



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MEME KANSERİNDE PPAR- γ AGONİSTLERİ VE KEMOTERAPİ
KOMBİNASYONUNUN DİFERANSİYASYON İLİŞKİLİ OLARAK EMT
YOLAĞINA ETKİSİ**

FEYZA BAYRAMOĞLU

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın seviyesi :Yüksek Lisans () Doktora (×)
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Öğrenci : Feyza Bayramoğlu
Tez Başlığı : Meme Kanserinde PPAR- γ Agonistleri ve Kemoterapi Kombinasyonunun Diferansiyasyon İlişkili Olarak EMT Yolağına Etkisi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi
Sınav Tarihi : 09.11.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri		
Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU	İstanbul Üniversitesi	
Prof. Dr. Tuğba TUNALI AKBAY	Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Ahmet BELCE	Biruni Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Feyza BAYRAMOĞLU

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde tecrübesi ile yolumu aydınlatan, çözüm odaklı kişiliği ile zorlu süreçleri kolaylaştıran çok kıymetli Hocam, tez danışmanım, Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na,

Sadece mesleki değil sosyal olarak da yetişmemizi sağlayan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye,

Eğitimime pek çok kez katkı sağlayan, önerileri ile tezime yön veren Hocalarım Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu, Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay, Prof. Dr. Ahmet Belce, Prof. Dr. Hasan Körkaya ve Dr. Öğr. Üyesi Gözde Ülfer'e,

Laboratuvar dönemim boyunca emeklerini, zamanlarını ve dostluklarını esirgemeyen arkadaşlarım başta Dr. Öğr. Üyesi. Çağrı Çakıcı olmak üzere, Şehadet Maşite Şenol, Hatice Sultan Çelik, Zeynep Doğru (M.Sc), Şeyma Çimen (M.Sc) ve Dr. Öğr. Üyesi. Ünsal Veli Üstündağ'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora sürecinde de sevincimle sevinen, üzüntümde yanımda olan çok sevgili annem, babam, kardeşlerim ve sevgileriyle her daim sarmalayan sevgili dedem ve ailemin diğer tüm bireyelerine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Meme Kanseri	5
4.2. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	5
4.3. Meme Kanserinde Histolojik ve Moleküler Sınıflandırma	6
4.4. Meme Kanserinin Tedavisi	8
4.4.1. Lokal tedavi	8
4.4.2. Adjuvan sistemik tedavi	10
4.4.3. Kişiselleştirilmiş tıp	14
4.5. Metastaz	14
4.6. EMT	16
4.6.1. Parsiyal EMT	16
4.6.2. EMT transkripsiyon faktörleri	17
4.6.2.1. Snail	19
4.6.2.2. Slug	19
4.6.2.3. Hipoksi ile indüklenebilir faktör- 1 α (HIF-1 α)	20
4.7. Meme Kanserinde EMT	22

4.8.	Epitelyal Mezenkimal Plastisite (EMP)	24
4.8.1.	Peroxisome proliferator activator receptor- γ (PPAR- γ)	24
4.9.	Warburg Etkisi	25
4.10.	Hücresel Enerji Metabolizması ve Metabolik Akış Analizi	26
5.	MATERYAL VE METOD	29
5.1.	Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	29
5.2.	Adiposit Diferansiyasyonu	31
5.2.1.	Kullanılan hücre hatları	31
5.2.2.	Kullanılan ajanlar	32
5.2.3.	Hücre kültürü deneyleri	35
5.2.4.	3T3-L1 hücre hattında diferansiyasyon	38
5.2.5.	PyMT-1099 hücre hattında diferansiyasyon	39
5.3.	Adipozit Oluşumunun Doğrulanması	40
5.3.1.	Oil Red boyaması ile adipoza farklılaşmanın doğrulanması	41
5.3.2.	Adiponektin ölçümü ile adipoza farklılaşmanın doğrulanması	43
5.4.	Western Blot ile EMT Belirteçlerinin İncelenmesi	45
5.5.	Metabolik Akış Analizi	47
5.5.1.	Kullanılan hücre hatları ve özellikleri	47
5.5.2.	Deney grupları ve plate dizaynı	47
5.5.3.	Metabolik stres modülatörleri	49
5.6.	Kullanılacak istatistiksel yöntemler	56
6.	BULGULAR	57
6.1.	Diferansiyasyon Deneylerinin Sonuçları	57
6.1.1.	Oil Red O boyama sonuçları	59
6.1.2.	Adiponektin konsantrasyonu sonuçları	61
6.2.	Western Blot EMT Belirteçleri Sonuçları	62
6.2.1.	E-Kaderin	62

6.2.2.	N-Kaderin.....	64
6.2.3.	Snail	65
6.2.4.	Slug	67
6.2.5.	Twist.....	68
6.2.6.	HIF-1 α	70
6.3.	Metabolik Akış Analizi Deney Sonuçları.....	71
6.3.1.	Glikolitik stres kiti	71
6.3.2.	Mitokondriyal stres kiti	73
6.3.3.	Enerji fenotipi kiti	75
7.	TARTIŞMA	82
8.	SONUÇ	90
9.	KAYNAKLAR	91
10.	ETİK KURUL ONAYI	107
11.	ÖZGEÇMİŞ	108

KISALTMALAR LİSTESİ

AC: Doksorubisin ve Siklofosamid Kombinasyonu

ADRP: Adiposit Diferansiyasyonu İlişkili Protein

ATCC: Amerikan Type Culture Collection

ATP: Adenosin Trifosfat

ABCB1: ATP Bağımlı Translokaz 1

BRCA: Meme Kanseri İlişkili Gen

BSA: Sığır Serum Albümini

CMF: Siklofosamid/Metotreksat/5-fluorourasil Kombinasyonu

CPT1A: Karnitin Palmitoil Transferaz 1A

CSC: Kanser Kök Hücreleri

CTC: Dolaşımdaki Tümör Hücreleri

DCIS: Duktal Karsinoma İn Situ

DFS: Hastalısız Sağ Kalım (Disease Free Survival)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ECAR: Hücre Dışı Asitlenme Hızı

EMT: Epitelyal Mezenkimal Transizyon

EMP: Epitelyal Mezenkimal Plastisite

ER: Östrojen Reseptörü

ER α : Östrojen Reseptörü Alfa

ET: Endokrin Tedavi

ETZ: Elektron Transport Zinciri

FA: Yağ Asidi

FABP3: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 3

FABP7: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 7

FADH₂: Flavin Adenin Dinükleotit

FAO: Yağ Asidi Oksidasyonu

FCCP: Karbonil Siyanür-4 Fenilhidrazon

FISH: Floresan İn Situ Hibridizasyon

G-CSF: Granülosit Coloni-Stimüle Edici Faktör

GLUT: Glikoz Taşıyıcı

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

HIF-1 α : Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1 α

HIF-2 α : Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-2 α

HKMI:Hızlandırılmış Kısmi Meme Işınlaması

IC50: Yarisını İnhibe Eden Konsantrasyon (Half Maximal Inhibitory Concentration)

IHC: İmmünohistokimya

IL-6: İnterlökin-6

IL-8: İnterlökin-8

LCAD: Uzun Zincirli Asil-Coa Dehidrojenaz

LDH A: Laktat Dehidrojenaz A

MAPK: Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz

MCAD: Orta Zincirli Asil-Coa Dehidrojenaz

MDR1: Çoklu İlaç Direnç Proteini 1

MEK: MAPK Kinaz

MET: Mezenkimal Epitelyal Transizyon

MKC: Meme Koruyucu Cerrahi

NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

OCR: Oksijen Tüketim Oranı

OS: Toplam Sağkalım (Overall Survival)

OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon

p53: Tümör Protein P53

PBS:Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi

PBST:Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi-Tween 20

PDH: Piruvat Dehidrojenaz Kompleksi

PDK-1: Piruvat Dehidrojenaz Kinaz-1

PD-L1: Programlanmış Ölüm-Ligandı 1

PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Subunit Alfa 2 3 5

PMRT: Post Mastektomi Radyo-Terapi

PR: Progesteron Reseptörü

PTEN: Fosfataz ve Tensin Homoloğu

PTX: Paklitaksel

PVDF: Poliviniliden Florid

REMER: Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RPM: Dakikadaki Devir Sayısı

RT: Radyoterapi

RXR: Retinoid X Reseptörü

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel

TAM: Tümörle İlişkili Makrofaj

TCA: Trikarboksilik Asit Döngüsü

TDC: Test Drug Concentration (Test İlaç Konsantrasyonu)



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.6.2.1 Snail, Slug, Twist, ZEB1/2 transkripsiyon faktörlerinin E-Kaderin ile ilişkisi	18
Şekil 4.7.1 Meme kanseri progrezionunda olası EMT-MET süreci ve tümör hücrelerinin geri dönüşümsüz olarak adiposite farklılaşması	23
Şekil 4.10.1 Metabolik akış analizinde, H ⁺ çıkışı ve O ₂ tüketim hızı'nın OCR ve ECAR olarak yansımaları	28
Şekil 5.2.2.1 Roziglitazon'un kimyasal yapısı.....	32
Şekil 5.2.2.2 Trametinib'in kimyasal yapısı	33
Şekil 5.2.2.3 Paklitaksel'in kimyasal yapısı	34
Şekil 5.2.5.1 Kanser ve kontrol hücrelerinin adipoza diferansiyasyonu.....	40
Şekil 5.3.2.1 ADP standart eğrisi.....	45
Şekil 5.4.1 Deney akışı ve EMT belirteçlerinin belirlenmesi.....	46
Şekil 5.5.3.1 Metabolik akış sisteminde kullanılan metabolik modülatörler.....	50
Şekil 5.5.3.2 Seahorse XF96 Bioscience cihazı.....	51
Şekil 5.5.3.3 Glikolitik stres kiti ile oluşturulan ECAR ölçüm grafiği.....	52
Şekil 5.5.3.4 Mitokondriyal stres kiti ile oluşturulan OCR ölçüm grafiği.....	55
Şekil 5.5.3.5 Enerji fenotipi kiti ile oluşturulan OCR ve ECAR ölçüm grafiği	56
Şekil 6.1.1 PyMT-1099 hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....	58
Şekil 6.1.2 3T3-L1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....	59
Şekil 6.1.1.1 Oil Red O ile boyanan lipid dropletlerinin mikroskop görüntüleri	60
Şekil 6.1.2.1 PyMT-1099 ve 3T3-L1 hücrelerinin adiponektin konsantrasyonları ...	61
Şekil 6.2.1.1 E-Kaderin Western Blot sonuçları.....	63
Şekil 6.2.1.2 E-Kaderin Western Blot jel görüntüleri.....	63
Şekil 6.2.2.1 N-Kaderin Western Blot sonuçları.	64
Şekil 6.2.2.2 N-Kaderin Western Blot jel görüntüleri.	65
Şekil 6.2.3.1 Snail Western Blot sonuçları.	66
Şekil 6.2.3.2 Snail Western Blot jel görüntüleri.	66
Şekil 6.2.4.1 Slug Western Blot sonuçları	67
Şekil 6.2.4.2 Slug Western Blot jel görüntüleri.....	68
Şekil 6.2.5.1 Twist Western Blot sonuçları.	69
Şekil 6.2.5.2 Twist Western Blot jel görüntüleri.	69

Şekil 6.2.6.1 HIF-1 α Western Blot sonuçları.....	70
Şekil 6.2.6.2 HIF-1 α Western Blot jel görüntüleri.	71
Şekil 6.3.1.1 PyMT-1099 hücre hattı glikolitik stres test kiti sonuçları.	72
Şekil 6.3.1.2 EMT6 Hücre hattı glikolitik stres test kiti sonuçları	73
Şekil 6.3.2.1 PyMT-1099 hücre hattı mitokondriyal stres test kiti sonuçları.	74
Şekil 6.3.2.2 EMT6 hücre hattı mitokondriyal stres test kiti sonuçları.	75
Şekil 6.3.3.1 PyMT-1099 hücre hattı hücre sel enerji fenotipi sonuçları	76
Şekil 6.3.3.2 PyMT-1099 hücre hattına ait OCR değerleri.....	77
Şekil 6.3.3.3 PyMT-1099 hücre hattına ait ECAR değerleri.	78
Şekil 6.3.3.4 EMT6 hücre hattı hücre sel enerji fenotipi sonuçları.	79
Şekil 6.3.3.5 EMT6 hücre hattına ait OCR değerleri.....	80
Şekil 6.3.3.6 EMT6 hücre hattına ait ECAR değerleri	81

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.3.1 Meme karsinomu histolojik tipleri.....	6
Tablo 4.3.2 Meme karsinomu moleküler sınıflandırılması.....	7
Tablo 5.1.1 Deneyde kullanılan cihazlar.....	29
Tablo 5.1.2 Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler.....	30
Tablo 5.2.1.1 Hücre hatları ve özellikleri.....	32
Tablo 5.2.2.1 Deneyde kullanılan ajanlar ve uygulandıkları dozlar.....	35
Tablo 5.3.1 Standartların hazırlanması.....	44
Tablo 5.5.1 Hücre hatları ve özellikleri.....	47
Tablo 5.5.2 Metabolik akış analizi plate dizaynı.....	48
Tablo 6.1.2.1 PyMT-1099 ve 3T3-L1 hücrelerinin adiponektin konsantrasyonları..	62

1. ÖZET

MEME KANSERİNDE PPAR- γ AGONİSTLERİ VE KEMOTERAPİ KOMBİNASYONUNUN DİFERANSİYASYON İLİŞKİLİ OLARAK EMT YOLAĞINA ETKİSİ

Hücre plastisitesi, metabolik yeniden programlama ile EMT transkripsiyonel düzenlemesi iç içe geçerek kanserin negatif etkilerini potansiyalize etmeleri konusu çok yenidir. Bu çalışmanın amacı meme kanserinde PPAR- γ agonisti (Rosiglitazon), MEK inhibitörü (Trametinib) ve bunların konvansiyonel kemoterapötik ajan olan Paklitaxel (PTX) ile kombinasyonunun diferansiyasyon ilişkili olarak epitelyal mezenkimal transisyon (EMT) yolağına ve hücre enerji metabolizmasına etkisinin ortaya konmasıdır. Çalışmada, yüksek düzeyde metastatik bir fare olan MMTV-PyMT transgenik faresinin meme tümöründen primer hücre kültürü ile izole edilen PyMT-1099 hücreleri ve preadipozitik 3T3-L1 hücre hattı kullanıldı. Çalışma grupları, Negatif kontrol; TGF β ; PTX; TGF β +Rosi+tram; Rosi+Tram; TGF β +Rosi+Tram+PTX'den oluştu. EMT belirteçleri olan E-kaderin, N-kaderin, HIF-1 α , Snail, Slug, Twist western blot tekniği ile değerlendirildi. SeaHorse XF-96 Metabolik akış analizatörü ile hücre enerji fenotipleri değerlendirildi. Rosi+Tram grubunda hücre fenotipi glikolikten enerjetiğe doğru farklılaştı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında Rosi+Tram grubunda; N kaderin, Twist, Slug ve HIF-1 α en düşük düzeyde bulundu. EMT'nin ana regülatör transkripsiyon faktörlerinden biri olan Snail ekspresyonu incelendiğinde, TGF β grubunda, negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunda, negatif kontrol grubuna göre E-Kaderin ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği, ancak N-Kaderin ekspresyonlarının değişmediği görüldü. Sonuç olarak; Rosi+Tram kombinasyonunun hücre plastisitesi, EMT, ve metabolik yeniden programlamaya etkisinin incelendiği çalışmada; Rosi+Tram kombinasyonunun EMT-TF'leri azalttığı, hücre metabolizma-sını glikolitikten enerjetiğe çevirdiği ve Rosi+Tram kombinasyonuna PTX eklenmesi-nin E-kaderini maksimum düzeyde arttırdığı ortaya konmuştur. Bu tez BAP (2021-05) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adipojenez, EMT, Kanser metabolizması, Meme kanseri, Transkripsiyon faktörleri

2. ABSTRACT

EFFECT OF PPAR- γ AGONISTS AND CHEMOTHERAPY COMBINATION ON DIFFERENTIATION-RELATED EMT PATHWAY IN BREAST CANCER

Cell plasticity, metabolic reprogramming and EMT transcriptional regulation have been shown to collectively potentiate the negative effects of cancer in recent studies. The aim of this study is to analyze the effects of Rosiglitazone (Rosi) a PPAR- γ agonist, Trametinib (Tram) a MEK inhibitor and their combination with the conventional chemotherapeutic agent Paclitaxel (PTX) on epithelial mesenchymal transition (EMT) pathway and cell energy metabolism in relation to differentiation in breast cancer. PyMT-1099 primary breast cancer cell line isolated from breast tumor of MMTV-PyMT transgenic mice and pre-adipogenic 3T3-L1 cells were used in this study. Both cell lines were divided into six study groups: Negative control; TGF β ; PTX; TGF β +Rosi+tram; Rosi+Tram; and TGF β +Rosi+Tram+PTX. Western blot was used to evaluate EMT markers E-Cadherin, N-Cadherin, HIF-1 α , Snail, Slug and Twist. Cell energy phenotypes were evaluated with Sea Horse XF-96 Metabolic flow analyzer. In the Rosi+Tram group, the cell phenotype differentiated from glycolytic to energetic. N-Cadherin, Twist, Slug and HIF-1 α were found to be lowest in the Rosi+Tram group compared to the negative control group. Snail expression, one of the main regulatory transcription factors of EMT, was significantly high in the TGF β group compared to negative control. E-Cadherin protein was high expressed in the TGF β +Rosi+Tram+PTX group compared to the negative control group, but there was no change in N-Cadherin in all groups. As a result; it has been shown that Rosiglitazone and Trametinib combination reduces EMT-TFs, changes cell metabolism from glycolytic to energetic, and adding PTX to Rosiglitazone-Trametinib maximally increased E-Cadherin expression. This thesis was supported by BAP (2021-05)

Keywords: Adipogenesis, Breast cancer, Cancer metabolism, EMT, Transcription factors

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri en sık tanı alan kanserdir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en önemli ikinci nedenidir. Meme kanserine bağlı ölümlerin %90'ından fazlası primer tümör ile ilişkili değil de uzak bölgedeki metastazlarından kaynaklanmaktadır. Meme kanseri metastaz mekanizmasının anlaşılması erken tanı ve tedavi için oldukça önemlidir. Non-invaziv tümör hücrelerinin, metastatik potansiyeli olan hücrelere dönüşmesinde etkili olan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak eldeki veriler epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT) benzeri süreçlerin meme kanseri metastazında rol oynayan ana mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir (1).

Epitelyal durumdan mezenkimal duruma geçiş epitelyal mezenkimal transizyon (EMT) olarak adlandırılır (2). EMT, daha mezenkimal bir fenotipe geçiş, artmış plastisite, proliferasyon, kemorezistans ve invazivite ile ilişkilidir (3). Hücreler, epitelyal durumdan mezenkimal (EMT) dönüşebileceği gibi mezenkimalden epitele de (MET) dönüşebilir.

EMT, kanserde hücre plastisitesinin kolaylaştırılmasında önemli bir oynar ve kanser hücrelerinin kemoterapi ve diğer hedefli tedavilerden kaçmasına olanak sağlar. EMT primer tümör invazyonundan sorumlu iken, MET kanser hücrelerinin uzak organlardaki metastazından sorumludur. Bu yüzden terapötik olarak EMT'nin ters çevrilmesi daha zararlı etkiler ortaya çıkarabilir. Ancak MET ve EMT sürecindeki hücrelerin yüksek plastisiteye sahip olmaları terapötik bir avantaja çevrilebilir. EMT çok aşamalı ilerler; epitelyal durumdan başlayarak, parsiyel EMT, farklı fonksiyonel özelliklere sahip tamamen mezenkimal (tam EMT) durumların görülmesi ile sonuçlanır (4). Parsiyel EMT sürecinde hem epitelyal hem de mezenkimal özellikte hücreler görülür (5,6). Parsiyel EMT durumundaki hücreler, çoklu soy farklılaştırma kapasitesi göstererek mezenkimal kök hücre benzeri özellikler göstermiştir (7).

EMT Snail, Slug ve Twist gibi bir dizi transkripsiyon faktörü (EMT-TF'ler) tarafından indüklenir. Hepsi E-Kaderin gibi epitelyal faktörlerin baskılayıcılarıdır ve Vimentin, fibronektin veya N-kaderin gibi mezenkimal belirteçleri aktive ederler (8). Epitelyal belirteçlerdeki azalma ve mezenkimal belirteçlerdeki artma hücrenin EMT'ye gittiğinin göstergesidir (9).

Ishay-Ronen ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; EMT sırasında oluşan plastisite, meme kanser hücrelerini adipositlere farklılaştırmak için kullanılmış ve fonksiyonel adipositler elde edilmiştir. Ancak meme kanserinde normalde kullanılan ajanların, bu dönüşümle kombinasyonunun etkisi bilinmemektedir.

Mezenkimal hücreler, epitel hücrelerinden farklı enerji gereksinimlerine sahiptir. Dolayısıyla, metabolik değişiklikler EMT ile ilişkilidir (10).

Kanser hücrelerinde glikoz alımı ve glikoliz artarken, oksidatif fosforilasyon azalır. Glikolizden sentezlenen pirüvatın laktata dönüşerek ECAR artar Bu metabolik fenotip, Warburg etkisi olarak adlandırılır (9). Meme kanseri hücreleri heterojen hücrel enerji metabolizması gösterir. Hızlı çoğalan meme kanseri hücreleri, hücrel enerjiyi sağlamak için glikolitik fenotip gösterir. Glikolitik fenotipte; yüksek glikoz alımı, düşük oksijen kullanımı, azalmış mitokondrial aktivite gözlenir (11).

Glikolitik fenotipi karşılayan Warburg etkisi sadece tümör büyümesini sağlamak ile kalmaz, aynı zamanda metastazı da kolaylaştırır. Mevcut çalışmalar, Warburg etkisini malignitenin merkezinde konumlandırmaktadır (12).

Oksidatif fenotipte; azalmış glikoz alımı, artmış oksijen kullanımı, artmış mitokondriyal aktivite gözlenir. Sessiz meme kanseri kök hücreleri, oksidatif fenotip gösterir. ATP üretmek için glikoliz yerine daha fazla oksidatif fosforilasyon kullanır (11).

Kombine fenotip; Hem fazla glikoliz hem de fazla Oksidatif fosforilasyonun görüldüğü yüksek metastatik özellik gösterir. Proliferatif kanser kök hücreleri kombine fenotip gösterirler (11).

Hücre plastisitesi, metabolik yeniden programlama ile EMT transkripsiyonel düzenlemesi iç içe geçerek kanserin negatif etkilerini potansiyalize etmeleri konusu çok yenidir. Bu çalışmanın amacı meme kanserinde PPAR- γ agonisti (Rosiglitazon) MEK inhibitörü (Trametinib) ve bunların konvansiyonel kemoterapötik ajan olan Paklitaxel (PTX) ile kombinasyonunun diferansiyasyon ilişkili olarak epitelyal mezenkimal transisyon (EMT) yolağına ve hücre enerji metabolizmasına etkisinin ortaya konmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Kanseri

Meme kanseri; aynı anatomik organı etkileyen ve aynı anatomik bölgeden köken alan, farklı risk faktörleri, klinik görünümler, patolojik özellikler, tedaviye yanıt ve sonuçlara sahip heterojen bir hastalık grubudur (13).

Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en önemli ikinci nedenidir (1). 2019 verilerine göre meme kanseri, ABD'de kadınlar arasında cilt kanserleri hariç en sık teşhis edilen kanserdir ve akciğer kanserinden sonra kadınlar arasında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir (14,15).

Kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri, dünya çapında yaklaşık 1.384.155 yeni vaka ve 459.000 ölümlerle birlikte önemli bir halk sağlığı sorunudur. Meme kanseri, patolojik özellikleri bakımından oldukça heterojendir, bazı vakalar mükemmel prognozla yavaş büyüme gösterirken, diğerleri agresif tümörlerdir. Mevcut tahminler ve istatistikler, hem dünya çapında meme kanseri insidansının hem de meme kanserine bağlı ölüm oranlarının artmakta olduğunu göstermektedir (1).

4.2. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konmuş ve 685,000 meme kanseri ilişkili ölüm görülmüştür (16). 2012 yılına ait GLOBCON verilerine göre 1,7 milyon kadına teşhis konmuş ve 522,000 meme kanseri kaynaklı ölüm görülmüştür. Bu verilere göre meme kanseri insidansında ve buna bağlı ölüm oranlarında artış olduğu görülmektedir (17).

Amerikan Kanser Derneği'ne göre, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki her sekiz kadından birinin yaşamı boyunca bir kez meme kanserine yakalanacağı ve dünya çapında kadın meme kanseri insidansının 2050 yılına kadar yılda yaklaşık 3,2 milyon yeni vakaya ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu rakamlar meme kanseri insidansının

büyükliğini, dünya çapında etkisini ve önleyici ve tedavi edici tedbirler için aciliyeti ortaya koymaktadır (18).

4.3.Meme Kanserinde Histolojik ve Moleküler Sınıflandırma

En yaygın meme kanserinin tipi, invaziv duktal ve invaziv lobüler karsinomlardır (Tablo 4.3.1) (13).

Tablo 4.3.1 Meme Karsinomu Histolojik Tipleri

Histolojik Tip	Prevelans (%) (19)	Prevelans (%) WHO (20)	Prevelans (%) (21,22)	Prevelans (%) (23)
İnvaziv duktal karsinom	65-80	50-80	56.4	78
Osteoklastik dev hücreli karsinom	0,5-1,2			
İnvaziv lobüler karsinom				
Saf tübüler karsinom	5	5-15	16.4	11.1
İnvaziv kribriform karsinom				
Medüller karsinom	<2	<2	4.4	2.2
Müsinöz karsinom	<4	0,8-3,5	0.6	0.3
Nöroendokrin karsinom		2-5		0.0
İnvaziv papiller karsinom	1-2	1-2	0,4	0.7
İnvaziv mikropapiller karsinom	<2.7	<2		
Apokrin karsinom	<1-4	<4		
Metaplastik karsinom	<5	<1		0,2
Lipid açısından zengin karsinom	<1	<1-6		
Salgı kansinomu	Birkaç vaka	<0.15		
Onkositik karsinom		Birkaç vaka		
Adenoid kistik karsinom	Birkaç vaka	0.1		0.1
Asinik hücreli karsinom		Birkaç vaka		
Glikojenden zengin berrak hücreli karsinom	<1-3	1-3		
Sebasöz karsinom		Birkaç vaka		
Karışık tipler			50.6	4.0
Çeşitli			0.6 (Metaplastik ve adenoid kistik karsinom)	0.0 (Taşlı yüzük hücreli karsinom)

Meme kanserinin heterojen yapısı, modern moleküler profillemeye tekniklerinin ortaya çıkmasından çok önce histopatologlar tarafından morfolojik gözlemlerle fark edilmiştir. Sınıflandırma şu ölçütlere dayanıyordu: histolojik tip, tümör derecesi, lenf notlarının durumu, Östrojen reseptörü (ER) ve daha yakın zamanda İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi prediktif belirteçlerin varlığı. DNA mikroarray tekniği kullanılarak moleküler profillemenin geliştirilmesi, bu heterojeniteyi kanıtlamıştır. Moleküler profillemeye ve ERa, progesteron reseptörü (PR) ve HER2'nin immünohistokimyasal ekspresyonu ile meme kanseri; luminal A, luminal B, HER2, bazal ve normal olarak en az beş alt tipte sınıflandırılabilir (Tablo 4.3.2) (24).

Tablo 4.3.2 Meme karsinomu moleküler sınıflandırılması

Sınıflandırma	İmmünprofil	Diğer karakteristikler	Örnek hücre hatları
Lüminal A	ER+, PR+/-, HER2-	Ki67 düşük, endokrin duyarlı, sıklıkla kemoterapi duyarlı	MCF-7, T47D, SUM185
Lüminal B	ER+, PR+/-, HER2+	Ki67 yüksek, genellikle endokrin duyarlı, kemoterapiye karşı değişken, HER2+ trastuzumab duyarlı	BT474, ZR-75
Bazal	ER-, PR-, HER2-	EGFR+ ve/veya sitokeratin 5/6+, Ki67 yüksek, endokrin duyarlı değil, sıklıkla kemoterapi duyarlı	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-Low	ER-, PR-, HER2-	Ki67, E-kaderin, claudin-3, claudinin-4 ve claudinin-7 düşük. Kemoterapiye orta düzeyde duyarlı.	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER-, PR-, HER2+	Ki67 yüksek, trastuzumab duyarlı, kemoterapi duyarlı	SKBR3, MDA-MB-453

Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sinde HER2 pozitifliği görülür. HER2 proteininin over-ekspresyonu ile karakterizedir. HER2 over-ekspresyonu, immünohistokimya (IHC3 +) veya floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile ölçülür. Meme kanserinde, HER2 ve hormon reseptörleri, hedefe yönelik tedavi seçimi için yegâne prediktif faktör olmaya devam etmektedir. PIK3CA (Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Subunit Alfa 2 3 5) veya PTEN'deki (Fosfatase ve Tensin Homoloğu) mutasyonlar gibi diğer faktörler, anti-HER2 tedavisinden yararlanabilecek bir hasta grubunu daha ileri düzeyde seçmek için değerlendirilmiş, ancak henüz rutin klinik uygulamaya girmemiştir (25).

4.4.Meme Kanserinin Tedavisi

Her alt tipin farklı bir prognozu ve tedavi yanıtı vardır. Terapötik hedef ER olduğu için luminal A ve lüminal B alt tipleri hormon terapisine uygundur. Benzer şekilde HER2 grubu, trastuzumab tedavisi için potansiyel adaylardır. Bilinen bir terapötik hedefin ekspresyonunun olmadığı bazal tümörlerin tedavisi zordur, biyolojik olarak daha agresiftir ve genellikle kötü prognoza sahiptir. Bazal fenotip, ERα, PR ve HER2 ekspresyonunun olmaması ile karakterize edildiğinden, bazen triple negatif olarak anılır (26,27). Bazal ve triple negatif fenotiplerde benzerlikler olsa da, terimler kesinlikle birbirleri ile değiştirilebilir değildir. 2011 yılına ait bir incelemede ana hatlarıyla belirtildiği gibi, bazal kanserler için hala birleştirici bir tanım yoktur ve fenotipler aynı değildir (28). İnsan ve fare veri setlerinin sorgulanmasıyla claudin-low alt tipi tanımlanmıştır (29). Başlangıçta ERα (Östrojen Reseptörü alfa), PR ve HER2 ekspresyonları olmadığı ve kötü prognozla ilişkilendiği için bazal alt tip sınıfına alınmıştır. Ancak claudin-3 ve claudinin-4'ün down-regülasyonu, proliferasyon belirteci olan Ki67'nin düşük ekspresyonu, EMT (Epitelyal Mezenkimal Transizyon) ile ilişkili belirteçlerin yüksekliği ve meme kanseri kanser kök hücreleri (CSCs) ile ilişkili özelliklerin ekspresyonu (örneğin CD44+CD24-/düşük fenotip) göstermiştir ki bu tümörler farklıdır (24,30).

4.4.1. Lokal tedavi

Cerrahi: Primer meme kanserinin cerrahi tedavisindeki en büyük değişiklik, yaklaşık 30 yıl önce meme koruma tedavisine geçilmiş olmasıdır. Şu anda, Batı Avrupa'da yeni teşhis edilen kanserlerin %60-80'i meme koruma tedavisine uygundur (geniş lokal eksizyon ve radyoterapi). Tümör boyutu (meme büyüklüğüne göre), tümör çok merkezliliği, çoklu rezeksiyonlardan sonra negatif cerrahi sınırlara ulaşılamaması, göğüs duvarına/memeye daha önceden radyasyon verilmiş olması veya radyoterapi (RT) için başka kontrendikasyonların varlığı ya da hasta tercihlerinden dolayı bazı hastalarda mastektomi halen yapılmaktadır (31).

Meme Koruyucu Cerrahi (MKC): Geniş lokal eksizyon uygulanan hastalar için, cerrahlar genellikle doku yer değiştirme tekniklerini kullanarak onkoplastik yaklaşımlara yönelmektedir (32).

Mastektomi: Mastektomi gerektiren durumlarda çoğunlukla meme rekonstrüksiyonu yapılmaktadır. Bazı durumlarda; tedavinin gecikmesi, rekürrens ve uzun-dönemde zayıf sağkalımla ilişkili olduğu için rekonstrüksiyon önerilmez. Otolog doku-bazlı teknikler genellikle postoperatif RT'yi iyi tolere ederlerken, implant-bazlı rekonstrüksiyonda, postoperatif RT sonrası olumsuz bir estetik sonuç görülebilmektedir (33).

İn Situ Malignite Cerrahisi (İntraepitelyal Neoplazi): Duktal karsinoma in situ (DCIS), net rezeksiyon sınırlarına ulaşılabilmesi koşuluyla total mastektomi veya MKC ile tedavi edilebilir (34).

Risk Azaltıcı Mastektomi: Daha önce lenfoma veya BRCA1 (Meme kanseri ilişkili gen 1) veya BRCA2 (Meme kanseri ilişkili gen 2) gen mutasyonu taşıyıcısı olduğu yüksek risk altındaki kadınlara, risk azaltıcı cerrahi (rekonstrüksiyon ile profilaktik bilateral mastektomi) önerilebilir (35).

Tüm Meme Radyasyon Tedavisi (TMRT): MKC sonrası postoperatif RT şiddetle tavsiye edilir. Tek başına TMRT, 10 yıllık ilk rekürrens riskini (lokal ve uzak bölgeler dahil) %15, 15 yıllık meme kanserine bağlı mortalite riskini ise %4 azaltmaktadır (36). Boost ışınması %50 daha fazla relatif risk azalması sağlar. 50 yaş altı, grade 3 tümörler, yaygın DCIS, vasküler invazyon veya radikal olmayan tümör eksizyonu (fokal olara aksi takdirde daha ileri cerrahi düşünülebilir) gibi lokal kontrol için olumsuz risk faktörlerine sahip hastalar için endikedir (37,38).

Hızlandırılmış Kısmi Meme Işınlaması: Hızlandırılmış kısmi meme ışınlaması (HKMI) kavramı, tedavi süresini önemli ölçüde kısalttığı için önemli bir yaklaşımdır. Meme kanseri ameliyatı sonrası rekürrens riskini azaltmak için uygulanan adjuvan RT'de, tüm memeyi ışınlamak yerine, HKMI uygulanmasının da etkin bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Bunun sebebi kanserin memede çoğunlukla ilk olduğu bölgede ya da yakınında tekrarlıyor olmasıdır. HKMI ile, kanserin ilk olduğu bölgede sınırlandırılarak olası yan etkilerin azaltılması ve tedavinin daha kısa sürede (genellikle yaklaşık 1 hafta) uygulanması mümkündür. Bu tedavi ile ilgili daha net veriler elde edebilmek için halen devam etmekte olan birkaç prospektif randomize HKMI çalışmasının uzun vadeli sonuçları beklenmektedir (39,40).

Post Mastektomi Radyo-Terapi (PMRT): Node-pozitif hastalarda PMRT'nin, 10 yıllık herhangi bir rekürrens (lokal ve uzak dahil) riskini %10 ve 20 yıllık meme kanserine bağlı mortalite riskini %8 azalttığı gösterilmiştir. PMRT'nin faydaları, ilgili aksiller lenf düğüm sayısından ve adjuvan sistemik tedavi uygulanmasından bağımsızdır (41).

Bölgesel Radyo-Terapi: Eski randomize çalışmalarda göğüs duvarını ve tüm bölgesel lenf düğümlerini kapsayan geniş kapsamlı bölgesel RT kullanılmıştır. Yakın zamanda bulunan sonuçlar da özellikle aksiller lenf nodları tutulmuş hastalar için bu yaklaşımı desteklemektedir (42,43,44). Bu nedenle, klinik olarak belirgin lenf nodu relapsları (özellikle aksiller ve internal meme) nadir olmakla birlikte, lenf nodu tutulumu olan hastalarda nodal RT endikedir (45).

4.4.2. Adjuvan sistemik tedavi

Adjuvan sistemik tedaviye ilişkin karar, belirli tedavi türlerine karşı öngörülen duyarlılığa, kullanımlarından sağlanan faydaya ve bireyin nüks riskine dayanmalıdır. Nihai karar ayrıca öngörülen tedavi komplikasyonlarını, hastanın biyolojik yaşını, genel sağlık durumunu, eşlik eden hastalıkları ve tercihlerini de kapsamalıdır. Tedavi ameliyattan tercihen 2-6 hafta sonra başlamalıdır. Veriler, tedavinin cerrahiden 12 hafta sonra uygulandığında sistemik tedavi etkinliğinde önemli bir düşüş olduğunu göstermektedir (46).

Tüm lümen kanserleri ET ile tedavi edilmelidir. En yüksek nüks riski (yaygın nodal tutulum) olanlar hariç çoğu luminal A tümörleri kemoterapi gerektirmezken, luminal B, HER2 (-) kanserler ise kemoterapi endikasyonları ile ilgili en yüksek belirsizliğe sahip popülasyonu oluşturur. Bu alt tipteki kemoterapi endikasyonları bireyin nüks riskine bağlıdır. Tümör boyutu ve agresifliğini düşündüren özellikler (evre, proliferasyon, vasküler invazyon), ET duyarlı olduğunun varsayılması ve hasta tercihleri de değerlendirilmelidir. Düşük endokrin duyarlılığı ile ilişkili özellikler, düşük steroid reseptörü ekspresyonu, PgR ekspresyonu yokluğu, yüksek tümör derecesi ve proliferasyon belirteçlerinin yüksek ekspresyonudur. Luminal B HER2 pozitif tümörler kemoterapi, ET ve trastuzumab ile tedavi edilir. Bu gruptan kemoterapinin çıkarılmasını destekleyen hiçbir randomize veri mevcut değildir. Ancak

küçük, nod negatif tümörlerde tek ajan paklitaksel ve trastuzumab kombinasyonu mükemmel sonuçlar sağlar. Ek olarak, kemoterapi kontrendikasyonu veya hasta reddi durumlarında, seçilmiş vakalarda hedefe yönelik ajanların (ET ve trastuzumab) kombinasyonunun uygulanması kabul edilebilir (46).

Genel olarak kemoterapi ET ile birlikte kullanılmamalıdır. Trastuzumab, rutin olarak non-antrasiklin bazlı kemoterapi ve ET ile kombine edilebilir. Klinik araştırmalar dışında, antrasiklinlerle eşzamanlı kullanım, rutin olarak önerilmemektedir. Çoğu hasta için, ardışık antrasiklin ve ardından taksan-trastuzumab bazlı tedavi rejimi tercih edilmektedir. RT, trastuzumab, ET ve non-antrasiklin non-taksan kemoterapi sırasında güvenle uygulanabilir. Kemoterapi ve RT ayrı olarak uygulanacaksa, kemoterapi genellikle RT'den önce gelir (37).

Endokrin Tedavi (ET): ET, kemoterapi ve/veya hedefe yönelik tedavi kullanımına bakılmaksızın ER (+) olan tüm hastalarda endikedir. Saptanabilir ER ekspresyonu invaziv kanser hücrelerinin $\geq 1\%$ olarak tanımlanmıştır. Ajan seçiminde, primer olarak hastanın menopozda olması, etkinlik ve yan etkiler göz önünde bulundurulur (46).

Premenopozal Hastalar: Tamoksifen 20 mg/gün, 5-10 yıl için standarttır. Tamoksifenin ilk 5 yılında postmenopozal hale gelen hastalarda, bir aromataz inhibitörü olan letrozole geçişin faydalı olduğu görülmektedir (46).

Postmenopozal Hastalar: Postmenopozal hastalarda AI'ler (non-steroidal ve steroidal) ve tamoksifen kullanımı uygundur. AI'lerin genel yaşam ömrü üzerinde önemli bir etkisi gözlenmezken, hastalığa bağlı olmayan yaşam ömrünün uzamasını sağladığı görülmüştür (47,48,49).

Kemoterapi: Triple (-) ve HER2 (+) meme kanserlerinin büyük çoğunluğunda ve ayrıca yüksek riskli lüminal HER2 (-) tümörlerde kemoterapi önerilir. ER(-) tümörlerde, kemoterapiden sağlanan mutlak fayda daha belirgindir (50,51). En sık kullanılan kemoterapi rejimleri antrasiklinler ve/veya taksanları içerenlerdir, ancak seçili hastalarda cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil kombinasyonu (CMF) hala kullanılabilir. Dört siklus doksorubisin ve siklofosfamid (AC), altı siklus CMF'ye eşit olarak kabul edilir. Altı siklus, üç ilaçlı antrasiklin rejimleri tartışmalıdır (52,53).

Taksanların eklenmesi, kemoterapinin etkinliğini yaştan, lenf nodu durumundan, tümör boyutundan veya derecesinden, steroid reseptör ekspresyonundan veya tamoksifen kullanımından bağımsız olarak iyileştirir, ancak yan etki olarak non-kardiyak toksisiteye sebep olur (54,55). Antrasiklinlerin ve taksanların ardışık kullanımı, birlikte kullanımına kıyasla daha etkilidir (56). Bazı veriler, taksan-antrasiklin ardışık kullanımının, geleneksel antrasiklinetaksan birlikte kullanımından daha etkili olabileceğini düşündürmektedir (57). Genel olarak, antrasiklinlere ve taksanlara dayalı kemoterapi rejimleri meme kanseri mortalitesini yaklaşık üçte bir oranında azaltır (52).

Kemoterapi, hastanın rekürens riskine ve seçilen rejime bağlı olarak genellikle 12-24 hafta (dört ile sekiz siklus) uygulanır. Özellikle yüksek oranda proliferatif tümörlerde, yoğun dozlu programların kullanımı (granulocyte colony-stimulating factor [G-CSF] desteği ile) düşünülmelidir. Kök hücre destekli yüksek doz kemoterapi kullanılmamalıdır (46).

HER2'ye Yönelik Terapi: HER2 aşırı ekspresyonu/amplifikasyonu olan hastalarda kemoterapi ile kombine edilen trastuzumab, tek başına kemoterapiye kıyasla nüks riskini yaklaşık olarak yarıya indirerek, uzun vadeli hastalıksız sağ kalımda (disease free survival, DFS) % 10'luk bir artışa ve 10 yıllık toplam sağ kalımda (overall survival, OS) ise %9'luk bir artışa neden olur (58,59,60). Trastuzumab standart olarak 1 yıl uygulanır. Trastuzumab genellikle iyi tolere edebilen bir ilaç olmasına karşılık genellikle geri dönüşümü olan kardiyak disfonksiyona neden olabilmektedir. Hastalar, temel kardiyak fonksiyon testleri (sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile ifade edilen) temel alınarak seçilmelidir. Tedavi sırasında kardiyak fonksiyon periyodik olarak (genellikle her 3-4 ayda bir) izlenmelidir. Trastuzumab, neden olduğu kardiyotoksisite dolayısıyla rutin olarak antrasiklinlerle birlikte uygulanmamalıdır. Taksanlarla kombinasyonu güvenlidir ve ardışık tedaviden daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Trastuzumab, RT ve ET ile de güvenli bir şekilde kombine edilebilir (59).

Neoadjuvan başlanmış tedavide, ikili anti-HER2 blokajlı kemoterapide (trastuzumab + lapatinib, trastuzumab + pertuzumab), bir anti-HER2 ajanlı kemoterapiye kıyasla patolojik tam yanıtta (pathological complete response, pCR) iyileşmeler görülmüştür. Ancak, trastuzumab + lapatinib kombinasyonunun uzun vadeli sonuçlarında iyileşme görülmediği için böyle bir tedavi önerilmemektedir.

Trastuzumab + pertuzumab kombinasyonu için ise, rutin kullanımın önerilmesinden önce adjuvan-Aphinity denemesinden gelecek verilere ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, potansiyel riskler ve faydalar (finansal etki dahil) gözden geçirildikten sonra, bazı yüksek riskli vakalarda neoadjuvan tedavi olarak kabul edilebilir bir seçenek olarak düşünülebilir (61,62,63,64,65).

Bifosfonatlar: Bifosfonatların profilaktik kullanımı, çoğu ülkede resmi olarak onaylanmamasına rağmen, düşük östrojen düzeyine sahip (ovaryum supresyonu veya menopoz sonrası) kadınlarda tartışılabilir, çünkü bu popülasyonlarda bifosfanat kullanımı sonrasında DFS'de uzama ve sağkalımda artış gösterilmiştir. Tedaviye bağlı kemik kaybı olan hastalarda da bifosfonatların iskelet komplikasyonu riskini azalttığı bilinmektedir (66,67,68).

Yaşlı Hastaların Tedavisi: Randomize çalışmalardan elde edilen verilerin kısıtlı olması nedeniyle, bu popülasyonda adjuvan sistemik tedavilerin kullanımına ilişkin güçlü öneriler yapılamamaktadır. Genel olarak, tedavi kararları resmi yaştan ziyade biyolojik yaşa göre alınmalı ve "zinde" yaşlı hastalar, genç muadilleri ile aynı tedaviyi almalıdır. Mümkün olduğunda tam doz ilaçlar kullanılmalıdır (69,70,71).

DCIS İçin Sistemik Adjuvan Tedavi: ER-pozitif DCIS için konservatif olarak tedavi edilen hastalarda, tamoksifen hem invaziv hem de non-invaziv nüks riskini azaltır ve ikinci primer (kontralateral) meme kanseri insidansını azaltır. Ancak OS üzerinde etkisi yoktur. Mastektomi sonrasında, yeni meme tümörü riski yüksek olan hastalarda, tamoksifenin kontralateral meme kanseri riskini azalttığı düşünülmektedir. AI'lerin DCIS için adjuvan tedavide kullanımı araştırılmaktadır, ancak şu anda rutin bakımda kullanılmamalıdır (72,73,74).

Primer (Neoadjuvan) Sistemik Tedavi: Lokal olarak ilerlemiş ve büyük olmasına rağmen cerrahiye uygun tümörlerde, özellikle tümör boyutuna bağlı olarak mastektominin gerekli olduğu durumlarda, primer sistemik tedavi (lokal tedaviden önce), cerrahi alanını azaltabilir. Ameliyat edilebilir vakalarda, tedavi zamanlamasının (postoperatif öncesi) uzun vadeli sonuçlar üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Adjuvan tedavide kullanılan tüm yöntemler (kemoterapi, ET ve hedefe yönelik tedavi) preoperatif olarak da kullanılabilir. Kemoterapi uygulanacaksa, planlanmış tüm tedavilerin gereksiz ara verilmeden, yani tümör yanıtından bağımsız olarak ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası dönemlere bölünmeden uygulanması önerilir. Bu, iyi

prognozun kanıtlanmış bir göstergesi olan pCR elde etme olasılığını artıracaktır. Aynı nedenle HER2 pozitif meme kanserinde trastuzumab tedavisine neoadjuvan olarak başlanmalıdır (55,75,76,77).

4.4.3. Kişiselleştirilmiş tıp

Meme kanseri, onkolojide kişiselleştirilmiş tıbbın öncüsüdür. ER ve/veya PgR ve HER2 durumu, ET veya anti-HER2 tedavisi için hasta seçiminde uzun yıllardır kullanılan belirleyicilerdir. Son yıllarda, biyomarker ekspresyonuna dayalı intrinsik tümör fenotipleri de tedavinin bireyselleştirilmesi için kullanılmaktadır (78).

4.5. Metastaz

Kanser'e bağlı ölümlerin büyük çoğunluğu metastaz kaynaklıdır. Kanser hücrelerinin birincil tümörlerden invazyonu ve ardından uzak dokularda yeni tümör kolonilerini oluşturması, invazyon-metastaz kaskadı olarak bilinen çok adımlı bir süreçtir. Bu olaylar dizisi; birincil tümör hücrelerinin çevre dokulara lokal istilasını, dolaşım sistemine intravazasyonunu ve hematojen geçiş sırasında hayatta kalmasını, uzak dokuların parankimine vasküler duvarlardan ekstravazasyon ve tutulumunu, bu parankimde mikrometastatik kolonilerin oluşumunu ve ardından mikroskobik kolonilerin belirgin, klinik olarak saptanabilir metastatik lezyonlara proliferasyonunu yani kolonizasyonunu içerir (79,80).

Primer tümör oluşumuna yol açan patogenetik mekanizmaları ayrıntılı bir şekilde açıklayan geniş bir veri yığınının olmasına rağmen metastazın altında yatan biyolojik temeller hala tam olarak anlaşılammıştır (79,80).

Meme kanserine bağlı ölümlerin nedeninin %90'ından fazlası primer tümörden değil, uzak bölgedeki metastazlarından kaynaklanmaktadır. Meme kanseri tanısı konduğunda hastaların %6-10'unda, kanser zaten vücudun diğer bölümlerine metastaz yapmıştır. Erken evrede tanı alan meme kanserli hastaların yaklaşık %30'unda da metastatik ya da reküren tip kanser görülmektedir. Meme kanseri metastaz mekanizmasının anlaşılması erken tanı ve tedavi için oldukça önemlidir. Non-invaziv tümör hücrelerinin, metastatik potansiyeli olan hücrelere dönüşmesinde etkili olan

mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak eldeki veriler EMT benzeri süreçlerin meme kanseri metastazında rol oynayan ana mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir (1).

Metastaz, kansere bağlı ölümlerin %90'ından fazlasından sorumludur; Metastazın önlenmesi için yeni klinik yaklaşımlar bulunması bu nedenle oldukça önemlidir. Uzak metastaz için, primer tümör hücrelerinin invaze olması, kan dolaşımı yoluyla yayılması ve uzak bölgede yerleşerek kolonize olması gerekir. EMT'nin anormal aktivasyonu ile farklılaşmanın, kanser hücresinin hareketliliğini ve yayılımını arttırdığı gösterilmiştir (81,82).

Kansere bağlı ölümlerin önemli bir kısmını metastazların oluşturduğu düşünüldüğünde, kanser tedavisinde EMT ile ilişkili yolların farmakolojik olarak hedeflenmesinin önemli bir gelişme olduğu düşünülmektedir. Değerlendirilen tedavi yaklaşımlarından bir kısmı EMT'yi uyaran reseptörlerin inhibisyonuna odaklanmışken bir kısmı da mezankimal hücre fenotipini hedeflemeyi ya da Mezenkimal Epitelyal Transizyonu (MET) bloke etmeyi amaçlar. Bu tedavi yaklaşımlarının hepsi aslında epitelyal plastisiteyi, metastatik veya invaziv hücrelerin dezavantajlı bir özelliği olarak görür (83).

Araştırmacılar ve klinisyenler tarafından primer kanserin tedavisi için; kanser hücresine karşı immün cevabın düzenlenmesi, kanser hücrelerinin iyi huylu hücrelere yeniden programlanması ve kanser kök hücrelerinin doğrudan yok edilmesi olmak üzere 3 ana terapötik strateji belirlenmiştir. Bunlardan kanser hücrelerinin iyi huylu hücrelere yeniden programlanması yeni bir yaklaşımdır. İmmüterapi ve hedefli (targeted) tedaviler, geleneksel kemo-/radyo-terapi ile kıyaslandığında daha iyi bir terapötik performans gösteriyor olsalar da kanser kök hücrelerinin varlığı ve heterojenitenin etkileri hala belirsizliğini korumaktadır. Kanser hücresini yeniden programlamaya dayalı tedaviler kanser hücrelerini, alt tiplerinden bağımsız olarak iyi huylu hücrelere dönüştürme potansiyeli sağlamıştır. Henüz bu tedavinin klinik çalışmaları yapılmamış olsa da ilerlemeler umut vericidir (84,85).

4.6. EMT

Embriyonik gelişim sırasında hücreler yüksek plastisiteyle ve dinamik bir şekilde epitelyal ve mezenkimal durumlar arasında geçiş yapabilirler. Epitelyal durumdan mezenkimal duruma geçiş kısaca EMT, hücre tarafından eksprese edilen adhezyon moleküllerinin düzenlenmesiyle göçmen ve invaziv bir karakter benimsemelerini sağlar. Bu sürecin tersine işlemesine, yani mezenkim hücrelerinin epitel hücrelerine dönüşmesi kısaca MET sürecindeki hücreler hareket yeteneklerini kaybederek göçmen karakterlerinden uzaklaşırlar, epitel doku göstergelerinden olan sıkı bağlantı komplekslerini eksprese ederler (2).

EMT, epitel hücrelerinin apikal-bazal polaritesini kaybettiği, hücre iskeletini modüle ettiği ve hücre-hücre adezyonunda azalma görülen, hücre fenotiplerindeki çok yönlü ve genellikle geri döndürülebilir bir değişikliktir. Hücreler ayrı ayrı veya toplu olarak mezenkimal özellikler kazanabilir, invazyon ve mobilite yeteneklerini artırabilir. Tipik olarak, EMT'nin tamamlanmasından sonra ara filament kullanımında sitokeratinlerden vimentine geçiş gözlenir. Epitel hücrelerindeki kortikal aktin filamentleri de EMT sırasında belirgin bir yeniden düzenlemeye uğrar (8).

MET, embriyonik gelişim (örneğin, kalp gelişimi, böbrek morfogenezi) ve kanser sırasında görülen hücre fenotipidir. EMT'nin tersine uyarılmasıyla hücre fenotipinde karşılıklı değişiklikler görülür. Mezenkimal hücreler apikal-bazal polarite kazanabilir, hücre iskeletini yeniden düzenleyebilir ve artmış hücre-hücre adezyonu göstererek bir epitelyum oluşturabilirler (86,87,88,89,85).

4.6.1. Parsiyal EMT

EMT, embriyonik gelişim ve kanser ilerlemesi sırasında olağanüstü bir hücre fenotipi örneği sağlar (5). EMT'nin çok aşamalı ilerlemesi ve tersine çevrilebilirliği, tam epitelyal, kısmi EMT, kısmi MET ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip tamamen mezenkimal (tam EMT) durumların görülmesi ile sonuçlanır (4).

Embriyonik gelişimde EMT sırasında, epitel hücreleri epitelyal kökenlerinin tüm kalıntıları kaybederler ve tipik olarak kaderin anahtarı olarak adlandırılan tam EMT olarak bilinen tamamen mezenkimal bir fenotip kazanırlar. Tersine, kanser

ilerlemede EMT sırasında, epitelyal hücrelerden kaynaklanan kanser hücreleri, kısmi EMT olarak bilinen bir süreçte hibrit E/M fenotipi olan hem mezenkimal hem de epitelyal özellikler sergiler (5). Kısmi EMT durumlarındaki hücreler, çeşitli derecelerde epitelyal ve mezenkimal fenotipik özellikler ile bulunur ve epitelyal ve mezenkimal hücre belirteçlerinin kombinasyonlarını ifade eder (4).

Kanser hücrelerinde kısmi EMT'nin istilacı özelliklerini geliştirdiği, dolaşan tümör hücreleri ve kanser kök hücreleri ürettiği ve kanser önleyici ilaçlara karşı direnci arttırdığı düşünülmektedir. Bu fenotipik değişiklikler, EMT transkripsiyon faktörleri olarak bilinen çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenleyen hücre dışı matris bileşenleri, eksozomlar ve çözünür faktörler tarafından düzenlenmektedir (5,89,2,90).

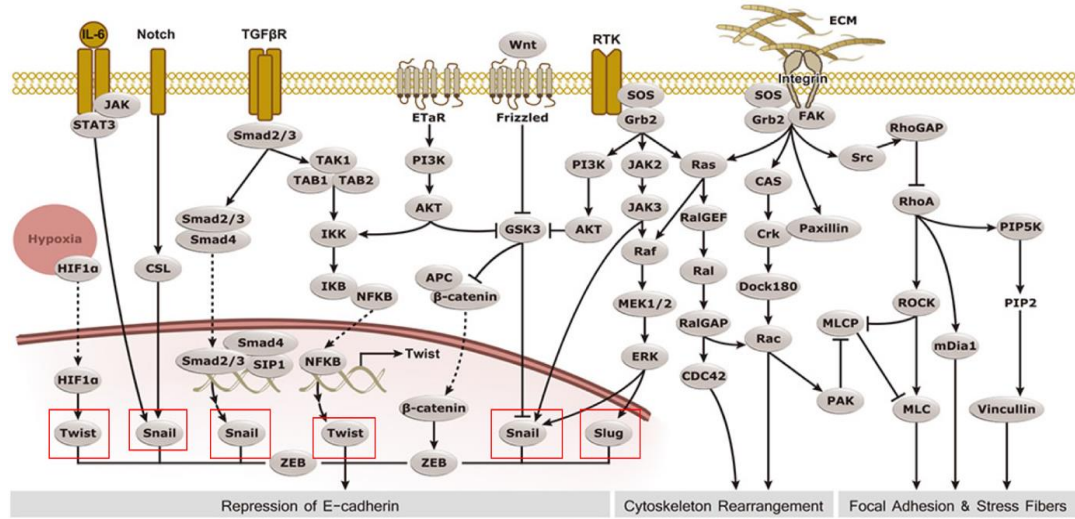
4.6.2. EMT transkripsiyon faktörleri

EMT'ye epitelyal ve mezenkimal belirteçlerdeki değişikliklere bakılarak karar verilmektedir. Epitelyal belirteçlerdeki (E-kaderin) azalma ve mezenkimal belirteçlerdeki (N-kaderin, vimentin) artma hücrenin EMT'ye gittiğinin göstergesidir. Kanser hücrelerinde, EMT biyobelirteçleri arasında yer alan Snail, Slug, Twist, ZEB1/2 gibi transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar. Bu transkripsiyon faktörlerinin tamamı hücrelerarası bağlantıların ana bileşeni olan E-kaderinin baskılayıcılarıdır ve kanser hücrelerinde mezenkimal durumun korunması için gereklidir (9).

Snail, Twist ve Zeb ailelerine ait çeşitli transkripsiyon faktörlerinin, hücre-hücre adezyonunu, hücre migrasyonunu ve ECM degradasyonunu kontrol ettiği ve çeşitli biyolojik ortamlarda ve organizmalarda EMT'nin yürütülmesinde evrimsel olarak korunmuş merkezi roller oynadıkları bulunmuştur. Dikkat çekici bir şekilde, bugüne kadar açıklanan tüm gelişimsel EMT süreçleri, bu çekirdek EMT-TF ailelerinin en az bir üyesini içerir. Diğer transkripsiyon faktörlerinin ise sadece belirli bağlamlarda EMT'yi etkilediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu transkripsiyon faktörleri, proliferasyon, apoptoz veya stemness gibi diğer hücresel süreçlerde de rol oynar. Buna ek olarak EMT-TF'lerin çoğu, fibroblastlardan hematopoetik prekürsörlere kadar pek çok non-epitelyal hücrede, melanom, glioblastoma ve lösemi gibi non-epitelyal kanser türlerinde de ekspres olurlar. Dahası tümör progresyonu sırasında, genellikle klasik EMT aşamalarının ötesinde önemli roller oynarlar. EMT

ile ilişkili tüm transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması için EMT-TF terimi kullanılmasına rağmen, tek başına bunların ekspresyonları EMT'nin meydana geldiğini belirtmek için yeterli değildir (8,90).

İn-vitro ve in-vivo ortamda yapılan EMT çalışmalarında, kanser hücrelerinde E-kaderin seviyesinin düştüğü ve N-kaderin, vimentin gibi mezankimal biyobelirteçlerin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalarda Snail, Slug, Twist ve ZEB1/2 konsantrasyonlarının E-kaderini baskılamak üzere arttığı çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir (91,92). TGFβ, BMP, Wnt-β-catenin, Notch, Hedgehod ve Hipoksi sinyal yolları tarafından uyarılan EMT'de Snail, Slug, Twist ve ZEB1/2, E-kaderini baskılamak üzere yolağın sonunda yer alırlar. Hipoksi yolağında yer alan ve Twist'ten önce gelen HIF-1 α (Hipoksi ile indüklenbilir faktör-1α) tümör hücrelerinin hipoksiye adaptasyonunda anahtar bir rol oynar ve hipoksiye yanıt veren en kritik sinyal yolağıdır. HIF-1 α ile indüklenen EMT, metastazda önemlidir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde HIF-1 α seviyelerinin yükselmesi ile hücrelerin EMT'ye gittiği bulunmuştur.



Şekil 4.6.2.1 Snail, Slug, Twist, ZEB1/2 transkripsiyon faktörlerinin E-Kaderin ile ilişkisi

4.6.2.1. *Snail*

Snail/Slug ailesi, Twist, δ EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 ve E12/E47 dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri, mikro çevresel uyarılara yanıt verir ve EMT programı için moleküler anahtarlar olarak işlev görür. Snail, embriyogenez ve tümör ilerlemesi sırasında EMT'yi kontrol eden bir zing finger transkripsiyonel baskılayıcıdır. RTKs, TGF β , Notch, Wnt, TNF- α ve BMPs yollarını içeren entegre ve karmaşık bir sinyal ağı, snail'i aktive ederek EMT'yi indükler. Artmış Snail ekspresyonu, birçok tümör tipinin tümör derecesi, nodal metastazı ile ilişkilidir ve metastatik kanserli hastalarda kötü prognozu işaret eder. Ortaya çıkan kanıtlar, Snail'in metabolik bir yeniden programlamaya neden olduğunu, tümör hücrelerine kanser kök hücre benzeri özellikler kazandırdığını ve ayrıca ilaç direncini, tümör nüksetmesini ve metastazı desteklediğini göstermektedir (93).

Snail ekspresyonu, metastatik kanserde kötü prognozun yaygın bir işaretidir ve Snail ekspresyonu yüksek olan tümörlerin mevcut terapötik tedavilerle yok edilmesi orantısız bir şekilde zordur (94).

4.6.2.2. *Slug*

Agresif bazal tip meme tümörlerinde sürekli olarak aşırı eksprese edilen Slug, DNA ile diziye özgü etkileşimlere aracılık eden Snail zing finder transkripsiyonel baskılayıcı ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin en çok çalışılan üyeleri, her ikisi de omurgalı türleri arasında korunmuş olan Snail (Snail1) ve Slug'dir. Snail ailesi üyeleri, tümör hücresi istilası ve metastazından hücre hayatta kalması ve çoğalmasına kadar çok çeşitli süreçleri düzenler ve çeşitli kanserlerde anormal şekilde eksprese edilirler.

Snail ve Slug'ın her ikisi de E-kaderin'in promotörüne bağlanabilmesine ve transkripsiyonunu baskılayabilmesine rağmen, Snail bunu Slug'dan daha yüksek verimlilikle yapar. Ayrıca, Snail ve Slug çeşitli tümörlerde anormal şekilde eksprese edilirken, çalışmalar tümör başlangıcı, ilerlemesi ve metastaz ile ilgili farklı roller oynadıklarını göstermektedir.

Moleküler düzeyde, Slug'un EMT'yi düzenlemesi, genellikle epitelyal genin, E-kaderin'in ekspresyonunu transkripsiyonel olarak baskılama yeteneği ile ilişkilidir. Bu fenotipik ve fonksiyonel değişikliklerin kanser hücresinin istilasını ve metastazı kolaylaştırdığı gösterilmiştir.

EMT ile ilgili olarak, tümörjenezin geç aşamalarında, Slug fonksiyonunun inhibe edilmesinin, kanser hücresi istilasını ve metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir (95).

4.6.2.3. Hipoksi ile indüklenebilir faktör- 1 α (HIF-1 α)

Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α (HIF-1 α), kanser hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonunu kolaylaştıran bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 α , anjiyogenez ve vasküler yeniden şekillenmeyi ve oksijen kullanımını düzenleyerek, glikoz metabolizmasını ve redoks homeostazını düzenleyerek oksijen dağıtımını kontrol eder (96).

HIF'ler geniş bir gen aralığını transkripsiyonel olarak kontrol ederek çeşitli hücrel olaylar üzerinde etki gösterir. HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonunun kanserde normal dokulardan daha güçlü olduğu fark edilmiştir (97).

HIF-1 α ve HIF-2 α , tümör proteini p53 (p53) tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümünü bastırır. HIF-1 α , epitelyalden EMT'yi arttırarak kanser saldırganlığını ve metastazı destekler. HIF'ler ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) gibi transkripsiyonel olarak düzenleyen hedef genler yoluyla anjiyogenez ve enerji metabolizmasına katkıda bulunur . HIF'ler tarafından kontrol edilen diğer hücrel olaylar, terapötik direnç ve anti-kanser bağışıklığını içerir. Örneğin, HIF'ler, interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8) ve aynı zamanda çoklu ilaç direnç proteini 1 (MDR1) olarak da bilinen ATP bağımlı translokaz 1 (ABCB1) ekspresyonunu indükleyerek paklitaksel ve gemitabine karşı direnci arttırır. HIF-1 α ve HIF-2 α , sırasıyla programlanmış ölüm-ligandı 1'in (PD-L1) indüklenmesine ve tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ler) infiltrasyonuna yol açarak, anti-kanser bağışıklığını sınırlayabilir (97).

Kanser hücreleri normal hücrelerden daha fazla glikoz kullanır. Hipoksida, glikoz taşıyıcıları (GLUT1 ve GLUT3), glikolitik enzimler (yani heksokinaz 1 ve 2, enolaz 1, fosfogliserat kinaz 1, piruvat kinaz M2) ve LDH A (Laktat Dehidrogenaz A), HIF-1'in transkripsiyonel kontrolü altındadır Normoksida, piruvat, TCA döngüsüne (Trikarboksilik asit döngüsü) girmek için piruvat dehidrojenaz kompleksi (PDH) tarafından asetil-CoA'ya dönüştürülür. Hipoksida, PDH, HIF-1 tarafından indüklenen piruvat dehidrojenaz kinaz-1 (PDK-1) tarafından katalitik alanında fosforilasyon yoluyla etkisiz hale getirilir. PDH'nin inhibisyonu ile birlikte glikoliz indüksiyonu, OXPHOS'tan anaerobik glikolize geçiş ile karakterize edilen tümör hücrelerinde laktat üterimi artar.

Hipoksida glukoz metabolizmasının yeniden programlanması bağlamında, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ekspresyonunun azalması nedeniyle pentoz fosfat yolu aktivitesi de azalır.

Hipoksi altında, HIF-1 ayrıca glikozun glikojene dönüşümünü uyarır, böylece uzun süreli stresten kurtulmak için enerji depolanmasını sağlar (98).

Kanser hücreleri artmış lipid içeriğine sahiptir. Hipoksik koşullarda, HIF-1, lipid damlacık birikimini ve alımını indükler ve β -oksidasyonunu ve yağ asitlerinin biyosentezini yeniden programlar. HIF-1, yağ asidi bağlayıcı proteinler olan FABP3 (Fatty acid binding protein 3) ve FABP7 (Fatty acid binding protein 7) ve damlacık oluşumu için gerekli faktör olan ADRP'yi (Adiposit diferansiyasyonu ile ilişkili protein) indükler. Bu durum ROS'a karşı koruma sağlar ve hipoksi rejenerasyonundan sonra hücre büyümesine ve hayatta kalmasına katkıda bulunur.

HIF-1, orta zincirli Asil-CoA dehidrojenaz (MCAD) ve uzun zincirli Asil-CoA dehidrojenazın (LCAD) inhibisyonu yoluyla mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu (FAO) baskılar, bu da ROS'un azalmasına ve PTEN yolunun baskılanmasına neden olur. HIF-1, mitokondriyal Kompleks I, Kompleks II'nin azalmasına neden olur, ve hipoksik durumda elektronları oksijene transfer etmede Kompleks IV aktivitesini iyileştirir, böylece ROS üretimini düşürür ve membran potansiyelini korur. Böylece tümör hücrelerinin çoğalmasını teşvik eder. Mitokondriyal yağ asidi (FA) taşınmasının hız sınırlayıcı bileşeni olan karnitin palmitoiltransferaz 1A (CPT1A) HIF-1 ve HIF-2 tarafından baskılanarak mitokondriye taşınmanın azalmasına ve yağ asitlerinin lipid damlacıkları oluşumuna zorlanmasına neden olur (98).

4.7. Meme Kanserinde EMT

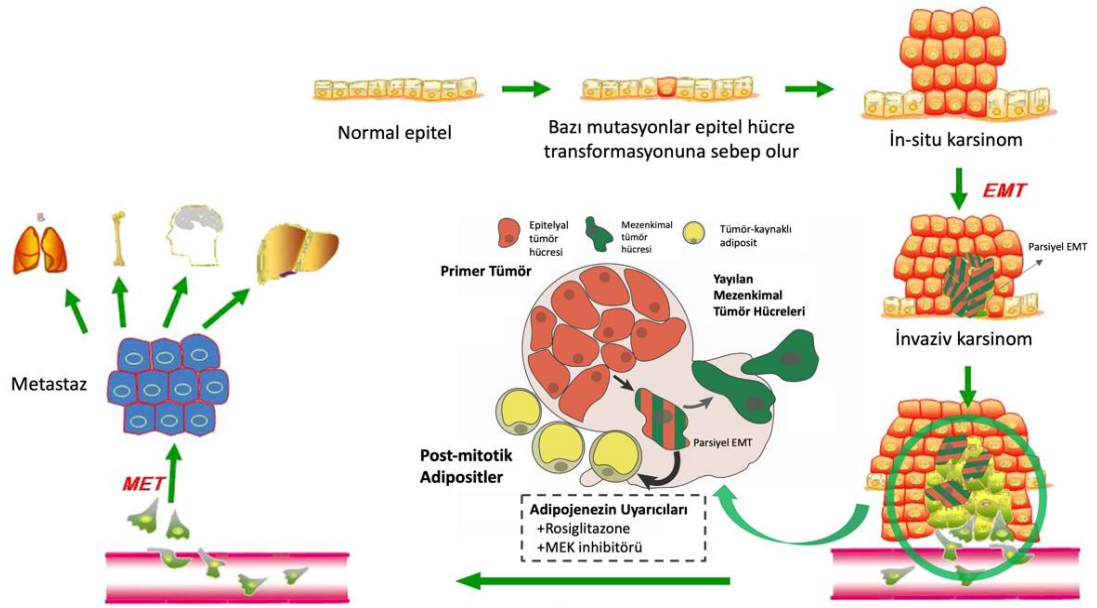
EMT embriyonik gelişim sırasında farklı doku ve organların oluşması için, çeşitli hücreler tarafından gerçekleştirilen fizyolojik bir süreçtir. Yetişkinlerde ise normal şartlar altında sadece yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve organ fibrozunda görülür (3).

Bazı bakış açılarına göre EMT, iki durum arasındaki geçiş sırasında belirli özelliklerin kazanılması ya da kaybedilmesi olarak tanımlanır. Bu nedenle, çoğu deneysel model EMT'yi doğrulamak için belirli epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyonundaki dramatik değişiklikleri dikkate alma eğilimindedir. E-kaderin, okludinler ve sitokeratinler epitelyal durumu gösteren, N-kaderin ve vimentin ise mezenkimal durumu gösteren en yaygın kullanılan belirteçlerdir. Şimdilerde EMT tanımı birçok gözlem ve özellikle parsiyel EMT verileri ışığında genişletilmiştir. Ara hibrit epitelyal ve mezenkimal fenotiplerin varlığı ile ortaya çıkan parsiyel EMT durumunun, birçok gelişimsel süreç, yara iyileşmesi, fibroz ve kanser süreçleri ile bağlantılı olduğu kaydedilmiştir (2).

EMT, daha mezenkimal bir fenotipe geçiş, artmış plastisite, proliferasyon, kemorezistans ve invazivite ile ilişkilidir (2). Hücreler, epitelyal durumdan mezenkimale dönüşebileceği gibi mezenkimalden epitele de dönüşebilir. Doku bütünlüğü ve homeostatik dengenin korunması için gelişmiş organlardaki epitelyal hücrelerde EMT'nin sıkı bir şekilde denetlenmesi mecburidir. Transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, posttranslasyonel ve epigenetik gibi hücresel programların karmaşıklığı EMT regülasyonunun önemini artırır. Meme kanseri epitelyal kökenlidir ve kanser progresyonu sırasında epitelyal plastisite artabilir. Gerçekten de bu mekanizmalar kanser hücresi tarafından tümör büyümesi, kanser hücresinin yaşaması ve metastaz için kendi yararları doğrultusunda çok sık kullanılır. EMT fenotipi sergileyen kanserler, ilaç direnci gelişimine, metastaza ve zayıf sağkalıma yatkın olduğu için klinik olarak zorlayıcıdır (83,99). EMT fenotipi gösteren meme kanseri de bu gruba girmektedir (100).

EMT, kanserde hücre plastisitesinin kolaylaştırılmasında önemli bir rol oynar ve kanser hücrelerinin kemoterapi ve diğer hedeflenmiş tedavilerden kaçmasına olanak sağlar. EMT primer tümör invazyonundan sorumlu iken, MET kanser hücrelerinin uzak organlardaki metastazından sorumludur. Bu yüzden terapötik olarak

EMT'nin ters çevrilmesi daha zararlı etkiler ortaya çıkarabilir. Ancak MET ve EMT sürecindeki hücrelerin yüksek plastisiteye sahip olmaları terapötik bir avantaj sağlayabilir. Farklılaştırılmamış meme epitel hücrelerinde EMT, çoklu soy farklılaştırma kapasitesi göstererek mezenkimal kök hücre benzeri özellikler göstermiştir (7). Hüresel plastisite kavramı ilk olarak Gurdon ve ark. tarafından önerilmiş ve terminal olarak farklılaşmış somatik hücrelerin, diğer soylara yeniden programlanabileceği doğrulanmıştır (84). Kanser hücresi plastisitesi, hücrenin eksternal sinyallerle tetiklenen dinamik değişikliklere verdiği adaptasyon yanıtı olarak tanımlanabilir. Hüresel plastisite, kanser hücresi canlılığında, invazyonunda ve metastaz oluşumunda kritik bir rol oynadığı gibi tümörün heterojen yapısından ve tedavi direncinden de sorumludur. Kanser hücresi plastisitesi dinamiktir ve mikroçevredeki küçük değişikliklerden etkilenebilir. 2019 yılında yapılmış bir çalışmada EMT sırasında oluşan plastisite sayesinde, klasik EMT süreci yönlendirilmiş ve metastatik meme kanseri hücreleri adipositlere dönüştürülmüştür (7) (Şekil 4.6.1.)



Şekil 4.7.1 Meme kanseri progrediyonunda olası EMT-MET süreci ve tümör hücrelerinin geri dönüşümsüz olarak adiposite farklılaşması. Normal epitel hücreleri bir dizi değişikliğe uğrayarak malign tümör hücresine dönüşür. Malign hücrelerin klonal proliferasyonu sonucu invaziv karsinoma oluşur. Bu hücrelerin bazıları EMT'ye uğrar ve komşu lenf ya da kan damarlarına geçer. Bu hücreler kan damarlarında dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) olarak kalabilir ya da uzak bölgelerde MET'e uğrayarak makrometastaz oluştururlar (1).

4.8. Epitelyal Mezenkimal Plastisite (EMP)

Epitelyal mezenkimal plastisite (EMP), 2020 yılında “The EMT International Association” (TEMTIA) tarafından yayınlanmış olan konsensusta, hücrelerin, karışık E/M özelliklerine adapte olabilmeye ve ara E/M fenotipik durumları arasında dönüşüm yapma yeteneğini tanımlamak için kullanılması önerilen bir terimdir. Bu plastisite, parsiyal EMT, hibrid E/M durumu, yarı kararlı metastatik EMT durumu, EMT sürekliliği ve EMT spektrumu gibi değişik şekillerde isimlendirilmiştir. Farklı şekillerde isimlendirilmiş olsalar da hepsinin ortak özelliği, hücrelerin aynı anda epitelyal (sitokeratinler gibi) ve mezenkimal (hücre migrasyonu gibi) özellikler göstermesi ve karışık markerlar ekspresyon etmesidir (87,101).

EMP, farklı biyolojik bağlamlarda, farklı durumların stabilitesi değişikliği gösterse de, bu çeşitli durumlar arasında kolayca hareket etme yeteneğini gösterir. EMP; gelişimsel süreç, yara iyileşmesi ve kanserde yaygın olarak gözlenmektedir.

EMP ayrıca, EMT programının tersine çevrilebilirliğinden de sorumlu tutulur. EMT'ye giden epitel hücreleri, farklı oranlarda epitel ve mezenkimal özelliklere sahip MET'e gitme potansiyeli olan hücre popülasyonunda artışa yol açar. EMP'nin hücrelere, gelişimsel veya patolojik süreçler sırasında çeşitli gereksinimleri yerine getirmek için uygunluk ve esneklik sağladığı düşünülmektedir (87,99,102).

4.8.1. Peroxisome proliferator activator receptor- γ (PPAR- γ)

Peroxisome proliferator activator receptor- γ (PPAR- γ) adipozit-spesifik nükleer hormone reseptörüdür. Adipojenez regülatörü olan PPAR- γ ekspresyonu kanser hücresi adipojenezinde de artmaktadır. Rosiglitazon gibi PPAR γ agonistlerinin hücrelerel diferansiyasyonu uyarmak için kullanıldıkları bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada tek başına Rosiglitazon ve diğer PPAR- γ agonistlerinin sınırlı bir etkisi olduğu görülmüş, Rosiglitazonun MEK inhibitörleriyle birlikte, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak epitelyal farklılaşmayı ve adipojenezi arttırdığı gösterilmiştir (103).

Son on yılda, adipojenezde yer alan bir nükleer reseptör olan peroksisom proliferatörü ile aktive olan reseptör γ (PPAR γ), meme kanseri hücrelerinde de ikili bir etki yoluyla anti-tümör etkileri nedeniyle meme kanseri tümörojenezinde dikkat

çekmiştir. Retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerizasyonundan sonra ligandlara bağlanan PPAR γ , PPAR yanıt elemanları (PPRE'ler) olarak adlandırılan DNA dizi elemanlarına bağlanarak çoklu hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Farklı çalışmalar, sırasıyla omega (ω)-3 çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ve tiazolidindionlar (TZD'ler) gibi doğal veya sentetik ligandlar tarafından PPAR γ 'nin aktivasyonunun, farklı meme kanseri hücrelerinde meme kanseri hücre büyümesini, göçünü ve istilasını azalttığını bildirmiştir (104,105,106).

Ayrıca, makrofajlar ve fibroblastlar dahil olmak üzere tümör mikroçevresinin (TME) çeşitli hücrelerinde PPAR γ 'nin aktivasyonu, daha az agresif fenotiplere doğru bir kaymayı indükler, böylece meme kanseri ilerlemesini engeller (107).

4.9. Warburg Etkisi

Normal hücrelerde hemen hemen tüm ATP (Adenosin Trifosfat) mitokondriyal oksidatif aktivite tarafından üretilerek ATP'ye bağlı reaksiyonlar için kullanılırken, tümör hücrelerinde oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi düşüktür ve glikozun glikolitik fosforilasyonu artmıştır (108). Kanser hücrelerinde glikoz alımı ve glikoliz artarken aynı zamanda glikoliz, mitokondriyal TCA döngüsünden ve oksidatif fosforilasyondan (OXPHOS) ayrılır. Sonuç olarak, glikolizden türetilen piruvatın çoğunluğu laktat fermentasyonuna yönlendirilir ve mitokondriyal oksidatif metabolizmadan uzak tutulur. Bu metabolik fenotip, Warburg etkisi olarak bilinir (109). Warburg etkisi, mitokondriyal solunumdaki bir hasar tarafından tetiklenen oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize metabolik geçişi tanımlamaktadır (110).

Hücreler, metastatik süreç sırasında hücre dışı matrislerini değiştirir veya kaybeder. Yetersiz/uygun olmayan matris bağlanması, reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. ROS, oksidatif metabolizmanın doğal yan ürünleri olduğundan, kanser hücrelerinde glikoz oksidasyonunun aşırı uyarılması OS'i artırır (109). Warburg etkisi, mitokondriyal oksidatif metabolizmaya sınırlayarak kanser hücrelerinin mitokondriyal solunumdan ve ROS oluşumundan kaçınmasını sağlar. Aynı zamanda artan glikolitik ara ürünlerin hücre proliferasyonu ve tümör büyümesi için temel anabolik destek sağladığı düşünülmektedir (109). Warburg etkisi tümör büyümesini sağlamanın

yanında, kanser mortalitesinin birincil nedeni olan metaztazı da arttırır. Kanser hücrelerinin temel metabolik özelliği olan Warburg etkisi çoğunlukla geri dönüşümlüdür ve bu özelliği onun tedavi hedefi olmasının nedenini oluşturmaktadır (12).

Ters warburg etkisi, kanser hücreleri ile komşu stromal hücreleri veya kanserle ilişkili fibroblastlar arasındaki metabolik ilişkiyi tanımlamaktadır. Kanser hücrelerinde aşırı salgılanan H_2O_2 (Hidrojen peroksit) fibroblastlarda OS artışına ve mitokondrielerde fonksiyon kaybına neden olur. Artan aerobik glikoliz laktat artışını sağlar. Laktat, monokarboksilat taşıyıcıları ile kanser hücresine taşınır. Hipoksik veya aerobik koşullardan bağımsız olarak üretilen bu laktat, kanser hücreleri için birincil metabolik yakıt görevi görür. Ayrıca, çeşitli yollarla malignitenin ilerlemesini ve metastazını destekleyen bir tümör mikro ortamı yaratır (110).

4.10. Hüresel Enerji Metabolizması ve Metabolik Akış Analizi

Hüresel metabolizmanın birincil çıktısı, ATP formundaki kimyasal enerjidir. Bir hücrede ATP üreten başlıca biyoenerjetik yollar mitokondriyal olmayan glikoliz ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyondur. Glikolitik yol ile pirüvata kadar gelen glikoz, stoplazmada laktata indirgenir ya da mitokondriye geçerek Asetil KoA'ya dönüşür. TCA'da elde edilen yüksek enerjili bileşikler olan NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit) ve $FADH_2$ (Flavin adenin dinükleotit), elektron transport zincirinde (ETZ) kompleks I, III ve IV içinden hücreler arası boşluğa H^+ iyonlarının atılımını sağlar. Bu arada iç mitokondri membranında kompleksler üzerinden ilerleyen elektronlar oksijene aktarılır. Oksijenin hidrojen ile birleşmesi sonucu su meydana gelir. Membranlar arası boşluktan kompleks V üzerinden matrikse dönen hidrojenler ADP ve P'in birleşmesi neticesi ATP oluşumunu sağlar (111). (Şekil 4.10.1).

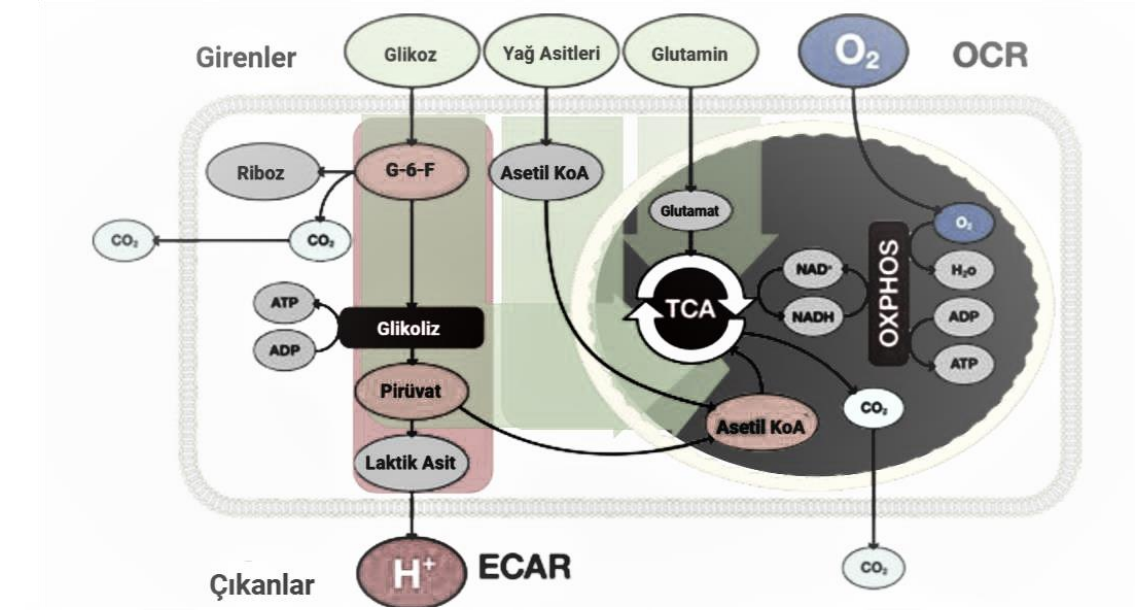
Malignitede hızla çoğalan hücrelerin enerjik ve metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için, metabolizmalarını yeniden programladıkları bilinmektedir. Hızlı çoğalan kanser hücreleri, yetersiz vaskülarisyon, hipoksi ve hızlı enerji ihtiyacının olduğu ortamda aerobik glikolize yönelirler. Artan Glikoliz sonucu laktik asit üretimi, mikro-çevresel asidoz ile sonuçlanır. Çevresel asidoz, hücre dışı matrisin

bozulması ve anjiyogenezin teşvik edilmesi yoluyla istilayı kolaylaştırır. Glikolitik fenotip, istilacı kanser hücreleri için güçlü bir büyüme avantajı sağlar (112).

Oksidatif fosforilasyon ve glikoliz gibi enerji üreten yolların durumlarını gerçek zamanlı olarak değerlendirmek için, hücre metabolizmasının temel parametrelerini, yani hücre dışı asitlenme oranı (ECAR) ve oksijen tüketim oranı (OCR) kullanılır. ECAR, ölçülen pH'dan belirlenirken OCR, ölçülen O₂ seviyesinden belirlenir. ECAR genellikle glikolitik metabolizmanın bir ölçüsü olarak kullanılırken, OCR oksidatif fosforilasyonun ölçüsüdür (113).

Deneyde kullandığımız Seahorse XF 96 ekstrasellüler akış analizörü; hücre kültüründeki canlı hücrelerin OCR ve ECAR'ını ölçmek için hızlı ve güvenilir bir metodolojidir. Böyle bir ekipman OCR ve ECAR'daki değişiklikleri hızla karşılaştırabilir hücre tipleri arasında veya farklı stimülasyon koşulları karşısındaki değişimleri ortaya koyabilir (111).

Ek olarak, metabolik akış teknolojisi, mitokondrinin biyoenerjetik özellikleri ve fonksiyonel durumu hakkında da bilgi sağlayabilir. Örneğin, mitokondriyal zehirler, bir hücrenin biyoenerjetik esnekliğini, ETC komplekslerinin aktivitesini ve maksimum solunum kapasitesini anlamak için kullanılabilir (113).



Şekil 4.8.10.1 Metabolik akış analizinde, H⁺ çıkışı ve O₂ tüketim hızı'nın OCR ve ECAR olarak yansımaları. OCR:Oksijen tüketim oranı; ECAR: Hücre dışı asitlik oranı.

5. MATERYAL VE METOD

Çalışmamız İstanbul Medipol Üniversitesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu tarafından 22.01.2020 (Karar no: 04) tarihinde onaylanmıştır. Çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı ve Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) gerçekleştirildi.

5.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Tablo 5.1.1 Deneyde kullanılan cihazlar

Kullanılan Gereçler	Marka- Ürün Kodu-Katalog Numarası
Santrifüj	Nüve -NF-048
Soğutmalı Santrifüj	Nüve- NF-400R
Su Banyosu	Nüve- NB-20
Multi-Therm shaker	Benchmark Scientific- H500-HC
Vortex	Benchmark Scientific- BV100
Spin-Down Mini santrifüj	Sprout
Qubit 2.0 Fluorometer	ThermoFisher
Yarı otomatik pipet seti	Eppendorf
Kimyasal Dolabı	Asecos
pH metre	Isolab- pH7110
Distile Su Cihazı	Millipore
LC-Vial	Sigma-Aldrich-29413-U
+4 Dolabı	Uğur
-20 Dolabı	Thermo Scientific
-80 Dolabı	ESCO

Hassas Tartı	Ohaus Explorer
Manyetik Karıştırıcı	Benchmark Scientific
Laminar Flow	ESCO
Inverted Mikroskop	Zeiss Primovert Axiocam 208 color
Neubauer – improved Hücre Sayım Lamı	Isolab
Pipet Adaptörü	Isolab
Otomatik Pipet Seti	Gilson
Multimod Plate Reader	Synergy HTX, BioTek

Tablo 5.1.2 Deneide kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler

Kullanılan Gereçler	Marka- Ürün Kodu-Katalog Numarası
3T3-L1 cell line	ATCC- CL-173
D-MEM (HG) W/NA PYR (CE) 500 ml	GIBCO-41966029
TRYPsin 0.25% EDTA 100 ML	GIBCO-25200056
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Thermo Scientific
L-Glutamin	Thermo Scientific
Penisilin-Streptomisin (10.000U/mL)	Thermo Scientific
Phosphate Buffered Saline, pH 7.4	SIGMA
Trypan Blue	SIGMA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	SIGMA- M5655
Paklitaxel	Ebetaxel
Rosiglitazone 1 gr	ADIPOGEN- AG-CR1-3570-G001
Insulin Solution from bovine pancreas	SIGMA- I0516-5ML
Mouse adiponectin, ADP Elisa Kit	BT-LAB- E0246Mo
Transforming growth factor B1 human	SIGMA- H8541-5UG
Trametinib 50 mg	CAYMAN-16292
Calf Bovine Serum	ATCC-30-2030
Gentamicin Solution	SIGMA- G1397-10ML
Click-IT EdU Cell Proliferation Kit for imaging, Alexa Fluor 488 dye	Thermo Scientific- C10337

Lipolysis Assay Kit, Colorimetric	ABCAM- ab185433
4-20% mini protean TGX precast protein gels	BIORAD-4561096
Clarity Western ECL substrate, 200 mL	1705060
Qubit® Protein Assay Kit	ThermoFisher- Q33211
Qubit® Assay Tubes	ThermoFisher- Q32856
Qubit 2.0 Fluorometer	ThermoFisher
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kiti	AGILENT
Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kiti	AGILENT
Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test Kiti	AGILENT
Seahorse XF Media ve Kalibrant solüsyonu	AGILENT

5.2. Adiposit Diferansiyasyonu

5.2.1. Kullanılan hücre hatları

Bu çalışmada, EMT çalışmalarında kullanılan temel hücre hattı olan PyMT-1099 hücre hattı ve American Type Culture Collection (ATCC)'den ticari olarak satın alınan 3T3-L1 (ATCC® CL-173) pre-adipozitik fibroblast hücre hatları kullanıldı. Yüksek düzeyde metastatik bir fare olan MMTV-PyMT transgenik faresinin meme tümöründen primer hücre kültürü ile izole edilen PyMT-1099 hücreleri Prof. Dr. Hasan Körkaya'nın laboratuvarından temin edildi. PyMT-1099 hücreleri, TGFβ ile işleme tabi tutulduğunda geri-dönüşümlü EMT'ye uğradığı için tercih edilmektedir. Bu model EMT-uyarılı kanser hücre plastisitesi çalışmalarında kullanılan temel fare-metodudur ve altın standart olarak kabul edilmektedir (114). Hücre hatlarına ait özellikler Tablo 5.21.1'de görülmektedir.

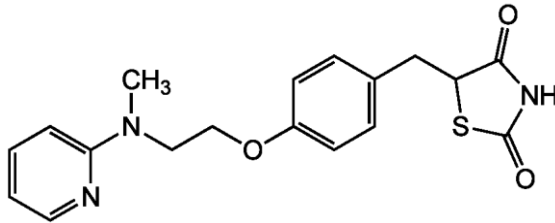
Tablo 5.2.1.1 Hücre hatları ve özellikleri

Hücre Hattı	İmmün Profili	Organizma	Özelliği
3T3-L1		<i>Mus-musculus</i> , Mouse	Pre-adipozitik fibroblast hücre hattı. Farklılaşma ajanları ile adipozite dönüşür.
PyMT-1099	HER2(+) E.R(-) P.R(-)	<i>Mus-musculus</i> , Mouse	Yüksek düzeyde metastatik bir fare olan MMTV-PyMT transgenic faresinin meme tümöründen izole edilen hücreler, epitelyal karakterdedir. TGFβ ile birlikte farklılaştırma ajanları kullanıldığında adipozite hücrelerine dönüşür.

5.2.2. Kullanılan ajanlar

Rosiglitazon

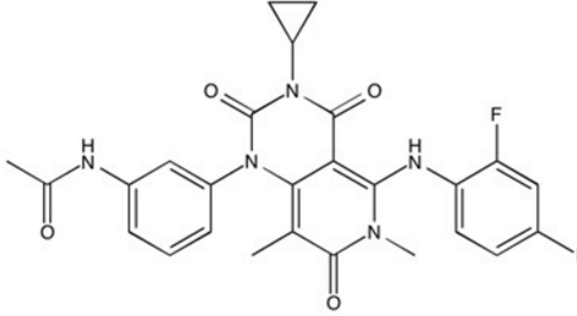
Rosiglitazon, thiazolidinedione sınıfından bir anti-diyabetik ilaçtır. Tip 2 (insüline bağımlı olmayan) diyabetli hastaların çoğunda temel metabolik anomali olan insülin duyarlılığını artırır (115). Güçlü bir PPAR- γ agonistidir (116). PPAR γ agonistleri, çeşitli dokularda gelişimi ve hücreSEL büyümeyi ve metabolizmayı düzenler. Özellikle, potansiyel anti-tümör etkilerinin incelenmesine yol açan adipozite farklılaşmasına aracılık ederler (117).



Şekil 5.2.2.1 Rosiglitazon'un kimyasal yapısı

Trametinib

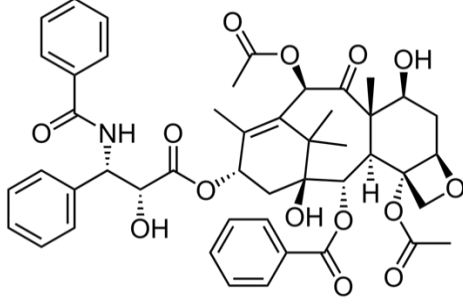
Trametinib, antineoplastik aktiviteye sahip bir mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK) inhibitörüdür. Spesifik olarak MEK1 ve MEK2'ye bağlanır ve büyüme faktörü aracılı hücre sinyalleşmesinin ve hücresel proliferasyonun inhibisyonunu sağlar (118).



Şekil 5.2.2.2 Trametinib'in kimyasal yapısı

Paklitaksel

Paklitaksel, tanımlanan ilk mikrotübül stabilize edici ajandır. Replikasyonun G2/M aşamasında somatik hücre mitozunu durdurur. Keşfi son 20 yılda kemoterapideki en önemli ilerleme olarak görülmektedir. Mikrotübüller, hücre iskeletinin ana bileşenlerini oluşturan uzun, filamentli ve tüp şeklindeki protein polimerleridir. Hücre şeklinin gelişiminde ve korunmasında, hücre içi taşımada, hücre sinyalizasyonunda ve hücre bölünmesi ve mitozda rol oynadıkları için tüm ökaryotik hücreler için esansiyellerdir. Mikrotübüller, ince filamentli tüpler şeklinde düzenlenmiş α -tubulin ve β -tubulin heterodimerlerinden oluşur. Mikrotübül işlevini değiştiren ilaçlar, antimikrotübül ilaçlar olarak bilinir. Bu ilaçlar mikrotübül-destabilize edici ajanlar ve mikrotübül-stabilize edici ajanlar olmak üzere genellikle iki tipte sınıflandırılır. Paklitaksel, mikrotübüldeki β -tubulin alt biriminin N-terminal 31 amino asidine bağlanır. Hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış N15 hücrelerinde β -tubulinin fosforilasyonunu uyarır. Bu bağlanma, mikrotübülü stabilize eder ve hücre ölümüne yol açan mikrotübül polimerizasyonunu artırır (119,120,121,122).



Şekil 5.2.2.3 Paklitaksel'in kimyasal yapısı

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β)

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β), hücre büyümesini ve farklılaşmasını, apoptozu, hücre hareketliliğini, hücre dışı matris üretimini, anjiyogenezi ve hücre bağışıklığı düzenler. Kanserde paradoksal bir rolü vardır. Erken evrelerde hücresel dönüşümü engelleyerek kanserin ilerlemesini engeller. Daha sonraki aşamalarda TGF β , başlıca 3 mekanizma aracılığıyla tümörün ilerlemesini teşvik etmede önemli bir rol oynar: epitelyalden mezenkimal geçişi kolaylaştırmak, anjiyogenezi uyarmak ve immünosupresyonu indüklemektir (123). TGF β , EMT'yi teşvik ederek hücre istilasını, anjiyogenezi ve metastatik ilerlemeyi artırır. Ortaya çıkan kanıtlar, TGF β 'nin bağışıklık tepkilerini bastırdığını, fırsatçı kanser hücrelerinin bağışıklık kontrol noktalarından kaçmasına ve metastazları teşvik etmesine olanak tanıdığını gösteriyor (124). Tümör baskılayıcı yeteneklerinin bir sonucu olarak, TGF β ve yolu, ilaç geliştirme için potansiyel fırsatları temsil etmiştir ve TGF β yolunu hedefleyen çeşitli terapiler tanımlanmıştır (123).

PyMT hücrelerinin farklılaşması için gerekli olan ajanlar rosi tram ve TGF β b'dir. Ronen ve ark.nın yaptığı çalışmada PyMT hücrelerinin farklılaşması için gerekli olan en etkili dozlar bulunmuştur (7). 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşması için rosi deksametazon ve insülin kullanılmıştır (125). (Tablo 5.5.2.1)

Tablo 5.2.2.1 Deneyde kullanılan ajanlar ve uygulandıkları dozlar

Kullanılan Ajan	Uygulanan Doz
Rosiglitazon	2 µM (7)
Trametinib	0,5 ng/ml (7)
TGFβ	2 ng/ml (7)
Paklitaksel (PTX)	2,5 µM (126)
İnsülin	5 µg/ml (125)
Deksametazon	1 µM (125)

5.2.3. Hücre kültürü deneyleri

Bu çalışmada, PyMT-1099 meme kanseri hücre hattı ve 3T3-L1 pre-adipozitik fibroblast hücre hatları kullanıldı (Tablo 5.2.1) .

PyMT-1099 hücreleri deneylerde kullanılmak üzere %10 fetal sığır serumu (EU-Approved, Thermo Fisher) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Thermo Fisher) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (HG) W/NA PYR (CE) (Thermo Fisher)'dan oluşan kültür ortamında 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında 25 cm²'lik hücre kültür flasklarında inkübe edilerek çoğaltıldı.

3T3-L1 hücreleri deneylerde kullanılmak üzere %10 calf serumu (EU-Approved, Thermo Fisher) ve %1 Penisilin- Streptomisin (Thermo Fisher) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (HG) W/NA PYR (CE) (Thermo Fisher)'dan oluşan kültür ortamı kullanılarak 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında 25 cm²'lik hücre kültür flasklarında inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücrelerden elde edilen ilk pasajlar, -80°C'de saklandı. Çalışmada planlanan deneyler pasaj 4'ten sonra elde edilen hücreler kullanılarak gerçekleştirildi.

Sekonder hücrelerin çözdürülmesi protokolü

1. -80°C soğutucudan çıkartılan hücreler üzerine 1 mL complete medium ilave edilerek çözdürüldü.
2. 15 mL'lik falkon içerisine 3 ml complete medium koyuldu ve çözdürülen hücreler falkon tüp içerisine aktarıldı.
3. +4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve pellet 1 mL complete medium'da çözdürüldü.
5. Hücre süspansiyonu, öncesinde içine 2,5 mL complete medium ilave edilmiş flaska alındı.
6. Flask içerisindeki hücreler, invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, 37°C'ye ayarlı %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında inkübe edilerek çoğalmaya bırakıldı. Invert mikroskopta düzenli olarak hücrelerin morfolojisi ve sayısı incelendi. Hücrelerin durumuna göre ortalama 2 günlük aralıklarla pasaj yapıldı.

Hücrelerin pasajlanması protokolü

1. %90 hücre yoğunluğa ulaşan flasklar kabine alındı ve içlerindeki medium aspire edildi.
2. Fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile 3 kez nazıkçe yıkandı
3. 0,75 mL Tripsin ile 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.
4. Tripsin ile muamele edilmiş hücreler falkon tüplere aktarıldı ve üzerine 10 ml FBS içeren Complete Medium konularak, nötralizasyon sağlandı.
5. 4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve pellet 2 mL complete medium içerisinde çözdürüldü.

7. Hücre süspansiyonundan 1'er mL alınarak, öncesinde içine 2,5 mL complete medium ilave edilmiş 2 ayrı flaska aktarıldı.
8. Flask içerisindeki hücreler, invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, flaskın kapağı kapatılarak 37°C'ye ayarlı %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında inkübe edilerek çoğalmaya bırakıldı. Hücreler düzenli olarak invert mikroskopta morfolojileri ve sayıları yönünden incelendi. Hücrelerin durumuna göre ortalama 2 günlük aralıklarla pasaj yapıldı.

Hücrelerin dondurulması protokolü

1. 37°C'ye ulaşan FBS ile %10'luk 2 ml hacimde DMSO hazırlandı (0,2 ml DMSO + 1,8 ml FBS).
2. %90 hücre yoğunluğa ulaşan flasklar kabine alındı ve içerisindeki medium aspire edildi.
3. PBS ile 3 kez nazikçe yıkama yapıldı.
4. 0,75 mL tripsin ile 5 dakika 37°C'de inkübe edildi.
5. Tripsin ile muamele edilmiş hücreler falkon tüplere aktarıldı ve üzerine 10 ml FBS içeren Complete Medium konularak nötralizasyon sağlandı.
6. 4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 2 ml %10'luk DMSO eklenerek hafifçe çalkalama ile homojen hale getirildi.
8. 2 adet dondurucu (cryo) tüpüne her birine 1'er ml olacak şekilde aktarıldı.
9. Dondurucu (cryo) tüplerin üzerine pasaj no, hücre hattı, kişinin adı ve tarih bilgileri yazıldı.
10. Dondurucu (cryo) tüpleri -80°C'ye kaldırıldı.

Hücrelerin sayım protokolü

1. Her pasaj işleminin ardından hücre canlılığı Tripan Blue solüsyonu kullanılarak yapıldı. Tripan Blue boyasını hücre zarından geçirmeyen hücreler, canlı hücreler olduğu için bu özelliklerinden faydalanılarak sayım yapıldı.
2. Hücre kültür medyumunu ile dilue edilmiş hücrelerden 5 µl alınarak üzerine 45 µl Tripan Blue boyası eklenerek 1,5 ml'lik tüp içerisinde karıştırıldı.
3. Bu karışımdan 10 µl Neubauer lamı üzerine aktarılarak lam üzerindeki bölmelerde yer alan hücreler invert mikroskopta sayıldı.
4. Bulunan sonuç, dilüsyon faktörü ile çarpılarak, 1 ml medyumda yer alan canlı hücre sayısı hesaplandı.

5.2.4. 3T3-L1 hücre hattında diferansiyasyon

Kontrol grubu olarak 3T3-L1 pre-adipozitik fibroblast hücre hattı seçildi. Adipojenez protokolü ilk önce bu hücre hattında optimize edilir. Çünkü bu hücrelerin insülin, dexamethasone ve PPAR- γ agonisti olan Rosiglitazone varlığında adipozite farklılaştığı bilinmektedir (103). (Şekil 5.2.5..1).

3T3-L1 hücre hattında in-vitro adipojenez aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Hücreler, 20.000 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde ekildi.
2. %5 CO₂ etüvde 37°C'de 1 gece, büyüme mediumunda inkübe edildi.
3. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasını uyarmak için büyüme mediumu, farklılaşma mediumu No1 ile değiştirildi.

Farklılaşma mediumu no1: 5 µg/ml insulin, 1 µM Dexamethasone (etanolda çözülmüş), 2 µM Roziglitazon (DMSO'da çözülmüş)

4. Hücreler 48 saat boyunca farklılaşma mediumu No:1 ile inkübe edildi.
5. Farklılaşma mediumu No:2 hazırlandı.

Farklılaşma mediumu No2: 5 µg/ml insulin

6. Hücreler 48 saat boyunca farklılaşma mediumu No:2 ile inkübe edildi.
7. Farklılaşma mediumu No:3 hazırlandı.

Farklılaşma mediumu No3: 1 µM Rosiglitazon

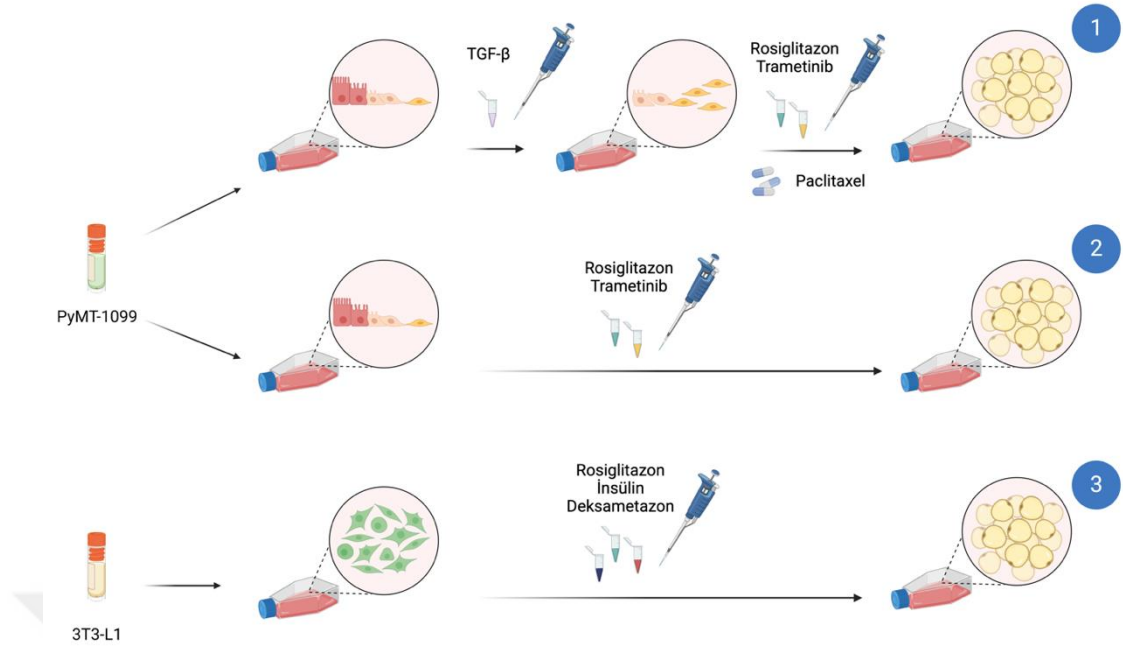
8. Hücreler 48 saat boyunca farklılaşma mediumu No:3 ile inkübe edildi.

5.2.5. PyMT-1099 hücre hattında diferansiyasyon

PyMT-1099 meme kanseri hücre hattında in-vitro adipojenez aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi (Şekil 5.2.5.1). Bu aşamada hücreler 2 gruba ayrıldı ve bir gruba sadece Rosiglitazon ve Trametinib uygulanırken diğer gruba bu ajanlar haricinde bir de TGFβ eklendi.

Epitelyal karakteristiğe sahip hücrelerin mezenkimal karakter kazanması için öncelikle hücreler 3 gün boyunca TGFβ ile inkübe edildi. Bu amaçla, her bir kuyuda 10.000 hücre olacak şekilde plate'e hücreler ekildi. 24 saat boyunca 37 derece %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Hücreler 3 gün boyunca, 2 ng/ml TGFβ içeren mediumda inkübe edildi. Hücrelerin mezenkimal karakteristik kazanmalarının ardından adipojenezi uyarmak için, deney grubu hücreleri 15 gün boyunca 2 µM Rosiglitazon ve 0,5 ng/ml Trametinib içeren mediumda inkübe edildi.

TGFβ kullanmadan hücreleri farklılaştırmaya çalıştığımız Deney Grubu E için, hücreler 1 ay boyunca 2 µM Rosiglitazon ve 0,5 ng/ml Trametinib içeren mediumda inkübe edildi.



Şekil 5.2.5.1 Kanser ve kontrol hücrelerinin adipoza diferansiyasyonu

5.3. Adipozit Oluşumunun Doğrulanması

Adiposite farklılaştırma deneylerinde kontrol grubu olarak 3T3-L1 pre adipozitik fibroblast hücre hattı kullanıldı. İnsülin, deksametazon ve rosiglitason varlığında bu hücrelerin adipozite farklılaşmaları bilinmektedir (103). Deney gruplarından elde edilen adipoz hücreleriyle, 3T3-L1 hücrelerinden elde ettiğimiz bona fide adipositler kıyaslandı. Flask içerisindeki hücrelerin homojen olarak sadece epitelyal ya da sadece mezankimal olarak dağılmadığı, heterojen bir dağılım olduğu görüldüğü için D grubu olan TGFβ + Rosiglitazon + Trametinib grubunda TGFβ kullanmadan adipojenez denendi (Şekil 5.2.5.1). PyMT-1099 hücrelerinden farklılaştırılan adipozitlerin iyi huylu olup olmadıklarının 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen adipositlerle kıyaslanması amacıyla Oil Red O boyaması yapıldı ve Adiponektin konsantrasyonları ölçüldü.

Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

GRUP-1: Deney grubu olarak PyMT-1099 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

A- Grubu: [PyMT-1099 Hücre Hattı] (Negatif kontrol)

B- Grubu: [PyMT-1099 Hücre Hattı] + TGF β

C- Grubu: [PyMT-1099 Hücre Hattı] +Paklitaksel

D- Grubu: [PyMT-1099 Hücre Hattı] TGF β + Rozigitazon + Trametinib

E- Grubu: [PyMT-1099 Hücre Hattı] Rozigitazon + Trametinib

F- Grubu: [PyMT-1099 Hücre Hattı] +TGF β + Rozigitazon + Trametinib+ Paclitaxel

GRUP-2: Kontrol grubu olarak 3T3-L1 pre-adipozitik fibroblast hücre hattı kullanıldı.

A- Grubu: [3T3-L1 Hücre Hattı] (Negatif kontrol)

B- Grubu: [3T3-L1 Hücre Hattı] + Farklılaştırma ajanları (Rosigitazon + İnsülin + Deksametazon)

5.3.1. Oil Red boyaması ile adipoza farklılaşmanın doğrulanması

Oluşan adipozite karakteristiklerini kıyaslamak için 3T3-L1 ve PyMT-1099 hücrelerinde Oil Red O ile lipid damlacıkları boyandı ve mikroskop ile görüntüledi. Oil Red O boyaması protokolü aşağıdaki şekildedir;

Adipojenik Kültürleri Fikse etme (sabitleme)

1. Hücreler inkübatörden çıkarılarak kabin içine alındı.
2. Medium önce kontrol ve ardından deney grubunu içeren kuyucuklardan çekildi. Tüm bu işlemler sırasında hücrelerin 30 saniyeden uzun süre kuru kalmamasına özen gösterildi.
3. Plate, tek tabaka hücreleri bozmadan, 100 μ L steril PBS ile nazikçe yıkandı.

4. PBS aspire edildi ve yine nazikçe 100 µL % 10 formalin eklendi.
5. Plate oda ısısında 30-60 dakika inkübe edildi.

Oil Red O Boyasının Hazırlanması

1. 300 mg Oil Red O, 100 mL %99 izopropanolde çözdürülerek stok solüsyonu hazırlandı (Bu çözelti, yapıldığı tarihten itibaren bir yıl süreyle stabildir).
2. Kabin içerisinde, 3 kısım Oil Red O stok solüsyonu, 2 kısım dH₂O ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi(Çalışma solüsyonu sadece 2 saat stabildir, bu nedenle çalışmadan hemen önce hazırlanmalıdır).
3. Bir huni ve filtre kağıdı yardımıyla, Oil Red O çalışma solüsyonu süzüldü.

Adipojenik Kültürlerin Boyanması

1. Önce kontrol grubu olmak üzere, kuyucuklardaki tüm formalin dikkatlice çekildi.
2. Tüm kuyucuklar 200 µL steril su ile nazikçe yıkandı.
3. Her kuyuya 100 µL %60 İzopropanol eklendi ve 2-5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
4. İzopropanol aspire edildi ve kuyucuklara kenarları boyunca 100 µL Oil Red O çalışma solüsyonunu pipetlendi. Kuyulara eşit yayılmasını sağlamak için plate yavaşça döndürüldü ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
5. Plateden akan su berrak olana kadar her plakanın ortasından musluk suyuyla durulandı. Tek tabakayı bozmamak adına kuyucuklara doğrudan akan su eklenmedi.
6. Hücrelerin eşit şekilde kaplandığından emin olarak her bir kuyucuğa 100 µL hemotoksilen karşıt boyası eklenerek 1 dakika bekletildi.

7. Hematoksilen aspire edildi ve plate yukarıdaki adımlarda olduğu gibi ılık musluk suyuyla yıkandı. Lipid vakuollerinin bozulmasını önlemek için plakaların ıslak tutulmasına özen gösterildi.
8. Plate faz kontrast mikroskopunda görüntülendi.

5.3.2. Adiponektin ölçümü ile adipoza farklılaşmanın doğrulanması

Adiponektin düzeyleri Elisa kiti ile ölçüldü. Elisa kiti ile üreticinin protokolüne göre, 3 tekrarlı olarak çalışıldı. İstatistiksel analizler SPSS programı kullanılarak yapıldı.

ELİSA Protokolü: Fare Adiponektin Elisa testi Bioassay Technology Laboratory marka (Katalog No: E0246Mo) kit kullanılarak yapıldı.

Testin Prensibi: Testin prensibi sandviç Elisa yöntemine dayanmaktadır. 96 well plate daha önceden fare ADP antikoruna ile kaplanmıştır. ADP içeren örnekler plate kuyucularına eklendiğinde antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş antikor örnekteki ADP antikoruna bağlanır. Bunların üzerine Streptavidin-HRP eklenir ve o da biyotinlenmiş ADP antikoruna bağlanır ve plate inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra bağlanmayan Streptavidin-HRP konjugatının uzaklaştırılması için yıkanır. Sonra Substrat solüsyonu eklenir ve kuyucuklarda renk oluşumu örnekte bulunan ADP miktarına bağlı olarak oluşur. En son durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulur ve plate mikrolate okuyucuda 450 nm’de okunur.

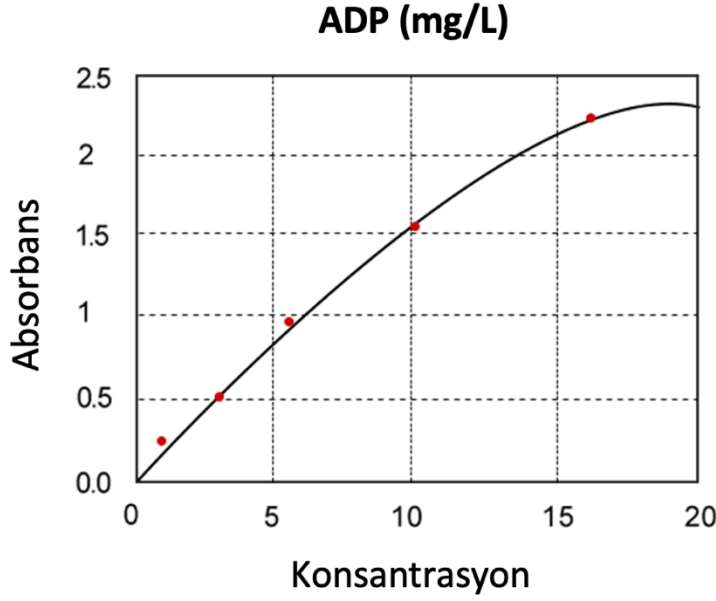
Testin Yapılışı

1. Gerekli bütün reaktifler deneye başlanmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart eğri grafiğinin çizimi için orjinal standart (64 mg/L) dilüe edilerek azalan konsantrasyonlara sahip standartlar elde edildi (Tablo 5.5.1.1).

Tablo 5.3.2.1 Standartların Hazırlanması

32 mg/L	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
16 mg/L	Standart No.4	120µl Standart No.5 + 120µl Standart Dilüent
8 mg/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
4 mg/L	Standart No.2	120µl Standart No.3 + 120µl Standart Dilüent
2 mg/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

1. Hazırlanan standart çözeltiler plate üzerindeki kuyucuklara 50 µl olarak pipetlendi.
2. Geri kalan kuyucuklara 40 µl serum örneği ve üzerine 10 µl antikor eklendi. Standart çözeltileri antikor içerdiğinden üzerlerine ayrıca antikor eklenmedi. Bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve plate'in üzeri kapatıcı ile kapatılıp 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda plate 5 defa 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı.
4. 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B reaktifi bütün kuyucuklara sırasıyla eklendi ve 37°C'de, karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve reaksiyon durduruldu.
6. Plate 450 nm'de okutuldu ve örneklerin ADP serum absorbanları Biotek Synergy HTX multi-mode okuyucu ile okundu.
7. Standart eğri grafiğinden elde edilen denklem yolu ile örneklerin serum ADP konsantrasyonları hesaplandı.



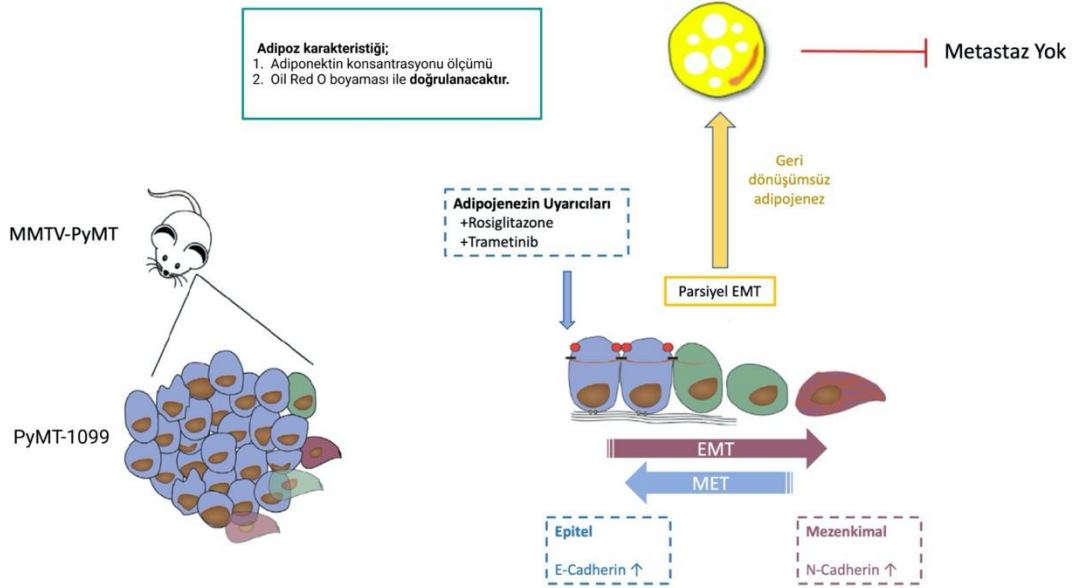
Şekil 5.3.2.1 ADP standart eğrisi

5.4. Western Blot ile EMT Belirteçlerinin İncelenmesi

EMT yolu uyarılmış meme kanseri hücrelerinin, adipozitlere dönüşümüne kemoterapötik ajanların etkisi, EMT belirteçleri incelenerek bakıldı. Western Blot tekniği ile EMT belirteçleri olan E-kaderin, N-kaderin, HIF-1 α , Snail, Slug, Twist değerlendirildi (Şekil 5.4.1).

1. Numuneden 20-30 μ g protein alınarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) yürütüldü.
2. Jel üzerinde yürüyen proteinler elektroforetik olarak poliviniliden florid (PVDF) membran üzerine aktarıldı.
3. Membran, yağsız süt veya Bovine serum albümin (BSA) ile bloklandı.
4. E-kaderin, N-kaderin, HIF-1 α , SNAIL, SLUG, TWIST primer antikoru ile +4°C'de, over-night inkübe edildi.
5. Kontrol olarak β -aktin primer antikoru kullanıldı.

6. Primer antikorlarla muamele edilen membran, Fosfat tampon-Tween 20 (PBST) çözeltisi ile 3 kere yıkandı.
7. Yıkama işleminin sonlanması ardından membran, blocking buffer içinde sekonder antikor olan anti mouse ya da anti rabbit horseradish peroksidaz konjugatı ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Membran tekrar 3 defa PBST ile yıkandı.
9. Daha sonra belirtilen proteinler görüntü tarama yöntemleri ile kontrol olarak kullanılan β -aktin'e göre değerlendirildi.
10. İncelenecek parametreler için primer ve sekonder antikorlar ticari olarak satın alındı, analiz 3 tekrarlı yapıldı ve istatistiksel analizler graphpad programı kullanılarak değerlendirildi.



Şekil 5.4.1 Deney akışı ve EMT belirteçlerinin belirlenmesi

5.5. Metabolik Akış Analizi

5.5.1. Kullanılan hücre hatları ve özellikleri

Seahorse analizinde, PyMT-1099 hücre hattı, ATCC'den ticari olarak satın alınan EMT-6 (ATCC® CRL-2755) meme kanseri hücre hatları kullanıldı.

Tablo 5.5.1.1 Hücre hatları ve özellikleri

Hücre Hattı	İmmün Profili	Hücre Tipi	Organizma	Özelliği
PyMT-1099	HER2(+) E.R(-) P.R(-)	Epitelyal	<i>Mus-musculus</i> , Mouse	Metastatik Meme Kanseri
EMT-6	HER2(-) E.R(-) P.R(-)	Epitelyal	<i>Mus-musculus</i> , Mouse	Metastatik Meme Kanseri

5.5.2. Deney grupları ve plate dizaynı

Metabolik Akış Analizi için deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu. Plate dizaynı tablodaki gibi yapıldı (Tablo 5.5.2.1).

GRUP-1: Deney grubu olarak PyMT-1099 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

A- Kolu: [PyMT-1099 Hücre hattı] (Negatif kontrol)

B- Kolu: [PyMT-1099 Hücre hattı] +Paklitaksel (Pozitif kontrol)

C- Kolu: [PyMT-1099 Hücre hattı] +TGFβ+Roziglitazone+Trametinib

D- Kolu: [PyMT-1099 Hücre hattı] +TGFβ+Roziglitazon+Trametinib+ Paklitaksel

GRUP-2: Kontrol grubu olarak EMT-6 pre-adipozitik fibroblast hücre hattı kullanıldı.

A- Kolu: [EMT-6 Hücre hattı] (Negatif kontrol)


B- Kolu: [EMT-6 Hücre hattı] +Paklitaksel (Pozitif kontrol)

C- Kolu: [EMT-6 Hücre hattı] +TGF β +Roziglitazone+Trametinib

D- Kolu: [EMT-6 Hücre hattı] +TGF β +Roziglitazon+Trametinib+ Paklitaksel

Tablo 5.5.2.1 Metabolik akış analizi plate dizaynı

PyMT						EMT-6					
x	C	C	C	D	D	C	C	C	D	D	x
A	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A
A	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A
A	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A
B	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	B
B	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	B
B	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	B
x	D	E	E	E			D	E	E	E	x

 → Mitokondriyal Stres Test Kiti

 → Glikoliz Stres Test Kiti

 → Enerji Fenotipi Test Kiti

5.5.3. Metabolik stres modölatörleri

Metabolik Akış Analizi deneylerinde PyMT-1099 ve EMT-6 meme kanseri hücre hatları kullanıldı. Farklılaşma ajanları olan Rosiglitazon ve Trametinib ile kemoterapötik ajan olan paklitakselin meme kanseri hücrelerindeki kombine etkisi araştırıldı.

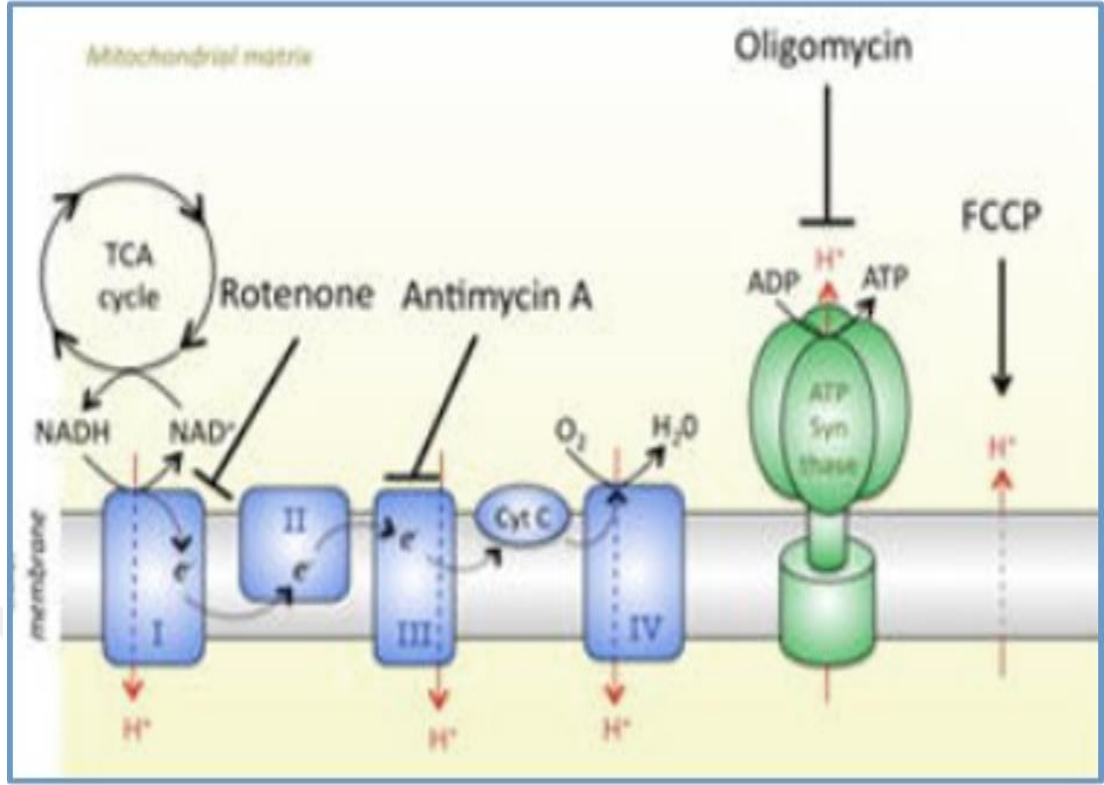
Metabolik akış analizinin çalışma prensibi, glikoliz ve oksidatif fosforilasyona belirli noktalarda metabolik stres modölatörleri ekleyerek ortaya çıkan etkilerin değerlendirilmesine dayanır.

Metabolik akış sisteminde metabolik modölatörler olarak; D-Glukoz, 2-deoksiglukoz (2-DG), Oligomisin, Karbonil siyanür-4 fenilhidrazon (FCCP), Antimisin A ve Rotenon kullanıldı (111).

Bu ajanların etki mekanizmalarına bakıldığında; 2- deoksiglukoz (2-DG), 2-deoksiglukoz-6-fosfata dönüşür ki bu da, fosfoglukoizomerazın kompetitif inhibitörüdür. Glikolizi inhibe eder.

Rotenon, mitokondriyal kompleks 1 inhibitörüdür. Antimisin A, mitokondriyal kompleks III inhibitörüdür. Oligomisin, mitokondriyal kompleks V (ATP Sentaz) inhibitörüdür. FCCP, oksidatif fosforilasyon ayrıştırıcısıdır. Çalışmada kullanılan metabolik modölatörler, sisteme özgü tasarlanan ticari olarak temin edilen kitlerden kullanıldı (111,116). (Şekil 5.5.3.1).

Çalışmada kullanılan metabolik modölatörler, Seahorse XFe96 sistemine özgü tasarlanan ticari kitlerin içindeki metabolik modölatörlerdir (Şekil 5.5.3.2).



Şekil 5.5.3.1 Metabolik akış sisteminde kullanılan metabolik modülatörler

Deneyde, PyMT-1099 ve EMT-6 meme kanseri hücreleri farklılaşma ajanları olan Rosiglitazon ve Trametinib ile kemoterapötik ajan olan paklitakselin etkileri Seahorse XF96 Extrasellüler akış analizörü ile değerlendirildi (Şekil 5.5.3.2). Geleneksel metabolik tahlillere göre Seahorse Ekstrasellüler Akış Analizörü (127) kullanmanın avantajları, herhangi bir radyoaktivite olmadan, nispeten az sayıda hücre üzerinde gerçek zamanlı olarak glikoliz ve mitokondriyal solunumun eşzamanlı ölçümünü içerir.



Şekil 5.5.3.2 Seahorse XF96 Bioscience cihazı

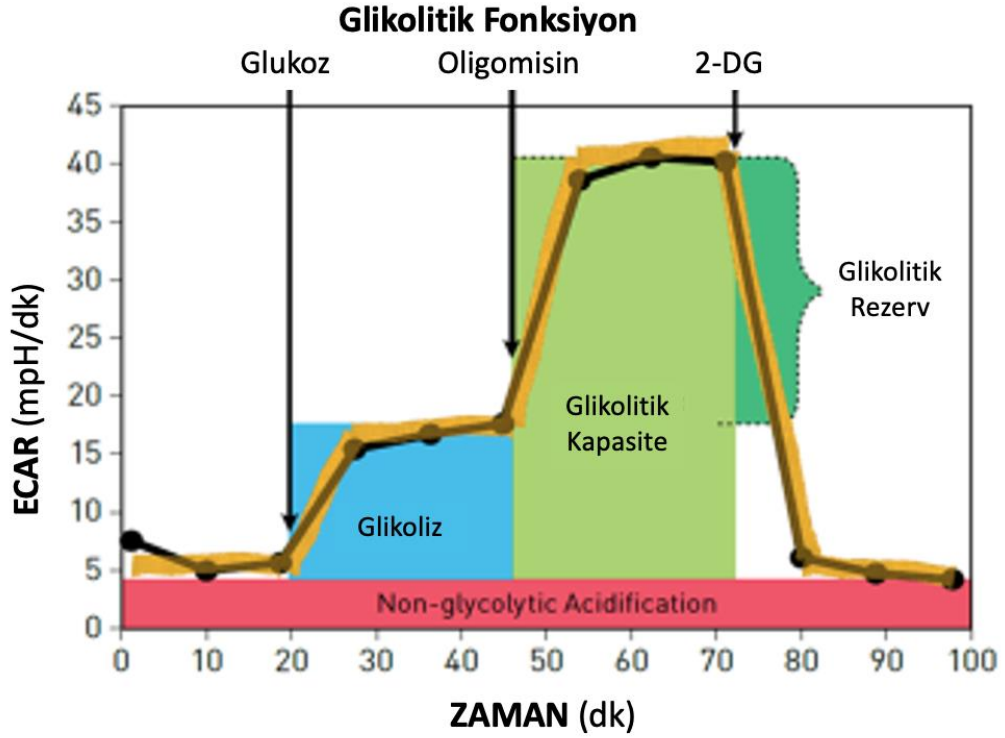
Çalışmamızda, ticari olarak temin edilen, Glikolitik Stres Kiti, Mitokondriyal Stres Kiti, Enerji Fenotipi Kiti kullanılarak ölçümler yapıldı.

Glikolitik stres kiti

Glikolitik Stres Kiti ile, glikolitik olmayan asidifikasyon, glikoliz, glikolitik rezerv ve glikolitik kapasite parametrelerine bakıldı.

ECAR'ı ölçmek için D-Glukoz, 2DG ve oligomisin kullanıldı. Glikolizi arttırmak amacıyla D-glukoz verildi. Glikolizi inhibe etmek için 2-DG kullanıldı.

Oligomisin, oksidatif fosforilasyonda, ATP sentezini engelleyen bir inhibitör (Şekil 5.5.3.2) (127) olduğu için ATP sentezinde hızlı bir düşüşe neden olur. Hücreler bu duruma glikolizi maksimum seviyeye aktive ederek yanıt verir ve bu glikolitik kapasitede artışla kendini gösterir.



Şekil 5.5.3.3 Glikolitik stres kiti ile oluşturulan ECAR ölçüm grafiği

Yüksek glikolitik kapasiteye sahip hücrelerde, ATP talebinde önemli bir artış olmazsa, glikoliz, yukarı regüle edilmesine gerek kalmadan mitokondriyal ATP kaybıyla mükemmel bir şekilde başa çıkabilir (111).

Glikoliz stres testi, ECAR'ın temel ölçümü (baseline) ile başlar. Bu nokta glikolitik olmayan asidifikasyon olarak anılır. Bu asitleşme muhtemelen TCA döngüsünde üretilen CO_2 'in HCO_3^- ve H^+ 'e dönüştürülmesine karşılık gelir. Glikolitik olmayan asidifikasyonu, glikolizi etkinleştirmek için yapılan glikoz enjeksiyonu izler. Glikoliz neticesi laktat oluşumunda artış nedeniyle asidite artar. Bu artış, normal glikoliz oranını temsil eder. Hücrelere daha sonra oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP oluşumunu engellemek amacıyla oligomisin enjeksiyonu uygulanır. Hücreler, ATP üretimindeki düşüş nedeniyle glikolizi artırırlar ve bu ECAR seviyesinde ikincil bir artışa (glikolitik rezerv) neden olur. Test, ECAR'ı glikolitik olmayan seviyeye döndüren glikoz analogu 2-DG kullanılarak glikolizin toplam inhibisyonu ile sonlandırılır (127) (5.5.3.3).

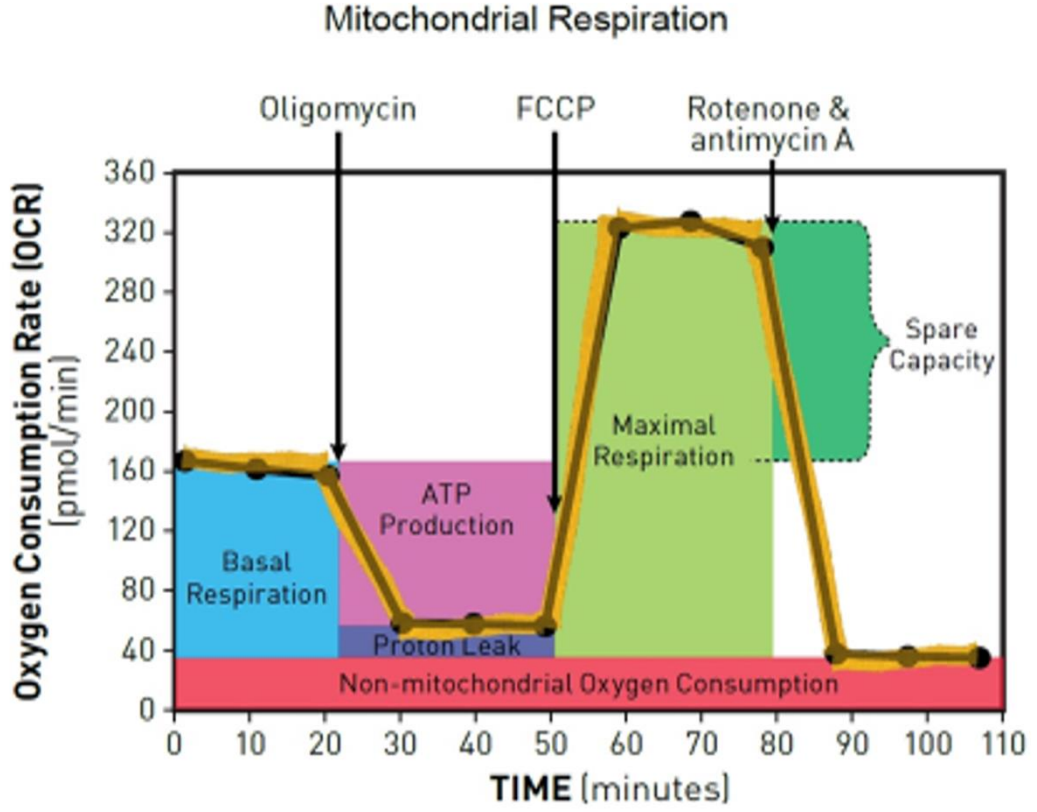
Deneyin Yapılışı:

1. Uygun hücre kültürü ortamı kullanılarak her bir kuyuya PyMT-1099 için 20.000 hücre /200ul ve EMT-6 için 4.000 hücre /200ul hücre Agilent Seahorse XFe96 plaka içerisine ekildi.
2. Hücreler 48 saat boyunca medium içerisinde büyütüldü.
3. Büyüme mediumu içerisinde ilaçların bulunduğu deney mediumu ile değiştirildi. Paclitaxel, test ilaç konsantrasyonu (TDC) olan 15,9 uM (128), Rosiglitason ve Trametinib ise farklılaşma için önerilen dozları olan, 2 uM ve 0,5 ng/mL konsantrasyonlarda uygulandı.
4. Deneylere başlamadan önce Agilent Seahorse sensör kartuşu, nemlenmesi için, 1 gece boyunca 37⁰C de CO₂ içermeyen inkübatörde XF kalibratör içerisinde bekletildi.
5. Plaka, inkübatörden çıkarılarak kabine alındı. Eski medium uzaklaştırıldı ve yerine deney mediumu (1 mM piruvat, 2 mM glutamin, 10 mM glukoz, Ph:7.4) eklendi.
6. Plaka 45 dakika boyunca CO₂ içermeyen 37⁰C lik inkübatörde inkübe edildi. Sonrasında cihazın kalibrasyonu başlatıldı.
7. Çalışılacak tamponlar pH:7.4 ayarlandı.
8. Kullanılacak kite göre, inhibitörler ve substratların önce ana stok ardından ara stoklar olmak üzere 15ml 'lik falcon tüplerde taze hazırlandı.
9. Solunum modülatörleri taze olarak hazırlanarak mini enjeksiyon kuyularına yüklendi. Sensör kartuşu cihaza konularak 20 dakikalık kalibrasyon işlemi gerçekleştirildi. Kalibrasyon sonrası 96'lık çalışma plakası cihaza verilerek deney başlatıldı ve ardışık olarak ölçümler alındı.

Mitokondriyal stres kiti

Mitokondriyal stres testi oksijen tüketim oranının (OCR) temel ölçümü ile başlar. Bunu, ATP sentaz kompleksinden protonların geri dönüşünü engelleyen ve böylece mitokondriyal membranı hızla hiperpolarize eden oligomisin enjeksiyonu izler. Hiperpolarizasyon, solunum kompleksleri yoluyla daha fazla proton pompalanmasını önler ve solunum hızı düşer (127).

Kalan solunuma, protonların lipidler veya diğer kanallardan akışını temsil eden proton sızıntısı denir. Bu hiperpolarize durum, bir proton iyonofor gibi davranan ayırıcı ajan FCCP' nin eklenmesiyle tersine çevrilir. Buna yanıt olarak hücreler, elektron taşıma hızını maksimuma çıkararak zar potansiyelini kurtarmaya çalışır ve bu da OCR'yi artırır. Son olarak, iki ETZ inhibitörü antimisin A ve rotenon eklenmesiyle mitokondriyal solunum tamamen durur ve OCR en düşük seviyesine iner. Bu seviyede oksijen tüketimi mitokondriyal aktiviteye bağlı değildir. (111,112). (Şekil. 5.5.3.4).

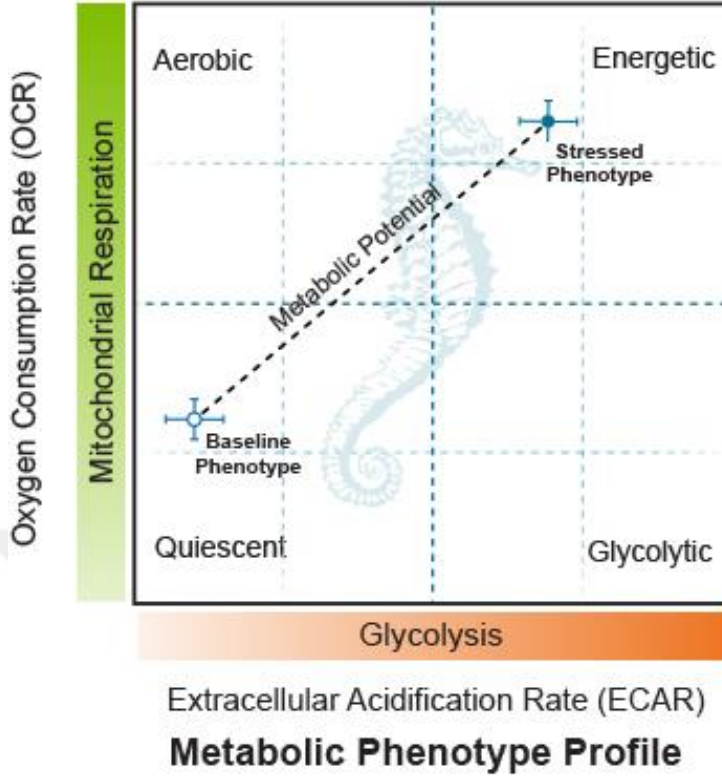


Şekil 5.5.3.4 Mitokondriyal stres kiti ile oluşturulan OCR ölçüm grafiği

Enerji fenotipi kiti

Enerji Fenotipi Kiti, hücelere ilaç/inhibitörler uygulandıktan sonra hücrel enerji fenotipinin glikolitik yola ya da mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemine doğru yönelimi OCR ve ECAR parametreleri aracılığıyla verir. Metabolik akış sisteminde metabolik modülatörler olarak Hücre Enerji Fenotipi Kitinde sırasıyla; Oligomisin, FCCP ve Rotenon / Antimisin kullanıldı. Enerji Fenotipi Kiti ile uygulanan ajanlar ile metabolizmanın yönünün enerjetik ya da glikolitik dönüşümü gözlemlendi (Şekil 5.5.3.5).

XF Energy Map



Şekil 5.5.3.5 Enerji fenotipi kiti ile oluşturulan OCR ve ECAR ölçüm grafiği

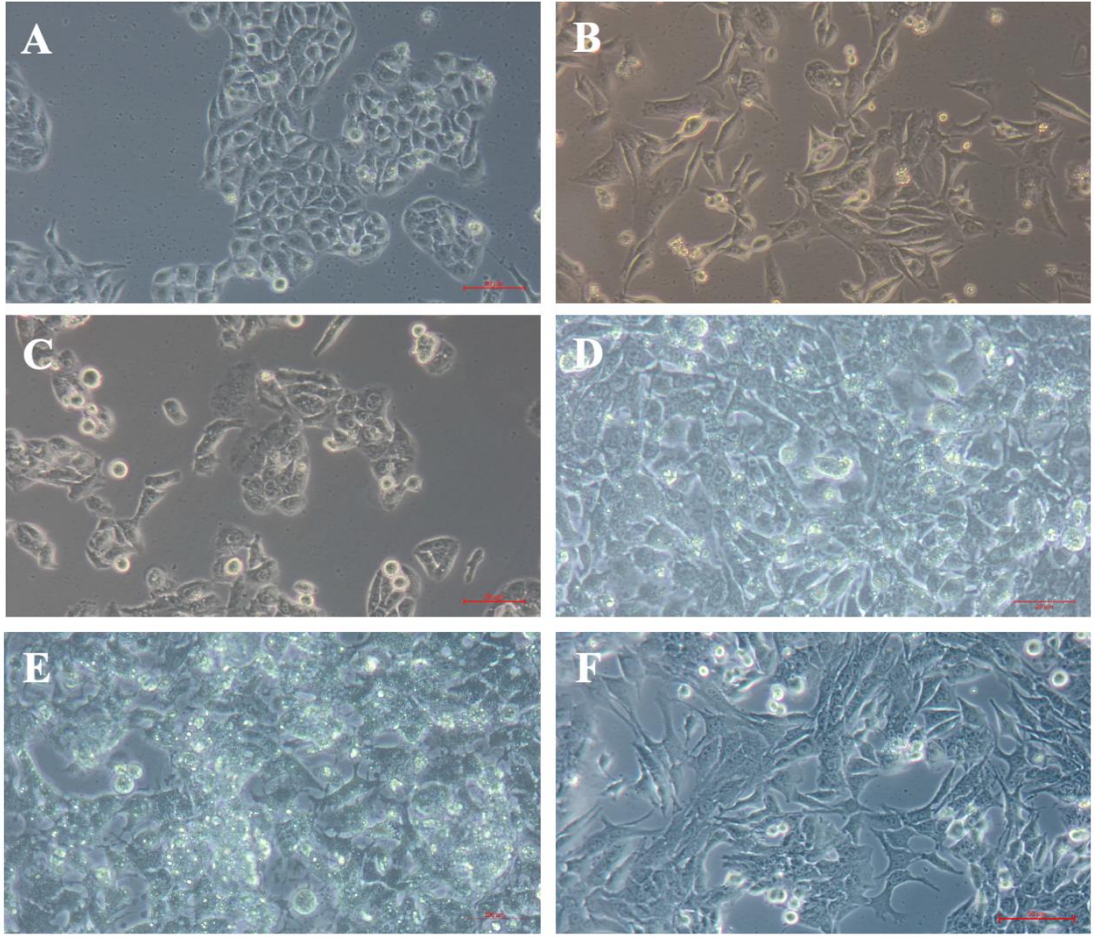
5.6. Kullanılacak istatistiksel yöntemler

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ABD) 21.0 (SPSS, Chicago, IL, United States) kullanılarak gerçekleştirildi. Değerlendirilen parametreler kapsamında farklılıkları değerlendirmek için parametrik olmayan Mann Whitney U testi kullanıldı. Testler 3 veya daha fazla bağımsız deneyde tekrar edildi. Metin ve şekillerin sayısal değerleri, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. p değeri $\leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

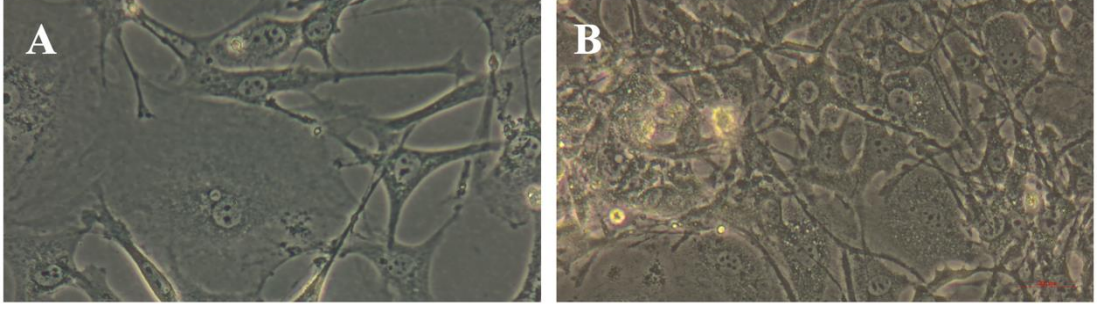
6.1. Diferansiyasyon Deneilerinin Sonuçları

PyMT hücre hattında uygulanan ajanlara göre 6 deney grubumuz oluştu. Negatif kontrol olarak tanımlanan A grubu PyMT-1099 hücrelerinde, yoğunlukla epitelyal karakterde, parke taşı görünümünde hücreler olduğu ancak az miktarda da olsa mezenkimal hücrelerin de olduğu görüldü. TGF β grubu hücrelerinde; beklendiği gibi epitelyal karakterde olan hücrelerin, mezenkimal karakteristik kazandığı görüldü. PTX Grubu hücrelerinde; hücre sayısında azalma görülürken, hücre görünümlerinin değişmediği gözlendi. TGF β +Rosi+Tram grubu hücrelerinde adipojenezin yoğun olarak uyarıldığı ve TGF β ile mezenkimale dönüştürülen hücrelerin adipoz hücrelerine dönüştüğü görüldü. Rosi+Tram grubunda; TGF β +Rosi+Tram grubuna göre daha az olmakla beraber yoğun adipojenez görüldü. Adipojenezin en yoğun olarak görüldüğü TGF β +Rosi+Tram grubuna, ilave olarak paklitakselin eklendiği TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunda; hücre içindeki adipojenez görünümünün değişmediği ancak hücre sayısının azaldığı gözlendi (şekil 6.1.1.).



Şekil 6.1.1 PyMT-1099 hücrelerinin mikroskop görüntüleri. *İnvert faz kontrast mikroskobu, 20x (Zeiss Primovert). A: Negatif kontrol; B: TGF β ; C: PTX; D: Rosiglitazon+Trametinib; E: TGF β +Rosiglitazon+Trametinib; F: TGF β +Rosiglitazon+Trametinib+PTX*

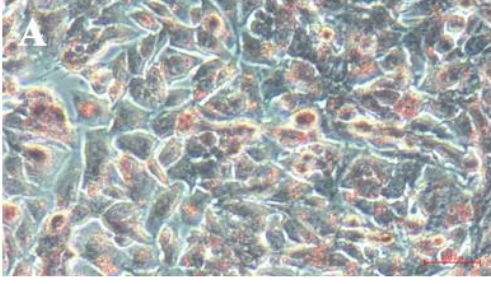
Kontrol grubu olarak seçtiğimiz pre-adipozitik fibroblast hücre hattı olan 3T3-L1 hücrelerinin belli ajanlar uygulandığında adipozite farklılaştığı bilinmektedir. Negatif kontrol olan A grubu hücrelerinin fibroblast karakterleri gözlemlendi. B grubu hücrelerine ise farklılaştırma ajanları olan insülin, deksametazon ve rosiglitazon uygulandığında, adipoza farklılaşmanın olduğu görüldü (Şekil 6.1.2).



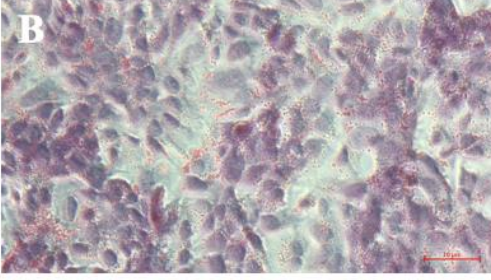
Şekil 6.1.2 3T3-L1 Hücrelerinin mikroskop görüntüleri. *İnvert faz kontrast mikroskobu, 40x (Zeiss Primovert). A: Kontrol hücreleri; B: Farklılaştırılmış hücreler*

6.1.1. Oil Red O boyama sonuçları

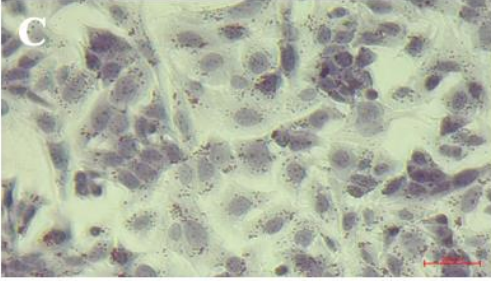
TGF β +Rosi+Tram grubu hücrelerde adipojenezin yoğun olarak uyarıldığı, Oil Red O boyaması ile gösterildi (A). Rosi+Tram hücrelerinde, A resmine kıyasla daha az olmakla beraber Oil Red O ile boyanmış yoğun lipid dropletleri görüldü (B). Adipojenezin en yoğun olarak görüldüğü TGF β +Rosi+Tram grubuna, ilave olarak paklitakselin eklendiği TGF β +Rosi+Tram+PTX grubu hücrelerde; Oil Red O ile boyanmış lipid dropletleri gözlemlendi (C). D resminde ise, adipojenez protokolü uygulanan, kontrol hücre hattı olan 3T3-L1 pre-adipositik fibroblast hücrelerindeki, Oil Red O ile boyanmış lipid dropletleri görüldü (D) (Şekil 6.1.1.1).



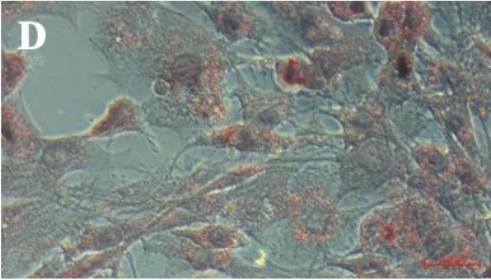
PyMT-1099
TGF- β + Rosiglitazon + Trametinib



PyMT-1099
Rosiglitazon + Trametinib



PyMT-1099
TGF- β + Rosiglitazon + Trametinib + PTX

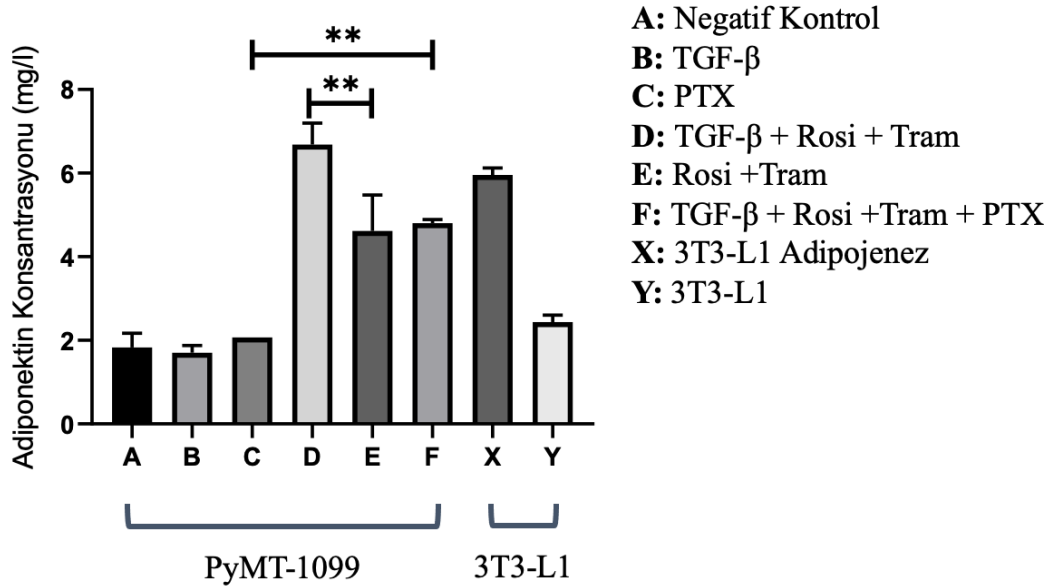


3T3-L1
İnsülin + Rosiglitazon + Deksametazon

Şekil 6.1.1.1 Oil Red O ile boyanan lipid dropletlerinin mikroskop görüntüleri. *İnvert faz kontrast mikroskobu, 40x (Zeiss Primovert). PTX: Paklitaksel*

6.1.2. Adiponektin konsantrasyonu sonuçları

Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, PyMT-1099 hücre hattı olan TGFβ+Rosi+Tram grubu, Rosi+Tram grubu, TGFβ+Rosi+Tram+PTX grubu ve 3T3-L1-adipojenez gruplarında adiponektin konsantrasyonlarının yüksek olduğu görüldü. Adipojenez protokolü uygulanan gruplara bakıldığında en yüksek adiponektin konsantrasyonu TGFβ+Rosi+Tram grubunda görüldü. Bu gruptaki adiponektin konsantrasyonu Rosi+Tram grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p \leq 0,01$). PTX grubu ile TGFβ+Rosi+Tram+PTX grubunu kıyasladığımızda ise, TGFβ+Rosi+Tram+PTX grubunda adiponektin konsantrasyonunun istatistiksel olarak yüksek olduğu bulundu ($p \leq 0,01$). Kontrol hücre hattı olarak seçtiğimiz, pre-adipositik fibroblast 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma ajanlarıyla uyarıldığı grubumuz olan 3T3-L1-adipojenez grubunun adiponektin konsantrasyonu ile kıyaslandığında, olan TGFβ+Rosi+Tram grubu, Rosi+Tram grubu ve TGFβ+Rosi+Tram+PTX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (Şekil 6.1.2.1) (Tablo 6.1.2.1).



Şekil 6.1.2.1 PyMT-1099 ve 3T3-L1 hücrelerinin adiponektin konsantrasyonları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)

Tablo 6.1.2.1 PyMT-1099 ve 3T3-L1 hücrelerinin adiponektin konsantrasyonları.

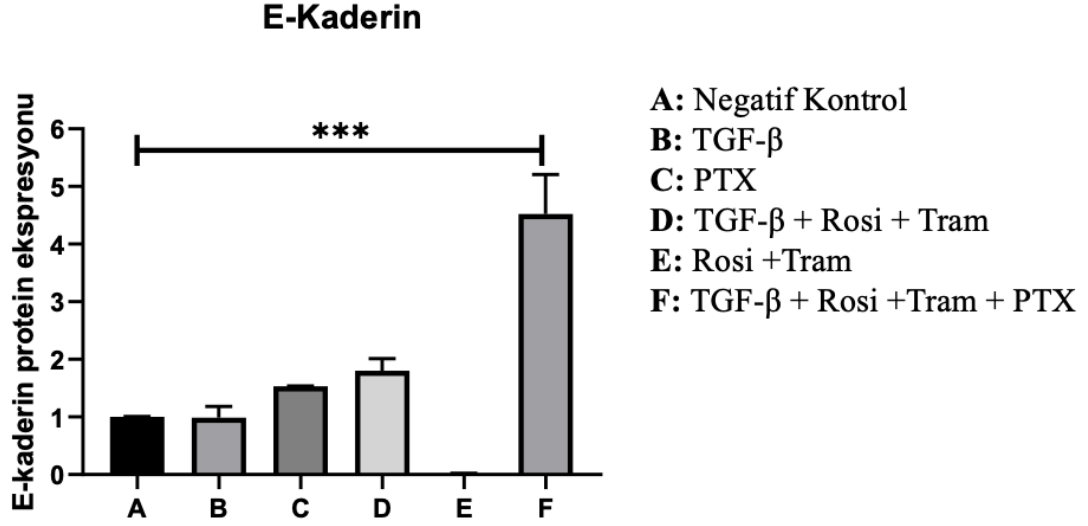
Hücre Hattı	Grup	Açıklama	Adiponektin Konsantrasyonu (mg/L)
PyMT-1099	A	Negatif Kontrol	1,82
PyMT-1099	B	TGF β	1,7
PyMT-1099	C	PTX	2,07
PyMT-1099	D	TGF β +Rosi+Tram	6,68
PyMT-1099	E	Rosi+Tram	4,61
PyMT-1099	F	TGF β +Rosi+Tram+PTX	4,8
3T3-L1	X	Negatif Kontrol	5,95
3T3-L1	Y	Farklılaştırılmış hücreler	2,43

(PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

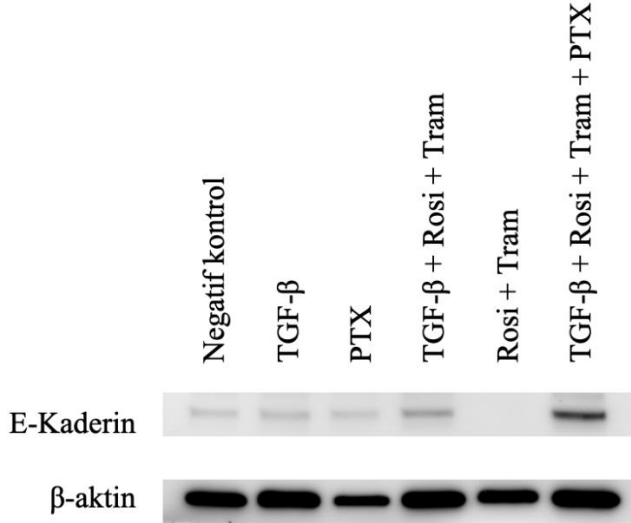
6.2. Western Blot EMT Belirteçleri Sonuçları

6.2.1. E-Kaderin

Gruplar arası E-Kaderin proteininin ekspresyonları incelendiğinde, TGF β +rosi+tram+PTX grubunda, negatif kontrol grubu olan A grubuna göre E-Kaderin ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği görüldü ($p \leq 0,001$). TGF β grubu, TGF β +rosi+tram grubu ve TGF β +rosi+tram+PTX grupları birbirleri ile kıyaslandığında epitelyal bir belirteç olan E-Kaderin ekspresyonunun sayısal olarak giderek yükseldiği görüldü. TGF β +rosi+tram grubu ve TGF β +rosi+tram+PTX grupları incelendiğinde ise, PTX ilave edilmesiyle birlikte F grubunda E-Kaderin ekspresyonunda rakamsal bir artış olduğu görüldü. TGF β +Rosi+Tram grubu ile Rosi+Tram grubu kıyaslandığında; E grubunda E-Kaderin ekspresyonunun azaldığı görüldü. Rosi+Tram grubunda E-Kaderin ekspresyonunun tüm gruplar arasında en az düzeyde olduğu görüldü (Şekil 6.2.1.1) (Şekil 6.2.1.2).



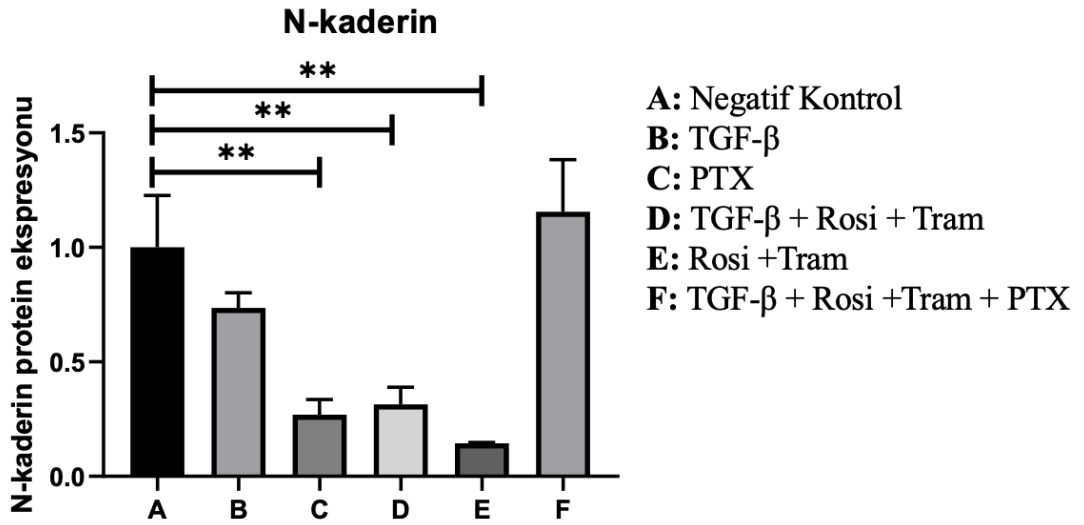
Şekil 6.2.1.1 E-Kaderin Western Blot sonuçları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)



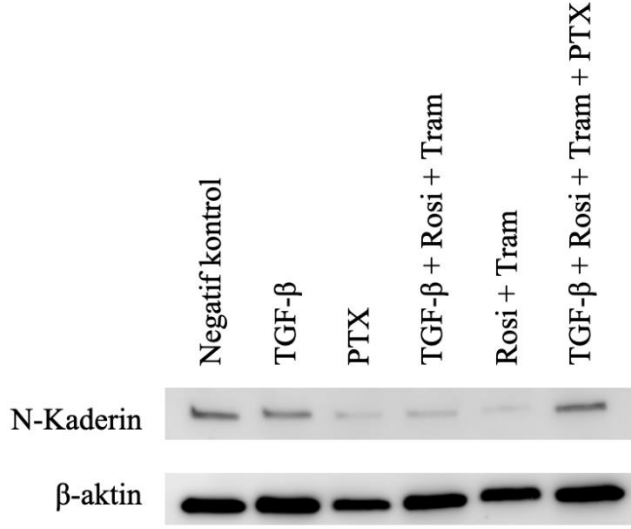
Şekil 6.2.1.2 E-Kaderin Western Blot jel görüntüleri. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

6.2.2. N-Kaderin

Gruplar arası N-Kaderin proteininin ekspresyonları incelendiğinde, negatif kontrol grubuna göre kıyaslandığında PTX grubu, TGF β +Rosi+Tram grubu ve Rosi+Tram gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma olduğu görüldü ($p \leq 0,01$). TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunda, negatif kontrol grubuna göre N-Kaderin ekspresyonunun rakamsal olarak yükseldiği görüldü. TGF β +Rosi+Tram grubu ve TGF β +Rosi+Tram+PTX grupları incelendiğinde ise, PTX ilave edilmesiyle birlikte F grubunda N-Kaderin ekspresyonunda rakamsal bir artış olduğu görüldü. Rosi+Tram grubunda N-Kaderin ekspresyonunun tüm gruplar arasında en az düzeyde olduğu görüldü (Şekil 6.2.2.1) (Şekil 6.2.2.2).



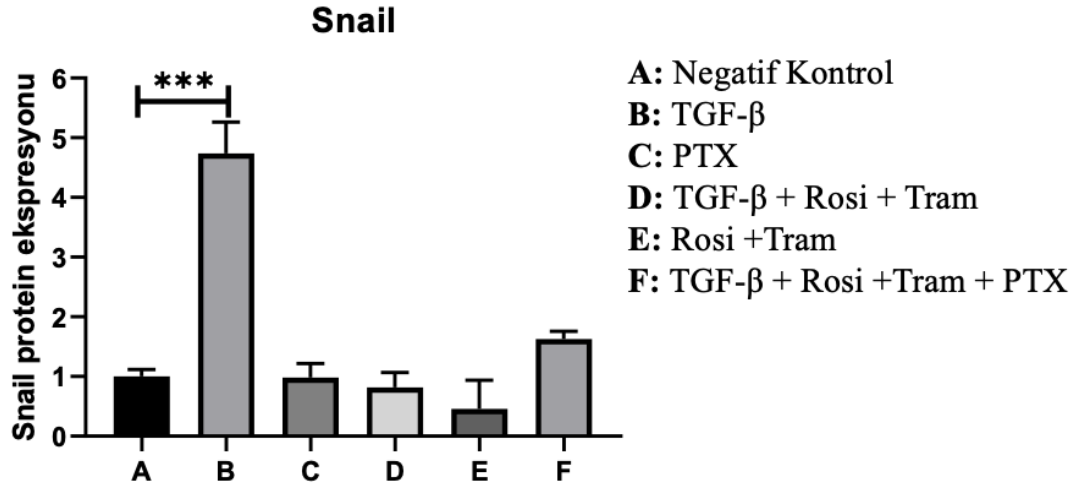
Şekil 6.2.2.1 N-Kaderin Western Blot sonuçları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)



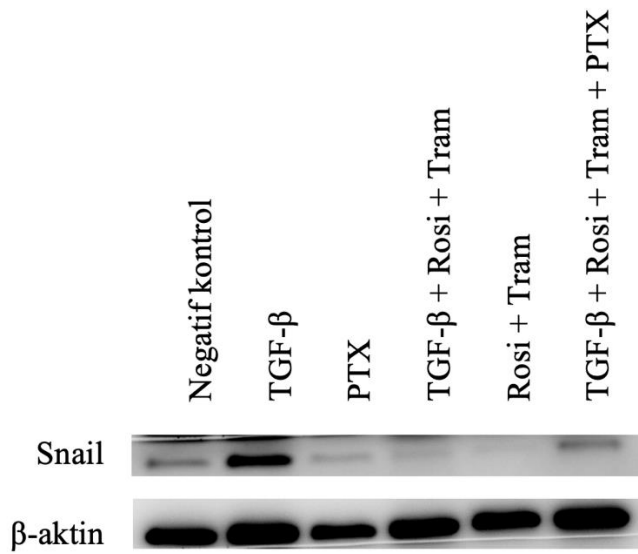
Şekil 6.2.2.2 N-Kaderin Western Blot jel görüntüleri. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

6.2.3. Snail

EMT transkripsiyon faktörlerinden biri olan Snail ekspresyonunu incelediğimizde, TGF β grubunda, negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p \leq 0,001$). TGF β +Rosi+Tram grubu ile karşılaştırıldığında TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunda Snail ekspresyonunun rakamsal olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında PTX grubunda ve TGF β +Rosi+Tram grubunda Snail ekspresyonları açısından bir farklılık olmadığı görüldü. TGF β +Rosi+Tram grubunda, TGF β grubuna kıyasla Snail ekspresyonunun azaldığı görüldü. Yine aynı şekilde, TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunda da TGF β grubuna kıyasla Snail ekspresyonunun azaldığı görüldü. Rosi+Tram grubunda Snail ekspresyonunun tüm gruplar arasında en az düzeyde olduğu görüldü (Şekil 6.2.3.1) (Şekil 6.2.3.2).



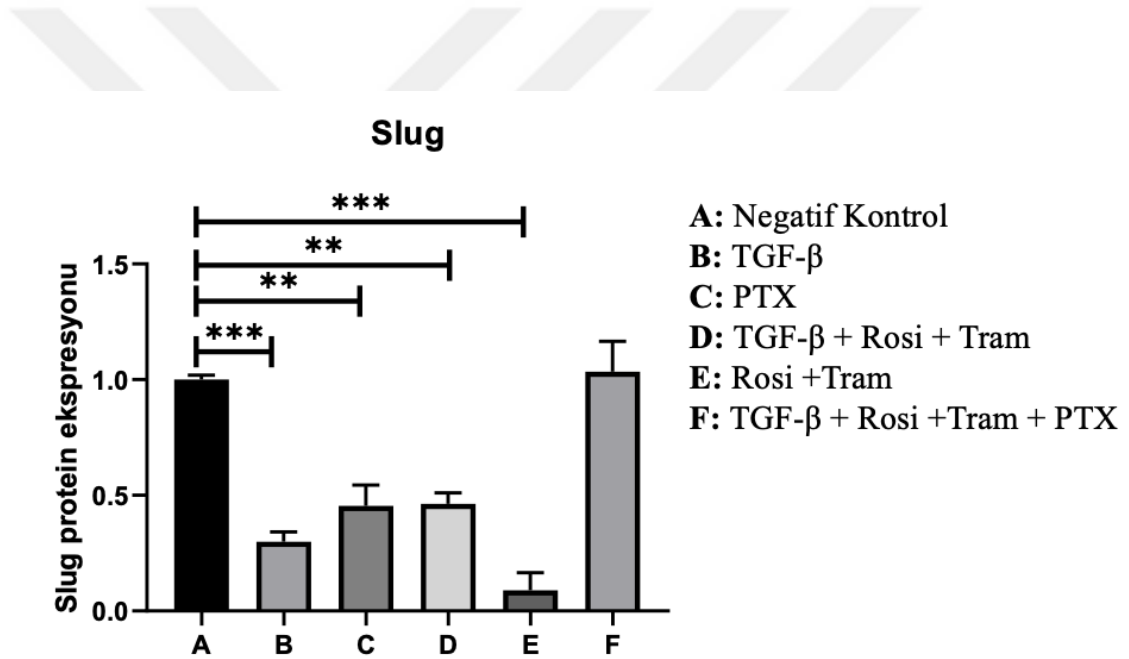
Şekil 6.2.3.1 Snail Western Blot sonuçları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)



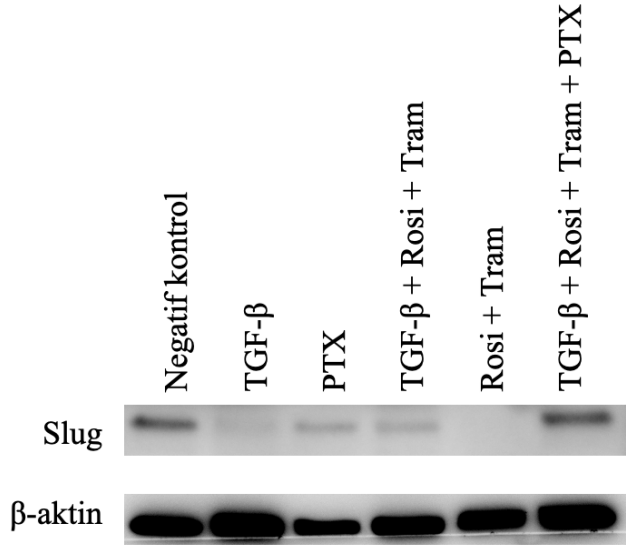
Şekil 6.2.3.2 Snail Western Blot jel görüntüleri. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

6.2.4. Slug

Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında; TGF β grubunda ve Rosi+Tram grubunda Slug ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p \leq 0,001$). Yine negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında; PTX grubunda ve TGF β +Rosi+Tram grubunda Slug ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p \leq 0,01$). PTX grubuna göre ve TGF β grubuna göre, TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunun Slug ekspresyonunda rakamsal bir artış olduğu gözlemlendi. TGF β +Rosi+Tram grubu ile kıyaslandığında, TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunun Slug ekspresyonunun rakamsal olarak arttığı izlendi. Tüm gruplar arasında en az Slug ekspresyonunun Rosi+Tram grubunda olduğu görüldü (Şekil 6.2.4.1) (Şekil 6.2.4.2).



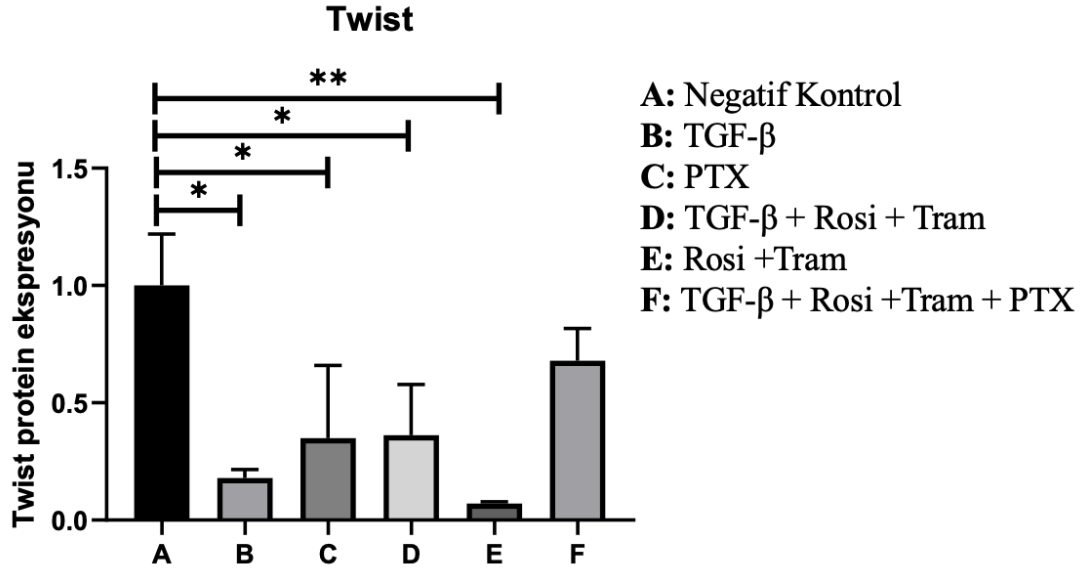
Şekil 6.2.4.1 Slug Western Blot sonuçları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)



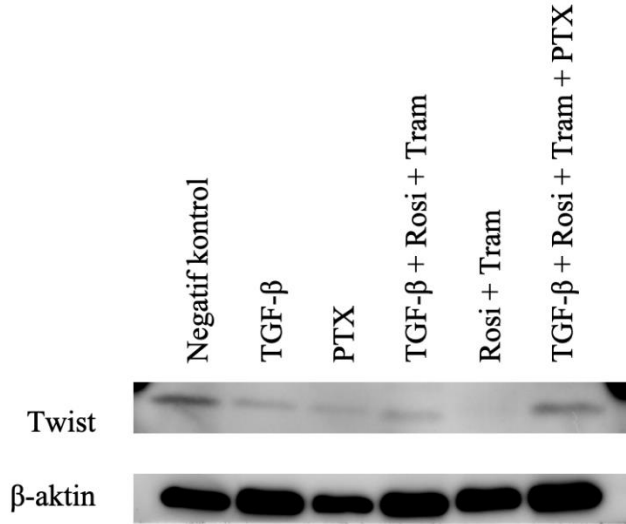
Şekil 6.2.4.2 Slug Western Blot jel görüntüleri. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

6.2.5. Twist

EMT transkripsiyon faktörlerinden biri olan Twist ekspresyonu incelendiğinde, negatif kontrol grubuna göre rosi+tram grubunda, ekspresyonun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p \leq 0,01$). Negatif kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında TGFβ grubunda, PTX grubunda ve TGFβ+Rosi+Tram grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük düzeyde Twist ekspresyonu olduğu görüldü ($p \leq 0,05$). TGFβ+Rosi+Tram+PTX grubundaki Twist ekspresyonunun, TGFβ grubuna, PTX grubuna ve TGFβ+Rosi+Tram grubuna kıyasla rakamsal olarak daha fazla olduğu izlendi. Tüm gruplar arasındaki en düşük Twist ekspresyonunun Rosi+Tram grubunda olduğu görüldü (Şekil 6.2.5.1) (Şekil 6.2.5.2).



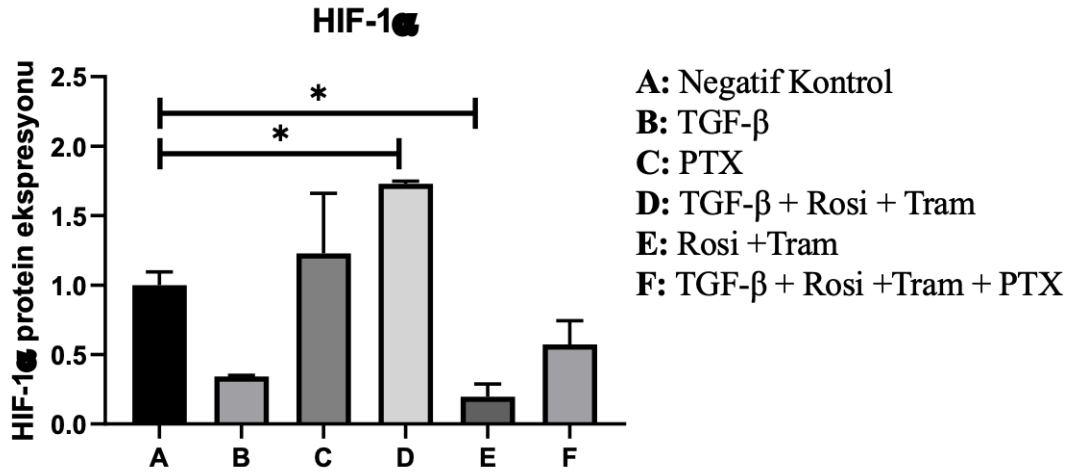
Şekil 6.2.5.1 Twist Western Blot sonuçları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)



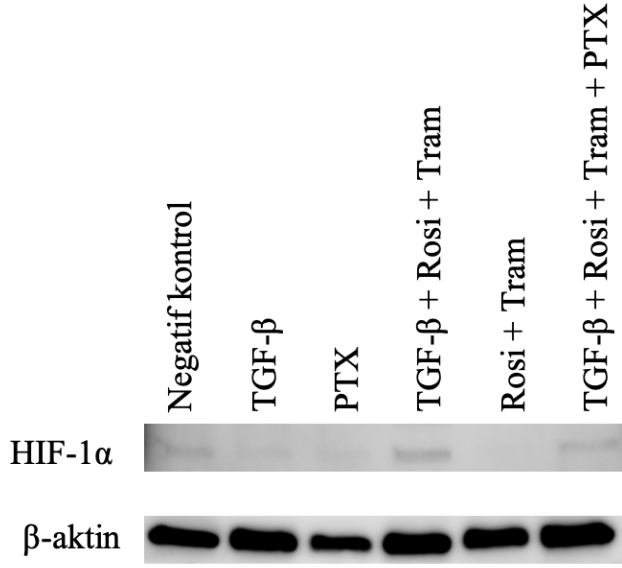
Şekil 6.2.5.2 Twist Western Blot jel görüntüleri. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

6.2.6. HIF-1 α

Negatif kontrol grubuna göre kıyaslandığında, TGF β +Rosi+Tram grubunda HIF-1 α ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükseldiği görüldü ($p \leq 0,05$), rosi+tram grubunda ise HIF-1 α ekspresyonunun, negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı izlendi ($p \leq 0,05$). TGF β +Rosi+Tram+PTX grubundaki HIF-1 α ekspresyonunun, hem PTX grubuna göre hem de TGF β +Rosi+Tram grubuna göre rakamsal olarak daha az olduğu izlendi. TGF β grubuna kıyasla, TGF β +Rosi+Tram grubunda HIF-1 α ekspresyonunun, rakamsal olarak daha yüksek olduğu görüldü. Tüm gruplar arasında en yüksek HIF-1 α ekspresyonunun TGF β +Rosi+Tram grubunda, en düşük ekspresyonun ise Rosi+Tram grubunda olduğu görüldü (Şekil 6.2.6.1) (Şekil 6.2.6.2).



Şekil 6.2.6.1 HIF-1 α Western Blot sonuçları. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)



Şekil 6.2.6.2 HIF-1 α Western Blot jel görüntüleri. (PTX: Paklitaksel; Rosi: Rosiglitazon; Tram: Trametinib)

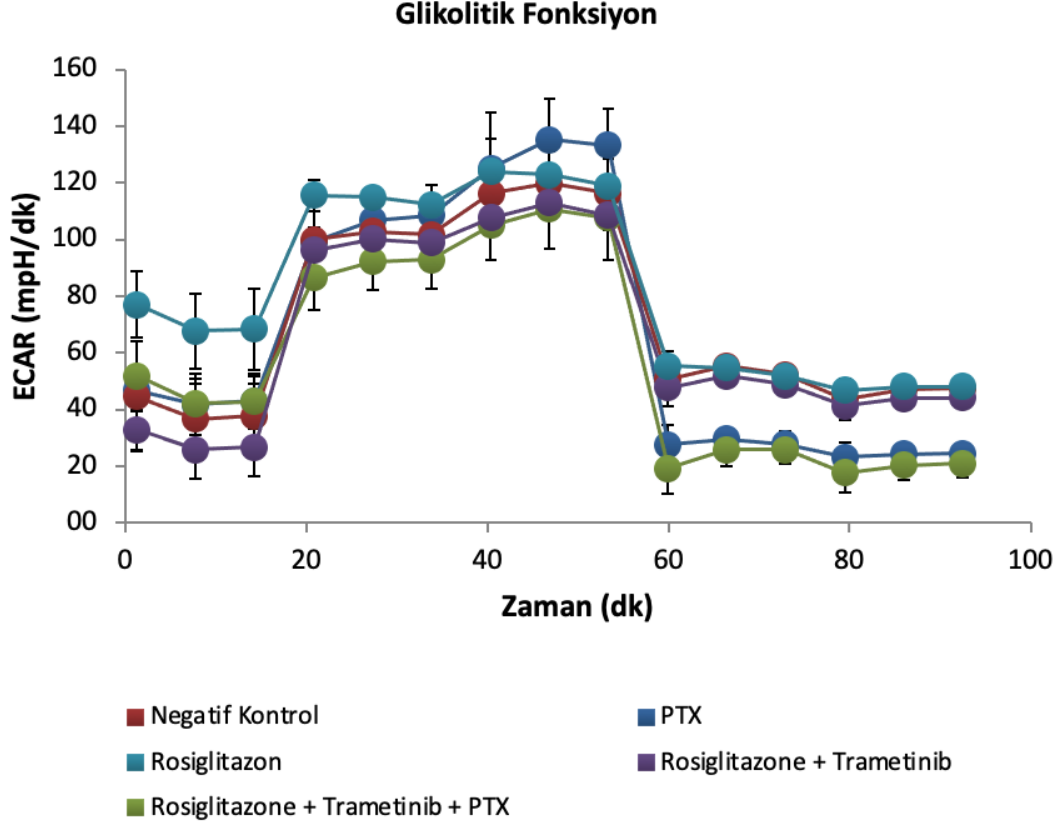
6.3. Metabolik Akış Analizi Deney Sonuçları

6.3.1. Glikolitik stres kiti

Metabolik akış sisteminde, Glikoz Stres Kitinde metabolik modülatörler olarak sırasıyla; D-Glukoz, Oligomisin ve 2-DG kullanıldı. 2-DG bir heksokinaz inhibitörüdür. Oligomisin, mitokondriyal kompleks 5 (ATP Sentaz) inhibitörüdür. PyMT-1099 hücre hattına ait, Glikolitik stres kiti sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 6.2.1.1).

Her2(+) ER(-) PR(-), epitelyal karakterde, metastatik bir meme kanseri hücre hattı olan PyMT-1099 hücrelerinin Glikolitik Stres Test grafiğine göre, ilk 20. dakikada ardından ortama akut olarak D-Glukoz'un eklenmesinin ardından, tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış ve buna bağlı ECAR grafiğinde yükselme meydana geldi. 40. dakikada ortama eklenen oligomisin ile oksidatif fosforilasyon inhibe, dolayı ATP azalışına cevap olarak glikoliz artışı gözlemlendi. 60. dakikada ortama eklenen 2-DG ile glikoliz sonlandırıldığından

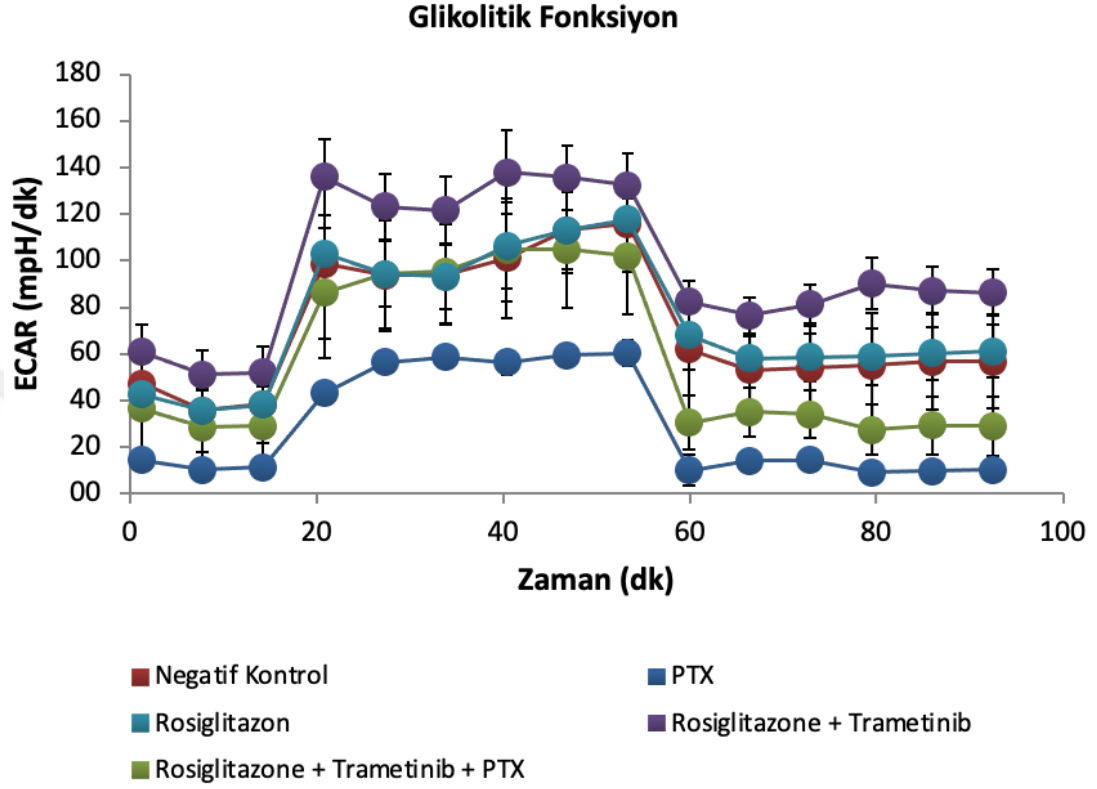
beklendiği şekilde tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda azalma görüldü. PYMT hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt veren, glikolitik kapasiteyi en çok arttıran grup rosiglitazon grubu oldu (Şekil 6.3.1.1).



Şekil 6.3.1.1 PyMT-1099 hücre hattı glikolitik stres test kiti sonuçları. (PTX: Paklitaksel)

Her2(-) ER(-) PR(-), epitelyal karakterde, metastatik bir meme kanseri hücre hattı olan EMT-6 hücrelerinin Glikolitik Stres Test grafiğine göre, tüm gruplarda ilk 20 dakikada ortama akut olarak D-Glukoz'un eklenmesinin ardından, glikoliz artışı sonucu medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda artış ve buna bağlı ECAR grafiğinde yükselme meydana geldi. En fazla yükselme Rosiglitazon+Trametinib grubunda, 2. sırada en iyi artış ise Rosiglitazon grubunda görüldü. PTX grubundaki hücrelerde en az yanıt gözlemlendi. 40. dakikada ortama eklenen oligomisin ile oksidatif fosforilasyon inhibe olduğundan ATP azalışına cevap olarak glikoliz artışı gözlemlendi. 60. dakikada ortama eklenen 2-DG ile glikoliz sonlandırıldığından beklendiği şekilde tüm gruplarda medyuma salınan H⁺ iyonu konsantrasyonunda azalma görüldü. EMT6

hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt vererek glikolitik kapasiteyi en çok arttıran grubun, Rosiglitazon+Trametinib grubu olduğu görüldü (Şekil 6.3.1.2).



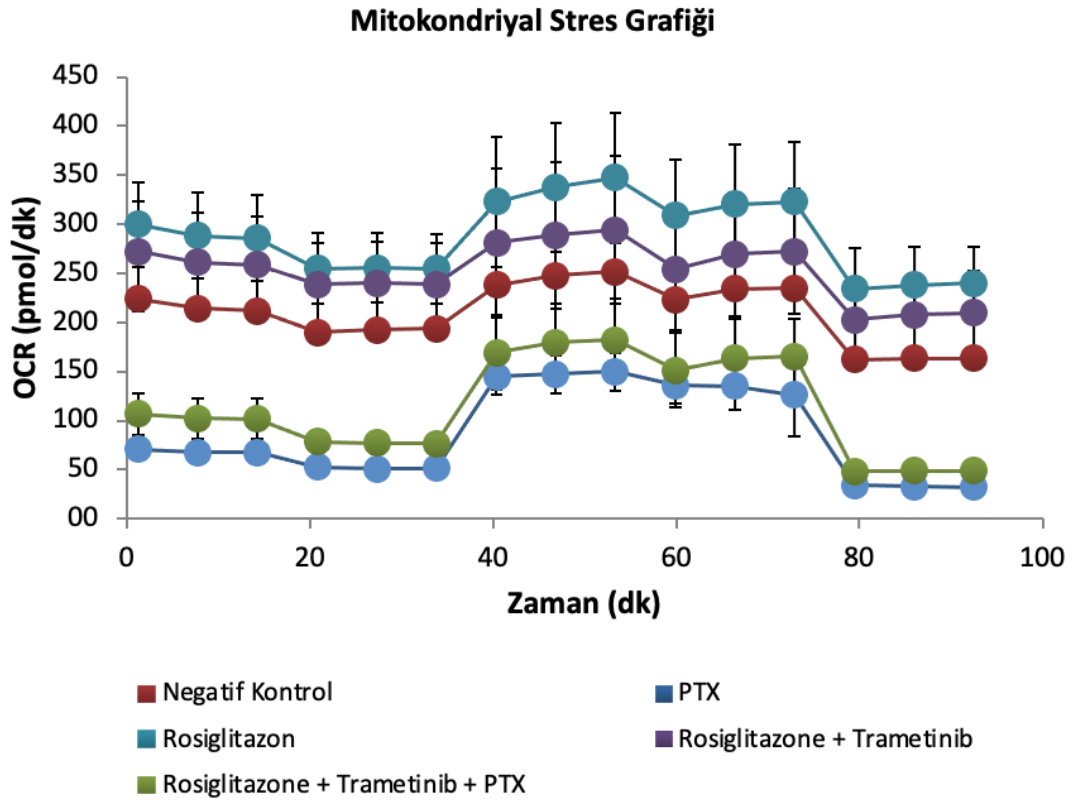
Şekil 6.3.1.2 EMT6 Hücre hattı glikolitik stres test kiti sonuçları. (PTX: Paklitaksel)

6.3.2. Mitokondriyal stres kiti

Metabolik akış sisteminde metabolik modülatörler olarak Mitokondriyal Stres Kitinde sırasıyla; Oligomisin, FCCP ve Rotenon/Antimisin kullanıldı. FCCP, ATP sentezini bozan güçlü bir oksidatif fosforilasyon ayırıcısıdır. Rotenon, mitokondriyal kompleks I inhibitörüdür. Antimisin A, mitokondriyal kompleks III inhibitörüdür.

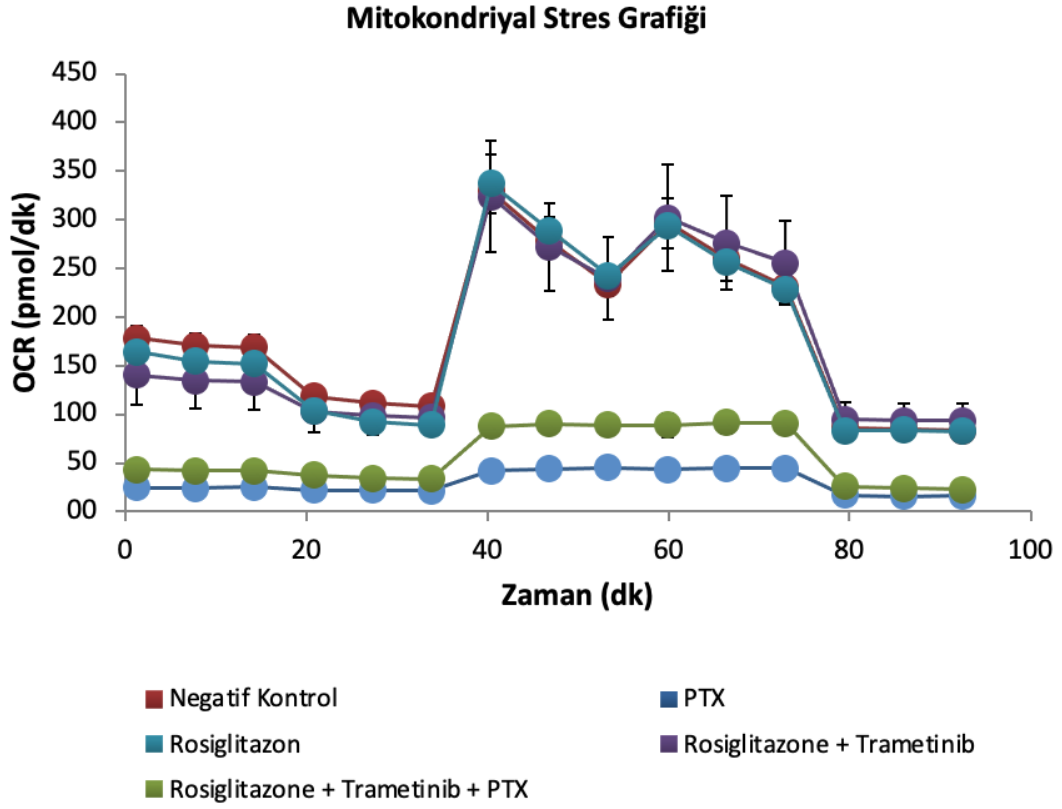
PYMT hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt Rosiglitazon grubunda gözlemlendi. 2. sırada Rosiglitazon+Trametinib grubu yer aldı. 20. dakikada yapılan ATP sentaz inhibitörü olan oligomisin enjeksiyonu sonrası, tüm deney gruplarında OCR'da hafif bir azalma gözlemlendi. 40. dakikada FCCP enjeksiyonundan sonra artış ve Rotenon ve Antimisin A enjeksiyonundan sonra beklendiği gibi bir azalma gözlemlendi. PTX

grubu ve Rosigilitazon+Trametinib+PTX grubu, uygulanan modölatörlere en az yanıt veren gruplar oldu (Şekil 6.3.2.1).



Şekil 6.3.2.1 PyMT-1099 hücre hattı mitokondriyal stres test kiti sonuçları. (PTX: Paklitaksel)

EMT6 hücrelerinde Oligomisin eklenmesi ile 20. dakikada OCR tüm gruplarda hafif azaldı. FCCP eklenmesi ile 40. dakikadaki özellikle Rosigilitazon ve Rosigilitazon+Trametinib gruplarında keskin bir OCR artışı gözlemlendi. Rotenon/Antimisin eklenmesi ile beklendiği gibi tüm gruplarda azalma görüldü (Şekil 6.3.2.2).

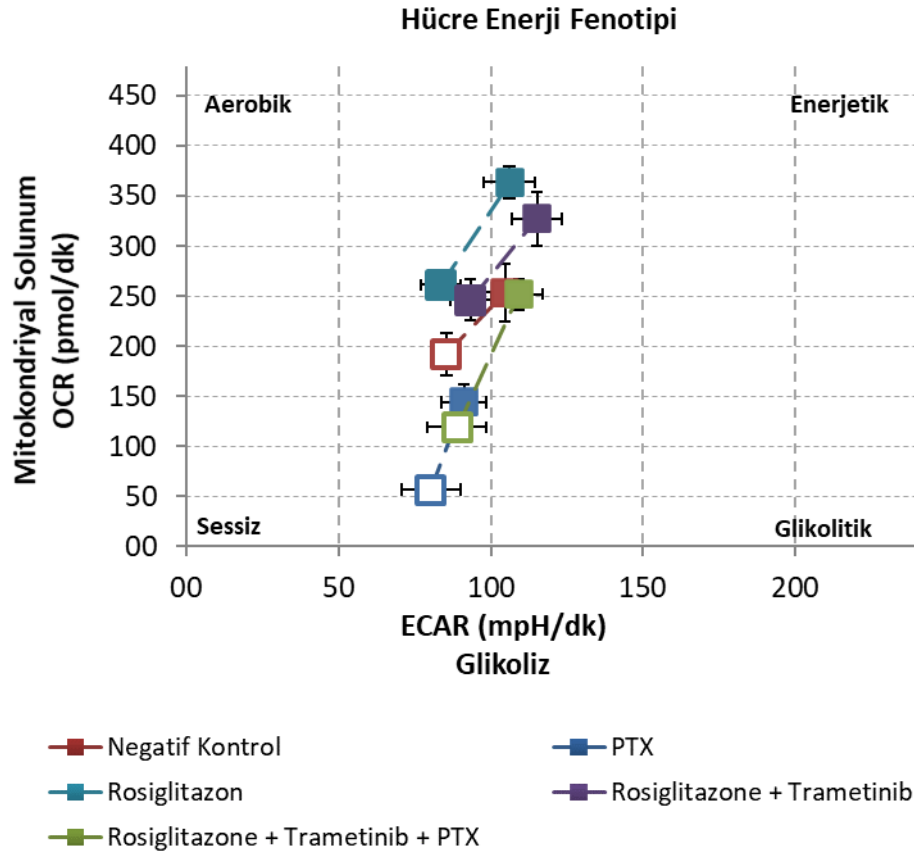


Şekil 6.3.2.2 EMT6 hücre hattı mitokondriyal stres test kiti sonuçları. (PTX: Paklitaksel)

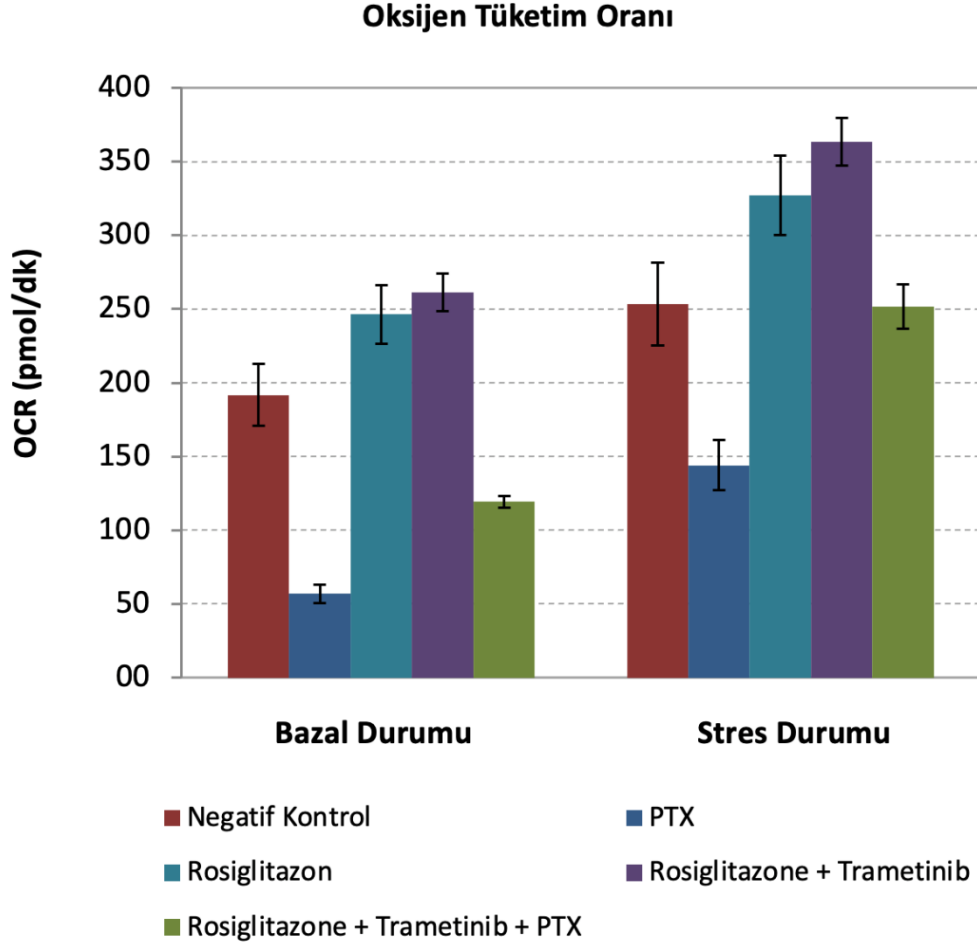
6.3.3. Enerji fenotipi kiti

Hücre Enerji Fenotipi testinde metabolik modülatörler olarak, Oligomisin, FCCP, Rotenon/Antimisin kullanıldı. Enerji akışının yönünün glikolitik ya da enerjetik yöne doğru değişimi ölçüldü.

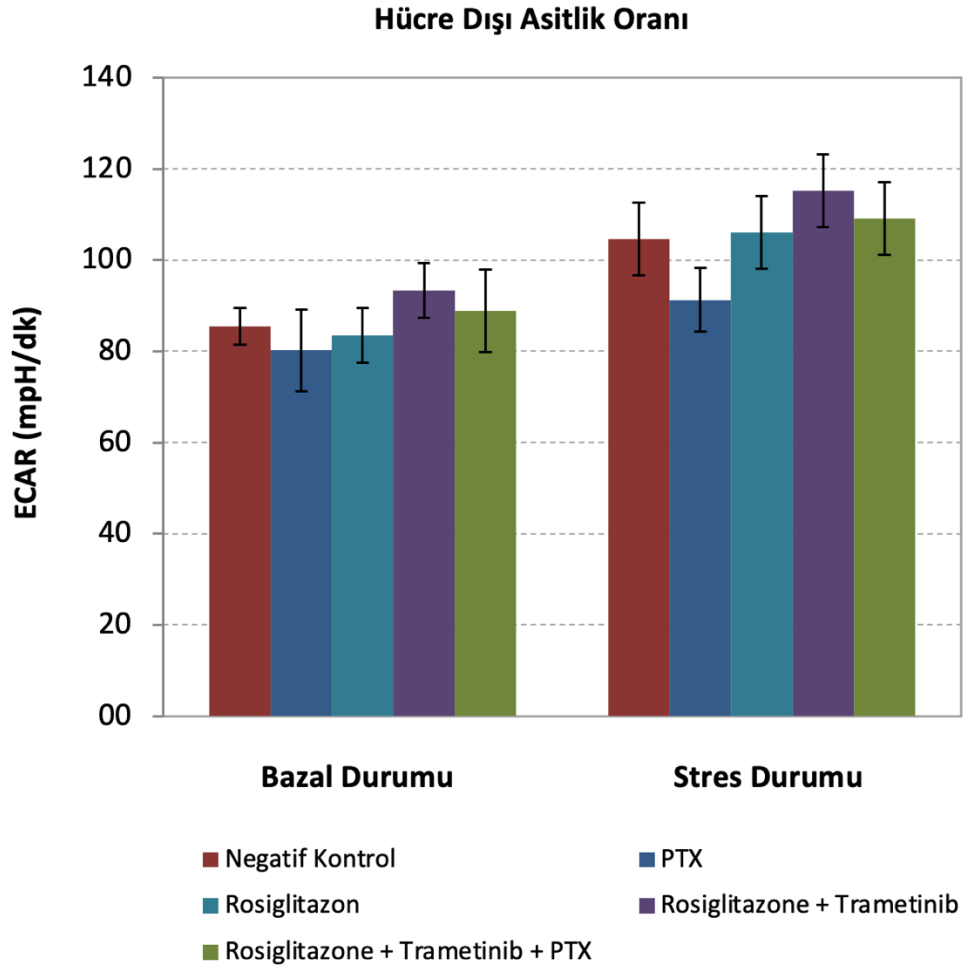
PyMT hücrelerinde bazal fenotip ile kıyaslandığında, modülatörler uygulandıktan sonra oluşan stres fenotipinde metabolizmayı en fazla enerjetik yöne değiştiren Rosiglitazon grubu oldu. Rosiglitazon+Trametinib grubu da metabolizmanın enerjetik yöne kaydığı ikinci grup idi (Şekil 6.3.3.1) (Şekil 6.3.3.2) (Şekil 6.3.3.3).



Şekil 6.3.3.1 PyMT-1099 hücre hattı hücresel enerji fenotipi sonuçları. (PTX: Paklitaksel)

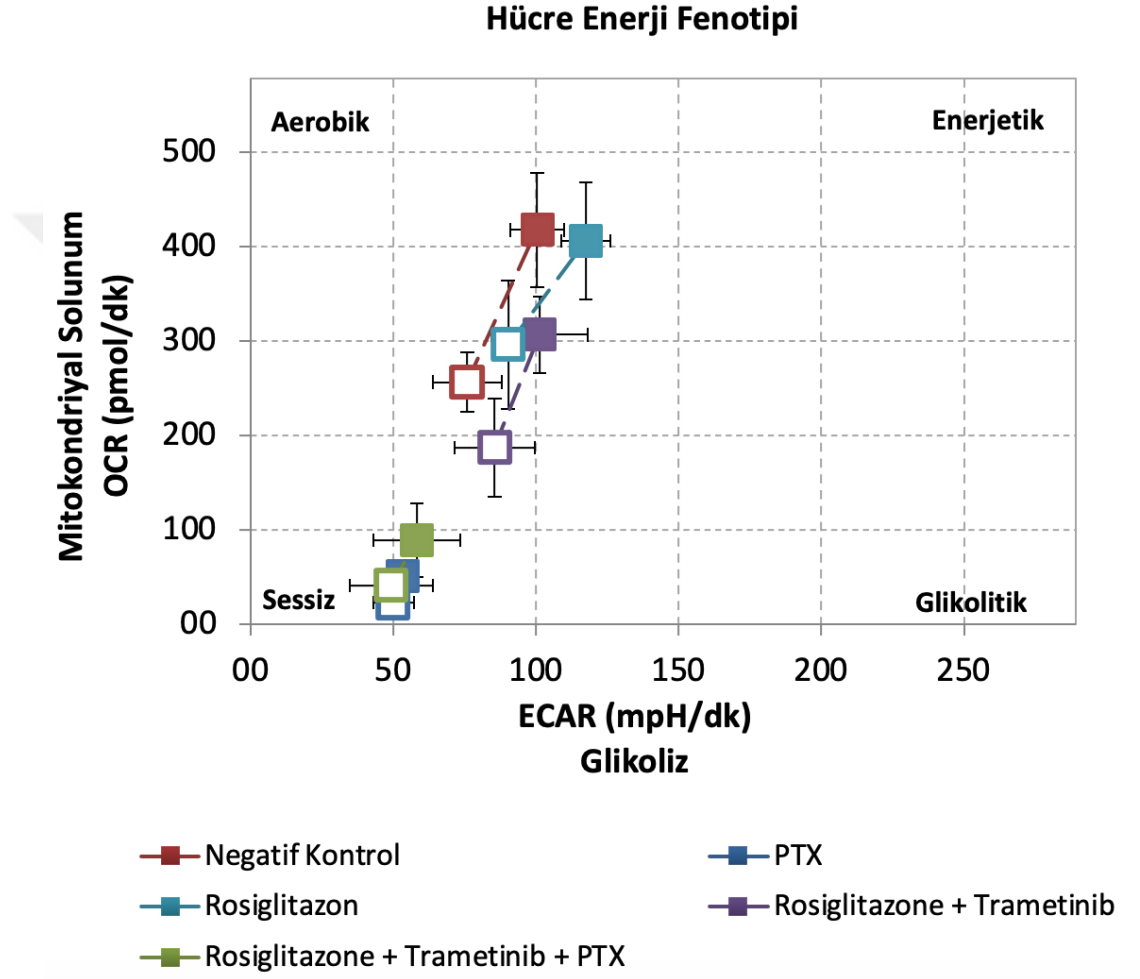


Şekil 6.3.3.2 PyMT-1099 hücre hattına ait OCR değerleri. (PTX: Paklitaksel)

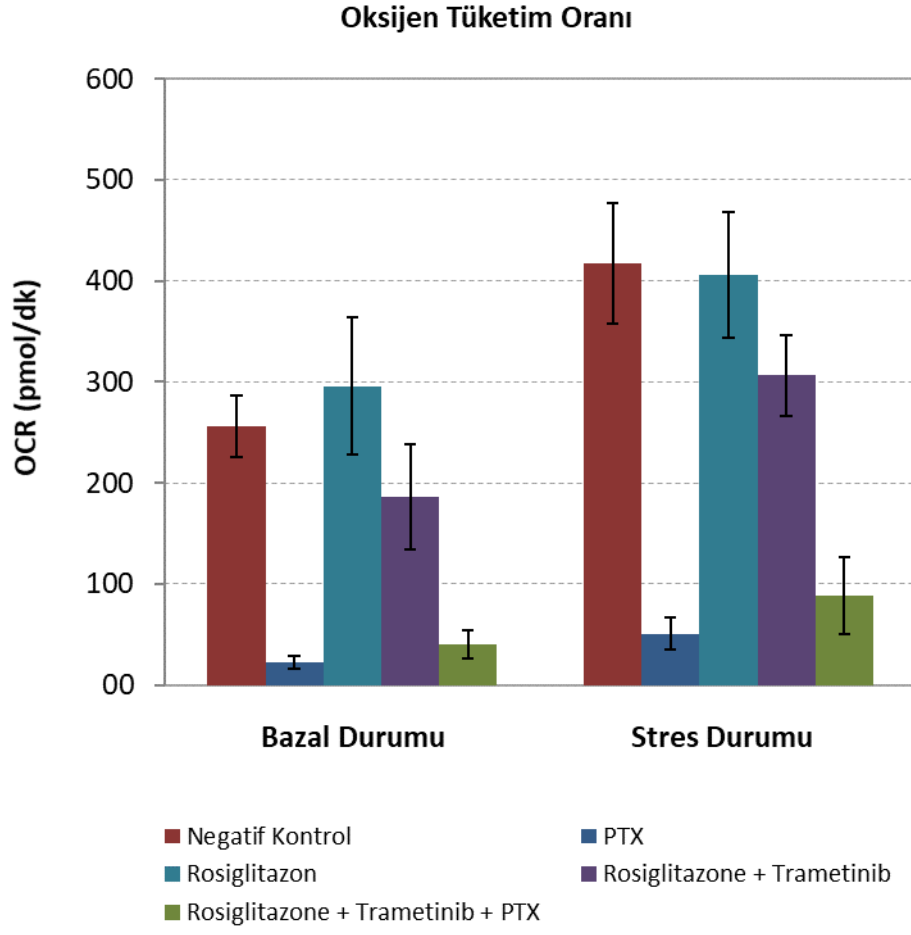


Şekil 6.3.3.3 PyMT-1099 hücre hattına ait ECAR değerleri. (PTX: Paklitaksel)

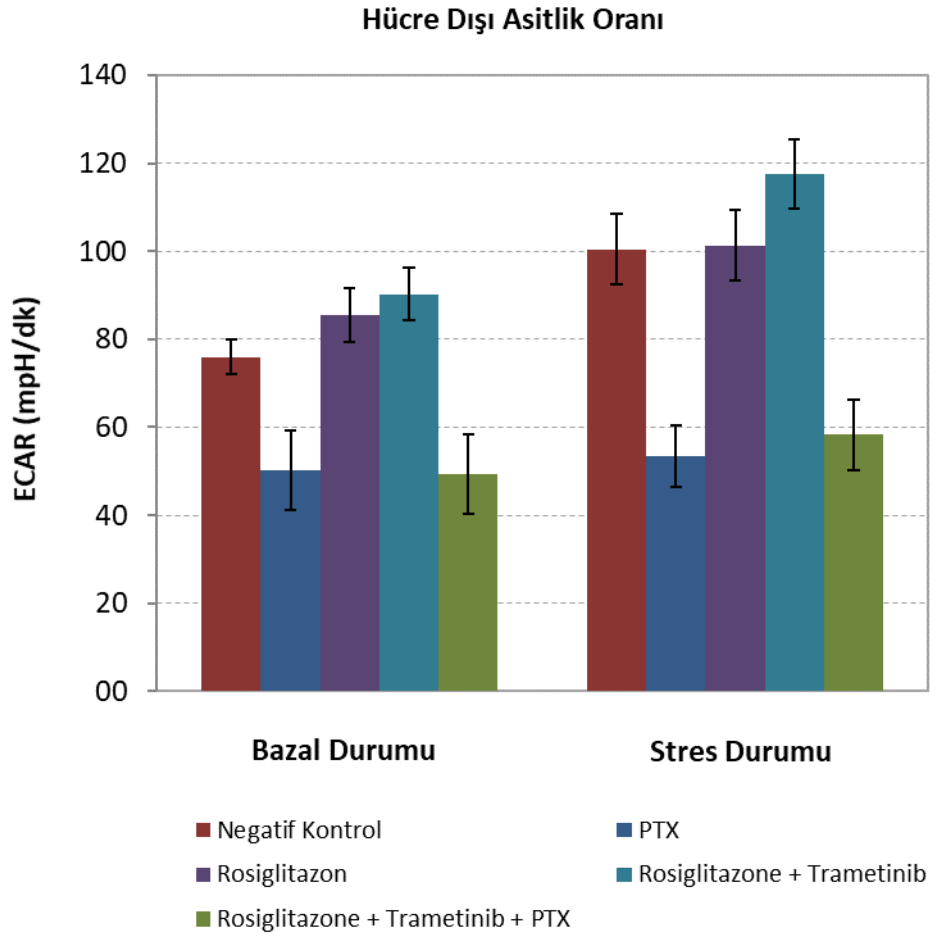
EMT6 hücrelerinde bazal fenotip ile kıyaslandığında, modülatörler uygulandıktan sonra oluşan stres fenotipinde metabolizmayı en fazla enerjetik yöne değiştiren Rosiglitazon grubu oldu. Rosiglitazon+Trametinib grubu da metabolizmanın enerjetik yöne kaydığı ikinci grup idi (Şekil 6.3.3.4) (Şekil 6.3.3.5) (Şekil 6.3.3.6).



Şekil 6.3.3.4 EMT6 hücre hattı hücresel enerji fenotipi sonuçları. (PTX: Paklitaksel)



Şekil 6.3.3.5 EMT6 hücre hattına ait OCR değerleri (PTX: *Paklitaksel*)



Şekil 6.3.3.6 EMT6 hücre hattına ait ECAR değerleri (PTX: Paklitaksel)

7. TARTIŞMA

Meme kanseri, farklı biyolojik özelliklere ve klinik davranışlara sahip karmaşık bir hastalık grubudur. Dünyada en sık görülen ikinci kanser ve kadınlar arasında en sık görülen kanserdir (12).

Şu anda meme kanseri tedavileri cerrahi, radyoterapötik, kemoterapötik ve biyolojik terapötik yaklaşımlara dayanmaktadır (11). Meme kanserinde; yaş, tümör boyutu, aksiller düğüm tutulumu, anjiyo-lenfatik invazyon, histolojik derece, hormonal reseptör durumu (östrojen ve progesteron) ve HER-2/neu ekspresyonu gibi birçok klinik ve patolojik özellik tedaviye alınan cevabı değiştirmektedir (12).

Meme kanseri yönetimini iyileştirmeye yönelik süregelen çabalara rağmen, erken teşhis edilen meme kanseri hastaların sadece %70-80'inde tedavi edilebilir bir hastalık olarak kabul edilirken, hastaların %30'u nüks etmekte ve metastatik kanser geliştirmektedir (11) ve meme metastatik karsinomu hala tedavi edilememektedir (129).

Bu durum da yeni tedavi anlayışlarına ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir (129).

Kanser hastasının hayatta kalmasının önündeki en büyük engel olan metastaz, bir tümörün birincil bölgesinden vücudun uzak bölgelerine yayılmasıdır. Kanser hücresi yayılması, tümör ilerlemesinde önemli bir adım olarak kabul edilir ve EMT gelişim süreçlerine benzer (130), Kanserde EMT, tümör başlangıcı, invazyon, metastaz ve tedaviye direnç ile ilişkilidir. Farklı EMT durumlarıyla ilişkili çoğalma, yayılma, plastisite, istila ve metastaz gibi farklı işlevsel özellikler bulunmaktadır (6) EMT boyunca, iyi polarize epitel hücreleri, hücre-hücre temaslarını yavaş yavaş kaybeder ve mezenkimal hücrelerin hareketli, göçmen özelliklerini kazanır. Bu geçiş; snail, slug ve Twist (EMT-TF) gibi bir dizi transkripsiyon faktörleri ağının aktivasyonu ile düzenlenir. Bunlar, hücresel yapışma, polarite ve hücre iskeleti ile ilgili çok sayıda epitelyal markır genini doğrudan baskılar. Aynı zamanda çeşitli mezenkimal işaretleyici genler doğrudan veya dolaylı olarak yukarı doğru düzenlenir (130).

EMT'nin çok aşamalı ilerlemesi ve tersine çevrilebilirliği; epitelyal durumdan başlayarak, parsiyel EMT, farklı fonksiyonel özelliklere sahip tamamen mezenkimal (tam EMT) durumların görülmesi ile sonuçlanır (4,5). Kısmi EMT, eksik EMT ya da hibrit EMT olarak da isimlendirilen Parsiyel EMT sürecinde hem epitelyal hem de mezenkimal özellikte hücreler görülür (5, 6).

Parsiyel EMT sürecinde çeşitli ajanlar kullanılarak kanser hücresi yağ hücresine dönüştürülür. Bu adipojenik farklılaşmanın, parsiyel EMT durumundaki hücrelerden kaynaklanırsa daha verimli olduğu gösterilmiştir (7). Çalışmamızda biz de parsiyel EMT sürecindeki hücrelere PPAR- γ agonisti olan Rosiglitazon, MEK inhibitörü olan Trametinib veya TGF β uygulayarak adipojenezi uyardık.

Rosiglitazon, PPAR- γ ligandlarına bağlanarak, glukoz ve lipid metabolizmasında olumlu etkiler gösteren, FDA onaylı antidiyabetik bir ajandır. Meme kanserinde, proliferasyonu, tümör anjiyogenezini, invazyonunu inhibe eder ve apoptozu uyararak antikanser etki gösterir (131).

TGF β aracılı EMT'de, TGF β sinyali, TGF β ligandları tarafından aktive edilebilir ve hem kanonik hem de non-kanonik yolağı aktive edebilir. Kanonik SMAD yolunda, fosforile SMAD2/SMAD3, SMAD4 ile bir kompleks oluşturur ve nükleusa geçerek EMT TF'lerini (SNAI1/2, ZEB1/2 ve TWIST1/2) aktive eder. Non-kanonik TGF β yolağında ise RAS/MAPK yolları SMAD'dan bağımsız olarak aktive edilir ve EMT TF'lerini aktive eder (132).

Trametinib, ERK fosforilasyonunu inhibe ederek (7), MEK yolağının inhibisyonunu sağlayan, antineoplastik aktiviteye sahip, FDA onaylı bir ajandır. TGF β aracılı hücre sinyalleşmesinin ve hücresele proliferasyonun inhibisyonunu sağlar (118).

Mezenkimal hücreler, epitel hücrelerinden farklı enerji gereksinimlerine sahiptir. Sonuç olarak, metabolik değişiklikler EMT ile ilişkilidir. Bununla birlikte, EMT'nin kanser hücrelerinin metabolik yeniden programlanmasını nasıl indüklediği hala belirsizdir. Meme kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi bazı kanserlerde, EMT'nin ya fosfofruktokinaz (10) ve sitokrom c oksidazı (133) inhibe ederek glikolizi aktive eder ya da Pirüvat dehidrogenaz kinaz 4'ün aşağı regülasyonu aminoasitlerde özellikle glutamatta artışa yol açarak glikolizden oksidatif fosforilasyona geçiş sağlar (134).

Kanser hücrelerinde glikoz alımı ve glikoliz artarken, oksidatif fosforilasyon azalır. Glikolizden sentezlenen pirüvatın laktata dönüşerek ECAR artar Bu metabolik fenotip, Warburg etkisi olarak adlandırılır (9).

Meme kanseri hücreleri heterojen hücrel enerji metabolizması gösterir. Hızlı çoğalan meme kanseri hücreleri, hücrel enerjiyi sağlamak için glikolitik fenotip gösterir.

Glikolitik fenotipte; yüksek glikoz alımı, düşük oksijen kullanımı, azalmış mitokondrial aktivite gözlenir (11). Glikolitik fenotipi karşılayan Warburg etkisi sadece tümör büyümesini sağlamak ile kalmaz, aynı zamanda metastazı da kolaylaştırır. Mevcut çalışmalar, Warburg etkisini malignitenin merkezinde konumlandırmaktadır (12).

Oksidatif fenotipte; azalmış glikoz alımı, artmış oksijen kullanımı, artmış mitokondriyal aktivite gözlenir. Sessiz meme kanseri kök hücreleri, oksidatif fenotip gösterir. ATP üretmek için glikoliz yerine daha fazla oksidatif fosforilasyon kullanır (11).

Kombine fenotip; hem fazla glikoliz hem de fazla Oksidatif fosforilasyonun görüldüğü yüksek metastatik özellik gösterir. Proliferatif kanser kök hücreleri kombine fenotip gösterirler (11).

Hücre plastisitesi, metabolik yeniden programlama ile EMT transkripsiyonel düzenlemesi iç içe geçerek kanserin negatif etkilerini potansiyalize etmeleri konusu çok yenidir. Bu çalışmanın amacı meme kanserinde PPAR- γ agonisti (Rosiglitazon) MEK inhibitörü (Trametinib) ve bunların konvansiyonel kemoterapötik ajan olan Paklitaxel (PTX) ile kombinasyonunun diferansiyasyon ilişkili olarak epitelyal mezenkimal transisyon (EMT) yolağına ve hücre enerji metabolizmasına etkisinin ortaya konmasıdır.

Bu çalışmanın özgün yönü, PyMT-1099 meme kanseri hücre hattında, PPAR- γ agonisti olan Rosiglitazon, MEK inhibitörü olan Trametinib ve kemoterapötik bir ajan olan PTX uygulanarak, hücrelerin adiposite farklılaştırılmasıdır. Daha önce başka araştırmacılar tarafından aynı fareden elde edilmiş başka bir hücre hattı olan Py2T hücre hattında Rosiglitazon ve Trametinib kullanılarak bu farklılaşma gerçekleştirilmiştir (7). Ancak güncel klinik tedavide uygulanan kemoterapötik bir

ajan olan PTX'in bu farklılaşmaya etkisi bilinmemektedir. Bu kombinasyonun adipojeneze, EMT'ye ve hücre enerji mtabolizmasına olan etkisinin ortaya konması, çalışmamızın özgün değeridir.

Çalışmamızda; faz kontrast mikroskopu görüntülerini incelediğimizde negatif kontrol grubu PyMT-1099 negatif kontrol grubu hücrelerinde, yoğunlukla epitelyal karakterde, parke taşı görünümünde hücreler olduğu ancak az miktarda mezenkimal hücrelerin de olduğu görüldü.

Saxena ve arkadaşları, 2018 yılında MMTV-PyMT faresinin meme kanseri dokusundan izole ettikleri bir hücre hattı olan PyMT-1099 hücrelerinin, TGF β varlığında epitelyal karakteristiklerini kaybederek, mezenkimal karakteristik kazandıklarını bildirmişlerdir (114). Aynı şekilde biz de çalışmamızda TGF β uyguladığımız hücrelerin mezenkimal özellik kazandıklarını gözlemledik.

PTX grubu hücrelerinde; hücre sayısında azalma görülürken, hücre görünümlerinin değişmediği gözlemlendi.

TGF β +Rosi+Tram grubu hücrelerinde adipojenezin yoğun olarak uyarıldığı ve TGF β ile mezenkimale dönüştürülen hücrelerin adipoz hücrelerine dönüştüğü görüldü. Rosi+Tram grubunda; TGF β +Rosi+Tram grubuna göre daha az adipojenez görüldü. Adipojenezin en yoğun olarak görüldüğü TGF β +Rosi+Tram grubuna, ilave olarak paklitakselin eklendiği TGF β +Rosi+Tram+PTX grubunda; hücre içindeki adipojenez görünümünün değişmediği ancak hücre sayısının azaldığı gözlemlendi.

Kemoterapötik bir ajan olan PTX, mikrotübül polimerizasyonunu artırarak hücre ölümüne sebep olmaktadır (120). Dolayısıyla PTX uyguladığımız gruplarda hücre sayısında azalma olması beklediğimiz bir sonuçtur. Ancak PTX'in adipojenez görünümünü değiştirmemesi yeni bir bulgudur.

Adiposite farklılaştığı bilinmekte olan ve bu sebeple kontrol hücre hattı olarak seçtiğimiz pre-adipozitik fibroblast hücre hattı olan 3T3-L1 hücrelerinin adipojeneze uğradıktan sonraki görüntüsü ile bizim elde ettiğimiz adipojenez görüntüsü birbirine benzemektedir. Bu da elde ettiğimiz farklılaşmış hücrelerin adiposit karakteristikte olduğunu doğruladı. Bu veri aynı zamanda Oil Red O boyaması ve ELİSA yöntemi ile adiponektin konsantrasyonları ölçülerek teyit edildi. Oil Red O ile boyanmış lipid dropletleri, 3T3-L1 hücrelerindeki boyanmış lipid droplet görünümü ile benzer

bulundu. Adipojenez protokolü uyguladığımız hücrelerdeki adiponektin konsantrasyonu ve kontrol adiposit konsantrasyonunun birbirine yakın olması elde ettiğimiz hücrelerin adiposit karakterde olduğunu doğrulamıştır.

2019 yılında Ronen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; Py2T hücrelerinde adipojenezi uyarmak amacıyla farklı kombinasyonlarla TGF β , Rosi ve Tram uygulanmış ve en iyi yanıtın TGF β +Rosi+Tram grubunda olduğunu görmüşlerdir (7). Aynı fareden elde edilen başka bir hücre hattı olan PyMT-1099 hücre hattında yaptığımız çalışmamızda biz de adipoza en iyi dönüşümün TGF β +Rosi+Tram grubunda olduğunu gördük.

FDA onaylı anti-kanser ajanlar olan PPAR- γ agonisti Rosiglitazon ve MEK inhibitörü Trametinib kullanılarak TGF β olmadan da adipogenezin sağlanmasının klinik uygulamalara hızlı geçiş açısından bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

PTX, metastatik meme kanseri tedavisinde güncel olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Adipojenez protokolüne ek olarak PTX eklenmesinin adipojenezi engellememesi, Rosiglitazon ve Trametinib ile beraber PTX'in kullanılabilirliğini düşündürdü.

Western Blot protein ekspresyonları incelendiğinde, negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görülen tek grubumuz TGF β +Rosi+Tram+PTX grubudur ($p \leq 0,001$). Bu grupta negatif kontrol grubuna göre HIF-1 α 'nın yükselmediği dolayısıyla HIF-1 α tarafından ekspresyonu tarafından uyarılan Twist'in de ekspresyonunun düşük olduğu görüldü. Bu grupta MEK inhibitörü olan Trametinib'in eklenmiş olması, Snail'in de ekspresyonunun düşük olmasına neden olmuştur. Twist, N-Kaderin ekspresyonunu yukarı yönlü olarak düzenler. Bu grupta Twist ekspresyonunun düşük olması N-Kaderin ekspresyon düşüklüğünü açıklayabilir.

Gruplar arası N-Kaderin proteininin ekspresyonları incelendiğinde, negatif kontrol grubuna göre kıyaslandığında TGF β +Rosi+Tram grubu ve Rosi+Tram gruplarında N-Kaderin ekspresyonunun azaldığı görüldü ($p \leq 0,01$). Bu da bize hücrelerin mezenkimal proteinlerini (sıkı bağlantıların kaybı) kaybederek ($p \leq 0,01$) post mitotik adipositlere dönüşmüş olabileceğini düşündürdü.

EMT'nin ana regülatör transkripsiyon faktörlerinden biri olan Snail ekspresyonu incelendiğinde, çalışmamızda tüm gruplar arasında en yüksek Snail ekspresyonunun TGFβ grubunda olduğu ($p \leq 0,001$), ancak buna karşılık E-Kaderin düzeyinin düşük olduğu gözlemlendi. TGFβ aracılı EMT'de, SMAD kompleksi nükleusa geçerek Snail ekspresyonunu artırır. Snail'in ise epitelyal proteinlerin ekspresyonunu inhibe ederek EMT'yi desteklediği bilinmektedir (132). Bizim çalışmamızda da Snail ekspresyonunun en yüksek olduğu grupta, epitelyal bir protein olan E-Kaderin konsantrasyonunun çok azaldığı görülmektedir.

Kemoterapötik bir ajan olan PTX'in hücre içi ROS üretimini artırarak, Snail ekspresyonunu yükselttiği bilinmektedir (135). Bizim çalışmamızda da TGFβ+Rosi+Tram+PTX grubunda, TGFβ+Rosi+Tram grubuna göre daha yüksek Snail ekspresyonu olduğu görüldü.

PTX'in, tümör baskılayıcı mekanizmaları artırarak EMT'yi inhibe ettiği ve PTX sensitivitesini arttırdığı bilinmektedir (136). Bizim çalışmamızda da negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında; PTX grubunda Slug ekspresyonunun azaldığı görülmüştür ($p \leq 0,01$).

Slug ekspresyonlarını incelediğimizde, negatif kontrol grubuna kıyasla, Rosi+Tram grubunda ekspresyonun azaldığı görülmüştür ($p \leq 0,01$). Slug ekspresyonu non-kanonik MEK/ERK yoluyla uyarılır (132). Trametinib ile MEK yolunun inhibe edilmesiyle birlikte, ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Yine aynı şekilde TGFβ+Rosi+Tram grubunda Slug ekspresyonundaki azalmanın da MEK yolundaki inhibisyon ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür ($p \leq 0,001$).

Çalışmamızda farklılaşma ajanları olan Rosiglitazon ve Trametinibe ek olarak güncel klinik tedavide kullanılan PTX'in adipojeneze ve EMT'ye etkisini inceledik. Bu ajanları birlikte kullandığımız TGFβ+Rosi+Tram+PTX grubunda EMT transkripsiyon faktörlerinin kontrole benzer olduğu, buna karşılık E-Kaderin'in arttığı ($p \leq 0,001$) görüldü. Bu da bize bu grubun EMT özelliğini kaybettiğini düşündürdü.

Negatif kontrol grubuna göre kıyaslandığında, TGFβ+Rosi+Tram grubunda HIF-1α ekspresyonunun yükseldiği ($p \leq 0,05$), Rosi+Tram grubunda ise azaldığı izlendi ($p \leq 0,05$). Bu da bize TGFβ'nin HIF-1α'yı ve hipoksiyi attırdığını gösterdi (137).

PYMT-1099 hücrelerinin Glikolitik Stres Test grafiğine göre; modülatörlere en iyi yanıt veren, glikolitik kapasiteyi en çok arttıran grup Rosiglitazon grubu oldu. PYMT hücrelerinde 40. dakikada uygulanan oligomisin'den sonra Rosiglitazon grubundaki hücreler yüksek glikolitik rezerv gösterdiler. ATP azalmasını glikolizi arttırmadan tolere ettiler. Oysa PTX hücreleri aynı anda glikolizi en üst düzeyde arttırdı. EMT6 hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt veren grup Rosiglitazon+Trametinib grubu idi. Rosiglitazon grubu modülatörlere iyi yanıt veren 2. grup oldu. PYMT hücrelerinin glikolitik kapasitesinin, EMT-6 hücrelerine göre daha fazla olduğu görüldü. EMT-6 hücrelerinde 2DG uygulamasının ardından ECAR değerleri, PYMT hücrelerine göre daha yüksekti, EMT6 hücrelerinde glikoliz daha uzun süre devam etti.

PYMT-1099 ve EMT6 hücrelerinde modülatörlere en iyi yanıt Rosiglitazon ve 2. sırada Rosiglitazon+Trametinib grubu oldu. Aynı şekilde her iki hücre hattında PTX grubu ve Rosiglitazon+Trametinib+PTX grubu uygulanan modülatörlere en az yanıt veren gruplar oldu.

PYMT ve EMT6 hücrelerinde bazal fenotip ile kıyaslandığında, modülatörler uygulandıktan sonra oluşan stres fenotipinde metabolizmayı en fazla enerjetik yöne değiştiren Rosiglitazon ve Rosiglitazon+Trametinib grubu oldu.

PPAR γ agonistleri, çeşitli dokularda gelişimi ve hücre sel büyüme yi ve (117) yağ asidi depolanmasını ve glukoz metabolizmasını düzenler (138). Özellikle, potansiyel anti-tümör etkilerinin incelenmesine yol açan adiposit farklılaşmasına aracılık ederler (117).

PPAR γ ligandları, birkaç hücre döngüsü düzenleyicisinin ekspresyonunu inhibe ederek kanser hücresi proliferasyonunu azaltır. Sentetik PPAR γ ligandları, rosiglitazon ve troglitazon ve endojen 15dPGJ2, siklin D1 transkripsiyonunun baskılanması yoluyla siklin D1 gen ekspresyonunu inhibe ederek hücre döngüsü durmasına yol açar (11).

Siklin D1'in sitozolik glikolizi düzenlediği ve Warburg etkisini indüklediği birkaç ek mekanizma tarif edilmiştir. (11) Rosiglitazon tarafından Siklin D1'in baskılanması enerji fenotipinin Rosiglitazon ve Rosi+tram grubunda glikolikten enerjetikçe değişmesini açıklamaktadır. Enerjetik fenotip gösteren Rosi+tram grubunda

kontrol grubuna göre, N kaderin ($p<0.01$), Twist ($p<0.01$), Slug ($p<0.001$), ve HIF1- α ($p< 0.05$), en düşük düzeyde bulunmuştur.



8. SONUÇ

Sonuç olarak, Rosi+Trametinip kombinasyonunun hücre plastisitesi, EMT, ve metabolik yeniden programlamaya etkisinin incelendiği çalışmada; Rosi+trametinip kombinasyonunun EMT-TF leri azalttığı, hücre metabolizmasını glikolitikten enerjetige çevirdiği görülmüştür. Bu durum enerji metabolizmasının oksidatif yöne değişmesiyle EMT'nin baskılandığını düşündürmektedir. Rosi+Tram kombinasyonuna PTX eklenmesinin EMT-TF'lerini arttırmadığı, E-kaderin ekspresyonunu ise maksimum düzeyde arttırarak EMT'yi baskıladığı ortaya konmuştur.



9. KAYNAKLAR

1. Liu F, Gu LN, Shan BE, Geng C Z, Sang MX. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncology letters*. 12(6), 4869-4876, 2016.
2. Nieto MA, Huang RYJ, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 166(1), 21-45, 2016.
3. Paternoster S, Falasca M. Targeting the adipose tissue to fight prostate cancer. *Translational Andrology and Urology*. 8(S3), S229–S231, 2019.
4. Lüönd F, Sugiyama N , Bill R ,Bornes L,Carolina Hager,Tang F vd. Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy. *Dev Cell*. 56(23),3203-3221, 2021. doi: 10.1016/j.devcel.2021.11.006.
5. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem*. 164(4),257-264, 2018. doi: 10.1093/jb/mvy047.
6. Pastushenko I, Blanpain, C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. *Trends in cell biology*. 29(3), 212-226, 2019.
7. Ishay-Ronen D, Diepenbruck M, Kalathur RKR, Sugiyama N, Tiede S, Ivanek R, Christofori G. Gain fat-lose metastasis: converting invasive breast cancer cells into adipocytes inhibits cancer metastasis. *Cancer cell*. 35(1), 17-32, 2019.
8. Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, Stemmler MP. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *The EMBO journal*. 40(18), e108647, 2021.
9. Larriba MJ, García de Herreros A, Muñoz A. Vitamin D and the epithelial to mesenchymal transition. *Stem cells international*, 2016.
10. Kim NH, Cha YH, Lee J, Lee SH, Yang JH, Yun JS. Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. *Nat. Commun*. 8, 14374, 2017.

11. Patra S, Elahi N, Armorer A, Arunachalam S, Omala J, Hamid I, ve ark. Mechanisms Governing Metabolic Heterogeneity in Breast Cancer and Other Tumors. *Front Oncol.* 23(11),700629, 2021.
12. Yadav BS, Sharma SC, Chanana P, Jhamb S. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J Clin Oncol.* 5(2),125-33, 2014.
13. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they?. *Mol Oncol.* 4(3),192-208, 2010.
14. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, Siegel RL. Breast cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians.* 69(6), 438-451, 2019.
15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6),394-424, 2018.
16. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (Erişim 01.10.2022).
17. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell biochemistry and biophysics.* 72(2), 333-338, 2015.
18. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis C & ABREAST Investigators. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clinical breast cancer.* 6(5), 391-401, 2005.
19. Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology*, 2th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
20. Ellis P, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabar L, Jacquemier J, Cornelisse CJ, Sasco AJ, Kaaks R, Pisani P, Goldgar DE, Devilee P, Cleton-Jansen MJ, Borresen-Dale AL, van't Veer L, Sapino A. Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A.,

Devilee, P. (Eds.), WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, Lyon Press, 2003.

21. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J. Pathol.* 208, 495-506, 2006.
22. Rakha EA, El-Sayed ME, Menon S, Green AR, Lee AH, Ellis IO. Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* 111, 121-127, 2008.
23. Louwman MW, Vriezen M, van Beek MW, Nolthenius- Puylaert MC, van der Sangen MJ, Roumen RM, et al. Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands. *Int. J. Cancer.* 121, 127-135, 2007.
24. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research.* 13(4), 1-7, 2011.
25. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *The Lancet.* 389(10087), 2415-2429, 2017.
26. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:9212-9217, 1999.
27. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406:747-752, 2000.
28. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 24:157-167, 2011.

29. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8:R76, 2007.
30. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12:R68, 2010.
31. Association of Breast Surgery at Baso. Surgical guidelines for the management of breast cancer. *Eur J Surg Oncol*; 35(Suppl 1): 1–22, 2009.
32. Albornoz CR, Matros E, Lee CN, Hudis CA, Pusic AL, Elkin E, Bach PB, Cordeiro PG, Morrow M. Bilateral mastectomy versus breast-conserving surgery for early-stage breast cancer: the role of breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 135(6): 1518–1526, 2015.
33. Senkus-Konefka E, Wełnicka-Jaskiewicz M, Ja skiewicz J, Jassem J. Radiotherapy for breast cancer in patients undergoing breast reconstruction or augmentation. *Cancer Treat Rev.* 30(8): 671–682, 2004.
34. Morrow M, Van Zee KJ, Solin LJ ve ark. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology-American Society of Clinical Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol.* 34(33): 4040–4046, 2016.
35. Ludwig KK, Neuner J, Butler A ve ark. Risk reduction and survival benefit of prophylactic surgery in BRCA mutation carriers, a systematic review. *Am J Surg.* 212(4): 660–669, 2016.
36. Darby S, McGale P, Correa C ve ark. Effect of radiotherapy after breastconserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer

- death: meta-analysis of individual patient data for 10, 801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 378(9804): 1707–1716, 2011.
37. van Werkhoven E, Hart G, van Tinteren H ve ark. Nomogram to predict ipsilateral breast relapse based on pathology review from the EORTC 22881-10882 boost versus no boost trial. *Radiother Oncol*. 100(1): 101–107, 2011.
38. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P ve ark. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 16(1): 47–56, 2015.
39. Coles CE, Griffin CL, Kirby AM ve ark. Partial-breast radiotherapy after breast conservation surgery for patients with early breast cancer (UK IMPORT LOW trial): 5-year results from a multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet*. 390(10099): 1048–1060, 2017.
40. Livi L, Meattini I, Marrazzo L ve ark. Accelerated partial breast irradiation using intensity-modulated radiotherapy versus whole breast irradiation: 5-year survival analysis of a phase 3 randomised controlled trial. *Eur J Cancer*. 51(4): 451–463, 2015.
41. McGale P, Taylor C, Correa C ve ark. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet*. 383(9935): 2127–2135, 2014
42. Poortmans PM, Collette S, Kirkove C ve ark. Internal mammary and medial supraclavicular irradiation in breast cancer. *N Engl J Med*. 373(4): 317–327. 109, 2015.
43. Whelan TJ, Olivotto IA, Levine MN. Regional nodal irradiation in early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 373(19): 1878–1879. 110, 2015.
44. Thorsen LB, Offersen BV, Danø H ve ark. DBCG-IMN: a population based cohort study on the effect of internal mammary node irradiation in early node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 34(4): 314–320. 111, 2016.

45. Poortmans P. Postmastectomy radiation in breast cancer with one to three involved lymph nodes: ending the debate. *Lancet*. 383(9935): 2104–2106, 2014.
46. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, Senkus E. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 30(8), 1194-1220, 2019.
47. Bliss JM, Kilburn LS, Coleman RE ve ark. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study. *J Clin Oncol*. 30(7): 709–717, 2012.
48. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A ve ark. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up. *Lancet Oncol*. 12(12): 1101–1108, 2011.
49. Cuzick J, Sestak I, Baum M ve ark. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 11(12): 1135–1141, 2010.
50. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC ve ark. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*. 295(14): 1658–1667, 2006.
51. Clarke M, Coates AS, Darby SC ve ark. Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 371(9606): 29–40, 2008.
52. Peto R, Davies C, Godwin J ve ark. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of longterm outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 379(9814): 432–444, 2012.
53. Samuel JA, Wilson JW, Bandos H ve ark. Abstract S3-02: nSABP B-36: a randomized phase III trial comparing six cycles of 5-fluorouracil (5- FU), epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) to four cycles of adriamycin and

cyclophosphamide (AC) in patients (pts) with nodenegative breast cancer. *Cancer Res.* 75 (Suppl 9): S3-02, 2015.

54. Nitz U, Gluz O, Huober J ve ark. Final analysis of the prospective WSGAGO EC-doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. *Ann Oncol.* 28(11): 2899, 2017.
55. Gianni L, Baselga J, Eiermann W ve ark. Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 27(15): 2474–2481, 2009.
56. Shao N, Wang S, Yao C ve ark. Sequential versus concurrent anthracyclines and taxanes as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of phase III randomized control trials. *Breast.* 21(3): 389–393, 2012.
57. Earl HM, Vallier AL, Hiller L ve ark. Effects of the addition of gemcitabine, and paclitaxel-first sequencing, in neoadjuvant sequential epirubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel for women with high-risk early breast cancer (Neo-tAnGo): an open-label, 2x2 factorial randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15(2): 201–212, 2014.
58. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD ve ark. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet.* 389(10075): 1195–1205, 2017.
59. Perez EA, Romond EH, Suman VJ ve ark. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B- 31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol.* 32(33): 3744–3752, 2014.
60. Slamon D, Eiermann W, Robert N ve ark. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 365(14): 1273–1283, 2011.

61. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H ve ark. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, openlabel, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 379(9816): 633–640, 2012.
62. Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A ve ark. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *J Clin Oncol*. 30(16): 1989–1995, 2012.
63. Gianni L, Pienkowski T, Im YH ve ark. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 13(1): 25–32, 2012.
64. Piccart-Gebhart M, Holmes E, Baselga J ve ark. Adjuvant lapatinib and trastuzumab for early human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: results from the randomized phase III adjuvant lapatinib and/or trastuzumab treatment optimization trial. *J Clin Oncol*. 34(10): 1034–1042, 2016.
65. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E ve ark. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 377(2): 122–131, 2017.
66. Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W ve ark. Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 360(7): 679–691, 2009.
67. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: metaanalyses of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 386(10001): 1353–1361, 2015.
68. Dhesy-Thind S, Fletcher GG, Blanchette PS ve ark. Use of adjuvant bisphosphonates and other bone-modifying agents in breast cancer: a Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 35(18): 2062–2081, 2017.

69. Muss HB, Berry DA, Cirrincione CT ve ark. Adjuvant chemotherapy in older women with early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 360(20): 2055–2065, 2009.
70. Perrone F, Nuzzo F, Di Rella F ve ark. Weekly docetaxel versus CMF as adjuvant chemotherapy for older women with early breast cancer: final results of the randomized phase III ELDA trial. *Ann Oncol.* 26(4): 675–682, 2015.
71. Crivellari D, Gray KP, Dellapasqua S ve ark. Adjuvant pegylated liposomal doxorubicin for older women with endocrine nonresponsive breast cancer who are NOT suitable for a “standard chemotherapy regimen”: the CASA randomized trial. *Breast.* 22(2): 130–137, 2013.
72. Staley H, McCallum I, Bruce J. Postoperative tamoxifen for ductal carcinoma in situ. *Cochrane Database Syst Rev.* 10: CD007847, 2012.
73. Forbes JF, Sestak I, Howell A ve ark. Anastrozole versus tamoxifen for the prevention of locoregional and contralateral breast cancer in postmenopausal women with locally excised ductal carcinoma in situ (IBIS-II DCIS): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 387(10021): 866–873, 2016.
74. Margolese RG, Cecchini RS, Julian TB ve ark. Anastrozole versus tamoxifen in postmenopausal women with ductal carcinoma in situ undergoing lumpectomy plus radiotherapy (NSABP B-35): a randomised, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 387(10021): 849–856, 2016.
75. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD ve ark. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 26(5): 778–785, 2008.
76. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S ve ark. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 15(7): 747–756, 2014.
77. Sikov WM, Berry DA, Perou CM ve ark. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete

- response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 33(1): 13–21, 2015.
78. Harbeck N, Kates RE, Look MP ve ark. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n=3424). *Cancer Res.* 62(16): 4617–4622, 2002.
79. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell.* 168(4), 670-691, 2017.
80. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 127(4), 679-695, 2006.
81. Brabletz, T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell.* 22, 699–701, 2012.
82. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 139(5), 871-890, 2009.
83. Hinz S, LaBarge MA. Hijacking EMT: better fat than dead. *Cancer Cell.* 35(1), 1-2, 2019.
84. Gong L, Yan Q, Zhang Y, Fang X, Liu B, Guan X. Cancer cell reprogramming: a promising therapy converting malignancy to benignity. *Cancer Communications.* 39(1), 1-13, 2019.
85. Welch DR, Hurst DR. Defining the hallmarks of metastasis. *Cancer research.* 79(12), 3011-3027, 2019.
86. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell.* 14(6), 818-829, 2008.
87. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 342(6159), 1234850, 2013.
88. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?. *Current opinion in cell biology.* 43, 7-13, 2016.

89. Pastushenko I, Blanpain, C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. *Trends in cell biology*. 29(3), 212-226, 2019.
90. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 20(2), 69-84, 2019.
91. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Limonta P, Gagliano N. Epithelial-to-mesenchymal transition markers and CD44 isoforms are differently expressed in 2D and 3D cell cultures of prostate cancer cells. *Cells*. 8(2), 143, 2019.
92. Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 13(16), 4769–4776, 2007.
93. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 13(9),963-972, 2013. doi: 10.2174/15680096113136660102.
94. Kaufhold SA, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res*. 33(1),62, 2014. doi: 10.1186/s13046-014-0062-0.
95. Phillips S, Kuperwasser C. SLUG: Critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer. *Cell Adh Migr*. 8(6),578-87, 2014.
96. Collin LJ, Maliniak ML, Cronin-Fenton DP, Ahern TP, Christensen KB, Ulrichsen SP, Damkier P, Hamilton-Dutoit S, Yacoub R, Christiansen PM, Sørensen HT, Lash TL. Hypoxia-inducible factor-1 α expression and breast cancer recurrence in a Danish population-based case control study. *Breast Cancer Res*. 23(1),103, 2021. doi: 10.1186/s13058-021-01480-1.
97. Yun BD, Son SW, Choi SY, Kuh HJ, Oh TJ, Park JK. Anti-Cancer Activity of Phytochemicals Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha. *Int J Mol Sci*. 22(18),9819, 2021. doi: 10.3390/ijms22189819.

98. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 22(11),5703, 2021.
99. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. Phenotypic plasticity: driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Cell stem cell.* 24(1), 65-78, 2019.
100. Polyak K. Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. *Cell.* 117(11), 3155–3163, 2007.
101. Merrell AJ, Stanger BZ. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nature reviews Molecular cell biology.* 17(7), 413-425, 2016.
102. Lu W, Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Developmental cell.* 49(3), 361-374, 2019.
103. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology.* 7(12), 885-896, 2006.
104. Hwang JK, Yu HN, Noh EM, Kim JM, Hong OY, Youn HJ, Jung SH, Kwon KB, Kim JS, Lee YR. DHA blocks TPA-induced cell invasion by inhibiting MMP-9 expression via suppression of the PPAR- γ /NF- κ B pathway in MCF-7 cells. *Oncol. Lett.* 13, 243–249, 2017.
105. Rovito D, Gionfriddo G, Barone I, Giordano C, Grande F, De Amicis F, Lanzino M, Catalano S, Andò S, Bonofiglio D. Ligand-activated PPAR γ downregulates CXCR4 gene expression through a novel identified PPAR response element and inhibits breast cancer progression. *Oncotarget.* 7, 65109–65124, 2016.
106. Rovito D, Gionfriddo G, Plastina P, Barone I, De Amicis F, Mauro L, Rizza P, Lanzino M, Catalano S, Bonofiglio D. Omega-3 DHA- and EPA–dopamine conjugates induce PPAR γ -dependent breast cancer cell death through autophagy and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1850, 2185–2195, 2015.

107. Gionfriddo G, Plastina P, Augimeri G, Catalano S, Giordano C, Barone I, Morelli, C, Giordano F, Gelsomino L, Sisci D. Modulating Tumor-Associated Macrophage Polarization by Synthetic and Natural PPAR γ Ligands as a Potential Target in Breast Cancer. *Cells*. 9, 174, 2020.
108. Pascale RM, Calvisi DF, Simile MM, Feo CF, Feo F. The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. *Cancers (Basel)*. 12(10):2819, 2020.
109. Lu J, Ming Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*. 28;356(2 Pt A):156-64, 2015.
110. Benny S, Mishra R, Manojkumar MK, Aneesh TP. From Warburg effect to Reverse Warburg effect; the new horizons of anti-cancer therapy. *Med Hypotheses*. 144:110216, 2020.
111. Walther S, Riad A, Nikolic A, Wang Y, Ebermann L, Siems WE et al. Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation*. 115,333–344, 2007.
112. Traba J, Miozzo P, Akkaya B, Pierce SK, Akkaya M. An Optimized Protocol to Analyze Glycolysis and Mitochondrial Respiration in Lymphocytes. *J Vis Exp*. 117:54918, 2016.
113. Little AC, Kovalenko I, Goo LE, Hong HS, Kerk SA, Yates JA, et al. High-content fluorescence imaging with the metabolic flux assay reveals insights into mitochondrial properties and functions. *Commun Biol*. 29;3(1),271, 2020.
114. Saxena M, Kalathur RKR, Neutzner M, Christofori G. PyMT-1099, a versatile murine cell model for EMT in breast cancer. *Scientific reports*. 8(1), 1-12, 2018.
115. Balfour JAB, Plosker GL. Rosiglitazone. *Drugs*. 57(6), 921-930, 1999.
116. Zhang H, You L, Zhao M. Rosiglitazone attenuates paraquat-induced lung fibrosis in rats in a PPAR γ -dependent manner. *European Journal of Pharmacology*. 851, 133-143, 2019.

117. Mody M, Dharker N, Bloomston M, Wang PS, Chou FS, Glickman TS. Rosiglitazone sensitizes MDA-MB-231 breast cancer cells to anti-tumour effects of tumour necrosis factor-alpha, CH11 and CYC202. *Endocr Relat Cancer*. 14(2),305-15, 2007.
118. Wright CJM, McCormack PL. Trametinib: First Global Approval. *Drugs* 73, 1245–1254, 2013. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0096-1>
119. Alqahtani FY, Aleanizy FS, El Tahir E, Alkahtani HM, AlQuadeib BT. Paclitaxel. In *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*. 44, 205-238, 2019.
120. Spencer CM, Faulds D. Paclitaxel. *Drugs*. 48(5), 794-847, 1994.
121. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*. 235(1-2), 179-192, 2002.
122. Panchagnula R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*. 172(1-2), 1-15. 1998.
123. Shukla N, Naik A, Moryani K, Soni M, Shah J, Dave H. TGF- β at the crossroads of multiple prognosis in breast cancer, and beyond. *Life Sci*. 27:310, 121011, 2022.
124. Trivedi T, Pagnotti GM, Guise TA, Mohammad KS. The Role of TGF- β in Bone Metastases. *Biomolecules*. 11(11),1643, 2021.
125. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical biochemistry*. 425(1), 88-90, 2012.
126. VanKlompberg MK, Bedalov CO, Soto KF, Prospero JR. APC selectively mediates response to chemotherapeutic agents in breast cancer. *BMC cancer*. 15(1), 1-14, 2015.
127. <http://www.seahorsebio.com> (Erişim 21.08.2022).

128. Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA, Gabriel FG, Whitehouse PA, Sharma S, Cree IA. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC cancer*. 5(1), 1-16, 2015.
129. Nandy A, Gangopadhyay S, Mukhopadhyay A. Individualizing breast cancer treatment-The dawn of personalized medicine. *Exp. Cell Res.* 320, 1–11, 2014.
130. Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, Berx G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 1868(2),584-591, 2017.
131. Fenner MH, Elstner E. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands for the treatment of breast cancer. *Expert opinion on investigational drugs*. 14(6), 557-568, 2005.
132. Hua W, Ten Dijke P, Kostidis S, Giera M, Hornsveld M. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 77(11), 2103-2123, 2020.
133. Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Kim CH, Yoon G, Han SI, Park HG, Kang HS. Wnt/Snail signaling regulates cytochrome C oxidase and glucose metabolism. *Cancer Res.* 72, 3607–3617, 2012.
134. Sun Y, Daemen, A, Hatzivassiliou G, Arnott D, Wilson C, Zhuang G. Metabolic and transcriptional profiling reveals pyruvate dehydrogenase kinase 4 as a mediator of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumor cells. *Cancer Metab.* 2, 20, 2014.
135. Park SY, Kim MJ, Park SA, Kim JS, Min KN, Kim DK, Sheen YY. Combinatorial TGF- β attenuation with paclitaxel inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 6(35), 37526, 2015.
136. Ashrafizadeh M, Mirzaei S, Hashemi F, Zarrabi A, Zabolian A, Saleki H, Samarghandian S. New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 141, 111824, 2021.

137. Tam SY, Wu VW, Law HK. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in cancers: HIF-1 α and beyond. *Frontiers in oncology*. 10, 486, 2020.
138. Xu YY, Liu H, Su L, Xu N, Xu DH, Liu HY, ve ark. PPAR γ inhibits breast cancer progression by upregulating PTPRF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 23(22),9965-9977, 2019.



10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
22/01/2020	04		Feyza Bayramoğlu

“Meme Kanserinde PPAR- γ Agonistleri ve Kemoterapi Kombinasyonunun Diferansiyasyon İlişkili Olarak EMT Yolağına Etkisi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Haziran 2020, 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	