



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**Üçlü Negatif Meme Kanseri Konvansiyonel Tedavisinde  
Epigenetik Ajan ile Adjuvan İmmunoterapi Kombine  
Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması**

**Doktora Tezi**

Uzm. Ecz. Fazilet Esra İNCEDERE DÜZDAĞ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2024

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Üçlü Negatif Meme Kanseri Konvansiyonel Tedavisinde  
Epigenetik Ajan ile Adjuvan İmmunoterapi Kombine  
Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması**

Uzm. Ecz. Fazilet Esra İNCEDERE DÜZDAĞ

Danışman  
Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2024

## Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ .....

(Danışman)

**Üye** : Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ .....

**Üye** : Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI .....

**Üye** : Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL .....

**Üye** : Doç. Dr. Seher KARSLI .....

**Üye** : Dr. Öğr. Üy. Besra ÖZMEN YELKEN .....

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 26.07.2024

## Önsöz

Meme kanseri, dünya genelinde ve ülkemizde en yaygın teşhis edilen kanser türlerinden biri olup hem insidans hem de mortalite oranlarındaki artışla önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Teşhis ve tedavi alanında kaydedilen önemli ilerlemelere rağmen, hastalığın tedavisinde karşılaşılan zorluklar ve meme kanseri hücrelerinin vücuttan tamamen yok edilememesi, bu alanda yeni nesil tedavi yaklaşımlarının etkinliğinin araştırılmasını, hastalığın prognozu açısından hayati kılmaktadır.

Tez çalışmamda, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin tedavi süreçlerinde en zorlu ve tedaviye dirençli olan üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemeyi amaçladım. Bu kapsamda, spesifik olarak HDAC inhibitörü olarak kullanılan Droxinostat'ın etkileri, mevcut tedavi protokollerinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel ve immünoterapötik ajan olarak bilinen PD-L1 inhibitörü Atezolizumab ile kombinasyon halinde değerlendirildi. Araştırma, hücresel düzeyde *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiş olup, elde edilen bulguların daha ileri aşamalarda üç boyutlu hücre kültürleri ve *in vivo* hayvan modelleri ile doğrulanması ile bu sonuçların klinik çalışmalar için bir temel oluşturulması hedeflenmektedir.

Çalışmanın yürütülmesi sürecinde, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Burçin Tezcanlı Kaymaz'ın desteği, farklı bakış açısı ve akademik önderliği, karşılaştığımız sorunların çözümünde ve çalışmanın akıcı bir şekilde ilerlemesinde büyük önem taşımıştır. Kendisine daima şükranlarımı sunarım. Ayrıca, tez izleme komitesinin değerli üyeleri, anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Cumhur Gündüz ve Dr. Besra Özmen Yelken'e, tezimin gerçekleştirilmesi sürecindeki destekleri ve yardımları için minnettarlığımı ifade ederim. Tez değerlendirme kurulunun kıymetli üyeleri Sayın Doç. Dr. Aslı Tetik Vardarlı, Doç. Dr. Nur Selvi Günel, ve Doç. Dr. Seher Karslı'ya değerli eleştirileri ve katkıları için içten şükranlarımı sunarım. Bu tez çalışması, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 24010 nolu proje ile ve Türkiye ağılık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 24430 nolu B Grubu Ar-ge Projesi kapsamında maddi olarak desteklenmiştir. Destek sağlayan kurumlara teşekkürlerimi borç bilirim.

## Özet

### Üçlü Negatif Meme Kanseri Konvansiyonel Tedavisinde Epigenetik Ajan ile Adjuvan İmmunoterapi Kombine Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), yüksek metastaz oranı ve kötü prognozu ile bilinen, tedaviye direnç gösteren bir meme kanseri türüdür. PD-L1 inhibitörü Atezolizumab ve albumin bağlı paklitaksel nanopartiküllerinden oluşan Nab-paklitaksel kombinasyonu, mevcut tedavi protokollerinde kullanılmasına rağmen, çoğu hastada beklenen faydayı sağlamamaktadır. Epigenetik ajanlar, kanser hücrelerinde apoptoz ve hücre döngüsü durmasına neden olarak ve immünmodülatör etkileri sayesinde potansiyel kanser tedavi ajanları olarak değerlendirilmektedir. Meme kanseri progresyonunda HDAC 1, 6 ve 8 genlerinin rol oynaması nedeniyle, HDAC 3, 6 ve 8 inhibitörü olan Droxinostat'ın, kemoterapötik ve immünoterapötik direnci aşmada etkili bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Droxinostat'ın etkileri Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ile karşılaştırılmıştır. Droxinostat, Atezolizumab ve Nab-paklitaksel'in tekli dozlarının yanı sıra ikili ve üçlü kombinasyonlarının MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücreleri ve MCF-10A sağlıklı meme hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri XTT yöntemi ile değerlendirilmiş ve IC<sub>50</sub> ile ED<sub>50</sub> dozları hesaplanmıştır. Apoptotik etkiler Annexin V yöntemi ile analiz edilmiş, apoptoz ve hücre döngüsü analizleri akış sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, yara iyileşme ve invazyon analizleri yapılmış, Ki-67 proteininin ekspresyonu immünofloresan yöntemi ile belirlenmiş, oksidatif stres belirteçleri ölçülmüş ve karsinogenez sürecinde rol oynayan 26 genin transkripsiyonel ifadeleri q-RT-PCR ile analiz edilmiştir.

Sonuçlar, Droxinostat'ın MDA-MB-231 hücrelerinde 72. saatte IC<sub>50</sub> dozunun 60 µM, MCF-10A hücrelerinde ise 190 µM olarak belirlendiğini göstermektedir. Nab-paklitaksel'in MDA-MB-231 hücrelerinde IC dozu 0,58 µM, MCF-10A hücrelerinde ise 0,16 µM olup, kombinasyon dozlarında Droxinostat için 48 µM, Nab-paklitaksel için 0,28 µM dozlarının CI indeksi 0,808 ile ılımlı sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur. Atezolizumab'ın toksik etkiler göstermemesi nedeniyle tüm deneylerde 100 nM doz kullanılmıştır. Droxinostat'ın mono ve kombinasyon dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu ve nekroptozu 5-6 kat artırırken, MCF-10A

hücrelerinde sadece nekroptozu artırdığı gözlemlenmiştir. Droxinostat, hem apoptoz hem de nekroptoz yolaklarını aktive ederek hücre ölümüne neden olmuştur. Ayrıca, Droxinostat'ın hücre döngüsünü S ve M fazında daha fazla durdurduğu, Nab-paklitaksel'in ise daha fazla M fazında hücre tutulması sağladığı belirlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde ajanlar anlamlı değişikliğe neden olmamıştır.

Ki-67 ifadesinde azalma gözlemlenmiş, özellikle MDA-MB-231 hücrelerinde bu düşüş belirgin olmuştur. Ajanlar hem invazif hücre sayısını hem de hücre migrasyonunu azaltmıştır. Droxinostat'ın antioksidan biyomarkerlar üzerindeki etkisinin minimal olduğu, ancak Nab-paklitaksel ile kombinasyon halinde ROS'u indüklediği saptanmıştır. Gen ekspresyonu analizleri, Atezolizumab'ın MDA-MB-231 hücrelerinde PD-L1 ifadesini 6,33 kat azalttığını, Droxinostat'ın bu ifadeyi artırdığını ve MCF-10A hücrelerinde değişiklik göstermediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, Atezolizumab ve Nab-paklitaksel'in MDA-MB-231 hücrelerinde PD-1 ifadesini yaklaşık 2 kat artırdığı bulunmuştur. Droxinostat'ın en fazla HDAC 8'i inhibe ettiği tespit edilmiştir. Droxinostat'ın hem tekli hem de kombinasyon dozları, kaspaz-3 ve kaspaz-8'in ekspresyon seviyelerini artırmıştır. Nab-paklitaksel de bu genlerin ekspresyonunu artırmış, ancak bu artış Droxinostat'a kıyasla daha sınırlı kalmıştır.

Droxinostat'ın sağlıklı hücrelerdeki IC<sub>50</sub> dozunun kanser hücrelerinden 3 kat fazla olması, apoptozu ve nekroptozu Nab-paklitaksel ve Atezolizumab'a kıyasla daha fazla artırması ve etkili molekül olarak potansiyeli, ÜNMK tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler;**   l  Negatif Meme Kanseri; Histon Deasetilaz İnhibitörleri; İmmunoterapi; İmmun Kontrol Noktası İnhibisyonu; Kanser İmmunolojisi

## **Abstract**

### **Evaluation Of The Effectiveness Of Adjuvant Immunotherapy Combined Use With Epigenetic Agent In Conventional Treatment Of Triple Negative Breast Cancer**

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a treatment-resistant type of breast cancer known for its high metastasis rate and poor prognosis. The combination of the PD-L1 inhibitor Atezolizumab and Nab-paclitaxel, which consists of albumin-bound paclitaxel nanoparticles, is used in current treatment protocols but does not provide the expected benefit in most patients. Epigenetic agents are considered as potential cancer treatment agents by inducing apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells and by their immunomodulatory effects. Since HDAC 1, 6 and 8 genes play a role in breast cancer progression, Droxinostat, an HDAC 3, 6 and 8 inhibitor, may be an effective approach to overcome chemotherapeutic and immunotherapeutic resistance.

In this study, the effects of Droxinostat were compared with Nab-paclitaxel and Atezolizumab. The cytotoxic effects of single doses as well as double and triple combinations of Droxinostat, Atezolizumab and Nab-paclitaxel on MDA-MB-231 TNBC and MCF-10A healthy breast cells were evaluated by XTT method and  $IC_{50}$  and  $ED_{50}$  doses were calculated. Apoptotic effects were analyzed by Annexin V method and apoptosis and cell cycle analysis were performed by flow cytometry. In addition, wound healing assay and invasion analyses were performed, expression of Ki-67 protein was determined by immunofluorescence method, oxidative stress markers were measured and transcriptional expression of 26 genes involved in the carcinogenesis process were analyzed by q-RT-PCR.

The results show that the  $IC_{50}$  dose of Droxinostat was determined as 60  $\mu$ M in MDA-MB-231 cells and 190  $\mu$ M in MCF-10A cells at 72 hours. The  $IC_{50}$  dose of Nab-paclitaxel was 0.58  $\mu$ M in MDA-MB-231 cells and 0.16  $\mu$ M in MCF-10A cells, and the combination doses of 48  $\mu$ M for Droxinostat and 0.28  $\mu$ M for Nab-paclitaxel showed a moderate synergistic effect with a CI index of 0.808. Since Atezolizumab did not show toxic effects, 100 nM dose was used in all experiments. It was observed that mono and combination doses of Droxinostat increased apoptosis and necroptosis 5-6 fold in MDA-MB-231 cells, whereas it only increased necroptosis in MCF-10A cells. Droxinostat caused cell death by activating both apoptosis and necroptosis

pathways. Moreover, Droxinostat was found to arrest the cell cycle more in the S and M phases, whereas Nab-paclitaxel induced more cell retention in the M phase. The agents did not cause significant changes in healthy cells.

A decrease in Ki-67 expression was observed, especially in MDA-MB-231 cells. The agents decreased both the number of invasive cells and cell migration. Droxinostat had minimal effect on antioxidant biomarkers but induced ROS in combination with Nab-paclitaxel. Gene expression analysis revealed that Atezolizumab decreased PD-L1 expression by 6.33-fold in MDA-MB-231 cells, while Droxinostat increased this expression and showed no change in MCF-10A cells. Furthermore, Atezolizumab and Nab-paclitaxel were found to increase PD-1 expression approximately 2-fold in MDA-MB-231 cells. Droxinostat was found to inhibit HDAC 8 the most. Both single and combination doses of droxinostat increased the expression levels of caspase-3 and caspase-8. Nab-paclitaxel also increased the expression of these genes, but this increase was more limited compared to Droxinostat.

The fact that the IC<sub>50</sub> dose of Droxinostat in healthy cells was 3 times higher than in cancer cells, that it increased apoptosis and necroptosis more than Nab-paclitaxel and Atezolizumab, and its potential as an effective molecule indicate that it can be used in the treatment of TNBC.

**Keywords;** Triple Negative Breast Cancer; Histone Deacetylase Inhibitors; Immunotherapy; Immune Checkpoint Inhibition; Cancer Immunology

## İçindekiler

|                                                                                |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| Önsöz.....                                                                     | II   |
| Özet.....                                                                      | III  |
| Abstract.....                                                                  | V    |
| İçindekiler.....                                                               | VII  |
| Tablolar Dizini.....                                                           | X    |
| Şekiller Dizini.....                                                           | XI   |
| Grafikler Dizini.....                                                          | XII  |
| Kısaltma Listesi.....                                                          | XIII |
| Giriş.....                                                                     | 1    |
| 1.1. Araştırmanın Problemi.....                                                | 1    |
| 1.2. Araştırmanın Sorusu.....                                                  | 1    |
| 1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....                                             | 2    |
| 1.4. Araştırmanın Varsayımları.....                                            | 2    |
| 1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları.....                                          | 3    |
| 1.6. Araştırmanın Amacı.....                                                   | 3    |
| Genel Bilgiler.....                                                            | 6    |
| 2.1. Meme Kanseri.....                                                         | 6    |
| 2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri .....                                           | 6    |
| 2.2.1.Nab-Paklitaksel.....                                                     | 7    |
| 2.3. Kansere Bağışıklık Döngüsü.....                                           | 8    |
| 2.4. PD1/PD-L1 Sinyal İletimi ve Bağışıklık Kontrol Noktası İnhibitörleri..... | 9    |
| 2.4.1. PD-L1 inhibitörü Atezolizumab.....                                      | 10   |
| 2.5. Histon Modifikasyonu.....                                                 | 10   |
| 2.5.1. Histon Deasetilazlar (HDAC).....                                        | 10   |
| 2.5.2. Histon Deasetilaz (HDAC) İnhibitörleri.....                             | 11   |
| 2.5.2.1. Droxinostat.....                                                      | 12   |
| Gereç ve Yöntem.....                                                           | 15   |
| 3.1. Hücre Hatlarının Kültürü.....                                             | 15   |
| 3.1.1. Hücre Hatlarının Özellikleri.....                                       | 15   |
| 3.1.2. Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Takibi.....                              | 17   |
| 3.1.3. Hücre Canlılığının Takibi.....                                          | 17   |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması.....                                                         | 18 |
| 3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi ve Ekilmesi.....                                                      | 18 |
| 3.1.6. Hücrelerin Kriyoprezervasyonu.....                                                         | 19 |
| 3.2. Etken Maddelerin Hazırlanması.....                                                           | 19 |
| 3.2.1. Droxinostat Etken Maddesinin Hazırlanması.....                                             | 19 |
| 3.2.2. Nab-paklitaksel Etken Maddesinin Hazırlanması.....                                         | 20 |
| 3.2.3. Atezolizumab Etken Maddesinin Hazırlanması.....                                            | 21 |
| 3.3. Hücre Proliferasyon Analizi ve Sitotoksosite Analizleri.....                                 | 21 |
| 3.3.1. Hücre Proliferasyon Analizi.....                                                           | 21 |
| 3.3.2. Hücre Sitotoksosite Analizleri .....                                                       | 22 |
| 3.4. Apoptoz Analizi .....                                                                        | 24 |
| 3.5. Hücre Döngüsü Tutulma Analizi.....                                                           | 25 |
| 3.6. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizleri .....                                                 | 26 |
| 3.6.1. Yara İyileşme Analizi.....                                                                 | 26 |
| 3.6.2. Hücre İnvazyon Testi.....                                                                  | 27 |
| 3.7. Ki-67 Proliferasyon İndeks Belirtecinin İmmunofloresan Boyama ile<br>Ekspresyon Analizi..... | 27 |
| 3.8. Oksidatif Stres Biyogöstergelerinin Değerlendirilmesi.....                                   | 28 |
| 3.8.1. Total-Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi .....                                              | 28 |
| 3.8.2. Katalaz (CAT) Analizi .....                                                                | 31 |
| 3.8.3. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi .....                                                  | 33 |
| 3.9. Bradford Protein Tayin Yöntemi .....                                                         | 35 |
| 3.10. Gen Ekspresyon Analizleri .....                                                             | 36 |
| 3.10.1. RNA İzolasyonu.....                                                                       | 36 |
| 3.10.2. cDNA sentezi.....                                                                         | 38 |
| 3.10.3. RT-qPCR ile Hedef Genlerin Analizi .....                                                  | 39 |
| 3.11. İstatistiksel Analizler.....                                                                | 42 |
| Bulgular.....                                                                                     | 43 |
| 4.1. Hücre Hatlarında Proliferasyon ve Sitotoksosite Analizleri.....                              | 43 |
| 4.1.1. Proliferasyon Analizleri.....                                                              | 43 |
| 4.1.2. Sitotoksosite Analizleri.....                                                              | 44 |
| 4.1.2.1. HDAC inhibitörü Droxinostat'ın Sitotoksik Etkileri.....                                  | 44 |
| 4.1.2.2. Nab-paklitaksel'in Sitotoksik Etkileri .....                                             | 47 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2.3. Droxinostat ve Nab-paklitaksel İkili Kombinasyonlarının Sitotoksik Etkileri.....                                                     | 48  |
| 4.1.2.4. PD-L1 inhibitörü Atezolizumab'ın Sitotoksik Etkileri .....                                                                           | 50  |
| 4.2. Apoptoz Analizleri.....                                                                                                                  | 51  |
| 4.2.1. MDA-MB-231 Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Apoptotik Etkileri.....                   | 51  |
| 4.2.2. MCF-10A Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Apoptotik Etkileri .....                     | 53  |
| 4.3. Hücre Döngüsü Analizleri.....                                                                                                            | 56  |
| 4.3.1. MDA-MB-231 Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Analizleri.....             | 56  |
| 4.3.2. MCF-10A Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Analizleri .....               | 58  |
| 4.4. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizleri .....                                                                                             | 60  |
| 4.4.1. Yara İyileşme Analizi .....                                                                                                            | 60  |
| 4.4.2. Hücre İnvazyon Testi .....                                                                                                             | 62  |
| 4.5. Ki-67 Proliferasyon İndeks Belirtecinin İmmunofloresan Boyama ile Ekspresyon Analizi .....                                               | 64  |
| 4.6. Oksidatif Stres Biyogöstergelerinin Değerlendirilmesi .....                                                                              | 68  |
| 4.6.1. Total-Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi Sonuçları .....                                                                                | 68  |
| 4.6.2. Katalaz (CAT) Analizi Sonuçları .....                                                                                                  | 69  |
| 4.6.3. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi Sonuçları .....                                                                                    | 71  |
| 4.7. Gen Ekspresyon Analizleri .....                                                                                                          | 72  |
| 4.7.1. Total RNA Konsantrasyon ve Saflık Değerleri .....                                                                                      | 72  |
| 4.7.2. MDA-MB-231 ve MCF-10A Hücre Hatlarında Droxinostat, Nab-paklitaksel Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Gen Ekspresyon Analizleri ..... | 74  |
| Tartışma .....                                                                                                                                | 84  |
| Sonuç ve öneriler.....                                                                                                                        | 94  |
| Kaynaklar .....                                                                                                                               | 96  |
| Teşekkür.....                                                                                                                                 | 108 |
| Ekler.....                                                                                                                                    | 110 |

## Tablolar Dizini

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Kullanılan hücre hatlarının özellikleri.....                                                                                                                                                                             | 16 |
| <b>Tablo 2.</b> Kombinasyon çalışmaları için doz uygulama planı.....                                                                                                                                                                     | 23 |
| <b>Tablo 3.</b> Kombinasyon İndeksi (CI) ve Etki Tablosu .....                                                                                                                                                                           | 24 |
| <b>Tablo 4.</b> Apoptoz analizinde hücrelerin apoptotik durumları.....                                                                                                                                                                   | 25 |
| <b>Tablo 5.</b> Bradford standartlarının dilüsyon tablosu .....                                                                                                                                                                          | 36 |
| <b>Tablo 6.</b> cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı .....                                                                                                                                                                    | 38 |
| <b>Tablo 7.</b> cDNA termal döngü profili .....                                                                                                                                                                                          | 39 |
| <b>Tablo 8.</b> qRT-PCR analizlerinde hazırlanan reaksiyon karışımı .....                                                                                                                                                                | 40 |
| <b>Tablo 9.</b> qRT-PCR analizi termal döngü profili .....                                                                                                                                                                               | 40 |
| <b>Tablo 10.</b> Analizi yapılan hedef genler .....                                                                                                                                                                                      | 40 |
| <b>Tablo 11.</b> Hedef genlere ait primer dizileri .....                                                                                                                                                                                 | 41 |
| <b>Tablo 12.</b> MDA-MB-231 hücre hatlarına ait total RNA izolasyonu sonuçları .....                                                                                                                                                     | 72 |
| <b>Tablo 13.</b> MCF-10A hücre hatlarına ait total RNA izolasyonu sonuçları .....                                                                                                                                                        | 73 |
| <b>Tablo 14.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen genlerin ekspresyon kat değişimleri ..... | 75 |
| <b>Tablo 15.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen genlerin ekspresyon kat değişimleri .....    | 77 |

## Şekiller Dizini

|                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> (A) MDA-MB-231 Hücrelerinin düşük ve (B) yüksek yoğunluktaki inverted mikroskop görüntüsü.....                                                                                                                                                                                | 15 |
| <b>Şekil 2.</b> (A) MCF-10A Hücrelerinin düşük ve (B) yüksek yoğunluktaki inverted mikroskop görüntüsü .....                                                                                                                                                                                  | 16 |
| <b>Şekil 3.</b> Neubauer Lamı .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 18 |
| <b>Şekil 4.</b> Droxinostat moleküler yapısı.....                                                                                                                                                                                                                                             | 20 |
| <b>Şekil 5.</b> Paklitaksel moleküler yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| <b>Şekil 6.</b> XTT Çalışma Prensibi .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 21 |
| <b>Şekil 7.</b> Süperoksit dismutaz (SOD) etki mekanizması .....                                                                                                                                                                                                                              | 29 |
| <b>Şekil 8.</b> SOD inhibisyon oranının (i) hesaplanması ( $OD_{Control}$ ; Kontrol absorbansı, $OD_{BlankControl}$ ; Blank absorbansı, $OD_{Sample}$ ; Örnek absorbansı).....                                                                                                                | 31 |
| <b>Şekil 19.</b> Total SOD aktivitesinin hesaplanması (i; SOD inhibisyon oranı, $V_1$ ; Toplam reaksiyon hacmi (240 $\mu$ L), $V_2$ ; Reaksiyona giren örnek hacmi (20 $\mu$ L), f; dilüsyon faktörü, $C_{pr}$ ; protein konsantrasyonu) .....                                                | 31 |
| <b>Şekil 10.</b> CAT aktivitesinin hesaplanması ( $\Delta A$ ; $OD_{Kontrol}-OD_{Örnek}$ , a; standart doğru denkleminin eğimi, 0,02; standartların hacmi (mL), V; test öncesinde örneklerin hacmi, f; dilüsyon faktörü, $C_{pr}$ ; protein konsantrasyonu (mgprot/mL)) .....                 | 33 |
| <b>Şekil 11.</b> İndirgenmiş glutatyon etki mekanizması .....                                                                                                                                                                                                                                 | 33 |
| <b>Şekil 12.</b> GSH içeriğinin hesaplanması ( $\Delta A_{405}$ ; $OD_{Örnek}-OD_{Kontrol}$ , b; standart doğru denklemine ait parametre, a; standart doğru denkleminin eğimi, 2*; dilüsyon faktörü, f; Test öncesindeki dilüsyon faktörü, $C_{pr}$ ; protein konsantrasyonu (gprot/L)) ..... | 35 |
| <b>Şekil 13.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-23 hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekroz yüzdeleri .....                                                                                           | 52 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 14.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekroz yüzdeleri .....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 55 |
| <b>Şekil 15.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-23 hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü analiz sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 57 |
| <b>Şekil 16.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü analiz sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 59 |
| <b>Şekil 17.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerin tekli, ikili ve üçlü dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturulan yaraların 0. Saatten itibaren 60. Saate kadar kapanma oranları (UT; Kontrol, Drox; Droxinostat mono, Abrax; Nab-paklitaksel mono, Atezo; Atezolizumab mono, D+AB; Droxinostat+Nab-paklitaksel, D+AT; Droxinostat+Atezolizumab, AB+AT; Nab-paklitaksel+Atezolizumab, 3Lu; Droxinostat+ Nab-paklitaksel+Atezolizumab)... | 61 |
| <b>Şekil 18.</b> Boyama sonrası polikarbonat membrandan geçen hücrelerin inverted mikroskop ile görüntüleri A; UT, B; Droxinostat mono, C; Nab-paklitaksel mono, D; Atezolizumab, E; Droxinostat+Nab-paklitaksel F; Droxinostat+Atezolizumab G; Nab-paklitaksel+Atezolizumab, H; Droxinostat+Nab-paklitaksel+Atezolizumab..                                                                                                                                               | 63 |
| <b>Şekil 19.</b> MDA-MB-231 hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait immüno Floresan mikroskop görüntüleri (Büyütme oranı 40x;20µm) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 65 |
| <b>Şekil 20.</b> MCF- 10A hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait immüno Floresan mikroskop görüntüleri (Büyütme oranı 40x;20µm) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 67 |

## Grafikler Dizini

|                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafik 1.</b> MDA-MB-231 hücre hattına ait proliferasyon analizi .....                                                                                                                                                                                                | 43 |
| <b>Grafik 2.</b> MCF-10A hücre hattına ait proliferasyon analizi .....                                                                                                                                                                                                   | 44 |
| <b>Grafik 3.</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Droxinostat IC <sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi .....                                                                                                                                         | 45 |
| <b>Grafik 4.</b> MCF-10A hücrelerinde Droxinostat IC <sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi .....                                                                                                                                            | 46 |
| <b>Grafik 5.</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Nab-paklitaksel IC <sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi .....                                                                                                                                     | 47 |
| <b>Grafik 6.</b> MCF-10A hücrelerinde Nab-paklitaksel IC <sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi .....                                                                                                                                        | 48 |
| <b>Grafik 7.</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Droxinostat-Nab-paklitaksel ikili kombinasyonunun doz-etki eğrisi ve medyan-etki, etkilenen fraksiyon ve izobologram grafikleri.....                                                                                            | 50 |
| <b>Grafik 8.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin kat değişim grafiği ( *; p<0.05, **** ; p<0.0001) .....              | 53 |
| <b>Grafik 9.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin kat değişim grafiği (**; p<0.01, ***; (p<0.001), ****; (p<0.0001))..... | 56 |
| <b>Grafik 10.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü kat değişim grafiği (**; p<0.01, ***; (p<0.001), ****; (p<0.0001)) .....                 | 58 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafik 11.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü kat değişim grafiği (*; $p<0.05$ , ***; $p<0.001$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 59 |
| <b>Grafik 12.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerin tekli, ikili ve üçlü dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturulan yaraların 0. Saatten itibaren 60. Saate kadar kapanma oranlarının karşılaştırması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 62 |
| <b>Grafik 13.</b> MDA-MB-231 hücrelerinde, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla ilaç uygulanan dozlarda hücre invazyonunda gözlemlenen kat değişimi (*; $p<0.05$ , **; $p<0.01$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 64 |
| <b>Grafik 14.</b> MDA-MB-231 hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait grafik. a: UT MDA-MB-231 grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), b: Drox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), c: Abrox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), d: Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), e: Drox + Abrox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), f: Drox +Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), g: Abrox + Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), h: Drox + Abrox + Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ). .... | 66 |
| <b>Grafik 15.</b> MCF- 10A hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait grafik. a: UT MCF- 10A grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), b: Drox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), c: Abrox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), d: Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 68 |
| <b>Grafik 16.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve ikili kombinasyonlarının SOD düzeyi üzerindeki etkileri ve kat değişim grafiği (***; $p<0.001$ , ****; ( $p<0.0001$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 69 |
| <b>Grafik 17.</b> Katalaz $H_2O_2$ standart eğrisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 70 |
| <b>Grafik 18.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve ikili kombinasyonlarının CAT aktivitesi üzerindeki etkileri ve kat değişim grafiği (****; ( $p<0.0001$ ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 70 |
| <b>Grafik 19.</b> İndirgenmiş Glutasyon standart eğrisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| <b>Grafik 20.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve ikili kombinasyonlarının GSH düzeyi üzerindeki etkileri ve kat değişim grafiği (***; $p<0.001$ , ****; ( $p<0.0001$ )).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 71 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafik 21.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki ekspresyon değişimlerine ait ısı haritası .....                                                             | 76 |
| <b>Grafik 22.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki ekspresyon değişimlerine ait ısı haritası .....                                                                | 78 |
| <b>Grafik 23.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen MYC, SRC VE TP53 genlerinin ekspresyon kat değişimleri .....       | 79 |
| <b>Grafik 24.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen PD-1 ve PD-L1 genlerinin ekspresyon kat değişimleri .....          | 80 |
| <b>Grafik 25.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen HDAC 2, HDAC6 ve HDAC8 genlerinin ekspresyon kat değişimleri ..... | 81 |
| <b>Grafik 26.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen HGF, MET, GAB1 ve GRB2 genlerinin ekspresyon kat değişimleri ..... | 82 |
| <b>Grafik 27.</b> Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen CASP3 ve CASP8 genlerinin ekspresyon kat değişimleri .....         | 83 |

## Kısaltma Listesi

|         |                                         |
|---------|-----------------------------------------|
| ÜNMK    | : Üçlü Negatif Meme Kanseri             |
| HDAC    | : Histon Deasetilaz                     |
| PD-1    | : Programlı Ölüm 1                      |
| PD-L1   | : Programlı Ölüm Ligandı 1              |
| HER2    | : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2  |
| PARP    | : Poli-ADP-Riboz Polimeraz              |
| IKNi    | : İmmun Kontrol Noktası İnhibitörleri   |
| FDA     | : Amerikan İlaç Ve Gıda Dairesi         |
| MDR     | : Çoklu İlaç Direnci Genlerinin         |
| MDSC    | : Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler |
| Treg    | : Düzenleyici T Hücreleri               |
| APC     | : Antijen Sunan Hücreler                |
| MHCI/II | : Major Doku Uyumluluk Kompleksi I/II   |
| IL      | : İnterlökin                            |
| TIL     | : Tümör İnfiltr Eten Lenfositler        |
| HDAC    | : Histon Deasetiltransferaz             |
| HAT     | : Histon Asetiltransferaz               |

|                  |                                                         |
|------------------|---------------------------------------------------------|
| VEGFR            | : Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü          |
| TNF              | : Tümör Nekroz Faktör                                   |
| TRAIL            | : TNF ile İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand           |
| FLICE            | : FADD benzeri IL-1 $\beta$ dönüştürücü enzim           |
| c-flip           | : Hücresel FLICE inhibitör protein                      |
| AIC              | : Apoptoz Önleyici Kompleksi                            |
| DISC             | : Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi                     |
| ROS              | : Radikal Oksijen Türleri                               |
| TAM              | : Tümörle İlişkili Makrofajlar                          |
| FBS              | : Fetal Sığır Serum                                     |
| hEGF             | : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü                        |
| DF               | : Dilüsyon Faktörü                                      |
| DMSO             | : Dimetil Sülfoksit                                     |
| IC <sub>50</sub> | : İnhibitör Konsantrasyon                               |
| ED <sub>50</sub> | : %50'si Etkilenen Hücrelere Uygulanan Kombinasyon Dozu |
| CI               | : Kombinasyon İndeksi                                   |
| FITC             | : Floresan İzotiyosiyanat                               |
| PI               | : Propidyum İyodür                                      |

|                               |   |                                    |
|-------------------------------|---|------------------------------------|
| BSA                           | : | Sığır Serum Albümini               |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : | Hidrojen Peroksit                  |
| PBS                           | : | Phosphate Buffer Saline            |
| DAPI                          | : | 4',6-diamidino-2-phenylindole      |
| SOD                           | : | Süperoksit dismutaz                |
| CAT                           | : | Katalaz                            |
| GSH                           | : | Glutasyon                          |
| XO                            | : | Ksantin Oksidaz                    |
| OD                            | : | Optik Dansite                      |
| IHC                           | : | İmmunohistokimya                   |
| DTNB                          | : | Dinitrobenzoik asit                |
| PBMC                          | : | Periferik Kan Mononükleer Hücreler |

## Giriş

### 1.1. Araştırmanın Problemi

Solid tümörler arasında yer alan meme kanseri vakalarının %20'sini oluşturan üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) tedavisinde, biyoteknolojik olarak üretilmiş olan immun kontrol noktası inhibitörlerinden Programlı Ölüm Ligandı 1 inhibitörü (anti-PD-L1 monoklonal antikoru) Atezolizumab ile taksan grubu antineoplastik ajanlardan albumin bağlı Paklitaksel nanopartiküllerinden oluşan Nab-paklitaksel kombinasyonu tedavi protokollerinde kullanılıyor olsa da, immunosupresif tümör mikroçevresi ve kemoterapötik direnç mekanizmaları nedeniyle hastaların çoğunda beklenen fayda sağlanamamaktadır.

Epigenetik ajanlar, kanser hücrelerinde hem apoptoz ve hücre döngüsü durmasına neden olarak, hem de immunomodülatör etkileri nedeniyle epigenetik veya epigenetik olmayan düzenlemede önemli görevleri olan, preklinik ve klinik denemelerde potansiyel kanser önleyici terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır.

Meme kanseri progresyonunda Histon Deasetilaz (HDAC) 1,6 ve 8 genleri rol oynamakta olup, HDAC 3,6 ve 8 inhibitörü Droxinostat kullanımının meme kanserinde tedavisinde iyi bir yaklaşım olabileceği, kemoterapötik ve immunoterapötik direncin üstesinden gelinmesine, ayrıca diğer bilinmeyen mekanizmaların aydınlatılıp terapötik yanıtın geri kazandırılarak yeni hedef tedavilerin ortaya çıkmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

### 1.2. Araştırmanın Sorusu

Üçlü negatif meme kanseri hastalarında epigenetik ajan ile adjuvan immünoterapi kombinasyonunun konvansiyonel tedavilere göre tedaviye yanıt oranı üzerindeki etkisi nedir?

P. Üçlü Negatif Meme Kanseri Hastalarında yeni nesil tedavi yöntemlerinin araştırılması

I.Epigenetik ajan kullanımı ve adjuvan immünoterapi ile kombinasyonu sonucunda etkin bir tedavi yönteminin geliştirilmesi

C. İlaçların etkileri sağlıklı hücreler ve ilaç uygulanmayan kanser hücreleri arasındaki karşılaştırma ile analiz edilecektir.

O. Hem tekli hem de kombinasyon dozları ile kanser hücrelerinin bertarafını sağlayarak tedavi yöntemi geliştirmek

### 1.3. Araştırmanın Hipotezleri

1- HDAC inhibitörü Droxinostat, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde tek başına kullanıldığında hücre proliferasyonunu azaltacak ve apoptozu artıracaktır.

2- Droxinostat'ın, konvansiyonel kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel ile kombine kullanımı, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde tedaviye yanıtı artırarak hücre ölümünü daha etkin hale getirecektir.

3- Droxinostat, immünoterapötik ajan PD-L1 inhibitörü Atezolizumab ile birlikte kullanıldığında, kanser hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını ve yok edilmesini kolaylaştırarak, tedavi etkinliğini artıracaktır.

4- HDAC inhibitörü Droxinostat ile Nab-paklitaksel ve Atezolizumab'ın birlikte kullanımı, üçlü negatif meme kanseri tedavisinde sinerjik bir etki yaratarak, hücre ölüm oranını artıracak ve bu kombinasyonun klinik olarak uygulanabilir bir tedavi yaklaşımı olabileceğini gösterecektir.

### 1.4. Araştırmanın Varsayımları

1- Üçlü negatif meme kanseri hücre hattı ve sağlıklı meme hücre hattı, *in vitro* koşullarda araştırmanın hedeflediği biyolojik süreçleri ve tedavi etkilerini doğru bir şekilde yansıtmaktadır.

2- HDAC inhibitörü Droxinostat, kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel ve immünoterapötik ajan Atezolizumab, *in vitro* ortamdaki hücreler üzerindeki etkileri daha ileri üç boyutlu hücre kültürü ve *in vivo* modellerde de gözlemlenebilir olacaktır.

3- Araştırmada kullanılan hücre kültürü yöntemleri, çalışma süresi boyunca hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümesini ve tedavilere doğru yanıt vermesini sağlamaktadır.

4- Çalışmadan elde edilen bulgular, klinik uygulamalara yönelik potansiyel tedavi kombinasyonları hakkında genel çıkarımlar yapmaya uygun olacaktır.

5- *in vitro* olarak elde edilen sonuçlar, *in vivo* ve klinik çalışmalar için başlangıç aşaması olarak değerlendirilebilir ve bu sonuçlar, ilerleyen aşamalarda yapılan çalışmalarda benzer eğilimler gösterecektir.

### 1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez çalışmamız yalnızca *in vitro* ortamda yürütülmüştür. *In vitro* ortam, hastanın metabolizmasını tam olarak yansıtamadığından, elde edilen bulguların geçerliliği üç boyutlu hücre kültürü ve ardından *in vivo* hayvan deneyleri ile desteklenmelidir. Bu aşamalar tamamlandığında, bulguların klinik çalışmalara taşınabilmesi mümkün olacaktır.

Çalışmamızda kullanılan PD-L1 inhibitörü Atezolizumab'ın etki mekanizması, lenfositlerin aktivasyonu yoluyla anti-tümör etki sağlamaktır. Ancak çalışmamızda kullanılan hücre ortamında lenfosit bulunmadığından, Atezolizumab'ın birincil etkisini gözlemlemek mümkün olmamıştır. İlacın gerçek etkinliğini belirlemek amacıyla, tez çalışmamızın devamında ko-kültür ortamında lenfositlerin hücre ortamına ilave edilmesi ve bu koşullarda elde edilen verilerin değerlendirilmesi planlanmaktadır.

### 1.6. Araştırmanın Amacı

Bu bağlamda tasarlanan tez çalışmasında; *in vitro* ortamda, HDAC inhibitörü Droxinostat'ın hem tek başına hem de immun kontrol noktası inhibitörü Atezolizumab ve kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi sağlıklı kontrol meme hücrelerinden elde edilecek bulguların kıyaslanmasıyla belirlenecektir.

Bu amaç doğrultusunda;

1- Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat etken maddelerinin IC<sub>50</sub> dozları ile kombinasyonları ED<sub>50</sub> dozunun MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine uygulanmasını takiben, hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksosite analizleriyle, bu ajanların mono ve kombine kullanımının, kanser ve sağlıklı meme kontrol hücreleri üzerindeki olası sinerjik/additif/antagonist etkisi belirlenmesi,

2- Meme kanserinde tümör proliferasyon belirteci olarak kullanılan, tedavi seçimine karar vermede ve hastalığın ilerlemesinde öngörü sağlayan Ki-67 proliferasyon indeksi belirtecinin hem elisa yöntemi hem de immunofloresans yöntemi ile protein düzeyindeki ekspresyon analizlerinin gerçekleştirilmesi ile bu ajanların mono/kombine kullanımının tümör içerisinde prolifere olan hücrelerin proliferasyonunu inhibe edebilmek üzerine etkisinin belirlenmesi,

3- Kullanılacak ajanların hücrelerde meydana getireceği canlı ve erken apoptotik/geç apoptotik/nekrotik hücre yüzdelerinin belirlenmesi ile hücre döngüsü tutulması analiziyle G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M ya da S fazı evrelerindeki arrest yüzdelerinin belirlenmesi; böylelikle apoptotik indüksiyon ve hücre döngüsünün erken safhalarında hücre arrestinin sağlanıp sağlanmadığının saptanmasını,

4- Kullanılacak ajanların sitotoksite analizinden elde edilecek mono ve sinerjistik kombinasyon dozlarının, apoptotik hücre yüzdesi ve hücre döngüsü arresti analizinden elde edilecek tutulma evresi ile Ki-67 proliferasyon indeksinin mRNA seviyesindeki ekspresyon değerleri arasındaki olası korelasyonun belirlenmesi,

5-Üçlü negatif meme kanserinin metastaz oranı yüksek olan kanser türü olması nedeniyle etken maddelerin sitotoksite analizinden elde edilecek mono ve sinerjistik kombinasyon dozlarının, bu hücrelerin migrasyon ve invazyon özelliklerini nasıl etkilediğinin belirlenmesi,

5- Etken maddelerin mono ve sinerjistik kombinasyon dozlarının, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilecek Ki-67 mRNA ekspresyon profillemesinin, hücre yara iyileşme migrasyon testi ve hücre invazyon testi ile arasındaki olası korelasyon belirlenerek, hücre proliferasyonunun migrasyon ve invazyon ile ilişkisinin ortaya konması,

6- Kanser hücrelerinde etken maddelerin mono/kombinasyon dozlarının kanser ve sağlıklı meme kontrol hücrelerinde oksidatif stres parametrelerini nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi,

7- Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat etken maddelerinin IC<sub>50</sub> dozları ile bu maddelerin kombinasyonlarının ED<sub>50</sub> dozlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A

hücrelerine uygulanmasının ardından, onkojenik sinyal yolaklarında rol oynayan hedef genlerin mRNA düzeyindeki ifadelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Böylelikle,  l  negatif meme kanserinin konvansiyonel tedavisine destek olabilecek yeni ajanların ve bu ajanların kombine kullanım etkinliklerinin belirlenmesiyle, metastatik meme kanseri hücre proliferasyonunun engellenmesi, konvansiyonel kemoterapötik ve adjuvan immunoterapi ilaçlarına yanıt hassasiyetinin arttırılması, meme kanseri hücrelerinin apoptozunun indüklenerek erken evre hücre tutulmasının sağlanması, migrasyon ve invazyonun önlenmesi; bu biyolojik yanıtların moleküler mekanizmasında yer alan genlerin ekspresyonel değişimlerinin saptanmasıyla, süreç üzerindeki etkileri belirlenmiş olacaktır.

Bu sayede *in vitro* ortamda yeni kombine tedavi stratejisi geliştirilmesine bağlı olarak literatüre katkı sağlanmış olacak ve *in vivo* hayvan deneyialışmalarının  n  açılmış olacaktır. Ayrıca ilk defa  NМК’dealışılacak olan Droxinostat’ın farklı formülasyonlarda hazırlanarak ( rn. nanopartiküllerle kaplanarak, ya da eksozom/lipozom hibrit nanopartikül taşıma sistemi) uygulanması ile daha ilerialışmalara da zemin hazırlayabilecektir.

## Genel Bilgiler

### 2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen ve ölümlerle sonuçlanabilen kanserlerin başında gelmektedir. Son yıllarda ülkemiz de meme kanseri sıklığı artarak hastalığın tanısı ileri evrelerde konulmakta ve bu durum da tedavideki başarı oranını olumsuz etkilemektedir. Meme kanseri lokal bir hastalık olup tedavideki ilk seçenek cerrahidir. Cerrahi tedavinin yanına radyoterapi, kemoterapi ve endokrin tedavileri seçenekleri de eklenmektedir (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2020).

### 2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), meme kanseri vakalarının %15 ini oluşturur (Michel vd., 2020). ÜNMK, östrojen ve progesteron gibi hormon reseptörlerini ve insan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2'nü (HER2/neu) eksprese etmeyen, heterojen, metastaz oranı yüksek, prognozu kötü ve tedaviye en fazla direnç gösteren bir meme kanseri tipidir (Nath vd., 2022).

Metastatik ÜNMK'li hastalar için ortalama genel sağ kalım süresi yaklaşık 18 aydır. ÜNMK'de kemoterapi en önemli tedavi seçeneği olmakla birlikte, poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) ve bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri (IKNi) ile hedeflenen tedavilerin yanı sıra çok sayıda yeni terapötik ajanların etkinlikleri yapılan prelinik ve klinik çalışmalarla değerlendirilmektedir. ÜNMK tümör hücrelerinin heterojenliği ve yüksek mutasyon yüküne sahip olması nedeniyle tedavide direnç gelişmektedir (Vagia vd., 2020). ÜNMK hastalarının yaklaşık %20'si standart tedaviye (tümör rezeksiyonu, radyasyon ve kemoterapi) iyi yanıt verir, ancak geri kalanında metastaz gelişerek hastalık ölümcül hale gelmektedir. Bu nedenle hastalığın tedavisinde tam remisyonun sağlanabilmesi amacıyla yeni tedavi yöntemlerinin keşfedilmesi önem taşımaktadır.

Meme kanseri tedavisinde çeşitli IKNi yöntemleri halen klinik denemelerde olup, PD-L1 ( $\geq$  %1) eksprese eden ÜNMK hastaları için yapılan FazIII IMpassion 130 klinik denemesinde PD-L1 inhibitörü atezolizumab ile taksan grubu antineoplastik ajan Nab-paklitaksel kombinasyonunun progresyonsuz sağkalım sonuçlarına dayanılarak, 2019

yılında Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu tarafından meme kanserinde ilk immünoterapi onayı alınmıştır (Schmid vd., 2020; Keenan ve Tolaney, 2020). Buna karşın, randomize seçilen 651 ÜNМК hasta grubunda yapılan Impassion 131 klinik denemesinde, paklitaksel ile atezolizumab kombinasyonun PD-L1 pozitif olan hasta grubunda tek başına Paklitaksel'e göre progresyonsuz sağ kalımını iyileştirmediği bu nedenle de Impassion 130 çalışmasının sonuçları ile çeliştiği gösterilmiştir (Miles vd., 2021). Bu iki çalışmanın birbirleriyle tutarsız sonuçlar ortaya koymasının, Paklitaksel uygulamalarında yoğun olarak steroid kullanımının tümör mikroçevresinde immunosupresyona neden olabileceği gösterilebilmekle birlikte bu çelişkili sonuçların nedenlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **2.2.1. Nab-Paklitaksel**

Taksan grubu ilaçlardan paklitaksel, 1990'lardan beri meme, yumurtalık, akciğer, prostat ve mide kanserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış bir ajandır. Paklitaksel'in meme kanseri tedavisinde yanıt oranı birinci basamak kemoterapilerde %50 iken ikinci ve üçüncü basamak kemoterapilerde bu oran %20-30'lara kadar düşmektedir. Paklitaksel'e karşı gelişen ilaç direncinde, p-glikoprotein, çoklu ilaç direnci genlerinin (MDR) ve ATP bağlayıcı kaset taşıyıcılarının aşırı ekspresyonlarının,  $\beta$ -tubulin genindeki nokta mutasyonlarının, mikrotübül ile ilişkili proteinlerin anormal ekspresyonu sonucu yapılarının değişmesinin ve anti-apoptotik yolların aktivasyonunun majör rol oynadığı bildirilmiştir (Yusuf vd., 2003; Jiang vd., 2014; Shimomjura vd., 2012). Paklitaksel'in yüksek düzeyde lipofilik yapıda olması nedeniyle tümör hücrelerine geçişinin sağlanması için çözücü solvent ve etanol ile formülize edilmektedir. Bu nedenle hastalarda gelişebilecek aşırı duyarlılık reaksiyonlarını önlenmesi amacıyla tedavi öncesi steroid kullanımını gerekmektedir (Schettini, 2016). Nab-paklitaksel (Nab-paklitaksel) ise, albümin bağlı paklitaksel nanopartüküllerinin kolloidal süspansiyonundan oluşan bir formülasyondur. Tümör hücrelerine geçişi için herhangi bir solvante ihtiyaç duymamaktadır, içerisindeki albüminin gp60/caveolin-1 reseptörüne bağlanması ile tümör hücresi içerisine geçişi gerçekleşmektedir. Solvent içeren bir formülasyona sahip olmamasından dolayı uygulama öncesinde steroid kullanımını gerektirmemesi, Paklitaksel'e göre daha lineer bir farmakokinetiğe sahip

olması nedeniyle yüksek dozlarda daha iyi tolere edilebilmektedir (Schettini, 2016). Nab-paklitaksel, antijen sunan hücrelerin olgunlaşmasını ve sitokin ekspresyonunu artırarak antijen sunumunu artırmaktadır. Ayrıca, miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin (MDSC) ve düzenleyici T (Treg) hücrelerini bloke etmekte, T hücrelerinin, efektör T hücrelerine farklılaşmasına yardımcı olmakta ve sitotoksik T hücrelerinin tümör mikroçevresine infiltrasyonuna yardımcı olarak tümör hücrelerinin apoptozunda rol oynamakta ve bu özellikleriyle kanser bağışıklık döngüsünde, bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yardımcı önemli görevleri bulunmaktadır (Chen vd., 2022).

### **2.3. Kanser Bağışıklık Döngüsü**

Kanser bağışıklık döngüsünde, antijen sunan hücreler (APC) tarafından, tümör hücrelerinin oluşturduğu tümör hücrelerine spesifik neoantijenler yakalanır, işlenir ve major doku uyumluluk kompleksi I/II (MHC I/II) yoluyla T hücrelerine sunulur. Antijen sunan hücrelerde sunulan neoantijenlerin T hücre reseptörüne bağlanması sonucunda T hücre aktivasyonu için gerekli ilk sinyal oluşturulmaktadır. Ancak T hücrelerinin tam aktivasyonu için ikinci bir kostimülatör sinyalin bulunması gerekir. Kostimülatör sinyal, APC'deki CD80/86 proteinleri ile T hücresi üzerindeki CD28 reseptörünün etkileşimi sonucu oluşur. Bu etkileşimler sonucunda T hücresi aktive edilerek etkin hale gelir ve interlökinler (IL-2, IL-4 ve IL-7 gibi) proliferatif sitokinlerin üretiminin sağlanması ile otokrin olarak klonal çoğalır. Çoğalan efektör T hücreleri, tümör bölgesine göç ederek bu bölgedeki tümör hücrelerine infiltre olarak kanser hücrelerini tanır, perforin ve granzim enzimlerinin etkisiyle bu hücrelerin apoptozuna neden olur. Ölü tümör hücreleri tarafından bağışıklık hücrelerini yeniden aktive etmek için yeni neoantijenler salgılanır, yakalanır, işlenir ve T hücrelerine tekrar sunulur kanser bağışıklık döngüsünün devam etmesi sağlanır (Chen ve Flies, 2013; Cogdill vd., 2017).

Vücuttaki malign hücrelerin sayıca artmasını etkileyen birçok mekanizma vardır ve bunlardan biri de bağışıklık kontrol noktalarının aktivasyonu ile immün aracılı hücre hasarını bloke edilerek malign hücrelerin immün gözetimden kaçabilmelerini sağlayan mekanizmalardır (Chen ve Flies, 2013). T hücreleri, kronik enfeksiyonlarda ve neoplastik süreçlerde, kronik zayıf antijenik uyarı aldıklarında, hayatta kalır ancak T hücresi tükenmesine neden olur. T hücresi aktivasyonunun negatif düzenleyicileri

olarak bilinen bağışıklık kontrol noktaları, bağışıklık tepkisinin düzenlenmesi ve immun hiperaktivitenin önlenmesini sağlamaktadır. Kanseri hücreleri de bu noktaları ele geçirerek vücudun bağışıklık tepkisinden kaçabilmektedir.

#### **2.4. PD1/PD-L1 Sinyal İletimi ve Bağışıklık Kontrol Noktası İnhibitörleri**

Programlı Ölüm Ligandı-1 (PD-L1) bazı kanser hücrelerinde ve çeşitli tümör infiltrate eden hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir. PD-L1, T hücreleri üzerinde bulunan Programlı ölüm-1 (PD-1) reseptörüne bağlanarak ve T hücre sinyalini azaltarak sitotoksik T hücrelerinin proliferasyonunu ve fonksiyonunu inhibe etmektedir.

Anti-PD-1, anti-PD-L1 gibi ICi'ler bozulmuş anti-tümör immün yanıtlarını yeniden aktive ederek T hücrelerinin fonksiyonlarını geri kazanmasına, granzim ve perforin salgılanması ile tümör sitolizisinin artmasına ve metastazın azalmasına neden olur (Waldman vd., 2020; Patel ve Kurzrock, 2015). ÜNМК hastalarının, yüksek oranda PD-L1 eksprese etmesi, ÜNМК hücrelerinde bulunan tümör mutasyon yükünün fazlalığı, tümör mikroçevresinde yüksek oranda tümör infiltrate eden lenfositlerin (TIL) varlığı ile diğer meme kanseri tiplerine göre daha immunojenik bir mikroçevreye sahip olması gibi özelliklerle, tedavide immünoterapinin etkinliğini artırma potansiyeli taşımaktadır (Kwapisz, 2021). Kanseri hücrelerine ait neoantijenlerin ekspresyon kaybına yol açan mekanizmalar, antijen sunumundaki defektler, onkogen ve tümör supresör genlerdeki defektler sonucu onkojenik sinyal yollarının immün hücre kompozisyonunu ve sitokin profilini değiştirerek tümör mikroçevresini etkilenmesi tümörlerin ICi tedavisine dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Hangi hastanın tedaviden fayda sağlayacağını belirlemek açısından biyogöstergelere ihtiyaç duyulmakla birlikte, günümüzde ICi tedavisinde, PD-L1 ekspresyonu ve tümör mutasyon yükünün belirlenmesi bu amaçla kullanılmaktadır. Tümör mutasyon yükü, tümör hücrelerinde bulunan toplam mutasyon sayısıdır. Tümörlerin bağışıklık hücrelerine sunduğu neoantijen yükünü yansıtır ve bu nedenle immünoterapinin, mutasyon yükü yüksek olan tümörlerde daha etkili olabileceği kanıtlanmıştır (O'Meara ve Tolaney, 2021). ÜNМК hücrelerinin, diğer meme kanseri türlerine göre daha fazla tümör mutasyon yükü bulundurması ve daha yüksek oranda PD-L1 ekspresyonuna sahip olması nedeniyle immünoterapiye daha iyi yanıt verdiği ve progresyonsuz sağkalım süresinin uzadığı yapılan klinik çalışmalarla da gösterilmiştir (Schmid vd., 2020; Loibl vd., 2019).

#### **2.4.1. PD-L1 inhibitörü Atezolizumab**

Bu amaçla kullanılan ICi atezolizumab, tümör hücrelerinde ve tümör infiltre edici immün hücrelerde eksprese edilen PD-L1'e bağlanarak, hem PD-1 hem de CD80 reseptörleri ile etkileşimlerini bloke eden bir monoklonal antikordur. PD-1'in inhibisyonu sonucunda T hücre aktivasyonunu yeniden sağlanarak kanser hücrelerinin immun gözetimden kaçmalarının önlenmesine ve antitümör immun yanıtların indüklenmesine neden olmaktadır.

#### **2.5. Histon Modifikasyonu**

DNA organizasyonunda yer alan H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinleri her bir histonun iki kopyasından oluşarak histon oktamelerini oluşturmaktadır. Histonların asetilasyonu, DNA'nın açılıp transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlayan epigenetik modifikasyonlardan olup geri dönüşümlü bir dinamik süreçtir. Gen transkripsiyonunu aktive eden histon asetiltransferazlar (HAT'ler) ve inhibe eden histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından katalize edilmektedir. HDAC'lerin aşırı ekspresyonu ve HAT'lerin ekspresyonlarının azalması bu dengenin bozulmasına yol açar. Kromatin yapısında ve gen transkripsiyonundaki anormallikler tümör oluşumuna neden olabilmektedir (Orr ve Hamilton, 2007). Bu nedenle özellikle HDAC 8 inhibisyonunun ÜNMK tedavisi için etkili bir yöntem olabileceği düşünülebilir.

##### **2.5.1. Histon Deasetilazlar (HDAC)**

Histonların deasetillenmesi, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesini sağlayarak gen transkripsiyonunu baskılamasının yanı sıra oksidatif stres mekanizması ve/veya oksidatif hasarın onarılmasına yardımcı olan proteinlerin ekspresyonlarının azalması sonucu DNA hasarını indüklemekte, epitelyal mezenkimal geçişi düzenlemekte ve proapoptotik genlerin ekspresyon artışı, anti-apoptotik genlerin ekspresyon azalışı ile intrinsik ve ekstrinsik apoptoz mekanizmalarını etkilemektedir (Fedele vd., 2017). Ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörünün (VEGFR) ekspresyonunu azalttığı ve endotel hücrelerin proliferasyonunu, invazyonunu, migrasyonunu ve adezyonunu engellemektedir (Deroanne vd., 2002). HDAC inhibitörleri normal, kanserli olmayan sağlıklı hücrelerde düşük toksisiteye sahiptir (Blattman vd., 2010; Konsoula vd., 2011). HDAC inhibitörlerinin monoterapi olarak kullanımı klinik

öncesi çalışmalarda etkili bulunmuşken, klinik çalışmalarda sınırlı başarı sağlamıştır. Bununla birlikte, farklı antikarsinojenik ajanlar ile birlikte kombine tedavileri, hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda tümör hücrelerinin kullanılan ilaçlara karşı duyarlılığını arttırarak, diğer bir deyişle tümör hücrelerini tedaviye duyarlı hale getirerek sinerjistik etki göstermiştir (Hontecillas-Prieto, 2020).

### **2.5.2. Histon Deasetilaz (HDAC) İnhibitörleri**

HDAC inhibitörleri, kombine antikanser tedavileri için umut verici adaylar olarak kabul edilmektedirler. HDAC inhibitörleri, çok farklı kanser hücrelerine uygulandığında hücre döngüsü durmasına, erken hücre yaşlanmasına ve apoptoza neden olarak antiproliferatif etki gösteren, epigenetik düzenlemede önemli roller oynayan kanser önleyici ajanlardır (Kim ve Bae, 2011). Antiproliferatif etkileri dışında, HDAC inhibitörleri DNA hasar yanıtını değiştirerek kanser hücrelerini genotoksik tedaviye duyarlı hale getirebilir (Konsoula vd., 2011; Thurn vd., 2013; Wu vd., 2017). Aynı zamanda, HDAC inhibitörleri normal insan akciğer fibroblastlarına uygulandığında sağlıklı hücreleri radyoterapiye duyarlı hale getirmezler, bu durum kanser hücrelerine karşı seçici olduklarını düşündürmektedir (Munshi vd., 2005). HDAC inhibitörü OBP-801 ile antimikrotübül ajanı eribulin kombinasyonunun, apoptozis inhibitör proteinlerinden Survivin'in yanı sıra anti-apoptotik protein olan Bcl-XL'nin ve MAPK yolunun baskılanmasıyla ÜNMK hücrelerinin inhibisyonu üzerinde sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir (Ono vd., 2018). HDAC inhibisyonu ile ekstrinsik apoptotik yolda hücre yüzeyindeki Tümör Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkili Apoptozu İndükleyen Ligand (TRAIL) ve ilgili reseptörler aktive edilerek ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna neden olmakta ve kaspaz 8 aktivasyonuna sonucunda apoptoz gerçekleşmektedir. Hücrel FLICE (FADD benzeri IL-1 $\beta$  dönüştürücü enzim) inhibitör protein (c-flip) ise DISC'in önemli bir bileşenidir (Huang vd., 2018). c-flip, FADD ve TRAIL reseptörü'ne liganda bağımlı ve bağımsız bir şekilde bağlanarak apoptoz önleyici kompleksi (AIC) oluşturur. Bu etkileşim sonucunda DISC oluşumunu ve kaspaz kaskadı aktivasyonunu önleyerek apoptozisin inhibisyonuna neden olur. c-flip'in, Akt, ERK ve NF-kB gibi sitoprotektif ve hücrenin sağ kalım yollarında görevli sinyal proteinlerini aktive ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, malign hücrelerde kemoterapi ajanları tarafından tetiklenen apoptozun da baskılanmasını sağlayarak kemorezistansa neden olmaktadır (Safa,

2012). c-flip, çeşitli kanserlerde kemoterapötik ilaç direncinde majör rol oynadığından tümörijenite ve kötü prognoza katkıda bulunduğu, yüksek düzeyde c-flip ekspresyonunun agresif tümörlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, aşırı c-flip ekspresyonunun,  $\beta$ -katenin'in proteozomal bozunmasını inhibe etmesi sonucu yükselen  $\beta$ -katenin seviyelerinin, Wnt sinyalini ile siklin D ekspresyonunu indüklediği, kanser hücrelerinin proliferasyonuna ve hücre döngüsünün devam etmesine neden olduğu gösterilmiştir (Naito vd., 2004). c-flip, kaspaz-8 ile yapısal benzerliğe sahiptir. Bu nedenle, c-flip'in inhibisyonu ile kaspaz-8 de inhibe olmakta, böylece apoptozun indüklenmesi engellenmektedir. Bu nedenle apoptozun indüklenmesi için c-flip'in selektif olarak inhibe edilmesi gerekmektedir (Vishehsaraei vd., 2010). c-flip'in selektif olarak inhibe edilerek ilaç direncinin üstesinden gelinmesi ve kötü prognozun iyileştirilmesine katkı sağlayarak tedavide etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

HDAC inhibitörlerinin kanser gelişiminde rol oynayan DNA hasar ve onarımda görevli proteinlerin anlatımını oksidatif stres ile indüklenen yollarla zayıflatarak DNA hasar cevabını düzenlediği bildirilmiştir (Munshi vd., 2005; Lee vd., 2010). Bununla birlikte, bu mekanizmaların moleküler temelini ve kanser hücrelerinin HDAC inhibitörleri ile indüklenen duyarlılık mekanizmasında rol oynayan hedeflerin yanı sıra kanserli olmayan hücreler üzerindeki potansiyel koruyucu etkilerini aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **2.5.2.1. Droxinostat**

Droxinostat (4-(4-chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide), selektif bir HDAC 3,6 ve 8 inhibitörüdür (Liu vd., 2016). c-flip ekspresyonunu selektif olarak baskılayarak prostat kanseri PPC-1 hücrelerini FAS ve TRAIL reseptörlerine duyarlı hale getirerek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Schimmer vd. 2006). Ayrıca anti-apoptotik gen olan Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken, Bax gibi proapoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak apoptozun indüklenmesini sağlamaktadır (Huang vd., 2018). Droxinostat'ın hücresel strese yol açarak radikal oksijen türlerinin (ROS) fazla üretilmesine yol açtığı ve böylece hücre ölümünün indüklenmesini sağladığı (Schimmer vd. 2006), MCF-7 meme kanseri hücrelerinde c-flip mRNA ve protein düzeylerini inhibe ettiği ve DNA onarımı, genomik stabilite ve apoptozda rol oynayan

PARP degradasyonuna neden olduğu, hücre sağ kalımını azalttığı ve apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Vishehsaraei vd., 2010).

HDAC 8, ÜNМК hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. ÜNМК’de tümör boyutu, lenfatik invazyon, tümör derecesi ve perinöral invazyon ile HDAC 8 aşırı ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olması nedeniyle, HDAC 8 ekspresyonunun ÜNМК tanısında potansiyel bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Menbari vd., 2020). HDAC 1, 6 ve 8, meme kanseri hücrelerinin invazyonu ve progresyonunda rol oynamaktadır (Park vd., 2011). Bu nedenle HDAC 3, 6, 8 ve c-flip inhibitörü droxinostat’ın ÜNМК tedavisinde etkili bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

Meme kanserinde tümör proliferasyon belirteci olarak kullanılan, tedavi seçimine karar vermede ve hastalığın ilerlemesinde öngörü sağlayan Ki-67 proteini, hücrelerin proliferasyonu sırasında eksprese olan bir nüklear proteindir. Ki-67, hücre döngüsünün S, G1, G2 ve M evrelerinde eksprese olup, G<sub>0</sub> evresinde olmamaktadır. Ki-67 ekspresyonunun yüksek olduğu tümörlerde hücrelerin daha fazla proliferasyon olduğu ve bu nedenle hastalığın prognozunu daha kötü seyretnesine neden olduğu düşünülmektedir (Inwald vd., 2013; Kim vd., 2014). Bu nedenle araştırılacak etken maddelerin, ÜNМК hücre hatlarının proliferasyonunu ne derecede etkilediğini analiz etmek amacıyla Ki-67 proliferasyon indeks biyogöstergesinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

ÜNМК gibi immunojenitesi zayıf olan tümörlerde, immunosupresif tümör mikro çevresi nedeniyle ICi monoterapisinde antitümör tepkiler sınırlıdır. ICi’lerin duyarlılığını artırmak ve bağışıklık hücrelerini aktive etmek için kombinasyon tedavilerinin etkili olabileceği düşünülmektedir (Zhang vd., 2021). Ayrıca, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC) tümör mikro çevresinde immun kaçışı etkileyen diğer faktörler olmakla birlikte metastatik yayılmayı ve immunoterapilere direnci artırmaktadır. HDAC inhibisyonunun, MDSC’lerin tümör dokusuna geçişini azalmasına, tümörle ilişkili makrofajların anti-tümör fenotipinin belirlenmesine ve tümör mikroçevresinde bulunan T hücrelerinin aktivasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2021).

Epigenetik düzenlenme yoluyla T hücresi aktivasyonu, farklılaşması, efektör işlevi ve tükenmesi sırasında da HDAC'lerin rolü bulunmaktadır. Antijen sunumunun ve MHC-I ekspresyonunun azalması, ICI tedavisine direnç gelişmesine katkı sağlamaktadır. HDAC inhibisyonunun, MHC-I ekspresyonunu ve antijen sunumunu artırması ile anti-tümör immun cevabın güçlenmesine yardımcı olmakta ve ICI tedavisine karşı gelişebilecek direncin üstesinden gelinmesine katkı sağlamaktadır (Borcoman vd., 2022).

ICI tedavisine yanıtı artırmak için HDAC inhibitörü olarak Vorinostat'ın kullanıldığı bir çalışmada, Vorinostat'ın ÜNМК hücre hattı olan MDA-MB-231'de ve 4T1 ile oluşturulan fare meme kanseri modelinde PD-L1 protein ve mRNA ekspresyon düzeyini artırdığı, ICI'leri ile kombine edildiğinde ise tümör büyümesinin azaldığı bildirilmiştir (Terranova-Barberio vd., 2017).

Anaplastik tiroid kanser hücrelerinde, HDAC inhibitörlerinden SAHA veya Valproik asit ile hücre döngüsü arrestinin ve PD-L1 ekspresyonunu indüklediği, ayrıca paklitaksel-sisplatin ajanlarıyla kombine edildiğinde de PD-L1 ekspresyonunu artırdığı, bu nedenle HDAC inhibisyonunun tek başına veya standart kemoterapilerle kombine olarak kullanıldığında immunoterapinin başarısına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Hegedüs vd., 2020).

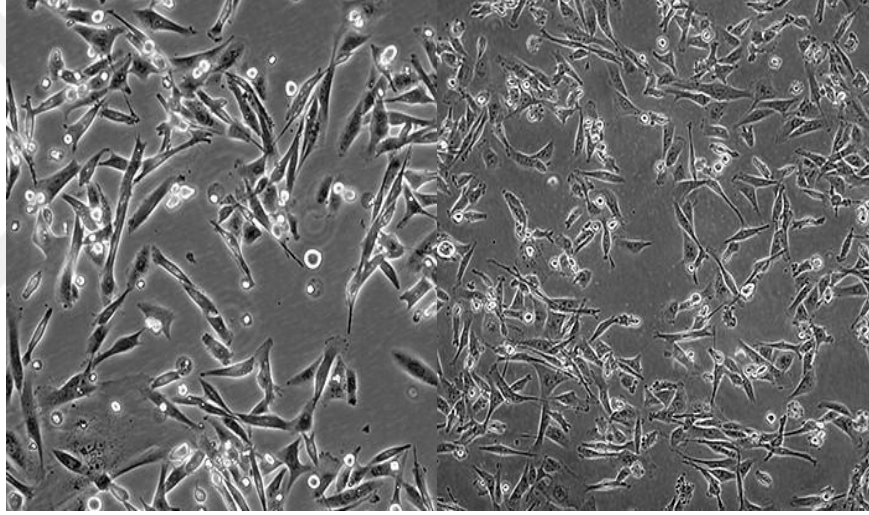
Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda kullanacağımız droxinostat'ın, meme kanserinde yüksek oranda eksprese edilen HDAC 6 ve 8'in selektif inhibitörü olması, apoptozu indükleyen mekanizmalarda rol oynaması ve immunomodülatör etkileri nedeni ile tek başına veya kemoterapötik ajan nab-paklitaksel ve ICI atezolizumab ile kombinasyonunun hem kemosensitivitenin geri kazanılması hem de immun kontrol noktası inhibisyonuna karşı gelişebilecek direncin üstesinden gelinmesi için uygun bir tedavi seçeneği olabileceği, araştırma sonuçlarının literatüre önemli katkılar sağlayacağı ve ÜNМК tedavisinde, yeni bir tedavi stratejisinin oluşturulmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

## Gereç ve Yöntem

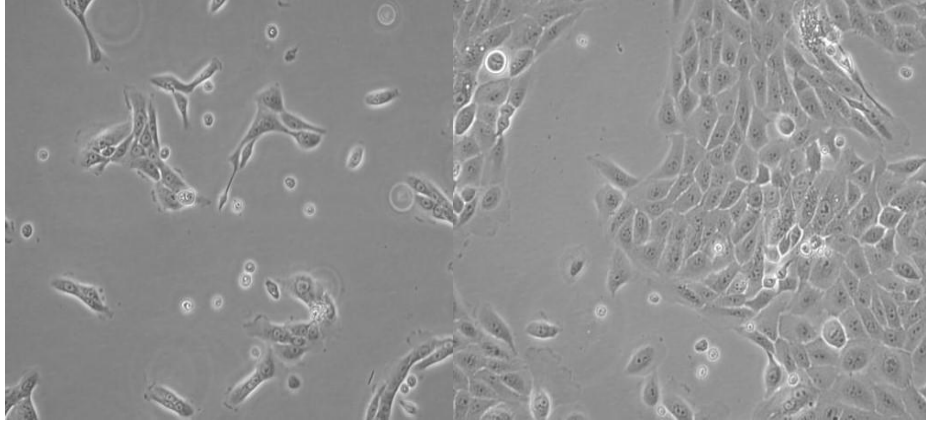
### 3.1. Hücre Hatlarının Kültürü

#### 3.1.1. Hücre Hatlarının Özellikleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan, üçlü negatif meme kanseri MDA-MB 231 hücreleri (ER-, PR-, HER2-) [ECACC Katalog no. 92020424] ve sağlıklı kontrol meme epitel MCF-10A hücreleri [ATCC Katalog no. CRL-10317], Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarından temin edilmiştir. Hücrelerin düşük ve yüksek yoğunluktaki inverted mikroskop görüntüleri Şekil 1 ve Şekil 2’de, özellikleri ise Tablo 1’de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** (A) MDA-MB-231 Hücrelerinin düşük ve (B) yüksek yoğunluktaki inverted mikroskop görüntüsü (ATCC, <https://www.atcc.org/>)



**Şekil 2.** (A) MCF-10A Hücrelerinin düşük ve (B) yüksek yoğunluktaki inverted mikroskop görüntüsü (ATCC, <https://www.atcc.org/>)

**Tablo 1:** Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri

| Hücre Hattı | Özellikleri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MCF-10A     | İnsan iyi huylu proliferatif meme dokusundan izole edilmiş, tümorijenik olmayan, östrojen reseptörünü eksprese etmeyen epitel hücre hattıdır. En sık kullanılan normal meme hücresi modelidir. Meme bezi gelişiminde hücre-hücre etkileşimlerini incelemek için kullanılabilecek uygun bir hücre hattıdır (Qu vd., 2015).                                        |
| MDA-MB-231  | İnvazif duktal karsinomalı bir hastanın plevral efüzyonundan izole edilen ve genellikle son dönem meme kanseri hayvan modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu hücre hattı ER, PR ve HER2, E-kaderin negatif ve mutant p53 eksprese eder. Bu nedenle üçlü negatif meme kanseri modeli oluşturmak için kullanılabilecek uygun bir hücre hattıdır (Conn, 2017). |

### 3.1.2. Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Takibi

*Hücrelerin, in vitro* ortamda optimal koşullarda büyümeleri ve çoğalmaları sağlanması amacıyla flask yüzeyine yapışma özelliğine sahip MDA-MB 231 hücre hattı için, %10 Fetal sıgır serumu (FBS), 2mM L-glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM ortamı, MCF-10A hücreleri için ise %5 at serumu, 10µg/mL insülin, 20ng/mL insan epidermal büyüme faktörü (hEGF), 0.5 µg/mL hidrokortizon ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM-F12 ortamı kullanıldı. MDA-MB 231 ve MCF-10A hücre hatları, filtreli kapaklı flasklara (25cm<sup>2</sup>'lik/75cm<sup>2</sup>'lik) ekilerek, 37<sup>0</sup> C'de %95 nem ve %5'lik CO<sub>2</sub> 'li etüvde inkübasyonu sağlandı. Hücreler, hem ışık hem de inverted mikroskop ile düzenli olarak takip edildi.

### 3.1.3. Hücre Canlılığının Takibi

Hücrelerin canlılık yüzdelerinin takibi ve deneyler için kullanılacak hücre sayısı, tripan mavisi boyası testi ile hesaplandı. Bu test için, 50uL hücre ve 50uL tripan mavisi boya karışımı Neubauer lamına (Şekil 3) aktarılarak, hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı. Ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğundan tripan mavisi boyasını hücre içine alıp mavi renkte görünürken; canlı hücreler boyanmayarak parlak beyaz göründü. Canlı hücre sayısı/mL hesabı, hücre sayımı ardından 2x10<sup>4</sup> dilüsyon faktörü (DF) ile çarpılarak hesaplandı. Yüzde canlılık; canlı hücre sayısı, toplam hücre sayısına oranlanarak belirlenerek sonraki analizlere canlılık yüzdesi en az %95 olan hücrelerle devam edildi.

$$\text{Canlı Hücre Sayısı} = \text{Sayılan Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon Oranı} \times \text{DF}$$

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Canlı Hücre sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$



**Şekil 3.** Neubauer Lamı

#### **3.1.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması**

Hücrelerin çoğalmaları düzenli aralıklarla kontrol edilerek %80 oranında çoğalan hücreler pasajlandı. Hücrelerin pasajlama işlemi aşağıda belirtilen sıraya göre gerçekleştirildi.

- Hücrelerin eski besiyeri dökülerek %0,05’lik tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra 3-4 dk etüvde bekletilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- İnkübasyon süresi sonundan flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin maruz kaldığı tripsinin etkisini inhibe edebilmek amacıyla eklenen tripsinin 2 katı serumlu ortam eklendi.
- Hücreler 15 ml lik falkona alınarak 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine serumlu ortam eklendi.
- Hücreler sayılarak uygun sayıda hücreler yeniden flaska ekildi ve 37<sup>0</sup> C’de %95 nem ve %5’lik CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübasyonu sağlandı.

#### **3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi ve Ekilmesi**

86<sup>0</sup>C’de saklanan kriyotüplerdeki dondurulmuş hücrelerin çözülmesi ve ekilmesi aşağıda belirtilen basamaklara göre gerçekleştirildi.

- Kriyotüp içerisinde bulunan dondurulmuş hücreler, hızlı bir şekilde besiyeri ile çözülerek 15 ml lik bir falkona alındı.
- 1200 rpm de 10 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atılarak pellet besiyeri ile yeniden süspanse edildi.
- Hücreler sayılarak kültür kabına ekildi ve 37<sup>0</sup> C’de %95 nem ve %5’lik CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübasyonu sağlandı.

### **3.1.6. Hücrelerin Kriyoprezervasyonu**

Kullanılmayan hücreler, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere -86<sup>0</sup>C’de donduruldu. Hücre dondurma (kriyoprezervasyon) işlemi aşağıda belirtilen basamaklara göre gerçekleştirildi.

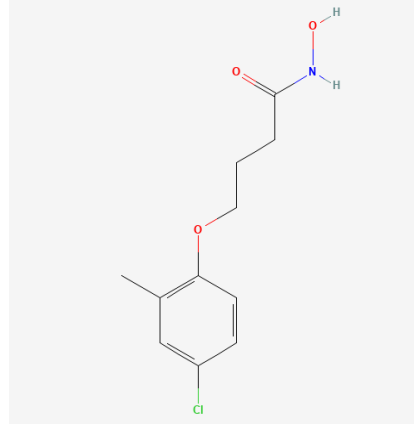
- Hücreleri eski besiyeri dökülerek %0,05’lik tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra 3-4 dk etüvde inkübe edilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin maruz kaldığı tripsinin etkisini inhibe edebilmek amacıyla eklenen tripsinin 2 katı serum içerek besiyeri eklendi.
- Hücreler 15 ml lik falkona alınarak 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
- Başka bir falkonda FBS dondurma vasatı hazırlandı. Dondurma vasatı; 1:9 oranında dimetil sülfoksit (DMSO): FBS olacak şekilde hazırlandı. Süpernatant atılarak hücreler, buz üzerinde dondurma vasatı ile muamele edildi ve her bir kriyotüpte 1000uL olacak şekilde eklenerek yeniden kullanılacağı zamana kadar -86<sup>0</sup>C’de saklandı.

## **3.2. Etken Maddelerin Hazırlanması**

Tez çalışmamızda HDAC inhibitörü Droxinostat, albumin bağlı Paklitaksel nanopartiküllerinden oluşan kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel ve PD-L1 inhibitörü Atezolizumab etken maddeleri kullanılmıştır.

### **3.2.1. Droxinostat Etken Maddesinin Hazırlanması**

HDAC inhibitörü Droxinostat (Selleckchem, Cat. No. S1422, Şekil 4) DMSO 1mg olarak tartılarak 20 uL DMSO ile çözülerek 800 uL besiyeri eklenerek 5mM lık ana stok hazırlandı. Çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlanarak 500uM-1uM doz aralığında hücrelere uygulandı. Etken maddenin toz hali +4<sup>0</sup>C’de saklanırken, sulandırılmış ana stok ve ara stoklar -20<sup>0</sup>C’de saklandı.

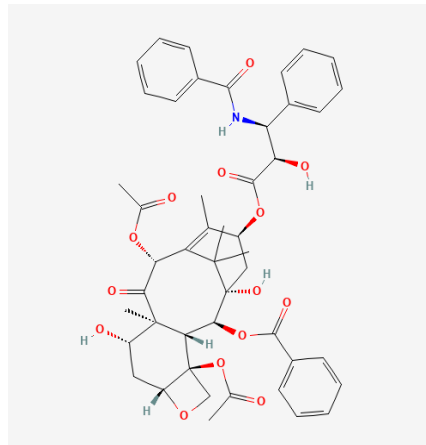


**Şekil 4.** Droxinostat moleküler yapısı,

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/568416>, erişim tarihi 11.06.2024)

### 3.2.2. Nab-paklitaksel Etken Maddesinin Hazırlanması

Albumin bağlı Paklitaksel nanopartiküllerinden oluşan kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel (Medchem, Cat No; HY-99974-294707, Şekil 5), 1 mg tartılarak 200 ul PBS ile çözüldü ve hücre besiyeri ile son molarite 1mM olacak şekilde ana stok taze olarak hazırlandı. 10uM-10nM doz aralığında ara stoklar hazırlanarak hücrelere uygulandı. Etken maddenin toz hali +4<sup>0</sup>C’de saklanırken, sulandırılan dozlar, ilacın stabilitesinin bozulması nedeniyle saklanmadı.



**Şekil 5.** Paklitaksel moleküler yapısı,

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36314#section=2D-Structure> , erişim tarihi 11.06.2024)

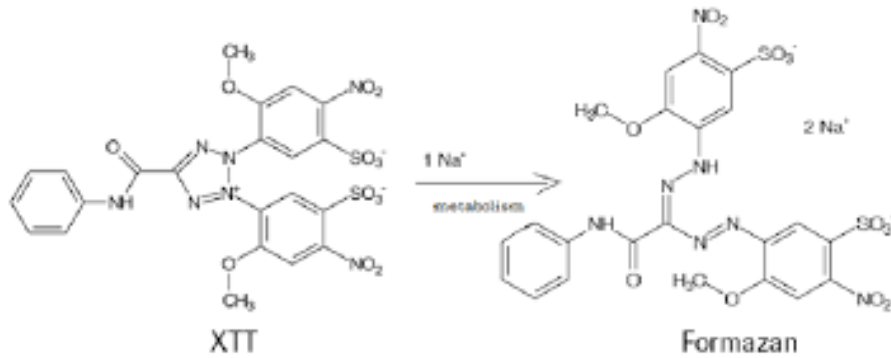
### 3.2.3. Atezolizumab Etken Maddesinin Hazırlanması

Anti-PD-L1 monoklonal antikoru Atezolizumab (Medchem, HY-P9904-79451) ise sıvı formda olduğundan doğrudan kullanıldı. 50,97 uM olan ana stoktan, 500-1nM doz aralığında ara stoklar hazırlanarak hücelere uygulandı. Atezolizumab ana stoğu -86°C’de, ara stoklar ise -20°C’de saklandı.

### 3.3. Hücre Proliferasyon Analizi ve Sitotoksisite Analizleri

#### 3.3.1. Hücre Proliferasyon Analizi

Hücre canlılığı ve sitotoksisite analizinde kullanılacak optimal hücre sayısının belirlenebilmesi amacıyla proliferasyon deneyleri gerçekleştirildi. Proliferasyon analizi için, XTT hücre proliferasyon kiti (Cell Proliferation Kit XTT, Biological industries, Cat# 20-300-1000) kullanıldı. Bu analiz yöntemi, canlı hücrelerden tetrazolyum tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-reaktif spektrofotometrik ve kolorimetrik bir test olan sitotoksisite analizinde tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenmekte ve formazona dönüşmektedir. Bu şekilde de canlı hücrelerde renk değişimi oluştururken, ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybettikleri için renk değişimi meydana gelmeyecektir. Böylece canlı hücre sayısının artması formazon boyasının miktarını da arttırmaktadır. Formazon boyasının ölçümü, spektrofotometrik olarak 450 nm absorbans ve 620 nm referans aralığında mikropılaka okuyucusunda değerlendirildi (Şekil 6, Kayabasi vd., 2022).



Şekil 6. XTT Çalışma Prensibi

96 saatlik olarak tasarlanan deney setlerinde, ilk kuyucukta 200 µl ortam içerisinde  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı. İlk kuyucuk haricindeki diğer tüm kuyulara 100 µl hücrelerin büyütüldüğü besiyeri ortamı eklenerek; ilk kuyucuktan başlayarak aşağıya doğru 100 µl seri dilüsyon şeklinde 6 tekrarlı olarak hücreler dağıtıldı. Madde uygulanmayan hücreler kontrol grubunu oluşturdu. 96. saatte analiz sonlandırılarak kuyucuklara, 50 µl XTT reaktifi eklenerek, saat başı okuma ile Multiskan FC (Thermo Scientific Multiskan FC instrument using “Scanning for multiscan F.C.2.5.1 software; Vantaa, Finland) mikropak okuyucusunda 450nm absorbans 620nm referans aralığında değerleri ölçülüp, kolorimetrik olarak ölçümler gerçekleştirilerek, her iki hücre hattı için optimal hücre sayısı belirlendi.

### **3.3.2. Hücre Sitotoksosite Analizleri**

Optimal hücre sayısı belirlendikten sonra, 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 100 uL hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler, adherent özellikte olduğundan, hücre ekimi akabinde hücreler plaka yüzeyine yapışması sağlandıktan sonra ertesi gün hücre yüzeyinden besiyeri çekilerek, taze besiyeri ile hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda etken maddeler total hacim 100 uL olacak şekilde 3 lü tekrar halinde hücrelere eklendi ve 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 50 uL XTT eklenerek, her bir kuyucuktaki renk değişimi, 450nm - 620nm referans aralığında absorbans değerleri kolorimetrik olarak ölçüldü. Hücrelerin %50 azalmasına neden olan inhibitör konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) dozu, CalcuSyn (Biosoft) yazılımında hesaplandı.

Kombinasyon analizleri için, hücreler 96-kuyucuklu plaklara 100 µl ortam içerisinde ekildi. Her bir hücre hattı için ayrı ayrı hesaplanan, Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat  $IC_{50}$  dozları referans olarak kullanılarak hücrelere ikili ve üçlü kombinasyon şeklinde uygulanarak, sabit bir kombinasyon oranı belirlenerek, 2 kat artan ve azalan dozlardaki ilaç kombinasyonları hücrelere 3 tekrarlı olacak şekilde uygulandı (Tablo 2). CalcuSyn (Biosoft) yazılımında, kombinasyonların sinerjistik, antogonistik veya additif etki gösterip göstermedikleri elde edilen kombinasyon indeksleri (CI) değerlerine göre analiz edilecektir (Tablo 3). Doz-etki eğrisi çizilerek, belirlendi (Chou, 2006). İkili kombinasyon analizi sonrasında sinerjistik etki

gösterdiği belirlenen ilaçların üçlü kombinasyon analizleri CalcuSyn (Biosoft) yazılımıyla üçlü matris yapılarak belirlendi (Ahmas vd., 2020). Madde uygulanmayan hücreler kontrol grubunu oluşturdu.

**Tablo 2.** Kombinasyon Çalışmaları İçin Doz Uygulama Planı

| NAB-PAKLİTAKSEL-<br>DROXİNOSTAT                                             | ATEZOLİZUMAB-<br>DROXİNOSTAT                                             | ATEZOLİZUMAB-<br>NAB-PAKLİTAKSEL                                                | ATEZOLİZUMAB- NAB-<br>PAKLİTAKSEL-<br>DROXİNOSTAT                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| x4 (Nab-paklitaksel IC <sub>50</sub> +<br>Droxinostat IC <sub>50</sub> )    | x4 (Atezolizumab IC <sub>50</sub><br>+ Droxinostat IC <sub>50</sub> )    | x4 (Atezolizumab<br>IC <sub>50</sub> + Nab-paklitaksel<br>IC <sub>50</sub> )    | (Atezolizumab IC <sub>50</sub> + Nab-<br>paklitaksel IC <sub>50</sub> ) + x4<br>Droxinostat IC <sub>50</sub>    |
| x2 (Nab-paklitaksel IC <sub>50</sub> +<br>Droxinostat IC <sub>50</sub> )    | x2 (Atezolizumab IC <sub>50</sub> +<br>Droxinostat IC <sub>50</sub> )    | x2 (Atezolizumab<br>IC <sub>50</sub> + Nab-paklitaksel<br>IC <sub>50</sub> )    | (Atezolizumab IC <sub>50</sub> + Nab-<br>paklitaksel IC <sub>50</sub> ) + x2<br>Droxinostat IC <sub>50</sub>    |
| <b>(Nab-paklitaksel IC<sub>50</sub>+<br/>Droxinostat IC<sub>50</sub>)</b>   | <b>(Atezolizumab IC<sub>50</sub>+<br/>Droxinostat IC<sub>50</sub>)</b>   | <b>(Atezolizumab IC<sub>50</sub>+<br/>Nab-paklitaksel IC<sub>50</sub>)</b>      | <b>(Atezolizumab IC<sub>50</sub> +<br/>Nab-paklitaksel IC<sub>50</sub>+<br/>Droxinostat IC<sub>50</sub>)</b>    |
| x0.5 (Nab-paklitaksel<br>IC <sub>50</sub> + Droxinostat IC <sub>50</sub> )  | x0.5 (Atezolizumab<br>IC <sub>50</sub> + Droxinostat IC <sub>50</sub> )  | x0.5 (Atezolizumab<br>IC <sub>50</sub> + Nab-paklitaksel<br>IC <sub>50</sub> )  | (Atezolizumab IC <sub>50</sub> + Nab-<br>paklitaksel IC <sub>50</sub> ) + x0.5<br>Droxinostat IC <sub>50</sub>  |
| x0.25 (Nab-paklitaksel<br>IC <sub>50</sub> + Droxinostat IC <sub>50</sub> ) | x0.25 (Atezolizumab<br>IC <sub>50</sub> + Droxinostat IC <sub>50</sub> ) | x0.25 (Atezolizumab<br>IC <sub>50</sub> + Nab-paklitaksel<br>IC <sub>50</sub> ) | (Atezolizumab IC <sub>50</sub> + Nab-<br>paklitaksel IC <sub>50</sub> ) + x0.25<br>Droxinostat IC <sub>50</sub> |
| Kontrol                                                                     | Kontrol                                                                  | Kontrol                                                                         | Kontrol                                                                                                         |

**Tablo 3.** Kombinasyon İndeksi (CI) ve Etki Tablosu

| CI         | ETKİ                     |
|------------|--------------------------|
| < 0.1      | Oldukça Güçlü Sinerjizm  |
| 0.11 – 0.3 | Güçlü Sinerjizm          |
| 0.31 – 0.7 | Sinerjizm                |
| 0.71 – 0.9 | İlımlı Sinerjizm         |
| 0.91 – 1.1 | Additif Etki             |
| 1.11- 1.45 | İlımlı Antagonizm        |
| 1.46 – 3,3 | Antagonizm               |
| >3,31      | Oldukça Güçlü Antagonizm |

### 3.4. Apoptoz Analizi

Droxinostat, Nab-paklitaksel, Atezolizumab tekli ve kombinasyon için belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine uygulanması sonrasında apoptotik durum, Annexin V yöntemi ile “*BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit*” (BD Biosciences, Cat#AB\_2869082) kullanılarak, BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (New York) akım sitometri cihazında değerlendirildi. Normal durumlarda hücre iç membranında bulunan fosfatidilserin membran lipidi, apoptoz durumunda hücre dışı membranına geçmektedir. Hücre dışı membranında fosfatidilserin varlığını belirlemek için FITC (floresan izotiyosiyanat) ile konjuge Annexin V, membran bütünlüğünü ölçmek için ise kırmızı renkli propidyum iyodür (PI) kullanıldı. Hem FITC-Anneksin V hem de PI negatif olan hücreler canlı, FITC-Anneksin V pozitifken PI negatif olan hücreler apoptoz sürecine girmiş ancak henüz membran bütünlüğü bozulmamış erken apoptotik, hem FITC-Anneksin V hem de PI pozitif olan hücreler apoptoz sürecine girmiş ve membran bütünlüğü bozulmuş geç apoptotik, FITC-Anneksin V negatif PI pozitif olan hücreler ise nekrotik olarak değerlendirildi (Tablo 4, Vermes vd., 1995). Apoptoz analizi, aşağıda basamaklar halinde belirtilen şekilde 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

**Tablo 4.** Apoptoz analizinde hücrelerin apoptotik durumları

| ANNEXIN V- FITC | PI      | Hücresel Durum  |
|-----------------|---------|-----------------|
| Negatif         | Negatif | Canlı           |
| Pozitif         | Negatif | Erken Apoptotik |
| Pozitif         | Pozitif | Geç Apoptotik   |
| Negatif         | Pozitif | Nekrotik        |

### 3.5. Hücre Döngüsü Tutulma Analizi

Droxinostat, Nab-paklitaksel, Atezolizumab tekli ve kombinasyon için belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine uygulanması sonrasında etken maddelerin hücre döngüsü üzerindeki etkisi BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (New York) akım sitometri cihazında değerlendirildi. Hücre döngüsü tutulması analizi için “BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit” (Becton Dickinson) kullanıldı. Bu yöntemde, sodyum sitrat, süktroz ve DMSO içeren tampon içine toplanan hücrelerin membran lipitleri non-iyonik deterjanı ile liziz edildi. Hücre iskeleti ve nuklear proteinler ise tripsin ile elimine edildi. Ribonükleaz A ile RNA sindirimi gerçekleştirilirken, sperminin ile ise kromatinlerin stabilizasyonu sağlanmıştır. İzole edilen DNA’ nın Propidyum iyodür (PI) boyası ile boyanması sonucunda 580 nm ve 650 nm arasındaki dalga boylarında floresan ışık yaymaktadır. Elde edilen floresans ışımları sayesinde; DNA miktarı belirlenmiştir (2n, 2-4n, 4n) ve böylece G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M ve S faz evrelerindeki hücre sayısı ve yüzdeleri tespit edilmiştir (Sabran vd., 2019).

### 3.6. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizleri

Tez çalışmamız kapsamında, Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat etken maddelerinin MDA-MB-231 ÜNMK hücreleri ve MCF-10A kontrol grubu sağlıklı hücrelerin migratif özellikleri üzerine etkilerini incelemek için yara iyileşme deneyi ve invazyon analizleri gerçekleştirildi.

### 3.6.1. Yara İyileşme Analizi

Yara iyileşme analizinde, tek bir hücre tabakasında bir "yara boşluğu" çizilmeyle oluşturuldu ve bu boşluğun hücre migrasyonu ve boşluk merkezine doğru büyümesiyle "iyileşmesi" izlendi. Hücrelerin hareketliliğini veya büyümesini değiştiren faktörler, aralığın "iyileşme" oranının artmasına veya azalmasına neden olmaktadır (Lampugnani vd., 1999). Bu amaçla, hücreler 6 kuyucuklu plakalara kendi ortamları ile ekildi ve plaka yüzeyinin tamamen tek sıra halinde hücrelerle kaplaması sağlandı. Plaka yüzeyine steril bir pipet ucuyla (200 µl), çizginin her yeri aynı mesafeye sahip olması amacıyla dik bir açıyla her kuyucuğu boydan boya bölecek şekilde bir çizgi çekildi. Kaldırılan hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuk besiyeri ile dikkatlice yıkandı. Daha sonra, çizilmiş plakaların 6 saat ara ile mikropkop görüntüsü alındı. Aralık mesafesi, ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) yazılımı kullanılarak kantitatif olarak değerlendirildi.

### 3.6.2. Hücre İnvazyon Testi

Kanser hücreleri, invazif özellik kazanarak bulundukları mikroçevreden başka dokulara göç edebilmektedir. Çalışmamızda, üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan hücre hattında Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat IC<sub>50</sub> dozunun kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri olan invazyon yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla *CytoSelect™ 24-Well Invasion Assay (Cell Biolabs, Inc, USA, # CBA110)* kiti kullanıldı (Xue vd., 2014). İnvazif özellikteki hücrelerin invazif olmayanlardan ayrılabilmesi amacıyla 8 µm lik gözenek boyutuna sahip bazal membran matriksi ile kaplı polikarbonat membran kullanılmıştır. İnvazif özellikteki hücreler bu membrandaki proteinlerin parçalanmasına ve böylece membrandan geçebilmelerine olanak sağlamaktadır. Membrandan geçen hücreler boyanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her deney grubu için  $2,5 \times 10^5$  hücre ekilip, Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat'ın IC<sub>50</sub> dozlarının uygulaması gerçekleştirildi. Etken madde uygulanmayan hücreler ise kontrol grubunu oluşturdu. Uygun inkübasyon süresi sonunda deney kit manüeline göre aşağıdaki işlem basamaklarına göre yürütülmüştür.

İşlem basamakları;

- 1- İnvazyon deneyine başlamadan önce 24 kuyucuklu migrasyon plaka'ı 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 2- Hücreler  $2,5 \times 10^5$  hücre serumsuz ortamda olacak şekilde süspanse olarak hazırlandı.
- 3- Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab'ın tekli, ikili ve üçlü kombinasyonları hazırlanan hücre süspansiyonuna eklendi.
- 4- Migrasyon plakasının alt kuyucuğuna 500  $\mu$ L %10 FBS içeren hücre ortamı eklendi.
- 5- Migrasyon plakasının her bir üst kuyucuğuna 300  $\mu$ L hazırlanan hücre süspansiyonu ilave edildi.
- 6- 48 saat boyunca inkübatörde bekletildi.
- 7- Üst kuyudan ortam dikkatlice çekildi.
- 8- Pamuk çubukların uçları suyla ıslatılarak temiz ve sert bir yüzeye bastırılarak düzleştirildi ve göç etmeyen hücreler dikkatlice temizlendi. Bu işlem yapılırken polikarbonat membrana hasar verilmemesi sağlandı.
- 9- Üst kuyu 400  $\mu$ L hücre boyama solüsyonu içeren temiz bir kuyucuğa aktarılarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 10- Üst kuyucuk dikkatlice beher içerisinde suda birkaç kez yıkandı ve kurumaya bırakıldı.
- 11- Migrasyona uğrayan hücreler ışık mikroskobu ile sayıldı.
- 12- Her bir üst kuyu boş bir kuyucuğa aktarıldı ve 200  $\mu$ L ekstraksiyon solüsyonu eklendi ve orbital karıştırıcıda 10 dk inkübe edildi.
- 13- Her bir örnekten 100  $\mu$ L 96 kuyucuklu plakaya eklenerek 560nm de absorbansı ölçüldü.

### **3.7. Ki-67 Proliferasyon İndeks Belirtecinin İmmunofloresan Boyama ile Ekspresyon Analizi**

Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat'ın ÜNKM hücreleri için belirlenen IC<sub>50</sub> tekli ve kombinasyon dozları uygulandıktan sonra toplanan tüm deney gruplarına ait hücreler, 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilen 15 mm'lik yuvarlak lamellere ekildi. Belirlenen ilaç dozları uygulandıktan sonra hücreler 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda örnekler öncelikle PBS içerisinde hazırlanmış %4'lük paraformaldehit

(PFA) ile +4 °C'de 15 dakika fikse edildi. Fiksasyondan sonra PFA ortamdan uzaklaştırılacak ve örnekler yıkama amacı ile 3 kez, x5 dakika PBS'te bekletildi. Hücrelerde permeabilizasyonu arttırmak amacı ile PBS içerisinde hazırlanmış %0.25'lik Triton-X solüsyonuna alınarak ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Permeabilizasyon işleminin ardından örnekler PBS ile yıkanıp bloklayıcı işlemi için PBS içerisinde hazırlanmış %5 Sığır Serum Albümini (BSA) solüsyonuna alınıp oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. BSA'nın ortamdan uzaklaştırılmasının ardından herhangi bir yıkama işlemi yapılmaksızın 1/100 oranında seyreltilmiş primer antikorlar (Recombinant Anti-Ki67 antibody [SP6] (ab16667) örnekler üzerine eklendi ve nemli ortamda +4°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası örnekler PBS ile 3 kez 5 dk yıkanarak karanlık bir ortamda 1/1000 oranında seyreltilmiş FITC bağlı sekonder antikor ile oda sıcaklığında 60 dk süre ile inkübe edildi. Son aşamada örnekler son kez PBS ile 3x5 dk yıkandıktan sonra nükleus boyaması için DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) kapama medyumunu ile kapatıldı (Acikgoz vd., 2015). Bu şekilde immünofloresan boyaması gerçekleştirilen örnekler Olympus CX31RTSF-5 marka immünofloresan mikroskop altında incelendi. Buna göre her bir deney seti için x3 biyolojik tekrarlı olacak şekilde yapılacak analizler sonrasında, proliferasyon belirteci Ki-67'nin protein seviyesindeki ekspresyonları belirlendi.

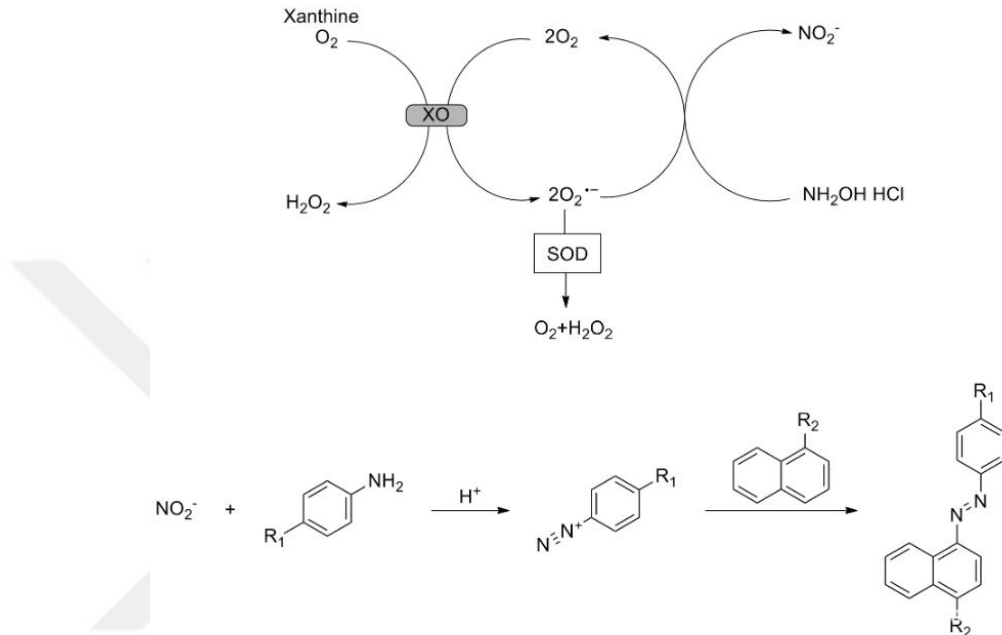
### **3.8 Oksidatif Stres Biyogöstergelerinin Değerlendirilmesi**

Droxinostat ve Nab-paklitaksel etken maddelerinin tekli ve ikili kombinasyon dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinde oksidatif stres parametrelerindeki değişimi değerlendirmek amacı ile Total-Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve İndirgenmiş Glutatyon (GSH) analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler, etken maddelerin IC<sub>50</sub> ve kombinasyon dozları ile 72 saat inkübe edilerek ileri analizler gerçekleştirildi.

#### **3.8.1. Total-Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi**

SOD analizi, WST-1 esasına dayanan kolorimetrik yöntemle göre gerçekleştirildi. Protokol, Ksantin Oksidaz (XO), WST-1'in O<sub>2</sub>•- süperoksit anyonları ile reaksiyona

girerek suda çözünür bir formazan boyası üretmesini katalize etmektedir. SOD ise süperoksit anyonlarının dismutasyonunu katalize etmekte ve bu nedenle reaksiyon SOD tarafından inhibe edilmektedir. Buna göre, SOD aktivitesi, formazan boyasının miktarı ile ters orantılıdır (Şekil 7).



Şekil 7. Süperoksit dismutaz (SOD) etki mekanizması

SOD analizi, *Total Superoxide Dismutase (T-SOD) Activity Assay Kit (WST-1 Method)* (Elabscience ®, #E-BC-K020-M) kiti manüeline uygun olarak aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi.

İşlem basamakları;

1- Protokol uygulamasına başlanmadan önce çalışma çözeltileri hazırlandı.

- Substrat uygulama çözeltisinin hazırlanması: Test öncesinde, test kuyularına göre yeterli miktarda substrat uygulama çözeltisi hazırlandı. Buna göre, 1005 µL substrat uygulama çözeltisi hazırlamak için 1000 µL tampon çözeltisi ile 5

$\mu$ L substrat çözeltisi iyice karıştırıldı. Substrat uygulama çözeltisi taze olarak hazırlandı.

- Enzim çalışma çözeltisinin hazırlanması: Test öncesinde, test kuyularına göre yeterli miktarda enzim çalışma çözeltisi hazırlandı. Buna göre, 220  $\mu$ L enzim çalışma çözeltisi hazırlamak için 20  $\mu$ L enzim stok çözeltisi ile 200  $\mu$ L enzim dilüentini iyice karıştırıldı. Bu işlem buz üzerinde gerçekleştirildi. Enzim çalışma çözeltisi taze olarak hazırlandı.

2- Her bir deney grubu için  $10^6$  hücre hücre toplanarak hücreler PBS (0.01 M, pH 7.4) ile 2 kez yıkandı. Hücreler 300 $\mu$ L PBS ile dilüe edilerek ultrasonik homojenizatörde 4°C'de homojenize edildi. Çözünmeyen materyalin uzaklaştırılması için 4°C'de 10000 $\times$ g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantı toplanarak ve analiz boyunca buz üzerinde tutuldu. Süpernatantın protein konsantrasyonu Bradford protein tayini yöntemine göre belirlendi.

3- Kontrol kuyusuna; 20  $\mu$ L bidistile su ve 20  $\mu$ L enzim çalışma çözeltisi, blank kuyusuna; 20  $\mu$ L bidistile su ve 20  $\mu$ L enzim dilüenti, örnek kuyusuna; 20  $\mu$ L örnek ve 20  $\mu$ L enzim çalışma çözeltisi eklendi.

4- Her bir kuyuya çok kanallı pipet kullanarak 200  $\mu$ L substrat uygulama çözeltisi eklenerek iyice karıştırılarak 37°C'de 20 dakika inkübe edildi.

5- Her bir kuyunun OD değerleri 450 nm'de mikropilaka okuyucusu ile ölçüldü.

6- Hücrelerin, SOD inhibisyon oranı ve SOD aktiviteleri hesaplandı (Şekil 8 ve Şekil 9).

Buna göre, bu reaksiyon sisteminde SOD inhibisyon oranı (i), %50'ye ulaştığında, buna karşılık gelen enzim seviyesi 1 SOD aktivite birimi (U) olarak kabul edilmektedir.

$$\text{Inhibition ratio} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100\%$$

**Şekil 8.** SOD inhibisyon oranının (i) hesaplanması (OD<sub>Control</sub>; Kontrol absorbansı, OD<sub>BlankControl</sub>; Blank absorbansı, OD<sub>Sample</sub>; Örnek absorbansı)

$$\text{T-SOD activity (U/mgprot)} = i \div 50\% \times \frac{V_1}{V_2} \times f \div C_{\text{pr}}$$

**Şekil 9.** Total SOD aktivitesinin hesaplanması (i; SOD inhibisyon oranı, V<sub>1</sub>; Toplam reaksiyon hacmi (240 µL), V<sub>2</sub>; Reaksiyona giren örnek hacmi (20 µL), f; dilüsyon faktörü, C<sub>pr</sub>; protein konsantrasyonu)

### 3.8.2. Katalaz (CAT) Analizi

Peroksizomlarda bulunan katalaz enzimi (CAT), metabolik süreçler sonucu oluşan ve hücrelere zarar veren reaktif bir oksijen türü olan hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) parçalayarak su ve oksijene dönüştürme yeteneğine sahip olan antioksidan bir enzimdir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amonyum molibdat ile reaksiyona girerek sarımsı bir kompleks oluşturur ve katalazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i parçalaması durdurulur. Böylece oluşan sarı kompleksin 405 nm'deki absorbansına göre CAT miktarı hesaplanabilir. Çalışmamızda katalaz enziminin analizi *Catalase (CAT) Activity Assay Kit (Elabscience ®, # E-BC-K031-M)* maneline uygun olarak aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi.

İşlem Basamakları;

- 1- Tampon çözeltisi ve substrat kullanımdan önce 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 2- Kromojenik uygulama çözeltisinin hazırlanması: Bir vial kromojenik ajanı 24 mL çift distile su ile çözüldü.
- 3- Berraklaştırıcı çözelti kullanmadan önce 37°C su banyosunda berrak olana kadar ısıtıldı.

4- Standart Çözeltilerin Hazırlanması: 9.6 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart çözeltisinden 40 µL ile 344 µL bidistile su alınarak 1 mmol/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart çözeltisinin hazırlandı. 1 mmol/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart çözeltisini bidistile su dilüenti ile seyreltme gradyanı 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100 µmol/mL olacak şekilde dilüe edildi.

5- Her bir deney grubu için 10<sup>6</sup> hücre toplanarak PBS (0.01 M, pH 7.4) ile yıkandı.

6- Hücreler 300 µL PBS ile dilüe edilerek 4°C'de ultrasonik hücre parçalayıcı kullanarak homojenize edildi.

7- Hücreler 4°C'de 10000×g'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant toplandı ve deney süresinde buz üzerinde tutuldu.

8- Süpernatantın protein konsantrasyonu Bradford protein tayini yöntemine göre belirlendi.

9- Standart eğrisi için işlem adımları:

- Farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart çözeltisinden 20 µL eklenerek, her biri için ayrı 1.5 mL ependorf tüplere alındı.
- Sırasıyla, 200 µL tampon çözeltisi, 20 µL bidistile su, 200 µL kromojenik ajan uygulama çözeltisi ve 20 µL berraklaştırıcı eklenerek iyice karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek ve 200 µL reaksiyon çözeltisini mikropalakaya alınarak 405 nm'de OD değerini ölçüldü.

10- Örnekler için işlem adımları:

- Kontrol tüpüne; 200 µL tampon çözeltisi, örnek tüpüne ise, 20 µL örnek ve 200 µL tampon çözeltisi eklendi ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her bir tüpe 20 µL substrat eklenerek iyice karıştırıldı ve 37°C'de 1 dakika boyunca reaksiyona girmesi sağlandı.
- Reaksiyon sonunda kontrol tüpüne; 200 µL kromojenik uygulama çözeltisi, 20 µL berraklaştırıcı ve 20 µL örnek, örnek tüpüne ise 200 µL kromojenik uygulama çözeltisi ve 20 µL berraklaştırıcı eklenerek iyice karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 200 µL reaksiyon çözeltisini mikropalakaya alındı.

11- Mikroplaka okuyucusunda 405 nm'de OD değeri ölçüldü.

12- Ölçülen OD değerlerine göre standart eğri grafiği ve standart eğriye ait doğru denklemi  $y=ax+b$  olarak hesaplandı.

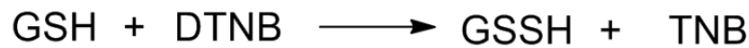
13- 37 °C'de 1 dk içinde 1µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi parçalayan 1 mg protein içerisindeki CAT miktarı 1 birim olarak tanımlanmaktadır. Buna göre, hücrelerin CAT aktiviteleri hesaplandı (Şekil 10).

$$\text{CAT activity (U/mgprot)} = \frac{\Delta A}{a} \times \frac{0.02^*}{1^* \times V} \times f \div C_{pr}$$

**Şekil 10.** CAT aktivitesinin hesaplanması ( $\Delta A$ ; OD<sub>Kontrol</sub>-OD<sub>Örnek</sub>, a; standart doğru denkleminin eğimi, 0,02; standartların hacmi (mL), V; test öncesinde örneklerin hacmi, f; dilüsyon faktörü, C<sub>pr</sub>; protein konsantrasyonu (mgprot/mL))

### 3.8.3. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi

İndirgenmiş Glutasyon (GSH), Dinitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek 405 nm'de kolorimetrik analizle tespit edilebilen sarı bir kompleks oluşturur ve indirgenmiş GSH içeriği dolaylı olarak hesaplanabilmektedir (Şekil 11). İndirgenmiş Glutasyon (GSH) analizi, Reduced Glutathione (GSH) Colorimetric Assay Kit (*Elabscience* ®, # *E-BC-K030-M*) manüeline uygun olarak aşağıdaki basamaklara göre işlemler gerçekleştirildi.



**Şekil 11.** İndirgenmiş glutasyon etki mekanizması

İşlem basamakları;

- 1- Tüm reaktifleri kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- 2- GSH standart diluentinin hazırlanması: 1.3 mL GSH standart stok diluentini 11.7 mL biistile su ile seyreltilti. GSH standart diluenti taze olarak hazırlandı.
- 3- 1 mmol/L GSH standart çözeltisinin hazırlanması: 3.07 mg GSH standardını 10 mL GSH standart diluenti ile çözüldü. 1 mmol/L GSH standart çözeltisi taze hazırlandı. 1 mmol/L GSH standart çözeltisini GSH standart diluenti ile 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100  $\mu\text{mol/L}$  seri konsantrasyonlara kadar seyreltilti.
- 4- Her bir test için  $1 \times 10^6$  hücre toplanarak PBS (0.01 M, pH 7.4) ile yıkandı.
- 5-  $1 \times 10^6$  hücre 250  $\mu\text{L}$  soğuk PBS ile süspanse edilerek 4°C'de ultrasonik hücre parçalayıcı kullanarak homojenize edildi.
- 6- 1500 $\times$ g'de 10 dakika santrifüj yapılarak süpernatantı toplandı ve deney süresinde örnekler buz üzerinde tutuldu.
- 7- Süpernatantın protein konsantrasyonu Bradford protein tayin yöntemine göre belirlendi.
- 8- Örnek süpernatantının hazırlanması: 0.1 mL örnek, 0.1 mL asit reaktifi alınarak iyice karıştırıldı ve 4500 $\times$ g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplandı.
- 9- Kontrol, standart ve örnek kuyuları belirlenerek her bir kuyuya 25  $\mu\text{L}$  DTNB çözeltisi eklendi.
- 10- Kontrol kuyusuna 100  $\mu\text{L}$  asit reaktifi, standart kuyusuna farklı konsantrasyonlarda 100  $\mu\text{L}$  standart çözeltisi ve örnek kuyusuna ise 100  $\mu\text{L}$  süpernatant eklendi.
- 11- Her kuyuya 100  $\mu\text{L}$  fosfat çözeltisi eklendi.
- 12- 1 dakika boyunca iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- 13- Mikroplaka okuyucusu ile her kuyunun OD değerlerini 405 nm'de ölçüldü.
- 14- Ölçülen OD değerlerine göre standart eğri grafiği ve standart eğriye ait doğru denklemi  $y=ax+b$  olarak hesaplandı.
- 15- Hücrelerdeki GSH oranı hesaplandı (Şekil 12).

$$\text{GSH content } (\mu\text{mol/gprot}) = (\Delta A_{405} - b) \div a \times 2^* \times f \div C_{pr}$$

**Şekil 12.** GSH içeriğinin hesaplanması ( $\Delta A_{405}$ ;  $OD_{\text{Örnek}} - OD_{\text{Kontrol}}$ , b; standart doğru denkleminde ait parametre, a; standart doğru denkleminin eğimi,  $2^*$ ; dilüsyon faktörü, f; Test öncesindeki dilüsyon faktörü,  $C_{pr}$ ; protein konsantrasyonu (gprot/L))

### 3.9. Bradford Protein Tayin Yöntemi

- Hücrelerin protein miktarlarının hesaplanmasında Bradford protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Bu yönteme göre, protein miktarı tayini yapılacak örnekler bidistile su ile 1:200 oranında dilüe edildi.
- Bradford protein standardı olarak, 2mg/ml bovine serum albüminin (BSA) ana stok kullanılarak, bidistile su ile seri dilüsyonlar şeklinde dilüe edildi (Tablo 5). Her bir kuyucuğa 50  $\mu\text{L}$  standart veya 50  $\mu\text{L}$  protein örnekleri eklendikten sonra Bradford reaktifi eklenerek 5 dk çalkalayıcıda ışıktan korunarak bekletildi.
- 595nm’de absorbansı okutularak elde edilen absorbans değerlerine göre standart eğri çizilerek protein konsantrasyonu hesaplandı.

**Tablo 5.** Bradford standartlarının dilüsyon tablosu

| <b>BSA Standart Stok Solüsyon Konsantrasyonu (mg/ml)</b> | <b>Alınacak Miktar</b> | <b>dH<sub>2</sub>O (µL)</b> | <b>Standart Son Konsantrasyon (µg/ml)</b> |
|----------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| 2                                                        | 4                      | 316                         | 25                                        |
| 2                                                        | 4                      | 396                         | 20                                        |
| 1.5                                                      | 4                      | 396                         | 15                                        |
| 1                                                        | 4                      | 396                         | 10                                        |
| 0.5                                                      | 4                      | 396                         | 5                                         |
| 0.25                                                     | 4                      | 396                         | 2.5                                       |
| 0.125                                                    | 4                      | 396                         | 1.25                                      |

### 3.10. Gen Ekspresyon Analizleri

#### 3.10.1. RNA İzolasyonu

Bu amaçla hücrelerden *Nucleospin RNA Blood 50 Prep (Macherey Nagel # 740200.50)* kiti ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kit manüeline göre, izolasyon işlemi aşağıda belirtilen basamaklara göre gerçekleştirildi.

İşlem basamakları;

1- Hücre pelleti 2 ml lik toplama tüpüne alınıp üzerine 200 µL Lizis Buffer DL eklendi.

2- Kısa bir spin yapıldıktan sonra 5 µL Liquid Proteinase K eklendikten sonra 3-15 dk oda sıcaklığında (18-25 C) inkübasyona bırakıldı.

3- İnkübasyon süresinde tüpler 1400 rpm’de shakerda tutuldu ve sonrasında 2000g’de 1sn çok kısa santrifüj yapıldı.

4- 200 µL %70 etanol eklenerek ve iyice karıştırıldı ve 2000g 1sn santrifüj edildi.

5- Tüm lizatu NucleoSpin RNA Blood Column kolonuna aktarılaraq 11000g 30sn santrifüj edildi.

6- Kolona 350µL MDB eklenerek 11000g 30sn santrifüj edildi.

7- Kolona 95 µL rDNAaz eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi

- 1. yıkama basamağında, kolona 200 µL Buffer RB2 eklendi ve 11000g 30 sn santrifüj edildi. toplama tüpü atılıp ve kolonu yeni bir toplama tüpüne (2ml kapaksız) yerleştirildi.
- 2. yıkama basamağında kolona 600 µL Buffer RB3 eklenerek 11000g 30 sn santrifüj edildi. toplama tüp at ve kolonu yeni bir toplama tüpüne (2ml kapaksız) yerleştirildi.
- 3. yıkama basamağında ise kolona 250 µL Buffer RB3 eklenerek 11000g 2dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü atılarak ve kolon yeni bir 1,5ml lik (nuclease free) toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolona 60 µL RNase free su ekle, 11000g 30 sn santrifüj yapıldı ve böylece toplama tüpte RNA elde edildi.

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260/280nm ve 230/260nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesi ile belirlendi. Her bir örnekten 1-1,5 µL kullanılarak Nanodrop cihazında (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer; Thermo Scientific™, Catalog number: ND- 2000) ölçüldü.

### 3.10.2. cDNA sentezi

Total RNA' lardan cDNA sentezi, konvansiyonel bir PCR cihazında “*OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit*” (Abm, Cat# G236) manueline göre gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA' lar PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılarak, PCR sonucunda elde edilen ifadeler birbirleriyle karşılaştırıldı.

Kit protokolüne göre;

- Kit içerisinde bulunan bileşenler, Tablo 6'da belirtilen oranlarda bir mikro tüp içerisinde iyice karışması ve hava kabarcıklarının önlenmesi amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tablo 7'de belirtilen termal döngü profiline uygun olarak Thermal Cycler (Thermo) cihazı ile kalıp RNA dan cDNA çevrimi gerçekleştirildi.

**Tablo 6.** cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

| İçerik                             | Miktar |
|------------------------------------|--------|
| 10X Reaksiyon Buffer               | 2 µl   |
| Random hexamer (50 µM)             | 2 µl   |
| dNTP (her birinden 2,5 mM)         | 1 µl   |
| Reverse Transkriptaz (200 U/µl)    | 1 µl   |
| RNaz İnhibitörü                    | 0,5 µl |
| Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O | 3,5 µl |
| Kalıp RNA                          | 10 µl  |
| Toplam Hacim                       | 20 µl  |

**Tablo 7.** cDNA termal döngü profili

| İşlem Basamağı                            | Termal Profil |
|-------------------------------------------|---------------|
| Priming                                   | 10 dk- 25°C   |
| Reverse Transkripsiyon (RT) Aktivasyonu   | 120 dk- 37°C  |
| Reverse Transkripsiyon (RT) İnaktivasyonu | 5 dk-85°C     |
| Soğuma                                    | ∞ – 4°C       |

### 3.10.3. RT-qPCR ile Hedef Genlerin Analizi

Onkogenik yollarlarda rol alan 26 adet gene ait transkriptlerinin mRNA seviyesindeki ekspresyon kantitasyonları gerçek zamanlı PCR cihazı *LightCycler 480 (Roche, Germany)* de uygun termal profile, “Blastaq 2X qPCR MasterMix (*ABM Catalog #G891*) Sybr Green kullanılarak gerçekleştirildi. Gen ekspresyon analizi 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılıp, istatistiksel analizler Student T testi ile gerçekleştirildi. Hedef gen mRNA seviyesindeki ekspresyon profili, her bir kuyucuk için eşik döngüsü (CT) değeri, *LightCycler 480 Quantification software* (kantifikasyon yazılımı) kullanılarak hesaplandıktan sonra, verilerin analizi “SABiosciences PCR Array Data Analysis” sistemine girilerek  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu gereğince hesaplandı. cDNA, primerler ve Blastaq Mastermix ile her gen için Tablo 8’de verilen reaksiyon karışımı hazırlanarak Tablo 9’de belirtilen termal profile göre *Lightcycler 480* cihazında q-RT-PCR analizi gerçekleştirildi. Analizi yapılan genler Tablo 10’da, primer dizileri ise Tablo 11’de belirtilmiştir.

**Tablo 8.** qRT-PCR analizlerinde hazırlanan reaksiyon karışımı

| İçerik                             | Miktar   |
|------------------------------------|----------|
| Mastermix                          | 10 µl    |
| cDNA                               | 100 ng   |
| Forward Primer                     | 1 µl     |
| Reverse Primer                     | 1 µl     |
| Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O | Değişken |
| Toplam Hacim                       | 20 µl    |

**Tablo 9.** qRT-PCR analizi termal döngü profili

| İşlem Basamağı    | Termal Profil | Döngü Sayısı |
|-------------------|---------------|--------------|
| Enzim Aktivasyonu | 3 dk- 95°C    | 1            |
| Denatürasyon      | 15 sn.- 95°C  | 40           |
| Bağlanma/Uzama    | 1 dk- 60 °C   |              |
| Erime Eğrisi      | 72 – 95 °C    |              |

**Tablo 10.** Analizi yapılan hedef genler

| Fonksiyon                           | Genler                            |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Apoptoz ile ilişkili                | BCL-2, BAX, CASP3, CASP8          |
| Onkogen ve Tumor Supresör           | MYC, SRC, NRAS, V-K-RAS, TP53     |
| Epigenetik ile ilişkili             | DNMT1, HDAC3, HDAC6, HDAC 8       |
| Hücre Döngüsü ile İlişkili          | CDK4, CDKN1A                      |
| İmmune Kontrol Noktası Genleri      | PD1, PD-L1                        |
| İlaç Direnci ile İlişkili           | ABCG2, ABCB1                      |
| Transkripsiyon Faktörleri           | E2F1                              |
| Hücre Sağkalımı ile İlişkili Genler | HGF, MET, GAB1, GRB2, AKT1, PK3R1 |

**Tablo 11.** Hedef genlere ait primer dizileri

| Gen Adı  | 5'-3' Baz Dizisi             | Baz Sayısı | Erime Derecesi (°C) |
|----------|------------------------------|------------|---------------------|
| E2F1-F   | 5'AGGAGTTCATCAGCCTTTCC3'     | 20nt       | 52                  |
| E2F1-R   | 5'CCCAAAGTCACAGTCGAAGA3'     | 20nt       | 52                  |
| MYC-F    | 5'ATCTCTGGGAGGAATGCTAC3'     | 22nt       | 53                  |
| MYC-R    | 5'ATCTGCGTGGCTACAGATAAG3'    | 21nt       | 53                  |
| TP53-F   | 5'AGGGATGTTTGGGAGATGTAAG3'   | 22nt       | 53                  |
| TP53-R   | 5'CCTGGTTAGTACGGTGAAGTG3'    | 21nt       | 54                  |
| BCL2-F   | 5'GTGGATGACTGAGTACCTGA3'     | 22nt       | 55                  |
| BCL2-R   | 5'GAGACAGCCAGGAGAAATCA3'     | 21nt       | 53                  |
| BAX-F    | 5'ATCATGGGCTGGACATTGG3'      | 19nt       | 51                  |
| BAX-R    | 5'TGGAGACAGGGACATCAGT3'      | 19nt       | 51                  |
| CASP3-F  | 5'GCTGCCTGTAACCTGAGAGT3'     | 22nt       | 55                  |
| CASP3-R  | 5'GTATGGAGAAATGGGCTGTA3'     | 22nt       | 55                  |
| CASP8-F  | 5'GGAGCTGCTCTTCCGAATTA3'     | 20nt       | 52                  |
| CASP8-R  | 5'CATGACCCTGTAGGCAGAAA3'     | 20nt       | 52                  |
| CDK4-F   | 5'GCACAGACGTCCATCAGCC3'      | 19nt       | 61                  |
| CDK4-R   | 5'GCCGGCCCCAAGGAAGACTGGGAG3' | 24nt       | 71                  |
| HDAC3-F  | 5'TGGCTTCTGCTATGTCAACG3'     | 20nt       | 57                  |
| HDAC3-R  | 5'GCACGTGGGTTGGTAGAAGT3'     | 20nt       | 59                  |
| HDAC6-F  | 5'TCAGGTCTACTGTGGTCTGTT3'    | 20nt       | 57                  |
| HDAC6-R  | 5'TCTTCACATCTAGGAGAGCC3'     | 20nt       | 57                  |
| HDAC8-F  | 5'AGATGAAGCATCTGGTTTTT3'     | 20nt       | 51                  |
| HDAC8-R  | 5'GGGATCTCAGAGGATAGTG3'      | 19nt       | 57                  |
| PD-L1-F  | 5'AGACCACCACCACCAATTCC3'     | 20nt       | 59                  |
| PD-L1-R  | 5'TGGAGGATGTGCCAGAGGTA3'     | 20nt       | 59                  |
| PD1-F    | 5'AAACCCTGGTGGTTGGTGT3'      | 19nt       | 57                  |
| PD1-R    | 5'TTCTCTCGCCACTGGAAATC3'     | 20nt       | 57                  |
| MAPK-F   | 5'CAATGGCGGTGTGGTGTTC3'      | 19nt       | 59                  |
| MAPK-R   | 5'GATTGCGGGTTTGATCTCCAG3'    | 21nt       | 60                  |
| NF-KB-F  | 5'AACAGAGAGGATTTTCGTTCCG3'   | 22nt       | 58                  |
| NF-KB-R  | 5'TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT3'  | 23nt       | 59                  |
| ABCG2-F  | 5'CCCTGCTGTTTCGATATACCAATC3' | 23nt       | 61                  |
| ABCG2-R  | 5'TCGAGAGAATCCAGAATAGGGAC3'  | 23nt       | 61                  |
| ABCB1-F  | 5'TTGCTGCTTACATTCAGGTTTCA3'  | 23nt       | 57                  |
| ABCB1-R  | 5'AGCCTATCTCCTGTCGCATTA3'    | 21nt       | 58                  |
| AKT1-F   | 5'CTACAACCAGGACCATGAGAAG3'   | 22nt       | 55                  |
| AKT1-R   | 5'TCTTGAGCAGCCCTGAAAG3'      | 19nt       | 51                  |
| CDKN1A-F | 5'GAAGAGGCTGGTGGCTATTT3'     | 20nt       | 52                  |
| CDKN1A-R | 5'GCTCTCTGCTTGTATCCTTTA3'    | 22nt       | 53                  |
| DNMT1A-F | 5'TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC3'  | 23nt       | 61                  |

| Gen Adı     | 5'-3' Baz Dizisi            | Baz Sayısı | Erime Derecesi (°C) |
|-------------|-----------------------------|------------|---------------------|
| DNMT1A-R    | 5'GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG3' | 23nt       | 62                  |
| SRC-F       | 5'AGAACAGGGCCAGGAATTG3'     | 19nt       | 51                  |
| SRC-R       | 5'GAGGCAATCAAGCAGACATAGA3'  | 22nt       | 53                  |
| GAB1-F      | 5'GATGGTTCGTGTTACGCAGTG3'   | 21nt       | 60                  |
| GAB1-R      | 5'CGCTGTCTGCTACCAAGTAGAA3'  | 22nt       | 60                  |
| HGF-F       | 5'GCTATCGGGGTAAAGACCTACA3'  | 22nt       | 60                  |
| HGF-R       | 5'CGTAGCGTACCTCTGGATTGC3'   | 21nt       | 62                  |
| V-K-RAS-F   | 5'TTTCACACAGCCAGGAGTCTT3'   | 21nt       | 58                  |
| V-K-RAS-R   | 5'ACAGAGAGTGGAGGATGCTTT3'   | 21nt       | 58                  |
| GRB2-F      | 5'CTGGGTGGTGAAGTTCAATTCT3'  | 22nt       | 58                  |
| GRB2-R      | 5'GTTCTATGTCCCGCAGGAATATC3' | 23nt       | 61                  |
| PK3R1-F     | 5'ACCACTACCGGAATGAATCTCT3'  | 22nt       | 58                  |
| PK3R1-R     | 5'GGGATGTGCGGGTATATTCTTC3'  | 22nt       | 60                  |
| NRAS-F      | 5'ATGACTGAGTACAACTGGTGGT3'  | 23nt       | 59                  |
| NRAS-R      | 5'CATGTATTGGTCTCTCATGGCAC3' | 23nt       | 61                  |
| MET-F       | 5'AGCAATGGGGAGTGTAAGAGG3'   | 22nt       | 60                  |
| MET-R       | 5'CCCAGTCTTGTAAGTCAAGG3'    | 21nt       | 60                  |
| GAPDH-F     | 5'GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC3'    | 19nt       | 59                  |
| GAPDH-R     | 5'GAAGATGGTGATGGGATTTTC3'   | 20nt       | 59                  |
| BETAAKTİN-F | 5'CATGTACGTTGCTATCCAGGC3'   | 21nt       | 60                  |
| BETAAKTİN-R | 5'CTCCTTAATGTCACGCACGAT3'   | 21nt       | 58                  |

### 3.11. İstatistiksel Analizler

•Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab IC<sub>50</sub> ve ED<sub>50</sub> kombinasyon değerleri CalcuSyn software yazılımı ile hesaplandı.

•Apoptotik analizler, hücre döngüsü analizleri ve RT-qPCR ile tespit edilen hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri, p<0.05'in önemi referans alınarak Graphpad yazılımında *Anova Testleri* ile değerlendirildi.

•Ki-67 mRNA ekspresyon profillemesi İmage J, hücre yara iyileşme migrasyon testi ise Tscratch yazılımı ile analiz edildi.

•Grafik dizaynları CalcuSyn ve GraphPad ver. 10.0 yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi.

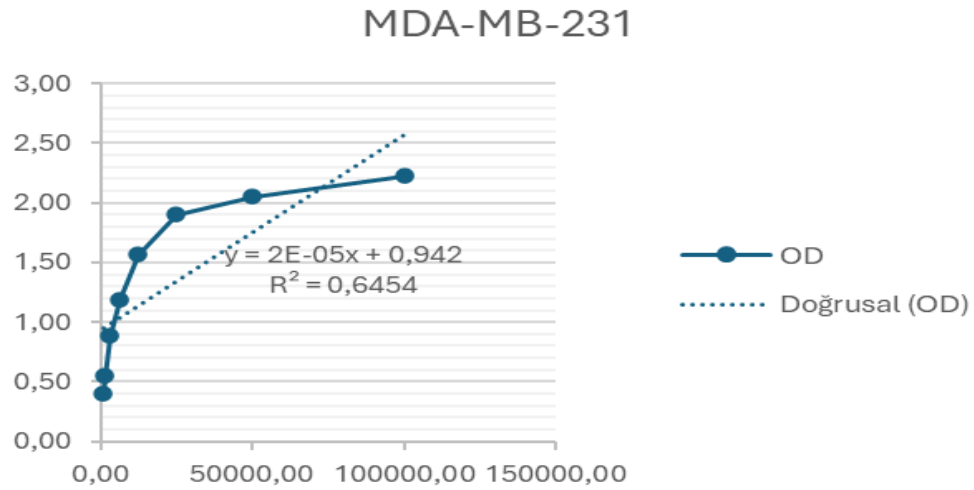
## Bulgular

### 4.1. Hücre Hatlarında Proliferasyon ve Sitotoksosite Analizleri

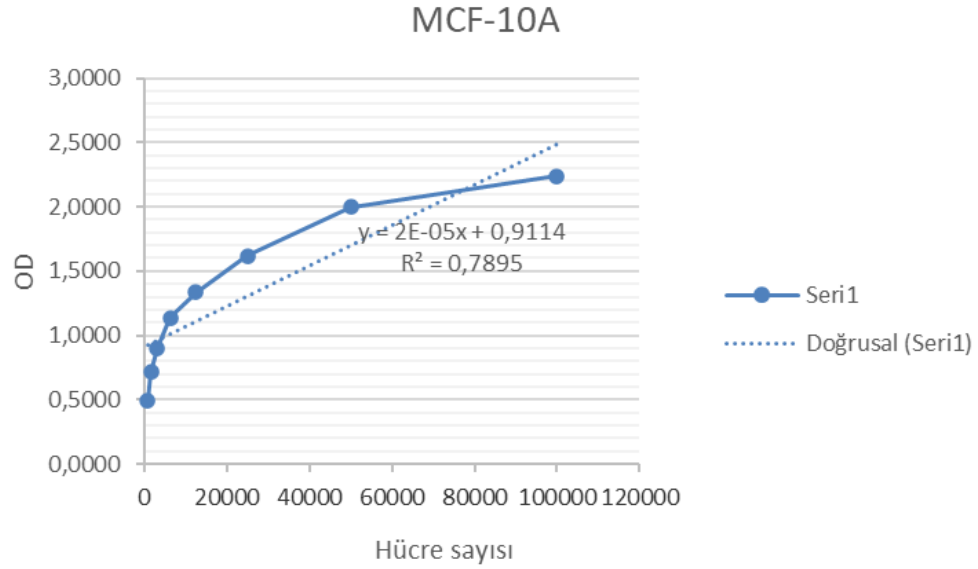
Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri tripan mavisi ile boyanarak canlılık yüzdeleri ve hücre sayıları belirlendi. Analizler sonucunda, canlılık oranı %95'in üzerinde olan hücrelerle deneyler gerçekleştirildi.

#### 4.1.1. Proliferasyon Analizleri

Sitotoksosite analizlerinde kullanılmak üzere optimal hücre sayısını belirlenmesi amacıyla proliferasyon deneyleri gerçekleştirildi. İlk kuyuda  $10^5$  hücre olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekilen hücreler, son kuyucukta 780 hücre olacak şekilde seri dilüsyonla dağıtıldı ve 96. saatin sonunda hücrelere 50 ul XTT reaktifi eklenerek Multiscan FC mikropılaka okuyucusu ile saat başı okutma gerçekleştirildi. Proliferasyon analizi sonuçlarına göre; MDA-MB-231 ve MCF-10 optimal hücre sayıları sırasıyla 15000 hücre/100ul ve 12500 hücre/100ul olarak hesaplandı (Grafik 1 ve Grafik 2).



**Grafik 1.** MDA-MB-231 hücre hattına ait proliferasyon analizi



**Grafik 2.** MCF-10A hücre hattına ait proliferasyon analizi

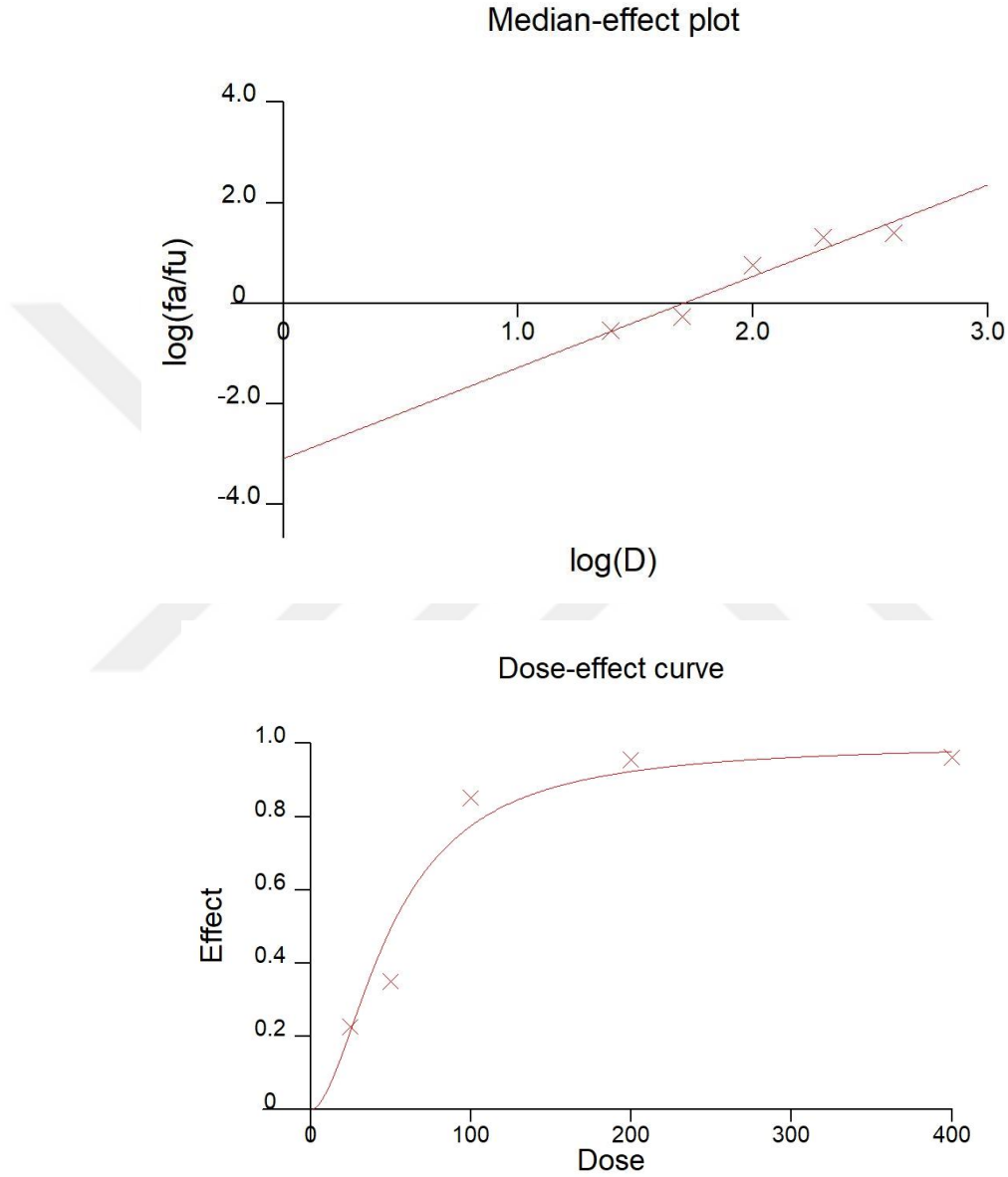
#### 4.1.2. Sitotoksikite Analizleri

HDAC inhibitörü Droxinostat, kemoterötik ajan Nab-paklitaksel ve PD-L1 inhibitörü Atezolizumab'ın tekli ve ikili ve üçlü kombinasyon dozları, ÜNМК hücre hattı olan MDA-MB-231 ve sağlıklı kontrol hücre hattı olan MCF-10A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirildi. İlaçlar, çeşitli dilüsyon oranlarında hücrelere verilerek hücreler üzerinde oluşturacağı sitotoksik etkiler belirlendi. Etken madde uygulaması yapılmamış hücreler ise kontrol grubu olarak referans alınarak sitotoksik etki hesaplandı. Hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) dozları CalcuSyn 2.0 (Biosoft) programında hesaplanarak ve grafikler GraphPad Prism v10.0 yazılımında oluşturuldu.

##### 4.1.2.1. HDAC inhibitörü Droxinostat'ın Sitotoksik Etkileri

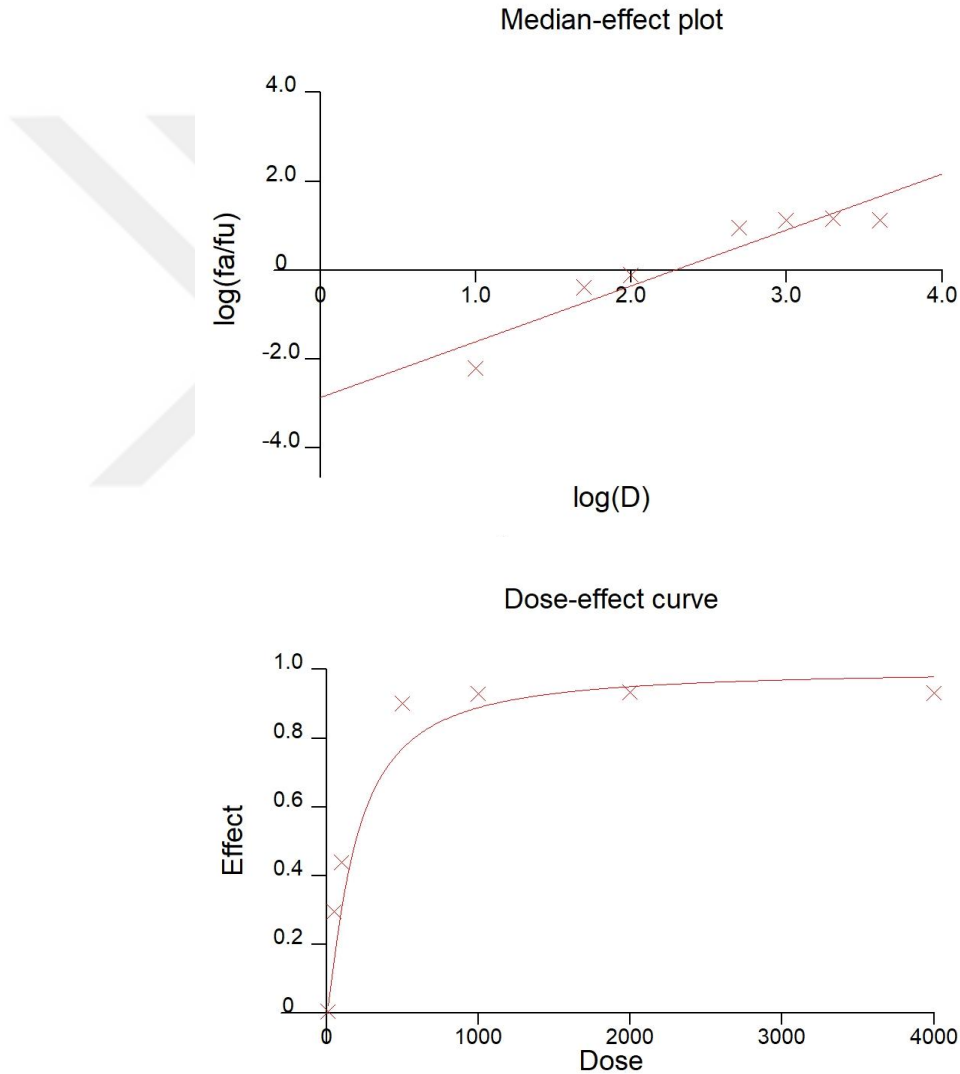
96 well plakalarda gerçekleştirilen sitotoksikite analizinde her bir kuyucuğa proliferasyon deneyleri sonucunda belirlenen optimal hücre sayısı ekilmiştir. Buna göre, MDA-MB-231 hücreleri kuyu başına 15000 hücre olarak ekildi. Droxinostat, MDA-MB-231 hücrelerine 5-500 µM konsantrasyon aralığında uygulandı. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. İlaç uygulamasından 72. saat sonra her bir kuyucuğa 50 µl XTT eklenerek absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçülen absorbans değerlerine göre, kontrol grubu referans

alınarak Calculusyn programı ile  $IC_{50}$  dozları hesaplandı. Analiz sonucuna göre, Droxinostat'ın 72. saat  $IC_{50}$  dozları, MDA-MB-231 hücre hattında  $60\mu M$  ve r değeri 0.96389 olarak belirlendi (Grafik 3).



**Grafik 3.** MDA-MB-231 hücrelerinde Droxinostat  $IC_{50}$  dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi

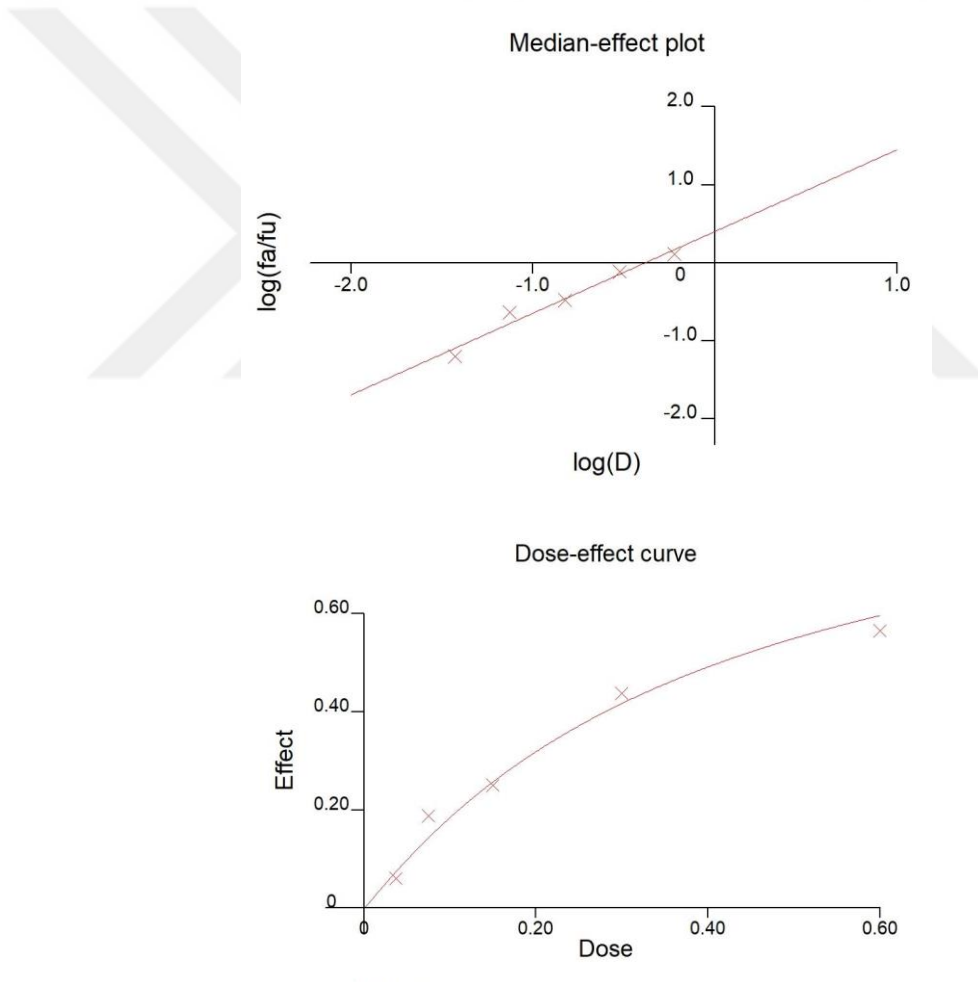
MCF-10A hücreleri için de aynı işlemler gerçekleştirildi. Proliferasyon deneyleri sonucunda optimal hücre sayısı olarak kuyu başına 12500 hücre olarak ekildi. Droxinostat, MCF-10A hücrelerine ise 10 $\mu$ M- 4mM konsantrasyon aralığında uygulandı. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. İlaç uygulamasından 72. saat sonra her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l XTT eklenerek absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçülen absorbans değerlerine göre, kontrol grubu referans alınarak Calculusyn programı ile IC<sub>50</sub> dozları hesaplandı. Sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A'da IC<sub>50</sub> dozu 190  $\mu$ M ve r değeri 0.94151 olarak hesaplandı (Grafik 4).



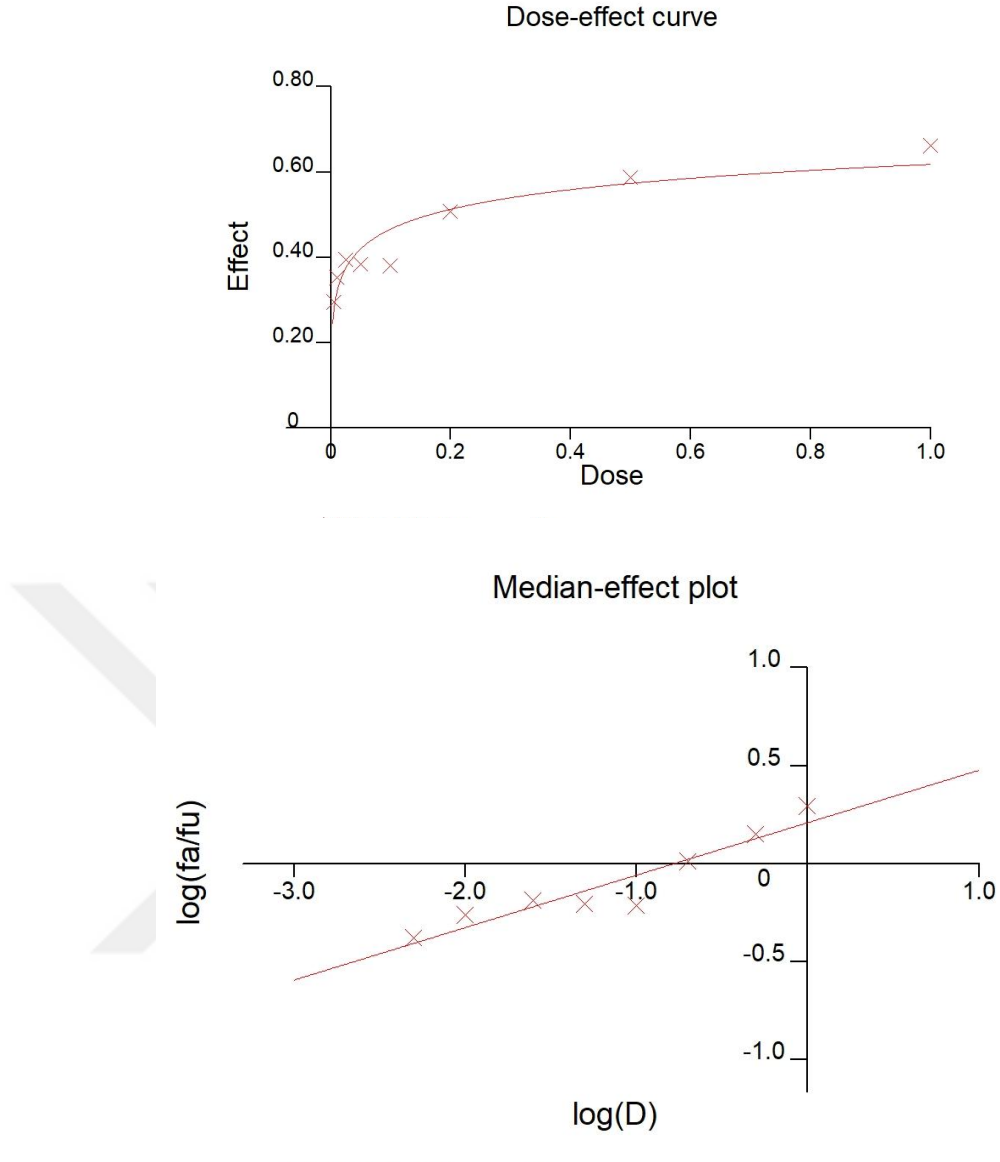
**Grafik 4.** MCF-10A hücrelerinde Droxinostat IC<sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi

#### 4.1.2.2. Nab-paklitaksel'in Sitotoksik Etkileri

MDA-MB-231 hücreleri kuyu başına 15000 hücre, MCF-10A hücreleri ise 12500 olarak ekildi. Nab-paklitaksel, MDA-MB-231 hücrelerine 37,5- 0,6  $\mu$ M, MCF-10A hücrelerine ise 0.005-1 $\mu$ M konsantrasyon aralığında uygulandı. İlaç uygulamasından 72. saat sonra her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l XTT eklenerek absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçülen absorbans değerlerine göre, kontrol grubu referans alınarak Calculusyn programı ile IC<sub>50</sub> dozları hesaplandı. Nab-paklitaksel'in sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A'da IC<sub>50</sub> dozu 0.16  $\mu$ M ve r değeri 0.94122 iken, MDA-MB-231 kanser hattı hücrelerinde 0,58 $\mu$ M ve r değeri 0.98280 olarak hesaplandı (Grafik 5, Grafik 6).



**Grafik 5.** MDA-MB-231 hücrelerinde Nab-paklitaksel IC<sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi

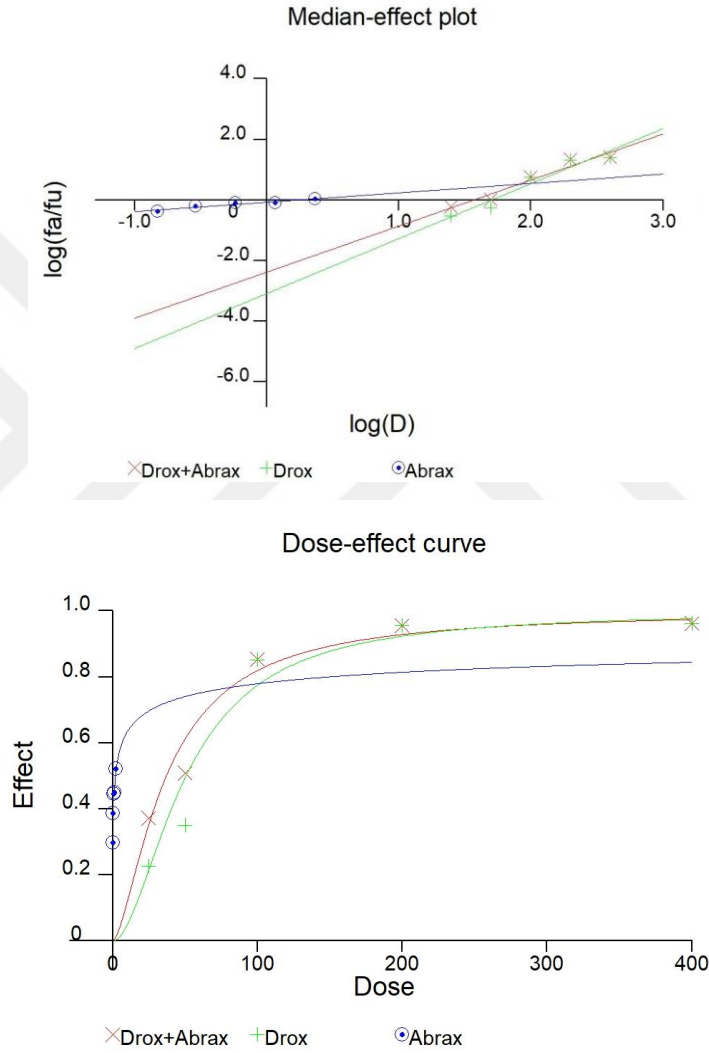


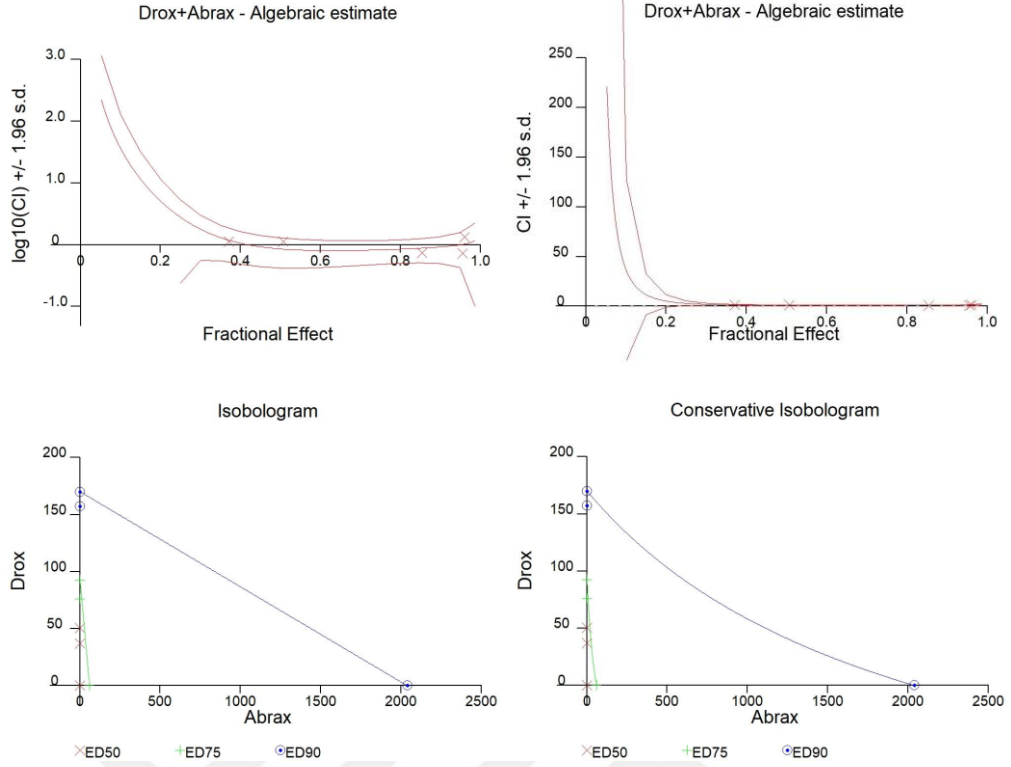
**Grafik 6.** MCF-10A hücrelerinde Nab-paclitaxel IC<sub>50</sub> dozlarına ait medyan etki grafiği ve doz-etki eğrisi

#### 4.1.2.3. Droxinostat ve Nab-paclitaxel İkili Kombinasyonlarının Sitotoksik Etkileri

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde, Droxinostat ve Nab-paclitaxel etken maddelerin ikili kombinasyon dozları 72. saat için değerlendirilmiştir. Buna göre etken maddelerin IC<sub>50</sub> dozlarının ¼ kat, ½ kat, 1 kat, 2 kat ve 4 kat IC<sub>50</sub> dozları hesaplanarak 3 tekrarlı olacak şekilde hücrelere eklendi. MDA-MB-231 hücreleri için 15000 hücre, MCF-10A hücreleri için ise 12500 hücre ekildi. 24 saat sonra hücrelerin besiyeri

çekilerek hazırlanan ilaç karışımları kuyucuklara eklendi. Doz-etki eğrisi, medyan-etki, fraksiyonel etki ve izobologram grafikleri gösterilmiştir (Grafik 7). Kombinasyon analizine göre, 0,600 fraksiyonda etkilenen Droxinostat için  $48\mu\text{M}$ , Nab-paklitaksel için ise  $0,28\mu\text{M}$  dozunun CI indeksi 0,808 yani ılımlı sinerjistik etkiye sahip olduğu bulundu.





**Grafik 7.** MDA-MB-231 hücrelerinde Droxinostat-Nab-paklitaksel ikili kombinasyonunun doz-etki eğrisi ve medyan-etki, etkilenen fraksiyon ve izobologram grafikleri

#### 4.1.2.4. PD-L1 inhibitörü Atezolizumab'ın Sitotoksik Etkileri

Atezolizumab, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine 1-500 nM konsantrasyon aralığında uygulandı. İlaç uygulamasından 72. saat sonra her bir kuyucuğa 50  $\mu\text{l}$  XTT eklenerek absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçülen absorbans değerlerine göre, kontrol grubu referans alınarak Calcsyn programı sitotoksikite oranları hesaplandı. Analiz sonucuna göre Atezolizumab'ın sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A'da ve MDA-MB-231 kanser hattı hücrelerinde toksik etki oluşturmadığı belirlendi. Bu hücre hatları içerisinde lenfosit gibi immun hücreler içermemesi nedeniyle, PD-L1 inhibitörü Atezolizumab'ın etki mekanizmasını sağlayan T hücre aktivasyonunu gerçekleştirmediğinden anti-kanser veya sitotoksik etki göstermemiştir.

Ayrıca, ilaçların hem kendi aralarındaki etkileşimleri hem de hücrelere etkileri değerlendirmek amacıyla literatürden referans alınarak 100 nm Atezolizumab dozu ile Droxinostat ve Nab-paklitaksel'in hem tekli  $IC_{50}$  dozları ile ikili , Droxinostat ve

Nab-paklitaksel'in kombinasyon dozlarına ait ED<sub>50</sub> dozları ile de üçlü kombinasyon analizi gerçekleştirildi. Bu analizler sonucuna göre Atezolizumab, hem Droxinostat ile hem de Nab-paklitaksel ile hem de bunların ikili kombinasyonları ile etkileşmemekte ve hücreler üzerinde de sitotoksik etki oluşturmamıştır. Bu nedenle apoptoz ve gen ekspresyon çalışmalarında literatürden referans alınan 100 nm dozu kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir (Quagliariello vd., 2024).

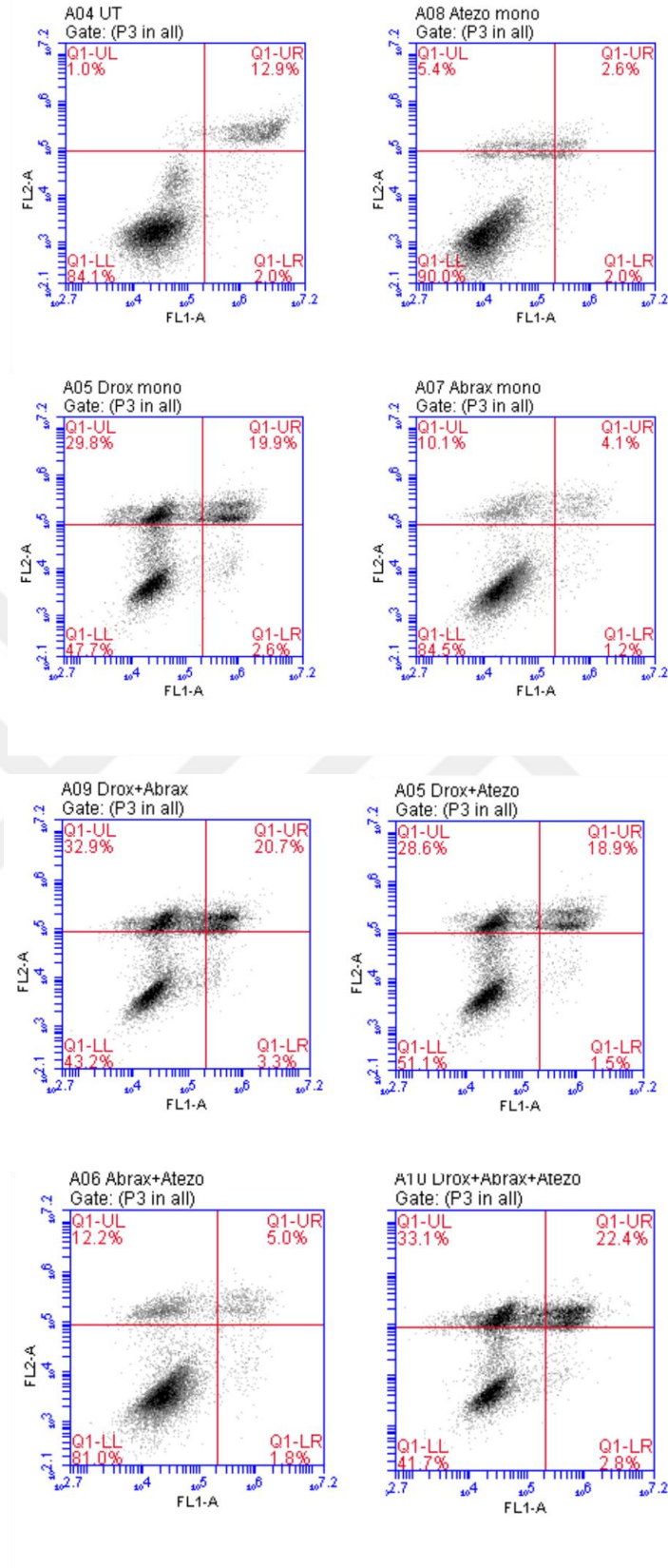
## **4.2. Apoptoz Analizleri**

### **4.2.1. MDA-MB-231 Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Apoptotik Etkileri**

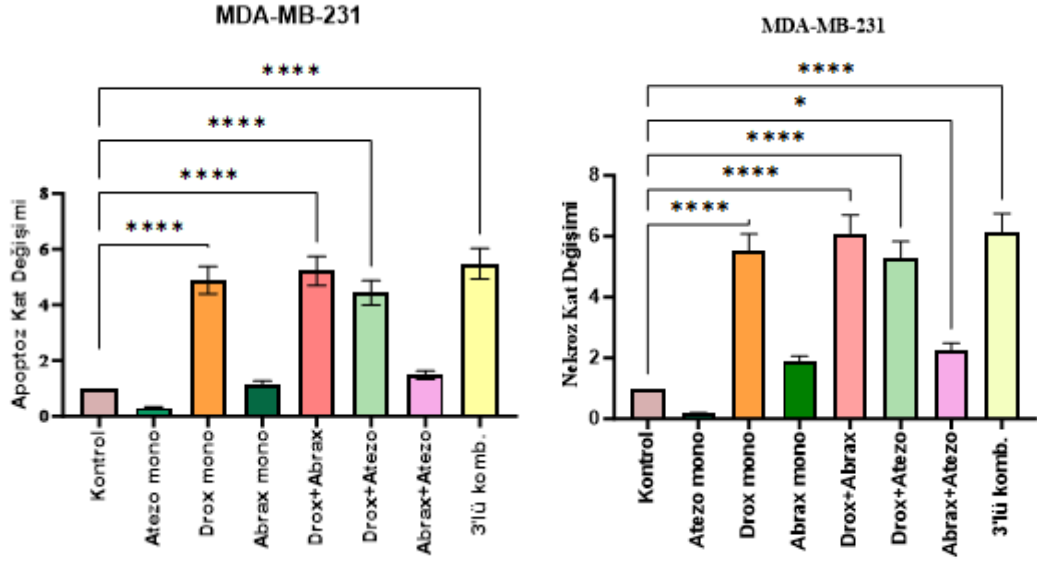
Droxinostat ve Nab-paklitaksel için belirlenen IC<sub>50</sub> ve ED<sub>50</sub> dozları ile Atezolizumab için 100 nm olarak belirlenen ve bu etken maddelerin hem tekli hem de kombinasyonel dozları MDA-MB-231 hücrelerine uygulanarak apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Apoptoz analizi sonuçlarına göre, ajanların mono dozlarında Droxinostat'ın apoptoz ve nekroptozu sırasıyla %22,5 ve %9,5 oranında artırırken, Nab-paklitaksel'in %5,3 ve %10,1, Atezolizumab'ın ise %4,6 ve %5,4 olarak değişim göstermiştir. Droxinostat mono dozu, hem apoptozu hem de nekroptozu artırırken, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab'ın ise sadece nekroptozu artırdığı saptanmıştır.

Kombinasyon dozlarında ise Droxinostat+Nab-paklitaksel apoptoz ve nekroptozu sırasıyla %24 ve %32,9 oranında artırırken, Nab-paklitaksel+Atezolizumab %6,8 ve %12,2, Droxinostat+Atezolizumab %20,4 ve %28,6 ve 3 lü kombinasyon ise %24,8 ve %33,1 oranında belirlendi. Sonuç olarak, Droxinostat'ın mono ve kombinasyonları apoptoz ve nekroptozu yüksek düzeyde indüklemiştir. Apoptoz sonuçları Şekil 13 ve Grafik 8'de gösterilmiştir.



**Şekil 15.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-23 hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekroz yüzdeleri



**Grafik 8.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekrotik yüzdelерinin kat değışim grafiğı (\*;  $p<0.05$ , \*\*\*,  $p<0.0001$ )

#### 4.2.2. MCF-10A Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Apoptotik Etkileri

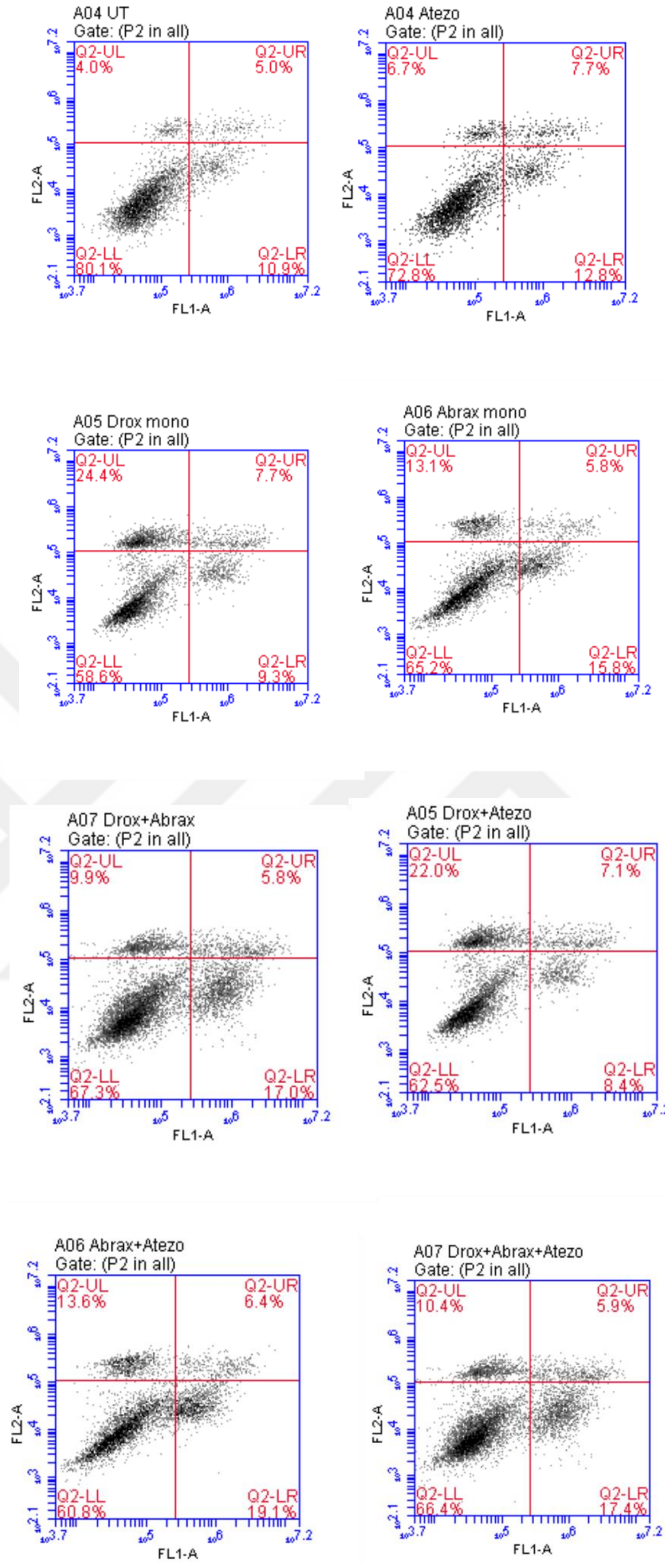
Droxinostat ve Nab-paklitaksel için belirlenen  $IC_{50}$  ve  $ED_{50}$  dozları ile Atezolizumab için 100 nm olarak belirlenen ve bu etken maddelerin hem tekli hem de kombinasyonel dozları MCF-10A hücrelerine uygulanarak apoptotik etkileri değерlendirilmiştir. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak değерlendirilmiştir.

Apoptoz analizi sonuçlarına göre, mono dozlarda Droxinostat'ın apoptoz ve nekroptozu sırasıyla %17 ve %24,4, Nab-paklitaksel %21,6 ve %13,1, Atezolizumab'ın ise %20,5 ve %6,7 oranında etkilemiştir. Analiz sonucuna göre, Nab-paklitaksel'in mono dozunun hem apoptoz hem de nekroptozu, Droxinostat'ın ise sadece nekroptozu indüklediğı belirlenmiştir. Kombinasyon dozlarında ise, Droxinostat-Nab-paklitaksel kombinasyonunun apoptoz ve nekroptozu sırasıyla %22,8 ve %9,9, Droxinostat-Atezolizumab'ın %15,5 ve %22, Nab-paklitaksel-

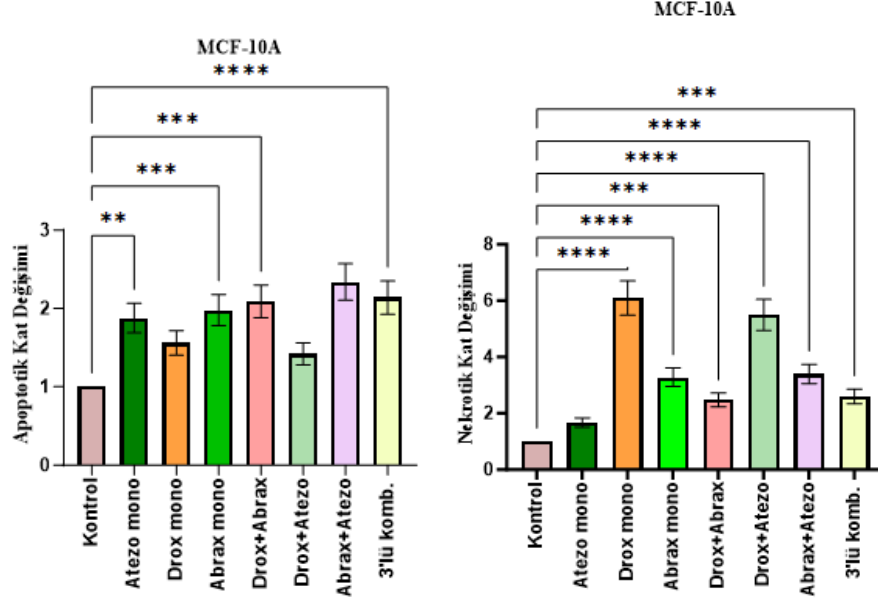
Atezolizumab'ın %25,5 ve %13,6 ve üçlü kombinasyonun %23,3 ve %10,4 oranında etkilemiştir.

Analiz sonucuna göre, ilaçların ikili ve üçlü kombinasyon dozlarının MCF-10A hücrelerinde nekroptozu apoptozdan daha fazla indüklediği belirlendi. Apoptoz analizi sonuçları Şekil 14 ve Grafik 9'da gösterilmiştir.





**Şekil 14.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekroz yüzdeleri



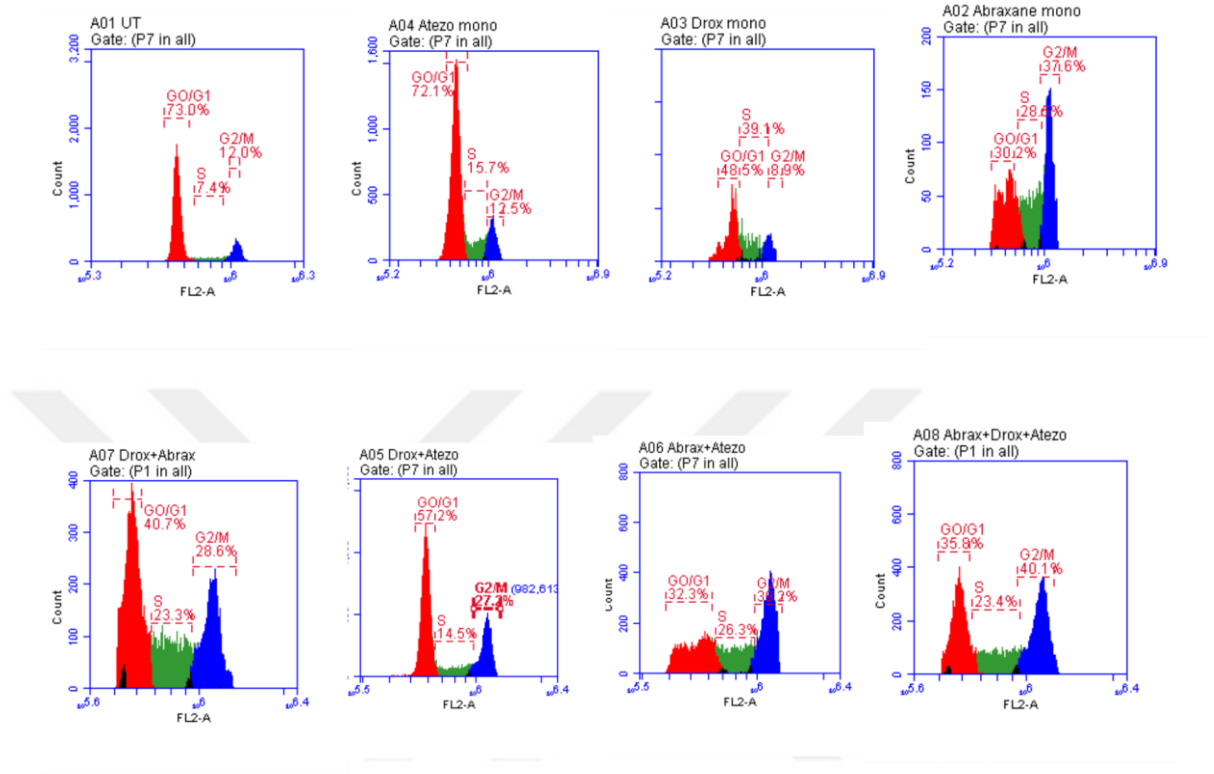
**Grafik 9.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki apoptotik ve nekrotik yüzdelерinin kat değişim grafiğı (\*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*; ( $p<0.001$ ), \*\*\*\*; ( $p<0.0001$ ))

#### 4.3. Hücre Döngüsü Analizleri

##### 4.3.1. MDA-MB-231 Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Analizleri

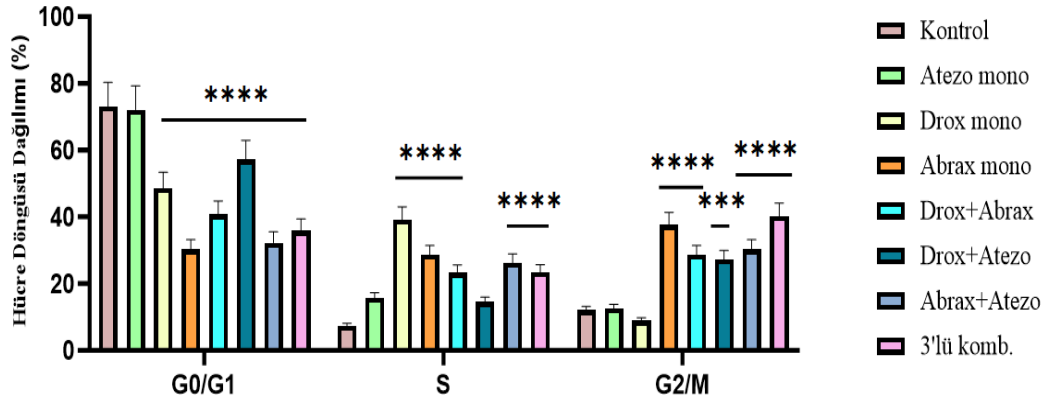
Droxinostat ve Nab-paklitaksel için belirlenen  $IC_{50}$  ve  $ED_{50}$  dozları ile Atezolizumab için 100nm olarak belirlenen ve bu etken maddelerin hem tekli hem de kombinasyonel dozları MDA-MB-231 hücrelerine uygulanarak hücre döngüsü üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Hücre Döngüsü analizi sonuçlarına göre, Droxinostat'ın kontrol grubuna göre S fazındaki tutulmayı 5,3 kat artırırken Nab-paklitaksel'in ise G2/M fazındaki tutulmayı 3 kat artırdığı, Atezolizumab'ın ise hücre döngüsü üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Droxinostat-Nab-paklitaksel kombinasyonunda, S ve G2/M fazı hücre tutulmaları sırasıyla 3,15 kat ve 2,38 kat, Droxinostat-Atezolizumab kombinasyonu; 1,95 kat ve 2,26 kat, Nab-paklitaksel-Atezolizumab kombinasyonunda 3,55 kat ve 2,51 kat 3 lü kombinasyonda ise 3,16 kat

3,34 kat artmıştır. Hücre döngüsü analiz sonuçları Şekil 15 ve Grafik 10’da gösterilmiştir.



**Şekil 15.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-23 hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü analiz sonuçları

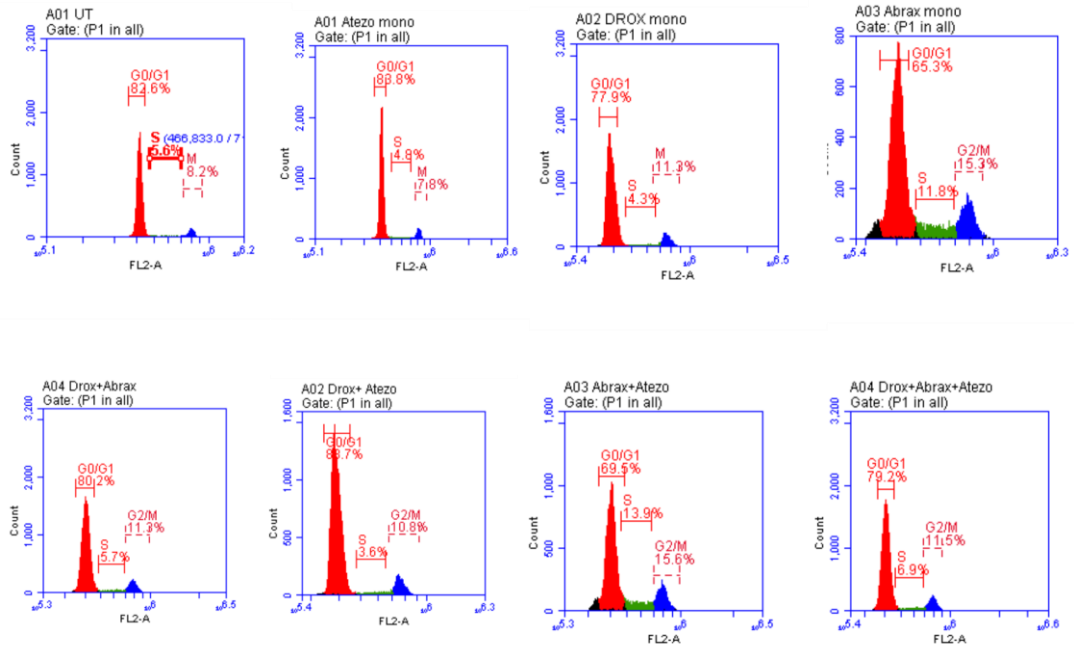
#### MDA-MB-231



**Grafik 10.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü kat değişim grafiği (\*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*; ( $p < 0.001$ ), \*\*\*\*; ( $p < 0.0001$ ))

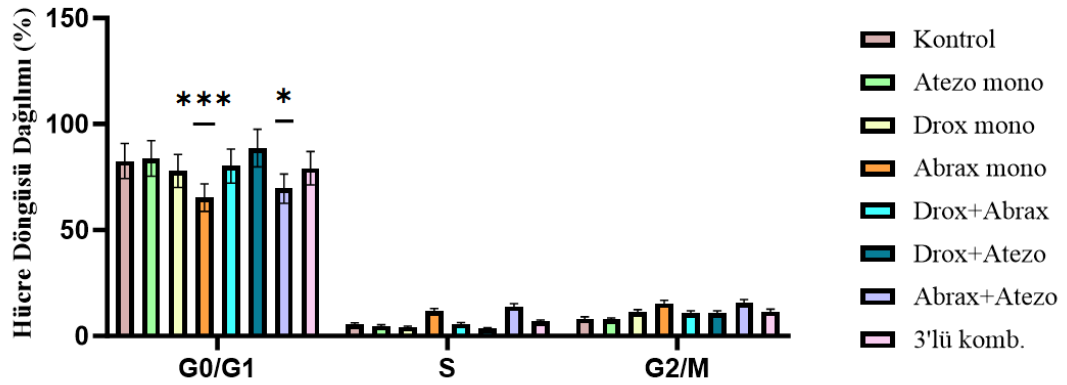
#### 4.3.2. MCF-10A Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Hücre Döngüsü Analizleri

Droxinostat ve Nab-paklitaksel için belirlenen  $IC_{50}$  ve  $ED_{50}$  dozları ile Atezolizumab için 100nm olarak belirlenen ve bu etken maddelerin hem tekli hem de kombinasyonel dozları MCF-10A hücrelerine uygulanarak hücre döngüsü üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Hücre Döngüsü analizi sonuçlarına göre, Droxinostat'ın mono dozu G2/M fazındaki tutulmayı 1,37 kat, Nab-paklitaksel'in ise S fazını 2,10 kat, G2/M fazını 1,86 kat artırdığı, Atezolizumab'ın ise hücre döngüsü üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Ajanların ikili ve üçlü kombinasyonlarının MCF-10A hücrelerinde hücre döngüsü G2/M fazında minimal oranda tutulma gerçekleştirdiği belirlendi. Hücre döngüsü analiz sonuçları Şekil 16 ve Grafik 11'da gösterilmiştir.



**Şekil 16.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü analiz sonuçları

#### MCF-10A



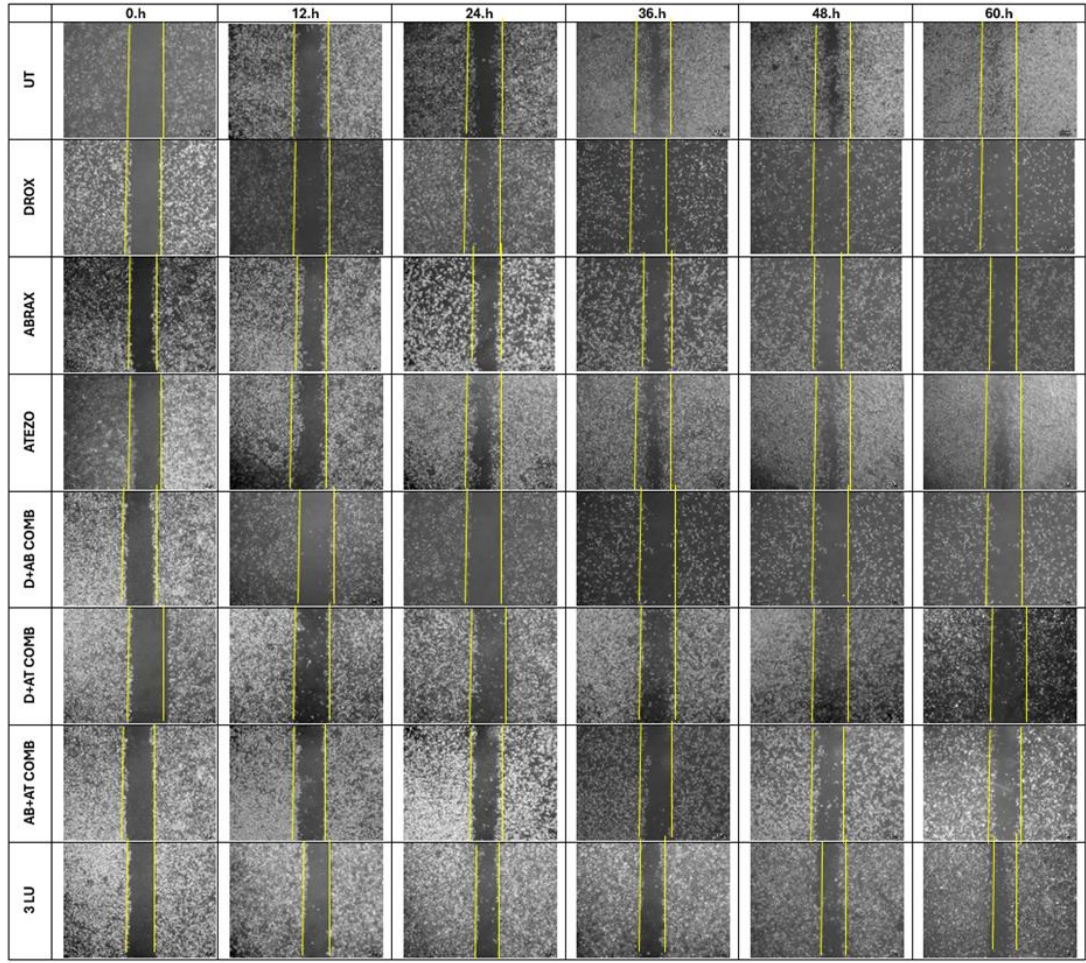
**Grafik 11.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki hücre döngüsü kat değişim grafiği (\*;  $p < 0.05$ , \*\*\*;  $p < 0.001$ )

#### **4.4. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizleri**

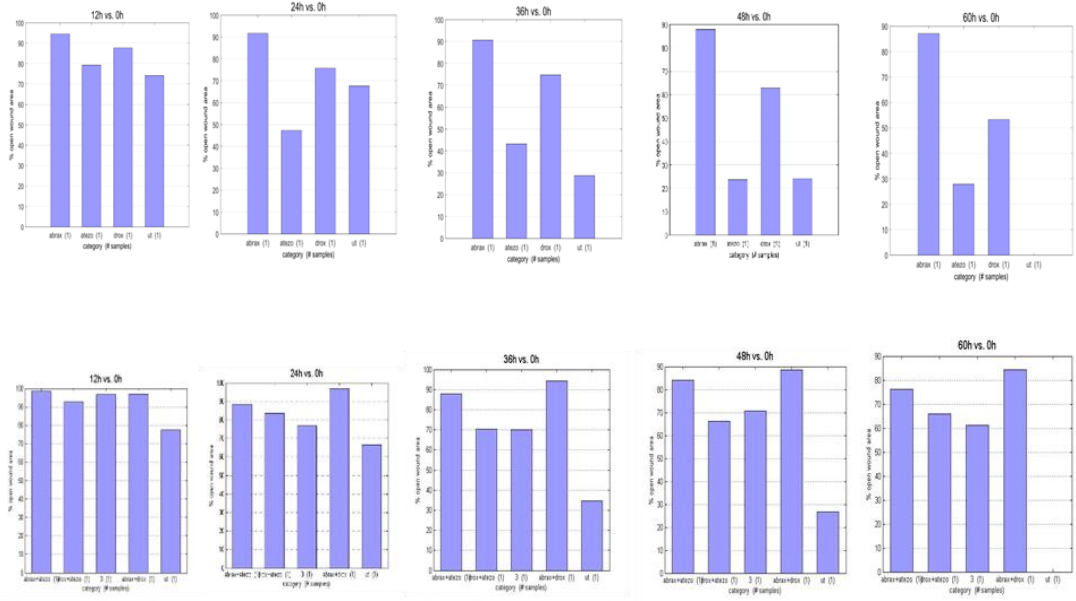
Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droksinostat etken maddelerinin MDA-MB-231 ÜNМК hücreleri ve MCF-10A kontrol grubu sağlıklı hücrelerin migratif özellikleri üzerine etkilerini incelemek için yara iyileşme deneyi ve invazyon analizleri gerçekleştirildi.

##### **4.4.1. Yara İyileşme Analizi**

0. saatte oluşturulan boşluk referans alınarak hücrelerin 12 saatte bir alınan görüntüleri ile yaraların kapanma yüzdeleri belirlendi. İlaç uygulanmayan kontrol grubunda oluşturulan yara kapanana kadar analize devam edildi. 60. saat sonunda kontrol grubunda oluşturulan yara tamamen kapandıktan sonra aralık mesafesi, Scratch yazılımı kullanılarak kantitatif olarak değerlendirildi. 60. sonunda ilaç uygulanmayan kontrol grubunda yara boşluğu tamamen kapanırken, Atezolizumab, Droksinostat ve Nab-paklitaksel tekli dozları uygulanan hücrelerde kapanma oranı sırasıyla %72.1, %46.79 ve %12.91, Droksinostat+Nab-paklitaksel, Droksinostat+Atezolizumab, Nab-paklitaksel+Atezolizumab, Droksinostat+Nab-paklitaksel+Atezolizumab kombinasyon dozlarında ise sırasıyla %15.71, %34.19, %23.81 ve %38.72 olarak belirlendi (Şekil 17, Grafik 12). Bu sonuçlara göre yara kapanması üzerindeki en etkili ilaçlar Nab-paklitaksel ile Nab-paklitaksel+Droksinostat ikili kombinasyonu olarak belirlendi.



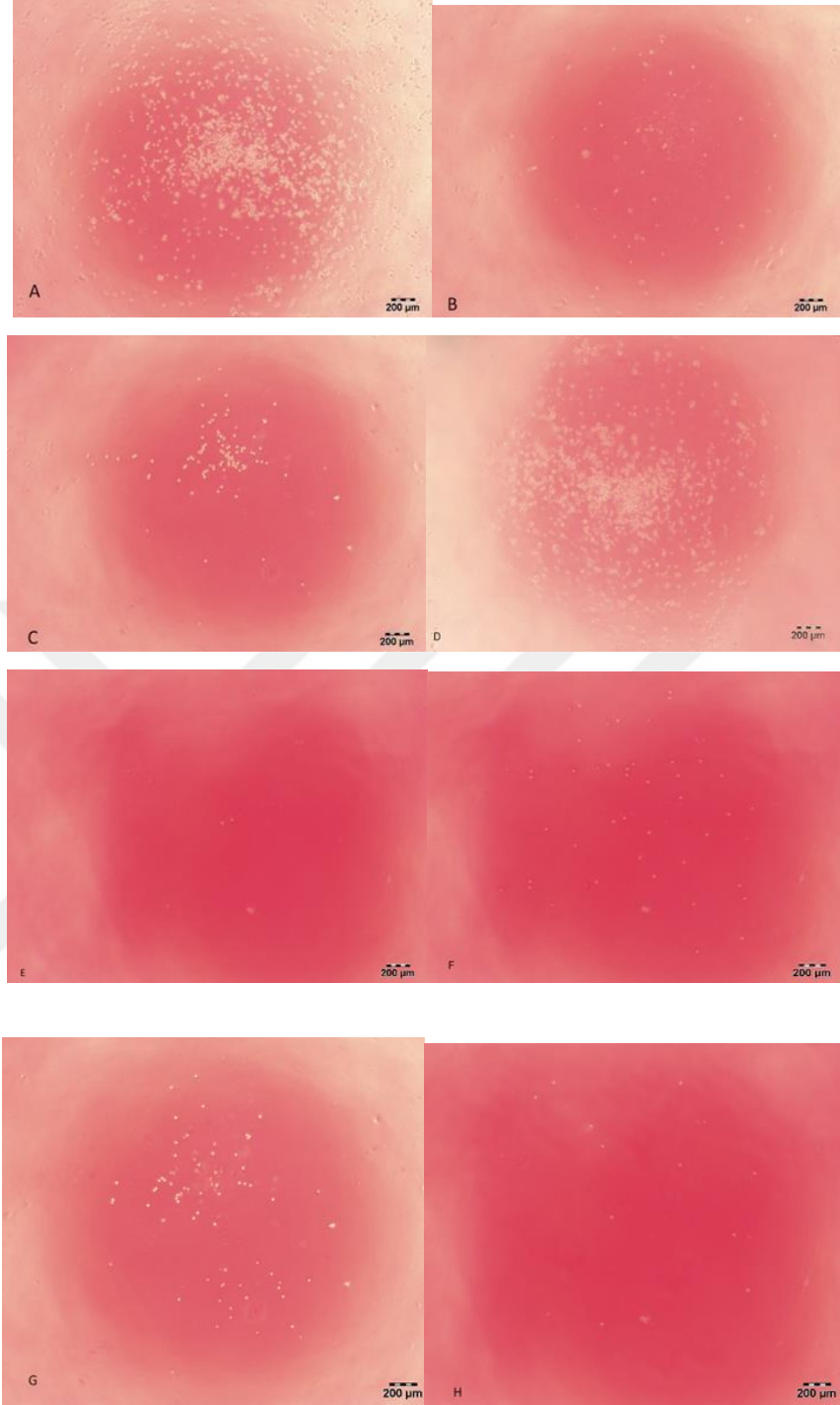
**Şekil 17.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerin tekli, ikili ve üçlü dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturulan yaraların 0. Saatten itibaren 60. Saate kadar kapanma oranları (UT; Kontrol, Drox; Droxinostat mono, Abrax; Nab-paklitaksel mono, Atezo; Atezolizumab mono, D+AB; Droxinostat+ Nab-paklitaksel, D+AT; Droxinostat+Atezolizumab, AB+AT; Nab-paklitaksel+Atezolizumab, 3Lu; Droxinostat+ Nab-paklitaksel+Atezolizumab)



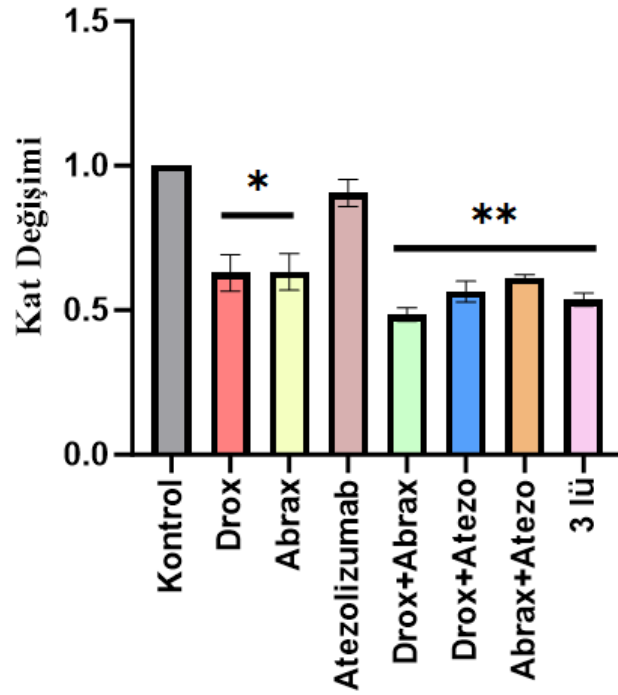
**Grafik 12.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerin tekli, ikili ve üçlü dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturulan yaraların 0. Saatten itibaren 60. Saate kadar kapanma oranlarının karşılaştırması

#### 4.4.2. Hücre İnvazyon Testi

İnvazif özellikteki hücreler bu membrandaki proteinlerin parçalanmasına ve böylece membrandan geçebilmelerine olanak sağlamaktadır. Membrandan geçen hücreler boyanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat'ın  $IC_{50}$  dozlarının uygulaması gerçekleştirildi. Etken madde uygulanmayan hücreler ise kontrol grubunu oluşturdu. Elde edilen absorbans değerlerine dayanarak, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla ilaç uygulanan dozlarda hücre migrasyonunda meydana gelen kat değişimi hesaplanmıştır. İncelenen veriler sonucunda, invazyon oranında en belirgin azalma, Droxinostat ve Nab-paklitaksel ikili kombinasyon dozunun yanı sıra üçlü kombinasyon dozlarının uygulandığı gruplarda gözlemlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Bu bulgular, ilgili kombinasyonların hücre invazyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermektedir (Şekil 18, Grafik 13).



**Şekil 18.** Boyama sonrası polikarbonat membrandan geçen hücrelerin inverted mikroskop ile görüntüleri A; UT, B; Droxinostat mono, C; Nab-paklitaksel mono, D; Atezolizumab, E; Droxinostat+Nab-paklitaksel F; Droxinostat+Atezolizumab G; Nab-paklitaksel+Atezolizumab, H; Droxinostat+Nab-paklitaksel+Atezolizumab

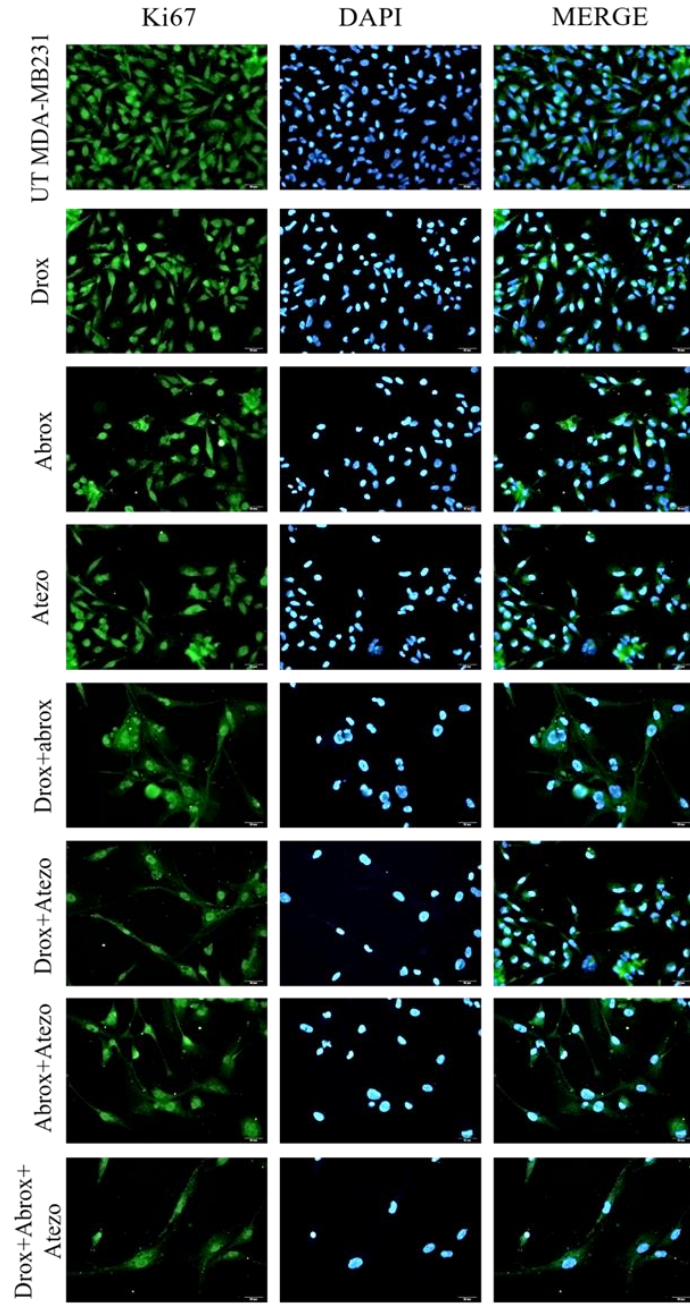


**Grafik 13.** MDA-MB-231 hücrelerinde, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla ilaç uygulanan dozlarda hücre invazyonunda gözlemlenen kat değişimi (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ )

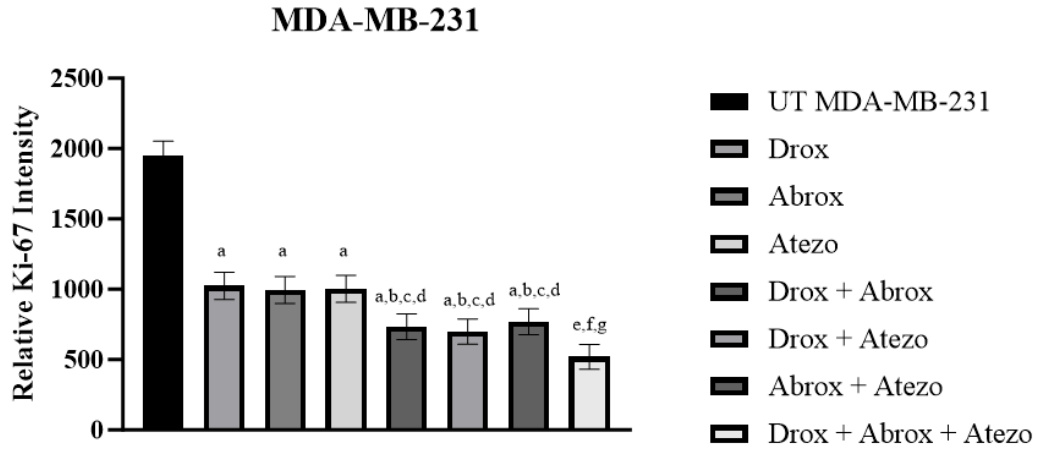
#### 4.5. Ki-67 Proliferasyon İndeks Belirtecini İmmunofloresan Boyama ile Ekspresyon Analizi

Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve Droxinostat etken maddelerinin MDA-MB-231 ÜNМК hücreleri ve MCF-10A kontrol grubu sağlıklı hücrelerin hücrelerinin proliferasyonunu ne derecede etkilediğini analiz etmek amacıyla Ki-67 belirtecini protein düzeyinde ifadeleri immunofloresan analizi ile belirlendi.

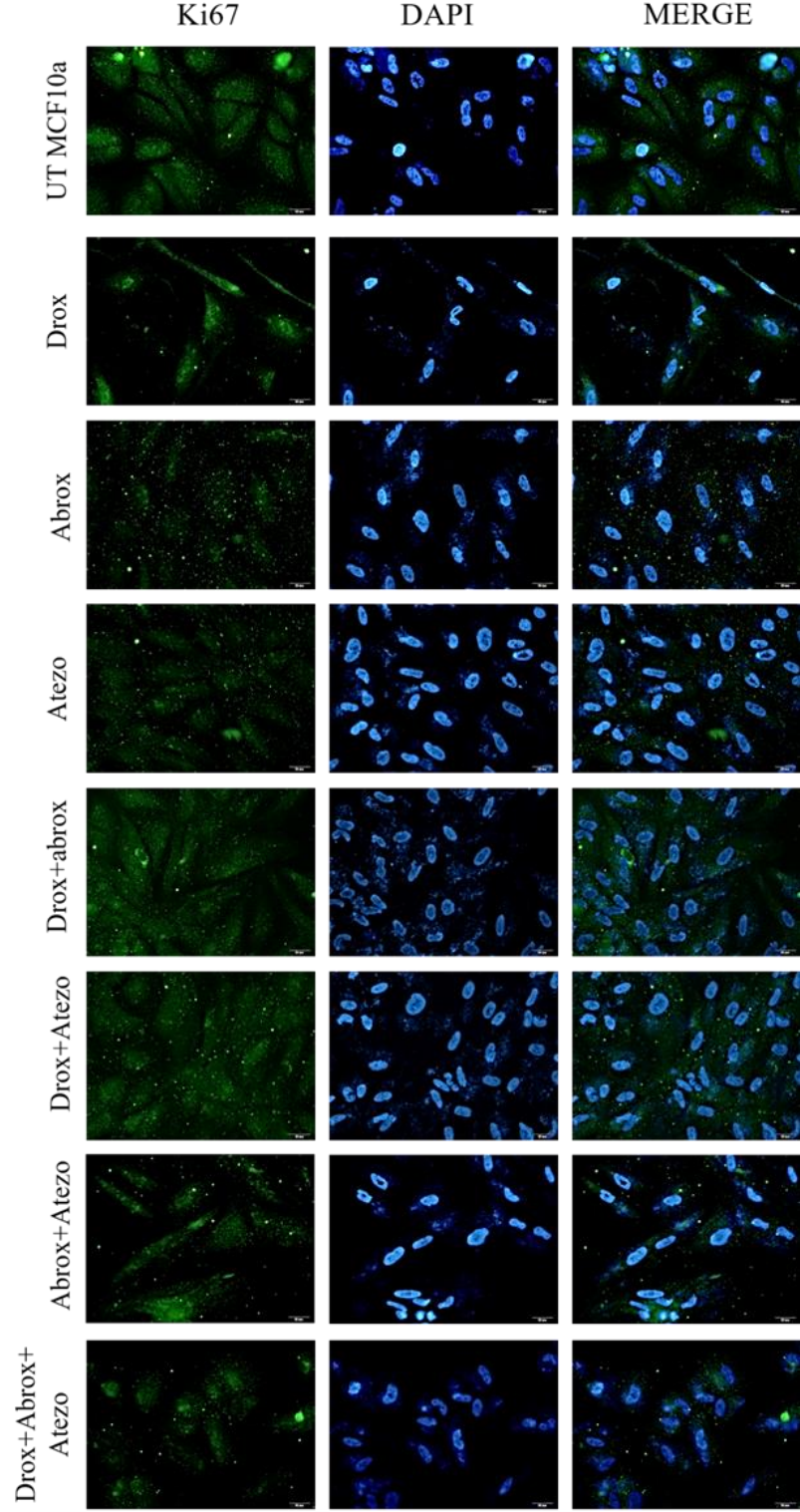
Analiz sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücrelerinde tüm ilaç dozlarının uygulanmasıyla Ki-67 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ , Şekil 19, Grafik 13). MCF-10A hücrelerinde de Ki-67 ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ( $p<0.001$ , Şekil 20, Grafik 14); ancak, MDA-MB-231 hücrelerinde bu azalma, MCF-10A hücrelerine oranla çok daha belirgin olmuştur. Bu bulgular, MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyonun daha etkili bir şekilde baskılandığını ortaya koymaktadır.



**Şekil 19.** MDA-MB-231 hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait immüno Floresan mikroskop görüntüleri (Büyütme oranı 40x;20µm)

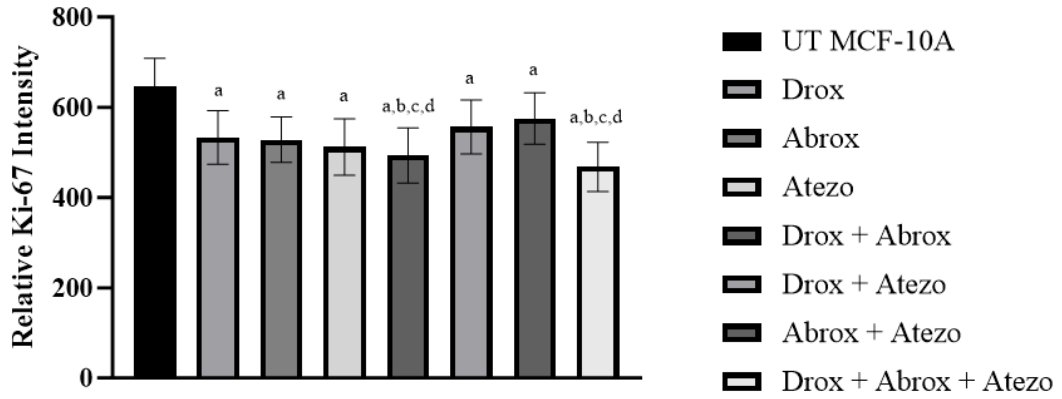


**Grafik 14.** MDA-MB-231 hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait grafik. a: UT MDA-MB-231 grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), b: Drox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), c: Abrox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), d: Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), e: Drox + Abrox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), f: Drox +Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), g: Abrox + Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), h: Drox + Abrox + Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ).



**Şekil 20.** MCF- 10A hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait immünofloresan mikroskop görüntüleri (Büyütme oranı 40x;20µm)

### MCF-10A



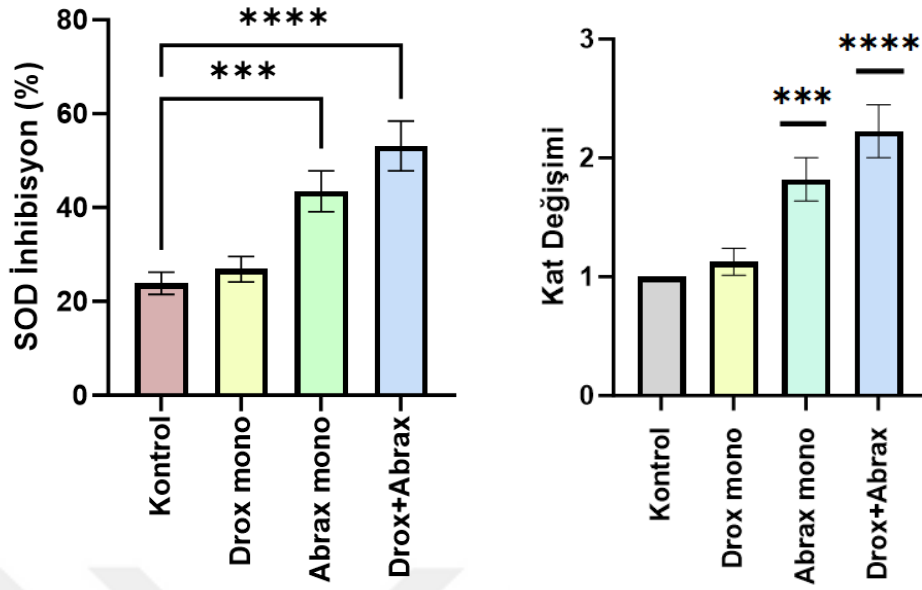
**Grafik 15.** MCF- 10A hücre hattı ile oluşturulan deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonuna ait grafik. a: UT MCF- 10A grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), b: Drox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), c: Abrox grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ), d: Atezo grubuna göre anlamlı değişim ( $p<0.001$ ).

#### 4.6. Oksidatif Stres Biyogöstergelerinin Değerlendirilmesi

Droxinostat, Nab-paklitaksel ve bu ajanların ikili kombinasyonlarının oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkilerini değerlendirilmesi amacıyla Total-Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Analizi gerçekleştirildi.

##### 4.6.1. Total-Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi Sonuçları

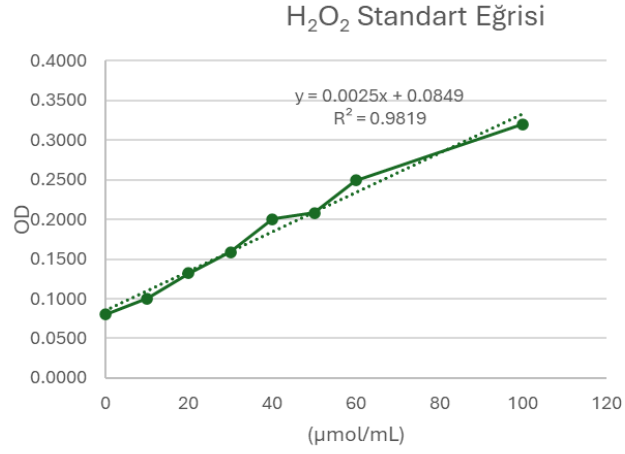
SOD analiz sonuçlarına göre, Droxinostat uygulanan grupta, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmezken, Nab-paklitaksel'in tek başına uygulandığında %SOD inhibisyon düzeyini 1.82 kat, Droxinostat ile kombinasyon halinde uygulandığında ise 2.22 kat anlamlı olarak artırdığı saptandı (Grafik 16,  $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ).



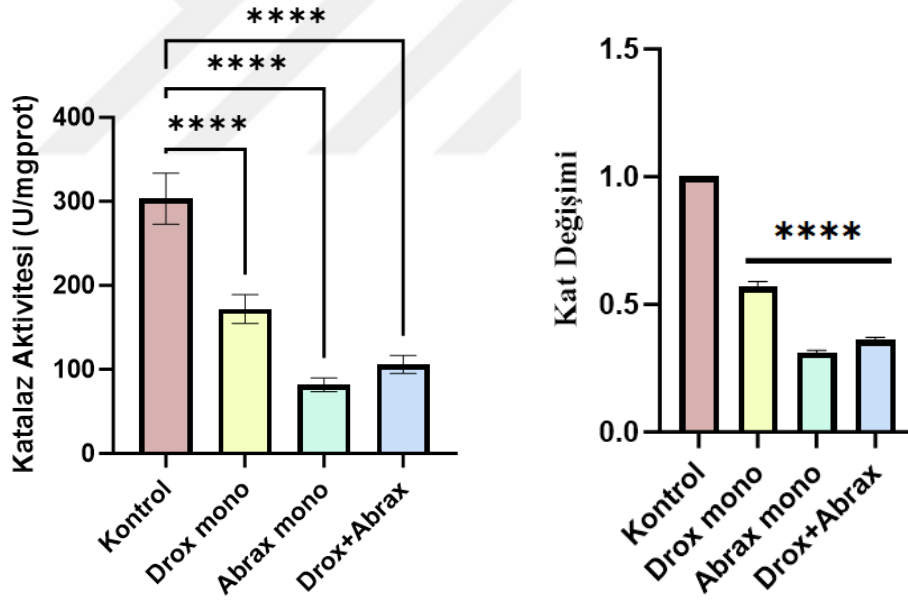
**Grafik 16.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve ikili kombinasyonlarının SOD düzeyi üzerindeki etkileri ve kat değişim grafiği (\*\*\*;  $p<0.001$ , \*\*\*\*; ( $p<0.0001$ ))

#### 4.6.2. Katalaz (CAT) Analizi Sonuçları

CAT analiz sonuçlarına göre, Droxinostat, Nab-paklitaksel ve bu ajanların ikili kombinasyonlarının uygulandığı gruplarda, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla CAT aktivitesini sırasıyla 1.76, 3.71 ve 2.86 kat düşürdüğü saptandı (Grafik 18,  $p<0.0001$ ). Katalaz  $H_2O_2$  standart eğrisine ait grafik ise Grafik 17’da gösterilmiştir.



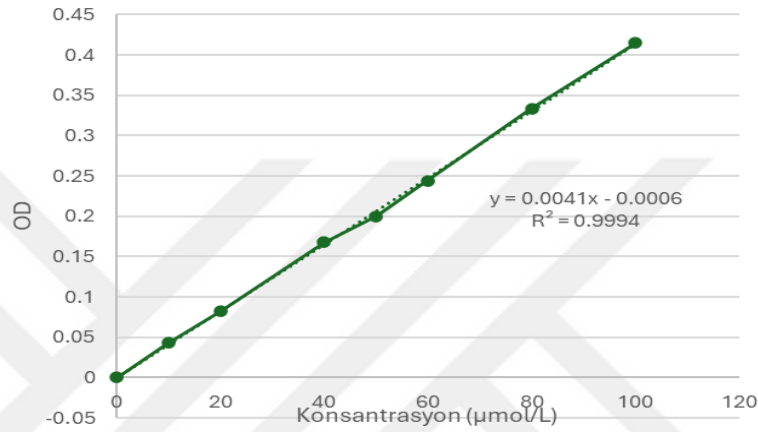
**Grafik 17.** Katalaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart eğrisi



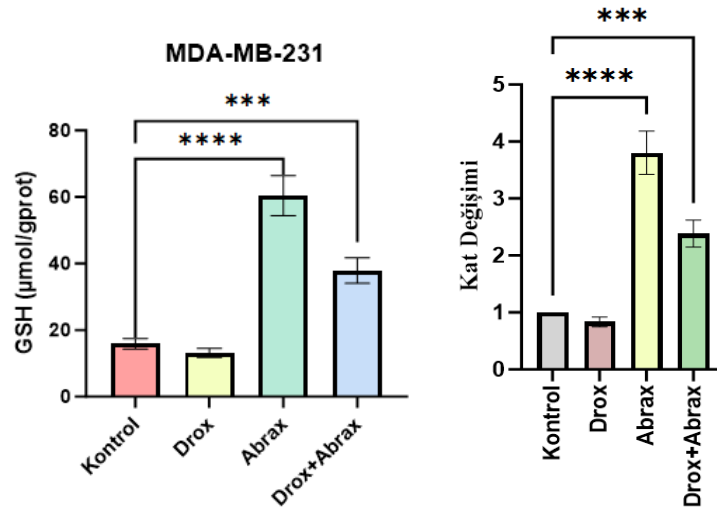
**Grafik 18.** Droxinostat, Nab-paklitaxel ve ikili kombinasyonlarının CAT aktivitesi üzerindeki etkileri ve kat değişim grafiği (\*\*\*\*; (p<0.0001)

#### 4.6.3. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Analizi Sonuçları

GSH analiz sonuçlarına göre, Droxinostat uygulanan grupta, ilaç uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmezken, Nab-paklitaksel'in tek başına uygulandığında GSH düzeyini 3.80 kat, Droxinostat ile kombinasyon halinde uygulandığında ise 2.38 kat anlamlı olarak artırdığı saptandı (Grafik 20,  $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ). GSH standart eğrisine ait grafik ise Grafik 19'da gösterilmiştir.



**Grafik 19.** İndirgenmiş Glutatyon standart eğrisi



**Grafik 20.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve ikili kombinasyonlarının GSH düzeyi üzerindeki etkileri ve kat değişim grafiği (\*\*\*;  $p<0.001$ , \*\*\*\*;  $p<0.0001$ )

#### 4.7. Gen Ekspresyon Analizleri

Droxinostat ve Nab-paklitaksel için belirlenen IC<sub>50</sub> ve ED<sub>50</sub> dozları ile Atezolizumab için 100 nm olarak belirlenen ve bu etken maddelerin hem tekli hem de kombinasyonel dozları MDA-MB-231 ve MCF-10A sağlıklı meme hücrelerine uygulanarak hücre büyümesi, proliferasyonu, kanser gelişimi gibi süreçlerde rol alan 26 gene ait ekspresyon analizi gerçekleştirildi. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler ise kontrol grubu olarak değerlendirildi. Hücrelere ilaç uygulamaları yapıldıktan 72 saat sonra hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Hedef genlerin analizi Light Cycler 480 cihazı ile gerçekleştirildi. Ekspresyon sonuçları housekeeping gen GAPDH'a göre normalize edilerek  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerlerine göre Log2 kat değişim oranları hesaplandı.

##### 4.7.1. Total RNA Konsantrasyon ve Saflık Değerleri

Hücrelere ilaçların uygulanması sonrasında izole edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık analizleri Nanodrop ND-100 spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Total RNA'lara ait sonuçlar Tablo 12 ve Tablo 13'de belirtilmiştir.

**Tablo 12.** MDA-MB-231 hücre hatlarına ait total RNA izolasyonu sonuçları

| Örnekler             | 260/280 OD | 260/230 OD | RNA Konsantrasyonu (ng/μL) |
|----------------------|------------|------------|----------------------------|
| UT                   | 2,1        | 2,06       | 1022,8                     |
| Nab-paklitaksel mono | 2,02       | 2,2        | 343,2                      |
| Droxinostat mono     | 2,06       | 2,17       | 96,5                       |
| Atezolizumab mono    | 2,09       | 2,17       | 1419,7                     |

| Örnekler                                    | 260/280 OD | 260/230 OD | RNA Konsantrasyonu (ng/μL) |
|---------------------------------------------|------------|------------|----------------------------|
| Droxinostat + Nab-paklitaksel               | 2,06       | 2,21       | 178,3                      |
| Droxinostat+ Atezolizumab                   | 2,05       | 2,09       | 108,6                      |
| Nab-paklitaksel + Atezolizumab              | 1,96       | 1,79       | 395                        |
| Droxinostat+ Nab-paklitaksel + Atezolizumab | 2,03       | 2,03       | 157,6                      |

**Tablo 13.** MCF-10A hücre hatlarına ait total RNA izolasyonu sonuçları

| Örnekler                      | 260/280 OD | 260/230 OD | RNA Konsantrasyonu (ng/μL) |
|-------------------------------|------------|------------|----------------------------|
| UT                            | 2,02       | 2,06       | 144,6                      |
| Nab-paklitaksel mono          | 2,05       | 1,79       | 90                         |
| Droxinostat mono              | 2,01       | 1,75       | 59,4                       |
| Atezolizumab mono             | 2,09       | 2,17       | 135,2                      |
| Droxinostat + Nab-paklitaksel | 2,02       | 1,88       | 71                         |

|                                                 |      |      |      |
|-------------------------------------------------|------|------|------|
| Droxinostat+ Atezolizumab                       | 2,01 | 2,02 | 60,1 |
| Nab-paklitaksel +<br>Atezolizumab               | 2,06 | 1,92 | 92,4 |
| Droxinostat+ Nab-<br>paklitaksel + Atezolizumab | 2,03 | 2,01 | 59,9 |

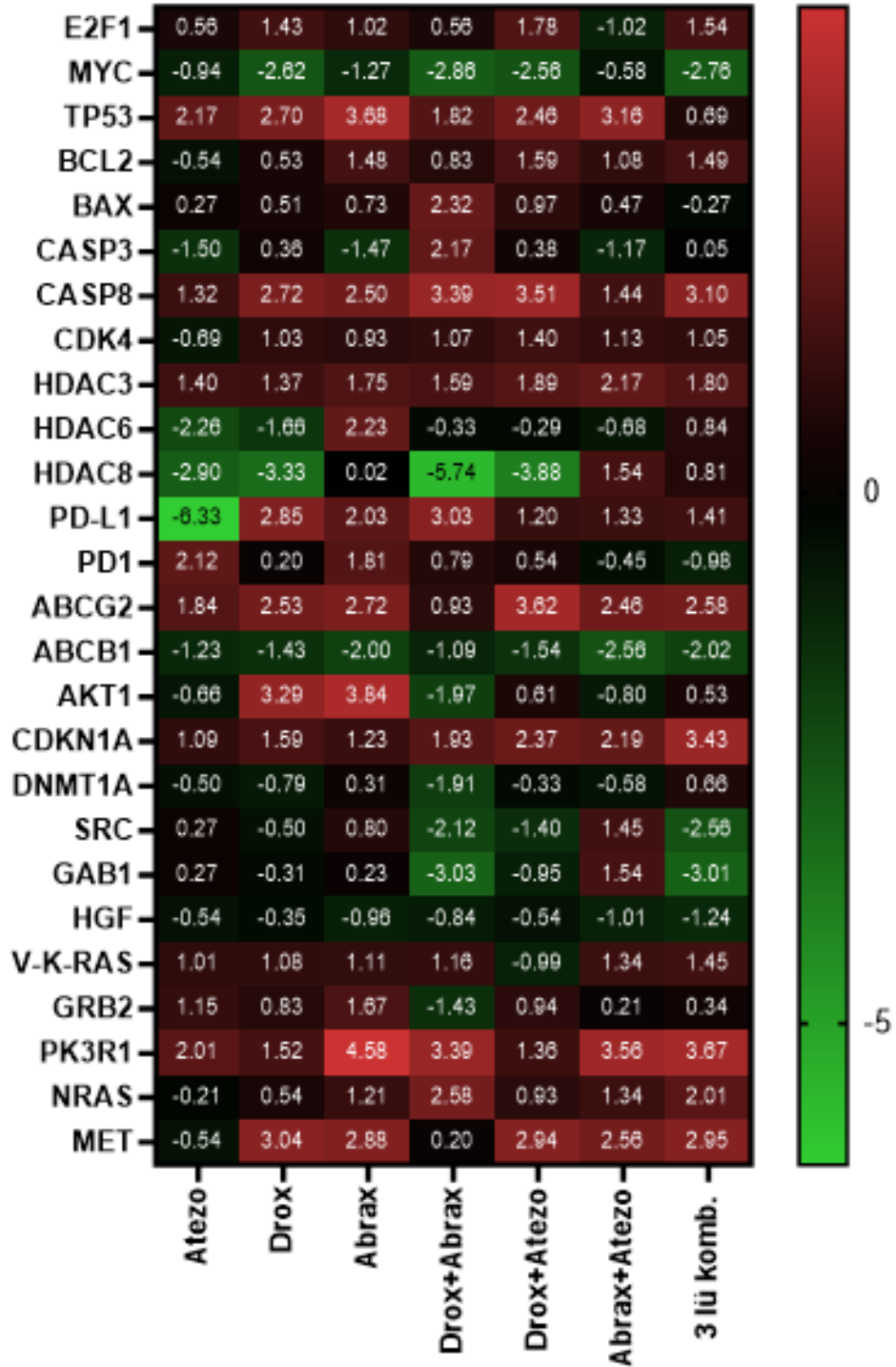
#### 4.7.2. MDA-MB-231 ve MCF-10A Hücre Hattında Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab ve Kombinasyonlarının Gen Ekspresyon Analizleri

Karsinogenez sürecinde rol oynayan 26 adet genin ekspresyon analizi sonuçlarına ait Log2 kat değişimleri tablosu ile ısı haritaları Tablo 14, Tablo 15, Grafik 21 ve Grafik 22’de toplu olarak gösterilmiştir.

**Tablo 14.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen genlerin ekspresyon kat değişimleri

| MDA-MB-231 |       | Log2 Kat Değişimi |       |              |             |               |                      |
|------------|-------|-------------------|-------|--------------|-------------|---------------|----------------------|
| Genler     | Atezo | Drox              | Abrax | Drox + Abrax | Drox+ Atezo | Abrax + Atezo | Drox + Abrax + Atezo |
| E2F1       | 0,56  | 1,43              | 1,02  | 0,56         | 1,78        | -1,02         | 1,54                 |
| MYC        | -0,94 | -2,62             | -1,27 | -2,86        | -2,56       | -0,58         | -2,76                |
| TP53       | 2,17  | 2,70              | 3,68  | 1,82         | 2,46        | 3,16          | 0,69                 |
| BCL2       | -0,54 | 0,53              | 1,48  | 0,83         | 1,59        | 1,08          | 1,49                 |
| BAX        | 0,27  | 0,51              | 0,73  | 2,32         | 0,97        | 0,47          | -0,27                |
| CASP3      | -1,50 | 0,36              | -1,47 | 2,17         | 0,38        | -1,17         | 0,05                 |
| CASP8      | 1,32  | 2,72              | 2,50  | 3,39         | 3,51        | 1,44          | 3,10                 |
| CDK4       | -0,69 | 1,03              | 0,93  | 1,07         | 1,40        | 1,13          | 1,05                 |
| HDAC3      | 1,40  | 1,37              | 1,75  | 1,59         | 1,89        | 2,17          | 1,80                 |
| HDAC6      | -2,26 | -1,66             | 2,23  | -0,33        | -0,29       | -0,68         | 0,84                 |
| HDAC8      | -2,90 | -3,33             | 0,02  | -5,74        | -3,88       | 1,54          | 0,81                 |
| PD-L1      | -6,33 | 2,85              | 2,03  | 3,03         | 1,20        | 1,33          | 1,41                 |
| PD1        | 2,12  | 0,20              | 1,81  | 0,79         | 0,54        | -0,45         | -0,98                |
| ABCG2      | 1,84  | 2,53              | 2,72  | 0,93         | 3,62        | 2,46          | 2,58                 |
| ABCB1      | -1,23 | -1,43             | -2,00 | -1,09        | -1,54       | -2,56         | -2,02                |
| AKT1       | -0,66 | 3,29              | 3,84  | -1,97        | 0,61        | -0,80         | 0,53                 |
| CDKN1A     | 1,09  | 1,59              | 1,23  | 1,93         | 2,37        | 2,19          | 3,43                 |
| DNMT1A     | -0,50 | -0,79             | 0,31  | -1,91        | -0,33       | -0,58         | 0,66                 |
| SRC        | 0,27  | -0,50             | 0,80  | -2,12        | -1,40       | 1,45          | -2,56                |
| GAB1       | 0,27  | -0,31             | 0,23  | -3,03        | -0,95       | 1,54          | -3,01                |
| HGF        | -0,54 | -0,35             | -0,96 | -0,84        | -0,54       | -1,01         | -1,24                |
| V-K-RAS    | 1,01  | 1,08              | 1,11  | 1,16         | -0,99       | 1,34          | 1,45                 |
| GRB2       | 1,15  | 0,83              | 1,67  | -1,43        | 0,94        | 0,21          | 0,34                 |
| PK3R1      | 2,01  | 1,52              | 4,58  | 3,39         | 1,36        | 3,56          | 3,67                 |
| NRAS       | -0,21 | 0,54              | 1,21  | 2,58         | 0,93        | 1,34          | 2,01                 |
| MET        | -0,54 | 3,04              | 2,88  | 0,20         | 2,94        | 2,56          | 2,95                 |

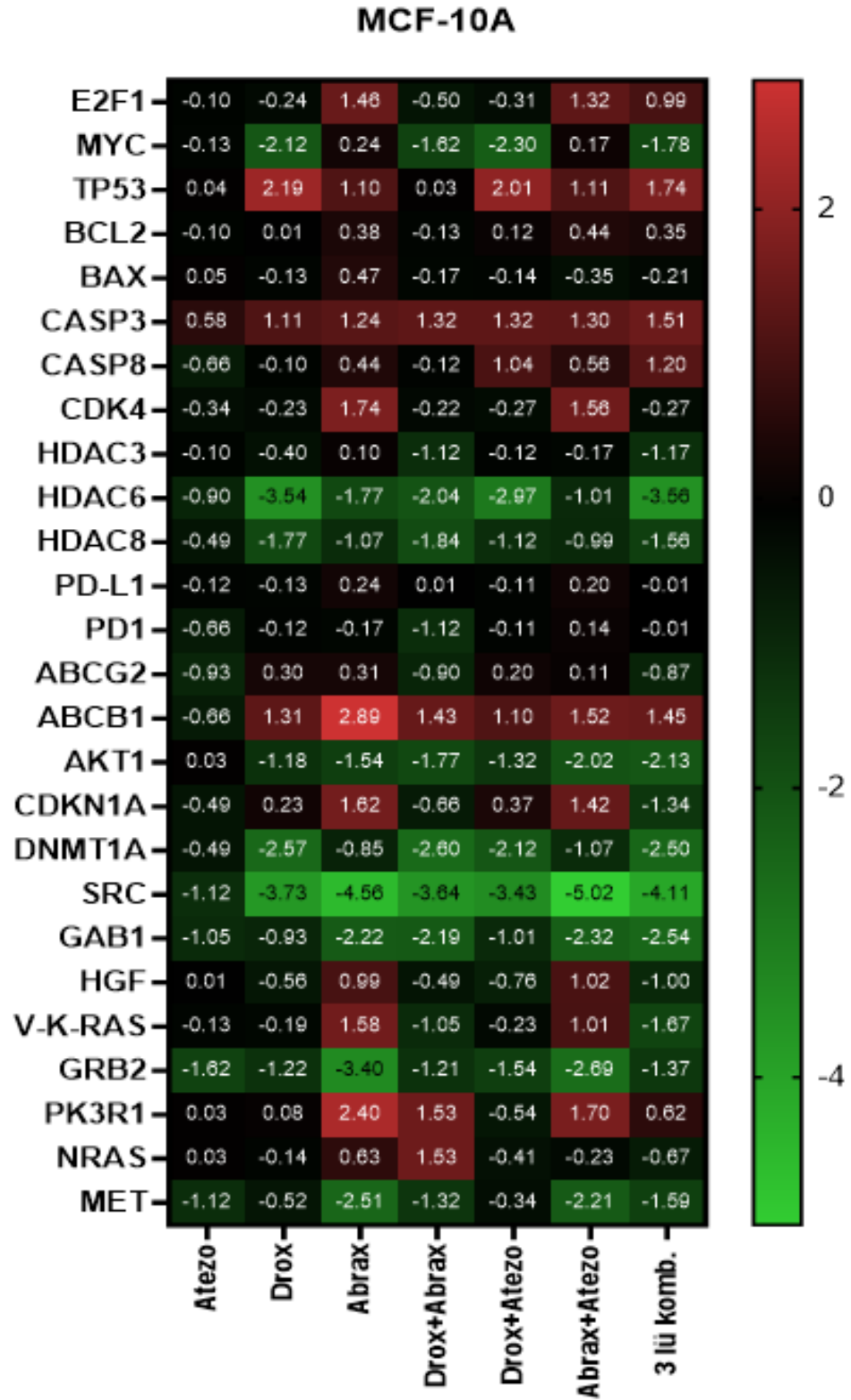
## MDA-MB-231



**Grafik 21.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 hücre hattında 72. saatteki ekspresyon değişimlerine ait ısı haritası

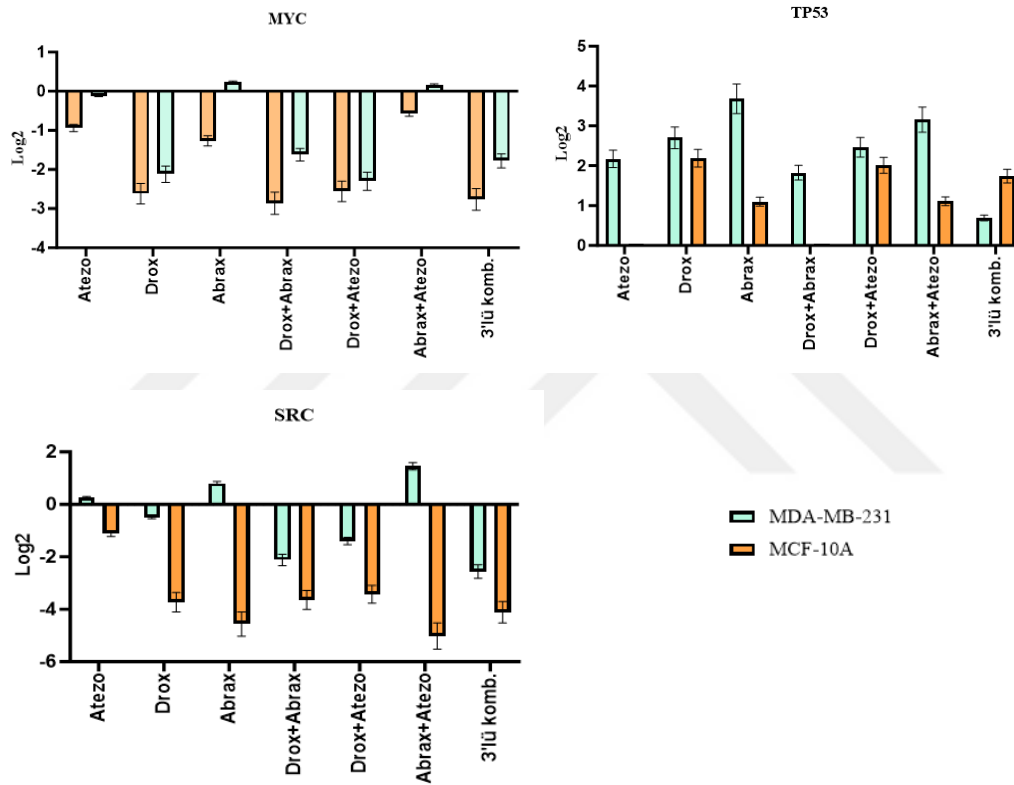
**Tablo 15.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen genlerin ekspresyon kat değişimleri

| MCF-10A |       | Log2 Kat Değişimi |       |              |              |               |                      |
|---------|-------|-------------------|-------|--------------|--------------|---------------|----------------------|
| Genler  | Atezo | Drox              | Abrax | Drox + Abrax | Drox + Atezo | Abrax + Atezo | Drox + Abrax + Atezo |
| E2F1    | -0,10 | -0,24             | 1,46  | -0,50        | -0,31        | 1,32          | 0,99                 |
| MYC     | -0,13 | -2,12             | 0,24  | -1,62        | -2,30        | 0,17          | -1,78                |
| TP53    | 0,04  | 2,19              | 1,10  | 0,03         | 2,01         | 1,11          | 1,74                 |
| BCL2    | -0,10 | 0,01              | 0,38  | -0,13        | 0,12         | 0,44          | 0,35                 |
| BAX     | 0,05  | -0,13             | 0,47  | -0,17        | -0,14        | -0,35         | -0,21                |
| CASP3   | 0,58  | 1,11              | 1,24  | 1,32         | 1,32         | 1,30          | 1,51                 |
| CASP8   | -0,66 | -0,10             | 0,44  | -0,12        | 1,04         | 0,56          | 1,20                 |
| CDK4    | -0,34 | -0,23             | 1,74  | -0,22        | -0,27        | 1,56          | -0,27                |
| HDAC3   | -0,10 | -0,40             | 0,10  | -1,12        | -0,12        | -0,17         | -1,17                |
| HDAC6   | -0,90 | -3,54             | -1,77 | -2,04        | -2,97        | -1,01         | -3,56                |
| HDAC8   | -0,49 | -1,77             | -1,07 | -1,84        | -1,12        | -0,99         | -1,56                |
| PD-L1   | -0,12 | -0,13             | 0,24  | 0,01         | -0,11        | 0,20          | -0,01                |
| PD1     | -0,66 | -0,12             | -0,17 | -1,12        | -0,11        | 0,14          | -0,01                |
| ABCG2   | -0,93 | 0,30              | 0,31  | -0,90        | 0,20         | 0,11          | -0,87                |
| ABCB1   | -0,66 | 1,31              | 2,89  | 1,43         | 1,10         | 1,52          | 1,45                 |
| AKT1    | 0,03  | -1,18             | -1,54 | -1,77        | -1,32        | -2,02         | -2,13                |
| CDKN1A  | -0,49 | 0,23              | 1,62  | -0,66        | 0,37         | 1,42          | -1,34                |
| DNMT1A  | -0,49 | -2,57             | -0,85 | -2,60        | -2,12        | -1,07         | -2,50                |
| SRC     | -1,12 | -3,73             | -4,56 | -3,64        | -3,43        | -5,02         | -4,11                |
| GAB1    | -1,05 | -0,93             | -2,22 | -2,19        | -1,01        | -2,32         | -2,54                |
| HGF     | 0,01  | -0,56             | 0,99  | -0,49        | -0,76        | 1,02          | -1,00                |
| V-K-RAS | -0,13 | -0,19             | 1,58  | -1,05        | -0,23        | 1,01          | -1,67                |
| GRB2    | -1,62 | -1,22             | -3,40 | -1,21        | -1,54        | -2,69         | -1,37                |
| PK3R1   | 0,03  | 0,08              | 2,40  | 1,53         | -0,54        | 1,70          | 0,62                 |
| NRAS    | 0,03  | -0,14             | 0,63  | 1,53         | -0,41        | -0,23         | -0,67                |
| MET     | -1,12 | -0,52             | -2,51 | -1,32        | -0,34        | -2,21         | -1,59                |



**Grafik 22.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MCF-10A hücre hattında 72. saatteki ekspresyon değişimlerine ait ısı haritası

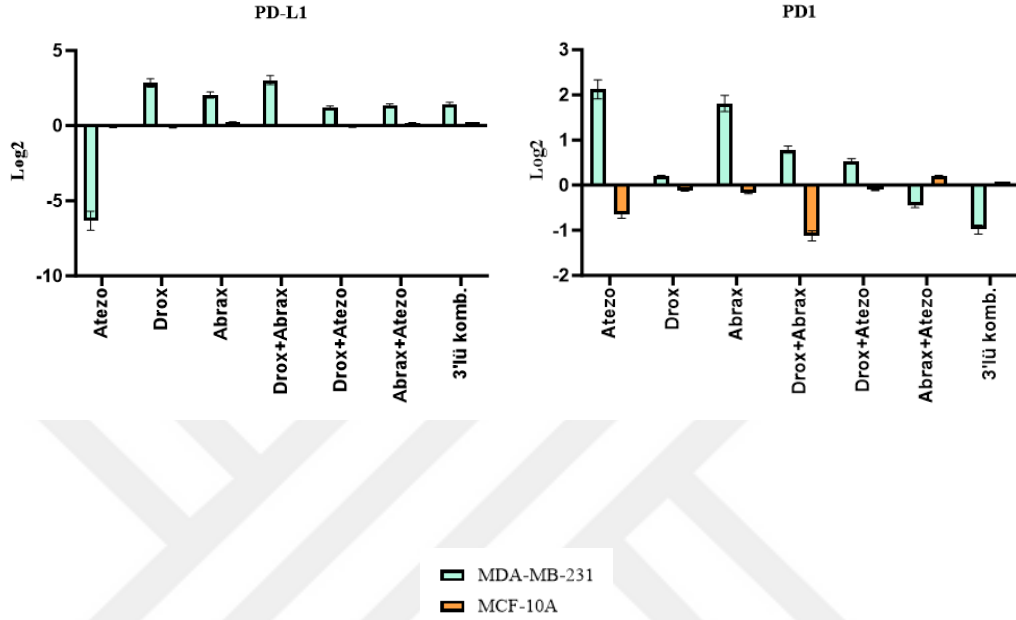
Gen ekspresyon analizleri sonucunda, ajanların SRC ve MYC onkogenlerinin ifadesini azaltırken TP53 ifadesini artırmıştır. Droxinostat'ın mono ve kombinasyon dozları hem MCF-10A hem de MDA-MB-231 hücrelerinde MYC ifadesini azaltmıştır. Droxinostat ve Nab-paklitaksel'in MCF-10A hücrelerinde SRC ifadesi azalırken MDA-MB-231 hücrelerinde sadece Droxinostat kombinasyon dozlarında azalmıştır. Ayrıca TP53 geninin ifadesi MDA-MB-231 hücrelerinde artmış, MCF-10A'da ise Droxinostat'ın mono dozunda artış göstermiştir (Grafik 23).



**Grafik 23.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen MYC, SRC VE TP53 genlerinin ekspresyon kat değişimleri

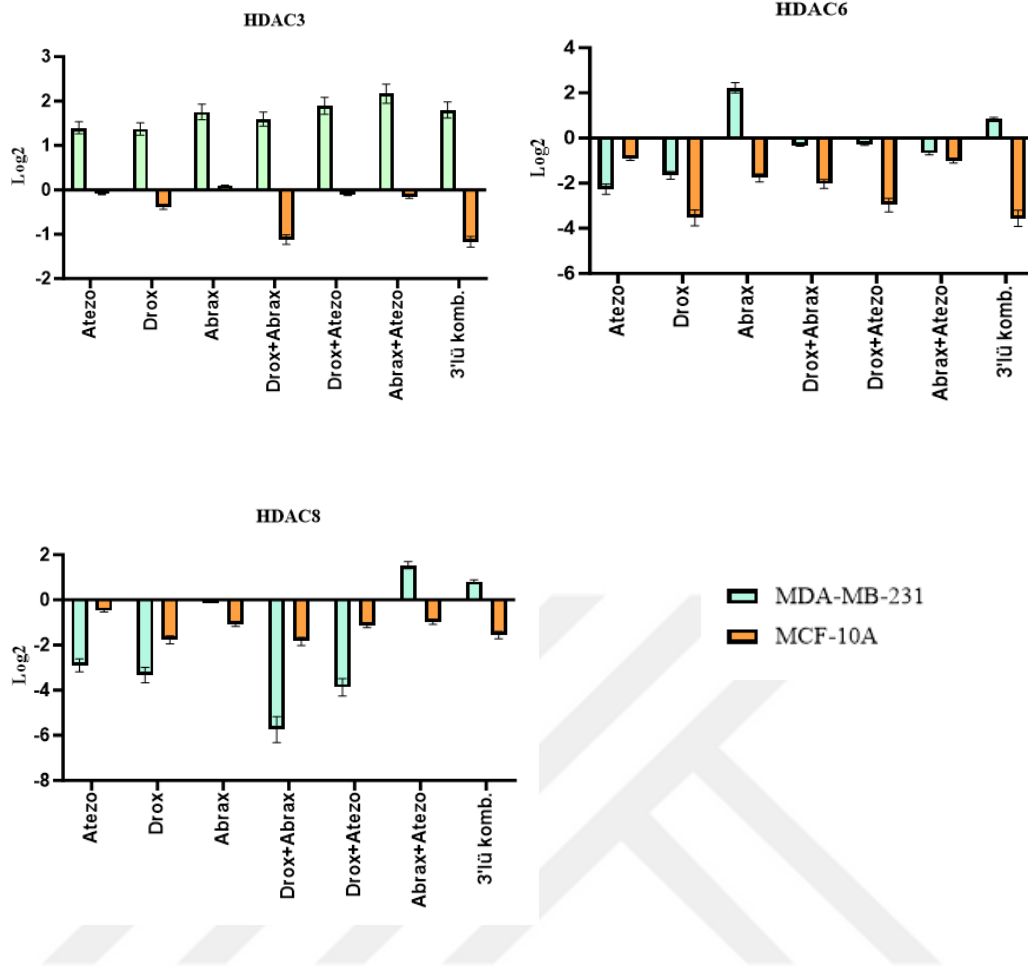
İmmün kontrol nokası ile ilişkili genlerden PD-L1 ve PD1 ifadeleri analiz sonuçlarına göre, Atezolizumab MDA-MB-231 hücrelerinde PD-L1 ifadesini 6,33 kat azaltmıştır.

Bununla birlikte PD-L1 ifadesi Droxinostat ile 2,85 kat, Nab-paklitaksel ile 2.03 ve Droxinostat-Nab-paklitaksel kombinasyonu ile 3,03 kat artmıştır. Atezolizumab ve Nab-paklitaksel uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ise PD-1 ifadesi yaklaşık 2 kat artmıştır (Grafik 24).



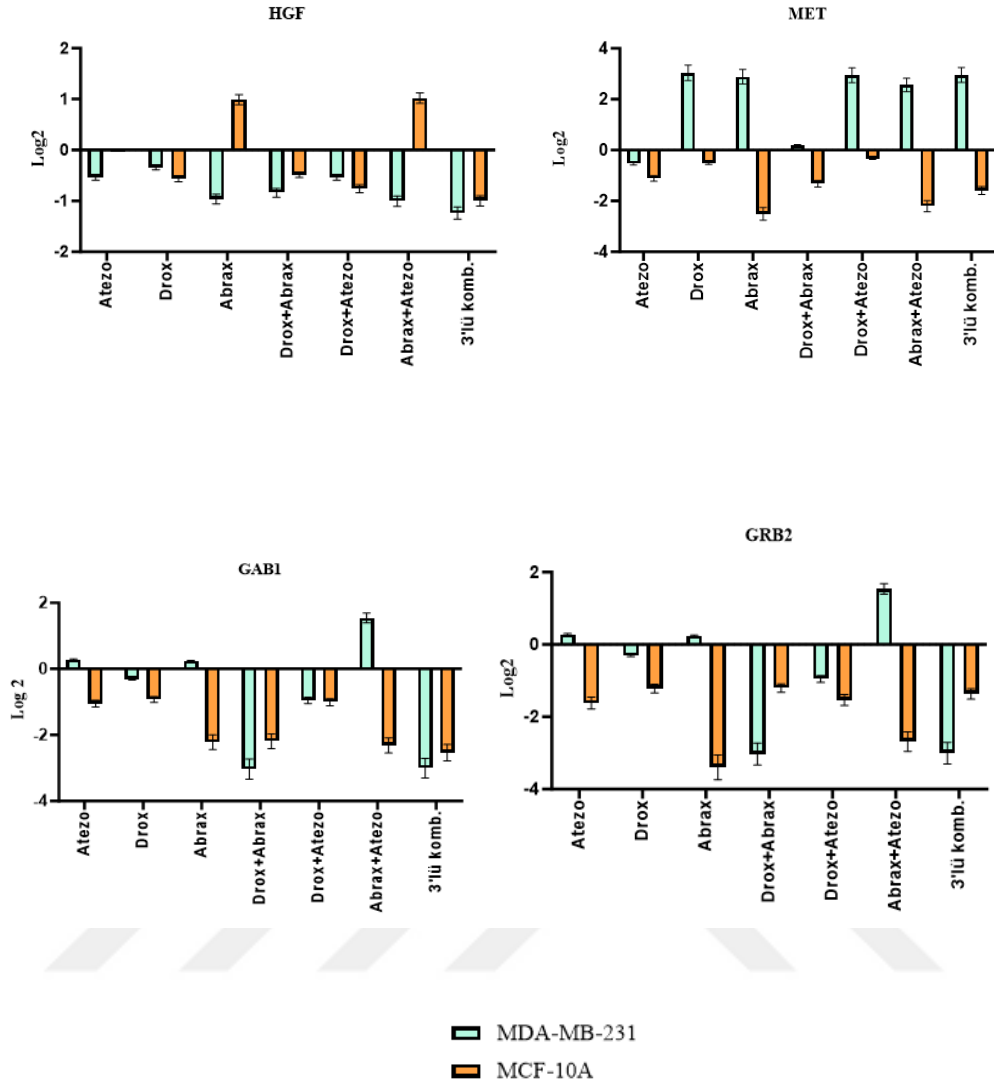
**Grafik 24.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen PD-1 ve PD-L1 genlerinin ekspresyon kat değişimleri

Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab uygulanan hücrelerde HDAC3 ifadesinde her iki hücre hattında da anlamlı bir fark görülmedi. MCF-10A hücrelerinde HDAC 6 ifadesinin, Droxinostat uygulanan tüm hücrelerde azalmış ancak MDA-MB-231 hücrelerinde sadece Droxinostat ve Atezolizumab dozlarında minimal bir azalış olmakla beraber Nab-paklitaksel uygulanan hücrelerde ise HDAC6 ifadesi artmıştır. MCF-10A hücrelerinde ise HDAC8 ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmamakla birlikte, MDA-MB-231 hücrelerinde Atezolizumab uygulanan hücrelerde 3 kat, Droxinostat dozunda 3,5 kat, Droxinostat-Nab-paklitaksel kombinasyonunda 5,74 kat ve Droxinostat-Nab-paklitaksel kombinasyonunda ise 3.87 kat azalmıştır (Grafik 25).



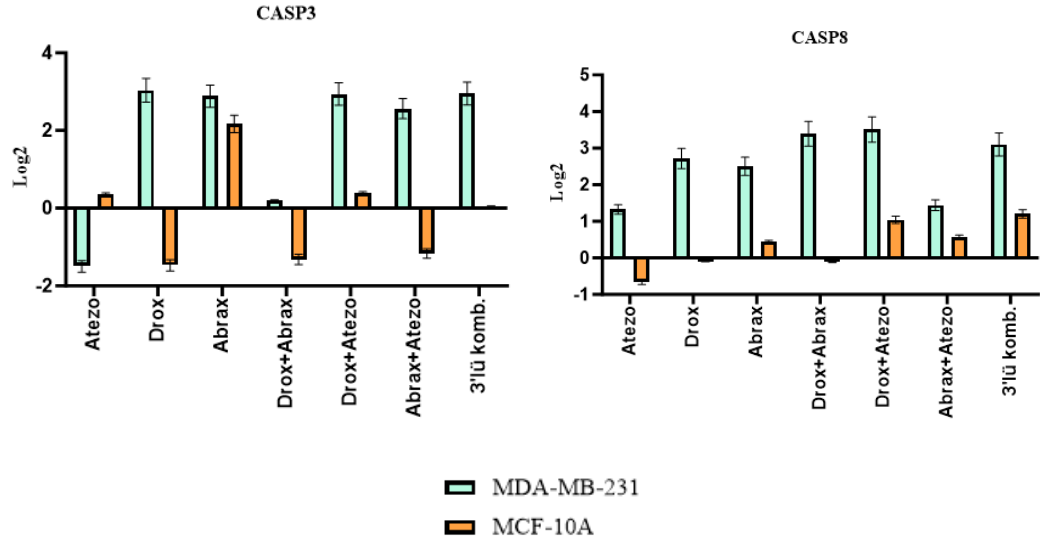
**Grafik 25.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen HDAC 2, HDAC6 ve HDAC8 genlerinin ekspresyon kat değişimleri

Ajanların HGF, MET, GAB1 ve GRB2 genleri üzerindeki etkisi hem ÜNМК hem de sağlıklı meme hücrelerinde değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinde MET ifadesi artarken MCF-10A'da azalmıştır. Buna karşın GAB1 ve GRB2 ifadelerinin de her iki hücre hattında özellikle Droxinostat-Nab-paklitaksel ve 3 lü kombinasyon dozlarında anlamlı azalış göstermiştir (Grafik 26).



**Grafik 26.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen HGF, MET, GAB1 ve GRB2 genlerinin ekspresyon kat değişimleri

Droxinostat, Nab-paklitaksel, Atezolizumab ve kombinasyonlarının MCF-10A hücrelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmazken MDA-MB-231 hücrelerinde hem kaspaz 3 hem de kaspaz8'in ifadesini artırdığı belirlenmiştir (Grafik 27).



**Grafik 27.** Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab etken maddelerinin tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hattında 72. saatteki GAPDH'a göre normalize edilen CASP3 ve CASP8 genlerinin ekspresyon kat değişimleri

## Tartışma

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), östrojen ve progesteron hormon reseptörlerini ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'yi (HER2) eksprese etmeyen bir meme kanseri alt tipidir. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sini oluşturan ÜNMK, yüksek heterojeniteye, yüksek tümör mutasyon yüküne ve metastaz yapma olasılığına sahip olup, genellikle kötü bir prognoza sahiptir. Metastatik ÜNMK'li hastalar için ortalama genel sağkalım süresi yaklaşık 18 ayardır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2020; Michel vd., 2020).

ÜNMK, hormon tedavilerine ve HER2 hedefli terapilere yanıt vermemekte olup, tedavide ilk seçenek olarak kemoterapi kullanılmaktadır. ÜNMK hastalarının yaklaşık %20'si standart tedavilere (tümör rezeksiyonu, radyoterapi ve kemoterapi) iyi yanıt verirken, geri kalan hastalarda metastaz gelişimi nedeniyle hastalık ölümcül hale gelmektedir. ÜNMK'nin yüksek tümör heterojenitesi ve kanser hücrelerindeki yüksek mutasyon yükü, kemoterapötik ilaçlara karşı kemorezistansın gelişmesine yol açmaktadır. Bu nedenle, kemorezistansı aşmak amacıyla alternatif tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır (Nath vd., 2022, Vagia vd., 2020).

ÜNMK hastalarının yaklaşık %20'si PD-L1 ekspresyonu göstermektedir. PD-L1, kanser hücrelerinde eksprese edilen bir ligand olup, T hücreleri üzerindeki PD-1 reseptörüne bağlanarak T hücre proliferasyonunu engeller ve bu sayede immün kaçışa yol açar. T hücre proliferasyonunu artırmak, tümör hücrelerinin immün gözetimden kaçmalarını önlemek ve antitümör yanıtları güçlendirmek amacıyla immün kontrol noktası inhibitörleri, birçok solid tümörde kullanılmaktadır (He vd., 2021; Akkoi vd., 2022; Emiloju ve Sinicrope, 2023; Conroy vd., 2023).

Bir Faz 3 klinik çalışmasının sonuç raporunda, PD-L1 ekspresyonu olan ÜNMK hastalarında, Nab-paklitaksel ile PD-L1 inhibitörlerinin kombinasyonunun sağkalımı uzattığı bildirilmiş ve bu kombinasyon tedavisi FDA tarafından tedavi protokollerine dahil edilmiştir (Schmid vd., 2020; Keenan&Tolaney, 2020). Ancak, bu tedavi protokolü sınırlı bir hasta grubunda fayda sağlamış olsa da, hastaların çoğunda zamanla ilaç direnci gelişmiş ve tedavi yetersiz kalmıştır (Miles vd., 2021). İmmünoterapinin sınırlı etkinlik göstermesinin en önemli nedenlerinden biri, immünosupresif tümör mikroçevresidir. Bu nedenle, baskılayıcı etkileri ortadan

kaldırmak ve T hücresi aktivasyonunu desteklemek amacıyla daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, epigenetik düzenlemede merkezi öneme sahip enzimler olup, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, epitelyal-mezenkimal geçişin regülasyonu, proliferasyon, invazyon, migrasyon ve hücre adezyonunun inhibisyonu gibi kritik biyolojik süreçlerde rol oynar. Ayrıca, immünosupresif tümör mikroçevresinin modülasyonunda önemli işlevler üstlenirler. HDAC inhibitörleri, kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek amacıyla sıklıkla kombinasyon tedavilerinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, tümör mikroçevresinde immünosupresif hücrelerin infiltrasyonunu azaltarak ve T hücre aktivasyonunu destekleyerek, immün kontrol noktası inhibitörlerine karşı gelişen direnç mekanizmalarını önleyebilir ve tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahiptirler (Ramaiah vd., 2021; Shanmugam vd., 2022).

HDAC 6 ve 8'in aşırı ekspresyonunun, meme kanserinin invazyonu ve progresyonunda kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Menbari vd., 2020; Park vd., 2011). HDAC inhibitörü Droxinostat, özellikle HDAC 3, 6 ve 8'i hedefleyerek inhibe ederken, aynı zamanda antiapoptotik bir protein olan c-FLIP'in baskılanmasına neden olmaktadır. Ayrıca, Droxinostat'ın hücrelerde oksidatif stres yaratarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine ve dolayısıyla hücre ölümünün indüklenmesine yol açtığı bildirilmiştir (Schimmer vd. 2006; Huang vd., 2018; Vishehsaraei vd., 2010). Literatürde çeşitli HDAC inhibitörleri üzerine birçok çalışma bulunmasına rağmen, Droxinostat üzerine yapılan araştırmalar sınırlıdır ve Droxinostat'ın ÜNMK hücrelerini hedefleyen herhangi bir preklinik veya klinik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, Droxinostat'ın meme kanseri patogenezindeki rolünü ilk kez incelenerek, metastatik üçlü negatif meme kanseri tedavisinde konvansiyonel yaklaşımlara ek olarak kullanılabilecek potansiyel bir epigenetik ajanın olası sinerjistik etkilerini belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, çalışmamızda, epigenetik regülatörlerden biri olan HDAC inhibitörü Droxinostat'ın, hem tek başına hem de immünoterapötik ajan PD-L1 inhibitörü Atezolizumab ve konvansiyonel kemoterapötik ajan Nab-paklitaksel ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının ÜNMK ve sağlıklı meme hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

HT-29 kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre, Droxinostat'ın farklı dozları bu hücrelere uygulanarak 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MTT testi ile sitotoksisite analizi yapılmıştır. Buna göre, Droxinostat'ın HT-29 kolon kanseri hücrelerindeki IC<sub>50</sub> değeri 21 µM olarak bulunmuştur (Huang vd., 2018). Başka bir çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 72 saatlik ilaç uygulama süresi sonunda IC<sub>50</sub> değeri 30 µM olarak belirlenmiştir (Vishehsaraei vd., 2010). Tez çalışmamız kapsamında ise öncelikle sitotoksisite analizlerinde kullanılacak optimal hücre sayısının belirlenmesi amacıyla proliferasyon analizi gerçekleştirilmiş ve MDA-MB-231 ve MCF-10 optimal hücre sayıları sırasıyla 15000 hücre/100ul ve 12500 hücre/100ul olarak hesaplandı (Grafik 1 ve Grafik 2). Sitotoksisite analizleri sonucunda Droxinostat'ın, MDA-MB-231 hücrelerindeki 72.h IC<sub>50</sub> dozu 60µM iken, MCF-10A hücrelerinde ise 190µM olarak belirlendi (Grafik 3 ve Grafik4). Droxinostat'ın sağlıklı hücrelerdeki IC<sub>50</sub> dozunun kanser hücrelerine göre üç kat daha yüksek olması, bu bileşiğin potansiyel bir antikanser ajanı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu bulgu, Droxinostat'ın kanser hücrelerini etkili bir şekilde hedef alırken, sağlıklı hücreler üzerinde daha az toksik etki oluşturabileceğini öne sürmektedir. Bu nedenle, Droxinostat'ın kanser tedavisinde seçici bir ajan olarak kullanımı, ileri preklinik ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

Nab-paklitaksel, mevcut tedavi protokollerine girmiş ve metastatik ÜNMK tedavisinde de kullanılan bir ajandır. Çalışmamızda Nab-paklitaksel'in MDA-MB-231 hücrelerinde IC<sub>50</sub> dozu 0,58µM iken MCF-10A hücrelerinde ise 0,16 µM olarak bulunmuştur (Grafik 5 ve Grafik 6). Kombinasyon analizine göre ise 0,600 fraksiyonda etkilenen hücrelerde, Droxinostat için 48µM, Nab-paklitaksel için ise 0,28 µM dozunun CI indeksi 0,808 yani ılımlı sinerjistik etkide olduğu bulundu ve kombinasyon analizlerine ise bu dozlar ile devam edildi (Grafik 7).

Atezolizumab'ın hem monoterapi olarak hem de kombinasyon tedavisi şeklinde MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine uygulanması sonucunda, beklenildiği gibi bu hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Sitotoksik etkinin gözlenmemesinin, iki boyutlu hücre kültürü ortamında bağışıklık hücrelerinin bulunmaması ve dolayısıyla T hücre aktivasyonunun sağlanamaması nedeniyle ilacın etkisini tam olarak gösterememesiyle ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Bu durum, Atezolizumab'ın etkisinin doğru şekilde değerlendirilmesi için bağışıklık hücrelerini

içeren daha kompleks modellerin kullanılmasının gerekliliğine işaret etmektedir. Ayrıca, ilaçların birbirleriyle olan etkileşimlerini ve hücreler üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, literatürdeki referanslar doğrultusunda 100 nM Atezolizumab dozu ile Droxinostat ve Nab-paklitaksel'in hem tekli IC<sub>50</sub> dozları hem de ikili kombinasyon dozlarına ait ED<sub>50</sub> dozları kullanılarak üçlü kombinasyon analizleri gerçekleştirilmiştir (Quagliariello vd., 2024). Bu analizlerin sonucunda, Atezolizumab'ın ne Droxinostat ne de Nab-paklitaksel ile, ayrıca bu ilaçların ikili kombinasyonlarıyla etkileşime girmediği ve hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenle, apoptoz ve gen ekspresyonu çalışmalarında literatürde önerilen 100 nM Atezolizumab dozu kullanılmıştır.

Droxinostat'ın anti-apoptotik gen olan c-flip ekspresyonunu selektif olarak baskılayarak prostat kanseri PPC-1 hücrelerini FAS ve TRAIL reseptörlerine duyarlı hale getirerek apoptozu indüklediği, düşük c-flip ifadesi ile yüksek kaspaz 8 ifadesinin apoptozu artırdığı gösterilmiştir (Schimmer vd. 2006). Başka bir çalışmada ise, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde c-flip mRNA ve protein düzeylerini inhibe ettiği ve DNA onarımı, genomik stabilite ve apoptozda rol oynayan Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) degradasyonuna neden olduğu, hücre sağ kalımını azalttığı ve apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Vishehsaraei vd., 2010). HDAC inhibisyonu ile ekstrinsik apoptotik yolda hücre yüzeyindeki Tümör Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkili Apoptozu İndükleyen Ligand TRAIL) ve ilgili reseptörler aktive edilerek ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna neden olmakta ve kaspaz 8 aktivasyonuna sonucunda apoptoz gerçekleşmektedir (Hurwitz vd., 2012).

Çalışmamızın apoptoz analizi sonuçlarına göre ise, MDA-MB-231 hücrelerinde Droxinostat'ın mono ve kombinasyon dozlarının diğer ajanların mono ve kombinasyon dozlarına göre apoptozu ve nekroptozu 5-6 kat daha fazla artırırken ( $p<0.0001$ ), MCF-10A hücrelerinde ise sadece nekrozu artırmıştır ( $p<0.0001$ ). Droxinostat hem apoptoz hem de nekroz yollarını aktive ederek hücre ölümüne neden olmuştur (Şekil 13, Şekil 14, Grafik 8, Grafik 9,  $p<0.0001$ ). Çalışmamızın bulguları, literatüre ilk kez katkı sağlayacak nitelikte olup, daha önce ÜNMK hücrelerinde ve sağlıklı meme hücrelerinde Droxinostat'ın apoptotik etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, elde ettiğimiz veriler, Droxinostat'ın ÜNMK tedavisindeki potansiyel rolünü anlamada önemli bir adım teşkil etmektedir.

Gelecek çalışmalarda, Droxinostat'ın sadece apoptotik etkileri değil, aynı zamanda nekroptoz üzerindeki etkilerinin de detaylı olarak incelenmesi planlanmaktadır. Bu çalışmalar, Droxinostat'ın kanser tedavisindeki terapötik potansiyelini daha iyi anlamak için kritik öneme sahip olacaktır.

HDAC inhibitörleri, hücre döngüsünü duraklatan ve apoptozu teşvik eden birkaç mekanizma aracılığıyla etkili olur. Özellikle, p21 (CDKN1A) gibi hücre döngüsü genlerinin ekspresyonunu artırarak, siklin ve siklin bağımlı kinaz dimerlerinin oluşumunu engellerler. Ayrıca p53'ün asetilasyonunu ve p21 promotörü ile etkileşimini artırarak p21 seviyelerini yükseltir. Siklin D ve A'nın ekspresyonunu inhibe ederek CDK2 ve CDK4'ün aktivitelerini azaltır ve RUNX3'ün stabilitesini artırarak p21 ve anti-apoptotik Bim üretimini teşvik eder. Bu mekanizmalar ile HDAC inhibitörlerinin hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozu artırarak kanser hücrelerinin büyümesini engellediği bildirilmiştir (Eckschlager vd., 2017). HDAC inhibitörlerinin, hücre döngüsünü sıklıkla G2/M fazında durdurduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Dong vd., 2017; Alqosaibi vd., 2023, Sun vd., 2017, Hoffmann vd., 2021). Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücrelerinde Droxinostat'ın mono, 2 ve 3 lü kombinasyon dozlarının hücre döngüsünü S ve G2/M fazında daha fazla durdurduğu saptandı. Nab-paklitaksel'in ise Paklitaksel analogu olarak mitotik blokaja neden olduğu bilinmektedir (Sui vd., 2004; Gallego-Jara vd., 2020). Bu nedenle hücrelerin G2/M fazında tutulduğu beklenmekteydi. Çalışmamızın sonuçlarına göre de Nab-paklitaksel uygulanan mono ve kombinasyon dozlarında, diğer gruplara göre daha fazla M fazında hücre tutulması saptandı (Şekil 15 ve Grafik 10,  $p < 0.0001$ ). Sağlıklı meme hücrelerinde ise ilaçların mono ve kombinasyon dozlarının kontrol grubuna göre döngüsü üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Şekil 16 ve Grafik 11). Bu durum ajanların kanser hücrelerine selektif özellikte olduğunu göstermektedir.

Kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yetenekleri, tedavi başarısını belirleyen en kritik özelliklerden biridir. Bu nedenle, etkili bir antikanser ajanın kanser hücrelerinin bu yeteneklerini önemli ölçüde azaltması beklenir (Krakhmal vd., 2015). Droxinostat ve Nab-paklitaksel'in tek başına ve kombinasyon halinde yüksek invazyon kapasitesine sahip MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, her iki ilacın da invazif hücre sayısını anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular,

her iki ilacın da hem monoterapi hem de kombinasyon tedavisi olarak kanser hücrelerinin invazyon kapasitesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir ( $p<0.01$ , Şekil 18, Grafik 13). Ayrıca, yara iyileşme deneyi sonuçları da invazyon deneyleriyle tutarlı olarak, Nab-paklitaksel ve Nab-paklitaksel + Droxinostat kombinasyonunun yara iyileşmesini diğer dozlara kıyasla daha etkin bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuştur ( $p<0.001$ , Şekil 17, Grafik 12).

Meme kanserinde tümör proliferasyon belirteci olarak kullanılan, tedavi seçimine karar vermede ve hastalığın ilerlemesinde öngörü sağlayan Ki-67 proteini, hücrelerin proliferasyonu sırasında eksprese olan bir nüklear proteindir. Ki-67, hücre döngüsünün S, G1, G2 ve M evrelerinde eksprese olup, G<sub>0</sub> evresinde olmamaktadır. Ki-67 ekspresyonunun yüksek olduğu tümörlerde hücrelerin daha fazla proliferasyon gösterdiği ve bu nedenle hastalığın prognozunu daha kötü seyretnesine neden olduğu düşünülmektedir (Inwald vd., 2013; Kim vd., 2014). Farklı 17 meme kanseri hücre hattında yapılan immünohistokimya (IHC) analizinde, her bir meme kanseri alt tipinde farklı düzeylerde Ki-67 ekspresyonu tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde Ki-67 ekspresyonu %100 iken, MCF-10A hücrelerinde bu oran %30 olarak belirlenmiştir (Subik vd., 2010).

Çalışmamızda ise ÜNMK hücrelerinin proliferasyonunu ne derecede etkilediğini analiz etmek amacıyla Ki-67 proliferasyon indeks biyogöstergesinin protein düzeyindeki ekspresyonları immunofloresan boyama ile belirlendi. Analiz sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücrelerinde tüm ilaç dozlarının uygulanmasıyla Ki-67 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ( $p<0.001$ , Şekil 19, Grafik 14). MCF-10A hücrelerinde de Ki-67 ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ( $p<0.001$ , Şekil 20, Grafik 15) fakat MDA-MB-231 hücrelerinde bu azalma, MCF-10A hücrelerine oranla çok daha belirgin olmuştur. Bu bulgular, MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyonun daha etkili bir şekilde baskılandığını ortaya koymaktadır.

Pro-oksidanların hücrede artışı ve antioksidan mekanizmaların aşılması ile oksidatif stres oluşmaktadır. Aşırı oksidatif stres sonucunda ise kaspazların aktive olmaktadır. Böylece hücreler ya nekroz yoluyla ya da apoptozis yoluyla ölmektedir (Kannan vd.,2000). Droxinostat'ın hücresel strese yol açarak ROS'un fazla üretilmesine yol açtığı ve böylece hücre ölümünün indüklenmesini sağladığı (Schimmer vd. 2006), başka bir çalışmada ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinde DNA onarımını azaltarak,

genomik instabiliteyi indüklediği bildirilmiştir (Vishehsaraei vd., 2010). Buna göre, MDA-MB-231 kanser hücrelerinde Droxinostat ve Nab-paklitaksel'in hem mono hem de kombinasyon olarak, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon gibi antioksidan özellikte olan oksidatif biyomarkerların düzeylerini ne şekilde etkilediği araştırıldı.

Çalışmamızın bulgularına göre, Droxinostat mono olarak uygulandığında ilaç uygulanmayan kontrol grubuna göre SOD inhibisyon yüzdesini değiştirmezken, Nab-paklitaksel ve Droxinostat+Nab-paklitaksel kombinasyonunda SOD inhibisyon yüzdesini artırdığından antioksidan aktivitenin inhibe olması ve ROS'un artışına neden olarak hücre ölümünün indüklediği düşünülmektedir (Grafik 16,  $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ). Droxinostat'ın mono uygulanması glutatyon düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamış, Nab-paklitaksel mono ve kombine uygulandığında ise Glutatyon düzeyi artmıştır (Grafik 20,  $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ). Katalaz düzeylerinde ise Droxinostat, Nab-paklitaksel mono ve kombinasyon uygulamalarının hepsinde ise azalış görülmüş, en fazla azalış ise Nab-paklitaksel mono uygulanan dozda görülmüştür (Grafik 18,  $p<0.0001$ ). Genel olarak bakıldığında Droxinostat'ın antioksidan biyomarkerların düzeyleri üzerindeki etkisinin minimal olduğu, bununla birlikte Nab-paklitaksel ile kombinasyon olarak uygulandığında ise ROS'u indüklediği belirlendi.

MDA-MB-231 hücreleri ile PBMC'lerin birlikte kültüre edilerek HDAC inhibitörü Vorinostat'ın, immomodülatör özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, Vorinostat'ın PD-L1 mRNA ve protein ekspresyonunu zamanla bağımlı olarak artırdığı, ancak hormon yanıt veren hücrelerde böyle bir etkisinin olmadığı belirlenmiş, ÜNMK tedavisinde HDAC inhibisyonun immunoterapi uygulamaları için uygun bir kombinasyon stratejisi olabileceği bildirilmiştir (Terranova vd., 2017).

PD-L1, kanser hücrelerinde ifade edilirken, PD1 ise immun hücrelerde ifade edilmekle birlikte minimal oranda da kanser hücrelerinde ifade edilmektedir.

Çalışmamızda, ajanların hem mono hem de kombinasyonlarının sağlıklı meme ve ÜNMK hücrelerindeki PD1 ve PD-L1 ifadelerini mRNA düzeyinde incelendiğinde, Atezolizumab'ın PD-L1 inhibitörü olması nedeniyle, MDA-MB-231 kanser hücrelerindeki PD-L1 ifadesini 6,33 kat azaltmıştır ( $p<0.0001$ ). Bununla birlikte PD-L1 ifadesi Droxinostat ile 2,85 kat, Nab-paklitaksel ile 2.03 ve Droxinostat+Nab-

paklitaksel ile 3,03 kat artmıştır (( $p < 0.0001$ ). Buna karşın sağlıklı meme hücrelerinde PD-L1 ifadesi değişmemiştir (Grafik 24).

Her ne kadar PD-1 ekspresyonunun immün hücrelerde bulunduğu bilinmekteyse de, kanser hücrelerinde de çok düşük düzeylerde PD-1 ekspresyonu gözlemlenebilir. Bulgularımız doğrultusunda, Atezolizumab ve Nab-paklitaksel tedavileri, MDA-MB-231 hücrelerinde PD-1 ifadesini yaklaşık iki kat artırmıştır. Bu bulgularımız, mevcut literatürle uyumlu olup, önceki araştırmaları desteklemiştir (Terranova vd., 2017). Bu açıdan, Droxinostat ve Nab-paklitaksel'in PD-L1 antikoru ile kombine olarak tedavide kullanılmasının uygun bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir.

HDAC 8'in, ÜNMK hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği, tümör boyutu, lenfatik invazyon, tümör derecesi ve perinöral invazyon ile HDAC 8 aşırı ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olması nedeniyle, HDAC 8 ekspresyonunun ÜNMK tanısında potansiyel bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Menbari vd., 2020). Başka bir çalışmada ise, HDAC 1, 6 ve 8'in, meme kanseri hücrelerinin invazyonu ve progresyonunu desteklediği bildirilmiştir (Park vd., 2011).

Droxinostat'ın selektif bir HDAC 3,6 ve 8 inhibitörü olduğunu belirten bir çalışmadan yola çıkarak (Liu vd., 2016) çalışmamızda ajanların mono ve kombinasyon dozları hem MDA-MB-231 hem de MCF-10A hücrelerine uygulanarak HDAC3,6 ve 8'in mRNA seviyesinde ifadeleri analiz edildi. Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab uygulanan hücrelerde HDAC3 ifadesinde her iki hücre hattında da ilaç uygulanmayan hücrelere göre anlamlı bir fark görülmedi. MCF-10A hücrelerinde HDAC 6 ifadesinin, Droxinostat uygulanan tüm hücrelerde azalmış ancak MDA-MB-231 hücrelerinde sadece Droxinostat ve Atezolizumab dozlarında minimal bir azalış olmakla beraber Nab-paklitaksel uygulanan hücrelerde ise HDAC6 ifadesi artmıştır. MCF-10A hücrelerinde HDAC8 ifadesinde ise anlamlı bir değişiklik olmamakla birlikte, MDA-MB-231 hücrelerinde Atezolizumab dozunda 3 kat, Droxinostat dozunda 3,5 kat, Droxinostat+Nab-paklitaksel kombinasyonunda 5,74 kat ve Droxinostat+Atezolizumab uygulanan hücrelerde ise 3.87 kat azalmıştır. Sonuç olarak Droxinostat'ın en fazla inhibisyon etkisi HDAC 8 ile gerçekleşmiştir. HDAC8'in ÜNMK hücreleri üzerindeki elde edilen bulgu literatürü desteklemektedir (Menbari vd., 2020, Park vd., 2011, (Grafik 25).

SRC geni hücre proliferasyonu, sağkalımı, migrasyon ve invazyon gibi süreçleri düzenleyen bir non-reseptör tirozin kinaz ailesinden bir gen olup, bu genin aşırı aktivasyonu hücrel sinyal iletim yollarını aşırı aktive ederek tümör progresyonunu ve metastazını desteklemektedir (Dehm vd., 2004). MYC geni hücre döngüsü, büyüme ve farklılaşmayı kontrol eden bir onkogen olarak bilinir. ÜNМК'de MYC'in aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin hızlı proliferasyonunu ve hayatta kalmasını desteklemektedir. Ayrıca MYC geninin aşırı ekspresyonunun ÜNМК hücrelerinde interferon sinyalizasyonunun inhibisyonu üzerinden immunosupresif etki oluşturduğu bildirilmiştir (Zimmerli vd., 2022). TP53 geni ise DNA hasarının onarılması, hücre döngüsünü düzenlenmesi ve apoptozun indüklenmesi gibi kritik işlevleri yerine getiren tümör supresör geni olarak bilinmektedir. ÜNМК'de TP53'ün mutasyonlarının veya inaktivasyonun, tümör hücrelerinin direnç kazanmasına ve kemoterapiye yanıt vermemesine yol açtığı bilinmektedir (Mitri, vd., 2022; Eustace vd., 2022). Çalışmamız kapsamında analizi yapılan ilaç dozlarının MCF-10A hücrelerinde SRC ve MYC geninin ifadesinde azalış, TP53 ifadesinde ise artışa neden olduğu, ÜNМК hücrelerinde ise SRC geninde Droxinostat+Nab-paklitaksel ve 3 lü kombinasyon uygulanan hücrelerde 2 kat azalış, MYC geninde ise Droxinostat mono ve kombinasyonlarında 2 katlık azalış, TP53 geninde ise tüm doz gruplarında artış görülmekle birlikte en fazla artışın Nab-paklitaksel ve Nab-paklitaksel+Atezolizumab grubunda saptandı (Grafik 23). Tüm bu sonuçlar ışığında genel olarak SRC ve MYC'in inhibisyonunun yanı sıra TP53 ifadesinin artışı ile bu ajanların ÜNМК tedavisinde sadece mono değil, kombine kullanımlarının da potansiyel bir tedavi stratejisi olabileceğini göstermektedir.

ÜNМК'de HGF/c-Met yolaklarının aşırı aktivasyonu, hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını teşvik ederek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, bu yolakların hedeflenerek aşırı aktivasyonunun inhibe edilmesi, ÜNМК tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilebilir (Ji vd., 2023, Gaule vd., 2013; Gaule vd., 2014). Çalışmamızda, ilaçların bu sinyal yolağında görev alan HGF, MET, GAB1 ve GRB2 genler üzerindeki etkisi hem ÜNМК hem de sağlıklı meme hücrelerinde değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinde MET ifadesi artarken MCF-10A'da azalmıştır. Buna karşın HGF ekspresyonun her iki hücre hattında da azaldığı, GAB1 ve GRB2 ifadelerinin de her iki hücre hattında özellikle Droxinostat-Nab-paklitaksel ve 3 lü kombinasyon dozlarında azalış gösterdi (Grafik 26). Elde

edilen bulgular doğrultusunda bu yolağın hedeflenerek aşırı aktivasyonunun inhibe edilmesi ÜNМК tedavisinde bir strateji olarak düşünülebilir.

Kaspaz 3 ve kaspaz 8 genleri hücrelerde özellikle apoptoz sürecinde çok önemli rol oynayan iki proteaz enzimidir. Bozulmuş apoptoz karsinogenik sürecin temel özelliklerinden biridir. Meme kanserinde kaspaz 3 ve 8'in prognostik rolünü araştıran bir çalışmada, invazif meme kanseri hastalarında yapılan büyük bir kohort (n=1902) çalışmasında, bu genlerin protein ifadeleri ve doku mikroyarrayleri IHC yöntemi ile incelendiğinde kaspaz 8'in meme kanserine özgü sağ kalımla ilişkili bulunurken kaspaz 3'ün sağkalımla ilişkisi anlamlı bulunmamıştır (Pu vd., 2017).

Çalışmamızda ise bu genlerin ifadeleri incelendiğinde Droxinostat mono ve kombinasyonları hem kaspaz 3 hem de kaspaz8'in ifadesini artırmıştır. Nab-paklitaksel uygulanan hücrelerde de bu genlerin ifadelerini artırmış ancak artış düzeyi Droxinostat'a göre daha kısıtlı kalmıştır (Grafik 27).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, Droxinostat, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab'ın hem mono hem de kombinasyon dozlarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, Droxinostat'ın ÜNМК hücrelerindeki seçici antikanser etkileri öne çıkmaktadır. Droxinostat'ın, Nab-paklitaksel ve Atezolizumab'a kıyasla apoptoz ve nekroptozu daha fazla indüklediği ve apoptotik süreçler, hücre sağkalımı, onkogenik ve tümör süpresör genler üzerindeki etkileri nedeniyle ÜNМК tedavisinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak, bu bulguların klinik uygulamalara aktarılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Sonuç ve Öneriler

Dünyada ve ülkemizde meme kanserinin prevalansı artarken, cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi yaklaşımlarının yanı sıra, immünoterapinin de dahil olduğu hedefe yönelik tedavi yöntemleri giderek daha yaygın hale gelmektedir. Geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamaları göz önüne alındığında, meme kanseri hücrelerinin ve hastalığın patogenezi ile ilişkili moleküler mekanizmaların anlaşılması, hedefe yönelik tedavilerin etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Kanser immünoterapisi, bağışıklık hücrelerinin etkinliğini artırarak kanser hücrelerini spesifik olarak tanıyıp yok etmeye yönelik bir yaklaşımdır. İmmünoterapinin hedefe yönelik doğası, uzun süreli etkileri ve iyileşme üzerindeki katkıları, onu kanser tedavisinde önemli bir seçenek haline getirmektedir.

Meme kanserinde immünoterapinin etkinliği, kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan immün kontrol noktası ligandlarının ve tümör immün mikroçevresindeki bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunan immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyon düzeylerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Tez çalışmamızda, üçlü negatif meme kanseri hastalarında epigenetik ajan ile adjuvan immünoterapi kombinasyonunun konvansiyonel tedavilere göre tedaviye yanıt oranı üzerindeki etkisi araştırılmış olup, elde edilen bulgular açısından bakıldığında, epigenetik ajan Droxinostat'ın meme kanseri hücreleri üzerindeki inhibitör dozu sağlıklı meme hücrelerine göre 3 kat daha az olarak bulunmuştur. Bu bulgular, ideal bir antikanser tedavisinin geliştirilmesi açısından umut verici niteliktedir. Ancak, bu çalışma 2 boyutlu hücre kültürü ortamında *in vitro* düzeyde gerçekleştirilmiştir.

Ajanların bağışıklık hücreleri üzerindeki etkilerini daha kapsamlı bir şekilde değerlendirebilmek için, MDA-MB-231 hücreleri ile periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) ko-kültür analizlerinin yapılması ve *in vitro* çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların doğrulanması gerekmektedir. Buna ek olarak, tedavi yaklaşımlarının etkinliğini *in vivo* ortamda test etmek amacıyla hayvan modellerinde deneyler gerçekleştirilmesi, ajanların bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasını ve klinik uygulamalara yönelik stratejilerin geliştirilmesini önemli ölçüde destekleyecektir.

Transkriptom analizlerinin çalışmaya dahil edilmesi, ÜNМК'de gelişen kemo-immuno direnç mekanizmalarının henüz bilinmeyen yönlerini aydınlatma potansiyeline sahiptir. Bu sayede, direnç mekanizmalarının üstesinden gelinerek yeni tedavi stratejileri geliştirilebilir ve bu stratejilerin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlardaki hücresel yanıtları detaylı bir şekilde analiz edilebilecek, mevcut tedavi protokollerindeki kemoterapi ve immunoterapi uygulamalarının sınırlı etkilerinin üstesinden gelinerek, ÜNМК tedavisinde daha etkili ve hedefe yönelik bir yaklaşım geliştirilmesine olanak sağlanacaktır.



## Kaynaklar

Acikgoz, E., Guven, U., Duzagac, F., Uslu, R., Kara M., Soner, B.C., Oktem, G. (2015). Enhanced G2/M Arrest, Caspase Related Apoptosis and Reduced E-Cadherin Dependent Intercellular Adhesion by Trabectedin in Prostate Cancer Stem Cells. Oct 20;10(10):e0141090.

Ahmad, S., He, Q., Williams, K.P., Scott, J.E. (2020). Identification of a Triple Drug Combination That Is Synergistically Cytotoxic for Triple-Negative Breast Cancer Cells Using a Novel Combination Discovery Approach. SLAS Discov, Sep;25(8), (s.923-938).

Alqosaibi, A. I., & Abdel-Ghany, S. (2023). Vorinostat induces G2/M cell cycle arrest in breast cancer cells via upregulation of PTEN. *European review for medical and pharmacological sciences*, 27(4), 1503–1511.

Bas, A., Forsberg, G., Hammarström, S., Hammarström, M.L. (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* Jun;59(6), (s.566-73).

Blattmann C., Oertel S., Ehemann V., Thiemann M., Huber P.E., Bischof M., Witt O., Deubzer H.E., Kulozik A.E., Debus J., et al. (2010). Enhancement of Radiation Response in Osteosarcoma and Rhabdomyosarcoma Cell Lines by Histone Deacetylase Inhibition. *Int. J. Radiat. Oncol.* ;78 (s.237–245).

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170. <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic> Son Erişim Tarihi: 17.08.2022.

Borcoman, E., Kamal, M., Marret, G., Dupain, C., Castel-Ajgal, Z., Tourneau, C.L. (2022). HDAC Inhibition to Prime Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers* 2022, 14, 66.

Chen L., Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Immunology*, Volume 13, (s. 227-242).

Chen, Y., Wanga, L., Zhengc, M., Zhua, C., Wanga, G., Xiad, Y., Blumenthala, E.J.,... Wana, Y. (2022). Engineered extracellular vesicles for concurrent Anti-PDL1 immunotherapy and chemotherapy. *Bioactive Materials* 9, (s.251–265).

Chou, T.C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, 58, (s.621–681).

Cogdill, A., Andrews, M.M, Wargo, J.A. (2017). Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *British Journal of Cancer*, (s.1-7).

Conn, M. (2017). *Animals Models For The Study Of Human Disease*. United States: Academic Press.

Conroy, M. R., Dennehy, C., & Forde, P. M. (2023). Neoadjuvant immune checkpoint inhibitor therapy in resectable non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 183, 107314.

Dehm, S. M., & Bonham, K. (2004). SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 82(2), 263–274.

Deroanne, C.F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clausse, N.,... Castronovo, V. (2002). Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 21, (s. 427-436).

Dong, Z., Yang, Y., Liu, S., Lu, J., Huang, B., & Zhang, Y. (2017). HDAC inhibitor PAC-320 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer. *Oncotarget*, 9(1), 512–523.

Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1414.

Emiloju, O. E., & Sinicrope, F. A. (2023). Neoadjuvant Immune Checkpoint Inhibitor Therapy for Localized Deficient Mismatch Repair Colorectal Cancer: A Review. *JAMA oncology*, 9(12), 1708–1715.

Eustace, A. J., Lee, M. J., Colley, G., Roban, J., Downing, T., & Buchanan, P. J. (2022). Aberrant calcium signalling downstream of mutations in TP53 and the PI3K/AKT pathway genes promotes disease progression and therapy resistance in triple negative breast cancer. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 5(3), 560–576.

FDA approves atezolizumab for PD-L1 positive unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. FDA. March 8, 2019. <https://bit.ly/3Bn1vP1>  
Son Erişim Tarihi: 17.08.2022.

Fedele, P., Orlando, L., Cinieri, S. (2017). Targeting triple negative breast cancer with histone deacetylase inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26:11, (s.1199-1206).

Fenech, M. 2007. “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, *Nature protocols*, 2(5), (s.1084-1104).

Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2020). A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5986.

Gaule, P. B., Collins, D., Walsh, N., Duffy, M. J., Crown, J., & O'Donovan, N. (2013). Met and HGF inhibition in triple-negative breast cancer cell lines. *Journal of Clinical Oncology*, Volume 31, Number 15.

Gaule, P. B., Crown, J., O'Donovan, N., & Duffy, M. J. (2014). cMET in triple-negative breast cancer: is it a therapeutic target for this subset of breast cancer patients?. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(9), 999–1009.

Hatanaka, H., Mukai, A., Ito, E., Ueno, M., Sotozono, C., Kinoshita, S., Hamuro, J. (2021). Epigenetic regulation of the epithelial mesenchymal transition induced by synergistic action of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 544, (s.31-37).

He, M., Yang, T., Wang, Y., Wang, M., Chen, X., Ding, D., Zheng, Y., & Chen, H. (2021). Immune Checkpoint Inhibitor-Based Strategies for Synergistic Cancer Therapy. *Advanced healthcare materials*, 10(9), e2002104.

Hegedűs, L., Rittler, D., Garay, T., Stockhammer, P., Kovács, I., Döme, B.,... Hegedűs, B. (2020). HDAC Inhibition Induces PD-L1 Expression in a Novel Anaplastic Thyroid Cancer Cell Line. *Pathology & Oncology Research*, 26, (s.2523–2535).

Hoffmann, M. J., Meneceur, S., Hommel, K., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2021). Downregulation of Cell Cycle and Checkpoint Genes by Class I HDAC Inhibitors Limits Synergism with G2/M Checkpoint Inhibitor MK-1775 in Bladder Cancer Cells. *Genes*, 12(2), 260.

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. *Front. Genet.* 11:578011.

Huang, Y., Yang, W., Zeng, H., Hu, C., Zhang, Y., Ding, N.,... Kuang, B. (2018). Droxinostat sensitizes human colon cancer cells to apoptotic cell death via induction of oxidative stress. *Cellular & Molecular Biology Letters*, (s.23:34).

Hurwitz, J. L., Stasik, I., Kerr, E. M., Holohan, C., Redmond, K. M., McLaughlin, K. M., Busacca, S., Barbone, D., Broaddus, V. C., Gray, S. G., O'Byrne, K. J., Johnston, P. G., Fennell, D. A., & Longley, D. B. (2012). Vorinostat/SAHA-induced apoptosis in malignant mesothelioma is FLIP/caspase 8-dependent and HR23B-independent. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(7), 1096–1107.

Inwald, E.C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstadter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., Ortmann, O. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*, 139, (s.539–552).

Ji, X., Meng, X., He, Q., Xiang, X., Shi, Y., & Zhu, X. (2023). Foretinib Is Effective against Triple-Negative Breast Cancer Cells MDA-MB-231 *In Vitro* and *In Vivo* by Down-Regulating p-MET/HGF Signaling. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 757.

Jiang, Y.Z., Yu1, K., Peng, W., Di, G., Wu, J., Liu, G., Shao, Z. (2014). Enriched variations in TEKT4 and breast cancer resistance to paclitaxel. *Nature Communications*, 5:3802.

Kayabasi, C., Yilmaz Susluer, S., Balci Okcanoglu, T., Ozmen Yelken, B., Mutlu, Z., Goker Bagca, B.,...Gunduz C. (2022). Origanum Sipyleum Methanol Extract in Combination with Ponatinib Shows Synergistic anti-Leukemic Activities on Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Nutr Cancer*. May 24 (s.1-13).

Keenan, T.E., Tolaney, S.M. (2020). Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(4), (s.479–489).

Kim, H.J., Bae, S.C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*;3(2), (s.166-179).

Kim, K.I., Lee, K.H., Kim, T.R., Chun, Y.S., Lee, T.H., Park, H.K. (2014). Ki-67 as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Journal of Breast Cancer*, 17:1, (s.40-46).

Konsoula Z., Cao H., Velen A., Jung M. Adamantan yl-Histone Deacetylase Inhibitor H6CAHA Exhibits Favorable Pharmacokinetics and Augments Prostate Cancer Radiation Sensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011;79, (s.1541–1548).

Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V., & Perelmuter, V. M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta naturae*, 7(2), 17–28.

Kwapisz, D. (2021). Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70, (s.607–617).

Lampugnani, M. G. (1999). Cell migration into a wounded area *in vitro*. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 96, (s.177–182).

Lee J.-H., Choy M.L., Ngo L., Foster S.S., Marks P.A. (2010). Histone Deacetylase Inhibitor Induces DNA Damage, Which Normal but Not Transformed Cells Can Repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107, (s.14639–14644).

Li, X., Su, X., Liu, R., Pan, Y., Fang, J., Cao, L.,...Shi, Y. (2021). HDAC inhibition potentiates anti-tumor activity of macrophages and enhances anti-PD-L1-mediated tumor suppression. *Oncogene*, 40, (s.1836–1850).

Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W. (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 47(8):e47. <http://subread.sourceforge.net> Son Erişim Tarihi: 17.08.2022.

Liu, J., Blake, S. J., Yong, M. C., Harjunpää, H., Ngiew, S. F., Takeda, K., Young, A., O'Donnell, J. S., Allen, S., Smyth, M. J., & Teng, M. W. (2016). Improved Efficacy of Neoadjuvant Compared to Adjuvant Immunotherapy to Eradicate Metastatic Disease. *Cancer discovery*, 6(12), 1382–1399.

Liu, J., Li, G., Wang, X., Wang, L., Zhao, R., Wang, J.,...Zhang, L. (2016). Droxinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines via Activation of the Mitochondrial Pathway and Downregulation of FLIP. *Translational Oncology*, 9, (s.70–78).

Loibl, S., Untch, M., Burchardi, N., Huober, J., Sinn, B.V., Blohmer, J.U.,...Schneeweiss, A. (2019). A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Annals of Oncology*, 30, (s. 1279–1288).

Markham, A. (2016). Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs* (2016) 76, (s. 1227–1232).

Meme Kanseri Korunma, Tarama, Tanı, Tedavi ve İzlem Klinik Rehberi (2020). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı

Menbari, M., Rahimi, K., Ahmadi, A., Yeganeh, S., Elyasi, A. Darvishi, N.,... Abdi, M. (2020). Association of HDAC8 Expression with Pathological Findings in Triple Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer: Implications for Diagnosis. *Iranian Biomedical Journal*, 24 (5), (s.288-294).

Michel, L., Au, A., Mavratzas, A., Smetanay, K., Schütz, F., Schneeweiss, A. (2020). Immune Checkpoint Blockade in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Targeted Oncology*, 15 (s.415–428).

Miles, D., Gligorov, J., André, F., Cameron, D., Schneeweiss, A., Barrios, C.,... O'Shaughnessy, J. (2021). Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, Vol32;8, (s.994-1004).

Mitri, Z. I., Abuhadra, N., Goodyear, S. M., Hobbs, E. A., Kaempf, A., Thompson, A. M., & Moulder, S. L. (2022). Impact of TP53 mutations in Triple Negative Breast Cancer. *NPJ precision oncology*, 6(1), 64.

Munshi A., Kurland J.F., Nishikawa T., Tanaka T., Hobbs M.L., Tucker S.L., Ismail S., Stevens C., Meyn R.E. (2005). Histone Deacetylase Inhibitors Radiosensitize Human Melanoma Cells by Suppressing DNA Repair Activity. *Clin. Cancer Res.*11, (s.4912–4922).

Naito, M., Katayama, R., Ishioka, T., Suga, A., Takubo, K., Nanjo, M.,... Tsuruo, T. (2004). Cellular FLIP Inhibits Catenin Ubiquitylation and Enhances Wnt Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, (s.8418–8427).

Nath, A., Mitra, S., Mistry, T., Pal, R., Nasare, V.D. (2022). Molecular targets and therapeutics in chemoresistance of triple-negative breast cancer. *Medical Oncology*, 39:14.

O'Meara, T.A., Tolaney, S.M. (2021). Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response in breast cancer. *Oncotarget*, Vol. 12, (No. 5), (s.394-400).

Ono, H., Sowa, Y., Horinaka, M., Iizumi, Y., Watanabe, M., Morita, M.,... Sakai, T. (2018). The histone deacetylase inhibitor OBP-801 and eribulin synergistically inhibit the growth of triple-negative breast cancer cells with the suppression of survivin, Bcl-xL, and the MAPK pathway. *Breast Cancer Research and Treatment*, 171, (s.43–52).

Orr, J.A., Hamilton, P.W. Histone acetylation and chromatin pattern in cancer. A review. (2007). *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, Feb;29(1), (s.17-31).

Park, S.Y., Jun, J.A., Jeong, K.J., Heo, H.J., Sohn, S.J., Lee, H.Y.,...Kang, J. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports* 25, (s.1677-1681).

Patel, S.P., Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(4), (s.847-856).

Pu, X., Storr, S. J., Zhang, Y., Rakha, E. A., Green, A. R., Ellis, I. O., & Martin, S. G. (2017). Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 22(3), 357–368.

Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B.Y.,...Cui, X. (2015). Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *Plos One* 10(7).

Quagliariello, V., Passariello, M., Bisceglia, I., Paccone, A., Inno, A., Maurea, C., Rapuano Lembo, R., Manna, L., Iovine, M., Canale, M. L., Scherillo, M., Ascierto, P. A., Gabrielli, D., De Lorenzo, C., & Maurea, N. (2024). Combinatorial immune checkpoint blockade increases myocardial expression of NLRP-3 and secretion of H-FABP, NT-Pro-BNP, interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6: biochemical implications in cardio-immuno-oncology. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 11, 1232269.

Ramaiah, M. J., Tangutur, A. D., & Manyam, R. R. (2021). Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy. *Life sciences*, 277, 119504.

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 20;43(7):e47.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K. (2010) EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. *Bioinformatics*, 26, (s.139-140).

Sabran, A., Kumolosasi, E., Jantan, I. (2019). Effects of annexin A1 on apoptosis and cell cycle arrest in human leukemic cell lines. *Acta Pharmaceutica*, 69:1, (s.75-86).

Safa, A.R. c-flip, a master anti-apoptotic regulator. (2012). *Experimental Oncology*, 34(3), (s.176–184).

Schettini, F., Giuliano, M., Sabino De Placido, S.D., Arpino, G. (2016). Nab-paclitaxel for the treatment of triple-negative breast cancer: Rationale, clinical data and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 50, (s.129–141).

Schimmer, A.D., Thomas, M.P., Hurren, R., Gronda, M., Pellecchia, M., Pond, G.R.,... Reed, J.R. (2006). Identification of Small Molecules that Sensitize Resistant Tumor Cells to Tumor Necrosis Factor-Family Death Receptors. *Cancer Res*, 66: (4), (s.2367-2375).

Schimmer, A.D., Thomas, M.P., Hurren, R., Gronda, M., Pellecchia, M., Pond, G.R.,... Reed, J.R. (2006). Identification of Small Molecules that Sensitize Resistant Tumor Cells to Tumor Necrosis Factor-Family Death Receptors. *Cancer Res*, 66: (4), (s.2367-2375).

Schmid, P., Rugo, H.S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C.B., Iwata, H.,... Leisha A Emens, L.A. (2020). Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 21, (s.44–59).

Shanmugam, G., Rakshit, S., & Sarkar, K. (2022). HDAC inhibitors: Targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. *Translational oncology*, 16, 101312.

Shimomura, M., Yaoi, T., Itoh, K., Kato, D., Terauchi, K., Shimada, J., Fushiki, S. (2012). Drug resistance to paclitaxel is not only associated with ABCB1 mRNA expression but also with drug accumulation in intracellular compartments in human lung cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 40(4), (s.995-1004)

Subik, K., Lee, J. F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M. C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G., & Tang, P. (2010). The Expression Patterns

of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast cancer : basic and clinical research*, 4, 35–41.

Sui, M., Dziadyk, J. M., Zhu, X., & Fan, W. (2004). Cell cycle-dependent antagonistic interactions between paclitaxel and gamma-radiation in combination therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(14), 4848–4857.

Sun, W. J., Huang, H., He, B., Hu, D. H., Li, P. H., Yu, Y. J., Zhou, X. H., Lv, Z., Zhou, L., Hu, T. Y., Yao, Z. C., Lu, M. D., Shen, X., & Zheng, Z. Q. (2017). Romidepsin induces G2/M phase arrest via Erk/cdc25C/cdc2/cyclinB pathway and apoptosis induction through JNK/c-Jun/caspase3 pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical pharmacology*, 127, 90–100.

Terranova-Barberio, M., Thomas, S., Ali, N., Pawlowska, N., Park, J., Krings, G.,... Munster, P.N. (2017). HDAC inhibition potentiates immunotherapy in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, Vol. 8, (s.114156-114172).

Thurn K.T., Thomas S., Raha P., Qureshi I., Munster P.N. (2013). Histone Deacetylase Regulation of ATM-Mediated DNA Damage Signaling. *Mol. Cancer Ther.* 12:2078–2087. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1242.

Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. May 1;25(9):1105-11. <https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml> Son Erişim Tarihi: 17.08.2022.

Ueda, M. (2020). Alkali Comet Assay in Genotoxicity Tests. In: Hanada, K. (eds) *DNA Electrophoresis. Methods in Molecular Biology*, vol 2119, s.73.

Vagia, E., Mahalingam, D., Cristofanilli, M. (2020). The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers*, 12, 916.

van Akkooi, A. C. J., Zijlker, L. P., & Wouters, M. W. J. M. (2022). Neoadjuvant Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Melanoma: Efficacy, Safety and Timing. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 36(3), 373–380.

Vermes, I.M, Haanen, C., Nakken, H.S., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184 (199.5), (s.39-51).

Vishehsaraei, K.B., Huang, S., Safa, S.A. (2010). 4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide (CMH) targets mRNA of the c-FLIP variants and induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*; 342(0), (s.133–142).

Waldman, A.D., Jill, M.F., Lenardo, M.J.(2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Immunology*, Volume 20, (s.651-668).

Wu Y.H., Hong C.W., Wang Y.C., Huang W.J., Yeh Y.L., Wang, B.J., Wang Y.J., Chiu H.W. A Novel Histone Deacetylase Inhibitor TMU-35435 Enhances Etoposide Cytotoxicity through the Proteasomal Degradation of DNA-PKcs in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Lett.* 2017;400, (s.79–88).

Xue, M., McKelvey, K., Shen, K., Minhas, N., March, L., Park, S.Y., Jackson C.J. (2014). Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology*, Volume 53, Issue 12, (s.2270–2279).

Yusuf, R.Z., Duan, Z., Lamendola, D.E., Penson, R.T., Seiden, M.V. (2003). Paclitaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Pharmacologic Manipulation. *Current Cancer Drug Targets*, 3, (s.1-19).

Zhang, H., Xie, W., Zhang, Y., Zheng, X.D.L., Wang, H. (2021). Oncolytic adenoviruses synergistically enhance anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 immunotherapy by modulating the tumour microenvironment in a 4T1 orthotopic mouse model. *Cancer Gene Therapy*, 29, (s.456-465).

Zimmerli, D., Brambillasca, C. S., Talens, F., Bhin, J., Linstra, R., Romanens, L., Bhattacharya, A., Joosten, S. E. P., Da Silva, A. M., Padrao, N., Wellenstein, M. D., Kersten, K., de Boo, M., Roorda, M., Henneman, L., de Bruijn, R., Annunziato, S., van der Burg, E., Drenth, A. P., Lutz, C., ... Jonkers, J. (2022). MYC promotes

immune-suppression in triple-negative breast cancer via inhibition of interferon signaling. *Nature communications*, 13(1), 6579.

Zou, Y., Cui, X., Xiang, Q., Guo, M., Liang, Y., Qu, Y., Yang, X. (2021). Protective effect of against ethanol-induced gastric ulcer and its mechanism. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2021 Oct 25;50(5), (s.561-567).



## Teşekkür

Bu tez, akademik yolculuğumun uzun ve zorlu bir serüveninin sonucudur. Ailevi nedenlerle on yıl süren bir ara sonrasında doktora programına yeniden başlamış ve bitirmiş olmanın verdiği mutluluk ve gurur içindeyim. Bu süreçte bana destek olan, cesaret veren ve yol gösteren herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

Öncelikle, gizli kahramanlarım oğlum Deniz ve eşim Can, bana verdiğiniz güç ve anlayış, bu zorlu sürecin en büyük motivasyon kaynağı oldu. Her anımda yanımda olarak beni cesaretlendirmeniz, başarıya ulaşmamda en büyük etkenlerden biri oldu. Canım annem ve babam Ahmet & Fatma İNCEDERE başta olmak üzere dünyadaki en değerli aileye sahip olduğumu bana her seferinde hatırlatan, bu uzun yolculukta bana sonsuz destek veren, sabır ve sevgiyle yanımda olan ailemin tüm güzel bireylerine şükranlarımı borç bilirim. Haklarınızı asla ödeyemem.

Tez çalışmamda bana rehberlik eden, destekleyen, akademik bilgi birikimimi geliştirmemde bana ilham veren danışmanım Sayın Doç. Dr. Burçin Tezcanlı KAYMAZ'a özel teşekkürlerimi sunarım. Tecrübeniz, yol göstericiliğiniz ve sürekli desteğiniz bu yolculuğu daha anlamlı ve değerli kıldı. Her zaman bana inandınız ve bu süreçte gösterdiğiniz sabır, bana büyük bir ilham kaynağı oldu.

Bu tez, sadece kişisel bir başarı değil, aynı zamanda ailemin ve sevdiklerimin desteğiyle mümkün olan bir başarının sembolüdür. Herkese en içten teşekkürlerimi sunar, bu yolculukta yanımda olduğunuz için minnettarlığımı ifade ederim.

Doktora tez sürecim boyunca bize huzurlu bir çalışma ortamı sunan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, bize büyük bir aile olduğumuzu hissettiren çok değerli hocam, anabilim dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ, sizin öğrenciniz olduğum için kendimi hep şanslı hissettim.

Anabilim dalımızın çok değerli öğretim görevlileri, Sn. Prof. Dr. Çığır BİRAY AVCI ve Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL, pozitif enerjiniz ve güler yüzünüzü esirgemediğiniz için içten teşekkürlerimi sunarım. Bu olumlu tavırlarınız, çalışma ortamımızı daha keyifli getirdi.

Sn. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU, Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA, Sn. Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ, Sn. Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER deneyimlerinizi ve bilgilerinizi cömertçe paylaştığınız için çok teşekkür ederim. Sunduğunuz destek ve pozitif yaklaşım, doktora sürecimi daha verimli hale getirdi.

Çok değerli hocam Sn. Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI, dostluğunuz, güler yüzünüz, her zaman destekleyici yaklaşımınız ve yapıcı geri bildirimleriniz için minnettarım. Desteğınızı hep hissetmek benim için çok anlamlı ve değerliydi.

Doktora eğitimim boyunca, beni hiç yalnız bırakmayan, hep yüreklendiren, gerek renkli kişiliğiyle gerekse insanlığıyla dünyamı güzelleştiren canım arkadaşım Dok. Öğr. Sevim AYDEMİR başta olmak üzere, çok değerli çalışma arkadaşlarım Dok. Öğr. İlayda ALÇİTEPE, Dok. Öğr. Zafer YILDIRIM, Dok. Öğr. Ayşe ÇEKİN, Dok. Öğr. Büşra BARA, Dok. Öğr. Semahat ÇELİKTEN, Dok. Öğr. Burcu BÖLÜK, Dok. Öğr. UYGAR GENİŞ, Dok. Öğr. İbrahim Halil ÇİTÇİ, Dok. Öğr. Eda DOĞAN, Dok. Öğr. Kutay BULUT, Dr. Fatma SÖĞÜTLÜ, Dok. Öğr. Elham Shahriyari, Dr. Alperen UYSAL, Dr. Roya Gasımlı ve ismini sayamadığım nice arkadaşımın desteğinin ve katkıları için çok teşekkür ederim.

Son olarak, anabilim dalımızın en yardımsever sekreteri Sn. Merve YILDIRIM, güler yüzün, arkadaşlığın, yardımların için çok teşekkür ederim. Ayrıca, içtiğim harika kahvelerini unutmayacağım sevgili Şengül ablacığım, emeğin ve güler yüzün için çok teşekkür ederim.

Bu tezde emeği geçen tüm hocalarım, araştırma arkadaşlarım ve destekçilerime teşekkür ederim. Her birinizin katkısı bu çalışmanın başarısına büyük bir etkiyle bulunmuştur.

Tez çalışmamın maddi desteklenmesinde katkıda bulunan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB) sağladıkları imkân ve destekler için teşekkür ederim.

İzmir,

Uzm. Ecz. Fazilet Esra İNCEDERE DÜZDAĞ

14.06.2024

## **Ekler**

Çalışmamız *in vitro* hücre kütürü ortamında gerçekleştirildiği için “Etik Kurul Onay Belgesi, Gönüllü Onay Formu ve Olgu Rapor Formuna” ihtiyaç duyulmamıştır.

