

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

**OLAPARİB-PACLİTAXEL KOMBİNASYONUNUN
PARP1/2 İNHİBİTÖR DİRENÇLİ MCF7 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE APOPTOTİK BİYOGÖSTERGELER ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ABDULLAH YILDIRIM

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Can Ali AĞCA**

BİNGÖL-2021

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek yüksek tecrübeleriyle beni yönlendiren başta danışman hocam sayın Doç. Dr. Can Ali AĞCA'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı arz ederim. Kullanılan ilaçların temini noktasında yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU'ya, laboratuvarındaki yardımlarından ötürü çalışma arkadaşlarım Deniz ÖZDEMİR ve Dilan ERASLAN'a teşekkürlerimle.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi akademik kariyerimin ilk basamağı olan ön lisans, lisans ve yüksek lisans çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerine ihtiyaç duyduğum ve bunu benden asla esirgemeyen çok kıymetli aileme saygı ve sevgilerimi belirterek teşekkür etmek istiyorum.

Ayrıca, BAP-FEF.2020.00.003 no'lu proje kapsamında desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimle.

Abdullah YILDIRIM

Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Problemin Analizi(Teşhis, Tanım, Önem)	1
1.2. Çalışmanın Amacı	1
1.3. Kanser.....	2
1.4. Meme Kanseri	3
1.4.1. Meme Kanseri Epidemolojisi	3
1.4.2. Meme Kanserini Tetikleyen Risk Faktörleri	4
1.5. Poli ADP-Riboz Polimeraz(PARP).....	7
1.5.1. PARP1	8
1.5.2. PARP2	9
1.6. PARP İnhibitörleri.....	9
1.6.1. Olaparib	10
1.6.2. Sentetik Letalite	11
1.7. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları.....	12
1.7.1. Doğrudan Onarım(Direkt Onarım / Hasarın Geri Döndürülmesi).....	13
1.7.1.1. Fotoreaktivasyon	13
1.7.1.2. O6-MGMT Onarımı(O6 Metilguanin-DNA-Metiltransferaz Onarımı)..	14
1.7.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Yapıştırılması(Ligasyon) ile Onarım	14
1.7.2. Rekombinasyonel Onarımı	14

1.7.3. SOS Onarımı.....	15
1.7.4. Doğrudan Olmayan(Dolaylı) Onarım.....	15
1.7.4.1. Kesip-Çıkarma(Eksizyon) Onarımı	15
1.7.4.1.1. Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (BER = Base Exeision Repair)	16
1.7.4.1.2. Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (NER = Nucleotide Exeision Repair).....	17
1.7.4.2. Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR; Mismatch Repair)	18
1.7.4.3. Çift Zincir Kırık Onarımı	19
1.7.4.3.1. Homolog Rekombinasyon(HR) ile Onarım.....	19
1.7.4.3.1.1. Homolog Rekombinasyon ile BRCA1/2 İlişkisi	20
1.7.4.3.2. Serbest Uçların Homolog Olmayan Uçların Bağlanması ile Onarım(NH-EJ: Non-Homolous End Joining).....	21
1.8. Programlı hücre ölümü: Apoptozis	21
1.8.1. Apoptozis	21
1.8.2. Morfolojik Olarak Apoptozis.....	22
1.8.3. Apoptozisi Nekroz Gibi Diğer Ölüm Yolaklarından Ayıran Farklar	22
1.8.4. Ekstresek Yolak(Hücre Dışından Kaynaklı Ölüm Reseptörleri Yolağı)	23
1.8.5. İntrensek Yolak(Mitokondri Aracılı yol)	23
1.10. Çoklu İlaç Direnci(MDR; Multi Drug Resistance)	25
1.10.1. Olaparib Direnci	26
1.11. Paklitaksel.....	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Materyal.....	28
2.2. Yöntem	29
2.2.1. Hücre Kültürü	29
2.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini	29
2.2.1.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması	29
2.2.1.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması	29
2.2.1.4. Hücre Sayımı.....	30
2.2.1.5. Hücrelerin Hatlarının Stoklanması.....	30
2.2.2. Dirençli Hücre Hattının(MCF-7/PIR) Elde Edilmesi	30
2.2.3. WST-1 (Water Soluble Tetrazolium-1) Analizi	30

2.2.4. Koloni Sağ-Kalım(Klonojenik) Analizi.....	31
2.2.5. Wound Healing(Yara İyileşmesi) Deneyi.....	32
2.2.6. Akridin Oranj – Etidyum Bromür Boyama Deneyi.....	33
2.2.7. Western Blot Yöntemi	34
2.2.7.1 Protein İzolasyonu.....	34
2.2.7.2. Jel Hazırlama.....	35
2.2.7.3. Örnekleri Yükleme.....	35
2.2.7.4. Transfer İşlemi	35
2.2.7.5. Bloklama İşlemi	36
2.2.7.6. Primer(Birincil) Antikor ile İnkübasyon İşlemi.....	36
2.2.7.7. Sekonder(İkincil) Antikor ile İnkübasyon İşlemi	36
2.2.7.8.Görüntüleme.....	37
2.2.8. İstatistiksel Analiz.....	37
 3. BULGULAR VE TARTIŞMA	 38
3.1. Dirençli MCF-7/PIR Hücrelerinin Elde Edilmesi	38
3.2. Hücre Hatlarına İlaçların Tekli Uygulanmasıyla(Monoterapi) Elde Edilen Sonuçlar.....	 38
3.2.1. Hücre Canlılığının WST-1(Water Soluble Tetrazolium-1) Yöntemiyle Belirlenmesi	 39
3.2.1.1. Farklı Dozlarda MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücrelerine Uygulanan Olaparibin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	 39
3.2.1.2. Farklı Dozlarda MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücrelerine Uygulanan Paklitakselin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	 40
3.2.2. Koloni Sağ-Kalım Deney Sonuçları	40
3.2.2.1. Olaparibin MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının Farklı Sayıda Ekilen Koloni Sağ-Kalım Formasyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi ...	 40
3.2.2.2. Paklitaksel'in MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının Farklı Sayıda Ekilen Koloni Sağ-Kalım Formasyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	 41
3.2.3. Wound Healing(Yara İyileşmesi) Deneyi Sonuçları	42
3.2.3.1. Olaparibin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	42
3.2.3.2. Paklitakselin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	43

3.2.4. Akridin Oranj – Etidyum Bromür Boyama Deneyi Sonuçları	44
3.2.4.1. Uygulanan Olaparibin Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi ile MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarında Apoptotik Süreçlerin Belirlenmesi.....	44
3.2.4.2. Uygulanan Paklitakselin Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi ile MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarında Apoptotik Süreçlerin Belirlenmesi.....	45
3.2.5. Western Blot Deneyi Sonuçları	46
3.2.5.1. MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının İlaç ile Tedavi Edilmeden Önce Western Blot Yöntemi İle Apoptotik Süreçlerinin Belirlenmesi	46
3.3. Hücre Hatlarına İlaçların Birlikte Uygulanmasıyla(Kombinatif Tedavi) Elde Edilen Sonuçlar;	47
3.3.1. 5µM Olaparib ile Farklı Dozlardaki Paklitaksel Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	47
3.3.2. 10 µM Olaparib ile Farklı Dozlardaki Paklitaksel Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	48
3.3.3. Farklı Dozlarda Uygulanan Olaparib, Paklitaksel ve İkisinin Kombinasyonlarıyla Tedavi Edilen MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi ile Apoptotik Süreçlerinin Belirlenmesi	49
3.3.4. Kombinasyon tedavisinin Bax ve TIGAR proteini üzerine olan etkilerinin Belirlenmesi	50
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
CO ₂	: Karbondioksit
FBS	: Fetal Bovine Serum
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ml	: Mililitre
NER	: Nükleotid Eksizyon Onarımı
O ₂	: Oksijen
OH	: Hidroksil
p53	: Tümör protein 53
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
µL	: Mikrolitre
nM	: Nanomolar
µM	: Mikromolar
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
GLOBOCAN	: Uluslararası Kansere Ajansı
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı(Michigan Cancer Foundation-7)
MCF-7/PIR	: PARP İnhibitörlerine Dirençli(PARP İnhibitör Resistance) MCF-7
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PARPi	: PARP İnhibitörü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
SiY	: Sağlık İstatistikleri Yıllığı
DSB	: DNA Çift Zincir Kırığı
SSB	: DNA Tek Zincir Kırığı
NaN ₃	: Sodyum Asit

NaOH	: Sodyum Hidroksit
WST-1	: Water Soluble Tetrazolium-1
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
TEMED	: Tetrametilendiamin
BSA	: Bovin Serum Albümin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
PO ₄ ³⁻	: Fosfat
Ca ⁺	: Kalsiyum
NAD ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
BRCA-1	: Breast Cancer-1
BRCA-2	: Breast Cancer-2
PARP-1	: Poli ADP-Riboz Polimeraz-1
PARP-2	: Poli ADP-Riboz Polimeraz-2
CH ₃	: Metil
AZD2281	: Olaparib
Pac	: Paklitaksel
BER	: Baz Eksizyon Onarımı
HR	: Homolog Rekombinasyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
CPDs	: Siklobütan Pirimidin Dimerleri
MMR	: Yanlış Eşleşme Onarımı
NH-EJ	: Non-homolog Uç Birleştirme
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
DISC	: Ölüm Sinyal Kompleksi
P-gp	: P-glikoprotein
53BP1	: P53 Bağlayıcı Protein-1
RNA	: Ribonükleik Asit
MDR	: (Multi Drug Resistance)Çoklu İlaç Direnci
ATCC	: American Type Culture Collection
TNBC	: Triple Negatif Meme Kanseri
mA	: Miliamper

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Meme kanserinde görülen bazı belirti ve bulgular	4
Şekil 1.2. PARP-1 proteinin yapısı	8
Şekil 1.3. Sentetik Letalite	11
Şekil 1.4. PARP inhibitörlerinin uygulanması	12
Şekil 1.5. Baz Eksizyon(Kesip-Çıkarma) Onarımı.....	17
Şekil 1.6. Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı	18
Şekil 1.7. Homolog rekombinasyon	19
Şekil 1.8. Apoptozis yolları	23
Şekil 1.9. Apoptozda mitokondri aracılı yolak.....	25
Şekil 1.10. Paklitakselin kimyasal formu.....	27
Şekil 3.1. Dirençli hücrenin Elde Edilmesi	39
Şekil 3.2. Olaparibin hücre canlılığı üzerine etkisi	39
Şekil 3.3. Paklitakselin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	40
Şekil 3.4. Olaparibin hücrelerin sağ-kalımı üzerine etkisi	41
Şekil 3.5. Paklitakselin hücrelerin sağ-kalımı üzerine etkisi	42
Şekil 3.6. Olaparib ile tedavi edilen hücrelerin wound healing görüntüleri	43
Şekil 3.7. Paklitaksel ile tedavi edilen hücrelerin wound healing görüntüleri	44
Şekil 3.8. Olp tedavisi ile apoptotik süreçlerinin AO/EB deneyi ile analizi	45
Şekil 3.9. Pac tedavisi ile apoptotik süreçlerinin AO/EB deneyi ile analizi	46
Şekil 3.10. Hücre hatlarının tedavi öncesi Western blot sonuçları	47
Şekil 3.11. Kombinasyon tedavisinin(5µM Olp + Pac) wound healing görüntüleri.	48
Şekil 3.12. Kombinasyon tedavisinin(5µM Olp+ Pac) wound healing görüntüleri..	49
Şekil 3.13. Kombinasyon tedavisinin AO/EB deneyi ile görüntülenmesi.....	50
Şekil 3.14. Kombinasyon tedavisinin western blot analizi sonuçları.....	51

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Yakınlık derecesine göre meme kanserinde meydana gelen risk.....	6
Tablo 2. BRCA-1 ve BRCA2'nin görevi.....	8

OLAPARİB-PACLİTAXEL KOMBİNASYONUNUN PARP1/2 İNHİBİTÖR DİRENÇLİ MCF7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOTİK BİYOGÖSTERGELER ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Meme kanseri, yüksek ölüm oranlarından dolayı kadın sağlığı önündeki en büyük tehditlerden biridir. Meme kanseri hücre hattı(MCF-7) yapısında meydana gelen bir hasarın onarılması için DNA tamir mekanizması ve bu mekanizmada etkin rol oynayan PARP'lar(Poli ADP-riboz Polimeraz) büyük önem taşımaktadır. Kanserli bir hücrenin programlı ölüm yolağına(apoptoz) sürüklenebilmesi için söz konusu tamirde görevli PARP'ların inhibisyonuna yani PARP İnhibitör(PARPi) ajanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu düşünce ile geliştirilen ve güvenilirliği FDA tarafından onaylanan Olaparib, yaygın kullanım alanına sahip bir PARP inhibitörüdür. Özellikle tümör süpresör genler olarak bilinen BRCA genlerinin mutasyonlu olduğu meme kanseri hücrelerinde olaparibin PARP'ları inhibisyonuyla tedavi noktasında yeni fikirler geliştirmektedir. Ancak söz konusu PARP inhibitörü kullanılırken hücresel düzeylerde karşılaşılan ilaç dirençleri nedeniyle tedavide istenilen sonuçlar elde edilememektedir. Bu çalışmada da PARPi olan Olaparibe karşı *in-vitro* şartlarda direnç kazandırılmış MCF-7/PIR hücre hattı elde edilerek deneyler yapıldı. Gelişen direnci yıkabilmek adına aynı anda farklı hücresel mekanizmaları hedefleyerek kanser hücrelerini apoptoza yönlendirecek yeni tedavi stratejilerini sunmak gerekmektedir. Bu noktada birçok çalışmada bireysel olarak etkisi kanıtlanmış olan kemoterapötik ajan Paklitaksel değerlendirilmektedir. Mekanizma olarak paklitaksel, apoptozisi uyarmak için bir takım sinyal molekülleri ve gen ürünleri aracılığıyla Bcl-2 ailesi üyelerini fosforile eder ve sitotoksisteyi sağlamak için hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, çoklu ilaç direncinin yaşandığı meme kanseri tedavilerinde, DNA hasarını tetikleyen olaparib ile hücre döngüsü üzerinde etkili paklitakselin kombine edilmesiyle yeni bir terapötik yaklaşım değerlendirildi. Olaparib'e karşı dirençli MCF-7 hücre hattında ilk defa çalışılan bu kombinasyonun programlı hücre ölümü apoptoz üzerine olan etkisi araştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, MCF-7, direnç, MCF-7/PIR, PARP, PARP inhibitörleri, olaparib, paklitaksel, kombinasyon tedavi.

EFFECT OF OLAPARIB-PACLITAXEL COMBINATION ON APOPTOTIC BIOMARKERS IN PARP1/2 INHIBITOR-RESISTANT MCF 7 BREAST CANCER CELLS

ABSTRACT

Breast cancer is one of the biggest threats to women's health due to its high death rate. DNA repair mechanism and PARPs (Poly ADP-ribose Polymerase) that play an active role in this mechanism are of great importance for repairing a damage in the structure of breast cancer cell line (MCF-7). In order for a cancer cell to be dragged into the programmed death pathway (apoptosis), inhibition of PARPs involved in the said repair, that is, PARP Inhibitor (PARPi) agents are needed. Developed with this in mind and approved by the FDA, Olaparib is a widely used PARP inhibitor. Especially in breast cancer cells where BRCA genes known as tumor suppressor genes are mutated, olaparib develops new ideas at the point of treatment by inhibiting PARPs. However, due to drug resistance encountered at cellular levels when using the said PARP inhibitor, desired results cannot be obtained in the treatment. In this study, experiments were carried out by obtaining MCF-7/PIR cell line, which was resistant to Olaparib, which is PARPi, under in-vitro conditions. In order to break down the developing resistance, it is necessary to present new treatment strategies that will direct cancer cells to apoptosis by targeting different cellular mechanisms at the same time. At this point, Paclitaxel, a chemotherapeutic agent whose individual effect has been proven in many studies, is being evaluated. Paclitaxel as a mechanism, a number of signaling molecules and genes to induce apoptosis. It phosphorylates Bcl-2 family members through its products and is known to arrest the cell cycle in the G2/M phase to achieve cytotoxicity. In the light of this information, a new therapeutic approach was evaluated by combining olaparib, which triggers DNA damage, and paclitaxel, which is effective on the cell cycle, in the treatment of breast cancer with multidrug resistance. The effect of this combination, which was studied for the first time in an olaparib-resistant MCF-7 cell line, on programmed cell death apoptosis was investigated.

Keywords: Breast cancer, MCF-7, resistance, MCF-7/PIR, PARP, PARP inhibitors, olaparib, paclitaxel, combination therapy.

1. GİRİŞ

1.1. Problemin Analizi (Teşhis, Tanım, Önem)

Kanserin, görülme sıklığında günden güne artışın meydana gelmesi gerek Türkiye ve gerekse dünya için çok ciddi sağlık problemi olarak göze çarpmaktadır. Yapılan araştırmalarda kanser teşhisi konulma hızındaki artışın bu şekilde devam etmesi halinde 2030'lu yıllarda her yıl için 27 milyon yeni kanser vakasının görülebileceği ve yılda yaklaşık 17 milyon kişinin de bu hastalığa bağlı sebeplerden dolayı hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Tuncer 2009). Uluslararası Kanser Ajansı (GLOBOCAN) tarafından 2012 yılında paylaşılan verileri incelendiğinde o yıl içerisinde toplam olarak 14.1 milyon yeni kanser tanısının konulduğunu ve kansere bağlı ölüm sayısının da 8.2 milyon kişi olduğu bildirilmiştir (Sung et al. 2021). Sağlık Bakanlığı'nın 2017 verileri incelendiğinde ülkemizde kansere bağlı ölümlerin meydana gelen toplam ölümler arasında %19,71 oranla 2. sırada olduğu bildirilmektedir (Başara et al. 2018).

Yılda ortalama 2.1 milyon kadını doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen meme kanseri, kadınlarda en çok karşılaşılan kanser çeşidi olduğu bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization [WHO], 2019) verilerine göre kadınlar arasında toplam ölümlerin %15'inin meme kanserinden kaynaklı olduğu ve kansere bağlı ölümlerde de ilk sırayı meme kanserinin aldığı bildirilmektedir (Delgado-Díaz et al. 2020). Küresel çapta tüm bölgelerde görülen ve bununla beraber görülme sıklığı da her geçen gün artan meme kanseri vakaları, kırsal kesimlerle kıyasla gelişmiş toplumlarda daha çok teşhisi konulan bir hastalık grubu olmaktadır (Kayar 2019).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığının verileri baz alındığında söz konusu hastalığın görülme sıklığının kadınlar arasında 100.000'de 43.8 olduğu görülmektedir (Başara et al. 2018). Yine GLOBOCAN verilerine göre bu kanser çeşidindeki görülme sıklığının %20 civarında seyrettiği, meme kanserine bağlı ölüm oranının ise %14 arttığı

vurgulanmaktadır. Dolayısıyla kanser tanısı konulan her dört kadından birinin istatistiksel olarak meme kanseri hastası olduğu görülmektedir. Ülkemizde meme kanseri tanısı konulan kadınların çoğunlukla 25-49 yaş aralığında olduğu bilinmektedir (Başara et al. 2018; Ferlay et al. 2015). Meme kanserinin kadınlar arasındaki görülme sıklığı ve ölümcül sonuçları değerlendirildiğinde tedavi şeklinin ya da seçeneğinin sosyal, fiziksel ve psikolojik yönden kadın sağlığı adına çok büyük önem taşıdığı bilinmektedir. Tam da bu noktada erken tanı ve devamında yapılacak tedavi önemli bir yere sahip olmaktadır. Nitekim doğru zamanda konulan tanı ve yapılacak tedavilerle kadın sağlığının yanı sıra yaşam kalitesinin de arttırılacağı düşünülmektedir (Kayar 2019; Kılıç et al. 2006).

1.2. Çalışmanın Amacı

Meme kanserine yönelik terapötik yaklaşımlar dünya genelinde her geçen gün artış göstermesine rağmen tedavide bu gelişmelere orantılı olarak iyimser sonuçlar maalesef alınamamaktadır. Geliştirilen tedavi yöntemleri erken evre meme kanseri vakalarında olumlu sonuçlar verse de ileri evre hastalarda maalesef aynı müspet sonuçlardan bahsedilememektedir. Kemoterapi veya radyoterapi gibi gelişmelerin ışığında son zamanlarda bu hastalık gurubundan kaynaklı mortalite sayısında düşüşler gözlenmekte ancak ileri evre hastalarda MCF7 hücre hattı eksenli ölüm oranları halen çok yüksek düzeylerde seyretmektedir. MCF7 hücre hattı kaynaklı mortalite oranlarının düşürülmesi adına geliştirilecek yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulduğu aşikârdır. Var olan terapötik yaklaşımlar birçok olumsuz durumu da beraberinde meydana getirebildikleri için tedavi konusunda yetersiz kalabilmektedirler. Tedavi noktasında olumsuz durumları tetikleyen en önemli handikaplardan birisi de hücresel düzeyde meydana gelen ve söz konusu tedavilere karşı moleküler düzeyde gelişen güçlü bir İlaç direnci (MDR)'nin gelişiyor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu bağlamda, DNA tamir yollarında üstlendiği rolle majör bir aktör olduğu bilinen PARP enzim ailesinin tamir mekanizmalarındaki rollerinin inhibisyonu amaçlanarak gerçekleştirilen tedavi stratejileri her geçen gün daha da çok artmaktadır. Bu stratejilerin geliştirilmesinde PARP inhibitörlerinin önemi büyüktür. 2018 yılında FDA tarafından meme kanseri hastalarında kullanımı onaylanan PARP küçük molekül inhibitörü “Olaparib” en yakın tarihli örneğidir. PARP inhibitörlerinin bireysel olarak etkileri açıklanmasına rağmen hücresel düzeylerde karşılaşılan ilaç dirençleri nedeniyle tedavide istenilen sonuca ulaşamaması

büyük bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda, PARP inhibitörü olaparibe karşı direnç geliştirilmiş meme kanseri hücre hattında, geleneksel kemoterapi ajanı paklitakselin, olaparib ile birlikte kullanımının hücre ölümü üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

1.3. Kanser

Hem Türkiye hem de dünya için tehdit oluşturmaya devam eden kanser, görülme sıklığının yanı sıra ciddi oranda ölümlere neden olması, sakat bırakması ve de işgücü kayıplarına sebebiyet vermesi yönünden toplum sağlığı önündeki en büyük engellerden biridir (Tuncer 2009). 21. yüzyılda yaşam süresiyle beraber kalitesi de artmakta ancak bu iyi gelişmelerin önündeki en büyük engellerden biri olan kanser, gün geçtikçe yüksek mortalite oranlarına da neden olmaktadır. Bu oranların yükselmesini tetikleyen nedenlerin başında dünya genelinde nüfusun hızla artması, yaşlanma, ekonomik şartlardaki eşitsizlik ve bunun beraberinde sağlıksız yaşam modelleri sayılabilmektedir (İlgü ece gülser, 2015; Sa et al., 2019).

GLOBACAN, 2020 yılı içerisinde 10 milyon kişinin kanserden öldüğünü, 19.3 milyon kişiye de yeni kanser tanısının konulduğunu bildirmiştir. Yine aynı kurumun verilerine göre her 5 kişiden 1'ine yaşamının bir döneminde kanser tanısı konulduğu rapor edilmiştir. Dünya çapında akciğer kanserinden kaynaklı meydana gelen ölümlerden sonra meme kanserinden kaynaklı ölümlerin geldiği kaydedilmektedir(Sung et al. 2021). Artan kanser potansiyelinden dolayı dünya genelinde erkek nüfusunun %20'si, kadın nüfusunun ise yaklaşık %16'sı hayatı boyunca kansere yakalanmaktadır. Bu veriler ışığında 2040'lı yıllara kadar nüfusun artması ve de yaşlanmasıyla beraber kanserden kaynaklı ölümlerin 16 milyonu bulacağı, yeni kanser vakalarının ise 29 milyon kişiyi geçeceği tahmin edilmektedir. Yine aynı tahmin verilerinde kanserden kaynaklı meydana gelen ölümlerin %75'nin az ve orta gelişmiş ülkelerde görüleceği de tahmin edilmektedir (İlgü ece gülser, 2015; Sa et al., 2019; Sung et al., 2021).

Hızla çoğalan kanserli hücrelerin meydana getirdiği tümoral oluşum, ilk olarak lokal çevrede sonrasında ise lenf ve de kan yoluyla daha uzaktaki organlara yayılım (metastaz) gerçekleştirerek etkisini göstermektedir. Dolayısıyla da kontrolsüz proliferasyon,

apoptozdan kaçma (ölümsüzlük) ve de metastaz yapabilme gibi yetenekleri kazanan kanserli bir hücre, organizmanın sağlığı için artık en büyük tehdit haline gelmiş bulunmaktadır. Bu bağlamda sahip olduğu yüksek metastaz potansiyel ile meme kanseri, küresel kanser yükü içerisinde çok önemli bir yere sahip olmaktadır (İlgü ece gülser, 2015; Sa et al., 2019; Fojo & Bates, 2013).

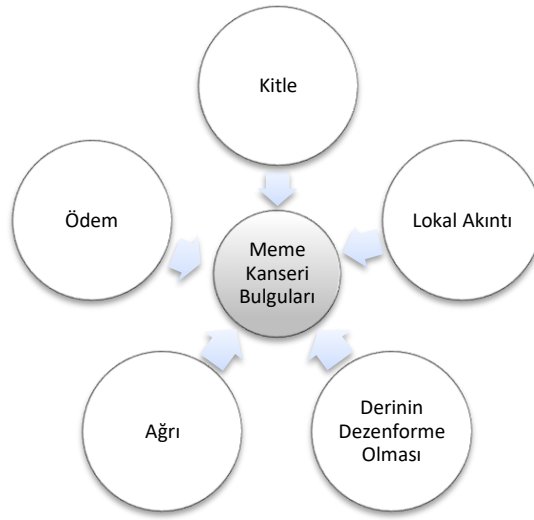
1.4. Meme Kanseri

Meme kanseri, genel kanser tanımına uymakla beraber kadınların süt kanalı yapılarından köken aldığı ve bazal membrandan ilerleyip bağ dokusu kanallarına kadar uzanabildiği belirtilmektedir (Ward et al. 2015). Ayrıca, farklı klinik özellikleri barındırmakla beraber morfolojik ve histopatolojik olarak da farklı özelliklere sahip heterojen bir hastalık olan meme kanseri, yapılan tedavilere de farklı cevaplar vermektedir. Bu sebeplerden dolayı, kadınlar arasında morbidite ve mortalitenin en yüksek olduğu kansere bağlı hastalıkların başında geldiği bilinmektedir. Kafkasyalı 69 yaşındaki bir kadının epitel hücrelerinden izole edilmesiyle bilime kazandırılan meme kanseri hücre hattı, daha sonra bu hücre hattı üzerinde çalışmaları ile bilinen Michigan Kanser Vakfı-7'nin (Michigan Cancer Foundation-7) bir kısaltması olarak MCF-7 adını almış bulunmaktadır (Sa et al., 2019). Meme kanserinin gelişimde rol oynayan risk faktörleri arasında ırsi nedenler olabileceği gibi bunlardan bağımsız bir şekilde ortaya çıkan ve kişinin aile öyküsünde olmamasına rağmen gen mutasyonları sonucunda kanseri tetikleyen faktörlerin de var olduğu da bilinmektedir. Son yarım yüzyıldır cerrahi teknikler, kemoterapi, radyoterapi, mamografik görüntüleme ve teşhis/tedavi gibi alanlarda yaşanan gelişmelerin bir sonucu olarak meme kanseri insidansında gözlenen ciddi artışların aksine mortalite oranlarında gözle görülebilir derecede düşüşler görülememektedir (Kars Demirel et al. 2009; Selin 2017).

1.4.1. Meme Kanseri Epidemolojisi

Meme kanserine yakalanma oranları dünya genelinde tüm bölgelerde yükselmekle beraber gelişmiş ülkelerde bu oran daha yüksek seviyelerde seyretmektedir. Ancak gelişmiş olan ülkelerde meme kanserine yakalanma oranları yüksek olmasına rağmen, meme kanserine bağlı ölüm oranlarında ise ilk sırayı geliştirmekte olan ülkeler almaktadır (Kayan 2019).

Ülkemizde meme kanseri insidansı 2009 yılında 100.000’de 40.6 iken 2017 yılı Sağlık İstatistikleri Yıllığı’nın(SİY) paylaştığı verilerde bu oranın 43.8’e kadar yükseldiği görülmektedir. Kadınlarda kanser tanısı konulan hastaların %24,7 meme kanseri hastası olduğu bilinmektedir. SİY’in paylaştığı verilerden hareketle Türkiye’de kanser hastası her 4 kadından 1’i meme kanseri tanısı ile tedavi görmektedir (Başara et al. 2018). Yine GLOBOCAN ‘nın meme kanserine yönelik yaptığı tahminlerle elde edilen sonuçlar arasında meme kanseri insidansında %20, meme kanserinden kaynaklı ölümlerde ise %14’lük bir artışın meydana geldiği görülmektedir (Sung et al. 2021).



Şekil 1.1. Meme kanserinde görülen bazı belirti ve bulgular

Meme kanserinin gelişimini indükleyen risk faktörleri kişi tarafından değiştirilebilir faktörler (yaşam tarzı, davranışlar) ve değiştirilemez faktörler (genetik) olarak sınıflandırılmaktadır (Sun et al. 2017).

1.4.2. Meme Kanserini Tetikleyen Risk Faktörleri

Yüksek oranda risk oluşturmaya da erkeklerde de meme kanserine yakalanma oranı yaklaşık olarak %1 olduğu rapor edilmektedir. Kadınlar ise bu oran meme dokusunun fazlalığı ve östrojen hormonunun düzeyisel değişimlerinden kaynaklı olarak yaklaşık 100 kat daha fazladır (Tazhibi and Feizi 2014).

Kadınlarda erken menarş veya geç menopoz dönemlerinin görülmesi meme kanseri riskini artırmaktadır. Aynı zamanda geç menopozda hormonal etkinin fazla olması ve obezite gibi etmenler de meme kanseri insidansını etkilemektedir (Sun et al. 2017).

Ailede daha önceden meme kanserine yakalanmış kişilerin olması, ailenin diğer fertlerinde bu hastalığın meydana gelme ihtimalini güçlendirmektedir. Aile içinde meme kanserine yakalanmış kişilerin yakınlık durumu ile bu hastalığın ailenin diğer fertlerinde ortaya çıkma oranı arasındaki ilişki aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Kayar 2019).

Tablo 1. Yakınlık derecesine göre meme kanserinde meydana gelen risk (Kayar 2019'dan uyarlanmıştır)

Yakınlık Derecesi	Meme Kanseri Öykülü Hasta	Oluşacak Risk Oranı
Birinci dereceden akraba (anne, kız kardeş,kız çocuğu)	Bir kişi	2 kat
	İki kişi	3 kat

Meme kanserine yakalanma oranı olarak beyaz tenli kadınların siyahi kadınlara kıyasla %20 daha fazla risk taşıdıkları bilinmektedir. Ancak buna karşılık, mortalite oranlarında ise siyah ırkın daha fazla tehdit altında olduğu bu durumda da sosyoekonomik durumlardan ve de yaşam şekillerinden kaynaklandığı varsayılmaktadır(Selçuk 2018).Meme dokusu yani parankim dokunun normalden fazla olması, yağ dokusunun ise normalin altında kalması kadınlarda meme dokusunun yoğunluğuna işaret ettiğinden dolayı riski yaklaşık 4-5 kat arttırmaktadır (Ozmen 2008). Kadınlarda menopozun geç olması kadar hiç doğum yapmamış olmak veya 35 yaşından sonra çocuk sahibi olmak da meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Yine kadınlarda menopoz seyrinin 45 yaşından önce gerçekleşmesi ve ya 45 yaşından önce cerrahi müdahalelerde yumurtalıkların alınması kadınlarda meme kanseri insidansını önemli oranda azalttığı da rapor edilmektedir (Mcperson, Steel, and Dixon 2000; Tazhibi and Feizi 2014). Yaşları 13 - 19 arasında değişen ve 2. Dünya savaşı esnasında yüksek doz radyasyona maruz kalan genç kızlarda meme kanserinin gerçekleşme riskinin 2 kat daha fazla olduğu yapılan bir araştırma ile tespit edilmiştir. Yine aynı araştırmanın devamında; vücuda radyasyon verildikten sekiz yıl sonra meme kanserinin görülme ihtimalinin başladığı, 25 yıldan itibaren ise söz konusu ihtimalin en üst seviyeye eriştiği rapor edilmiştir

(Mcpherson et al. 2000). Meme kanserine yakalanma ihtimalini etkileyen bir diğer faktör ise kadınların çocuk sahibi olup-olmama durumundan kaynaklanmaktadır. Nitekim çocuk sahibi olma, genç yaştaki hamilelikler gibi durumlar meme kanserine yakalanma riskini düşürdüğü bilinmektedir. Bunun yanında en az bir yıl çocuklarını emziren annelerin meme kanserine yakalanma riskinin düştüğü de belirtilmektedir (Sun et al., 2017). Her gün tüketilen alkolün meme kanseri insidansında farkedilebilir düzeyde bir artışa sebebiyet verdiği belirtilmektedir. Özellikle, 30 yaşından önce günde içilen çok az miktardaki alkol bile söz konusu hastalığın meydana gelme riskini çok ciddi ölçüde arttırmaktadır. Aynı şekilde sigara kullanan kadınların, kullanmayanlara oranla meme kanserine yakalanma riski yaklaşık %12 daha fazla olmaktadır (Gaudet et al. 2013). Kozmetik ürünlerin çoğunda bulunan paraben bileşeni, östrojenik etkisinden dolayı kanserleşen dokunun yapısına katıldığı bilinmektedir. Bu yüzden, söz konusu ürünlerin alınması veya kullanılması durumunda dikkat edilmelidir (Heneweer et al. 2005). Günlük fiziksel aktivitelerin en önemli kısımlarından biri olan egzersizler bağışıklık sistemini olumlu etkilemesi, vücuttaki toplam yağ kütlesini düşürmesi, hücre proliferasyonunu indükleyen hormonları baskılaması ve genel olarak östrojen hormonunu regüle etmesi gibi nedenlerden dolayı meme kanseri üzerinde doğrudan ya da dolaylı olarak bir etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Vera-Ramirez et al. 2013). Ayrıca, düzenli yapılan egzersizlerle, kız çocuklarında meme kanserini tetikleyen faktörlerden biri olan menarşın erken yaşlarda görülmesinin engellendiği ve bu sayede kadınların meme kanseri insidansının %20 düştüğü bilinmektedir. Ancak ideal egzersiz programları kişinin sağlık, hormonal dönem ve yaş parametreleri göz önünde bulundurularak uzman fizyoterapistler eşliğinde belirlenmelidir (Harries and Salaniponi 2005).

Meme kanseri görülen hastaların yarısından fazlası 17. kromozom üzerinde bulunan Breast Cancer-1 (BRCA-1) veya Breast Cancer-2 (BRCA-2) genlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Tümör süpresör /susturucu role sahip olan BRCA-1/2, anormal bir şekilde büyüyen hücrelerin proliferasyonunu engellemede rol almaktadır. Söz konusu genlerinde mutasyon olan kadınların mutasyon olmayanlara oranla meme veya yumurtalık (over) kanserine yakalanma risklerinin çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Selçuk 2018). Aynı zamanda, aile içinde bu genlerdeki mutasyon varlığından kaynaklı olarak meme kanserinin görülme ihtimali %80'ne kadar

çıkmaktadır. Bu genlerin görevi tablo Tablo 2’de gösterilmektedir (Tazhibi and Feizi 2014).

Tablo 2. BRCA-1 ve BRCA-2’nin görevi (Kayar 2019’dan uyarlanmıştır)

BRCA-1	- Östrojenin reseptör aktivitesini regüle eder, - Meme dokusunda proliferasyonu indükleyen östrojenin regülasyonunu ve kontrolünü sağlar.
BRCA-1/2	- DNA kormatinlerinin şekillenmesinde ve DNA tamir mekanizmasında rol alır.

Kalıtsal materyalimiz, yaşamı boyunca sürekli endojen ve eksojen kaynaklı bir takım ajanların tehdidiyle karşı karşıya kalmaktadır. DNA’nın yapısında tek veya çift zincir kırıklarına sebebiyet verebilme potansiyellerine sahip olan bu ajanlar, sonuç itibariyle DNA’yı biyokimyasal ve morfolojik olarak çok ciddi hasarlara zorlayabilmektedir. Böylesi bir durumda DNA’da meydana gelen hasarlar, DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılabilmektedir. Söz konusu tamir mekanizmaları sağlıklı bir şekilde onarım fonksiyonlarını yerine getirebilmek için bazı majör aktörlere ihtiyaç duymaktadır. DNA tamir mekanizmasında rol oynayan majör aktörlerden biri de PARP (Poli ADP-Riboz Polimeraz)’dır (Kayar 2019; Patel, Sarkaria, and Kaufmann 2011; Shi et al. 2014).

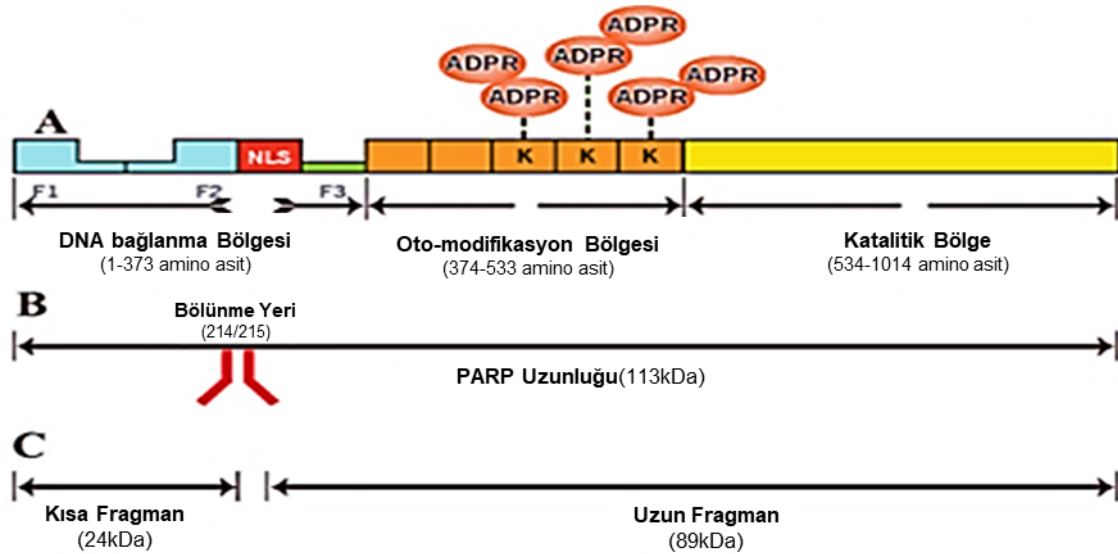
1.5. Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)

İlk olarak Japonya’da birbirinden bağımsız şekilde çalışan iki araştırmacı tarafından literatüre kazandırılan Poli ADP-Riboz Polimerazlar (PARP), keşfedildiği 1960’tan günümüze kadar moleküler düzeyde çalışan birçok araştırmacının dikkatini üzerine çekmeyi başarmıştır (Fojo and Bates 2013). Bünyesinde 18 farklı homoloğu barındıran ve nükleusta konuşlanan PARP’lar, DNA’nın herhangi bir hasara uğraması durumunda yanıt olarak aktifleşen kompleks bir enzim ailesidir. PARP enzim ailesi, “Parilasyon” olarak da bilinen poli ADP-riboz zincirlerini kovalent bir şekilde hedefteki moleküllere bağlama suretiyle hücrel olaylara katılmaktadır (Göngür 2010; Santiago-O’Farrill et al. 2020). Yapılan araştırmalar ışığında PARP1, PARP2, PARP3, PARP4 (vPARP), PARP5a (tankiraz1) ve PARP5b (tankiraz2) gibi 18 üyesi tanımlanmış olmasına rağmen, fonksiyonel olarak bu üyelerden her birinin farklı işlevlere yönelik rollerinin olduğu

gözlemlenmiştir. PARP enzim ailesi üyelerinin teker teker fonksiyonlarına yönelik bilimsel araştırmalar devam etmektedir. Ancak, söz konusu enzimlerin biyolojik işlevleri açısından evrimsel süreçteki korunma oranları önem arz ettiği için bilimsel çalışmaların büyük çoğunluğu PARP1 ve PARP2 üzerinde yoğunlaşmış bulunmaktadır (Göngür 2010; Gottipati, Vischioni, Schultz, Solomons, Helen E Bryant, et al. 2010; Tok and KocyigitKaymakcioglu 2015).

1.5.1. PARP1

Diğer PARP üyeleri gibi nükleusta konumlanan PARP1 enzimi, 3 bölgeden meydana gelmektedir. Sırasıyla N-terminal kısmında DNA bağlama bölgesi, otomodifikasyon bölgesi ve son olarak da C-terminal kısmında bulunan katalitik bölgeden oluşmaktadır (GÖNGÜR, 2010; Tok & KocyigitKaymakcioglu, 2015).



Şekil 1.2. PARP-1 proteinin yapısı A) PARP enziminin yapısal bölgeleri, B) Kaspaz-3 yarıklanma bölgesi C) Yarıklanan kısa ve de uzun PARP fragmanları (Güngör 2010)

DNA bağlayan bölge, özel olarak 2 çinko parmak bölgesine sahip olduğundan dolayı DNA çift zincir kırıkları (DSB) ile güçlü bir duyarlılıkla kimyasal bağ kurabilmektedir. Birinci çinko parmak aracılığıyla DSB tarafından PARP1'in aktive olması sağlanmaktadır. İkinci çinko parmak ise daha çok tekli zincir kırıkları ile PARP1'in aktive olmasında görev almaktadır. Bundan dolayı da, ikinci çinko parmak DSB eksenli

PARP1 aktivasyonu için zaruriyet oluşturmamaktadır. DNA’da herhangi bir kırık olmadığı sürece PARP1 bazal olarak rutin enzim fonksiyonunu yerine getirmektedir (Göngür 2010; Johnson et al. 2013). Otomodifikasyon kısmı ile PARP1, poli ADP’lere ribozların bağlandığı ana bölgeyi oluşturmaktadır. Bu bölge kapsamında BRCA1 motifinin varlığı ayrı bir önem kazanmaktadır. Çünkü BRCA1 gen bölgesi aracılığıyla PARP1, olası DNA hasarı onarımında ve hücre döngüsünün kontrolünde rol alan çoğu protein üzerinde önemli etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Son domaini oluşturan C-terminal kısmı ise NAD^+ ’nın bağlanmasında, ADP-ribozil kompleksinin taşınmasında ve kimyasal dallanma tepkimelerinde gerekli olan yapıları kapsamaktadır. Ayrıca PARP1’in aktive olması, hücresel düzeyde DNA hasarına yönelik olan ve söz konusu hasara cevap niteliğine sahip zincir tepkimelerinin başlatılması için de ayrı bir önem kazanmaktadır. PARP1 bu zincir tepkimeleri esnasında PARP2 ve PARP3 başta olmak üzere diğer PARP üyeleriyle de yakın bir ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir (Göngür 2010; Santiago-O’Farrill et al. 2020).

1.5.2. PARP2

PARP2, N-terminal ucunda nükleusa yerleştirme sinyali (NLS: Nuclear Localization Signal) ve DNA bağlayan kısım (bazik özellik taşır) olmak üzere iki ana bölgeyi kapsamaktadır. Bunun haricinde PARP2, PARP1’de de olduğu gibi C-terminal ucunda NAD^+ bağlayıcı işleve sahip bir katalitik bölgeyi de barındırmaktadır. PARP enzim ailesi üyelerinin DNA tamir mekanizmalarında üstlendikleri bu rolleri baz alınarak kanserli bir bölgede ilgili PARP enziminin inhibisyonu hedef alınabilir ve söz konusu kanserli hücre programlı ölüm yollarına yönlendirilebilmektedir (Fojo and Bates 2013; Göngür 2010; Johnson et al. 2013).

1.6. PARP İnhibitörleri

Genetik ve de çevreden kaynaklı uyaranlar DNA yapısında bir takım hasarlar meydana getirebilmektedirler. Böyle bir durumdan kaynaklı olup DNA yapısında meydana gelen hasarlar, DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılmaktadır. Genetik hazinenin korunaklı bir şekilde ve bir bütünlük içerisinde sonraki nesillere sağlıklı olarak aktarılması için böylesi önemli bir görevi olan DNA tamir mekanizması, bu fonksiyonunu sağlıklı hücrelerde olduğu gibi kanserli hücrelerde de yerine getirmeye

çalışmaktadır (Shi et al., 2014; Bixel & Hays, 2015). Bu bağlamda, kanserli bir hücre de DNA tamir mekanizmalarına ihtiyaç duymaktadır. Çünkü kanserli bir hücre, DNA'sında meydana gelen bir hasarı tamir mekanizmalarıyla onararak apoptozdan kaçma dolayısıyla da ölümsüzlüğü kazanma gibi bir amacı bulunmaktadır. Esasen yeni geliştirilen terapötik yaklaşımların çoğunun temelinde bu mekanizma bilgisi yatmaktadır. Çünkü Kanserli bir hücrenin söz konusu tamir mekanizmalarının inhibisyonunun sağlanmasıyla, canlı organizma için büyük tehdit oluşturan kanser gibi kompleks bir hastalık grubunun doğal ölüm yollarına sürüklenmesi olağan olacaktır. Bu düşünce ile geliştirilen PARP inhibitörleri kanserli bir hücrenin tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım ümidini doğurmaktadır (Gupta et al., 2019; Cortesi et al., 2021). Bu terapötik yaklaşımların artması ile doğru orantılı olarak PARP inhibitörlerine olan ilgiyi de beraberinde artırmaktadır. Çünkü DNA çift zincir kırıklarındaki etkin rolünün keşfedilmesinden önce sadece nükleer enzim olduğu bilinen PARP aile üyelerinin, spesifik amaçlara yönelik inhibisyonlarının sağlanması hedeflenebilmekte ve bu sayede de kanser çalışmalarında ciddi ilerlemeler meydana gelebileceği düşünülmektedir. Zira bu inhibisyon mantığı ile DNA tamir mekanizması manipüle edilebilecek ve DNA yapısında olası bir hasarın tetikleyicisi olan ajanlara karşı söz konusu kanserli hücrelerin duyarlılıkları artırılabilir. Bu bağlamda PARP inhibitörlerinin keşfedilmesi kanserli bir hücrenin tedavisi noktasında ümit vadeden bir gelişme olmaktadır. Meme ve over kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için FDA tarafından onay alan dört PARP inhibitöründen biri de “Olaparib”tir (Shi et al., 2014; Topçul et al., 2018; Santiago-O’Farrill et al., 2020).

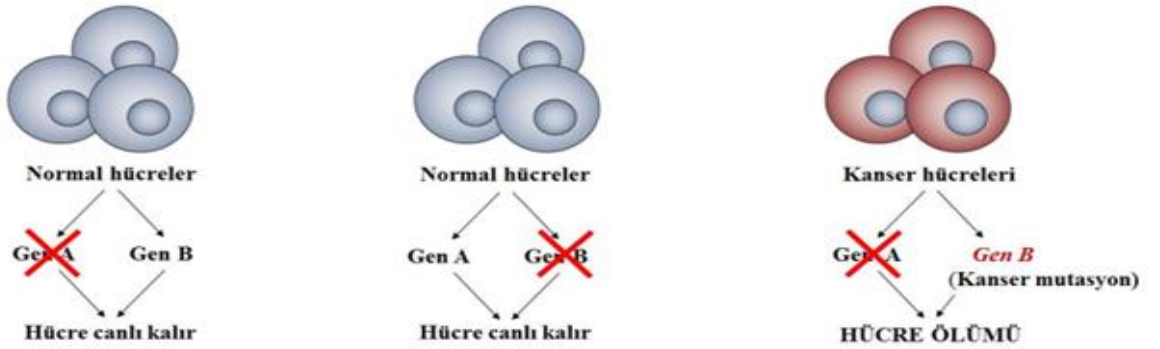
1.6.1. Olaparib

Olaparib, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2014 yılında ileri yumurtalık karsinomu olan kadınlarda tedavi amaçlı onay alırken, 2018 yılında ise metastatik meme kanseri tedavilerinde kullanılmak için onay almıştır (Arora et al. 2021). Normal şartlarda BRCA1/2 mutasyonlarını taşıyan hastalar büyük bir risk altındadırlar. Esasen BRCA gen ailesi homolog rekombinasyonla DNA onarım mekanizmasında görev yaptığından dolayı BRCA mutasyonlarının olduğu hücreler, DNA'nın diğer onarım mekanizmalarına ihtiyaç duymaktadırlar. Bundan dolayı söz konusu hücreler ile PARP inhibisyonuna karşı olan duyarlılık da artmaktadır (Gündoğdu 2020). DNA tamir mekanizmasının bir parçası olan

PARP enzimlerinin inhibisyonu DNA tamir repertuarının akıbeti açısından çok büyük önem arz etmektedir. Çünkü DNA tamir repertuarının yetersiz kalmasıyla DNA çift zincir kırıklarının ortaya çıkması beraberinde hedef hücreyi ölüm yolları olan apoptozis veya nekroze yönlendirebilmektedir. Ölüm fonksiyonu sırasında komşu hücrelere olan olası zararları (enflamasyon gibi) göz önünde bulundurulduğunda, meydana gelecek ölüm şeklinin nekrozisten ziyade apoptozis olması istenilen bir sonuç olmaktadır. Bu bağlamda, tedaviye karşı direnç gösteren kanserli hücrenin minimum zararlar programlı ölüm yolağına yönlendirmek için sentetik letalite fikri ön plana çıkmaktadır (Gündoğdu 2020; Tok ve KocyigitKaymakcioglu 2015; Zhao et al. 2018).

1.6.2. Sentetik Letalite

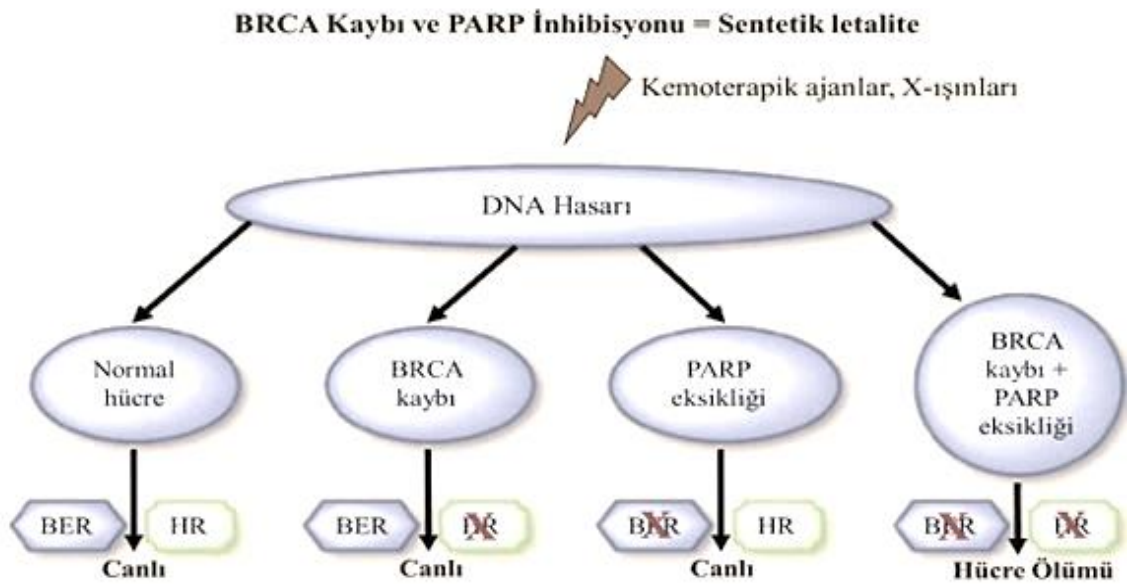
İki veya ikiden fazla gende eş zamanlı olarak meydana gelen mutasyonlar sonucu hücrenin ölümüne zemin hazırlanması olarak da tanımlanan sentetik letalite, Calvin Bridges atlı bir bilim adamı tarafından ilk olarak *Drosophila Melanogaster*'deki farklı gen kombinasyonlarının ölümcül sonuçlara sebebiyet verdiğinin keşfedilmesiyle literatürlere kazandırılmıştır (Güney Eskiler 2017).



Şekil 1.3. Sentetik Letalite. Normal bir hücrede A veya B genlerinden birinin kaybolması karşısındaki diğer genin fonksiyonu ile telafi edilebilirken, iki genden birinin mutasyona uğraması diğer genin ise ilaç inhibisyonu sonucu her iki gende de fonksiyon kaybının oluşmasına dolayısıyla da tedaviye karşı duyarlılığına sebebiyet vermektedir (Güney Eskiler 2017)

Normal şartlarda BER mekanizması ile DNA'nın tek zincir kırıklarına sebep olan hasarların onarımı yapılmaktadır. Geliştirilen terapötik yaklaşımlar doğrultusunda BER tamir mekanizmasının baskılanması sağlanabilmektedir. BER mekanizmasının PARP

inhibitörleri tarafından baskılanması beraberinde tek zincir kırıklarının tamir edilememesini ve buna paralel olarak da replikasyon çatalının çökmesiyle birlikte çift zincir kırıklarının meydana gelmesini de tetiklemektedir (Tok ve KocyigitKaymakcioglu 2015). Meydana gelen çift zincir kırıklarının onarımı ise BRCA1 ve BRCA2'nin de etkin role sahip olduklarının bilindiği homolog rekombinasyon (HR) ile yapılabilmektedir. HR'deki etkin rollerinden dolayı BRCA1/2'nin mutasyona uğraması DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının tamir edilememesine ve bunun sonucunda da kanserli bir hücrenin ölümüne zemin hazırlayacaktır. Verilen bu bilgiler ışığında, PARP inhibitörleri ile BER ve HR'nin aynı anda inhibe edilmesi kontrollü bir sentetik letaliteyi sağlayacaktır. Bu sayede de kanserli bir hücrede PARP inhibitörlerine karşı duyarlılık geliştirilebilecektir (Güney Eskiler 2017; Tok and KocyigitKaymakcioglu 2015).



Şekil 1.4. PARP inhibitörlerinin uygulanması. BRCA1 ve BRCA2'nin mutasyona uğramasıyla ve de homolog rekombinasyonun pasifleştirilmesi yoluyla meydana gelen sentetik letalite (Anders et al. 2010)

1.7. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları

DNA, endojen ve eksojen faktörlerden kaynaklı olarak gelebilecek tehditlere karşı sürekli kendisini korumak eğilimindedir. Aksi takdirde genetik hazinenin varlığı ve de bütünlüğü tehlikeye girmektedir. Endojen faktörler; DNA'da kendiliğinden oluşan hatalar olabileceği gibi metabolizma tepkimelerinin yan ürünü (ROS vb.) olarak da meydana gelmektedir. Dışarıdaki uyarılardan kaynaklı DNA'da meydana gelen hatalar ise

eksojen faktörler kısmına girmektedir. Eksojen faktörlere ultraviyole ışınlar, kometerapötik ilaçlar ve iyonize radyasyon gibi örnekler verilebilmektedir. Söz konusu iki hata durumundan kaynaklı olarak her gün bir memeli genomunda yaklaşık 10^4 sayısını geçecek şekilde DNA hasarı meydana geldiği söylenmektedir (Kurtoğlu and Tekedereli 2015). DNA’da meydana gelen hasarları kısaca tek baz değişimi (deaminasyon, vb), tek ya da çift zincirde meydana gelen kırıklar, aynı veya farklı DNA’nın zincirleri arasında meydana gelen çapraz bağlanmalar şeklinde özetlenebilmektedir. Özellikle de onarımı başarılı bir şekilde gerçekleşmeyen çift zincir kırıkları, başta kanser olmak üzere çok ciddi sonuçlara sebebiyet verebilmenin yanı sıra kromozomal düzeyde kayıpları bile meydana getirebilmektedir. Bu sebeple de çift zincir kırıklarının tamiri hücrenin hem hayatını idame edebilmesi hem de genomik bütünlüğün korunması adına çok daha büyük önem arz etmektedir. Ayrıca oluşan hasarın türüne ve yoğunluğuna bağlı olarak; hücre döngüsü durdurulabilmekte, gen ifadesi değiştirilebilmekte, apoptoz ya da DNA tamir mekanizması aktive edilebilmekte, kanser tetiklenebilmekte veya yaşlanma gibi süreçler hızlanabilmektedir. Özellikle kanser başta olmak üzere yüksek mortalite oranına sahip birçok genetik hastalığın susturulması veya meydana gelme hızlarının yavaşlaması adına DNA tamir mekanizmasına ihtiyaç duyulmaktadır. DNA tamir mekanizmasında görev alan genler bu işlevini ya sinyal iletimi ve onarımın düzenlemesi veya meydana gelen hatalı eşleşme onarımı, baz ve nükleotid ekleme-çıkarma onarımı yoluyla yerine getirir. Genomik devamlılığın sağlanması için tek ve çift zincirde meydana gelen kırıkları tamir etmek üzere 5 tane majör DNA onarım mekanizmasıyla beraber yaklaşık 150 tane de genin bu süreçte etkin rol oynadığı belirtilmektedir. Bu yönüyle de DNA tamiri çok kompleks bir mekanizma olduğu bilinmektedir. Söz konusu genlerin görev aldığı DNA onarım mekanizmasını kısaca doğrudan onarım veya dolaylı onarım olarak ikiye ayrılabilir (Kurtoğlu ve Tekedereli 2015; Patel et al. 2011).

1.7.1. Doğrudan Onarım (Direkt Onarım / Hasarın Geri Döndürülmesi)

1.7.1.1. Fotoreaktivasyon

Kimi durumlarda enzimler kullanılarak tek adımlı reaksiyonlarla DNA’da meydana gelen hasarlar onarılmaktadır. Bu onarım mekanizmasında özellikle fotolizaz enzimleri siklobütan pirimidin dimerlerini (CPDs) ayırarak hasarı onarmaktadır (Onur et al. 2009). Fotoreaktivasyon onarım mekanizmasına ile bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve bazı

omurgalı canlılarda DNA hasarının geri döndürülmesi mümkün olabilmekte ancak ökaryotik canlıların çoğunda (insanlar dâhil) böyle bir onarım sistemi olmadığı için fotoreaktivasyon evrensel bir onarım mekanizması sayılmamaktadır (Kurtoglu ve Tekedereli 2015; Onur et al. 2009; Tok ve KocyigitKaymakcioglu 2015).

1.7.1.2. O6-MGMT Onarımı (O6 Metilguanin-DNA-Metiltransferaz Onarımı)

Büyük oranda mutajen bir özellik gösteren O-6-metilguanin, alkilleyici ajanların (kloroetilasyon ajanları vb.) ortamda bulunmasıyla meydana gelmektedir. O6 metilguanin onarımında görevli Metiltransferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenmiş olan bazların metil (CH₃) gruplarını kendi sistein rezidüllerine taşıyarak normal bir guanin bazının meydana gelmesini sağlamaktadır. Bu şekilde kısaca değinilen onarım mekanizmasında görevli enzimler, geri dönüşümsüz yani baskılanmış oldukları için işlev dışı kalmaktadırlar. Bu onarım mekanizmasında enzimin sayısı ve de özgünlüğü çok önemli bir yer tutmaktadır (Kurtoglu ve Tekedereli 2015; Onur et al. 2009).

1.7.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Yapıştırılması (Ligasyon) ile Onarım

DNA'da meydana gelen basit düzeyde zincir kırıkları X-ray ve peroksidler başta olmak üzere bazı ajanlardan kaynaklı olabilmektedir. Bir zincirde meydana gelen nispeten basit düzeydeki kırıklardan kaynaklı hasarlar DNA ligaz enzimi ile onarılmaktadır. Söz konusu enzim, onarım mekanizmasını 3' OH (hidroksil) grubu ile 5' fosfat (PO₄³⁻) grupları arasında enerji harcayarak güçlü fosfodiester bağlarını kurarak gerçekleştirmektedir (Kurtoglu and Tekedereli 2015; Onur et al. 2009).

1.7.2. Rekombinasyonel Onarımı

Rekombinasyon gerçekleştikten sonra aktif durumu gelen ve onarımda kalıp olarak kullanılacak tamamlayıcı ipliğin olmadığı durumlarda aktiveleşen bir onarım sistemidir. DNA replikasyonu sırasında Timin dimerlerinde bir lezyon görüldüğünde DNA polimeraz enzimi lezyonun olduğu bölgeye giderek yeni sentezlenecek zincir boyunca lezyonun olduğu lokalizasyonda boşluk bırakarak ilerlemektedir. Bu onarımda görev alan RecA proteini ise rekombinasyonel bir değiş tokuş yöntemiyle komplementer dizide hasar görmeyen bir segmenti alarak ilgili boşluğa yerleştirmektedir. Bu olay sırasında

hasarsız segmentin alındığı zincirde meydana gelen boşluklar daha sonraki aşamalarda doldurulmakta ve bu onarım mekanizmasının işleyişi bu şekilde devam etmektedir (Debele, Ege, ve Dal 2006; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015; Onur et al. 2009).

1.7.3. SOS Onarımı

Bu onarım ile diğer DNA onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı yüksek orandaki DNA hasarlarının tamiri yapılabilmektedir. Bu yönüyle, SOS onarım sistemi DNA için adeta bir acil cevap mekanizmasıdır. Yüksek DNA hasarlarına karşı acil cevap olarak onarımda kullanılacak enzimlerin sayısal yönden artmasını sağlamaktadır. Mekanizma işleyiş olarak, DNA sentezi esnasında DNA polimeraz enziminin hasarlı lezyon üstünden atlamadan replikasyonun devam etmesini kolaylaştırmaktadır. Ancak bu işleyiş sırasında ciddi oranda hataya meyil söz konusu olduğu için replikasyonun güvenilirliği büyük risk taşımaktadır (Debele et al. 2006; Güney Eskiler 2017; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015; Onur et al. 2009).

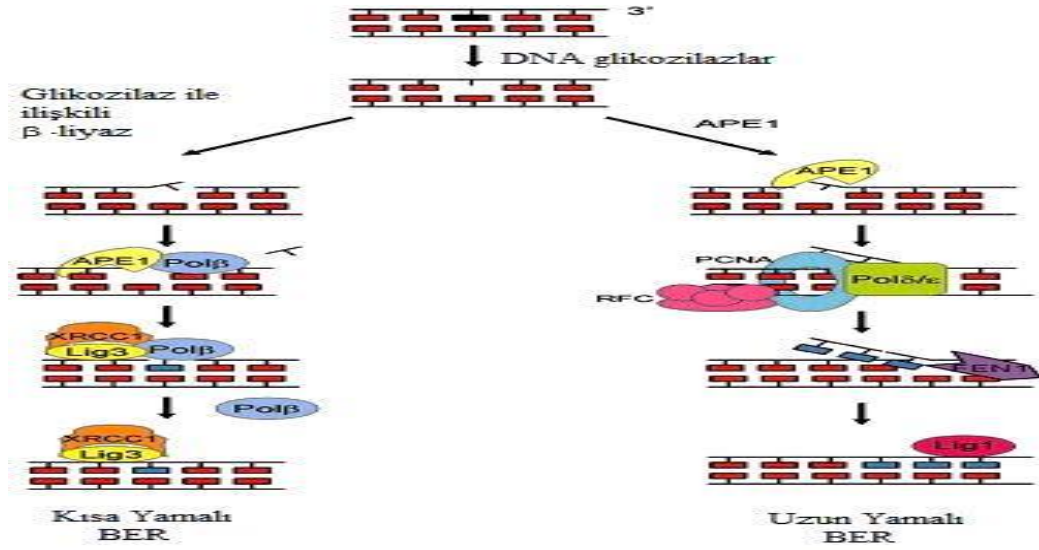
1.7.4. Doğrudan Olmayan (Dolaylı) Onarım

1.7.4.1. Kesip-Çıkarma (Eksizyon) Onarımı

En önemli onarım mekanizması olarak bilinen eksizyon ile onarım tüm prokaryot ve ökaryot canlılarda bulunmaktadır. Bu onarım mekanizmasında ana prensip, DNA’da meydana gelen hasarlı oligonükleotid kısımlarının çıkartılarak yerine doğru bazların doldurulması ve son olarak da oluşmuş çentiğin ligasyon ile kapatılmasıdır. Bu onarım mekanizması temel olarak 3 ana basamakta incelenmektedir. İlk basamakta hasarlı bölgenin tanınması ve devamında nükleaz enzimi tarafından enzimatik olarak kesilip çıkarılması, ikinci basamakta, nükleaz enzimi ile kesilip çıkarılması sonucu oluşan boşlukların DNA polimeraz enzimiyle doldurulması, son basamakta ise, DNA ligaz enzimi ile meydana gelen çentiğin tamamen kapatılmasıdır (Kurtoğlu ve Tekedereli 2015; Onur et al. 2009).

1.7.4.1.1. Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (BER = Base Exeision Repair)

Alkilasyon, deaminasyon ve replikasyon hataları gibi sebeplerden kaynaklı küçük DNA modifikasyonları BER (Base Exeision Repair [Baz Kesip-Çıkarma Onarımı]) tamir mekanizmasıyla onarılmaktadır. BER tamir mekanizmasında DNA polimeraz, DNA ligaz, DNA liyaz, AP endonükleaz ve DNA glikozilaz gibi enzimlerin önemli bir yere sahip oldukları bilinmektedir. Bu tamir mekanizması, kısa yamalı BER (short-patch, SP-BER) ve uzun yamalı BER (long-patch, LP-BER) olmak üzere iki ana yolağın oluşmaktadır. SP-BER yolağında tek baz değişimleri şeklinde tamir fonksiyonları yerine getirilirken LP-BER yolağında ise sayısı 2-8 arasında değişen nükleotidlerin kesilip çıkarılmasına dayalı tamir fonksiyonları görülmektedir. Her iki yolda da tamir mekanizması, ya spesifik olarak hataya yönelik tek fonksiyonlu veya birden çok fonksiyonel kapasiteye sahip DNA glikozilazlar ile tamir süreci başlatılabilmektedir. İnsan hücresinde tanımlı en az 12 tane DNA glikozilaz enziminin olduğu bilinmektedir. DNA glikozilazlar, söz konusu tamir yolağında abazik (AP) bir bölge oluşturarak baz ve şeker arasında kalan N-glikozidik bağların hidrolizasyonunu katalizlemektedirler. Buradaki AP bölgeler, DNA glikozilazların haricinde ayrıca spontan olarak radyasyon ve kimyasallar yoluyla da oluşturulabilmektedirler. Bu tamir mekanizmasında LP-BER yolağında APE1 endonükleaz (APEX1) ile ya da SP-BER yolağında ise glikozilaz ile ilintili β -liyazlar tarafından söz konusu bölgede çentikler meydana getirilerek abazik (AP) bölgeye komşu 3' hidroksil(OH) ucu oluşturulmaktadır. Oluşan bu boşluklar SP-BER ve LP-BER alt yolaklarda görevli DNA polimeraz enzimleri (pol β , ϵ , δ) ile doldurulmaktadır. Son olarak SP-BER alt yolağında ligasyon işlemi XRCC1 ile Ligaz-III enzim sistemleri tarafından yapılırken, LP-BER alt yolağında ise aynı işlem Ligaz-I enzimi ile gerçekleştirilmektedir (Debele et al. 2006; Kurtoğlu and Tekedereli 2015; Onur et al. 2009).



Şekil 1.5. Baz Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Onarımı (BER) (Kurtoğlu ve Tekedereli 2015)

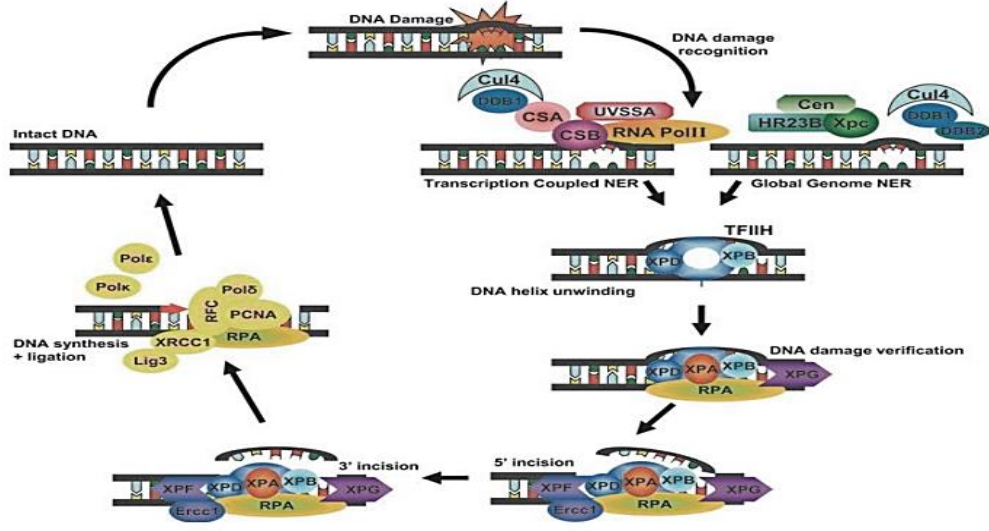
Dolayısıyla BER tamir mekanizması, yanlış şekilde eşleşen veya eşleşirken hasarlı olduğu anlaşılan bazların ortamdan uzaklaştırılmasında aktif olan bir mekanizma olduğu bilinmektedir (Debele et al. 2006; Onur et al. 2009).

1.7.4.1.2. Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (NER = Nucleotide Exeision Repair)

Bu onarım mekanizması, birden fazla farklı hasarı tanıyabilme gibi bir avantaja sahip olduğu için mikoplazmadan memeli organizmalara kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır. Özellikle güneşten gelen UV ışınları gibi karsinojenik etkilerden kaynaklı meydana gelen hasarlara karşı aktifleşen önemli bir savunma mekanizması olduğu bilinmektedir (Kurtoğlu ve Tekedereli 2015; Onur et al. 2009). NER tamir mekanizmasının işleyişi 6 ana basamakta incelenebilmektedir;

1. NER mekanizmasıyla ilk olarak hasarlı bölge tanınması.
2. Tanınan hasarlı bölgeye ilgili protein komplekslerinin gelip bağlanması.
3. İnsizyonun (lezyonun iki tarafından da hasara uğramış zincirde kesilmelerin yapılması)
4. Degradasyon (hasarlı oligonükleotidlerin ortamdan uzaklaştırılması)
5. Polimerizasyon (hasarlı oligonükleotidlerin ortamdan uzaklaştırılması sonucu DNA sarmalında oluşan boşluğun DNA polimeraz enzimi tarafından doldurulması)

6. Ligasyon (DNA polimeraz tarafından doldurulan bölgelerin yapıştırılması (Debele et al. 2006)



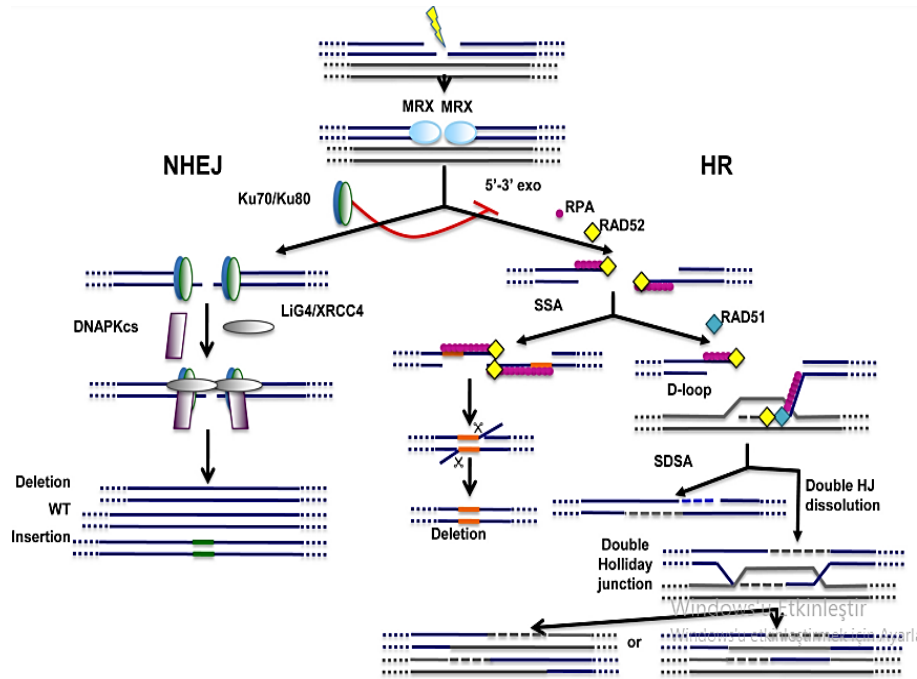
Şekil 1.6. Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (NER) (Kurtoglu ve Tekedereli 2015)

1.7.4.2. Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR; Mismatch Repair)

MMR onarımı ile DNA replikasyonu veya rekombinasyonu sırasında ortaya çıkan ve çift zincirde normalin dışında boyutlara sebep olan, normal bazların yanlış eşleşmeleriyle meydana gelen DNA hasarları düzeltilmektedir. DNA replikasyonunun doğru bir şekilde yapılıp yapılmadığını kontrol eden son onarım mekanizmasıdır. MMR mekanizması, replikasyondan sonra yanlış eşleşmelerin ve DNA halkalarının onarımını üstlenmektedir (Onur et al. 2009). Söz konusu tamirde, heterodimer yapıdaki MSH2-MSH3 ile MSH2-MSH6 gibi farklı iki protein kompleksi görev yapmaktadır. Burada bahsedilen MSH, replikasyon esnasında genomdaki tek zincir hatalarını tanıyıp onları onarmak veya hasara uğramış zincirlerin duplike olmasını engellemede görevli protein kompleksleridir. Hasarlı zincirin tanınması için özellikle MSH2 proteini, hasarın durumuna ve şiddetine MSH6 veya MSH3 proteinlerinden biriyle heterodimer bir yapı meydana getirmektedir. Bunun yanında, ATP bağımlı bir mekanizma olan MMR onarımı için insanlarda minimum 6 tane farklı proteine ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (Shi et al., 2014).

1.7.4.3. Çift Zincir Kırık Onarımı

Çift zincir kırıkları (DSBs), genetik bütünlüğün kaybıyla sonuçlanabileceğinden en yıkıcı etkilere sahip kromozomal kırıklardır. Söz konusu kırıklar, ekzojen kaynaklı (iyonize radyasyon, rodon bozunumu, genotoksik bileşen vb.) olabileceği gibi endojen kaynaklı (ROS, V(D)J rekombinasyonu vb.) olarak da meydana gelebilmektedir. Onarılamayan çift zincir kırıkları, kromozomlardaki kırıkların büyümesine dolayısıyla da hücre ölümüne sebebiyet verebilmektedir. Yanlış onarılma durumunda ise kromozomların translokasyonu ya da kanser riski oluşabilmektedir. İnsanlarda DBSs'nin tamiri 2 ana mekanizma ile yapılabilmektedir. Bu mekanizmalar; homolog rekombinasyon (HR) ve non-homolog uç birleştirme (NH-EJ). DBSs sırasında tamirin hangi mekanizma ile olacağı kullanılan spesifik bileşenlerinin konsantrasyon miktarlarına bağlı olduğu bilinmektedir (Debele et al. 2006; Kurtoğlu and Tekedereli 2015).



Şekil 1.7. Homolog rekombinasyon(HR) ve non-homolog uç birleştirme (NH-EJ) (Decottignies 2013)

1.7.4.3.1. Homolog Rekombinasyon (HR) ile Onarım

HR onarım mekanizmasının ile kalıp olarak kardeş kromatid kullanıldığı için çift zincirde meydana gelen kırıkların onarımı çoğunlukla hatasız bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu

yüzden yüksek güvenilirlik yüzdesine sahip olan bu onarım mekanizması, çift zincirde oluşan hataların onarımında sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Kardeş kromatitler baz alındığı için hücre döngüsünün S ve G₂/M evrelerinde gerçekleşen HR, onarımın yanı sıra replikasyonda çatalın korunması, telomerlerin bakımı ve mayoz-I'de oluşan kromozom dağılımlarının korunmasında da etkin rol oynamaktadır. Homolog rekombinasyonda ilk aşama olarak MRN kompleksi ile zincir kırıkları tanınmaktadır (Iyama and Wilson 2013; Slupphaug, Kavli, and Krokan 2003). Bir kırık sensörü olarak görev yapmakta olan MRN kompleksi Mre11, Rad51, Nbs1 protein üçlüsünden meydana gelmektedir. Bu kompleks, kaybın olduğu bölgedeki DNA'ya bağlandıktan sonra 5'-3' yönündeki kırık DNA'yı seçip kesmektedir. Bu işlem ile hasarı tanıyan protein komplekslerinin ilgili bölgeye çağrılmasını da tetiklemektedir. Aksi takdirde, HR regülasyonunda aktif rol alan genlerin mutasyona uğramaları, DNA çift zincir kırığında görev yapan onarım mekanizmalarının işlevlerini yerine getirememelerine sebebiyet vermektedir (Onur et al. 2009; Slupphaug et al. 2003).

1.7.4.3.1.1. Homolog Rekombinasyon ile BRCA1/2 İlişkisi

Tümör süpresör genler olarak bilinen BRCA1 ve BRCA2 genleri aynı zamanda homolog rekombinasyonda da etkin rol almaktadırlar. Özellikle BRCA1, DNA tamir mekanizmasının yanında hücre döngüsünün regülasyonunda da rol aldığı bilinmektedir. BRCA2 ise RAD51 proteiniyle oluşturduğu kimyasal bağlantıyla HR'nin düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu genlerin mutasyona uğramaları, fonksiyonlarını düzgün olarak yerine getirememelerine sebebiyet vermektedir (Johnson et al. 2013). Böyle bir durumda hücreler, büyümede orantısızlıklar yaşamakta ve bunun bir sonucu olarak da bölünme için gerekli talimatları yerine getiremediklerinden kontrolsüz proliferasyon sonucu tümör oluşturmaktadırlar. Bu bağlamda meme ve over kanserine yakalanma yatkınlığının temelinde, BRCA1/2 genlerinde meydana gelen mutasyonların rol oynadığı belirtilmektedir. Bu bilgiler göz önüne alındığında, BRCA1/2 mutasyonu geçiren hücrelerde HR temelli DNA tamir mekanizmalarının manipülasyonu hedeflenerek yeni terapötik stratejileri geliştirilmektedir (Jaspers et al. 2013; Ordonez 2014).

1.7.4.3.2. Serbest Uçların Homolog Olmayan Uçların Bağlanması ile Onarım (NH-EJ: Non-Homologous End Joining)

Bu onarım mekanizması, hücre döngüsünün haricinde bölünen veya bölünmeyen hücrelerde de görülmektedir. Hücre döngüsünün G₁ fazında daha aktif olduğu bilinmektedir. Bu onarım mekanizması çift zincirde meydana gelen kırık uçlarının modifikasyonunu sağlayarak birbirine bağlamaktadır. NH-EJ onarım mekanizmasıyla hasara uğramamış (sağlam) DNA kalıbına gereksinim duyulmadığı için hataya meyil söz konusu olabilmektedir. Dolayısıyla nükleotid kaybı ihtimali yüksek bir durumdur (Iyama and Wilson 2013). NH-EJ ile ilk etapta, DNA hasarı belirlenmektedir. Hasar belirlendikten sonra hatalı bölgeye uzak ve de yakın uçlarından bağlanan ve ilgili bölgeyi koruyan Ku70/Ku80 heterodimerik protein kompleksi göreve çağrılmaktadır. Bu kompleks, DNA-PKcs (DNA bağımlı protein parçalayıcı katalitik alt birim) ile birleşip DNA-PK holoenziminin oluşumunu sağlamaktadır. DNA-PK holoenzimi ise protein parçalayıcı fonksiyonunu yerine getirmektedir. Meydana gelen bu kompleksler DNA uçlarını hizalayıp stabilize olmasını sağlamaktadır. Son aşamada ise XRCC4/DNA ligaz IV kompleksi ile DNA uçlarının ligasyonu gerçekleşmektedir (Jeppesen, Bohr, and Stevnsner 2011; Slupphaug et al. 2003).

1.8. Programlı hücre ölümü: Apoptozis

1.8.1. Apoptozis

Apo (ayrı) + ptozis (düşen) kelimelerinin bir araya getirilmesiyle meydana gelen apoptozis, ilk olarak Avusturyalı bir patolog (J.F. Ker) tarafından literatüre kazandırılmış doğal bir ölüm programıdır. Kısaca hücrenin kendini yok etme/öldürme eylemi olarak tanımlanan bu ölüm programı, hücresel düzeyde ömür boyu süren bir dizi işlemler silsilesidir (Köse 2019). Daha radikal tanımı itibarıyla bu ölüm yolağı, programlı şekilde işleyen bir süreç olarak kabul gören, hücresel düzeyde biyolojik fonksiyonu sona ermiş veya kompleks organizmada artık ihtiyaç olmaktan çıkmış hücrelerin ortamdaki ayıklanması için gerçekleşen bir intihar eylemi olarak da açıklanabilmektedir. Kompleks organizmalar için hücre sayısındaki dengenin korunması adına hayati bir önem taşıyan bu ölüm programı, hücredeki growft (büyüme) faktörlerinin yanı sıra hücrenin kalsiyum

(Ca⁺) konsantrasyonundaki artışından da tetiklenebilmektedir (Andrew G Renehan, Catherine Booth 2019; Eda Köse 2019).

1.8.2. Morfolojik Olarak Apoptozis

Gelişmiş organizmalarda işlevselliğini yitirdiği için artık ihtiyaç olmaktan çıkmış hücrelerin canlı organizma adına minimum zararlar ortamdan uzaklaştırılması apoptozis ile mümkün olmaktadır. Bu ölüm mekanizması ömür boyu devam eden bir süreç olduğu bilinmektedir (Çiftçi 2017). Apoptoz sırasında ilk olarak hücre ölüm sinyali alır. Ölüm sinyali alındıktan sonra hücrede kromatinler sıkışır ve hücre yavaş yavaş parçalanmaya doğru sürüklenir. Son aşamada ise fagositoz gerçekleşir ve apoptotik süreç tamamlanır (Coşkun ve Özgür 2011).

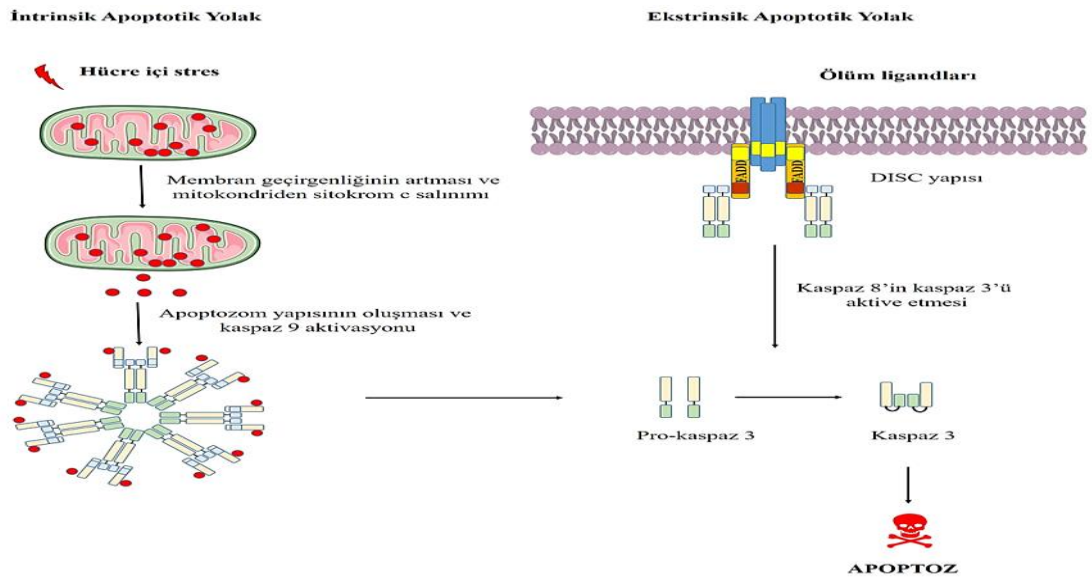
1.8.3. Apoptozisi Nekroz Gibi Diğer Ölüm Yolaklarından Ayıran Farklar

Hücresel düzeyde görülen başlıca ölüm mekanizmalarının apoptozis veya nekrozis olduğu bilinmektedir. Apoptozdan farklı olarak hasar yoluyla meydana gelmesi nekrozu ayrı bir yere koymaktadır. Nekrozis ayrıca ısı düzensizliği, ortamın oksijensizliği gibi kimyasal ve fiziksel faktörlerden de kaynaklı meydana gelebilmektedir. Çevresel faktörlerin haricinde enerjide yaşanan ani kayıplar nekrozis adına hücre zarında geçirgenliği önemli ölçüde değiştirmektedir. Bundan kaynaklı olarak hücrede şişmeler görülebilmekte devamında ise hücre zarında patlamalar meydana gelebilmektedir (Tsujimoto 2008). Oysa apoptozda fonksiyonelliğini kaybetmiş yaşlı, hasarlı vb. durumdaki hücreler programlı bir şekilde ölüme sürüklenmektedir. Bundan sebeple, apoptozda diğer ölüm yolaklarının aksine ölüm sırasında diğer hücrelerle olan temas kaybolmaktadır. Diğer hücrelerle temasın kaybolmasındaki en büyük etken ölüm sinyali alan söz konusu hücrenin büzülerek hacmini yarıya kadar indirmesi olarak bilinmektedir. Hacimsel olarak yarıya inen bir hücrede plazma membranı şekilsel değişikliklere uğramaktadır (Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptoz mekanizması gerçekleştiği yolak sayısı açısından intrinsek ve ekstrinsek olmak üzere iki ana yolda meydana gelmektedir. Bu mekanizma; p53, sitokrom-c, kaspazlar, spesifik iyonlar (Ca⁺ gibi), pro-apoptotikler (Bax, vb.), anti-apoptotikler (Bcl-2, vb.) gibi bir çok faktör tarafından regüle edilmektedir (Dinçel and Kul 2016).

1.8.4. Ekstresek Yolak (Hücre Dışından Kaynaklı Ölüm Reseptörleri Yolağı)

Gelişmekte olan organizmalarda ihtiyaç olmaktan çıkmış hücrelerin yok edilmesi, bağışıklık mekanizmasının indüklenmesi ya da uyarılan bağışıklık sistemi aracılığıyla tümörün eleme edilmesi gibi durumlarda görülmektedir. Hücre dışından gelen ve ölüm sinyallerini taşıyan reseptörler aracılığıyla meydana gelen apoptozun bu yolağında, TNF (Tümör Nekroz Faktör) ailesi üyeleri aktif rol oynamaktadır (Coşkun ve Özgür 2011). 80 aminoasitlik alt üyelerden oluşan TNF reseptör ailesi, ölüm sinyallerinin transferinde aktif olarak görev almaktadır. Ölüm reseptörlerine Fas, TNFR ve DR5 yapılarının bağlanmasıyla trimerik bir yapı meydana gelmektedir. Trimerik yapıdaki ilgili reseptör, pro-kaspaz ve adaptör rolündeki molekülle birleşerek DISC olarak bilinen ölüm sinyal kompleksini oluşturmaktadır. DISC kompleksi, pro-kaspaz 8'in aktifleşmesine zemin hazırlamaktadır. Aktif pro-kaspaz 8 doğrudan ya da dolaylı yollardan kaspaz-3'ün de aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktif hale gelen kaspaz-3, DNA fragmentasyonuna sebebiyet vermektedir (Andrew G Renehan, Catherine Booth 2019; Tsujimoto 2008).

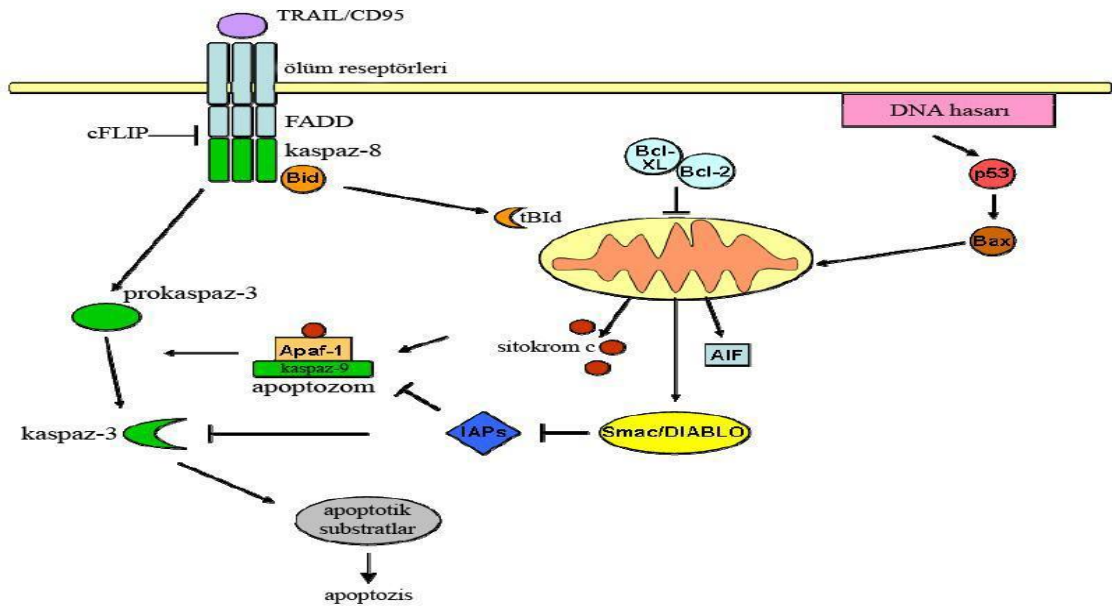


Şekil 1.8. Apoptozis yolları (Ichim & Tait, 2016)

1.8.5. İntrensek Yolak(Mitokondri Aracılı yol)

Bu yolak, reseptör sinyal transferinden farklı olarak mitokondri aracılı uyarılar tarafından indüklenmektedir. Hücre içindeki sinyal iletim mekanizmalarının da

yardımıyla ilgili hücre ölümüne yönlendirilmektedir. İntrensek yolağın doğrudan uyarılmasını sağlayan faktörlerin (toksik maddeler, vb) haricinde dolaylı olarak apoptozu indükleyen (sitokinler vb.) faktörlerin olduğu da bilinmektedir. Apoptozu doğrudan uyarıcı faktörlere pozitif sinyaller, dolaylı uyarıcı faktörlere ise negatif sinyaller denilmektedir (Ichim and Tait 2016). Bu yolağın ayrıca apoptozu indükleyen pro-apoptotikler ve apoptozu baskılayan anti-apoptotikler tarafından regüle edilmektedir. Örneğin; pro-apoptotik proteinlerin önemli bir üyesi olan Bax, ölüm sinyallerinin hücre içine alınmasıyla sitoplazmadan ayrılarak mitokondrinin dış zarına tutunmaktadır. Bax burada mitokondri permeabilitesini doğrudan regüle edebildiğinden dolayı mitokondriyal yolağın aktifleşmesini sağlayabilmektedir (Ağca 2019). Diğer taraftan anti-apoptotik bir protein olan TIGAR ise, glikoliz evresinin negatif bir düzenleyicisi olarak hücredeki ROS miktarının düşürülmesinde rol almaktadır. Böylece kanserli bir hücrenin programlı ölüm yollarına sürüklenmesine engel olduğu bilinmektedir (Poyya et al. 2021). Dolayısıyla verilen örneklerden de anlaşıldığı gibi, pro ve anti-apoptotik proteinlerin varlığı ve ekspresyonlarının dengesi, hücrenin kaderi açısından çok önemli bir yere sahip olmaktadır. İntrensek yolağın, doğrudan ya da dolaylı olarak ölüm sinyallerinin alınmasıyla mitokondriyal dış zar geçirgenliği artmakta ve devamında da mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımı gerçekleşmektedir. Sitoplazmaya ulaşan sitokrom-c burada Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) ile kompleks oluşturmaktadır. Apaf-1 ve inaktif durumdaki kaspaz-9'un etkileşimi sonucu apoptozom kompleksi meydana gelmektedir. Apoptozom kompleksinin aktivasyonu ile pro-kaspaz-9 aktifleşerek kaspaz-9'u oluşturmaktadır. Daha sonra kaspaz-9 da kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlayarak apoptozun indüklenmesini gerçekleştirmektedir (Coşkun ve Özgür 2011; Gültekin, Karaoğlu, ve Küçükates 2008; Tsujimoto 2008).



Şekil 1.9. Apoptozda mitokondri aracılı(intrensek) yolak(Eda KÖSE, 2019)

1.10. Çoklu İlaç Direnci (MDR; Multi Drug Resistance)

Hücresel düzeyde gelişen ilaç dirençleri, primer ve sekonder (kazandırılmış ilaç direnci) olarak ikiye ayrılmaktadır. Hiç bir ajan uygulanmadan ve hücrede kendiliğinden gelişen direnç primer ilaç direnci olarak adlandırılmaktadır. Kazanılmış direnç ise herhangi bir ilaçlı tedavi sonrasında meydana gelen veya sonradan spontane bir şekilde kazanılan direnç olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla, herhangi bir ajanın belirli bir süre uygulanması sonucunda ilgili ajana karşı hücrelerin yapı ya da etki mekanizmaları ile gösterdiği dirence çoklu ilaç direnci (MDR; Multi Drug Resistance) denilmektedir (Huang et al. 2016). Kanser hücrelerinde ise MDR'nin gelişimi, bağımsız ya da bağımlı bir şekilde birlikte çalışan moleküler mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalara, uygulanan anti-kanser ajanlarının hücre dışına atılmasında görevli proteinlerin fazla ekspresyonu, DNA tamir mekanizmalarının aktifleşmesi, apoptoz sinyal yollarının regülasyonu, hücredeki hipoksi ve pH değerleri gibi parametreler örnek verilebilmektedir. Ayrıca, MDR gelişiminde p53 geninde görülen mutasyonlar, Bcl-2 geninin aşırı ekspresyonu ve bunun devamında apoptozun baskılanması da örnek verilebilir (Demirel 2009; Selin 2017). Son yıllarda kanserli hücrelerde DNA tamir repertuarının manipülasyonuna yönelik yapılan çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan PARP inhibitör ajanlarına duyulan ilgi artmaktadır. Ancak, kullanılan PARPi ajanlarına

karşı da hücreysel düzeyde bir MDR gelişimi söz konusu olduğu için, PARPi'lere duyulan bu ilginin beraberinde tedavide istenmeyen sonuçlar noktasında bazı handikapları da meydana getirdiği görülmektedir. Önemli bir PARPi ajanı olarak metastatik meme kanseri tedavilerinde kullanılmak için FDA tarafından onay alan olaparib de kendisine karşı gelişen dirençten nasibini almıştır (Kakde et al. 2011; Xin et al. 2016).

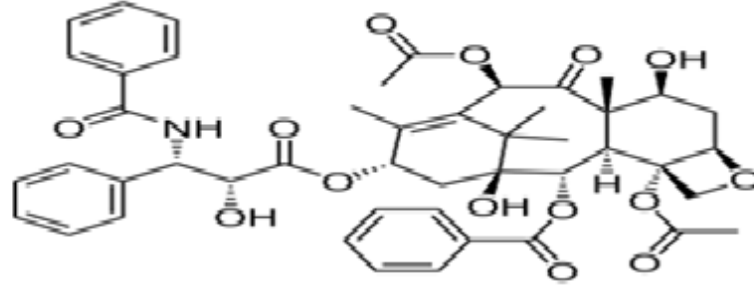
1.10.1. Olaparib Direnci

Yapılan çalışmalarda olaparibe karşı hücreysel düzeyde gelişen dirençte farklı mekanizmaların etkili olduğu rapor edilmiştir(Jaspers et al. 2013). Bu mekanizmalardan bir tanesinin ilaç akış pompası rolüyle tanınan ve uygulanan ilaçların hücre içi konsantrasyonlarının azalmasına sebebiyet veren P-glikoprotein (P-gp) olduğu bilinmektedir. Nitekim, uygulanan ilaçlar hücreye girdikten sonra P-gp ile bağlanarak bir kompleks oluşturduğu ve P-gp'nin de ATP enerjisini harcayarak oluşan bu kompleksin hücre dışına atılmasında etkin rol oynadığı bilinmektedir. Bu şekilde gelişen P-gp kökenli MDR'nin aşılması için uygulanacak anti-kanser ilaçlarla entegre bir şekilde P-gp inhibitörleri de hücreye verilerek yeni bir tedavi stratejisi geliştirilebilmektedir (Gajan et al. 2021; Xin et al. 2016). Meme kanseri vakalarının %40-50'sinde aşırı eksprese olduğu bilinen P-gp'nin ekspresyonunun baskılanması MDR'nin aşılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Olaparibe karşı direncin gelişmesinde etkili olan bir diğer önemli mekanizma ise BRCA1 ve BRCA2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin düşük olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Jaspers et al. 2013). Çünkü tümör supresör özellikleriyle bilinen BRCA1/2 genlerinin mutasyonlu olduğu hücrelerde PARP inhibisyonuna olan duyarlılık çok daha yüksek olduğu için bu duyarlılıktan faydalanılarak kanserli bir hücrenin hücre siklusu durdurulabilmekte ve apoptoz uyarılabilmektedir. Ayrıca, 53BP1'in (p53 bağlayıcı protein 1) ekspresyon seviyesinin kaybıyla HR yolağının yeniden aktivasyonu da olaparibe karşı MDR gelişiminde etkili olduğu belirtilen bir diğer direnç mekanizmasıdır (Ordonez, 2014; Cortesi et al., 2021; Santiago-O'Farrill et al., 2020).

1.11. Paklitaksel

Paklitaksel, yarı sentetik ve taksan grubundan bir ilaç olup pasifik porsuk diye de bilinen *Taxus brevifolia* ağacından elde edilmiştir. Meme, over, prostat ve mide gibi kanser

türlerinde sıklıkla kullanılan ve geniş etki alanına sahip olan antineoplastik ajanlardan biridir (Barbuti and Chen 2015; Masaroğulları 2010).



Şekil 1.10. Paklitakselin kimyasal formu (Masaroğulları 2010)

Paklitaksel anti-mikrotübül özelliğini barındıran bir ajan olduğu ve bu sebepten dolayı hücre döngüsünün M fazı üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bunun yanında DNA ve RNA'nın yanı sıra protein sentezinin inhibisyonunda da rol oynamaktadır. Bazı çalışmalar göstermektedir ki söz konusu kemoterapötik ajan, apoptozisi uyarmak için bir takım sinyal molekülleri ve gen ürünleri vasıtasıyla Bcl-2 ailesi üyelerini fosforile ettiği ve sitotoksiteyi sağlamak için hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu rapor edilmiştir (Masaroğulları 2010; Saunders et al. 1997; Topçul et al. 2018). Spesifik olarak, anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2 gibi) ekspresyonunu düşürüp pro-apoptotik proteinlerin ise (Bax gibi) gen ifadelerini arttırdığı ve böylece apoptozun uyarılmasında rol oynadığı belirtilmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda da paklitakselin, Bcl-2 ailesinin üyelerini fosforile etme suretiyle apoptozis indüklenmesinde aktif rol oynadığı kanıtlanmıştır (Ruvolo et al. 2001). Paklitaksel, metastatik meme kanseri vakalarında çok fazla Faz-II ve Faz-III çalışmalarında tekli ya da kombine tedavilerinde, etkisi ispatlanmış kemoterapötik bir ajan olduğu bildirilmiştir (Masaroğulları, 2010).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

PARP inhibitör olan olaparib Selleckchem (Houston, ABD); kemoterapötik ajan olan paklitaksel ise Medchem Express (Monmouth Junction, ABD); DMSO (Dimetil Sülfoksit) Bioshop Canada'dan, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) ve FBS (Fetal Bovine Serum) Gibco'dan; penisilin/streptomisin, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) Lonza (Basel, İsviçre) firmasından temin edildi. Tripkan mavisi, tris HCl, tripsin-EDTA, TEMED (tetrametilendiamin), Commasi Bluemavi boyası, sodyum asit (NaN_3), luminol, yağsız süt tozu, ponceau S, fosforik asit (H_3PO_4), p-kumarik asit, fenilmetilsülfonil florür (PMSF), benamidin, hekzan, kloroform, metanol, etanol, gliserin, gliserol, sodyum dodesil sülfat, bovin serum albümin (BSA) Sigma Aldrich firmasından; hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum hidroksit (NaOH), glisin, Tween-20, bromfenol mavisi, β -merkaptotanol, EDTA (etilendiamintetraasetik asit), Merck firmasından temin edildi. Hücre proliferasyon kiti I (MTT) Roche firmasından temin edildi. Kitlerle yapılan analizler, üreticilerin protokollerine göre gerçekleştirildi. Primer antikorlardan Bcl-2 (sc-7382, 1:1000-1:5000), GAPDH (#sc-365062, 1:1000-1:5000) ve TIGAR (#sc-377065, 1:1000-1:5000) Santa Cruz'dan, Bax (#ab-7977, 1:1000-1:5000) ise Abcam Biotechnology firmasından satın alınmıştır. Anti-rabbit(#bs-0295G-HRP) ve anti-mouse(#bs-0295G) antikorlar Bioss firmasından temin edilmiştir. Olaparib ve paklitaksel stok çözeltileri DMSO içinde hazırlandı ve -80°C dereceye kaldırıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini

Meme kanseri hücre hattı MCF-7, ATCC'den (American Type Culture Collection) satın alındı. Hücre kültürü şartları altında, sürekli seleksiyon metoduyla *in vitro* olarak Olaparibe karşı direnç kazandırılmış MCF7 hücre hattı [MCF-7/ PARP Inhibitor Resistance (PIR)]

2.2.1.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması

-80°C'de bulunan hücre hatları, 37 °C'deki su banyosunda çözündürüldü ve 25cm²'lik flasklara ekildi. Her bir flaska 10ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) eklendi. Flasklara ekim işlemi tamamlanan hücre hatları 37 °C sıcaklık, nem ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

2.2.1.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması

MCF-7 ve MCF-7/PIR hücrelerinin çoğaltıldığı flasklardaki konfülens %80-90'na ulaştığında, flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra ölü hücrelerin uzaklaştırılması için flasklar fosfat tampon solüsyonu(PBS) ile yıkandı. Ardından yüzeye yapışan hücrelerin kaldırılması için flasklara 1X Trypsin/EDTA (%0.25 trypsin/ 1mM EDTA) solüsyonu bırakıldı. Devamında flasklar 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve nemli inkübatörde 3-5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tripsinin hücrelere zarar vermesini önlemek amacıyla flasklara eklenen tripsin miktarının 2 katı kadar besiyeri eklendi. Daha sonra falkon tüpündeki hücre örnekleri 1200 rpm'de ve 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Ardından tüplerdeki süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet kısmında kalan hücre yoğunluğuna uygun miktarda hücreler besiyeri ile süspanse edildi. Falkondaki her bir hücre hattından 150 µl alınarak flasklara bırakıldı. Flasklar 10 ml besiyeri ile tamamlanarak 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve nem içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.1.4. Hücre Sayımı

Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Falkonda kalan hücre pelleti üzerine 3ml besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından 100µl hücre solüsyonundan 100µl de tripan blue boyasından alınarak 1,5'lik ependorf tüpü eklendi ve örnek iyice pipetaj yapıldı. Hazırlanan ependorftaki solüsyondan thoma lamına 10µl bırakıldı. Mikroskop altında thoma lamındaki kareli alanın içinde kalan hücreler sayıldı. Sonucun güvenilirliği için sayım işlemi tekrarlandı. Tüm sayımların ortalaması alınarak toplam hücre sayısı, toplam hücre sayım formülü ile hesaplandı. 1 ml'de hücre hesabı üzerinden 3 ml'deki toplam hücre sayısı belirlendi.

2.2.1.5. Hücrelerin Hatlarının Stoklanması

Trypsin ile kaldırılan ve ardından santrifüj edilen hücrelerin thoma lamı ile sayımları yapıldı. Sayım işleminden sonra her bir hücre hattı için ayrı ayrı cryo tüpleri etiketlendirildi ve etiketlendirilen cryo tüplere sırasıyla 900µl hücre besiyerinden 100µl de DMSO eklendi. Hazırlanan cryo tüpler - 80°C'ye kaldırıldı.

2.2.2. Dirençli Hücre Hattının(MCF-7/PIR) Elde Edilmesi

MCF-7 hücre hattına sürekli seleksiyon metoduyla Olaparib uygulanmasıyla olaparib'e karşı dirençli MCF-7/PIR hücreleri elde edildi. MCF-7 hücrelerinde olaparib'in IC₅₀ değeri (5.8 µM) belirlendi. IC₅₀ değerine göre sürekli seleksiyon metoduyla hücrelere uygulandı. Böylece olaparibe karşı direnç mekanizmasını kazanmış dirençli MCF-7/PIR hücre hattı elde edildi.

2.2.3. WST-1 (Water Soluble Tetrazolium-1) Analizi

Burada çalışma prensibi olarak, hızlı bir proliferasyon geçiren hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile renksiz bir tuz olan tetrazoliumu kullanarak renkli bir ara ürün olan formazona (mor) dönüşümünü sağlamak ve meydana gelen renk değişimlerini ELISA veya spektrofotometre ile absorbanslarını ölçmeye dayalı bir test tekniğidir. WST-1 ise, radyoaktif bir özelliğe sahip olmadığı için spektrofotometre ile hücrelerin proliferasyon ve canlılık miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılan bir

reaktiftir (Tokur ve Aksoy 2017). Hücreler DMEM besi yerlerinde %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Daha sonra 96'lı hücre kültür kaplarındaki her kuyucuğa ekilecek hücre miktarı optimize edildi. Olaparib ve paklitakselin MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin ölçülmesi için WST-1'in kit protokolüne uygun hücre ekimleri yapıldı. Bu doğrultuda her iki hücre hattından da her kuyucuğa 3x10³ hücre gelecek şekilde 96'lı kültür kabına ekim yapıldı. Ardından gece boyunca inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışması sağlandı. 24 saatin ardından hücre hatlarına belirlenen konsantrasyonlarda olaparib (1, 2.5, 5, 10, 100µM) ve paklitaksel (0.01, 0.2, 0.5, 1, 5nM) ilaç tedavileri yapıldı. 48 saat sürecek tedavi için örnekler tekrar inkübatörde bekletildi. Tedavi süresi dolduktan sonra kit protokolüne göre kuyucuklara 10µl WST-1 ilave edildi. 3 saat inkübasyonun ardından 490nm'de ELISA cihazı ile ölçüm alındı.

$$\%Canlılık = \frac{\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması}}{\text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}} \times 100$$

2.2.4. Koloni Sağ-Kalım (Klonojenik) Analizi

Koloni sağ-kalım yöntemi, sitotoksik ajanların uygulanmasıyla hücrelerin koloni meydana getirme potansiyeli üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Rafehi et al. 2011). MCF-7 ve MCF-7/PIR hücrelerinin proliferasyon hızları göz önünde bulundurularak 6'lı hücre kültür kaplarına ve her kuyuya 750 hücre gelecek şekilde ekimleri yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra 24 saat boyunca %5 CO₂ inkübatörde 37 °C'de hücreler inkübe edildi. Ardından 2.5, 5, 10µM AZD2281 ve 1, 10, 100nM Paklitaksel ile tedaviler yapıldı. Daha sonra örnekler 48 saat süre ile tekrar inkübe edildi. 48 saatin sonunda tedavi sonlandırıldı ve kuyucuklara temiz medium bırakıldı. 10-14 gün boyunca hücreler inkübasyona bırakılarak koloni oluşum süreçleri ve hızları takip edildi. Kolonilerde beklenen büyüklükler elde edilinceye kadar süreç boyunca 2-3 günde bir hücrelerin besiyerleri tazelandı. Koloni yoğunlukları beklenen seviyeye geldikten sonra deneyi sonlandırmak için kuyucuklardaki medium oda sıcaklığında aspire edildi. Ardından her kuyucuğa 2 ml asetik asit ve metanol çözeltisi (3:1) ilave edildi. 10 dk'lık bir beklemeden sonra kuyucuklardaki sıvı kısım aspire edildi. Daha sonra her kuyucuğa 3 ml kristal viyole (100:0,5) bırakıldıktan sonra 15 dk beklendi. 15 dk'lık bir beklemenin

ardından 6 kuyucuklu hücre kültür kapları dikkatli bir şekilde yıkanarak boyanın da aspirasyonu sağlandı. Yıkama işleminden sonra hücre kültür kapları oda sıcaklığında gece boyunca kuruması için bekletildi. 6'lı hücre kültür kapları bilgisayar ortamında taratılıp kayıt altına alındı. Son olarak kuyucuklardaki 50 ve daha fazla hücrelerin oluşturduğu koloniler sayılarak kolonilerin yer kaplama, hayatta kalma gibi fraksiyonları değerlendirildi.

2.2.5. Wound Healing (Yara İyileşmesi) Deneyi

Yara iyileşmesi deneyi ile hücre polarizasyonunun yanı sıra değişken kültür şartlarında hücrelerin proliferasyon ve göç etme (migrasyon) hızlarının analiz edilmesi amaçlanmaktadır. Bu yöntem ile ekilen hücreler tek katmanlı olarak istenilen konfülsense ulaştıktan sonra yara alanı oluşturulmakta ve oluşturulan yara alanı açıklığının zamana bağlı olarak kapanması mikroskop yardımıyla görüntülenmektedir. Buradaki yara alanının kapanma süresi; kullanılan hücre hattına, hücrenin içinde bulunduğu kültür koşullarına ve yara alanının genişliğine göre değişkenlik göstermektedir (Liang et al. 2007).

İlk olarak, 24 kuyulu kültür kabında her kuyucuğa 5×10^4 hücre gelecek şekilde MCF-7/PIR hücre hattının ekimi yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra hücreler istenilen konfülsense ulaşmaları için iki gün inkübe edildi. Ardından farklı dozlarda olaparib 0.2, 0.5, 1, 5, 10 μ M), paklitaksel (1, 2, 4, 6, 8nM) daha sonra da olaparibin iki dozu (5, 10 μ M) ile paklitakselin tüm dozları kombine edilerek tedaviler yapıldı. Yapılan tedavilerle eş zamanlı olarak kuyucuklardaki zemin steril ve ince bir pipet ucu yardımıyla dikkatli bir şekilde kuyunun çapı boyunca çizildi. Burada migrasyon ve proliferasyon testi için çizilen zeminin düzgün ve tek yöne olmasına dikkat edildi. Tedavi ve çizim işlemlerinin hemen devamında hücrelerin ilk (0. saat) görüntüleri daha sonra ise sırasıyla 6, 24, 48, 72 ve 96. saat görüntüleri inverted mikroskop ile çekildi.

2.2.6. Akridin Oranj – Etidyum Bromür Boyama Deneyi

Akridin oranj - etidyum bromür boyama deneyi ile ilgili hücrenin apoptotik süreci hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Deneyde kullanılan akridin oranj boyası, vital bir boya olduğu için canlı hücrelerin DNA'sına bağlanarak yeşil renk vermektedir. Non-vital bir boya olan etidyum bromür ise ölü veya nekrotik hücrelerin çeperlerine bağlanıp kırmızı renginde görülebilmektedir. Aynı zamanda deneyde hücrelerin morfolojik değişimleri ve yeşil-kırmızı arasındaki renk diyagramları analiz edilerek hücrelerin erken veya geç apoptotik süreçleri hakkında yorum yapılabilir (Shakeri et al. 2019). Yeteri yoğunluğa sahip olan MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatları ekim için toplandı. Hücre hatlarının proliferasyon hızları göz önünde bulundurularak 6'lı hücre kültür kaplarında her kuyucuğa 1×10^5 sayıda hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra 24 saat boyunca %5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de hücreler inkübe edildi. Ardından, farklı dozlarda olaparib (0.2, 0.5, 1, 5, 10 μ M) ile hem MCF -7 hem de MCF-7/PIR hücre hattının tedavisi yapıldı. Aynı şekilde ve yine aynı doz kombinasyonlarıyla MCF -7 ve MCF-7/PIR hücre hatları Paklitaksel ile (0.2, 0.5, 1, 5, 10nM) de tedavi edildi. İki hücre hattında da farklı dozlarda Olaparib ve Paklitaksel ile ayrı ayrı tedaviler yapıldıktan sonra, bir başka 6'lı hücre kültür kabında söz konusu ilaçların kombinasyonları (1nM-Pak+10 μ M-Olp, 2nM-Pak+10 μ M-Olp, 4nM-Pak+10 μ M-Olp, 6nM-Pak+10 μ M-Olp, 8nM-Pak+10 μ M-Olp) ile direnç kazandırılmış olan MCF-7/PIR hücre hattı tedavi edildi. Daha sonra 48 saat süre ile örnekler tekrar inkübe edildi. İnkübasyonun ardından deneyin sonuç alma aşaması için hücreler kültür kaplarındaki kuyucuklardan dikkatli bir şekilde toplanarak etiketlenen ependorf tüplerine transfer edildi. Daha sonra, 4°C sıcaklıkta, 2500 rpm'de ve 10 dk. süre ile örnekler santrifüj edildi. Santrifüjden sonra ependroflardaki süpernatant kısım dikkatli bir şekilde aspire edildi. Devamında ependorflara sırasıyla 50 μ l PBS bırakıldı. Ardından, akridin oranj ve etidyum bromür (1:1) boya hazırlandı. Daha sonra, dozlara göre etiketlenen lamaların üzerine sırasıyla 30 μ l ependroflardaki hücre örneğinden ve 10 μ l de hazırlanan boyadan bırakıldı. Devamında, lamaların üzerindeki örnekler taşmayacak şekilde lamellerle kapatıldı ve boyanın canlı veya ölü hücrelere nüfus edebilmesi için örnekler 10 dk karanlık bir ortamda inkübe edildi. Beklemenin ardından görüntü almak için örnekler sırasıyla floresan-inverted mikroskop altına alındı ve sonuçlar değerlendirilmek üzere kayıt edildi.

2.2.7. Western Blot Yöntemi

Western blot ile poliakrilamid jelde koşturulan protein örneklerinin destek membrana aktarılması ve buradaki örneklerin immünolojik yöntemlerle belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Ustuner 2010).

2.2.7.1 Protein İzolasyonu

MCF-7/PIR hücre hattına 48 saat boyunca 1nM Paklitaksel, 10 μ M Olaparib ve ikisinin kombinasyonu (1nM Paklitaksel + 10 μ M Olaparib) tedavi dozları uygulandı. Protein izolasyonu için 6 cm'lik hücre kültür kaplarına 3x10⁵ sayıda olacak şekilde ekilen hücrelerin tedavi inkübasyon süresinin ardından kültür kaplarındaki besi ortamları aspire edildi. Daha sonra 6 cm'lik hücre kültür kabının her biri 1 ml soğuk ile PBS yıkandıktan sonra hücreler kazıyıcı yardımıyla dikkatli bir şekilde toplandı. Toplanan hücreler 1,5 ml'lik ependorf tüplerine bırakılıp etiketlendirildi. Etiketlenen örnekler devamında 4°C sıcaklıkta, 6600 rpm'de ve 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ependorflardaki örneklerin pellet kısmı alındı ve Proteaz inhibitörleri (Leopeptin, Benzamidin, DDT, PMSF) ile liziz buffer (1:1000) hazırlandı. Ardından hazırlanan liziz bufferdan pellet kısmı alınan ependorflardaki örneklerin üzerine 250 μ L bırakıldı ve daha sonra hücrede protein dışında geriye kalan yapıların parçalanması için enjektör yardımıyla pipetaj yapıldı. Pipetajı yapılan örnekler buz dolu küvetin içinde 50 dk bekletildikten sonra ikinci bir pipetaj daha yapıldı ve örnekler 10 dk boyunca tekrar buzun içinde bekletildi. Daha sonra örnekler 4°C sıcaklıkta, 14000 rpm'de ve 10 dk süre ile ikinci bir santrifüj daha yapıldı. Santrifüjün ardından örneklerin süpernatant kısımları alınarak etiketlendirilen yeni ependorf tüplerine alındı. Tüm işlemler buz dolu küvetin üzerinde yapıldı. Bu işlemlere paralel olarak Commesie blue (4:1) boyası hazırlandı ve spektrofotometre tüplerine 1'er ml bırakıldı. Daha sonra spektrofotometre tüplerine örneklerden 5'er μ L bırakıldı ve spektrofotometrede ölçümler alındı. Spektrofotometrede alınan protein konsantrasyon değerlerine göre örneklerden jelle yükleme miktarları hesaplandı. Daha sonra ependorf tüplerinde olan örnekler Laemli Sample Buffer (4:1) ile tamamlanarak proteinlerin primer hallerini elde etmek için 96°C'de ve 5dk süre ile denatürasyonları sağlandı. Thermomixerde denatürasyonları tamamlanan örnekler 2-3 dakika oda sıcaklığında soğutulduktan sonraki işlem için +4°C'ye kaldırıldı.

2.2.7.2. Jel Hazırlama

Kaset hazırlandı ve yerleştirildi. Saf su kullanılarak kasette sızıntı olup olmadığı kontrol edildi. 50'lik falkon tüpünde separating jel bileşenleri (H_2O , %30 akrilamid mix, 1.5M Tris, %10 SDS, %10APS, TEMED) hazırlandı. Separating jel kasete döküldükten sonra jelin üst kısmı propanol ile tamamlandı. Oda sıcaklığında jelin donması beklendi. Propanol ile separating jelin seviyesi sabitlenip donması gerçekleştiikten sonra Jelde örneklerin yükleme yerinin tayin edilmesi için dikkatli bir şekilde tarak yerleştirildi. Daha sonra stacking jel (H_2O , %30 akrilamid mix, 1.5M Tris, %10 SDS, %10APS, TEMED) hazırlandı ve kasetin geri kalan kısmı stacking jel ile dolduruldu. Jelin polimerleşmesi için beklendi.

2.2.7.3. Örnekleri Yükleme

Spektrofotometrede proteinlerin alınan konsantrasyon değerlerine göre örneklerden jele yüklenecek miktarlar hesaplandı. Daha sonra Mini-PROTEAN® cihazı ile yüklemeye göre uygun büyüklükte hazırlanmış SDS-PAGE (%12-15)(Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) jel kaseti (Bio-Rad, ABD) elektroforez tankına konuldu. Elektroforez tankı taze hazırlanan 1X Running buffer ile uygun seviyeye kadar dolduktan sonra dikkatli bir şekilde jeldeki tarak çıkarıldı. Kuyucukların düzgün ve kirli olmadığından emin olduktan sonra sample buffer, marker ve örneklerin sırasıyla yüklemeleri hesaplanan ölçüm değerlerine göre yapıldı. Yükleme işleminden sonra elektroforez cihazı güç kaynağına bağlandı ve örnekler 20mA'de yaklaşık 2 saat süre ile yürütüldü. Protein örneklerinin moleküler ağırlıklarına bağlı olarak bantların açılması için markerlar jelin altından akmaya yakın elektroforez durduruldu.

2.2.7.4. Transfer İşlemi

Elektroforez aşaması tamamlandıktan sonra transfer işlemi ıslak şekilde yapılacağı için kurutma ve filtre kâğıdı 1X transfer buffer ile membran ise menatol ile ıslatıldı. Elektroforez işlemi bitince tanktan çıkarılan kaset açıldı ve kasetteki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Elde edilen jel, sünger/filtre kağıdı/jel/membran/filtre kağıdı/sünger şeklinde hazırlanan sandviç kasetine yerleştirildi. Hazırlanan sandviç da elektroforez tankına kutuplarına dikkat edilerek yerleştirildi. Sandviç hazırlanırken membran ile jel

arasında hava kabarcığının kalmamasına özen gösterildi. Transfer işleminin sağlığı açısından elektroforez tankının içerisine hacme göre 1-2 buz poşeti bırakıldı. Ardından +4°C’de bekletilen soğuk 1X transfer buffer dikkatli bir şekilde elektroforez tankının içerisine sandviçi kaplayacak şekilde döküldü. Protein örneklerinin 220mA’de 2 saat süre ile yürütülerek jelden poliviniliden diflorür (PVDF) membranına doğru transferi gerçekleştirildi. Transfer tamamlandıktan sonra işlemin başarısını kontrol etmek için transferde elde edilen membran Ponceau S solüsyonu ile yaklaşık 10 dakika muamele edildi. Proteinlerin(bant) görüntüleri membranda elde edildikten sonra membran ilk önce distile su ile devamında ise %0.1’lik hazırlanan Tween 20’li 1X TBS-T (+ 900 µl dH₂O + 100 µL TBS + 2ml Tween 20) tamponuyla yıkandı ve bloklama işlemine hazır hale getirildi.

2.2.7.5. Bloklama İşlemi

Transfer sonrası elde edilen membran (50 mM Tris, 150 mM NaCl,% 0.5 Tween-20, pH 7.5) içinde hazırlanan% 5 yağsız süt ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından membran 5dk/5kez TBS-T tamponu ile yıkandı.

2.2.7.6. Primer (Birincil) Antikor ile İnkübasyon İşlemi

Hazırlanan membran, bloklama çözeltisi içinde farklı oranlarda dilüe edilmiş ve HR, MDR gibi yolaklarla ilişkili anti-mouse TIGAR (#sc-377065, 1:1000), anti-mouse GAPDH (#sc-365062, 1:1000), anti-rabbit Bax (#ab-7977, 1:1000) ve anti-mouse Bcl-2 (#sc-7382, 1:1000) ile +4°C’de çalkalayıcı (25rpm) bir zemin üzerinde bir gece süre boyunca primer antikorda inkübe edildi. Ertesi gün alınan membran 5dk/5kez TBS-T ile yıkandı.

2.2.7.7. Sekonder (İkincil) Antikor ile İnkübasyon İşlemi

Birincil antikor ile inkübe edildikten sonra membran, yine bloklama çözeltisi içerisinde farklı oranlarda dilüe edilmiş Anti-Rabbit IgG (#bs-0995G, HRP, 1:5000) ve Anti-Mouse IgG (#bs-0295G, HRP, 1:5000) sekonder antikorda 1 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin sonunda alınan membran 5dk/5kez TBS-T ile yıkandı.

2.2.7.8.Görüntüleme

İşaretlenmiş olan proteinlerin görüntülenip analizlenmesi amacıyla membran, oran olarak 1:1 şeklinde hazırlanan A-B solüsyonu (kemilüminesan solüsyonları) ile yaklaşık 2 dakika boyunca muamele edildikten sonra membrandan X-Ray cihazı ile görüntüler filme aktarıldı. Bantların yoğunlukları İmage-J programı ile analiz edildi ve sonuçlar kullanılmak üzere kayıt altına alındı.

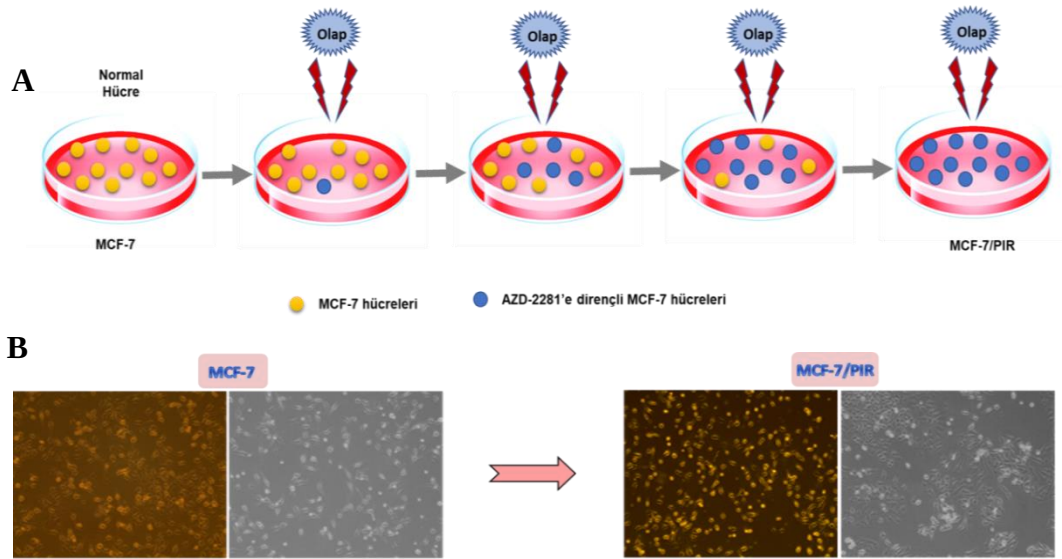
2.2.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi AnovaTukey ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar, * $p<0.05$; ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ şeklinde gösterilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Dirençli MCF-7/PIR Hücrelerinin Elde Edilmesi

MCF-7 hücre hattına düzenli olarak AZD-2281 uygulanmasıyla AZD-2281'e karşı dirençli MCF-7/PIR hücreleri elde edildi. MCF-7/PIR hücrelerinde AZD-2281'in IC_{50} değeri 5.8 olarak belirlendi. IC_{50} değerine göre belirlenen doz aralıkları hücrelere uygulandı. En düşük doz konsantrasyonundan başlayarak adım adım doz artırıldı ve dirençli hücreler elde edildi. Hücreler direnç kazanırken belirli periyotlarda inverted mikroskop altında çekilen görüntülerinde morfolojik yapılarının da doza paralel olarak değiştiği gözlemlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. (A) MCF-7 meme kanseri hücre hattında, adım adım AZD-2281(Olaparib) kullanılarak AZD-2281'e dirençli MCF-7/PIR hücrelerinin elde edilmesi. (B) normal MCF-7 ve AZD-2281'e dirençli MCF-7/PIR hücrelerinin morfolojik görüntüleri (20X)

3.2. Hücre Hatlarına İlaçların Tekli Uygulanmasıyla (Monoterapi) Elde Edilen Sonuçlar;

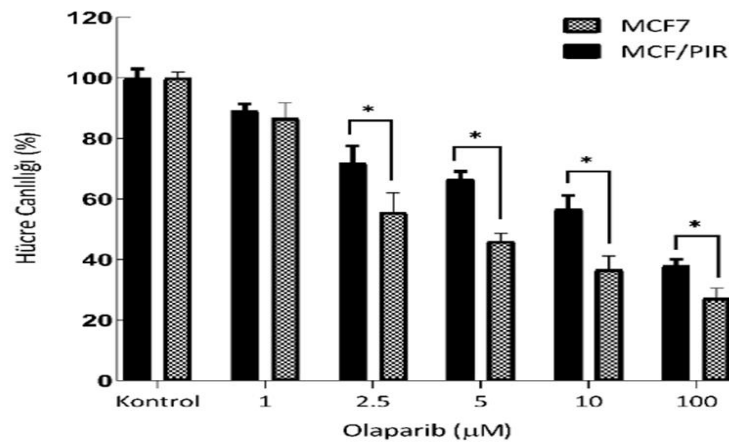
Normal MCF-7 hücre hattı ile direnç kazandırdığımız MCF-7/PIR hücre hatları tekli olaparib ve tekli paklitaksel ile tedavi edildi. Uygulanan iki ajanın da zamana ve doza bağlı hücre hatlarına olan etkileri karşılaştırılarak apoptotik süreçleri incelendi.

3.2.1. Hücre Canlılığının WST-1 (Water Soluble Tetrazolium-1) Yöntemiyle Belirlenmesi

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla, WST-1 kiti üretici firmanın geliştirdiği protokol uygulanarak gerçekleştirildi (bkz. 2.2.3).

3.2.1.1. Farklı Dozlarda MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücrelerine Uygulanan Olaparibin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

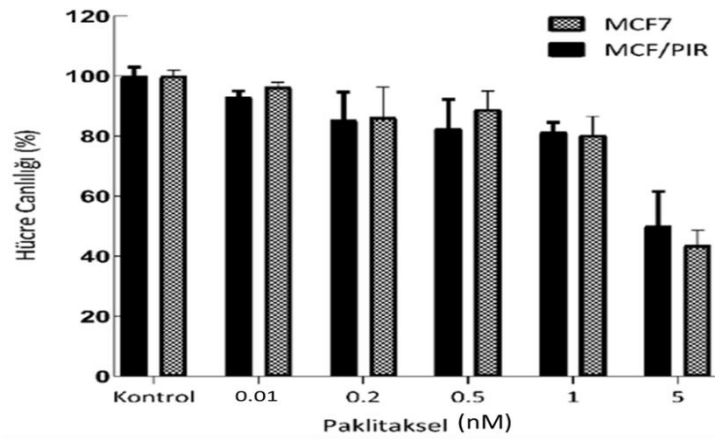
MCF-7 hücreleri olaparib ile tedavi edildiğinde herhangi bir direnç durumu söz konusu olmadığı için tedavide kullanılan doz miktarı artıkc hücre canlılığında gözle görülür bir farkın meydana geldiği görüldü. MCF-7/PIR hücreleri aynı dozlarda olaparib ile tedavi edildiğinde IC₅₀ değerinin altındaki dozlarda dirençten kaynaklı olarak hücre canlılığında anlamlı bir farkın olmadığı ancak IC₅₀ değerinin üstündeki dozlarda ise normal hücrelerle karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın meydana geldiği gözlemlendi. Dirençli hücreye olaparib uygulandığında IC₅₀ değerine kadar hücre proliferasyonunda anlamlı bir değişim olmadığı halde söz konusu değerin üstündeki dozlarda hücre proliferasyonunda ciddi bir azalmanın olduğu görüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. MCF-7 ve MCF-7/PIR hücrelerine farklı dozlarda uygulanan olaparibin hücre canlılığı üzerine etkisi

3.2.1.2. Farklı Dozlarda MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücrelerine Uygulanan Paklitakselin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7 ve MCF-7/PIR hücreleri paklitaksel ile tedavi edildiğinde her iki hücre hattında da paklitaksele karşı herhangi bir direnç durumu olmadığı için doz bağımlı olarak hücre canlılığında bir azalmanın olduğu gözlemlendi. Ancak hücre canlılığında meydana gelen bu değişimin normal ve dirençli hücre hatlarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 3.3).



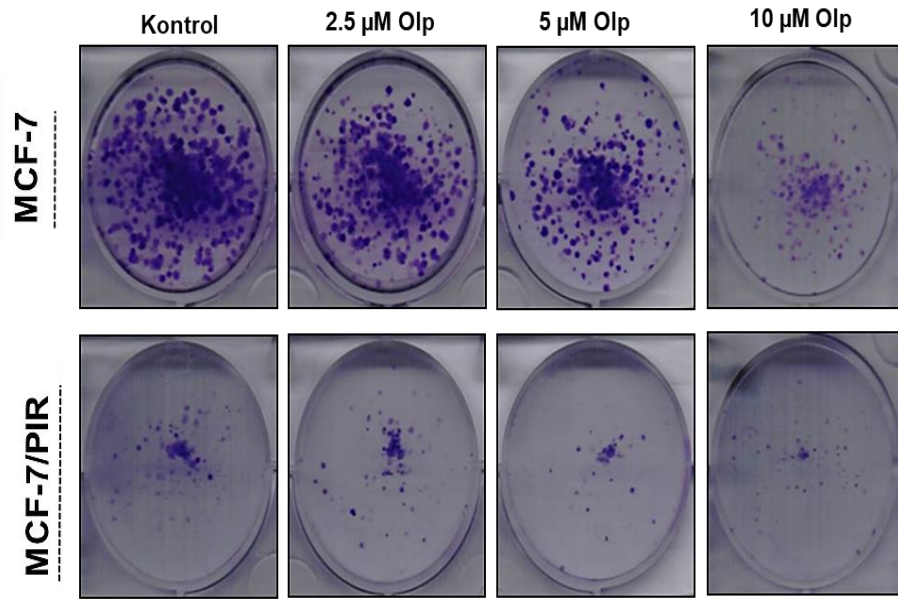
Şekil 3.3. MCF-7 ve MCF-7/PIR hücrelerine farklı dozlarda uygulanan paklitakselin hücre canlılığı üzerine etkisi

3.2.2. Koloni Sağ-Kalım Deney Sonuçları

Koloni sağ-kalım yönteminde farklı kemoterapötik ve sitotoksik ajanların uygulanmasıyla hücrelerin koloni meydana getirme potansiyeli üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak amaçlandı.

3.2.2.1. Olaparibin MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının Farklı Sayıda Ekilen Koloni Sağ-Kalım Formasyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

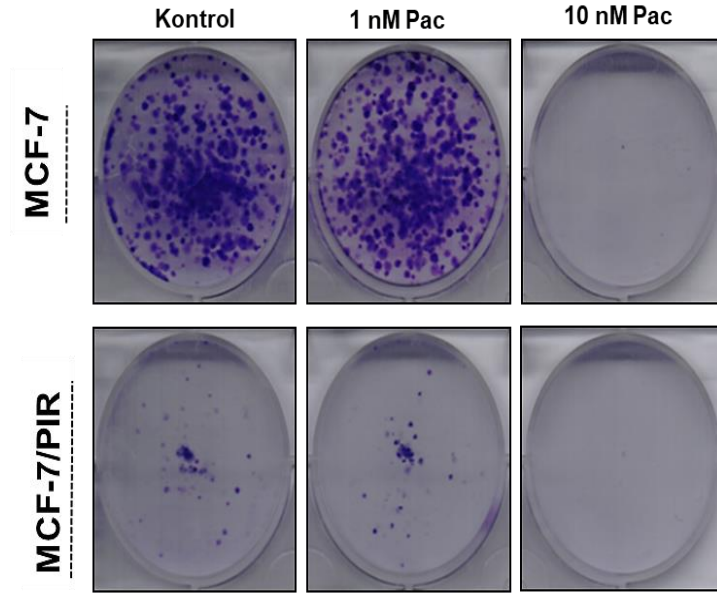
MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarından 6'lı hücre kültür kaplarındaki her kuyucuğa 750 sayıda hücre ekimi yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 11. MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarına farklı dozlarda uygulanan olaparibin (2.5, 5, 10 μ M) 48 saatlik tedavisi sonrası hücrelerin sağ-kalımı üzerine etkisi

3.2.2.2. Paklitaksel'in MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının Farklı Sayıda Ekilen Koloni Sağ-Kalım Formasyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

MCF-7 - MCF-7/PIR hücre hatlarından 750 sayıda iki farklı 6'lı kültür kaplarına ekilen hücreler paklitaksel ile tedavi edildi. Tedavide kullanılan paklitaksele yönelik bir direnç durumu olmadığından dolayı artan dozlara paralel olarak hücre sağ-kalım koloni sayısının azalmasında anlamlı bir farkın meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 3.5).



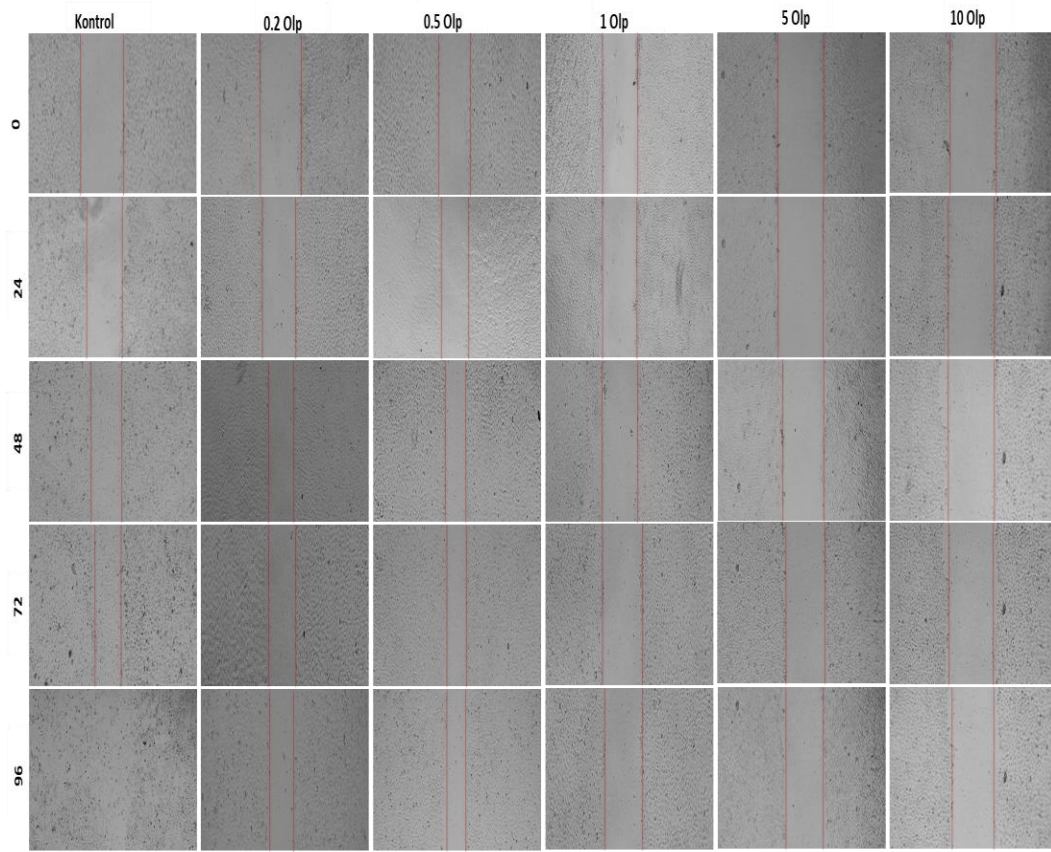
Şekil 3.5. MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarına ve farklı dozlarda uygulanan paklitakselin (1, 10 nM) 48 saatlik tedavisi sonrası hücrelerin sağ-kalımı üzerine etkisi

3.2.3. Wound Healing (Yara İyileşmesi) Deneyi Sonuçları

Wound healing ile yara iyileşme alanındaki MCF-7/PIR hücre hattının proliferasyon ve göç etme (migrasyon) hızı analiz edildi.

3.2.3.1. Olaparibin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

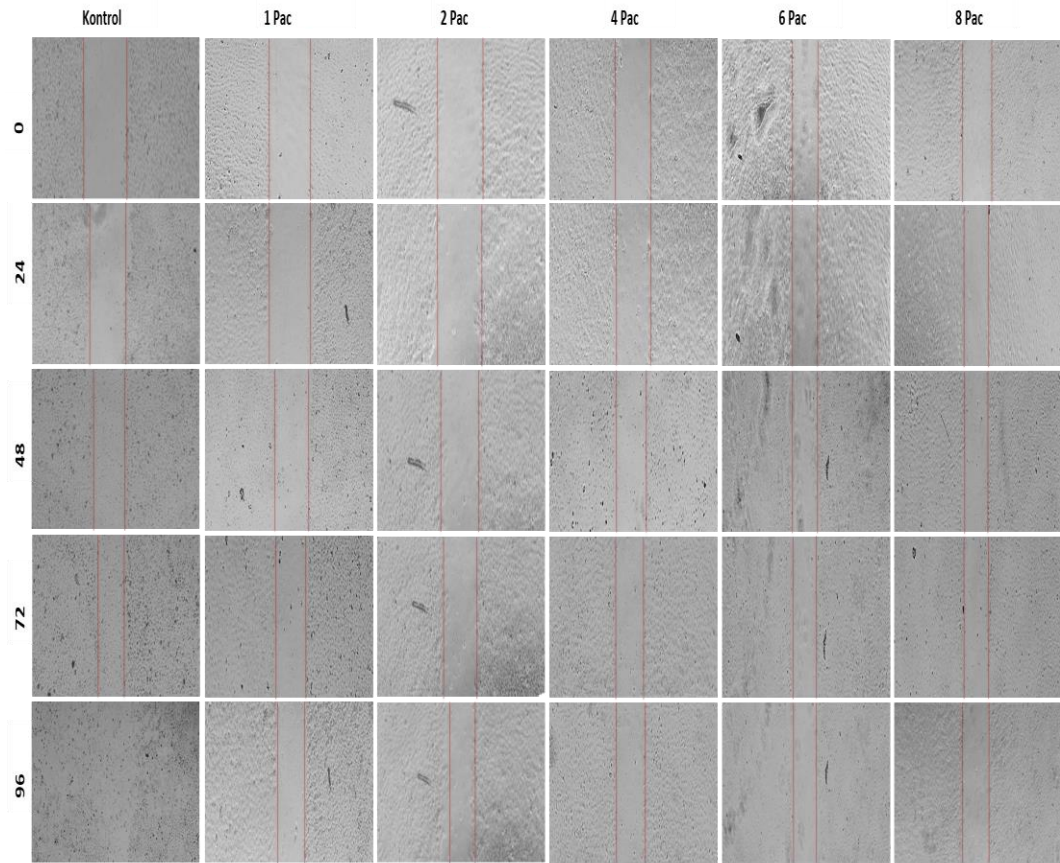
Olaparibin MCF-7/PIR hücre hattının migrasyon ve proliferasyon yetenekleri üzerindeki etkisinin araştırılması için yapılan yara iyileşmesi analizi sonucunda, ayrı ayrı her deney kuyucuklarında yara iyileşme çizgileri (alanı) çizildikten 96 saat sonra yara iyileşme alanlarının değerlendirilmesi yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. MCF-7/PIR hücre hattından (5x104 hücre) ekildikten sonra Olaparib ile tedavi edilen hücrelerin zamana ve doza bağlı wound healing (yara iyileşmesi) görüntüleri (0., 24., 48., 72., 96. saat görüntüleri)

3.2.3.2. Paklitakselin Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Paklitakselin MCF-7/PIR hücre hattının migrasyon ve proliferasyon yetenekleri üzerindeki etkisinin araştırılması için yapılan yara iyileşmesi analizi yapıldı. Bir önceki deney setinde de olduğu gibi 96 saat sonra kontrol grubundaki yara iyileşme alanı kapandığından deney sonlandırıldı. Deney sonunda Paklitakselin MCF-7/PIR hücre hattında doz konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı bir şekilde hem proliferasyon hem de migrasyon yeteneklerinde azalışa sebep olduğu gözlemlendi. İlgili antineoplastik ilaca karşı bir direnç söz konusu olmadığı için yara iyileşme hızındaki azalma aynı hücre hattına ve aynı tedavi süresiyle uygulanan AZD2281’re nazaran daha anlamlı bir şekilde gözlemlendi. Ancak kapanan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında iyileşme hızında yine de istenilen düzeyde bir azalmanın olmadığı ve netice itibariyle yaranın kontrol grubu dışındaki doz gruplarında az da olsa kapanmaya başladığı sonucuna varıldı (Şekil 3.7).



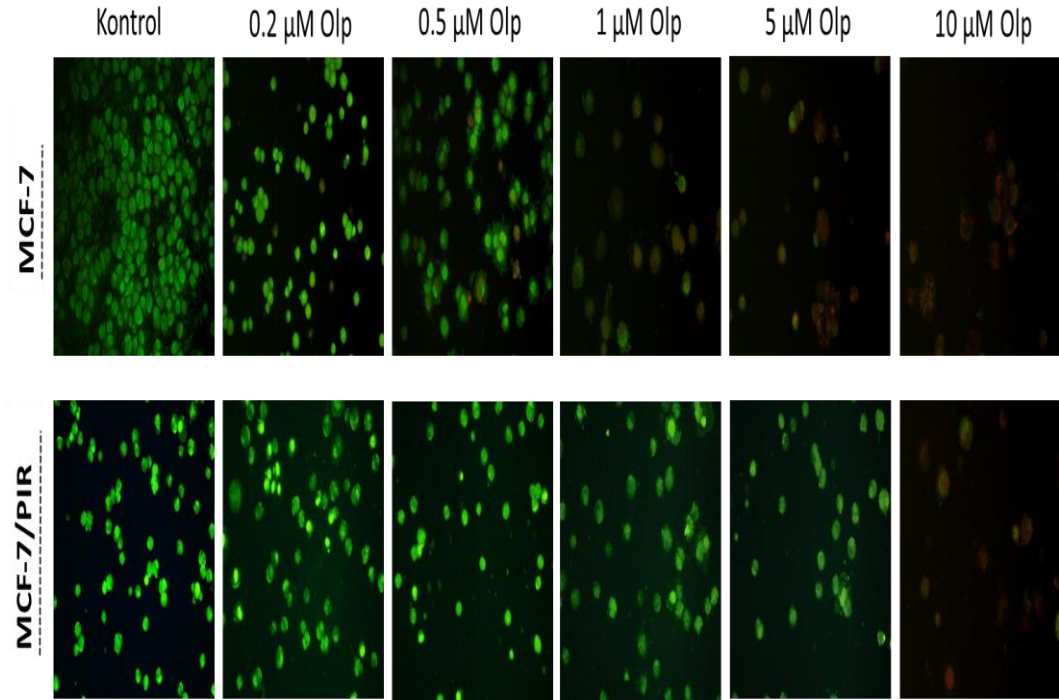
Şekil 3.7. MCF-7/PIR hücre hattından (5×10^4 hücre) ekildikten sonra Paklitaksel ile tedavi edilen hücrelerin zamana ve doza bağlı wound healing (yara iyileşmesi) görüntüleri (0., 24., 48., 72., 96. saat görüntüleri)

3.2.4. Akridin Oranj – Etidyum Bromür Boyama Deneyi Sonuçları

Bu deney seti ile kullanılan boyaların vital-nonvital özelliklerinden yararlanarak ilgili hücrelerin ölü veya canlı süreçleri hakkında analizler yapıldı. Ayrıca renk diyagramlarına göre hücrelerin erken veya geç apoptotik evreleri de değerlendirildi (Shakeri et al. 2019).

3.2.4.1. Uygulanan Olaparibin Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi ile MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarında Apoptotik Süreçlerin Belirlenmesi

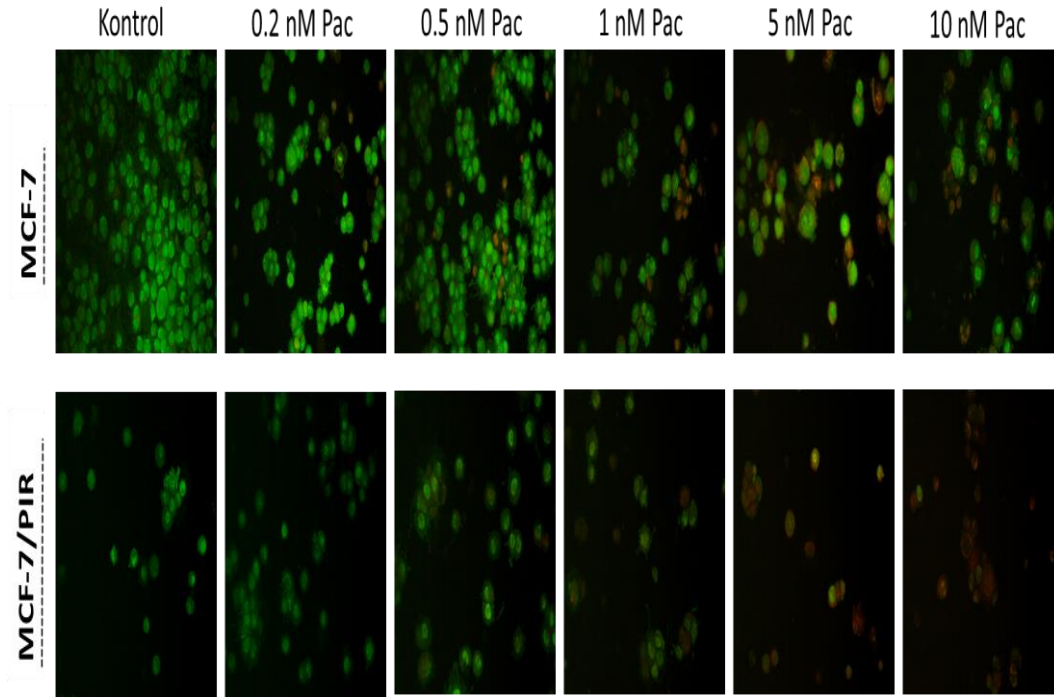
MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarından ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından her iki hücre hattı da farklı dozlarda olaparib ile tedavi edildi. Örnekler tekrardan 48 saatlik bir inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından örnekler hazırlanarak inverted mikroskop görüntüleri çekildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Sadece olaparibin aynı doz konsantrasyonlarıyla(0.2, 0.5, 1, 5 ve 10 μ M) tedavi edilen MCF-7 ve MCF- 7/PIR hücre hatlarının apoptotik süreçlerinin akridin oranj-etidyum bromür deneyi ile görüntülenmesi

3.2.4.2. Uygulanan Paklitakselin Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi ile MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarında Apoptotik Süreçlerin Belirlenmesi

MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarından ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından her iki hücre hattı da farklı dozlarda paklitaksel ile tedavi edildi. Örnekler tekrardan 48 saatlik bir inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından örnekler hazırlanarak inverted mikroskop görüntüler çekildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Sadece paklitakselin aynı doz konsantrasyonlarıyla (0.2, 0.5, 1, 5 ve 10 nM) tedavi edilen MCF-7 ve MCF- 7/PIR hücre hatlarının apoptotik süreçlerinin akridin oranj-etidyum bromür deneyi ile görüntülenmesi

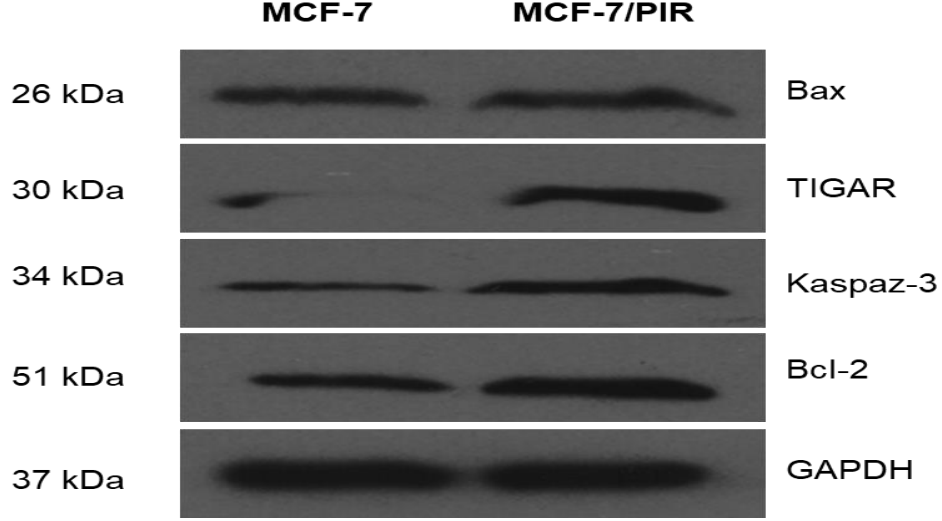
3.2.5. Western Blot Deneyi Sonuçları

Western blot yöntemi ile hücrelerdeki protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi çalışıldı.

3.2.5.1. MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının İlaç ile Tedavi Edilmeden Önce Western Blot Yöntemi İle Apoptotik Süreçlerinin Belirlenmesi

Pro-apoptotik bir protein olan Bax'ın bant yoğunluğundaki değişimi GAPDH ile karşılaştırdığımızda herhangi bir ilaç tedavisi yapılmadığı için MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarında anlamlı bir değişimin olmadığı dolayısıyla Bax'ın ekspresyon düzeyinin aynı seviyelerde seyrettiği görüldü. Anti-apoptotik (Bcl-2, TIGAR) proteinlerdeki ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise normal hücreye oranla özellikle dirençli MCF7/PIR hücrelerinde anlamlı bir artışın olduğu dolayısıyla da beklenildiği gibi ilgili hücrenin apoptoza gitme konusunda bir direnç sergilediği gözlemlendi. Aynı şekilde apoptozun intrinsik (içsel) yolağında önemli bir rol üstlendiğinden dolayı hücrenin apoptotik süreci hakkında bilgi edindiğimiz Cas-3 proteinini incelendiğinde ise bant

yoğunluğunun normal hücreye kıyasla dirençli hücrede daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 3.10).



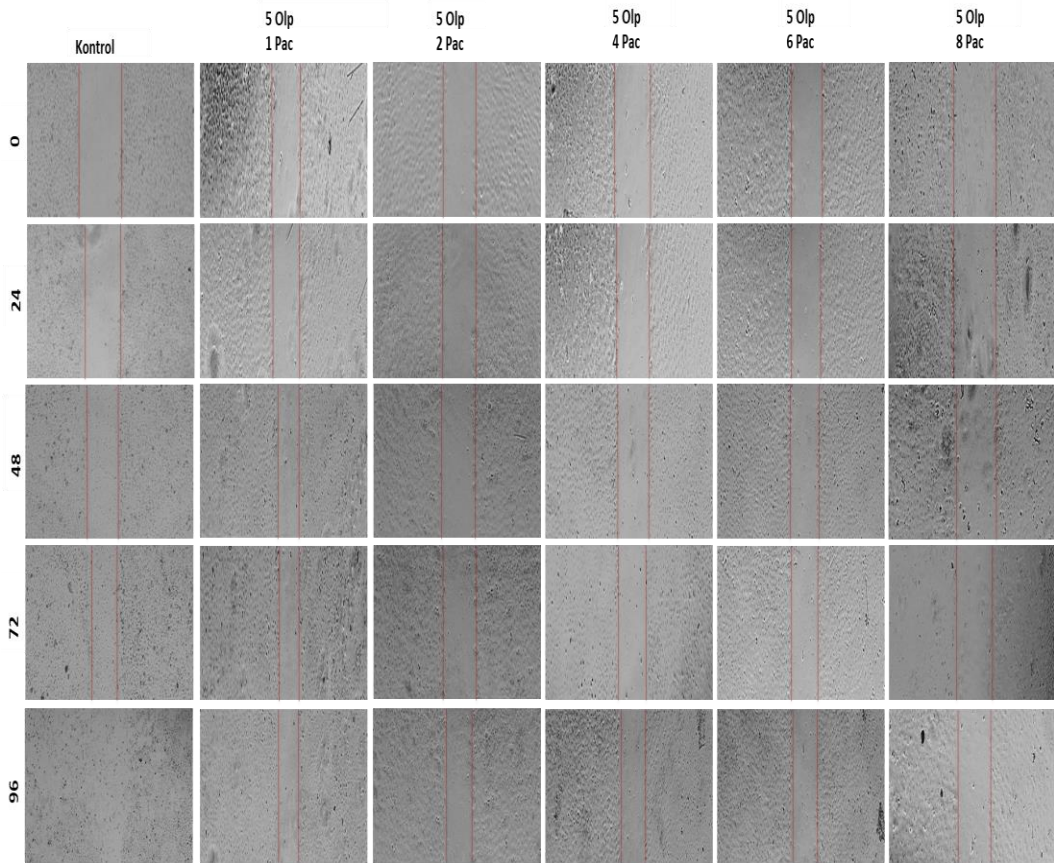
Şekil 3.10. MCF-7 ve MCF-7/PIR hücre hatlarının ilaç ile tedavi edilmeden önceki pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein değerlerinin western blot yöntemi ile analizi

3.3. Hücre Hatlarına İlaçların Birlikte Uygulanmasıyla(Kombinatif Tedavi) Elde Edilen Sonuçlar;

Normal MCF-7 hücre hattı ile direnç kazandırdığımız MCF-7/PIR hücre hatları her iki ilacın birlikte uygulanması (kombinasyon) ile tedavi edildi. Uygulanan iki ajanın da zamana ve doza bağlı hücre hatlarına olan etkileri karşılaştırılarak apoptotik süreçleri incelendi.

3.3.1. 5µM Olaparib ile Farklı Dozlardaki Paklitaksel Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

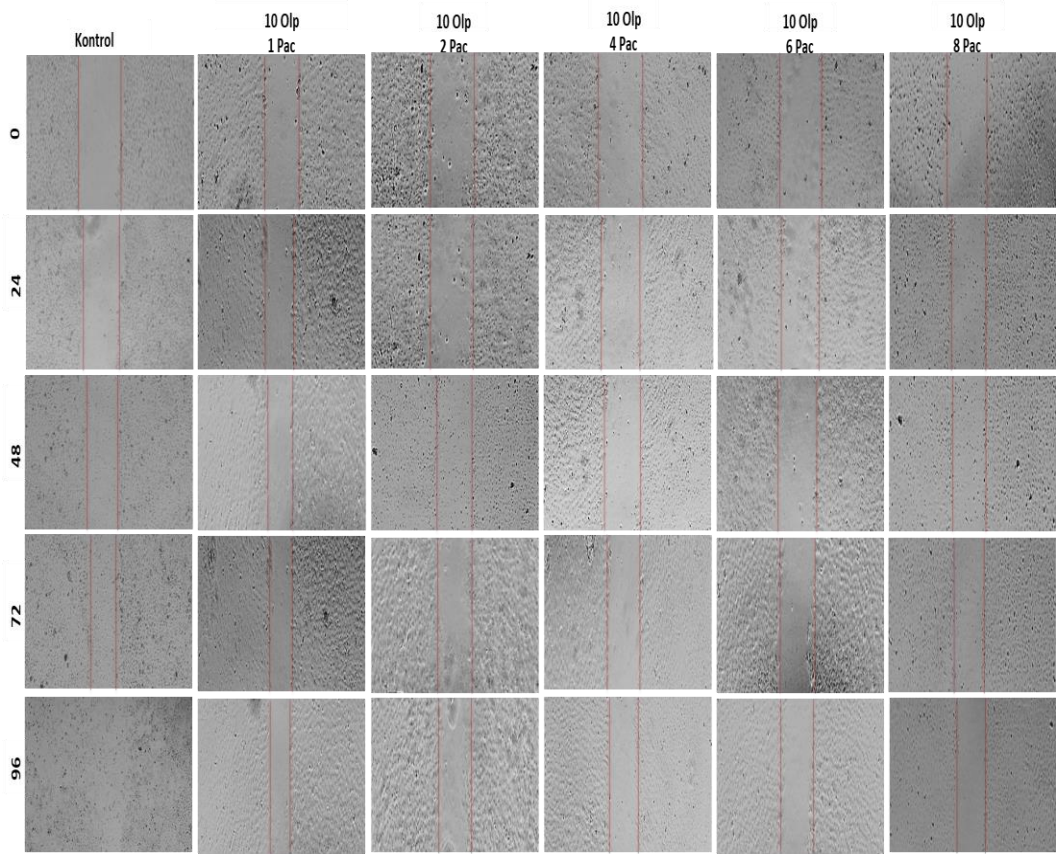
Yara iyileşme çizgileri (alanı) çizildikten 96 saat sonra kontrol gurubundaki yara iyileşme alanı kapandığı için deney sonlandırıldı. Olaparibin sabit dozu ile paklitakselin farklı doz (1, 2, 6, 8nM) kombinasyonlarıyla tedavi edilen MCF-7/PIR hücre hattında kombine edilen doz konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı bir şekilde migrasyon yeteneğinde çok ciddi bir azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. MCF-7/PIR hücre hattından (5x10⁴ hücre) ekildikten sonra 5µM Olaparib + farklı dozlarda Paklitaksel(kombinasyon tedavi) ile tedavi edilen hücrelerin zamana ve doza bağlı wound healing (yara iyileşmesi) görüntüleri (0., 24., 48., 72., 96. saat görüntüleri)

3.3.2. 10 µM Olaparib ile Farklı Dozlardaki Paklitaksel Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

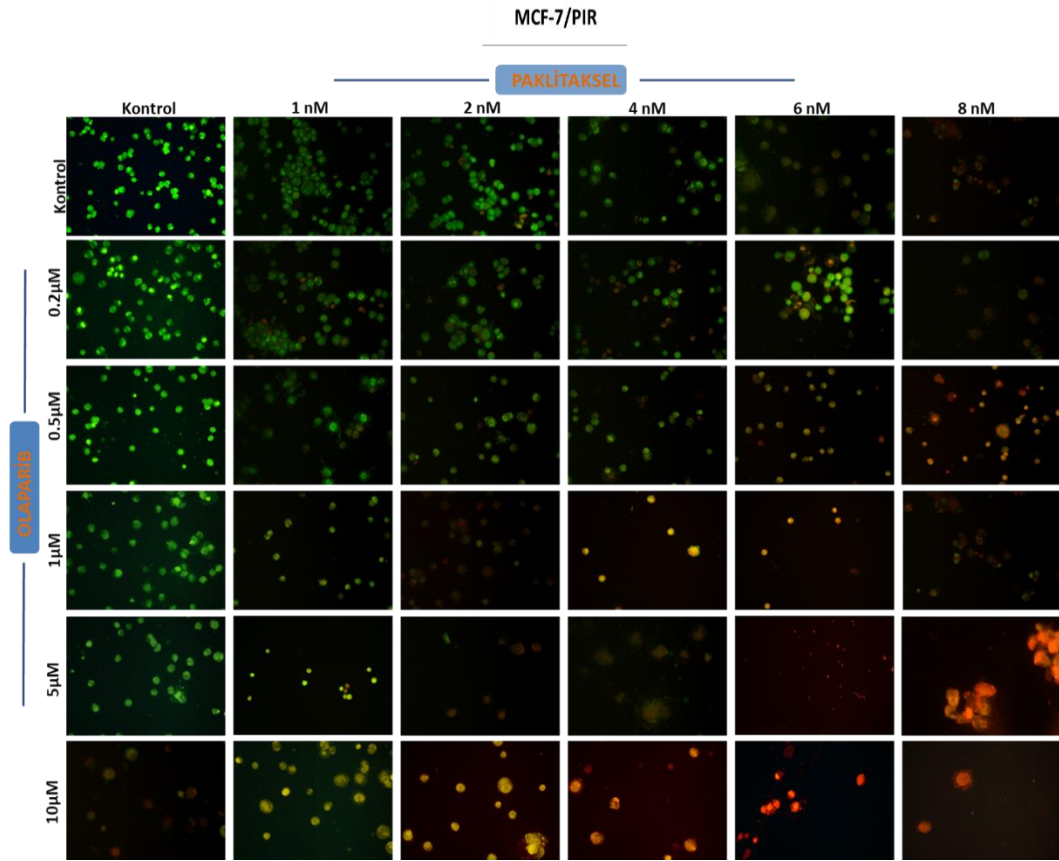
Sonuç olarak, kombinasyon tedavisiyle MCF-7/PIR hücre hattına uygulanan doz konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin migrasyon (yara iyileşme) hızındaki azalmayla beraber migrasyon mesafesindeki (yaralı alan) artışın da anlamlı bir şekilde seyrettiği gözlemlenmiştir. Böylelikle, ilgili hücre hattında doza bağlı olarak migrasyon yeteneğindeki değişimler diğer deney setlerinde elde edilen sonuçlar ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Kombinasyon tedavisinin özellikle yüksek doz konsantrasyonlarına doğru yara iyileşme hızında anlamlı bir şekilde azalmanın olduğu ve dolayısıyla da olaparibe karşı gelişen ilaç direncinin aşılmaya başlandığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. MCF-7/PIR hücre hattından (5x10⁴ hücre) ekildikten sonra 10µM Olaparib + farklı dozlarda Paklitaksel(kombinasyon tedavi) ile tedavi edilen hücrelerin zamana ve doza bağlı wound healing (yara iyileşmesi) görüntüleri (0., 24., 48., 72., 96. saat görüntüleri)

3.3.3. Farklı Dozlarda Uygulanan Olaparib, Paklitaksel ve İkisinin Kombinasyonlarıyla Tedavi Edilen MCF-7 ve MCF-7/PIR Hücre Hatlarının Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi ile Apoptotik Süreçlerinin Belirlenmesi

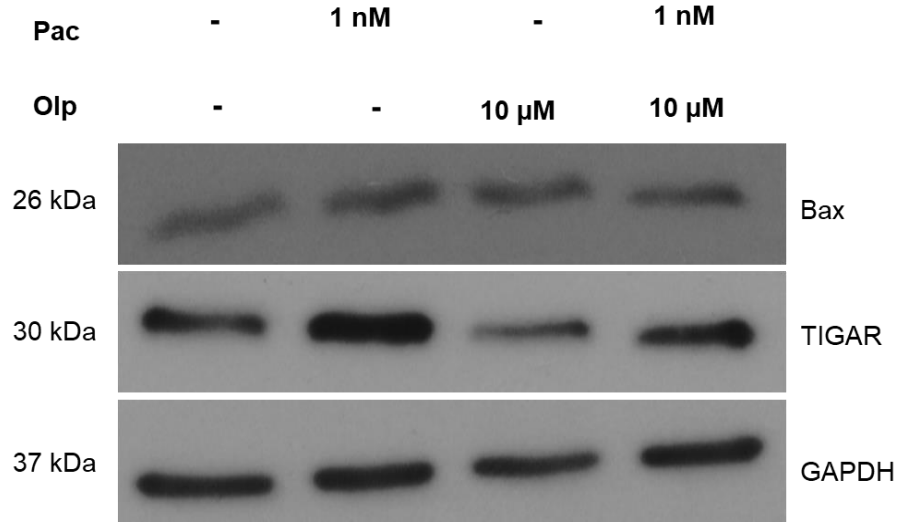
Öncelikle düşük dozlardaki kombinasyon tedavilerinde de yine düşük dozlardaki tekli ajan tedavileri gibi MCF-7/PIR hücrelerinde apoptoza yönelme konusunda anlamlı bir farkın meydana getirmediği görüldü. Dirençli hücreyi apoptoza sürüklemenin ya düşük dozlu olaparib ile yüksek dozlu paklitakselin veyahut tam tersi kombinasyonu ile ancak mümkün olabileceği gözlemlendi. Ayrıca, hücre dirençli olsun-olmasın tekli paklitaksel ile tedavi edildiğinde apoptotik hücre ölümü değişimin olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Farklı dozlarda uygulanan Olaparib (0.2, 0.5, 1, 5, 10 μ M), Paklitaksel (1, 2, 4, 6, 8nM) ve ikisinin kombinasyonlarıyla tedavi edilen MCF-7/PIR hücre hattının apoptotik süreçlerinin akridin oranj – etidyum bromür deneyi ile görüntülenmesi

3.3.4. Kombinasyon tedavisinin Bax ve TIGAR proteini üzerine olan etkilerinin Belirlenmesi

Kombinasyon tedavisinin apoptotik biyogöstergeler üzerine olan etkisinin belirlenmesi için western blot deneyi yapıldı. Proteinlerin bant yoğunluklarına bakılarak apoptotik süreç değerlendirildi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Sadece Olaparib (10 μ M), sadece Paklitaksel (1nM) ve kombinasyonlarıyla (1nM + 10 μ M) tedavi edilen MCF-7/PIR hücre hattının pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein değerinin western blot yöntemi ile analizi

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzün en tehlikeli hastalığı olarak kabul edilen kanser, tedavisi adına yapılan tüm çalışmalara rağmen yüksek ölüm oranlarının engellenemediği kompleks bir hastalık gurubudur. Tedaviye yönelik mevcut stratejilerin karşılaşılan ilaç direnci gibi yan etkilerden kaynaklı yetersiz kaldığı bilinmektedir. Hızlı yayılma potansiyeline sahip bu hastalığın teşhisi ve de tedavisi için alternatif tamamlayıcı stratejilerinin gerekli olduğu görölmektedir (Erdoğan 2019).

Hem sağlıklı hem de kanserli bir hücrede DNA tamir mekanizmasında majör bir rol üstlenen PARP enzim ailesi, özellikle kansere yönelik terapötik yaklaşımlar üzerinde çalışan araştırmacıların dikkatini çekmiş bulunmaktadır. Terapötik yaklaşımlar kapsamında PARP enzim ailesinin inhibisyonu hücrelerde apoptozis veya yaşlanmanın tetiklendiği tespit edilmiştir (Tok ve KocyigitKaymakcioglu 2015). Arun ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada PARPi ajanlarını over ve meme kanseri gibi BRCA ilişkili kanser tedavilerinde kullandıklarını ve tedavide umut verici bir anti-kanser ajan olduğunu belirtmişlerdir (Arun et al. 2015). Selçuk ve arkadaşlarının BRCA gen mutasyonlarına bağlı olarak meme ve over kanser sendromu üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise, PARP inhibitör ajanları ile özellikle BRCA1/2 mutasyonu görölen hücrelerde DNA çift zincir kırığının indüklendiği ve dolayısıyla da sentetik letalitenin tetiklendiği belirtilmiştir (Selçuk 2018).

FDA tarafından onaylanan ve yapılan çalışmalarla etkisi tespit edilen olaparib, yaygın kullanım alanına sahip bir PARP inhibitörüdür (Arun et al. 2015; Gündoğdu 2020). Olaparibin kullanılmasındaki temel amaç, DNA tamir mekanizmasında rol oynayan PARP'ın görevini baskılayarak meme kanseri hücrelerinde DNA hasarına sebebiyet vermektir. Böylelikle de kanserli hücreyi programlı ölüm yolağı olan apoptoza yönlendirmektir. Ancak söz konusu PARP inhibitörü kullanılırken hücresel düzeylerde karşılaşılan ilaç dirençleri nedeniyle tedavide istenilen sonuçlar elde edilememektedir

Bununla birlikte, ilaç direnci meme kanserinde kemoterapinin başarısız olmasına yol açan başlıca engellerden biridir (Gajan et al. 2021). Bu nedenle, aynı anda farklı hücresel mekanizmaları hedefleyerek kanser hücrelerini apoptoza yönlendirecek yeni tedavi stratejilerini sunmak gerekmektedir. Bu noktada birçok kanser tedavisinin yönetiminde kullanılan ve yapılan çalışmalarda bireysel olarak etkisi kanıtlanmış olan kemoterapötik ajanlardan paklitaksel değerlendirilmektedir. Park ve arkadaşlarının dirençli meme kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, paklitakselin meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek potansiyele sahip kemoterapötik bir kimyasal olduğunu bildirmişlerdir (Park and 1 2019). Mekanizma olarak paklitaksel, apoptozisi uyarmak için Bcl-2 ailesinin fosforilasyonunu regüle etmektedir (Blagoskionny 1997). Bu regülasyon yardımıyla da paklitaksel, sitotoksiteyi sağlamak için hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu bilinmektedir (Masaroğulları 2010).

Bu tez çalışmasında, MDR'nin çoğunlukla yaşandığı meme kanseri vakalarında bireysel olarak ayrı ayrı denenmiş olmalarına rağmen kombinasyon halde daha önce hiç denenmemiş olan PARP inhibitörü olaparib ve kemoterapötik ajan paklitakselin kombine edilmesiyle yeni bir tedavi yaklaşımı öngörüldüğünden, söz konusu tedavide kullanılan küçük moleküllü ajanların sitotoksik aktivitelerini birlikte artırabilmesi ve meme kanseri tedavisinin daha sağlıklı bir şekilde yönetilmesi hedeflendi.

Bu tezde öncelikli olarak sürekli seleksiyon metoduyla olaparibe karşı dirençli MCF-7/PIR hücreleri geliştirilmiştir. Ardından MCF-7 ve MCF-7/PIR hücrelerinde hem olaparibin hem de paklitakselin hücre canlılığı üzerine olan etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kendisine karşı direnç geliştirilen hücrelerde olaparibin herhangi bir etki göstermediği öte yandan paklitakselin ise herhangi bir direnç ile karşılaşmadığı belirlenmiştir. Nitekim Gajan ve arkadaşlarının TNBC (Triple Negative Breast Cancer) hücreleri üzerinde olaparib direncinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin araştırıldığı çalışmada, platin bazlı bir kemoterapötik ilaç olan sisplatine karşı direncin oluşmadığını rapor etmişlerdir (Gajan et al. 2021). Bir başka çalışmada ise Gottipati ve arkadaşları U2OS (insan osteosarkoma) hücrelerinde BRCA1/2 mutasyonlu olduğu durumlarda homolog rekombinasyon ile DNA tamirinin yapılmadığı bundan dolayı da PARP inhibitörlerine karşı bir direncin geliştiğini belirtmişlerdir (Gottipati et al. 2010).

Koloni sağ-kalım deneyinde elde ettiğimiz bulgulara göre olaparib ile tedavi edilen dirençli hücrelerde hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinde herhangi bir değişimin olmadığı ancak paklitaksel ile tedavi edilen hücrelerde koloni sağ-kalım üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. HCT116 (kolon kanseri) hücre hattında koloni sağ-kalımının engellenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, tekli olaparib veya paklitaksel ile tedavi edilen hücrelerin sağ-kalım değerlerinde kısmi azalmaların gözlemlendiği rapor edilmiştir (Gündoğdu 2020). Ancak Vescarelli ve arkadaşlarının olaparibe dirençli yumurtalık kanseri üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise, olaparibin bir transmembran reseptörü olan Neuropilin-1 ile birlikte uygulandığında koloni sağ-kalım potansiyelinin azaldığı ve apoptozun indüklendiği rapor edilmiştir (Vescarelli et al. 2020).

Anti-apoptotik proteinlerden biri olan Bcl-2 (B-hücreli lenfoma-2), ölüm sinyallerinin hücre içerisine alınmasıyla mitokondrinin dış zar geçirgenliği üzerinde önemli bir role sahip olduğundan dolayı apoptozun regülasyonunda görev almaktadır (Lucantoni et al. 2021; Pilco-Ferreto and Calaf 2016). Apoptozun baskılanması hücre içindeki bcl-2 proteininin ekspresyon miktarıyla orantılı seyrederken bax ve kaspaz 3 ekspresyonunun artması ise apoptozu indüklediği bilinmektedir (Zahra et al. 2021). Özellikle Bax'ın aşırı ekspresyonunda mitokondrinin dış zar geçirgenliği tetiklenerek sitokrom-c'nin sitoplazmaya geçişi sağlanır ve böylece kaspaz kaskadı aktif edilerek apoptoz gerçekleşmektedir (Kong et al. 2020). Bir diğer anti-apoptotik protein olan TIGAR ise glikoliz evresinin negatif bir düzenleyicisi olarak hücredeki ROS miktarının düşürülmesinde rol almaktadır. Böylece kanserli bir hücrenin programlı ölüm yollarına sürüklenmesine engel olduğu bilinmektedir (Poyya et al. 2021; Tykhomyrov et al. 2020). Ölüm yollarının aktivasyonunda görevli alan kaspazlar, sistein proteaz grubu olarak bilinmektedirler. Bu grubun önemli bir üyesi olan kaspaz-3 ise apoptoz sırasında sıklıkla aktifleşen ve bazı hücrel proteinlerin bölünmesini spesifik olarak katalizleyen efektör bir kaspaz grubudur (Pilco-Ferreto and Calaf 2016). Elde ettiğimiz western blot sonuçlarına göre PIR hücrelerinde MCF-7 hücrelerine oranla anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2, TIGAR gibi) ekspresyon düzeylerinin arttığını öte yandan pro-apoptotik proteinlerin (Bax) ekspresyonunda herhangi bir değişimin olmadığı yine aynı deneyde kaspaz-3 ekspresyonunda ise kısmi olarak düşüş olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlardan hareketle beklenildiği gibi MCF-7/PIR hücre hattının apoptoza gitme konusunda bir

direnç sergilediği tespit edildi. Pilco ve arkadaşları doksorubisinin meme kanseri hücre hatlarında apoptoz ve oksidatif stres üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, doksorubisin tedavisiyle normal MCF-7 hücre hattında oksidatif stresin tetiklendiği ve bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada Bax ve kaspaz-3'ün ise ekspresyon düzeylerinin arttığı dolayısıyla da doksorubin tedavisiyle dirençsiz meme kanseri hücrelerinde apoptozun indüklendiği gözlemlenmiştir (Pilco-Ferreto and Calaf 2016).

Elde ettiğimiz akridin oranj/etidyum bromür deneyi sonuçlarına göre tekli paklitaksel ile tedavide hem MCF-7 hem de MCF-7/PIR hücre hatlarının artan doz konsantrasyonlarına paralel olarak anlamlı bir şekilde apoptoza gittiği gözlemlendi. Öte taraftan tekli olaparib ile tedavide ise MCF-7 hücrelerinde yine artan doz konsantrasyonlarına paralel olarak hücrenin apoptoza gittiği ancak dirençli MCF-7/PIR hücre hattında ise böyle bir etkinin olmadığı gözlemlendi. Dirençli hücre hattında IC₅₀ değerinin üstündeki dozlarında ise olaparib uygulanırken de ilgili hücrenin apoptoza gittiği dolayısıyla da direncin aşıldığı gözlemlendi. Eskiler ve arkadaşlarının PARP inhibitörü talazoparib karşı dirençli TNBC hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, direncin yıkılması için hücrelerin quercetin ile tedavisiyle hem normal hem de dirençli hücre hatlarının artan dozlara paralel bir şekilde apoptoza sürüklendiği rapor edilmiştir (Güney Eskiler 2020). Hücre göçü deneyinde de ulaştığımız sonuçlara göre tekli olaparib ile tedavi edilen MCF-7/PIR hücre hattı kapanan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında doz konsantrasyonuna bağlı olarak migrasyon yeteneğinde azalmanın olmadığı gözlemlendi. Yüksek doz konsantrasyonlarına doğru dirençten kaynaklı olarak yara iyileşme hızında bir artış olduğu da görüldü. Tahmin edildiği gibi doza bağlı ve anlamlı bir şekilde yara iyileşme alanındaki hızda artışın olduğu, hücrelerin proliferasyon yeteneklerinin de etkisiyle yara iyileşme alanının kapandığı ve direncin etkili olduğu gözlemlendi. Öte yandan tekli paklitaksel ile tedavi edilen dirençli hücre hattı kapanan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında migrasyon yeteneğinde kısmi azalmanın olduğu gözlemlendi. İlgili ajana karşı bir direnç söz konusu olmadığı için yara iyileşme hızındaki azalma aynı süre ve dozda uygulanan olaparib oranla daha anlamlı olduğu gözlemlendi. PARP inhibitörlerine karşı geliştirilen direnç üzerine yapılan bir çalışmada, hücrelere sadece talazoparib uygulandığında hem normal hem de dirençli TNBC hücre hatlarında doz konsantrasyonlarına paralel olarak hücrelerin migrasyon yeteneklerinde azalmanın olduğu rapor edilmiştir (Güney Eskiler 2017).

Dolayısıyla, sürekli seleksiyon metoduyla olaparibe karşı direnç geliştirdiğimiz hücre hattının çeşitli deney setlerinde sadece olaparib ve/veya sadece paklitaksel ile tedavisinde söz konusu ajana karşı bir direnç geliştiği ve hücrenin programlı ölüm yollarına gitmediği gözlemlendi. Bu tezde çalışılan bir diğer aşama ise; her iki hücre hattına uygulanan tekli tedavi verilerinin karşılaştırılması ve direncin aşılması noktasında çalışmanın asıl hedefine ulaşması için uygulanan ajanların birlikte/kombinatif şekilde kullanılmasıdır. Bu doğrultuda elde ettiğimiz akridin oranj/etidyum bromür deneyi sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda paklitaksel ve olaparibin kombine edildiği en düşük dozda (1nM Pac + 0.2µM Olp) herhangi bir hücre ölümünün gözlemlenmediği (renklerde bir değişimin olmadığı) öte yandan tam da beklenildiği gibi en yüksek dozda ise (8nM Pac+ 10µM Olp) hücre ölümünün anlamlı bir şekilde gerçekleştiği akridin oranj/etidyum bromür testiyle belirlenmiştir. Yine aynı deneyin sonuçları içerisinde optimum doz olarak hedeflenen (2nM Pac + 0.5 µM Olp) dozlarda ise hücrelerin belirli bir kısmında renk değişiminin (kırmızı) olduğu ve dolayısıyla da hücrelerin ölüme gittiği gözlemlendi. Gajan ve arkadaşlarının TNBC hücreleri üzerinde olaparib direncinin araştırıldığı çalışmada, sisplatine duyarlı olan hücre hatlarının olaparib ile tedavi edildiğinde DNA hasarının uyarıldığı ve sonucunda da kanserli hücrenin programlı ölüm yolağına yönlendirildiği rapor edilmiştir (Gajan et al. 2021).

Yara iyileşmesi metodu ile hücrelerin proliferasyon ve göç etme (migrasyon) hızları zamana ve kapanan kontrol grubuna göre belirlenmektedir (Liang et al. 2007). Hücre göçü deneyinde elde ettiğimiz sonuçlara göre, kapanan kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında kombine edilen doz konsantrasyonlarına bağlı olarak dirençli hücre hattında anlamlı bir şekilde migrasyon yeteneğinin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca, yüksek doz konsantrasyonlarına doğru yara iyileşme hızında anlamlı bir şekilde azalmanın olduğu ve migrasyon mesafesinde (yaralı alan) de kısmi kapanmaların olduğu gözlemlendi.

Western blot deneyinde elde ettiğimiz sonuçlara göre Bax'ın bant yoğunluğuna bakıldığında, tekli ajan ile tedavi edilen hücrede kontrol gurubuna oranla farkedilebilecek düzeyde anlamlı bir değişimin olmadığı ancak kombinasyon tedavisinde bant yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. Yine aynı deneyin sonuçlarından hareketle anti-

apoptotik protein olan TIGAR'ın ekspresyon düzeyi incelendiğinde ise, tekli olaparib ve kombinasyon tedavi gruplarında kontrol grubuna oranla bir azalma olduğu gözlemlendi. Ancak, tekli paklitaksel tedavisinde ise TIGAR'ın ekspresyon düzeyinde anlamlı şekilde bir artışın olduğu görüldü. Li ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada düşük dozlarda kullanılan paklitakselin meme kanseri hücrelerinde bilindiğinin aksine tümör malignitesini doğrudan arttırdığını ve karaciğer metastazını da arttırdığını rapor etmişlerdir (Li et al. 2016). Poyya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise TIGAR'ın ROS miktarının düşürülmesini indüklediğini belirtmişlerdir (Poyya et al. 2021). Dolayısıyla 1 nM paklitaksel uygulandığında anti-apoptotik protein olan TIGAR'ın ekspresyonundaki yoğunluğun bundan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sadece 10 µM olaparib ile tedavi edildiğinde ise TIGAR'ın ekspresyonunda kısmi bir azalmanın olduğu dolayısıyla kombinasyon tedavisi kadar olmasa da hücrenin apoptoza gittiği gözlemlendi. Nitekim Santiago O'Farrill ve ark. PARP inhibitörlerinin over kanseri hücrelerinde otofaji aracılı ilaç direncini araştırdıkları çalışmalarında, CQ (klorokin) ile kombinatif şekilde uygulanan olaparibin PARP inhibisyonu ile beraber hücrede ROS miktarını artırdığı, DNA hasarını tetiklediği ve sonuç itibarıyla hücreyi apoptoza sürüklediği rapor edilmiştir (Santiago-O'Farrill et al. 2020).

Bu çalışmada, çoklu ilaç direncinin yaşandığı meme kanseri tedavilerinde, DNA hasarını tetikleyen olaparib ile hücre döngüsü üzerinde etkili paklitakselin kombine edilmesiyle yeni bir terapötik yaklaşım değerlendirildi. Bu bağlamda, PARP inhibitörlerinin kullanılmasında önemli bir engel olan MDR'nin aşılması için kombinasyon tedavisinin geliştirilmesi ve bununla beraber meme kanseri hastalarının tedavisinde PARP inhibitörlerinin kullanılması güncel terapötik yaklaşımların ilerlemesine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

Ağca CA, Mahinur K, Abdurrahman C, Yeşim Y (2019) 5-Florouracil ve resveratrol kombinasyonunun insan akciğer kanseri A549 hücre hattında apoptozis üzerin etkisi. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 21(3): 359–68

Andrew GR, Catherine B, Christopher SP (2019) Comorbidity: what is it and why is it important? Comorbidity: Symptoms, Conditions, Behavior and Treatments, p. 1–22

Arora S, Sanjeev B, Hui Z, Tara B, Preeti N (2021) FDA approval summary: olaparib monotherapy or in combination with bevacizumab for the maintenance treatment of patients with advanced ovarian cancer. Oncologist 26(1): 164–72

Arun B, Akar U, Angelica MG, Gabriel NH, Ozpolat B (2015) The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy / mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. 2281: 262–68

Barbuti AM, Zhe-sheng C (2015) Paclitaxel through the ages of anticancer therapy : exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. Cancers (7): 2360–71

Başara BB, Aygün İ, Soytutan ÇA, Kulali TA, Özdemir B (2018) Sağlık istatistikleri yılı. T.C. Sağlık Bakanlığı, s. 5-91

Bixel K, Hays JL (2015) Olaparib in the management of ovarian cancer. Pharmacogenomics and Personalized Medicine 8: 127–35

Çiftçi N (2017) Oksidatif stresin kanserdeki rolü: antioksidanlar kanser progresyonunun yakıtı olabilir mi? Ahi Evran Tıp Dergisi 1: 8–13

Cortesi L, Hope SR, Christian J (2021) An overview of parp inhibitors for the treatment of breast cancer. Targeted Oncology 16(3): 255–82

Coşkun G, Özgür H (2011) Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 20(3): 145–58

Debele-Bütüner B, Kantarcı G (2006) Mutasyon, dna hasarı ,onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı 35(2): 149–70

Decottignies A (2013) Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. Frontiers in Genetics 4(APR): 1–7

Delgado-Díaz N, Heredia-Talledo M, Ramos-Becerra A, Samillán-Jara L, Sánchez-Carranza M, Iglesias-Osores S, Arce-Gil Z (2020) Level of knowledge on risk factors and preventive measures for breast cancer in health science students. *Revista de La Facultad de Medicina Humana* 20(3): 412–18

Güngör Çağdaş D, Kul O (2016) Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 5(1): 86–108

Köse E (2019) Pterijum patogeneğinde apoptozis ve enflamasyon. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, s. 14-22

Erdoğan MK, Ağca CA, Aşkın H (2019) Enhanced antiproliferative and apoptotic effects of 5-fluorouracil by combined with pistacia eurycarpa extracts on human colorectal cancer cells. *Biological Diversity and Conservation* 12(1): 27–38

Jacques F, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Maxwell Parkin D, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5): E359–86

Fojo T, Bates S (2013) Mechanisms of resistance to parp inhibitors-three and counting. *Cancer Discovery* 3(1): 20–23

Ambikai G, Sarma A, Kim S, Gurdziel K, Wu GS, Shekhar MP (2021) Analysis of adaptive olaparib resistance effects on cisplatin sensitivity in triple negative breast cancer cells. *Frontiers in Oncology* 11(July): 1–14

Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ (2013) Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 105(8): 515–25

Göngür NE (2010) Fetal, neonatal, puberte ve erişkin fare testisinde PARP-1 , PARP-2 ve PAR ekspresyonlarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, s. 13-24

Gottipati P, Vischioni B, Schultz N, Solomons J, Bryant HE, Djureinovic T, Issaeva N, Sleeth K, Sharma RA, Helleday T (2010) Poly(ADP-Ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Research* 70(13): 5389–98

Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükates E (2008) Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arsivi* 36(2): 120–30

Gündoğdu R (2020) Inhibition of colorectal cancer cell survival by paclitaxel combined with olaparib. *Adıyaman University Journal of Science* 10: 427–40

Güney Eskiler G (2017) Triple negatif meme kanseri tedavisinde parp inhibitörü yüklü kati lipid nanopartiküllerin ilaç direnç mekanizmalarının aşılmasındaki rollerinin araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, s. 6-64

Güney Eskiler G, Çeçener G, Egeli Ü, Tunca B (2020) Reversal effect of quercetin on talazoparib resistance in BRCA1 mutant triple negative breast cancer. *The European Research Journal* 6(1): 19–25

Gupta M, Renuka I, Christos F (2019) Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitors in pancreatic cancer: a new treatment paradigms and future implications. *Cancers* 11(12): 1–25

Harries AD, Salaniponi F (2005) Improving health workers' performance in low-resource settings. *Lancet* 366(9497): 1606. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67659-3

Heneweer M, Martin Van Den B, De Geest MC, De Jong PC, Bergman Å, Sanderson JT (2005) Inhibition of aromatase activity by methyl sulfonyl pcb metabolites in primary culture of human mammary fibroblasts. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202(1): 50–58

Yinghong H, Cole SPC, Cai T, Cai Y (2016) Applications of nanoparticle drug delivery systems for the reversal of multidrug resistance in cancer. *Oncology Letters* 12(1): 11–15

Ichim G, Tait SWG (2016) A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer* 16(8): 539–48

Gülser İE (2015) Bu çalışma, 212T026 proje numarası ile TÜBİTAK 1001 bilimsel ve teknolojik araştırma projelerini destekleme programı tarafından desteklenmiştir. Yüksel Lisans Tezi, Acıbadem Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s. 2-14

Iyama T, Wilson DW (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12(8): 620–36. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015

Jaspers JE, Kersbergen A, Boon U, Sol W, Deemter LV, Zander SA (2013) Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in BRCA1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discovery* 3(1): 68–81

Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T (2011) DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology* 94(2): 166–200

Johnson N, Johnson SF, Yao W, Yu Chen L (2013) Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(42): 17041–46

Kakde D, Jain D, Shrivastava V, Kakde R, Patil AT (2011) Cancer therapeutics-opportunities, challenges and advances in drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(9): 1–10

Kars Demirel M, Darcansoy İşeri Ö, Arpacı F, Gündüz U (2009) Meme kanseri MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristin'e karşı gelişmiş çoklu ilaç direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi* 24(4): 153–58

Kayan S (2019) Kadınların meme kanseri bilgi düzeyleri ile meme kanseri korkuları arasındaki ilişki. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı, s. 4-12

Kayar N (2019) Meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi eğitiminin meme kanseri korkusu ve sağlık inançlarına etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemşirelik Anabilim Dalı, s. 6-15

Kılıç S, Muharrem U, Seymen E, Ince S (2006) Kendi Kendine meme muayenesi bilgi ve uygulamasının GATA eğitim hastanesinde görevli hemşire, hemşirelik öğrencileri ve hastaneye müracaat eden kadın hastalarda araştırılması. *Gulhane Medical Journal* 48(4): 200–204

Kong BH, Teoh KH, Tan NH, Tan CS, Ng ST, Fung SY (2020) Proteins from *lignosus tigris* with selective apoptotic cytotoxicity towards MCF7 cell line and suppresses MCF7-xenograft tumor growth. *PeerJ* 8: 1–21

Kurtoğlu EL, Tekedereli İ (2015) DNA onarım mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 7(2): 115–20

Li Q, Ma Z, Liu Y, Kan X, Wang C (2016) Low doses of paclitaxel enhance liver metastasis of breast cancer cells in the mouse model. *FEBS Journal* 283: 2836–52

Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2(2): 329–33

Lucantoni F, Salvucci M, Düssmann H, Lindner AU (2021) BCL(X)L and BCL2 increase the metabolic fitness of breast cancer cells: a single-cell imaging study. *Cell Death and Differentiation* 28(5): 1512–31

Masaroğulları K (2010) Paklitaksel / (-)- Gossypol (At-101) kombinasyonunun meme kanseri hücre hattında sinerjistik sitotoksik ve apoptotik etkileri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, s. 3-35

Mcperson K, Steel CM, Dixon JM (2000) ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology risk factors and genetics. *Bmj* 321(7270): 1198

Selçuk İ, Özel Ş, Güngör T, Engin-Üstün Y (2018) Derleme review over kanseri perspektifinde BRCA gen mutasyonları ve hereditör meme ve over kanser sendromu. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Uygulama ve Araştırma Merkezi, Jinekoloji - Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi, s. 135–44

Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F (2009) DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Derleme Türk Klinik Biyokimya Dergisi 7(2): 61–70

Ordóñez L (2014) Investigation of response and resistance to PARP inhibition in mouse models of human BRCA2 - mutant breast cancer. Cardiff University, s. 7-41

Ozmen V (2008) Breast cancer in the World and Turkey. Journal of Breast Health 4(2): 7–12

Park S, Kim H (2019) Cold atmospheric plasma restores paclitaxel sensitivity to paclitaxel-resistant breast cancer cells by reversing expression of resistance-related genes. Cancers, s. 2–13

Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH (2011) Nonhomologous end joining drives Poly(ADP-Ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(8): 3406–11

Pilco-Ferreto N, Calaf GM (2016) Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. International Journal of Oncology 49(2): 753–62

Poyya J, Kumar DJ, Nagendra HG, Dinesh B, Rao SJA, Joshi CG (2021) Receptor based virtual screening of potential novel inhibitors of tigar [TP53 (Tumour Protein 53)-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator. Medical Hypotheses 156(June): 110683

Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC (2011) Clonogenic assay: adherent cells. Journal of Visualized Experiments (49): 1–4

Blagoskionny MV, Giannakakou P, El-Deiry WS, Kingston DGI (1997) “Raf-1/Bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. Cancer Research (57): 130–36

Ruvolo PP, Deng X, May WS (2001) Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. Leukemia 15(4): 515–22

Santiago-O’Farrill JM, Weroha SJ, Hou X (2020) Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) polymerase inhibitors induce autophagy-mediated drug resistance in ovarian cancer cells, xenografts, and patient-derived xenograft models. Cancer 126(4): 894–907

Saunders DE, Lawrence DW, Christensen C, Wappler NL, Ruan H, Deppe G (1997) Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. International Journal of Cancer 70(2): 214–20

Öncül S (2017) Meme kanseri hücrelerinde P53 apoptoz yolağı ve çoklu ilaç direnci üzerinde farklı etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s. 4-32

Shakeri R, Khorshidi J, Radjabian T, Lashkari A, Safavi M (2019) Cytotoxic and antioxidant activities of *crocus pallasii* subsp. *haussknechtii* corms extracts compared with *crocus sativus*. *Research Journal of Pharmacognosy* 6(3): 51–59

Shi Y, Zhou F, Jiang F, Lu H, Wang J, Cheng C (2014) PARP inhibitor reduces proliferation and increases apoptosis in breast cancer cells. *Chinese Journal of Cancer Research* 26(2): 142–47

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531(1–2): 231–51

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu YZ, Shi W (2017) Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences* 13(11): 1387–97

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–49

Tazhibi M, Feizi A (2014) Awareness levels about breast cancer risk factors, early warning signs, and screening and therapeutic approaches among Iranian adult women: a large population based study using latent class analysis. *BioMed Research International* 2014

Tok F, Koçyiğit-Kaymakcioğlu B (2015) A new approach in cancer treatment: Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences* 1(1): 1

Tokur O, Aksoy A (2017) In vitro sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 6(1):112–18

Topçul M, Çetin İ, Turan SÖ, Kolusayin Ozar MÖ (2018) In vitro cytotoxic effect of PARP inhibitor alone and in combination with nab-paclitaxel on triple-negative and luminal a breast cancer cells. *Oncology Reports* 40(1): 527–35

Tsujimoto Y (2008) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Nervenarzt* 79(3): 697–707

Tuncer M (2009) Ulusal Kanser Programı 2009-2015. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, s. 9-80

Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Ağca CA, Guzyk MM, Korsá VV, Grinenko TV (2020) Plasminogen/plasmin affects expression of glycolysis regulator tigar and induces autophagy in lung adenocarcinoma A549 cells. *Experimental Oncology* 42(4): 270–76

Ustuner D (2010) Tümör hücrelerinde western blotlama uygulamaları. *Journal of Tubav Science* 3(4): 330–34

Vera-Ramirez L, Ramirez-Tortosa MC, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL (2013) Impact of diet on breast cancer risk: a review of experimental and observational studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(1): 49–75

Vescarelli E, Gerini G, Megiorni F, Anastasiadou E, Pontecorvi P, Solito L (2020) MiR-200c sensitizes olaparib-resistant ovarian cancer cells by targeting neuropilin 1. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 39(1):1–15

Ward EM, DeSantis CE, Lin CC, Kramer JL (2015) Cancer statistics: breast cancer in situ. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65(6): 481–95

Xin Y, Huang Q, Tang JQ, Hou XY (2016) Nanoscale drug delivery for targeted chemotherapy. *Cancer Letters* 379(1): 24–31

Zahra C, Azam Moslehi¹, Rohani AEAH (2021) Chlorogenic acid inhibits growth of 4T1 breast cancer cells through involvement in Bax/Bcl2 pathway. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 14(7): 1435–42

Zhao H, Yang Q, Hu Y, Zhang J (2018) Antitumor effects and mechanisms of olaparib in combination with carboplatin and BKM120 on human triple-negative breast cancer cells. *Oncology Reports* 40(6): 3223–34

ÖZGEÇMİŞ

Abdullah YILDIRIM, 1990 yılında Diyarbakır/Kulp doğumlu. İlköğrenimini Malabaşo İlköğretim okulunda orta öğrenimini ise Kulp Y.İ.B.O’da tamamladı. Lise öğrenimini Ergani Anadolu Öğretmen Lisesi’nde başlayıp Rekabet Kurumu Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2013 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü lisans programını, 2014 yılında ise yine Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Yaşlı Bakımı bölümü ön lisans programını kazandı. Ön lisanstan 2016 lisanstan ise 2017’de mezun oldu. 2018 Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına kabul aldıysa da mezuniyetini Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda tamamladı.