

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**BT474 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA RUXOLİTİNİB VE
MK-2206'NİN ÖSTROJEN SİNYAL YOLAĞININ PI3K/AKT VE JAK/STAT SİNYAL
YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
ESİN GÜVENİR ÇELİK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2023

10533754

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**BT474 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA RUXOLİTİNİB VE
MK-2206'NİN ÖSTROJEN SİNYAL YOLAĞININ PI3K/AKT VE JAK/STAT SİNYAL
YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
ESİN GÜVENİR ÇELİK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2023

10533754



**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ONAY FORMU**

BŞEÜ-KAYSİS Belge No	DFR-360
İlk Yayın Tarihi/Sayısı	26.08.2022/35
Revizyon Tarihi	
Revizyon No.su	
Toplam Sayfa	01

Not: Formdaki ıslak imzalı kısımlar hariç tüm bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar işleme alınmayacaktır.

Öğrencinin,

Adı Soyadı : Esin GÜVENİR ÇELİK

Anabilim/Anasanat Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik Ortak-Dr

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Onur EROĞLU

Tez Başlığı : BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Ruxolitinib ve MK-2206'NİN Östrojen Sinyal Yolağının PI3K/AKT ve JAK/STAT Sinyal Yolakları Üzerindeki İlişkinin Araştırılması

Tezin İngilizce Başlığı : Investigation of the Relationship Between Ruxolitinib and MK 2206'S Estrogen Signaling Pathway on PI3K/AKT and JAK/STAT Signaling Pathways in BT474 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line

Savunma Sınavı Tarihi : 07/04/2023

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışması ilgili EYK kararıyla oluşturulan jüri tarafından **OY BİRLİĞİ /OY ÇOKLUĞU(../..)** ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim/Anasanat Dalında **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri;

Unvan, Ad Soyad	İmza
Doç. Dr. Onur EROĞLU	
Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU	
Prof. Dr. Beyhan DURAK ARAS	
Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR	
Doç. Dr. Gökhan KUŞ	

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. /.. / 20.. tarih ve ../.. sayılı kararı.

Prof. Dr. Murat ALANYALIOĞLU

İmza/Mühür

BEYAN

'BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Ruxolitinib ve MK-2206'nın Östrojen Sinyal Yolağının PI3K/AKT ve JAK/STAT Sinyal Yolakları Üzerindeki İlişkinin Araştırılması' adlı doktora tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığımı, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

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

Esin GÜVENİR ÇELİK

Tarih

İmza

ÖN SÖZ

Doktora tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde tüm bilgi ve tecrübesiyle hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen çok değerli tez danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Onur EROĞLU'na değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı sürdürdüğüm süre içerisinde bilimsel ve laboratuvar imkanları açısından yardım ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Bilge EREN'e, Sayın Doç. Dr. Rafiq GURBANOV'a, Sayın Doç. Dr. Fadime ÖZDEMİR KOÇAK'a, Sayın Doç. Dr. Sinem TUNÇER'e, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Gökhan SEVİNÇ'e, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tüm öğretim üyelerine değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimim ve laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini esirgemeyen tüm asistan ve lisansüstü eğitim gören arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam süresince iyi kötü her anlamda yanımda olan ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyerek bugünlere ulaşmamı sağlayan sevgili aileme, doktora çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Önder ÇELİK'e ve bana sevginin en masum ve saf halini gösteren sevgili oğlum Mete ÇELİK'e en içten saygılarım ve sevgimle teşekkür ederim.

Esin GÜVENİR ÇELİK

2023

ÖZET

BT474 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA RUXOLİTİNİB VE MK-2206'NİN ÖSTROJEN SİNYAL YOLAĞININ PI3K/AKT VE JAK/STAT SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Tümörlü bir hücrede, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması gerçekleşir. PI3K/AKT, JAK/STAT ve MAPK sinyal yolları kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasında, anjiyogenez ve metastazın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu sinyal yollarındaki genlere spesifik inhibitörlerle hücre proliferasyonunun azaltılması ve hücre ölümünün uyarılması terapötik yaklaşımlardandır. Ruxolitinib, JAK1/2'yi hedef alan bir RTK inhibitörüdür. MK-2206, oldukça güçlü ve seçici bir AKT inhibitörüdür. Ruxolitinib'in kanser hücrelerinde daha etkili bir şekilde etki edebilmesi, tümör hücrelerindeki ilaç birikiminin seçici bir şekilde artırılması, ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltılması gereksinimi bulunmaktadır. Bu çalışmanın ilk kısmında BT474 (ER+, PR+, HER2+) ve MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) meme kanseri hücrelerinde birbiri ile sinerjistik etki gösteren Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine tedavisi bu eksikliğin giderilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmanın ikinci kısmında ise Ruxolitinib ve MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller sentezlenerek bu eksikliğin giderilebilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL'nin IC₅₀ değerleri MTT testiyle; anti-kanser ve anti-proliferatif etkileri Survival, Soft Agar, Koloni Oluşum, Yara iyileşme testleriyle; apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişiklikler Hoechst boyasıyla incelenmiştir. İlaçların hücrelerde apoptoz, ER α , MAPK, PI3K/AKT ve JAK/STAT yolları üzerindeki etkileri protein seviyesinde immunblotlamayla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda Ruxolitinib+MK-2206 uygulamasının BT474 hücrelerinde PI3K/AKT, MAPK ve JAK/STAT3 yolağını inhibe ederek ekstrinsik apoptotik yolağı, MDA-MB-231 hücrelerinde PI3K/AKT, MAPK ve JAK/STAT5 yolağını inhibe ederek intrinsik apoptotik yolağı aktive ettiği gözlemlenmiştir. PCL-NP'lerin her iki hücrede toksik bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Ruxolitinib ve MK-2206'nın IC₅₀ değerlerinin ilaçların nanoformuyla birlikte BT474 hücrelerinde sırasıyla 0,3267 μ M ve 0,208 μ M'a, MDA-MB-231 hücrelerinde MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 2,08 μ M'a düştüğü gözlemlenmiştir. Hücrelerde Rux-PCL-NP ve MK-PCL-NP'nin PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT yolağı üzerinde benzer etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ruxolitinib, MK-2206, İlaç Yüklü PCL Nanopartiküller, Hücre Sağkalım Yolları, Apoptoz

ABSTRACT
INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN RUXOLITINIB AND MK
2206'S ESTROGEN SIGNALING PATHWAY ON PI3K/AKT AND JAK/STAT
SIGNALING PATHWAYS IN BT474 AND MDA-MB-231 BREAST CANCER CELL
LINE

In a tumor cell, the imbalance of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins takes place. PI3K/AKT, JAK/STAT and MAPK signaling pathways play an important role in the uncontrolled proliferation of cancer cells and in the regulation of angiogenesis and metastasis. Reducing cell proliferation and stimulating cell death with gene-specific inhibitors in these signaling pathways are therapeutic approaches. Ruxolitinib is an RTK inhibitor that targets JAK1/2. MK-2206 is a highly potent and selective AKT inhibitor. There is a need for Ruxolitinib to act more effectively on cancer cells, to selectively increase drug accumulation in tumor cells, and to reduce the toxic and side effects of drugs. In the first part of this study, the combined treatment of Ruxolitinib and MK-2206, which have synergistic effects on BT474 (ER+, PR+, HER2+) and MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) breast cancer cells, aimed to eliminate this deficiency. In the second part of this study, it was aimed to eliminate this deficiency by synthesizing PCL nanoparticles loaded with Ruxolitinib and MK-2206. Therefore, IC₅₀ values of Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP and Rux/MK-PCL were determined by MTT test; its anti-cancer and anti-proliferative effects by Survival, Soft Agar, Colony Formation, Wound healing tests; Morphological changes in apoptotic cells were examined with Hoechst stain. The effects of drugs on apoptosis, ER α , MAPK, PI3K/AKT and JAK/STAT pathways in cells were investigated by immunoblotting on protein level. In the results obtained; It has been observed that Ruxolitinib+MK-2206 application activates the extrinsic apoptotic pathway by inhibiting PI3K/AKT, MAPK and JAK/STAT3 pathways in BT474 cells, and activates the intrinsic apoptotic pathway by inhibiting PI3K/AKT, MAPK and JAK/STAT5 pathways in MDA-MB-231 cells. It was observed that PCL-NPs did not have a toxic effect on both cells. It was observed that the IC₅₀ values of Ruxolitinib and MK-2206 decreased to 0.3267 μ M and 0.208 μ M in BT474 cells, respectively, and the IC₅₀ value of MK-2206 decreased to 2.08 μ M in MDA-MB-231 cells with the nanoform of the drugs. It has been observed that Rux-PCL-NP and MK-PCL-NP have similar effects on the PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT pathways in cells.

Keywords: Ruxolitinib, MK-2206, Drug Loaded PCL Nanoparticles, Cell Survival Pathways, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanser.....	5
2.2. Meme Kanseri.....	6
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	6
2.2.2. Meme Kanserinin Moleküler Altipleri.....	9
2.2.3 Meme Kanserinde Prognostik Biyobelirteçler	12
2.2.4. Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması	15
2.2.5. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları.....	17
2.3. Apoptoz.....	21
2.3.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması.....	22
2.4. Meme Kanseri Progresyonunda Reseptör Tirozin Kinazların Rolü	25
2.4.1. Kanser Patogenezinde MAPK Yolağı	26
2.4.2. Kanser Patogenezinde PI3K/AKT Yolağı	27
2.4.3. Kanser Patogenezinde JAK/STAT Yolağı.....	29
2.5. Kombine Terapi.....	30
2.6. Kullanılan İlaçlar Ve Etki Mekanizmaları	31
2.6.1. Ruxolitinib	31

2.6.2. MK-2206	32
2.7. Nanopartiküller	33
3. MATERYAL-YÖNTEM	38
3.1 Materyaller.....	38
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	38
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	39
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	40
3.1.4. Kullanılan İlaçların ve Tamponların Hazırlanması	41
3.2. YÖNTEMLER.....	43
3.2.1. PCL, Blank ve İlaç Yüklü PCL Nanopartiküllerin Sentezi	43
3.2.1.5. Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü PCL Nanopartikül Sentezi.....	44
3.2.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	45
3.2.3. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 Etkin Maddelerinin Ve Ruxolitinib, MK-2206 Ve Ruxolitinib+MK-2206 Etkin Maddelerini İçeren PCL Nanopartiküllerin Hücreler Üzerindeki Antikanser Etkilerinin Belirlenmesi	46
3.2.4. Metastatik Ve Anti-Metastatik Etkinin Belirlenmesi.....	49
3.2.5. Apoptotik/Nekrotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi	50
3.2.6. İmmunblotlama Yöntemi	50
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Poli-ε-kaprolakton (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 yüklü Poli(ε-kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	53
4.2. Poli(ε-kaprolakton) (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (MK-PCL-NP) Ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	53
4.2.1. Nanopartiküllerin Büyüklükleri, Zeta Potansiyel Ve Polidispersite İndeks (PDI) Değerlerinin Ölçülmesi	53

4.2.2. Ruxolitinib yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), MK-2206 yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimliliği (EV) Ve İlaç Yükleme Kapasitesi (İY) Değerlerinin Belirlenmesi.....	54
4.2.3. Ruxolitinib, MK-2206 ve PCL Arasındaki Kimyasal Uyumsuzlukların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (FTIR) Spektroskopisi İle Belirlenmesi.	55
4.2.4. Ruxolitinib Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Morfolojik Analizleri.....	59
4.2.5. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerden <i>In Vitro</i> Etkin Madde Salım Çalışmaları.....	61
4.3. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Antikanser Etkisinin incelenmesi	63
4.3.1. BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin <i>In Vitro</i> Ortamda Büyütülmesi.....	63
4.3.2. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında <i>In Vitro</i> Sitotoksitesinin Ölçülmesi.....	64
4.3.3. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Sağkalımına Etkisi.....	75
4.3.4. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin (SM), Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	91
4.4. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-	

231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Sağkalım Yolakları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi.....	98
4.4.1. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında MAPK Sinyal Yolaklarındaki Etkilerinin İmmunblotlama Yöntemi ile Belirlenmesi	98
4.4.2. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında PI3K/AKT Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	100
4.4.3. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında JAK/STAT Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	102
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	104
5.1. Sonuç.....	104
5.2. Tartışma	109
5.2.1. Ruxolitinib, MK-2206 Ve Ruxolitinib+MK-2206 Saf Maddesi Uygulanan BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi	109
5.2.2. PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP Uygulanan BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi...	117
5.3. Öneriler.....	128
KAYNAKÇA	129

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Meme Kanserinin Değiştirilebilir Ve Değiştirilemez Risk Faktörleri	9
Tablo 2. 2. BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki Gen Mutasyonları	12
Tablo 3. 1. Kullanılan Cihazlar.....	38
Tablo 3. 2. Kullanılan Sarf Malzemeler	39
Tablo 3. 3. Kullanılan Kimyasallar	40
Tablo 3. 4. İlaç Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	42
Tablo 3. 5. SDS-PAGE Jel İçeriği	43
Tablo 3. 6. Bu Çalışmada Kullanılan Deney Setleri.....	47
Tablo 4. 1. Ruxolitinib, MK-2206 Ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü PCL Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	54
Tablo 4. 2. BT474 Ve MDA-MB-231 BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Ruxolitinib Ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP Uygulaması Sonrasında MTT Testi İle Belirlenen IC ₅₀ Değerleri.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	6
Şekil 2. 2. GLOBOCAN 2020 Verilerine Göre Meme Kanserinin Dünya Çapında Görülme Sıklığı	7
Şekil 2. 3. Erkeklerde ve Kadınlarda En Sık Görülen Kanser Türlerinin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları	8
Şekil 2. 4. MDA-MB-231(A) ve BT474 (B) Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Görüntüsü (10X10).	11
Şekil 2. 5. Meme Kanserinde Kullanılan Mevcut Tedavilerin Şematik Gösterimi	17
Şekil 2. 6. Apoptoz İlişkili Yolaklar	21
Şekil 2. 7. Apoptotik Yolaklar	24
Şekil 2. 8. MAPK Sinyal Patogenezi	27
Şekil 2. 9. PI3K/AKT Sinyal Yolağı ve Apoptozun İnhibe edilmesi	28
Şekil 2. 10. Meme Kanseri Patogenezinde JAK/STAT Sinyal Yolağı.....	30
Şekil 2. 11. JAK2 İnhibitörü Ruxolitinibin Etki Mekanizması.....	32
Şekil 2. 12. Akt İnhibitörü MK-2206 ‘nın Etki Mekanizması.....	33
Şekil 2. 13. Meme Kanseri Ve Üçlü Negatif Meme Kanserin Teşhis Ve Tedavisinde Kullanılan Nanotıp Yaklaşımları	34
Şekil 2. 14. Nanoçöktürme Yöntemiyle Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	36
Şekil 4. 1. Ruxolitinib (A), MK-2206 (B) ve PCL (C)’nin kimyasal formülü.....	56
Şekil 4. 2. PCL (A), Rux-PCL-NP(B), MK-PCL-NP(C) Ve RUX/MK-PCL-NP(D) FTIR Analiz Ölçümleri; PCL: Poli(E-Kaprolakton), PCL-Rux: Ruxolitinib Yüklü PCL Nanopartikül, PCL-MK: MK-2206-Yüklü PCL-Nanopartikül, PCL-RUX-MK: Ruxolitinib/MK2206-Yüklü PCL-Nanopartikül	58
Şekil 4. 3. Ruxolitinib’in Morfolojik Yapısı.....	59
Şekil 4. 4. Sentezlenen Rux-PCL-NP’lerin Morfolojik Yapısı.....	59

Şekil 4. 5. MK-2206'nın Morfolojik Yapısı	60
Şekil 4. 6. Sentezlenen MK-PCL-NP'lerin Morfolojik Yapısı	60
Şekil 4. 7. Sentezlenen Rux/MK-PCL-NP'lerin Morfolojik Yapısı	60
Şekil 4. 8. PCL Nanopartiküllerden Ruxolitinib Salınım Profili	61
Şekil 4. 9. PCL Nanopartiküllerden MK-2206 Salınım Profili.....	62
Şekil 4. 10. PCL Nanopartiküllerden Ruxolitinib+MK-2206 Salınım Profili	62
Şekil 4. 11. BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü (10X10).	64
Şekil 4. 12. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib (A) ve MK-2206 (B) İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48, 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.	66
Şekil 4. 13. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib+MK-2206 Kombinasyonu İle BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48 ve 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.....	67
Şekil 4. 14. Hücre Canlılık Testi. PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48 ve 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.	68
Şekil 4. 15. Hücre Canlılık Testi. Rux-PCL-NP (A), MK-PCL-NP (B) ve Rux/MK-PCL-NP (C) İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48 ve 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.	69
Şekil 4. 16. Hücre Canlılık Testi. PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.	71
Şekil 4. 17. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib (A) Ve Rux-PCL-NP (B) İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.	72
Şekil 4. 18. Hücre Canlılık Testi. MK-2206 Ve MK-PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.....	73

Şekil 4. 19. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib+MK-2206 İL BT474 (A) Ve MDA-MB-231(B) Ve Rux/MK-PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 (C) Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001..	74
Şekil 4. 20. Ruxolitinib, PCL-NP Ve Rux-PCL-NP'nin BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Sağkalımı Üzerine Etkisi. ****P<0.000.....	76
Şekil 4. 21. MK-2206, PCL-NP ve MK-PCL-NP'nin BT474 (A) ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Sağkalımı Üzerine Etkisi. ****p<0.000.	78
Şekil 4. 22. Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP' Nin BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Sağkalımı Üzerine Etkisi ****P<0.000.	80
Şekil 4. 23. Ruxolitinib Ve MK-2206 Saf Maddelerinin (A), PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP'nin (B) BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Büyüyebilme Yeteneklerinin Soft Agar Koloni Oluşum Testi İle Ölçülmesi.	82
Şekil 4. 24. Ruxolitinib Ve MK-2206'nın (A), PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP (B)'Nin BT474 Meme Kanseri Kanseri Hücre Hatlarının Metastaz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.	84
Şekil 4. 25. Ruxolitinib Ve MK-2206'nın (A), PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP (B)'Nin MDA-MB-231 Meme Kanseri Kanseri Hücre Hatlarının Metastaz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.	85
Şekil 4. 26. Ruxolitinib Ve MK-2206'nın BT474 (A) Ve MDA-MB-231(B) Meme Kanseri Hücrelerinde Lateral Hücre Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	88
Şekil 4. 27. PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP'nin BT474 (A) Ve MDA-MB-231(B) Ve Meme Kanseri Hücrelerinde Lateral Hücre Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.	90
Şekil 4. 28. Ruxolitinib Ve MK-2206 Tarafından (A) Ve PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP (B) Tarafından Tetiklenen DNA Kırıklarının BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Belirlenmesi.....	92
Şekil 4. 29. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Uygulaması Sonucundaki Apoptotik Değişimlerin BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.	94

Şekil 4. 30. Apoptotik Hücre Ölüm Yolağının Tetiklenmesinde Önemli Bir Rolü Olan Pro- Ve Anti- Apoptotik Bcl-2 Ailesi Üyelerinde Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Uygulaması Sonucundaki Değişimlerinin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.	97
Şekil 4. 31. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Uygulamasının MAPK Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin İmmunoblotlama Yöntemi İle MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.	99
Şekil 4. 32. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin PI3K/AKT Hücre Sağkalım Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin İmmunoblotlama Yöntemi İle MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.	101
Şekil 4. 33. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin JAK/STAT Hücre Sağkalım Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin İmmunoblotlama Yöntemi İle MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.	103
Şekil 5. 1. Ruxolitinib Ve MK-2206 Kombine Uygulamasının BT474 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması.....	116
Şekil 5. 2. Ruxolitinib Ve MK-2206 Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması	117
Şekil 5. 3. Rux-PCL-NP Uygulamasının BT474 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması.....	127
Şekil 5. 4. MK-PCL-NP Uygulamasının MDA-MB-231 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması	127

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- Abl** : Abelson
- ADCC** : Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksiste
- AKT** : Protein Kinaz B
- ANOVA** : Tek Yönlü Varyans Analizi
- APAF1** : Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
- APS** : Amonyum Persülfat
- AR** : Androjen Reseptörü
- ATM** : ATM serin/treonin kinaz
- BAK** : BCL2-Antagonisti/Öldürücü
- BC** : Meme Kanseri
- BID** : BH3 İle Etkileşime Giren Domain Ölüm Agonisti
- BLBC** : Bazal Meme Kanseri
- BRCA1** : Meme Kanseri 1
- CDC** : Kompleman Bağımlı Sitotoksiste
- CHEK2** : Kontrol Noktası Kinaz 2
- circRNA** : Dolaşımdaki Dairesel RNA
- CSC** : Meme Kanseri Kök Hücreleri
- CDH1** : E-Kaderin
- CI** : Kombinasyon İndeksi
- CTLA-4** : Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Molekül-4
- DISC** : Ölüm Dahil Sinyal Kompleksi
- DFS** : Hastaliksız Sağkalım
- DMSO** : Dimetilsülfoksit
- DOX** : Doksorubisin
- DR3** : Ölüm Reseptörü 3

DR4 : Ölüm Reseptörü 4

ECL : Arttırılmış Kemiluminisans Tamponu

EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri

EMT : Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

ER : Östrojen reseptörü

ER α : Östrojen Reseptör α

ER β : Östrojen Reseptör β

ERE : Östrojen Reseptörlerinden Sorumlu Elementler

ERK : Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyen Kinaz

ESR1 : Östrojen Reseptörü 1

EV : Enkapsülasyon Verimliliği

FADD : FAS Adaptör Proteini İle İlişkili Ölüm Alanı

FAK : Fokal Adhezyon Kinaz

FAS : Fas Hücre Yüzey Ölüm Reseptörü

FBS : Fetal Sığır Serumumu

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FGFR : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri

FTI : Farnesil Transferaz İnhibitörleri

FT-IR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi

GDP : Guanin Di-Fosfat

GNP : Altın Nanopartikül

GRB2 : Büyüme Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 2

HDAC : Histon deasetilaz

HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2

HR : Hormon Reseptör

HSP : Isı Şok Proteini

IC₅₀ : Yarı-Maksimal İnhibitör Konsantrasyon

IGFR : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri

INPP4B : İnositol Polifosfat-4-Fosfataz Tip II B

İY : İlaç Yükleme Kapasitesi

JAK : Janus Kinaz Ailesi

JNK : c-Jun NH₂- Terminal Kinaz

Kaspaz : Sistein Aspartat Spesifik Proteaz

K-Ras : Kirstein Rat Sarkoma

MAPK : Mitojen Aktive Protein Kinaz

MAPKK : MAP Kinaz Kinaz

MAPKKK : MAP Kinaz Kinaz Kinaz

Mib1 : Ki-67'ye Karşı Antikor

miRNA : MikroRNA

MK-PCL-NP : MK-2206 Yüklü Poli-ε-kaprolakton Nanopartikül

MoI : Migrasyon İndeksi

MOMP : Mitokondri Dış Membran Geçirgenliği

MPN : Myeloproliferatif Neoplazmlar

mTOR : Rapamisinin Memeli Hedefi

MTT : 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolyum Bromid

NP : Nanopartikül

PALB2 : BRCA2'nin Partneri Ve Lokalizörü

PARP1 : Poli(Adenozin Fosfat-Riboz) Polimeraz-1

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCL : Poli-ε-Kaprolakton

PGA : Poli (Glikolik Asit)

PLA : Poli (Laktik Asit)

PD-1 : Programlanmış Hücre Ölümü Ligand-1

PDI : Polidispers İndeks

PDGFR : Trombosit Türevli Büyüme Faktörü Reseptörleri

PDK : PIP₃ Bağımlı Kinazlar

PEG : Polietilen Glikol

PI3K : Fosfatidilinositol 3- Kinaz

PIK : Fosfoinositid Kinazlar

PIK3CA : Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Ünitesi Alfa

PIP2 : Fosfatidilinositol 4,5 Bisfosfatı

PIP₃ : Fosfatidilinositol 3,4,5- Trifosfat

PKB : Protein Kinaz B

PNP : Polimerik Nanopartiküller

PR : Progesteron Reseptörü

PTEN : Fosfataz Ve Tensin Homologu

p85 : PI3K İin Düzenleyici Altünitesi

RIPA : Radyo İmmünopresipitasyon Deneyi

RTK : Reseptör Tirozin Kinazlar

Rux-PCL-NP : Ruxolitinib Yüklü Poli-ε-kaprolakton Nanopartikül

Rux/MK-PCL-NP : Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli-ε-kaprolakton

SD : Standart sapma

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SERMs : Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri

SERDs : Selektif Östrojen Reseptör Downregülatörleri

SHC1 : Src Homoloji 2 Alanı İçeren Dönüştürücü Protein 1

SM : Saf Madde

SOS : Son of Sevenless

STAT : Sinyal Transdüzer ve Transkripsiyon Aktivatör

TAM : Tümörle İlişkili Makrofajlar

THF : Tetrahidrofuran

TNBC : Triple Negatif Meme Kanseri

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TNFR1 : TNF reseptörü 1

TPBC : Triple Pozitif Meme Kanseri

TRADD : TNF reseptör-ilişkili ölüm domain protein

TRAIL : TNF İle İlişkili Apoptozu Tetikleyen Ligand

TRAIL/Apo2L : Tümör-Nekroz Faktör-İlişkili Apoptoz Ligand Veya Apo2L

Tripsin-EDTA : Tripsin-Etilen Daimin Tetra Asetik Asit

TYK2 : Tirozin Kinaz2

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFR : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörleri

WBC : Düşük Beyaz Kan Sayımı

WT : Yabanıl Tip

cm : Santimetre

kDa : Kilo Dalton

g : Gram

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolar

mV : Milivolt

n : Örnek Sayısı

nm : Nanometre

µl : Mikrolitre

μm : Mikrometre

μM : Mikromolar

nM : Nanomolar

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Kanser, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen mekanizmalardaki mutasyonların birikimi sonucu oluşan ve bunun devamında programlı hücre ölümü ve proliferasyon arasındaki dengenin kaybolduğu bir hastalıktır (Letai, 2017: 275). Meme kanseri, kadınlarda en yaygın gözlenen kanser türlerindedir.

Östrojen reseptörü (ER) ifadesi meme karsinomlarının %70-75 inde önemli derecede arttığından tanıtılabilir bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Stanisławek vd., 2021: 12). Östrojen etkisini iki tip spesifik reseptörü ile gösterir; Östrojen Reseptör Alfa (ER α) ve Östrojen Reseptör Beta (ER β). Bu nükleer reseptörler, östrojenlerin ve anti-östrojenlerin biyolojik etkilerine aracılık eden ligand bağımlı transkripsiyon faktörleridir (Germain, 2011: 476; C. Williams & Lin, 2013: 2). Östrojen reseptörleri çekirdeğe hızla transfer olur ve inaktif halde dururlar. Çeşitli ısı şok proteinleri (Hsp 90, Hsp 56 gibi) östrojen reseptörleriyle kompleks oluşturur ve östrojenin reseptöre bağlanmasını sağlayarak reseptörde konformasyonel bir değişikliğe neden olurlar. Aktivasyondan sonra östrojen reseptör monomerleri arasında protein-protein etkileşimine bağlı olarak dimerleşme görülür. DNA'ya bağlanma afinitesinin yüksek olabilmesi için reseptörler arasında bu dimerleşmeye ihtiyaç vardır. Reseptör daha sonra duyarlı genlerin promotor bölgesindeki östrojen reseptörlerinden sorumlu elementlerle (ERE) etkileşerek hedef gen ifadesinin başlamasına yani hormonal etkinin başlamasına neden olmaktadır (Moras, 1998: 389).

Meme epitel hücrelerinde farklı sinyal yollarındaki düzensizlikler sonucu meme kanseri oluşmaktadır. Kanser hücrelerinde, sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedefleyen onkogenik mutasyonlar ve protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar hücre proliferasyonu ve sağkalım kontrolünün kaybına ve böylelikle karsinogeneze neden olur. Onkogenik sinyal iletiminin tümör gelişimi ve invazyon/metastaz sürecinde önemli bir etkisinin olduğu bilinmektedir. Östrojen sinyalinin karmaşıklığı ve diğer onkogenik yollar ile ilişkisi olabilmesi anti-östrojen tedavisi ile tedavi edilen hastalarda anahtar bir rolü olabilir (Ribeiro & Freiman, 2014: 6).

Reseptör tirozin kinazlar (RTK), kanser hücrelerinde sürekli ve kontrolsüz bir şekilde aktivite gösteren transmembran proteinlerdir. Fosfataz grubu proteinler RTK aktivasyonunun sonlandırılmasında rol alırlar. Yapılan çalışmalarda meme kanserinde agresifliğin artmasının ve hücre sağkalımının azalmasının RTK seviyelerinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Templeton vd., 2014: 1049). RTKlar, PI3K/AKT, JAK/STAT ve MAPK gibi sinyal

yolaklarını düzenler. Bu yolakların kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasında, anjiyogenez ve metastazın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Butti vd., 2018). Karsinogenezde rolü olan PI3K/AKT, JAK/STAT, MAPK gibi sinyal yolaklarının inhibe edilerek, hücre sağkalımının azaltılması ve hücre ölümünün tetiklenmesi son zamanlarda kullanılan terapotik yaklaşımlardandır (Godone vd., 2018: 30).

Programlı hücre ölümü apoptoz çok hücreli canlılarda normal gelişim sırasında gerçekleşen olaydır. Apoptoz mekanizmasında, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, kaspaz aktivitesinin azalması ve ölüm reseptör sinyallerinin bozulması gibi aksaklıkların olması apoptoz oluşumunu inhibe ederek kanser gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir (An vd., 2019: 1; Igney ve Krammer, 2002: 277).

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı hücre zarından nükleusa sinyali ileten bir dizi protein kinazlarla hücre proliferasyonunu, mitozu, gen ifadesini, metabolizmasını ve apoptozu düzenleyen bir sinyal iletim yoludur (Wada & Penninger, 2004: 2838). ERK' lar büyüme sinyaline cevap olarak MAPK'ları aktive ederken, diğer MAPK aile üyeleri p38-MAPK ve JNK osmolarite ve metabolizmadaki değişiklikler, DNA hasarı, oksidatif stres gibi çevresel uyarılara yanıt olarak aktive olmaktadır (Wada & Penninger, 2004: 2838). Serin/treonin kinaz ailesi MAPK'lar, MAP kinaz yolu reseptör aracılı sinyalin hücre içine iletiminde görevli bir kinaz kaskadı olarak rol alırlar. MAPK'lar RAS aktivasyonunu sağladıktan sonra sırası ile RAF, MEK ve ERK aktivasyonunu sağlar (Wada & Penninger, 2004: 2838). Aktive olan ERK, c-FOS, c-JUN, c-MYC veya ELK1 gibi proliferasyonla ilişkili transkripsiyon faktörlerini aktive eder (Zaballos & Santisteban, 2017: 45). Ras/Raf/MEK/ERK yolağının aşırı aktivasyonu insan tümörlerinin yaklaşık olarak %30'unda görülür. Mutant Ras proteinleri RAS-GTP formunda kalarak hücrenin kontrolsüz olarak sürekli uyarılmasını sağlar. Onkogenik Ras, PI3K/AKT yolağının sürekli aktive olarak hücre proliferasyonunu uyarır (Blalock vd., 2003: 1058).

PI3K/AKT sinyal yolağı meme kanseri dahil çoğu kanser türünde aktive haldedir. RTK tarafından aktive hale gelen fosfolipidlerdeki inositol halkasındaki 3'-OH grubunu fosforile ederek sinyal iletimini gerçekleştirir. PIP₃ bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumlu fosfatidilinositol trifosfat (PIP₃)'ı üreterek tümör gelişimi ve progresyonunu içeren sinyal yolaklarının iletilmesini sağlar (Alqahtani vd., 2019: 1). PI3K'nin sentezinin artması, PTEN' in işlev kaybı veya PKB'nin aşırı ifadesinin karsinogenez ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmalar PI3K ve ER yolaklarının tümörün progresyonunda sinerjistik bir etkisi olabileceğini göstermektedir (D. Zhou vd., 2019: 765).

Östrojenin PI3K aktivasyonu ile oluşan östrojen sinyal yolağının downregülasyonunu belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. PI3K ve AKT inhibitörleri aracılığıyla PI3K/AKT sinyal yolağının inhibe edilmesi kanserde kullanılan terapötik yaklaşımlardandır. MK-2206, AKT'ın zara taşınmasını ve aktivasyonunu bloke eden PH ve kinaz alanlarına bağlanan güçlü bir allosterik AKT inhibitörüdür (Kim vd., 2016: 5; Li vd., 2019: 2). MK-2206 ile AKT inhibe edilerek PI3K/AKT sinyal yolağının aktivasyonu durdurularak hücre ölümü uyarılabilir.

Memeli JAK-STAT sinyal yolağı JAK1, JAK2, JAK3 ve (Tirozin Kinaz2) TYK2 proteinlerini içeren 4 Janus Kinaz domaininden, 7 Sinyal Transdüzer ve Transkripsiyon Aktivatör (STATs) STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT5B ve STAT6 dan oluşmaktadır (Shuai & Liu, 2003: 900). JAK/STAT sinyal yolağının disregülasyonu tümorigenez, invazyon, metastaz, sağkalım, anjiyogenez, anti-apoptosis ve immün kaçış gibi onkogenik fenotipin oluşmasına yol açabilir (Obr ve Edwards, 2012: 8; Thomas vd., 2015: 365; Yu vd., 2014: 1). Ruxolitinib, JAK1/JAK2'yi hedefleyen JAK/STAT sinyalini baskılayan bir RTK inhibitörüdür ve miyelofibrozis ve polisitemi veralı hastaları tedavi etmek için onaylanmıştır (Stover vd., 2018: 1). JAK2'ye spesifik inhibitörler, STAT, PI3K/AKT ve MAPK yolaklarını inhibe eden ajanlarla kombine uygulanması terapötik bir yaklaşım olarak kullanılabilir.

Kombinasyon tedavisi, kanser tedavisinde iki veya daha çok terapötik ajanların kombinasyonunu kullanan bir terapötik yaklaşımdır (Eroglu vd., 2019). Kombine terapi ilaçların etkinliğini arttırdığından tümör büyümesini azaltmada ve hücre ölümünü uyardırma ilaçların tekli olarak uygulandığı monoterapiye göre daha etkili olabilmektedir (Eroglu, Kaya, vd., 2019; Mokhtari vd., 2017). Çeşitli kombinasyon yaklaşımlarının geliştirilmesinde nanoteknolojiden yararlanılabilir (Wang ve Minden, 2022: 2).

Geleneksel küçük molekül ve biyolojik anti-kanser ilaçları, hastalıklı ve sağlıklı dokulara etki ederek sistemik toksisite riskini arttırmakta ve hedef dokulara etkili ilaç konsantrasyonu ulaşamamaktadır (Hamzehzadeh vd., 2016: 60). Normal hücrelere zarar vermeden direkt kanser hücrelerine zarar verecek yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Nanopartiküllerin (NP'ler), direkt kanser hücrelerine daha etkili bir şekilde etki edebilen, tümör hücrelerindeki ilaç birikimini seçici bir şekilde arttırabilen ve dolayısıyla ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltılması için önemli bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir (Shafei vd., 2017: 1209). Nano-ilaç taşıma sistemlerinde ilaç-yüklü nanopartiküller, miseller, lipozomlar, katı-lipit nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, dendrimerler, metalik nanopartiküller, karbon

nanotüpler, nano boyutlu yarı iletken kristal yapılar (kuantum noktaları), fullerenler, metaloksitler kullanılabilir (Jain vd., 2020: 633; Marangoz & Yavuz, 2020; Tüylek, 2017). Polimerik nanopartiküller (PNP), ilacın enkapsüle edilebilmesinde çeşitli polimerlerin kullanıldığı bir nanopartikül sınıfıdır. PNP'ler, ilacın stabilitesinin artırılması ile o hücreye afiniteye sahip olan ligandına bağlanarak belirli kanserli hücreleri veya dokuları hedeflemede kullanılır (Shukla vd., 2019: 391) ve biyoyumlulukları sebebiyle avantaj sağlarlar (Jain vd., 2020: 635). Poli-ε-kaprolakton (PCL), sentetik yarı kristalin yapıda biyoçözünür ve yüksek oranda hidrofobik bir polimerdir ve in vitro çalışmalarında diğer polimerlerle bileşik yapabilmek özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu polimer fizyolojik ortamda yavaş yavaş degrade olmakta, toksik metabolitlerin birikimine sebep olmaması, biyoyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle, ilaç geliştirilmesi ve uzun süreli degradasyonu birkaç aya kadar ilaç salımını kolaylaştırması nedeniyle ilaç geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Sinha vd., 2004: 1).

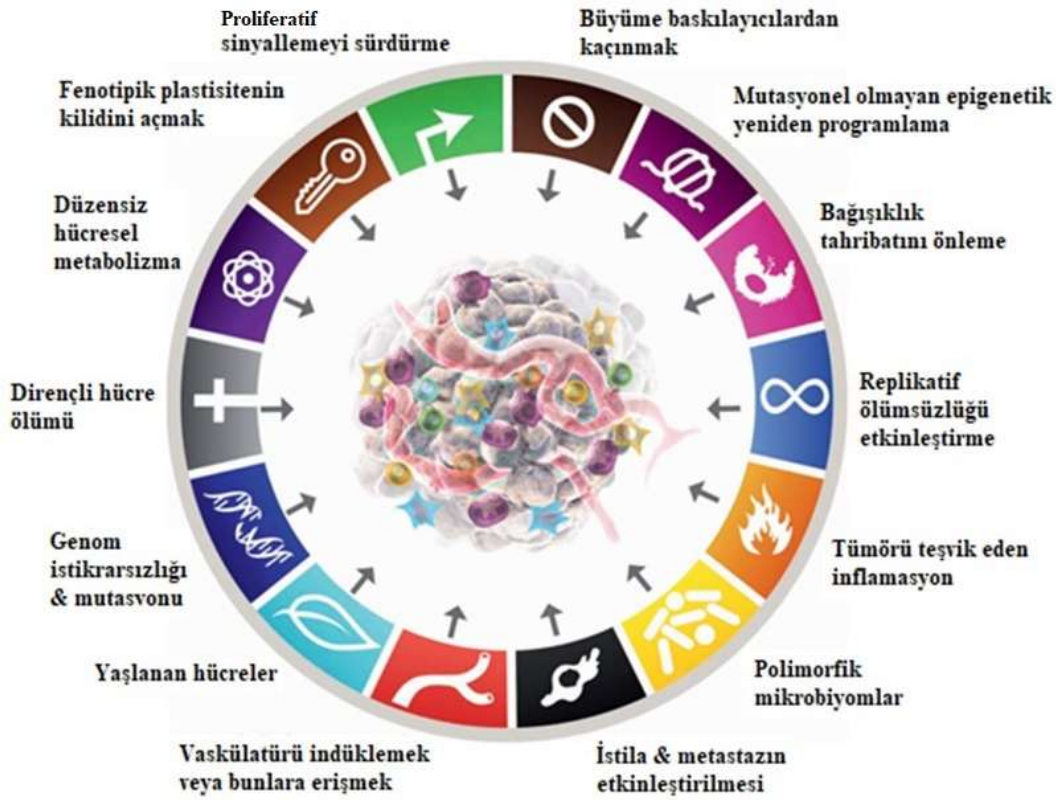
Bu çalışmanın ilk aşamasında biyoyumlu PCL nanopartiküller birbiri ile sinerjistik etki gösterdiği bilinen JAK1 ve JAK2 inhibitörü Ruxolitinib ve AKT inhibitörü MK-2206 ile yüklenerek ilaçların antitümör aktivitesinin artırılması, ilaçların yaratmış olduğu sitotoksik etkinin en aza indirgenmesi ve hücre içine alınımının kolaylaştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmanın ikinci aşamasında ise BT474 (ER+, PR+, HER2+) ve MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) meme kanseri hücre hatlarında Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib yüklü PCL nanopartikül, MK-2206 yüklü PCL nanopartikül ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin östrojen sinyal yolağı, PI3K/AKT, JAK/STAT, MAPK sinyal yolları ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin anlaşılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, proliferasyon ve programlı hücre ölümü arasında dengesizlik ile sonuçlanan hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmalarda meydana gelen mutasyonların sonucu oluşmaktadır (Letai, 2017: 275). Bu mutasyonlar, Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanan kanser hücrelerinin özelliklerini oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinin özellikleri büyüme baskılayıcılarından kaçış, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, immün sistemden kaçmak, sınırsız replikasyon potansiyeli, inflamasyonu teşvik eden tümör, polimorfik mikrobiyomlar, invazyon ve metastazın aktivasyonu, vaskülarizasyonun uyarılması, hücrelerin yaşlanması, genom instabilitesi ve mutasyon, hücre ölümüne direnç, hücre metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, fenotipik plastisitenin kilidinin açılması, proliferatif sinyallerin sürekliliğidir (Hanahan, 2022: 31) (Şekil 2.1.). Hücrelerde meydana gelen bu değişimler, tümör hücrelerine sınırsız replikasyon özelliği kazandırmaktadır. Kanser hücrelerinin hücre/hücre ve hücre/matriks adezyon moleküllerinin ifadesinin yok olması sonucunda metastaz özelliği kazanarak diğer dokulara yayılabilirler (Hanahan ve Weinberg, 2000: 65).

Sınırsız replikasyon ve metastaz özelliği kazanan kanser hücrelerinde, hücre çoğalması/ölümü dengesi bozulduğundan homeostatik denge de bozulmaktadır. Yapılan çalışmalarda apoptoz, hücre döngüsü ve DNA onarımı mekanizmalarında anahtar rolü olan genlerde, tümör baskılayıcı ve protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonların, hücrelerde malign fenotipin oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (Rohrbeck ve Borlak, 2009: 4). Ayrıca yapılan çalışmalarda transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, mitojenik aktivite gibi hücrelerel sinyal iletim basamaklarında meydana gelen bozuklukların da tümorigenez sürecinde rolü olduğunu göstermiştir (Sanovic vd., 2009: 934).



Şekil 2. 1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kaynak: (Hanahan, 2022: 32)

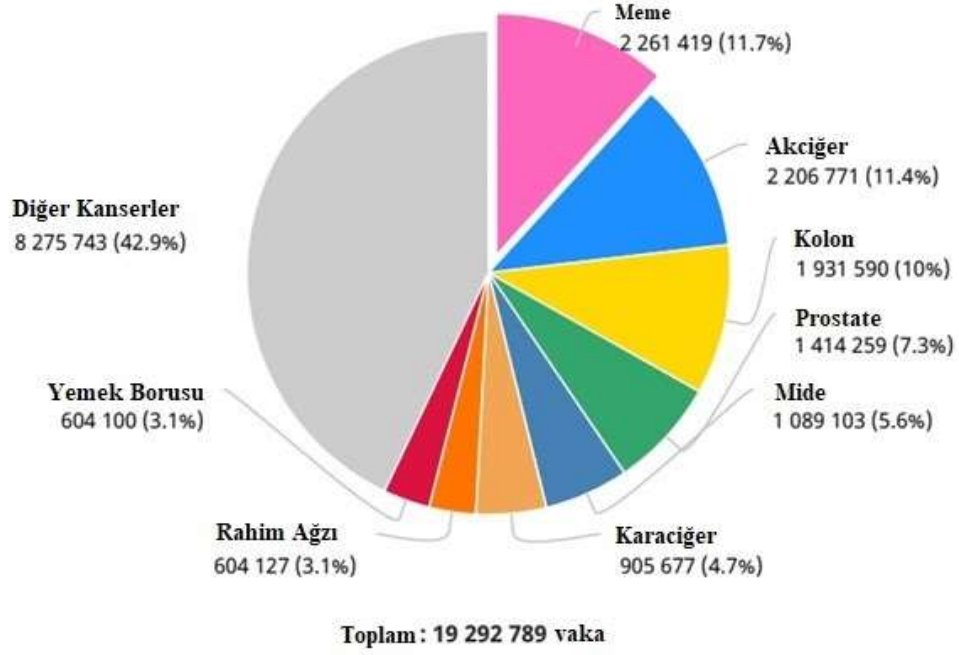
2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusunda meydana gelen patolojik bir durumdur. Çoğu kanser vakasında süt kanalından kökenlenir, daha az vakasında ise lobüllerden meydana gelir. Duktal bölgeden kökenleniyorsa duktal karsinoma, meme lobüllerinden kökenleniyorsa lobuler karsinom olarak adlandırılmaktadır (Almansour, 2022: 1).

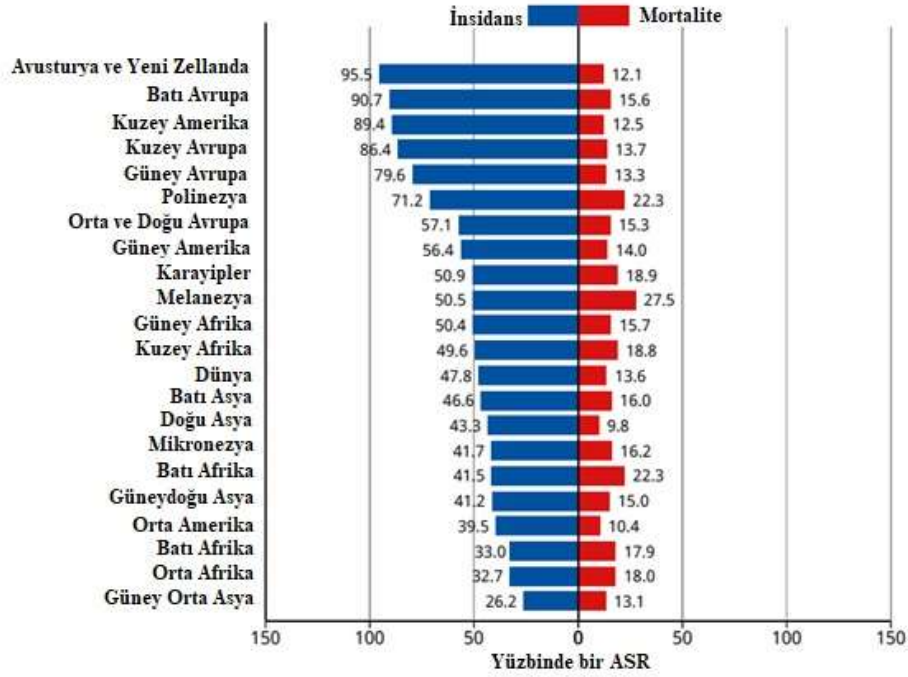
2.2.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Meme kanseri (BC), 2020'de 2 milyondan fazla yeni vaka ile dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir (Stanisławek vd., 2021). GLOBOCAN 2020 verilerine göre 19.292.789 vakanın toplamın %11,7'sinde görülmektedir (Şekil 2.2.). Türkiye'de ise Sağlık Bakanlığı'nın 2017 yılı istatistiklerine göre, BC görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 47,7 ile kadınlarda ilk sıradadır (Şekil 2.3.) (Türkyılmaz vd., 2021: 22). En yüksek meme kanseri insidansı %95,5 ile Avusturalya ve Yeni Zelanda'da, en düşük meme kanseri insidansı %26,2 ile güney Orta Asya'da görülmektedir (Şekil 2.2.).

2020'de her iki cinsiyette, her yaştaki yeni vaka sayısı



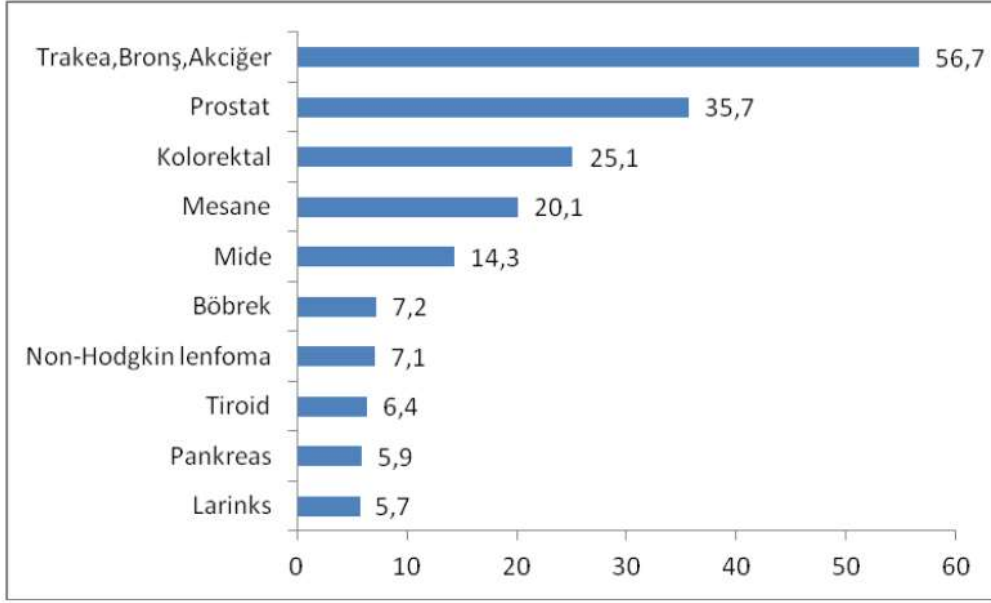
Yaşa standardize edilmiş (Dünya) insidans ve ölüm oranları, meme kanseri



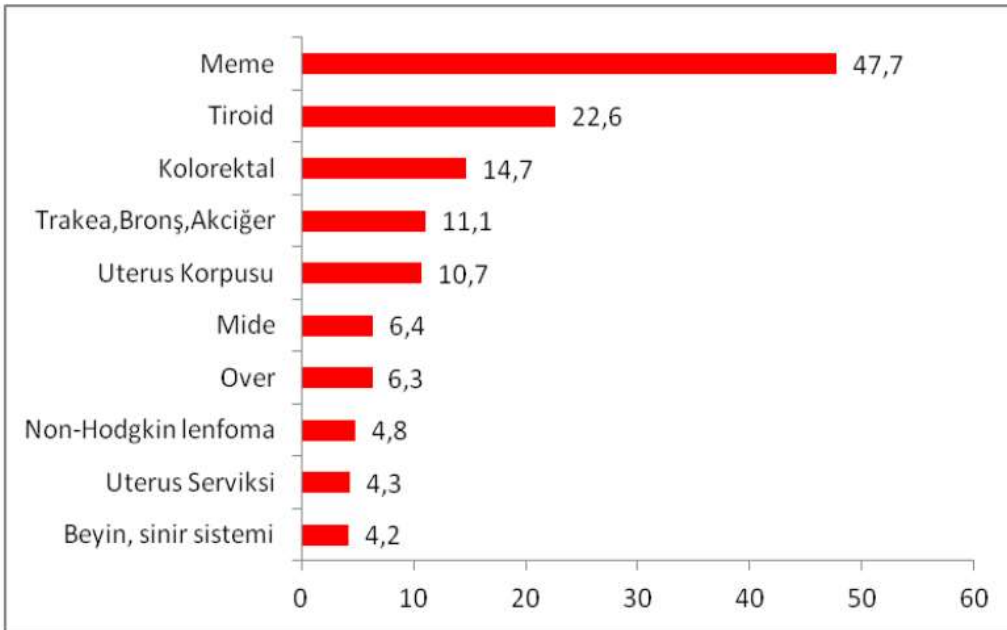
Şekil 2. 2. GLOBOCAN 2020 Verilerine Göre Meme Kanserinin Dünya Çapında Görülme Sıklığı

Kaynak: (Dünya sağlık örgütü, GLOBOCAN 2020 kanser istatistikleri)

Erkeklerde



Kadınlarda



Şekil 2. 3. Erkeklerde ve Kadınlarda En Sık Görülen Kanser Türlerinin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları

Kaynak: (Türkiye Sağlık Bakanlığı 2017 kanser istatistikleri)

Meme kanserinin oluşumunda hormonal, genetik, biyokimyasal, psikolojik ya da çevresel pek çok faktör etkilidir. Meme kanserinin değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Meme Kanserinin Değiştirilebilir Ve Değiştirilemez Risk Faktörleri

Değiştirilemez Risk Faktörleri	Değiştirilebilir Faktörler
Artan Yaş	Hormonal replasman tedavisi
Aile öyküsü (meme kanseri ve diğer kanser türleri)	Fiziksel aktivite
Genetik Faktörler	Aşırı kilo/Obezite
Meme dokusunun densitesi	Alkol tüketimi
İrk	Sigara kullanımı
Cinsiyet	İşlenmiş gıda alımı
Adet döngüsü ve menapoz	Kimyasallara maruziyet
Gebelik ve emzirme	Yetersiz vitamin takviyesi
Kişinin meme kanseri öyküsü	Yapay ışığa aşırı maruz kalma
Kanser olmayan diğer meme hastalıkları öyküsü	Diğer ilaçlar
Önceki radyasyon terapisi	

Kaynak: (Stanisławek vd., 2021: 1)

1.1.1. Meme Kanserinin Moleküler Altıpleri

BC'nin heterojen bir yapıya sahip olmasından dolayı, meme kanserinin moleküler, histopatolojik ve klinik özelliklerine göre sınıflandırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır (Eliyatkin vd., 2015: 59). BC'nin moleküler alttıplerinin özelliklerinin belirlenmesi BC hastalarına uygulanacak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlar (Stanisławek vd., 2021: 1).

Sınıflandırma yapılırken histolojik tipi, köken aldığı bölge, lenf nodlarına yayılım, histolojik özellikleri, insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) ve östrojen reseptörü (ER) pozitif yada negatiflik durumları değerlendirilmiştir (Sert & Küçükkılınç, 2022: 47). Bu değerlendirme sonucunda luminal A, luminal B, HER2, bazal tip, klaudin düşük ve normal tip olmak üzere alttiplere ayrılmıştır (Eliyatkin vd., 2015: 61; Sert & Küçükkılınç, 2022: 47).

Luminal A: Meme kanserinin % 50-60'ını oluşturmakta ve en sık görülen alt tipidir. Bu alt tipte östrojen (ER) ve progesteron (PR) hormon reseptörleri pozitif, negatif HER2 ve düşük proliferasyon hücre nükleer antijeni (Ki-67) indeksine sahiptir. Hormon tedavisi bu gruptaki hastalarda kullanılabilir (Eliyatkin vd., 2015: 61; Sert & Küçükkılınç, 2022: 47).

Luminal B: Meme kanserinin %10-20'sini oluşturmaktadır. İmmünohistokimyasal açıdan ER+, HER2- ve Ki-67 yüksek veya ER+ ve HER2+ tümörlerdir. Luminal A tipine göre daha yüksek nüks oranı, agresif bir fenotip, relaps sonrası daha fazla progresyon görülmesi, daha yüksek histolojik derece, proliferatif indekse ve daha kötü prognoz göstermektedir. Luminal B Tipi meme kanserlerinin tedavisinde hormonal terapi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Ayrıca bu tip meme kanserleri anti-HER2 terapisine de yanıt vermektedir (Eliyatkin vd., 2015: 61; Sert & Küçükkılınç, 2022: 47).

HER2-pozitif meme kanseri: Meme kanserinin %15-20'sinde görülmekte ve ER ve PR ifadesi bulunmazken, HER2 ifadesi yüksektir. Diğer luminal tipi meme kanseri alt tiplerine oranla yüksek farklılaşma yeteneği ve lenf nodüllerine çok hızlı olarak metastaz yapma eğilimi yüzünden prognozu çok kötü ve hastalığın çabuk ilerlemesine rağmen, anti-HER2 terapisine yanıt verdiği için tedavide başarı oranı yüksektir (Eliyatkin vd., 2015: 61; Sert & Küçükkılınç, 2022: 47).

Bazal benzeri: Üçlü negatif (Triple negatif) olarak tanımlanan ER, PR, HER2 reseptörü negatif alt tiptir ve meme kanserlerinin %15-20'sinde görülmektedir. BRCA1 ve BRCA2 geninde mutasyon olan kadınlarda görülme oranı daha yüksektir. En agresif gruptan biridir ve prognozları kötü bir şekilde ilerlemektedir. Bu tip meme kanserinde hormonal terapi ve kemoterapi tedavileri uygulanmaktadır (Eliyatkin vd., 2015: 61; Sert & Küçükkılınç, 2022: 47).

Klaudin düşük: Tight junctions ve hücreler arası yapışmada görevli Klaudin-3, -4, -7, okludin ve E-kaderin gibi genlerinin ifadeleri düşüktür ve meme kanserlerinin %12 -14'de görülmektedir (Eliyatkin vd., 2015: 64; Sert & Küçükkılınç, 2022: 47).

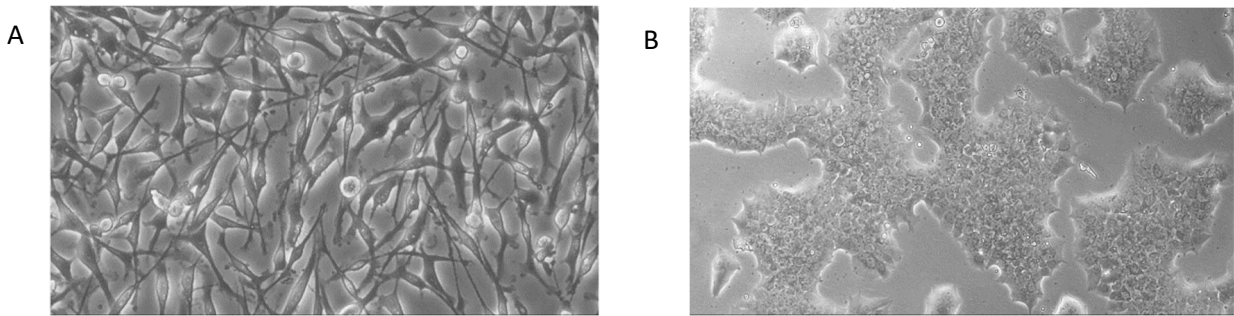
Normal meme benzeri: Bu tümörler meme kansinolarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır. Luminal A tipi ile benzer özellikte ER ve/veya PR ifadesi pozitif ve HER2 ifadesi negatiftir. Görülme oranı az olmasından dolayı bu alt tipe ilgili yapılan çalışma sayısı azdır (Eliyatkin vd., 2015: 64; Sert & Küçükkılınc, 2022: 47).

1.1.1.1. MDA-MB-231 ve BT474 hücre hatları

MDA-MB-231 oldukça agresif, invaziv ve az farklılaşmış, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme Faktörü 2 reseptörü (HER2) veya HER2 amplifikasyonu gibi hormon reseptörlerinin ifadesinde bir eksiklik ile karakterize üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır (Şekil 2.4 A.) (Franklin vd., 2020: 604; Y. Yang vd., 2018: 6515). Diğer invaziv kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin invazivliğine hücre dışı matrisin proteolitik bozunması aracılığı ile gerçekleşir. Claudin-3 ve claudinin-4'ün down regülasyonu, Ki-67 proliferasyon belirtecinin düşük ifadesi, epitelyal-mezenkimal geçişle ilişkili belirteçler için zenginleştirmesi ve CD44+CD24-/düşük fenotip gibi meme kanseri kök hücreleri (CSC'ler) ile ilişkili özellikler sergilediğinden claudin-düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmektedir (Holliday ve Speirs, 2011: 2). 3D kültürde endotel benzeri morfoloji gösterir (Harrell vd., 2014: 42). Hücre kolonileri arasında köprü oluşturan yıldız şeklindeki çıkıntılara sahip olan agresif fenotipi ile ayırt edilir (Kenny vd., 2007: 89).

BT474 ER pozitif, PR pozitif ve HER2 pozitif luminal B tipi meme kanseri hücre hattıdır ve hücre-hücre adhezyonunda sıkı kohesiv yapılar görülmektedir (Şekil 2.4 B). BT474 hücreleri estradiole yanıt olarak büyür ancak ER antagonisti tamoksifene karşı direnç gösterir. Ayrıca bir çalışmada BT474 hücrelerinde Tamoksifen ve Herceptin' in birlikte uygulamasının sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir (Dai vd., 2017: 3135).

BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki gen mutasyonları Tablo 2.2.' de gösterilmiştir.



Şekil 2. 4. MDA-MB-231(A) ve BT474 (B) Meme Kanseri Hücre Hattının Morfolojik Görüntüsü (10X10).

Tablo 2. 2. BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarındaki Gen Mutasyonları

Hücre Hattı	Tümör kaynağı	Histoloji	Mutant Gen	Zigosite	Gen Sekansı	Protein Sekansı
MDA-MB-231	metastaz, plevral efüzyon	Adenokarsinom	BRAF	heterozigot	c.1391G>T	p.G464V
	metastaz, plevral efüzyon	Adenokarsinom	CDKN2A	homozigot	c.1_471del471	p.0?
	metastaz, plevral efüzyon	Adenokarsinom	RAS	heterozigot	c.38G>A	p.G13D
	metastaz, plevral efüzyon	Adenokarsinom	TP53	homozigot	c.839G>A	p.R280K
BT474	primer	Duktal karsinoma	PIK3CA	heterozigot	c.333G>C	p.K111N
	primer	Duktal karsinoma	TP53	homozigot	c.853G>A	p.E285K

2.2.3 Meme Kanserinde Prognostik Biyobelirteçler

Prognostik belirteçler hastaya uygulanacak tedavi biçiminin belirlenmesi açısından önemlidir.

2.2.3.1. Östrojen Reseptörü (ER)

ER, invaziv meme kansinomlarının yaklaşık olarak %70-75'inde önemli ölçüde artan ER ifadesi ile karakterize edildiğinden, önemli bir tanısal belirleyicidir (Stanisławek vd., 2021: 12). Klinik uygulamalarda, birincil invaziv tümörler ve tekrarlayan lezyonlarda başta seçici östrojen reseptörü modülatörleri, saf östrojen reseptörü downregülatörleri veya üçüncü nesil aromataz inhibitörleri olmak üzere endokrin tedavisinin uygulanmasından en fazla fayda sağlayacak hastaların seçimini sağlamak için ER ifadesinin ölçümü gereklidir. Böylelikle uygun tedavinin seçimi gerçekleştirilmiş olmaktadır. Yüksek ER ifadesi olan hastalarda genellikle önemli ölçüde daha iyi klinik sonuçlar görülmektedir (Duffy vd., 2017: 12).

2.2.3.2. Progesteron Reseptörü (PR)

PR, ER-pozitif meme kanseri hastalarında yüksek oranda ifade edilirken (>%50), ER-negatif meme kanserli hastalarda oldukça nadiren ifade edilmektedir (Obr ve Edwards, 2012:

8). PR ifadesi ER tarafından düzenlenir, bu nedenle PR'nin fizyolojik değerleri fonksiyonel ER yolu hakkında bilgi verir (Obr ve Edwards, 2012: 8). Bununla birlikte, hem ER hem de PR meme kanseri hücrelerinde bol miktarda eksprese edilir ve her ikisi de meme kanserinin tanısal ve prognostik biyobelirteçleri olarak kabul edilir (Wu vd., 2020: 2). Daha yüksek PR ifadesi, genel sağkalım, nüks kadar geçen süre ve tedavi başarısızlığına veya progresyona kadar geçen süre ile pozitif olarak ilişkilirken, düşük PR seviyeleri genellikle hastalığın daha agresif seyri ve daha kötü nüks ve prognoz ile ilişkilidir (Patani vd., 2013: 2).

2.2.3.3. İnsan epidermal büyüme Faktörü 2 reseptörü (HER2)

HER2 ifadesi, meme kanserlerinin yaklaşık %15-25'inde görülür ve meme kanseri hastalarında uygun tedavi seçiminde önemlidir. HER2 aşırı ifadesi, meme karsinogenezi sırasındaki en erken olaylardan biridir. Ayrıca HER2 ifadesi, metastatik veya tekrarlayan meme kanserlerinin saptanma oranını %50'den %80'in üzerine çıkarır (Stanisławek vd., 2021: 12). HER2-pozitif kanserlerde, HER2 amplifikasyonu pro-onkogenik sinyal yollarının daha fazla aşırı aktivasyonuna yol açarak, daha kötü klinik sonuçlara sebebiyet veren kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine yol açar (Stanisławek vd., 2021: 12).

2.2.3.4. Ki-67

Ki-67 proteini, proliferasyon belirteçidir ve Ki-67 çoğalma indeksi, özellikle meme kanserinde kanserli hücrelerin proliferasyonu, tedaviye yanıt ve nüks süresi ile birlikte kanserin agresifliği hakkında bilgi verir (Nishimura vd., 2010: 747). Bu nedenle Ki-67, uygun tedavinin seçimi ve olası nüks nedeniyle takipler açısından çok önemlidir.

2.2.3.5. Mib1

Mib1 (Ki-67'ye karşı antikor) proliferasyon indeksi, Ki-67'ye benzer şekilde meme kanseri için güvenilir bir tanısal biyobelirteçtir. Hem Mib1 hem de Ki-67'nin ifade seviyelerindeki azalma, meme kanseri hastalarının ameliyat öncesi tedaviye iyi tepki vermesiyle ilişkilidir (Stanisławek vd., 2021: 13).

2.2.3.6. E-Kaderin

E-Kaderin (CDH1), epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) görevli kritik bir proteindir; ifadesinin kaybı, metastaz riskinin artmasıyla ilişkili olan mezenkimal fenotipe kademeli dönüşüme yol açar. E-Kaderin ifadesinin düşük veya hatta tamamen kaybı, meme kanserinin histolojik alt tipinin belirlenmesinde potansiyel olarak yararlı olabilir. Azalan E-Kaderin ifadesi, lenf nodu metastazı ile pozitif olarak ilişkilidir (Stanisławek vd., 2021: 13).

2.2.3.7. TP53

TP53 genindeki işlev kaybı mutasyonları, lösemi, osteosarkomlar, adrenokortikal karsinomlar, beyin tümörleri ve meme kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünde görülmektedir. P53 proteini normal hücrel homeostazi, hücre döngüsünün durması, apoptoz, DNA onarımı ve hücrel yaşlanma dahil olmak üzere hücrel stres tepkilerine aracılık ederek genomun korunması için gereklidir. P53 geninin inaktif hale gelmesi, kanser oluşumunun erken evrelerinde belirgin olarak görülür (Stanisławek vd., 2021: 14).

2.2.3.8. Dolaşımdaki dairesel RNA'lar

Dolaşımdaki dairesel RNA'lar (circRNA'lar), kodlayıcı olmayan RNA grubuna aittir ve yakın zamanlardaki çalışmalarda apoptoz, artan proliferasyon veya artan metastatik potansiyel gibi kanserin özellikleri açısından çok önemli oldukları gösterilmiştir (Zhou vd., 2019: 765). circFBXW7, TNBC hastaları için terapötik bir araç ve potansiyel bir tanısal biyobelirteçtir. hsa_circ_0072309 meme kanseri hastalarında bol miktarda eksprese edilir ve genellikle daha düşük hayatta kalma oranları ile ilişkilidir (Tran vd., 2020). Hsa_circ_0001785'in meme kanserinin tanısal bir biyobelirteç olarak umut verici olduğu düşünülmektedir (De Palma vd., 2022: 12).

2.2.3.9. MikroRNA

MikroRNA'lar (miRNA), birçok yolakda düzenleyici rollere sahip olan endojen kodlayıcı olmayan RNA moleküllerinin (19-25 nükleotit) ana sınıfıdır (Wiemer, 2007: 1529). Bazı miRNA'lar tümörün gelişimi, progresyonu ve tedaviye yanıtı ile ilişkilidir (Iorio ve Croce, 2012: 143). Yapılan birkaç çalışmada, meme kanseri doku örneklerinde anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilceğini gösterilmiştir (Adhami vd., 2018: 198). miRNA-21 ve miRNA-210 sürekli olarak up regüle ve miRNA-145, miRNA-139-5p, miRNA-195, miRNA-99a, miRNA-497 ve miRNA-205 ise down regüle olduğu gösterilmiştir (Adhami vd., 2018: 198). miRNA-21 aşırı ifade, TNBC dokularında gözlemlendi ve TNBC hücrelerinin artan invazyonu ve proliferasyonu ve PTEN ifadesinin down regülasyonu ile ilişkilendirildi (Fang vd., 2017: 953). Benzer şekilde, miRNA-210'un yüksek ifadesi meme kanseri hastalarında proliferasyon, invazyon ve kötü hayatta kalma oranları ile ilişkili olduğu gösterildi (Rothé vd., 2011: 1).

2.2.3.10. Tümörle İlişkili Makrofajlar

Makrofajlar, immünomodülatör etkileri ile bilinirler ve fenotiplerine göre M1 veya M2 benzeri durumlara bölünebilirler (Gordon ve Martinez, 2010: 593). M1 makrofajları,

antimikrobiyal ve antitümör etkileri olan IL-12 ve tümör nekroz faktörünü salgılar. M2 makrofajları, IL-10, IL-1 reseptörü antagonisti tip II ve IL-1 tuzak reseptörü dahil olmak üzere sitokinler üretir. Bu nedenle, M1 benzeri fenotipe sahip makrofajlar, iyi hastalık seyri ile ilişkilendirilirken, M2 benzeri fenotip, anjiyogenez, potansiyel olarak immün baskılama, tümör hücresi proliferasyonu ve invazyonu teşvik etmesinden dolayı olumsuz sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (C. B. Williams vd., 2016: 3). Literatürde, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) tümör büyümesini ve metastazını destekleyen M2 makrofajları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinde yapılan çalışmalar, TAM'lerin yoğunluğunun hormon reseptör durumu, histolojik derece, evre, vasküler invazyon. ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Gwak vd., 2015: 1; J. Yang vd., 2015: 6656).

2.2.4. Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması

Kanser hücresi içindeki mitojenik sinyaller için sinyal iletim yolları, hücre döngüsü kontrol sistemleri, DNA tamir sistemleri gibi çeşitli sistemler bozularak sınırsız büyüme, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, apoptoza direnç, invazyon ve metastaz anjiyogenez gibi malignant fenotip gözlemlenir (Schuur ve Deandrade, 2015: 159).

Meme kanseri ile ilişkili germline mutasyonların çoğu BRCA1 ve BRCA2 genlerinde görülmektedir. Meme kanseri 1 (BRCA1), BRCA2, kontrol noktası kinaz 2 (CHEK2), ATM serin/treonin kinaz (ATM) ve BRCA2'nin partneri ve lokalizörü (PALB2) gibi genlerin mutasyonu meme kanseri görülme riskini artırır sağlar (Tungsukruthai vd., 2018: 2608). Bu nedenle meme kanserinde yeni nesil dizileme, BRCA genlerine ek olarak PALB2, ATM, CHEK2, RAD51C, BARD1 ve TP53'ü içeren gen panellerine dayanmaktadır (Loibl vd., 2021: 1750). BRCA1 ile ilişkili tümör profilinin TNBC alt tipine benzediği, BRCA2 ile ilişkili tümörün profilinin ise luminal benzeri meme kanserleri, özellikle Luminal B alt tipi ile korele olduğu ortaya çıkarılmıştır (Incorvaia vd., 2020). Hastalarda meme kanseri ile ilişkili genlerdeki mutasyonların tespit edilmesi korunma, erken tanı ve tedavi yönteminin belirlenmesinde son derece öneme sahiptir (Polyak, 2002: 1).

Yapılan çalışmalar sonucunda östrojen antagonistlerinin terapötik olarak kullanılması ve östrojen reseptörünün tanısal bir biyobelirteç olarak ölçülmesi için temel atılmasını sağladı. Östrojen etkisini Östrojen Reseptör Alfa (ER α) ve Östrojen Reseptör Beta (ER β) spesifik reseptörü ile gösterir. Bu nükleer reseptörler, östrojenlerin ve anti-östrojenlerin biyolojik etkilerine aracılık eden ligand bağımlı transkripsiyon faktörleridir (Germain, 2011: 476; C. Williams ve Lin, 2013: 2). Östrojen reseptörleri çekirdeğe hızla transfer olur ve inaktif

haldedirler. Hsp 90, Hsp 56 gibi ısı şok proteinleri, östrojen reseptörleriyle kompleks oluşturur ve östrojenin reseptöre bağlanmasını sağlayarak reseptörde konformasyonel bir değişikliğe ve aktivasyondan sonra östrojen reseptör monomerleri arasında protein-protein etkileşimine bağlı olarak dimerleşme görülür. DNA'ya bağlanma afinitesinin yüksek olabilmesi için reseptörler arasında bu dimerleşmeye ihtiyaç vardır. Reseptör daha sonra duyarlı genlerin promotör bölgesindeki östrojen reseptörlerinden sorumlu elementlerle (ERE) etkileşerek hedef gen ifadesinin başlamasına yani hormonal etkinin başlamasına neden olmaktadır (Moras, 1998: 389). ER, ERE'lerden bağımsız olarak gen ifadesini da aktive edebilir. Bunu, JUN ve AP-1 dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörleriyle kompleksler oluşturarak yapar ve bunlar daha sonra ovalbumin, IGF-1 ve CCND1 gibi genler için gen promotörlerindeki aynı kökenli bağlanma bölgeleri aracılığıyla transkripsiyonu uyarır. Gen ifade transaktivasyonuna ek olarak, östrojen reseptörü, genomdan bağımsız bir şekilde MAPK, PI3K sinyal yolağı gibi mitojenik sinyal yollarının aktivasyonuna aracılık edebilir (Velloso vd., 2017: 5492).

HER2 gibi büyüme faktörü reseptörlerinin meme kanseri oluşumunda önemli rolü vardır ve kanser terapötikleri için ana hedeftir (Tungsukruthai vd., 2018: 2610).

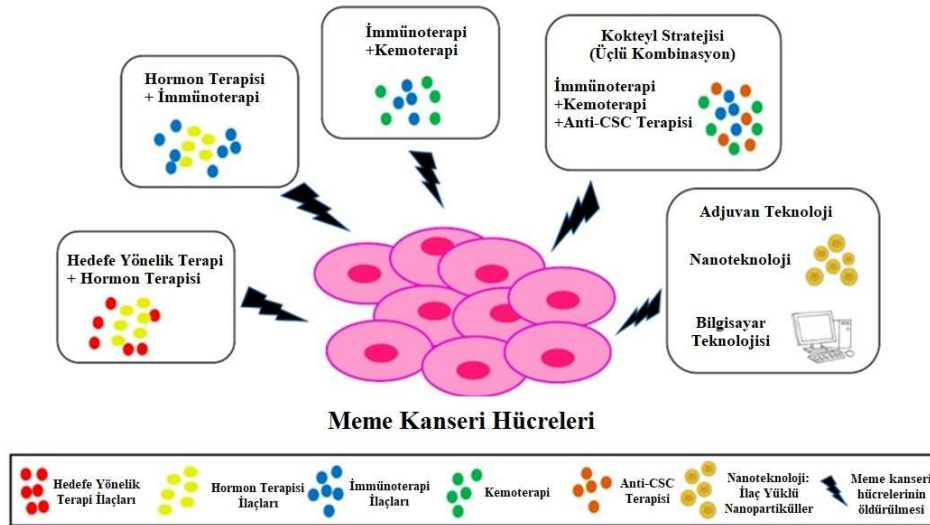
Meme kanseri onkogenesinde yer alan TP53, ATM, CCND1 ve CHEK2 genleri, hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alır. TP53, birçok farklı kanser türünde en sık mutasyona uğrayan genlerden biri olan P53 tümör baskılayıcı proteini kodlar. P53 proteinini, hedef genlerini DNA hasarı da dahil olmak üzere çeşitli hücrel streslere yanıt olarak düzenleyen ve böylece hücre döngüsünü durduran veya yaşlanmayı, apoptozu, DNA onarımını veya metabolizma değişiklikleri uyaran çok işlevli bir proteindir. CCND1, sikline bağımlı kinazlar 4 ve 6 ile etkileşime girerek hücre döngüsünü düzenleme işlevi gören siklin D1 proteinini kodlar. Siklin D1'in kendisi, tümör baskılayıcı protein RB tarafından düzenlenir. ATM geni, ultraviyole radyasyon gibi kaynaklardan kaynaklanan DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen bir PI3/PI4-kinaz ailesi proteinini kodlar. CHEK2 geni, bir hücre döngüsü kontrol noktası düzenleyicisi ve varsayılan tümör baskılayıcı olan bir proteini kodlar ve bu protein, DNA hasarı ve hücre döngüsünün blokajı ile aktive edilir ve G1'de hücre döngüsü durmasını indüklemek için P53 ve diğer proteinlerle etkileşime girer (Schuur & Deandrade, 2015: 155).

Progresif DNA hasarı, çoğu kanserin bir özelliğidir ve onarım yollarının işlev kaybından kaynaklanır. Çift sarmallı DNA molekülündeki hasar birkaç şekilde oluşabilir: tek sarmal bölünmesi veya baz yer değiştirmesi, çift sarmal kırılmaları veya sarmallar arası çapraz bağlar. DNA molekülünün korunması için hücre, meydana gelen bu hasara karşı korunmak ve

onarmak için birden fazla sistem devreye sokar. BRCA genlerinin her ikisi de genetik olarak tümör baskılayıcı genler gibi davranan multifonksiyonel proteinleri kodlar. Homolog rekombinasyon yoluyla DNA çift iplikçik kırılma onarımını kolaylaştırarak genomik stabiliteyi korumada çoklu fonksiyonlara sahip proteinleri kodlarlar. BRCA genlerinin heterozigotluğunun kaybı, eksik DNA onarımına ve onkogeneze katkıda bulunan ek DNA hasarının birikmesine neden olur. BRCA fonksiyonunun yokluğunda hücreler, DNA onarımı için poli(adenozin fosfat-riboz) polimeraz-1'e (PARP1) geri döner. Klinik test aşamasında olan sentetik bir öldürücü terapötik strateji, PARP aktivitesini inhibe ederek bu mutant meme epitel hücrelerindeki dengeyi DNA onarımından ziyade hücre ölümüne doğru yönlendirir (Fong vd., 2009: 124).

2.2.5. Meme Kanseri Tedavi Yaklaşımları

Meme kanserinin tedavisinde, tümörün bulunduğu bölgenin cerrahi olarak çıkarılması, radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavisi ve immünoterapi gibi çeşitli tedavi yaklaşımları mevcuttur (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. Meme Kanseri Tedavisinde Kullanılan Mevcut Tedavilerin Şematik Gösterimi

Kaynak: (Wang ve Minden, 2022: 2).

2.2.5.1. Kemoterapi

Bu terapi şeklinde kanser hücrelerinin çoğalmasının kontrol altına alınması veya öldürülmesi hedeflenmektedir. Tümörün alt tipine, kullanılan ilaç ve dozlarına göre tedavinin

etkinliği değişmektedir (Sert ve Kckkılın, 2022: 49). Epirubicin, Doksorubicin gibi antrasiklinler, Paklitaksel ve Dosetaksel gibi taksanlar, Vonorelbin gibi vinca alkaloidleri, Kapesitabin ve Gemsitabin gibi antimetabolitler, Sisplatin ve Karboplatin gibi platin analogları gibi meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlardır (Sert & Kckkılın, 2022: 49).

2.2.5.2. Endokrin (Hormonal) Tedavi

Meme kanserinin endokrin tedavisinde Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERMs), aromataz inhibitörleri ve Selektif östrojen reseptör downreglatörleri (SERDs) kullanılmaktadır.

2.2.5.2.1. SERMler

Tamoksifen ve toremifen gibi SERM'ler hormon reseptör antagonisti olarak hareket eder. SERMler östrojenle yarışarak östrojen bağlanma bölgelerine bağlanması ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdururlar. Östrojen reseptörü 1 (ESR1) genindeki veya efektörlerindeki mutasyonlar meme kanseri hastalarında endokrin tedavisine direnç geliştirebileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, ESR1 genindeki *D538G* veya *Y537S/C/N* mutasyonlarının, ESR1'in ligand bağlanma bölgesinde konformasyon değişikliği meydana getirdiği ve böylece tamoksifene olan afiniteyi düşürerek ve hastalığın tedavisinde tamoksifenin etkisini yitirmesine sebep olduğu gösterilmiştir (Robinson vd., 2013: 17). Ayrıca hücreler tamoksifen tarafından gelişen östrojen sinyal blokajını atlama için fosfataz ve tensin homologu (PTEN) gibi tümör baskılayıcı genlerin ifadesini azaltarak ER+ tümörlerde PI3K/AKT'nin fosforilasyonunu artırmak gibi alternatif yollar geliştirebilirler (Tserga vd., 2016: 36).

2.2.5.2.2. Aromataz İnhibitörleri

Meme kanseri tedavisinde kullanılan aromataz inhibitörleri aromataz enzimi tarafından androstenedion ve testosteronun aromatazasyonu ile östrojen sentezini inhibe eder ve hormon reseptörü pozitif (HR+) meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Trunet vd., 1997: 247).

Nonsteroid aromataz inhibitörleri: Anastrozol ve letrozol örnek olarak verilebilir. Endojen ligandlar, aromataz enziminin aktif bölgesine reversibel olarak bağlanabilmek için androstenedion ve testosteron ile yarışır (Kudachadkar vd., 2005: 147).

Steroid arometaz inhibitörleri: Ekzemestan bu gruba örnek olarak verilebilir. Aromataz enziminin aktif bölgesine ırreversibl olarak bağlanır ve ilaç kan dolaşımından atılsa bile metabolitleri sayesinde aromatazın kalıcı inaktivasyonunu sağlar (Buzdar vd., 2002: 2009).

2.2.5.2.3. SERDler

SERDler östrojen reseptörlerine bağlanılarak östrojen bağlanma bölgesini bloke ederler ve böylece östrojen reseptörlerini etkisiz hale getirir. Bu gruba ait olan Fulvestrant postmenapozol metastatik meme kanserlerinde veya yumurtalık ablasyonu yapılmış pre menapozol hastalarda kullanılmaktadır (Di Leo vd., 2010: 4599).

2.2.5.3. Anti-anjiyogenik Tedavi

Metastaz ve tümör gelişiminde önemli rolü olan anjiyogenezin engellenmesi terapötik yaklaşımlardandır. Bu tedavide; Bevacizumab monoklonal antikoru kullanılarak vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) bloke edilmesi, VEGF reseptörünün sinyal iletiminin Sunitib ve Sorafenib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ile inhibe edilmesi hedeflenmektedir (Gotink ve Verheul, 2010: 1).

2.2.5.4. İmmünoterapi

Meme kanserinin immünoterapisinde meme kanseri aşılı ve monoklonal antikolar kullanılmaktadır.

2.2.5.4.1. Meme Kanseri Aşılı

Kemoterapi ve radyoterapi gibi meme kanseri tedavisinde kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinin doku özgüllüğünün olmaması, hayatta kalma oranlarının düşük olması, ilaç direncinin gelişmesi gibi dezavantajlarının olması alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden biri tümörle ilişkili peptit veya protein aşılı, DNA aşılı, aşı preparatlarının immünojenitesini iyileştiren rekombinant viral veya bakteriyel vektörler ve hücre bazlı aşılı gibi meme kanseri aşılıdır (Burke vd., 2019: 355). Gen bazlı aşı tedavilerinde fonksiyonel terapötik proteinlerin üretiminin sağlanması için hedef hücreye verilen gen metastatik hücrelerin ve yeni damar oluşumu engellenebilir, tümör hücresi doğrudan inhibe edilebilir veya hücre döngüsü bloke edilebilir ve hücrenin apoptozu uyarılabilir (Santos-Carballal vd., 2018: 3).

2.2.5.4.2. Monoklonal Antikorlar

Klinik uygulamada en sık kullanılan immünoterapi yöntemidir (Waldmann, 2003: 269). Monoklonal antikorlar kanser hücrelerinin bölünme ve anjiogenezi ile ilgili sinyal yollarını aktive eden faktörlere ve reseptörlerine bağlanarak inhibe etmesi, Antikora bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC) ve kompleman aktivasyonu ile kompleman bağımlı sitotoksiste (CDC) olmak üzere üç esas mekanizma ile immünoterapötik etkilerini gösterirler (Şakalar vd., 2013: 108).

2.2.5.4.3. Kontrol Noktası İnhibitörleri

Tümör hücreleri antitümör immün tepkilerini inhibe etmek için Programlanmış Hücre Ölümü Ligand-1 (PD-1) ve Sitotoksik T lenfositle ilişkili molekül-4 (CTLA-4) gibi inhibitör reseptörlerini (kontrol noktası reseptörü olarak da bilinmektedir) aşırı eksprese ederek immün baskılamayı sağlamaktadır (Pardoll, 2012: 252; Zhang vd., 2018: 1). PD-1 insanlarda ve farelerde aktive edilmiş dendritik hücreler, monositler, B hücreleri, T hücreleri, ve doğal öldürücü T hücrelerinde eksprese edilen esas immün kontrol noktası reseptörü olarak bilinmektedir. PD-1 hücre yapışması, çoğalması ve sitokin sinyalinde önemli bir rol oynar. PD-L1 ve PD-L2 ligandlarının ifadesi kanser hücreleri immün sistem tarafından saldırıya uğradığında artar ve böylelikle T hücrelerinin baskılanmasına ve immün kaçışına sebep olur. Meme kanserinde yüksek PD-L1 ifadesinin yüksek histolojik derece ve proliferatif indeksle, tümör boyutunun artması gibi çeşitli negatif prognostik faktörlerle ilişkili olabilir. Kanser tedavisinde kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini arttırmak için PD-1 ve PD-L1'in etkileşiminin inhibe edilmesi hedeflenmektedir (Zhang vd., 2018: 1). CTLA-4 T hücresi aktivasyonundan sonra upregülasyonu gerçekleşir, CD28 kostimülasyonuna negatif feedback sağlamak amacıyla CD80/CD86'ya bağlanır ve T hücresinin aktivasyonunu kısıtlar. Böylelikle, CTLA-4 kontrolsüz bağışıklığın önlenmesine katkı sağlar (Pardoll, 2012: 253).

2.2.5.5. İlaç Taşıyıcı Sistem Nanopartiküllerin Kullanıldığı Yeni Tedavi Yaklaşımları

Nanopartiküller normal hücrelere zarar vermeden terapötik genleri hedefleyen veya kanserli hücrelerde yüksek kemoterapötik dozları azaltmada kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Nanopartiküller hedefe yönelik olmaları nedeniyle ilaç direncinin üstesinden gelmeleri, diğer dokulara dağılımlarının az olması ve tümör hücrelerinde birikimlerinin fazla olması, uzun süre kan dolaşımında kalmaları, ciddi sistemik yan etkilerinin daha az görülmesi, ilacın anti-kanser etkinliğinin arttırılması, suda çözünürlüğü düşük ilaçların taşınması gibi

korunmuş hücre içi bir katabolik bozunma sürecidir (X. Li vd., 2020: 1). Nekroptoz, yüksek immünojenisiteye sahip, otofaji ve apoptoz ile etkileşime giren nekrotik programlanmış bir hücre ölümüdür (Gong vd., 2019: 1). Piroptoz, litik bir tür inflamatuvar hücre ölümüne neden olan inflamatuvar kaspazların aktivasyonudur (Kesavardhana vd., 2020: 2).

Hücre ölümü, radyasyon ve kemoterapi sonrasında malignant hücrelerin ölümüne neden olduğu için kanser terapisi ile ilişkilendirilmiştir, fakat kanserli hücrelerin ölmesinin yanında normal hücrelerin de ölmesine neden olmaktadır (Strasser ve Vaux, 2020: 1045). Apoptoz, programlanmış bir hücre ölümü sürecidir ve insan gelişimi ve doku homeostazında hayati bir role sahiptir (An vd., 2019: 1). Apoptoz mekanizmasındaki herhangi bir aksaklık, otoimmünite, dejeneratif hastalıklar, kanser vb. gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir (An vd., 2019: 1). Bir diğer ölüm şekli olan nekroz sadece hücre sayısının düzenlenmesiyle değil, belirli bir dokudaki hücrelerin farklı morfolojik profile sahip olmasıyla apoptozdan ayırt edilir (Fasoulakis vd., 2021: 171; Strasser & Vaux, 2020: 1045). Apoptotik hücre ölümü genellikle hücre büzülmesi, ekstrasellüler matrikse adhezyonun kaybı, dinamik membranda kabarcık oluşumu, apoptotik cisimcik oluşumu, çekirdekte kromatin materyalinin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu gibi biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler görülmektedir (Fasoulakis vd., 2021: 172; M. Y. Park vd., 2021: 1). Ayrıca, diğer biyokimyasal değişiklikler arasında kaspazlar, yani sistein aspartil proteazların aktivasyonu ve fosfatidilserinin eksternalizasyonu hücre ölümüyle sonuçlanır (Ouyang vd., 2012: 489).

2.3.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptozun uyarılmasında ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı yolak) ve intrinsik yolak (mitokondri aracılı yolak) olmak üzere iki ana yolak bulunmaktadır (Ouyang vd., 2012: 488).

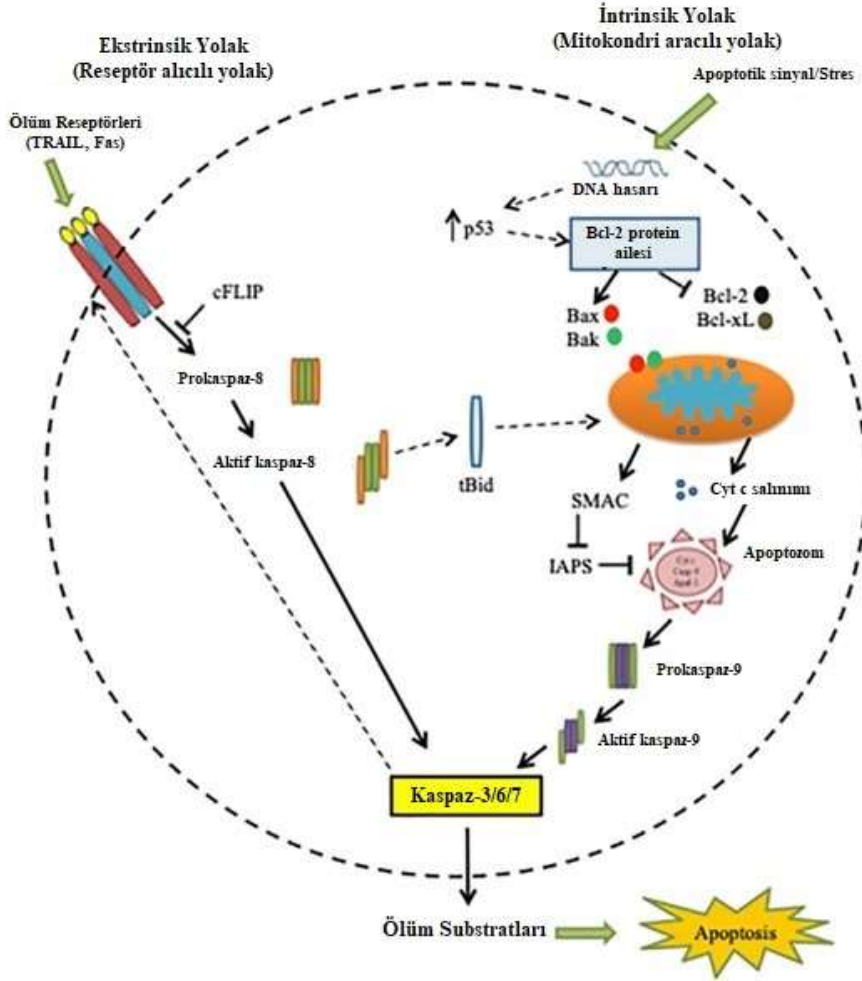
2.3.1.1 Ekstrinsik Yolak: Hücre Yüzey Reseptörleri Aracılığı ile Tetiklenen Apoptoz

Apoptoz, hücre dışı ölüm reseptörleri (tümör nekroz faktörü (TNF), TNF ile ilişkili apoptozu tetikleyen ligand (TRAIL) ve Fas hücre yüzey ölüm reseptörü (FAS)) veya besin yoksunluğu, onarılamaz genetik hasar, osmotik stres, hipoksi gibi hücre içi uyarılar tarafından uyarılabilir (Mishra vd., 2018: 2). Ekstrinsik yol, TNF gibi transmembran ölüm reseptörleri ve ekstrinsik yolak ve bu yolak ile ilişkili protein ailesi üyelerinin aracılık ettiği bağlantıları içermektedir (Mishra vd., 2018: 2). Ölüm reseptörleri ve ligandlar arasındaki bağlanma ile ekstrinsik yolak uyarılır ve TNF reseptörü 1 (TNFR1), Fas-Fas-L, ölüm reseptörü 3 (DR3), ölüm reseptörü 4 (DR4) ve Tümör-Nekroz-Faktör-İlişkili Apoptoz Ligand Veya Apo2L

(TRAIL/Apo2L)'den oluşan bir "ölüm dahil sinyal kompleksi"nin (DISC) gelişmesiyle sonuçlanır (D'Arcy, 2019: 585). Bunun sonucunda, FAS adaptör proteini ile ilişkili ölüm alanına (FADD) bağlanabilen FAS ölüm efektör alanı açığa çıkar. RIPK1 ve TNF reseptör-ilişkili ölüm domain protein (TRADD), TNF trimeri TNF reseptörü trimerine bağlandığında apoptoz kompleksi I oluşturmak için TNA reseptörünün sitoplazmik kısmına bağlanan adaptör proteinlerdir (D'Arcy, 2019: 585). cIAP ve FLIP gibi doğal hücre ölümünü baskılayan proteinlerin yokluğunda, RIP1, FADD ve kaspaz-8 gibi kompleksler sitoplazmada birleşerek kaspaz zincir reaksiyonu başlatır. Ekstrinsik yolda, kaspaz-8 ve kaspaz-10, BH3 ile etkileşime giren domain ölüm agonistini (BID) tBID'e parçalanır. BAX ve BCL2-antagonisti/öldürücü (BAK), tBID tarafından aktive edilir. Böylece apoptoz meydana gelir (Şekil 2.7) (D'Arcy, 2019: 590; M. Y. Park vd., 2021: 3).

2.3.2.2. Mitokondriyal Apoptotik Yolak

Apoptozun intrinsik yolağı, hipoksi, endoplasmik retikulum (ER) stresi, metabolik stres ve DNA hasarı gibi intrinsik letal uyaranlar tarafından tetiklenmektedir (D'Arcy, 2019: 583). Bu uyaranlar sonucunda BAX ve BAK'ı aktive eden sadece BH3 bölgesine sahip proteinlerini uyarabilir. Aktive edilen BAX ve BAK, mitokondri transmembran potansiyelinin kaybı ile mitokondri dış membran geçirgenliği (MOMP) uyararak apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ile apoptozom oluşumunu kolaylaştırmak için Smac/Diablo, sitokrom C ve Ht-A2/Omi pro-apoptotik proteinlerinin sitozole salınmasına sebep olmaktadır. Apoptozom kompleksi oluştuğunda, Kaspaz-9 uyarılır, ardından Kaspaz-3 ve Kaspaz-7'yi aktive eden kaskadlar gelir. Aktif Kaspaz-3 ve Kaspaz-7, apoptoz yoluyla hücrel bileşenlerin yıkımına yol açar (Şekil 2.7) (D'Arcy, 2019: 585; Jorgensen vd., 2017: 155; Mishra vd., 2018: 3).



Şekil 2. 7. Apoptotik Yolaklar

Kaynak: (Jan ve Chaudhry, 2019: 207)

2.3.2.2.1. BCL-2 Ailesi Üyeleri

Mitokondriyal apoptotik olayın düzenlenmesinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri rol alır (Letai, 2017: 277). Azalan BCL-2 ifadesi, antikanser ilaçlara apoptotik yanıtları uyarabilirken, artan BCL-2 ifadesi, kemoterapötik ilaçlara ve radyasyon tedavisine karşı dirence yol açar (Ouyang vd., 2012: 489).

BCL-2 ailesi üyeleri dış mitokondri membranında bulunurlar (Letai, 2017: 277). Antiapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL-1 ve BFL-1/A1) mitokondriyal geçirgenliği önlerken, pro-apoptotik üyelerinin (BAX, BAK, BIM, BID, BAD, BMF ve PUMA) mitokondriyal geçirgenliği uyarıcı rolü olduğu anlaşılmıştır (Ouyang vd., 2012: 489). Bir ölüm sinyalinin ardından, pro-apoptotik proteinler, fosforilasyon ve aktivasyonlarına yol açan bölünme ve apoptozun başlatılabileceği mitokondriye

translokasyonunu içeren post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir (Shamas-din vd., 2011: 508). Yalnızca BH3 içeren BCL-2 ailesi üyeleri (BİD, BİM, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HRK ve BİK), intrinsik pro-apoptotik aktivitelerini gerçekleştirebilmek için BAX ve BAK proteinlerine ihtiyaç duyar. Böylece Sitokrom C'nin ve ikinci olarak mitokondri kaynaklı aktivatör kaspazlar apoptotik uyarılara yanıt olarak dış mitokondriyal membrana salınır. Sitoplazmaya salınan Sitokrom C APAF-1'a bağlanarak halkasal bir kompleks oluşturur ve böylece KASPAZ-9 APAF-1'e bağlanarak aktif hale gelir (Wen vd., 2012: 218). Aktive edilen KASPAZ-9, KASPAZ-3'ü aktive eder, ardından kaspaz kaskadını aktive eder ve sonunda apoptozu oluşturur.

P53, kanserde en sık silinen veya mutasyona uğrayan tümör baskılayıcıdır (Letai, 2017: 282). P53; PUMA, NOXA ve BAX gibi pro-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu aktive eder. Bu proteinler apoptotik hücre ölümünü uyararak için diğer BCL-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girer. Sitoplazmik P53 yeni transkripsiyonun yokluğunda bile BCL-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girerek apoptozu uyarabilir (Letai, 2017: 282).

2.4. Meme Kanseri Progresyonunda Reseptör Tirozin Kinazların Rolü

Meme kanseri, meme epitel hücrelerinde farklı sinyal yollarının düzensizliği sonucu ortaya çıkar. Büyüme faktörleri ve kemokinler, tümör mikroçevresinde kanser progresyonuna yol açan moleküllerle etkileşime girerek çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK'ler) gibi reseptör ailelerine bağlanırlar.

RTK'ler, tümör mikroçevresinde de olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilen tek geçişli transmembran proteinlerdir. RTK'ların sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu olan tirozin kinaz bölgesi bulunur. RTK'ler, büyüme faktörlerinin bağlanmasıyla aktive edilir ve sitoplazmada sinyal yolağıyla ilişkili hedef proteinlerle etkileşime girerek sinyali iletir. RTK aktivasyonu için ligand bağlanması ve reseptör dimerizasyonudur gereklidir (Butti vd., 2018: 1).

Meme kanseri de dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR), trombosit türevli büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR), insülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri (IGFR) ve fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) gibi çeşitli RTK tiplerinin aşırı eksprese haldedir (Lemmon ve Schlessinger, 2011: 11). Artan RTK seviyeleri, meme kanserinin agresifliğinin artması ve hücre sağkalımının azalması ile ilişkilidir (Templeton vd., 2014: 1049). RTK'lar tarafından aktive edildiği bilinen önemli yollar arasında mitojenle

aktive olan protein kinaz (MAPK), Janus kinaz (JAK)/sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT sinyali yolakları bulunmaktadır (Ibrahim vd., 2017: 2; J. Park vd., 2016: 43961; Wise & Zolkiewska, 2018: 2). RTK tarafından düzenlenen yolaklar, kanser progresyonunda önemli rol oynar.

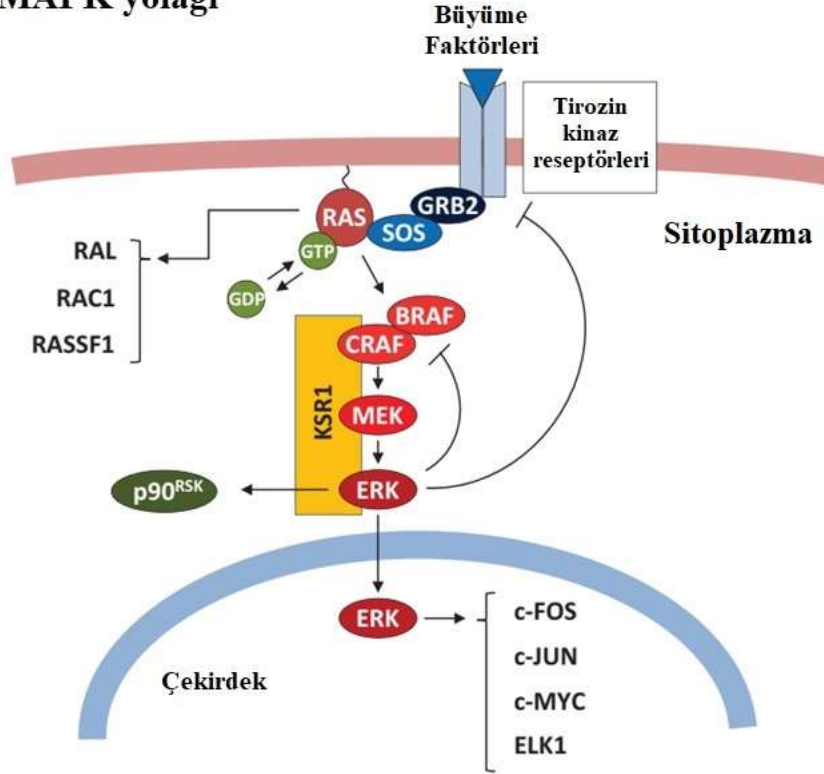
2.4.1. Kanser Patogenezinde MAPK Yolağı

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyali yolağı, hücre zarından nükleusa sinyali ileten bir dizi protein kinazlardan oluşan bir sinyali iletim yoludur. Proliferasyon, farklılaşma, hücre çoğalması, hareketi, gen ifadesi, metabolizma ve apoptozu düzenlemektedir (Wada ve Penninger, 2004: 2838). MAPK yolunun hiperaktivasyonu, nörodejeneratif ve gelişimsel hastalıklar, diyabet ve kanser dahil olmak üzere çeşitli patolojilerde rol oynar (Krishna ve Narang, 2008: 3525).

Ekstrasellüler sinyali-düzenleyen kinaz (ERK), c-Jun NH₂- terminal kinaz (JNK) ve P38-MAPK aile üyeleri MAPK' yu oluşturmaktadırlar. ERK'lar büyüme sinyaliine cevap olarak aktive olurlar. Hem JNK'ler hem de p38-MAPK, ozmolarite veya metabolizmadaki değişiklikler, DNA hasarı, ısı şoku, iskemi, enflamatuar sitokinler, kayma stresi, UV radyasyon seramidi veya oksidatif stres gibi çeşitli hücresele ve çevresel streslere yanıt olarak aynı anda aktive edilir (Wada ve Penninger, 2004: 2838).

Büyüme faktörleri ve mitojenler gibi dış uyaranlar plazma membran reseptörlerine bağlandığında, reseptör dimerizasyonunu ve src homoloji 2 alanı içeren dönüştürücü protein 1 (SHC1) ve büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) gibi adaptör proteinler tarafından tanınan rezidülerin otofosforilasyonu ile sinyali aktivasyonu gerçekleşir. Buna karşılık, adaptör proteinler, RAS proteinleri üzerinde guanin di-fosfatı (GDP) GTP'ye dönüştürmek için Son of Sevenless (SOS) gibi değişim faktörlerini çağırır. Aktive edildikten sonra RAS, MEK ve ERK'nin sıralı aktivasyonunun uyarılması için RAF proteinlerini plazma zarına alır. İki yüze kadar farklı efektör, sitoplazma, mitokondri, golgi, endoplazmik retikulum gibi hücrenin organel kısımlarında ve özellikle c-FOS, c-JUN, c-MYC veya ELK1 gibi proliferasyonla ilişkili transkripsiyon faktörleri ERK tarafından aktive edilir (Şekil 2.8) (Zaballos ve Santisteban, 2017: 45).

MAPK yolağı



Şekil 2. 8. MAPK Sinyal Patogenezi

Kaynak: (Zaballos & Santisteban, 2017: 45)

2.4.2. Kanser Patogenezinde PI3K/AKT Yolağı

Fosfoinositid kinazlar (PIK'ler), çeşitli sinyal yolaklarında sinyal transduser olarak işlev gören lipid kinazlardır (Alqahtani vd., 2019: 1). PI3K/AKT sinyal yolağının aşırı aktivasyonu meme kanseri dahil birçok kanser türünde hücre proliferasyonu, invazyonu, metastazı ve ilaç direncinin gelişimi ile ilişkilidir (Jiang vd., 2020: 4587; Pascual ve Turner, 2019: 1051).

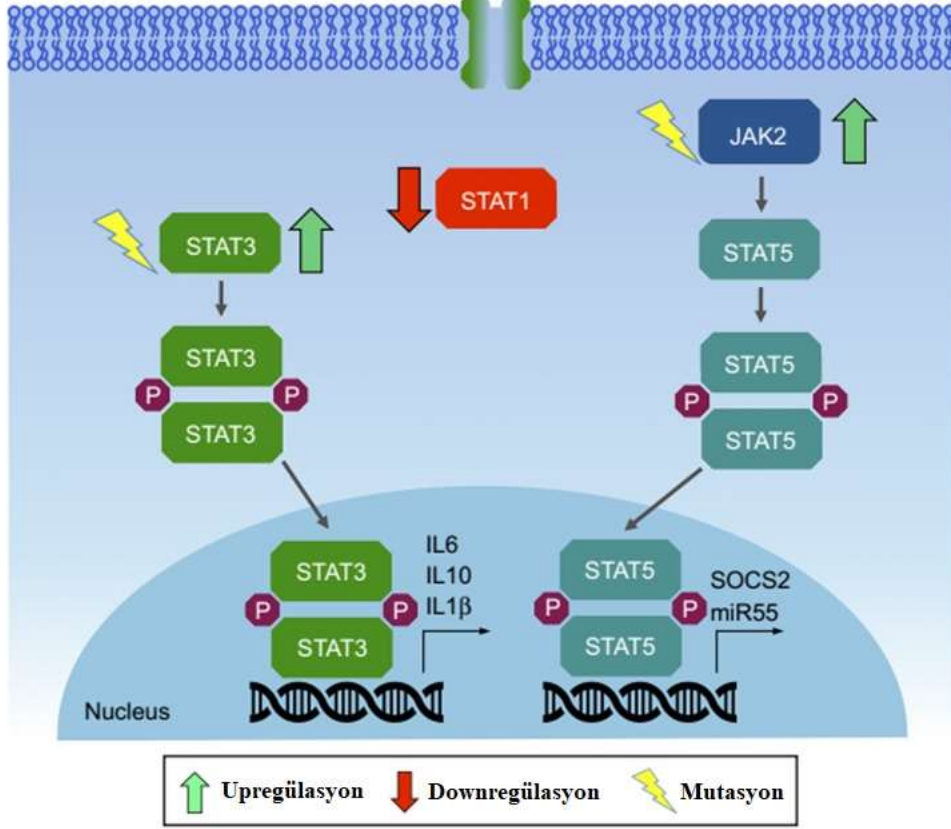
PI3K, bir büyüme faktörüne bağlı reseptör tirozin kinaz (RTK) tarafından aktive olduktan sonra fosfoinositidlerin inositol halkasını fosforile ederek sinyali iletir ve fosfatidilinositol 4,5 bisfosfatı (PIP₂) fosforile ederek ikinci mesaj olan fosfatidilinositol trifosfat (PIP₃)' ı üretir. PIP₃, PI3K'nin aktivasyonu ve ardından PIP₃ üretimi, tümör gelişimi ve progresyonu içeren sinyal yolaklarının iletilmesine aracılık eder (Alqahtani vd., 2019: 1). PI3K'nin downstreaminde protein kinaz B (AKT) ve rapamisinin memeli hedefi (mTOR) bulunur. Bu sinyal, inositol polifosfat-4-fosfataz tip II B (INPP4B) ve fosfataz ve tensin homologu (PTEN) dahil olmak üzere çoklu fosfatazlar tarafından düzenlenir (Şekil 2.9).

2.4.3. Kanser Patogenezinde JAK/STAT Yolağı

Memeli JAK-STAT sinyal yolağı JAK1, JAK2, JAK3 ve (Tirozin Kinaz²) TYK2 proteinlerini içeren 4 Janus Kinaz domainininden, 7 Sinyal Transdüzer ve Transkripsiyon Aktivatör (STATs) STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT5B ve STAT6 dan oluşmaktadır (Shuai ve Liu, 2003: 900). JAK bir transmembran proteindir ve transkripsiyon mekanizmasını düzenlemek için bir genin promotör bölgesini hedeflemek üzere nükleusa transloke olan STAT'lar olarak bilinen transkripsiyon faktörünü fosforile ederek sinyali intrasellüler ortama yönlendirir (Fiebelkow vd., 2021: 2). Ligandlar aynı kökenli reseptöre bağlandıkça, iki JAK yakınlışır ve hem reseptörlerin hem de STAT'ların C-terminal bölgesinin yakınında bulunan korunmuş tirozin rezidüsünde fosforilasyonuna izin verir (Morris vd., 2018: 1992). Tirozinin C-terminal bölgesindeki fosforilasyonu, SH2 domain olarak adlandırılan korunmuş bir domainin etkileşimini daha da artıran STAT'lerin dimerizasyonundan sorumludur (Morris vd., 2018: 1992). STAT, sitoplazmada bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Fosforlanmış STAT'ler daha sonra sitoplazmadan importin α -5 ve Ran nükleer taşınımı adı verilen bir aracı ile nükleusa aktarılır (Seif vd., 2017: 3). Bu dimerize STAT'ler daha sonra hedeflenen genlerin aktivasyonu veya baskılanması için belirli düzenleyici rol alırlar (şekil 2.10) (Seif vd., 2017: 3). JAK/STAT sinyal yolağının disregülasyonu tümorigenez, invazyon, metastaz, sağkalım, anjiyogenez, anti-apoptosis ve immün kaçış gibi onkogenik fenotipin oluşmasına yol açabilir (Britschgi vd., 2012: 796; Furth, 2014: 3; Halim vd., 2020: 1; Thomas vd., 2015: 365; Yu vd., 2014: 1).

Meme kanserinde, JAK-STAT yolağındaki değişikliklerin mekanizması: 1- fosfotirozin spesifik fosfatazların downregülasyonu (Shields vd., 2013: 567), 2- IL-6 ligandının aktivasyonu (Lieblein vd., 2008: 1), 3-ErbB1, c-Src, PI3K/AKT (Yokogami vd., 2000: 1) sinyal yolağının aktivasyonu, negatif regülatör STAT3'ün downregülasyonudur. STAT3 ve STAT5'in tümör gelişiminde, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve apoptozda önemli bir rolü vardır ve meme, akciğer, prostat ve pankreas kanserleri ile diğer hematolojik malignitelerde aktive haldedirler (şekil 2.11) (Jang vd., 2019: 2; Orlova vd., 2019: 1; Owen vd., 2019: 2). alışmalar, JAK2/STAT5 aktivasyonunun meme kanserinde PI3K/mTOR baskılanmasına karşı direnç geliştirdiğini göstermiştir (Britschgi vd., 2012: 2).

JAK/STAT sinyal yolağı MAPK ve PI3K/AKT yolakları ile etkileşim halindedir. Bu sinyal yolakları arasındaki etkileşim pluripotensi ve farklılaşma immün düzenlenme ve tümorigenez sürecinde önemli rol oynar (X. Hu vd., 2021: 8).



Şekil 2. 10. Meme Kanseri Patogenezinde JAK/STAT Sinyal Yolağı

Kaynak: (Velloso vd., 2017: 5502)

2.5. Kombine Terapi

Bazı meme kanseri hastalarının tedavisinde hedefli terapi, hormon tedavisi, immünoterapi veya kemoterapi gibi monoterapiler iyi bir etkinliğe sahip olsa da, bunların etkinliği bazen zamanla zayıflar ve bazı hastalarda tedaviye direnç gelişebilir (Liang vd., 2019: 9). Bu nedenle, meme kanseri için daha etkili ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, farklı kombinasyon yaklaşımlarını optimize etmek için nanoteknoloji, DNA dizileme teknolojileri ve hesaplamalı analiz gibi destekleyici veriler kullanılabilir (Wang ve Minden, 2022: 2).

Kombinasyon tedavisi, kanser tedavisinde iki veya daha çok terapötik ajanların bir kombinasyonunu kullanan bir tedavi türüdür (Eroglu vd., 2019:75). Kombine terapi, antikanser ilaçlarla birlikte kullanıldığında, monoterapi yaklaşımıyla karşılaştırıldığında, sinerjistik veya aditif olarak kilit yolları hedefleyerek ilaçların etkinliğini artırır. Kombinasyon tedavisi muhtemelen ilaç direncini azaltır ve tümör büyümesini azaltmak, mitotik olarak aktif hücreleri durdurmak ve apoptozu tetiklemek gibi bazı avantajlar sağlar (Eroglu vd., 2019: 71). Şu anda

geliştirilmekte olan moleküler kombinasyon tedavileri, tedaviye verilen yanıtı iyileştirmek için umut verici görünmektedir.

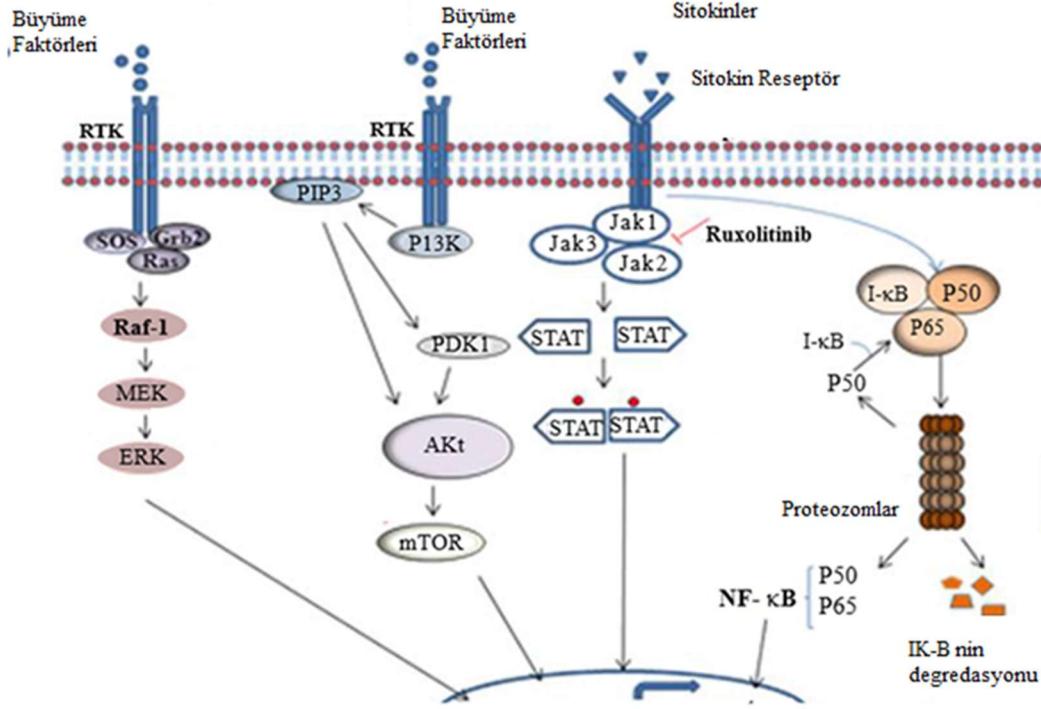
2.6. Kullanılan İlaçlar Ve Etki Mekanizmaları

2.6.1. Ruxolitinib

JAK inhibitörleri, STAT inhibitörleri ve Sitokin veya reseptör antikollarının kullanılarak JAK/STAT sinyal yolağının inhibe edilerek apoptozun uyarılması terapötik yaklaşımlardandır (Godone vd., 2018: 30).

JAK inhibitörlerinin terapötik etkileri iki faktöre dayanmaktadır. İlk olarak, JAK'lar çeşitli hücrel aktivitelere aracılık eder. JAK fonksiyonunun inhibisyonu, immünosupresyona neden olabilir ve JAK/STAT sinyal yolunun aracılık ettiği anormal derecede yüksek serum proinflatuar sitokinlerini azaltabilir. İkinci olarak da, miyeloproliferatif hastalıklar ve çeşitli kanserler gibi hastalıklarda, fonksiyon kazanımı sağlayan JAK mutantlarının tanımlanması, bunların inhibisyonu yoluyla tedaviye gerçekleştirilebilir (Aittomaki ve Pesu, 2014: 20).

Balko ve ark (2016) meme kanserli dokularda ve triple negatif meme kanser hücre hatlarında (MDA-MB-231, MDA-MB-436) yaptığı bir çalışmada, JAK2'nin JAK1 / STAT3'ten bağımsız bir sinyal yolağını kullandığını göstermişlerdir (Balko vd., 2017: 4). JAK2'ye spesifik inhibitörler, STAT, PI3K/AKT ve MAPK yolaklarını inhibe eden ajanlarla kombine olarak kullanılması, JAK sinyalinin disregülasyonunun neden olduğu malignansilerde kritik bir kombine terapi olarak kullanılabilir. Böylelikle seçici JAK2 inhibitörleri bazal meme kanserinde (BLBC) hedef olarak kullanılabilir. JAK1/2 inhibitörü Ruxolitinib çeşitli kanser hastalarında kullanılmaktadır (Bianchini vd., 2016: 682).



Şekil 2. 11. JAK2 İnhibitörü Ruxolitinibin Etki Mekanizması

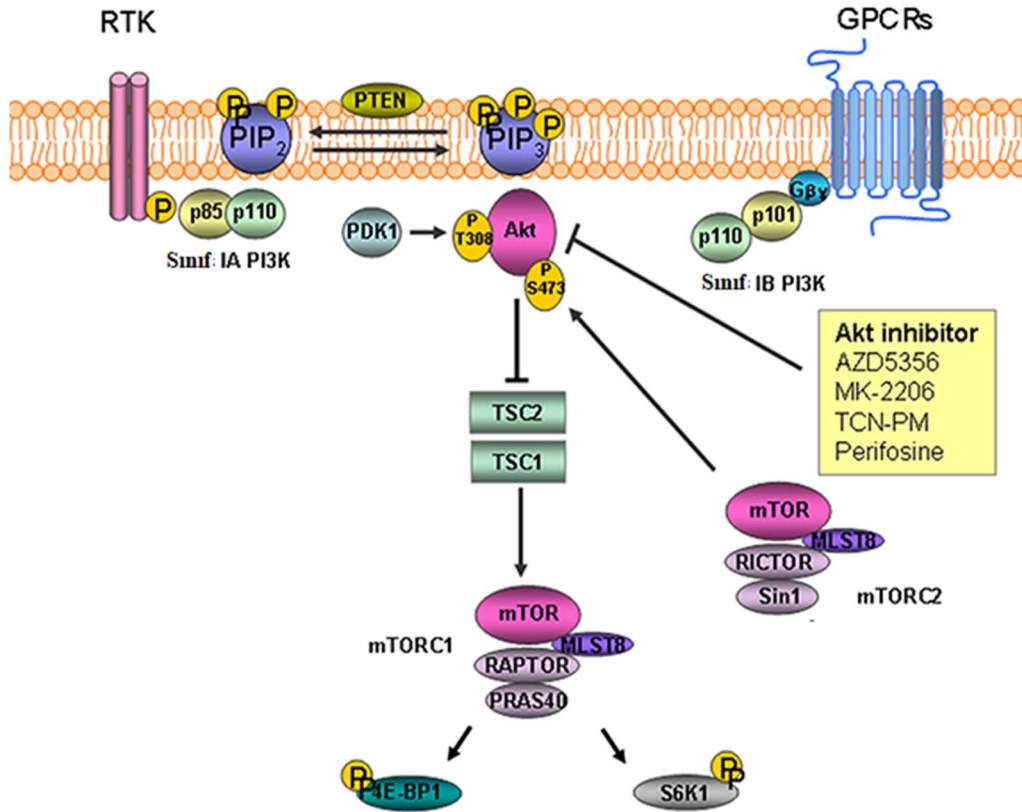
Kaynak: (Lavanya vd., 2014: 42)

2.6.2. MK-2206

Hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki dengenin bozulması kanser hücrelerinde meydana gelir ve apoptoza direnç gibi farklı moleküler mekanizmalar aracılığı ile kanserli hücrelerin aşırı çoğalmasına yol açar. PI3K/AKT sinyal yolunun tümör hücrelerinin apoptozu üzerindeki rolünü gösteren çok sayıda çalışma vardır. Kanser progresyonu sırasında PI3K/AKT sinyal yolağının upregülasyonu, hücre apoptozun inhibisyonuna yol açabilir. Bu nedenle prostat ve meme kanseri hücreleri gibi çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda PI3K/AKT sinyal yolağının baskılanarak apoptozun uyarılması hedeflenmektedir (Singh vd., 2019: 2; Yan vd., 2018: 3962; Yang vd., 2018: 699). Kanserde PI3K/AKT sinyal yolağındaki terapötik yaklaşımlar arasında PI3K ve AKT inhibitörleri bulunmaktadır (Rafi vd., 2022: 6).

MK-2206, şu anda farklı kanser türlerine karşı sitotoksitenin incelendiği klinik deneylerin konusu olan, AKT'nin zara taşınmasını ve aktivasyonunu bloke eden PH ve kinaz alanlarına bağlanan güçlü bir allosterik AKT inhibitörüdür (Şekil 2.12) (Kim vd., 2016: 5; Li vd., 2019: 2). Böylelikle PI3K/AKT sinyal yolunun ve tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonuna ve tümör hücresinde apoptozun indüklenmesine neden olabilir. Yeni ilaç

hedeflerinin geliştirilmesi ve kombine tedavi ile çoklu onkogenik sinyal yolları hedeflenebilir ve ilaç direnci ortadan kaldırılabilir.



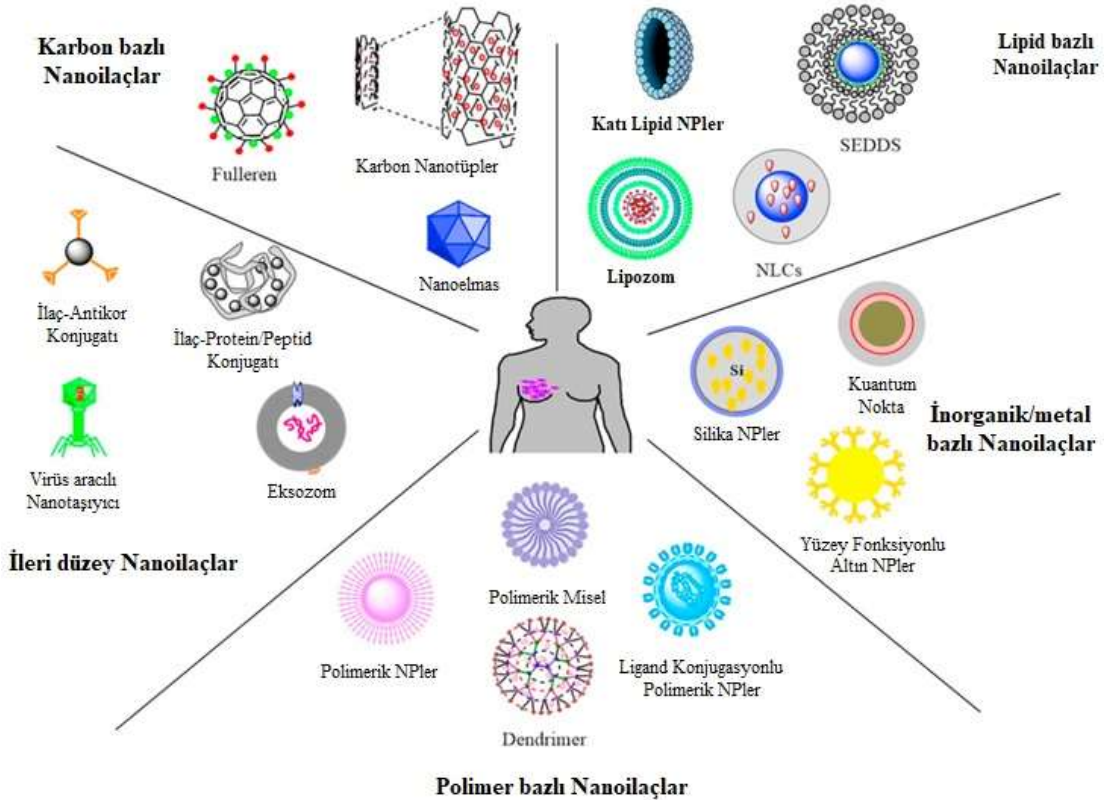
Şekil 2. 12. Akt İnhibitörü MK-2206 'nın Etki Mekanizması

Kaynak: (Kim vd., 2016: 3)

2.7. Nanopartiküller

Nanoteknoloji nanometre (nm) boyutundaki yapıları inceler ve kemoterapötik ilaçların tümör bölgesine ulaşması, görüntüleme, izleme, teşhis gibi çok sayıda yaklaşımı mümkün kılar. Nanopartiküllerin (NP'ler), direkt kanser hücrelerine daha etkili bir şekilde etki edebilen, tümör hücrelerindeki ilaç birikimini seçici bir şekilde arttırabilen ve dolayısıyla ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltması için önemli bir yaklaşım olduğu ve böylelikle ilaçların antikanser aktivitesini arttırabileceği düşünülmektedir (Jain vd., 2020: 631; Shafei vd., 2017: 1209). Nanotıp, malzeme bilimi, farmasötikler, tıp, mühendislik, moleküler biyoloji ve bilgi teknolojisinin birleşimidir. Nanobilimin tıp ile birlikte kullanılması, biyolojik sistemin daha iyi bir şekilde incelenmesini ve biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olur (Jain vd., 2020: 633).

Geleneksel küçük molekülü ve biyolojik anti-kanser ilaçları, hastalıklı ve sağlıklı dokulara etki ederek sistemik toksisite riskini arttırmakta ve hedef dokulara etkili ilaç konsantrasyonuna ulaşamamaktadır (Hamzehzadeh vd., 2016: 60). Normal hücrelere zarar vermeden direkt kanser hücrelerine zarar verecek yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Nano taşıyıcılar hücre membranından kolayca geçebilir ve böylece ilaçların geçirgenliği ve taşınımını kolaylaştırır (Jain vd., 2020: 630). Nano-ilaç taşıma sistemlerinde ilaç-yüklü nanopartiküller, miseller, lipozomlar, katı-lipit nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, dendrimerler, metalik nanopartiküller, karbon nanotüpler, nano boyutlu yarı iletken kristal yapılar (kuantum noktaları), fullerenler, metaloksitler gibi birçok nano-ilaç sistemi bulunmaktadır (Şekil 2.13) (Jain vd., 2020: 633; Marangoz ve Yavuz, 2020: 511; Tüylek, 2017: 91). Nano-ilaç taşıyıcı sistemlerle hücre membranına nüfuz ederek nanopartiküllere yüklenen ilaçların hücrelere iletimi sağlanabilir. Parçacığın boyutu, şekli ve yüzey kimyası hücresel alımı, biyodistribütörü ve temizleme mekanizmalarını belirleyen faktörlerdir (Jain vd., 2020: 633).



Şekil 2. 13. Meme Kanseri Ve Üçlü Negatif Meme Kanserinin Teşhis Ve Tedavisinde Kullanılan Nanotıp Yaklaşımları

Kaynak: (Jain vd., 2020: 636)

2.7.1. Polimerik Nanopartiküller

Farklı antikanser nanopartikül tiplerinin terapötik aktiviteyi arttırmak için farklı polimerlere yüklendiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Polimerik nanopartiküller (PNP), ilacın enkapsüle edilmesi için farklı polimerlerin kullanıldığı nanopartikül sınıfıdır. Bu polimerik nanopartiküller, ilacın stabilitesinin artırılması ile o hücreye afiniteye sahip olan ligandına bağlanarak belirli kanserli hücreleri veya dokuları hedeflemede kullanılır ve biyouyumlulukları sebebiyle avantaj sağlarlar (Jain vd., 2020: 635).

PNP'ler doğal ve sentetik polimerlerden oluşmaktadır. Nanopartiküllerde kullanılan doğal polimerler albümin, lesitin, jelatin, visilin ve legumin gibi protein ve kitozan, aljinat, agaroz, pullulan ve dekstran gibi polisakkaritlerdir (Yavuz ve Marangoz, 2022). Nanopartiküllerde yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktit-ko-glikolid), poli(laktik asit) (PLA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve poliakrilik asittir (Shukla vd., 2019: 391).

Dünyanın ilk gıda ve ilaç idaresi (FDA) onaylı nanoilaç 1995 yılında Doxil adlı üründür. Doxil, anti-kanser ilacı doksorubisin (DOX) ile yüklü polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş alt mikrometrik lipid veziküllerinden (lipozomlardan) oluşan, yumurtalık kanseri ve kaposi sarkoması tedavisinde bir atılımdı. Yarım doza 100 kat daha fazla kan dolaşımı ve serbest DOX'tan yedi kat daha düşük kardiyotoksikite yarattığı gösterilmiştir (O'Brien vd., 2004: 440).

2.7.1.1. Poli- ϵ -kaprolakton (PCL)

Poliesterler polimerik zincirdeki tekrardaki ester bağları içeren sentetik polimer sınıfına aittir. Poliester sınıfı, PLA, PGA, PCL, PLGA ve daha fazlası gibi kimyasal olarak tasarlanmış çeşitli polimerlerden oluşur (Jain vd., 2020: 635).

Poli- ϵ -kaprolakton (PCL) sentetik yarı kristalin yapıda biyoçözünür ve yüksek oranda hidrofobik bir polimerdir ve in vitro çalışmalarında diğer polimerlerle bileşik yapabileceği özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu polimer fizyolojik ortamda yavaş yavaş degrade olmakta, toksik metabolitlerin birikimine sebep olmamaktadır. Poli- ϵ -kaprolakton 'un biyouyumlu ve biyobozunur doğası nedeniyle, ilaç geliştirilmesi ve uzun süreli degradasyonu birkaç aya kadar ilaç salımını kolaylaştırması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Sinha vd., 2004: 1).

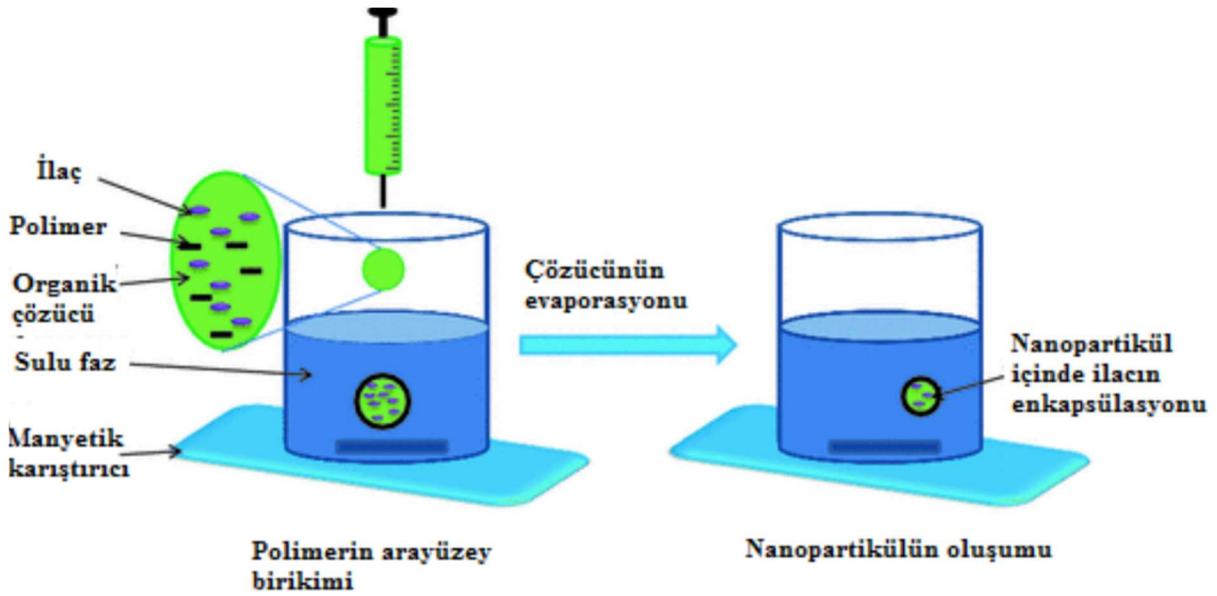
2.7.1.2. Polimerik Nanopartiküllerin Sentezlenme Yöntemleri

PNP'lerin sentezlenmesinde önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu veya iyonik jelleşme, hidrofilik polimerlerin uyumlu hale getirilmesi, monomer polimerizasyonu,

emülsiyon difüzyon, çözücü yer değiştirmesi, evaporasyon/ekstraksiyon ve nanoçöktürme gibi yöntemler kullanılır (Rizi vd., 2022: 232; Wang vd., 2016).

2.7.1.2.1. Nanoçöktürme Yöntemiyle Nanopartikül Sentezinin Mekanizması

Nanoçöktürme, ilk olarak Fessi ve arkadaşları tarafından geliştirilen (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, & Benita, 1989) tarafından geliştirilen ve çözücü yer değiştirmesi veya arayüzey biriktirme yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Nanoçöktürme yönteminde, organik/yağ fazı manyetik karıştırıcı altında yavaş yavaş sıvı faza eklendiğinde koloidal süspansiyonda nanoparçacıklar elde edilir (Şekil 2.14). Bu yöntemde NP'lerin oluşumu anında gerçekleşir ve yalnızca bir adım gerektirir. Bu nedenle hızlı ve kolay çalışma avantajına sahiptir. Organik faz enjeksiyon hızı, sulu faz çalkalama hızı ve yağ fazı/sulu faz oranı gibi sentez prosedüründeki anahtar parametreler nanoçöktürme yönteminde önemli bir etkiye sahiptir (Mora-Huertas vd., 2010: 118). Bu yöntem çoğunlukla hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için kullanılır, ancak bazen hidrofilik ilaçlar için de kullanılır. Polimer ve ilaç, aseton veya metanol gibi suyla karışabilen bir organik çözücü içinde çözülür. Çözelti daha sonra sürfaktan içeren sulu bir çözeltiye damla damla eklenir. Hızlı solvent difüzyonu sayesinde NP'ler hemen oluşur. Bundan sonra çözücüler ortamdaki uzaklaştırılır (Wang vd., 2016: 9).



Şekil 2. 14. Nanoçöktürme Yöntemiyle Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kaynak: (Miladi vd., 2016: 20)

Bu araştırmanın ilk aşamasında JAK1/2 inhibitörü Ruxolitinib ve AKT inhibitörü MK-2206 birlikte kullanılarak BT474 (ER+, PR+, HER2+) ve MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-)

meme kanseri hücre hattında JAK/STAT, PI3K/AKT ve MAPK sinyal yollarının inhibe edilerek hücre proliferasyonunun engellenmesi ve apoptozun uyarılarak hücre ölümünün gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu araştırmanın ikinci aşamasında Ruxolitinib ve MK-2206'nın serbest formlarının hücrede yarattığı toksisitenin en aza indirilebilmesi ve ilaçların konsantrasyonlarının daha etkili bir şekilde hücreye ulaşmasının sağlanabilmesi hedeflenmektedir. Bu amaç doğrultusunda Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller sentezlenip hücrelere uygulanarak, ilaçların nanoformlarının BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde JAK/STAT, PI3K/AKT ve MAPK sinyal yolları ve apoptoz üzerindeki etkilerinin ilaçların serbest halleri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışma ile BT474 (ER+, PR+, HER2+) ve MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) meme kanseri hücre hatlarında Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, Ruxolitinib yüklü PCL nanopartikül, MK-2206 yüklü PCL nanopartikül ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin östrojen sinyal yolağı, PI3K/AKT, JAK/STAT, MAPK sinyal yolları ve apoptotik hücre ölümündeki etkisinin açıklığa kavuşturulması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL-YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3. 1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Kullanılan Cihazın Markası
Buz Makinesi	Biobase
+4 °C, -20 °C ve -80 °C Buzdolapları	Regal, Uğur, Panasonic
Neubauer Thoma Lamı	Marienfeld Superior
CO ₂ 'li İnkübatör	Memmert
Laminar Flow	Scanlaf - Mars Safety Classe 2
İnverted Mikroskop	Nikon Eclipse TS100-F
Florosan Mikroskop	Olympus-BX53
Otoklav	Nüve Steamart - OT 90L
Dikey Elektroforez Sistemi	Cleaver
Western Transfer Sistemi	Hoefer
Jel Görüntüleme Sistemi	Syngene - G-box
Distile Su Cihazı	Mes
Etüv	Jeio Tech-IB-E
Hassas Terazı	Ohaus
pH Metre	İnolab - PH 7110
Mikroplaka Okuyucu	Thermo Scientific - Multiscan Go
Pipet Seti	Thermo Scientific
Otomatik pipet	Nichiryo
Rotatör	Biosan - Multi Bio RS24
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Thermo Scientific - Micro CL 21R
Santrifüj Cihazı	Nüve - NF 800
Su Banyosu	Nüve- NF 800
Vorteks	Jeio Tech, Lab Companion
Manyetik Karıştırıcı	MTOPS- MS300HS
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	ZEISS / Supra 40 VP
Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı	MALVERN / NANO-ZS
Liyofilizatör	Biobase, BK-FD10S
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi(FTIR)	Schimidzu

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3. 2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Kullanılan Sarf Malzeme	Kullanılan Sarf Malzemenin Markası
1,5 ml'lik toplama tüpü	Isolab
10 µl'lik pipet ucu	Isolab
10 ml Serolojik Pipet	Euro clone
1000 µl'lik pipet ucu	Isolab
2 ml'lik toplama tüpü	Isolab
200 µl'lik pipet ucu	Isolab
5 ml Serolojik Pipet	Euro clone
50 ml'lik ve 15 ml'lik falkon	Euro clone
6'lı well plate	SPL
96'lı well plate	Biologix
Beher ve Erlen	S&H Labware
Cam Şişe	Isolab
Cryo Tüp	Isolab
Enjektör	Ayset
Filtre 0,22 µM	Sarstedt
T75 ve T25 Flask	Thermo Scientific
Mezür	S&H Labware
PVDF Membran	Merck Millopore
Scraper	SPL
Whatman Kağıdı	Bio-Rad
Dialysis tubing cellulose membrane, avg. flat width 10 mm (0.4 in.), MWCO: 14000 Da	Sigma-Aldrich

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3. 3. Kullanılan Kimyasallar

Prestained Protein Marker 11-180 kDA	Thermo Scientific- 26616
2X Laemli	Sigma
Agaroz	Applichem
Akrilamid / Bisakrilamid	Sigma
Amonyum Asetat	Merck Millipore
Amonyum Persülfat	Thermo Scientific
PI3K primer antikor	Santa Cruz, sc-1637
AKT primer antikor	Santa Cruz, sc-5298
PTEN primer antikor	Santa Cruz, sc-7974
JAK2 primer antikor	Santa Cruz, sc-390539
STAT3 primer antikor	Santa Cruz, sc-8019
STAT5 primer antikor	Santa Cruz, sc-74442
ER α primer antikor	Santa Cruz, sc-8002
SRC-1 primer antikor	Santa Cruz, sc-32789
c-RAF primer antikor	Santa Cruz, sc-7267
ERK1/2 primer antikor	Santa Cruz, sc-514302
SAPK/JNK primer antikor	Santa Cruz, sc-7345
c-JUN primer antikor	Santa Cruz, sc-74543
P53 primer antikor	Santa Cruz, sc-126
KASPAZ-8 primer antikor	Santa Cruz, sc-56070
BCL-2 primer antikor	Santa Cruz, sc-7382
MCL-1 primer antikor	Santa Cruz, sc-12756
BAX primer antikor	Santa Cruz, sc-20067
BAD primer antikor	Santa Cruz, sc-8044
c-MYC primer antikor	Santa Cruz, sc-40
PARP primer antikor	Cell Signaling Technology, CST-9532
KASPAZ-9 primer antikor	Cell Signaling Technology, CST-9508
KASPAZ-3 primer antikor	Cell Signaling Technology, CST-9662
KASPAZ-7 primer antikor	Cell Signaling Technology, CST-12827
β -AKTİN primer antikor	Cell Signaling Technology, CST-4970
Anti-tavşan ve Anti-fare sekonder antikorları	Cell Signaling Technology, 7074P2 ve 7076P2
Bradford Reagent	Sigma
BSA	Carlo Erba
Coomassie Brilliant Blue	Sigma
Hoechst 33342 nükleer boya	Enzo
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck Millipore
ECL	Thermo Scientific
EDTA	Carlo Erba
FBS	Biological Industries
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries

Tablo 3.3. (Devamı)

Fenol klorofom izoamil alkol	Sigma
Asetik Asit	Sigma
HCl	Merck Millipore
Ruxolitinib	MedChemExpress
MK-2206	MedChemExpress
İzopropanol	Merck Millipore
KCl	Merck Millipore
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore
Metanol	Sigma
MTT Reagent	Glenthams Life Sciences
Na ₂ HPO ₄	Merck Millipore
NaCl	Merck Millipore
PMSF	Cell Signaling Technology
PVDF Membran	Merck Millipore
Ponceau Red	Merck Millipore
Proteinaz K	Sigma
RIPA Tamponu	Cell Signaling Technology
RPMI-1640 Besiyeri	Biological Industries
DMEM Besiyeri	Gibco
Non essential amino acids (NEAA)	Capricorn
İnsulin	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma
TEMED	Tokya Chemical Industry
Tripsin-EDTA	Sigma
Tris-Base	Sigma
Trypan Blue Solüsyonu (%0,4)	Amresco
Tween80	Merck
Tween20	Sigma

3.1.4. Kullanılan İlaçların ve Tamponların Hazırlanması

3.1.4.1. Kullanılan İlaçların Hazırlanması

Ruxolitinib ve MK-2206 MedChemExpress'ten satın alınmıştır. Ruxolitinib ve MK-2206 1 mM ana stok olacak şekilde DMSO içinde çözülerek hazırlanmış ve uzun süre

saklanmak üzere -20 °C dondurucuda saklanmıştır. İlaçların stok solüsyonlarının hazırlanması Tablo 3.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 3. 4. İlaç Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

İlaç	Konsantrasyon	Çözücü	Kütle	Ek Koşul
Ruxolitinib	1 mM	3.2640 mL DMSO	1 mg	-
MK-2206	1 mM	2.0816 mL DMSO	1 mg	Ultrasonik su banyosunda 10 dakika çözülür.

3.1.4.2. Kullanılan Tamponların Hazırlanması

1X PBS Tamponu: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ ve 0,24g KH₂PO₄ tartılarak 800 ml dH₂O ile çözülürmüş ve pH 7,4’e ayarlanıp hacmi 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Otoklav ile sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra 4 °C’de saklanmıştır.

0,01 M Tris-HCl (pH: 8): 0,0121 g Tris bazı tartılıp dH₂O’da çözülürerek pH= 8’e ayarlanmış ve hacmi 10 ml’ye tamamlanmıştır.

0,1 M EDTA (pH:8): 0,29 g EDTA 10 ml dH₂O’da çözülürmüş ve pH:8’e ayarlanmıştır.

%10 SDS: 10 g SDS 100 ml dH₂O’da ile çözülmüştür.

1X RIPA Tamponu: 100 µl 10X RIPA tampondan alınarak 1000 µl’ye tamamlanmıştır. 5 µl PMSF kullanım öncesinde 1 ml RIPA tamponu içerisine eklenmiştir.

%10 APS: 0,1 g Amonyum persülfat 1 ml dH₂O’da ile çözülürerek -20 °C’de saklanmıştır.

MTT Solüsyonu: 0,05 g MTT kimyasalı 10 ml 1XPBS solüsyonunda çözülürdüktan sonra 0,22 µm lik filtreden geçirilerek -20 °C’de saklandı.

1X Towbin Tamponu: 100 ml 10X Yürütme tamponu, 200 ml MetOH eklenerek dH₂O ile 1000 ml’ye tamamlanır.

10X Yürütme Tamponu: 30 g Tris bazı, 144 g glisin ve 10 g SDS bir miktar dH₂O içinde çözülürerek pH:8.3’e ayarlandıktan sonra ile 1000 ml’ye tamamlanır.

10X TBS tamponu: 86,6 g NaCl ve 12,11 g Tris bazı bir miktar dH₂O içinde çözdürüldükten sonra pH 8,8'e ayarlanarak hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 100 ml 10X TBS tamponundan alınıp 1000 ml'ye tamamlanarak 1XTBS tamponu hazırlanmıştır.

1X TBS-T Tamponu: 500 ml 1XTBS Tamponuna %0,1 Tween20 içerecek şekilde hazırlanmıştır.

%5 Yağsız Süt: 100 ml 1XTBS-T tamponu içerisinde 5 g yağsız süt tozu çözdürülür.

SDS Poliakrilamid Jel: Tablo 3.2.'deki bileşenlerden belirtilen miktarda tartılarak hazırlanmıştır.

Tablo 3. 5. SDS-PAGE Jel İçeriği

	%12'lik Ayırma Jeli	%4' lük Yükleme Jeli
Distile Su	3,4 ml	3,025 ml
Tris-HCl	2,5 ml(1,5 M pH: 8.8)	1,125 ml (0,5 M pH: 6.8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/ Bis-Akrilamid (%30)	4ml	0,67 ml
Amonyum Persülfat (APS)	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	0,025 ml	0,005 ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05 ml

Coommasie Brilliant Blue: 0,25 g Coommasie, 25 ml Glasiyel asetik asit, 100 ml MetOH eklenerek 250 ml e tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

Destaining Solüsyonu: 10 ml Glasiyel asetik asit, 90 ml MetOH ve 50 ml dH₂O ile hazırlanarak +4 °C'de saklandı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. PCL, Blank ve İlaç Yüklü PCL Nanopartiküllerin Sentezi

3.2.1.1. PCL Sentezi

5 ml ε-kaprolakton ve 50 mg alüminyum izopropoksit 50 ml toluen içerisinde çözülüp argon atmosferi altında 80°C 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonunda toluen uzaklaştırılıp elde edilen polimer 10 ml tetrahidrofuranda (THF) çözünüp soğuk metanolde çöktürüldükten sonra süzülüp vakum etüvde kurutularak saflaştırıldı.

3.2.1.2. Poli-ε-kaprolakton Nanopartikül Sentezi

PCL nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlandı. 100 mg PCL, 25 ml asetonunda çözündürüldü. Bu organik solüsyon, içerisinde %0,1(w/v) asetik asit ve %0.03(w/v) Tween80 içeren 75 ml dH₂O (soğuk) sulu çözeltiye buz banyosunda manyetik karıştırıcıda damla damla eklendi. Elde edilen süspansiyon 4°C'de 16000G 75 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet -20°C de 24 saat donduruldu ve 24 saat liyoflize edildi (Biobase, BK-FD10S) (Jesus vd., 2018: 102).

3.2.1.3. Ruxolitinib Yüklü PCL Nanopartikül Sentezi

Ruxolitinib Yüklü PCL nanopartiküller (Rux-PCL-NP) nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlandı. 10 mg PCL, 5 ml asetonunda çözündürüldü. Ardından Ruxolitinib (1 mg) 1 ml DMSO'da çözündürüldü ve karışıma eklenerek iyice karıştırıldı. Bu organik solüsyon, içerisinde %0.03 Tween80 içeren 20 ml dH₂O (soğuk)'a manyetik karıştırıcıda damla damla eklendi ve organik çözücünün tamamen buharlaşmasına izin vermek ve nanopartiküllerin çökmesini desteklemek için oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. Elde edilen süspansiyon 4°C'de 16000G 75 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet -20°C de 24 saat donduruldu ve 24 saat liyoflize edildi (Biobase, BK-FD10S). Örnekler 4°C de kullanılana kadar saklandı. BlankNPs (PCL nanopartikül) kontrol olarak kullanıldı (Bernabeu vd., 2014: 44; Bragta vd., 2018: 340).

3.2.1.4. MK-2206 Yüklü PCL Nanopartikül Sentezi

MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller (MK-PCL-NP) nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlandı. 10 mg PCL, 5 ml asetonunda çözündürüldü. Ardından MK-2206 (1 mg) 1 ml DMSO'da çözündürüldü ve karışıma eklenerek iyice karıştırıldı. Bu organik solüsyon, içerisinde %0.03 Tween80 içeren 20 ml dH₂O (soğuk)'a manyetik karıştırıcıda damla damla eklendi ve organik çözücünün tamamen buharlaşmasına izin vermek ve nanopartiküllerin çökmesini desteklemek için oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. Elde edilen süspansiyon 4°C'de 16000G 75 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet -20°C de 24 saat donduruldu ve 24 saat liyoflize edildi (Biobase, BK-FD10S). Örnekler 4°C de kullanılana kadar saklandı. BlankNPs (PCL nanopartikül) kontrol olarak kullanıldı (Bernabeu vd., 2014: 44; Bragta vd., 2018: 340).

3.2.1.5. Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü PCL Nanopartikül Sentezi

Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü PCL (Rux/MK-PCL-NP) nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlandı. 10 mg PCL, 5 ml asetonunda çözündürüldü. Ardından Ruxolitinib

(0,5mg) ve MK-2206 (0,5 mg) 1 ml DMSO'da çözdürüldü ve karışıma eklenerek iyice karıştırıldı. Bu organik solüsyon, içerisinde %0,03 Tween80 içeren 20 ml dH₂O (soğuk)'a manyetik karıştırıcıda damla damla eklendi ve organik çözücünün tamamen buharlaşmasına izin vermek ve nanopartiküllerin çökmesini desteklemek için oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. Elde edilen süspansiyon 4°C'de 16000g 75 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet -20°C de 24 saat donduruldu ve 24 saat liyoflize edildi (Biobase, BK-FD10S). Örnekler 4°C de kullanılabilece kadar saklandı. BlankNP (PCL nanopartikül) kontrol olarak kullanıldı (Bernabeu vd., 2014: 44; Bragta vd., 2018: 340).

3.2.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli Ölçümü

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin ortalama boyutu ve zeta potansiyeli zetapotansiyometre cihazı ile ölçülmüştür (MALVERN, NANO-ZS). Nanoparçacıklar (50 µl), 1 ml'lik bir çözelti elde etmek için çift damıtılmış su (950 µl) içinde dağıtılacak ve okumalar 25°C'de alınmıştır. Ortalama büyüklük ve standart sapma, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli için ortalama bir değer vermek üzere üç farklı grup analiz edilmiştir (Bragta vd., 2018: 44).

3.2.2.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometresi

FT-IR spektroskopisi, ilaç ve polimerler arasındaki kimyasal uyumsuzlukları belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan polimer ilaç kompozitlerinin FT-IR ölçümleri, attenuated reflection accessory (ATR) ile donatılmış Bruker Tensor 27 spektrofotometresi ile alınmıştır. Bir elmas kristal kullanılarak 4000 ile 500 cm⁻¹ aralığında numunelerin spektrumları ölçülmüştür.

3.2.2.3. İlaç Yüklü PCL Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Liyofilize Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP' ler karbon bant yapıştırılan Stuba damlatıldıktan sonra 1 dakika boyunca altın ile kaplanmıştır. Ardından SEM (ZEISS/ Supra 40 VP) örnek aparatına yerleştirilerek boyutları ve morfolojileri belirlendi (Ünal vd., 2022: 1013).

3.2.2.4. Enkapsülasyon Verimliliği Ve İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 ilaçlarının biyoyumlu PCL polimerine enkapsülasyon işlemi nanoenkapsülasyon yöntemi ile yapılmıştır. Nanoçöktürme

yöntemi ile Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 ilaçlarıyla kapsüllenmiş PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan ilaç içeren nanopartiküller 45 dakika boyunca 16.000 rpm de santifüjleme ile numuneleri ile belirlenmiştir. Süpernatantın içindeki serbest nanopartiküllerin ayrılması sağlanacaktır. Enkapsülasyona uğramayan serbest Ruxolitinib, MK2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 içeriği, UV spektrofotometrede 230 nm dalga boyunda nanopartikül süpernatantı blank olarak kullanılarak belirlenmiştir. Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP enkapsülasyon verimliliği (EV) ve ilaç yükleme kapasitesi (İY) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$EV(\%) = \left(\frac{\text{NPlerin İçindeki İlaç Miktarı}}{\text{Başlangıçta Kullanılan İlaç Miktarı}} \right) \times 100 \text{ (Bernabeu vd., 2014: 45)}$$

$$İY(\%) = \left(\frac{\text{NPlerin İçindeki İlaç Miktarı}}{\text{NPlerin Toplam Ağırlığı}} \right) \times 100 \text{ (Bernabeu vd., 2014: 45)}$$

3.2.2.5. İn Vitro Salım Çalışması

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 etkin maddelerini içeren PCL nanopartiküllerin in vitro ilaç salımı diyaliz membran tekniği ile belirlenmiştir. Diyaliz membran (MWCO: 14.000 Da) %70 EtOH ile aktive edilmiştir. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 etkin maddelerini içeren PCL nanopartikül süspansiyonları diyaliz membranlara aktarılmıştır ve 75 ml phosphate buffer saline (PBS) (pH:7.4) ortamına konularak 'de 37 °C 200 rpm de inkübe edilmiştir. 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72, 96 saatlerde 2 ml örnek alınıp yerine PBS yerleştirildikten sonra örnekler aynı hacim ve sıcaklıkta inkübe edildi. Alınan örnekler UV spektrofotometrede 230 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri ile her formülasyon için grafik çizilerek her ölçüm saati için ilaç salım miktarı belirlendi (Ünal vd., 2022: 1014).

3.2.3. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 Etkin Maddelerinin Ve Ruxolitinib, MK-2206 Ve Ruxolitinib+MK-2206 Etkin Maddelerini İçeren PCL Nanopartiküllerin Hücreler Üzerindeki Antikanser Etkilerinin Belirlenmesi

BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 etkin maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 etkin maddelerini içeren PCL nanopartiküllerin Antikanser Aktivitesi belirlenirken Tablo 3.3'teki deney setleri kullanılmıştır.

Tablo 3. 6. Bu Çalışmada Kullanılan Deney Setleri

	Ruxolitinin ve MK-2206'nın Serbest Formu				Ruxolitinin ve MK-2206 Yüklü PCL Nanopartiküller			
PCL	-	-	-	-	+	+	+	+
Ruxolitinin	-	+	-	-	-	+	-	-
MK-2206	-	-	+	-	-	-	+	-
Ruxolitinin+MK-2206	-	-	-	+	-	-	-	+

3.2.3.1. Hücre Kültürü

BT474 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayşe Elif ERSON BENSAN tarafından yeniden temin edilmiştir. BT474 hücreleri RPMI besiyerinde %20 ısı ile inaktive olmuş fetal sığır serumu (FBS), %1 NEAA, %1 penisilin/streptomisin ve %0,1 insülin katkısı ile %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörlerde (Mettler CO₂ İnkübatör, INCO153med, Germany) büyütülmüştür. MDA-MB-231 hücreleri ise Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU tarafından yeniden temin edilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri DMEM besiyerinde %10 ısı ile inaktive olmuş fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin katkısı ile %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörlerde (Mettler CO₂ İnkübatör, INCO153med, Germany) büyütülmüştür. BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri inverted mikroskopta 10X10 büyütme ile elde edilmiştir.

Hücrelerin pasajlanması için hücre kültür kaplarına ekilen hücreler %60-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırılır. Ardından 75 cm² lik petri kaplarındaki hücreler 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 2 kez yıkanır ve PBS ortamdan uzaklaştırılır. Hücrelere 2 ml tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (tripsin-EDTA) (%0,25) ile %5 CO₂ içeren etüvde 3 dakika bekletilir. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin zarar görmesi için petri kabına 2 ml besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulur ve hücreler santrifüj tüplerine aktarılır. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak, hücrelerin bulunduğu pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklenir. Pipetaj ile hücre süspansiyonu homojen hale getirilerek hücreler sayıma hazır hale getirilir.

Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresine aktarılır. Hemositometrede bulunan 25 karedeki hücrelerin sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının belirlenmesi için 10^4 ile çarpılır.

3.2.3.2. Hücre Canlılık Testi

BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 etkin maddelerini içeren PCL nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarıyla muamelesi sonrasında canlı hücrelerde hidrojenaz enzimi ile indirgenmediğinde çözünemeyen mor formazan tuzu oluşturması esasına dayanan 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolyum Bromid (MTT) belirteci ile hücre canlılığı kolorimetrik olarak incelenmiştir. BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin petriye yapışmasının ardından Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin doza bağlı uygulaması 48 saat boyunca uygulanmıştır. İlaç uygulamasının ardından her kuyucuğa 10 µl MTT belirteci eklenip 4 saat boyunca 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Ardından MTT belirteci eklenen besiyeri uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µl DMSO eklenmiş ve karanlıkta 5 dakika boyunca bekletilmiştir. ELISA okuyucuda (Multiskan™ FC Microplate Fotometre, ThermoFisher Scientific, Multiskan FC China), ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür.

3.2.3.3. Ruxolitinib ve MK-2206'nın Kombinasyon Etkisinin Analizi

Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombinasyon etkisinin incelenmesi için CompuSyn yazılımı ve Chou-Talalay yöntemi kullanıldı ve kombinasyon indeksi (CI) değeri belirlendi. CI değeri şu denklem kullanılarak hesaplandı: $\frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2}$, (Dx)1 ve (Dx)2, Ruxolitinib ve MK-2206 tekli uygulandığında %x inhibisyon için dozları gösterir. (D)1 ve (D)2 ise Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombinasyon uygulaması için %x inhibisyon için dozlarını temsil etmektedir. $CI > 1$ antagonizmayı gösterir, $CI = 1$ aditif etkiyi gösterir ve $CI < 1$ sinerjizmi gösterir. CI değerlerini belirlemek için üç bağımsız deney tekrarı gerçekleştirildi (Chou, 2010: 440).

3.2.3.4. Hücre Sağkalım Testi

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitostatik etkisi değerlendirilmiştir. 6 kuyucuklu petrinin her

kuyucuğuna 5×10^4 hücre ekilip ve 37°C 'de bir gece yapışması için inkübasyonun ardından hücrelere belirlenen dozlarda Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddeleri ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından ilaç uygulanan hücreleri toplamak için tripsin uygulanarak 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Hücre içeren pellet 50 μl besiyeri ve 50 μl 0.4 % (w/v) Tripkan Mavisini boyası ile muamele edilerek 10 μl bu çözeltilerden çekilerek Neubauer hemositometre ile boyanan ve boyanmayan hücreler inverted mikroskopta (Nikon Eclipse TS100-F) sayılmıştır.

3.2.3.5. Soft Agar Koloni Oluşum Testi

Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği bir ortamda büyüebilme yeteneğinin gözlenmesi için soft-agar koloni oluşum testi ile belirlenmiştir. 6 kuyucuklu petripler önceden hazırlanan ve otoklavlanan %0,5'lik agaroz çözeltisi ve %20 FBS içeren 2X'lik medya 1:1 oranında kaplanmıştır. BT474 ve MDA-MB-231 hücreleri $2,5 \times 10^3$ hücre olacak şekilde 2Xmedya, %0,3 agaroz ve hücre 1:1 oranında %0,5 agaroz ile kaplanan petrilere ekilmiştir. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddeleri ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller ile belirlenen konsantrasyonlarda hücreler 15 gün inkübe edilmiş ve %5 CO_2 içeren 37°C inkübatörlerde büyütülmüştür. 2 günde 1 üst medya çekilip yeni medya eklenerek hücrelerin beslenmesi sağlanmıştır. Oluşan koloniler 0,5 ml %0,005'lik kristal viyole ile 20 dakika boyunca boyanmasının ardından inverted mikroskopta (Nikon Eclipse TS100-F) 100X büyütme ile incelenmiştir.

3.2.4. Metastatik Ve Anti-Metastatik Etkinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Koloni Oluşum Testi

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller' in hücrelerdeki metastatik etkisi ve hücrelerin tek başına kaldığındaki davranışları koloni oluşum testi ile incelenmiştir. Her kuyucuğunda 4×10^3 hücre ekilen 6 kuyucuklu petripler 37°C 'de hücrelerin yapışması için bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresini takiben hücrelere belirlenen konsantrasyonlarda Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddeleri ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller ile 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulanmasının ardından ilaçlı medya ilaçsız medya ile değiştirilerek sonra hücrelerin 14 gün büyümesi beklenmiştir. Ardından hücreler metanol asetik asit (3:1) ile 5 dakika fikse edilmiştir.

Hücreler 0,5 ml %0,5'lik kristal viyole ile 20 dakika boyandıktan sonra yıkanmış ve morfolojik görüntüler trans UV ile elde edilmiştir.

3.2.4.2. Yara İyileşme Analizi

Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmiştir. Her kuyucuğunda 5×10^5 hücre ekilen 6 kuyucuklu petrilere 37°C 'de bir gece boyunca hücrelerin yapışması için inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından $200 \mu\text{l}$ 'lik steril pipet ucu ile kazınarak hücrelerde yara oluşturulmuştur. 0, 24, 48, 72 ve 96 saatte yara genişlikleri mikrometrik oküler ile invert mikroskopta ölçülmüştür. 0. Saat değerleri (W_0) ve ölçüm yapılan saat değerleri (W_t) not edilmiştir. Aşağıdaki formülle migrasyon indeksi (MoI) hesaplanarak ölçüm sonuçları değerlendirilmiştir.

$$\text{MoI} = 1 - (W_t/W_0)$$

3.2.5. Apoptotik/Nekrotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Apoptoz sırasında nükleer kondensasyon ve DNA fragmentasyonu gibi morfolojik değişikliklerin belirlenmesi için hücreler Hoechst 33342 nükleer boya ile boyanarak floresan mikroskopunda incelenmiştir. Hücreler $2,5 \times 10^2$ yoğunlukta 6 kuyucuklu petrilere coversliplere ekilmiştir. Hücreler belirlenen konsantrasyonlara Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından hücreler $1 \times$ assay buffer ile iki kere yıkanmıştır. $70 \mu\text{l}$ Microscopy Dual Detection Reagent (1 ml $1 \times$ assay bufferda $1 \mu\text{l}$ Hoechst 33342 ve $2 \mu\text{l}$ CYTO-ID® Green Detection Reagent içermektedir) her örneğe eklenerek 15 dakika 37°C de inkübe edilmiştir. Hücreler $100 \mu\text{l}$ $1 \times$ Assay Buffer ile yıkanmış ve %4 formaldehitte 20 dakika fikse edilmiştir. $1 \times$ Assay Buffer ile 3 kere yıkanarak formaldehit uzaklaştırılmıştır. Boyanan hücreler floresan mikroskopunda (Olympus-BX53) görüntülenmiştir.

3.2.6. İmmunblotlama Yöntemi

3.2.6.1. Total Protein İzolasyonu

$1,5 \times 10^5$ yoğunlukta 100 mm 'lik petrilere ekilen 37°C %5 CO_2 de hücreler yapışması için bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler belirlenen konsantrasyonlara Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddelerinin ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller ile muamele edilmiştir. Hücreler $1 \times$ PBS ile yıkayıp toplanarak 2

1 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Santrifüjle çöktürülen hücrelere Radyo immünopresipitasyon deneyi (RIPA) lizis tamponu eklenmiş ve 5 dakika buzda beklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 15 dakika 13200 rpm de 4°C'de santrifüj yapılarak süpernatant yeni Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

3.2.6.2. Bradford Protein Miktar Tayini

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. 1 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl, 4 µg/µl, 5 µg/µl BSA'ya Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. İzole edilen proteinlerden 1 µg/µl alınarak aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları standart grafiğindeki eğim eşitliği ($y=ax+b$) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.6.3. Proteinlerin Hazırlanması Ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi

50 µg protein örnekleri laemmlı tamponu (2x) ile 1:1 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika inkübe edilecektir. Hazırlanan %4 yükleme ve % 12'lik ayırma SDS PAGE jel sistemine hazırlanan proteinler yüklenmiştir. Jel sisteminde ilk kuyucuğa daima protein belirteç yüklenerek 1X Tris-Gly-SDS yürütme tamponu ile 100V'da 2 saat yürütülmüştür.

3.2.6.4. Membrana Transfer Ve Bloklama

%12 SDS jelde yürütülen protein örnekleri, yükleme jeli ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra yarı ıslan transfer sistemi (Hofer) cihazında PVDF (Merck Millipore) membranlara 30 Volt'da 30 dakika transfer edilmiştir. Transfer işleminin ardından membranlar %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1XTBS) içerisinde 2 saat oda sıcaklığında bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5. Primer Ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri

Bloklama işleminin ardından membranlar, primer antikorlarla gece boyu 4°C sıcaklıkta bekletileceklerdir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween20 içeren 1xTBS) içinde aşağıda belirtilen dilüsyonlarda uygulanacaktır. PI3K, AKT, PTEN, JAK2, STAT3, STAT5, ERα, P53, SRC-1, ERK1/2, SAPK/JNK, c-JUN, PARP, KASPAZ-9, KASPAZ-8, KASPAZ-3, KASPAZ-7, BCL-2, MCL-1, BAD, c-MYC, β-AKTİN her bir antikor %5'lik

yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1XTBS) ile 1:500 oranında 1 gece inkübe edilmiştir. HRP-konjuge sekonder antikolar ise 1:5000 oranında hazırlanmıştır.

Primer antikolarla inkübasyonundan sonra membranlar 5 dakika TBS-Tween ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin tamamlanmasının ardından, membranlar 1:3000 oranında hazırlanan anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikolar ile gece boyunca +4°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından 10'ar dakika TBS-Tween ile 3 kez ve 10 dakika TBS ile 1 kez yıkanan membranlar arttırılmış kemiluminisans tamponu (ECL, Thermo Fisher Scientific) ile 1 dakika muamele edilmiştir.

3.2.6.6. Blotların Görüntülenmesi

Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletilen membranlardan elde edilen kemiluminisans Syngene G: Box Chemi XRQ cihazı ile görüntülenmiştir.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Her deney için istatistiksel analiz, GraphPad Prism 9.0.0 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Standart sapma (SD) değerleri, grafiklerdeki hata çubuklarını belirlemek için kullanılır ve en az üç tekrarlı üç bağımsız deneyi gösterir. Western blot analizi ile elde edilen protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak ölçülmüştür. Her bir protein bandı, üç ölçümün ortalama değerini alabilmek için üç kez ölçülmüştür. Her proteinin ifade seviyelerinin hesaplanması için, her değer β -aktin değerine bölünmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen P değerleri * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ şeklindedir.

4. BULGULAR

4.1. Poli-ε-kaprolakton (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 yüklü Poli(ε-kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Hazırlanması

PCL nanopartikül (PCL-NP), Ruxolitinib yüklü PCL-nanopartikül (Rux-PCL-NP), MK-2206 yüklü Poli(ε-kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL-nanopartikül nanoçöktürme metodu ile hazırlanmıştır ve örnekler -20°C de muhafaza edilmiştir (Bernabeu vd., 2014: 44; Bragta vd., 2018: 340).

4.2. Poli(ε-kaprolakton) (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (MK-PCL-NP) Ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ε-kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1. Nanopartiküllerin Büyüklükleri, Zeta Potansiyel Ve Polidispersite İndeks (PDI) Değerlerinin Ölçülmesi

Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin ve sentezlenen PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerinin ortalama boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerleri zeta potansiyel ve mobilite ölçüm cihazı ile ölçüldü.

Ruxolitinib'in, MK-2206'nin, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK -PCL-NP ortalama boyutları sırasıyla 564,4641±25,4505 nm, 687,8088±25,48317 nm, 159,4±74,72 nm, 219±88,66 nm, 232,8±24,56 ve 356±3,848 nm olarak belirlendi (Tablo 4.1). Sentezlenen ilaç yüklü nanopartiküllerin ortalama boyutlarının kabul edilebilir değer aralığında olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1.).

Ruxolitinib'in, MK-2206'nin, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK -PCL-NP zeta potansiyel değerleri sırasıyla -44,6 ±6,19 mV, 30,9 ±17,5 mV, -0,372±0,449 mV, 0,471±0,453 mV, -0,139±0,646 mV ve 0,227±0,02 mV olarak ölçülmüştür (Tablo 4.1.).

Ruxolitinib'in, MK-2206'nin, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK -PCL-NP polidispersite indeks (PDI) değerleri sırasıyla 0,696, 1,000, 0,756, 0,669, 0,676 ve 0,558 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1.).

4.2.2. Ruxolitinib yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), MK-2206 yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimliliği (EV) Ve İlaç Yükleme Kapasitesi (İY) Değerlerinin Belirlenmesi

Ruxolitinib'in ve MK-2206'nın tek tek ve birlikte olarak ne kadarının PCL ile kaplandığı ve PCL içindeki Ruxolitinib, MK-2006 ve Ruxolitinib+MK-2206 konsantrasyonu 230 nm de UV/Visible spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP enkapsülasyon verimliliği (EV) ve ilaç yükleme kapasitesi (İY) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$EV(\%) = \left(\frac{\text{NPLerin İçindeki İlaç Miktarı}}{\text{Başlangıçta Kullanılan İlaç Miktarı}} \right) \times 100 \text{ (Bernabeu vd., 2014)}$$

$$İY(\%) = \left(\frac{\text{NPLerin İçindeki İlaç Miktarı}}{\text{NPLerin Toplam Ağırlığı}} \right) \times 100 \text{ (Bernabeu vd., 2014)}$$

Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP' lerin %EV değerleri sırasıyla %61, %66 ve %65 olarak bulunmuştur. Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP' lerin %İY değerleri ise sırasıyla %6,1, %6,6 ve %6,5 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1.).

Tablo 4. 1. Ruxolitinib, MK-2206 Ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü PCL Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Örnek	Boyut (nm) (\pm SD)	PDI (\pm S.D.)	Zeta Potansiyel (mV) (\pm SD)	EV(%)	İY(%w/w)
Ruxolitinib	564,4641 \pm 25,45057	0,696	-44,6 \pm 6,19		
MK-2206	687,8088 \pm 25,4831	1,000	30,9 \pm 17,5		
PCL-NP	159,4 \pm 74,72	0,756 \pm 0,172	-0,372 \pm 0,449		
Rux-PCL-NP	219 \pm 88,66	0,669 \pm 0,245	0,471 \pm 0,453	61	6,1
MK-PCL-NP	232,8 \pm 24,56	0,676 \pm 0,18	-0,139 \pm 0,646	66	6,6
Rux/MK-PCL-NP	356 \pm 3,848	0,558 \pm 0,021	0,227 \pm 0,02	65	6,5

4.2.3. Ruxolitininib, MK-2206 ve PCL Arasındaki Kimyasal Uyumsuzlukların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (FTIR) Spektroskopisi İle Belirlenmesi

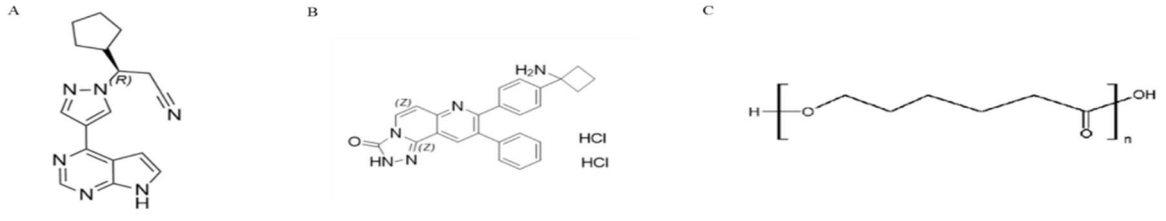
Ruxolitininib, MK-2206 ve PCL arasındaki kimyasal uyumsuzlukların belirlenmesi için FTIR analizi yapılmıştır. Ruxolitininib, MK-2206 ve PCL'nin kimyasal formülleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Saf PCL'nin spektrum grafiğine bakıldığında; 2938 ve 2864 cm^{-1} de gelen pikler polimerin yapısındaki C-H pikleridir. 1724 cm^{-1} de gelen pik ise polimerin ana zincirinde karbonil gruplarına ait C=O pikidir. 1090 ve 1158 cm^{-1} gelen pikler polimerdeki karbon oksijen tekli C-O bağlarını göstermektedir (Şekil 4.2A.).

Rux-PCL-NP'nin spektrum grafiğine bakıldığında 2938 ve 2864 cm^{-1} de gelen pikler polimerin yapısındaki C-H pikleridir. 1724 cm^{-1} de gelen pik ise polimerin ana zincirinde karbonil gruplarına ait C=O pikidir. 1090 ve 1158 cm^{-1} gelen pikler polimerdeki C-O bağlarını bize göstermektedir. 3350 cm^{-1} de Ruxolitininib'in yapısında bulunan sekonder amin N-H piki, 2300 cm^{-1} de nitril C≡N piki ve 1580 cm^{-1} de alken C=C pikleri görülmektedir (Şekil 4.2B.).

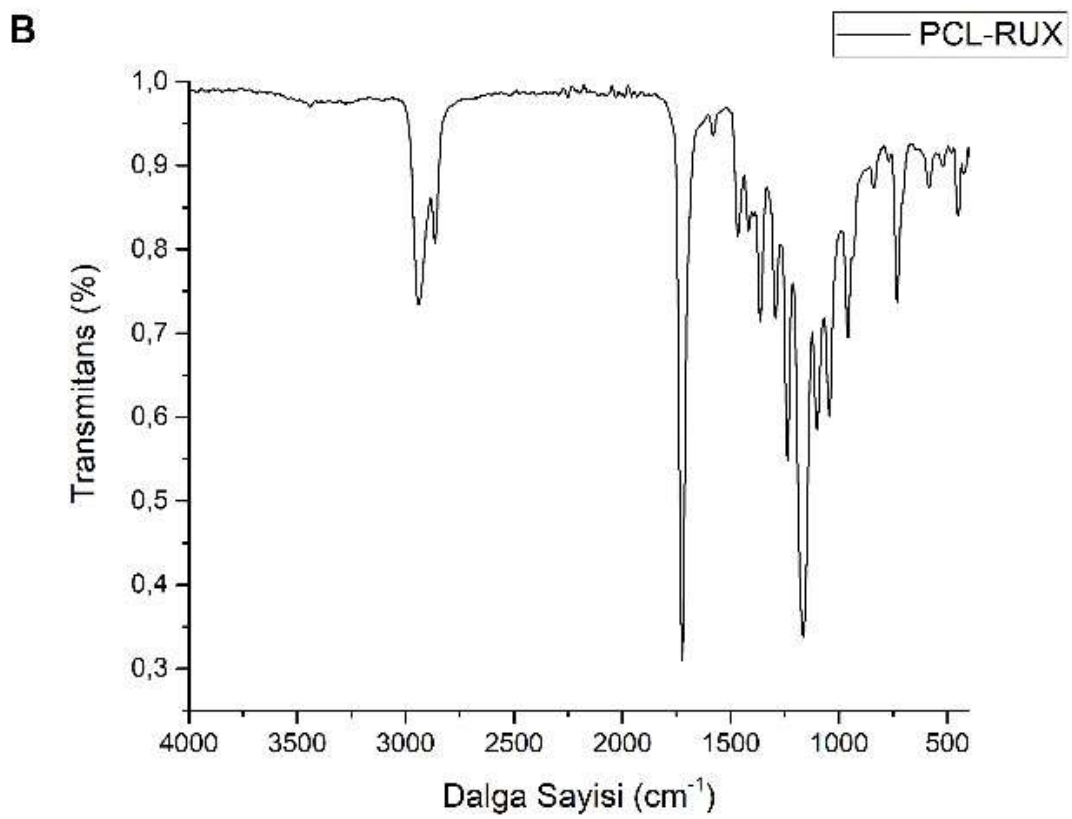
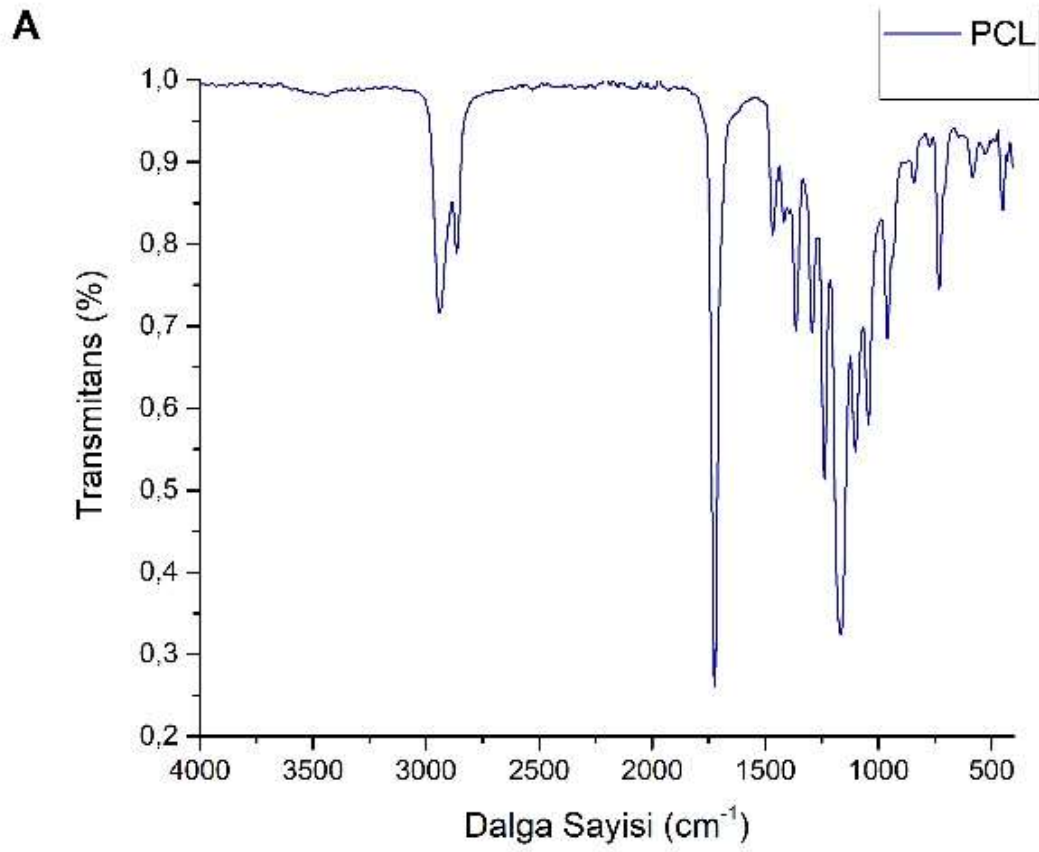
MK-PCL-NP'in spektrum grafiğine göre 2938 ve 2864 cm^{-1} de gelen pikler polimerin yapısındaki C-H pikleridir. 1724 cm^{-1} de gelen pik ise polimerin ana zincirinde karbonil gruplarına ait C=O pikidir. 1090 ve 1158 cm^{-1} gelen pikler polimerdeki C-O bağlarını bize göstermektedir. 3350 cm^{-1} de MK-2206'nın yapısında bulunan amin N-H piki, 1650 cm^{-1} de MK-2206'nın yapısındaki amid piki 1600 cm^{-1} civarında ise MK-2206 yapısındaki bulunan alken C=C pikleri görülmektedir (Şekil 4.2C).

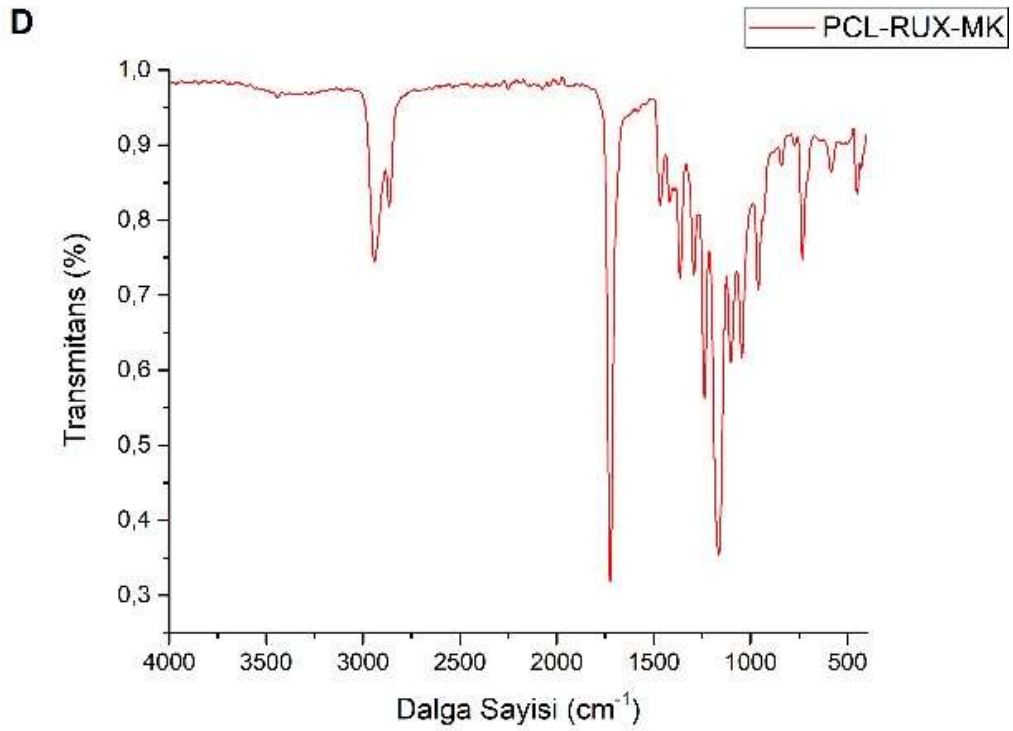
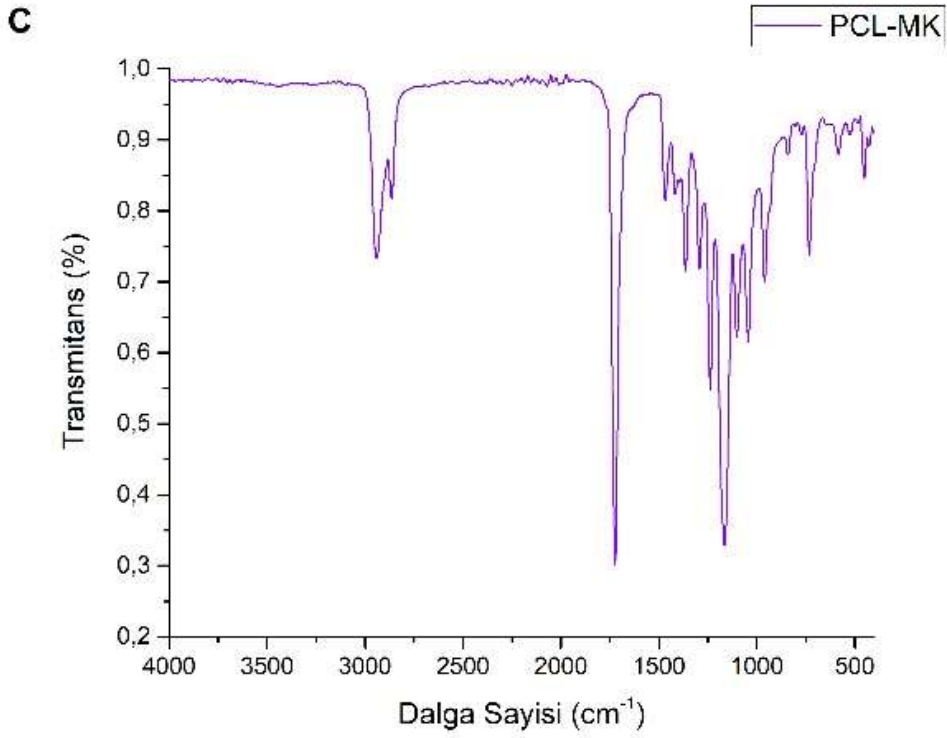
Rux/MK-PCL-NP'in spektrum grafiğine göre 2938 ve 2864 cm^{-1} de gelen pikler polimerin yapısındaki C-H pikleridir. 1724 cm^{-1} de gelen pik ise polimerin ana zincirinde karbonil gruplarına ait C=O pikidir. 1090 ve 1158 cm^{-1} gelen pikler polimerdeki C-O bağlarını bize göstermektedir. 3350 cm^{-1} civarında Ruxolitininib'in ve MK-2206'nın yapısında bulunan amin pikileri, 2300 cm^{-1} de Ruxolitininib'in yapısındaki nitril C≡N piki ve 1650 cm^{-1} de MK-2206'nın yapısındaki amid piki 1600 -1580 cm^{-1} civarında ise MK-2206 ve Ruxolitininib yapısındaki bulunan alken C=C pikleri görülmektedir (Şekil 4.2D.).



Şekil 4. 1. Ruxolitinib (A), MK-2206 (B) ve PCL (C)'nin Kimyasal Formülü.

Kaynak: (Charlier vd., 2019: 2, NCBI PCS, 2023 , Mahapatro, A. 2011: 4)

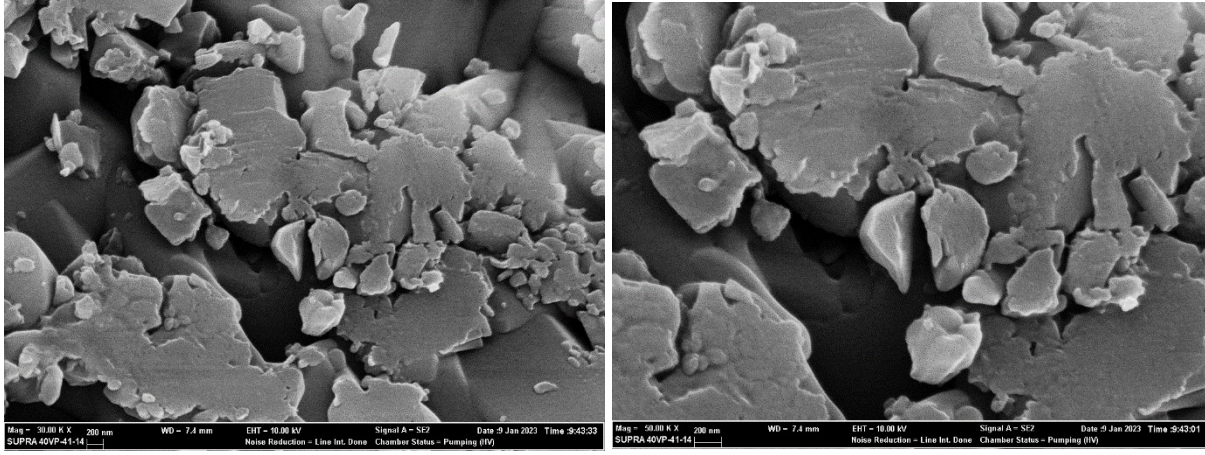




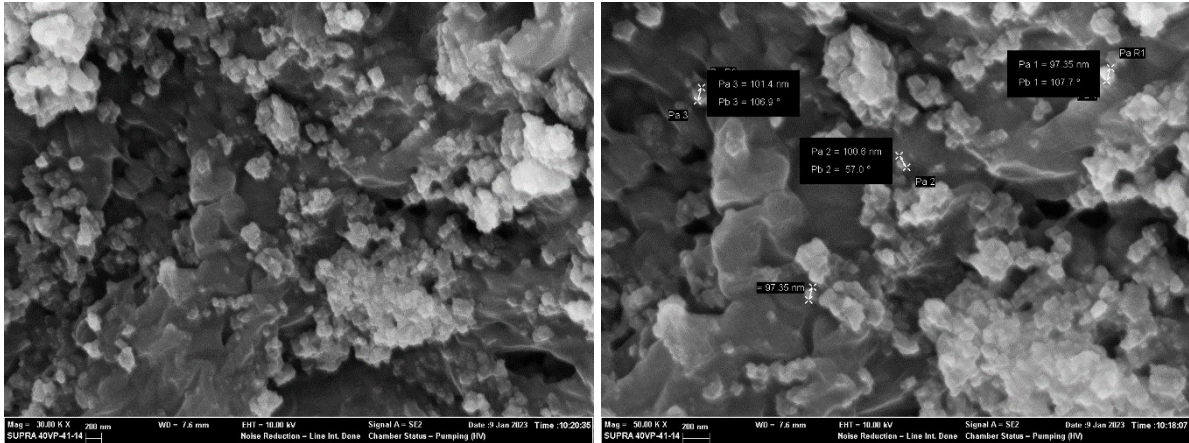
Şekil 4. 2. PCL (A), Rux-PCL-NP(B), MK-PCL-NP(C) Ve Rux/MK-PCL-NP(D) FTIR Analiz Ölçümleri; PCL: Poli(E-Kaprolakton), PCL-Rux: Ruxolitiniib Yüklü PCL Nanopartikül, PCL-MK: MK-2206-Yüklü PCL-Nanopartikül, PCL-RUX-MK: Ruxolitiniib/MK2206-Yüklü PCL-Nanopartikül

4.2.4. Ruxolitinib Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerin Morfolojik Analizleri

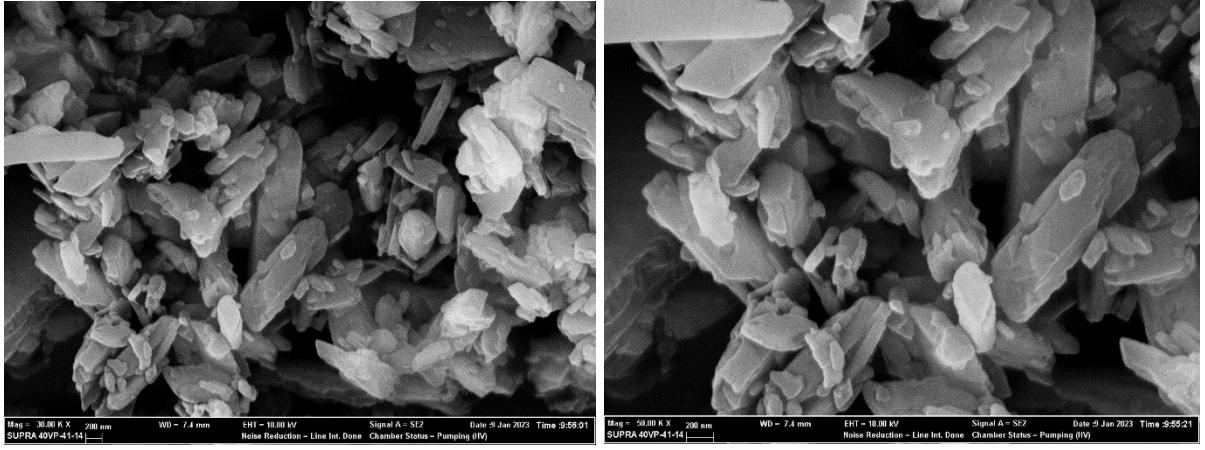
Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin yüzey morfolojisi SEM mikroskopuyla incelendi. Ruxolitinib ve MK-2206'nın molekül boyutunun molekül boyutunun PCL ile enkapsülasyonu ile azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.3. ve 4.5.). Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/ MK-PCL-NP boyutlarının sırasıyla 97- 101 nm, 182-264 nm ve 143-234 nm arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.4., 4.6. ve 4.7.).



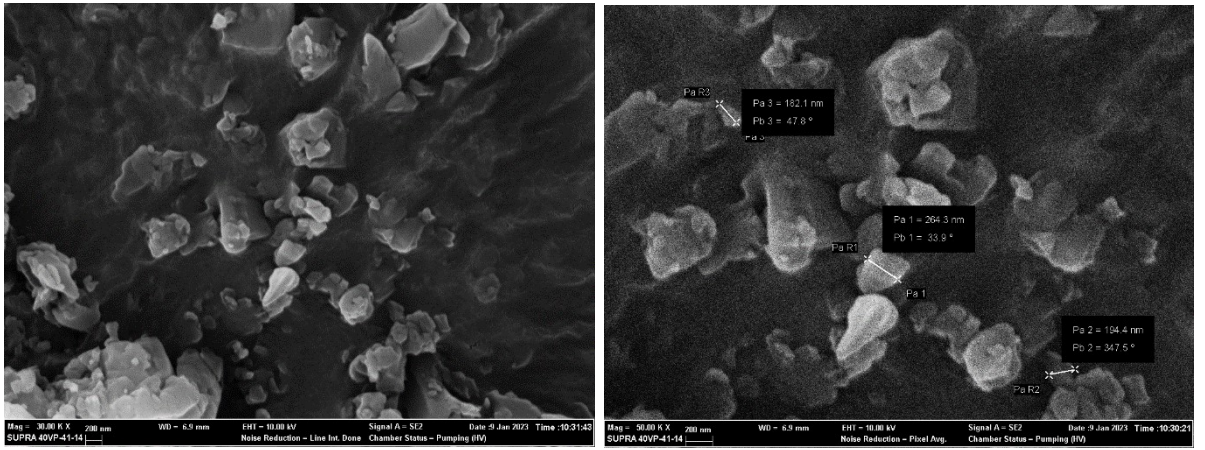
Şekil 4. 3. Ruxolitinib'in Morfolojik Yapısı



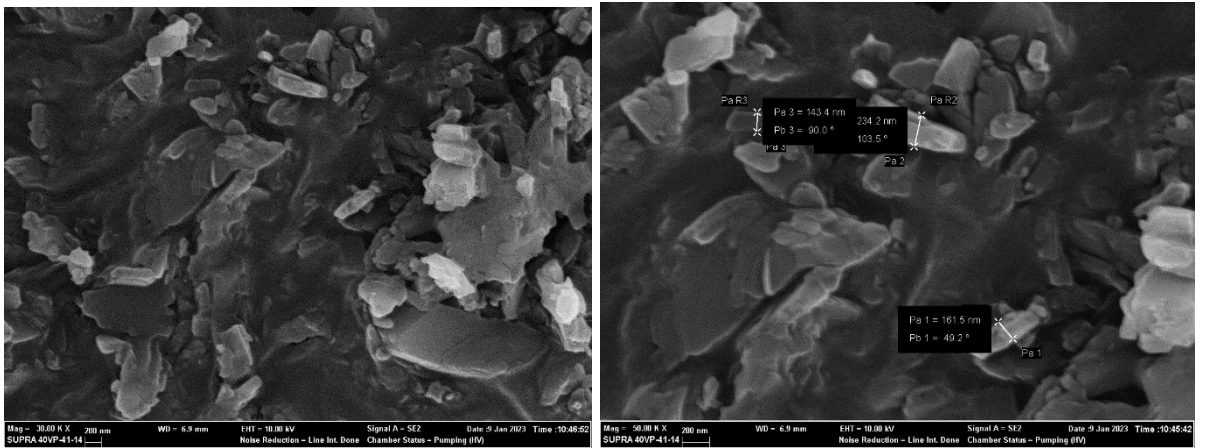
Şekil 4. 4. Sentezlenen Rux-PCL-NP'lerin Morfolojik Yapısı



Şekil 4. 5. MK-2206'nın Morfolojik Yapısı



Şekil 4. 6. Sentezlenen MK-PCL-NP'lerin Morfolojik Yapısı

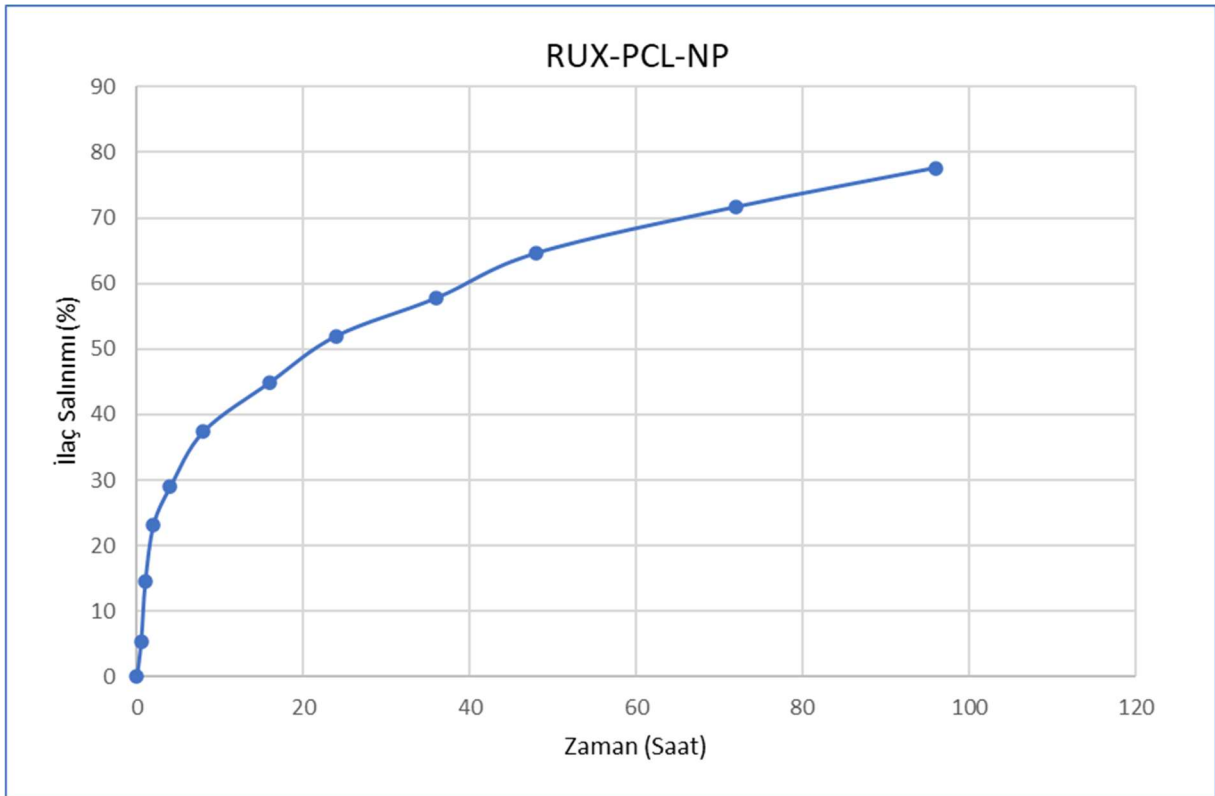


Şekil 4. 7. Sentezlenen Rux/MK-PCL-NP'lerin Morfolojik Yapısı

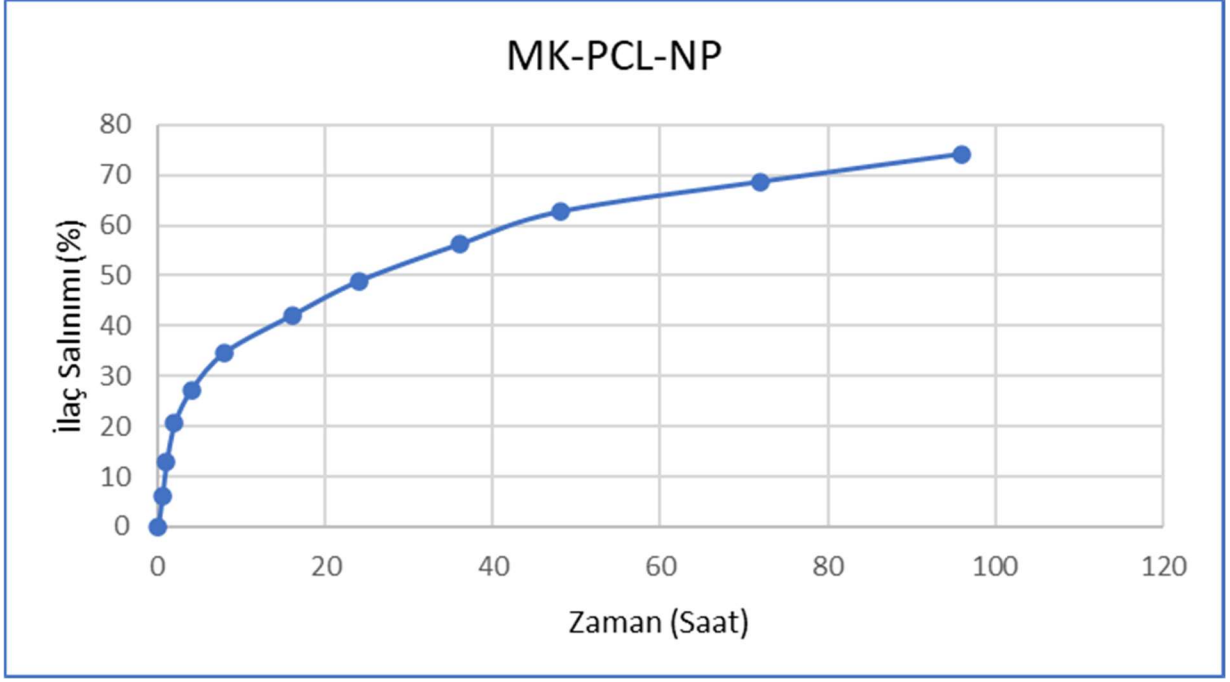
4.2.5. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), Ruxolitinib Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitinib+MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerden *İn Vitro* Etkin Madde Salım Çalışmaları

Sentezlenen PCL nanopartiküllerden sırasıyla Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206'nın in vitro ilaç salınımı diyaliz membran tekniği ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8., 4.9., 4.10.).

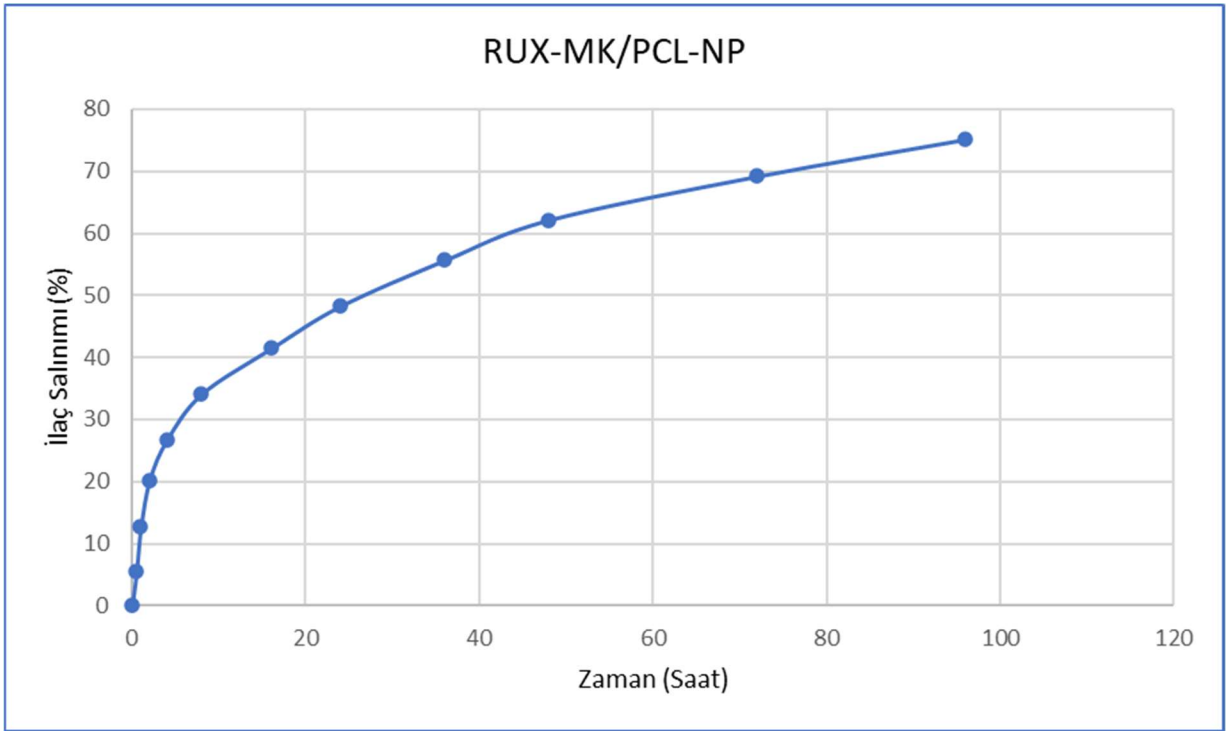
İlk 24 saatte PCL nanopartiküllerden Ruxolitinibin %51 oranında salındığı saptanmıştır (Şekil 4.8.). MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonunun ise ilk 36 saatte PCL nanopartiküllerden sırasıyla %51 ve %56'sının salındığı saptanmıştır (Şekil 4.9. ve 4.10.). Doksanaltıncü saatin sonunda ise Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonunun sırasıyla %77, %74 ve %75'inin salındığı görülmüştür (Şekil 4.8., 4.9., 4.10.).



Şekil 4. 8. PCL Nanopartiküllerden Ruxolitinib Salınım Profili



Şekil 4. 9. PCL Nanopartiküllerden MK-2206 Salınım Profili



Şekil 4. 10. PCL Nanopartiküllerden Ruxolitinib+MK-2206 Salınım Profili

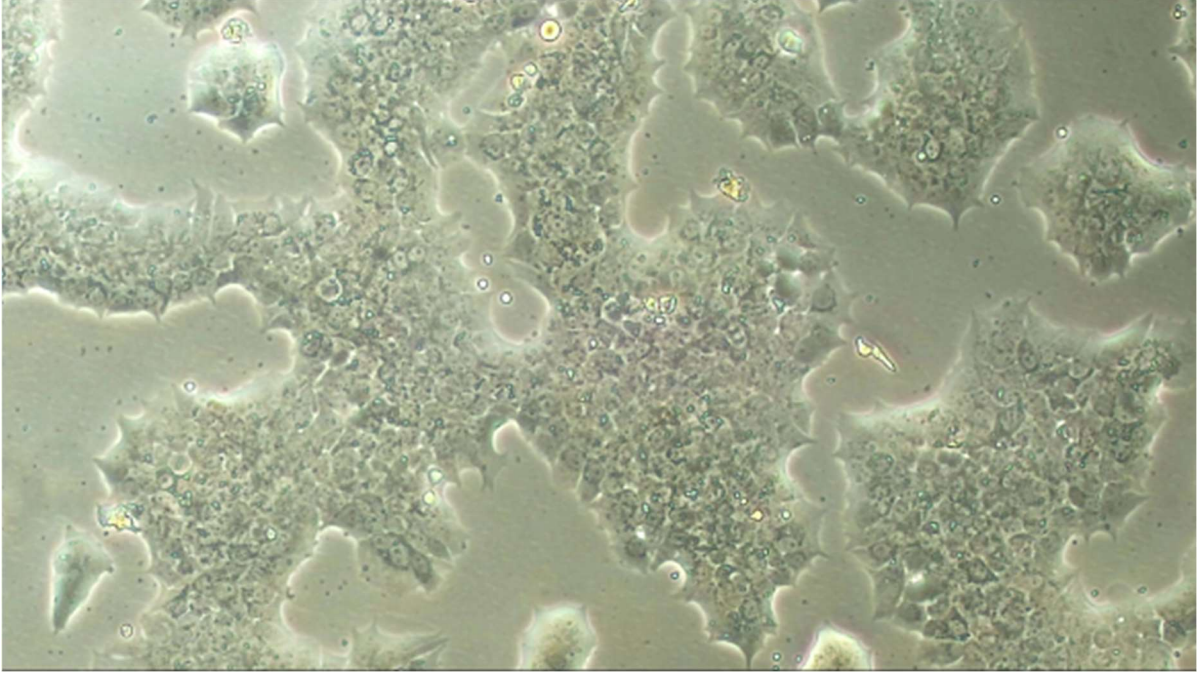
4.3. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), Ruxolitininb Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux-PCL-NP), MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (MK-PCL-NP) ve Ruxolitininb+MK-2206 Yüklü Poli(ϵ -kaprolakton) (Rux/MK-PCL-NP) Nanopartiküllerinin Antikanser Etkisinin incelenmesi

4.3.1. BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin *In Vitro* Ortamda Büyütülmesi

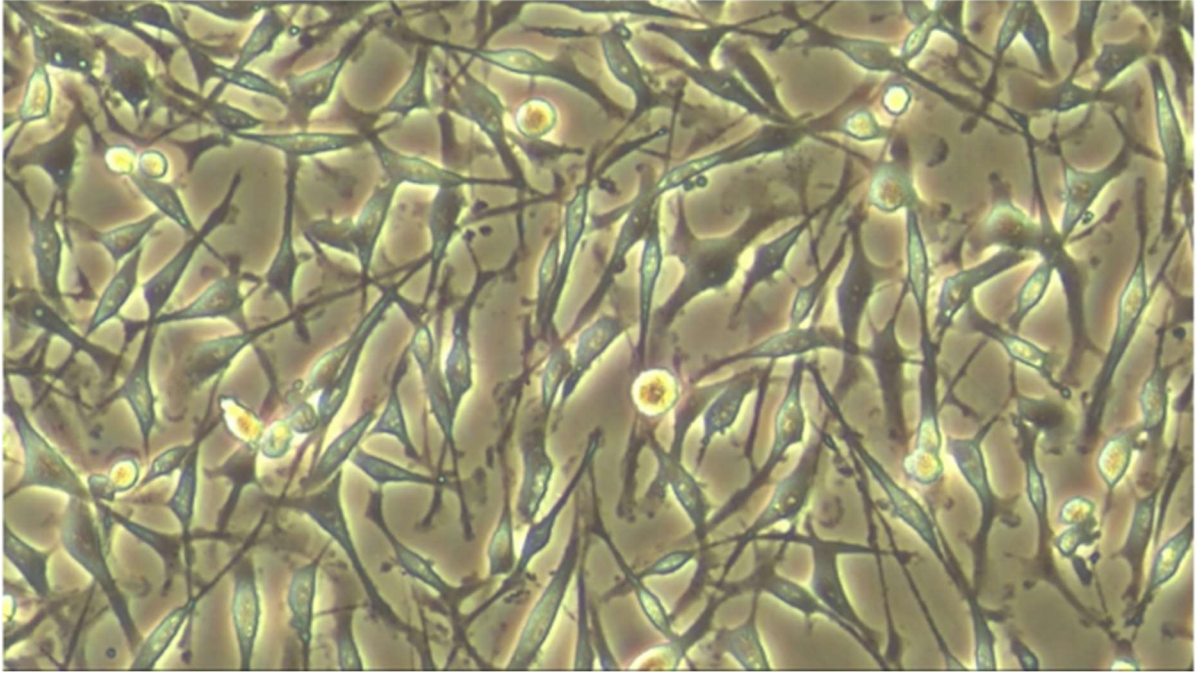
BT474 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayşe Elif ERSON BENSAN tarafından yeniden temin edilmiştir. BT474 hücreleri RPMI-1640 besiyerinde %20 ısı ile inaktive olmuş fetal sığır serumu (FBS), %1 NEAA, %1 penisilin/streptomisin ve %0,1 insülin katkısı ile %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörlerde büyütülmüştür (Şekil 4.11 A.).

MDA-MB-231 hücreleri Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU tarafından temin edilmiştir. DMEM besiyerinde %10 ısı ile inaktive olmuş fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin katkısı ile %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörlerde büyütülmüştür. BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri inverted mikroskopta 10X10 büyütme ile elde edilmiştir (Şekil 4.11 B.).

A



B



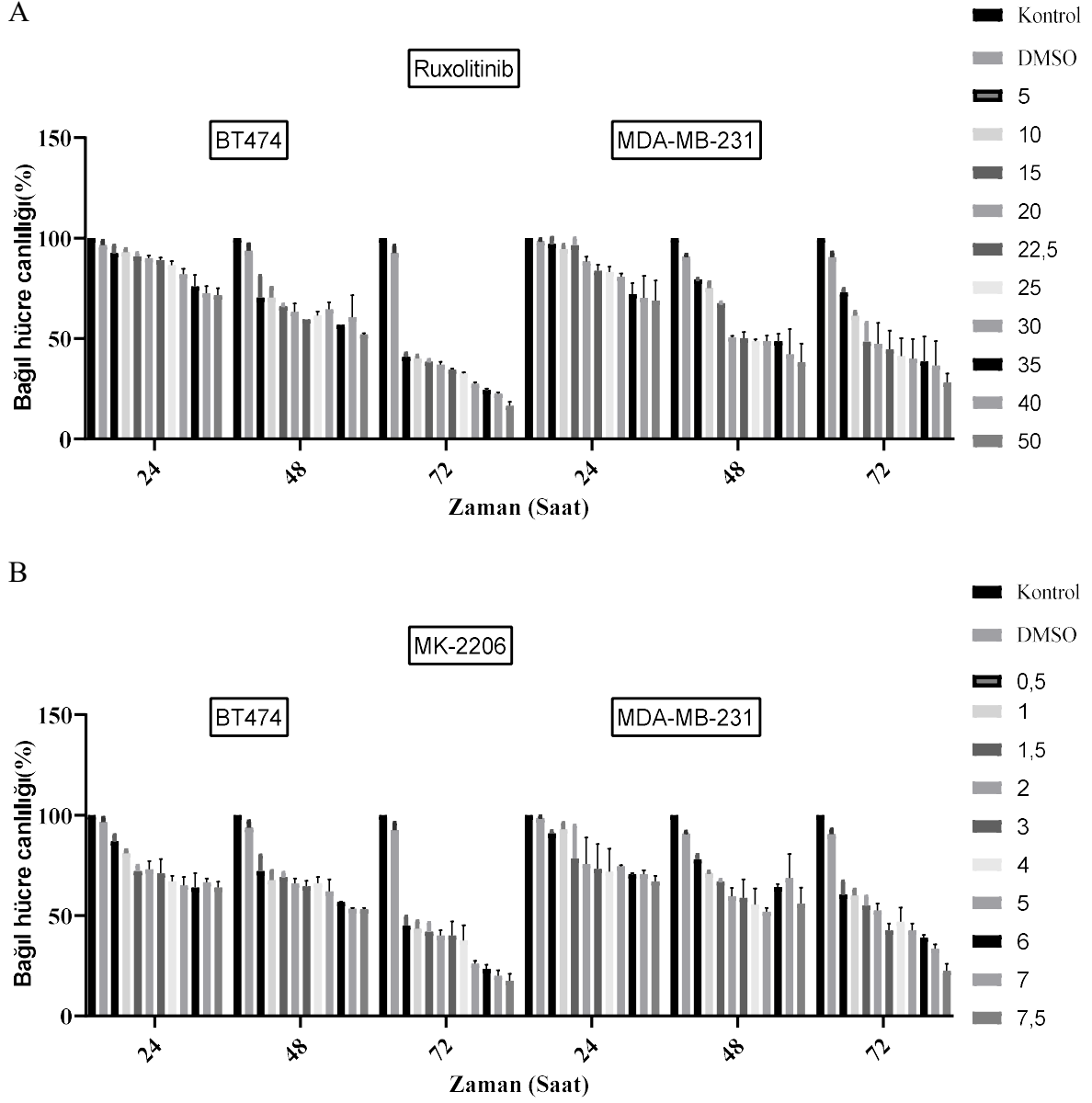
Şekil 4. 11. BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü (10X10).

4.3.2. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında *In Vitro* Sitotoksitesinin Ölçülmesi

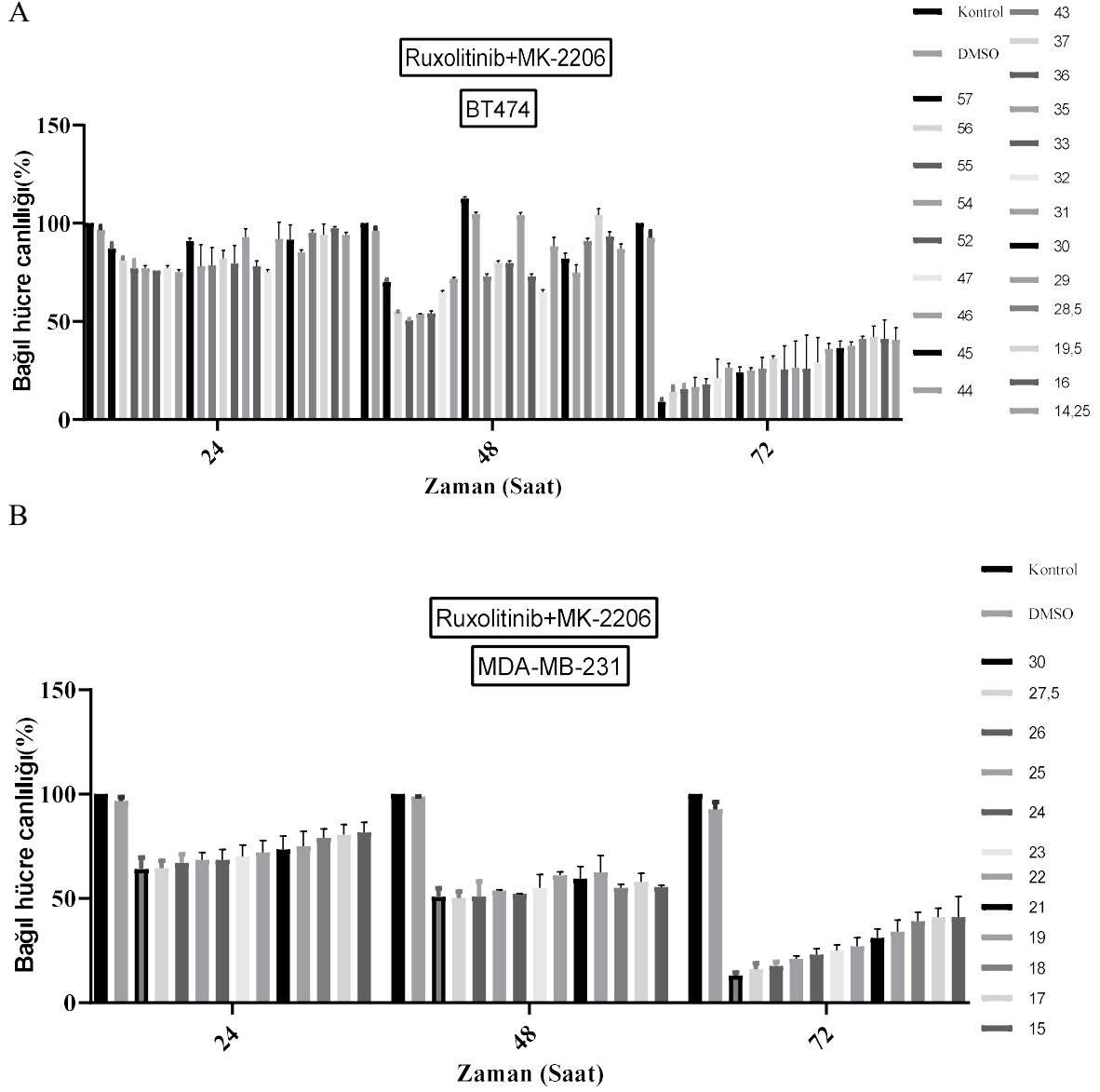
BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin doza ve zamana bağlı *in vitro* sitotoksitesini belirleyebilmek için 24, 48 ve 72 saatlik MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır (Şekil 4.12., 4.13., 4.14. ve 4.15.).

BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri saf maddelerin farklı konsantrasyonlarıyla (0-50 μ M) Ruxolitinib (Civallero, Cosenza, Pozzi, & Sacchi, 2017; Lim, Jeon, Gwak, Kim, & Suh, 2018) ve (0-7.5 μ M) MK-2206 (Jiao vd., 2013; B. B. Y. Ma vd., 2013; Simioni vd., 2012; Tao vd., 2016; Wilson, Kunnimalaiyaan, Gamblin, & Kunnimalaiyaan, 2014) ve Ruxolitinib ve MK-2206'nin farklı oranlarda (1:1, 1:1.5, 1:1.75, 1:4) birbiri ile ayrı ayrı 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiştir. Hücre canlılığındaki azalmanın Ruxolitinib ve MK-2206'nin kendisinden mi yoksa içinde çözündüğü DMSO'dan mı kaynaklandığını anlayabilmek için hücrelere maksimum final konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde DMSO uygulanmıştır. BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sırasıyla 24 saatlik Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombine uygulamasının etkili olmadığı, sırasıyla 72 saatlik Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombine uygulamasının ise toksik olduğu bulunmuştur. Bu nedenle deneyler 48 saatlik Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombine uygulaması ile devam ettirilmiştir (Şekil 4.12 A ve B, Şekil 4.13 A ve B).

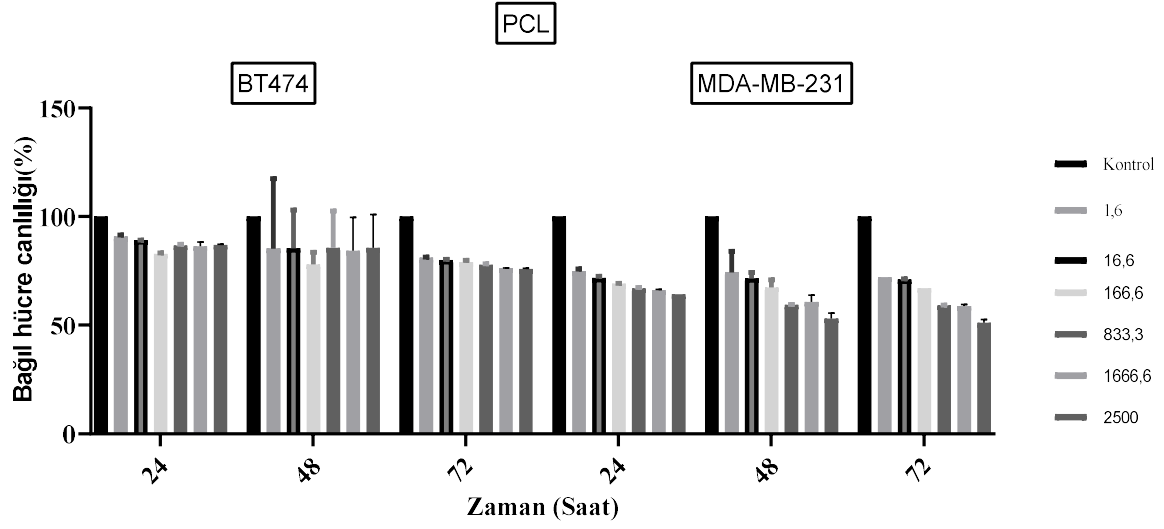
BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-2500 nM) PCL-NP, (0-490 μ M) Rux-PCL-NP, (0-312 μ M) MK-PCL-NP ve (Rux Mk mol oranları 1:1,6 oranında sabit tutularak, PCL nanopartiküllerine 0,1:1:10:50:100:150 oranlarında enkapsüle edilerek) Rux/MK-PCL-NP'nin herbiri ile ayrı ayrı 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiştir (Şekil 4.14., 4.15. A, B ve C). BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PCL-NP uygulamasının toksik etkisi olmadığı gözlenmiştir. BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sırasıyla 24 saatlik Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının etkili olmadığı, sırasıyla 72 saatlik Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının ise toksik olduğu bulunmuştur. Bu nedenle deneyler 48 saatlik Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile devam ettirilmiştir.



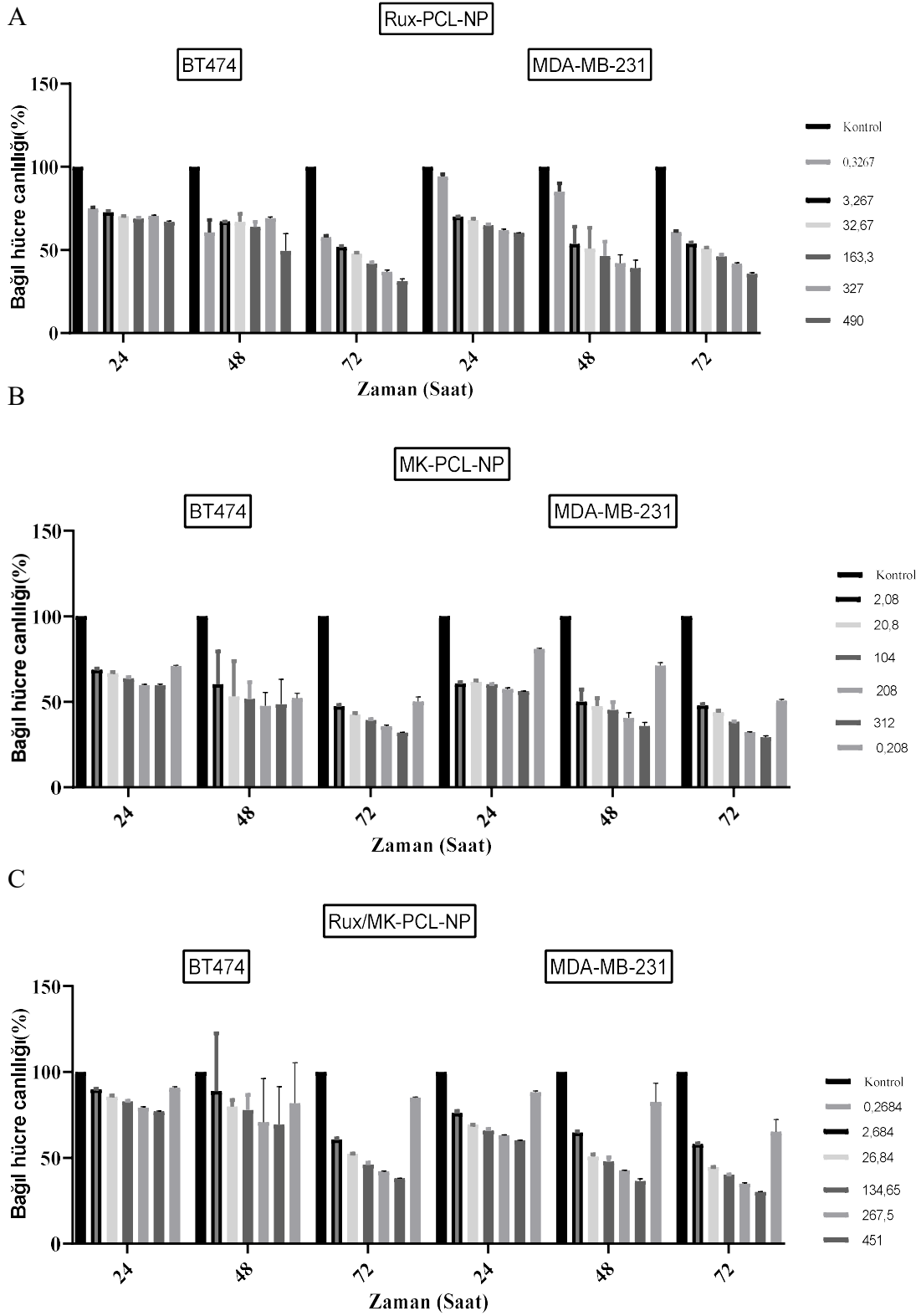
Şekil 4. 12. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib (A) ve MK-2206 (B) İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48, 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.



Şekil 4. 13. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib+MK-2206 Kombinasyonu İle BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48 ve 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.



Şekil 4. 14. Hücre Canlılık Testi. PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48 ve 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.



Şekil 4. 15. Hücre Canlılık Testi. Rux-PCL-NP (A), MK-PCL-NP (B) ve Rux/MK-PCL-NP (C) İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 24, 48 ve 72 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.

BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksitesini belirleyebilmek için MTT hücre canlılığı testi uygulanmıştır.

BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri saf maddelerin farklı konsantrasyonlarıyla (0-50 μ M) Ruxolitinib (Civallero, Cosenza, Pozzi, & Sacchi, 2017; Lim, Jeon, Gwak, Kim, & Suh, 2018) ve (0-7.5 μ M) MK-2206 (Jiao vd., 2013; B. B. Y. Ma vd., 2013; Simioni vd., 2012; Tao vd., 2016; Wilson, Kunnimalaiyaan, Gamblin, & Kunnimalaiyaan, 2014) ve Ruxolitinib ve MK-2206'nın farklı oranlarda (1:1, 1:1.5, 1:1.75, 1:4) birbiri ile ayrı ayrı 48 saat muamele edilmiştir. Hücre canlılığındaki azalmanın Ruxolitinib ve MK-2206'nın kendisinden mi yoksa içinde çözündüğü DMSO'dan mı kaynaklandığını anlayabilmek için hücrelere maksimum final konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde DMSO uygulanmıştır. MTT testi ile ilaçların ve sentezlenen nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri Tablo 4.2'deki gibidir.

BT474 hücre hattında kullanılacak uygun Ruxolitinib (Şekil 4.17 A.) ve MK-2206 (Şekil 4.17 B.) doz konsantrasyonlarının IC_{50} değerlerine bakılarak sırasıyla 50 μ M ve 7 μ M, kombine doz konsantrasyonları 55 μ M (Şekil 4.18 A.) (CI 0.92) olarak bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hatlarında kullanılacak uygun Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 sırasıyla 22.5 μ M (Şekil 4.17 A.) ve 7.5 μ M (Şekil 4.18 A.), kombine doz konsantrasyonları 23 μ M (Şekil 4.19 B.) (CI 0.95) olarak bulunmuştur.

BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-2,5 μ M) PCL-NP, (0-490 μ M) Rux-PCL-NP, (0-312 μ M) MK-PCL-NP ve (Rux Mk mol oranları 1:1.6 oranında sabit tutularak, PCL nanopartiküllerine 0,1:1:10:50:100:150 oranlarında enkapsüle edilerek) Rux/MK-PCL-NP' nin herbiri ile ayrı ayrı 48 saat muamele edilmiştir.

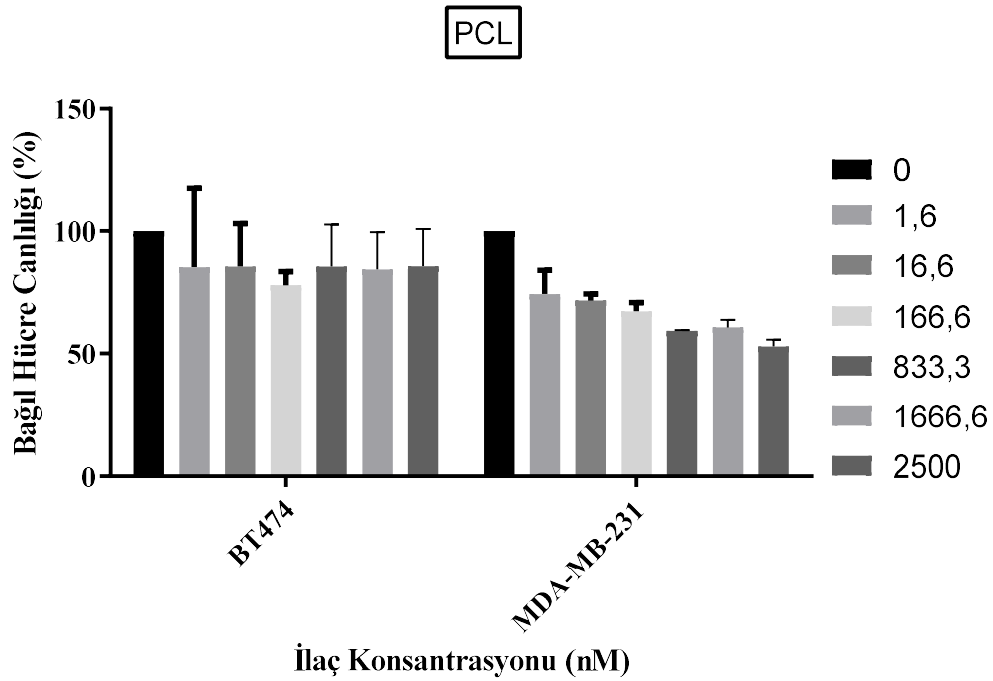
BT474 hücrelerinde Blank nanopartikül olarak kullanılan PCL-NP artan polimer konsantrasyonlarında herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir (Şekil 4.16.). BT474 hücre hattında kullanılacak Rux-PCL-NP (Şekil 4.17 B.), MK-PCL-NP (Şekil 4.18 B.) ve Rux/MK-PCL-NP (Şekil 4.19 C.)'nin uygun doz konsantrasyonları sırasıyla 0,3267 μ M, 0,208 μ M ve 451 μ M olarak bulunmuştur.

PCL-NP'nin artan polimer konsantrasyonlarında MDA-MB-231 hücrelerinde de herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir (Şekil 4.16.). MDA-MB-231 hücre hattında kullanılacak Rux-PCL-NP (Şekil 4.17. B.), MK-PCL-NP (Şekil 4.18. B.) ve RUX/MK-PCL-

NP (Şekil 4.19. C.)' nin uygun doz konsantrasyonları ise 32,67 µM, 2,08 µM ve 2,684 µM olarak bulunmuştur.

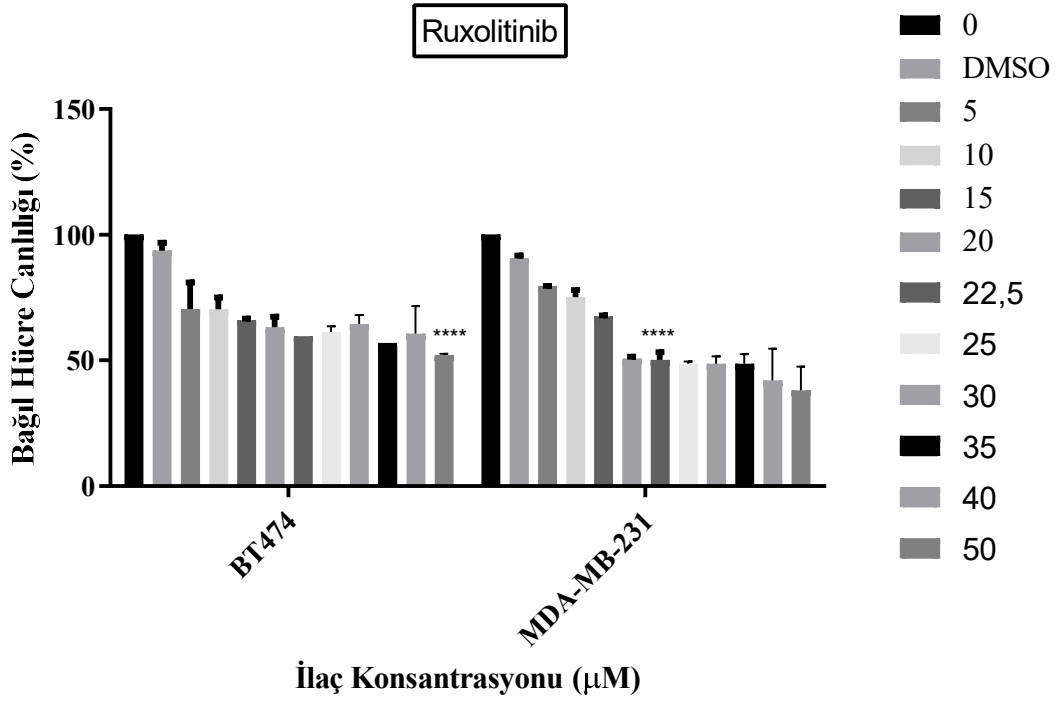
Tablo 4. 2. BT474 Ve MDA-MB-231 BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Ruxolitinib Ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP Uygulaması Sonrasında MTT Testi İle Belirlenen IC₅₀ Değerleri

	BT474	MDA-MB-231
	IC₅₀ Değeri	IC₅₀ Değeri
Ruxolitinib	50 µM	22,5 µM
MK-2206	7 µM	7,5 µM
Ruxolitinib+MK-2206	55 µM	23 µM
PCL	2,5 µM	2,5 µM
Rux-PCL-NP	0,3267 µM	32,67 µM
MK-PCL-NP	0,208 µM	2,08 µM
Rux/MK-PCL-NP	451 µM	2,684 µM

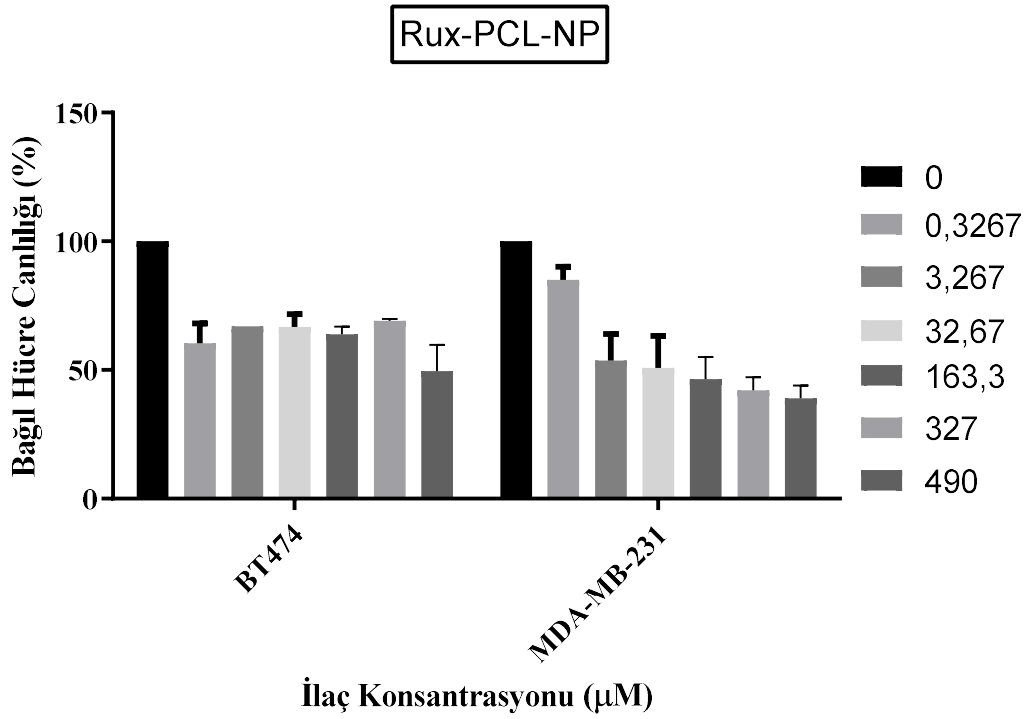


Şekil 4. 16. Hücre Canlılık Testi. PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.

A

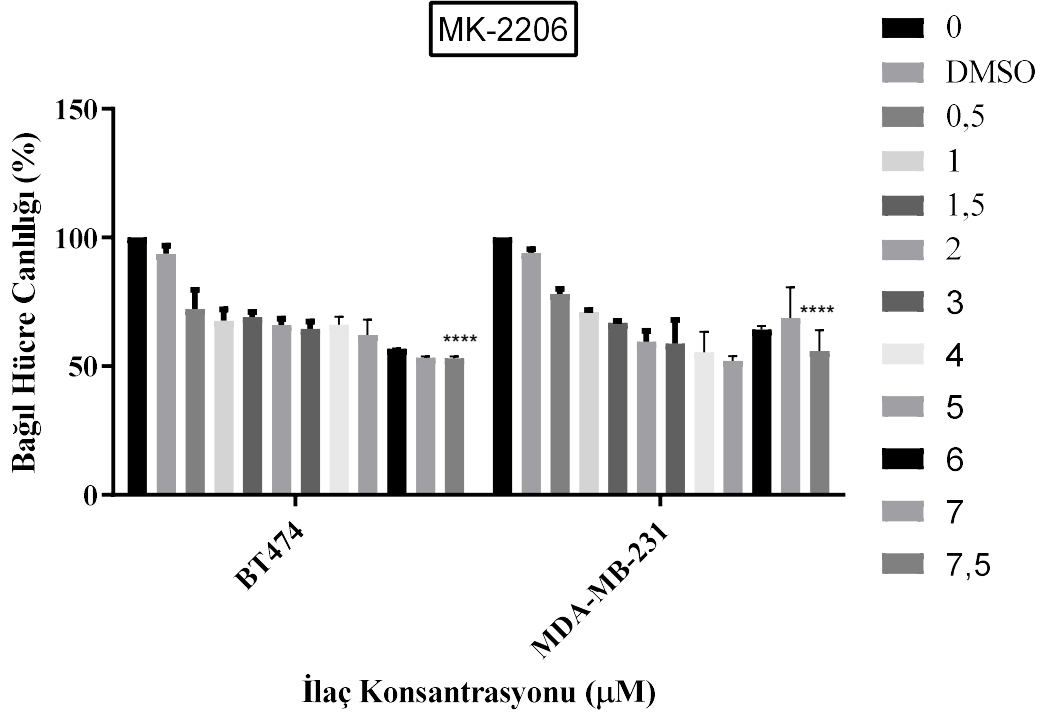


B

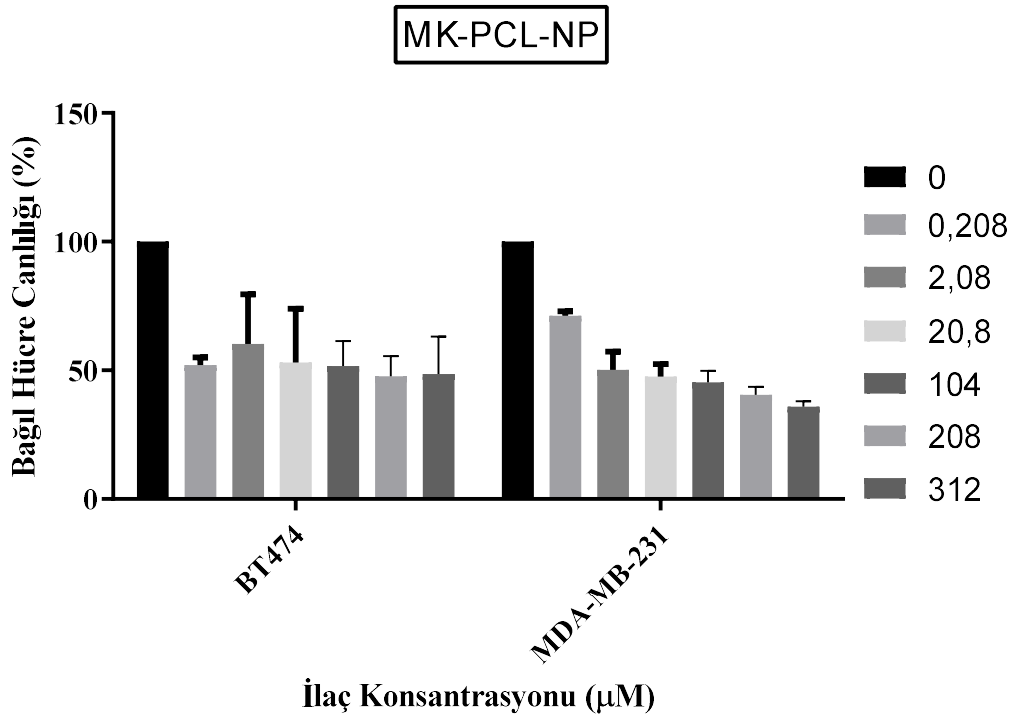


Şekil 4. 17. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib (A) Ve Rux-PCL-NP (B) İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. **** $P < 0.0001$.

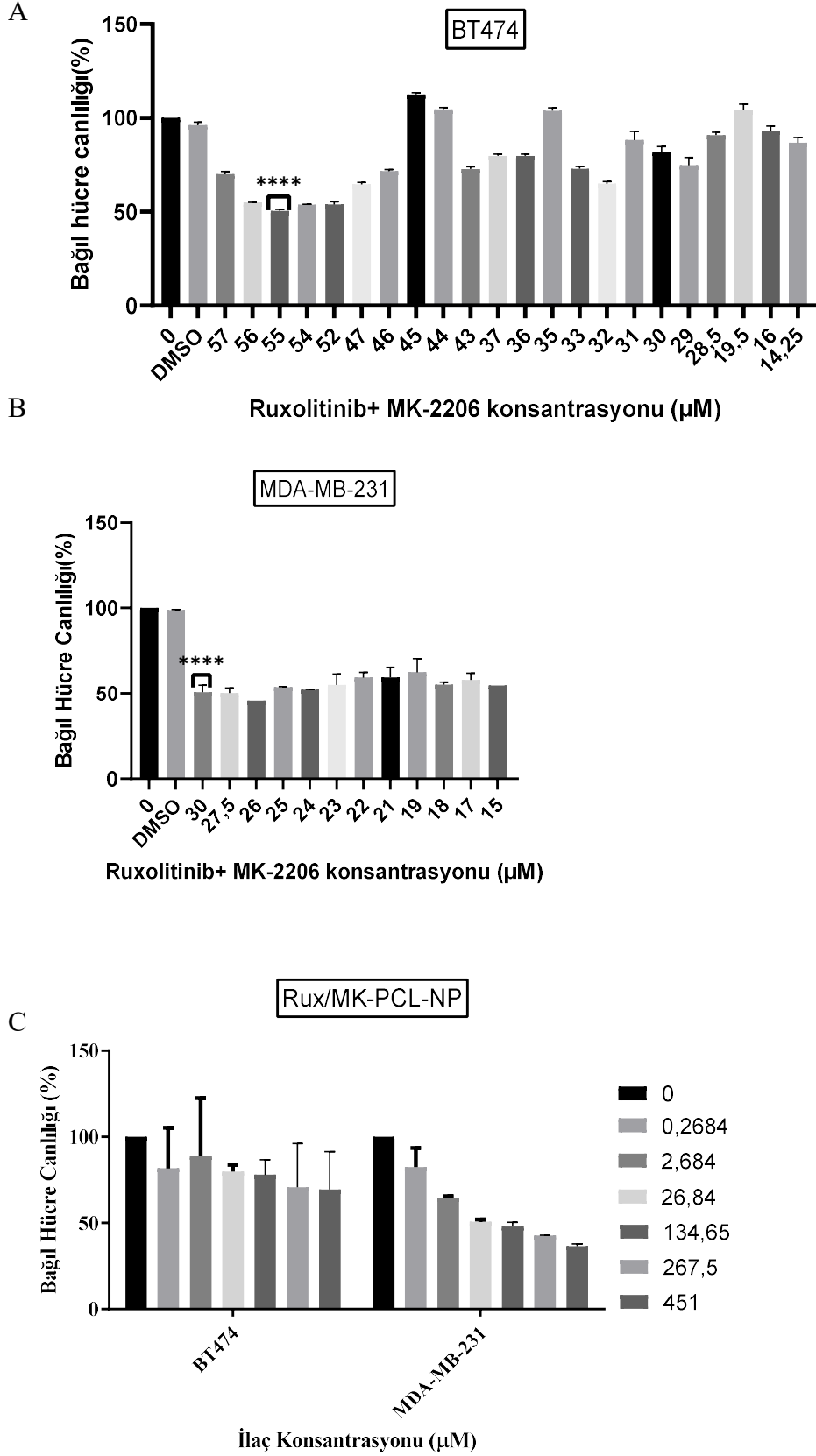
A



B



Şekil 4. 18. Hücre Canlılık Testi. MK-2206 Ve MK-PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. **** $P < 0.0001$.



Şekil 4. 19. Hücre Canlılık Testi. Ruxolitinib+MK-2206 İle BT474 (A) Ve MDA-MB-231(B) Ve Rux/MK-PCL-NP İle BT474 Ve MDA-MB-231 (C) Hücrelerinin Ayrı Ayrı 48 Saat Muamele Sonrasında Hücre Canlılığının MTT Testi İle Değerlendirilmesi. ****P<0.0001.

4.3.3. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Sağkalımına Etkisi

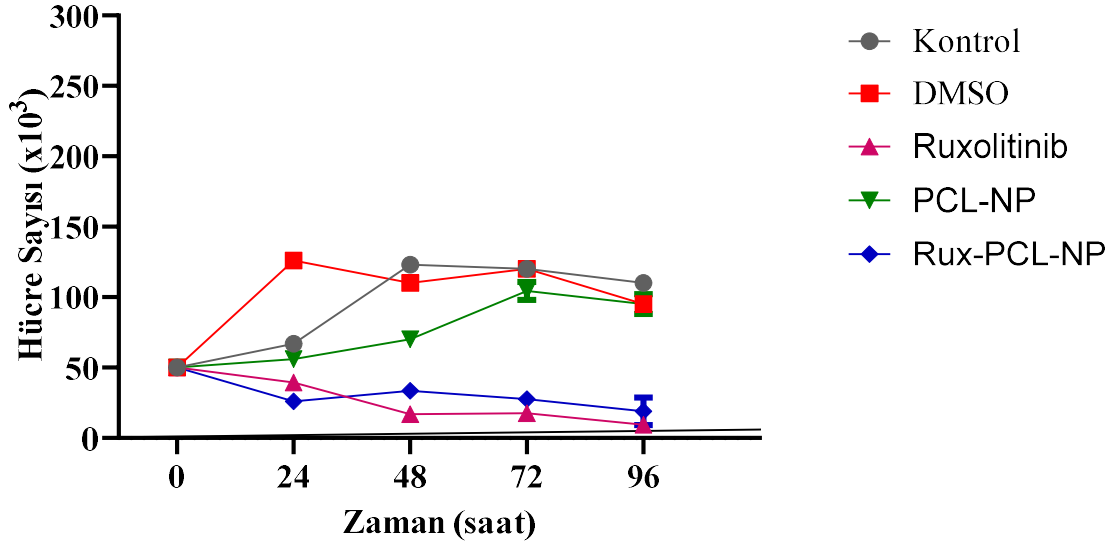
Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin zamana bağlı olarak hücre sağkalım üzerindeki etkisini belirleyebilmek için hücre sağkalım testi yapılmıştır. Hücre sağkalımındaki azalmanın Ruxolitinib ve MK-2206'nın kendisinden mi yoksa içinde çözündüğü DMSO'dan mı kaynaklandığını anlayabilmek için hücrelere maksimum final konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde DMSO uygulanmıştır. Sentezlenen ilaç yüklü nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinin sağkalımındaki azalma üzerindeki etkisinde PCL'nin etkisinin anlaşılabilmesi için hücreler kör nanopartikül PCL ile muamele edilmiştir.

BT474 hücrelerinde Ruxolitinib ve Rux-PCL-NP uygulanmamış kontrol grubunda zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görülmüştür. DMSO uygulanan BT474 hücrelerinde hücre canlılığında kontrol grubuna benzer şekilde artma görülmüştür. PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde hücre canlılığının zamana bağlı artması ile hücrelerde sitotoksik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde ise hücre canlılığındaki azalmanın sadece Ruxolitinib uygulanan gruptakine benzer şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil. 4.20 A.).

MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve Rux-PCL-NP uygulanmamış kontrol grubunda zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görülmüştür. DMSO uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığının arttığı görülmüştür. PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığının zamana bağlı arttığı ve hücrelerde sitotoksik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Rux-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ise hücre canlılığının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.20 B.).

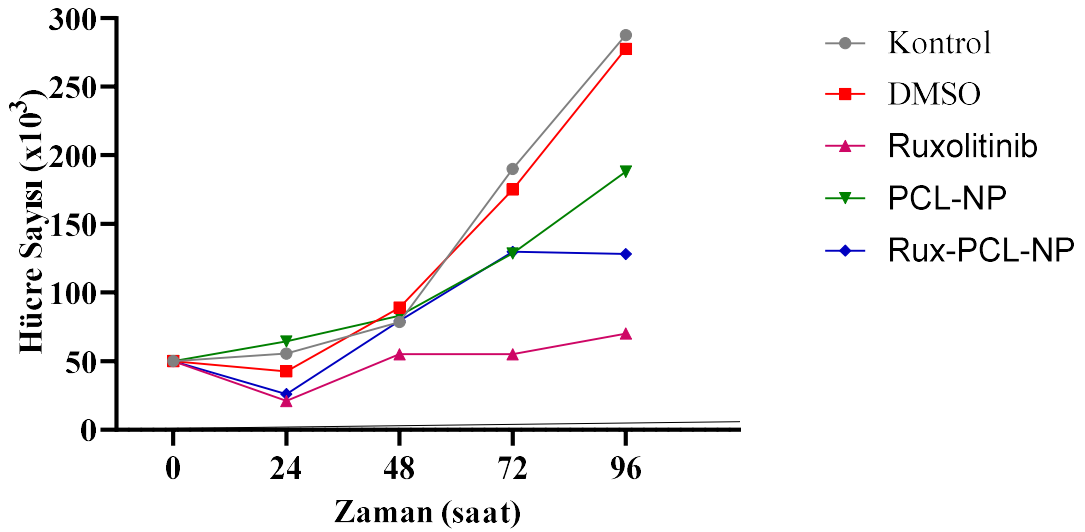
A

BT474



B

MDA-MB-231



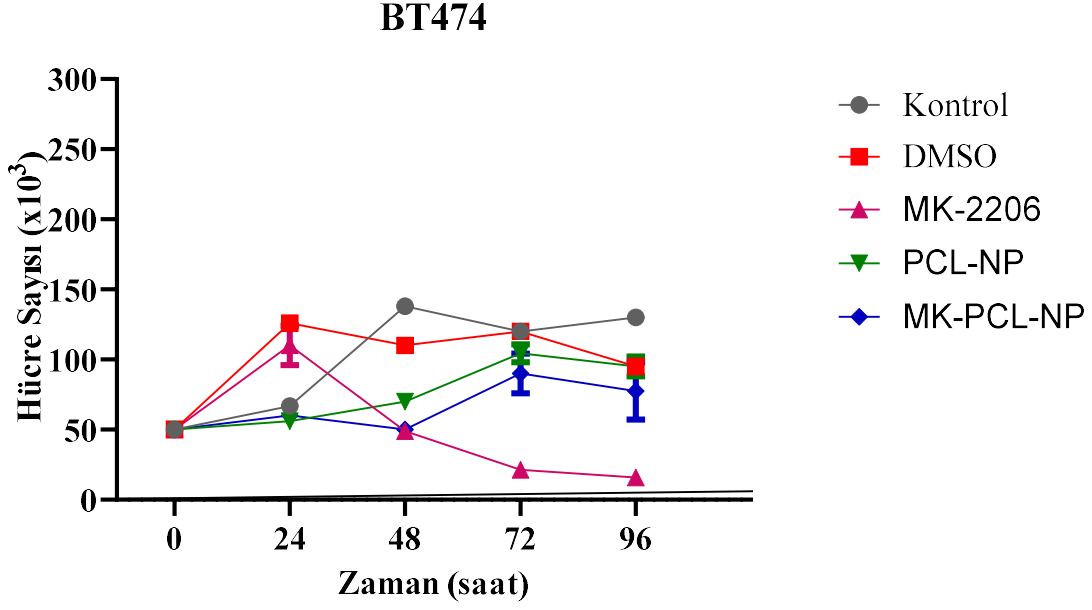
Şekil 4. 20. Ruxolitinib, PCL-NP Ve Rux-PCL-NP'nin BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Sağkalımı Üzerine Etkisi. ****P<0.000.

BT474 hücrelerinde MK-2206 ve MK-PCL-NP uygulanmamış kontrol grubunda zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görülmüştür. DMSO uygulanan BT474 hücrelerinde 72. saate kadar hücre canlılığında artış 96. Saatte ise bir miktar azalış görülmüştür. PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinde sitostatik bir etkisi olmadığı hücre canlılığının zamana bağlı artması ile gözlenmiştir. MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde ise hücre

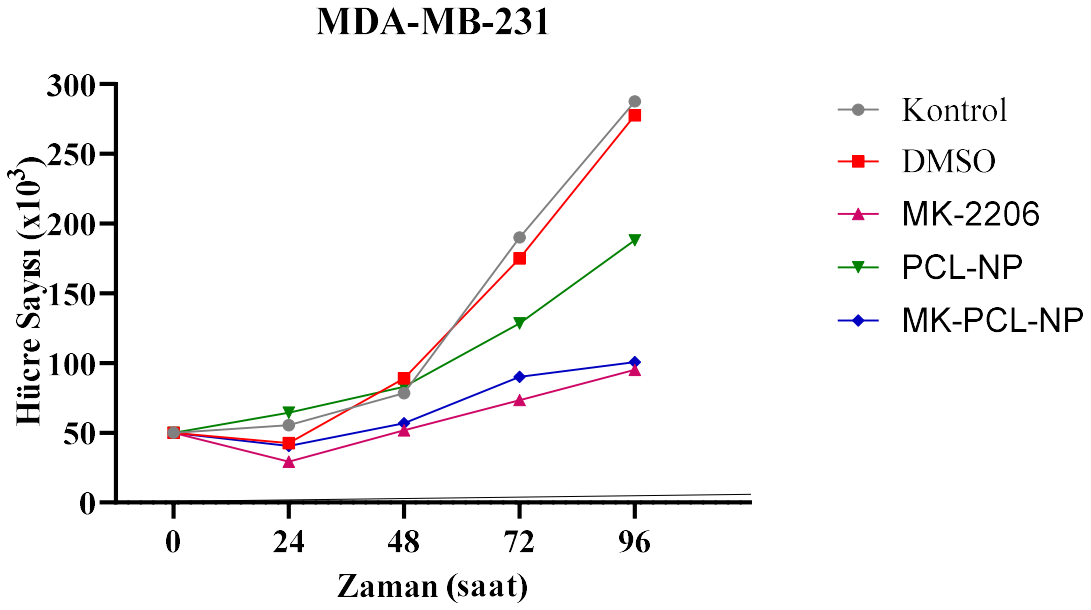
canlılığındaki azalmanın sadece MK-2206 uygulanan hücre grubundaki gibi keskin olmadığı görölmüştür (Şekil. 4.21 A.).

MDA-MB-231 hücrelerinde MK-2206 ve MK-PCL-NP uygulanmamış kontrol ve DMSO uygulanan gruplarda zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görölmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde PCL-NP uygulamasının hücre canlılığının zamana bağlı artmasını sağladığı ve hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir. MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ise hücre canlılığındaki azalmanın MK-2206 saf maddesi uygulanan hücre grupları ile benzer şekilde olduğu görölmüştür (Şekil 4.21 B.).

A



B



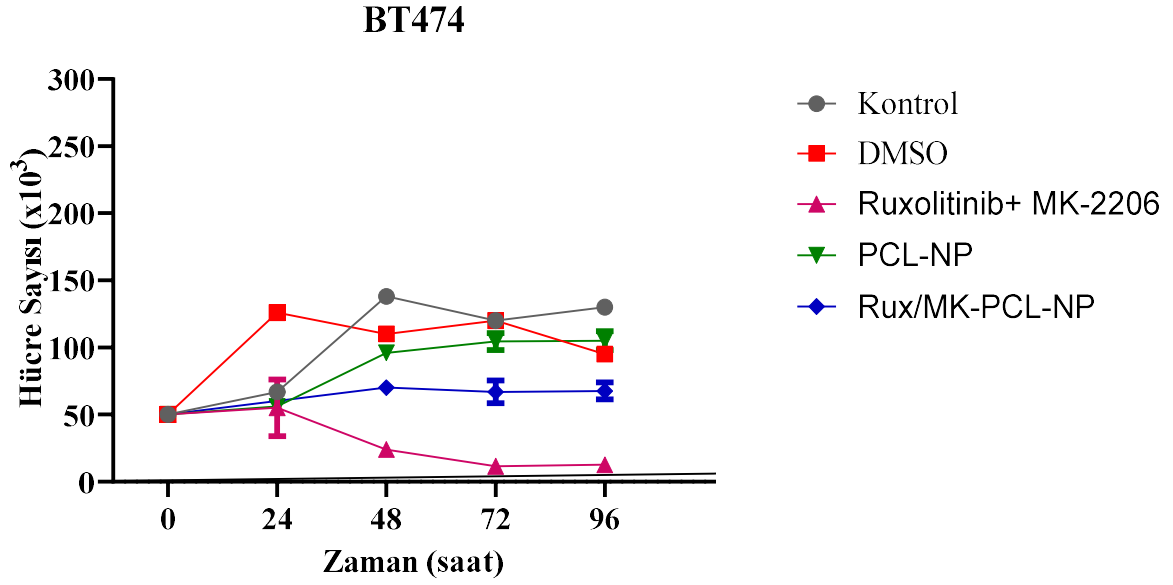
Şekil 4. 21. MK-2206, PCL-NP ve MK-PCL-NP'nin BT474 (A) ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Sağkalımı Üzerine Etkisi. ****p<0.000.

BT474 hücrelerinde Ruxolitinib+MK-2206 ve Rux/MK-PCL-NP uygulanmamış kontrol grubunda zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görülmüştür. DMSO uygulanan BT474 hücrelerinde 72. saate kadar hücre canlılığında artma 96. Saatte ise bir miktar azalış görülmüştür. BT474 hücrelerinde PCL-NP uygulamasının toksik bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Rux/MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde ise hücre canlılığındaki

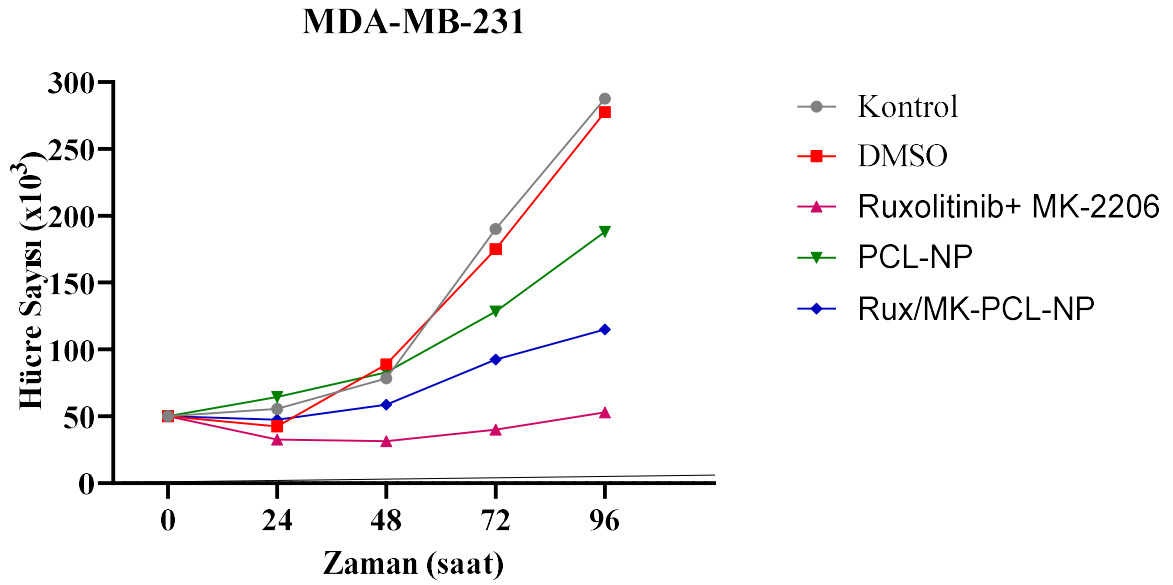
azalmanın sadece Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonu uygulanan hücre grubundan daha az olduğu görülmüştür (Şekil. 4.22 A.).

MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib+MK-2206 ve Rux/MK-PCL-NP uygulanmamış kontrol ve DMSO uygulanan gruplarda zamana bağlı olarak hücre sayısının arttığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde PCL-NP uygulamasının hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ise hücre canlılığındaki azalmanın Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonu uygulanan hücre grupları ile benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.22 B.).

A



B



Şekil 4. 22. Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP' Nin BT474 (A) Ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinin Sağkalımı Üzerine Etkisi ****P<0.000.

Hücrelerin yüzeye yapışmasının engellendiği ortamda hücrelerin büyüebilme yeteneğinin ölçülmesi amacı ile soft-agar koloni oluşum testi yapılmıştır (Şekil 4.23 A. ve B.).

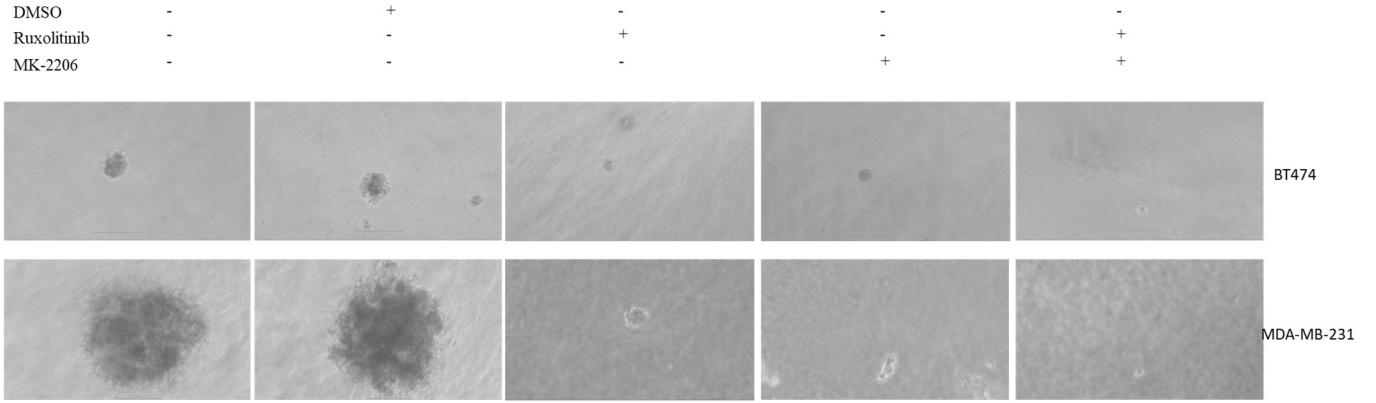
BT474 hücrelerinde ilaç uygulanmamış kontrol grubu ve DMSO uygulanan grupta benzer büyüklüklerde koloni oluşumu gözlenmiştir. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonu uygulanan BT474 hücrelerinde koloni oluşumunu belirgin bir şekilde engellediği görülmüştür (Şekil 4.23.A.).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise ilaç uygulanmayan kontrol grubu ve DMSO uygulanan grubunda oluşan koloni büyüklüklerinin BT474 hücrelerine oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206'nın tekli uygulaması sonucunda hücrelerde bir miktar koloni oluşumu görülmüştür. Ruxolitinib+ MK-2206'nın kombine uygulaması ile hücrelerde koloni oluşumu ve büyümesinin engellediği belirgin bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.23.A.).

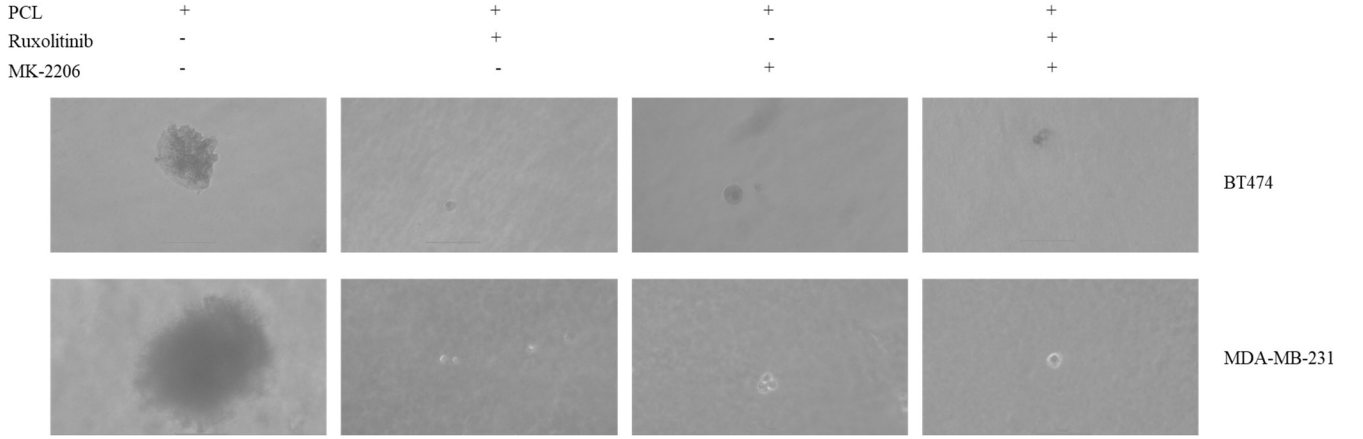
BT474 hücrelerinde PCL'nin koloni oluşumunu engellemediği görülmüştür. BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulamasının koloni oluşumunu engellemede MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanmasına oranla daha etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.23.B.).

PCL uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde de benzer şekilde koloni oluşumu engellemediği görülmüştür. Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumunun benzer oranlarda engellendiği görülmüştür (Şekil 4.23.B.).

A



B



Şekil 4. 23. Ruxolitinib Ve MK-2206 Saf Maddelerinin (A), PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP'nin (B) BT474 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Büyüeyebilme Yeteneklerinin Soft Agar Koloni Oluşum Testi İle Ölçülmesi.

Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki metastatik etkisini belirlemek için koloni oluşum testi yapılmıştır (Şekil 4.24 A. ve B., Şekil 4.25 A. ve B.).

BT474 hücrelerinde hiçbir ilaç uygulanmamış ve DMSO uygulamasının sonrasında hücre çoğalmasında değişiklik gözlenmemiştir. Ruxolitinib saf maddesi uygulanan BT474 meme kanseri hücre hatlarında ilaç uygulanmamış hücre hatlarına oranla hücre proliferasyonunda zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür. MK-2206 saf maddesi uygulanan BT474 hücrelerinde 72. saatte hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür. Ruxolitinib ve

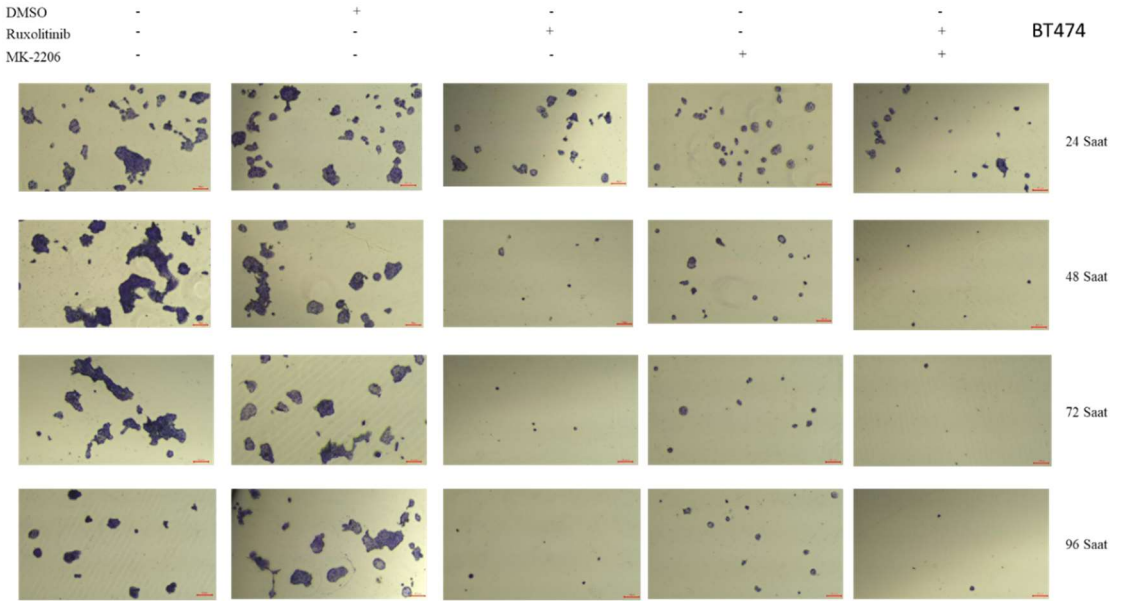
MK-2206 saf maddeleri kombine olarak uygulandığında BT474 hücre hattında hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür (Şekil 4.24 A.).

MDA-MB-231 hücrelerinde de hiçbir ilaç uygulanmamış kontrol ve DMSO uygulanan gruplarda hücre proliferasyonunda değişiklik gözlemlenmemiştir. Ruxolitinib saf maddesi uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda belirgin bir azalma görülmemiştir. MK-2206 saf maddesi uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda belirgin bir azalma görülmemiştir. Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddeleri kombine olarak uygulandığında MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda görülen azalmanın BT474 hücrelerindeki gibi belirgin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.25. A.).

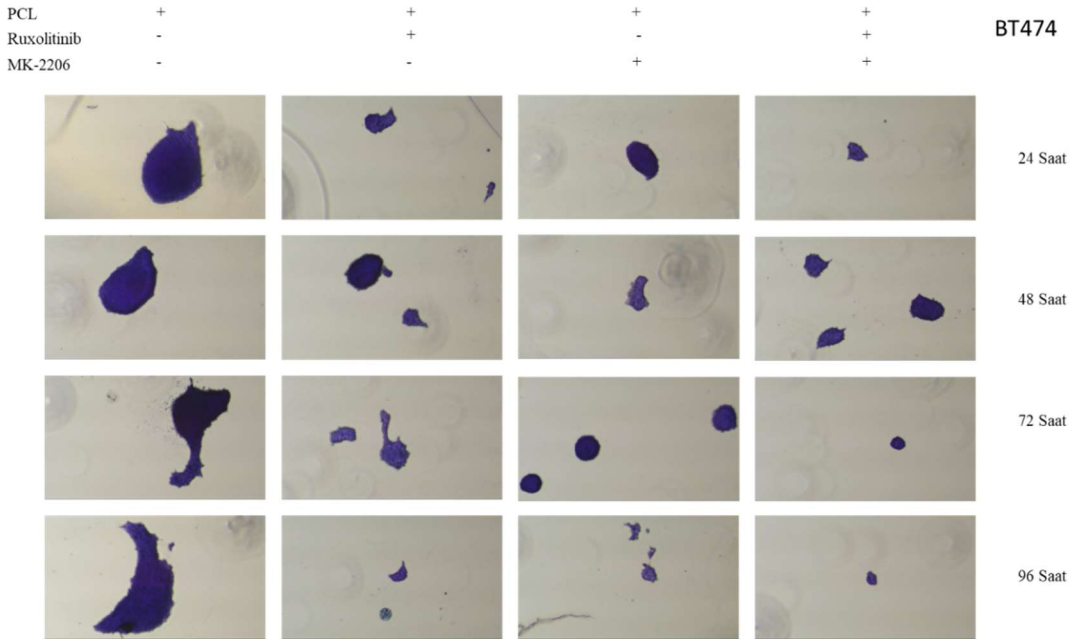
PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinin proliferasyonunu engellemediği görülmüştür. Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonunda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde benzer oranlarda azalma görülmüştür. MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonunda 96. saatte azalma görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonunda 72 ve 96. saatte belirgin bir azalma görülmüştür (Şekil 4.24. B.).

PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonun engellenmediği görülmüştür. Rux-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 96. Saatte azalma saptanmıştır. MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda 96. saatte azalma görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde BT474 hücrelerindeki gibi belirgin bir şekilde azalma saptanmamıştır (Şekil 4.25. B.).

A

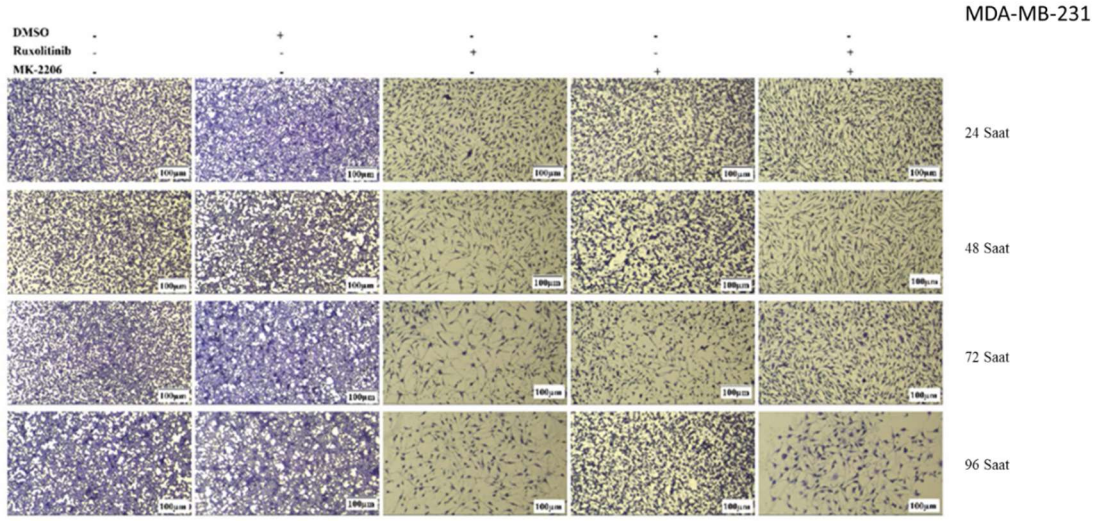


B

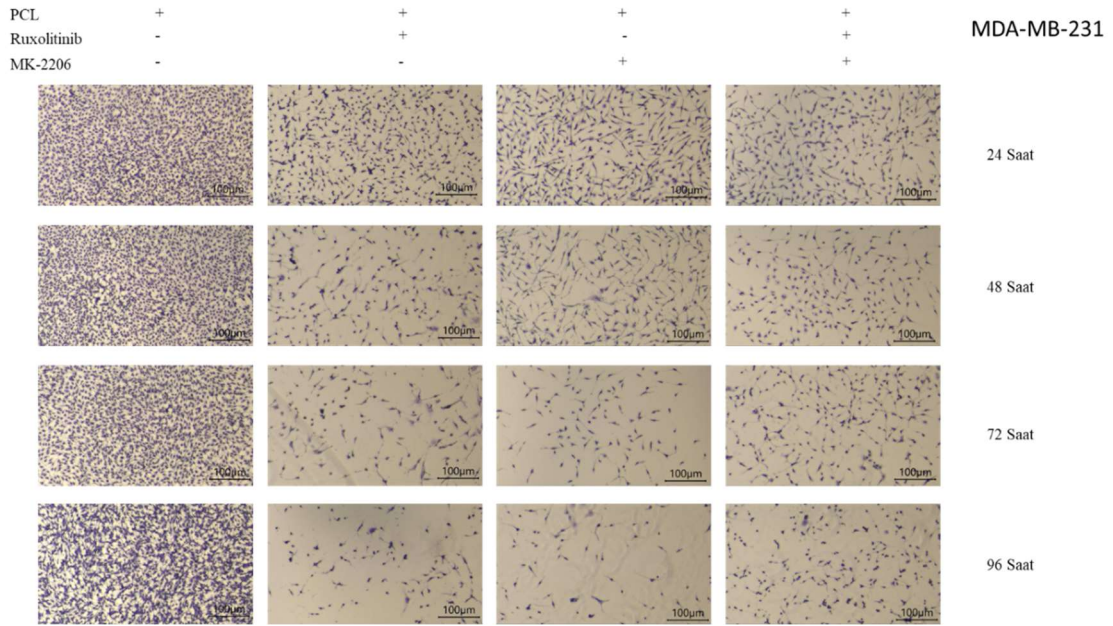


Şekil 4. 24. Ruxolitinib Ve MK-2206'nın (A), PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP (B)'Nin BT474 Meme Kanseri Kanseri Hücre Hatlarının Metastaz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.

A



B



Şekil 4. 25. Ruxolitinib Ve MK-2206'nın (A), PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP (B)'nin MDA-MB-231 Meme Kanseri Kanseri Hücre Hatlarının Metastaz Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.

Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin BT474 ve MDA-MB-231 meme kanseri kanseri hücrelerinde metastaz üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.26 A, B).

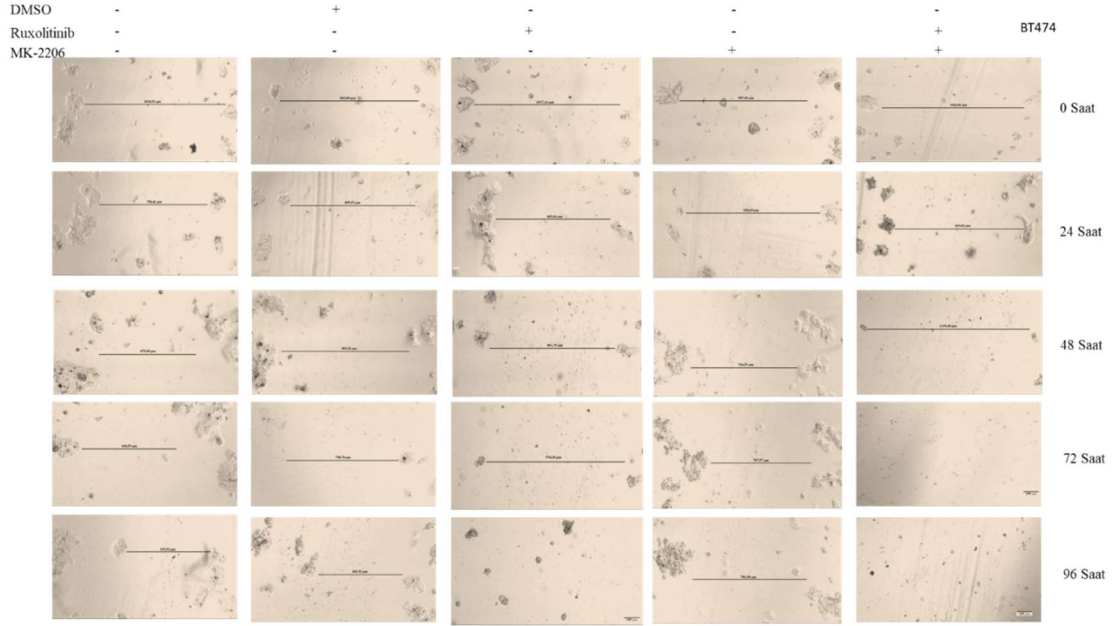
BT474 hücrelerinin hiçbir ilaç uygulanmayan kontrol ve DMSO uygulanan gruplarında açılan yara genişliklerinin hücrelerin yavaş ve üst üste büyümesinden dolayı kapanamadığı saptanmıştır. BT474 hücrelerinde Ruxolitinib, Ruxolitinib+MK-2206 birlikte uygulandığında 72 ve 96. saatlerde hücrelerin tamamen öldüğü görülmüştür. MK-2206 uygulanan BT474 hücrelerinde ise açılan yara genişliğini kapatamadığı saptanmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerinin hiçbir ilaç uygulanmayan kontrol ve DMSO uygulanan gruplarında açılan yara genişliğinin zamana bağlı olarak yavaş yavaş kapandığı görülmüştür. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde açılan yara genişliğinin zamanla kapanamadığı saptanmıştır.

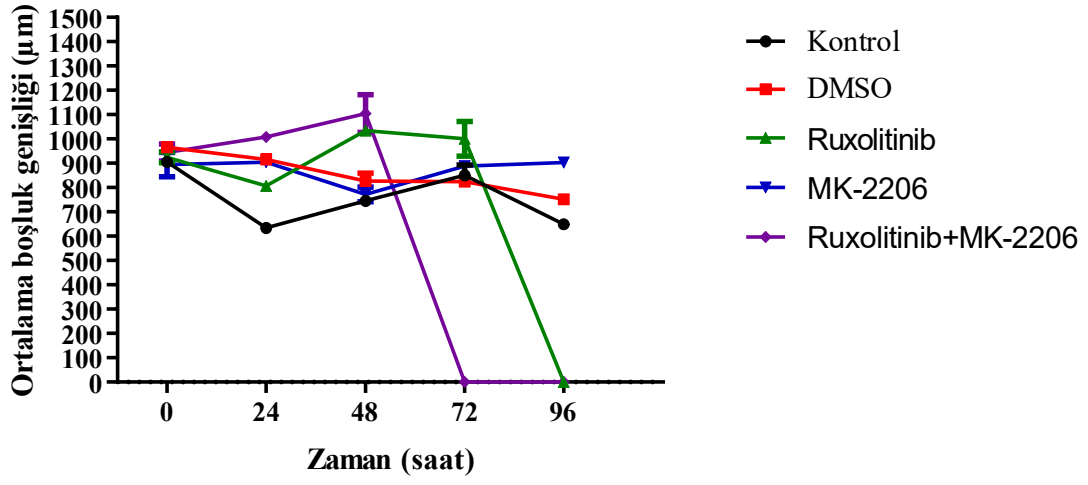
PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinde 96. saatin sonunda açılan yara genişliğini kapatamadığı bulunmuştur. Rux-PCL-NP ve MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde de açılan yara genişliğinin kapatılamadığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulanan BT474 96. saatin sonunda hücrelerin öldüğü görülmüştür (Şekil 4.27. A.).

PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde açılan yara genişliğinin 96. saatin sonunda kapandığı görülmüştür. Rux-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 96. saatte açılan yara genişliğinin kapandığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde açılan yara genişliğinin 96. saatte kapanamadığı görülmüştür (Şekil 4.27. B.).

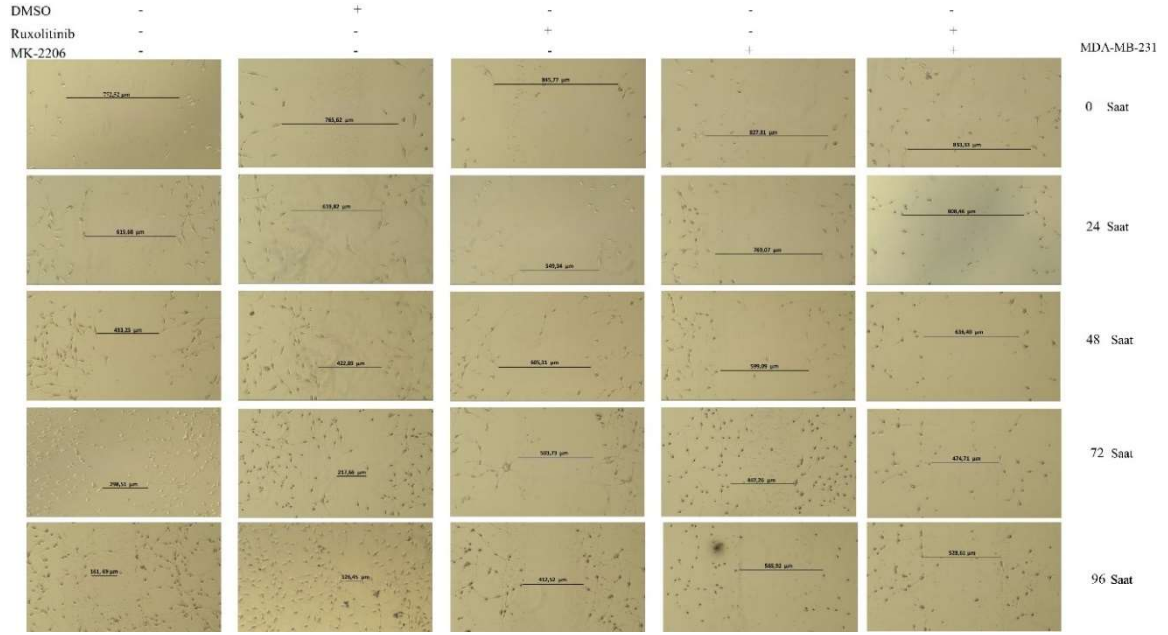
A



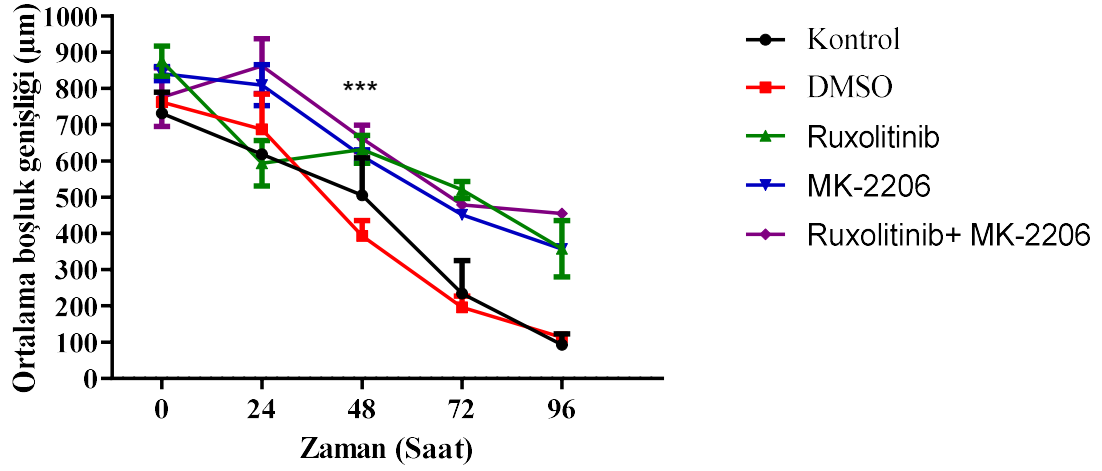
BT474



B

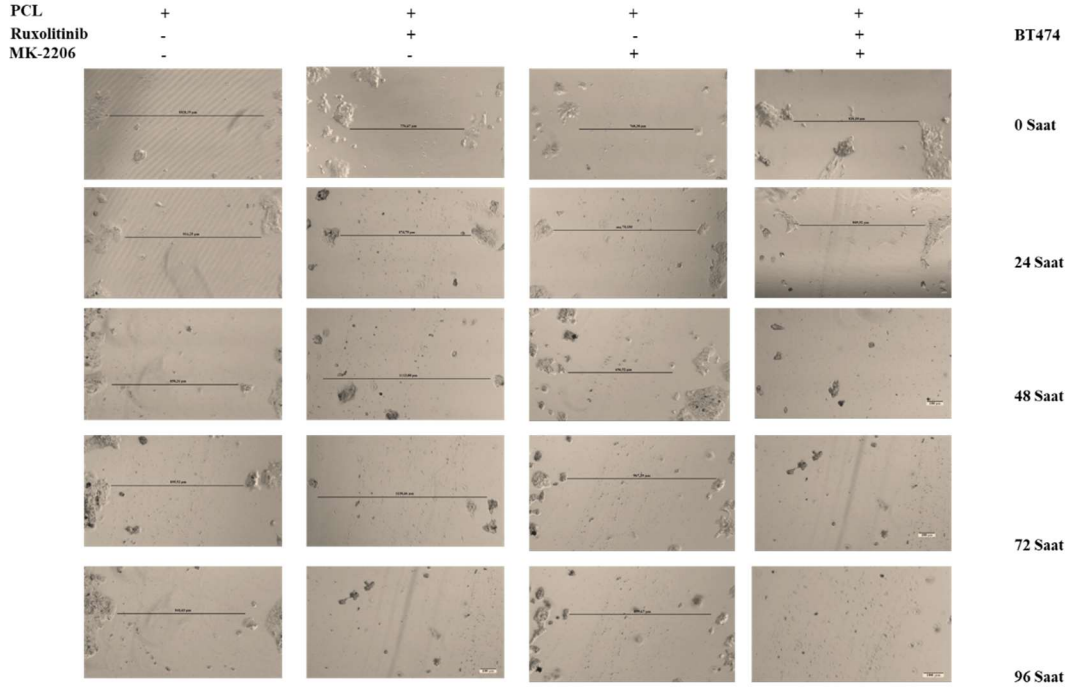


MDA-MB-231

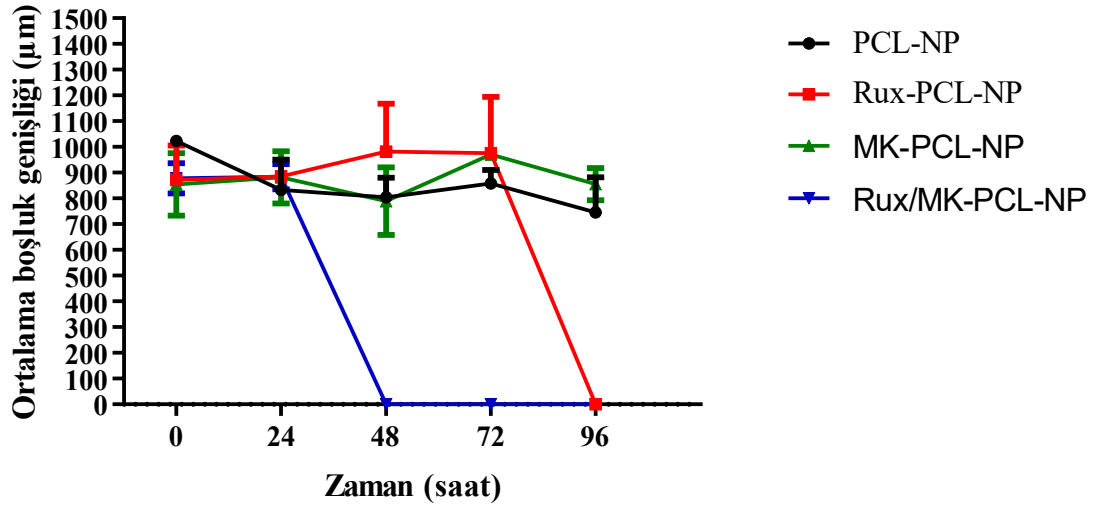


Şekil 4. 26. Ruxolitinib Ve MK-2206'nın BT474 (A) Ve MDA-MB-231(B) Meme Kanseri Hücrelerinde Lateral Hücre Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.

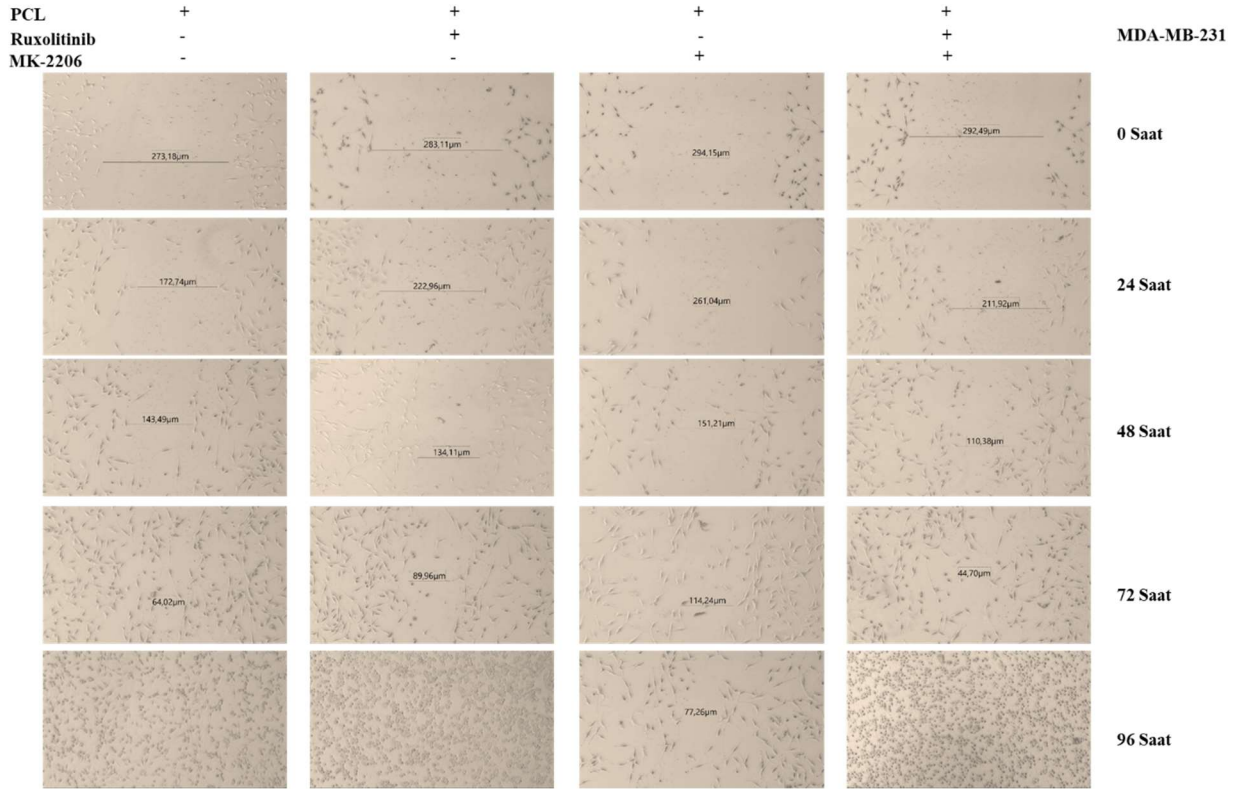
A



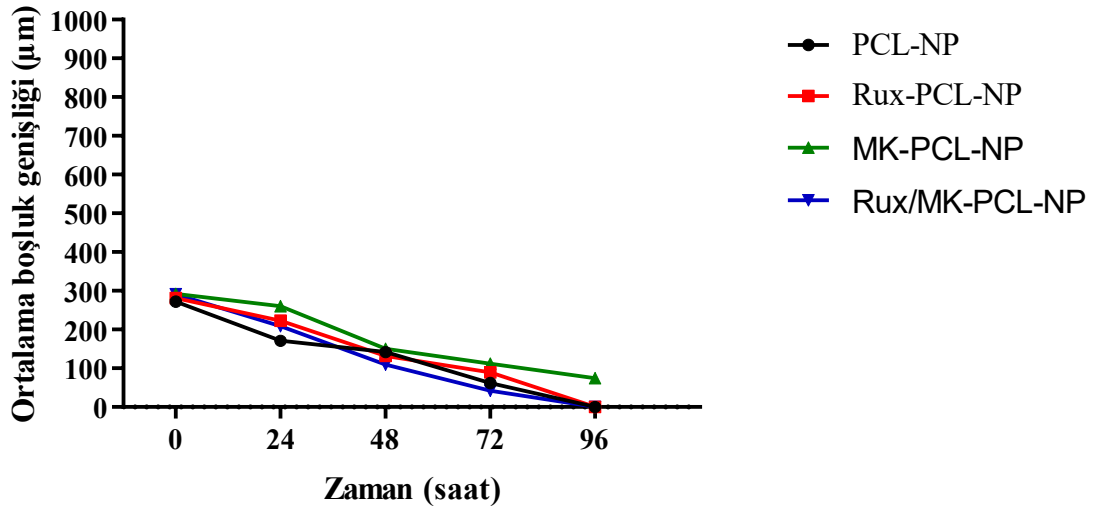
BT474



B



MDA-MB-231



Şekil 4. 27. PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP'nin BT474 (A) Ve MDA-MB-231(B) Ve Meme Kanseri Hücrelerinde Lateral Hücre Hareketi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.

4.3.4. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin (SM), Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

4.3.4.1. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin (SM), Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptoz Üzerindeki Etkisinin Hoescht Boyama İle İncelenmesi

BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/PCL-NP uygulamasının apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin tespit edilmesi için Hoescht 33342 nükleer boya ile boyanmıştır.

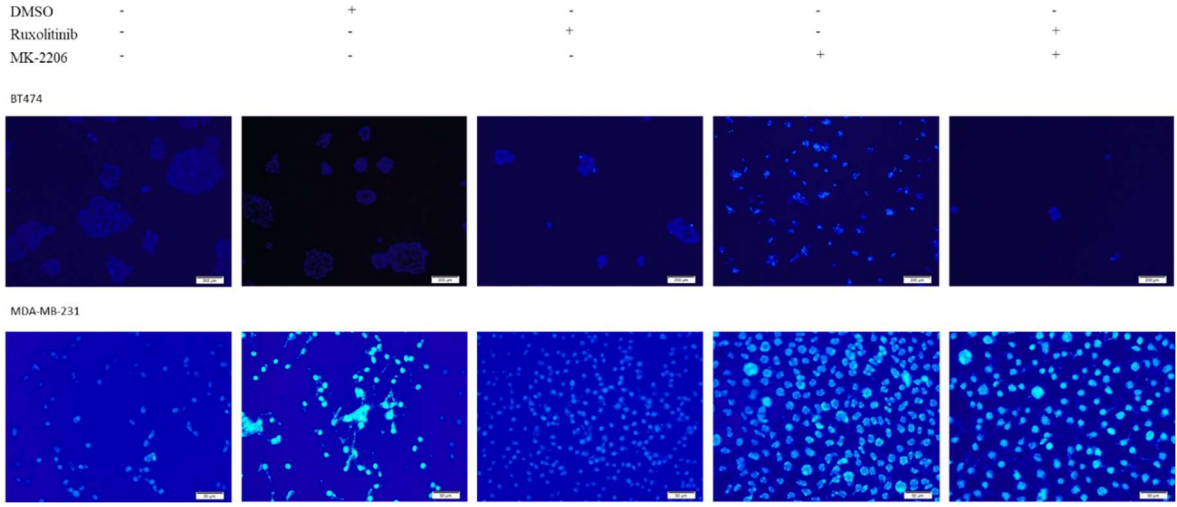
BT474 hücrelerinde hiçbir ilaç uygulanmayan kontrol ve DMSO uygulanan hücrelerde DNA fragmentasyonu görülmemiştir. Ruxolitinib tek başına ve MK-2206 ile kombine uygulandığında bir miktar DNA fragmentasyonu görülmüştür. MK-2206 uygulanan hücrelerde DNA fragmentasyonun arttığı görülmüştür (Şekil 4.28 A).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise hiçbir ilaç uygulanmayan kontrol ve DMSO uygulanan hücrelerde DNA fragmentasyonu görülmemiştir. MK-2206 uygulaması ve Ruxolitinib ile kombine uygulanması sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde DNA fragmentasyonun arttığı görülmüştür (Şekil 4.28 A).

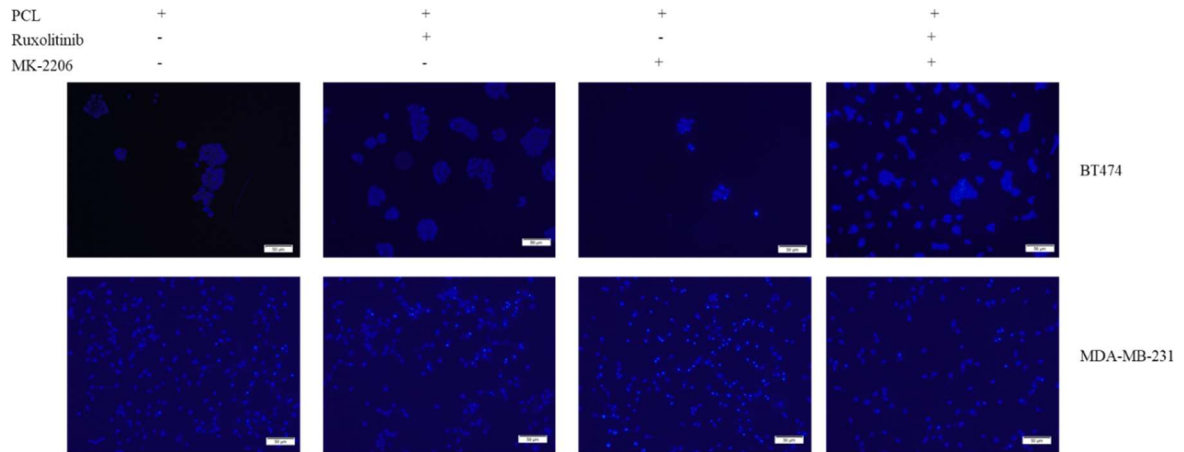
BT474 hücrelerinde PCL-NP hücrelerde DNA fragmentasyonu görülmemiştir. Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulanan hücelere oranla daha fazla DNA kırığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ise DNA fragmentasyonunda azalma görülmüştür (Şekil 4.28 B).

PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmemiştir. MK-PCL-NP uygulanan hücrelerde Rux-PCL-NP uygulanan hücelere oranla da fazla oranda DNA kırığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ise DNA fragmentasyonunda BT474 hücrelerindeki benzer şekilde azalma görülmüştür (Şekil 4.28 B).

A



B



Şekil 4. 28. Ruxolitinib Ve MK-2206 Tarafından (A) Ve PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP (B) Tarafından Tetiklenen DNA Kırıklarının BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Belirlenmesi.

4.3.4.2. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İmmunblotlama Tekniği ile İncelenmesi

BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının tetiklediği apoptotik hücre ölümü yolağı üzerine etkisini protein seviyesinde

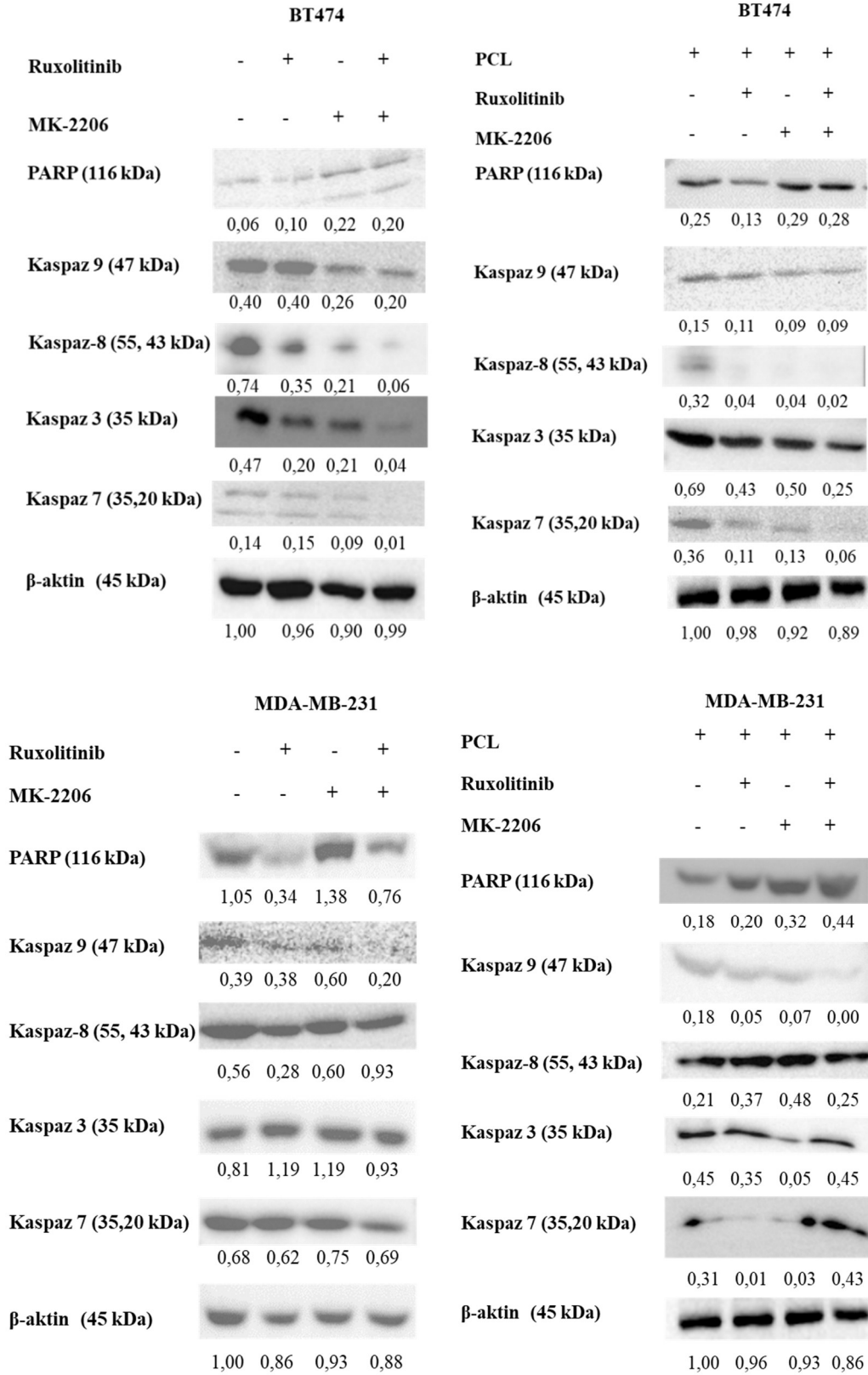
inceleyebilmek için apoptotik yolda görev alan proteinlerin ifadelerindeki değişiklikler immunblotlama tekniği ile incelenmiştir (Şekil 4.29).

BT474 hücrelerinde tek başına Ruxolitinib uygulaması sonucunda PARP, Kaspaz-8, Kaspaz-7 ve Kaspaz-3 ifadesinin azaldığı, Kaspaz-9 ifadesinde değişiklik olmadığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde tek başına MK-2206 uygulaması sonucunda PARP cleaved arttığı, Kaspaz-9, Kaspaz-8, Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 ifadesinin azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinin Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonu ile muamele edilmesi sonucunda apoptoz belirteci olan PARP ifadesinde artma görülürken, Kaspaz-9, Kaspaz-8, Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 ifadesinde anlamlı bir şekilde azalma saptanmıştır (Şekil 4.29).

MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib'in tek başına uygulamasının PARP ve Kaspaz-9 ifadesini azalttığı görülmüştür. MK-2206'nın tek başına uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde PARP ifadesini arttırdığı, Kaspaz-9 ifadesini azalttığı, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 ifadesinde ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin Ruxolitinib+MK-2206'nın kombine uygulaması ile PARP, Kaspaz-9, Kaspaz-8 ve Kaspaz-7 ifadesinin azaldığı, Kaspaz-3 ifadesinde ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.29).

BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulaması sonucunda PARP, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 ifadesinin azaldığı, Kaspaz-9 ve Kaspaz-8 ifadesinde değişiklik olmadığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulaması sonucunda PARP ifadesinin arttığı, Kaspaz-8 ve Kaspaz-7 ifadesinin azaldığı, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 ifadesinde değişiklik olmadığı görülmüştür. BT474 hücrelerinin Rux/MK-PCL-NP ile muamele edilmesi sonucunda apoptoz belirteci olan PARP ifadesinde artma, Kaspaz-9, -8, -7 ve -3 ifadesinde azalma görülmüştür (Şekil 4.29).

MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulamasının PARP ve Kaspaz-8 ifadesini arttırdığı görülmüştür MK-PCL-NP uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde PARP ve Kaspaz-8 ifadesini arttırdığı, Kaspaz-9, -7 -3 ifadesini azalttığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinin Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile PARP ifadesinin arttığı, Kaspaz-9, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 ifadesinin azaldığı, Kaspaz-7 ifadesinin ise arttığı görülmüştür (Şekil 4.29).



Şekil 4. 29. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Uygulaması Sonucundaki Apoptotik Değişimlerin BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.

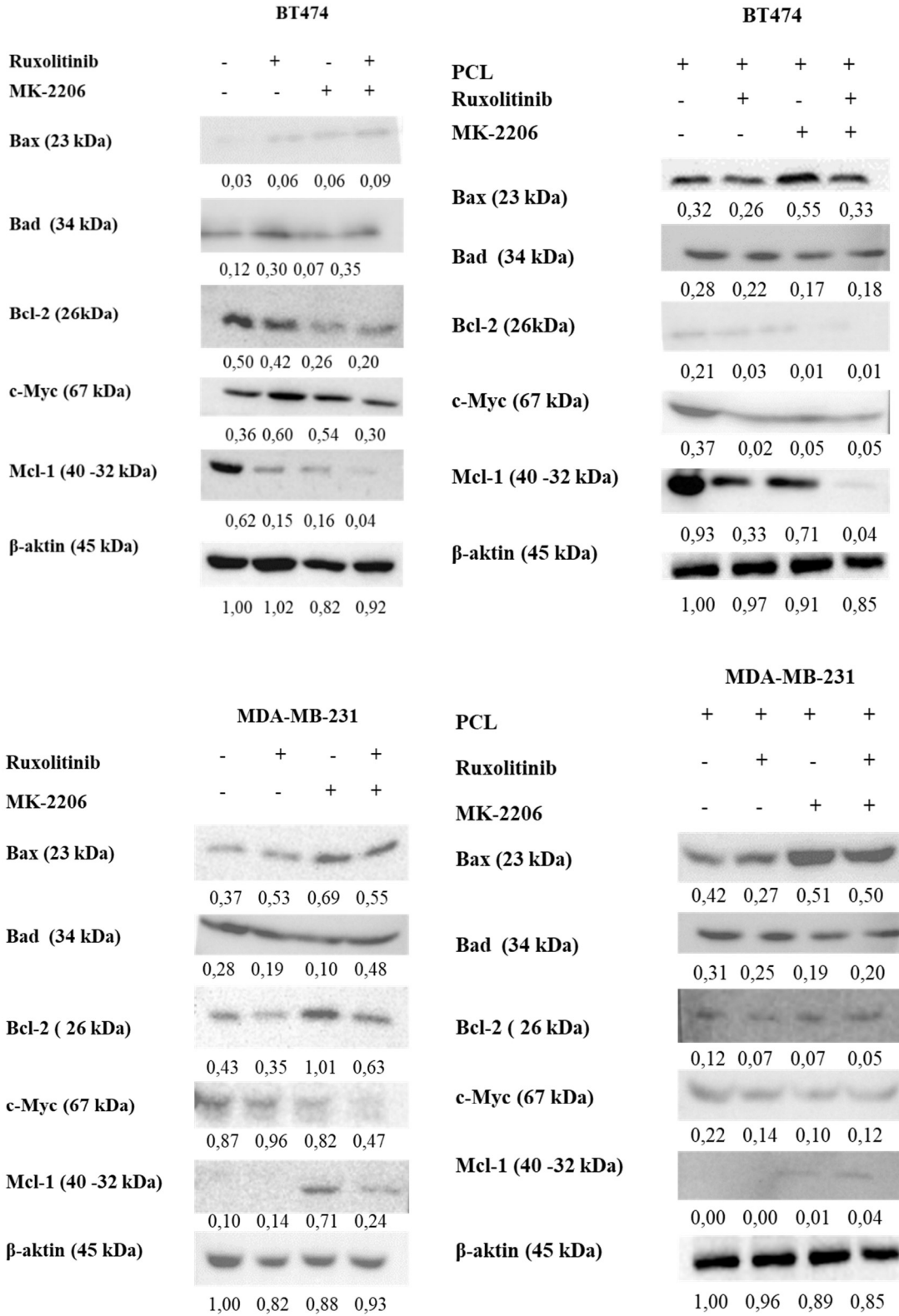
Apoptozun düzenlenmesinde düzenlenmesinde pro- ve anti- apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge önemli bir role sahiptir. BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin apoptotik yolaktaki etkilerinin tam olarak belirlenmesi için pro- ve anti- apoptotik protein ifadelerindeki değişimler araştırılmıştır (Şekil 4.30).

BT474 hücrelerinde Ruxolitinib'in tek başına uygulaması ile Pro-apoptotik Bcl-2 ailesine ait olan Bax proteininin ifadesinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaldığı, pro-apoptotik Bad ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı, c-Myc ifadesinin arttığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde MK-2206'nın tek başına uygulaması ile pro-apoptotik Bax ifadesinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaldığı, c-Myc ifadesinin arttığı, Bad ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulaması ile pro-apoptotik Bax ifadesinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ifadesinin azaldığı, anti-apoptotik Mcl-1 ifadesinin neredeyse tamamen yok olduğu, c-Myc ifadesinin azaldığı, Bad ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.30).

MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib'in tek başına uygulaması ile anti-apoptotik Bax ve Bad ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaldığı, c-Myc ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde MK-2206'nın tek başına uygulamasının pro-apoptotik Bax ifadesini arttırdığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 protein ifadelerini arttırdığı, c-Myc ifadesini azalttığı, pro-apoptotik Bad ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulamasının sonucunda pro-apoptotik Bax ifadesini arttırdığı, anti-apoptotik Mcl-1 ifadesinin azaldığı fakat anti-apoptotik Bcl-2 ifadesinde değişiklik olmadığı, c-Myc ifadesinin yok denecek kadar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.30).

BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulaması ile Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaldığı, Bad, Bax ve c-Myc ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulaması ile pro-apoptotik Bax ifadesinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaldığı, c-Myc ve Bad ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin neredeyse tamamen yok olduğu, c-Myc ifadesinin azaldığı, Bad ve Bax ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.30).

MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP uygulaması ile anti-apoptotik Bax ifadesinin arttığı, Bad ifadesinde değişiklik olmadığı, anti-apoptotik Bcl-2 ifadesinin azaldığı, Mcl-1 ifadesinin olmadığı, c-Myc ifadesinin azaldığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulamasının pro-apoptotik Bax ifadesini arttırdığı, Bad ifadesini azalttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 protein ifadelerini arttırdığı, c-Myc ifadesini azalttığı gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde Rux/MK-PCL-NP uygulamasının sonucunda pro-apoptotik Bax ifadesini arttırdığı, anti-apoptotik Mcl-1 ve Bcl-2 ifadesinin arttığı, c-Myc ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.30).



Şekil 4. 30. Apoptotik Hücre Ölüm Yolağının Tetiklenmesinde Önemli Bir Rolü Olan Pro- Ve Anti- Apoptotik Bcl-2 Ailesi Üyelerinde Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Uygulaması Sonucundaki Değişimlerinin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.

4.4. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Sağkalım Yolakları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

4.4.1. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında MAPK Sinyal Yolaklarındaki Etkilerinin İmmunblotlama Yöntemi ile Belirlenmesi

BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde MAPK hücre sağkalım sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için bu yolak ile ilişkili proteinlere immunblotlama ile bakılmıştır (Şekil 4.31).

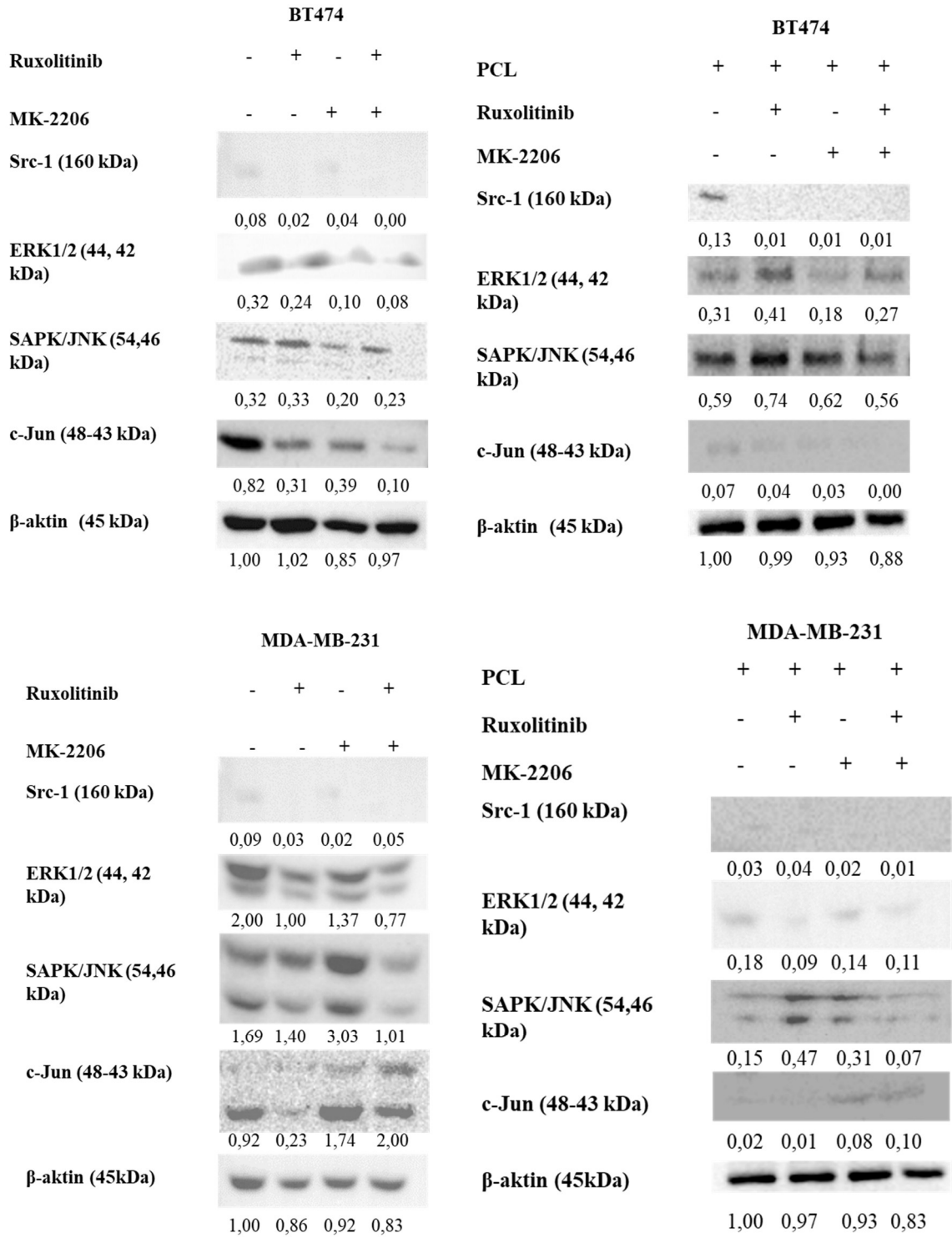
BT474 hücrelerinde sadece Ruxolitinib uygulamasıyla Src-1, c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde sadece MK-2206 uygulamasıyla Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde Ruxolitinib+MK-2206'nın birlikte uygulanmasıyla Src-1 ifadesinin yok denecek kadar azaldığı, ERK1/2 ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.31).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise tek başına Ruxolitinib uygulandığında Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise tek başına MK-2206 uygulandığında Src-1 ve c-Jun ifadesinin azaldığı, ERK1/2 ve SAPK/JNK ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib ve MK-2206 kombine uygulandığında Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ifadesinin azaldığı, c-Jun ifadesinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.31).

BT474 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP uygulamasıyla c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulamasıyla ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulanmasıyla SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.31).

MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP uygulandığında ERK1/2 ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulandığında c-Jun ifadesinin arttığı, ERK1/2 ve SAPK/JNK ifadesinin arttığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ERK1/2,

SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.31).



Şekil 4. 31. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Uygulamasının MAPK Sinyal Yolağı Üzerine Etkilerinin İmmunoblotlama Yöntemi İle MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.

4.4.2. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında PI3K/AKT Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

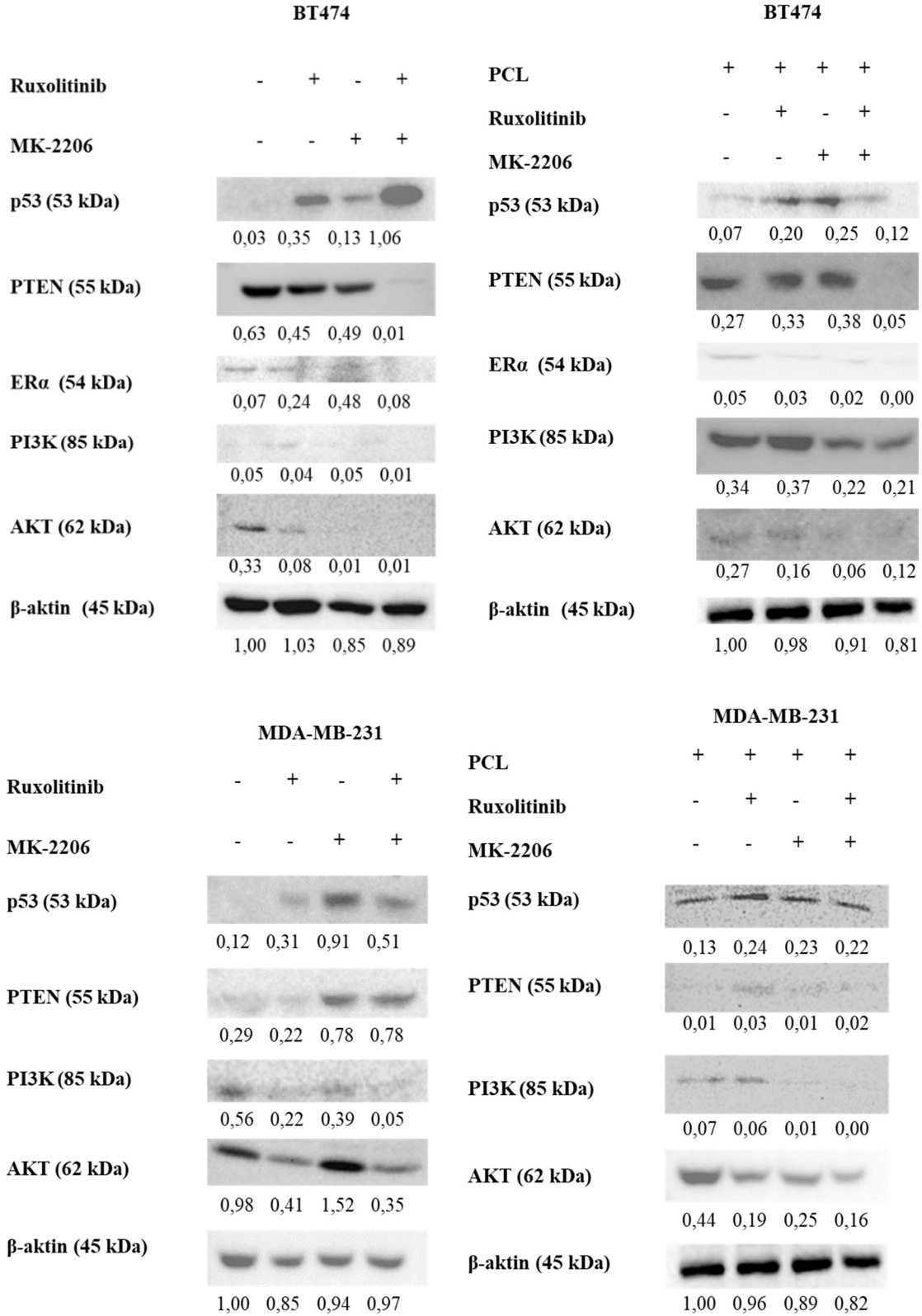
BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin hücre sağkalım yolağı olan PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için bu yolak ile ilişkili proteinlerin ifadesindeki değişiklikler immunblotlama yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.32).

BT474 hücrelerinde tek başına Ruxolitinib uygulandığında P53 ifadesinin arttığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı, PTEN ifadesinin bir miktar azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde tek başına MK-2206 uygulandığında P53 ifadesinin arttığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin yok denecek kadar azaldığı, PTEN ifadesinin bir miktar azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 kombine uygulandığında P53 ifadesinin arttığı, ER α , PTEN, PI3K ve Akt ifadesinin yok olduğu görülmüştür (Şekil 4.32).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib tek başına uygulandığında P53 ifadesinin arttığı, PTEN ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı, PI3K ve Akt ifadelerinin azaldığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise MK-2206 tek başına uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ifadesinin azaldığı, Akt ifadesinin arttığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulaması ile P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.32).

BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin azaldığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin bir miktar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.32).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise Rux-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ve Akt ifadelerinin bir miktar azaldığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ifadesinin yok denecek kadar azaldığı ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.32).



Şekil 4. 32. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin PI3K/AKT Hücre Sağkalım Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin İmmunoblotlama Yöntemi İle MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.

4.4.3. Ruxolitinib ve MK-2206 Saf Maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP Nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında JAK/STAT Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

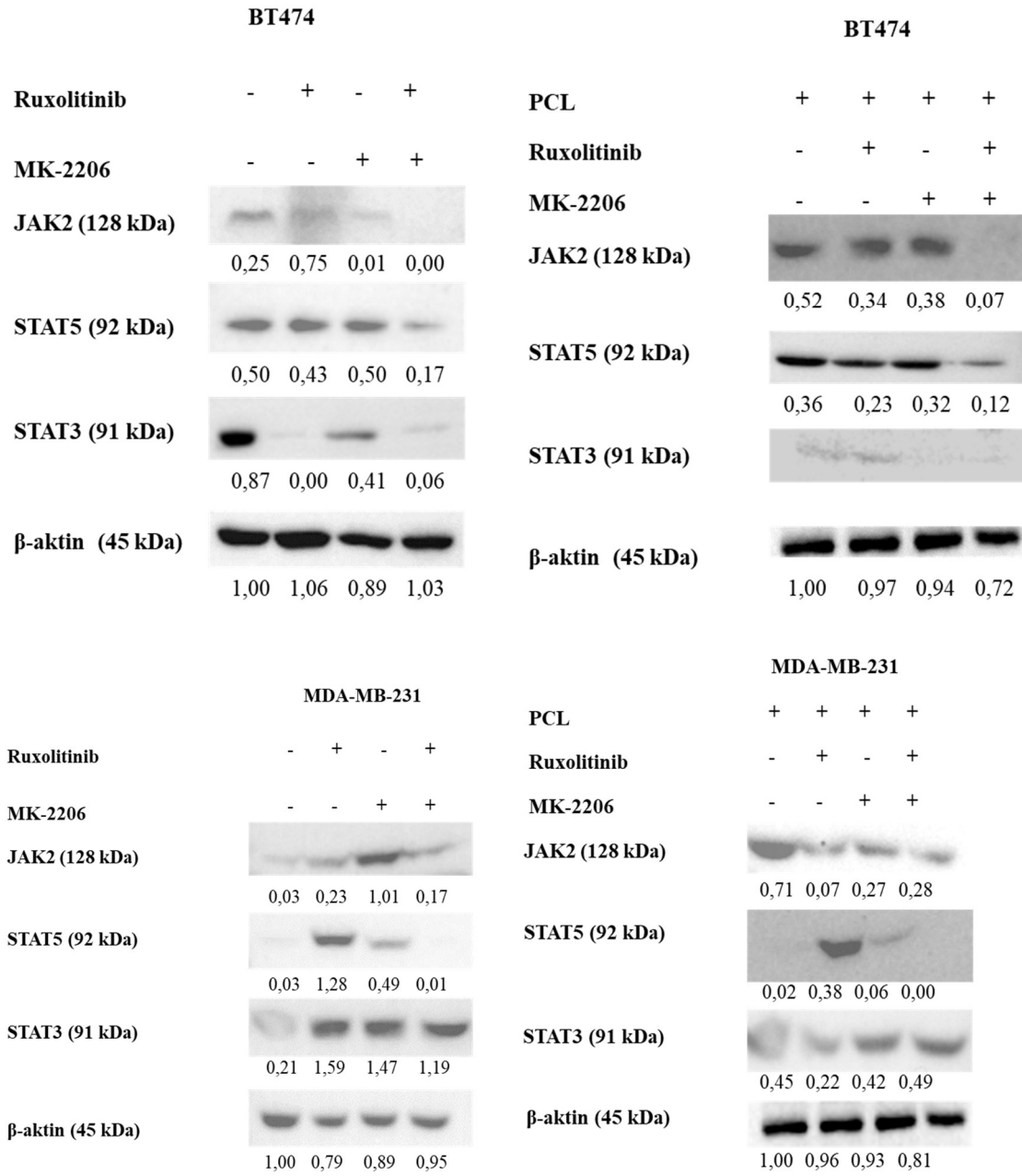
BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 saf maddelerinin, Ruxolitinib+MK-2206, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin hücre sağkalım yolağı olan JAK/STAT sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için bu yolak ile ilişkili proteinlerin ifadesindeki değişiklikler immunblotlama yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.33).

BT474 hücrelerinde Ruxolitinib'in tek başına uygulamasıyla JAK2 ve STAT3 ifadesinin azaldığı, STAT5 ifadesinin değişmediği görülmüştür. BT474 hücrelerinde MK-2206'nın tek başına uygulaması ile JAK2 ifadesinin bir miktar daha azaldığı, STAT3 ifadesinin azaldığı, STAT5 ifadesinin değişmediği görülmüştür. BT474 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206'nın birlikte uygulaması ile JAK2 ifadesinin yok olduğu, STAT3 ifadesinin yok denecek kadar azaldığı, STAT5 ifadesinin bir miktar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.33).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise tek başına Ruxolitinib uygulamasıyla JAK2 ve STAT5 ifadesinin arttığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise tek başına MK-2206 uygulamasıyla JAK2 ifadesinin daha da arttığı, STAT5 ifadesinin azaldığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulamasıyla JAK2 ifadesinin azaldığı ve STAT5 ifadesinin yok olduğu görülmüştür (Şekil 4.33).

BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulamasıyla STAT3 ifadesinin azaldığı, JAK2 ve STAT5 ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulaması ile STAT3 ifadesinin azaldığı, JAK2 ve STAT5 ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile JAK2 ve STAT3 ifadesinin yok olduğu, STAT5 ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.33).

MDA-MB-231 hücrelerinde ise Rux-PCL-NP uygulamasıyla JAK2, STAT5 ve STAT3 ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulamasıyla JAK2 ve STAT5 ifadesinin azaldığı, STAT3 ifadesinin arttığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulamasıyla JAK2 ve STAT3 ifadesinin arttığı, STAT5 ifadesinin yok olduğu görülmüştür (Şekil 4.33).



Şekil 4. 33. Ruxolitinib, MK-2206, Ruxolitinib+MK-2206, PCL, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin JAK/STAT Hücre Sağkalım Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin İmmunoblotlama Yöntemi İle MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında İncelenmesi.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bu çalışmada BT474 (ER+, PR+, HER2+) ve MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-) meme kanseri hücre hatlarında Ruxolitinibin MK-2206 ile kombine etkileri ve Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206'nın sitotoksik ve hücre proliferasyonunu inhibe edici etkileri ilk kez incelenmiştir.

Bu çalışmada;

- Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 saf maddeleri uygulanan BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen sonuçlarda JAK2 inhibitörü Ruxolitinib, AKT inhibitörü MK-2206 ile sinerjistik bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak, Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulaması ilaçların tek kullanımına kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur.
- Ruxolitinib+MK-2206 uygulamasının BT474 hücrelerinde;
 - DNA fragmentasyonu arttırarak, anti-apoptotik Mcl-1 ve Bcl-2 ifadelerinin azalması, c-Myc ifadesinin azalması ve pro-apoptotik Bax ifadesinin artması ile apoptozu uyurabileceğini,
 - Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ifadesinin azalması ile hücre ölümünü engelleyebileceğini,
 - Ruxolitinib ve MK-2206'nın birlikte uygulanması ile JAK2 ifadesinin ve STAT3 ifadesinin azaltarak JAK/STAT sinyal yolağını inhibe edebileceğini düşünmekteyiz.
- Ruxolitinib+MK-2206 uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde;
 - BT474 hücrelerindeki benzer şekilde DNA fragmentasyonun arttırdığı, anti-apoptotik Bcl-2 ifadesinin azalması, c-Myc ifadesinin azalması, pro-apoptotik Bax ifadesinin artması ile apoptozu apoptozun uyarılmasında farklı Bcl-2 ailesi üyelerinin etkili olabileceğini,
 - Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun inaktivasyonunun sağlanarak hücre çoğalmasını engellediğini,
 - JAK2 ifadesinin ve STAT5 ifadesinin azaltarak farklı STAT'ları aktive ederek JAK/STAT sinyal yolağını inhibe ederek apoptozun uyarılmasında önemli bir role sahip olabileceğini düşünmekteyiz.
- Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulaması ilaçların tek kullanımına kıyasla her iki hücre hattında da daha etkili olduğu söylenebilir.

Bu çalışmanın ikinci aşamasında Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller ilk kez sentezlenip hücrelere uygulanarak, ilaçların nanoformlarının BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde JAK/STAT, PI3K/AKT ve MAPK sinyal yolları ve apoptoz üzerindeki etkilerinin ilaçların serbest halleri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Ruxolitinib ve MK-2206'nın nanoformlarının sentezlenerek, Ruxolitinib ve MK-2206'nın serbest formlarının hücrede yarattığı toksisitenin en aza indirilebilmesi ve ilaçların konsantrasyonlarının daha etkili bir şekilde hücreye ulaşmasının sağlanabilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada;

- Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 ile yüklenen PCL nanopartiküllerin ortalama boyutlarının uygun olduğu bulunmuştur.
- Rux-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin zeta potansiyelinin pozitif değerde olmasının NP'lerin hücre içine alınımını artırabileceği bulunmuştur.
- Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin PDI değerlerinin 0'a yakın olduğu ve sentezlenen nanopartiküllerin homojen olduğu bulunmuştur.
- Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206'nın PCL ile enkapsüle olduğu ve ilaçlarla PCL arasında kimyasal uyumsuzluk olmadığı bulunmuştur.
- Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyon etken maddelerinin PCL nanopartiküllerden kontrollü bir şekilde salınımının gerçekleşebileceği gözlenmiştir.
- PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinde;
 - PCL-NP'nin herhangi bir toksik etkisi olmadığı ve hücrelerin proliferasyonunu engellemediği gözlenmiştir.
 - Ruxolitinib'in IC_{50} değerinin $50 \mu M$ 'dan Ruxolitinib'in nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC_{50} değerinin $0,3267 \mu M$ 'a düştüğü bulunmuştur.
 - MK-2206'nın IC_{50} değerinin $7 \mu M$ 'dan MK-2206'in nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC_{50} değerinin $0,208 \mu M$ 'a düştüğü bulunmuştur.
 - Ruxolitinib+MK-2206'nın IC_{50} değerinin $55 \mu M$ 'dan Ruxolitinib+MK-2206'nın nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC_{50} değerinin $451 \mu M$ olarak değiştiği ve anlamlı sonuç elde edilememiştir.
 - Rux-PCL-NP uygulamasının koloni oluşumunu engellemede MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanmasına oranla daha etkili olduğu görülmüştür.
 - Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonunda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde benzer oranlarda azalma görülmüştür.

- MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonunda 96. saatte azalma görülmüştür.
- Rux/MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonunda 72 ve 96. saatte belirgin bir azalma görülmüştür.
- PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinde 96. Saatin sonunda açılan yara genişliğini kapatamadığı bulunmuştur.
- Rux-PCL-NP ve MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde de açılan yara genişliğinin kapatılamadığı görülmüştür.
- Rux/MK-PCL-NP uygulanan BT474 96. saatin sonunda hücrelerin öldüğü görülmüştür.
- Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde apoptozu uyarmada MK-PCL-NP uygulamasına oranla daha etkili olduğu görülmüştür.
- MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinde apoptozun ekstrasik yolağını uyardığı görülmüştür.
- BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile pro-apoptotik Bax ifadesinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaltarak hücre ölümünü uyardığı görülmüştür.
- BT474 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP MAPK sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği görülmüştür.
- BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP ve MK-PCL-NP uygulandığında PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği görülmüştür.
- BT474 hücrelerinde Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile JAK2/STAT3 yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği görülmüştür.
- PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde;
 - PCL-NP'nin herhangi bir toksik etkisi gözlenmemiştir.
 - Ruxolitinib'in nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.
 - MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 7.5 µM'dan MK-2206' in nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 2,08 µM'a düştüğü gözlemlenmiştir.
 - Ruxolitinib+MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 23 µM'dan Ruxolitinib+MK-2206'nın nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 2,684 µM'a düştüğü saptanmıştır.

- Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumunun benzer oranlarda engellendiği görülmüştür.
- Rux-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 96. saatte azalma saptanmıştır.
- MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda 96. saatte azalma görülmüştür.
- Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde BT474 hücrelerindeki gibi belirgin bir şekilde azalma saptanmamıştır.
- PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde açılan yara genişliğinin 96. Saatin sonunda kapandığı görülmüştür. Rux-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 96. Saatte açılan yara genişliğinin kapandığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde açılan yara genişliğinin 96. saatte kapanmadığı görülmüştür.
- Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu uyardığı görülmüştür.
- MK-PCL-NP uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozun intrinsik yolağını uyardığı, Rux/MK-PCL-NP uygulamasının ise apoptozun ekstrinsik yolağını uyardığı görülmüştür.
- MDA-MB-231 hücrelerinde MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının pro-apoptotik Bax ifadesinin artması, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 protein ifadelerinin artması, c-Myc ifadesini azalması ile apoptozu uyarabileceği gözlenmiştir.
- MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azalması ile MAPK sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engelleyebileceği gözlenmiştir.
- MDA-MB-231 hücrelerinde ise Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ve Akt ifadelerinin bir miktar azaltarak PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği gözlenmiştir.
- MDA-MB-231 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulamasıyla JAK2 ve STAT5 ifadesinin azaltarak JAK2/STAT5 sinyal yolağını inhibe edebileceği gözlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalar doğrultusunda, meme kanseri hücre hatlarına uygulanan JAK1/2 ve Akt inhibitörleri aracılığı ile PI3K/AKT, JAK/STAT ve MAPK sinyal yollarını inhibe edilerek hücre proliferasyonunun engellenmesinin ve apoptozun aktif hale gelmesinin gerçekleştiği düşünülmektedir. Ruxolitinib ve MK-2206 uygun nanopartikülle kaplanarak ilaçların etkinliği artırılabilir. Ruxolitinib ve MK-2206 kombine uygulaması ile PI3K/AKT ve JAK/STAT sinyal yollarındaki disregülasyon inhibe edilerek meme kanseri hastalarında terapötik bir yaklaşım olarak kullanılabilir.

5.2. Tartışma

5.2.1. Ruxolitinib, MK-2206 Ve Ruxolitinib+MK-2206 Saf Maddesi Uygulanan BT474 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tümörlü bir hücre, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, kaspaz aktivitesinin azalması ve ölüm reseptör sinyallerinin bozulması sonucunda apoptoz oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir (Igney & Krammer, 2002: 277). Kanser hücrelerinde, sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlar, çoğalma ve sağkalım kontrolünün kaybına sebep olur (Khanna vd., 2018: 1).

Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkogenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi hücrel olayları hızlandırmaktadır. RTKlar, PI3K/AKT, JAK/STAT ve MAPK gibi sinyal yollarını düzenler. Bu yolların kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasında, anjiyogenez ve metastazın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. JAK2'ye spesifik inhibitörler, STAT, PI3K/AKT ve MAPK yollarını inhibe eden ajanlarla kombine olarak kullanılması, JAK sinyalinin disregülasyonunun neden olduğu malignansilerde kritik bir kombine terapi olarak kullanılabilir. PI3K/AKT sinyal yolağının inhibe edilerek, hücre sağkalımının azaltılması ve hücre ölümünün uyarılması son zamanlarda yapılan çalışmalarda kullanılan kemoterapötik yaklaşımlardandır (Godone vd., 2018: 30).

Opzelura (Ruxolitinib), Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımı onaylanan ilk ve tek topikal Janus kinaz (JAK) inhibitörüdür. Ruxolitinib'in oral formülasyonu ilk olarak 2011 yılında Jakafi markası altında miyelofibrozis, polisitemi vera ve graft-versus-host hastalığını tedavi etmek için ABD Gıda ve İlaç İdaresi ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Mascarenhas ve Hoffman, 2012: 3009). MK-2206, şu anda farklı kanser türlerine karşı sitotoksitenin incelendiği klinik deneylerin faz II aşamasında olduğu, AKT'ın zara taşınmasını ve aktivasyonunu bloke eden PH ve kinaz alanlarına bağlanan güçlü bir allosterik AKT inhibitörüdür (Stover vd., 2022: 2; Kim vd., 2016: 5; Li vd., 2019: 2). Bu çalışmada JAK1/2 inhibitörü Ruxolitinib ve AKT inhibitörü MK-2206 kombine kullanılarak BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT ve apoptoz üzerine etkilerinin ER ile ilişkisi ilk kez incelenmiştir.

Schneider vd. 2022 yılında yaptıkları çalışmada, Ruxolitinib ve Calcitriol'ün hem ayrı ayrı hem de kombine olarak MCF-7, SKBR3 ve MDA-MB-468'de antiproliferatif etkisini BrdU testi kullanılarak incelenmiştir (Schneider vd., 2022: 2). Ruxolitinib'in MCF-7, SKBR3 ve

MDAMB-468 hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığını ve Ruxolitinibin IC₅₀ değerlerinin MCF-7'de 30,42 µM, SKBR3'te 13,94 µM ve MDA-MB-468 hücrelerinde 10.87 µM olduğunu gösterilmiştir (Schneider vd., 2022: 2). Savaee ve ark. PC-3 hücrelerinde 10 µM MK-2206'nın hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Savaee vd., 2022: 160). Bu çalışmada ise BT474 hücrelerinde uygun Ruxolitinib (Şekil 4.17 A) ve MK-2206 (Şekil 4.18 A) IC₅₀ değerleri sırasıyla 50 µM ve 7 µM, kombine doz konsantrasyonları 55 µM (Şekil 4.19 A) (CI=0.92) olarak saptanırken, MDA-MB-231 hücre hatlarında sırasıyla 22.5 µM Ruxolitinib (Şekil 4.17 A) ve 7.5 µM MK-2206 (Şekil 4.18 A), kombine doz konsantrasyonları 23 µM (Şekil 4.19 B) (CI=0.95) olarak bulunmuştur. Şekil 4.13 A, 4.14A, 4.15 A ve B'de gösterildiği gibi BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 uygulaması ile hücre canlılığının doza ve zamana bağlı azaldığı gösterilmiştir. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombine uygulamasının TPBC ve TNBC hücre hatlarında hücre canlılığının azalmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Tavalli ve ark., Ruxolitinib'in Lapatinib ile birlikte uygulanan SUM149 meme tümör dokularında, Ruxolitinib'in Lapatinib ile sinerjistik etki gösterdiğini koloni oluşum testi ile gösterilmiştir (Tavallai vd., 2016: 5). Schneider ve ark., Ruxolitinib ve Calcitriol kombine uygulamasının SKBR3 ve MDA-MB-468 hücrelerinin proliferasyonu sinerjistik olarak inhibe ettiği BrdU testi ile gösterilmiştir (SKBR3: CI 0.759–0.836, MDA-MB-468: CI 0.676–0.787) (Schneider vd., 2022: 1). Khan ve ark., MK-2206 ile tedavi edilen primer miyelofibrozis (PMF) hastalarından alınan periferik kan CD34+ hücrelerinde, doza bağımlı bir şekilde koloni oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Khan vd., 2013: 6). Ek olarak, araştırmacılar MK-2206'nın JAK2V617F-mutant SET2 hücrelerinin büyümesinin baskılanmasında Ruxolitinib ile sinerjistik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (CI < 1) (Khan vd., 2013: 1). Sim ve ark. 5 µM MK2206'nın HeLa hücrelerinde %30 oranında hücre migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Sim vd., 2021: 144). Li ve ark. MDA-MB-231 hücrelerinde (CI 0.21) MK-2206'nın WZB117 ile sinerjik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2019: 1). Bu sonuçlara benzer şekilde bu çalışmada BT474 hücrelerinde (CI 0.92) ve MDA-MB-231 hücrelerinde (CI 0.95) Ruxolitinib'in MK-2206 ile sinerjistik etki gösterdiği ve koloni oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Şekil 4.23 A ve B, Şekil 4.24 A ve B, Şekil 4.25 A ve B). Aynı zamanda Ruxolitinib'in MK-2206 ile kombine uygulamasının hücre migrasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Şekil 4.26 A ve B). Ruxolitinib'in MK-2206 ile kombine uygulamasının BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206'nın tek başına uygulandıklarındaki

antiproliferatif etkisinin sinerjistik olarak artması TPBC ve TNBC hücre hatlarının tedavisi için umut vaat edici olabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptoz bir seri olaylar zinciri tarafından düzenlenir (Çakır ve Eroglu, 2021: 1). Yapılan çalışmalarda, Ruxolitinib ve MK-2206'nın diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanser hücrelerinin büyümesini sinerjistik olarak apoptozu tetikleyerek engellediği gösterilmiştir ancak bu iki ilacın birbiriyle kombinasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Cheng vd., 2012: 1; Hirai vd., 2010: 1956; Lim vd., 2018: 5581). Mitokondri membran potansiyelinin kaybının, mitokondri çift zarı arasında bulunan Sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımını ve apoptozun mitokondriyal yolağını aktifleştirdiği ve kaspaz aktivasyonunu uyardığı bilinmektedir (Olson ve Kornbluth, 2005: 91). Proteaz kaspaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde önemli rol oynar. Bir sinyale yanıt olarak ilk aktive olan başlatıcı kaspazlar (Kaspaz -2, -8, -9 ve -10) ve apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren cellat kaspazlar (Kaspaz -3, -6 ve -7) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Birçok geleneksel kanser tedavisi, bu kaspazları dolaylı olarak devreye sokarak kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için apoptozu indükler (Boice ve Bouchier-Hayes, 2020: 9). BCL-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri, apoptozun düzenlenmesinde rol alırlar (Lim vd., 2018: 5581). BCL-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri olan BCL-2, MCL-1, BCL-W ve BCL-XL'nin aktivasyonundan dolayı birkaç kanser hücrelerinin kemoterapiye direncinin artmasına sebep olmaktadır (Kim vd., 2019: 3983). TNBC'ler gibi agresif birçok malignitede, MYC onkogeni aşırı ifade olmaktadır (Kim vd., 2019: 3982). Li ve ark. yaptıkları çalışmada 48 saat Ruxolitinib uygulamasının LS411N ve SW620 kolorektal kanser hücrelerinde cleaved Kaspaz -3, -8, -9 ve PARP ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Li vd., 2021: 4). Lim ve ark. yaptıkları çalışmada Ruxolitinib ve kalsitriolün MCF7-HER18 meme kanseri hücrelerinde sinerjistik etkisinin JAK2, fosforile JAK2, c-Myc, Bcl-2 ve Bcl-XL protein düzeylerinin azalması ve Kaspaz-3 ve Bad proteinlerinin ifadelerinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lim vd., 2018: 5581). Chen ve ark. yaptıkları çalışmada MK-2206'nın MLN4924 ile kombinasyonunun sinerjik olarak SK-BR3 ve MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Chen vd., 2018: 2069). MK-2206 ve MLN4924 kombine uygulamasının SK-BR3 ve MDA-MB-231 hücrelerinde FACS analizinde çok daha yüksek Annexin V+ popülasyon yüzdesi, apoptotik DNA fragmentasyonunun indüklendiği ve cleavedPARP ve Kaspaz 3 ifadesini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, MK-2206'nın MLN4924 ile birlikte AKT aktivasyonunun engellediği ve apoptozun uyarılmasında sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir (Chen vd., 2018: 2075). Bu çalışmada BT474 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulamasının anti-

apoptotik Mcl-1 ve Bcl-2 ifadelerini azalttığı, c-Myc ifadesinin azalttığı ve pro-apoptotik Bax ifadesinin arttırdığı, MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib ve MK2206 ile birlikte uygulanması sonucunda ise pro-apoptotik Bax ifadesi önemli ölçüde artarken, Kaspaz-9, Kaspaz-7, PARP, c-Myc ve Bcl-2 ifadesinin azalttığı bulunmuştur (Şekil 4.29). İlaç uygulanmayan ve DMSO uygulanan BT474 hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmezken, Ruxolitinib ve Ruxolitinib+MK-2206 uygulandığında bir miktar DNA fragmentasyonu görülürken, MK-2206 uygulanan hücrelerde DNA fragmentasyonun daha fazla oranda arttığı saptanmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise kontrol ve DMSO uygulanan hücrelerde DNA fragmentasyonu görülmezken, MK-2206 uygulaması ve Ruxolitinib+MK-2206'nın uygulanması ile apoptoz belirteci olan DNA fragmentasyonun (Xu vd., 2019: 5) arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.28 A). Elde edilen bulgulara göre, BT474 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 kombine uygulamasının Kaspaz -8, -7 ve -3 proteinlerinin ifadeleri azaltarak ekstrinsik apoptoz yolağının uyarılmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib ve MK-2206 kombinasyonunun Kaspaz-9 ve Kaspaz-7 proteinlerinin ifadesini azaltarak apoptozun intrinsik yolunu uyarılmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Her iki hücre hattında da Ruxolitinib ve MK-2206'nın tekli uygulamalarına oranla Ruxolitinib ve MK-2206'nın kombine uygulamasının apoptozun uyarılmasında daha etkili olduğu düşüncesindeyiz.

MAPK sinyal yolağı ERK ailesi, JNK ailesi ve p38-MAPK ailesinden oluşur ve memeli hücrelerinde sinyal iletim kaskatı oluşturarak gen ifadesi, hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Wada ve Penninger, 2004: 2838). Src kinaz ailesi GTP-bağlayıcı protein olan Ras ile birlikte MEK/ERK sinyal yolağının aktivasyonunda rol alan Raf ailesinin fosforilasyonunda görevlidir. Reseptör tirozin kinazlar ve G-protein bağlı reseptörler Ras'ı daha sonra Raf-MEK-MAPK yolağını uyararak aktive etmektedir (Avruch vd., 1994: 279). Proliferasyon ilişkili c-Jun transkripsiyonel aktivitesi SAPK/JNK aracılığıyla Ser63 ve Ser73'te fosforilasyon ile düzenlenir (Zaballos ve Santisteban, 2017: 45). Cao ve ark. yaptıkları bir çalışmada Ruxolitinib uygulamasının MAPK sinyal yolağını inhibe ederek PMN-MDSCs fonksiyonunu baskıladığı ve olgun miyeloid farklılaşmasını önlediği ex vivo deneylerle gösterilmiştir. Ayrıca STAT5 inhibisyonu ile MDSCs birikiminin uyarıldığı gösterilmiştir. Ruxolitinib'in JAK/STAT ve ROS-MAPK/NF- κ B sinyal yolları aracılığıyla PMN-MDSCs fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (Cao vd., 2023: 1). Brkic ve ark. yaptıkları çalışmada JAK2 ve ERK1/2'nin Ruxolitinib ve ERK inhibitörleri aracılığıyla birlikte inhibisyonunun Jak2V617F hücrelerinin proliferasyonunu

azalttığı gösterilmiştir (Brkic vd., 2021: 2875). Bu çalışmada BT474 hücrelerinde Ruxolitinib+MK-2206 uygulaması ile Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ifadesinin azalması ile, Ruxolitinib+MK-2206 uygulaması ile MDA-MB-231 hücrelerinde ise Src-1, ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun inaktivasyonunun sağlanarak hücre çoğalmasını engelleyebileceğini ve hücre ölümünü uyarabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 4.31).

PI3K/AKT sinyali genellikle meme kanserlerinde aktive olur ve tümör oluşumu, apoptoz ve otofajide önemli bir role sahiptir (Vagia vd., 2020: 15). Büyüme faktörlerinin etkisiyle membrandaki ER α , PI3K, AKT, mTOR gibi sitoplazmik kinazları aktive ederek hücre sağkalımını sağlamaktadır (Bader vd., 2005: 921). PTEN, bir tümör baskılayıcı ve PI3K/AKT sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olarak işlev görür. Birçok kanserde, PTEN ile inaktive hale gelerek PI3K sinyalinin upregülasyonu gerçekleşir. Ek olarak, PI3K'nın düzenleyici bir alt birimi olan P85'teki mutasyonlar insanda tümörlerinde tanımlanmıştır (Thorpe vd., 2017: 7095). PTEN ve P53 birbiriyle sıkı bir şekilde ilişkisi bulunmaktadır ve ikisi birlikte hücre proliferasyonunu ve apoptozu birlikte düzenlerler ve aktivasyonları birbirine bağlıdır (Blanco-Aparicio vd., 2007: 1381). Ayrıca PTEN ve P53 PI3K/AKT Sinyal Yolağı ile ilişkili tümör supressör genlerdir. P53 ve c-MYC transkripsiyonel regülatör aktiviteleri PI3K/AKT yolu tarafından etkilenmektedir. Bu proteinlerin hepsi, onkogenik transformasyonla ilişkilidir, ancak rolleri PI3K aracılı onkogenez sırasındaki rolleri hala tam olarak bilinmemektedir. AKT fosforilasyonu P53 aktivitesini baskılar ve c-Myc'in aktivitesi artırır. AKT ve PI3K tümör progresyonunda transkripsiyonel düzenleyici olarak önemli rol oynamaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda pro-apoptotik proteinlerin Kaspaz-9 fosforilasyonunu uyarılmasının ve AKT inaktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Bader vd., 2005: 925). Karagianni ve ark. yaptıkları çalışmada MyLa Cutaneous T-Cell Lenfoma (CTCL) hücrelerinde 24 saat Ruxolitinib uygulamasının p-AKT seviyelerini azalttığı ve 48 saat uygulama sonucunda ise p-STAT3'ü önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Karagianni vd., 2021: 7). Sim ve ark. yaptıkları çalışmada 24 saat 5 μ M MK-2206 uygulamasının HeLa hücrelerinde total AKT ifadesinde değişiklik olmazken fosfo-AKT (Ser473-Thr308) ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (Sim vd., 2021: 144). Savaee ve ark. yaptıkları çalışmada MK-2206 ile salinomisin kombine uygulamasının, toplam AKT ifadesini azaltarak kanser hücrelerinin apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir (Savaee vd., 2022: 1). Hirai ve ark. yaptıkları çalışmada MK-2206'nın antimetabolitler, topoizomeraz inhibitörleri, DNA çapraz bağlayıcıları ve anti-mikrotübül ajanları gibi sitotoksik ilaçlarla birlikte uygulamasının A2780 ovaryum ve NCI-H460 akciğer tümör hücrelerinde AKT yolağını sinerjik olarak baskıladığı gösterilmiştir (Hirai vd., 2010:

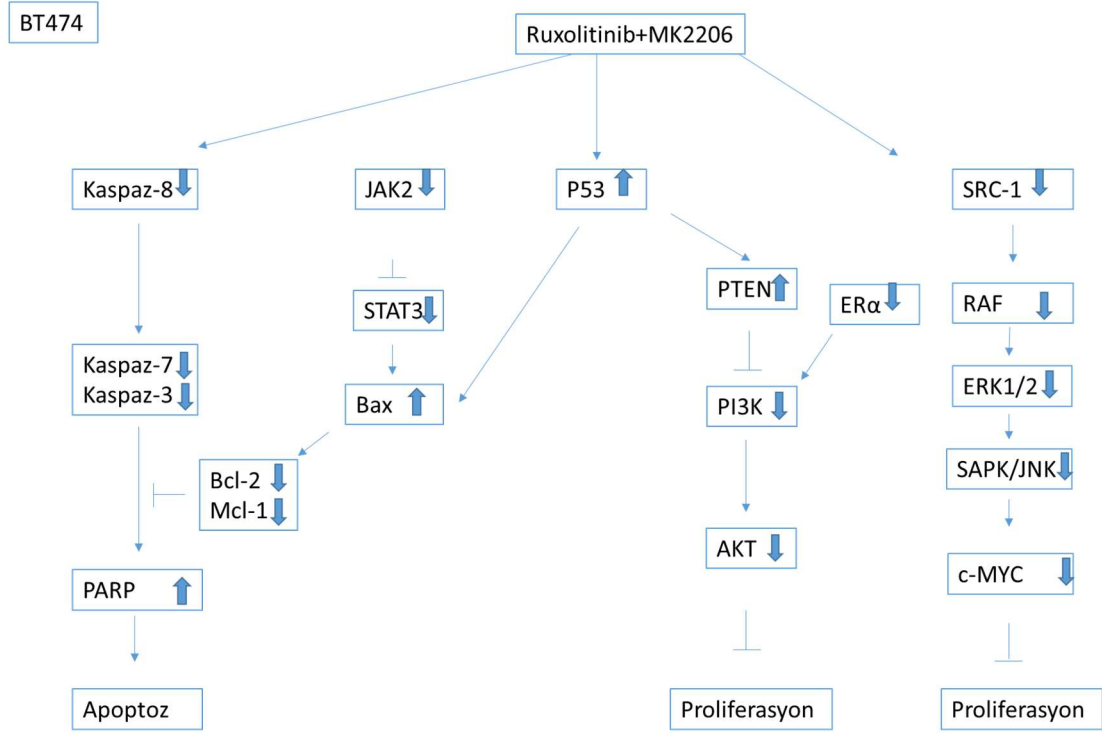
1956). Stottrup ve ark. 2016'da yaptıkları bir çalışmada, PI3K/AKT sinyal yolağının hiperaktivasyonunun insanda malignansilere yol açtığı, pekçok PI3K ve Akt inhibitörlerinin mekanizmasının tam olarak anlaşılamadığı belirtilmiştir. Akt inhibitörlerinin hücrelerdeki direnç üzerine mekanizmalarını aydınlatılmaya çalışılmıştır. T47D, HEK293T ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında AKT inhibitör dirençli hücrelerin AKT3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. AKT3 susturulduğunda ise dirençli hücrelerin Akt inhibitörü MK2206'ya dirençli hale geldiği, epitelyal belirteçlerin tekrar eksprese edildiği ve AKT3 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. AKT3'ün terapötik hedef olarak geliştirebileceğini gösterilmiştir (Stottrup vd., 2016: 1). Tao ve ark. (2016) yaptığı bir çalışmada, Akt inhibitörü MK-2206 ve cisplatinin kombine uygulaması ile AGS gastrik kanser hücre hattında Akt fosforilasyonunun arttığını fakat MKN-45 ve MGC-803 hücrelerinin Akt aktivasyonunun sınırlı olduğu gösterilmiştir. MK-2206 ve cisplatinin sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur. İlaçların tekli uygulamasına oranla kombine uygulamanın daha fazla oranda apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Tao vd., 2016: 365). Khan ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada, BCR-ABL1 negatif myeloproliferatif neoplazmlar (MPN) hücrelerinde MK-2206'nın potansiyel allosterik AKT inhibitörü olabileceğini, solid tümörlerde PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe edebildiği gösterilmiştir. MK-2206 ve Ruxolitinib'in sinerjistik etki gösterdiği, JAK2V617F mutant SET2 hücrelerinde büyümeyi engellediği gösterilmiştir (Khan vd., 2013: 1882). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, Ruxolitinib ve MK-2206'nın birlikte uygulamasının, ER reseptör pozitif meme kanseri hücrelerinde (BT474 hücreleri) ER α ifadesinin azalmasını, PI3K ve AKT ifadesini belirgin şekilde azaltarak hücre sağkalımını engelleyebileceği söylenebilir. MDAMB-231 hücrelerinde P53 ve PTEN ifadesini artırarak, PI3K ve AKT ifadesini azaltarak PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ederek hücre çoğalmasını engelleyebileceğini düşünmekteyiz (Şekil 4.32).

JAK2, STAT5/STAT3 ve PI3K/AKT sinyal yolları gibi farklı sinyal yollarını aktif hale getirerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozu düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Ishida vd., 2018: 26834). STAT aile üyeleri STAT5 ve STAT3, anjiyogenez, sağkalım ve hücre büyümesinde rol alan genlerin ifadelerini düzenler (Yeh vd., 2013: 2). Bu nedenle ilaç direnci ve nüks gelişebilir. STAT3 ve STAT5'in hiperaktivasyonu bu genlerdeki mutasyonlar tarafından gerçekleşir ve hastalarda kanserin progresyonu ile ilişkilidir (Orlova vd., 2019: 2). STAT3 aktivasyonu tüm meme kanseri sınıflarında bulunur, ancak çoğunlukla TNBC ile ilişkilidir. Aktive edilmiş STAT3, agresif meme tümörlerinin patogenezi destekleyebilir (Walker vd., 2014: 2). STAT5 hem sağkalımı hem de meme bezinin terminal

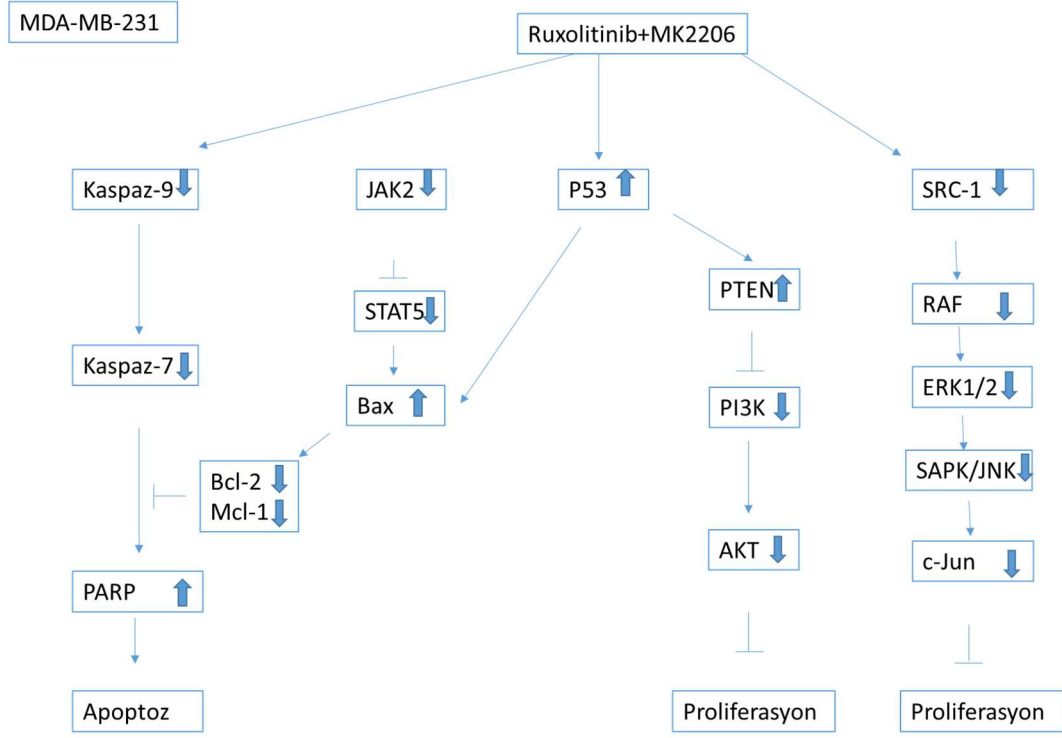
farklılaşmasını uyarır (Walker vd., 2014: 2). STAT5, Bcl-Xl gibi pro-survival genlerin ifadesini artırır. STAT5'in hormona yanıt veren meme tümörlerinde tümörlerde meme tümörlerinde yapısal olarak aktif haldedir (Walker vd., 2014: 3). Kim ve ark. yaptıkları çalışmada IL-6/STAT3/ROS yolağının sadece meme kanseri progresyonu ve inflamasyonu ile değil, meme kanser kök hücrelerinin oluşumunun artması ile de ilişkili olabileceği gösterilmiştir (S. L. Kim vd., 2019: 1). Bak/Bax ve Bcl-2 gibi pro- ve antiapoptotik proteinler, JAK/STAT sinyal yolağı ile de ilişkilidir. Tavalli Vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada Ruxolitinib ve multiple sklerozis de kullanılan dimetil fumarat (DMF) nin aktif formu mono-metil fumarat (MMF) ile kombine terapi uyguladıklarında, Ruxolitinib ve MMF kombinasyonun çeşitli beyin, akciğer ve meme kanseri hücre hatlarında (SUM149, BT474) ERK1/2, Akt, STAT3 ve STAT5'i inhibe ettiği, Mcl-1, Bcl-XL, SOD2 ve TRX ifadesini azalttığı, Bim ekspresyonunun arttığı, Bad fosforilasyonunun azaldığını ve pro-Kaspaz3 kırılmasını arttırdığı bulunmuştur. Ruxolitinib ve MMF kombinasyonun beyin, akciğer ve triple meme kanseri hücre hatlarında sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir (Tavallai vd., 2016: 1). Lim vd. 2017'de yaptıkları bir çalışmada, JAK1 ve JAK2 inhibitörü Ruxolitinib ve vitamin D'nin aktif formu Calcitriol'ün MCF-7-HER18 meme kanseri hücre hatlarında antikanser etkisini incelemişlerdir. AnnexinV-PI boyama ile flow sitometri cihazı ile ilaçların hücreler üzerinde apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Ruxolitinib ve Calcitriol'ün kombine uygulamasının JAK2, c-Myc protoonkogen, Siklin-D1, apoptoz regülatörü Bcl-2 proteinlerinin ifadesinin azaldığı, Kaspaz-3 ve Bcl-2 ilişkili hücre ölüm proteinlerinin ifade seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. (Lim vd., 2018: 5581).

Girardot ve ark. yaptıkları bir çalışmada, P53'ün tirozin fosforile ve fosforil olmayan (U) STAT5 ine etkileşimde olduğunu koimmünopresipitasyon yöntemi ile gösterilmiştir (Girardot vd., 2015: 3). Ayrıca, WT P53'ün miyeloid neoplazmalarda STAT5'in transkripsiyonel aktivitesin baskılayabileceği gösterilmiştir. Son araştırmalar, kanser meme modellerinde JAK2/STAT3 sinyal yolağına odaklanmıştır. Britschgi vd. 2012 yılında yaptıkları çalışmada BEZ235 ve NVP-BSK805 kombinasyonu uygulanan RAS mutant MDA-MB-231 LM2 ve PTEN eksikliği olan MDA-MB-468 meme hücreleri ve fare meme hücreleri hücre hattı 4T1'de Bim aktivasyonu ve Mcl-1 inhibisyonu ile PI3K/mTOR ve JAK2/STAT5 yolağını ikili inhibe ettiği gösterilmiştir (Britschgi vd., 2012: 797). Ayrıca, JAK2'nin inhibe edilmesinin PI3K/mTOR yolağının inhibe edilmesine gösterilen direnci önlediğini ve PI3K/mTOR ile JAK2 kombine terapinin tümör büyümesi, kanserli hücre sayısı ve metastazı negatif yönde engellediği gösterilmiştir (Britschgi vd., 2012: 797; Yeh vd., 2013: 1). Li ve ark. yaptıkları çalışmada, Ruxolitinib uygulanan LS411N ve SW620 kolorektal kanser hücrelerinde JAK1, JAK2 ve STAT1 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (Li vd., 2021: 1). Bu çalışmada MDA-

MB-231 hücrelerinde Ruxolitinib ve MK-2206 kombine uygulamasının P53 ve PTEN tümör baskılayıcı genlerin ifadelerini arttırdığı ve STAT5 ifadesini azalttığı ilk kez gösterilmiştir. BT474 hücrelerinde STAT3 ifadesinin Ruxolitinib uygulamasıyla ve Ruxolitinib ve MK-2206 uygulamasıyla azaldığı görülmüştür (Şekil 4.33). Ruxolitinib+MK-2206 uygulamasının TPBC meme kanseri hücrelerinde meme kanseri kök hücrelerini de hedefleyerek anti-kanser etki gösterebileceğini, TNBC meme kanseri hücrelerinde anti-apoptotik genleri azaltarak hücre ölümünü uyarabileceğini düşünmekteyiz.



Şekil 5. 1. Ruxolitinib Ve MK-2206 Kombine Uygulamasının BT474 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması



Şekil 5. 2. Ruxolitinib Ve MK-2206 Kombine Uygulamasının MDA-MB-231 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması

5.2.2. PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP Ve Rux/MK-PCL-NP Uygulanan BT474 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ruxolitinib, JAK1 ve JAK2'yi hedef alan ve oral yoldan temin edilebilir bir reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Orta veya yüksek riskli miyelofibrozu hastaların ve hidroksiüreye karşı yetersiz yanıt veren veya bunlara tolerans göstermeyen polisitemi vera hastalarının tedavisi için onaylanmıştır. En sık gözlenen toksisiteler anemi, lökopeni, trombositopeni, morarma, baş dönmesi ve baş ağrısıdır (Stover vd., 2018: 1). Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda Ruxolitinib'in kanda çok hızlı bir şekilde çözünmesi gibi sistemik yan etkilerine rastlanmıştır (Boca vd., 2017: 4). Ruxolitinib diğer kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında anti-kanser etkisinin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Schneider vd., 2022: 2; Tavallai, vd., 2016: 5). Literatürde Ruxolitinib'in hücrede ve hastalarda meydana getirdiği yan etkilerin fazla olması, Ruxolitinib'in yan etkilerinin en aza indirgenmesi ve ilaç etkinliğinin artırılması gereksinimini açığa çıkarmıştır. Bu noktada direkt kanser hücrelerine daha etkili bir şekilde etki edebilecek, tümör hücrelerindeki ilaç birikimini seçici bir şekilde arttırabilecek, ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltması için önemli bir yaklaşım olan

nanopartiküllerle ilacın nanoformunun sentezlenerek bu eksikliğin giderilebileceği düşünülmüştür.

PCL'nin biyouyumlu ve biyobozunur doğası nedeniyle, ilaç geliştirilmesi ve uzun süreli degradasyonu birkaç aya kadar ilaç salımını kolaylaştırması nedeniyle ilaç geliştirme çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır (Sinha vd., 2004: 1). Literatürde Paclitaxel (Ünal vd., 2022: 1009), Quercetin (Abamor, 2018: 1071), Irinotecan (Mahmoud ve McConville, 2021: 1), 5-Fluorouracil (Öztürk vd., 2017: 1) ve Atorvastatin calcium (Kumar vd., 2016: 2) yüklü PCL nanopartikül çalışmaları bulunmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda ruxolitinib nanoformuyla ilgili Ruxolitinib'in altın kaplı nanopartiküller (Boca vd., 2017: 4) ve Ruxolitinib nanolipozom içeren topikal bir emulgel (Naeimifar vd., 2022: 75) ile ilgili iki adet çalışma bulunmaktadır. MK-2206'nın nanoformuyla ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın ikinci aşamasında literatürde ilk kez Ruxolitinib yüklü PCL nanopartiküller, MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller ve Ruxolitinib+MK-2206 yüklü PCL nanopartiküller sentezlenmiştir.

İki veya daha çok terapötik ajanın kullanıldığı kombine terapi (Eroglu vd., 2019: 78), monoterapiye oranla önemli yolları hedefleyip ilaçların etkinliğini artırarak sinerjistik veya aditif olmak üzere daha etkili sonuçlar vermektedir (Eroglu vd., 2019: 82). Terapötik ilaçların birlikte kullanılmasına ek olarak nanoteknoloji uygulamalarından yararlanılarak farklı kombinasyon yaklaşımları geliştirilebilir (Wang ve Minden, 2022: 2).

Yeni kemoterapotik ilaçların çoğu JAK/STAT ve PI3K/AKT sinyal yolağı ile ilişkili hedeflere özgü olarak tasarlanmaktadır. Yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesi ve kombine terapi ile birlikte birden çok onkogenik sinyal yolağı hedeflenebilir ve oluşan ilaç direncinin ortadan kaldırılması sağlanabilir. Bu yüzden, bu sinyal yollarını iyi anlamının pek çok kanser tipinin tedavi edilmesinde önemli bir role sahip olabileceği düşünülmektedir.

İlaç yüklü nanoyapılarla birlikte ilaçların hücrede yarattığı sitotoksik etkinin azaltılması ve lokal ilaç konsantrasyonu ve etkinliğinin artırılması da kanser çalışmalarında yeni bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır (Jain vd., 2020: 630). İlaç yüklü nanoyapıların kombinasyonu koleraktal kanser (CRC) uygulamalarında lokal ilaç konsantrasyonunun artırılması, kemoterapi ve tümör hedeflenmesinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır (Ma ve Coombes, 2014: 1).

Partikül boyutunun, NP'ler ve hücre zarı arasındaki etkileşimde, hücresel alımda, penetrasyonda ve ayrıca uygulama yolunun belirlenmesinde önemli bir rolü vardır. Özellikle

intravenöz uygulamalarda nanopartikül çapı, kan kılcal damarlarında tıkanıklığa neden olabileceğinden belirli bir boyutun altında olmalıdır. Öte yandan, daha küçük parçacıkların daha büyük yüzey alanları nedeniyle toksik etkileri olması muhtemeldir (Yang vd., 2021: 275). Ünal vd. 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada sentezledikleri Paclitaxel yüklü PCL nanopartiküllerin ortalama boyutlarının 199-383 nm olarak kabul edilebilir ölçüler arasında olduğunu ve Paclitaxel'in nanopartikül yüzeyine yerleşmesinden ötürü blank nanopartiküllere oranla nanopartikül boyutunun artabileceği gösterilmiştir (Ünal vd., 2022: 1015). Bu çalışmada da benzer şekilde Ruxolitinib'in, MK-2206'nın, PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK -PCL-NP ortalama boyutları sırasıyla 564,4641±25,4505 nm, 687,8088±25,48317 nm, 159,4±74,72 nm, 219±88,66 nm, 232,8±24,56 ve 356±3,848 nm olarak bulundu (Tablo 4.1.). Literatürdeki çalışmalarda ilaç yüklü nanopartiküllerin boş nanopartiküllere oranla boyutlarının daha büyük olabileceği, özellikle kanser araştırmalarında 500 nm'den küçük taşıyıcı sistemlerin aktif taşınmasından dolayı ilaçların hedef dokuya ulaştırılmasında daha başarılı olduğu gösterilmiştir (Abamor, 2018: 1078). Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 ile yüklenen PCL nanopartiküllerin üçünde de ilaçların nanopartikül yüzeyine yerleşmelerinden dolayı nanopartikül yüzeyine yerleşmelerinden dolayı partikül boyutunun PCL-NP'ye oranla artmasına neden olmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Zeta potansiyeli, partikül karakterini ve kararlılığını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Literatürde, pozitif yüklü NP'lerin, hücre membran yüzeyi negatif yüklü olduğundan dolayı hücre membranı ile etkileşime girme olasılığının yüksek olduğu vurgulanmaktadır (Miladi vd., 2015: 27). Yue vd. 2014 yılında yaptıkları çalışmada pozitif yükün, NP'lerin hücre içine alımını daha da arttırdığını bildirilmiştir (Yue vd., 2011: 2440). Ünal vd. 2015 yılında yaptıkları çalışmada pozitif yüklü malzemelerle kaplanan NP'lerin, NP'ler ve mukus tabakası arasındaki etkileşimi önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir (Ünal vd., 2015: 3). PCL, terminal karboksilik grupları nedeniyle negatif yüzey yüküne sahiptir. Ünal vd. 2022 yılında yaptıkları çalışmada kaplanmamış NP'lerin zeta potansiyel değerlerinin tümü -20.1 ve -25,8 arasında negatifken, kaplanmış NP'lerin yüzey yükü +29,6 ila +57,1 aralığında olduğu gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan kitozan ve PCL ile kaplanan NP'lerin zeta potansiyelinin negatiften pozitifte doğru değiştiği bildirilmiştir (Ünal vd., 2022: 1016). Bu çalışmaya ait Tablo 4.1'de gösterilen değerlere göre Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP lerin yüzey yükünün -0,372' den sırasıyla 0,471, -0,139 ve 0,227 mV'ye yükseldiği belirlenmiştir. Rux-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin zeta potansiyelindeki artış açısından MK-PCL-NP'ye oranla

daha etkili olabileceğini düşündürmektedir (Bilensoy vd., 2009: 179; Varan ve Bilensoy, 2017: 1449).

PDI değerleri, formülasyondaki NP boyutunun homojenliğini gösterir. 0'a yakın değerler monodispers bir sistemi, 1'e yakın değerler ise sistemin agrega, polimer kalıntıları, farklı büyüklükteki partiküllerden oluşan heterojen bir yapıya sahip olduğunu gösterir. Ünal vd. 2022 yaptıkları çalışmada Paclitaxel yüklü PCL ve kitozan nanopartiküllerin PDI değerlerinin 0'a yakın olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen Tablo 4.1'deki verilere bakıldığında Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin PDI değerlerinin 0'a yakın olduğu için sentezlenen nanopartiküllerin homojen olduğu düşüncesindeyiz.

Literatürdeki çalışmalarda yüksek moleküler ağırlıklı (M_w) PCL ile hazırlanan NP'lerin enkapsülasyon verimliliğinin düşük moleküler ağırlıklı PCL ile kaplanan NP'lere oranla daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ali vd., 2017: 261; Miladi vd., 2015: 1). Artan organik faz viskozitesinin yüksek enkapsülasyon verimliliğine sebep olabileceği düşünülmektedir. Ünal vd. 2022 yılında yaptıkları çalışmada 80.000 M_w PCL ile hazırlanan NP'lerin enkapsülasyon veriminin %59,4 ile %64,7 arasında değişirken, 14.000 M_w PCL ile hazırlanan NP'lerin enkapsülasyon veriminin %51,3 ile %63,1 arasında değiştiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada 80.000 M_w PCL ile hazırlanan NP'lerin ilaç yükleme kapasitesinin %6,2-8,4 arasında değişirken, 14.000 M_w PCL ile hazırlanan NP'lerin ilaç yükleme kapasitesinin %5,2-6,6 arasında değiştiği gösterilmiştir (Ünal vd., 2022: 1017). Bu tez çalışmasındaki verilerden elde edilen Tablo 4.1'de 66000 M_w PCL ile hazırlanan Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'lerin %EV değerleri sırasıyla %61, %66 ve %65, % İY değerleri ise sırasıyla %6,1, %6,6 ve %6,5 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar literatürdekilerle benzerdir (Badran vd., 2018: 1464; Varan ve Bilensoy, 2017: 1450). Enkapsülasyon değerlerinin artmasından dolayı Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206'nın PCL ile kaplanmasının etkili olabileceği düşüncesindeyiz.

Bragta vd. 2018 yaptıkları çalışmada Carboplatin yüklü PCL NP'lerin (CBDCA-PCL-NPs) FT-IR spektrofotometresi sonuçlarında ilaç ve polimer arasında kimyasal uyumsuzlukların olmadığı gösterilmiştir (Bragta vd., 2018: 343). Bu tez çalışmasında elde edilen Şekil 4.2 A, B, C ve D'deki sonuçlarda literatüre paralel bir şekilde Ruxolitinib ve MK-2206 ilaçları ile PCL polimeri arasında herhangi bir kimyasal uyumsuzluk saptanmamıştır. Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206'nın PCL ile kaplandığını düşünmekteyiz.

Ünal vd. 2022’de yaptıkları çalışmada 80000 M_w PCL ile hazırlanan Paclitaxel yüklü NP’lerin boyutlarının 238-380 nm olduğunu ve NP formülasyonlarının pürüzsüz ve küresel şekilli olduğunu bulmuşlardır (Ünal vd., 2022: 1015). Şekil 4. 3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7’deki Ruxolitinib, MK-2206, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP nanopartiküllerin SEM analiz sonuçlarına bakıldığında Ruxolitinib ve MK-2206’nın molekül boyutunun PCL ile enkapsülasyonu sonucunda azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.3 ve 4.5). Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP boyutlarının sırasıyla 97-101 nm, 182-264 nm ve 143-234 nm arasında değiştiğinin gözlenmesi zeta potansiyeli sonucunda sentezlenen Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP’lerin ortama boyutlarıyla benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4, 4.6 ve 4.7). Elde edilen SEM görüntüleri, tüm NP formülasyonlarının pürüzsüz ve küresel yüzeylere sahip olduğunu göstermektedir.

Ünal vd. 2022’de yaptıkları çalışmada (Ünal vd., 2022: 1018) diyaliz membran tekniğini kullanılarak PCX’in PCL NP’lerinden in vitro salım profillerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda Paclitaxel’in PCL formülasyonundan 96 saate kadar belirgin bir şekilde salınım profili gösterdiğini bulmuşlardır. Paclitaxel yüklü Kitozan (CS) ve Paclitaxel yüklü Poly-l-lizin (PLL) nanopartiküllerden Paclitaxel’in ilk 24 saatte ani bir salınım gerçekleştiğini yani kaplama malzesine bağlı olarak Paclitaxel’in salınım hızının değişebileceğini göstermişlerdir (Ünal vd., 2022: 1018). Yine aynı çalışmada partikül boyutlarına göre ilaç salınımlarının hızlarına bakıldığında, daha küçük boyutlu Paclitaxel yüklü PCL nanopartiküllerin daha yüksek salım oranı ve daha büyük boyutlu Paclitaxel yüklü kitozan kaplı PCL nanopartiküllerin daha yavaş salım gösterdiğini bulmuşlardır (Ünal vd., 2022: 1018). Kamaraj vd. 2017’de yaptıkları çalışmada 14-deoksi 11,12-didehidro andrografolit yüklü polikaprolakton nanopartiküllerden (nanoDDA) DDA salımının ilk 24 saatlerde %20 oranında olduğunu, 192 saate kadar %50’ye kadar arttığını ve 264. Saatte azaldığını belirtmişlerdir (Kamaraj vd., 2017: 358). Bu çalışmada ise literatürdekine benzer bir şekilde ilk 24 saatte PCL nanopartiküllerden Ruxolitinib’in %51 oranında salındığı görülürken (Şekil 4.8) MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonunun ise ilk 36 saatte PCL nanopartiküllerden sırasıyla %51 ve %56’sının salındığı gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10). Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyonun salınımının 96. saatin sonunda sırasıyla %77, %74 ve %75 olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyon etken maddelerinin PCL nanopartiküllerden kontrollü bir şekilde salınımının gerçekleşebileceği söylenebilir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10). Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK-2206 kombinasyon etken maddelerinin zamana bağlı salınım yüzdeleri

arasındaki değişkenlik sentezlenen nanopartiküllerin boyutları arasındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabileceği düşüncesindeyiz.

Abamor vd. 2018 yılında Quercetin, Quercetin-yüklü-PCL nanopartiküller ve boş nanopartiküllerin J774 hücrelerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmada boş nanopartiküllerin ve Quercetin-yüklü-PCL nanopartiküllerin toksik etkisinin oldukça düşük olduğu gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda bile nanopartiküllerin kontrolle benzer hücre canlılığı gösterdiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada Quercetin'in yüksek konsantrasyonda (1000 µg/ml) uygulandığı hücrelerde Quercetin'in toksik etkisi olduğu gösterilmiştir (Abamor, 2018: 1076). Öztürk vd. 2017'de yaptıkları çalışmada 24 saat ve 48 saat boyunca Caco-2 hücreleri için serbest 5-FU, 5-FU yüklü PCL2PVA2 nanoparçacıklarının *in vitro* sitotoksik etkilerini incelenmiştir. 5-FU-yüklü-PCL NP'lerde daha düşük hücre canlılığı elde edildiği gösterilmiştir. Boş PCL nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerinin canlılığını etkilemediği gösterildi (Öztürk vd., 2017: 6). Erdoğan'ın 2022'de yaptığı çalışmada A20 hücrelerinde Dox yüklü PCL NP'lerin 24 saat ve 48 saatteki biyolojik etkinliği, MTT kullanılarak incelenmiştir. Optimum dozu belirlemek için Dox ve Daratumumab'ın IC₅₀ değerleri 24 saatte sırasıyla 7,36 ve 0,64 µM olarak gösterilmiştir. Dox yüklü PCL NP'lerin sitotoksitesinin zamana bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Boş nanoparçacıkların ise hiçbir toksisitesi olmadığı gösterilmiştir (Erdoğan, 2022: 200).

Şekil 4.16'de boş PCL nanopartiküllerin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını etkilemediği gösterilmiştir. Şekil 4.17 A ve B'de gösterildiği gibi BT474 meme kanseri hücrelerine uygulanan Ruxolitinib'in IC₅₀ değerinin 50 µM'dan Ruxolitinib'in nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 0,3267 µM'a düştüğü saptanırken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 4.18 A ve B'de gösterildiği üzere BT474 meme kanseri hücrelerine uygulan MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 7 µM' dan MK-2206'in nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 0,208 µM'a düştüğü saptanırken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 7.5 µM'dan MK-2206'nın nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 2,08 µM'a düştüğü gözlemlenmiştir. Şekil 4.19 A, B ve C'de belirtildiği gibi BT474 meme kanseri hücrelerine uygulan Ruxolitinib+MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 55 µM'dan Ruxolitinib+MK-2206'nın nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 451 µM olarak değiştiiği ve anlamlı sonuç elde edilemezken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise Ruxolitinib+MK-2206'nın IC₅₀ değerinin 23 µM'dan Ruxolitinib+MK-2206'nın nanoformülasyonu uygulaması ile birlikte IC₅₀ değerinin 2,684 µM'a düştüğü saptanmıştır. BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP ve MK-

PCL-NP uygulaması ile MDA-MB-231 hücrelerinde ise MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile daha düşük doz konsantrasyonları uygulanarak serbest Ruxolitinib, MK-2206 ve Ruxolitinib+MK2206 uygulaması ile benzer sonuçlar alınabileceğini düşünmekteyiz.

Bhattacharya 2022’de yaptıkları çalışmada farklı polimerik nanoformülasyon (Gefitinib PCL10,000NPs, Gefitinib PCL45,000NPs ve Gefitinib PCL80,000NPs) konsantrasyonlarındaki (5, 25 ve 75 mg/mL) NCI-H460 hücre hatlarının büyüme eğrileri incelenmiştir. Gefitinib nanoparçacıkları üzerine daha yüksek moleküler ağırlıklı PCL kaplamanın NCI-H460 hücre büyümesi üzerinde antagonistik etkileri olduğu gösterilmiştir. 75 mg/mL Gefitinib PCL10.000NP, Gefitinib PCL45.000NP ve Gefitinib PCL80.000NP uygulandığında NCI-H460 hücre büyümesinin sırasıyla %50, %35 ve %28,57 inhibisyon ile kademeli olarak inhibe edildiğini gösterilmiştir. Aksine, daha yüksek konsantrasyonların ve daha uzun bir inkübasyon süresinin NCI-H460 hücrelerinde nanopartikül etkileşimlerini artırabileceği ve hücre büyümesinde olası bir azalma olduğu gösterilmiştir (Bhattacharya, 2022: 235).

PCL-NP uygulamasının BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinin büyümesini engellemediği saptanmıştır. Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması sonrasında BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda azalma görülmüştür (Şekil 4.20 A ve B, 4.21 A ve B, 4.22 A ve B). Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinin proliferasyonundaki azalışın MDA-MB-231 hücrelerine oranla daha fazla olduğu görülmüştür. İki hücre arasındaki bu farklılık TNBC hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin, üçlü pozitif meme kanseri (TPBC) hücre hattı olan BT474 hücrelerinden daha agresif olmasından kaynaklanıyor olabilir. BT474 hücrelerinde PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması sonucunda açılan yara genişliklerini kapatamadığı görülmüştür (Şekil 4.26 B). MDA-MB-231 hücrelerinde ise Rux-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması sonucunda açılan yara genişliklerinin kapandığı, MK-PCL-NP uygulanan hücrelerde ise kapanamadığı görülmüştür (Şekil 4.27 B). PCL-NP’nin BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerde toksik bir etkisi olmadığı düşüncesindeyiz. MK-PCL-NP’nin her iki hücre hattında da hücre proliferasyonunu engellemede etkili olabileceği düşüncesindeyiz. Rux-PCL-NP’nin hücre proliferasyonunu engellemede BT474 hücrelerinde daha etkili olabileceği düşüncesindeyiz.

PCL-NP uygulanan BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmediği için hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı düşüncesindeyiz. Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulanan hücrelere oranla daha fazla DNA kırığı

görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ise DNA fragmentasyonunda azalma görülmüştür (Şekil 4.28 B). MK-PCL-NP uygulanan hücrelerde Rux-PCL-NP uygulanan hücrelere oranla da fazla oranda DNA kırığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ise DNA fragmentasyonunda BT474 hücrelerindeki benzer şekilde azalma görülmüştür (Şekil 4.28 B). Hücre ölümünün uyarılmasında Rux-PCL-NP'nin BT474 hücrelerinde, MK-PCL-NP'nin ise MDA-MB-231 hücrelerinde daha etkili olduğu düşüncesindeyiz.

Bragta ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada Carboplatin-yüklü-poli-(ε-kaprolakton) nanopartiküllerin (CBDCA-PCL-NP) B16F1 melanoma hücreleri %57,6, CBDCA-PCL-NPs-Gel ise %80,2 oranında apoptoza götürdüğü flow sitometre analizleri ile gösterilmiştir (Bragta vd., 2018: 345). Yine aynı çalışmada CBDCA-PCL-NPs-Gel uygulamasının tümör dokularında Bcl-2 ifadesini 2,5 kat azalttığı, tümör dokularında ve B16F1 hücrelerinde Bax ifadesini ise 2.03 kat arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Carboplatin'in nanoformunun tümör dokularında ve B16F1 melanoma hücrelerinde Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 aracılı apoptozu uyarabileceği gösterilmiştir (Bragta vd., 2018: 345). Bhattacharya 2022 yılında yaptığı çalışmada serbest Gefitinib, Gefitinib PCL10,000NPs, Gefitinib PCL45,000NPs, and Gefitinib PCL80,000NPs ile muamele edilen NCI-H460 hücrelerinin apoptotik hücrelerin yüzdesi Annexin V yöntemi ile değerlendirilmiştir. serbest Gefitinib, Gefitinib PCL10,000NPs, Gefitinib PCL45,000NPs, and Gefitinib PCL80,000NPs ile inkübe edilen NCI-H460 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesinin sırasıyla $30,78 \pm 3,78$, $31,67 \pm 3,67$, and $46,78 \pm 4,56$ olarak arttığı ifade edilmiştir (Bhattacharya, 2022: 239).

Şekil 4.28 B'de Rux-PCL-NP uygulanan BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulanan hücrelere oranla daha fazla DNA kırığı görüldüğü, MDA-MB-231 hücrelerinde ise MK-PCL-NP uygulanan hücrelerde Rux-PCL-NP uygulanan hücrelere oranla da fazla oranda DNA kırığı olduğu gösterilmiştir. BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulaması sonucunda PARP, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 ifadesinin azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulaması sonucunda PARP ifadesinin arttığı, Kaspaz-8 ve Kaspaz-7 ifadesinin azaldığı görülmüştür. BT474 hücrelerinin Rux/MK-PCL-NP ile muamele edilmesi sonucunda apoptoz belirteci olan PARP ifadesinde artma, Kaspaz-9, -8, -7 ve -3 ifadesinde azalma görülmüştür (Şekil 4.29). BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile pro-apoptotik Bax ifadesinin arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 ifadesinin azaltarak apoptozun ekstrinsik yolağını inhibe edebileceği düşüncesindeyiz.

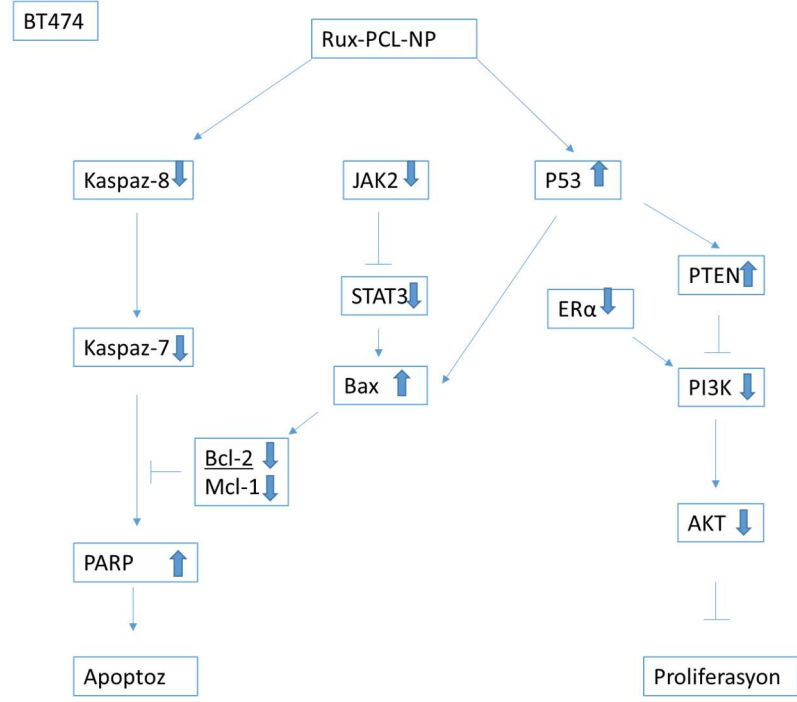
Şekil 4.29'da MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulamasının PARP ve Kaspaz-8 ifadesini arttırdığı görülmüştür MK-PCL-NP uygulamasının MDA-MB-231

hücrelerinde PARP ve Kaspaz-8 ifadesini arttırdığı, Kaspaz- 9 , -7 -3 ifadesini azalttığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinin Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile PARP ifadesinin arttığı, Kaspaz-9, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 ifadesinin azaldığı, Kaspaz-7 ifadesinin ise arttığı görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulamasının pro-apoptotik Bax ifadesinin artması, anti-apoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 protein ifadelerinin artması, c-Myc ifadesini azalması ile apoptozun intrinsik yolağının uyarılabileceği, Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile de MDA-MB-231 hücrelerinde ekstrinsik apoptotik yolağın uyarılabileceği düşüncesindeyiz.

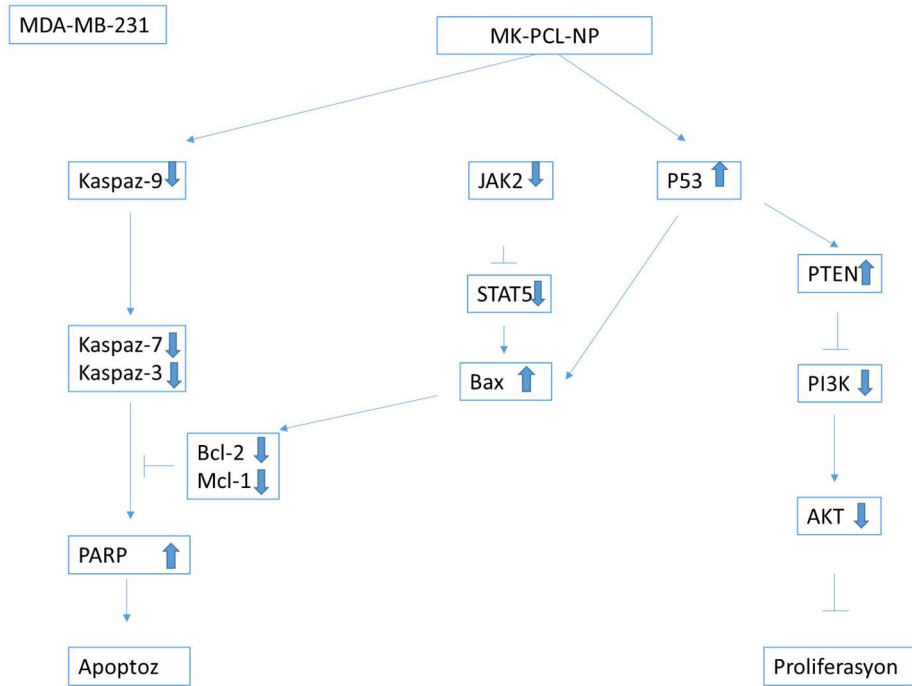
BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin MAPK sinyal yolağı üzerine etkileri ile ilgili yapılmış bir çalışmaya literatür taramamızda rastlanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda, BT474 hücrelerinde MK-PCL-NP uygulamasıyla ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı ve Rux/MK-PCL-NP uygulanmasıyla SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.31). MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulamasının BT474 hücrelerinde MAPK sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engelleyebileceği düşüncesindeyiz. MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP uygulandığında ERK1/2 ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulandığında MDA-MB-231 hücrelerinde ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.31). MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulandığında ERK1/2, SAPK/JNK ve c-Jun ifadesinin azalması ile MAPK sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engelleyebileceği düşüncesindeyiz.

BT474 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PCL-NP, Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP'nin PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkileri ile ilgili yapılmış bir çalışmaya literatür taramamızda rastlanmamıştır. BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, ER α , PI3K ve Akt ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.32). BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP ve MK-PCL-NP uygulandığında PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği düşüncesindeyiz. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ve Akt ifadelerinin bir miktar azaldığı görülmüştür (Şekil 4.32). MDA-MB-231 hücrelerinde Rux-PCL-NP, MK-PCL-NP ve Rux/MK-PCL-NP uygulandığında P53 ve PTEN ifadesinin arttığı, PI3K ve Akt ifadelerinin bir miktar azaltarak PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği düşüncesindeyiz.

PI3K/AKT ve JAK/STAT sinyal yolları, mitokondriyal apoptozu düzenleyen genlerin ifadelerini kontrol eder. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda Ruxolitinib için altın kaplı Ruxolitinib'in sadece hücre içine alınımı ve JAK2 üzerine etkisi incelenmiş, hücre sağkalım yolları ile ilişkisi araştırılmamış ve başka bir polimerle nanoformuna ait bir çalışmaya rastlanmamıştır (Boca vd., 2017: 7). Boca vd. 2017 yılında yaptıkları çalışmada altın nanopartikülle kaplanan Ruxolitinib'in fibroblast hücrelerinde JAK2 ifadesini engelleyerek fibroblastların proliferasyonunu engellediği belirtilmiştir (Boca vd., 2017: 7). BT474 hücrelerinde Rux-PCL-NP uygulamasıyla STAT3 ifadesinin azaldığı, JAK2 ve STAT5 ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulaması ile STAT3 ifadesinin azaldığı, JAK2 ve STAT5 ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile JAK2 ve STAT3 ifadesinin yok olduğu, STAT5 ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.33). BT474 hücrelerinde Rux/MK-PCL-NP uygulaması ile JAK2/STAT3 yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engelleyebileceği düşüncesindeyiz. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Rux-PCL-NP uygulamasıyla JAK2, STAT5 ve STAT3 ifadesinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür. MK-PCL-NP uygulamasıyla JAK2 ve STAT5 ifadesinin azaldığı, STAT3 ifadesinin arttığı görülmüştür. Rux/MK-PCL-NP uygulamasıyla JAK2 ve STAT3 ifadesinin arttığı, STAT5 ifadesinin yok olduğu görülmüştür (Şekil 4.33). MDA-MB-231 hücrelerinde ise MK-PCL-NP uygulamasıyla JAK2 ve STAT5 ifadesinin azaltarak JAK2/STAT5 sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engelleyeceği düşüncesindeyiz.



Şekil 5. 3. Rux-PCL-NP Uygulamasının BT474 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması



Şekil 5. 4. MK-PCL-NP Uygulamasının MDA-MB-231 Hücrelerinde Olası Etki Mekanizması

5.3. Öneriler

Moleküler kombinasyon tedavisi, meme kanseri hastalarında tedavinin olumlu yanıt vermesini arttırmak için umut verici bir mekanizmadır. Çok sayıda preklinik ve klinik çalışma ile ilaçların kombine tedavisinin, tekli tedavisinden daha etkili olabileceği gösterilmiştir.

Kombinasyon terapiler, radyoterapi, kimyasal terapi, endokrin terapi, hedefe yönelik terapi, immünoterapi ve diğer ilaç terapilerini içerebilen multidisipliner bir yaklaşımdır. Hastalığın evresine ve alt tipine bağlı olarak, kombinasyon terapisi, ilaçların toksisitesini, ilaçların yan etkilerini ve kanser hücrelerinin nüksünü en aza indirerek, monoterapiden daha etkili kişiselleştirilmiş tedaviler elde etmede terapötik bir yaklaşım olarak kullanılabilir.

Bu tedavilerin kullanımının ve yönetiminin optimize süreçlerinin devam etmesi son derece önemlidir. Kanser genomik teknolojisinin, nanoteknolojinin ve diğer multidisipliner veri analizlerinin gelecekteki kullanımı, kanser tedavisine olumlu yanıt için kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirmesinde önemli bir yere sahip olacaktır.

KAYNAKÇA

- Abamor, E. S.** (2018). A New Approach to the Treatment of Leishmaniasis: Quercetin-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(3), 1071–1082.
- Adhami, M. vd.** (2018). Candidate Mirnas in Human Breast Cancer Biomarkers: a Systematic Review. *Breast Cancer*, 25(2), 198–205.
- Aittomaki, S., & Pesu, M.** (2014). Therapeutic Targeting of the JAK/STAT Pathway. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*, 114, 18–23.
- Ali, R., Farah, A., & Binkhathlan, Z.** (2017). Development and Characterization of Methoxy Poly(Ethylene Oxide)-Block-Poly(E-Caprolactone) (PEO-B-PCL) Micelles as Vehicles for the Solubilization and Delivery of Tacrolimus. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 258–265.
- Almansour, N. M.** (2022). Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1–15.
- Alqahtani, A., Ayesh, H. S. K., & Halawani, H.** (2019). PIK3CA Gene Mutations in Solid Malignancies : Association with Clinicopathological Parameters. *Cancers*, 12(1): 93.
- An, W. vd.** (2019). Apoptotic Pathway as the Therapeutic Target for Anticancer Traditional Chinese Medicines. *Frontiers in Pharmacology*, 10(July), 1–25.
- Avruch, J., Zhang, X. feng, & Kyriakis, J. M.** (1994). Raf Meets Ras: Completing the Framework of a Signal Transduction Pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(7), 279–283.
- Bader, A. G. vd.** (2005). Oncogenic PI3K Deregulates Transcription and Translation. *Nature Reviews Cancer*, 5(12), 921–929.
- Badran, M. M. vd.** (2018). Novel Docetaxel Chitosan-Coated PLGA/PCL Nanoparticles with Magnified Cytotoxicity and Bioavailability. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106, 1461–1468.
- Balko, J. M. vd.** (2017). Triple Negative Breast Cancers with Amplification of JAK2 at the 9p24 Loci Demonstrate JAK2-Specific Dependence. *Science Translational Medicine*, 43(5), 909–932.
- Bernabeu, E. vd.** (2014). Paclitaxel-Loaded PCL-TPGS Nanoparticles: in Vitro and in Vivo

Performance Compared with Abraxane®. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 43–50.

Bhattacharya, S. (2022). Genotoxicity and in Vitro Investigation of Gefitinib-Loaded Polycaprolactone Fabricated Nanoparticles for Anticancer Activity Against NCI-H460 Cell Lines. *Journal of Experimental Nanoscience*, 17(1), 214–246.

Bianchini, G. vd. (2016). Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Opportunities of a Heterogeneous Disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(11), 674–690.

Bilensoy, E. vd. (2009). Intravesical Cationic Nanoparticles of Chitosan and Polycaprolactone for the Delivery of Mitomycin C to Bladder Tumors. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1–2), 170–176.

Blalock, W. L. vd. (2003). Requirement for the PI3K/Akt Pathway in MEK1-Mediated Growth and Prevention of Apoptosis: Identification of an Achilles Heel in Leukemia. *Leukemia*, 17(6), 1058–1067.

Aparicio, B. vd. (2007). PTEN, More Than the AKT Pathway. *Carcinogenesis*, 28(7), 1379–1386.

Boca, S. vd. (2017). Ruxolitinib-Conjugated Gold Nanoparticles for Topical Administration: An Alternative For Treating Alopecia? *Medical Hypotheses*, 109, 42–45.

Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting Apoptotic Caspases in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(6), 118688.

Bragta, P., vd. (2018). Intratumoral Administration of Carboplatin Bearing Poly (E-Caprolactone) Nanoparticles Amalgamated with in Situ Gel Tendered Augmented Drug Delivery, Cytotoxicity, and Apoptosis in Melanoma Tumor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 166, 339–348.

Britschgi, A. vd. (2012). JAK2/STAT5 Inhibition Circumvents Resistance to PI3K/mTOR Blockade: A Rationale for Cotargeting These Pathways in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Cell*, 22(6), 796–811.

Brkic, S. vd. (2021). Dual Targeting of JAK2 and ERK Interferes with the Myeloproliferative Neoplasm Clone and Enhances Therapeutic Efficacy. *Leukemia*, 35(10), 2875–2884.

Burke, E. E.vd. (2019). Vaccine Therapies for Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of north america*, 28(3), 353–367.

Butti, R., vd. (2018). Receptor Tyrosine Kinases (Rtks) in Breast Cancer: Signaling,

Therapeutic Implications and Challenges. *Molecular Cancer*, 17(1), 1–18.

Buzdar, A. U. vd. (2002). An Overview of the Pharmacology and Pharmacokinetics Of The Newer Generation Aromatase Inhibitors Anastrozole, Letrozole, and Exemestane. *Cancer*, 95(9), 2006–2016.

Çakir, H. K., & Eroglu, O. (2021). In Vitro Anti-Proliferative Effect of Capecitabine (Xeloda) Combined with Mocetinostat (MGCD0103) in 4T1 Breast Cancer Cell Line by Immunoblotting. *Iranian journal of basic medical sciences*, 9, 1515–1522.

Cao, Y., vd. (2023). JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Promotes the Expansion and Suppressive Action of Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells via the JAK/STAT And ROS-MAPK/NF-Kb Signalling Pathways in Acute Graft-Versus-Host Disease. *Clinical and Translational Immunology*, 12(2), 1–19.

Charlier, B. vd. (2019). Development and Validation of a Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (RP-HPLC-FL) Method to Quantify Ruxolitinib in Plasma Samples. *Analytical Letters*, 52(8), 1328–1339.

Chen, X.vd. (2018). AKT Inhibitor MK-2206 Sensitizes Breast Cancer Cells to MLN4924, A First-in-Class NEDD8-Activating Enzyme (NAE) Inhibitor. *Cell Cycle*, 17(16), 2069–2079.

Cheng, Y. vd. (2012). MK-2206, a Novel Allosteric Inhibitor of Akt, Synergizes with Gefitinib Against Malignant Glioma via Modulating both Autophagy and Apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(1), 154–164.

Chou, T. C. (2010). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446.

Civallero, M. vd. (2017). Ruxolitinib Combined with Vorinostat Suppresses Tumor Growth and Alters Metabolic Phenotype in Hematological Diseases. *Oncotarget*, 8(61), 103797–103814.

Cizkova, M. vd. (2012). PIK3CA Mutation Impact on Survival in Breast Cancer Patients and in ER α , PR and ERBB2-Based Subgroups. *Breast Cancer Research*, 14(1): R28

D’Arcy, M. S. (2019). Cell Death: a Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592.

Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141.

- De Palma, F. D. E., vd.** (2022). Circular RNAs as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Biomedicines*, *10*(3), 1–23.
- Deng, L., & Li, J.** (2019). Prevalence and Prognostic Role of PIK3CA / AKT1 Mutations in Chinese Breast Cancer Patients. *Cancer Research and Treatment*, *51*(1), 128–140.
- Di Leo, A., vd.**(2010). Results of the CONFIRM Phase III Trial Comparing Fulvestrant 250 Mg with Fulvestrant 500 Mg in Postmenopausal Women with Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(30), 4594–4600.
- Duffy, M. J., vd.** (2017). Clinical Use of Biomarkers in Breast Cancer: Updated Guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*, *75*, 284–298.
- Eliyatkin, N., vd.** (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, *11*(2), 59–66.
- Erdoğan, N.** (2022). Combination of Daratumumab and Doxorubicin Loaded Polycaprolactone Nanoparticles in the Treatment of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Annals of Medical Research*, *29*(3), 198–202.
- Eroglu, O., vd.** (2019). Investigation of Methylation Profiles of TP53 , Caspase 9 , Caspase 8 , Caspase 3 Genes Treated with DNA Methyl Transferase Inhibitor (DNMTi) Zebularine (ZEB) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Cancer Therapy*, *10*(1), 69–85.
- Eroglu, O., vd.** (2019). Triple Effect of Doxorubicin , 5-Fluorouracil , Propranolol on Cell Survival on MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Journal of Biosciences and Medicines*, *7*, 74–85.
- Eroles, P., vd.** (2012). Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways. *Cancer Treatment Reviews*, *38*(6), 698–707.
- Fang, H., vd.** (2017). Mirna-21 Promotes Proliferation and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells through Targeting PTEN. *American Journal of Translational Research*, *9*(3), 953–961.
- Fasoulakis, Z., vd.** (2021). Breast Cancer Apoptosis and the Therapeutic Role of Luteolin. *Chirurgia (Romania)*, *116*(2), 170–177.
- Fessi, H., vd.** (1989). Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, *55*(1), 1–4.

- Fiebelkow, J., vd.** (2021). The Tyrosine Phosphatase SHP2 Increases Robustness and Information Transfer within IL - 6 - Induced JAK / STAT Signalling. *Cell Communication and Signaling*, 1–19.
- Fong, P. C., vd.** (2009). Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *New England Journal of Medicine*, 361(2), 123–134.
- Franklin, D. A., vd.** (2020). MEK Inhibition Activates STAT Signaling to Increase Breast Cancer Immunogenicity via MHC-I Expression. *Cancer Drug Resistance*, 3(3), 603–612.
- Furth, P. A.** (2014). STAT Signaling in Different Breast Cancer Sub-Types. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 612–615.
- Germain, D.** (2011). Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 473–484.
- Girardot, M., vd.** (2015). Persistent STAT5 Activation in Myeloid Neoplasms Recruits P53 into Gene Regulation. *Oncogene*, 34(10), 1323–1332.
- Godone, R. L. N., vd.** (2018). Clinical and Molecular Aspects of Breast Cancer: Targets and Therapies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(January), 14–34.
- Gong, Y., vd.** (2019). The Role of Necroptosis in Cancer Biology and Therapy. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–17.
- Gordon, S., & Martinez, F. O.** (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, 32(5), 593–604.
- Gotink, K. J., & Verheul, H. M. W.** (2010). Anti-Angiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors: What Is Their Mechanism Of Action? *Angiogenesis*, 13(1), 1–14.
- Gwak, J. M., vd.** (2015). Prognostic Value of Tumor-Associated Macrophages According to Histologic Locations and Hormone Receptor Status in Breast Cancer. *Plos One*, 10(4), 1–14.
- Halim, C. E., vd.** (2020). Involvement of STAT5 in Oncogenesis. *Biomedicines*, 8(9), 316.
- Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S.** (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869–36872.
- Hamzehzadeh, L., vd.** (2016). New Approaches to Use Nanoparticles for Treatment of Colorectal Cancer; A Brief Review. *Nanomedicine Research Journal*, 1(2), 59–68.
- Hanahan, D.** (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A.** (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*, 57–70.
- Harrell, J. C., vd.** (2014). Endothelial-Like Properties of Claudin-Low Breast Cancer Cells Promote Tumor Vascular Permeability and Metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, *31*(1), 33–45.
- Hirai, H., vd.** (2010). MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs in Vitro And in Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, *9*(7), 1956–1967.
- Holliday, D. L., & Speirs, V.** (2011). Choosing The Right Cell Line for Breast Cancer Research. *Breast Cancer Research*, *13*(215), 1–7.
- Hu, X., vd.** (2021). The JAK/STAT Signaling Pathway : from Bench to Clinic. *6*(September), 402.
- Hu, Z., vd.** (2018). Identifying Circulating Tumor DNA Mutation Profiles in Metastatic Breast Cancer Patients with Multiline Resistance. *EBioMedicine*, *32*, 111–118.
- Ibrahim, S. A., vd.** (2017). Syndecan-1 is a Novel Molecular Marker for Triple Negative Inflammatory Breast Cancer and Modulates the Cancer Stem Cell Phenotype via the IL-6 / STAT3 , Notch And EGFR Signaling Pathways. *Molecular Cancer*, *16*(1), 57.
- Igney, F. H., & Krammer, P. H.** (2002). Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 277–288.
- Incorvaia, L., vd.** (2020). BRCA1/2 Pathogenic Variants in Triplenegative Versus Luminal-Like Breast Cancers: Genotype–Phenotype Correlation in a Cohort Of 531 Patients. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *12*, 1–9.
- Iorio, M. V., & Croce, C. M.** (2012). MicroRNA Dysregulation in Cancer: Diagnostics, Monitoring and Therapeutics. a Comprehensive Review. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(3), 143–159.
- Ishida, S., vd.** (2018). Mechanisms for Mtorc1 Activation and Synergistic Induction of Apoptosis by Ruxolitinib and BH3 Mimetics or Autophagy Inhibitors in JAK2-V617F-Expressing Leukemic Cells Including Newly Established PVTL-2. *Oncotarget*, *9*(42), 26834–26851.
- Jain, V., vd.** (2020). A Review of Nanotechnology-Based Approaches for Breast Cancer and Triple- Negative Breast Cancer. *Journal of Controlled Release*, *326*(April), 628–647.

- Jan, R., & Chaudhry, G.-S.** (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205–218.
- Jang, H., vd.** (2019). A Sesquiterpenoid from *Farfarae Flos* Induces Apoptosis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells Through Inhibition of JAK–STAT3 Signaling. *Biomolecules*, 9(7), 278.
- Jesus, S., vd.** (2018). The Inclusion of Chitosan in Poly- ϵ -Caprolactone Nanoparticles: Impact on the Delivery System Characteristics and on the Adsorbed Ovalbumin Secondary Structure. *AAPS PharmSciTech*, 19(1), 101–113.
- Jiang, N., vd.** (2020). Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer : the Framework of Malignant Behavior. *Molecular Biology Reports*, 47(6): 4587–4629.
- Jiao, P., vd.** (2013). MK-2206 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Hepg2 Cells and Sensitizes TRAIL-Mediated Cell Death. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 382(1–2), 217–224.
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M., & Miao, E. A.** (2017). Programmed Cell Death as a Defence Against Infection. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), 151–164.
- Kamaraj, N., vd.** (2017). Fabrication, Characterization, in Vitro Drug Release and Glucose Uptake Activity of 14-Deoxy, 11, 12-Didehydroandrographolide Loaded Polycaprolactone Nanoparticles. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(4), 353–362.
- Karagianni, F., vd.** (2021). Ruxolitinib with Resminostat Exert Synergistic Antitumor Effects in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Plos One*, 16, 1–14.
- Kenny, P. A., vd.** (2007). The Morphologies of Breast Cancer Cell Lines in Three-Dimensional Assays Correlate with Their Profiles of Gene Expression. *Molecular Oncology*, 1(1), 84–96.
- Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S., & Kanneganti, T. D.** (2020). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, 38, 567–595.
- Khan, I., vd.** (2013). AKT Is a Therapeutic Target in Myeloproliferative Neoplasms. *Leukemia*, 27(9), 1882–1890.
- Khanna, P., vd.** (2018). GRAMD1B Regulates Cell Migration in Breast Cancer Cells through JAK/STAT and Akt Signaling. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.

- Kim, H. J., Lee, S., & Oh, S. C.** (2016). The Inositide Signaling Pathway As a Target for Treating Gastric Cancer and Colorectal Cancer. *frontiers in Physiology*, 7, 1–8.
- Kim, J. W., vd.** (2019). Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis of Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells by Ruxolitinib, a Selective JAK2 Inhibitor. *Oncology Letters*, 17(4), 3981–3989.
- Kim, S. L., vd.** (2019). Dihydratanshinone-Induced Nox5 Activation Inhibits Breast Cancer Stem Cell through the ROS/STAT3 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9296439
- Knobbe, C. B., & Reifenberger, G.** (2003). Genetic Alterations and Aberrant Expression of Genes Related to the Phosphatidylinositol-3'-Kinaseprotein Kinase B (Akt) Signal Transduction Pathway in Glioblastomas. *Brain Pathology*, 13(4):507-18
- Krishna, M., & Narang, H.** (2008). The Complexity of Mitogen-Activated Protein Kinases (Mapks) Made Simple. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 3525–3544.
- Kudachadkar, R., & O'Regan, R. M.** (2005). Aromatase Inhibitors as Adjuvant Therapy for Postmenopausal Patients with Early Stage Breast Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3), 145–163.
- Kumar, N., vd.** (2016). Atorvastatin Calcium Loaded PCL Nanoparticles: Development, Optimization, in Vitro and in Vivo Assessments. *RSC Advances*, 6(20), 16520–16532.
- Lavanya, V., vd.** (2014). Small Molecule Inhibitors as Emerging Cancer Therapeutics. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 1(3), 39–46.
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J.** (2011). Cell Signaling by Receptor-Tyrosine Kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134.
- Letai, A.** (2017). Apoptosis and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 275–294.
- Li, Xia, vd.** (2021). Ruxolitinib Induces Apoptosis of Human Colorectal Cancer Cells by Downregulating the JAK1/2-STAT1-Mcl-1 Axis. *Oncology Letters*, 21(5), 1–14.
- Li, Xiaohua, He, S., & Ma, B.** (2020). Autophagy and Autophagy-Related Proteins in Cancer. *Molecular Cancer*, 19(1), 1–16.
- Li, Y.-L., vd.** (2019). The Combination of MK-2206 and WZB117 Exerts a Synergistic Cytotoxic Effect Against Breast Cancer Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1311.
- Liang, Y., vd.** (2019). Metastatic Heterogeneity of Breast Cancer : Molecular Mechanism and

Potential Therapeutic Targets. *Seminars In Cancer Biology*, 60, 14-27.

Lieblein, J. C., vd. (2008). STAT3 Can Be Activated Through Paracrine Signaling in Breast Epithelial Cells. *BMC Cancer*, 8, 1–14.

Lim, S. T., vd. (2018). Synergistic Anticancer Effects of Ruxolitinib and Calcitriol in Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer Cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5581–5588.

Loibl, S., vd. (2021). Breast Cancer. *The Lancet*, 397(10286), 1750–1769.

Ma, B. B. Y., vd. (2013). Preclinical Evaluation of the AKT İnhibitor MK-2206 in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines. *Investigational New Drugs*, 31(3), 567–575.

Ma, Y., & Coombes, A. G. A. (2014). Designing Colon-Specific Delivery Systems for Anticancer Drug-Loaded Nanoparticles: an Evaluation of Alginate Carriers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(9), 3167–3176.

Mahapatro, A., & Singh, D. K. (2011). Biodegradable Nanoparticles Are Excellent Vehicle for Site Directed in-Vivo Delivery of Drugs and Vaccines. *Journal Of Nanobiotechnology*, 9, 55.

Mahmoud, B. S., & McConville, C. (2021). Development and Optimization of Irinotecan-Loaded Pcl Nanoparticles and Their Cytotoxicity Against Primary High-Grade Glioma Cells. *Pharmaceutics*, 13(4), 541.

Marangoz, Ö., & Yavuz, O. (2020). Nano-İlaç Taşıma Sistemleri ve Toksikolojik Değerlendirmeleri Nano-Drug Delivery Systems and Their Toxicological Assessment. *Türk Hiyjen ve Deneyisel Biyoloji*, 77(4), 509–526.

Mascarenhas, J., & Hoffman, R. (2012). Ruxolitinib: the First FDA Approved Therapy for the Treatment of Myelofibrosis. *Clinical Cancer Research*, 18(11), 3008–3014.

Miladi, K., vd. (2015). Encapsulation of Alendronate Sodium by Nanoprecipitation and Double Emulsion: from Preparation to in Vitro Studies. *Industrial Crops and Products*, 72, 24–33.

Miladi, vd. (2016). Polymer Nanoparticles for Nanomedicines. 17-53. Springer.

Mishra, A. P., vd. (2018). Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 22(3), 281–295.

Mokhtari, R. B., vd. (2017). Combination Therapy in Combating Cancer. *Oncotarget*, 8(23),

38022–38043.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1–2), 113–142.

Moras, D. G. H. (1998). The Nuclear Receptor Ligand-Binding Domain : Structure and Function. *Cell Biology*, 10, 384–391.

Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018). The Molecular Details of Cytokine Signaling via the JAK / STAT Pathway. 27, 1984–2009.

Naeimifar, A., vd. (2022). Designing a Topical Nanoliposomal Formulation of Ruxolitinib Phosphate. *Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 75–83.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 24964624, MK-2206. [Erişim: 14.03.2023 [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mk-2206.](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mk-2206)]

Nishimura, R., vd. (2010). Ki-67 as a Prognostic Marker According to Breast Cancer Subtype and a Predictor of Recurrence Time in Primary Breast Cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(5), 747–754.

O'Brien, M. E. R., vd. (2004). Reduced Cardiotoxicity and Comparable Efficacy in a Phase III Trial of Pegylated Liposomal Doxorubicin Hcl (CAELYX™/Doxil®) Versus Conventional Doxorubicin for First-Line Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Annals of Oncology*, 15(3), 440–449.

Obr, A., & Edwards, D. P. (2012). The Biology of Progesterone Receptor in the Normal Mammary gland and in Breast Cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357(1–2), 4–17.

Olson, M., & Kornbluth, S. (2005). Mitochondria in Apoptosis and Human Disease. *Current Molecular Medicine*, 1(1):91-122.

Orlova, A., vd. (2019). Direct Targeting Options for STAT3 and STAT5 in Cancer. *Cancers*, 11(12), 1930.

Ouyang, L., vd. (2012). Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.

Owen, K. L., Brockwell, N. K., & Parker, B. S. (2019). JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*, 11(12), 2002.

- Öztürk, K., vd.** (2017). Preparation and In Vitro Evaluation of 5-Fluorouracil-Loaded PCL Nanoparticles for Colon Cancer Treatment. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(5), 635–641.
- Pardoll, D. M.** (2012). The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264.
- Park, J., vd.** (2016). MLLT11/AF1q Boosts Oncogenic STAT3 Activity Through Src- PDGFR Tyrosine Kinase Signaling. *Oncotarget*, 7(28), 43960.
- Park, M. Y., vd.** (2021). Differences of Key Proteins between Apoptosis and Necroptosis. *BioMed Research International*, 2021, 1–10
- Pascual, J., & Turner, N. C.** (2019). Targeting The PI3-Kinase Pathway in Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Oncology*, 30(7), 1051–1060.
- Patani, N., Martin, L. A., & Dowsett, M.** (2013). Biomarkers for the Clinical Management of Breast Cancer: International Perspective. *International Journal of Cancer*, 133(1), 1–13.
- Philp, A. J., vd.** (2001). The Phosphatidylinositol 3 -Kinase P85 Gene Is an Oncogene in Human Ovarian and Colon Tumors. *Cancer Research*, 61, 7426–7429.
- Polyak, K.** (2002). Breast Cancer Gene Discovery. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(18), 1–18.
- Rafi, M., vd.** (2022). The PI3K / AKT Signaling Pathway in Cancer : Molecular Mechanisms And Possible Therapeutic Interventions. *Experimental and Molecular Pathology*, 127, 104787.
- Ribeiro, J. R. ., & Freiman, R. N.** (2014). Estrogen Signaling Crosstalk: Implications for Endocrine Resistance in Ovarian Cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 23(1), 160–173.
- Rizi, H. A. Y., Shin, D. H., & Rizi, S. Y.** (2022). Polymeric Nanoparticles in Cancer Chemotherapy : A Narrative Review. *Iranian Journal of Public Health*, 51(2), 226–239.
- Robinson, D. R., vd.** (2013). Activating ESR1 Mutations in Hormone-Resistant Metastatic Breast Cancer. *October*, 45(12), 1446–1451.
- Rohrbeck, A., & Borlak, J.** (2009). Cancer Genomics Identifies Regulatory Gene Networks Associated with the Transition from Dysplasia to Advanced Lung Adenocarcinomas Induced by C-Raf-1. *Plos One*, 4(10).
- Rothé, F., vd.** (2011). Global MicroRNA Expression Profiling Identifies Mir-210 Associated

with Tumor Proliferation, Invasion and Poor Clinical Outcome in Breast Cancer. *Plos One*, e20980.

Şakalar, Ç., İzgi, K., & Canatan, H. (2013). Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *Firat Üniversitesi.Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 27(2), 105–110.

Sanovic, R., vd. (2009). Time-Resolved Gene Expression Profiling of Human Squamous Cell Carcinoma Cells During the Apoptosis Process Induced by Photodynamic Treatment with Hypericin. *International Journal of Oncology*, 35, 921–939.

Santos-Carballal, B., Fernández, E. F., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies. *Polymers*, 10(4), 1–51.

Savaee, M., vd. (2022). Evaluating the Effects of Separate and Concomitant Use of MK-2206 and Salinomycin on Prostate Cancer Cell Line. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 11(1), 157–165.

Schneider, J., vd. (2022). Effects of Ruxolitinib and Calcitriol Combination Treatment on Various Molecular Subtypes of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2535.

Schuur, E. R., & Deandrade, J. P. (2015). *International Manual of Oncology Practice 155-200*. Springer

Seif, F., vd. (2017). The Role of JAK-STAT Signaling Pathway and Its Regulators in the Fate of T Helper Cells. *Cell Communication and Signaling*, 15(1) 1–13.

Sert, P. İ., & Küçükılınç, T. T. (2022). Current Approaches in Breast Cancer Treatment. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 42(1), 46–59.

Shafei, A., vd. (2017). A Review on the Efficacy and Toxicity of Different Doxorubicin Nanoparticles for Targeted Therapy in Metastatic Breast Cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 95(September), 1209–1218.

Shamas-din, A., vd. (2011). BH3-Only Proteins : Orchestrators of Apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(4), 508–520.

Shields, B. J., vd. (2013). TCPTP Regulates SFK and STAT3 Signaling and Is Lost in Triple-Negative Breast Cancers. *Molecular and Cellular Biology*, 33(3), 557–570.

Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT Signalling in the Immune System.

Nature Reviews Immunology, 3(11), 900–911.

Shukla, R., vd. (2019). *Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics 390-403*. Elsevier.

Sim, H. J., Song, M. S., & Lee, S. Y. (2021). Kv3 Channels Contribute to Cancer Cell Migration via Vimentin Regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 551, 140–147.

Simioni, C., vd. (2012). Cytotoxic Activity of the Novel Akt Inhibitor, MK-2206, in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia*, 26(11), 2336–2342.

Singh, S. K., vd. (2019). Docetaxel Combined with Thymoquinone Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Inhibition of the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cancers*, 11(1390).

Singh, S. K., vd. (2017). Drug Delivery Approaches for Breast Cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6205–6218.

Sinha, V. R., vd. (2004). Poly-E-Caprolactone Microspheres and Nanospheres: An Overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1–23.

Stanislawek, A., vd. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review. *Cancers*, 4287(13), 1–30.

Stottrup, C., vd. (2016). Upregulation of Akt3 Inhibitor MK2206 In Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(8), 1964–1974.

Stover, D. G., vd. (2018). Phase II Study Of Ruxolitinib, A Selective JAK1/2 Inhibitor, In Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Npj Breast Cancer*, 4(1), 10.

Strasser, A., & Vaux, D. L. (2020). Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Molecular Cell*, 78(6), 1045–1054.

Tao, K., vd. (2016). Akt Inhibitor MK-2206 Enhances the Effect of Cisplatin in Gastric Cancer Cells. *Biomedical Reports*, 4(3), 365–368.

Tavallai, M., vd. (2016). Ruxolitinib Synergizes with DMF to Kill via BIM+BAD-Induced Mitochondrial Dysfunction and via Reduced SOD2/TRX Expression and ROS. *Oncotarget*, 7(14), 17290–17300.

Tavallai, M., vd. (2016). Rationally Repurposing Ruxolitinib (Jakafi®) as a Solid Tumor Therapeutic. *Frontiers in Oncology*, 6(June).

- Templeton, A. J., vd.** (2014). Prognostic Relevance of Receptor Tyrosine Kinase Expression in Breast Cancer : A Meta-Analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 40(9), 1048–1055.
- Thomas, S. J., vd.** (2015). The Role of JAK/STAT Signalling in the Pathogenesis, Prognosis And Treatment of Solid Tumours. *British Journal of Cancer*, 113(3), 365–371.
- Thorpe, L. M., vd.** (2017). PI3K-P110 α Mediates the Oncogenic Activity Induced by Loss of The Novel Tumor Suppressor PI3K-P85 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), 7095–7100.
- Tran, A. M., vd.** (2020). A New World of Biomarkers and Therapeutics for Female Reproductive System and Breast Cancers: Circular RNAs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1–17.
- Trunet, P. F., vd.** (1997). Clinical Use of Aromatase Inhibitors in the Treatment of Advanced Breast Cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61(3–6), 241–245.
- Tserga, A., vd.** (2016). Mutation of Genes of the PI3K/AKT Pathway In Breast Cancer Supports Their Potential Importance as Biomarker for Breast Cancer Aggressiveness. *Virchows Archiv*, 469(1), 35–43.
- Tungsukruthai, S., Petpiroon, N., & Chanvorachote, P.** (2018). Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis and Potential Anti-Metastatic Compounds. *Anticancer Research*, 38(5), 2607–2618.
- Türkyılmaz, M., vd.** (2021). Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. 1–65.
- Tüylek, Z.** (2017). İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp dergisi*, 7(3), 89–98.
- Ünal, H., vd.** (2015). Core–Shell Hybrid Nanocapsules for Oral Delivery Of Camptothecin: Formulation Development, In Vitro and In Vivo Evaluation. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(1).
- Ünal, S., Doğan, O., & Aktaş, Y.** (2022). Paclitaxel-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles for Lung Tumors; Formulation, Comprehensive In Vitro Characterization and Release Kinetic Studies. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 46(3), 1008–1028.
- Vagia, E., Mahalingam, D., & Cristofanilli, M.** (2020). The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers*, 12(4), 916.
- Varan, C., & Bilensoy, E.** (2017). Cationic Pegylated Polycaprolactone Nanoparticles

Carrying Post-Operation Docetaxel for Glioma Treatment. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8(1), 1446–1456.

Velloso, F. J., vd. (2017). The Crossroads of Breast Cancer Progression : Insights into the Modulation of Major Signaling Pathways. *Oncotargets And Therapy*, 10, 5491–5524.

Wada, T., & Penninger, J. M. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinases in Apoptosis Regulation. *Oncogene*, 23(16 REV. ISS. 2), 2838–2849.

Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy, Past, Present And Future. *Nature Medicine*, 9, 269–277.

Walker, S. R., Xiang, M., & Frank, D. A. (2014). Distinct Roles Of STAT3 and STAT5 in The Pathogenesis and Targeted Therapy of Breast Cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1).

Wang, Yichao, vd. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering Of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer Manufacturing Techniques And Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*, 6(2), 26.

Wang, Yiling, & Minden, A. (2022). Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11046.

Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2009). Histological and Molecular Types of Breast Cancer: Is There a Unifying Taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(12), 718–730.

Wen, X., vd. (2012). Caspase-Mediated Programmed Cell Death Pathways As Potential Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Proliferation*, 45(3), 217–224

Wiemer, E. A. C. (2007). The Role of Micrnas in Cancer: No Small Matter. *European Journal of Cancer*, 43(10), 1529–1544.

Williams, C. B., Yeh, E. S., & Soloff, A. C. (2016). Tumor-Associated Macrophages: Unwitting Accomplices in Breast Cancer Malignancy. *npj Breast Cancer*, 2(1).

Williams, C., & Lin, C. Y. (2013). Oestrogen Receptors in Breast Cancer: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Ecancermedicalscience*, 7(1), 1–12.

Wilson, J. M., vd. (2014). MK2206 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cellular Proliferation via Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Journal of Surgical Research*, 191(2), 280–285.

- Wise, R., & Zolkiewska, A.** (2018). Metalloprotease-Dependent Activation of EGFR Modulates CD44⁺/CD24⁻ Populations in Triple Negative Breast Cancer Cells through the MEK/ERK Pathway. *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(2), 421–433.
- Wu, J. R., vd.** (2020). Estrogen Receptor 1 and Progesterone Receptor are Distinct Biomarkers and Prognostic Factors in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Evidence From a Bioinformatic Analysis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121, 109647.
- Xu, X., vd.** (2019). Schisandrin a Inhibits Triple Negative Breast Cancer Cells by Regulating Wnt/ER Stress Signaling Pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 115(November 2018), 108922.
- Yan, W., vd.** (2018). Baicalein Induces Apoptosis and Autophagy of Breast Cancer Cells via Inhibiting PI3K/AKT Pathway In Vivo and Vitro. *Durg Design, Development and Therapy*, 12, 3961–3972.
- Yang, Jiali, Pi, C., & Wang, G.** (2018). Inhibition of PI3K / Akt / Mtor Pathway By Apigenin Induces Apoptosis and Autophagy in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103(April), 699–707.
- Yang, Ju, vd.** (2015). The Role of Tumor-Associated Macrophages in Breast Carcinoma Invasion and Metastasis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6656–6664.
- Yang, W., vd.** (2021). Nanoparticle Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 269–289.
- Yang, Y., vd.** (2018). Ganoderic Acid a Exerts Antitumor Activity Against MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells by Inhibiting The Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway. *Oncology Letters*, 16(5), 6515–6521.
- Yavuz, O., & Marangoz, Ö.** (2022). Nano-ilaç Taşıyıcı Sistemler. *Farmakoloji ve Toksikolojide Nanoteknoloji*, 1, 11–20.
- Yeh, J. E., Toniolo, P. A., & Frank, D. A.** (2013). JAK2-STAT5 signaling. *JAK-STAT*, 2(4), e24635.
- Yin, W. B., vd.** (2018). Circulating Circular RNA Hsa_Circ_0001785 Acts As a Diagnostic Biomarker for Breast Cancer Detection. *Clinica Chimica Acta*, 487(2), 363–368.
- Yokogami, K., vd.** (2000). Serine Phosphorylation And Maximal Activation of STAT3 during

CNTF signaling Is Mediated by the Rapamycin Target mTOR. *Current Biology*, 731(10), 47–50.

Yu, H., vd. (2014). Revisiting STAT3 Signalling in Cancer: New and Unexpected Biological Functions. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 736–746.

Yue, Z. G., vd. (2011). Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 12(7), 2440–2446.

Zaballos, M. A., & Santisteban, P. (2017). Key Signaling Pathways in Thyroid Cancer. *Journal of Endocrinology*, 235(2), R43–R61.

Zhang, X., vd. (2018). PD-1 Blockade Cellular Vesicles for Cancer Immunotherapy. *Advanced Materials*, 30(22), 1–8.

Zhou, D., vd. (2019). Chemotherapy Modulates Endocrine Therapy-Related Resistance Mutations in Metastatic Breast Cancer. *Translational Oncology*, 12(5), 764–774.

Zhou, S. vd. (2019). The Emerging Role of Circular Rnas in Breast Cancer. *Bioscience Reports*, 39(6), 1–12.