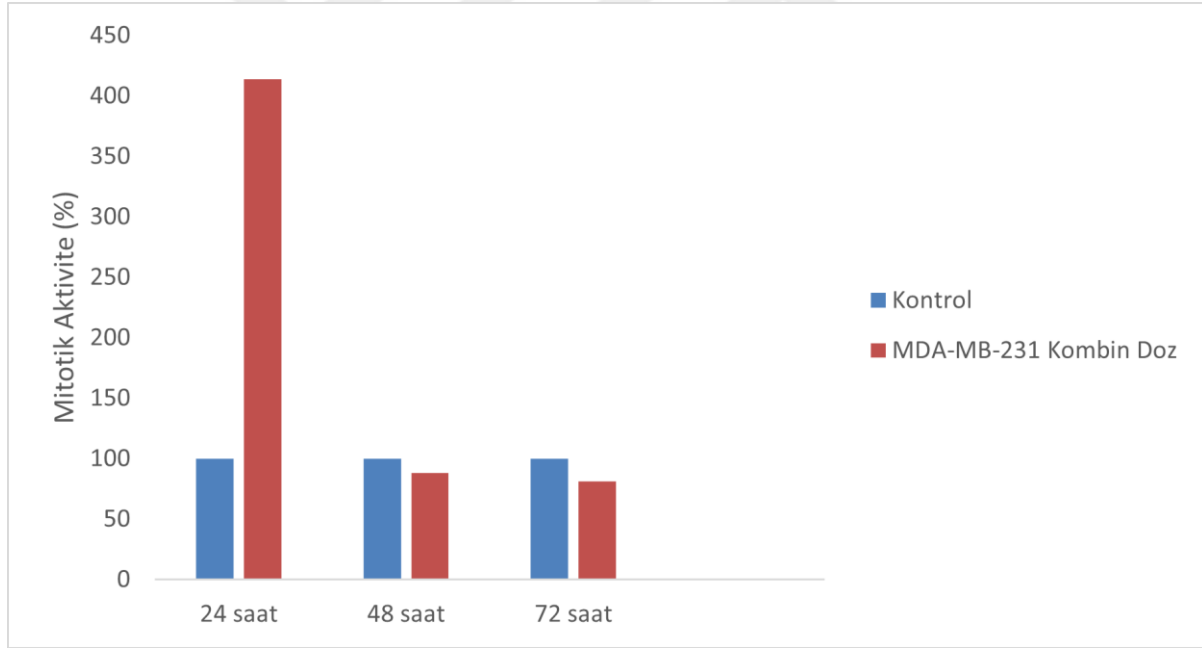
SKBR3 hücre hattında hem 0,5 µM İbrutinib hem de 5 µM BO-264 dozunun tek başına uygulamasının hücrede sitostatik etki yaratarak etki gösterdiği daha önce belirtilmişti ve görünen o ki 0,5 µM İbrutinib + 0,5 µM BO-264 kombin dozu da aynı etkiyi göstererek hücreyi etkilemektedir.

4.2 Mitotik Aktivite Analizi Bulguları

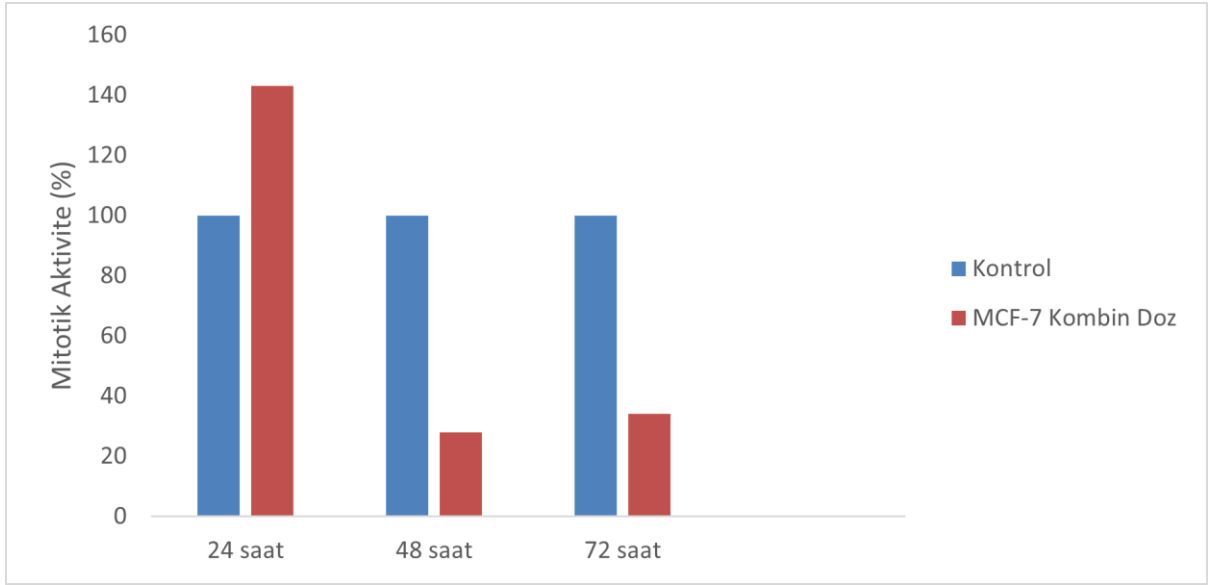
xCelligence gerçek zamanlı hücre analizinden elde edilen bulgulara göre MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatları için belirlenen kombin dozlarının mitotik aktivitesi 24, 48 ve 72 saat boyunca karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: 24, 48 ve 72 saat boyunca, kombin doz uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3 hücrelerine ait mitotik aktivite değerleri.

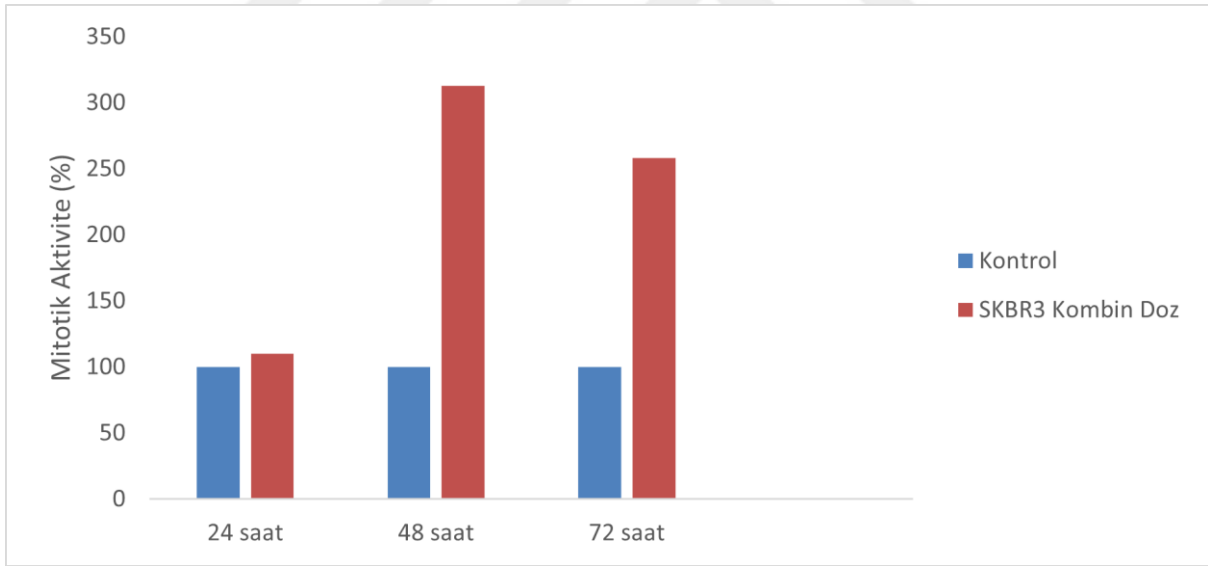
Zaman/Saat	Absorbans Değerleri (450-655 nm)					
	MDA-MB-231		MCF-7		SKBR-3	
	Kontrol	Kombin Doz	Kontrol	Kombin Doz	Kontrol	Kombin Doz
24	34x10 ⁻³	141x10 ⁻³	126x10 ⁻³	181x10 ⁻³	155x10 ⁻³	171x10 ⁻³
48	42x10 ⁻³	37x10 ⁻³	71x10 ⁻³	20x10 ⁻³	22x10 ⁻³	69x10 ⁻³
72	53x10 ⁻³	43x10 ⁻³	23x10 ⁻³	8x10 ⁻³	12x10 ⁻³	31x10 ⁻³



Şekil 4.10: 10 µM İbrutinib ve 0,5 µM BO-264 kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik aktivite - zaman grafiği.



Şekil 4.11: 1,25 μ M İbrutinib ve 1,25 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik aktivite - zaman grafiği.



Şekil 4.12: 0,5 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait mitotik aktivite - zaman grafiği.

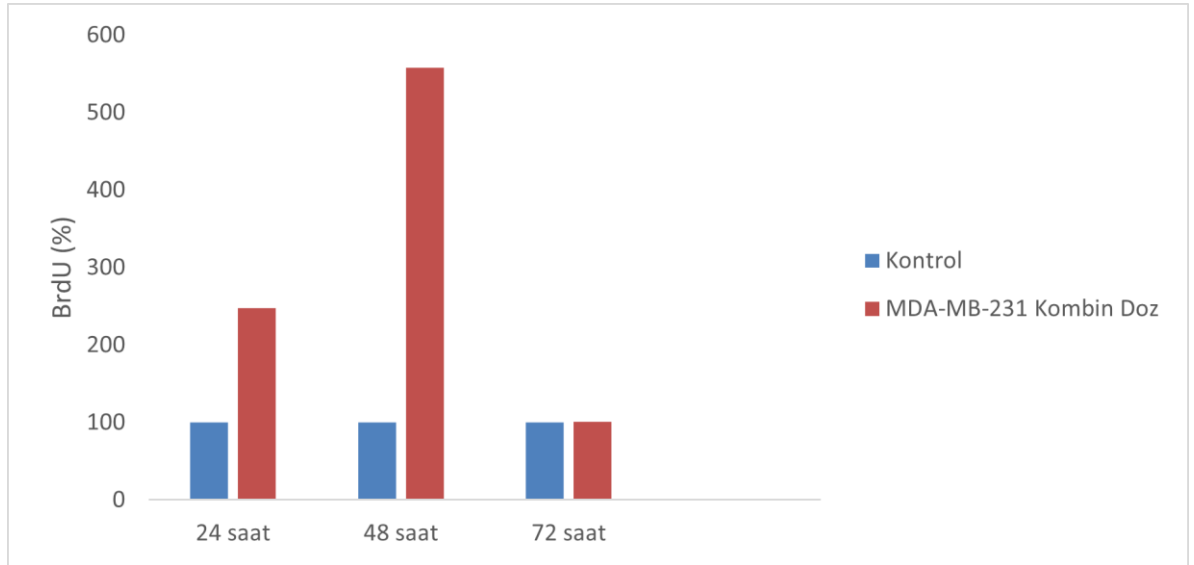
Mitotik aktivite analizi bulguları değerlendirildiğinde kombin uygulamanın en etkili olduğu hücrenin MCF-7 hücre hattı olduğu görülmektedir; 48 saatte %20'lere kadar düşen mitotik aktivite mevcuttur.

4.3 BrdU Hücre Profilerasyon Analizi Bulguları

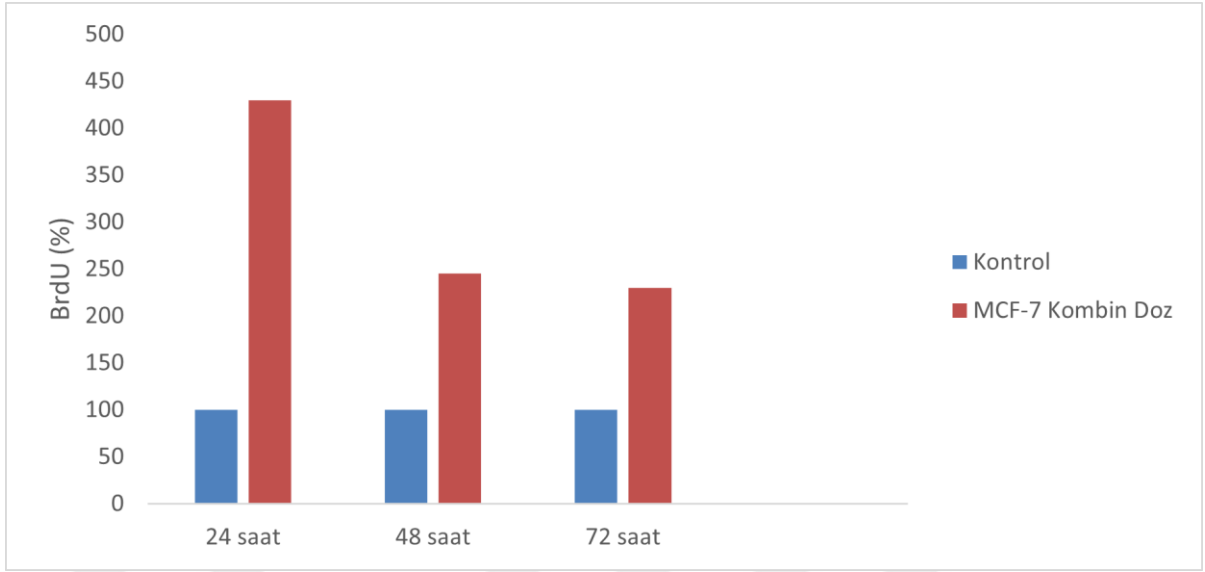
Hücre döngüsünün sentez fazında hücrelere uygulanan kombin dozların etkisi BrdU hücre proliferasyon analiziyle belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: 24, 48 ve 72 saat boyunca, kombin doz uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri.

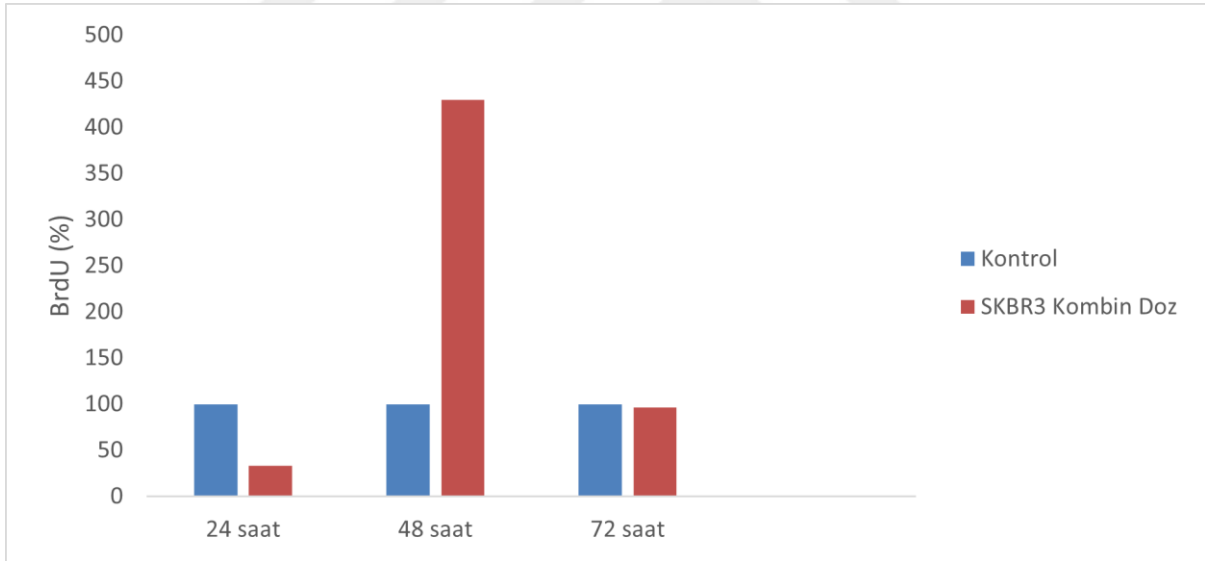
Zaman/Saat	Absorbans Değerleri (450-550 nm)					
	MDA-MB-231		MCF-7		SKBR-3	
	Kontrol	Kombin Doz	Kontrol	Kombin Doz	Kontrol	Kombin Doz
24	260x10 ⁻³	645x10 ⁻³	152x10 ⁻³	654x10 ⁻³	359x10 ⁻³	119x10 ⁻³
48	134x10 ⁻³	749x10 ⁻³	205x10 ⁻³	503x10 ⁻³	152x10 ⁻³	655x10 ⁻³
72	565x10 ⁻³	573x10 ⁻³	289x10 ⁻³	665x10 ⁻³	811x10 ⁻³	786x10 ⁻³



Şekil 4.13: 10 µM İbrutinib ve 0,5 µM BO-264 kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait BrdU aktivitesi - zaman grafiği.



Şekil 4.14: 1,25 μ M İbrutinib ve 1,25 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait BrdU aktivitesi - zaman grafiği.



Şekil 4.15: 0,5 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait BrdU aktivitesi - zaman grafiği.

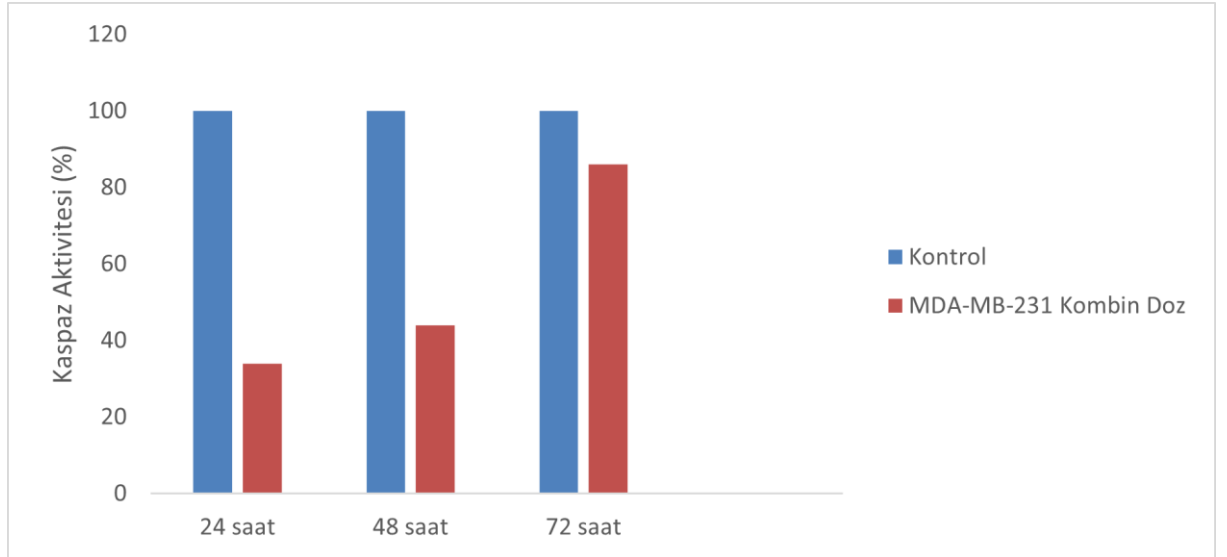
BrdU aktivitesi analizi bulgularına bakıldığında kombin uygulamanın SKBR3 hücre hattında ilk 24 saatte düşüşü görülmesine rağmen 48 saatte çok yüksek aktivite gözlenmiştir. MCF-7 hücre hattında 72 saate kadar aktivite hep yüksek görünmekte, MDA-MB-231 hattında ise yüksek aktivite 72 saatte ancak kontrolle aynı seviyeye düşmüştür.

4.4 Kaspaz 3,7 Aktivitesi Analizi Bulguları

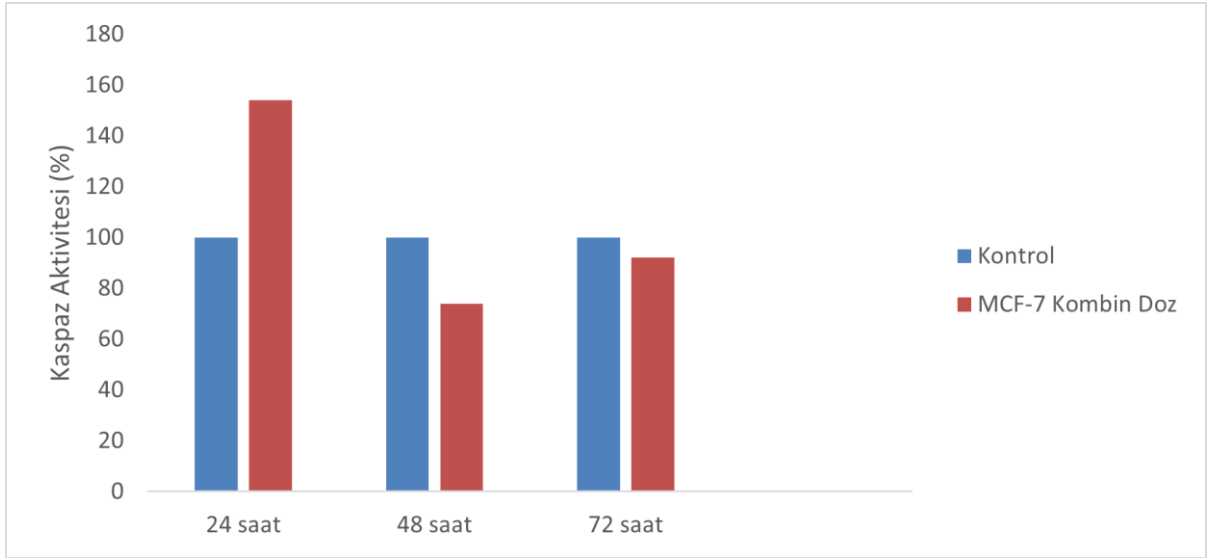
Hücrelere uygulanan kombin dozların hücredeki kaspaz bağımlı apoptoza olan etkisini ölçmek için yapılan Kaspaz 3,7 aktivitesi analiz bulguları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: 24, 48 ve 72 saat boyunca, kombin doz uygulanmış MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi değerleri.

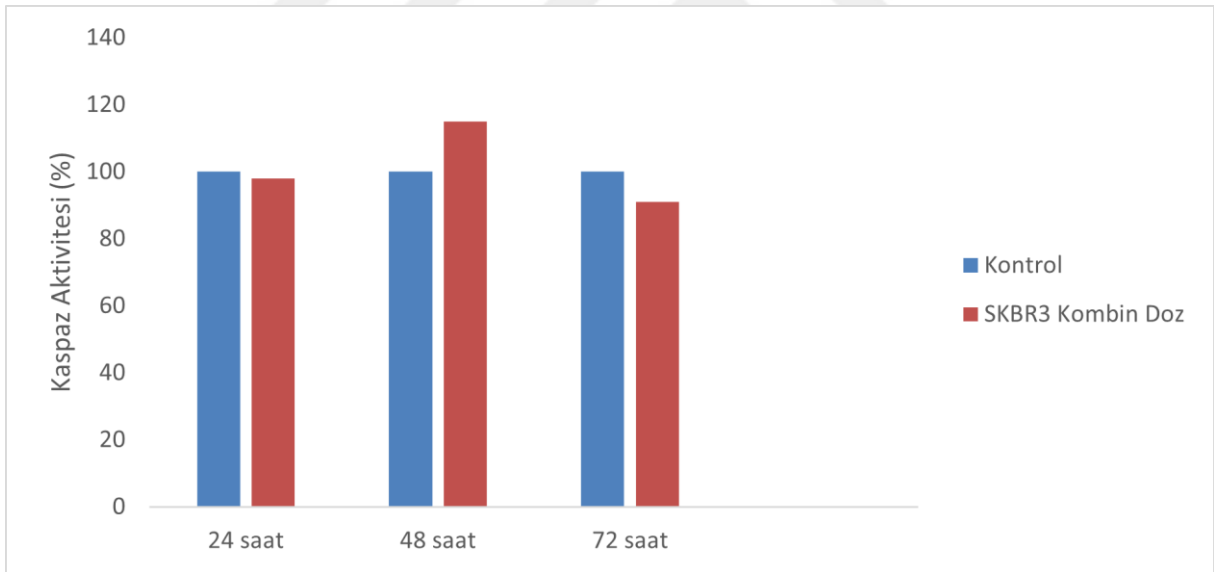
Zaman/Saat	Absorbans Değerleri (450-655 nm)					
	MDA-MB-231		MCF-7		SKBR-3	
	Kontrol	Kombin Doz	Kontrol	Kombin Doz	Kontrol	Kombin Doz
24	426	148	263	407	166	164
48	293	130	134	100	100	115
72	355	307	282	262	323	296



Şekil 4.16: 10 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi - zaman grafiği.



Şekil 4.17: 1,25 μ M İbrutinib ve 1,25 μ M BO-264 kombin doz uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi - zaman grafiği.



Şekil 4.18: 0,5 μ M İbrutinib ve 0,5 μ M BO-264 kombin doz uygulanan SKBR3 hücrelerine ait Kaspaz 3,7 aktivitesi - zaman grafiği.

MDA-MB-231 hücre hattında kombin uygulama tüm zaman aralıklarında kaspaz değerlerini kontrole göre düşürmüştür. MCF-7 hücre hattında ilk 24 saatte kontrole kıyasla %50 kadar artan kaspaz aktivitesi mevcuttur. SKBR3 hattında ise 48 saatte kaspaz aktivitesi kontrole kıyasla %20 kadar artmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada çeşitli meme kanseri hücre hatlarında Bruton Tirozin Kinaz inhibitörü olan İbrutinib ve yeni keşfedilen bir TACC3 inhibitörü olan BO-264'ün kombin kullanımının etkisini araştırmak istedik.

İbrutinib BTK'yi inhibe ediyordu ve BTK; B hücresinin çoğalması, olgunlaşması, farklılaşması, apoptoz ve hücre göçü dahil olmak üzere birçok işlevinde etkili bir moleküldü (Niir ve Clark, 2002). BO-264 ise bölünme esnasında sentrozomun kümelenmeden ayrılması üzerine çok kutuplu içcikler oluşturduğu (Fielding ve diğ., 2011) ve apoptoza yol açtığı bildirilen (Schneider ve diğ., 2007) bir moleküldü.

Daha önce İbrutinib ve BO-264 çeşitli meme kanserleri üzerine tek uygulanmış ve çeşitli IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Bunların bir kısmı Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: İbrutinib'in çeşitli hücre hatları üzerine etkisi.

Çalışmalar	İbrutinib'in Çeşitli Hücreler Üzerindeki Etkisi		
	MDA-MB-231	MCF-7	SKBR3
Chen vd., 2016	Çok az duyarlıydı ya da hiç değildi (>5 µM için).	Çok az duyarlıydı ya da hiç değildi (>5 µM için).	IC ₅₀ değeri: 2,90 nM
Wang vd., 2016	10 µM uygulama canlı hücre yüzdesini yaklaşık %35 azaltır.	10 µM uygulama canlı hücre yüzdesini yaklaşık %40 azaltır.	1 µM veya 10 µM mm uygulama canlılığı yaklaşık %90 azaltır.
Grabinski vd., 2014	IC ₅₀ >6400 nM	IC ₅₀ > 6400 nM	IC ₅₀ değeri: 2,1 nM
Prabaharan vd., 2020			IC ₅₀ değeri: 8,89 nM
Soltanshahi vd., 2022		IC ₅₀ değeri: 2000 nM	

Çalışmamız sonucunda İbrutinib'in hücrelere tek uygulanması ile elde edilen IC_{50} değerleri ise MDA-MB-231, SKBR3 ve MCF-7 hücre hatları için sırasıyla 40 μM , 5 μM ve 0,5 μM 'dir. Elimizdeki veriler mevcut verilerle karşılaştırıldığında İbrutinib'in MDA-MB-231 üzerindeki etkisinin yüksek dozlara bağlı olduğu doğrulanmakla beraber SKBR3 hücre hattı için mevcut değerlerin üstünde bir IC_{50} değeri elde edilmiştir. MCF-7 için elimizdeki IC_{50} değeri 5 μM olmakla birlikte bildirilen değerler 2 μM , >6.4 μM veya 10 μM uygulamanın yaklaşık %40 canlılık azalttığı şeklinde değişkendir.

xCELLigence DP analiz sonuçlarına göre elde edilen eğriler, standart eğrilerle karşılaştırıldığında İbrutinib uygulamasının MDA-MB-231 ve SKBR3 hücre hattında sitostatik, MCF-7'de ise anti-mitotik etkisi olduğu söylenebilmektedir. İbrutinib'in mevcut etki mekanizmasına bakıldığında HER2+ hücre hatları için daha geniş yelpazede açıklama olduğu görülmektedir. Grabinski ve arkadaşlarının 2014'te bildirdiğine göre İbrutinib uygulaması MDA-MB-231 hariç çalışmadaki diğer hücre hatlarında MAPK fosforilasyonunu azaltırken (MCF-7 ve SKBR3 dahil), sadece ErbB2+ AKT fosforilasyonunun aktivasyonunu inhibe etmiştir -ki hem MAPK hem AKT hücre sağkalımı ve apoptozla ilgilidir (De Luca ve diğ., 2012). Chen ve arkadaşlarının 2016'daki çalışmasının sonucuna göre ise İbrutinib'in, HER2+ hatlarda hücre büyümesi inhibisyonu, hücre döngüsü durması ve kaspaz bağımlı apoptoza sebep olduğu bildirilmiştir.

Meme, akciğer ve mide kanserlerinde daha kötü sağkalımla ilgili olan TACC3 molekülü inhibe eden ve yeni bulunmuş bir inhibitör olan BO-264 uygulamasının, çalışmamızın sonucuna göre IC_{50} değeri MDA-MB-231, SKBR3 ve MCF-7 hücre hatları için sırasıyla 0,5 μM , 10 μM ve 5 μM 'dir. Daha önce Akbulut ve arkadaşlarının çalışmasına göre ise daha düşük seviyelerde IC_{50} değerleri bildirilmiştir. Yine bu çalışmanın sonucuna göre BO-264, HER2+ hücre hatlarından biri olan JIMT1 üzerinde mitotik tutuklanma, apoptoz ve DNA hasarına sebep vermiştir ve aynı zamanda BO-264'ün metafazda yanlış hizalamaya sebep olduğu da bildirilmiştir. xCELLigence DP analiz sonuçlarımız da bu bilgileri destekler niteliktedir. Standart eğrilerle karşılaştırarak yaptığımız yorumlara göre BO-264 uygulaması MDA-MB-231 üzerine antimitotik etki, MCF-7 üzerine DNA hasarı ve SKBR3 üzerine sitostatik etki göstermiştir.

Bu iki ilacın kombine uygulaması ise MDA-MB-231 hücre hattında BO-264'ün kullanım oranında bir değişikliğe sebep olmazken, İbrutinib'in etkisini artırmış ve etki dozunu 4 katı kadar azaltmış; en uygun kombin dozu 10 μM İbrutinib + 0,5 μM BO-264 olarak belirlenmiştir.

Kombin doz uygulaması bu hücre hattında ilk 24 saatte mitotik aktiviteyi artırmış fakat 48 ve 72 saatte kontrole oranla %20 kadar azaltmıştır. Sentez fazındaki aktivitenin bir ölçütü olan BrdU aktivitesi sonucuna bakıldığında ilk 48 saatte aktivite artışı ve 72. saatte normal düzeyde bir aktivite sonucu edindik aynı zamanda kombin doz uygulanan hücrelerin kaspaz aktivitesi de kontrole oranla artmıştı. Sonuç olarak ayrı ayrı etkili olan bu iki molekül bir araya geldiğinde antagonizma göstermiştir.

Bu etkinin hesaplanması için %50 toksisite için kombinasyon indeksi hesabı aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır:

$$CI = D_1/DX_1 + D_2/DX_2 + \alpha.D_1.D_2/DX_1.DX_2$$

D_1 : D_2 ile kombinasyon halinde IC_{50} için ilaç 1'in dozu

D_2 : D_1 ile kombinasyon halinde IC_{50} için ilaç 2'nin dozu

DX_1 : Tek başına IC_{50} için ilaç 1'in dozu

DX_2 : Tek başına IC_{50} için ilaç 2'nin dozu

α : iki ilaçtan biri varken diğeri etki göstermezse "0"; iki ilaç birlikte etki gösteriyorsa "1" olarak kabul edilir ve hesaplanan değer; $CI > 1,3$ ise antagonizmayı, $CI = 1,1-1,3$ ise orta antagonizmayı, $CI = 0,9-1,1$ ise destekleyici etkiyi, $CI = 0,8-0,9$ ise hafif sinerjizmi, $CI = 0,6-0,8$ ise orta sinerjizmi, $CI = 0,4-0,6$ sinerjizmi ve $CI = 0,2-0,4$ ise yüksek sinerjizmi gösterir (Ichite ve diğ., 2019).

Kombinasyon uygulamasının SKBR3 hattındaki etkisine bakıldığında İbrutinib'in tek başına kullanılan dozuna göre bir değişiklik olmadığı fakat BO-264 için gerekli dozun 10 katı kadar azaldığını söylemek mümkündür. Kombin uygulamasının hücredeki etkisini anlamak için yapılan mitotik aktivite ve sentez fazı aktivitesini ifade eden BrdU aktivitesi sonuçlarına bakıldığında her ikisinde de artan sonuçlar görülmüştür. Kaspaz aktivitesinde ise kontrole kıyasla hemen hemen hiç değişiklik olmamıştır. HER2+ hücre hatlarında etkisi birçok yönden ele alınmış ve açıklanmış olan bu iki molekülün bir araya geldiğinde antagonist etki göstermesi düşündürücüdür.

MCF-7 hücre hattında kombinasyon sonuçlarına bakıldığında etki dozunun hem İbrutinib’de hem BO-264’te düştüğü görülmektedir. Mitotik aktivite analizi bulgularına göre kombin doz 48.saatte hücre canlılığını %28’e düşürmüş ve kaspaz aktivitesini 4 katı kadar artırarak etki göstermiştir. Aynı zamanda kombin dozun xCELLigence analizi grafiği bu etkinin sitoskeletal bir yönü olacağını da göstermektedir. Sonuç olarak MCF-7 üzerinde ayrı ayrı çok iyi etkisi açıklanmamış bu iki molekülün kombin uygulaması 0,4 CI değeriyle yüksek sinerjizme işaret etmektedir ki bu da yeni bir ilaç protokolünün gelişmesine katkı sağlayabilir.

Diğer taraftan HER2+ hücre hatlarında çok düşük dozlarda yüksek etki gösteren, MCF-7 hücre hattında ise diğer hücrelere oranla iyi sonuçlara ulaşılamamış bu iki molekülün kombin kullanımının SKBR3 hücre hattında antagonist, MCF-7 hattında ise yüksek sinerjistik etkisinin açıklanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. |

6. KAYNAKLAR

- Akbulut, O., Lengerli, D., Saatci, O., Duman, E., Seker, U. O., Isik, A., ... & Sahin, O. (2020). A Highly Potent TACC3 Inhibitor as a Novel Anticancer Drug CandidateA Novel TACC3 Inhibitor as an Anticancer Agent. *Molecular cancer therapeutics*, 19(6), 1243-1254.
- Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical breast cancer*, 9, S73-S81.
- Bajpai, U. D., Zhang, K., Teutsch, M., Sen, R., & Wortis, H. H. (2000). Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor κ B activation. *The Journal of experimental medicine*, 191(10), 1735-1744.
- Brown, J. R. (2013). Ibrutinib (PCI-32765), the first BTK (Bruton's tyrosine kinase) inhibitor in clinical trials. *Current hematologic malignancy reports*, 8(1), 1-6.
- Buggy, J. J., & Elias, L. (2012). Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *International reviews of immunology*, 31(2), 119-132.
- Burstein, H. J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1652-1654.
- Carey, L. A. (2010). Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000–2010. *Clinical breast cancer*, 10(3), 188-195.
- Chaudhary, L. N., Wilkinson, K. H., & Kong, A. (2018). Triple-negative breast cancer: who should receive neoadjuvant chemotherapy?. *Surgical Oncology Clinics*, 27(1), 141-153.
- Chen, J., Kinoshita, T., Sukbuntherng, J., Chang, B. Y., & Elias, L. (2016). Ibrutinib Inhibits ERBB Receptor Tyrosine Kinases and HER2-Amplified Breast Cancer Cell Growth. *Molecular cancer therapeutics*, 15(12), 2835–2844.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney Jr, D. W., & Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924), 756-760.
- Creighton, C. J. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 289-297.
- De Luca, A., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Pergameno, M., & Normanno, N. (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(sup2), S17-S27.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research*, 13(15), 4429-4434.

- Dias, K., Dvorkin-Gheva, A., Hallett, R. M., Wu, Y., Hassell, J., Pond, G. R., ... & Bane, A. L. (2017). Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PloS one*, 12(1), e0168669.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The lancet*, 378(9793), 771-784.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2012). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet*, 379(9814), 432-444.
- Fielding, A. B., Lim, S., Montgomery, K., Dobrev, I., & Dedhar, S. (2011). A critical role of integrin-linked kinase, ch-TOG and TACC3 in centrosome clustering in cancer cells. *Oncogene*, 30(5), 521-534.
- Figueroa-Magalhães, M. C., Jelovac, D., Connolly, R. M., & Wolff, A. C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *The Breast*, 23(2), 128-136.
- Gergely, F., Karlsson, C., Still, I., Cowell, J., Kilmartin, J., & Raff, J. W. (2000). The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14352-14357.
- Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G., ... & Lam, E. W. (2003). BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85 α subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. *Oncogene*, 22(15), 2248-2259.
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., & Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Annals of Oncology*, 20(12), 1913-1927.
- Grabinski, N., & Ewald, F. (2014). Ibrutinib (ImbruvicaTM) potently inhibits ErbB receptor phosphorylation and cell viability of ErbB2-positive breast cancer cells. *Investigational new drugs*, 32(6), 1096–1104.
- Guo, F., & Liu, Y. (2018). Knockdown of TACC3 inhibits the proliferation and invasion of human renal cell carcinoma cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 26(2), 183-189.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... & Tsang, J. F. (2019). *Cardoso. Breast cancer. Nat. Rev. Dis. Primers*, 5, 66.
- Hendriks, R. W., Yuvaraj, S., & Kil, L. P. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 14(4), 219-232.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., ... & Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology*, 8(5), 1-17.

- Higgins, M. J., & Stearns, V. (2009). Understanding Resistance to Tamoxifen in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Clinical chemistry*, 55(8), 1453-1455.
- Mahajan, S., Vassilev, A., Sun, N., Ozer, Z., Mao, C., & Uckun, F. M. (2001). Transcription factor STAT5A is a substrate of Bruton's tyrosine kinase in B cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31216-31228.
- Ichite, N., Chougule, M. B., Jackson, T., Fulzele, S. V., Safe, S., Singh, M., 2009, Enhancement of Docetaxel Anti-cancer Activity by A Novel Diindolylmethane (DIM) Compound in Human Non-Small Cell Lung Cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (2), 543
- Ignatiadis, M., Bedard, P., Haibe-Kains, B., Haibe-Kains, B., Singhal, S., Loi, S., ... & Sotiriou, C. (2009). A Meta-Analysis of Gene Expression Profiling Studies Identifies Clinically Relevant Oncogenic Pathways in Basal-Like Breast Cancer. *Cancer Research*, 69(24_Supplement), 106-106.
- Li, T., Rawlings, D. J., Park, H., Kato, R. M., Witte, O. N., & Satterthwaite, A. B. (1997). Constitutive membrane association potentiates activation of Bruton tyrosine kinase. *Oncogene*, 15(12), 1375-1383.
- Lin, N. U., Claus, E., Sohl, J., Razzak, A. R., Arnaout, A., & Winer, E. P. (2008). Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*, 113(10), 2638-2645.
- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern pathology*, 19(2), 264-271.
- López-Herrera, G., Vargas-Hernández, A., González-Serrano, M. E., Berrón-Ruiz, L., Rodríguez-Alba, J. C., Espinosa-Rosales, F., & Santos-Argumedo, L. (2014). Bruton's tyrosine kinase—an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system. *Journal of leukocyte biology*, 95(2), 243-250.
- Metzler, J. M., Burla, L., Fink, D., & Imesch, P. (2020). Ibrutinib in gynecological malignancies and breast cancer: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4154.
- Molina-Cerrillo, J., Alonso-Gordoa, T., Gajate, P., & Grande, E. (2017). Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a promising target in solid tumors. *Cancer treatment reviews*, 58, 41–50.
- Morris, G. J., Naidu, S., Topham, A. K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., ... & Mitchell, E. P. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: A single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and end results database. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 110(4), 876-884.

- Niirio, H., & Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature Reviews Immunology*, 2(12), 945-956.
- Nwagbara, B. U., Faris, A. E., Bearce, E. A., Erdogan, B., Ebbert, P. T., Evans, M. F., ... & Lowery, L. A. (2014). TACC3 is a microtubule plus end-tracking protein that promotes axon elongation and also regulates microtubule plus end dynamics in multiple embryonic cell types. *Molecular biology of the cell*, 25(21), 3350-3362.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *nature*, 406(6797), 747-752.
- Petschnigg, J., Kotlyar, M., Blair, L., Jurisica, I., Stagljär, I., & Ketteler, R. (2017). Systematic identification of oncogenic EGFR interaction partners. *Journal of molecular biology*, 429(2), 280-294.
- Prabakaran, C. B., Yang, A. B., Chidambaram, D., Rajamanickam, K., Napper, S., & Sakharkar, M. K. (2020). Ibrutinib as a potential therapeutic option for HER2 overexpressing breast cancer—the role of STAT3 and p21. *Investigational new drugs*, 38, 909-921.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., ... & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research*, 12(5), 1-18.
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*, 5(1), 5-23.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., ... & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*, 24, S26-S35.
- Poudel, P., Nyamundanda, G., Patil, Y., Cheang, M. C. U., & Sadanandam, A. (2019). Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. *NPJ breast cancer*, 5(1), 21.
- Ring, A., & Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer*, 11(4), 643-658.
- Schneider, L., Essmann, F., Kletke, A., Rio, P., Hanenberg, H., Wetzel, W., ... & Piekorz, R. P. (2007). The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29273-29283.
- Schneider, L., Essmann, F., Kletke, A., Rio, P., Hanenberg, H., Schulze-Osthoff, K., ... & Piekorz, R. P. (2008). TACC3 depletion sensitizes to paclitaxel-induced cell death and overrides p21WAF-mediated cell cycle arrest. *Oncogene*, 27(1), 116-125.
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer genomics & proteomics*, 9(5), 311-320.

- Schwartzberg, P. L., Finkelstein, L. D., & Readinger, J. A. (2005). TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 5(4), 284-295.
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G., ... & Martens, J. W. (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer research*, 68(9), 3108-3114.
- Smith, C. I., Baskin, B., Humire-Greiff, P., Zhou, J. N., Olsson, P. G., Maniar, H. S., ... & Hammarström, L. (1994). Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *The Journal of Immunology*, 152(2), 557-565.
- Smith, M. R. (2015). Ibrutinib in B lymphoid malignancies. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 16(12), 1879-1887.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *science*, 235(4785), 177-182.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., ... & Press, M. F. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905), 707-712.
- Soltanshahi, M., Taghiloo, S., & Asgarian-Omran, H. (2022). Expression Modulation of Immune Checkpoint Molecules by Ibrutinib and Everolimus Through STAT3 in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 21(1).
- Tran, B., & Bedard, P. L. (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research*, 13(6), 1-10.
- Uitdehaag, J. C. M., Kooijman, J. J., de Roos, J. A. D. M., Prinsen, M. B. W., Dylus, J., Willemsen-Seegers, N., Kawase, Y., Sawa, M., de Man, J., van Gerwen, S. J. C., Buijsman, R. C., & Zaman, G. J. R. (2019). Combined Cellular and Biochemical Profiling to Identify Predictive Drug Response Biomarkers for Kinase Inhibitors Approved for Clinical Use between 2013 and 2017. *Molecular cancer therapeutics*, 18(2), 470-481.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288-300.
- Wang, X., Wong, J., Sevinsky, C. J., Kokabee, L., Khan, F., Sun, Y., & Conklin, D. S. (2016). Bruton's tyrosine kinase inhibitors prevent therapeutic escape in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 15(9), 2198-2208.
- Wirapati, P., Sotiriou, C., Kunkel, S., Farmer, P., Pradervand, S., Haibe-Kains, B., ... & Delorenzi, M. (2008). Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Research*, 10(4), 1-11.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., ... & Hayes, D. F. (2013). American Society of Clinical Oncology; College of American

Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31(31), 3997-4013.

Woyach, J. A., Johnson, A. J., & Byrd, J. C. (2012). The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(6), 1175-1184.

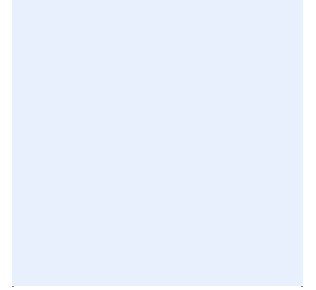
Wu, J., Liu, C., Tsui, S. T., & Liu, D. (2016). Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *Journal of hematology & oncology*, 9(1), 1-7.

Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(2), 127-137.

Zhang, L., Fang, C., Xu, X., Li, A., Cai, Q., & Long, X. (2015). Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *BioMed research international*, 2015. |

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İrem KARA DÖNE
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	