

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YUMURTALIK KANSERİ TEDAVİSİNDE IL-6R / STAT 3 / PD-L1 HEDEFLİ
LOBARİK ASİT VE LOBARİK ASİT -TOSİLİZUMAB KOMBİNASYONUNUN
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

İbrahim Gadaşlı

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Temmuz

2024

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

İbrahim Gadaşlı

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman danışmanlığında İbrahim Gadaşlı tarafından hazırlanan bu çalışma 14/08/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. H. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN,

İmza:

Üye: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN,

İmza:

Üye: Prof. Dr. Pelin MUTLU,

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yumurtalık Kanseri Tedavisinde IL-6R / STAT 3 / PD-L1 Hedefli Lobarik asit ve Lobarik asit -Tosilizumab Kombinasyonunun Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi

İbrahim Gadaşlı

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Yumurtalık kanseri, kadın jinekolojik kanserleri arasında en yüksek mortalite oranına sahip olup günümüzde önemli bir sağlık sorunu teşkil etmektedir. İlerleyen teknoloji ve çalışmalarına rağmen, erken tanının zorluğu, tedavi direnci, yüksek toksisite, maliyet ve düşük tedavi yanıtı gibi faktörler, yumurtalık kanseri tedavisinde yeni yaklaşımlara duyulan ihtiyacı artırmaktadır. Bu bağlamda, immünoterapi, bağışıklık sisteminin kanser üzerindeki etkilerine odaklanarak, hedefe yönelik tedavi ve yan etkileri en aza indirmeye yönelik bir tedavi modeli olarak öne çıkmaktadır. Tez çalışması konusu, immün kontrol noktasında rol oynayan IL-6R/STAT3/PD-L1 yolakları üzerinde doğal bir küçük molekül olan liken ikincil metaboliti lobarik asitin (LA) ve LA-Atezolizumab (ATE) ve LA-Tosilizumab (TCZ) monoklonal antikor kombinasyonunun yumurtalık kanseri üzerinde sinerjistik etki potansiyelinin belirlenmesidir. Bu amaçla, LA, TCZ ve ATE'nin yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hücre hattı OVCAR-3 üzerindeki anti-proliferatif etki potansiyeli, hücre göçü ve hücre morfolojisi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hedef moleküllerin immünoterapötik etkinliğini belirlemek için PD-1/PD-L1 protein bağlanması üzerindeki etkileri incelenmiştir. LA, TCZ ve ATE'nin hedef yolak üzerindeki transkriptom düzeyindeki etkileri qRT-PCR, protein düzeyindeki etkileri ise western blot analizi ile belirlenmiştir. LA, LA-ATE ve LA-TCZ'nin etki mekanizmasını anlamak ve hücre içi sinyallenme üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup immünoterapideki rolleri valide edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, LA ve LA-TCZ kombinasyonunun yumurtalık kanseri üzerinde immünoterapötik etkinlik gösterdiği anlaşılmıştır. Tez çalışması sonucunda elde edilen veriler, LA'nın tekli ve TCZ ile birlikte yumurtalık kanseri tedavisinde yenilikçi bir ilaç adayı olarak kullanıma potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Ancak dha fazla *in-vitro* analizler ve *in-vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

2024, 136 sayfa

Anahtar kelimeler: Yumurtalık kanseri, immünoterapi, lobarik asit, Tosilizumab.

ABSTRACT

McS Thesis

Determination of therapeutic effect of Lobaric acid and Lobaric acid – Tosilizumab combination targeted at IL-6R / STAT 3 / PD-L1 in ovarian cancer treatment

Ibrahim Gadashli

Ankara University, Biotechnology Institute

Prof. Demet Cansaran Duman

Ovarian cancer has the highest mortality rate among female gynaecological cancers and represents a significant public health concern in the present era. Despite the advent of sophisticated technology and a plethora of studies, factors such as the difficulty in early diagnosis, treatment resistance, high toxicity, cost and low treatment response underscore the necessity for novel approaches in ovarian cancer treatment. In this context, immunotherapy represents a promising treatment model that focuses on harnessing the immune system's effects on cancer, targeted treatment, and minimising side effects. The aim of this thesis is to ascertain the potential synergistic effect of the lichen secondary metabolite lobaric acid (LA), a natural small molecule, on IL-6R/STAT3/PD-L1 pathways that play a role in immune control, and the monoclonal antibody combination of LA-Atezolizumab (ATE) and LA-Tosilizumab (TCZ) on ovarian cancer. The objective was to evaluate the anti-proliferative potential, cell migration and cell morphology effects of LA, TCZ and ATE on the high-grade serous ovarian cancer cell line OVCAR-3. In order to ascertain the immunotherapeutic efficacy of the target molecules, their effects on PD-1/PD-L1 protein binding were examined. The effects of LA, TCZ and ATE on the target pathway at the transcriptome level were determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), while their effects at the protein level were determined by western blot analysis. In order to gain insight into the mechanism of action of LA, LA-ATE and LA-TCZ and to examine their effects on intracellular signalling, siRNA transfection was performed, and their role in immunotherapy was validated. The results demonstrated that the combination of LA and LA-TCZ exhibited immunotherapeutic efficacy in the treatment of ovarian cancer. The thesis study yielded data indicating the potential of LA as a standalone agent and in combination with TCZ as a novel drug candidate for the management of ovarian cancer. However, further *in vitro* analyses and *in vivo* studies are necessary to substantiate these findings.

2024, 136 pages

Keywords: Ovarian cancer, immunotherapy, lobaric acid, Tocilizumab.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana laboratuvarını açan, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, çalışmalarım için her türlü kolaylığı sağlayan, kendimi geliştirmem için bana destek olan, bilim insanı olma yolunda beni umutlandıran, bilim sevgimi körükleyen ve kariyerim için beni cesaretlendiren örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte olduğum ve tez çalışmalarımı yürüttüğüm Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine ve değerli hocalarıma,

Tez çalışmam boyunca bana desteklerini esirgemeyen, eğitimimi daha motive ve daha eğlenceli hale getirdikleri için başta Mine ENSOY ve Arş. Gör. Ayşe Hale ALKAN olmak üzere tüm Duman Lab ekip arkadaşlarıma,

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından yüksek lisans tez projesi FYL-2023-2896 kodu ile desteklenmektedir. Yüksek lisans çalışmalarımı gerçekleştirmemdeki destekleri için Ankara Üniversitesi BAP'a,

Bana Ankara'da asla yalnız hissettirmeyen, yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, başta Duygu AŞKUN olmak üzere bütün değerli arkadaşlarıma,

Son olarak kararlarımı ve hayallerimi her zaman destekleyip, maddi ve manevi yanımda olan sevgili aileme,

İçten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum...

İbrahim GADAŞLI

Temmuz 2024

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. KANSER.....	6
2.2. YUMURTALIK KANSERİ	7
2.2.1. YUMURTALIK KANSERİ HİSTOLOJİK ALT TİPLERİ.....	7
2.2.1.1. Epitelyal yumurtalık kanseri (EOC)	7
2.2.1.1.1. Yüksek dereceli seröz karsinom (HGSOC)	7
2.2.1.1.2. Düşük dereceli seröz karsinom (LGSOC)	8
2.2.1.1.3. Müsinöz karsinom (MC).....	8
2.2.1.1.4. Endometrioid karsinom (EC).....	9
2.2.1.1.5. Berrak hücreli karsinom (CCC).....	9
2.2.1.2. Germ hücreli yumurtalık tümörü (OGCT).....	10

2.2.1.2.1. Disgerminom OMGCT	10
2.2.1.2.2. Olgun teratom OMGCT	10
2.2.1.2.3. Olgunlaşmamış teratom OMGCT	11
2.2.1.2.4. Monodermal teratom OMGCT	11
2.2.1.2.5. Endodermal sinüs (Yolk kesesi) tümörleri	11
2.2.1.2.6. Embriyonel karsinomlar	11
2.2.1.2.7. Koryokarsinomlar	11
2.2.1.3. Seks-kord-stromal yumurtalık kanseri	12
2.3. EPİDEMİYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ	13
2.4. GENETİK MUTASYONLAR	15
2.4.1. BRCA MUTASYONLARI	15
2.4.2. TP53 MUTASYONLARI	16
2.4.3. PTEN MUTASYONLARI	16
2.4.4. KRAS VE BRAF MUTASYONLARI	17
2.4.5. ARID1A MUTASAYONU	17
2.5. YUMURTALIK KANSERİNDE TEDAVİ METOTLARI	18
2.5.1. CERRAHİ YAKLAŞIMLAR	18
2.5.2. YUMURTALIK KANSERİ KEMOTERAPİSİ	18
2.5.3. YUMURTALIK KANSERİ İMMÜNÖTERAPİSİ	18
2.6. KANSER İMMÜNÖTERAPİSİ	19
2.6.1. SİTOKİNLER	20
2.6.2. KANSER AŞILARI	20
2.6.3. ONKOLİTİK VİRÜSLER	21
2.6.4. CAR-T HÜCRE TERAPİSİ	21

2.6.5. MONOKLONAL ANTİKORLAR	22
2.6.5.1. İmmün Kontrol Noktası Blokajı	24
2.6.5.1.1. Programlanmış Ölüm Proteini Ligandı 1	24
2.6.5.1.2. Atezolizumab (ATE).....	25
2.6.5.1.3. İnterlökin 6 Reseptörü (IL-6R)	25
2.6.5.1.4. Tosilizumab (TCZ)	26
2.6.5.1.5. Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (STAT3)	27
2.6.6. KANSER İMMÜNOTERAPİSİNDE DOĞAL KAYNAKLI KÜÇÜK MOLEKÜLLER	28
2.6.6.1. Liken ikincil metabolitleri	29
2.6.6.1.1. Lobarik Asit (LA)	30
2.6.6.1.2. Kanser immünoterapisinde küçük moleküller ve monoklonal antikor kombinasyonlarının etkinliği.....	31
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	33
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	35
4.1. MATERYAL	35
4.1.1. KULLANILAN REAKTİFLER VE KİMYASALLAR	35
4.1.2. KULLANILAN KİLER	37
4.1.3. KULLANILAN SARF MALZEMELERİ	37
4.1.4. KULLANILAN CİHAZLAR	38
4.2. YÖNTEM.....	40
4.2.1. İLAÇ ADAY MOLEKÜLÜ LA'NIN HAZIRLANMASI.....	40
4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN DEVAMLILIĞI	40

4.2.2.1. Hücre Hatları ve Büyüme Koşulları	40
4.2.2.2. Hücre Açma ve Besiyeri değiştirilmesi	41
4.2.2.3. Hücre Pasajlaması	41
4.2.2.4. Hücre dondurulma ve saklanması	42
4.2.2.5. Hücre Sayımı	42
4.2.3. HÜCRE PROLİFERASYONU VE SİTOTOKSİK ETKİNİN BELİRLENMESİ .	43
4.2.3.1. xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analizi.....	43
4.2.4. HÜCRESEL MORFOLOJİNİN İZLENMESİ.....	45
4.2.4.1. Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi	45
4.2.4.2. Yara iyileşme analizi	46
4.2.5. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNLİĞİN BELİRLENMESİ.....	46
4.2.5.1. PD-1/PD-L1 protein bağlanma analizi	46
4.2.6. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNİN TRANSKRİPTOM BOYUTUNDA BELİRLENMESİ	47
4.2.6.1. RNA İzolasyonu	47
4.2.6.2. RNA saflık ve kalite tayini	48
4.2.6.3. Komplementer (cDNA) Sentezi.....	48
4.2.6.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR) Deneyi.....	49
4.2.7. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNİN PROTEİN BOYUTUNDA BELİRLENMESİ 50	
4.2.7.1. Protein İzolasyonu	50
4.2.7.2. Bradford Protein Saflık ve Miktar Tayini Analizi	50

4.2.7.3. Western Blot	50
4.2.8. LA VE LA-TCZ KOMBİNASYONUNUN IL-6R/STAT3/PD-L1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİ MEKANİZMASININ BELİRLENMESİ	53
4.2.8.1. siRNA Transfeksiyonu	53
4.2.8.2. LA'nın PD-L1 yolağı üzerindeki etki mekanizmasının transkriptom boyutunda belirlenmesi	53
4.2.8.3. LA-TCZ kombinasyonunun STAT3 yolağı üzerindeki mekanizmasının proteom boyutunda belirlenmesi	54
4.2.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	54
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	55
5.1. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN VE SİTOTOKSİK ETKİNİN BELİRLENMESİ	55
5.1.1. XCELLİNGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ.....	55
5.2. HÜCRESEL MORFOLOJİNİN İNCELENMESİ.....	58
5.2.1. HÜCRE MORFOLOJİSİNİN BELİRLENMESİ	58
5.2.2. HÜCRE GÖÇÜNÜN BELİRENMESİ.....	61
5.3. İMMÜNOTERAPÖTİK ETKİNİN BELİRLENMESİ.....	62
5.3.1. PD-1/PD-L1 PROTEİN BAĞLANMA ANALİZİ	62
5.4. LA VE LA-TCZ KOMBİNASYONUNUN IL-6R/STAT3/PD-L1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN TRANSKRİPTOM BOYUTUNDA BELİRLENMESİ	66
5.5. LA VE LA-TCZ KOMBİNASYONUNUN IL-6R/STAT3/PD-L1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN PROTEİN BOYUTUNDA BELİRLENMESİ	71
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	75
6.1. TARTIŞMA	75

6.2. SONUÇ.....	88
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>91</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>112</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>114</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağının çalışma mekanizması.....	4
Şekil 2.1. Yumurtalık kanserinin histolojik özelliklerine göre sınıflandırılması.	13
Şekil 2.2. Yumurtalık kanseri için risk faktörleri.	15
Şekil 2.3. Lobarik asitin molekül yapısı (167)	30
Şekil 3.1. Tez çalışmasının kapsadığı deneysel iş-akış şeması.	34
Şekil 4.1. xCELLigence RTCA S16 sistemi.....	44
Şekil 4.2. Western blot deneyi yürütme ve transfer aşamaları.	52
Şekil 5.1. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre LA'nın (A, B) A2780, (C, D) SKOV3, (E, F) OVCAR-3, (G, H) OSE hücre hatları üzerindeki doza ve zamana bağlı anti-proliferatif etkisi.	56
Şekil 5.2. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre ATE ve TCZ'nin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	57
Şekil 5.3. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre ATE'nin (A, B) ve TCZ'nin (C, D) OVCAR-3 üzerindeki doza ve zamana bağlı anti-proliferatif etkisi.	57
Şekil 5.4. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının OVCAR-3 hücresi üzerindeki anti-proliferatif etkisi.	58
Şekil 5.5. LA, TCZ, LA-TCZ (IC ₅₀) uygulaması sonrası OVCAR-3 ve OSE hücrelerindeki morfolojik değişim.	60
Şekil 5.6. Yara iyileşme analizine ait ters mikroskop görüntülerinin ImageJ analizi.	62
Şekil 5.7. Hedef moleküllerin IC ₅₀ konsantrasyonları uygulamasının hücre göçü üzerindeki etkisi.	62
Şekil 5.8. Hedef molekül uygulamasının PD-1/PD-L1 protein-protein bağlanması üzerindeki doza bağlı etkisi.....	65

Şekil 5.9. Hedef molekül uygulaması sonrası IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı ile ilgili genlerin ifade seviyeleri.....	68
Şekil 5.10. Hedef molekül uygulaması sonrası STAT3 hedefli siRNA transfekte edilmiş hücrelerde yolakla ilgili gen ifade seviyeleri.....	70
Şekil 5.11. Hedef molekül uygulaması sonrası (A) PD-L1, (B) STAT3 protein ekspresyon seviyeleri.....	72
Şekil 5.12. Hedef molekül uygulaması sonrası STAT3 hedefli siRNA transfekte edilmiş hücrelerde STAT3 protein ekspresyon seviyesi.	73
Şekil 6.1. LA'nın IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı üzerindeki etki mekanizması.	89
Şekil 6.2. Grafik özet.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları.	35
Çizelge 4.2. Tez çalışmasında kullanılan reaktif ve kimyasallar ve markaları.	36
Çizelge 4.3. Tez çalışmasında kullanılan kitler.	37
Çizelge 4.4. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları.	39
Çizelge 4.5. xCELLigence RTCA için LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının deney grupları e-plaka yerleşimi.	45
Çizelge 4.6. qRT-PCR deneyinde kullanılmış 6 hedef gene ait sekans bilgileri.	49
Çizelge 4.7. STAT3 hedefli siRNA sekans dizisi.	54
Çizelge 5.1. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre LA'nın hücre hatları üzerindeki IC ₅₀ değerleri.	55
Çizelge 5.2. Hedef molekül uygulamasının PD-1/PD-L1 protein-protein etkileşiminin baskılanması üzerindeki (%) etkinliği.	63
Çizelge 5.3. Hedef molüküllerin IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı ile ilgili 6 genin ifade seviye profili.	67

SİMGELER DİZİNİ

ASC	Amerikan Kanser Derneği
AKT	Protein kinaz B
AML	Akut miyeloid lösemi
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
ATE	Atezolizumab
ATP	Adenozin trifosfat
BAF	BRG/BRM-iliskili faktor
BC	Buffer kontrol
BEV	Bevacizumab
BMS	Bristol Myers Squibb
BRAF	B-Raf proto-onkogen, serin/treonin kinaz
BSA	Bovin serum albümin
CAR-T	Kimerik antijen reseptörü T hücresi
CCC	Berrak hücreli karsinom
cDNA	Komplementer DNA
CRS	Sitoredüksiyon
CTL	Sitotoksik T lenfosit
CTLA-4	Sitotoksik T-lenfosit antijen 4
DC	Dentritik hücreler

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Ortamı
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Endometrioid karsinom
EC ₅₀	Maksimum etki konsantrasyonunun yarısı
ED ₅₀	Maksimum inhibisyonu indükleyen dozun yarısı
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal mezankimal geçiş
EOC	Epitelyal yumurtalık kanseri
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FIGO	Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu
FL	Foliküler lenfoma
FBS	Fetal sığır serumu
GOF	Fonksiyon kazancı
HER2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HGSOC	Yüksek dereceli seröz karsinom
HIF-1 α	Hipoksi ile indüklenen faktör 1 α
HSP27	Isı şoku proteini 27

ICB	İmmün kontrol noktası blokajı
ICI	İmmunkontrol noktası inhibitörleri
IC ₅₀	Maksimum inhibisyon konsantrasyonunun yarısı
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IHC	İmmünohistokimya
IL-6	İnterlökin 6
IL-6R	İnterlökin 6 reseptörü
IL4	İnterlökin 4
JAK	Janus kinaz
KIT	KIT proto-onkogen, tirozin kinaz
KRAS	Kirsten rat sarkom virüsü onkogen
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
LA	Lobarik asit
LBCL	Büyük B hücreli lenfoma
LOF	Fonksiyon kaybı
LGSOC	Düşük dereceli seröz karsinom
mAb	Monoklonal antikor
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MHC	Majör histu uyumluluk kompleksi
MC	Müsinoz karsinom

MCL	Manto hücreli lenfoma
MCT	Olgun kistik teratom
MM	Multipl miyeloma
MMRd	Yanlış eşleşme onarımı eksikliği
mRNA	Haberci RNA
MTT	3-(4,5-Dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür
mTOR	Rapamisin memeli hedefi
Mw	Molekül ağırlığı
MZL	Marjinal zon lenfoma
NC	Negatif kontrol
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NLRC5	Majör histouyumluğu kompleksi-1'in anahtar transkripsiyonel aktivatörü 5
NK	Doğal öldürücü hücreler
NRAS	Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
OGCT	Germ hücreli yumurtalık tümörü
OMGCT	Germ hücreli malign yumurtalık tümörü
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PD-1	Programlanmış hücre ölüm proteini 1

PD-L1	Programlanmış hücre ölüm proteini ligandı 1
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PC	Pozitif kontrol
PI3K	Fosfoinozotid-3 kinaz
PTEN	Fosfotaz ve tensin homologu
RAF	Hızlandırılmış fibrosarkom kinaz
RNA	Rimonukleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTCA	Gerçek zamanlı hücre analizi
SBT	Seroz borderline tumorler
sc-siRNA	Unconjugated siRNA
SDS	Sodyum didosil sulfat
siRNA	Susturucu (small interfering) RNA
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
STIC	Seroz tubal intraepitelyal lezyon
STIL	Seröz tubal intraepitelyal lezyon
SWI/SNF	SWItch/sakkaroz
TCGA	Kanser genom atlası

TCZ	Tosilizumab
TGF- β	Dönüşen büyüme faktörü beta
TIL	Tumor infiltre lenfosit
TME	Kanser mikroçevresi
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF- α	Tumor nekroz faktör α
TP53	Tümör protein 53
TSG	Tumor baskılayıcı genler
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
WHO	Dünya sağlık örgütü
A	Amper
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
μ M	Mikromolar
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre

1. GİRİŞ

“Parçalara ayırdığınız canlılar aracılığıyla yaşamı izlemek gibidir bu.

Keşfettiğiniz anda kaybedersiniz onu” (Alexander Pope, 1688-1744) (1).

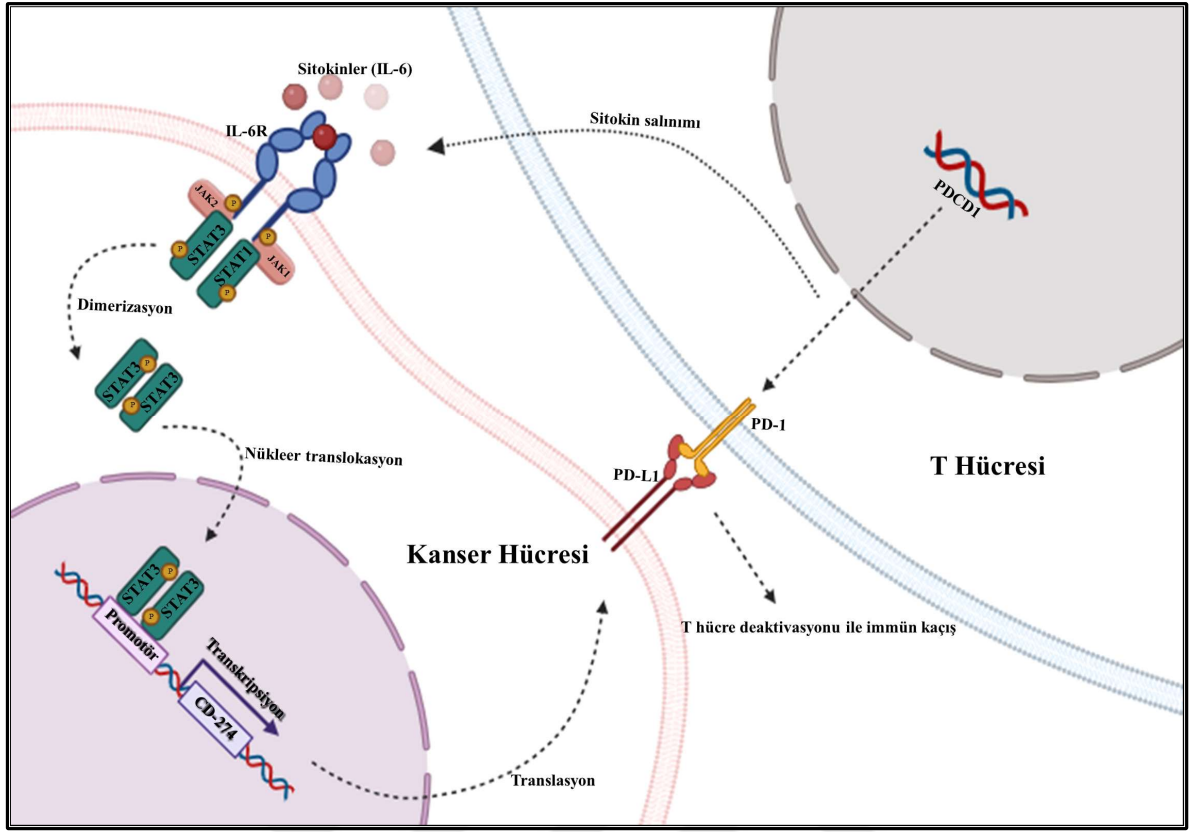
Farklı tedavi yöntemleri ve bu yöntemlere bağlı hızlı gelişmelere rağmen, 21. yüzyılda kanser hala ölümcül bir hastalık olmaya devam etmekte ve her geçen gün kansere bağlı ölüm sayısı artış göstermektedir (2). İstatiksel verilere göre her dört kişiden birinin hayatı boyunca kanser riski taşıdığı belirlenmiştir (2–4). Örneğin Amerika Birleşik Devletleri’de 1991’den beri kanser vakalarının kontrol edilmesinde %33’lük bir ilerleme ile 3.8 milyon ölüm engellenmiş, ama buna rağmen Amerikan Kanser Derneği (ASC) 2024 yılı için 2.001.140 yeni kanser vakasının ve 611.720 kansere bağlı ölümün beklenen bir istatistik olduğunu belirtmiştir (5,6). Sedeta ve arkadaşlarının 2023’de yaptığı bir araştırma sonuçlarına göre güncel tedavi metotları sonrasında, kadınlarda akciğer kanseri erkeklerde de karaciğer kanseri dışında diğer kansere bağlı ölüm oranlarında düşüşler gözlemlenmiştir (7). Sung ve arkadaşlarının 2020’de yayınladığı bir makaleye göre, kadınlarda meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir (%24,5), bunu kolorektal kanser (%9,4), akciğer kanseri (%8,4), rahim boynu (cervix uteri) kanseri (%6,5), tiroit kanseri (%4,9), rahim (corpus uteri) kanseri (%4,5), mide kanseri (%4,0), yumurtalık kanseri (%3,4), karaciğer kanseri (%3,0), maling lenfoma (%2,6) ve diğer kanserler (%28,9) takip etmektedir (8).

Kadınlarda insidansının en yüksek olduğu sekizinci, mortalite bakımından ise beşinci olan yumurtalık kanseri her yıl yaklaşık 152.000 kadının ölmesine sebep olmaktadır (9). Hastalık teşhisinin erken evrelerde olması sağkalımın %80-90 oranlarında tutulması mümkün olsa da, yumurtalık kanserinin metastaz yaptığı hastalarda bu oran %25’e kadar inmektedir. Ayrıca yumurtalık kanseri en yaygın görülen epitelyal ve tüm yumurtalık kanseri teşhislerinin sadece %5’ini oluşturan germ hücreli ve seks-kord-stromal kanserler olacak şekilde üç yumurtalık kanseri türü başlıkları altında incelenmektedir (10). Bununla beraber Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) Kadın Genital Tümörlerinin Sınıflandırılması üzerine 2020’de yayınladığı rehberde epitelyal yumurtalık kanserini hücreli yapısı sebebi ile beş ana histotipe - yüksek dereceli seröz karsinom (HGSOC), düşük dereceli seröz karsinom (LGSOC), müsinöz karsinom (MC), endometrioid karsinom (EC) ve berrak hücreli karsinom (CCC) – sahip olduğu bildirilmektedir (11).

Yumurtalık kanseri gizlice nüksedebilen ve teşhis konulduğunda tedavi olanaklarının sınırlı olduğu kanser türlerinden biridir. Hastalığın doğru şekilde kontrol edilebilmesi için hastanın ve sağlık personelinin kanserin semptomları, görüntüleme araçlarının verileri ve tedavi seçenekleri hakkında yeterli bilgiye sahip olması gerekmektedir (12). Yüksek derecede yapışık birinci evre yumurtalık kanserlerinde hastanın ölüm riski %30'a kadar yaklaşabildiğinden bu tip birinci evre tümörlerde ilk olarak cerrahi rezeksiyon devamında ise tümörün histolojisi ve yapışma oranına göre adjuvan tedavi uygulanmaktadır. Daha ileri seviyelerdeki yumurtalık kanseri için mümkünse ilk olarak cerrahi müdahale devamında ise platin bazlı kemoterapi, aralıklarla storedüktif cerrahi ve tekrar ek platin kemoterapisi tedavi metodu olarak kullanılmaktadır (13). Bütün bu tedavilere rağmen kanserin tekrardan gelişme riski bulunmaktadır. Yüksek verimli moleküler analiz teknolojilerinin hızla gelişmesi sayesinde transkriptomik ve proteomik verilere ulaşmak daha kolay bir hale gelmiştir. Bu ilerleme, geleneksel yöntemlere kıyasla insan hastalıklarının daha kesin ve hassas bir karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır (14). Bu sebeple, araştırmacılar yumurtalık kanseri ve diğer kanserler için yalnızca tam etkili bir yanıt sağlamakla kalmayıp aynı zamanda daha az toksisiteye ve yan etkilere sahip güvenilir bir yöntem geliştirmeye çalışmaktadırlar.

Bu bağlamda, kanser immünoterapi son zamanlarda yaygın olarak incelenen bir tedavi metodu olarak karşımıza çıkmaktadır (15). 2013 yılında "Science" dergisi tarafından "Yılın Atılımı" olarak seçilen kanser immünoterapisi, bağışıklık sisteminin kanseri önleme ve kanserle mücadele etme yeteneğini artıran ve yeniden düzenleyen bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır (16). Kontrolsüz otoimmün enflamatuvar yanıtlar üreten kanser hücrelerini tespit edip onları ortadan kaldırmak, onlara karşı pasif ve aktif bağışıklık sağlamak kanser immünoterapisinin başlıca hedefidir (16,17). Doğal bağışıklık hücreleri olan doğal öldürücü (NK) hücreler, eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri, nötrofiller, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) ya doğrudan tümör hücrelerini öldürerek ya da adaptif bağışıklık yanıtlarını tetikleyerek tümör baskılanmasına katıldığı bilinmektedir (18). Kanser immünoterapisi tedavisi farklı hücresel yollarda etkilidir (19). Bunları immün kontrol noktası blokajı (ICB), kinaz aktivitesi, aminoasit metabolizması ve adenoazin sinyallenmesi, kemokin reseptörleri, epigenetik düzenlemeler, doğuştan gelen bağışıklık etkileşimi olarak sınıflandırmak mümkündür (20).

Kanser immünoterapisinde en önemli hedef, kanser hücrelerine karşı sistemik ve tümöre özgü CD8⁺ sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtlarının aktivasyonudur (21). Buna dayanarak da, programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) veya programlanmış hücre ölüm proteini 1 ligandı (PD-L1)'na karşı kullanılan kontrol noktası blokajına dayalı tedavilerde büyük ilerlemeler elde edilmiştir (22). Kanserli dokularda kontrol noktası blokajı molekülleri anormal şekilde değişim göstererek T hücrelerinin baskılanmasına bu da kanserin bağışıklık sisteminden kaçmasına sebep olmaktadır (23). PD-L1 ifadesinin baskılanması, anti-PD-1 / PD-L1 tedavilerine direncin karakterizasyonunda önemli bir yere sahip mekanizma olarak görülmektedir (24). İnterferon- γ , TNF- α ve interlökin 6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen PD-L1 ifadesini aynı zamanda tümör mikroçevresi tarafından da desteklenerek antikanser etkinliğin oluşmasına engel olmaktadır (25). Translasyon öncesi PD-L1 yolağında görev alan en önemli sinyal yollarından biri de sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3)'dür ve anti-tümör immün tepkisinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (26). STAT3, tümör mikroçevresinde hem kanserli hem de kanserli olmayan hücrelerde geniş ölçüde aşırı ifade olmaktadır. Ayrıca, immün aktivasyon düzenleyicilerinin ifadesini inhibe etmede ve immünosupresif faktörlerin üretimini indüklemekte önemli roller oynadığı bilinmektedir (26). STAT3'ün aktivitesi IL-6 / JAK / STAT3 yolağı üzerinden kontrol edilmektedir (27). İlk olarak IL-6, interlökin 6 reseptörü (IL-6R)'e bağlanır ve reseptörün aktivasyonunu gerçekleştirir, daha sonra reseptöre bağlı Janus kinazı (JAK) tetiklenir ve STAT3'ün aktivitesini başlatmak için fosforilasyonu devreye sokar. Bununla da kanser hücrelerinde anti-apoptoz, anjiyogenez, çoğalma, istila, metastaz vs. gibi süreçlerin indüklenmesine zemin yaratılmış olur (27). Bu açıdan STAT3'ün en önemli özelliklerinden biri de, promotör bölgeye doğrudan bağlanarak PD-L1 ifadesini artırması olarak bilinmektedir (26) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağının çalışma mekanizması

Kanser immünoterapisi hem uygulanma şekline hem de uygulanacağı bölgeye göre farklı yöntemler kullanılarak yapılmaktadır (28). Ancak genel olarak, antikor bazlı yaklaşımlar (29), kanser aşılı (30), küçük molekül temelli yaklaşımlar (21) olarak sınıflandırılmaktadır (28). Bu yöntemlerin temel prensibi de, kontrol noktası blokajına, T hücre aktivasyonuna ve terapötik aşılama dayananmaktadır (19). İmmünoterapi bu yöntemleri hem tek başına hem de kombinasyon şeklinde, gerektiği durumlarda diğer terapi (radyoterapi, kemoterapi, cerrahi müdahale) yöntemleri ile birlikte de kullanarak kanserin bağışıklık sistemi yardımı ile önlenmesi üzerinde çalışmaktadır (22).

Küçük molekül temelli yaklaşımlar, hem maliyet, hem toksik etki, hem de daha hedefe spesifik olması açısından tedavi için daha uygundur ve ayrıca küçük molekül yapılı ilaçların büyük çoğunluğunun oral yoldan alınması, vücutta 24 saatten kısa sürede tamamen yayılmaları ve birden çok hedefe aynı anda etki edebilmeleri hem tedavi, hem hasta, hem de klinisyen için oldukça önemli yaklaşımlardır (20).

Yenilikçi bir ilaç aday molekülü ve liken ikincil metaboliti olan lobarik asit anti-tümör, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, antioksidan ve antimikrobiyal etkilere sahip bir küçük molekül olarak bilinmektedir (31). Likenler kendilerine özgü anatomileri ve fizyolojik yapıları sebebi ile 1500'den fazla biyoaktif ikincil metabolit rezervi barındırmaktadır. Lobarik asit, *Stereocaulon alpinum* ve *Stereocaulon paschale* gibi likenlerden izole edilmektedir (31,32).

Terapotik etkinliği yüksek olan küçük moleküller son yıllarda monoklonal antikorlar (mAb) kadar hızlı bir yükseliş göstermemiştir. Küçük moleküllerin mAb'lerin etkileyemediği doğuştan gelen veya adaptif bağışıklık mekanizmalarının hücre içi sinyal yollarını uyardıkları bilinmektedir (33). Bu bulgular sebebiyle, küçük molekül uygulamasına bağlı kanser immünoterapisinin, klinik tedavideki düşüşü ve kemoterapiye karşı direncin daha detaylı ele alınması gerektiğini ve ayrıca küçük moleküller ve mAb'lerin birlikte kombinasyon etkisinin tamamlayıcı bir tedavi olacağı düşünülmektedir (33). Tosilizumab 2010 yılında yetişkin hastalarda romatoid artrit tedavisi için onaylanmış, interlökin - 6 reseptörü (IL-6R) hedefli bir mAb'dir (34). Tosilizumab'ın kanser üzerinde de etkili olduğu, kromozomal instabilite gösteren kanserlerde büyümeyi yavaşlattığı tespit edilmiştir (35). Ayrıca tosilizumab'ın bir kemoterapotik olan korboplatin ile kombinasyon tedavide etkili olduğu, yumurtalık kanserinde hücre büyümesi ve proliferasyonu sinerjik olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (36).

Tez kapsamında liken sekonder metaboliti olan lobarik asitin ve lobarik asit – tosilizumab kombinasyonunun insan yumurtalık kanserinde IL-6R / STAT3 / PD-L1 immün yolağındaki etkileri araştırılmıştır. Lobarik asitin insan yumurtalık kanseri hücre hatları OVCAR-3, SKOV3, A2780 üzerinde anti-proliferatif etkisi ve insan normal yumurtalık hücre hattı OSE üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir. Lobarik asit ve lobarik asit – tosilizumab kombinasyonunun hedeflenen immün yolak üzerindeki etkileri mRNA ve protein boyutunda incelenmiş, hedef moleküllerin immün yolak üzerindeki spesifitesini anlamak için siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. PD-L1 inhibisyonunun belirlenmesi için PD-1 / PD-L1 bağlanma analizi, hücre göçünü belirlemek için ise yara iyileşme analizi yapılmıştır. Tez kapsamında lobarik asit ve lobarik asit – tosilizumab kombinasyonunun insan yumurtalık kanserinde hedef immün yolak üzerinde etkisinin tanımlanıp rutin tedavide kullanımının önerilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KANSER

Karsinogenez, hücre çoğalması ile apoptoz arasındaki denge açısından önemli olan, dolayısıyla sabit hücre kütesinin sürdürülmesi, hücrelerin ve dokuların işlevsel ve yapısal bütünlüğünü sağlayan karmaşık metabolik yolların düzenlenmesinde rol oynayan bir dizi gen mutasyonunu içeren karmaşık bir hastalık sürecidir (37). Kanser, anormal gen ifadesiyle karakterize edilir ve bu genetik düzensizlikler, hücre büyümesini engelleyen genleri (tümör baskılayıcı genler (TSG)) devre dışı bırakarak ve hücre büyümesini teşvik eden genleri (proto-onkogenler) aktive ederek kanser gelişimine yol açmaktadır (38).

Genellikle, proto-onkogenler hücre sel büyümeyi teşvik eden yolları düzenlediği bilinmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar baskın karakterli olup, değişiklikler sonucunda aktive olduğunda, onkogenlere dönüşmekte ve normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesine sebep olmaktadır (39). Bu onkogenler ortaya çıktıktan sonra, hücre çoğalmasını yönlendirilmesinde ve kanser gelişiminde çok önemli bir role sahiptirler. Proto-onkogenleri aktive eden mutasyonlar iki ana tipte kategorize edilebilir: kodlanan proteinin yapısını değiştirenler ve protein düzenlemesini bozanlar. Yapısal değişiklikler, RAS gibi proto-onkogenlerde nokta mutasyonlarını ve Philadelphia kromozom translokasyonu ile örneklenen füzyon genlerine yol açan kromozomal yeniden düzenlemeleri içerebilir. Günümüze kadar 50-60 arası onkogen tanımlanmıştır (40).

DNA hasarı onarımında, hücre bölünmesinin inhibisyonunda, apoptozun indüklenmesinde ve metastazın baskılanmasında rol oynayan ve bu sebeple mutasyon sebebi ile değişikliğe uğradıklarında kanserin başlaması ve ilerlemesine sebep olan bir diğer gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir (TSG) (39). TSG'ler genel olarak beş tipte sınıflandırılır:

- 1) Hücre döngüsünün belirli bir aşamasına ilerlemeyi kontrol eden hücre içi proteinleri kodlayan genler,
- 2) Hücre çoğalmasını engelleyen sinyaller için reseptörleri veya sinyal dönüştürücüleri kodlayan genler,
- 3) DNA hasarına veya kromozomal kusurlara yanıt olarak hücre döngüsünün durmasını tetikleyen kontrol noktası kontrol proteinlerini kodlayan genler,

4) Apoptozu indükleyen proteinleri kodlayan genler (örneğin, p53), ve

5) DNA'daki hataların onarılmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genler (39,40).

Kanserin gelişimi genetik faktörler (41), yaşlanma (42), inaktif yaşam tarzı (43), viral ve bakteriyel kanserojenler (44), çevresel ve kimyasal kanserojenler (45) ile bağlantılıdır. Kanserojenler, kansere neden olan veya kanser oluşumunu artıran maddelerdir. Kanserojenler, DNA'ya zarar vererek veya hücrelerde genetik değişikliklere neden olarak kanser oluşumuna katkıda bulunabilirler (46).

Çeşitli insan tümör tiplerinde, spesifik genetik değişiklikler tümör oluşumunun ve ilerlemesinin farklı aşamalarında görev almaktadır. Mutasyonların bir çok insan tümöründe yönetici rol oynadığı tespit edilse de, yine de bu konuda tartışmalar sürmektedir. Mutasyonların potansiyel bir tümör belirteci olması ile birlikte, normal hücrelerin kanserli hücreye dönüşmesinde ve tümör gelişiminde yer alan önemli bileşenlerden oldukları kabul görmektedir (37). Chang M. ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada 41 kanser türünde 257 gende mutasyona yatkın 470 sıcak nokta belirledikleri bildirilmiştir (47). İnsan kanserlerinde en iyi çalışılan terapötik hedefler, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *KIT* ve *EGFR* (47), meme ve yumurtalık kanserlerinde etkili *BRCA1*, *BRCA2* (48) tümöre özgü potansiyel mutasyona yatkın genler olarak bilinmektedir (47).

2.2. YUMURTALIK KANSERİ

2.2.1. YUMURTALIK KANSERİ HİSTOLOJİK ALT TİPLERİ

2.2.1.1. Epitelyal yumurtalık kanseri (EOC)

Epitelyal yumurtalık kanseri vakalarının %75'inin ileri evrelerde tanımlanması ve tedavideki zorlukları sebebi ile jinekolojik kanser ölümlerinde ilk sırada gelmektedir (49). Bu tip yumurtalık kanseri bütün yumurtalık malignitelerinin %95'inden fazlasını kapsamaktadır. Epitelyal yumurtalık kanseri kendi içinde 5 ana alt tipe ayrılarak, farklı tipte histolojilere, moleküler düzenlemelere ve farklı mikrocevresel özelliklere sahip tümörlerden oluşan heterojen bir kanser türüdür (50).

2.2.1.1.1. Yüksek dereceli seröz karsinom (HGSOC)

Epitelyal yumurtalık kanserinin en yaygın ve en agresif alt tipi yüksek dereceli seröz karsinomdur. Bütün hasta örneklerinin %60-80'inin içerdiği bilinmektedir (51).

HGSOC'lerin %96'sında BRCA mutasyonu ile ilişkili TP53 mutasyonu belirlenmiştir. Bu sebeple P53 mutasyonu ve WT1 IHC paterni hastalığın tanısında esas hedeflerden biri olarak dikkate alınmaktadır. Ayrıca, HGSOC, BRCA1, BRCA2 ve hücre sağkalımına sebep olan homolog rekombinasyonda yer alan diğer proteinler gibi DNA onarım yollarında kalıtsal veya edinilmiş mutasyonlarla karakterize edilmektedir. Nükleer anormal, P53 mutasyonu ve Ki-67 proliferasyon indeksi gibi kombine histolojik özellikler, seröz tubal intraepitelyal lezyon (STIL) ve seröz tubal intraepitelyal karsinom (STIC) olarak bir tubal lezyon aralığını tanımlamaktadır. STIC intraepitelyal bir lezyon olmasına rağmen metastatik bir yapıdadır, bu nedenle öncü bir lezyondan ziyade erken HGSOC olarak kabul edilebilmektedir (52).

2.2.1.1.2. Düşük dereceli seröz karsinom (LGSOC)

Yumurtalık karsinomlarının %2-5'i, seröz yumurtalık karsinomlarının ise %5-10'u invaziv bir tümör olan LGSOC başlığı altında incelenmektedir. HGSOC gibi LGSOC'de diğer tüm epitelyal yumurtalık kanseri alt türlerinden daha farklı bir moleküler yapıya sahiptir (52,53). Hücrel proliferasyon, canlılığın sürdürülmesi, göç ve anjiyogenez gibi hücrel aktivitelerin düzenleyicisi olan mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağının aktivasyonu LGSOC için karakteristik bir belirteçtir. MAPK yolağının indüklenmesinde rol alan BRAF ve KRAS'daki mutasyonlar, MAPK'nın yapısal aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. KRAS kötü BRAF ise nisbeten iyi prognozla ilişkilidir. Bu karsinom için ikinci bir belirteç insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) yolağıdır. IGF'nin IGF-reseptör ile bağlantısı, bu karsinomun patogeneğinde rol alan PI3K/AKT/mTOR, RAF ve MAP komponentlerinin aktivasyonuna sebep olmaktadır (53). HGSOC'den farklı olarak P53 daha agresif tiptedir ve kemoterapiye yanıtı oldukça zayıftır. Bu karsinomda BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının karakteristik bir özelliğe sahip olmadığı bilinmektedir (52).

2.2.1.1.3. Müsinöz karsinom (MC)

Müsinöz yumurtalık karsinomu genç yaşta kadınlar da daha sık görülen, ayrıca erken teşhis edilmesi olağan bir alt tiptir. Bunun sebebi genellikle çok büyük primer tümörler olması ve hastalık hala yumurtalıkla sınırlıyken semptomlara neden olmasıdır. Bununla beraber müsinöz karsinom epitelyal yumurtalık kanserlerinin %2,4'ünü oluşturmaktadır (54). Hastalığın ilk evrelerinde teşhis edilmiş müsinöz karsinomda sağkalım %90 oranındadır, bununla beraber metastaz göstermiş hastalıkta sağkalım 12 aya kadar düşebilmektedir (55). Hastaların %50 sinde KRAS mutasyonu %18 ise HER2 amplifikasyon bulunmaktadır.

Müsinöz karsinomların yalnızca karsinomatöz birleşenlerinde TP53 mutasyonuna denk gelmek mümkündür. Diğer yumurtalık kanserleri risk faktörleri bu karsinomun epidemiyolojisinde rol almamaktadır. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları bu karsinom için karakteristik değildir. Bilinen tek klinik risk faktörü tütün tüketimidir (56).

2.2.1.1.4. Endometrioid karsinom (EC)

Epitelyal yumurtalık kanserlerinin %10'unu oluşturan endometrial karsinomun ana sebebi olarak endometriozis hastalığı görülmektedir. Ayrıca Lynch sendromu olan kadınlarda endometrial karsinomun gelişme riski daha yüksek olarak bildirilmiştir. Bu risk faktörleri aynı zamanda berrak hücreli karsinom (CCC) ile de ilişkilidir (57). Endometrioid karsinom Kanser Genom Atlası (TCGA) tarafından moleküler işleyişi sebebi ile 4 kategoride sınıflandırmıştır:

- 1) POLE ekzonükleaz bölgesinde inaktive edici nokta mutasyonları ve ultra mutasyonlar. İyi prognozludur.
- 2) Yanlış eşleşme onarımı eksikliği (MMRd) instabilitesi gözlenen endometrioid karsinom ultra mutasyonları. Orta prognozludur.
- 3) Çoğu seröz karsinomdur, %95 oranında TP53 mutasyonu gözlenmektedir. Kötü prognozludur.
- 4) Somatik kopya sayısı düşüktür. Mutasyon yükü az bulunur. Karsinomun histolojik derecesi prognozu etkilemektedir (58).

2.2.1.1.5. Berrak hücreli karsinom (CCC)

Yumurtalık berrak hücreli karsinomu, yumurtalık kanserlerinin <%5'ini oluşturmaktadır. Araştırmacılar, endometrial kistlerde demir içeriğinin artmasıyla başlayan ve demirin neden olduğu oksidatif stres yoluyla DNA hasarına, mutasyonlara ve karsinojeneze neden olan bir mekanizmanın bu kanserin ana sebeplerinden biri olduğunu düşünmektedirler. Hastaların %50'sinde görülen, fermente edilmeyen SWItch/sakkaroz (SWI/SNF) kromatin modelleme protein kompleksi genlerindeki, PI3K/Akt sinyal yolundaki ve reseptör tirozin kinaz/Ras sinyal yolundaki mutasyonlar hastalık için karakteristik moleküler düzenlemelerdir. HGSOC ile karşılaştırıldığında CCC'de TP53, BRC1 ve BRC2 mutasyonlarına nadir

rastlanmaktadır. Bu karsinomun immünoterapi için açık bir hedef olduğu düşünülmektedir. İnstabil mikrosatelit CCC yüksek ölçüde PD-1 pozitif tümör infiltrate lenfositler (TIL) ve tümör hücrelerinde ve/veya intraepitelyal veya peritümöral immün hücrelerde PD-L1`i tek tip olarak ifade etmiştir (57).

2.2.1.2. Germ hücreli yumurtalık tümörü (OGCT)

Yumurtalıkta germ hücreli tümörler geniş bir yaş aralığında kendini göstermektedir. Bu tümörler pluripotent primodial germ hücrelerinden türemektedirler. %95 gibi büyük bir oranda bu tümörler iyi huyludur. %5`lik malign (OMGCT) ve karakteristik bir klinik veriye sahip tümörler genellikle 40 yaş altı kadınlarda gözlemlenmektedir. Epitelyal ve sex-kord-stromal tümörleri ile morfolojik benzerlikler göstermesi sebebi ile teşhisi zorludur (59). Olgun, olgunlaşmamış ve monodermal teratomlar, disgerminomlar, endodermal sinüs tümörleri, embriyonal karsinomlar, koryokarsinomlar germ hücreli malign tümörlerin bilinen alt tipleridir (60).

2.2.1.2.1. Disgerminom OMGCT

Disgerminomlar en sık gözlemlenen OMGCT alt tiplerinden biri olarak bilinmektedir. Gebelik esnasında teşhis edilebilen bu tümörlerin doğum için bir olumsuzluk teşkil etmedikleri görülmüştür (61). Monoton hücre popülasyonlarından oluşan bu tümörlerin hücresel ve nükleik yapılarında farklılıklar gözlenebilir. Yine bu tümörlerde nekroz, kanama, fibroz ya da hyalin dejenerasyonu görünmesi de karakteristik olabilmektedir. Cerrahi müdahale ve sonrasında kombinasyon kemoterapiler bu tümörlerin prognozunda büyük ölçüde iyileşmelere yardımcı olmuştur (61,62).

2.2.1.2.2. Olgun teratom OMGCT

Ektodermal, endodermal ve mezodermal olgun dokulardan köken alarak gelişen bu tümörler, olgun kistik teratom (MCT) olarakta isimlendirilen yaygın yumurtalık neoplazmlarıdır. İntratümöral yağ bazlı bileşenlerin saptanması bu tümörlerin temel tanısal karakteridir. Rüptür, torsiyon, malign transformasyon ve gliomatozis peritonei belirgin komplikasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (63). Bu komplikasyonlar sebebi ile teşhisler nadir olup genellikle, rutin pelvik kontroller esnasında teşhis edilmektedir (61). Bilinen en yaygın OMGCT alt tipidir (%95) (64).

2.2.1.2.3. Olgunlaşmamış teratom OMGCT

Menapoz sonrası kadınlarda çok nadir görülüp, genç yaşdaki ve özellikle üreme çağındaki kadınlarda sık rastlanan, bütün OMGCT vakalarının %36-42'ni oluşturan malign tümörlerdir. 18,5 cm ortalama çap ile en büyük OMGCT teratomları olarak bilinmektedir. Olgun teratomun tersine genelde kötü prognozludur. Katı bir yapıya sahip olgunlaşmamış teratomların her üç germ katmanından doku içerdiği bilinmektedir (61).

2.2.1.2.4. Monodermal teratom OMGCT

Kendi içinde üç farklı – nöroektodermal, struma ovarii ve karsinoid – alt tipe ayrılır. Nöroektodermal tümörler sıklıkla sinir sistemi tümörlerini taklit etmektedirler, doğru tanımlanması için 1 cm çapında nöroektodermal dokunun saptanması gerekmektedir. Struma ovarii tümörleri tiroid tipi karsinom hedefli tümörleri içermekte ve farklı büyüklüklerde epitel hücreleri ve foliküller şeklinde görünmektedir. Yumurtalık karsinoidleri de yine kendi içinde, adacıklı, müsinöz, stromal ve trabeküler alt tiplerine ayrılmaktadırlar (65,66).

2.2.1.2.5. Endodermal sinüs (Yolk kesesi) tümörleri

Çok genç yaştakı bireylerden menopoz dönemindeki bireylere kadar çok geniş bir yaş aralığı olan yolk kesesi bileşenine sahip bir yumurtalık germ hücresi neoplazmidir (67). Bu tümörde neoplastik elementler embriyolojik yolk kesesinden yumurtalığa göç eden hücreleri taklit etmektedirler. Merkezi kan damarlarının etrafını sarmış tümör hücreleri, glomeruloid cisimler ve düz ya da küboidal şekilde hücrelerden oluşan bir ağ yapısı göstermektedir (68). EOC ile karşılaştırıldığında, bu tümörler daha hızlı büyüme ve özellikle retroperitonel lenf düğümleri ve karın içi yapılara daha hızlı metastaz yapma yeteneğine sahiptirler (69).

2.2.1.2.6. Embriyonel karsinomlar

Embriyonel karsinomlar OMGCT'lerin %4'nü oluştururlar ve genellikle diğer neoplastik germ hücresi bileşenleri ile karıştırılırlar. Ortalama olarak 15 yaşlı kadınlarda tabakalar ve yuvarlar şeklinde görülme sıklığı daha yüksektir. Papillalar nadir seyrek ve kan damarı metastazı sık görülmektedir (70). Yumurtalıklarda nadir görünmesine karşılık, homolog karşılığı olan testislerde daha sık teşhis edilmektedir (61).

2.2.1.2.7. Koryokarsinomlar

Yumurtalık koryokarsinomları, hamilelik kaynaklı primer gestasyonel koryokarsinom, başta uterus olmakla diğer genital kısımlarda ortaya çıkan primer gestasyonel koryokarsinom

metastazı ve trofoblastik yapılara farklılaşabilen, diğer neoplastik germ hücreleriyle benzerlik gösteren birincil germ tümörleri başlıkları altında incelenmektedir (70). Gebelik dışı koryokarsinomlar genellikle çocuklarda, genç yetişkinlerde ve menopoz sonrası bireylerde teşhis edilmektedir. Peng ve arkadaşları gebelik dışı koryokarsinom teşhisine sahip 12 yaşındaki bir çocuğu incelemiş ve akciğer, retroperitoneal lenf düğümleri ve beyin metastazı olduğunu bildirişlerdir (71). Gebelik dışı koryokarsinomlar, gebelik temelli koryokarsinomlara göre daha kötü prognoza sahiptir. Bu ikisini birbirinden ayırt etmek için DNA polimorfizm analizi en isabetli test olarak bildirilmiştir (70).

2.2.1.3. Seks-kord-stromal yumurtalık kanseri

Bütün yumurtalık tümörü tiplerinin sadece %7'ni oluşturan, nadir görülen bir yumurtalık kanseri alt tipidir. Yumurtalık bağ dokusundan: primer üreme kordonlarından ve stromal hücrelerden kaynaklanmaktadır. Genç bireylerde görülme oranı daha yüksektir (72). Malign seks-kord-stromal tümörlerin %90'nı oluşturarak en sık gözlenen tipi granüloza hücreli tümörlerdir (73). Seks-kord-stromal tümörlerin sıklıkla virilizasyon ve hipoöstrojenizm gibi hormonal dengesizliklerle karıştırılmasının sebebi bu tümörlerin androjen, östrojen ve kortikoid üretmesidir (74). Histolojik olarak saf stromal, saf seks-kord ve karışık tümörleri içermektedirler. Saf stromal tümörler, yumurtalık stromasının mezankimal katman hücrelerinden kaynaklanmakta ve fibromlar, tekomalar, sklerozan stromal tümörler, mikrokistik stromal tümörler, Leyding hücreli tümörler ve steroid hücreli tümörler olarak sınıflandırılmaktadır (75). *DICER1*, *STK11* ve *FOXL2* genlerinde mutasyonlar bu tümörler için karakteristiktir (72,73).



Şekil 2.1. Yummurtalık kanserinin histolojik özelliklerine göre sınıflandırılması.

2.3. EPİDEMİYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Tanıyı zorlaştıran belirgin olmayan semptomları ve bu sebeple de tedavi sürecini karmaşık hale getirmesi göz önüne alındığında, yumurtalık kanserinin “sessiz katil” olarak adlandırılması şaşırtıcı değildir (10). Yumurtalık kanserinin evrelerinin anlaşılması ile ilgili ilk veriler 1988’de bildirilmiş, daha sonra Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) tarafında 2014’de bu bilgiler güncellenmiştir (76). Yumurtalık kanserinin 4 evresi aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır: Evre I yumurtalıkla ilgili tümörler. Tümör tek overle sınırlıdır ve yüzeysel değişiklik görülmez. Evre II ya tek ya da her iki overde görülen pelvik yayılımı ile gözlenen tümörler. Evre IIA uterus veya fallop tüplerine yayılım, evre IIB diğer

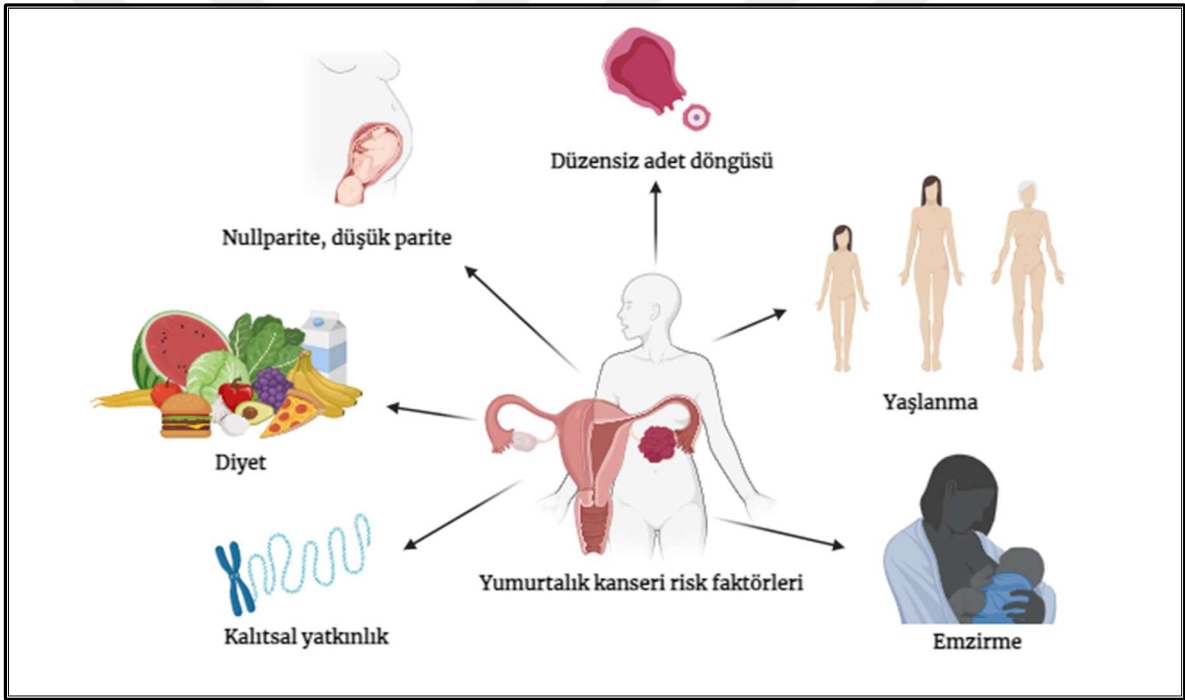
pelvik intraperitoneal dokulara nüks ile belirlenir. Evre III sitolojik ve hisolojik testler ile kesinleştirilen ve reperitoneal lenf nodlarında görülen metastaz ile karakterize edilir. Bir veya iki overde, evre IIIA mikroskobik, evre IIIB <2cm makroskobik ve evre IIIC >2cm makroskobik tümörlerin varlığı ile tanımlanır. Evre IV uzak metastazları içerir. Evre IVA sitolojik testler ile belirlenmiş maling prevral sıvı birikimi, evre IVB ise parankimal, karaciğer veya dalak metastazları ile karakteristiktir (76).

Adet döngüsünün erken başlaması veya yine genç yaşta adet döngüsünün sonlanması (menopoz) yumurtalık kanserinde risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (77). Doğum yapma oranı ile epitelyal ovaryum kanserinin görülme sıklığı ters orantılı olarak bildirilmiştir. Germ hücreli yumurtalık kanserinde nulliparite veya düşük parite gözlenen kadınlarda yumurtalık kanseri riski yüksekken, multiparite gösteren kadınlarda bu oranın %78 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Sex-kord-stromal yumurtalık kanserine sahip kadınlar için parite ile yumurtalık kanseri arasında bir bağlantı bildirilmemiştir (78). Emzirmenin kadınlarda yumurtalık kanseri riskini azalttığı tespit edilmiştir (79). Babic ve arkadaşlarının 2020'de 9973 kadın üzerinde yürüttüğü bir çalışma ile, emzirmenin yumurtalık kanseri ve özellikle yüksek dereceli mortalite gösteren serröz alt tipte etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca emzirmenin hamilelikten bağımsız olarakta kanser riskinin düşürdüğü belirlenmiştir (80).

Çeşitli kanser türlerinde olduğu gibi yumurtalık kanserinde de diyet belirleyici bir risk faktörüdür (81). Zeleznik ve arkadaşlarının 2020'de yayınladığı bir çalışmada, psödoüridin, triaçilgliserit, sfingolipitler yumurtalık kanseri ile ilgili risk faktörleri olarak bildirilmiştir (82). Diyabet ve yumurtalık kanseri arasında değişken bir ilişki olduğu bilinmektedir. Moleküler testler sonucunda, yüksek düzeyde insülin benzeri büyüme faktörünün, österojen ve sitokin seviyelerindeki artışların, adipokin seviyelerindeki değişkenliğin ve hiperinsülineminin yumurtalık kanseri riskine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (81).

Yumurtalık kanseri riski 30 yaş altındaki kadınlarda nadir görülürken, 50 yaş üstündeki özellikle beyaz kadınlarda daha yüksek risk düzeyine sahip olduğu bilinmektedir (10). Bununla beraber yumurtalık kanseri tanısı almış kadınların büyük çoğunluğu 70 yaş üzerindedir. Hastalığın risk düzeyi ve tedavi yönetimi hastaya bakım ve tanı – tedavi olanaklarına erişim ile ilişkilendirilmektedir (83).

Yumurtalık kanserinin ailesel hikayeye bağı gelişme riski, kalıtsal meme ve yumurtalık kanserinin (HBOC), BRCA1 ve BRCA2 patajonik varyantlarının etkinlik düzeyine göre değişmektedir (84). Bu patalojik varyantlara sahip kadınlarda seröz adenokarsinomların görölme oranının daha yüksek olduğı bildirilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 patalojik varyantları ile karakterize edilen yumurtalık kanseri, otozomal dominant bir şekilde kalıtsaldır. Hastanın ebeveynlerinin genomunda bu varyantların görünmesi, aynı zamanda yaşa ve cinsiyete bağı olarak kardeşleri de etkilemekte, eğer bir ebeveynde bu varyantlar bulunuyorsa hasta kardeşinin de bu patojeniteye sahip olması %50 oranla mümkündür (84). BRCA1 ve BRCA2 germ hattı patjjenik varyantına sahip bireyin bu patojenitetyi kendi çocuklarına devretme olasılığı %50`dir. Bu genlerin ifadesi, varyantın penetrasyonuna, bireyin cinsiyyetine ve yaşına göre çok sayıda değışiklik, göstermektedir (84).



Şekil 2.2. Yumurtalık kanseri için risk faktörleri.

2.4. GENETİK MUTASYONLAR

2.4.1. BRCA MUTASYONLARI

BRCA1 ve BRCA2 olarak ayrılan BRCA genleri sırası ile 17q21 ve 13q12 kromozomlarında bulunmakta ve DNA çift iplik kırılmalarında onarımı sağlayarak genom stabilitesine katkıda bulunmaktadır (85). Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar özellikle meme ve

yumurtalık kanserleri için önemli risk faktörleri olarak dikkate alınmaktadır (86). BRCA1 mutasyonuna sahip kadınlarda yumurtalık kanserinin gelişme riski %39, BRCA2 mutasyonuna sahip kadınlarda ise %11 olduğu bildirilmiştir. Herhangi bir BRCA mutasyonu bulunmayan ve 70 yaşına kadar olan kadınlarda ise yumurtalık kanseri gelişim riskinin %1,1' lere indiği görülmüştür (85). BRCA mutasyonları kalıtsal olabilecekleri gibi aynı zamanda sonradan da meydana gelebilmektedirler. Farklı araştırmalar yumurtalık kanserinde somatik BRCA mutasyonlarının oldukça yaygın (%5-7) olduğunu vurgulamaktadır. Bu somatik mutasyonlar, BRCA genlerinde kalıtsal bir hata olmamasına karşın, DNA onarımında hatalara sebep olarak yumurtalık kanseri riskini artırmaktadır (87).

2.4.2. TP53 MUTASYONLARI

Kromozom 17P13.1'de bulunan TP53, genom stabilitesi kontrol ederek, farklı hücresel stres durumlarında hücre döngüsünün durdurulması veya apoptozu indüklemek için gerekli genlerinin ifade seviyesini aktive ederek kanser gelişiminin engellenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (88). TP53 mutasyonu özellikle HGSOV'de çok yaygındır ve %96 oranında karakterize edilmektedir (89). Yumurtalık kanserinde P53 genindeki mutasyonlar, normal P53 proteininin işlevini bozabilir ve aynı zamanda "fonksiyon kazancı" (GOF) veya "fonksiyon kaybı" (LOF) olarak adlandırılan yeni işlevlere sahip bir protein üretebilmektedir. GOF mutasyonları, mutasyona uğramış P53 proteininin hücrelerde birikmesine neden olur ve bu da karsinogenezi, ilaç direnci, kötü prognoz ve tümör metastazının nüks etmesi gibi problemlere yol açar. P53 mutasyonu olan tümör hücreleri, hücre döngüsünü kontrol eden önemli bir mekanizma olan G1 kontrol noktasından yoksundur ve hücre döngüsünü durdurmak ve DNA hasarını onarmak için sadece G2 kontrol noktasına bağılırlar (88).

2.4.3. PTEN MUTASYONLARI

İfade seviyesinde düşük oranda olan değişiklikler bile hormonal reseptör aktivasyonunu etkileyebildiği için fosfotaz ve tensin homologu (PTEN) tümör oluşumu ve kanserin gelişiminde önemli bir hedeftir (90). Fosfoinozitol-3 kinaz (PI3K) yolağının inhibisyonundaki etkileri, fosfotaza bağımlı veya bağımsız aktivitelerde hücre göçü, çoğalması, genomik stabilite ve metabolizma üzerindeki etkileriyle güçlü bir tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (90). Shi ve arkadaşlarının 2020'de yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, Kanser Genom Atlası veri setinden alınan verilerde HGSOV'de

%45 oranında PI3K yolağı düzensizliği belirlenmiştir. Homozigot PTEN mutasyonlarının HGSOC'nin %7'sinde bulunduğu, bununla da, PTEN proteininin HGSOC'de %15 oranında tamamen ve %50 oranında ise kısmen kaybının gerçekleştiği bildirilmiştir (91). Ayrıca yumurtalık kanserinde PTEN mutasyonlarının EC ve CCC alt tiplerinde de gözlenen bir etken olduğu bilinmektedir (90).

2.4.4. KRAS VE BRAF MUTASYONLARI

Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve MAPK yolağının anahtar proto-onkogenleri olan *KRAS* ve *BRAF* hücre büyümesi ve çoğalmasında görev almaktadırlar. Fakat bu genlerde gerçekleşen mutasyonlar mitojenle tetikteldiği zaman hücre proliferasyonunda dengesizlikler yaşanarak tümör gelişimine katkı sağlamakta ve anormal protein ekspresyonuna sebep olmaktadır (92). Bu genlerde gerçekleşen mutasyonların yumurtalık kanseri için kötü prognoz ve kemorezistans biyobelirtici olduğu bilinmektedir (93). LGSOC başlangıcı olarak görülen yumurtalık seröz borderline tümörlerinde (SBT) bu mutasyonların görülme oranı %60 olarak belirlenmiştir. Ayrıca SBT'lerin yakınında bulunan yumurtalık kistadenomlarının da epitelyal yüzeylerinde *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarının olduğu bilinmektedir (94).

2.4.5. ARID1A MUTASYONU

ARID1A, SWI/SNF kompleksine ait, protein ürünü DNA'yı bağlayan ve ATP'ye bağlı polimorfik BRG/BRM-ilişkili faktör (BAF) kromatin yeniden şekillendirme biriminin çekirdek üyesi olarak bilinmektedir (95,96). ARID1A genindeki düzensizlikler fonksiyon kaybına sebep olmaktadır. Bu gen SWI/SNF kompleksinin en sık mutasyona uğrayan üyesi olarak bilinmektedir (95). Araştırmalar SWI/SNF kompleksinin toplu mutasyonunun insan kanserlerinin %20'inde ve özellikle ARID1A kromatin yeniden modelleme genindeki mutasyonun ise %45 oranında CCC hastalarında gözlemlendiğini göstermektedir (95,97). ARID1A'nın en önemli rollerinden biri de onkogeneze ve tümör baskılanmasına sebep olan gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki etkisidir. ARID1A özellikle PI3K/AKT/mTOR yolunun kontrol ederek hücre proliferasyonunda, T hücre aktivasyonu ve kanserin tanınmasında, EZH2 metiltransferaz işlevi ve gen ifadesindeki etkisinde, steroid reseptör modülasyonunda, DNA hasar onarımı ve hücre döngüsünde, p53 hedeflerinin ve *KRAS* sinyalinin düzenlenmesinde rol almaktadır (95,97).

2.5. YUMURTALIK KANSERİNDE TEDAVİ METOTLARI

2.5.1. CERRAHİ YAKLAŞIMLAR

Tom Griffiths'in 1975 yılında epitelyal yumurtalık kanseri hastaları için geliştirdiği sitoreduksiyon (CRS) cerrahi tekniği günümüzde de kullanılmaktadır (98). Yumurtalık kanseri cerrahisi, hayatta kalma şansını artırmak için mümkün olduğu kadar çok kanserli hücreyi ortadan kaldırmaya ve hatta bazen hastalığı tamamen iyileştirmeye çalışmaktadır. Fakat bu ameliyatlar riskli ve kapsamlıdır ve genellikle ameliyattan sonra ölüm veya takip eden kanser tedavilerini alamama gibi ciddi sorunlara yol açmaktadır (99). Yumurtalık kanseri müdahalelerinde laparotomi gibi geleneksel yöntemlerin yanında, ilerleyen teknolojiler sayesinde minimal invaziv cerrahi yöntemler de kullanılmaktadır. Özellikle erken evre yumurtalık kanserlerinde minimal invaziv cerrahi ile 5 yıllık sağkalım oranı %90'ın üzerinde gözlemlendiği belirtilmiştir (100).

2.5.2. YUMURTALIK KANSERİ KEMOTERAPİSİ

II ve IV evre yumurtalık kanserleri için CRS ve takibinde adjuvan platin bazlı kemoterapi uygulanması, en uygun tedavi metodu olarak bilinmektedir. İntraperitoneal kemoterapi, mikroskobik tohumlama, metastaz ve peritona kasinomatozis etkinliğine karşı etkili bir yöntem olmasının yanı sıra toksik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (101). Sisplatin ve paklitaksel uygulanması sonrasında hastalarda kanser yanıtı önemli bir boyuta ulaşmaktadır. Fakat kanserin kemoterapiye yanıtının uzun vadede geçerli olmamakla birlikte, hastalarda sürece bağlı ruhsal çöküntülere sebep olduğu bilinmektedir (102). Ayrıca ilerleyen zaman içerisinde hastalarda sisplatine karşı direnç oluşmakta ve bu da kanserin nüksetmesine olanak sağlamaktadır. Hastanın hayatta kalması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi bu ilaç direnci sebebi ile zor bir hal almaktadır (103).

2.5.3. YUMURTALIK KANSERİ İMMÜNÖTERAPİSİ

Cerrahi ve kemoterapideki ilerlemeler dikkate alındığında bile, yumurtalık kanserinin yüksek mortalite göstermesi, immünoterapi gibi farklı metotların kullanımını gerektirmektedir. Kontrol noktası blokajı, aşı kullanımını, uyarlayıcı hücre transferini ve bu yöntemlerin çeşitli kombinasyonları en çok bilinen immünoterapi stratejilerindendir (15). Yumurtalık kanseri immünoterapisi için tedavi metotlarının birçoğu klinik çalışmalarda test edilmektedir (104). Yapay T hücresi reseptörleri üretmek için genetik olarak tasarlanmış bir çeşit T hücresi kullanımını baz alan, kimerik antijen reseptörü T hücresi (CAR-T) adaptif

immün hücre terapileri arasında en hızlı gelişim gösteren tedavi metodu olarak bilinmektedir (105). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar yumurtalık kanserinin kendi immünojenik yapısından da kaynaklanan doğal NK dikkate değer bir immünoterapi metodu olduğunu belirtmektedir. NK'ların antikora bağlı hücre sitotoksitesi, performans salınımı ve granül enzim salgılanması mekanizmaları kullanarak yumurtalık kanseri üzerinde terapötik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (106).

2.6. KANSER İMMÜNÖTERAPİSİ

Kanserleşme prosesi esnasında kanser hücreleri bağışıklık sisteminden kaçınmak için mücadele etmektedirler. Bağışıklık düzenleme olarak bilinen bu dinamik süreç, eliminasyon, denge ve kaçış olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır (107). Eliminasyon aşamasında, bağışıklık sistemi tümör hücrelerini tanımlamaya ve primer düzeyde bir yanıt oluşturarak kanserli hücreleri ortadan kaldırmaya çalışmaktadır. Bağışıklık sisteminin yeterli olmaması veya çevresel faktörler sebebi ile eliminasyon fazından kurtulan kanserli hücreler mevcudiyetlerini korudukları fakat çoğalmanın durdurulduğu denge aşamasına geçmektedir. Adaptif bağışıklık ve kanserli hücreler arasındaki etkileşim yıllar veya on yıllar sürebilmektedir. Genetik mutasyonlar veya çevresel faktörlerin uyarması sebebi ile kanserli hücreler denge aşamasından çıkmakta ve immün sistemden kurtuldukları kaçış aşamasına geçmektedirler. Bu aşamadayken kanserli hücreler efektör T hecrelerinin fonksiyonlarını inhibe etmek ve bağışıklık baskılanmasından kurtulmak için çeşitli ligandlar eksprese etmektedirler (108,109).

Bağışıklık sistemini yeniden manipüle ederek, antitümör bağışıklık tepkisinin aktivasyonu ve kanserin kaçışını engellemeyi hedefleyen kanser tedavi metodu kanser immünoterapisi olarak isimlendirilmektedir (110). Kanser immünoterapisi sayesinde bir antitümör immün yanıtı oluşturmak, sadece tümör hücrelerinin proliferasyonunu engellemez, ayrıca birincil bölgedeki nüksü engeller ve kanserin farklı dokulardaki metastazlarını da dururdurmayı hedeflemektedir. Kanser mikroçevresi (TME) dahilinde bağışıklığa sistemik bir tepki oluşturmak ve bağışıklığın işleyişinin kontrolünü sağlamak kanser immünoterapisinin geliştirilmesindeki esas hedeflerdir (107).

2.6.1. SİTOKİNLER

İnsan ve hayvan tümörlerinde rekombinant sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve hormonların spesifik olmayan bir kanser immünoterapisi metodu olarak ele alındığı bir dizi araştırmalar bildirilmiştir (28). Bağışıklık hücrelerinin büyümelerini, aktivasyonunu ve tümör bölgesine dahil olmasını sağlayabilmek için birden fazla sitokine ihtiyaç vardır. Lenfotik salınımın uyarılmasında etkili olan IL-2 sitokini uygulamasının murin tümör modellerinde metastazı azalttığı bildirilmiştir. Bu sitokin ile tedavi daha sonra 1992'de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından böbrek hücreli karsinomu ve melanom tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (28,107).

2.6.2. KANSER AŞILARI

Kanserlere aşı kullanılarak müdahale edilmesine ilişkin ilkin çalışmaların, 1910'larda William Coley'in tümörlere ölü *Streptococcus* ve *Serratia* bakterilerini enjekte etmesiyle ve 1950'lerde Lloyd Old'un *Bacillus calmette-guérin* (BCG) ile benzer yöntemleri denemeleriyle başladığı bilinmektedir (111).

Terapötik kanser aşılarının temel prensibi, tümörün küçülmesini sağlamak, geriye kalan hastalığı tamamen ortadan kaldırmak, uzun süreli bir antitümör hafızası oluşturmak ve olumsuz ya da genel tepkileri engellemeye dayanmaktadır (112). Kanser aşıları kendi içerisinde 3 ana başlıkta incelenmektedir; hücre aşıları, protein/peptit aşıları ve nükleik asit aşıları (30).

DC aşılarının amacı, tümöre özgü efektör T hücrelerini harekete geçirerek tümörleri etkili bir şekilde kontrol altına almak ve tümör nüksünü önlemek için bağışıklık hafızasını oluşturmaktır. Günümüzde iki yaygın DC aşısı hazırlama yöntemi bulunmaktadır. İlk yöntemde, hastaların periferik kanından mononükleer hücreler toplanarak, kültüre GM-CSF ve IL4 eklenir ve hücrelerin olgunlaşmasını sağlamak için tümör TNF- α kullanılmaktadır. İkinci yöntemde ise, lökosit ayırıştırma öncesinde GM-CSF tedavisi uygulanarak hastanın kemik iliğinden mobilize edilen CD34+ öncül hücreler elde edilmektedir (113).

Yumurtalık kanseri hastalarından elde edilen DC verileri ele alındığında, DC bazlı tedavilerin yumurtalık kanseri için potansiyel bir tedavi metodu olabileceği düşünülmektedir. DC aşılarının yumurtalık kanseri tedavisindeki etkinliği, vaka raporları,

pilot çalışmalar ve klinik çalışmalar da dahil olmak üzere 20'den fazla çalışma tarafından rapor edildiği bilinmektedir (114).

Normal dokularda ifade edilmeyen ve yalnızca kanser hücrelerinde bulunan protein ve peptitlerden elde edilen spesifik antijenik epitoplara karşı bağışıklık tepkisini uyandırabilen aşılar, protein/peptit aşıları olarak sınıflandırılmaktadır. Yapay olarak sentezlenen bir antijen proteini/peptidi uygulandığında, profesyonel antijen sunan hücreler tarafından alınmaktadır. Antijenleri tanıyan T hücreleri kansere özgü bağışıklık tepkileri başlatmaktadır (30).

mRNA aşıları tümör antijenlerini mRNA formunda kodlayan genetik bilgi sağlamaktadır. mRNA aşıları dikkat çekici bir immünojenite göstermektedir. mRNA ile kodlanmış antijenin geçici ekspresyonu, daha kontrollü antijen maruziyetine izin verir ve uzun vadeli antijene maruz kalma riskini azaltır. RNA DNA'ya göre daha kolay degrades olduğundan, aşı stabilitesini sağlamak için çeşitli modifikasyonlar gerekmektedir. Kişiselleştirilmiş tıp gibi bu stabiliteyi sağlamaya yönelik atılımlar mRNA aşı çalışmalarındaki gecikmelerin esas sebebi olarak bilinmektedir (115).

2.6.3. ONKOLİTİK VİRÜSLER

Replikasyon yeteneği sayesinde kanseri hedefleyen virüslerin kullanımı onkolitik viroterapinin temel prensibidir (116). Bu virüslerin seçici bir şekilde kanser hücrelerinde çoğalması, hem direkt hücre lizisine hem de antikanser immün yanıtın indüklenmesine sebep olduğu bilinmektedir (116). Onkolitik viroterapide hasta sitemine en uygun şekilde müdahale edecek yöntemin belirlenmesi ile kansere karşı doğru immün yanıtın verilmesinin sağlanması bu tedavi metodundaki öncelikli zorluk olarak bilinmektedir (117).

Genetiği değiştirilmiş herpes simpleks virüsü *Talimogene laherparepvec*'in FDA ve Avrupa onkolitik viroterapi komisyonu tarafından tanınmaktadır. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda onkolitik viroterapi ve kemoterapinin kombine uygulamaları kanser tedavisinde başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (117).

2.6.4. CAR-T HÜCRE TERAPİSİ

CAR-T hücre tedavisi, dolaşım sisteminden izole edilen T lenfositlerini, kimerik antijen reseptörlerini ifade edecek şekilde işleyerek, majör histo-uyumluluk kompleksinden (MHC) bağımsız bir şekilde kanserin T hücresi tarafından tanınmasını baz alan bir tedavi metodudur

(118). CAR'lar belirli bir hedef tarafından ifade edilen antijenleri tanıyarak, hedef hücreyi ortadan kaldırmak için lenfositleri modüle eden sentetik reseptörlerdir (119). *In-vitro* çoğalmanın ardından kansere karşı immün yanıtın yeniden düzenlenmesi için hücreler hastaya geri aşılanmaktadır (118).

CAR-T tedavisi hematolojik malignitelerde CD19, BCMA, CD20 ve CD22 antijenlerine odaklanmıştır. CD19, CD20, CD22 ve CD23 genellikle B-hücre temelli malignitelerde kullanılan hedeflerdir. Bu antijenler arasında CD19, en yaygın kullanılan hedeftir ve çoğu B-hücreli malignitede yüksek düzeyde eksprese edilir. CD30, genellikle Hodgkin lenfomasının tümör hücrelerinde, CD33, özellikle akut miyeloid lösemi (AML) tedavisinde, SLAMF, BCMA ve CD138 ise, multipl miyelom (MM) tedavisinde geliştirilmiştir. CAR-T hücreleri, belirli tümörle ilişkili antijenleri tanıdığına, immünreseptör tirozin bazlı aktivasyon motiflerinin fosforilasyonu ile aktivasyonu başlatarak, hücre proliferasyonunu teşvik etmekte, sitokin salınımını sağlamakta ve immün yanıtları artırmaktadır (120).

CAR-T hücre tedavisi, akut lenfoblastik lösemi (ALL), büyük B hücreli lenfoma (LBCL), foliküler lenfoma (FL), manto hücreli lenfoma (MCL), marjinal zon lenfoma (MZL) ve MM tedavilerinde kullanım için FDA onayına sahiptir (121).

CAR-T güçlü bir tedavi hedefi olsa da yumurtalık kanserinde kullanımından zorluklar yaşanmaktadır. CAR-T hücrelerinin katı tümörleri etkileyebilmesindeki bu zorluk, hematolojik kanserler ile karşılaştırıldığında yumurtalık kanserinde tümör içi ve tümörler arası önemli heterojenitelerin varlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca yumurtalık kanserinin tümör mikro ortamının doğal immünojenitesi CAR-T hedeflemeyi daha da zor hale getirmektedir. TME'de bulunan hücreler tarafından salgılanan belirli sitokinler reaktif oksijen türleri üreterek CAR-T hücrelerinin hedefe ulaşmadan aktivitesinin inhibisyonuna sebep olabilmektedir (122).

2.6.5. MONOKLONAL ANTİKORLAR

Bağışıklık sisteminin normal bir tepkisi olarak, vücut yabancı maddelere karşı antikor üretmekte ve salınım yapmaktadır. Monoklonal antikorlar (mAb'ler) ise, kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan antijenlere bağlanarak, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine saldırısını düzenleyebilen, güçlendiren veya taklit eden antikorlar olarak tasarlanmış laboratuvar ürünü moleküller olarak bilinmektedir (123). Onkolojide mAb'ler tümörün

proliferasyonunun engellenmesi, anjiyogeneze müdahale ederek büyümenin engellenmesi, programlanmış hücre ölümü ve bağışıklık kontrol noktalarından kaçınmasını engellemek gibi amaçlarla kullanılmaktadır (123).

mAb'ler ilaç veya radioaktif madde taşıyıp taşımadıklarına göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar konjuge olmayan ve kanser üzerindeki antijene kendi kendine direkt etki eden çıplak mAb'ler ve kemoterapötik veya radioaktif parçacıklar taşıyan konjuge mAb'ler olarak bilinmektedirler. Ayrıca blinatumomab gibi iki ayrı mAb'den oluşan ve iki ayrı antijene aynı anda bağlanabilen bispesifik mAb'ler de mevcuttur (124).

Üretim formatına göre mAb'ler dört başlıkta incelenmektedirler. İnsanla uyumu düşük olmasına rağmen bir çok kanser için onaylanmış fare mAb'leri, %65 insan %35 fare kökenli kimerik mAb'ler, fare mAb'lerinin zincirlerindeki hiperdeğişken bölgelerin insan antikoruna eklenmesi ile oluşturulan insanlaştırılmış (hümanize) mAb'ler ve hayvan antikor üreten genlerinin endojen bölgelerinin sürdürülerek insan genleri ile değiştirilmesinden elde edilen tamamen insanlaştırılmış (tam hümanize) mAb'ler olarak ayrılmaktadırlar (125).

Kanser immünoterapisi için FDA tarafından onaylanmış mAb'lerin büyük çoğunluğu hematolojik kanserleri hedeflemektedir. CD20 hedefli kimerik mAb rituksimab ve tam insanlaştırılmış mAb ofatumab, CD52 hedefli hümanize mAb alemtuzumab ve CD22 hedefli mAb moxetumomab pasudotox bunlara örnek olarak gösterilebilir. Ayrıca katı kanserler için de HER2 hedefli hümanize mAb pertuzumab ve kimerik mAb margetuksimab, EGFR hedefli tam insanlaştırılmış mAb panitumumab FDA tarafından onaylanmıştır (126).

Pro-tümör büyümesinin ve hayatta kalma sinyallerinin bozulması ile sonuçlanan büyüme faktörü sinyallerinin bloke edilmesi mAb'lerin başlıca etki mekanizmaları arasında yer almaktadır. Setuksimab EGFR hedef alan bir mAb olarak incelenmektedir ve reseptör dimerizasyonunu bloke ederek apoptozun indüklenmesini sağladığı bildirilmiştir (127). Yumurtalık ve meme kanserlerinde yüksek ifade seviyesine sahip insan HER2 bilinen bir ligandı yoktur, bu sebeple trastuzumab kullanılarak hetero-dimerizasyon inhibisyonu hedeflenmektedir (127).

İmmün kontrol noktalarını hedefleyerek, kansere karşı immün yanıtın düzenlenmesinin amaçlayan mAb'ler immün kontrol noktası inhibitörleri (ICI) olarak güncel bir araştırma konusudur (128).

2.6.5.1. İmmün Kontrol Noktası Blokajı

Onkogenezin engellenmesinde bağışıklık sistemim mühim bir rol oynamaktadır. Fakat kanser hücrelerindeki genomik ve transkriptomik anormallikler tümöre karşı bağışıklık tepkisinin yetersiz kalmasına sebep olmakta ve kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminin kullandığı engelleyici yolları bloke etmesi ile sonuçlanmaktadır. Kontrol noktası blokajının hedeflenmesi kanserin, bağışıklık sistemine müdahale ederek T hücre aktivasyonunu engellemesini durdurmayı ve anormal inflamasyondan kaynaklanan normal dokuya verilen hasarın en aza indirilmesine odaklanmaktadır (129).

Sitotoksik T-lenfosit antijen 4 (CTLA-4), PD-1 ve PD-L1 immün ICI'lerinin temel hedefleri arasında yer almaktadır (128).

2.6.5.1.1. Programlanmış Ölüm Proteini Ligandı 1

PD-L1, B7 ailesine ait 290 aminoasitten oluşan ve T hücresi üzerinde eksprese edilen PD-1'in ligandı olan bir transmembran proteini olarak bilinmektedir. PD-1 ve PD-L1'in etkileşimi T hücre aktivasyonunu inhibe etmekte ve T hücresini apoptoza sürüklemektedir. Bununla da adaptif immün yanıtların düzenlenmesinde negatif etkiler göstererek, kanserin immün kontrolden kaçmasına olanak sağlamaktadır (130).

TME'de bulunan aktif T hücrelerinin PD-1 ifadesi, interferon gama, interlökinler ve TNF- α gibi sitokinlerin TME'ye salınmasına sebep olmaktadır. Kanser hücrelerindeki uygun reseptörler sayesinde algılanan bu sitokinler PD-L1 ifadesinin indüklenmesinde rol oynamaktadır (131). NF κ B, MAPK, mTOR, STAT ve c-Myc sinyal yolları kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesinde görev almaktadırlar (132). Ayrıca, hipoksi ile indüklenen faktör 1 α 'nın (HIF-1 α) bazı kanserlerde PD-L1 ifadesinde görev aldığı bilinmektedir (133).

PD-1 ifadesi sonrasında ortama salınan sitokinlerden IL-6 ve kanser hücresinde bulunan reseptörü IL-6R'nin PD-L1 ifadesini desteklediği bildirilmiştir. Bununla beraber IL-6/IL-6R etkileşimi JAK ve STAT3 aktivasyonuna sebep olarak PD-L1'in daha stabil bir yapıda eksprese olmasına yardımcı olmaktadır (134).

PD-L1 hedefli tedaviler için FDA tarafından çeşitli kanserlerde onaylanmış, atezolizumab, avelumab ve durvalumab mAb'leri mevcuttur (135). Avelumab 2017 yılında FDA tarafından metastatik merkel hücreli karsinom için bir tedavi hedefi olarak onaylanmıştır. Ayrıca renal hücreli karsinom için birincil tedavi olarak avelumab'ın bir küçük molekül olan axitinib ile kombinasyonu kullanılmaktadır. Platin bazlı tedavi sonrasında veya tedavi esnasında üretral karsinom hastalarının tedavisi için 2017 yılında onaylanmış bir diğer mAb de durvalumab'dır. Bununla da hem kemoterapi hem immünoterapi hem de hedefe yönelik tedavilerin kombinasyon kullanımının optimize bir tedavi metodu olduğu düşünülmüştür (136).

2.6.5.1.2. Atezolizumab (ATE)

Farmakokinetiği sinomolgus maymunları ve farelerde çalışılmış atezolizumab, şu an tamamen insanlaştırılmış IgG1 bir mAb'dir. İntravenöz uygulamasını takiben 24 saat sonrasında sırası ile dalak, akciğer, böbrekler, karaciğer, kalp ve kaslar olmak üzere dağılım göstermektedir. Vücuttaki PD-L1'in ATE tarafından bloke edilmesinin $>0,5 \mu\text{g/mL}$ serum konsantrasyonlarının uyulanmasından yaklaşık 24-48 saat sonra gerçekleştiği bildirilmiştir (137).

PD-L1'e spesifik olarak bağlanan ATE, ilk kez 2016 Mayıs'da da FDA tarafından ürotelyal karsinom için, 2016 Ekim'de ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) için ikinci basamak tedavi olarak onay almıştır (138)(139). Ayrıca üçlü negatif meme kanseri (TNBC), metastatik renal karsinom, kolorektal kanser (138), küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) (140), hepatoselüler karsinom (141) ve melanomda (142) atezolizumab'ın etkilerinin incelendiği çalışmalar yürütülmektedir.

ATE'nin yumurtalık kanseri üzerinde etkilerinin incelendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir (143). Moroney ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladığı bir çalışmanın sonuçları PD-L1 hedefli mAb ATE ve vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) hedefli mAb bevacizumab ile tedavi edilen platin dirençli yumurtalık kanserinde kalıcı tedavi yanıtları ve tedavi stabilizasyonu gözlemlendiğini göstermektedir (144).

2.6.5.1.3. İnterlökin 6 Reseptörü (IL-6R)

IL-6, insanlarda hem proinflamatuvar hem de anti-inflamatuvar rol oynayan çok işlevli bir sitokindir. Yumurtalık, meme, prostat, akciğer ve pankreas kanserleri gibi bir çok kanserde

karakteristik bir şekilde aşırı ifade edilir (145). Hedef hücrede bulunan, bir yüzey reseptörü olan IL-6R tarafından algılanarak çeşitli sinyallerin başlatılmasında etkilidir (146). IL-6 ile IL-6R'nin bu etkileşimi kanserde Ras/MAPK, PI3K/Akt ve JAK/STAT3 sinyal yolları ile birlikte aynı zamanda hücre proliferasyonunda, apoptozda, farklılaşmada, anjiyogeneze ve metastazda ve bunları regüle eden genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (145,146).

IL-6R inhibisyonu için mAb'ler dikkat çekici bir hedeftir. Hedefe yüksek bir afinite ile bağlanma yeteneği olan ve tamamen hümanize bir mAb olan sarilumab IL-6R inhibisyonunda kullanılmaktadır. Romatoid artrit tedavisi için onaylanmış sarilumab'ın nötropeni gibi yan etkileri gözlemlenmektedir (147).

2.6.5.1.4. Tosilizumab (TCZ)

İmmünoglobulin G1_k alt sınıfından hümanize bir monoklonal antikor olan tosilizumab, serbest ve membrana bağlı IL-6R'e spesifik bağlanan bir inhibitördür. İlk kez, Castelman hastalığı tedavisi için Japonya'da 2005 yılında "yetim ilaç" olarak onaylanmıştır. Şu anda Avrupa Birliği ülkelerinde hem tek başına hem de hastalık modifiye edici anti-romatizmal ilaçlar ile birlikte yetişkinlerde romatoid artrit, 2 yaşın üzerindeki çocuklarda da juvenil idiyopatik artrit tedavisinde TCZ kullanılmaktadır (148).

TCZ'nin kanser hücrelerinde IL-6R/JAK/STAT3 sinyali üzerindeki etkileri incelenmiştir. TCZ'nin IL-6R ile etkileşiminin bu yolağı inhibe etmesinin glioma hücrelerinde anti-proliferatif etkiye sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca TNBC'de sisplatin toksisitesine destek vererek proanjiyogenik potansiyeli önlediği incelenmiştir (149).

2020 yılında meydana gelen Covid-19 pandemisinde IL-6R yolu dikkatçekici bir hedef haline gelmiş, bu sebeple de IL-6R inhibitörü olan TCZ hastalığın tedavisi için test edilmiştir. CAR-T hücreleri tarafından indüklenen şiddetli sitokin salınım sendromunun TCZ tarafından hiper-enflamatuar durumunun kontrol edilmesi ve ayrıca TCZ'nin bağışıklık tepkisini güçlendirerek kanser tedavisindeki etkisi Covid-19 için potansiyel ve güvenilir bir aday haline getirmiştir (150).

Ge ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları bir çalışmada, yumurtalık kanserinde aşırı ifade olduğu bilinen bir uzun kodlanmayan RNA olan THOR'un IL-6R/STAT3 yolunun

aktivasyonunda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca IL-6R inhibitörü TCZ'nin uygulanması THOR susturulmuş yumurtalık kanseri hücreleri ve kontrol grubu hücreleri arasındaki metastatik farkların aradan kaldırıldığı gözlenmiştir (151). Yine farklı bir çalışmada TCZ ve karboplatin kombinasyonunun EOC hecrelerinin büyümesi ve çoğalmasını sinerjik olarak engellediği gözlenmiştir (36).

2.6.5.1.5. Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (STAT3)

Transkripsiyon faktörleri DNA'daki spesifik genlerin promotör bölgelerine özel bağlanma bölgeleri ile bağlanarak güçlendirici etki yaratan proteinlerdir. STAT3, STAT transkripsiyon faktörleri ailesine aittir ve kanserle yakın ilişkisi ve ilaç direnci sebebi ile önemli bir hedef olarak bilinmektedir (36). IL-6R tarafından IL-6'nın tanımlanması ile beraber, aynı zamanda uygun reseptörler ile IL-10 gibi diğer sitokinlerin, epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, onkostatın M, siliyer nörotrofik faktör, kardiyotrofin benzeri sitokin faktör 1, lösemi inhibitör faktör ve insulinin tanımlanması STAT3 aktivasyonunda rol almaktadır. Embriyonik gelişim, immünolojik aktivite, inflamasyon, hematopoez, kardiyovasküler fizyoloji, karaciğer ve nöronal rejenerasyon bu sitokin ve büyüme faktörlerinin temel görevlerindendir (152,153). Uygun reseptörler ile tanımlanan bu faktörler JAK'ların aynı kökenli reseptörün sitoplazmik kuyruğunu fosforile etmesine sebep olur. Bunu takiben STAT3 homodimer oluşturarak sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Çekirdekte fosforile STAT3 ve benzeri koaktivatörler ile kompleks oluşturarak hedef genlerin promotör bölgelerine bağlanır ve transkripsiyonu aktive eder (153).

Kanserlerin %70'de anormal düzeyde ifade edilen *STAT3* bir onkogen olarak bilinmektedir. STAT3'ün aşırı ifadesi, hücrelerin hayatta kalmasını ve aşırı büyümesini destekleyen anti-apoptotik ve büyüme faktörlerinin sürekli transkripsiyonuna sebep olarak tümörlere güçlü malignite kazandırmaktadır (152). Tümörün immün kaçışında görev alan immün kontrol noktası elemanlarının doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenmesinde STAT3 önemli bir role sahiptir. STAT3 uygun genin promotörüne bağlanarak PD-1 ve PD-L1 ifadesini artırmaktadır (26).

Yumurtalık kanserinde ve özellikle HGSOc'de STAT3'ün aşırı ifade olduğu bilinmektedir. Bu sayede invazyonu, metastazı, hücre büyümesini ve anjiyogenezi desteklediği tespit edilmiştir. Ayrıca STAT3 aktivasyonu yumurtalık kanserinde hücre hareketliliğine yardımcı

olan fokal adezyonlarda bulunmakta ve STAT3`ün inhibisyonunun buna dayanarak hücre invazivliğini azalttığı bilinmektedir (154).

STAT3 inhibisyonu için küçük moleküller önemli bir hedef haline gelmiştir. STAT3`ün aktif merkezi olan SH2 bölgesine özgü çeşitli küçük molekülü inhibitörler klinik çalışmalar için değerlendirilmiştir. C188-9 (TTI-101) küçük molekülü, karaciğer, meme, mide kanseri gibi kanserlerin Faz I çalışmaları için değerlendirilmiştir. OPB-111077 de yine başka bir yüksek afiniteli STAT3 küçük molekülü inhibitörüdür (155).

2.6.6. KANSER İMMÜNOTERAPİSİNDE DOĞAL KAYNAKLI KÜÇÜK MOLEKÜLLER

Geleneksel sentetik olarak geliştirilmiş moleküller-ilaçlar ile kıyaslandığında doğal kaynaklı moleküller günümüz çalışmalarında önemli etkileri ile yer almaktadırlar. Sentetik üretilmiş moleküller ile karşılaştırıldığında doğal moleküller daha geniş ve kapsayıcı kimyasal biyolojik aktivitesi yüksek bileşikler ile desteklenen bir yapıya sahiptir. Bu özellikleri doğal kaynaklı küçük molekülleri kanser ve birçok hastalık için önemli bir tedavi hedefi haline getirmektedir (156). Son yılların önemli araştırma alanlarından bir de sitotoksik kimyasal ilaçlar yerine hedefe yönelik biyolojik aktivitesi yüksek küçük moleküllerin geliştirilmesidir. Sitotoksik ilaçlar yerine, normal hücrelere zarar vermeden hedefe yönelik etki gösteren küçük moleküllerin çalışmalarda yerini alması 2001 yılında bir küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib`in FDA tarafından onaylanması ile başlamıştır. Sitotoksik ilaçlar ve doğal kaynaklı moleküllerin bir diğer kolu olan makromoleküller ile karşılaştırıldığında küçük moleküllerin düşük maliyet, hasta uyumu, farmakokinetik, depolama ve taşıma kolaylığı gibi özellikleri onları avantajlı hale getirmektedir (157). Küçük moleküllerin <1000 molekül ağırlıkları (Mw) ve hem hücre içi hem de hücre dışı etki kapasiteleri, makromoleküllerin büyük molekül ağırlıkları ve sınırlı etki mekanizmalarına karşı avantaj sağlamaktadır. Ayrıca daha kolay üretim koşulları ve küçük molekülü ilaçların oral yoldan biyoyararlanımı üretici ve tüteticisi bakımından da kolaylık sağlamaktadır. DNA hasarı ve onarılması, endokrinolojik kanallar, metabolizma, anjiyogenez, bağışıklık kontrol noktaları küçük moleküllerin kanser tedavilerinde dikkate alındığı temel hedefler olarak incelenmektedir (158,159).

Kanser immünoterapisinde küçük moleküllerin kullanılması, kanser tarafından bastırılan bağışıklık sisteminin yeniden aktif hale getirilmesi ve geliştirilmesini temel almaktadır. Bu şekilde sitotoksik T hücre kalitesinde ve miktarında artış olması ve tümör gerilemesi hedeflenmektedir. Sitolitik lenfosit deaktivasyonuna sebep olan reseptörlerin hedeflenmesinde kontrol noktası blokajı ajanları görev almaktadır (160). Kontrol noktası blokajı için mAb'ler daha çok tercih edilen tedavi metodu olsa da, mAb'lerin etki alanları hücre yüzeyi ile sınırlıdır. Küçük moleküllerin kontrol noktası blokajındaki en büyük avantajı hücre içi sinyal yollarını da hedef almasıdır. Kontrol noktası blokajındaki bu etkileri sayesinde CA-170 ve GS-4224 küçük moleküllerinin klinik çalışmalarda araştırılmaktadır. Ayrıca TME'de pro-tümörojenik yolları hedeflemeleri ve ICI mAb'ler ile sinerjik etkiler oluşturmaları küçük molekülleri kanser immünoterapisi için önemli bir hedef haline getirmektedir (160,161).

2.6.6.1. Liken ikincil metabolitleri

Likenler en az bir mantar, fototrof algler ve siyanobakterlerden oluşan morfolojik ve fizyolojik olarak birbirine entegre olmuş simbiyotik organizmalardır (162). Simbiyotik yapıları, likenlerin ağaçlar ve kaya, toprak gibi her türlü cansız nesnelerin üzerinde yaşamlarını sürdürmelerine ve ortam koşullarına uyum sağlamalarına yardımcı olmaktadır (163). Bu adaptasyon yeteneği liken metabolitlerinin sayesinde gerçekleşmektedir. Biyoaktif bileşikler olan liken metabolitlerinin büyük çoğunluğu mikobiyont olarak adlandırılan likenin mantar kısmı tarafından üretilse de, fotobiyont olarak bilinen algler ve siyanobakterler de önemli ikincil metabolitlerin üretiminde görev almaktadırlar (164).

Liken ikincil metabolitlerinin antioksidan, antikanser, anti-inflamatuar, analjezik, anti-mikrobiyal, nöroprotektif aktivite, UV koruyucu, allelopatik, antiprotozoal ve böcek öldürücü aktivite sergileyen etkileri olduğu bilinmektedir. Liken ikincil metabolitlerinin bu özellikleri sayesinde, güncel araştırmalarda önemli konu başlıkları olarak ve ilaç endüstrisinde dikkat çekici bir hedef olarak incelenmektedirler (165).

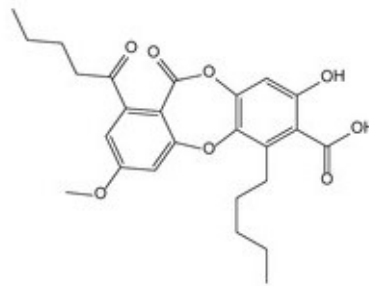
Liken ikincil metabolitlerinin antikanser özelliklerinin temeli, bu metabolitlerin kanser hücrelerine karşı sergilediği sitotoksik etkiye ve hücre döngüsünün çeşitli fazlarında hücre döngüsünü durdurarak, kanserli hücrelerin apoptoz, nekroz veya otofajiye sürüklenmesini sağlamalarına dayanmaktadır. Liken ikincil metabolitlerinin en önemli antikanser

özelliklerinden bir diğeri ise PI3K/Akt/mTOR ve STAT3 gibi sinyal yolaklarının düzenlenmesinde etkili mezenkimal epitelyal geçiş faktörü (c-Met) gibi kanser invazivliğini destekleyen yolların inhibisyonunda etkili olmalarıdır. Ek olarak bu ikincil metabolitler TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve TGF- β 1 bileşenlerini hedef alarak inflamatuvar yanıtların yeniden düzenlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (166).

Usnik asit iyi araştırılmış ve çeşitli liken türlerinde bulunan antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilere sahip bir ikincil metabolittir. Farklı kanser türlerinde yapılan incelemelerde usnik asidin anti-proliferatif etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Lobarik asit, atranorin, lekanorik asit, norstiktik asit, stiktik asit, ramalin, giroforik asit, salazininik asit, protolichesternik ve fumarprotosetrarik asit, güçlü antikanser etkilere sahip diğer ikincil liken metabolitleridir (167).

2.6.6.1.1. Lobarik Asit (LA)

Likenlerden farklı şekillerde sentezlenen 1000'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Bunlarda depsidonlar, dibenzofuranlar, depsidler ve ksantonlar asetat-malonat yolağı ile, pulvinik asit türevleri şikimik asit yolağı ile, terpenler ve steroidler ise mevalonik asit yolağı üzerinden sentezlenmektedirler (168). Asetat-malonat yolağı birimleri likendeki ikincil metabolitleri oluşturmak için orselinik asit veya B-orsellinik asit oluşturmak için bir araya gelmektedirler. Depsidlerin oksidatif siklizasyon zamanı hidrojen atomlarını kaybetmesi ile despidonlar oluşmaktadır. Depsidonların kimyasal çeşitliliğinin en başlıca sebebi ise oksijen metilasyonunun gerçekleşmesidir (168).



Şekil 2.3. Lobarik asitin molekül yapısı (168)

Carpentier ve arkadaşları 2018 yılında *Stereocaulon paschale*'den bir depsidon olan lobarik asitin (LA), 6 psödodepsidon ve 2 monoaromatik bileşiğin izolasyonunu bildirmişlerdir (32). Bunun dışında lobarik asit, *Stereocaulon alpinum* (169), *Stereocaulon vulcani*, *Usnea diffracta*, *Usnea zahlbruckneri* ve *Usnea trichodeoides* (170) likenlerinden de izole edilebilen biyoaktif ikincil liken metabolitidir.

LA 456.49 Mw (171) bir depsidon olup, molekül yapısı birbirine ester bağları ile bağlanan nadiren 3, ama genellikle 2 aromatik halkadan ve halkalar arasındaki eter bağlantısından oluşmaktadır (168) (Şekil 2.3.).

LA'nın insan tümörleri üzerindeki sitotoksik ve anti-proliferatif etkileri birçok *in vitro* çalışma ile test edilmiş ve anti-apoptotik genleri baskılayarak kanser hücrelerinin ölüme sürüklediği bildirilmiştir (168). Emsen ve meslektaşlarının 2018'de yayınladığı bir çalışmada LA'nın insan glioblastoma multiforme hücreleri ve primer sıçan serebral korteks hücreleri üzerinde yüksek düzeyde toksik etki sergilediği rapor etmiştir (172). Yine 2018'de Hong ve arkadaşlarının yürüttüğü başka bir çalışmada LA'nın serviks adenokarsinomu hücre hattı Hela ve insan kolon karsinomu hücre hattı HCT116'a uygulanması sonucunda apoptozun indüklendiği gözlemlenmiştir (171).

LA'nın lipopolisakkaritler ile uyarılan makrofajlarda NF-kB aktivasyonunu ve TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerinin salgılanmasını inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösterdiği gözlemlenmiştir (32). İnsülin direnci ve duyarlılığı, enerji dengesi ve vücut yağ depolarını düzenlenmesinde rol oynayan protein tirozin fosfataz 1B'nin LA uygulanması sonrasında inhibe olduğu Kim ve arkadaşları tarafından 2018 yılında rapor edilmiştir (173). Ayrıca LA'nın anti-oksidan aktivitesi ve *Taenia coli*'deki düzensiz kas kasılma aktivitesinin iyileştirilmesi gibi etkileri de bulunmaktadır (168).

2.6.6.1.2. Kanser immünoterapisinde küçük moleküller ve monoklonal antikor kombinasyonlarının etkinliği

mAb'lerin kanser immünoterapisindeki başarısı, küçük moleküllerin bu alandaki etkilerinin gölgede bırakılmaktadır. Fakat küçük moleküller mAb'ler gibi immünsüpresif mekanizmaları hedeflemekle birlikte bu mekanizmaların hücre için sinyal yollarını da hedefleme kapasitesine sahiptirler. Bu sebeple küçük moleküller ve hücre dışı kontrol noktası

mAb'lerinin birbirini tamamlayıcı ve sinerjik etkilerinin incelenmesi önemli bir tedavi hedefidir (33).

Rini ve meslektaşlarının 2019'da yayınladığı ilerlemiş renal hücreli karsinom üzerine Faz 1B çalışması sonuçlarına göre VEGF için birincil seviye tedavi olarak onaylanmış küçük molekül sunitinib, PD-1 hedefli mAb pembrolizumab ve yine VEGF yolunu hedef alan axitinib kombinasyonu ile karşılaştırılmıştır. Tedavi sonuçları pembrolizumab + axitinib uygulanmış hastalardan sunitinib uygulanmış hastalara göre daha uzun sağkalım ve daha objektif yanıtlar elde edilmiştir (174). Motzer ve arkadaşlarının 2019 yılında yürüttükleri yine renal hücreli karsinom üzerine Faz 3 çalışmasında sunitinib ile axitinib ve PD-L1 hedefli mAb olan avelumab kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Avelumab + axitinib uygulanmış hastalarda sağkalımın sunitinib uygulananlara nazaran daha uzun süreli olduğu gözlemlenmiş ve aynı zamanda kombinasyon uygulanan gruptan %55,2, sunitinib grubundan ise %25,5 oranında objektif yanıt elde edilmiştir (175).

Endometriyal kanserde, farklı bir VEGF küçük molekülü inhibitörü olan lenvatinib ile pembrolizumab kombinasyon tedavisi Makker ve meslektaşları tarafından 2019'da bir Faz 2 çalışması ile rapor edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre bu kombinasyon tedavinin anti-kanser etkilerinin onaylanmış ve Faz 3 çalışmasına geçilmesine hak kazanmıştır (176).

Gutzmer ve arkadaşları 2020 yılında, rezeke edilemeyen ileri BRAF^{V600} mutasyon pozitif melanom tedavisi için atezolizumab + vemurafenib + kobimetinib kombinasyonunu Faz 3 çalışması ile rapor etmişlerdir. Kombinasyon tedavi sonucu progresyonsuz sağkalımın önemli ölçüde arttığını göstermiştir (177).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

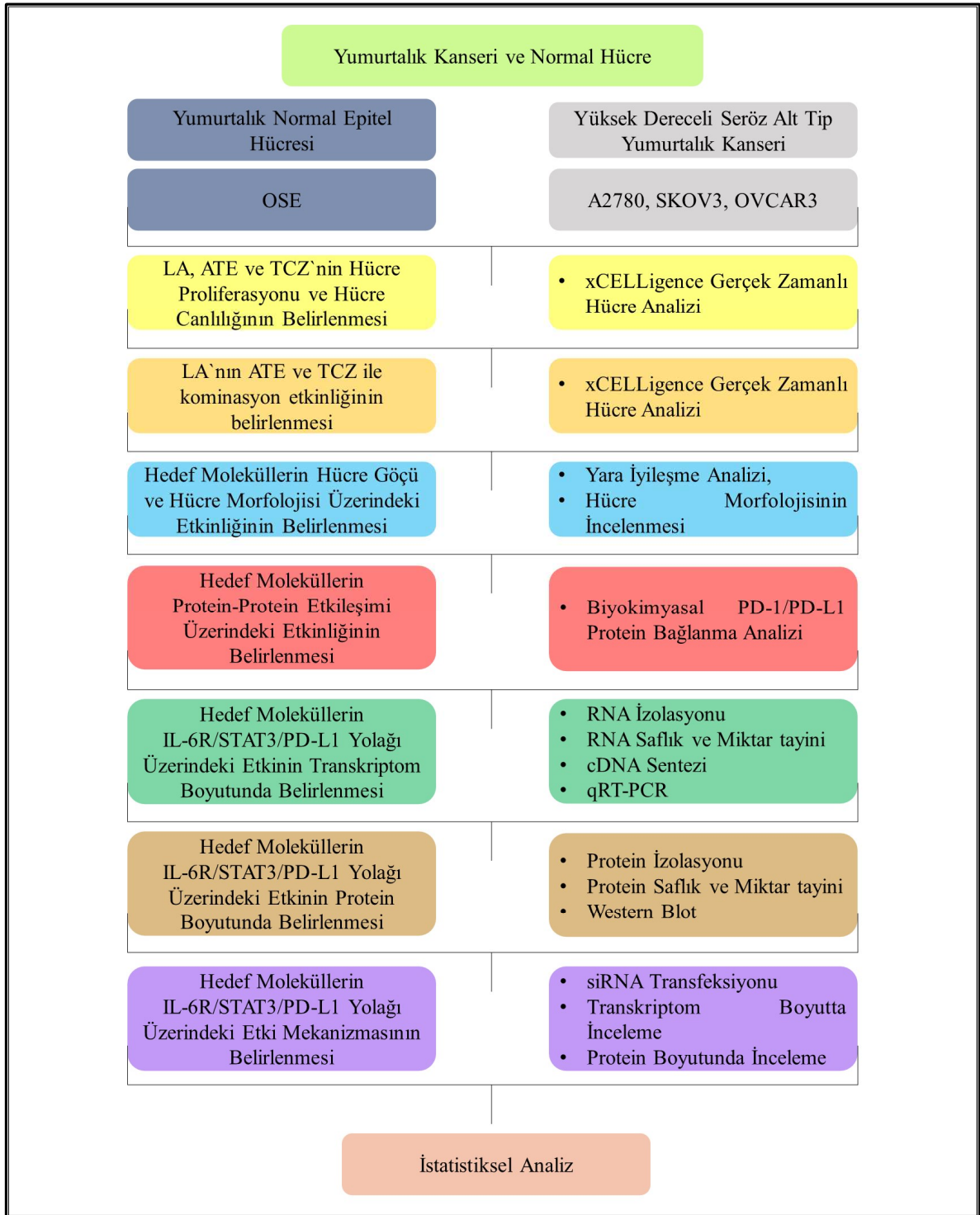
Yumurtalık kanseri, erken evrelerde belirtiler göstermemesi ve genellikle ilerlemiş evrelerde teşhis edilmesi ile tedavi sürecini zorlaştıran ve kadınlarda jinekolojik kanserler arasında en yüksek mortaliteye sahip kanser olarak bilinmektedir. Tedavide kullanılan mevcut kemoterapötik ajanların yetersizliği ve ilaç direnci yeni tedavi metotlarının ve kombinasyon tedavilerin geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Anti-kanser, anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileri farklı çalışmalar ile belirlenmiş LA önemli bir liken ikincil metabolitidir. Birçok çalışma ile LA'nın anti-proliferatif etkisi ve farklı biyoaktif özellikleri incelenmiş olmasına karşın LA'nın moleküler karakterizasyonu, etki mekanizması ve farklı hücre tipleri üzerindeki etkilerinin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda IL-6R hedefli bir mAb olan TCZ'nin de güçlü anti-kanser ve anti-inflamatuar etkileri birçok çalışma ile desteklenmektedir. Ayrıca mAb'ler ve küçük moleküllerin kombinasyonlarının kanser tedavisinde sinerjistik etki sergileyerek tedavi etkinliğini artırma potansiyeli vardır. Kanser hücrelerinin proliferasyonunu, inflammatuar yolları ve kanserin immün sistemden kaçış mekanizmalarını destekleyen IL-6R/STAT3/PD-L1 sinyal yolağı üzerinde LA ve LA-TCZ kombinasyonunun terapötik etkinlik gösterebileceği, bu yüksek lisans tez çalışmasının hipotezi olarak belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında LA ilaç aday molekülünün üç farklı yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hücre hattı (A2780, SKOV3, OVCAR-3) ve bir yumurtalık normal epitel hücre hattı (OSE) üzerindeki anti-proliferatif etkisi xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi metodu ile konsantrasyon aralığı ve zamana bağlı olarak belirlenmiştir. Tez çalışması süresince yumurtalık kanserinde hücresel, biyokimyasal, transkriptom ve proteom seviyelerinde uygun deneyler gerçekleştirilerek LA ve LA-TCZ kombinasyonunun IL-6R/STAT3/PD-L1 sinyal yolağı üzerindeki etki mekanizmasının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doğal kaynaklı bir küçük molekül olan LA ve LA-TCZ kombinasyonunun IL-6R/STAT3/PD-L1 sinyal yolağını hedeflemesi ile yumurtalık kanseri tedavisinde düşük yan etkiye sahip, daha düşük maliyetli ve immün kaçışı engelleyecek yeni bir tedavi metodu geliştirmeyi amaçlamakta olup LA ve LA-TCZ kombinasyonunun terapötik potansiyelinin

ortaya konulması hedeflemektedir (Şekil 3.1.). Bu bağlamda elde edilen bulguların kanser tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesini desteklemesi beklenmektedir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının kapsadığı deneysel iş-akış şeması.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları ATCC`den temin edilmiştir. Hücreler ve özellikleri Çizelge 4.1.`de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları.

Hücre adı	Organizma	Doku	Kanser Alt Tipi
A2780	<i>Homo sapiens</i>	Epitel	HGSOC
SKOV3			HGSOC
OVCAR-3			HGSOC
OSE			Yumurtalık normal

4.1.1. KULLANILAN REAKTİFLER VE KİMYASALLAR

Tez çalışmasında kullanılan reaktif ve kimyasalların adları ve markaları Çizelge 4.2.`de yer almaktadır.

Çizelge 4.2. Tez çalışmasında kullanılan reaktif ve kimyasallar ve markaları.

Reaktif ve Kimyasal Adı	Markası
Dulbecco's Modified Eagle Ortamı (DMEM)	Gibco
Roswell Park Memorial Institute 1640 Ortamı (RPMI-1640)	Gibco
Fetal Sığır Serum	Gibco
Penisilin / Streptomisin	Biological Industries
İnsulin	Lilly, Humilin
Tripsin - EDTA	Biological Industries
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	Gibco
Dimetil-sülfoksit (DMSO)	Serva
DMSO Cell Grade	Sigma-Aldrich
Trizol Reagent	Sigma
Tripan Blue Boya	BioRad
Lobarik asit (LA)	Santa Cruz Biotechnology
Atezolizumab	
Tosilizumab	
Kloroform	Sigma-Aldrich
İzopropanol	Sigma-Aldrich
Etanol	Isolab
SYBR Green	BioRad
Transfeksiyon Reagent	Dharmacon
Bradford Reagent	BioShop
Aquaguard-1, 2	Biological Industries
Lizis Tampon	Sigma-Aldrich
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Cell Signaling
Fosfotaz İnhibitör Kokteyli	Cell Signaling
Bovin Serum Albumin (BSA)	BioRad
EveryBlot Bloklama Tamponu	BioRad

Acrylamide/Bis Çözeltilisi	BioRad
Amonyum Persülfat	BioRad
TEMED	BioRad
Tris	BioShop
Tris-HCL	BioShop
SDS	Sigma-Aldrich
Glisin	BioShop
Sodyum Klorür	Supelco
Metanol	Supelco
Tween 20	BioShop
Gliserol	Sigma-Aldrich
PD-L1 Antikor	Cell Signaling
STAT3 Antikor	Cell Signaling
Anti- β Aktin Antikor	FineTest
Anti-Mouse IgG, HRP İşaretli Antikor	Cell Signaling
Anti-Rabbit IgG, HRP İşaretli Antikor	Cell Signaling

4.1.2. KULLANILAN KİLER

Tez çalışmasında kullanılan kitler Çizelge 4.3.'de markaları ile birlikte belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Tez çalışmasında kullanılan kitler.

Kit Adı	Markası
PD-1 / PD-L1 Protein Binding Kit	Cisbio
Iscrip cDNA Sentez Kit	BioRad
SuperSignal™ West Femto Maksimum Hassasiyet Substrate	Thermo Scientific

4.1.3. KULLANILAN SARF MALZEMELERİ

Tez çalışmasında kullanılan başlıca sarf malzemeler;

- Hücre kültür flaskı
- Hücre kültür petri
- 6 ve 96 kuyulu düz tabanlı steril hücre kültür plakası
- 384 kuyulu steril qPCR plakası
- 96 kuyulu steril qPCR plakası
- 5 ml, 10 ml, 25 ml steril serolojik pipet
- 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml steril eppendorf tüp
- 15 ml ve 50 ml steril falkon tüp
- 10 µl, 200 µl, 1000 µl steril pipet ucu
- 100 ml, 500 ml, 1000 ml cam şişe
- 1.8 ml Cryo-Tüp
- PVDF Nitroselüloz Membran
- Western Blot Filtre Kâğıdı 36
- Hücre Kazıyıcı
- Parafilm
- Otoklav Bandı
- Eldiven

4.1.4. KULLANILAN CİHAZLAR

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 4.4.`de markaları ile birlikte belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz adı	Markası
Laminar Flow Kabin	Holten Laminair Model 1.8, Eu
Ters Mikroskop	Ters Mikroskop Leica, Germany
Otomatik Pipetler (2 Ml, 10 Ml, 20 Ml, 100µl, 200 Ml, 1000µl)	Gilson, US
Otomatik Hücre Sayım Cihazı	BioRad, Tc20 Automated Cell Counter, Singapore
xCELLigence RTCA S16	Acea Bioscience Inc., San Diego, CA
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotina 35R, Germany
Spin Santrifüj Biosan FVL-2400N, Latvia	Spin Santrifüj Biosan FVL-2400N, Latvia
PCR	BioRad, T100 Thermal Cycler, Germany
Real Time PCR	Roche Diagnostics, Lightcycler 480, Switzerland
Compact Cell Culture Mikroskop	OLYMPUS CKX53
Spektrofotometre Nanodrop	ND-1000, US
Mikroplaka Okuyucu Tecan	Infinite 200 PRO, Austria
Güç Kaynağı	Cleaver, Poer-Pro, 3Amp
Elektroforez Tankı	BioRad, Mini PROTEAN Tetra Cell, US
Yarı-Kuru Transfer Cihazı	Cleaver Scientific, Semi Dry Blotter, UK
Yarı-Kuru Transfer Cihazı	BioRad, Trans Blot Turbo System, Singapore
Western Blot Görüntüleme Cihazı	LICOR Biosciences, Odyssey Infrared, Imaging System, US
Çalkalayıcı	MaxiLab Biotechnology, Orbital Shaker, Turkey
Çalkalayıcı	MIULAB, Rotarty Mixing Solution,
Saf Su Cihazı Elga	Model PQDIUVM1, UK
Tartım Cihazı	Sartorius, TE214S, Germany
Isı Bloğu	Major Science, MD-02N, Taiwan

Kar Buz Makinesi	Scotsman, AF-80, Italy
Sıvı Azot Tankı	Statebourne Cryogenics, England
+4°C Soğutucu Dolap	Sanyo, Pharmaceutical Refrigerator, Japan
-20°C Soğutucu Dolap	Sanyo, Biomedical Freezer, Japan
-80°C Soğutucu Dolap	Panasonic, Ultra-Low Temperature Freezer, Japan

4.2. YÖNTEM

Tez kapsamında liken ikincil metaboliti olan lobarik asit (LA)'ın, IL-6R hedefli mAb tosilizumab (TCZ)'ın ve PD-L1 hedefli mAb atezolizumab (ATE)'ın insan yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hücre hatları OVCAR-3, SKOV3, A2780 ve insan yumurtalık normal epitel hücre hattı OSE üzerinde hücre proliferasyonuna etkisi xCELLigence gerçek zamanlı hücre canlılığı sistemi ile incelenmiş, LA, LA-ATE, LA-TCZ kombinasyonlarının ve STAT3 hedefli siRNA ve siRNA+LA, siRNA+TCZ ve siRNA+LA-TCZ kombinasyonunun IL-6R / STAT3 / PD-L1 yolağı üzerinde etkisi hücresel, moleküler ve biyokimyasal olarak incelenmiştir.

4.2.1. İLAÇ ADAY MOLEKÜLÜ LA'NIN HAZIRLANMASI

Lobarik asit (LA) saf etken madde şeklinde ticari olarak temin edildi (Santa Cruz Biotechnology). 100 µM LA stoğu %0.05 DMSO içeren DMEM besiyeri içerisinde çözülerek hazırlandı. Daha sonra deneylerde kullanmak üzere değişen konsantrasyonlarda LA çözeltileri (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µM) stok çözeltiden uygun besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı.

4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN DEVAMLILIĞI

4.2.2.1. Hücre Hatları ve Büyüme Koşulları

Tez çalışmasında insan yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hücre hatları A2780, SKOV3, OVCAR-3 ile insan yumurtalık normal epitel hücre hattı OSE kullanıldı. Hücreler uygun besiyerleri ile birlikte 37°C %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilerek kültüre edildi. Kullanılan hücre hatlarının büyütülmesi için hazırlanan besiyeri içerikleri aşağıda gösterilmiştir.

Hücre Hattı**Besiyeri İçeriği**

A2780	RPMI-1640, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-glutamin
SKOV3	DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin
OVCAR-3	DMEM, %20 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, 50 µL İnsülin
OSE	RPMI-1640, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin

4.2.2.2. Hücre Açma ve Besiyeri değiştirilmesi

Azot tankında muhafaza edilen hücreler, dışarı çıkartılarak oda sıcaklığında katı halden sıvı hale dönüşmeleri beklenmiştir ve daha sonra hücre tipine uygun besiyeri bulunan 15 mL'lik falkona aktarılmıştır. Hücre eklenmiş 15 mL'lik falkon 1500 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj edilerek hücreler pellet olarak çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası oluşan üstteki besiyeri fazı atılmış ve pelet 5 ml uygun besiyerinde çözülmüştür. Çözülen hücreler pellet yoğunluğuna göre T25 mL'lik veya T75 mL'lik flaska alınmıştır. Hücrelerin mikroskopta kontrol edildikten sonra flask 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler, canlılık düzeyi ve kültür ortamının kalitesi her gün mikroskop ile takip edilmiştir. Bir kaç günde bir hücre ortamı değiştirilmiştir ve 37°C'de %5 CO₂ inkübatöre kaldırılmıştır.

4.2.2.3. Hücre Pasajlaması

%75-85 doluluk oranına ulaşan hücreler pasajlanmak aşaması için laminar kabine alınmıştır. Flaskta bulunan ortam uzaklaştırılarak 5 mL 1x PBS ile temizleme işlemi gerçekleştirilmiş daha sonrasında PBS uzaklaştırılmıştır. Hücre üzerine 1 mL Tripsin EDTA eklenmiş ve hücrelerin kalkma sürelerine göre 1-5 dk inkübatörde bekletilmiştir. Oturan hücrelerin flasktan tamamen kalktığı mikroskop ile incelendikten sonra 5 mL ortam eklenerek pipetleme yapılmıştır. Hücreler 15mL olan falkon tüpe alınmış ve tripsinin uzaklaştırılması için 1500 rpm'de 5-6 dk 4°C derecede santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra üst faz atılmış ve hücre peleti 4-5 mL taze uygun ortam ile çözülmüştür. Daha sonra hücreler pelet yoğunluğuna göre 2 farklı T25 mL'lik veya T75 mL'lik flaska eşit olarak dağıtılmış ve

üzerine yeni ortam eklenerek pipetleme yapılmıştır. Flask 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ şartlarda inkübe olmaya bırakılmıştır.

4.2.2.4. Hücrelerin dondurulması ve muhafaza edilmesi

Hücreleri dondurmak için gereken ortamı uygun miktarda %10 DMSO ve %90 FBS kullanılarak taze olarak hazırlanmıştır. %75-85 doluluk oranındaki dondurulması planlanan hücre flaskları laminar kabine alınmıştır. Flasktaki besiyeri uzaklaştırılmış, daha sonra 5 mL 1x PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücre flaskına 1 mL Tripsin EDTA eklenmiş ve 1-5 dk inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerinden kalktığından emin olduktan sonra flaks içerisine 5 mL taze besiyeri eklenerek pipetleme yapılmıştır. Flask içeriği 15 mL falkon tüpe alınmış, daha sonra Tripsinin uzaklaştırılması için 1500 rpm'de 5 dk 4°C derecede santrifüj yapılmıştır. Santrifüj bittikten sonra üst faz uzaklaştırılmış ve pelet oluşturan hücreler uygun miktarda dondurmak için hazırlanmış ortam kullanılarak çözülmüştür. Daha sonra hücreler krovial tüpete muhafaza edilmiştir. Bütün krovial tüpler ilk olarak -20°C derecede 45-60 dk bekletilmiştir. Hemen ardından -80°C derecede 18-24 saat bekletilerek kademeli bir şekilde hücre dondurma süreci gerçekleştirilmiştir. Dondurulmuş hücrenin daha uzun süre içerisinde korunması için son olarak krovial tüpler azot tank haznesine yerleştirilmiştir.

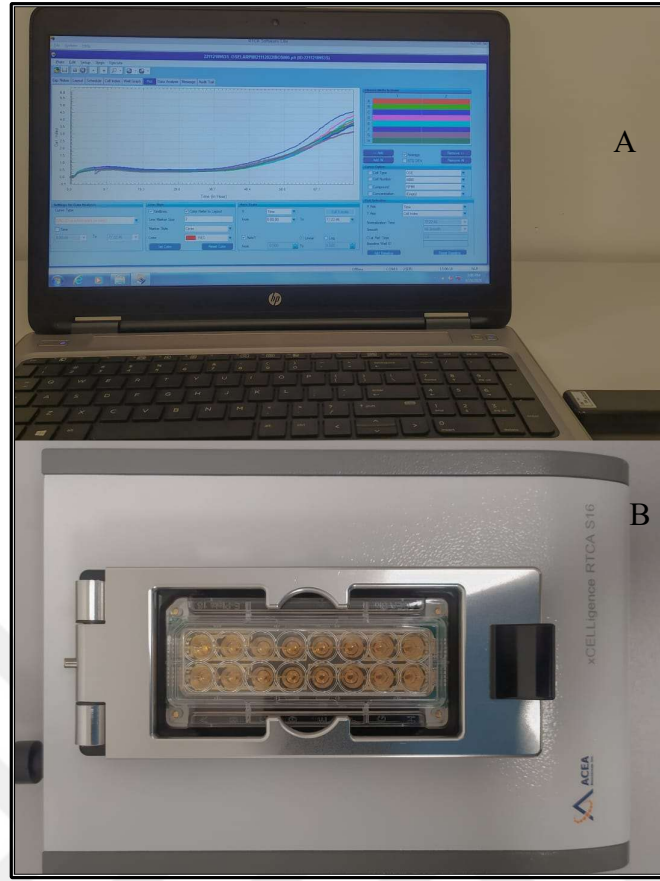
4.2.2.5. Hücre Sayımı

Hücrelerin uygun sayıda olması için sayım cihazı TC20 (BioRad) ve cihaz ait sayım slaytları kullanıldı. Canlı hücrelerin belirlenmesi için tripan mavi boyası kullanıldı. Sayım yapılacak hücreler pellet haline getirildi. Hücre pelleti 1 ml besiyeri ile çözüldü. Besiyeri içerisinde hücrelerin homojen bir şekilde dağılması için pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonunda 10 µl çekilerek hücre sayım slaytının A bölmesine eklendi. 0.2 ml eppendorf tüpe 10 µl tripan blue ve 10 µl hücre süspansiyonundan alınarak pipetaj yapıldı. Hazırlanan boya-hücre karışımından 10 µl çekilerek slaytın B bölmesine eklendi. Slayt bölmelerinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Slayt hücre sayım cihazına yerleştirildi ve sayım başlatıldı. Boya eklemeyen hücre yükleme yapılan A bölmesinden toplam hücre sayısı, boya-hücre karışımı yüklenen B bölmesinden toplam hücre sayısı, canlı hücre sayısı ve hücre canlılık yüzdesi değerleri elde edildi. Sayım 3 kez tekrar edildi. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak 1 ml besiyeri içerisindeki hücre sayısı ve canlılığı belirlendi.

4.2.3. HÜCRE PROLİFERASYONU VE SİTOTOKSİK ETKİNİN BELİRLENMESİ

4.2.3.1. xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Hücre anti-proliferasyonu belirlemek için xCELLigence RTCA analizi yöntemi kullanılmıştır (Şekil 4.1.). Deneye başlarken xCELLigence RTCA S16 cihazı inkübatör dahiline yerleştirilmiştir. On altı kuyulu e-plakada her bir kuyuya her hücre hattı için uygun ortam 100 µl eklenerek normalizasyonu sağlamak için ölçüm alınmıştır. Sonrasında on altı kuyulu e-plaka cihazdan çıkarılmış ve kabin içerisinde yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hücreleri OVCAR-3 için $7,5 \times 10^3$, SKOV3, A2780 ve insan yumurtalık normal hücre hattı OSE hücreleri için ise, kuyu başına 5×10^3 hücre sayıda ekilmiştir. Ekilmiş hücreler e-plakaya yayılabilsin diye plaka kabin içerisinde yarım saat bekletilmiştir. Zaman dolduğunda e-plaka xCELLigence RTCA S16 aletine yerleştirilmiştir. Hücre ölçümü 15 dk ve analizin tamamının 120 saat olacağı şekilde ölçekle uygulanmış ve program aktive edilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra cihaz durdurulmuş ve 16 kuyulu e-plate inkübatörde bulunan xCELLigence RTCA S16 aletinden çıkarılmıştır. Çıkarılan e-plate'in her bir kuyusundan 100 µl besiyeri çekilip atılmıştır. OVCAR-3, SKOV3, A2780 hücreleri için kuyulara 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında, insan yumurtalık normal hücre hattı OSE hücreleri için de yine 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında lobarik asit ilave edilmiştir. Kontrol olarak da her hücre hattı için uygun besiyeri kullanılmıştır. Uygulama aşamasından sonra e-plate inkübatör içindeki xCELLigence RTCA S16 aletine tekrar yerleştirilmiş ve program ölçüme devam edilmesi için tekrar çalıştırılmıştır. Ölçüm ve grafik sonuçları bilgisayara ekranından izlenerek deney tamamlanmıştır. IC₅₀ değerini belirlemek için RTCA Software Lite yazılımı kullanılmıştır.



Şekil 4.1. xCELLigence RTCA S16 sistemi. (A) RTCA S16 yazılımının kurulu olduğu bilgisayar ve izleme paneli, (B) 16 kuyulu e-plaka yerleştirilmiş RTCA S16 cihazı

Atezolizumab ve tosilizumab ticari olarak temin edildi. 100 µg/mL ATE ve TCZ stokları saf DMEM içerisinde çözülerek hazırlandı. Deneyde kullanılmak üzere uygun besiyeri kullanılarak 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml konsantrasyonlarında stok çözeltiden seyreltilti.

PD-L1 hedefli monoklonal antikor ATE ve IL-6R hedefli monoklonal antikor TCZ için de LA uygulaması sonrası en etkin sonucu gösteren OVCAR-3 hücre hattında hücre anti-proliferasyonu belirlemek için xCELLigence RTCA analizi yöntemi kullanılmıştır. OVCAR-3 hücreleri uygun sayılarda 16 kuyulu e-plakalara 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra hücreler üzerine 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml konsantrasyonlarında ayrı-ayrı ATE ve TCZ uygulaması yapıldı. Kontrol olarak OVCAR-3 hücresi için uygun besiyeri kullanıldı.

LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonları için de LA uygulaması sonrası en etkin sonucu gösteren OVCAR-3 hücre hattında hücre anti-proliferasyonu üzerindeki sinerjistik etkisini belirlemek için xCELLigence RTCA analizi yöntemi kullanılmıştır. OVCAR-3 hücreleri uygun sayılarda 16 kuyulu e-plakalara 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra hücreler üzerine LA ile ATE ve LA ile TCZ'nin IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅ konsantrasyon değerlerinde molekül uygulaması yapılmıştır. Kontrol olarak OVCAR-3 hücresi için uygun besiyeri kullanıldı (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. xCELLigence RTCA için LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının deney grupları e-plaka yerleşimi

Deney Grupları	Uygulanan Moleküller	
1. Grup	LA (IC ₂₅) + ATE (IC ₂₅)	LA (IC ₂₅) + ATE (IC ₂₅)
2. Grup	LA (IC ₅₀) + ATE (IC ₅₀)	LA (IC ₅₀) + ATE (IC ₅₀)
3. Grup	LA (IC ₇₅) + ATE (IC ₇₅)	LA (IC ₇₅) + ATE (IC ₇₅)
4. Grup	LA (IC ₂₅) + TCZ (IC ₂₅)	LA (IC ₂₅) + TCZ (IC ₂₅)
5. Grup	LA (IC ₅₀) + TCZ (IC ₅₀)	LA (IC ₅₀) + TCZ (IC ₅₀)
6. Grup	LA (IC ₇₅) + TCZ (IC ₇₅)	LA (IC ₇₅) + TCZ (IC ₇₅)
7. Grup	ATE (IC ₅₀) + TCZ (IC ₅₀)	ATE (IC ₅₀) + TCZ (IC ₅₀)
8. Grup	Kontrol (Besiyeri)	Kontrol (Besiyeri)

4.2.4. HÜCRESEL MORFOLOJİNİN İZLENMESİ

4.2.4.1. Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi

En fazla anti-proliferatif etki gösteren kanserli hücre hattı OVCAR-3 ve insan yumurtalık normal epitel hücre hattı OSE 6 kuyulu plakalara 3x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra LA, TCZ, LA-TCZ kombinasyonun IC₅₀ konsantrasyonları ile ve kontrol olarak da LA çözücüsü DMSO ve uygun besiyeri ile hücrelere muamele edilmiştir. TCZ'nin IC₅₀ değerine uygun olarak 72 saat sonra Compact Cell Culture Mikroskop (OLYMPUS CKX53) kullanılarak görüntüleme yapılmıştır.

4.2.4.2. Yara iyileşme analizi

En fazla anti-proliferatif etki gösteren yüksek dereceli seröz kanser hücre hattı OVCAR-3 kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve 18-24 saat boyunca inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. 18-24 saat sonrasında kuyulara steril 200 μ L'lik pipet ucu ile dik hizada yara izi oluşturulmuş ve yüzen hücreler 500 μ L PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında kuyulara uygun IC₅₀ konsantrasyon değerinde LA, ATE, TCZ, LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonları ve kontrol olarak da lobarik asit çözücüsü DMSO ile hücrelere muamele edilmiştir. Hücresel boyutta yara izleri 0, 24, 48 ve 72. saatlerde fotoğraflandı. Deney sonuçları ImageJ yazılımı kullanılarak yapılmıştır. ImageJ yazılımı ile yara bölgelerinin 3 tekrarlı analizinin ortalaması alınarak GraphPad Prism 10 yazılımında grafik oluşturulmuştur.

4.2.5. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNLİĞİN BELİRLENMESİ

4.2.5.1. PD-1/PD-L1 protein bağlanma analizi

Deney PD1/PD-L1 protein bağlanma analiz kiti (Cisbio) ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü petrilere 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra belirlenen konsantrasyonlarda LA, ATE, TCZ, LA-ATE, LA-TCZ kombinasyonları ve kontrol olarak da LA çözücüsü DMSO hücrelere uygulandı. Her molekül için ayrı-ayrı belirlenen IC₅₀ inkübasyon süresi sonunda petrilere besiyeri çekilip atılmış, petrilere ılık PBS ile yıkanmış ve petrilere 1000 μ L soğuk PBS eklenmiştir. Petrilere hücreler Scraper ile kazınarak lizat 2 mL'lik ependorf tüpe alınmıştır. Petrilere tekrar 1000 μ L soğuk PBS eklenmiş ve kazıma işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra ependorf tüp içindeki hücre lizatlar 300 g'de 5-6 dk 4°C derecede santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve pelet üzerine 750 μ L soğuk PBS eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra ependorf tüp içindeki hücre lizatları 300 g'de 5 dk 4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pelet üzerine pelet büyüklüğüne göre 200-250-300 μ L aralığında 1X lizis buffer+proteaz+fosfataz inhibitörü ekli çözeltiden eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. 30 dk buz üzerinde bekletilerek, 10 dk aralıklarla çıkarılıp vortekslenmiştir. Daha sonra 4°C'de 14000 g'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Bu şekilde protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve süpernatant muhafaza için alınarak -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Kit içerisinde bulunan PD1/PD-L1 standart stok solüsyonu oda sıcaklığına getirildikten sonra 5 kat seyreltilmiştir. Bunun için Standart 7 olarak belirlediğimiz PD-1/PD-L1 standart

stok çözeltisinden 10 µL ve 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi tüpte birleştirilmiş ve Standart 6 hazırlanmıştır. Standart 6'dan 10 µL alınarak 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi ile farklı bir tüpte birleştirilerek Standart 5 hazırlanmıştır. Standart 5'den 10 µL alınarak 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi ile farklı bir tüpte birleştirilerek Standart 4 hazırlanmıştır. Standart 4'den 10 µL alınarak 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi ile farklı bir tüpte birleştirilerek Standart 3 hazırlanmıştır. Standart 3'den 10 µL alınarak 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi ile farklı bir tüpte birleştirilerek Standart 2 hazırlanmıştır. Standart 2'den 10 µL alınarak 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi ile farklı bir tüpte birleştirilerek Standart 1 hazırlanmıştır. Standart 0 için sadece 40 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi kullanılmıştır.

Daha sonra 96 kuyulu plakanın standart örnekleri için işaretlenmiş kuyucuklarına 2 µL standart, 4 µL Tag1-PD-L1 ve 4 µL Tag2-PD1 eklenmiştir. Standartların olduğu her bir kuyu içerisine 10 µL Anti-Tag HTRF okuma solusyonu eklenmiştir. Protein örnekleri için işaretlenmiş kuyucuklara 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 µg/mL konsantrasyonlarında her protein örneğinden 2 µL, 4 µL Tag1-PD-L1 ve 4 µL Tag2-PD1 eklenmiştir. Protein örneğinin bulunduğu her bir kuyucuğa 10 µL Anti-Tag florasan okuma solusyonu eklenmiştir. Buffer kontrol (BC) için 20 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi, negatif kontrol (NC) için 6 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi 4 µL Tag1-PD-L1 ve 10 µL Anti-Tag HTRF okuma solusyonu, pozitif kontrol (PC) için 2 µL PPI Europium dedeksiyon çözeltisi, 4 µL Tag1-PD-L1, 4 µL Tag2-PD1 ve 10 µL Anti-Tag HTRF okuma solusyonu kullanılmıştır. Plaka oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra, 665 nm ve 620 nm ayrı ayrı HTRF uyumlu bir microplate okuyucuda ölçüm alınmıştır. Standart örnek ölçümlerine göre deney hassasiyeti belirlenmiş, deney sonuçları NC ve PC örneklerine göre normalize edilmiştir. 4 tekrarlı gerçekleştirilmiş deneyden elde edilen değerler ile GraphPad Prism 10 yazılımında grafik çizilmiştir.

4.2.6. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNİN TRANSKRİPTOM BOYUTUNDA BELİRLENMESİ

4.2.6.1. RNA İzolasyonu

6 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde OVCAR-3 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra hücrelere IC₅₀ konsantrasyonunda LA, ATE, TCZ, LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonları ve kontrol olarak da LA çözücüsü

DMSO uygulanmıştır. xCELLigence analizi sonrasında belirlenen süre sonrasında kuyularda bulunan ortam uzaklaştırılmış ve kuyular 1X PBS yardımı ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerinde 1 mL Trizol eklenerek hücrelerin kalkması sağlanmış ve hücreler ependorf tüplere alınmıştır. Trizol içerisinde çözülmüş hücrelerin üzerinde 200 µl kloroform eklenmiş ve tüpler yavaşça aşağı-yukarı sallanmış sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında +4°C'de 12.000 g'de 15 dk santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonunda oluşan 3 farklı fazdan üst kısımdaki şeffaf katman yeni bir ependorf tüpüne alınmıştır. Daha sonra 500 µl izopropanol eklenerek tüpler 1 dk yavaşça aşağı yukarı çalkalanmıştır. Daha sonra tüp oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. 10 dk bekletildikten sonra +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda RNA'lar pellet halinde tüpün dibine çökmüş olarak gözlemlenmiştir. Dip kısımdaki RNA pelletine dikkat edilerek süpernatant (izopropanol) uzaklaştırılmıştır. Tüplere 1 ml %75'lik etanol eklenerek pelletin etanol içinde çözünmesi sağlanmıştır. +4°C'de 7500 g'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dip kısımdaki RNA pelletine dikkat edilerek etanol uzaklaştırmış ve etanolle yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. Tüpler kapağı açık şekilde temiz bir zemin üzerinde kurumaya bırakılmış ve tüpte kalan etanolün uçması sağlanmıştır. Etanol uçtuktan sonra 35-50 µl DNase/RNase-free su eklenerek pellet çözülmüş ve elde edilen RNA'lar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Spektrofotometre (NanoDrop) yardımıyla izole edilen RNA'ların saflık ve miktar tayini yapılmıştır.

4.2.6.2. RNA saflık ve kalite tayini

RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık profili spektrofotometre cihazı (NanoDrop) ile tespit edildi. 1.5 µl ddH₂O dikkatli bir şekilde prob üzerine bırakıldı ve cihazın kapağı kapatılarak ilk ölçümün yapılması sağlandı. Ölçümden sonra prob temizlendi. RNA'ları çözmek için kullanılan DNase/RNase-free su'dan 1.5 µl alınarak prob üzerine bırakıldı ve arka plan ölçümü alındı. Prob temizliği sonrası ölçüm yapılacak RNA örnekleri pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiş ve 1.5 µl alınarak prob üzerine bırakıldı ardından ölçüm alınmıştır. Ölçüm 3 tekrarlı olarak yapıldı ve elde edilen değerlerin ortalaması alınarak RNA konsantrasyonu belirlendi.

4.2.6.3. Komplementer (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi için BioRad iScript™ sentez kiti kullanılmıştır. BIO-RAD iScript™ cDNA sentez kiti ticari olarak temin edilmiştir. 5x iScript Reaction Mix eridikten sonra 4 µL (20

µL total hacim için), 1 µL iScript Reverse Transcriptase, 1000 µg RNA ve toplam hacmi 20'e tamamlamak için gereken miktarda Nukleaz free su tüp içerisinde karıştırılmıştır. Tüp cDNA sentezi için örnekler PCR (Bio-Rad) cihazına alınarak ve aşağıda belirtilmiş kit protokoline uygun olarak önceden ayarlanmış reaksiyon koşullarında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir; 25°C'de 5 dakika, 46°C'de 20 dakika ters transkripsiyon işlemi, 95°C'de 1 dakika ters transkriptaz inaktivasyonu. Sentezlenmiş cDNA -20°C'e kaldırılarak muhafaza edilmiştir.

4.2.6.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR) Deneyi

qRT-PCR analizi için 96 kuyucuklu plakta her bir uygun kuyucuğa 9 µl karışım (ddH₂O, SYBR Green ve 100µ komplementer DNA) ve ana stoktan seyreltilmiş ara stoktan 1 µl (0.5 µl İleri + 0.5 µl Geri) primer eklenmiştir. Deney Light Cycler 480 Real Time (Roche) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında toplam 6 hedef gen (Çizelge 4.6.) ve house keeping olarak da *ACTB* geni kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan primerler Primer3 arayüzünde, uygun ürün boyutuna, GC oranının %40-55 arasında olmasına, erime sıcaklıklarının arasındaki farkın 2°C'den az olmasına ve saç tokası ve dimer oluşmamasına dikkat edilerek tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler özgünlüğü BLAST arayüzü ile doğrulanmış ve hedef dışı bağlanma yapmadığı kontrol edilmiştir. Çalışma 4 tekrar olmak üzere $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak qRT-PCR sonuçlarının analizi ANOVA istatistiksel analiz yöntemi ile yapılmış ve GraphPad Prism 10 ile grafik çizimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.6. qRT-PCR deneyinde kullanılmış 6 hedef gene ait sekans bilgileri.

Gen Adı	Forward (İleri) dizi 5'-3'	Reverse (Geri) dizi 3'-5'
<i>CD-274</i>	ACCTGGCTGCACTATTGTCT	AAGTGCAGCATTTTCCAGG
<i>STAT1</i>	GAGAGTCTGCAGCAAGTTCG	GGAAAAGACTGAAGGTGCGG
<i>STAT3</i>	AACGACCTGCAGCAATACCA	TCCATGTCAAACGTGAGCGA
<i>JAK1</i>	ACGAGTGTCTAGGGATGGCT	CGCATCCTGGTGAGAAGGTT
<i>JAK2</i>	AGACTCTGCATGGGAATGGC	TTCCTCAGATTTCCTCAAGGG
<i>IL-6R</i>	TCACTGTGTCATCCACGACG	CTGGATTCTGTCCAAGGCGT

4.2.7. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNİN PROTEİN BOYUTUNDA BELİRLENMESİ

4.2.7.1. Protein İzolasyonu

Hücre kültürü petrilere 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra belirlenen konsantrasyonlarda LA, ATE, TCZ, LA-ATE, LA-TCZ kombinasyonları ve kontrol olarak da LA çözücüsü DMSO hücrelere uygulandı. Her molekül için ayrı-ayrı belirlenen IC_{50} inkübasyon süresi sonunda petrilere besiyeri çekilip atılmış, petrilere ılık PBS ile yıkanmış ve petrilere 1000 μ l soğuk PBS eklenmiştir. Petrilere hücreler Scraper ile kazınarak lizat 2 mL'lik ependorf tüpe alınmıştır. Petrilere tekrar 1000 μ l soğuk PBS eklenmiş ve kazıma işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra ependorf tüp içindeki hücre lizatlar 300 g'de 5 dk $4^{\circ}C$ 'de santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmış ve hücre peleti üzerine 750 μ l soğuk PBS eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra ependorf tüp içindeki hücre lizatları 300 g'de 5 dk $4^{\circ}C$ 'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pelet üzerine pelet büyüklüğüne göre 200-250-300 μ l aralığında 1X cell lysis buffer+proteaz+fosfataz inhibitörü ekli çözeltiden eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. 30 dk buz üzerinde bekletilerek, 10 dk aralıklarla çıkarılıp vortekslenmiştir. Daha sonra $4^{\circ}C$ 'de 14000 g'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Bu şekilde protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve süpernatant muhafaza için alınarak $-20^{\circ}C$ 'ye kaldırılmıştır.

4.2.7.2. Bradford Protein Safılık ve Miktar Tayini Analizi

İzole edilen proteinlerin miktar tayini BSA standartları kullanılarak Bradford yöntemi ile tespit edilmiştir. 96 kuyulu plakalara BSA standartlarından ve izole edilen protein örneklerinden 5 μ l konulmuş ve üzerlerine 245 μ l Bradford çözeltisi (BioRad) eklenmiştir. 10 dakika karanlık bir ortamda bekletildikten sonra Infinite M Plex from Tecan plate okuyucu cihazı ile 595 nm dalga boyunda 3 tekrarlı olarak ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar $y=mx+n$ formülüne göre değerlendirilmiştir.

4.2.7.3. Western Blot

Western blot çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri aşağıda yer almaktadır.

- 10X Towbin Transfer Tamponu (pH: 8.3): 30.3 g Tris, 144 g Glycine, %10 SDS

- 1X Towbin Transfer Tamponu: 100 ml 10X towbin tamponu, 200 mL %100 metanol, 700 mL ddH₂O
- 10X TBS (pH: 7.6): 24.23 g Tris-HCl, 80.06 g NaCl
- 1X TBST: 100 ml 10X TBS, 500 µl Tween-20, 899.5 mL ddH₂O
- 6X SDS Protein Yükleme Tamponu: 375 mM Tris-HCl pH:6.8, %6 SDS, %4.8 Gliserol, %9 β-merkaptoetanol, %0.03 Bromofenol mavisi
- Bloklama Tamponu (%5): 2.5 g BSA, 50 mL 1X TBST

Western blot çalışmasında %4 toplama jeli ve %12 ve %8'lik ayırma jelinden oluşan SDS-PAGE jeli kullanıldı. Kullanılan jel içerikleri aşağıda yer almaktadır.

- %4 Toplama Jeli: ddH₂O (3 mL), %40 Akrilamid/Bis (0.66 mL), 0.5M Tris-HCl (pH: 6.8) (1.26 mL), %10 SDS (50 µL), %10 Amonyum Persülfat (25 µL), TEMED (5 µL)
- %12 Ayırma Jeli: ddH₂O (1.67 mL), %40 Akrilamid/Bis (2 mL), 1.5M Tris-HCl (pH: 8.8) (1.25 mL), %10 SDS (50 µL), %10 Amonyum Persülfat (25 µL), TEMED (2.5 µL)
- %8 Ayırma Jeli: ddH₂O (2.3 mL), %40 Akrilamid/Bis (1.3 mL), 1.5M Tris-HCl (pH: 8.8) (1.3 mL), %10 SDS (50 µL), %10 Amonyum Persülfat (50 µL), TEMED (3 µL)

Protein örnekleri 30 ng olacak şekilde hazırlanarak üzerine kuyu total hacminin üçte bir oranında loading sample buffer (4X)'dan eklenmiştir. Hazırlanan örnek ve boya karışımı 95°C'de 5-6 dakika bekletilerek proteinlerin açılması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezinde 120 dakika 120 V'da yürütme işlemi yapılmıştır. SDS-PAGE yöntemi için %4'lük toplama jeli ve %12'lik ve %8'lik ayırma jeli birlikte hazırlanarak uygulanmıştır. Protein örnekleri 120 V, 3000 mA'de 120 dk yürütülmüştür. SDS-PAGE işleminden sonra PVDF membran jelin boyutuna uygun olarak kesilmiş ve çalkalayıcıda 1 dakika %100 methanol içinde daha sonra da 1 dakika 1X Towbin transfer tamponuyla çalkalayıcıda muamele edilmiştir. Yarı kuru transfer işlemi için 1 adet filtre kağıdı transfer buffer (1X TBST) ile ıslatılmış ve yarı-kuru cihazına yerleştirilmiştir. Filtre kağıdı üzerine membran ve membranın üzerine jel yerleştirilmiştir. 1 adet filtre kağıdı transfer buffer ile ıslatılmış ve jelin üzerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu sandviç

transfer buffer ile ıslatılmıştır. 25 V, 1A'de 30 dakika transfer işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Western blot deneyi yürütme ve transfer aşamaları. (A) Örnek yükleme, (B) Yürütme tankı, (C) Transfer sandviçininin hazırlanması, (D) Yarı-kuru trans-blot cihazı.

Bu işlemden sonra proteinlerin transfer olduğu membran çalkalayıcı aracılığıyla %5 BSA'lı (w/v) TBST içinde (bloklama tamponu) 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Bloklama işlemi aynı zamanda, membranın 20 mL EveryBlot Bloklama Tamponunda 10 dk çalkalanması ile de gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bloklama tamponu 1X TBST ile 6 dakika 5 kez çalkalayıcıda yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Membrana örnekler uygun monoklonal birincil antikor ile muamele edilerek +4°C'de gece boyunca çalkalayıcıda çalkalanmıştır. İnkübasyon sonrası birincil antikor ependorf tüpe alınmış ve membran 6 dakika 1X TBST ile 5 defa yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işleminden sonra uygun oranda seyreltilmiş olan uygun karşılıklı ikincil antikor ile membrana muamele edilmiştir. Membran oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ikincil antikor ependorf tüpe alınmış ve membran 6 dakika 1X TBST ile 5 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında görüntüleme aşaması için SuperSignal™ West Femto Maksimum Hassasiyet Substrate (Thermo Scientific) reaktif kiti kullanılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Membran hazırlanan çalışma çözeltisi içinde 10 dakika oda

sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiş ve daha sonra LI-COR Odyssey CLx Western Blot görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir. ImageJ programı aracılığıyla analizi yapılmış ve 3 tekrar olacak şekilde elde edilmiş bulguların istatistiksel testleri ANOVA analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları GraphPad Prism 10 aracılığı ile grafik çizilmiştir.

4.2.8. LA VE LA-TCZ KOMBİNASYONUNUN IL-6R/STAT3/PD-L1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİ MEKANİZMASININ BELİRLENMESİ

4.2.8.1. siRNA Transfeksiyonu

OVCAR-3 hücreleri uygun büyüme ortamında büyütülmüştür. 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 5×10^5 hücre ve 2 mL normal besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır. STAT3 hedefli siRNA 5 μ M konsantrasyona getirilmek için, saf DMEM içerisinde yeniden süspanse edildi. 15 mL'lik falkon tüp içerisinde, 5 μ M siRNA'dan 5 μ L alınarak 95 μ L serum ve antibiyotik içermeyen saf DMEM içerisine eklenip, hafif pipetaj yapıldı. İkinci bir 15mL'lik falkon tüp içerisinde 99 μ L serum ve antibiyotik içermeyen DMEM içerisine 1 μ L Transfeksiyon reaktifi (Dharmacon) eklenip, hafifce pipetaj yapıldı. 2 tüp de 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüp içerikleri karıştırıldı ve reaksiyon kompleksi oluşturuldu. Hafifce pipetajlama sonrası reaksiyon kompleksi 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyon kompleksinin üzerine 800 μ L normal besiyeri eklenmiştir. Hücre ekiminden 18-24 saat sonra kuyucuklu plakadaki besiyeri uzaklaştırılır ve hücreler üzerine 1mL reaksiyon kompleksi ve besiyeri karışımı eklenmiştir. mRNA analizi için 24-48, protein analizi için 72 saat beklenmiştir. Deneyde konjuge olmayan kontrol siRNA (sc-siRNA) kullanılmıştır.

4.2.8.2. LA'nın PD-L1 yolağı üzerindeki etki mekanizmasının transkriptom boyutunda belirlenmesi

STAT3 geni siRNA (Çizelge 4.3.) aracılı susturulduktan sonra IC₅₀ konsantrasyonunda LA, TCZ, LA-TCZ kombinasyonları ve kontrol olarak da sc-siRNA uygulanmıştır. Daha sonra örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR analizi yapılarak gen ifade seviyesi profili belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. STAT3 hedefli siRNA sekans dizisi.

STAT3 hedefli siRNA Primer dizisi	
Forward (İleri) dizi 5'-3'	GCAGCAGCTGAACAACATGCATGTTCAAGAGACATGTTGTTCA GCTGCTGCTTTTT
Reverse (Geri) dizi 3'-5'	AATTAAAAAGCAGCAGCTGAACAACATGTCTCTTGAACATGTT GTTTCAG CTGCTGCTGCGGCC

4.2.8.3. LA-TCZ kombinasyonunun STAT3 yolağı üzerindeki mekanizmasının proteom boyutunda belirlenmesi

STAT3 geni siRNA aracılı susturulduktan sonra IC₅₀ konsantrasyonunda LA, TCZ, LA-TCZ kombinasyonları ve kontrol olarak da sc-siRNA uygulanmıştır. Daha sonra örneklerden protein izolasyonu, Bradford protein miktar ve saflık tayini analizi ve uygun monoklonal antikor kullanılarak western blot deneyi yapılarak protein ifade seviyesi profili belirlenmiştir.

4.2.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi deneyi sonuçları RTCA Software Lite yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Biyokimyasal protein bağlanma analizi sonuçları tek-yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. qRT-PCR çalışmaları ile elde edilen gen ifade seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile değerlendirilmiş ve tek-yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Western blot sonuçlarında elde edilen bant yoğunlukları ve yara iyileşme analizi yara alanının genişliği ImageJ programı ile hesaplanmış ve tek-yönlü ANOVA yöntemi ile analiz edildi. Analizler ve görselleştirmeler GraphPad Prism 10 veri analiz programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN VE SİTOTOKSİK ETKİNİN BELİRLENMESİ

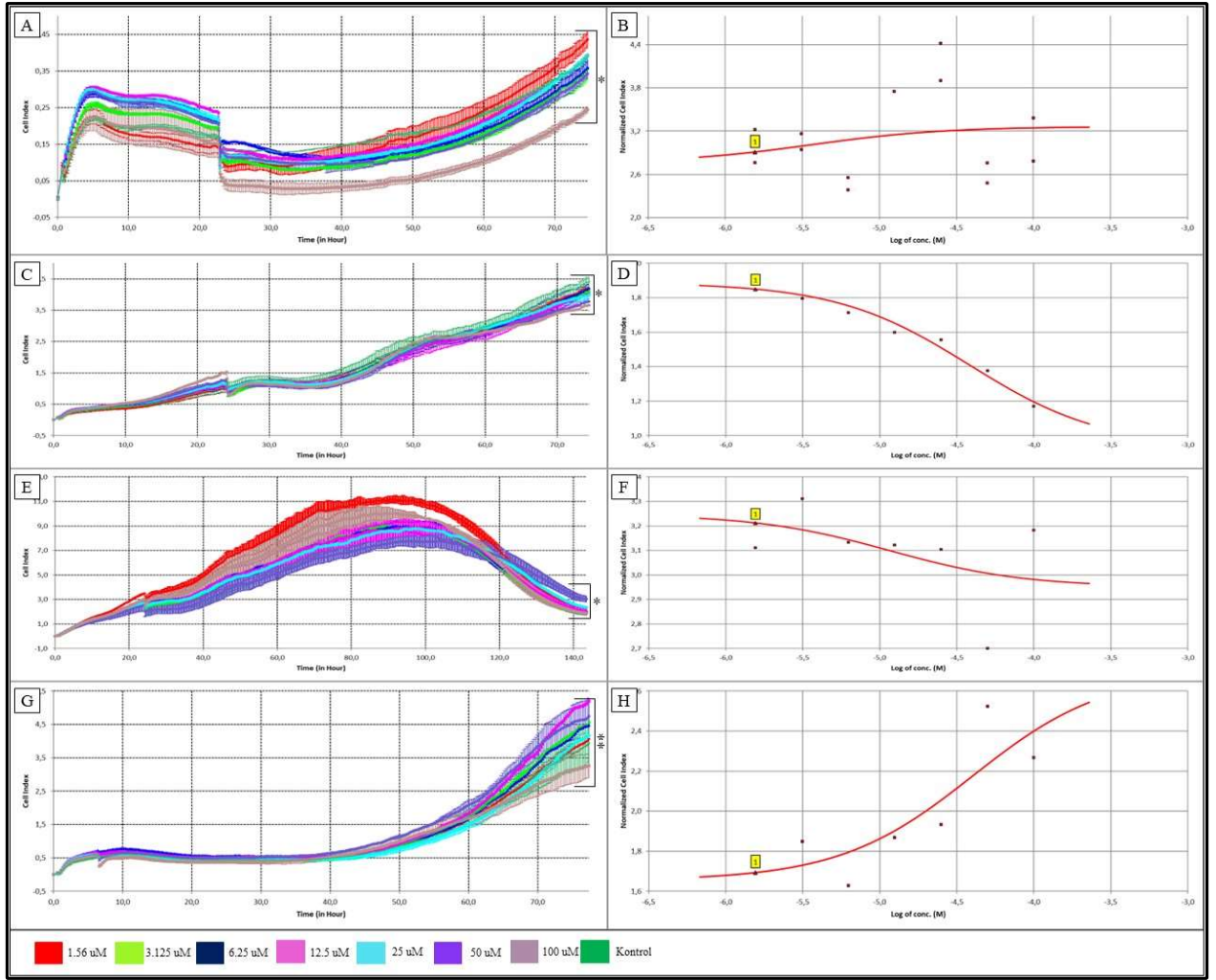
5.1.1. XCELLIGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ

LA ilaç aday molekülünün zamana ve doza bağlı olarak yumurtalık kanseri hücre hatları A2780, SKOV3 ve OVCAR-3 büyümesini kontrole kıyasla baskıladığı gözlemlenmiştir. 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ M LA konsantrasyonlarının A2780 hücrelerinin çoğalmasını sırası ile %11.78, %13.11, %27.47, %30.67, %38.96, %55.64, %66.59 ($p<0.05$) oranında (Şekil 5.1. A, B), SKOV3 hücrelerinin çoğalmasını sırası ile %6.47, %19.72, %22.16, %34.69, %41.64, %52.75, %66.45 ($p<0.05$) oranında (Şekil 5.1. C, D), OVCAR-3 hücrelerinin çoğalmasını sırası ile %19.38, %21.80, %42.72, %52.27, %58.92, %62.46, %82.91 ($p<0.05$) oranında (Şekil 5.1. E, F) baskıladığı belirlenmiştir. Cihaza ait olan RTCA Software Lite yazılımı kullanılarak LA'nın belirlenmiş hücreler üzerindeki etkin inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanmıştır. Deney hesaplama sonuçlarına göre LA'nın IC_{50} değeri A2780 hecreleri üzerinde 72 saatte 36.2 μ M ($p<0.05$), SKOV3 hücreleri üzerinde 48 saatte 38.4 μ M ($p<0.05$) ve OVCAR-3 hücreleri üzerinde 48 saatte 11.7 μ M ($p<0.05$) olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.1.). OSE normal yumurtalık epitel hücreleri için gerçekleştirilen xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sonuçlarına göre kontrole kıyasla, LA konsantrasyonlarının sitotoksik etkiye sebep olmadığı gözlemlenmiş ve OSE hücresi için LA'nın IC_{50} değeri 55 saatte 80.3 μ M olarak hesaplanmıştır ($p<0.01$) (Şekil 5.1. G, H).

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi deneyinin sonuçlarına göre OVCAR-3 yumurtalık kanseri hücresinin LA'a daha duyarlı olduğu belirlenmiş ve çalışmaya bu hücre hattı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 5.1. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre LA'nın hücre hatları üzerindeki IC_{50} değerleri.

Hücre Hattı	IC_{50} değeri	Zaman
A2780	36.2 μ M	72 Saat
SKOV3	38.4 μ M	48 Saat
OVCAR-3	11.7 μ M	48 Saat
OSE	80.3 μ M	55 Saat

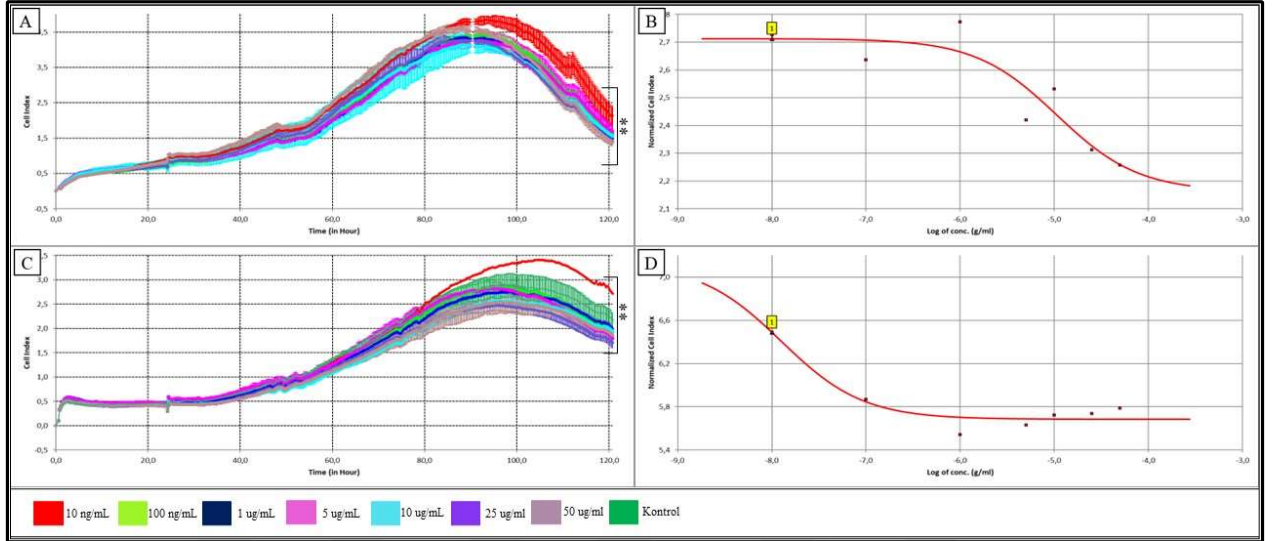


Şekil 5.1. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre LA'nın (A, B) A2780, (C, D) SKOV3, (E, F) OVCAR-3, (G, H) OSE hücre hatları üzerindeki doza ve zamana bağlı anti-proliferatif etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

OVCAR-3 LA'a duyarlı uygun hücre hattı seçildikten sonra, PD-L1 hedefli mAb ola ATE'nin ve IL-6R hedefli mAb TCZ'nin hedef hücre üzerindeki anti-proliferatif etkinliği 10 ng/ml, 100 ng/ml ve 1, 5, 10, 25, 50 μ g/ml konsantrasyonlarında ayrı-ayrı xCELLigence analizi ile değerlendirilmiştir. Deney analiz sonuçlarına göre, OVCAR-3 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri ATE için 48 saatte 10.7 μ g/ml ($p < 0.01$), TCZ için 72 saatte 0.0216 μ g/ml ($p < 0.01$) olarak belirlenmiştir (Şekil 5.3.).

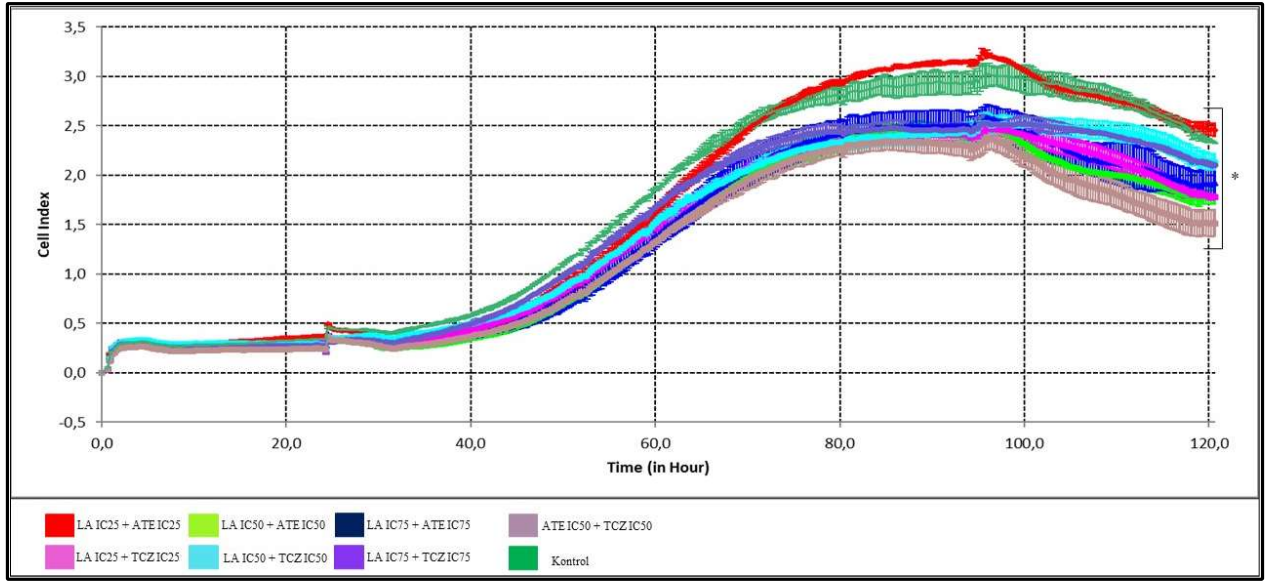
Şekil 5.2. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre ATE ve TCZ'nin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerleri.

Hücre Hattı	mAb	IC ₅₀ değeri	Zaman
OVCAR-3	ATE	10.7 µg/ml	48 Saat
OVCAR-3	TCZ	0.0216 µg/ml	72 Saat



Şekil 5.3. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre ATE'nin (A, B) ve TCZ'nin (C, D) OVCAR-3 üzerindeki doza ve zamana bağlı anti-proliferatif etkisi (**p<0.01).

LA'nın ATE ile ve LA'nın TCZ ile OVCAR-3 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin sinerjisitesini belirlemek için her bir molekülün IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ değerlerine uygun konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. ATE'nin IC₅₀ değerine uygun olarak 48 saat aralığında LA-ATE kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi ATE'ye göre %40.76 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (p<0.05). TCZ'nin IC₅₀ değerine uygun olarak 72 saat aralığında LA-TCZ kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi TCZ'ye göre %49.92 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. xCELLigence RTCA sonuçlarına göre LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının OVCAR-3 hücresi üzerindeki anti-proliferatif etkisi (* $p < 0.05$).

xCELLigence RTCA deneyi sonuçlarına göre, HGSOC hücre hatlarından LA'ya en duyarlı hücre hattının OVCAR-3 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, PD-L1 hedefli mAb ATE ve IL-6R hedefli mAb TCZ'nin OVCAR-3 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. ATE'nin LA ile ve TCZ'nin LA ile kombinasyon şeklinde uygulanması sonucunda, bu mAb'lerin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, LA'nın hedef mAb'lerin etkinliğini artırdığını ve HGSOC hücre hattı OVCAR-3 proliferasyonunu baskılamada LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının sinerjistik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, LA'nın, OVCAR-3 hücre hattında mAb'lerin anti-proliferatif etkisini potansiyel olarak artırabileceğini ortaya koymaktadır.

5.2. HÜCRESEL MORFOLOJİNİN İNCELENMESİ

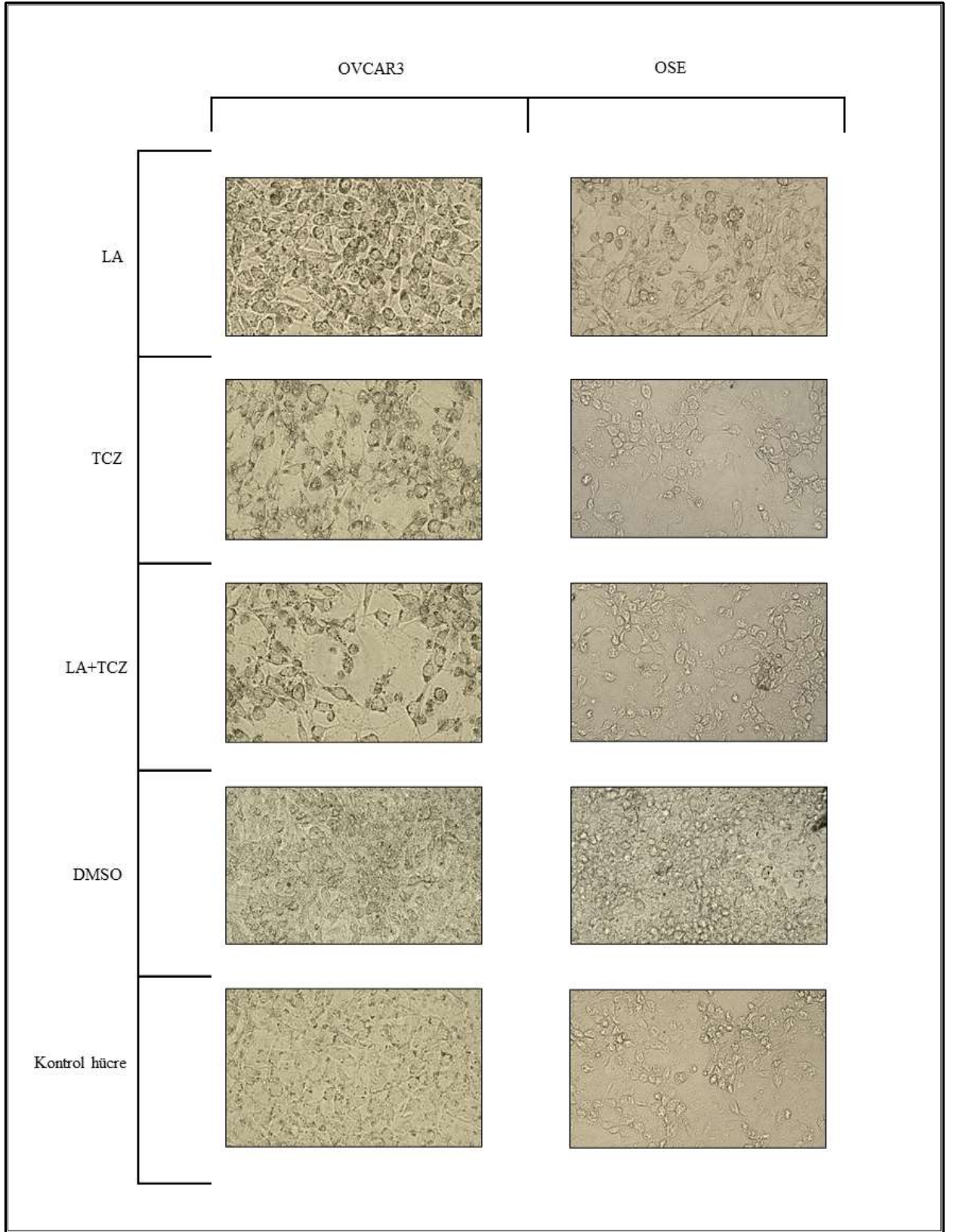
5.2.1. HÜCRE MORFOLOJİSİNİN BELİRLENMESİ

LA, TCZ ve LA-TCZ uygulanması sonucunda OVCAR-3 ve OSE hücrelerinin morfolojik değişimlerini incelemek için morfoloji belirleme deneyi gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerlerine uygun olarak hedef molekül ve kombinasyon uygulamasından TCZ'nin IC₅₀ değerine uygun olarak 72 saat sonra Compact Cell Culture Mikroskop (OLYMPUS CKX53) kullanılarak görüntüleme yapılmıştır. Kontrol olarak LA çözücüsü DMSO ve hücre hatlarına uygun besiyeri kullanılmıştır.

DMSO ve kontrol hücre örnek grupları ile karşılaştırıldığında OVCAR-3 hücreleri için LA, TCZ ve LA-TCZ örnek gruplarında hücre ölümünün olduğu belirlenmiştir. LA-TCZ örnek grubunda hücre ölümünün LA ve TCZ örnek gruplarına göre daha yüksek oranda gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 5.7.).

OSE yumurtalık normal epitel hücreleri için, DMSO ve kontrol hücre örnek grupları ile karşılaştırıldığında, LA, TCZ ve LA-TCZ örnek gruplarında hücre ölümünde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 5.7.).

Yapılan çalışmanın sonuçları, LA ve TCZ kombinasyonunun OVCAR-3 kanser hücreleri üzerindeki belirgin etkisini göstermektedir. DMSO ve kontrol hücre grupları ile karşılaştırıldığında, LA ve TCZ'nin tek başına uygulandığında hücre ölümünü arttırdığı, ancak bu etkinin LA-TCZ kombinasyonunda daha yüksek oranda gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu durum, LA-TCZ kombinasyonunun sinerjistik bir etki yaratarak kanser hücrelerinin ölümünü daha fazla teşvik ettiğini göstermektedir. Buna karşılık, OSE normal epitel hücrelerinde bu maddelerin ve kombinasyonlarının anlamlı bir hücre ölümüne yol açmaması, tedavinin seçici bir şekilde kanser hücrelerini hedef aldığını düşündürmekte ve normal hücrede sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Bu bulgular, LA-TCZ kombinasyonunun, OVCAR-3 hücre hattında etkili bir tedavi stratejisi olabileceğini işaret etmektedir.



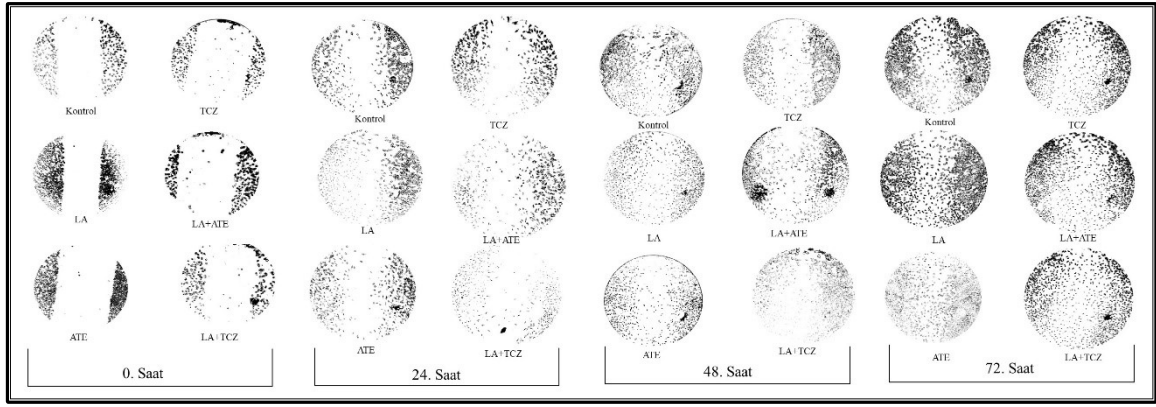
Şekil 5.5. LA, TCZ, LA-TCZ (IC_{50}) uygulaması sonrası OVCA3 ve OSE hücrelerindeki morfolojik değişim.

5.2.2. HÜCRE GÖÇÜNÜN BELİRENMESİ

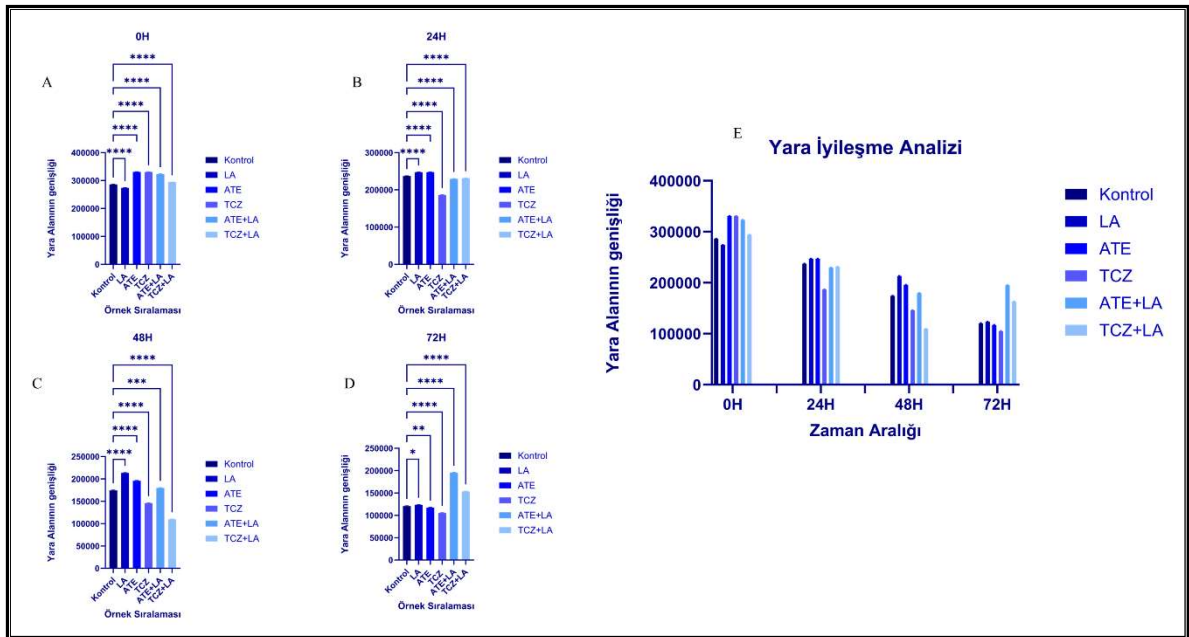
LA, ATE, TCZ molekülleri ve LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonları uygulanmış OVCAR-3 hücreleri için hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini belirlemek amacı ile yara iyileşme deneyi gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerinde uygun molekül ve kombinasyon gruplarının uygulanması sonrasında 0, 24, 48, 72. saatlerdeki yara alanı fotoğraflanmış ve ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir (Şekil 5.5.). LA uygulaması sonucunda 0, 24, 48, 72. saatlerdeki yara alanının sırası ile 273900, 247295, 213308, 123370 olduğu, ATE uygulaması sonucunda sırası ile 330692, 247266, 195762, 117113 olduğu, TCZ uygulaması sonucunda sırası ile 330478, 186492, 145805, 105312 olduğu, kontrol grubu için ise sırası ile 286044, 237042, 174301, 120517 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 5.6.).

LA'nın ATE ile ve LA'nın TCZ ile OVCAR-3 hücrelerinde, yara iyileşmesi ve hücre-hücre etkileşimi üzerindeki sinerjisi değerlendirilmiştir. LA-ATE uygulaması sonucunda 0, 24, 48, 72. saatlerdeki yara alanı sırası ile 323097, 229343, 179694, 195231 ve LA-TCZ uygulaması sonucunda sırası ile 294310, 231483, 109546, 163245 olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.6.).

Elde edilen verilere göre, LA, ATE ve TCZ uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde moleküllerin hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini baskılama etkilerinin 48. saatten sonra zayıfladığı gözlemlenmiştir. LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini baskılama etkilerinin LA, ATE ve TCZ'e kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Deney sonuçları incelendiğinde LA, ATE ve TCZ'nin tekli uygulamalarının HGSOC hücre hattı OVCAR-3'ün hücre-hücre etkileşimi ve hücre göçü özelliği üzerindeki etkinliğinin zamana bağlı olarak, özellikle 48. saatten sonra azaldığı belirlenmiştir. Bu etkinin OVCAR-3'ün agresif doğasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber 72. saate LA-ATE ve LA-TCZ uygulanmış örneklerde yara alanının diğer örnek gruplarına göre daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, LA'nın hedef mAb'lerin etkinliğine destek olduğunu ve HGSOC agresif hücre hattı OVCAR-3 hücrelerinin hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimini baskılamada LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının sinerjistik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, LA'nın, OVCAR-3 hücre hattında mAb'lerin etkinliğini artırabileceğini ve hücre göçünü engelleyerek metastazı önlemeye yardımcı olabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 5.6. Yara iyileşme analizine ait ters mikroskop görüntülerinin ImageJ analizi.



Şekil 5.7. Hedef moleküllerin IC50 konsantrasyonları uygulamasının hücre göçü üzerindeki etkisi. (A) 0. saat, (B) 24. saat, (C) 48. saat, (D) 72. saat, (E) Elde edilen toplam veri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

5.3. İMMÜNÖTERAPÖTİK ETKİNİN BELİRLENMESİ

5.3.1. PD-1/PD-L1 PROTEİN BAĞLANMA ANALİZİ

LA, ATE, TCZ moleküllerinin ve LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının OVCAR-3 hücrelerinde PD-1/PD-L1 protein bağlanma mekanizması üzerindeki etkinliği Cisbio İnsan PD-1/PD-L1 Biyokimyasal Bağlanma Test kiti (PerkinElmer, Katalog No 64PD1PEG) yardımı ile gerçekleştirildi. Örneklerin her biri için 50 (Şekil 5.8 A), 25 (Şekil 5.8. B), 12.50

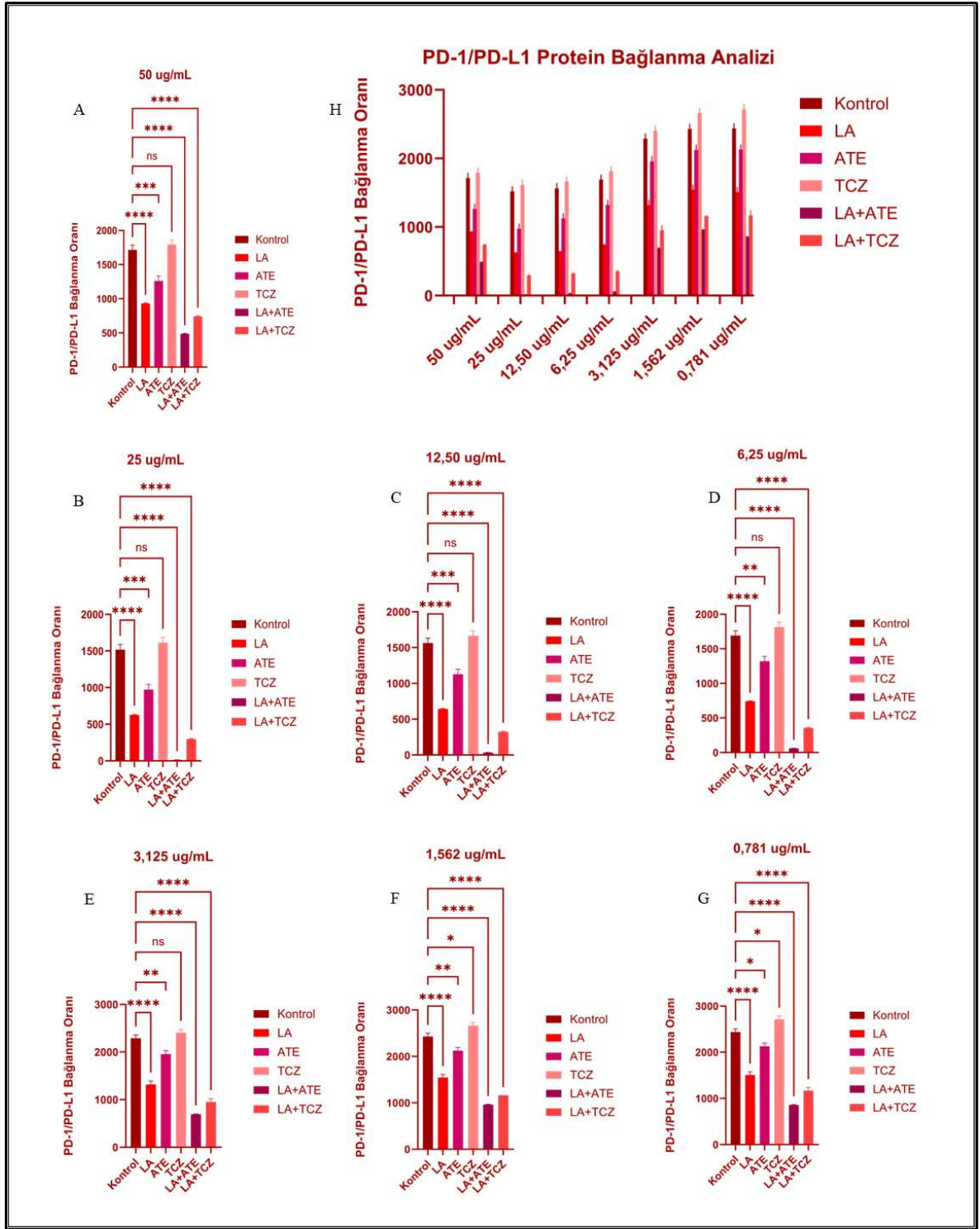
(Şekil 5.8. C), 6.25 (Şekil 5.8. D), 3.13 (Şekil 5.8. E), 1.56 (Şekil 5.8. F), 0.78 (Şekil 5.8. G) µg/mL konsantrasyonlarında seyreltilmiş protein örnekleri analiz edilmiş ve PD-1/PD-L1 protein bağlanmasının baskılanma oranı hesaplanmıştır (Çizelge 5.2.). PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşimi, IC₅₀ değerinde LA uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 µg/mL konsantrasyonlarında sırası ile %64.11 (p<0,0001), %76.03 (p<0,0001), %76.41 (p<0,0001), %74.85 (p<0,0001), %62.17 (p<0,0001), %56.87 (p<0,0001), %59.20 (p<0,0001) oranında, IC₅₀ değerinde PD-L1 hedefli mAb olan ATE uygulanmış hücrelerde sırası ile %51.39 (p<0,001), %62.78 (p<0,001), %58.61 (p<0,001), %55.13 (p<0,01), %43.91 (p<0,01), %40.67 (p<0,01), %42.31 (p<0,05) oranında, IC₅₀ değerinde IL-6R hedefli mAb olan TCZ uygulanmış hücrelerde sırası ile %31.01, %38.20, %38.90, %38.33, %31.07, %25.61 (p<0.05), %26.44 (p<0.05) oranında baskılandığı belirlenmiştir. PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşimini, doğal kaynaklı küçük molekül LA'nın makromolekül yapıdaki ATE ve TCZ'den daha yüksek oranda baskıladığı gerçekleştirilen analiz ile belirlenmiştir.

LA'nın ATE ile ve LA'nın TCZ ile OVCAR-3 hücrelerinde, PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşiminin baskılanmasındaki sinerjisi değerlendirilmiştir. PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşimi, LA (IC₅₀) + ATE (IC₅₀) kombinasyonu uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 µg/mL konsantrasyonlarında sırası ile %81.21 (p<0,0001), %99.45 (p<0,0001), %98.73 (p<0,0001), %97.92 (p<0,0001), %80.09 (p<0,0001), %73.12 (p<0,0001), %76.74 (p<0,0001) oranında, LA (IC₅₀) + TCZ (IC₅₀) kombinasyonu uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde sırası ile %71.37 (p<0,0001), %88.62 (p<0,0001), %88.14 (p<0,0001), %87.88 (p<0,0001), %72.75 (p<0,0001), %67.51 (p<0,0001), %68.32 (p<0,0001) oranında baskılandığı belirlenmiştir. Belirlenen her protein konsantrasyonu için LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının uygulandığı örneklerde PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşimi LA, ATE ve TCZ uygulanmış örneklerle göre daha yüksek oranda baskılandığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 5.2. Hedef molekül uygulamasının PD-1/PD-L1 protein-protein etkileşiminin baskılanması üzerindeki (%) etkinliği.

	LA	ATE	TCZ	LA-ATE	LA-TCZ
50 µg/mL	%64.11	%51.39	%31.01	%81.21	%71.37
25 µg/mL	%76.03	%62.78	%38.20	%99.45	%88.62
12.5 µg/mL	%76.41	%58.61	%38.90	%98.73	%88.14
6.25 µg/mL	%74.85	%55.13	%38.33	%97.92	%87.88
3.125 µg/mL	%62.17	%43.91	%31.07	%80.09	%72.75
1.56 µg/mL	%56.87	%40.67	%25.61	%73.12	%67.51
0.78 µg/mL	%59.20	%42.31	%26.44	%76.74	%68.32

Deney sonuçları, PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşiminin, doğal kaynaklı küçük molekül LA tarafından makromolekül yapıdaki ATE ve TCZ'den daha yüksek oranda baskılandığını ortaya koymuştur. OVCAR-3 hücrelerinde, LA'nın tek başına uygulanması, PD-1/PD-L1 etkileşimini yüksek oranda baskılamış, bu etki ATE ve TCZ'nin tekli uygulamalarına göre daha belirgin olmuştur. LA'nın ATE ile ve TCZ ile kombinasyonları, PD-1/PD-L1 etkileşimini daha da yüksek oranlarda baskılamış ve sinerjistik bir etki göstermiştir. Özellikle, LA-ATE kombinasyonu, PD-1/PD-L1 protein etkileşimini 25 µg/mL konsantrasyonunda neredeyse tamamen baskılamış, bu da LA'nın ATE ile birlikte güçlü bir sinerjistik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. LA-TCZ kombinasyonu da benzer şekilde yüksek baskılama oranları sergilemiş, ancak LA-ATE kombinasyonundan daha az etkili olmuştur. Bu sonuçlar, LA'nın mAb'lerle (ATE ve TCZ) kombine edildiğinde, OVCAR-3 hücrelerindeki PD-1/PD-L1 protein etkileşimini baskılamada sinerjistik bir etki yarattığını ve bu kombinasyonların kanser tedavisinde potansiyel olarak daha etkili olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, LA ve mAb kombinasyonlarının, kanser immünoterapisinde yeni ve etkili tedavi stratejileri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.8. Hedef molekül uygulamasının PD-1/PD-L1 protein-protein bağlanması üzerindeki doza bağlı etkisi. (A) 50µg/mL , (B) 25µg/mL , (C) 12.50µg/mL , (D) 6.25µg/mL , (E) 3.125 µg/mL , (F) 1.562 µg/mL , (G) 0.781 µg/mL , (H) Elde edilen toplam veri (^{ns}p>0.05, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

5.4. LA VE LA-TCZ KOMBİNASYONUNUN IL-6R/STAT3/PD-L1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN TRANSKRİPTOM BOYUTUNDA BELİRLENMESİ

LA, ATE, TCZ moleküllerinin ve LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının OVCAR-3 hücrelerinde IL-6R/STAT3/PD-L1 immün yolağı üzerindeki terapötik etkinliğinin mRNA boyutunda incelenmesi için yolakla ilişkili 6 hedef genin (*CD-274 (PD-L1)*, *STAT1*, *STAT3*, *JAK1*, *JAK2*, *IL-6R*) ifade seviyelerindeki değişimler qRT-PCR deneyi ile incelenmiştir. IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı ile ilgili ilişkili olup, hedef genlerin transripsiyonunda ve fosforilasyonunda görev alan genler seçilmiş ve genlere özel primerler tasarlanmıştır. Referans gen olarak *ACTB* geni kullanmış ve hedef genler referans gene göre normalize edilmiştir.

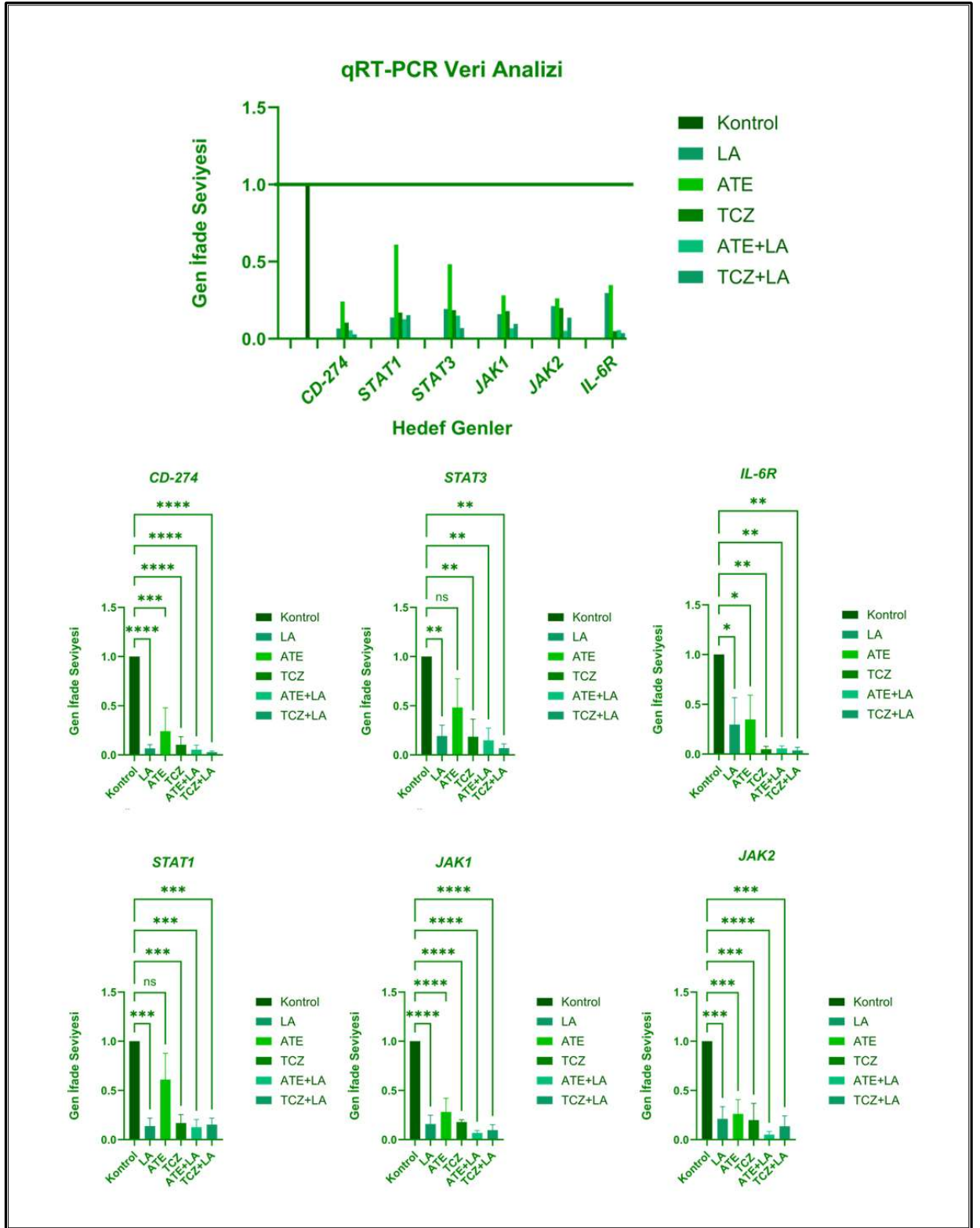
LA, ATE, TCZ uygulanması sonucunda yolak ile ilişkili 6 hedef genin de ifade seviyelerinde düşüş belirlendi. Deney sonuçları incelendiğinde LA ve TCZ uygulanmış örneklerde ifade seviyesi en çok azalan gen sırası ile 11.210 ($p<0.05$) ve 10.068 ($p<0.01$) *IL-6R*, ATE uygulanmış örneklerde 7.904 ($p<0.001$) *CD-274 (PD-L1)* olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.3.) (Şekil 5.9.).

LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının uygulanması sonucunda yolak ile ilişkili 6 hedef genin de ifade seviyelerinde azalma belirlendi. Deney sonuçları incelendiğinde LA-ATE uygulanmış örneklerde ifade seviyesi en çok azalan gen 14.172 ($p<0.0001$) kat *CD-274 (PD-L1)*, LA-TCZ uygulanmış örneklerde ifade seviyesi en çok azalan gen ise 19.293 ($p<0.01$) kat *IL-6R* olduğu tespit edilmiştir. Kombinasyonların uygulandığı örneklerde 6 hedef genin her birinin ifade seviyesi tekli moleküllerin uygulandığı örneklere kıyasla daha fazla azaldığı belirlendi(Çizelge 5.3.) (Şekil 5.9.).

Çizelge 5.3. Hedef molüküllerin IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı ile ilgili 6 genin ifade seviye profili.

Gen Adı	Örnek Adı				
	LA	ATE	TCZ	LA-ATE	LA-TCZ
	İfade Değişim Oranı				
CD-274	0,1241	0,1265	0,1581	0,0706	0,0716
STAT1	0,2314	0,4525	0,3161	0,1174	0,1864
STAT3	0,2567	0,9417	0,1851	0,1930	0,1334
JAK1	0,1398	0,1433	0,1754	0,0876	0,1039
JAK2	0,1442	0,1834	0,2594	0,1046	0,1215
IL-6R	0,0892	0,7448	0,0993	0,0805	0,0518

Gen Adı	Örnek Adı				
	LA	ATE	TCZ	LA-ATE	LA-TCZ
	p Değeri				
CD-274	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
STAT1	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001
STAT3	<0,01	-	<0,01	<0,01	<0,01
JAK1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
JAK2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,0001	<0,001
IL-6R	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01



Şekil 5.9. Şekil 5.9. Hedef moleköl uygulaması sonrası IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı ile ilgili genlerin ifade seviyeleri. (^{ns}p>0.05, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Bu sonuçlar, LA'nın ATE ve TCZ ile birlikte kullanıldığında, IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağını daha etkin bir şekilde baskıladığını ve gen ifadelerini daha fazla azaltarak sinerjistik bir etki yarattığını göstermektedir. Özellikle, LA-ATE kombinasyonunun *PD-L1* ($p<0.0001$) üzerindeki ve LA-TCZ kombinasyonunun *IL-6R* ($p<0.001$) üzerindeki etkisi, bu kombinasyonların kanser tedavisinde potansiyel olarak daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, LA'nın immünoterapi ajanları ile birlikte kullanıldığında, kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışını engelleyebileceğini ve tedavi etkinliğini artırabileceği potansiyelini ortaya koymaktadır.

LA'nın IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı üzerindeki etki mekanizmasını ve yumurtalık kanserinde STAT3 susturulması ile PD-L1 inhibisyonundaki rolünün önemini anlamak için OVCAR-3 hücrelerine siRNA ile transfeksiyon yapılarak STAT3 susturulmuş daha sonra etkin konsantrasyonda LA, TCZ molekülleri ve LA-TCZ kombinasyonu uygulanmıştır. Bu örnekler için de yolakla ilgili 6 hedef genin ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiş ve kontrol olarak sc-siRNA kullanılmıştır. Referans gen olarak *ACTB* geni kullanmış ve hedef genler referans gene göre normalize edilmiştir.

siRNA, siRNA+LA, siRNA+TCZ ve siRNA+LA-TCZ uygulanması sonucunda IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı ile ilişkili 6 hedef genin de ifade seviyelerinde azalma belirlendi. siRNA uygulanmış örneklerde *CD-274 (PD-L1)*, *STAT1*, *STAT3*, *JAK1*, *JAK2*, *IL-6R* genlerinin ifade seviyelerinde sırası ile 17.835 ($p<0.0001$), 14.354 ($p<0.0001$), 27.569 ($p<0.0001$), 2.819 (ns), 4.516 (ns), 5.116 ($p<0.05$) kat, siRNA+LA uygulanmış örneklerde sırası ile 20.464 ($p<0.0001$), 21.781 ($p<0.0001$), 31.017 ($p<0.0001$), 9.952 ($p<0.0001$), 8.664 ($p<0.0001$), 13.690 ($p<0.001$) kat, siRNA+TCZ uygulanmış örneklerde sırası ile 19.698 ($p<0.0001$), 18.379 ($p<0.0001$), 36.504 ($p<0.0001$), 6.892 ($p<0.0001$), 5.187 ($p<0.0001$), 14.172 ($p<0.0001$) kat, siRNA+LA-TCZ kombinasyonu uygulanmış örneklerde ise sırası ile 29.007 ($p<0.0001$), 27.761 ($p<0.0001$), 45.412 ($p<0.0001$), 13.132 ($p<0.0001$), 11.959 ($p<0.0001$), 22.785 ($p<0.0001$) kat azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.10).

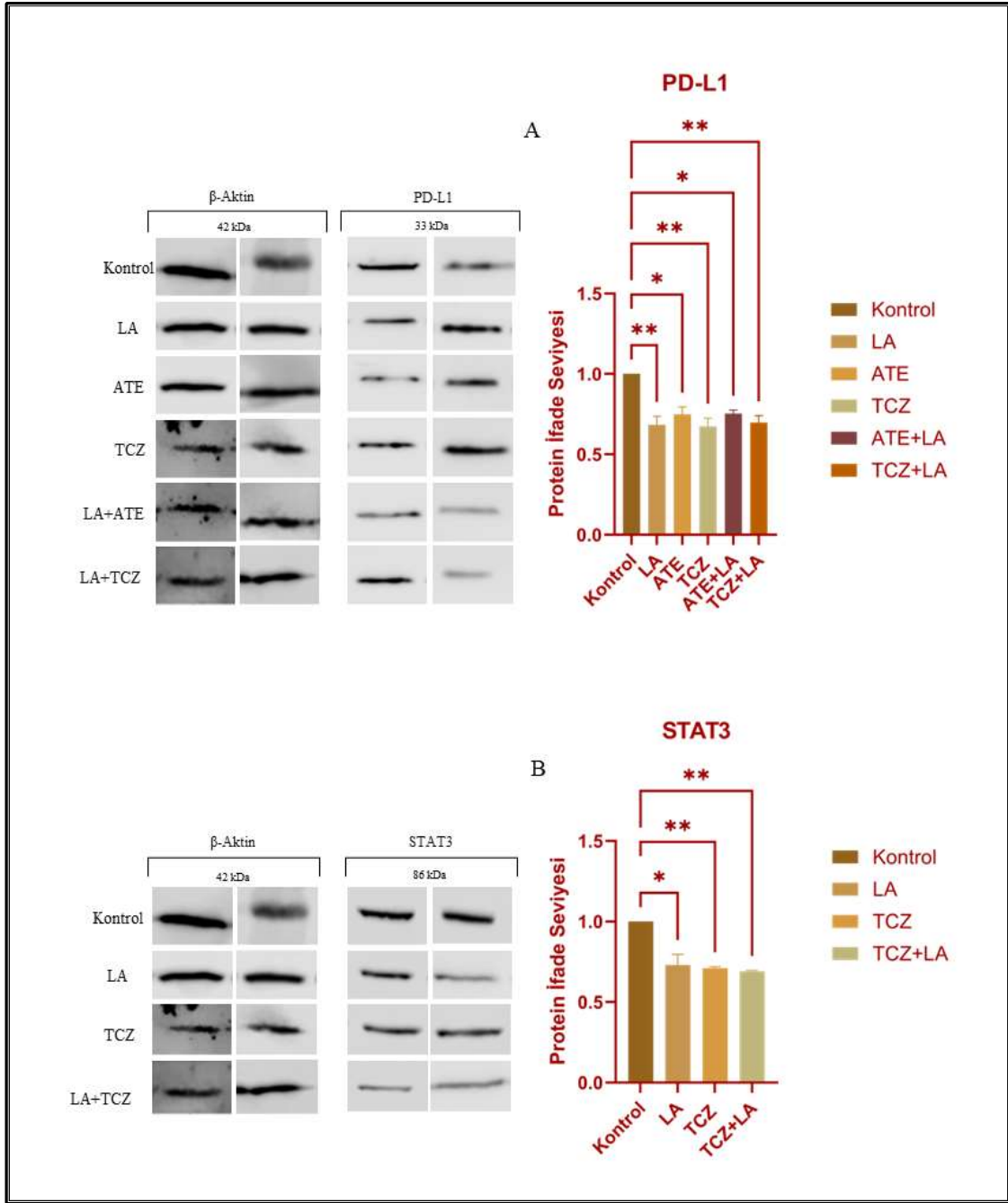
seviyesi en çok azalan gen olarak tespit edilmiştir ($p<0.0001$). STAT3 geninin ifade seviyesindeki düşüşe paralel olarak PD-L1 geninin ifade seviyesinde de azalma tespit edilmiştir. Bu durum, LA ve LA-TCZ kombinasyonunun PD-L1'i STAT3 aracılığı ile baskıladığını ve siRNA uygulanmış örneklerde STAT3 ve PD-L1'in siRNA uygulanmamış örneklerle göre daha fazla baskılandığını göstermektedir.

Özellikle LA-TCZ kombinasyonunun sinerjistik etkisi dikkat çekicidir. Bu kombinasyon, yalnızca LA veya TCZ uygulamalarına kıyasla gen ifade seviyelerinde daha yüksek oranlarda azalma sağlamıştır. Bu bulgular, LA'nın, TCZ ile birlikte kullanıldığında STAT3 yolağını daha etkin bir şekilde baskılayarak PD-L1 inhibisyonunu artırdığını ve böylece kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışını engelleyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu kombinasyon, yumurtalık kanserinde etkili bir tedavi stratejisi olarak potansiyel taşımaktadır.

5.5. LA VE LA-TCZ KOMBİNASYONUNUN IL-6R/STAT3/PD-L1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN PROTEİN BOYUTUNDA BELİRLENMESİ

LA ve LA-TCZ kombinasyonunun IL-6R/STAT3/PD-L1 hedef yolağı üzerinde protein boyutundaki etkinliğini incelemek için, yolakta transkripsiyonda görev alan STAT3 ve immün kontrol noktası olan PD-L1 hedef proteinlerinin ifade seviyesi western blot deneyi ile incelenmiştir. Referans protein olarak β -Aktin kullanılmıştır.

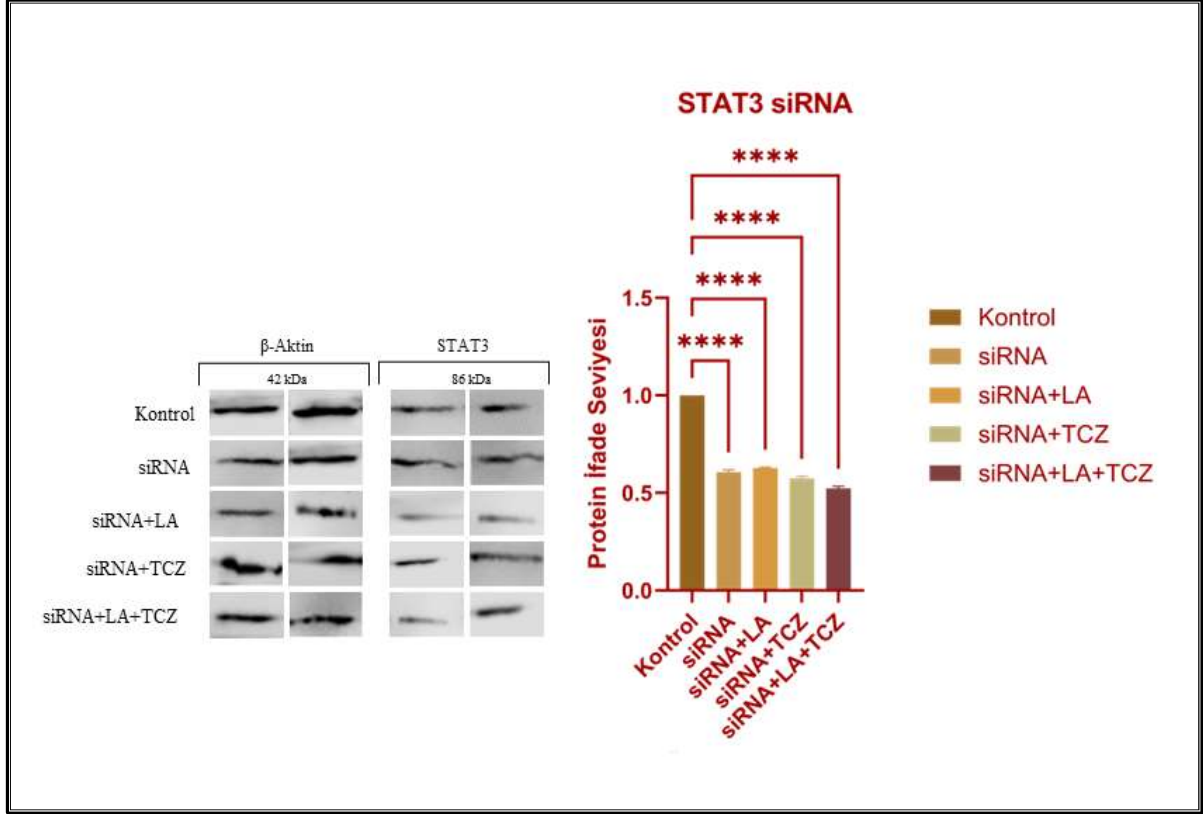
Western blot deneyi sonucunda LA (IC_{50}) uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla PD-L1 proteininin ifade seviyesi 3.1 ($p<0.01$) kat, STAT3 proteininin ifade seviyesi 2.7 ($p<0.05$) kat azalma olduğu belirlenmiştir. ATE, LA-ATE uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla PD-L1 proteininin ifade seviyesi sırası ile 2.5 ($p<0.05$) ve 2.4 ($p<0.05$) kat azalma gözlemlenmiştir. TCZ ve LA-TCZ uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla PD-L1 proteininin ifade seviyesinin her iki grupta da 3 ($p<0.01$), STAT3 proteininin ifade seviyesinin sırası ile 2.9 ($p<0.01$) ve 3.1 ($p<0.01$) kat azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.11.).



Şekil 5.11. Hedef molekül uygulaması sonrası (A) PD-L1, (B) STAT3 protein ekspresyon seviyeleri. Referans protein olarak β -Aktin kullanılmıştır (*p<0.05, **p<0.01).

LA ve LA-TCZ kombinasyonunun STAT3 proteini üzerindeki mekanizmasını incelemek için, OVCAR-3 hücrelerine siRNA ile transfeksiyon yapılarak STAT3 susturulmuş ve ardından etkin konsantrasyonda LA, TCZ ve LA-TCZ kombinasyonu uygulanmıştır. Hedef protein ifade seviyeleri western blot ile incelenmiş ve referans protein olarak yine β -Aktin kullanılmıştır.

Western blot deneyi sonucunda STAT3 hedefli siRNA ile transfekte edilmiş OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla STAT3 proteininin ifade seviyesi 3.9 ($p<0.0001$), siRNA+LA uygulanmış örnek grubunda 3.7 ($p<0.0001$), siRNA+TCZ uygulanmış örnek grubunda 4.2 ($p<0.0001$), siRNA+LA-TCZ uygulanmış örnek grubunda ise 4.7 ($p<0.0001$) kat ifade seviyesinde azalma tesbit edilmiştir.



Şekil 5.12. Hedef molekül uygulaması sonrası STAT3 hedefli siRNA transfekte edilmiş hücrelerde STAT3 protein ekspresyon seviyesi (**** $p<0.0001$).

Deney sonuçları incelendiğinde, LA'nın OVCAR-3 hücrelerinde IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağında etkili kontrol noktası proteini PD-L1'in ifade seviyesini, mAb TCZ ve PD-L1 hedefli bir mAb olan ATE'ye göre daha fazla baskıladığı belirlenmiştir. Bu da LA'nın membran proteini olan PD-L1 üzerindeki direkt etkinliği ile birlikte hücre içi sinyal yollarını kullanarak da PD-L1 protein ifadesini baskılayabildiğini düşündürmektedir. Ayrıca LA-TCZ kombinasyonu uygulanmış OVCAR-3 hücrelerinde hedef yoldaki transkripsiyondan sorumlu STAT3 proteinin ifade seviyesinin moleküllerin tekli uygulandığı gruplardan daha yüksek oranda azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar LA'nın STAT3 protein ifadesini baskılamada TCZ ile sinerjistik etki gösterdiğini ve güçlü bir tedavi hedefi

olduğunu göstermektedir. STAT3 hedefli siRNA ile transfekte edilmiş örneklerde siRNA+LA-TCZ ve siRNA+TCZ gruplarındaki protein ifade seviyesindeki azalma oranının diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular IL-6R'nin TCZ ile hedeflenmesinin STAT3'ün protein ifadesini baskıladığını ve yumurtalık kanserinde STAT3'ün hedeflenmesinin IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağında aktif bir tedavi hedefi olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğuna işaret etmektedir.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Yumurtalık kanseri jinekolojik kanserler arasında en yüksek mortalite gösteren kanser türü olarak, erken teşhisin zorluğu ve spesifik sinyallerin belirlenememesi açısından dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (9). Kanser immünoterapisinde hedefe yönelik tedavi metolarından biri olan doğal kaynaklı küçük molekül inhibitörlerinin temel kullanım amacı, kanser tarafından bastırılmış bağışıklığı yeniden aktif hale getirilmesi ve kanserin bağışıklık kaçış yollarının engellenmesini üzerine odaklanmaktır (160). Küçük moleküllerin düşük molekül ağırlıkları, hücre içi ve hücre dışı mekanizmalara aynı anda etki etme özellikleri, oral yoldan biyoyararlanım sağlama kolaylığı ve daha düşük üretim maliyetleri onları önemli bir tedavi hedefi haline getirmektedir (158,159). Lobarik asit (LA) likenlerden elde edilen ikincil bir metabolit olarak, kanser tedavisinde anti-proliferatif, anti-oksidan ve anti-inflamatuar özellikleri ile önemli bir küçük molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. LA'nın bağışıklık kontrol noktalarından kaçışını sağlayan hedef immün yolların öncülü olan sitokinlerin salgılanmasını engelleyerek T hücre aktivasyonu için potansiyel bir immünoterapi tedavi metodu olarak karşımıza çıkmaktadır (168). Ayrıca küçük moleküllerin mAb'ler ile kombinasyon halinde kullanıldığı tedavi modülleri bir çok klinik çalışma onayı alarak incelenmiş ve bu kombinasyon etkileşimin kanser tedavisinde sinerjistik bir etki gösterdiği belirlenmiştir (174–177).

PD-L1 kanser hücrelerinde ifade edilen ve T hücresindeki PD-1'e bağlanarak kanserli hücrenin bağışıklıktan kaçınmasını sağlayan bir membran proteindir. T hücresinin PD-1 ekspresyonu sebebi ile ortama salınım yaptığı IL-6 sitokinin kanser hücresinden reseptörü (IL-6R) tarafından algılanması, JAK sinyalizasyonuna bununla da STAT3'ün aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bununla da DNA'daki PD-L1 geninin (*CD-274*) promotör bölgesine bağlanan STAT3, PD-L1'in daha kararlı ve dayanıklı bir yapıda eksprese olmasını sağlamaktadır (133). Bununla da PD-1 ile etkileşime giren PD-L1 T hücrelerinin apoptoza uğramasına ve kanserin bağışıklık yanıtını engellemesine sebep olmaktadır. Bu sebeple IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağının hücre içi ve hücre dışı komponentlerinin hedeflenmesi, kanser immünoterapisi için önemli bir tedavi potansiyeli taşımaktadır.

Tez çalışması kapsamında LA'nın hem tek başına hem de tosilizumab ile kombinasyon halinde yumurtalık kanseri immünoterapisinde IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı üzerindeki terapötik etkinliği incelenmiştir.

Güncel literatürde, lobarik asidin yumurtalık kanseri üzerinde anti-proliferatif veya non-invaziv etkisi olduğunu gösteren benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, lobarik asidin farklı kanser türlerindeki anti-proliferatif etkinliği incelenmiştir. 2018 yılında Hong ve ark., lobarik asit ve lobarstin'in anti-kanser özelliklerini incelemiştir. Serviks adenokarsinomu hücre hattı Hela ve insan kolon karsinomu hücre hattı HCT116 üzerinde yürütülen 3-(4,5-Dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) deneyinde lobarik asidin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, LA'nın doksorubisin ile kombinasyonunun anti-proliferatif etkiyi artırdığı rapor edilmiştir (171). Ögmundsdottir ve ark. 2011'de yayınlanan bir çalışmada, LA'nın meme kanseri hücre hatları T-47D ve ZR-75-1, eritro-lösemi hücre hattı K-562, normal deri fibroblastları ve periferik kan lenfositlerinde LA uygulaması sonrasında DNA sentezinin azaldığı tespit edilmiş ve LA'nın maksimum inhibisyonun %50'sini indükleyen doz (ED₅₀) değerinin 14,5 ve 44,7 µg/mL arasında olduğu bildirilmiştir. LA'nın 30 µg/mL üzerindeki konsantrasyonları için yapılan MTS deneyinin sonuçları, molekülün her üç malign hücre hattı üzerinde de ciddi ölümlere sebep olduğunu göstermiştir. LA'nın 30 µg/mL'nin altındaki konsantrasyonlarında normal hücrelerde sitotoksik etki gözlemlenmediği rapor edilmiştir (178). Emsen ve ark. 2018'de yayınladığı bir çalışmada, LA'nın insan glioblastoma multiforme hücreleri U87MG ve primer sıçan serebral korteks hücreleri PRCC üzerinde yüksek düzeyde toksik etki sergilediğini rapor etmiştir. LA'nın IC₅₀ değeri PRCC hücreleri için 9.08 mg/L, U87MG hücreleri için ise 5.77 mg/L olarak belirlenmiştir. LA'nın sitotoksik etkisi sebebiyle PRCC hücrelerinin canlılığı %35.09'a, U87MG hücrelerinin ise %30.47'ye düştüğü bildirilmiştir (172). Haraldsdottir ve ark. 2004 yılında, LA'nın da dahil olduğu lipoksijenaz inhibitörlerinin 12 farklı kanser hücre hattında anti-proliferatif etkisini incelemiştir. Çalışma sonuçlarına göre, LA'nın hücre inhibisyonundaki etkin konsantrasyonu (EC₅₀) Capan1 15.2 ± 3.5, Capan2 34.4 ± 2.5 ve PANC1 35.9 ± 7.7 (pankreas kanseri), T-47D 21.4 ± 9.8 (meme kanseri), PC3 28.0 ± 5.6 (prostat kanseri), NCI-H1417 27.5 ± 3.8 (küçük hücreli akciğer kanseri), AGS 38.5 ± 2.7 (mide kanseri), WiDr 63.9 ± 2.2 (kolorektal kanser), HL60 52.1 ± 9.9 (akut promyelositik lösemi), K-562 19.7 ±

1.2 (eritro-lösemi), JURKAT 35.5 ± 9.4 (T hücreli lösemi) ve OVCAR-3 36.7 ± 10.5 (yumurtalık kanseri) olarak belirlenmiştir (179).

Tez çalışmasında, LA'nın yumurtalık kanseri OVCAR-3 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi incelenmiş ve IC_{50} değeri $11.7 \mu M$ olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tez çalışmasında, LA'nın OVCAR-3 hücrelerinde hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimi üzerindeki etkisi belirlenmiş ve 48. saat dahil olmak üzere non-invaziv etki gösterdiği ve hücre morfolojisi üzerindeki etkileri incelenerek hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, önceki çalışmalarda belirtilen lobarik asidin çeşitli kanser türlerindeki anti-proliferatif etkilerini desteklemekle beraber aynı zamanda LA'nın yumurtalık kanseri hücrelerinin büyümesi, gelişmesi ve metastazında önemli bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir. Bununla beraber, güncel literatürde LA'nın OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisine dikkat çeken tek çalışmada belirtilen hücrelerin %50'sinin proliferasyonunu teşvik ettiği belirlenen değer 36.7 ± 10.5 (179), bizim çalışmamızda bulduğumuz hücresel proliferasyonun %50'sini inhibe eden $11.7 \mu M$ değerinden oldukça yüksek olduğundan LA'nın hücre proliferasyonunu inhibe etme özelliğinin daha güçlü olduğunu göstermektedir. Bu da LA'nın anti-tümör ajan olarak düşük konsantrasyonlarda etkili olacağı potansiyeline işaret etmektedir.

Tez çalışmasında, LA'nın PD-L1 üzerindeki etkilerini detaylı incelemek için PD-L1 hedefli monoklonal antikör olan, FDA tarafından onaylanmış atezolizumab (ATE) kullanılmıştır. Çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılması ve farklı klinik çalışmalarda incelenmesinin yanı sıra, güncel literatürde ATE'nin yumurtalık kanseri üzerindeki etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

2019'da Zhang ve ark. yumurtalık kanseri tedavisinde ATE'nin VEGF hedefli monoklonal antikör olan bevacizumab (BEV) ile kombinasyonunu sundukları bir çalışma yayınladı (180). Bu çalışmada, ATE ve BEV'in, sisplatin dirençli yumurtalık kanseri hücre hattı A2780cis (sisplatin dirençli A2780 hücre hattı) üzerindeki anti-proliferatif etkinliği ve ektin konsantrasyon değeri incelendi. Deneylerde, 10 ve 100 ng/mL ile 1, 5 ve 10 $\mu g/mL$ konsantrasyonları kullanılarak hücre sayma kiti-8 (CCK-8) ile ölçümler yapıldı. Sonuçlara göre, ATE'nin uygun konsantrasyonu 10 $\mu g/mL$ olarak belirlendi ve ATE'nin A2780cis hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre göçünü baskıladığı tespit edildi. Ayrıca, yapılan *in-*

vivo deneylerle de ATE'nin tümör büyümesini engellediği rapor edilmiştir (180). Tez çalışmasında, OVCAR-3 yumurtalık kanseri hücreleri üzerinde ATE'nin IC50 değeri daha detaylı bir yöntem olan xCELLigence RTCA ile, benzer konsantrasyonlar kullanılarak 10.7 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hücre göçü deneyinde, ATE örneklerinin 48. saat de dahil olmak üzere hücre-hücre etkileşimini engellediği tespit edilmiştir. Hem Zhang ve ark. çalışmasında hem de bizim çalışmamızda, ATE'nin yumurtalık kanseri hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkisini ve hücre göçünü baskılama potansiyelini ortaya koymaktadır. Her iki çalışmada da ATE'nin belirli konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu baskıladığı ve hücre göçünü engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca, her iki çalışma da ATE'nin farklı yöntemlerle IC50 değerlerini belirleyerek, etkinliğini doğrulamış ve birbirine çok yakın sonuçlar elde edilmesi ATE'nin düşük konsantrasyonlarda yumurtalık kanseri hücre hatlarının proliferasyonunu etkileyebildiğini desteklemiştir. Literatürdeki örnek çalışmada ATE'nin BEV ile kombinasyon etkisinin sinerjisitesinden bahsedilmiştir. Bu da ATE'nin kombinasyon tedavilerde etkinliğinin potansiyelini belirtmekte olup yüksek lisans tez projesinde LA-ATE kombinasyonunun anti-proliferatif etkisinin tekli ATE uygulamasına göre %40.76 kat daha yüksek olmasını desteklemektedir.

Çalışmamızda odaklandığımız ikinci monoklonal antikor IL-6R hedefleyen tocilizumab (TCZ) olmuştur. Kanser tedavisinde IL-6R'nin blokajı, hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu önleyerek STAT3 fosforilasyonunun engellenmesi yoluyla potansiyel bir tedavi hedefi olarak öne çıkmaktadır. Yousefi ve arkadaşları, 2018 yılında yayınladıkları çalışmada, IL-6/IL-6R yolağının yumurtalık kanserinde önemli bir terapötik hedef olduğunu belirtmiş ve TCZ'nin bu kanser üzerindeki anti-proliferatif etkisine dikkat çekmişlerdir. Çalışmada, karboplatin ile tedavi edilmiş A2780CP, A2780S, SKOV3, OVCAR-3 EOC hücreleri ve metastatik fallop tüpü kitlesi olan CaoV4 hücrelerine TCZ uygulanmış ve 24 ile 48 saat aralığında MTT testi ile anti-proliferatif etki incelenmiştir. Deney sonuçları, A2780 ve SKOV3 hücrelerinde hücre büyümesinin sinerjistik olarak azaldığını, OVCAR-3 hücresinde ise sinerjistik bir değişiklik gözlenmediğini göstermiştir (36). Dijkgraaf ve arkadaşları, 2015 yılında yürüttükleri bir Faz I çalışmada, tekrarlayan EOC hastalarında karboplatin ve doksorubisin ile tedavi edilen hastalarda TCZ'nin IL-6R'yi bloke ederek tedavi yanıtını artırdığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada TCZ'nin 1 mg/kg (0.2 µg/mL), 2 mg/kg (0.4 µg/mL), 4 mg/kg (0.8 µg/mL) ve 8 mg/kg (1.6 µg/mL) konsantrasyonları kullanılmıştır (181). TCZ'nin mevcut tedavi etkisini artırdığına dair bir başka çalışma da

Poschner ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yayınlanmıştır. *In-vitro* olarak yürütülen bu çalışmada, platine dirençli HGSOC hücre hattı 13914_1'in TCZ uygulanmış örnek gruplarında hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı ve hücrelerin yeniden platine hassas hale geldiği bildirilmiştir (182). Literatürde, TCZ'nin farklı kanser türlerinde de anti-proliferatif etkisinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Kudo ve arkadaşları, 2009 yılında yayınladıkları bir çalışmada, IL-6/IL-6R yolağının aşırı ifade edildiği gliomada TCZ'nin U87MG hücre hattı üzerinde anti-kanser etki gösterdiğini doğrulamışlardır (183). Kim ve arkadaşları ise 2015 yılında yayınladıkları bir makalede, TCZ'nin NSCLC üzerindeki anti-proliferatif etkisini incelemişlerdir. 100 ng/mL TCZ ile tedavi edilen H460, A549, H1299 ve H358 hücrelerinde sırasıyla 27.75 ± 5.81 , 34.23 ± 9.49 , 22.14 ± 4.87 ve 10.81 ± 1.94 oranında azalma olduğu rapor edilmiştir (184).

Tez çalışmasında ise TCZ'nin OVCAR-3 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi doğrulanmış ve IC_{50} değeri 0.0216 μ g/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca, TCZ'nin hücre göçü üzerindeki hücre-hücre etkileşimini zamana bağlı olarak baskıladığı ve hücre morfolojisi üzerindeki etkileri incelenerek hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. TCZ'nin kombinasyon tedavilerindeki potansiyeline dair önceki çalışmaları dikkate alarak, çalışmamızda TCZ ile LA kombinasyonu oluşturulmuş ve LA-TCZ kombinasyonunun, tek başına TCZ'ye göre %49.2 daha etkili anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca yine LA-TCZ kombinasyonu hem LA'ya hem de TCZ'ye oranla hücre göçünü daha yüksek oranda baskılamıştır. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki örneğinden (36) farklı olarak OVCAR-3 hücre hattında TCZ'nin anti-proliferatif etkisini doğrulamıştır. Ayrıca yine literatürdeki örnekleri ile karşılaştırıldığında çalışmamızda TCZ'nin çok daha düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda OVCAR-3 yumurtalık kanseri hücre hattı üzerindeki IC_{50} değerinde TCZ uygulanmış yumurtalık normal epitel hücresi OSE'nin morfolojik değişimi incelenmiş ve sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. Bununla da çalışmamızın sonucu TCZ'nin düşük konsantrasyonlarda sitotoksik yan etkilere sebep olmadan anti-tümör etki gösterebileceğine işaret etmektedir. LA-TCZ kombinasyonunun daha yüksek anti-proliferatif etki göstermesi ve hücre göçünü yavaşlatması üzerindeki sinerjistik etkisi, LA-TCZ kombinasyonunu yumurtalık kanseri için önemli bir tedavi hedefi haline getirmektedir.

IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı komponentleri, kanser hücrelerinde farklı mekanizmaları kontrol etmek üzere hem birlikte hem de ayrı ayrı etkileşimlerde bulunabilir. Bu yolak, kanserde inflamatuvar yanıtlar, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, immün yanıtın düzenlenmesi, genomik stabilite bozulması ve epitelyal-mezankimal geçiş gibi birçok biyolojik süreçte kritik rol oynamaktadır.

Wan ve arkadaşları (2021), yaptıkları çalışmada 12 HGSOc hastasından elde ettikleri örneklerle, HGSOc tümör mikroçevresinde T ve NK hücrelerinin yoğunluğunu analiz etmiş ve bu hücrelerin proliferasyonunda azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bağışıklık hücreleri ve tümör hücrelerinde önemli düzeyde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu tespit etmişlerdir (185). Chin ve arkadaşları (2020) ise immünohistokimya (IHC) ve mikrodizin analizleri kullanarak yumurtalık kanseri alt tipleri arasında PD-L1 ekspresyonunu incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma, immünreaktif yumurtalık kanserlerinde genomik ve moleküler alt tiplerde PD-L1 ekspresyonunun belirgin şekilde yüksek olduğunu ortaya koymuştur (131,186). Bu ve benzeri çalışmalar dikkate alındığında PD-L1 potansiyel bir tedavi hedefi olabileceği vurgulanmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda PD-L1'i hedefledik ve yumurtalık kanseri için yumurtalık kanseri için tedavi hedefi olabileceğini ortaya çıkardık.

PD-1/PD-L1 etkileşiminin inhibisyonu için birçok farklı antikor FDA tarafından onaylanmış olmasına rağmen, mAb'lerin yüksek maliyeti, kullanım ve taşıma zorlukları, sadece hücre dışı mekanizmalarla etki etmeleri ve bağışıklık yanıtının işlevsiz kalma riski gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu sebeple de PD-1/PD-L1 hedefli tedavilerde küçük moleküllerin önü açılmıştır (131).

PD-1/PD-L1 etkileşiminin küçük moleküller ile hedeflendiği çalışmalar literatürde yerini almaktadır. Skalniak ve ark. 2017'de yayınladıkları bir çalışma ile Bristol-Myers Squibb (BMS) tarafından üretilen peptit bazlı olmayan küçük moleküllerin JURKAT hücrelerinde PD-1/PD-L1 etkileşimini hedeflediğini bildirmişlerdir. Hedef küçük moleküllerin PD-1 veya PD-L1'e bağlanarak etkileşimi bozduğunu kanıtlamak için 1H-15N HMQC NMR titrasyon deneyi uygulandı. Plazmada çözünebilir serbest sPD-L1 BMS hedef molekülleri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra anti-CD3 ile birlikte endotelyal hücrelere müdahale edilmiştir. Deney sonuçlarına göre, BMS-1001 ve BMS-1166 bileşikler sPD-L1'in

inhibisyon etkisini etkili bir şekilde ortadan kaldırmış ve EC'lerin yeniden stimüle olmasına sebep olmuştur (187). PD-L1 inhibisyonunu hedefleyen doğal küçük moleküllerden usnik asidin rahim ağzı kanseri üzerindeki etkilerini Sun ve ark. 2017 yılında yaptıkları bir çalışma ile bildirmişlerdir. Hela hücrelerine uygulanan usnik asidin hem transkriptom hem de protein seviyesinde PD-L1'in ifadesini baskıladığı gözlemlenmiştir. PD-L1 inhibisyonunun T hücrelerini aktive ettiği ve tümör büyümesini, proliferasyonunu, anjiyogenezini ve hücre göçünü inhibe ettiği rapor edilmiştir (188). Tez çalışması, doğal küçük molekül olan LA ve LA-TCZ kombinasyonunun PD-L1 üzerindeki etkilerini değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışma kapsamında hem LA'nın tek başına hem de LA-TCZ kombinasyonunun PD-L1'in hem transkriptomik hem de proteomik düzeyde ifadesini anlamlı şekilde baskıladığı belirlenmiştir. Çalışmamızda PD-L1 hedefli mAb ATE kullanılmış ve yumurtalık kanserinde PD-L1'in transkriptomik ve protein boyutundaki etkileri incelenmiştir. LA ve LA-TCZ örnek gruplarının sonuçları ATE grubu ile karşılaştırıldığında sonuçlar birbirini desteklemektedir. Bu sonuçlar LA ve LA-TCZ kombinasyonunun PD-L1 spesifik olmamasından kaynaklanarak, hedef moleküllerin PD-L1'i hücre içi sinyal yollarını kullanarak baskıladığını düşündürmektedir. Kullandığımız bu moleküllerin, PD-1/PD-L1 protein bağlanmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. PD-L1 bir membran proteini olduğundan, ATE'nin PD-L1 spesifik bir mAb olmasından ve LA ile ATE arasındaki sinerjistik etkiden kaynaklı olarak PD-1/PD-L1 bağlanmasını en yüksek düzeyde 25 µg/mL protein konsantrasyonunda %99.45 kat LA-ATE grubunda baskılamıştır. Bununla beraber hem LA, hem TCZ hem de LA-TCZ gruplarında PD-1/PD-L1 protein bağlanmasının 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 µg/mL konsantrasyonları için sırası ile LA örnekleri için, %64.11 (p<0,0001), %76.03 (p<0,0001), %76.41 (p<0,0001), %74.85 (p<0,0001), %62.17 (p<0,0001), %56.87 (p<0,0001), %59.20 (p<0,0001) oranında, TCZ örnekleri için %31.01, %38.20, %38.90, %38.33, %31.07, %25.61 (p<0.05), %26.44 (p<0.05) oranında, LA-TCZ örnekleri için %71.37 (p<0,0001), %88.62 (p<0,0001), %88.14 (p<0,0001), %87.88 (p<0,0001), %72.75 (p<0,0001), %67.51 (p<0,0001), %68.32 (p<0,0001) oranında baskılandığının gözlemlenmesi, bu moleküllerin hücre içi sinyal yollarını kullanarak PD-L1 membran proteininin ifadesini azalttığına işaret etmektedir. Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, LA ve LA-TCZ kombinasyonunun PD-L1 üzerindeki inhibe edici etkilerini vurgulamaktadır. Ayrıca çalışmamızın sonuçları literatürdeki çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermekte ve desteklenmektedir. Bu bulgular, PD-1/PD-L1

etkileşiminin hedeflenmesi üzerine yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi potansiyeli taşımakta ve LA ve LA-TCZ kombinasyonunun yumurtalık kanserinde PD-L1'i hedeflemek için uygun bir tedavi metodu olduğunu göstermektedir.

PD-L1'in daha kararlı bir yapıda ve daha fazla eksprese olmasında, uygun genin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonu indükleyen STAT3 önemli bir rol oynamaktadır (26). Bununla beraber STAT3 aynı zamanda kanser hücrelerinde hücre büyümesinde, çoğalmasında ve hayatta kalmasında görev almaktadır (189). Bu sebeple STAT3 kanser araştırmaları için önemli bir hedef haline gelmektedir.

Birçok kanserde, PD-L1 inhibisyonunun STAT3 ifadesinin baskılanması ile olan ilişkisi, literatürde farklı çalışmalar ile vurgulanmıştır. Xie ve ark. 2021 yılında NSCLC'de küçük molekülü kinaz inhibitörü apatinib ile VEGFR2/STAT3/PD-L1 ve ROS/Nrf2/p62 yollarını hedefleyerek apoptoz ve otofajiyi indüklemeyi hedefledikleri bir çalışmayı yayınlamışlardır. Apatinib uygulanmış NSCLC hücrelerinde fosforile olmuş STAT3'ün protein seviyesinde kontrole kıyasla azalma olduğu belirlenmiştir. STAT3 baskılanması sonrasında c-MYC ve PD-L1 ifade seviyeleri incelenmiş ve hedeflerin protein seviyelerinde düşüş olduğu belirlenmiştir (190,191). Tong ve ark. 2020 yılında yayınladığı bir çalışma ile STAT3 fosforilasyonunun PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisini detaylı bir şekilde glioblastomada incelemişlerdir. Bir "yetim ilaç" olan ve FDA tarafından glioblastoma tedavisi için onaylanan ACT001 uygulanmış hücrelerde PD-L1 ifadesi mRNA boyutunda incelenmiş ve ifade seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda tedavi uygulanmış örneklerde STAT3 ve fosforile olmuş STAT3 ifadesinin de anlamlı ölçekte baskılandığı belirlenmiştir. Bundan sonra PD-L1 seviyesi protein boyutunda incelenmiş ve kontrol grubuna göre protein ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla da ACT001'in STAT3 fosforilasyonunu inhibe etmesinin PD-L1 ekspresyonunu baskılama potansiyeline sahip olduğu vurgulanmıştır. Bunun kanıtlanması için çalışma kapsamında kromatin immünopresipitasyonu ve ikili lusiferaz raportör analizleri kullanılmıştır. Deney sonuçları fosforile olmuş STAT3'ün PD-L1'e ait genin promotörüne bağlandığını ve PD-L1 ekspresyonunu desteklediğini doğrulamıştır (191). Yumurtalık kanserinde STAT3 inhibisyonunun PD-L1 ekspresyonunu etkilediğini gösteren bir çalışma Ding ve ark. tarafından 2020'de yayınlanmıştır. Anti-anjiyogenez inhibitörü olan endostar ile tedavi edilen SKOV3 ve HO-8910PM hücrelerinde transkriptomik ve proteom boyutunda STAT3

ifadesinin baskılandığı, buna bağlı olarak da yine aynı testlerle PD-L1 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (192). Fezza ve ark. 2023 yılında yayınladığı başka bir çalışma yine yumurtalık kanserinde STAT3/PD-L1 ilişkisine dikkat çekmektedir. Çalışma STAT3 ve PD-L1 ile birlikte aynı zamanda, antitümör yanıtın engellenmesinde görev alan majör histoyu uyumluluk kompleksi-1'in anahtar transkripsiyonel aktivatörü 5 (NLRC5) ve immün baskılayıcı ısı şoku proteini HSP27 üzerine de odaklanmaktadır. HSP27'nin kanser ortamındaki ifadesi ile PD-L1 ve NLRC5 ifadesinde artış gözlemlenmiştir. HSP27'nin siRNA ile susturulduğu yumurtalık kanseri hücre örnekleri tekrardan mRNA ve protein boyutunda incelendikte ise PD-L1 ve NLRC5 ifadelerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmemiştir. Daha sonra STAT3'ün farmakolojik inhibitörü olan STAT3iC uygulanmıştır. HSP27 ve STAT3'ün aynı anda inhibe edilmesi PD-L1 ve NLRC5 ifadelerinde anlamlı düşüş gerçekleşmesine sebep olduğu rapor edilmiştir (193).

Çalışmamızda yumurtalık kanserinde PD-L1 ekspresyonu ve inhibisyonunda STAT3'ün rolünü incelemek ve ayrıca LA'nın PD-L1'i STAT3 aracılığı ile hücre içi sinyal yollarını kullanarak nasıl etkilediğini belirlemek için STAT3 hedefli siRNA transfeksiyonu gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz verilere göre siRNA transfekte edilmiş ve daha sonra LA, TCZ, LA-TCZ uygulanmış örnek gruplarında transkriptomik boyutta sırası ile 20.464 ($p<0.0001$), 19.698 ($p<0.0001$) ve 29.007 ($p<0.0001$) kat PD-L1'in ve transkriptomik boyutta sırası ile 31.017 ($p<0.0001$), 36.504 ($p<0.0001$), 45.412 ($p<0.0001$) kat, protein boyutunda sırası ile 3.7 ($p<0.0001$), 4.2 ($p<0.0001$), 4.7 ($p<0.0001$) kat STAT3'ün ifade seviyesinin baskılandığı tespit edilmiştir. siRNA transfekte edilmeden hedef moleküllerin uygulandığı örneklerle (LA: 8.058 kat) kıyasla, transfekte örneklerde (siRNA+LA: 20.464 kat) PD-L1 (CD-274) geninin ifadesinin daha fazla baskılanmış olması HGSOc hücre hattı OVCAR-3'de PD-L1'in ekspresyonunda STAT3'ün rolüne dikkat çekmektedir. Ayrıca bu sonuçlar LA'nın PD-L1'i hücre içi STAT3 hücre içi sinyal yolağını kullanarak etkileyebildiğini göstermektedir.

Klinikte kullanım için onaylanmış küçük moleküllü STAT3 inhibitörü henüz bulunmasa da, bir çok doğal ve kimyasal küçük molekül STAT3 inhibisyonu üzerindeki etkileri için pre-klinik ve klinik çalışmalarda incelenmektedir (194). Kriptotanshinon, toosendanin ve oridonin gibi doğal kaynaklı küçük moleküllerin STAT3 inhibitörü potansiyeli taşıdığı bilinmektedir (195).

Jung ve ark. yayınladıkları çalışmalarının birinde doğal bir bileşik olan kafeik asit ve onun sentetik türevi olan [3-(3,4-dihidroksi-fenil)-akrilik asit 2-(3,4-dihidroksi-fenil)-etil ester]'in STAT3 inhibisyonundaki rolünü bildirmişlerdir. Moleküllerin STAT3 aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiğini ve STAT3'ün çekirdeğe translokasyonunu engellediğini rapor etmişlerdir (196). Li ve ark. 2015 yılında doğal kaynaklı küçük molekül kriptotanshinonun kolorektal kanserde STAT3 apoptoz üzerindeki etkisini inceledikleri bir çalışma yayınlamışlardır. Kriptotanshinon ile müdahale edilen HCT116 ve SW480 hücre örnekleri ile western blot deneyi yapılmış ve fosforile olmuş STAT3 seviyesinin anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir (197). Daha önce yukarda bahsettiğimiz Sun ve ark. 2017'de Hela hücreleri üzerinde doğal kaynaklı küçük molekül olan usnik asitin etkilerini incelediği çalışmada, hedef molekülün STAT3 fosforilasyonunda ve nükleer translokasyonundaki etkileri incelenmiştir. Western blot analizi sonuçları ile STAT3'ün ifadesinin azaldığı, immüno Floresan analizi sonuçları ile de usnik asitin STAT3 fosforilasyonunu ve nükleer translokasyonunu engellediği gözlemlenmiştir (188). Bununla beraber, Wan ve ark. 2015'de yayınladıkları çalışmada, tümörle ilişkili makrofajlar tarafından indüklenen fosfo-STAT3'ün TCZ uygulaması sonrasında mRNA ve protein boyutunda inhibe olduğu rapor edilmiş (198) ve STAT3'ün TCZ ile hedeflenebildiğini göstermişlerdir.

Yumurtalık kanserinde LA ve LA-TCZ kombinasyonunun STAT3 ekspresyonu üzerine etkilerini araştıran çalışmamız literatürdeki ilk örnektir. Deneysel sonuçlarımız, hem hedef molekülün hem de kombinasyonun STAT3'ü transkriptomik (LA 3.89, LA-ATE 5.181, LA-TCZ 7.5 kat) ve proteomik (LA 2.7, LA-TCZ 3.1 kat) seviyelerde önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Bu da PD-L1 ekspresyonundaki rolü ile yanaşı bir çok hücre içi yolda görev alan ve kanser gelişiminde etkili STAT3'ün hedeflenmesi için LA ve LA-TCZ kombinasyonunu stratejik bir tedavi modeli haline getirmektedir. STAT3 hedefli siRNA transfeksiyonunun (LA 31.017, LA-TCZ 45.412 kat) ardından LA ve LA-TCZ kombinasyonunun uygulanması, STAT3 ekspresyonunu transfekte olmayan örnekler (LA 3.89, LA-TCZ 7.5 kat) ile kıyasla daha yüksek düzeyde baskılamıştır. Bu bulgular, tekli siRNA transfekte örneklerle (27.569 (p<0.0001) karşılaştırıldığında LA ve LA-TCZ kombinasyonunun, STAT3 ifadesini önemli düzeyde hedeflediğine işaret etmektedir. Ayrıca çalışmamızın sonuçları, literatürde STAT3'ün hem doğal küçük moleküller hem de TCZ ile hedeflenebileceğine dair çalışmaları desteklemektedir. LA-TCZ kombinasyonun STAT3

ifadesini baskılamadaki sinerjistik etkinliği bu kombinasyonun yumurtalık kanserinde STAT3 hedefli tedaviler için önemli potansiyelinin olduğunu vurgulamaktadır.

Uyaranlara tepki olarak çeşitli ligandlar tarafından indüklenen tirozin ve serin kalıntılarının fosforilasyonu, STAT3'ün aktivasyonunu sağlar ve ardından protein dimerizasyonu ile nükleer translokasyonunu gerçekleştirir. Bu ligandlar arasında JAK'lar, tirozin kinazlar, SRC ve sitokinler yer almaktadır (26). Proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkileri olan sitokinlerden biri olan IL-6, hedef hücredeki IL-6 reseptörü aracılığıyla algılanarak JAK/STAT3 gibi birçok sinyal yolunun başlatılmasında rol oynar (146). Özellikle EOC hastalarında yüksek IL-6 ve IL-6R ifadesi tespit edilmiş ve bu durum kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (36). Bu nedenle IL-6R/STAT3 sinyal yolu, kanser tedavisi için önemli bir hedef haline gelmektedir. Bharti ve ark. (2015) IL-6/IL-6R yolunun, meme kanserinde sentetik bir küçük molekül olan diacerein tarafından inhibisyonunu incelemiştir. MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücreleri hem IL-6R hedefli siRNA hem de diacerein ile tedavi edilmiş ve her iki durumda da kontrol grubuna göre anlamlı oranda IL-6R ifadesi baskılanmıştır. Bu hücre hatlarında IL-6R inhibisyonuna bağlı olarak STAT3, MAPK ve Akt protein seviyelerinde düşüş gözlemlenmiştir. Diaserin tedavisi uygulanmış hücrelere boş vektör ve IL-6R aşırı ekspresyon plazmidi transfekte edilmiştir. Deney sonuçları, diacerein'in hem IL-6R ekspresyonunu hem de buna bağlı olarak STAT3, MAPK ve Akt ifadesini inhibe ettiğini doğrulamıştır. Ayrıca, rekombinant IL-6'ya maruz bırakılmış hücrelerin diacerein ile tedavisi benzer sonuçlar göstermiş ve JAK/STAT3 fosforilasyonunu, STAT3'ün nükleer translokasyonunu ve MAPK ifadesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. İmmünohistokimya analizleri de bu bulguları desteklemiş ve IL-6/IL-6R inhibisyonunun STAT3, MAPK ve Akt fosforilasyon seviyelerinde azalmaya yol açtığını göstermiştir (199).

Yanaihara ve ark. (2015) çalışmalarında IL-6/IL-6R inhibisyonunun, yumurtalık kanseri alt türü olan CCC'de antitümör etkilerini incelemiştir. IL-6R'nin siRNA ile baskılandığı gruplarda, kontrol gruplarına göre hücre invazyon yeteneğinin önemli ölçüde azaldığı ve IL-6R susturulmasına bağlı olarak STAT3 inaktivasyonu sebebiyle hücrelerin sitotoksik strese daha duyarlı hale geldiği rapor edilmiştir. Ayrıca, IL-6R hedefli monoklonal antikör (mAb) olan TCZ ile tedavi edilmiş hücre gruplarında da hücre çoğalması ve invazyon yeteneği önemli ölçüde azalmış ve fosforile STAT3 ifadesinde düşüş gözlemlenmiştir (200).

Cao ve ark. (2021) doğal bir molekül olan kurkuminin hepatoselüler karsinomda IL-6R/STAT3 yolu üzerindeki etkilerini araştırmıştır. HepG2 hücresi taşıyan fareler üzerinde yapılan çalışmada kurkuminin, IL-6/STAT3 sinyalini inhibe ederek inflamasyonu ve epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) azalttığı ve N-cadherin, fosforile JAK ve STAT3 ekspresyonunu düşürdüğü gözlemlenmiştir. HepG2TCE hücrelerinde STAT3 ve fosforile STAT3 ekspresyonu western blot analizi ile incelenmiş ve kurkumin uygulanmış örneklerde IL-6R α /STAT3'ün inhibe edildiği gözlemlenmiştir (201).

Al Haq ve ark. (2024) yayınladıkları in-vivo çalışmada, TNBC'de IL-6R ve PD-L1'in birlikte hedeflenmesinin önemini vurgulamıştır. Çalışma sonuçları, IL-6R ve PD-L1'in birlikte hedeflenmesinin, monoterapiye kıyasla TNBC'de hücre canlılığı ve M2 makrofaj aktivitesini daha büyük ölçüde azalttığını göstermiştir. PD-L1 ve IL-6R'nin ardışık olarak hedeflenmesinin hücre canlılığı ve metastaz üzerinde önemli etkileri olduğu vurgulanmıştır (202).

Çalışmamız, LA ve LA-TCZ kombinasyonu ile yumurtalık kanserinde IL-6R ve IL-6R'nin STAT3 ve PD-L1 ile ilişkisini hedefleyen literatürdeki ilk çalışmadır. Bulgularımıza göre, hem LA hem de LA-TCZ uygulaması sonrasında IL-6R'nin gen ifadesi anlamlı düzeyde sırası ile 11.21 ($p<0,05$), 19.293 ($p<0,01$) baskılanmıştır. Özellikle, LA-TCZ kombinasyonunun uygulandığı örneklerde IL-6R geninin ifade seviyesi, tekli moleküllerin (TCZ 10.068 ($p<0,01$) kat) uygulandığı örneklerle göre daha fazla baskılanmıştır. LA ve LA-TCZ uygulanmış örneklerde, IL-6R ifadesindeki düşüşe paralel olarak, IL-6R tarafından indüklenen JAK1 (LA 7.152 ($p<0,0001$), LA-TCZ 9.629 ($p<0,0001$) kat) ve JAK2'nin (LA 6.936 ($p<0,001$), LA-TCZ 8.230 ($p<0,001$) kat), JAK ifadesine bağlı olarak indüklenen STAT1 (LA 4.322 ($p<0,001$), LA-TCZ 5.364 ($p<0,001$) kat) ve STAT3'ün (LA 3.89 ($p<0,01$), LA-TCZ 7.499 ($p<0,01$) kat) ve bunlara paralel olarak PD-L1'in (LA 8.058 ($p<0,0001$), LA-TCZ 13.969 ($p<0,0001$) kat) gen seviyelerinde de azalma gözlemlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar LA'nın hücre içi sinyal yollarını kullanarak IL-6R ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. LA-TCZ kombinasyonunun daha efektif sonuçlar göstermesi LA'nın hücre içinde aktif etki gösterirken TCZ'nin de membran proteini olan IL-6R'e bağlanarak birlikte kombine etki gösterebildiklerini düşündürmektedir. Aynı zamanda IL-6R'nin LA ile hedeflenmesi bu membran proteininin doğal kaynaklı küçük moleküller ile hedeflenebileceğine dair literatür çalışmalarını desteklemektedir. STAT3

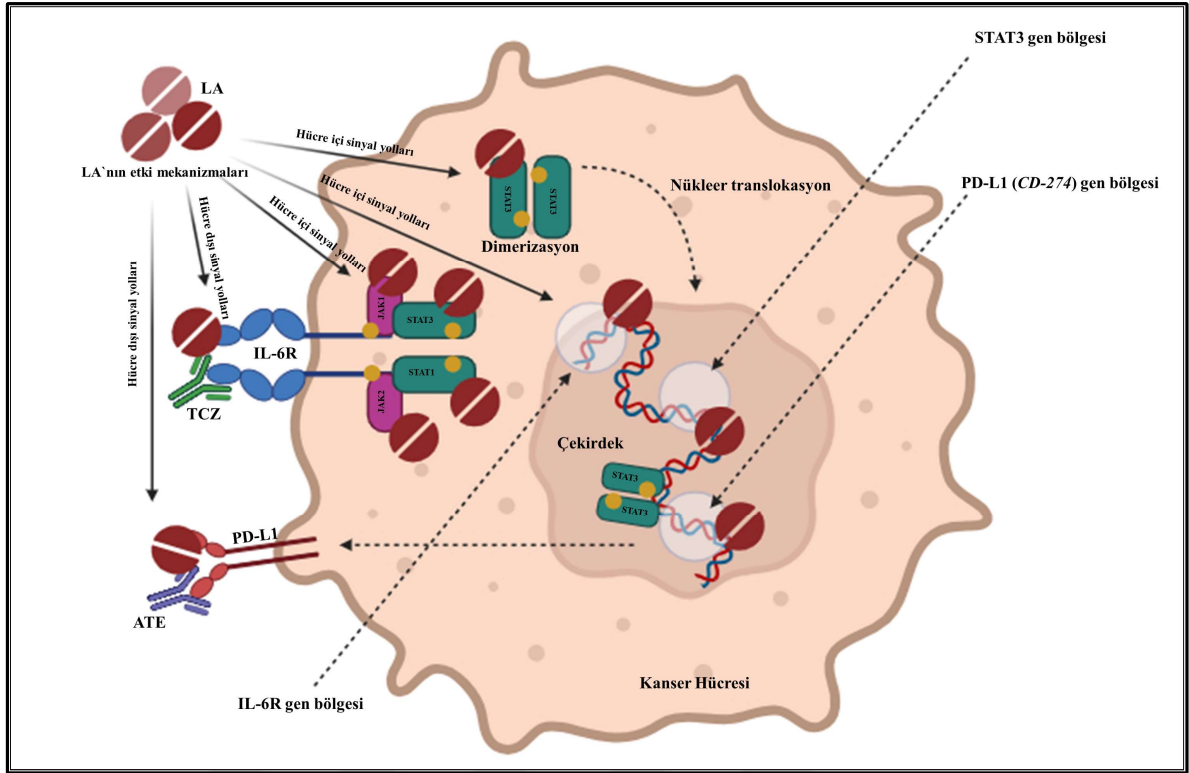
hedefli siRNA uygulaması sonrasında, uygulanan hedef moleküller ve kombinasyon, STAT3 seviyesinin tekli siRNA uygulamasına kıyasla hem transkriptom hem de proteomik düzeyinde daha fazla inhibe edildiğini göstermiş ve transfekte olmayan örnek gruplarının sonuçlarını doğrulamıştır. IL-6R hedefli bir mAb'ın STAT3  zerindeki etkinliinin bu düzeyde yüksek olması, STAT3' n TCZ ile hedeflenebileceğine ve yumurtalık kanserinde IL-6R ve STAT3 arasındaki bu bağlantının önemli bir tedavi hedefi olabileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar literatürdeki benzerleri ile örtüşmektedir. LA-TCZ ve TCZ uygulanan örneklerde PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşiminin baskılandığı tespit edilmiştir. Bununla da IL-6R inhibisyonunun PD-L1 inhibisyonundaki etkinliği değerlendirilmektedir. Bu sonuç, IL-6R'nin yokluğunda PD-L1 ekspresyonunu destekleyen diğer yolakların yeterince etkili olmadığını ve IL-6R'nin PD-L1 düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda IL-6R hedefli mAb TCZ uygulaması sonrasında PD-L1 ifade seviyelerindeki düşüş IL-6R ve PD-L1'in yumurtalık kanserinde birlikte hedeflenerek stratejik bir tedavi modeli oluşturulabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuçlar, yumurtalık kanserinde IL-6R'nin hedeflenmesinin, STAT3 ve PD-L1 için önemli bir tedavi potansiyeli taşıdığını ortaya koymakta ve LA-TCZ kombinasyonunun sinerjistik etkisini vurgulamaktadır.

6.2. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında hedef doğal kaynaklı küçük molekül olan lobarik asidin (LA) yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri üzerindeki anti-proliferatif ve non-invaziv etkileri, ve HGSOc'de IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma kapsamında yürütülen deney sonuçlarına göre LA OVCAR-3 hücre hattı üzerinde düşük konsantrasyonlarda önemli ölçüde anti-proliferatif etkiye sahiptir. Hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimleri üzerinde zamana bağlı olarak non-invaziv etki ve HGSOc hücre hattı OVCAR-3 morfolojisi üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. Bununla birlikte, LA'nın yumurtalık normal epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiş olması, onu HGSOc tedavisinde önemli bir anti-tümör tedavi hedefi haline getirmektedir.

Ayrıca, PD-L1 hedefli monoklonal antikor (mAb) atezolizumab (ATE) ve IL-6R hedefli mAb tosilizumab (TCZ) kullanılarak OVCAR-3 hücre hattında yapılan sitotoksisite çalışmaları, bu mAb'lerin hücre canlılığını ve büyümesini inhibe ettiğini ortaya koymuştur. LA'nın hem ATE hem de TCZ ile kombinasyonları kanser hücrelerinin anti-proliferasyonu ve non-invaziv etkisi üzerinde tekli moleküllere göre daha fazla etki göstermiş, bununla da LA'nın ATE ve TCZ'nin anti-tümör özellikleri üzerinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

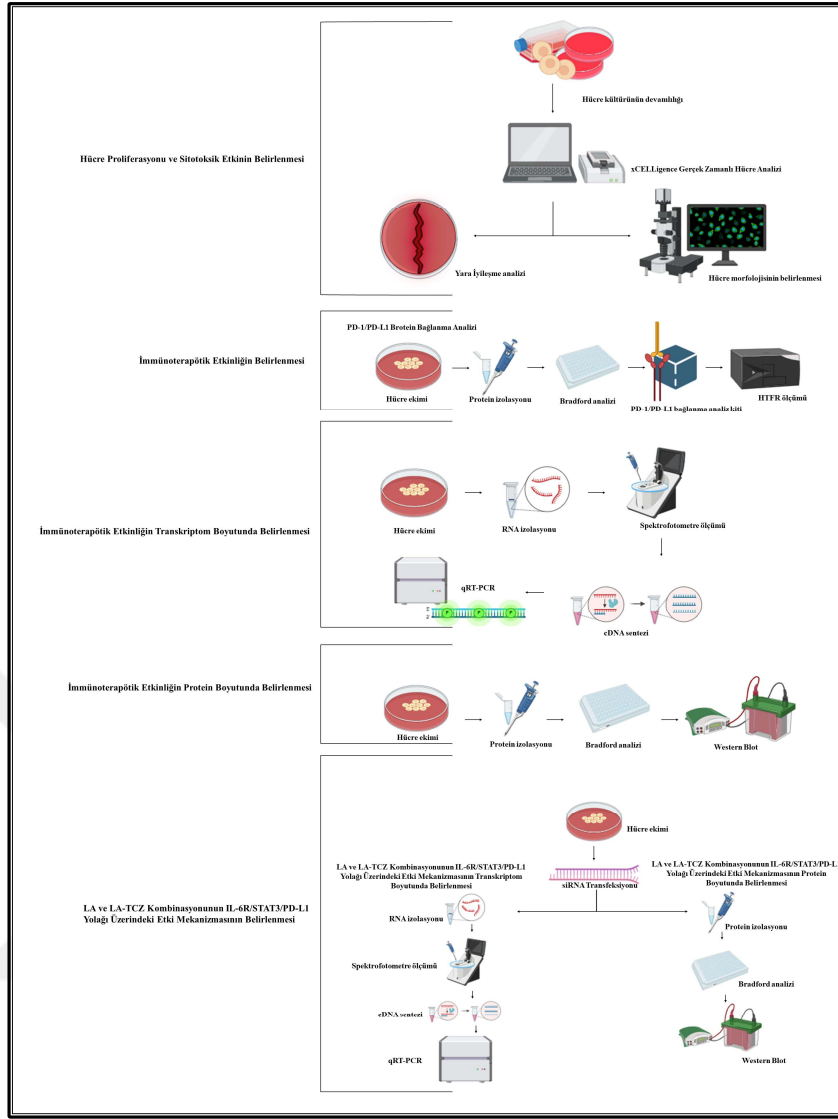
LA, ATE, TCZ, LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının OVCAR-3 hücrelerinde IL-6R/STAT3/PD-L1 sinyal yolağı aktivasyonunu inhibe ederek kanserin immün yanıtını engelleyen PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşimini başarılı bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. LA hücre içi ve hücre dışı sinyal yollarını kullanarak PD-L1 membran proteinini ifadesini baskılamış, bununla da PD-1/PD-L1 protein bağlanmasını ATE ve TCZ'ye göre daha fazla engellemiştir. LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonları tekli molekül uygulamalarına göre daha etkili sonuçlar göstermiştir. Bununla da LA'nın ATE ve TCZ'nin PD-1/PD-L1 protein bağlanma etkileşimi üzerinde sinerjistik etkisi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6.1. LA'nın IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağı üzerindeki etki mekanizması.

Hedef moleküller IL-6R/STAT3/PD-L1 yolağını hem mRNA hem de protein düzeyinde baskılamıştır. LA-ATE ve LA-TCZ kombinasyonlarının etkinlikleri tekli örneklerle göre daha fazla gözlemlenmiş ve sinerjistik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca HGSOc'de LA, TCZ ve LA-TCZ kombinasyonunun PD-L1'i IL-6R/STAT3 yolunu kullanarak hedeflediği ve TCZ'nin HGSOc'de STAT3 için potansiyel tedavi hedefi olduğu siRNA transfeksiyonu ile, transkriptomik ve protein boyutunda belirlenmiştir. Bununla da özellikle LA'nın PD-L1'i IL-6R/STAT3 yolağı üzerinden hedeflediği doğrulanmıştır. siRNA uygulaması sonrasında LA, TCZ ve LA-TCZ kombinasyonu sinerjistik olarak hedef yolağın inhibisyonunu artırmıştır. Bununla da LA'nın önemli sinerjistik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, LA ve LA-TCZ kombinasyonunun yumurtalık kanserinde IL-6R/STAT3/PD-L1 yollarını baskılayarak antiproliferatif etki gösterdiği ve sinerjistik etkiye sahip olduğu hücresel ve moleküler düzeyde gösterilmiştir. Bu çalışma, LA ve LA-TCZ kombinasyonunun yumurtalık kanserinde IL-6R/STAT3/PD-L1 yolları üzerindeki etkinliğini gösteren ilk çalışma olup, LA'nın yumurtalık kanseri immünoterapisinde potansiyel bir ilaç adayı olabileceğini *in-vitro* olarak sunmaktadır.



Şekil 6.2. Grafik özet

KAYNAKLAR

1. Mysterud I. Biology as ideology: The doctrine of DNA. *Journal of Social and Evolutionary Systems*. 1994 Jan;17(4):465–70.
2. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. Vol. 93, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015.
3. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. Vol. 53, *Indian Journal of Cancer*. 2016.
4. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4).
5. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73(1).
6. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024 Jan 17;74(1):12–49.
7. Sedeta E, Sung H, Laversanne M, Bray F, Jemal A. Recent Mortality Patterns and Time Trends for the Major Cancers in 47 Countries Worldwide. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2023;32(7).
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3).
9. Zhang R, Siu MKY, Ngan HYS, Chan KKL. Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. 2022.
10. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. Vol. 35, *Seminars in Oncology Nursing*. 2019.

11. Köbel M, Kang EY. The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification. Vol. 14, *Cancers*. 2022.
12. Penny SM. Ovarian Cancer: An Overview. *Radiol Technol*. 2020 Jul;91(6):561–75.
13. Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. Vol. 32, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2018.
14. Al-Harazi O, Al Insaif S, Al-Ajlan MA, Kaya N, Dzimir N, Colak D. Integrated Genomic and Network-Based Analyses of Complex Diseases and Human Disease Network. Vol. 43, *Journal of Genetics and Genomics*. 2016.
15. Siminiak N, Czepczyński R, Zaborowski MP, Iżycki D. Immunotherapy in Ovarian Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2022 Dec 9;70(1):19.
16. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs*. 2019 Oct;35(5):150923.
17. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Cancer immunotherapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009 Aug 3;46(4):167–89.
18. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*. 2020 Aug 1;17(8):807–21.
19. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Mar 8;18(3):175–96.
20. Huck BR, Kötzner L, Urbahns K. Small Molecules Drive Big Improvements in Immuno-Oncology Therapies. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018 Apr 9;57(16):4412–28.
21. Kötzner L, Huck B, Garg S, Urbahns K. Small molecules—Giant leaps for immuno-oncology. In: *Progress in Medicinal Chemistry*. 2020.
22. van der Zanden SY, Luimstra JJ, Neefjes J, Borst J, Ovaa H. Opportunities for Small Molecules in Cancer Immunotherapy. Vol. 41, *Trends in Immunology*. 2020.

23. Szeto GL, Finley SD. Integrative Approaches to Cancer Immunotherapy. Vol. 5, Trends in Cancer. 2019.
24. Morand S, Devanaboyina M, Staats H, Stanbery L, Nemunaitis J. Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. 2021.
25. Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. Vol. 76, Molecular Cell. 2019.
26. Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting stat3 in cancer immunotherapy. Mol Cancer. 2020;19(1).
27. Xu J, Lin H, Wu G, Zhu M, Li M. IL-6/STAT3 Is a Promising Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. Vol. 11, Frontiers in Oncology. 2021.
28. Bergman PJ. Cancer Immunotherapies. Vol. 49, Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice. 2019.
29. Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, et al. B7-H3: An attractive target for antibody-based immunotherapy. Vol. 27, Clinical Cancer Research. 2021.
30. Igarashi Y, Sasada T. Cancer Vaccines: Toward the Next Breakthrough in Cancer Immunotherapy. Vol. 2020, Journal of Immunology Research. 2020.
31. Lee HW, Kim J, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Anti-Inflammatory Activity of Lobaric Acid via Suppressing NF- κ B/MAPK Pathways or NLRP3 Inflammasome Activation. Planta Med. 2019;85(4).
32. Carpentier C, Barbeau X, Azelmat J, Vaillancourt K, Grenier D, Lagüe P, et al. Lobaric acid and pseudodepsidones inhibit NF- κ B signaling pathway by activation of PPAR- γ . Bioorg Med Chem. 2018;26(22).
33. Chen S, Song Z, Zhang A. Small-Molecule Immuno-Oncology Therapy: Advances, Challenges and New Directions. Curr Top Med Chem. 2019 Mar 28;19(3):180–5.

34. Kotch C, Barrett D, Teachey DT. Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Aug 3;15(8):813–22.
35. Hong C, Schubert M, Tijhuis AE, Requesens M, Roorda M, van den Brink A, et al. cGAS–STING drives the IL-6-dependent survival of chromosomally instable cancers. *Nature*. 2022 Jul 14;607(7918):366–73.
36. Yousefi H, Momeny M, Ghaffari SH, Parsanejad N, Poursheikhani A, Javadikooshesh S, et al. IL-6/IL-6R pathway is a therapeutic target in chemoresistant ovarian cancer. *Tumori Journal*. 2019 Feb 19;105(1):84–91.
37. N Kontomanolis E, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Kalagasidou S, Pagkalos A, et al. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. *J BUON*. 2021;26(5):1723–34.
38. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. In: *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*. Basel: Birkhäuser Basel; 2006. p. 321–49.
39. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;51(6):2647–93.
40. KONTOMANOLIS EN, KOUTRAS A, SYLLAIOS A, SCHIZAS D, MASTORAKI A, GARMPIS N, et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. 2020 Nov 27;40(11):6009–15.
41. Peters JM, Gonzalez FJ. The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*. 2018 Oct 1;165(2):272–6.
42. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019 Apr 1;99(2):1047–78.

43. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol*. 2021 Mar 18;15(3):790–800.
44. Singh N, Baby D, Rajguru J, Patil P, Thakkannavar S, Pujari V. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121.
45. Vitorino JD, Costa PM. After a Century of Research into Environmental Mutagens and Carcinogens, Where Do We Stand? *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Jan 6;20(2):1040.
46. Barrett JC, Shelby MD. Mechanisms of human carcinogens. *Prog Clin Biol Res*. 1992;374:415–34.
47. Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol*. 2016 Feb 30;34(2):155–63.
48. Samuel D, Diaz-Barbe A, Pinto A, Schlumbrecht M, George S. Hereditary Ovarian Carcinoma: Cancer Pathogenesis Looking beyond BRCA1 and BRCA2. *Cells*. 2022 Feb 4;11(3):539.
49. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *The Lancet*. 2019 Mar;393(10177):1240–53.
50. Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jul 17;69(4):280–304.
51. Kandalaft LE, Dangaj Laniti D, Coukos G. Immunobiology of high-grade serous ovarian cancer: lessons for clinical translation. *Nat Rev Cancer*. 2022 Nov 15;22(11):640–56.
52. Sambasivan S. Epithelial ovarian cancer: Review article. *Cancer Treat Res Commun*. 2022;33:100629.

53. Babaier A, Mal H, Alselwi W, Ghatage P. Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary: The Current Status. *Diagnostics*. 2022 Feb 10;12(2):458.
54. Gorringe KL, Cheasley D, Wakefield MJ, Ryland GL, Allan PE, Alsop K, et al. Therapeutic options for mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2020 Mar;156(3):552–60.
55. Craig O, Salazar C, Gorringe KL. Options for the Treatment of Mucinous Ovarian Carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2021 Dec 13;22(12):114.
56. Morice P, Gouy S, Leary A. Mucinous Ovarian Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2019 Mar 28;380(13):1256–66.
57. Zhou L, Yao L, Dai L, Zhu H, Ye X, Wang S, et al. Ovarian endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma: A 21-year retrospective study. *J Ovarian Res*. 2021 Dec 4;14(1):63.
58. Berek JS, Matias-Guiu X, Creutzberg C, Fotopoulou C, Gaffney D, Kehoe S, et al. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *J Gynecol Oncol*. 2023;34(5).
59. Ramalingam P. Germ Cell Tumors of the Ovary: A Review. *Semin Diagn Pathol*. 2023 Jan;40(1):22–36.
60. Euscher ED. Germ Cell Tumors of the Female Genital Tract. *Surg Pathol Clin*. 2019 Jun;12(2):621–49.
61. Gică N, Peltecu G, Chirculescu R, Gică C, Stoicea MC, Serbanica AN, et al. Ovarian Germ Cell Tumors: Pictorial Essay. *Diagnostics*. 2022 Aug 24;12(9):2050.
62. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Ovarian Germ Cell Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2002.
63. Srisajjakul S, Prapaisilp P, Bangchokdee S. Imaging features of unusual lesions and complications associated with ovarian mature cystic teratoma. *Clin Imaging*. 2019 Sep;57:115–23.

64. AlEsa A, AlAhmadi HH, Ahmed A, AlMousa A, Hamadeh NG, Farah YAH. Well-differentiated cerebellum in an ovarian mature cystic teratoma: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*. 2022 Dec 1;16(1):215.
65. Godlewska P, Januszkiewicz-Caulier J, Chojnowski M, Pyzlak M, Pałucki J, Dedecjus M. Ovarian monodermal teratoma as the cause of elevated serum thyroglobulin concentration in a patient after total thyroidectomy for papillary thyroid carcinoma. *Pol Arch Intern Med*. 2021 Dec 1;
66. Saleh M, Bhosale P, Menias CO, Ramalingam P, Jensen C, Iyer R, et al. Ovarian teratomas: clinical features, imaging findings and management. *Abdominal Radiology*. 2021 Jun 4;46(6):2293–307.
67. Hodgson A, Ghorab Z, Parra-Herran C. Somatically Derived Yolk Sac Tumor of the Ovary in a Young Woman. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2021 May;40(3):296–300.
68. Jamshidi P, Taxy JB. Educational Case: Yolk Sac (Endodermal Sinus) Tumor of the Ovary. *Acad Pathol*. 2020 Jan;7:2374289520909497.
69. Iscar T, Arian C, Chiva L, Sanz J. Ovarian yolk sac tumor. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2021 May 30;31(5):797–8.
70. Moro F, Castellano LM, Franchi D, Epstein E, Fischerova D, Froyman W, et al. Imaging in gynecological disease (22): clinical and ultrasound characteristics of ovarian embryonal carcinomas, non-gestational choriocarcinomas and malignant mixed germ cell tumors. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2021 Jun 2;57(6):987–94.
71. Peng H, Li L, Bi Y. Successful management of nongestational ovarian choriocarcinoma complicated with choriocarcinoma syndrome: A case report and a literature review. *Curr Probl Cancer*. 2020 Aug;44(4):100539.
72. Chávarri-Guerra Y, González-Ochoa E, De-la-Mora-Molina H, Soto-Perez-de-Celis E. Systemic therapy for non-serous ovarian carcinoma. *Chin Clin Oncol*. 2020 Aug;9(4):52–52.

73. Ordulu Z. Update on Ovarian Sex Cord–Stromal Tumors. *Clin Lab Med.* 2023 Jun;43(2):245–74.
74. Hanley KZ, Mosunjac MB. Practical Review of Ovarian Sex Cord–Stromal Tumors. *Surg Pathol Clin.* 2019 Jun;12(2):587–620.
75. Al Harbi R, McNeish IA, El-Bahrawy M. Ovarian sex cord-stromal tumors: an update on clinical features, molecular changes, and management. *International Journal of Gynecologic Cancer.* 2021 Feb;31(2):161–8.
76. Gaona-Luviano P, Medina-Gaona LA, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol.* 2020 Aug;9(4):47–47.
77. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *European Journal of Cancer Prevention.* 2017 Jan;26(1):55–62.
78. Sköld C, Koliadi A, Enblad G, Stålberg K, Glimelius I. Parity is associated with better prognosis in ovarian germ cell tumors, but not in other ovarian cancer subtypes. *Int J Cancer.* 2022 Mar 28;150(5):773–81.
79. Fan D, Xia Q, Lin D, Ma Y, Rao J, Liu L, et al. Role of breastfeeding on maternal and childhood cancers: An umbrella review of meta-analyses. *J Glob Health.* 2023 Jun 23;13:04067.
80. Babic A, Sasamoto N, Rosner BA, Tworoger SS, Jordan SJ, Risch HA, et al. Association Between Breastfeeding and Ovarian Cancer Risk. *JAMA Oncol.* 2020 Jun 11;6(6):e200421.
81. Khanlarkhani N, Azizi E, Amidi F, Khodarahmian M, Salehi E, Pazhohan A, et al. Metabolic risk factors of ovarian cancer: a review. *JBRA Assist Reprod.* 2021;
82. Zeleznik OA, Eliassen AH, Kraft P, Poole EM, Rosner BA, Jeanfavre S, et al. A Prospective Analysis of Circulating Plasma Metabolites Associated with Ovarian Cancer Risk. *Cancer Res.* 2020 Mar 15;80(6):1357–67.

83. Cabasag CJ, Butler J, Arnold M, Rutherford M, Bardot A, Ferlay J, et al. Exploring variations in ovarian cancer survival by age and stage (ICBP SurvMark-2): A population-based study. *Gynecol Oncol.* 2020 Apr;157(1):234–44.
84. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *GeneReviews®.* 2023;
85. Talwar V, Rauthan A. BRCA mutations: Implications of genetic testing in ovarian cancer. *Indian J Cancer.* 2022;59(5):56.
86. Huber D, Seitz S, Kast K, Emons G, Ortmann O. Use of oral contraceptives in BRCA mutation carriers and risk for ovarian and breast cancer: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet.* 2020 Apr 5;301(4):875–84.
87. Loboda AP, Adonin LS, Zvereva SD, Guschin DY, Korneenko T V., Telegina A V., et al. BRCA Mutations—The Achilles Heel of Breast, Ovarian and Other Epithelial Cancers. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 5;24(5):4982.
88. Guo T, Dong X, Xie S, Zhang L, Zeng P, Zhang L. Cellular Mechanism of Gene Mutations and Potential Therapeutic Targets in Ovarian Cancer. *Cancer Manag Res.* 2021 Apr;Volume 13:3081–100.
89. Tuna M, Ju Z, Yoshihara K, Amos CI, Tanyi JL, Mills GB. Clinical relevance of TP53 hotspot mutations in high-grade serous ovarian cancers. *Br J Cancer.* 2020 Feb 4;122(3):405–12.
90. Martins FC, Couturier DL, Paterson A, Karnezis AN, Chow C, Nazeran TM, et al. Clinical and pathological associations of PTEN expression in ovarian cancer: a multicentre study from the Ovarian Tumour Tissue Analysis Consortium. *Br J Cancer.* 2020 Sep 1;123(5):793–802.
91. Shi M, Whorton AE, Sekulovski N, Paquet M, MacLean JA, Song Y, et al. Inactivation of TRP53, PTEN, RB1, and/or CDH1 in the ovarian surface epithelium induces ovarian cancer transformation and metastasis. *Biol Reprod.* 2020 Apr 24;102(5):1055–64.

92. Mandalia T, Dave P, Sinha A, Gajjar K, Ghosh N. Potential Role of KRAS and BRAF in Epithelial Ovarian Cancer. *Indian J Gynecol Oncol*. 2021 May 7;19(2):35.
93. Therachiyil L, Anand A, Azmi A, Bhat A, Korashy HM, Uddin S. Role of RAS signaling in ovarian cancer. *F1000Res*. 2022 Nov 4;11:1253.
94. Chui MH, Shih I. Oncogenic *BRAF* and *KRAS* mutations in endosalpingiosis. *J Pathol*. 2020 Feb 29;250(2):148–58.
95. Mullen J, Kato S, Sicklick JK, Kurzrock R. Targeting ARID1A mutations in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2021 Nov;100:102287.
96. Li J, Wang W, Zhang Y, Cieşlik M, Guo J, Tan M, et al. Epigenetic driver mutations in ARID1A shape cancer immune phenotype and immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Apr 20;130(5):2712–26.
97. Takahashi K, Takenaka M, Okamoto A, Bowtell DDL, Kohno T. Treatment Strategies for ARID1A-Deficient Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 7;13(8):1769.
98. Hacker NF, Rao A. Surgery for advanced epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 May;41:71–87.
99. Lluca A, Serra A, Climent MT, Segarra B, Maazouzi Y, Soriano M, et al. Outcome quality standards in advanced ovarian cancer surgery. *World J Surg Oncol*. 2020 Dec 25;18(1):309.
100. Gallotta V, Certelli C, Oliva R, Rosati A, Federico A, Loverro M, et al. Robotic surgery in ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2023 Aug;90:102391.
101. Filis P, Mauri D, Markozannes G, Tolia M, Filis N, Tsilidis K. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for the management of primary advanced and recurrent ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *ESMO Open*. 2022 Oct;7(5):100586.

102. Sugarbaker PH. Optimizing regional chemotherapy for epithelial ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2022 Jun 27;48(6):1306–17.
103. Yang L, Xie HJ, Li YY, Wang X, Liu XX, Mai J. Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review). *Oncol Rep*. 2022 Feb 25;47(4):82.
104. Yang C, Xia BR, Zhang ZC, Zhang YJ, Lou G, Jin WL. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. *Front Immunol*. 2020 Oct 6;11.
105. Chen J, Hu J, Gu L, Ji F, Zhang F, Zhang M, et al. Anti-mesothelin CAR-T immunotherapy in patients with ovarian cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2023 Feb 4;72(2):409–25.
106. Fan Z, Han D, Fan X, Zhao L. Ovarian cancer treatment and natural killer cell-based immunotherapy. *Front Immunol*. 2023 Dec 21;14.
107. Cha JH, Chan LC, Song MS, Hung MC. New Approaches on Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Aug;10(8):a036863.
108. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16–25.
109. Liu S, Sun Q, Ren X. Novel strategies for cancer immunotherapy: counter-immunoediting therapy. *J Hematol Oncol*. 2023 Apr 13;16(1):38.
110. Kennedy LB, Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J Clin*. 2020 Mar 16;70(2):86–104.
111. Lin MJ, Svensson-Arvelund J, Lubitz GS, Marabelle A, Melero I, Brown BD, et al. Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier. *Nat Cancer*. 2022 Aug 23;3(8):911–26.
112. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2021 Jun 27;21(6):360–78.

113. Qian D, Li J, Huang M, Cui Q, Liu X, Sun K. Dendritic cell vaccines in breast cancer: Immune modulation and immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Jun;162:114685.
114. Zhang X, He T, Li Y, Chen L, Liu H, Wu Y, et al. Dendritic Cell Vaccines in Ovarian Cancer. *Front Immunol*. 2021 Jan 25;11.
115. Vishweshwaraiah YL, Dokholyan N V. mRNA vaccines for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2022 Dec 14;13.
116. Abd-Aziz N, Poh CL. Development of oncolytic viruses for cancer therapy. *Translational Research*. 2021 Nov;237:98–123.
117. Mondal M, Guo J, He P, Zhou D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2020 Oct 2;16(10):2389–402.
118. Lin H, Cheng J, Mu W, Zhou J, Zhu L. Advances in Universal CAR-T Cell Therapy. *Front Immunol*. 2021 Oct 6;12.
119. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021 Apr 6;11(4):69.
120. Lu J, Jiang G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Mol Cancer*. 2022 Oct 8;21(1):194.
121. Chohan KL, Siegler EL, Kenderian SS. CAR-T Cell Therapy: the Efficacy and Toxicity Balance. *Curr Hematol Malig Rep*. 2023 Apr 10;18(2):9–18.
122. Cutri-French C, Nasioudis D, George E, Tanyi JL. CAR-T Cell Therapy in Ovarian Cancer: Where Are We Now? *Diagnostics*. 2024 Apr 16;14(8):819.
123. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Semin Oncol Nurs*. 2019 Oct;35(5):150927.
124. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep*. 2018 Dec 11;45(6):2935–40.

125. Damián-Blanco P, Ahuexoteco-Sánchez S, Carbajal-Gallardo AA, Coctecon-Chávelas FC, Rodríguez-Nava C, Vences-Velázquez A, et al. Use of monoclonal antibodies in cancer immunotherapy: types and mechanisms of action. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2023;80(3):153–64.
126. Tsao LC, Force J, Hartman ZC. Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.* 2021 Sep 15;81(18):4641–51.
127. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies.* 2020 Jul 20;9(3):34.
128. Desnoyer A, Broutin S, Delahousse J, Maritaz C, Blondel L, Mir O, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of therapeutic monoclonal antibodies used in oncology: Part 2, immune checkpoint inhibitor antibodies. *Eur J Cancer.* 2020 Mar;128:119–28.
129. Kubli SP, Berger T, Araujo D V., Siu LL, Mak TW. Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Dec 8;20(12):899–919.
130. Zhou YJ, Li G, Wang J, Liu M, Wang Z, Song Y, et al. PD-L1: expression regulation. *Blood Science.* 2023 Apr 13;5(2):77–91.
131. Wu Q, Jiang L, Li S cheng, He Q jun, Yang B, Cao J. Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2021 Jan 9;42(1):1–9.
132. Gou Q, Dong C, Xu H, Khan B, Jin J, Liu Q, et al. PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer. *Cell Death Dis.* 2020 Nov 6;11(11):955.
133. Ding X chen, Wang L liang, Zhang X dong, Xu J long, Li P feng, Liang H, et al. The relationship between expression of PD-L1 and HIF-1 α in glioma cells under hypoxia. *J Hematol Oncol.* 2021 Dec 12;14(1):92.

134. Wang R, Ye H, Yang B, Ao M, Yu X, Wu Y, et al. m6A-modified circNFIX promotes ovarian cancer progression and immune escape via activating IL-6R/JAK1/STAT3 signaling by sponging miR-647. *Int Immunopharmacol*. 2023 Nov;124:110879.
135. Yi M, Zheng X, Niu M, Zhu S, Ge H, Wu K. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Mol Cancer*. 2022 Jan 21;21(1):28.
136. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Oncology*. 2022 Apr 24;29(5):3044–60.
137. Inman BA, Longo TA, Ramalingam S, Harrison MR. Atezolizumab: A PD-L1–Blocking Antibody for Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017 Apr 15;23(8):1886–90.
138. Markham A. Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs*. 2016 Aug 13;76(12):1227–32.
139. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*. 2017 Aug 23;8.
140. Frampton JE. Atezolizumab: A Review in Extensive-Stage SCLC. *Drugs*. 2020 Oct 29;80(15):1587–94.
141. Qin S, Chen M, Cheng AL, Kaseb AO, Kudo M, Lee HC, et al. Atezolizumab plus bevacizumab versus active surveillance in patients with resected or ablated high-risk hepatocellular carcinoma (IMbrave050): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet*. 2023 Nov;402(10415):1835–47.
142. Eddy K, Chen S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 26;21(23):8984.
143. Peng H, He X, Wang Q. Immune checkpoint blockades in gynecological cancers: A review of clinical trials. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2022 Sep 25;101(9):941–51.

144. Moroney JW, Powderly J, Lieu CH, Bendell JC, Eckhardt SG, Chang CW, et al. Safety and Clinical Activity of Atezolizumab Plus Bevacizumab in Patients with Ovarian Cancer: A Phase Ib Study. *Clinical Cancer Research*. 2020 Nov 1;26(21):5631–7.
145. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2020 Mar;28(5):115327.
146. Turano M, Cammarota F, Duraturo F, Izzo P, De Rosa M. A Potential Role of IL-6/IL-6R in the Development and Management of Colon Cancer. *Membranes (Basel)*. 2021 Apr 24;11(5):312.
147. Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020 Apr 3;9(4):880.
148. Sheppard M, Laskou F, Stapleton PP, Hadavi S, Dasgupta B. Tocilizumab (Actemra). *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Sep 2;13(9):1972–88.
149. Méndez-Clemente A, Bravo-Cuellar A, González-Ochoa S, Santiago-Mercado M, Palafox-Mariscal L, Jave-Suárez L, et al. Dual STAT-3 and IL-6R inhibition with stattic and tocilizumab decreases migration, invasion and proliferation of prostate cancer cells by targeting the IL-6/IL-6R/STAT-3 axis. *Oncol Rep*. 2022 Jun 14;48(2):138.
150. Richier Q, Plaçais L, Lacombe K, Hermine O. COVID-19 : encore une place pour le tocilizumab ? *Rev Med Interne*. 2021 Feb;42(2):73–8.
151. Ge J, Han T, Shan L, Na J, Li Y, Wang J. Long non-coding RNA THOR promotes ovarian Cancer cells progression via IL-6/STAT3 pathway. *J Ovarian Res*. 2020 Dec 17;13(1):72.
152. Tolomeo M, Cascio A. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 9;22(2):603.
153. Ma J hui, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Communication and Signaling*. 2020 Dec 28;18(1):33.

154. Liang R, Chen X, Chen L, Wan F, Chen K, Sun Y, et al. STAT3 signaling in ovarian cancer: a potential therapeutic target. *J Cancer*. 2020;11(4):837–48.
155. Chen H, Bian A, Yang L fang, Yin X, Wang J, Ti C, et al. Targeting STAT3 by a small molecule suppresses pancreatic cancer progression. *Oncogene*. 2021 Feb 25;40(8):1440–57.
156. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Mar 28;20(3):200–16.
157. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 May 31;6(1):201.
158. Sun G, Rong D, Li Z, Sun G, Wu F, Li X, et al. Role of Small Molecule Targeted Compounds in Cancer: Progress, Opportunities, and Challenges. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 8;9.
159. Ngo HX, Garneau-Tsodikova S. What are the drugs of the future? *Medchemcomm*. 2018;9(5):757–8.
160. Kerr WG, Chisholm JD. The Next Generation of Immunotherapy for Cancer: Small Molecules Could Make Big Waves. *The Journal of Immunology*. 2019 Jan 1;202(1):11–9.
161. Offringa R, Kötzner L, Huck B, Urbahns K. The expanding role for small molecules in immuno-oncology. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Nov 18;21(11):821–40.
162. Stanton DE, Ormond A, Koch NM, Colesie C. Lichen ecophysiology in a changing climate. *Am J Bot*. 2023 Feb 16;110(2).
163. Goodenough U, Roth R. Lichen 2. Constituents. *Algal Res*. 2021 Oct;58:102356.

164. Pichler G, Muggia L, Carniel FC, Grube M, Kranner I. How to build a lichen: from metabolite release to symbiotic interplay. *New Phytologist*. 2023 May 4;238(4):1362–78.
165. Kalra R, Conlan XA, Goel M. Recent advances in research for potential utilization of unexplored lichen metabolites. *Biotechnol Adv*. 2023 Jan;62:108072.
166. Solárová Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D, Solár P. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. *Biomolecules*. 2020 Jan 5;10(1):87.
167. Tripathi AH, Negi N, Gahtori R, Kumari A, Joshi P, Tewari LM, et al. A Review of Anti-Cancer and Related Properties of Lichen-Extracts and Metabolites. *Anticancer Agents Med Chem*. 2021 Jan;22(1):115–42.
168. Ureña-Vacas I, González-Burgos E, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. Lichen Depsidones with Biological Interest. *Planta Med*. 2022 Sep 25;88(11):855–80.
169. Lee HW, Kim J, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Anti-Inflammatory Activity of Lobaric Acid via Suppressing NF- κ B/MAPK Pathways or NLRP3 Inflammasome Activation. *Planta Med*. 2019 Mar 16;85(04):302–11.
170. Nguyen HT, Polimati H, Annam SSP, Okello E, Thai QM, Vu TY, et al. Lobaric acid prevents the adverse effects of tetramethrin on the estrous cycle of female albino Wistar rats. *PLoS One*. 2022 Jul 1;17(7):e0269983.
171. Hong JM, Suh SS, Kim T, Kim J, Han S, Youn U, et al. Anti-Cancer Activity of Lobaric Acid and Lobarstin Extracted from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. *Molecules*. 2018 Mar 14;23(3):658.
172. Emsen B, Aslan A, Turkez H, Taghizadehghalehjoughi A, Kaya A. The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(5):941–51.
173. Kim TK, Kim JE, Youn UJ, Han SJ, Kim IC, Cho CG, et al. Total Syntheses of Lobaric Acid and Its Derivatives from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. *J Nat Prod*. 2018 Jun 22;81(6):1460–7.

174. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2019 Mar 21;380(12):1116–27.
175. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2019 Mar 21;380(12):1103–15.
176. Makker V, Rasco D, Vogelzang NJ, Brose MS, Cohn AL, Mier J, et al. Lenvatinib plus pembrolizumab in patients with advanced endometrial cancer: an interim analysis of a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019 May;20(5):711–8.
177. Gutzmer R, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, et al. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2020 Jun;395(10240):1835–44.
178. Ögmundsdóttir HM, Zoëga GM, Gissurarson SR, Ingólfssdóttir K. Anti-proliferative Effects of Lichen-derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on Malignant Cell-lines and Mitogen-stimulated Lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011 Apr 12;50(1):107–15.
179. Haraldsdóttir S, Guðlaugsdóttir E, Ingólfssdóttir K, Ögmundsdóttir HM. Anti-Proliferative Effects of Lichen-Derived Lipoxygenase Inhibitors on Twelve Human Cancer Cell Lines of Different Tissue Origin *in vitro*. *Planta Med*. 2004 Nov;70(11):1098–100.
180. Zhang L, Chen Y, Li F, Bao L, Liu W. Atezolizumab and Bevacizumab Attenuate Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cells Progression Synergistically via Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Immunol*. 2019 Apr 26;10.
181. Dijkgraaf EM, Santegoets SJAM, Reyners AKL, Goedemans R, Wouters MCA, Kenter GG, et al. A phase I trial combining carboplatin/doxorubicin with tocilizumab,

- an anti-IL-6R monoclonal antibody, and interferon- α 2b in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 2015 Oct;26(10):2141–9.
182. Poschner S, Wackerlig J, Castillo-Tong DC, Wolf A, von der Decken I, Rižner TL, et al. Metabolism of Estrogens: Turnover Differs between Platinum-Sensitive and -Resistant High-Grade Serous Ovarian Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Jan 23;12(2):279.
 183. Kudo M, Jono H, Shinriki S, Yano S, Nakamura H, Makino K, et al. Antitumor effect of humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) on glioma cell proliferation: Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2009;111(2).
 184. KIM NH, KIM SK, KIM DS, ZHANG D, PARK JA, YI H, et al. Anti-proliferative action of IL-6R-targeted antibody tocilizumab for non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*. 2015;9(5):2283–8.
 185. Wan C, Keany MP, Dong H, Al-Alem LF, Pandya UM, Lazo S, et al. Enhanced Efficacy of Simultaneous PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2021 Jan 1;81(1):158–73.
 186. Chin CD, Fares CM, Campos M, Chen HW, Shintaku IP, Konecny GE, et al. Association of PD-L1 expression by immunohistochemistry and gene microarray with molecular subtypes of ovarian tumors. *Modern Pathology*. 2020 Oct;33(10):2001–10.
 187. Skalniak L, Zak KM, Guzik K, Magiera K, Musielak B, Pachota M, et al. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget*. 2017 Sep 22;8(42):72167–81.
 188. Sun TX, Li MY, Zhang ZH, Wang JY, Xing Y, Ri M, et al. Usnic acid suppresses cervical cancer cell proliferation by inhibiting <scp>PD-L1</scp> expression and enhancing T-lymphocyte tumor-killing activity. *Phytotherapy Research*. 2021 Jul 10;35(7):3916–35.
 189. Liu Y, Liao S, Bennett S, Tang H, Song D, Wood D, et al. STAT3 and its targeting inhibitors in osteosarcoma. *Cell Prolif*. 2021 Feb 31;54(2).

190. Xie C, Zhou X, Liang C, Li X, Ge M, Chen Y, et al. Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2021 Dec 24;40(1):266.
191. Tong L, Li J, Li Q, Wang X, Medikonda R, Zhao T, et al. ACT001 reduces the expression of PD-L1 by inhibiting the phosphorylation of STAT3 in glioblastoma. *Theranostics*. 2020;10(13):5943–56.
192. Ding Y, Wang Y, Cui J, Si T. Endostar blocks the metastasis, invasion and angiogenesis of ovarian cancer cells. *Neoplasma*. 2020;67(03):595–603.
193. Fezza M, Hilal G, Tahtouh R, Moubarak M, Atallah D. HSP27 modulates tumoural immune evasion by enhancing STAT3-mediated upregulation of PD-L1 and NLRC5 in ovarian cancer. *Ecancermedicalscience*. 2023 Mar 31;17.
194. Yang L, Lin S, Xu L, Lin J, Zhao C, Huang X. Novel activators and small-molecule inhibitors of STAT3 in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Oct;49:10–22.
195. Wang Z, Hui C, Xie Y. Natural STAT3 inhibitors: A mini perspective. *Bioorg Chem*. 2021 Oct;115:105169.
196. Jung JE, Kim HS, Lee CS, Park DH, Kim YN, Lee MJ, et al. Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1780–7.
197. Li W, Saud SM, Young MR, Colburn NH, Hua B. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro. *Mol Cell Biochem*. 2015 Aug 26;406(1–2):63–73.
198. Wan S, Zhao E, Kryczek I, Vatan L, Sadovskaya A, Ludema G, et al. Tumor-Associated Macrophages Produce Interleukin 6 and Signal via STAT3 to Promote Expansion of Human Hepatocellular Carcinoma Stem Cells. *Gastroenterology*. 2014 Dec;147(6):1393–404.

199. Bharti R, Dey G, Ojha PK, Rajput S, Jaganathan SK, Sen R, et al. Diacerein-mediated inhibition of IL-6/IL-6R signaling induces apoptotic effects on breast cancer. *Oncogene*. 2016 Jul 28;35(30):3965–75.
200. Yanaihara N, Hirata Y, Yamaguchi N, Noguchi Y, Saito M, Nagata C, et al. Antitumor effects of interleukin-6 (IL-6)/interleukin-6 receptor (IL-6R) signaling pathway inhibition in clear cell carcinoma of the ovary. *Mol Carcinog*. 2016 May;55(5):832–41.
201. Cao W, Zhang Y, Li A, Yu P, Song L, Liang J, et al. Curcumin reverses hepatic epithelial mesenchymal transition induced by trichloroethylene by inhibiting IL-6R/STAT3. *Toxicol Mech Methods*. 2021 Oct 13;31(8):589–99.
202. Haq AT Al, Yang PP, Jin C, Shih JH, Chen LM, Tseng HY, et al. Immunotherapeutic IL-6R and targeting the MCT-1/IL-6/CXCL7/PD-L1 circuit prevent relapse and metastasis of triple-negative breast cancer. *Theranostics*. 2024;14(5):2167–89.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İbrahim Gadaşlı

Yabancı Dil(ler) ve Seviyesi: İngilizce (B2), Almanca (A2), Rusça (A2)

Öğrenim Bilgileri

<u>Derece</u>	<u>Kurum Adı, Fakülte, Bölüm</u>	<u>Yıllar</u>
Lise	Gakh şehir Namig Allahverdiyev adına 2 numaralı orta okul - lise	2015 - 2017
Lisans	Sakarya Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü.	2017 - 2021
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Danışman: Prof. Dr. Demet Cansaran Duman Tez: Yumurtalık Kanseri Tedavisinde IL-6R/Stat3/PD-L1 Hedefli Lobarik Asit ve Lobarik Asit -Tosilizumab Kombinasyonunun Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi	2021 - 2024

Denevim/İşyeri Bilgileri

<u>Kurum</u>	<u>Görevi</u>	<u>Yıllar</u>
Sakarya Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Eğitim / Araştırma	2019 - 2020
Gakh Şehir Merkez Hastanesi, Hematoloji	Stajyer Biyolog	2020

Laboratuvarı, Biyokimya Laboratuvarı/Azerbaycan		
--	--	--

Yayın ve Bildiriler

1) Gadashli I, Cansaran-Duman D. Comparison of Antibody and Lobaric Acid Small Molecule Application in the Treatment of Ovarian Cancer at the Transcriptome Level in the IL-6R / STAT3 / PD-L1 Pathway, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2-6 July 2023, Ankara, Türkiye.

2) Ensoy M, Gadashli I, Alkan AH, Cansaran-Duman D. Determination of the therapeutic efficacy of the drug candidate molecule atranorin at the transcriptomic level as an innovative strategy in the treatment of melanoma cancer. 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2-6 July 2023, Ankara, Türkiye.

3) Farhang Boroujeni A, Zarrin P, Gado S, Gadashli I, Pariltı D.N, Duman-Cansaran D, Mutlu P. Ates-Alagoz Z. Design, synthesis, molecular docking and ADME studies of novel thiazolidinedione derivatives as CDK4/6 inhibitors. 14th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), June 2024, Ankara, Türkiye.

4) Zarrin P, Farhang Boroujeni A, Kislá M, Gadashli I, Bozkurt F.Z, Mutlu P, Duman-Cansaran D, Ates-Alagoz Z. Design, synthesis, molecular docking and ADME studies of novel thiazolidinedione derivatives as tubulin polymerase inhibitors 14th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), June 2024, Ankara Türkiye.

5) Al-Qaysi ASA, Alkan AH, Gadasli I, Cansaran-Duman D. To elucidate the effective role of small molecule regulated lncRNAs in the tumour microenvironment in immunotherapy. 2024. Current Medicinal Chemistry

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

1. **Gadashli I, Cansaran-Duman D.** Comparison of Antibody and Lobaric Acid Small Molecule Application in the Treatment of Ovarian Cancer at the Transcriptome Level in the IL-6R / STAT3 / PD-L1 Pathway, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2-6 July 2023, Ankara, Türkiye.



PBA2023

33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis



ABSTRACTS & PROCEEDINGS



www.pba2023.com

02-06 July 2023
Ankara University
Ankara / Türkiye



33rd International Symposium on
Pharmaceutical and
Biomedical Analysis

YOUNG SCIENTIST ORAL ABSTRACTS & PROCEEDINGS



02-06 July 2023
Ankara University, Türkiye

results. The technique holds potential for applications in various contexts, including tumorigenic growth, metabolic disorders, and personalized drug therapies by providing therapeutic profiles for cancer patients.

Acknowledgements: A.E.C. acknowledges TÜBİTAK 3501 - Cancer Development Program (Project No. 119E111) and BAGEP Award of the Science Academy, Turkey.

References:

- [1] Çetin, A. E., Tiplars, S. N., Yalçın Özyücel, O., & Khandanlou, A. (2021). Reflective Index Sensing for Measuring Single Cell Growth. *ACS Nano*, 15(6), 10710-10721. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04031>
- [2] Cisse-Casson, J. J., Henriksen-Lacey, M., Garcia, I., & Liu-Mandillo, L. M. (2016). Plasmonic surfaces for cell growth and retrieval triggered by near-infrared light. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(3), 874-878. <https://doi.org/10.1002/anie.201509025>
- [3] Housman, G., Byler, S., Herberich, S., Lapinska, K., Longacre, M., Seyler, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>

YS-015

Comparison of Antibody and Lobaric Acid Small Molecule Application in the Treatment Of Ovarian Cancer at the Transcriptome Level in the IL-6R / STAT3 / PD-L1 Pathway

Brakim Gadashli, Dilek Cansaran Duman
Ankara University, Institute of Biotechnology, Ankara, 06800, Turkey

Due to the difficulty of drug apply and toxic effects in ovarian cancer treatment methods, drug resistance, and low response rate to treatment, further research is needed for the treatment of ovarian cancer. Immunotherapy applications such as immune checkpoint blockade show promise in cancer treatment. Further investigation of checkpoint blockade in ovarian cancer, mainly programmed death protein (PD-1) and ligand 1 (PD-L1), IL-6R, and STAT3 pathways, is very important in terms of finding an effective treatment solution. In this study, it was aimed to investigate the anti-proliferative effect of lobaric acid (LA), a lichen secondary metabolite with many biological activities, and its potential in cancer immunotherapy at the transcriptomic level on human ovarian cancer. The anti-proliferative effects of

drug candidate small molecule LA on OVCAR-3, SKOV-3, A2780 human ovarian cancer cell lines, and OSE normal epithelial cell have been investigated by xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. LA does not show cytotoxic effect on OSE cells, but it has been determined that it has an anti-proliferative effect on ovarian cancer cells. As LA showed the highest anti-proliferative effect on OVCAR-3 ovarian cancer cells, the synergistic effect of IC₅₀ concentration of LA with atezolizumab (ATE, PD-L1 targeted mAb) and icotinib (Tos, IL-6R targeted mAb) was also determined by xCELLigence analysis. Moreover, the inhibition potential of the IL-6R/STAT3/PD-L1 pathway was determined at the mRNA level by the application of lobaric acid on ovarian cancer cells. For qRT-PCR analysis, six target genes (CD-274, STAT3, JAK1, JAK2, IL-6R) were used for LA, ATE, Tos, LA+ATE, LA+Tos. Control samples and ACTB gene was used as housekeeping. The study was performed in two repetitions using stu-t test statistical analysis method and 2^{ΔΔCT} method. As a result of anti-proliferative effect, IC₅₀ concentration of LA, ATE, and Tos were determined 11.7, 10.7 0.021 μM, respectively. According to qRT-PCR results, there was a 14.67-fold decrease in expression level of CD-274 (PD-L1) gene with LA treatment, 24.59-fold in ATE, and 48-fold in Tos, a monoclonal antibody targeting PD-1/PD-L1. In the LA+ATE and LA+Tos groups, 185.46 and 92.09-fold decrease in gene expression was found. In addition, STAT3, STAT3, JAK1, JAK2, IL-6R genes were suppressed in LA, ATE, Tos, LA+ATE, LA+Tos samples. As a result, it was revealed that LA and LA+monoclonal antibody combinations suppressed the IL-6R/STAT3/PD-L1 pathway in OVCAR-3 ovarian cancer cells. In Conclusion, results were obtained for the first time that lobaric acid will show less toxicity than ovarian cancer targeted chemotherapeutic drugs, and that it can target IL-6R/STAT3/PD-L1 pathways differently or synergistically than monoclonal antibodies. LA could be considered as a promising drug candidate molecule for ovarian cancer in cancer immunotherapy applications.

Keywords: Lobaric Acid, ovarian cancer, IL-6, STAT3, PD-L1.

2. Ensoy M, **Gadashli I**, Alkan AH, Cansaran-Duman D. Determination of the therapeutic efficacy of the drug candidate molecule atranorin at the transcriptomic level as an innovative strategy in the treatment of melanoma cancer. 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2-6 July 2023, Ankara, Türkiye.



PBA2023

33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis



ABSTRACTS & PROCEEDINGS



www.pba2023.com

02-06 July 2023

Ankara University

Ankara / Türkiye



33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis

POSTER ABSTRACTS & PROCEEDINGS

02-06 July 2023
Ankara University, Türkiye

PM-053

Determination of the Therapeutic Efficacy of the Drug Candidate Molecule Atranorin at the Transcriptomic Level as an Innovative Strategy in the Treatment of Melanoma Cancer

Mine Ensoy, *Ilhamin Gadashli*, Ayşe Hale Alkan, Demet Cansaran Duman
Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, Turkey

There are many routine treatment methods for the treatment of melanoma cancer. However, toxicity and resistance to treatment are observed in some treatment methods such as chemotherapy. Apoptosis, the programmed pathway of cell death, is defined as the natural barrier that restricts the survival and spread of cells in the process of cancerization. In this study, the antiproliferative efficacy of the drug candidate small molecule atranorin (ATR), which is a secondary metabolite of lichen with many biological activities, in melanoma cancer was examined at the transcriptomic level. Cell viability was determined with 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method after apply to atranorin to human melanoma cancer cell lines A-375, G-361 and MDA-MB-435 and melanocyte normal cells. According to results, no cytotoxic effect of atranorin on the melanocyte cell line was observed. Atranorin was found to have the highest antiproliferative effect on the A-375 melanoma cancer cell line. The antiproliferative effect of atranorin on the A-375 cell line was also examined with xCELLigence Real-Time Cell Analyser and the IC₅₀ value was determined as 12 µM. In addition, the antiproliferative potential of the drug candidate molecule atranorin was also examined at the mRNA level. For qRT-PCR analysis, a total of 88 target genes related with apoptosis and GAD6H gene was used as housekeeping. According to the qRT-PCR results, the expression levels of 87 genes from 88 target genes were determined. After apply to atranorin, the BCL2 gene was suppressed 47.58-fold and the MCL1 gene was 38.32-fold suppressed among the anti-apoptotic genes. In total, two anti-apoptotic genes (Casp6, Cas7) from the Caspase family, four (TRAF1, TRAF2, TRAF4, TRAF6) from the TRAF family, ten (BAG1, BAG2, BAG3, BAG4, BCL2L2, BCL2L1, BCL10, BIK, MCL1) from the BCL2 family, two (CHICK1, CHICK2) from the Kinase family and seven (BIRC1, BIRC2, BIRC3, BIRC4, BIRC5, BIRC6) from other apoptosis related genes were suppressed. The increase in the expression levels of pro-apoptotic and apoptotic genes and the suppression of the expression of anti-apoptotic genes have an antiproliferative effect on the drug candidate molecule atranorin melanoma cancer.

Keywords: Melanoma, apoptosis, atranorin.

PM-054

Investigation of Potential Binders to GPR17 Membrane Receptor by Surface Plasmon Resonance and Grating-Coupled Interferometry

Gabriella Masulli¹, Davide Capelli², Marco Ruffinetti³, Maria Pia Abbracchio⁴, Ivano Eberini⁵, Daniela Ubbi⁶, Giovanna Speranza⁷, Stefano Capaldi⁸, Enrica Collier⁹

¹Department of Drug Science, University of Pavia, Pavia, Italy
²Istituto di Cristallografia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome, Italy
³Department of Chemistry, University of Milan, Milan, Italy
⁴Department of Pharmaceutical and Biomolecular Sciences, University of Milan, Milan, Italy
⁵Department of Biotechnology, University of Verona, Verona, Italy
⁶Department of Pharmaceutical and Biomolecular Sciences, Data Science Research Centre, University of Milan, Milan, Italy

G-protein coupled receptors (GPCRs) are a large family of membrane proteins which hold great potential as drug targets. In particular, GPR17 is an interesting target in demyelinating diseases since it is involved in modulating the maturation of oligodendrocytes, the cells responsible for myelin production.

Both surface plasmon resonance (SPR) and grating-coupled interferometry (GCI) allow to study the interactions between molecules based on the changes in refractive index occurring at a sensor surface. However, while in SPR a localized evanescent field is created on the sensor chip, in GCI the light runs through the entire length of the sample enhancing the sensitivity and the signal-to-noise ratio.

In a previous study carried out by our research group [1], a new SPR method was developed to investigate the interaction of potential binders to GPR17. The aim of the present work is to transfer the method to a Crocopia WAVE GCI system and, in a second phase, to apply it to new potential more selective and potent GPR17 ligands.

The intrinsic instability of GPCRs outside their natural membrane environment presents an analytical challenge for their extraction, immobilization and use in a SPR/GCI system. Therefore, in an earlier stage of the project [1], a valuable protocol was developed allowing to extract engineered GPR17 from crude membranes, immobilize it on a SPR chip and maintain its stability and binding activity for over 24 h after immobilization. The same procedure was applied in this work and GPR17 was captured from solubilized membrane extracts on the sensor chip through a covalently bound anti-His6 antibody. The maintenance of receptor binding activity was assessed by kinetic analyses of the high affinity antagonist Cangrelor and agonist Atsine 1.

115