**T.C.**
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

# MONOSİT VE LENFOSİT HÜCRELERİYLE OLUŞTURULAN İN VİTRO MEME KANSERİ MODELİNDE PD1, PDL1 İNHİBİSYONU VE İLAÇ DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

**GÜNEŞ ÖZEN EROĞLU**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. DÜRDANE SERAP KURUCA**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**
**DOKTORA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2023**

# İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve daha sonra doktora eğitimim sürecinde değerli bilgilerinden ve her konudaki engin tecrübelerinden faydalandığım öncelikle gerçek bir bilim insanı olmanın yanı sıra insani değerleri her şeyin üzerinde tutan ve biz öğrencilerine her daim bu değerleri hatırlatan, bendeki yeri çok özel olan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Anabilim Dalı başkanımız, değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Başta akademik olarak ilerlememdeki her türlü desteği için; her konudaki sabrı, azmi, iyi niyeti ve etik anlayışına hayranlık duyduğum, bilgisine güvendiğim, sorunlar karşısında çözüm üretmedeki ustalığı konusunda kendisini örnek aldığım, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim; disiplinler arası birlikteliklerimizle yaptığımız birçok çalışma ile doktora eğitimimi bambaşka bir boyuta taşıyan, beraber çalışmaktan büyük keyif duyduğum, üzerimde büyük emekleri olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap Kuruca' ya,

Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda doktora eğitimim süresince bana emeği geçen tüm değerli hocalarıma,

Her zaman yanımda hissettiğim, doktora eğitimim sürecindeki tüm katkıları için değerli hocam Sayın Prof. Dr. Uğur Gezer'e,

Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğrencileri olarak tüm sorularımızı kendisine danıştığımız ve her zaman göstermiş olduğu çözüm odaklı yapısı, saygısı, özeni ve hassasiyeti için değerli hocam Öğr. Gör. Mehmet Tolgahan Hakan'a,

Bilimsel bakış açısı başta olmak üzere, özellikle etik anlayış ve saygı konularındaki özenli duruşunu kendime örnek aldığım ve bana sunduğu her türlü katkılar için değerli hocam Prof. Dr. Nilgün Lütfiye Karalı' ya,

Akademik olarak ve manevi olarak varlığını her daim hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Neslihan Cabioğlu'ya,

Hem akademik hem de sosyal hayatımda her zaman yanımda olduğunu bildiğim ve çok sevdiğim değerli hocam Prof. Dr. Tülay Bal Demirci'ye ve öğrencisi Elif Avcu Altıparmak'a,

Tez çalışmamdaki büyük özverileri ve katkıları için Öğr. Gör. Dr. Ayşe Erol'a ve Dr. Esra Sert'e,

Serap Hocamızın bize öncülük etmesiyle oluşan sinerji ile birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli ekip arkadaşlarım, hocalarım Öğr. Gör. Dr. Mediha Süleymanoğlu, Öğr. Gör. Dr. Ayşe Erol, Dr. Öğr. Üyesi Dilşad Özerkan, Dr. Öğr. Üyesi Ferdane Danışman, Öğr. Gör. Nilgün Okşak, Uzm. Bio. Gökçe Erdemir, Dr. Özge Özgen, Uzm. Dr. Agil Balakishiyev ve MSc Işık Korkut'a ve ekip içerisinde adını sayamadığım değerli arkadaşlarımıza, laboratuvarımıza adım atmış herkese içtenlikle teşekkür ediyorum.

Akademik olarak ilerlememde en büyük rolü olan maddi ve manevi olarak tüm desteğiyle yanımda olan ve her zaman kalbimde olan sevgili babam Salim Özen'e büyük bir teşekkür borçluyum. Onun gibi idealist, özverili, kendini eğitime adamış yüce yürekli bir babanın kızı olmaktan gurur duyuyorum. Benim sağlık alanındaki eğitimlerimin temellerini atmamdaki bir başka kahraman da sevgili annem Erdan Özen'dir. Aileme verdikleri tüm emekleri ve bana kattıkları tüm güzellikler için çok teşekkür ederim. Ayrıca o kadar şanslıyım ki, her daim bana destek olan, varlığıyla ve enerjisiyle her zaman beni mutlu eden, özellikle doktora tez sürecimdeki tüm yardım ve desteği için biricik eşim İlkay Eroğlu 'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması vasıtasıyla verdikleri desteklerden dolayı YÖK 100/2000 Programı'na ve 1649B031901688 no'lu başvuru ile katıldığım 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında TÜBİTAK'a içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35486

# İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 4
2.1. Meme Kanseri ..... 4
2.2. Meme kanseri tedavisi ..... 6
2.3. İmmün Hücreler ve Tümör Mikroçevresi ..... 7
2.4. Meme kanseri ve İmmün mikroçevre ..... 9
2.5. Kontrol Noktası İnhibitörleri ..... 12
2.6. PD-1 / PD-L1 ..... 13
2.7. Meme kanserinde PD-1/PD-L1 Bağlantısının Rolü ..... 16
2.8. PD-1/ PD-L1 Hedefli Küçük Molekül İnhibitörleri ..... 20
2.9. BMS-1166 ..... 21
2.10. Human PD-L1 Inhibitor IV ..... 22
2.11. Kanserde ilaç direnci ..... 22
2.12. Çoklu İlaç Direnci (MDR) ..... 23
2.13. Meme Kanserinde İlaç Direncinin Moleküler Mekanizmaları ..... 26
2.14. Paklitaksel ve İlaç Direnci ..... 27
2.15. Doksorubisin ve İlaç Direnci ..... 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 30
3.1. GEREÇ ..... 30
3.1.1. Hücre Hatları: ..... 30
3.1.2. Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri: ..... 30
3.1.2.1. Jurkat Hücre Hattı ..... 30

3.1.2.2. THP-1 Hücre Hattı .....30
3.1.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı .....31
3.1.2.4. MCF-7 Hücre Hattı .....31
3.2. YÖNTEM .....34
3.2.1. Hücre Kültürü .....34
3.2.1.1. Kültür Ortamı Hazırlığı .....34
3.2.1.2. Hücrelerin Çözülmesi .....34
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması .....35
3.2.1.4. Hücre sayımı .....35
3.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması .....36
3.2.2. MTT Canlılık Testi .....36
3.2.2.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi .....36
3.2.2.2. MTT Protokolü .....37
3.2.3. Akım Sitometri .....37
3.2.4. Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmünfenotipik Karakterizasyonu .....39
3.2.5. Akım Sitometri Yöntemi ile PD-1, PD-L1 hücre yüzey proteinleri ile ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ilaç direnci proteinlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi .....40
3.2.6. Jurkat Hücresinin Fitohemaglutinin-M (PHA-M) ile Aktivasyonu .....40
3.2.7. *In vitro* Meme kanseri Modelinin oluşturulması .....41
3.2.8. İstatistiksel Yöntemler .....42
4. BULGULAR .....43
4.1. Hücre karakterizasyonu .....43
4.1.1. Jurkat Hücresinin Karakterizasyonu .....43
4.1.2. THP-1 Hücresinin Karakterizasyonu .....43
4.2. Hücrelerde bazal düzeyde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları .....44
4.2.1. Jurkat Hücresinin Fitohemaglutinin (PHA) ile Aktivasyonu .....45
4.2.2. *In vitro* Meme Kanseri Modeli .....47
4.2.3. Ko-kültür Grubunda PD-1 Ekspresyonunun Akım Sitometri ile Belirlenmesi 48
4.3. Kemoterapi İlaçlarının ve PD-1/PD-L1 İnhibitörlerinin Hücre Canlılık Analizleri .....49
4.3.1. Hücrelerde Doksorubisinin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi .....49
4.3.2. Hücrelerde Paklitakselin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi .....50
4.3.3. Ko-kültür gruplarında Doksorubisinin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi .....51

4.3.4. Ko-kültür gruplarında Paklitakselin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi.....52
4.3.5. Hücrelerde BMS-1166 İnhibitörünün Canlılık Analizi .....53
4.3.5.1. Farklı Dozlarda BMS-1166 inhibitörü Uygulaması Sonrası Mikroskop Hücre Görüntüleri .....54
4.3.6. Hücrelerde Human PD-L1 inhibitör IV'ün Canlılık Analizi .....56
4.3.6.1. Farklı Dozlarda Human PD-L1 inhibitör IV Uygulaması Mikroskop Hücre Görüntüleri .....57
4.3.7. PD-1/PD-L1 İnhibitörleri ve Kemoterapi İlaçlarının Birlikte Kullanımına ait Hücre Canlılık Analizleri .....58
4.3.7.1. MCF-7: Jurkat Ko-kültürü Hücre canlılık analizleri.....59
4.3.7.2. MCF-7: THP-1 Ko-kültürü Hücre Canlılık Analizleri.....60
4.3.7.3. MDA-MB-231: Jurkat Ko-kültürü Hücre Canlılık Analizleri .....61
4.3.7.4. MDA-MB-231: THP-1 Ko-kültürü Hücre Canlılık Analizleri .....62
4.4. Akım Sitometri ile Kemoterapi ilaçları ve PD1/PD-L1 inhibitörlerinin Uygulaması ile PD-1, PD-L1 ekspresyonları ve ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının Tayini .....63
4.4.1. MCF-7: Jurkat ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi.....63
4.4.2. MCF-7: Jurkat ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi .....64
4.4.3. MCF-7 THP-1 ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi.....65
4.4.4. MCF-7 THP-1 ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi .....67
4.4.5. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi .....68
4.4.6. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi .....70
4.4.7. MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi .....71
4.4.8. MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi .....72
5. TARTIŞMA .....79
KAYNAKLAR .....89
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....103

# TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Kullanılan kimyasallar ..... 32
Tablo 3-2: Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan CD Belirteçleri ..... 33
Tablo 3-3: Kullanılan Alet ve Cihazlar ..... 33
Tablo 4-1: Farklı konsantrasyonlarda PHA-M uygulanan Jurkat hücrelerinin akım sitometri sonuçlarının kontrole göre PD-1 ve PD-L1 ekspresyon değişimleri ..... 46
Tablo 4-2: Ko-kültürdeki hücrelerde PHA-M ve rekombinant PD-1 proteini uygulaması ile PD-1 ekspresyon değişimleri ..... 49
Tablo 4-3: Hücrelerde ve ko-kültür gruplarında Dox ve PTX'in $IC_{50}$ Değerleri ..... 52
Tablo 4-4: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında PD-1 ekspresyon değişimi ..... 74
Tablo 4-5: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında PD-L1 ekspresyon değişimi ..... 75
Tablo 4-6: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında ABCG2 ekspresyon değişimi ..... 76
Tablo 4-7: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında MDR-1 ekspresyon değişimi ..... 77
Tablo 4-8: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında MRP-1 ekspresyon değişimi ..... 78

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meme kanseri progresyonu, prognozu, alt tipleri ve uygun tedavi seçenekleri7
Şekil 2-2: Kanserde temel mekanizmalar ..... 9
Şekil 2-3: PD-1 ve PD-L1'in moleküler yapıları ..... 15
Şekil 2-4: PD-1/PD-L1 bağlantısı ve inhibisyon mekanizması ..... 16
Şekil 2-5: BMS-1166 inhibitörünün kimyasal yapısı ..... 21
Şekil 2-6: Human PD-L1 inhibitör IV (Ar5Y_4) inhibitörünün kimyasal yapısı ve peptit dizisi ..... 22
Şekil 2-7: P-gp, MRP-1 ve BCRP'nin hücre membranındaki konumları ve ATP bağlantısı ..... 24
Şekil 3-1: Mikroskopta hücre sayımı, Neubauer lamı ve lamda hücre görüntüleri ..... 35
Şekil 3-2: Akım sitometre ve akım sitometrenin çalışma prensibi ..... 38
Şekil 3-3: Monosit ve lenfosit hücreleri ile oluşturulan *in vitro* meme kanseri modeli . 41
Şekil 4-1: Jurkat hücresinin lenfositik karakterizasyonu ..... 43
Şekil 4-2: THP-1 hücresinin monositik karakterizasyonu ..... 43
Şekil 4-3: Hücrelerin akım sitometrik olarak belirlenen bazal PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları ..... 44
Şekil 4-4: Jurkat Hücresinin Fitohemaglutinin (PHA) ile Aktivasyonu ..... 46
Şekil 4-5: Ko-kültürdeki hücrelerde PHA-M ve rekombinant PD-1 proteini uygulaması ile PD-1 ekspresyon değişimleri ..... 48
Şekil 4-6: MDA-MB-231, MCF-7, Jurkat ve THP-1 hücrelerinde Dox uygulamasının hücre canlılıklarına etkisi ..... 49
Şekil 4-7: MDA-MB-231, MCF-7, Jurkat ve THP-1 hücrelerinde PTX uygulamasının hücre canlılıklarına etkisi ..... 50
Şekil 4-8: MCF-7: Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında Dox'un hücre canlılıklarına etkisi ..... 51
Şekil 4-9: MCF-7: Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında PTX'in hücre canlılıklarına etkisi ..... 52
Şekil 4-10: BMS-1166 inhibitörünün meme kanseri hücreleri ve ko-kültür gruplarında hücre canlılık grafikleri ..... 53

Şekil 4-11: MCF-7 hücreleri, MCF-7: Jurkat ko-kültürü ve MCF-7: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörünün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x) ..... 54
Şekil 4-12: MDA-MB-231 hücreleri, MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörünün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x) ..... 55
Şekil 4-13: Human PD-L1 inhibitör IV'ün meme kanseri hücreleri ve ko-kültür gruplarında hücre canlılık grafikleri ..... 56
Şekil 4-14: MCF-7 hücreleri, MCF-7: Jurkat ko-kültürü ve MCF-7: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV'ün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x) ..... 57
Şekil 4-15: MDA-MB-231 hücreleri, MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV'ün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x) ..... 58
Şekil 4-16: MCF-7: Jurkat ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri ..... 59
Şekil 4-17: MCF-7: THP-1 ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri ..... 60
Şekil 4-18: MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri ..... 61
Şekil 4-19: MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri ..... 62
Şekil 4-20: MCF-7: Jurkat ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları ..... 63
Şekil 4-21: MCF-7: Jurkat ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları ..... 64
Şekil 4-22: MCF-7: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları ..... 65

Şekil 4-23: MCF-7: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları ..... 67
Şekil 4-24: MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları ..... 68
Şekil 4-25: MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları..... 70
Şekil 4-26: MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları ..... 71
Şekil 4-27: MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları..... 72

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PD-1: Programlanmış ölüm-1

PD-L1: Programlanmış ölüm- ligand 1

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FDA: ABD Gıda ve İlaç İdaresi

Dox: Doksorubisin

PTX: Paklitaksel

PHA: Fitohemaglutinin

ESM: Ekstraselüler matriks

TİM:Tümörle ilişkili makrofajlar

TİN: Tümörle ilişkili nötrofiller

TIL: Tümör infiltre eden lenfosit

$T_{reg}$: Düzenleyici T hücreleri

PI3KCA: Fosfatidilinositol 3-kinaz

HER2: Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

BRCA1: Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini

BRCA2: Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini

ERS1: Östrojen reseptörü geni

ATM: Ataksi-telanjiektazi mutasyona uğramış

TP53: Tümör proteini p53

PALB2: BRCA2'nin ortağı ve lokalizörü

CHEK2: Kontrol noktası kinaz 2

PTEN: Fosfataz ve tensin homologu

STK11: Serin/Treonin Kinaz 11

NF1: Neurofibromin 1

PI4: Human PD-L1 inhibitör IV

MDR-1: P-glikoprotein, Çoklu ilaç direnci-1

MRP-1: Çoklu ilaç direnci protein-1

ATP: Adenozintrifosfat

ABC: ATP- bağlayıcı kaset

ABCG2: ATP-bağlayıcı kaset süper aile G üyesi 2

ER: Östrojen reseptörü

PR: Progesteron reseptörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptör-1

PARP1: Poli [ADP-riboz] polimeraz 1

c-KIT: Tirozin protein kinaz KIT

DFS: Hastalıksız sağkalım

OFS: Genel sağkalım

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

MMP: Matriks metalloproteinaz

IFN-γ: İnterferon-γ

IL: İnterlökin

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarma faktörü

CD: Farklılaşma Kümesi

TNMK: Üçlü negatif meme kanseri

TME: Tümör mikroçevresi

TLR: Toll-benzeri reseptör

STAT: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü

CDKN: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog

ABC: ATP bağlayıcı kaset

CTLA-4: Sitotoksik T lenfositle ilişkili molekül-4

IRF-1: İnterferon düzenleyici faktör-1

RPMI: Roswell Park Memorial Enstitüsü

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

PBS: Fosfat tamponu

FBS: Fötal Sığır Serumu

HIF-1α: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1

FFPE: Formalinde fikse edilmiş parafine gömülü

IHC: İmmünhistokimya

ASH: Antijen sunan hücre

qRT-PCR: Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

siRNA: Küçük interferans RNA

$IC_{50}$: Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu

BMS: *Bristol-Myers Squibb*

BCRP: Meme kanseri ilişkili protein

M: Makrofaj

Th: Yardımcı T hücresi

ITIM: İmmunreseptör tirozin bazlı inhibe edici motif

ITSM: İmmunreseptör tirozin bazlı anahtar motif

TNF: Tümör nekroz faktörü

DNA: Deoksiribonükleik asit

µL: Mikrolitre

µM: Mikromolar

nM: Nanomolar

CYP450: Sitokrom p450

GST: Glutatyon-S-transferaz

UGT: Üridindifosfo-glukuronozil transferaz

NBD: Nükleotit-bağlanma bölgesi

TMD: Transmebran bölge

PDCD4: Programlı hücre ölümü-4

EMT: Epitelyal mezenkimal geçiş

Bcl-2: B hücre lenfoma-2

DMSO: Dimetil sülfoksit

# ÖZET

Özen Eroğlu, G. (2023). Monosit ve Lenfosit Hücreleriyle Oluşturulan in vitro Meme Kanseri Modelinde PD1, PDL1 İnhibisyonu ve İlaç Direnci ile İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Meme kanserinde hedefe yönelik tedavilerden immünoterapi son yıllarda oldukça yaygın bir tedavi stratejisidir. Kanser mikroçevresinde yer alan immün hücreler, tedaviyi değiştirme potansiyeli taşımaktadır. PD-1 ve PD-L1 hedefli tedaviler ile kanser ve immün sistem arasındaki bağlantı büyük önem kazanmaktadır. Çalışmamızda immün hücrelerle oluşturulan *in vitro* meme kanseri modeli ile PD-1/PD-L1 inhibisyonu ile ilaç direnci protein ekspresyonlarındaki olası değişikliklerin incelenmesi amaçlandı. Meme kanseri hücreleri olarak MDA-MB-231 ve MCF-7, monosit hücresi olarak THP-1, lenfosit hücresi olarak Jurkat kullanıldı. Tedavide sıklıkla kullanılan kemoterapi ilaçlarından Paklitaksel ve Doksorubisinin MTT hücre canlılık analizleriyle $IC_{50}$ değerleri belirlendi. Hücrelerde PD-1 ve PD-L1 inhibisyonunu sağlayan Human PD-L1 inhibitör IV ve BMS-1166 inhibitörlerinin canlılık analizleri gerçekleştirildi. Hücrelerde PD-1 reseptörü, PD-L1 ligandı ve ABCG2, MDR-1, MRP-1 ilaç direnci protein ekspresyonları arasındaki ilişki ve hücreler arasındaki farklar akım sitometri ile değerlendirildi. Doksorubisinin MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü hariç tüm ko-kültür gruplarında PD-L1 ekspresyonu azalttığı, MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü dışında ilaç direnci proteinlerini azalttığı belirlendi. BMS-1166 inhibitörü tüm ko-kültür gruplarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı ve kemoterapi ilaçları ile daha da azalttı. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe iki inhibitör de PD-L1 ekspresyonunu azaltarak inhibisyon etki gösterdi, buna karşılık ilaç direnci proteinlerinde artış gözlendi. Paklitakselin PD-L1 üzerine etkileri ko-kültür gruplarına göre değişkenlik gösterdi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, meme kanserinde özellikle farklı immün hücre popülasyonlarına sahip tümörlerde, kemoterapi ilaçlarının ve PD-1/PD-L1 hedefli inhibitörlerin, PD-L1 ve ilaç direnci ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu üzerine farklı etki ettiğini göstermesi açısından önem kazanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, immün hücreler, PD-1, PD-L1, ilaç direnci

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35486

Bu çalışma ayrıca, YÖK 100/2000 Programı ve TÜBİTAK 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

## ABSTRACT

Özen Eroğlu, G. (2023). Investigation of the Relationship with PD1, PDL1 Inhibition and Drug Resistance in the In Vitro Breast Cancer Model Created by Monocyte and Lymphocyte Cells. Tezin İngilizce Adı. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. PhD thesis. İstanbul.

Breast cancer is the most common type of cancer in women. Immunotherapy, one of the targeted therapies in breast cancer, is a very common treatment strategy in recent years. Immune cells in the cancer microenvironment have the potential to change the treatment. The connection between PD-1 and PD-L1 targeted therapies and cancer and immune system is gaining great importance. In our study, we aimed to investigate the possible changes in drug resistance protein expressions with PD-1/PD-L1 inhibition in an *in vitro* breast cancer model established with immune cells. MDA-MB-231 and MCF-7 were used as breast cancer cells, THP-1 as monocyte cell and Jurkat as lymphocyte cell. $IC_{50}$ values of Paclitaxel and Doxorubicin, chemotherapy drugs frequently used in treatment, were determined by MTT cell viability assays. The viability analyzes of Human PD-L1 inhibitor IV and BMS-1166 inhibitors that provide PD-1 and PD-L1 inhibition in cells were performed. The relationship between PD-1 receptor, PD-L1 ligand and ABCG2, MDR-1, MRP-1 drug resistance protein expressions in cells and the differences between cells were evaluated by flow cytometry. It was determined that doxorubicin decreased PD-L1 expression in all co-culture groups except MDA-MB-231: THP-1 co-culture, and drug resistance protein expressions were decreased except MDA-MB-231: Jurkat co-culture. BMS-1166 inhibitor significantly reduced cell viability in all co-culture groups and further reduced it with chemotherapy drugs. In the MDA-MB-231: Jurkat co-culture, both inhibitors showed an inhibitory effect by reducing PD-L1 expression, while an increase in drug resistance proteins was observed. The effects of paclitaxel on PD-L1 varied according to the co-culture groups. The results obtained from this study gain importance in terms of showing that chemotherapy drugs and PD-1/PD-L1 targeted inhibitors have different effects on the expression of PD-L1 and drug resistance-related proteins in breast cancer, especially in tumors with different immune cell populations.

Key Words: Breast cancer, immune cells, PD-1, PD-L1, drug resistance

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 35486

This study was also supported within the scope of YÖK 100/2000 Program and TÜBİTAK 2211-C Domestic Priority Areas PhD Scholarship Program.

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; hastaya özgü çok parametreli değişkenler içeren oldukça karmaşık bir sürece sahip ve halen tedavi şansı düşük bir hastalıktır. Kanseri tedavi etmek amacıyla günümüze kadar yapılan birçok keşif, üzerinde çalışılan birçok ilaç ve klinik çalışmalar neticesinde hastalara daha etkin tedavi rejimleri uygulanması mümkün olmaktadır.

Kanserin temel biyolojik mekanizmaları; çoğalma sinyalinin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçılması, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, immün yıkımın önlenmesi, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, tümör uyarıcı inflamasyon, polimorfik mikrobiyomlar, invazyon ve metastazın aktivasyonu, anjiyogenezin uyarılması, hücre yaşlanması, genomik instabilite ya da mutasyon varlığı, hücre ölümüne karşı direnç, hücresel metabolizmanın deregülasyonu, fenotipik plastisitenin kilidinin açılması gibi karmaşık süreçlerin bir kısmını ya da tamamını içine almaktadır (Hanahan, 2022).

2018 yılında verilen Nobel ödülü ile immünoterapinin tedavi seçenekleri arasına girmesi kanser tedavisinde büyük bir umut niteliği taşımaktadır. Kanser ve immün sistem arasındaki ilişki ile kişiye özgü tedavilerin önemi bir kez daha ortaya konmuştur. Kontrol noktası inhibitörleri, tümör hücresi-immün sistem hücresi etkileşimini düzenleyerek hastanın kendi immün sistemini tümör hücrelerini yok etmeye yönlendirmektedir. İmmünoterapide yer alan çoklu kontrol noktası inhibitörleri arasında, programlanmış ölüm-1 (PD-1)/programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) inhibitörleri, klinik uygulamalarda en parlak başarıyı elde etmiştir (Alsaab et al., 2017) (Mellman, Coukos, & Dranoff, 2011). Kanser hücreleri; immün sistemi baskılayıcı sinyaller oluşturma, immün tanıma mekanizmasından kaçma veya inflamasyon aracılığı ile immün mikroçevreyi etkileme potansiyeli ile progresyonu desteklemektedir. Uygun koşullar sağlandığında, mutasyona uğramış hücreler tarafından başlatılan lökosit aktivasyonu, malign tümör hücrelerine neoplastik dönüşümleri ilerletebilmektedir (Cavallo, De Giovanni, Nanni, Forni, & Lollini, 2011). Kanser immün düzenleme hipotezine göre, immün sistemin hem organizmayı koruyucu hem de tümör uyarıcı etki gösterdiği varsayılmaktadır (Dunn, Old, & Schreiber, 2004).

Tümör mikroçevresinde (TME) yer alan immün sistem hücrelerini, tümör ile ilişkili makrofajlar, tümör ile ilişkili nötrofiller, T lenfositler ($CD8^+$ T hücreleri, $CD4^+$ T

hücreleri, foliküler yardımcı T hücreleri ve düzenleyici T hücreleri ($T_{reg}$'ler), B lenfositler, tümör ile ilişkili fibroblastlar, dendritik hücreler (DC), doğal öldürücü (NK) hücreleri oluşturmaktadır (Tower, Ruppert, & Britt, 2019).

PD-1, aktive olmuş T hücreleri, B hücreleri, DC hücreleri ve monosit hücreleri üzerinde eksprese olmaktadır (Ohaegbulam, Assal, Lazar-Molnar, Yao, & Zang, 2015). PD-L1, T hücreleri, B hücreleri, DC hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere hematopoietik hücreler ile vasküler endotelyal hücreler, astrositler ve keratinositler gibi bazı hematopoietik olmayan hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda PD-L1'in tümör hücreleri ve tümör stroma hücrelerinde de eksprese olduğu bildirilmektedir (C. Sun, Mezzadra, & Schumacher, 2018).

PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşim, PD-1'in hücre sinyalizasyonunu aktive ederek T hücre aktivasyonunu baskılamaktadır. $CD8^+$ T hücreleri, tümör hücrelerini öldürmek için çok önemli olmakla birlikte PD-1/PD-L1 bağlantısı bu aktivasyona engel olarak tümörün immün kaçışına izin vermektedir. İmmünoterapide de bu bağlantının blokajı ile immün tanıma ile tümör hücrelerinin öldürülmesi hedeflenmektedir (L. Chen & Han, 2015).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserlerden biridir ve gelişmiş ülkelerde prevalansı giderek artmaktadır. Aynı zamanda mortalite oranları açısından diğer kanserler arasında 5. sırada yer almaktadır (Sung et al., 2021). Meme kanseri gelişiminde; cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıksız yaşam tarzı gibi çok sayıda risk faktörü görülmektedir (Y.-S. Sun et al., 2017). Tedavide cerrahi, radyoterapi, hormonal tedaviler, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler uygulanmaktadır (Debien et al., 2023; Moo, Sanford, Dang, & Morrow, 2018). Meme kanseri önceki yıllarda immün temelli bir kanser türü olarak görülmese de son yapılan çalışmalarla bu bakış açısından uzaklaşılmış ve tedavi protokolleri bu bağlamda güncellenmiştir.

Meme kanseri moleküler alt tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen yüksek PD-L1 ekspresyonları kötü prognozla ilişkilendirilmiş olup PD-1/PD-L1 blokajı ile bu durumun tersine çevrilebileceği öngörülmektedir (Gatalica et al., 2014; Muenst et al., 2014).

Meme kanseri hücrelerinde, normalde tümörlerde artmış PD-L1 ekspresyonunun yanı sıra kemoterapi ilaçlarının da PD-L1 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmektedir

(Gilad et al., 2019). Yapılan çalışmalarda PD-1/PD-L1 etkileşiminin meme kanser hücrelerinde ilaç direnci proteinlerinden çoklu ilaç direnci-1(MDR-1) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmekte ve kemoterapiye olan direncin de PD-1/PD-L1 aracılı bir mekanizmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (S. Liu et al., 2017).

Taksan türevli bir ilaç olan Paklitaksel (PTX) ve antrasiklin türevli bir ilaç olan Doksorubisin (Dox), meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan etkili ve aynı zamanda ilaç direnci geliştirdiği bilinen kemoterapi ilaçlarındandır. Birçok kanser hücresinde ve meme kanserinde bu ilaçların P-glikoprotein (P-gp, MDR-1), çoklu ilaç direnci ilişkili protein-1 (MRP-1) ve meme kanseri dirençli protein (BCRP, ABCG2) ilaç direnci proteinlerinin artışına sebep olduğu gösterilmektedir (Gote, Nookala, Bolla, & Pal, 2021).

Kanser tedavisinin başlarında ve ilerleyen tedavi süreçlerinde çok sayıda ilaç direnci proteininin ekpresyonlarının arttığı bilinmektedir. Kanserde çoklu ilaç direnci aşılması zor olan ve aynı zamanda hastalığın nüksünde rol oynayan bir durum olmakla birlikte kemoterapi ve immünoterapi tedavi stratejilerinin ilaç direncini ne yönde etkilediğini bilmek tedavi başarısı açısından oldukça büyük önem taşımaktadır (Gote et al., 2021).

İmmünoterapide, PD-L1/PD-1 bağlantısının Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı antikor temelli ilaçlar tarafından bloke edilmesi, kanser tedavisi açısından klinik olarak etkili bir strateji olmuştur. Bununla birlikte antikor yapısındaki ilaçların yan etki potansiyeli, yüksek üretim maliyetleri, saklama güçlüğü, immünojenisite, farmakokinetik sonuçlar ve yetersiz organ veya tümör penetrasyonu gibi dezavantajları dikkate alındığında küçük molekül inhibitörlerinin tedavide kullanımı yeni bir yaklaşım sağlamaktadır (Chang et al., 2015).

Çalışmamızda meme kanseri hücreleri ve immün hücrelerin birlikte olduğu *in vitro* bir modelde PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeyleri ile ilaç direnci proteinlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki hem kemoterapi ilaçları hem de küçük moleküler yapılı PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile birlikte değerlendirilmektedir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya çapında tahmini 2,3 milyon yeni vaka ile şu anda en yaygın teşhis edilen kanserlerden biri olmakla birlikte akciğer, kolon, karaciğer ve mide kanserlerinden sonra kansere bağlı ölümlerin 5. nedenidir. Türkiye'de ise mortalite oranları açısından sıralama akciğer, kolon, mide, pankreas ve meme kanseri olarak devam etmektedir (Sung et al., 2021).

Meme kanserinin hücresel temellerine bakıldığında; fibroblastlar, miyofibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller ve lenfositlerden oluşan stromadan bazal membran ile ayrılmış bir epitelyal ve miyoepitelyal hücre tabakası içeren terminal duktusların lobüler birimlerinden ortaya çıktığı görülmektedir. Normal meme hücreleri, PI3KCA (fosfatidilinositol 3-kinaz) ve HER2 (epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) gibi onkogenlerde fonksiyon mutasyonlarının kazanılması veya BRCA1 (meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini),) BRCA2 (meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini), ERS1 (östrojen reseptörü geni), ATM (ataksi-telanjiektazi mutasyona uğramış), TP53 (tümör proteini p53), PALB2 (BRCA2'nin ortağı ve lokalizörü), CHEK2 (Kontrol noktası kinaz 2), PTEN (fosfataz ve tensin homologu), STK11 (Serin/Treonin Kinaz 11) veya NF1 (Neurofibromin 1) gibi tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon mutasyonlarının kaybı nedeniyle tümörijenik hale gelebilmektedir (Harbeck et al., 2019; Y.-S. Sun et al., 2017).

Meme kanseri, tam bir miyoepitelyal hücre tabakası ve bazal membran ile epitel hücre proliferasyonu ile karakterize olan ve miyoepitelyal hücre tabakasının bozulması ve bazal membranın degradasyonunun ardından komşu dokulara invaze (invaziv duktal karsinom) ve metastaz ile ilerleyen bir kanser türüdür. Metastatik meme kanserinde, miyoepitelyal hücre tabakası ve bazal membran kaybı sonucu stromal hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve tümörijenik-epitelyal hücrelerin uzak bölgelere invazyonu gerçekleşmektedir. Kan veya lenfatik sistemden geçtikten sonra, metastatik meme kanseri hücrelerinin ana hedef bölgeleri arasında kemikler, karaciğer, akciğerler ve beyin bulunmaktadır (Khamis, Sahab, & Sang, 2012; S. Kumar, Desmedt, Larsimont, Sotiriou, & Goormaghtigh, 2013) (Şekil 2-1).

Meme kanserinde kesin tanı histopatoloji ile konulmakta ve evreleme, tümör boyutu, nodüller ve metastaz oluşumu değerlendirilerek yapılmaktadır (Rakha et al., 2010). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yakın zamanda meme kanserini ondokuz ana histoloji alt tipine ayırmaktadır. Daha nadir alt tipler olarak, tübüler karsinom, kribriform karsinom, müsinöz karsinom, pleiomorfik lobüler karsinom, yüksek dereceli metaplastik karsinom, mikropapiller karsinom ve inflamatuar meme kanserleri de bulunmaktadır (Harbeck et al., 2019).

Meme kanserinin en yaygın alt tipleri invaziv karsinom (%70-75) ve lobüler karsinomdur (%12-15). Her histolojik alt tipin kendine özgü bir prognozu ve tedavi protokolü bulunmaktadır. Meme kanseri ayrıca östrojen reseptörleri (ER), progesteron reseptörleri (PR) ve HER2 ifadelerine göre moleküler alt tipler olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca Ki67, tümör proliferasyonunu ve kemosensitiviteyi öngörmek için kullanılan bir belirteçtir ve ayrıca belirli moleküler alt tipler için bazı prognostik değerlere sahiptir (Feng et al., 2018; Waks & Winer, 2019). Bu parametrelerin değerlendirilmesi ile hastanın tanısı ve prognozu multidisipliner bir yaklaşımla yapılmaktadır. Tümörler, Luminal A benzeri alt tip (ER+ ve/veya PR+ ve HER2-, düşük Ki67 indeksi); Luminal B benzeri alt tip HER2+ (ER+ ve/veya PR+ ve HER2+, yüksek Ki67 indeksi) veya Luminal B benzeri HER2- (ER+ ve/veya PR+ ve HER2-, yüksek Ki67 indeksi); HER2 alt tipi (ER-, PR- ve HER2+, yüksek Ki67 indeksi) ve üçlü negatif (ER-, PR- ve HER2-, yüksek Ki67 indeksi) olarak sınıflandırılmaktadır (Boix-Montesinos, Soriano-Teruel, Arminan, Orzáez, & Vicent, 2021) (Şekil 2-1).

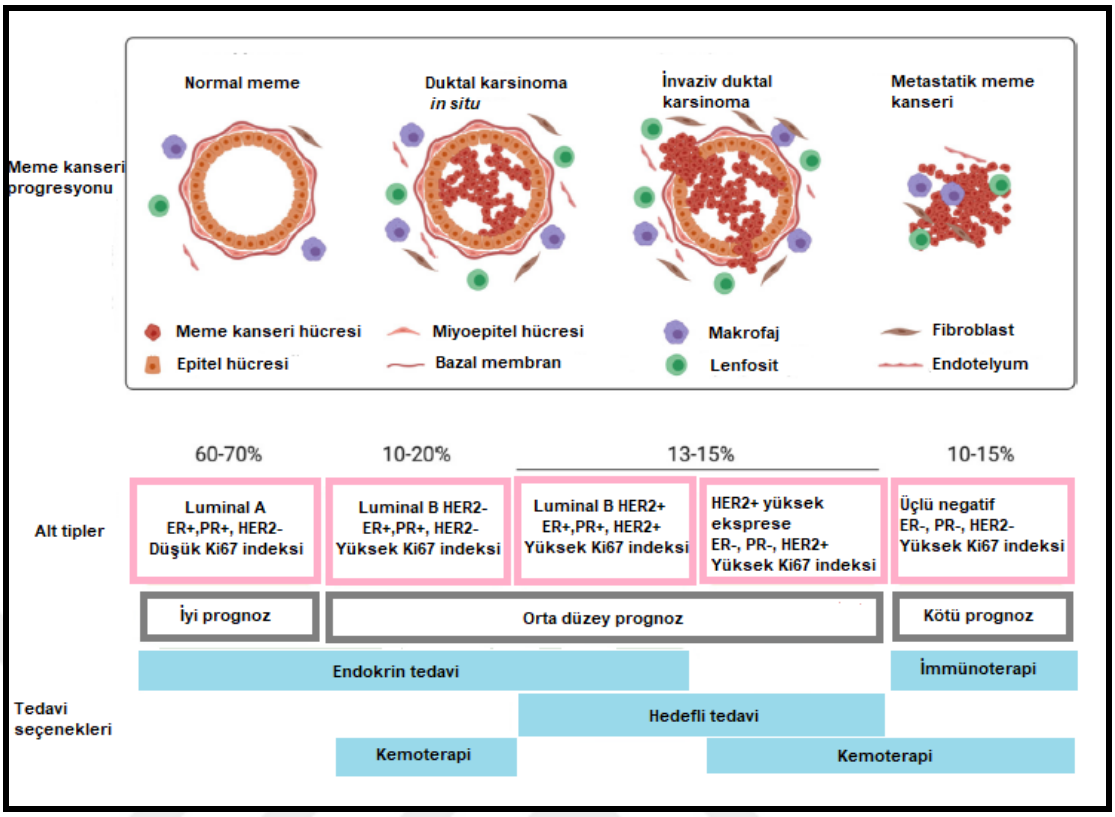
Luminal A olarak sınıflandırılan tümörler, iyi prognozla ve genellikle erken evre; Luminal B kötü prognozla birlikte, ileri tümör evreleri ve proliferatif aktivite ile ilişkilidir; HER2, daha çok lokal veya bölgesel nüks insidansı ile aşırı olarak eksprese edilmekte ve üçlü negatif ise kötü prognoz, daha yüksek nüks oranları, uzak metastazlar ve mortalite ile ilişkilidir. Kadınlarda kanser ölümlerinin temel nedeni, birincil tümörün kendisine değil, vücuttaki uzak organlara metastazının bir sonucu olarak görülmektedir (Allison, 2012; Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012; Rivenbark, O'Connor, & Coleman, 2013)(Şekil 2-1).

## 2.2. Meme kanseri tedavisi

Genel olarak meme kanseri tedavileri; hastalığın iyileştirilmesine, daha yüksek hastalıksız sağkalım (*disease free survival-DFS*) ve genel sağkalım (*overall survival-OS*) süresi ve yaşam kalitesine odaklanmaktadır. Tedavide lokal, sistemik ve destek tedavileri gibi farklı yaklaşımlardan yararlanılmaktadır. Lokal tedaviler cerrahi ve radyoterapiyi, sistemik tedaviler ise kemoterapi, immünoterapi, hedefli ve hormon tedavilerini kapsamaktadır. Tedavi seçiminde tümörün yeri ve boyutu, lenf nodu tutulumu, histopatolojisi, moleküler alt tipi ve metastaz varlığı dikkate alınmaktadır. Ayrıca hastanın genel sağlık durumu, yaşı, hormonal durumu ve tercihleri de değerlendirilmektedir (Burguin, Diorio, & Durocher, 2021).

Metastatik tümörleri bulunmayan hastalarda; tümörün ve bazı durumlarda koltuk altı lenf düğümlerinin cerrahi olarak çıkarılması ve ardından radyoterapi ile lokal tedavi yapılması önerilmektedir. Meme koruyucu lokal cerrahiden sonra çoğu hasta için radyasyon tedavisi uygulanmaktadır. Ek olarak sistemik tedavi, cerrahi için bir neoadjuvan ve/veya adjuvan tedavi olarak kullanılabilmektedir (Harbeck et al., 2019; Waks & Winer, 2019).

Metastatik tümörleri de içine alan ileri evre üçlü negatif meme kanseri (TNMK) tedavisi, tümörün moleküler özelliklerine dayanmaktadır ve çeşitli kemoterapi tedavilerinin yanısıra, tümörde BRCA1 işlevi olmadığında veya azaldığında poli-ADP riboz polimeraz-1 (PARP1) inhibisyonu, tümör epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR)'yi aşırı ifade ettiğinde antikor tedavisi, c-KIT'i aşırı ifade ettiğinde c-KIT tirozin kinaz inhibitörü ve EGFR'yi aşırı ifade ettiğinde multikinaz inhibitörleri, immünoterapi ile yapılan diğer tedavi seçenekleri de kullanılabilmektedir (Balic, Thomssen, Würstlein, Gnant, & Harbeck, 2019; Boix-Montesinos et al., 2021).




**Şekil 2-1: Meme kanseri progresyonu, prognozu, alt tipleri ve uygun tedavi seçenekleri**

(Boix-Montesinos et al., 2021)

## 2.3. İmmün Hücreler ve Tümör Mikroçevresi

Kanserin temel mekanizmalarından; çoğalma sinyalinin devamlılığı, büyüme baskılayıcılarından kaçma, immün yıkımın önlenmesi, tümör uyarıcı inflamasyon, invazyon ve metastazın aktivasyonu, anjiyogenezin uyarılması gibi birçok mekanizma TME'nin organizasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Hanahan, 2022) (Şekil 2-2).

TME, hücre dışı matriks, diğer hücre tipleri ve çok sayıda kan damarı, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli proteinlere ek olarak, tümörün heterojenitesini destekleyen farklı fenotiplere ve genotiplere sahip hücrelerden oluşmaktadır. Son yıllarda TME'nin, kanserin ilerlemesinde rolü olan anahtar faktörler ve bu faktörlerin etkileşimleri ile tümörün kemoterapiye olan tepkisini değiştirebilme potansiyeli pek çok hücresel mekanizma ile araştırılmaktadır (Netea-Maier, Smit, & Netea, 2018; Roma-Rodrigues, Mendes, Baptista, & Fernandes, 2019; Tsai, Chang, Huang, & Kuo, 2014; Yuan, Jiang, Sun, & Chen, 2016).

Adaptif immün sistemde, tümör hücrelerinin varlığının tespiti ile $CD8^+$ sitotoksik T lenfositleri aracılığıyla anormal olarak algılanan hücreler öldürülmektedir. Tümör immün gözetimi olarak da adlandırılan bu sürecin aşılmasıyla kanserleşme sürecinin başladığı belirtilmektedir. Bu noktada kilit bir rolde bulunan anti-kanser stratejisi ile; T hücre fonksiyonlarını baskılayan mekanizmaların durdurulması ve yeniden aktivasyonunun sağlanması ile kanser tedavisinde immün sistemin geri kazanılması hedeflenmektedir (Hirata & Sahai, 2017).

Tümörde miyeloid hücreler; olgunlaşmamış miyeloid hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar (TİM) ve tümörle ilişkili nötrofiller (TİN) olarak üç ana tür olarak yer almaktadır (Yang & Lin, 2017). Makrofajlar polarizasyon durumlarına göre M1 ve M2 alt tiplerine ayrılmaktadır. M1 makrofajları, Th1, interferon γ (IFN-γ) ve çeşitli mitojenler ile aktive edilebilirken, buna karşılık M2 makrofajlar; IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi Th-2 sitokinlerine cevap olarak farklılaşmaktadır. TİM'ler bağlamında bakıldığında, M1 makrofajlarının tümör öldürücü etki gösterdiği, M2 makrofajlarının ise tümörü desteklediği belirtilmektedir (T. Wu & Dai, 2017). TİM'ler; anjiyogeneze yol açan büyüme faktörlerinin üretimi, ekstraselüler matriks (ESM)'nin enzimlerle yeniden düzenlenmesi ve tümör hücrelerinin kaçışına izin veren konak immün sisteminin baskılanması gibi önemli süreçlerde rol oynamaktadır (Weber & Kuo, 2012).

Nötrofiller de tümörde ve metastaz süreçlerinde makrofajlarınkine benzer olarak vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi proteazları ve proanjiyojenik faktörleri salgılarlar (Missiaen, Mazzone, & Bergers, 2018).

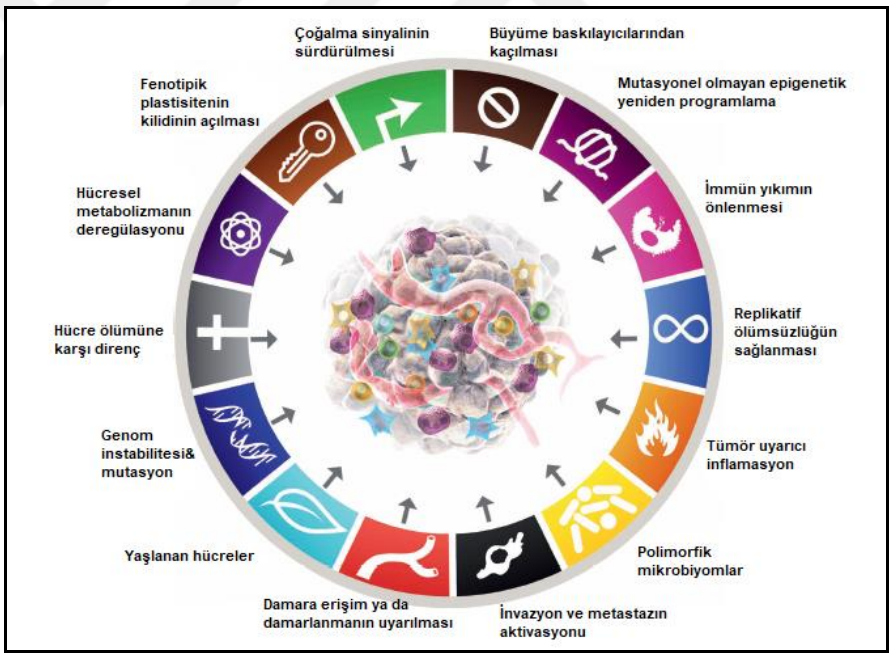
DC'ler, tümör antijen sunumunu bozarak, T hücre tükenmesini ifade eden efektör T hücrelerinin aktivitesinin zamanla azaldığı, son olarak apoptoz ile hafıza T hücresi alt popülasyonunun oluşumunun bozulduğu bir metabolik işlev kaybı ile ve düzenleyici T hücrelerini ($T_{reg}$'ler) uyararak anti-tümör T hücresi tepkilerini inhibe ederek rol oynar (Aksoylar, Tijaro-Ovalle, Boussiotis, & Patsoukis, 2020; Blomberg, Spagnuolo, & de Visser, 2018).

CD4+ T hücreleri de, TİM'ler gibi tümör destekleyici immün hücrelerin aktivasyonu ve polarizasyonunda rol oynayan IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler üretmektedir. Kanser türüne göre, $T_{reg}$'ler, tümör infiltre eden lenfositlerin (TIL'ler) önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İmmün-baskılayıcı aktiviteleri ile otoimmüniteyi

ve patojenlere karşı olan aşırı tepkileri önleme gibi oldukça önemli fonksiyonlara sahip olan $T_{reg}$'lerin tümör dokusunda birikmesi tümörlerin çoğunda kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir (Blomberg et al., 2018; Yang & Lin, 2017).

B hücreleri, doğrudan VEGF, FGF2 ve MMP-9 gibi pro-anjiyojenik faktörlerin üretimi ile veya dolaylı yoldan makrofajların immün-baskılayıcı ve pro-anjiyojenik bir fenotipe polarizasyonu ile anjiyogenezi uyarabildiği gösterilmiştir (Blomberg et al., 2018; Missiaen et al., 2018).

Kronik inflamasyonlu dokularda genellikle yüksek oranda kanser insidansı tespit edildiği bildirilmektedir (Yang & Lin, 2017). Özellikle yerleşik tümörler sıklıkla, aktif olan anti-tümör immüniteyi bloke edebilen immün-baskılayıcı bir mikroçevrede bulunmaktadır (Hui & Chen, 2015). Farklı birçok yönden bakıldığında immün mikroçevrenin hedeflendiği tedavi protokollerinin oluşturulması büyük önem taşımaktadır.




**Şekil 2-2: Kanserde temel mekanizmalar**

(Hanahan, 2022).

## 2.4. Meme kanseri ve İmmün mikroçevre

Kanserde immün sistemin spesifik olarak malignitenin karakterini şekillendirdiği bilinmektedir. Tümör ve immün sistem savunması arasındaki karmaşık etkileşim, "immün düzenleme" olarak belirtilmektedir. Kanser hücreleri ve immün

sistem arasındaki etkileşimler; eliminasyon, denge ve kaçış olarak üç farklı aşamada gelişmektedir (D. Mittal, Gubin, Schreiber, & Smyth, 2014). Hastaların çoğuna, kanser hücrelerinin immün gözetimden kaçtığı kaçış aşamasında teşhis konmaktadır. Bu immünolojik kaçışı açıklayan hipotezlerden biri, kanser hücreleri tarafından antijen ekspresyonunun kaybıdır; bir diğeri de immün-toleranslı bir ortamın oluşturulmasıdır (D. Mittal et al., 2014).

Meme kanseri geleneksel olarak yüksek derecede immünojenik bir malignite türü olarak kabul edilmese de, çok sayıda laboratuvardaki araştırmacılar intratümöral immün reaksiyon ile meme kanseri gelişimi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Gu-Trantien et al., 2013; Loi, 2013; Loi et al., 2013). Lökosit infiltrasyonunda ve tümör mikroçevresinde yer alan hücreler meme dokusunun neoplastik dönüşümünde ve kanserin ilerlemesinde önemli etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (DeNardo & Coussens, 2007).

Meme kanseri ile yapılan son çalışmalarla, tümörde veya TME'de immün parametrelerin varlığının prognostik ve prediktif değere sahip olduğu düşünülmektedir. TIL popülasyonları meme kanserlerinde üçlü negatif veya HER2 pozitif hastalarda daha sık gözlenmekle birlikte iyi prognozla ilişkilendirilmektedir (McArthur, 2016). Loi ve arkadaşları, $CD8^+$ intratümöral lenfositlere özel olarak yoğunlaştıkları büyük prospektif bir klinik araştırmada, TNMK'de TIL'lerin prognostik rolünü göstererek, $CD8^+$ T hücre infiltrasyonu ile TIL'leri olumlu prognostik faktör olarak tanımlamışlardır (Loi et al., 2016). Ayrıca gen ekspresyon profillerinin incelendiği bir çalışmada, immün hücre sinyalleri, sitokin sinyalleri, antijen işleme ve sunumu ve bağışıklık sinyali iletim yolakları ile immün sistem süreçlerinde rol alan genler için zenginleştirilmiş immünomodülatör alt tipine sahip altı farklı TNMK alt türü tanımlanmıştır (Lehmann et al., 2011).

TNMK'nin daha yüksek oranda TIL seviyesine sahip olduğu bildirilmektedir (Denkert et al., 2018). Ayrıca TNMK'deki yüksek TIL seviyelerinin, erken evre TNMK'de iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Loi et al., 2019). Aynı zamanda TNMK'de, hem tümör hücreleri hem de immün hücreler üzerinde daha yüksek oranda PD-L1 ekspresyon seviyesi rapor edilmektedir (Gatalica et al., 2014; Mittendorf et al., 2014). Meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunun yüksek olması yüksek proliferatif indeks, yüksek histolojik derece ve artmış tümör boyutu gibi çeşitli negatif

prognostik faktörlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sabatier et al., 2015). Bununla birlikte TNMK'nin, antitümör immün yanıt oluşturmak için neoantijene özgü T hücrelerini aktive eden tümöre özgü neoantijenlere yol açan (Schumacher & Schreiber, 2015), çok sayıda mutasyona sahip olduğu belirtilmektedir (Luen, Virassamy, Savas, Salgado, & Loi, 2016).

TME'de bulunan çeşitli immün hücreler arasında, TİM'ler, tümör infiltre edici immün hücrelerin baskın popülasyonudur (Cassetta & Pollard, 2018). Meme kanserinde TİM'lerin varlığı, kötü prognoz ile ilişkilidir ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Qiu et al., 2018). Meme kanserindeki TİM'ler, büyük ölçüde, kanser hücreleri tarafından salınan inflamatuar sitokinler yoluyla TME'ye alınan kemik iliği monositlerinden türetilmektedir (Franklin et al., 2014). TME'ye ulaştıktan sonra, monositler koloni uyarıcı faktör 1 (CSF1) ile makrofajlara farklılaşmaktadır (Martinez, Gordon, Locati, & Mantovani, 2006). Meme kanserinde çoğu TİM, interlökin IL-4, IL-10 ve IL-13 (Biswas & Mantovani, 2010) gibi sitokinler tarafından immünosupresif M2 benzeri makrofajlara (Qiu et al., 2018) polarize edilecektir. TME'de TİM'ler, tümör büyümesi, anjiyogenez, hücre invazyonu, hücre sağkalımı ve immün supresyona katılarak kanserin ilerlemesini desteklemektedir (Cassetta & Pollard, 2018). Spesifik olarak, TİM'ler, kanser hücrelerinin damar içi ve damar dışına çıkışını kolaylaştıran hücre-hücre bağlantılarını bozmak için MMP'leri, serin proteazları ve katepsinleri salgılamaktadırlar (Joyce & Pollard, 2009). Öte yandan, TİM'ler, doğrudan T hücrelerini inhibe etmek için PDL1, PDL2, CD80 ve CD86 gibi T hücresi immün kontrol noktası ligandlarını yüksek seviyelerde eksprese ederek veya immün baskılayıcı TME'nin korunmasına katkıda bulunan sitokinleri serbest bırakarak immün baskılamaya aracılık etmektedirler (Alderton, 2014; Noy & Pollard, 2014).

Meme kanseri mikroçevresinde yer alan hücrelerden T hücreleri antijene spesifik yanıtları veren hücrelerdir. Temelde iki tip T hücre yanıtı oluşmaktadır. Birisi antijeni eksprese eden hücrelerin etkisizleştirilmesi yani sitotoksisite yanıtı, diğeri ise inflamasyonu etkileyen sitokinlerin salgılanmasıdır. Sitotoksisitede sitotoksik T hücreleri, sitokin salınımı ile geç hipersensitivitede yardımcı T hücreleri etki göstermektedir. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin yanıt verdiği antijenler antijen sunan hücreler (ASH) tarafından peptidlere dönüştürülmüş olan protein antijenler olarak sırasıyla MHC-II ve MHC-I molekülleri varlığında antijen sunumu gerçekleşmektedir.

Bazı bakteriler fagositoz olduktan sonra, fagozomdan kaçma ya da fagozomdan sitozole taşınmaları esnasında fagositik hücrelerin öldürücü etkisinden kurtulabilmektedir. $CD8^+$ T hücreleri uyarılarak bu durumun kontrolü sağlanmaktadır. Bu şekilde hücre içi bakterilerin yıkımında hücresel immünite rol oynamaktadır. Hücresel immünite $CD8^+$ T hücreleri ve $CD4^+$ T hücreleri tarafından makrofaj aktivasyonu ile oluşmaktadır. Yardımcı T hücre reseptörleri antijen tanımada doğrudan etkilidir. Sitokin üretimi, proliferasyon ve belirli hücre yüzey molekül ekspresyonları, T hücre aktivasyonunu karakterize etmektedir. Bu hücrelerde yer alan IL-2 reseptörü, HLA-DR ve CD38, fenotipik aktivasyon moleküllerini oluşturmaktadır (Deniz, 2007).

İki farklı meme kanseri modeli ile yapılan bir çalışmada tümörleşme sürecinde hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T hücrelerinin meme kanserinde immün yanıtlara dinamik olarak dahil olduğu; meme tümörü gelişiminin erken evresinde, Th1 ve $CD8^+$ T hücrelerinin immün gözetim gerçekleştirebilen TIL'lerde baskın popülasyonlar olduğu, geç evrede, $CD4^+$ TIL sayısının önemli ölçüde arttığı ve baskın alt kümelerinin, tümörün ilerlemesine katkıda bulunabilecek olan $T_{reg}$ ve Th17 hücrelerine dönüştüğü gösterilmektedir. Aynı zamanda bu çalışmada, meme kanseri hastalarında $CD8^+$ T hücrelerinin iyi prognoz, $CD4^+$ T hücrelerinin kötü prognoz yönünde etki gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca, klinik kanser hastalarından elde edilen sonuçlar, CD4/CD8 oranlarının ilerlemiş tümör evresi, büyük tümör boyutları ve pozitif lenf nodu tutulumu ile güçlü pozitif korelasyona sahip olduğunu göstermektedir (Huang et al., 2015). Birçok çalışmada tedavide TME'nin hedeflenmesini destekleme yönünde tümör içi $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin yanı sıra TIL'lerdeki CD4/CD8 oranının meme kanseri sonuçlarını öngörmek için tümünün değerli ve önemli prognostik biyobelirteçler olduğu vurgulanmaktadır.

### 2.5. Kontrol Noktası İnhibitörleri

Tümör hücreleri antitümör immün tepkilerini inhibe etmek için birçok immün düzenleyici mekanizma kullanmaktadır. Bu mekanizmalardan biri immün kontrol noktaları olarak da bilinen inhibitör reseptörlerin aşırı ekspresyonudur. PD-1 ve sitotoksik T lenfositle ilişkili molekül-4 (CTLA-4), T hücrelerinde eksprese edilen iki immünomodülatör reseptör olarak immün baskılamaya aracılık ederek işlev görmektedir (Gubin et al., 2014). PD-1 insanlarda ve farelerde aktive edilmiş monositler, DC hücreleri, T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü T hücreleri

üzerinde eksprese edilen ana immün kontrol noktası reseptörüdür. PD-1 hücre yapışması, çoğalması ve sitokin sinyalleşmesinde önemli bir rol oynar. PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere iki ligandı bulunmaktadır. PDL1 ve PD-L2 ekspresyonu kanser hücreleri immün sistem tarafından saldırıya uğradığında artmaktadır. Bu da T hücrelerinin baskılanmasına ve immün kaçışına yol açmaktadır (Taube et al., 2018). Tedavide kanser hücrelerini hedeflemede immün yanıtı arttırmak amacıyla PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşimin bloke edilmesi yaklaşımından yararlanılmaktadır (Xudong Zhang et al., 2018a). Bir diğer hedeflenen molekül olan CTLA-4 ise T hücresi aktivasyonundan kısa bir süre sonra artmakta, CD28 ko-stimülasyonuna negatif geri bildirim sağlamak için CD80/CD86'ya bağlanarak immün yanıtın hazırlanma fazı sırasında T hücresi aktivasyonunu sınırlamaktadır. Bu durum, kontrolsüz immünitenin önlenmesine yardımcı olmaktadır (Pardoll, 2012).

### 2.6. PD-1 / PD-L1

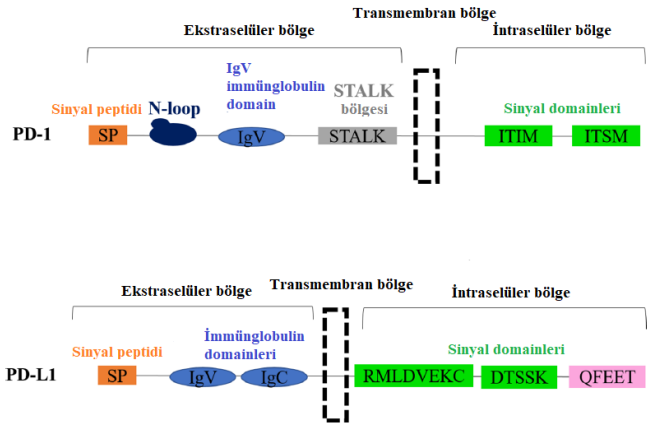
PD-1 (CD279) molekülü, hem adaptif hem de doğuştan gelen immün yanıtların bir inhibitörüdür ve aktifleştirilmiş T, NK ve B lenfositleri, makrofajlar, DC'ler ve monositler üzerinde eksprese edilmektedir (Lin et al., 2008). PD-1, T hücre fonksiyonunu baskılayarak kendi kendine toleransı sağlayabilme potansiyeli taşımaktadır (Taube et al., 2018). CTLA-4'ten farklı olarak, PD-1'in etkileri esas olarak intrinsiktir (Okazaki, Chikuma, Iwai, Fagarasan, & Honjo, 2013).

288 amino asitten oluşan 55 kDa'lık bir glikoprotein olan PD-1, sinyal dizisini de içeren N-terminal IgV benzeri domainden, 20 aminoasitlik bir sap bölümünden, bir transmembran domainden ve iki tirozin bazlı sinyal motiflerini (ITIM ve ITSM) içeren 95 amino asitlik bir intrasitoplazmik domainden oluşmaktadır (Boussiotis, 2016; Chocarro de Erauso et al., 2020) (Şekil 2-3). PD-1, yapısal olarak homodimerizasyon için gerekli olan sistein kalıntısından yoksun olduğu için monomer olarak üretilmektedir (Xuewu Zhang et al., 2004).

Normal fizyolojik koşullar altında, PD-1'in iki ligandı bulunmaktadır: PD-L1 ve PD-L2. Bu ligandlar, % 37 dizi homolojisi göstermektedir. Kanser hücreleri immün sistem tarafından saldırıya uğradığında PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunun arttığı ve bu durumun da T hücrelerinin baskılanmasına ve immün kaçışına yol açtığı bildirilmektedir (Nallasamy et al., 2018).

İnsan PD-L1'i 290 amino asitten oluşur, insan PD-L2 ile %40 ve murin ortologu ile %70 amino asit benzerliği taşır (Okazaki & Honjo, 2007). PD-L1, Ig tipi ekstraselüler domain, kısa bir intramembran domain ve sitoplazmik kuyruk kısmından oluşan bir tip I transmembran glikoproteindir . İntraselüler domain çok kısadır (uzunluk, 30 amino asit) ve türler arasında yüksek oranda korunur. Ekstraselüler bölge, kısa bir bağlayıcı sekans ile ayrılmış iki domainden oluşur. Sitoplazmik zardan N terminaline kadar, bir IgG benzeri C2 tipi domain ve bir IgG benzeri V tipi domain vardır (Collins, Ling, & Carreno, 2005) (Şekil 2-3). Bu bölge, β sarmallarından oluşur ve temel olarak PD-1 reseptörü ve antagonistik antikorlar ile etkileşime girmektedir (Collins et al., 2005; Gato-Cañas et al., 2017).

PD-L1'in normal şartlarda ASH'de, lenfoid olmayan organlarda, ayrıca kalp, akciğer, plasenta ve karaciğer gibi hematopoietik olmayan hücrelerde ekspresyonu görülmektedir. PD-L1'in artmış ekspresyonu ile, periferal dokuları aşırı inflamasyon ve otoimmün patolojilerden koruma ile ilişkili fonksiyonu gösterilmektedir (Y. Li et al., 2016; Nallasamy et al., 2018). PD-L1'in, akciğer kanseri, melanom, ürotelyal kanserler, gastrointestinal kanserler, meme kanseri ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli insan kanserlerinde de eksprese edildiği bildirilmektedir (Hamanishi et al., 2016). PD-L1, bir diğer T hücresi ile ilişkili immün kontrol noktası molekülü olan CD80 ile de etkileşimde bulunduğu gösterilmektedir. Aynı zamanda PD-L1'in PD-1 ile etkileşiminin, immün yanıtların azalmasına sebep olduğu bilinmektedir (Marcucci, Rumio, & Corti, 2017). Tümör hücresi ve PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkide endojen ve ekzojen olarak iki genel mekanizma yer almaktadır. Ekzojen mekanizma, IFN-γ, TNF-α, VEGF, granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör (GM-CSF) ve IL-10 gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenebilmektedir. PD-L1 ayrıca Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), interferon düzenleme faktörü 1 (IRF1), STAT1, STAT3 ve hipoksi indüklenebilir-1 alfa (HIF-lα) ile uyarılma potansiyeli taşımaktadır (Nallasamy et al., 2018). PD-L1 aracılı adaptif immün mekanizmada, gözetim yapan T hücrelerinin, tümör neoantijenlerini yabancı olarak tanıma özelliğini kullanarak aktif hale geldiği, PD-1'i düzenlediği ve IFN-γ salgıladığı belirtilmektedir. IFN-γ salınımına yanıt olarak, TME'deki tümör hücreleri ve immün hücrelerin PD-L1'i eksprese ettiği gösterilmektedir. PD-L1 daha sonra PD-1 bağlantısı ile gözetimde görevli T hücrelerinin fonksiyonlarını engellemektedir (Taube et al., 2018).

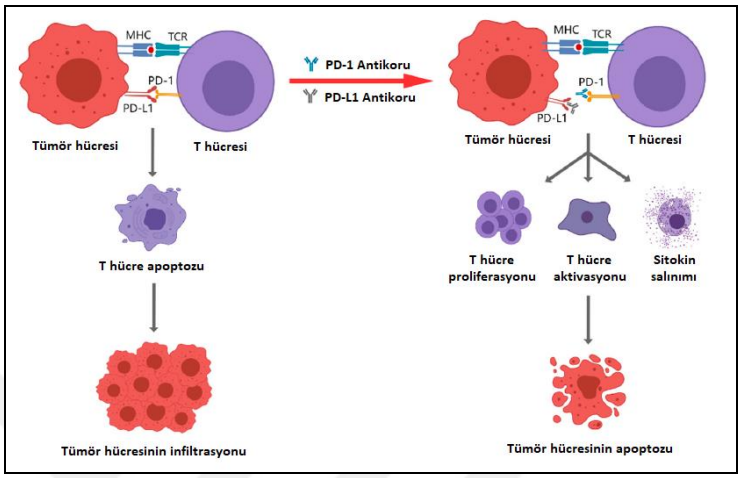



**Şekil 2-3: PD-1 ve PD-L1'in moleküler yapıları**

(Chocarro de Erauso et al., 2020)

PD-1/PD-L1 yolunu hedefleyen immün kontrol noktası blokajı; melanom, renal hücreli karsinom, küçük hücreli akciğer kanseri ve mesane kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde belirgin klinik yanıtlara neden olmaktadır. PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşimin antikorlarla bloke edilmesi, kanser hücrelerine karşı immün yanıtı arttırmaktadır (Xudong Zhang et al., 2018b). PD-1/PD-L1 immün kontrol noktası bağlantısının antikorlar kullanılarak hedeflenmesi ile, kanser tedavisindeki klinik çalışmalardan çok önemli sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir (Chowdhury et al., 2015). PD-1 veya PD-L1'in nivolumab ve pembrolizumab gibi bloke etmeye yönelik birçok monoklonal antikor, kanser immünoterapisi için incelenmiş olup farklı malign tümörlere sahip hastalarda etkili sonuçlar göstermektedir (Meng et al., 2018). Aynı şekilde benzer klinik çalışmalarda çeşitli kanser türleri için % 20- % 50 oranlarında bir yanıtla dikkat çekici sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Boussiotis, 2016). 2010 yılında, bir anti-PD-1 antikoru olan nivolumabın ilk faz I klinik denemesi olarak ileri melanom, küçük hücreli akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, prostat kanseri ve kolorektal kanser gibi tedaviye dirençli solid tümörleri bulunan 39 hastada yapılan çalışmada tek bir ciddi yan etki olarak kalın bağırsak iltihabının gösterildiği ve bunun tolere edilebilir bir yan etki olduğu bildirilmektedir (Brahmer et al., 2010). Bununla birlikte 2012 yılında çalışmanın devamında hastalarda en sık görülen yan etkilerin döküntü, ishal ve kaşıntı olduğu ve ayrıca immünolojik yan etkiler konusunda da dikkat edilmesi gerektiği rapor edilmektedir (Topalian et al., 2012). Bir başka çalışmada, faz III klinik deneylerinde, PD-1/PD-L1 blokajının; tam yanıtın sağlanması ve öncesinde tedavi almamış hastalarda sağkalım süresini uzatma potansiyelini de taşıyan önemli bir

etkinliğe sahip olduğunu gösterilmektedir. Blokajda görevli bu ajanların aynı zamanda, hematolojik malignitelerden solid tümörlere kadar geniş bir yelpazedeki histolojilerde aktivite gösterdiği vurgulanmaktadır (Majzner et al., 2017).




**Şekil 2-4: PD-1/PD-L1 bağlantısı ve inhibisyon mekanizması**

(Ren, Song, Li, & Luo, 2022).

PD-1 ve PD-L1'in bağlanması, T-hücresi apoptozunu indüklemekte, böylece tümör hücreleri infiltre olmaktadır. PD-1 veya PD-L1 inhibitörlerinin kullanımı, T hücresi proliferasyonunu, aktivasyonunu ve sitokinlerin salgılanmasını uyarmaktadır ve T hücrelerinin tümör hücrelerini öldürme etkisini arttırmaktadır (Şekil 2-4) (Ren et al., 2022).

## 2.7. Meme kanserinde PD-1/PD-L1 Bağlantısının Rolü

PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları, endometrium, malign melanom, mesane, küçük akciğer, over ve böbrek kanserleri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde gösterilmiştir (Gatalica et al., 2014). İmmün yanıtın negatif düzenleyicisi olarak işlev gören PD-L1, "sıcak" olarak tanımlanan tümör mikroçevresi ve immün yanıtı olan kanser hücreleri ile ilişkilidir (X. Li et al., 2016). PD-1/PD-L1 etkileşiminin tümör mikroçevresi ve immün kaçıştaki kritik rolü incelendiğinde, çoğu kanserdeki gibi meme kanserinde de yüksek PD-L1 ekspresyonu ile kötü prognoz arasında pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (Gatalica et al., 2014; Muenst et al., 2014).

Meme kanseri hücrelerinde PD-L1 ekspresyon değişiminin incelendiği bir çalışmada, PTEN kaybıyla indüklenen tümör hücreleri tarafından artmış PD-L1 hücre

yüzeyi ekspresyonunun, azalmış T hücre proliferasyonuna yol açtığı yönünde bulgular sunulmaktadır (Mittendorf et al., 2014). Meme kanserinde, PD-L1 ekspresyonu %20-%34 arasında değişerek farklı alt tipler arasında heterojen dağılım göstermektedir. Çalışmalarda genç yaş, ileri evre, TIL'lerin varlığı ve agresif moleküler alt tipler (TNMK, bazal, HER2 zengin) ile PD-L1 ekspresyonunun pozitif olarak ilişkili olduğu bildirilmektedir (Matikas et al., 2019; Mittendorf et al., 2014; Sabatier et al., 2015; Tsang et al., 2017).

ER veya HER2 ekspresyon düzeylerinden farklı olarak, tümördeki PD-L1 ekspresyonu dinamiktir ve ekspresyon düzeyleri spesifik maruz kalmalara yanıt olarak değişmektedir. Örneğin, T hücresi infiltrasyonu PD-L1'in tümör ekspresyonunu arttıran IFNγ'nın salınmasına neden olmaktadır (McArthur, 2016). Bununla birlikte, PD-L1 değerlendirmesinin hem kanser hücresi hem de immün hücrelerde yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır. PD-L1 ekspresyonu, formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş (FFPE) örneklerde monoklonal bir PD-L1 antikoru ile immünohistokimya (IHC) kullanılarak kolayca değerlendirilebilmektedir. TNMK'deki PD-L1'in immünhistokimyasal ifadesini değerlendirmek için aynı şartlar altında üç farklı antikor klonları kullanıldığı ve hem tümör hücrelerinde hem de immün hücrelerde PD-L1 ekspresyonunda farklılıklar bulunduğu ve antikor klonuna bağlı olarak kanser hücrelerinin ve immün hücrelerin %19.3 ile %37.6'sında PD-L1 ekspresyonu görüldüğü bildirilmektedir (W. Y. Sun, Lee, & Koo, 2016).

TNMK'deki PD-L1'in hormon reseptörüne sahip meme kanserlerine kıyasla daha yüksek ekspresyonu olduğu bildirilmektedir. Doku mikro dizileri üzerine yapılan analiz ile, 105 primer TNMK örneğinin %19'unun PD-L1 pozitif olduğunu gösterilmektedir (Mittendorf et al., 2014). Buna ek olarak, biyolojik belirteç olarak PD-L1'in rolünün belirsiz olmasına rağmen, primer TNMK hücrelerinin %26'sının (193'te 51 tanesinin) yüzeylerinde PD-L1 ekspresyonu keşfedilmiştir (Dua & Tan, 2017).

PD-L1'i eksprese eden kanserlerde PD-L1 blokajı, anti-tümör immün yanıtları indüklemede ve kişiye özel tedavi seçeneklerinin planlamasında önemli bir rol oynamakta, böylece birçok solid tümörün tedavi şeklini değiştirmektedir (W. Y. Sun et al., 2016). Tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği kötü prognozla ilişkili olduğundan PD-L1, TNMK için etkin immünoterapötik ajanlar için bir potansiyel oluşturmaktadır (Dua & Tan, 2017; Mittendorf et al., 2014; W. Y. Sun et al., 2016). Bu doğrultuda birçok

tümörde pre-klinik ve klinik çalışmalarda çok sayıda anti-PD-L1 antikorları ile PD-L1 hedefli tedaviler araştırılmakla birlikte elde edilen sonuçlarla PD-L1 ekspresyonunun tespitine yönelik 28-8, 22C3 klonu, SP142 ve E1L3N klonları gibi çoklu monoklonal PD-L1 antikorları ticari olarak geliştirilerek bu alandaki çalışmalar genişletilmektedir (W. Y. Sun et al., 2016).

Meme kanserinde PD-1 ve PD-L1'in önemi anlaşılması üzerine çok sayıda klinik çalışma yapılmıştır. PD-L1'i hedefleyen bir antikor olan atezolizumab monoterapisinin daha yüksek objektif yanıt oranı, OS ve daha yüksek TIL seviyelerine sahip metastatik TNMK hastalarında progresyonsuz sağkalım oranına sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, atezolizumab monoterapisi ile birinci basamak tedavinin iyi tolere edildiği ve ilerlemiş TNMK hastalarında, özellikle de yüksek TIL düzeyleri olan hastalarda yararlı olduğu ön sonucuna götürmektedir (Emens et al., 2019). Metastatik TNMK hastalarında pembrolizumab monoterapisinin incelendiği bir klinik faz II çalışmasında (KEYNOTE-086) PD-L1-pozitif hastalarda sağlam bir anti-tümör aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmaktadır (Adams et al., 2019).

Faz III randomize kontrollü bir çalışma olan KEYNOTE-119'da, metastatik TNMK tedavisi için birinci basamak olmayan bir tedavi olarak pembrolizumab monoterapisinin etkinliğini kemoterapi ile karşılaştırılmaktadır. Tümör mikroçevresinde PD-L1 arttıkça, pembrolizumab monoterapisinin daha etkili olduğu, kemoterapi etkinliğinde ise çok az fark olduğu, bunun da metastatik TNMK'li hastalarda pembrolizumab tedavisinin klinik fayda derecesinin tümör PD-L1 ifadesi ile korele olabileceği bildirilmektedir (Winer et al., 2021).

Ayrıca PD-L1 inhibitörü avelumabın lokal olarak ilerlemiş veya metastatik meme kanseri monoterapisindeki etkinliğinin incelendiği faz 1 JAVELIN Solid Tümör çalışmasında (NCT01772004) kabul edilebilir bir güvenlik profili ve klinik aktivite göstermektedir (Dirix et al., 2018).

Çok merkezli, randomize, çift kör faz III klinik çalışma olan IMpassion130'da, lokal ileri TNMK veya metastatik TNMK'li hastaların birinci basamak tedavisinde atezolizumab ile nab-PTX kombinasyonu (deneme kolu) ve nab-PTX ve plasebo kombinasyonu (kontrol kolu) etkinlik ve güvenilirliği değerlendirildi. Buna göre çalışmada PD-L1-pozitif tümörleri olan hastaların, yönetilebilir bir güvenlik profiline sahip ve PD-L1-pozitif metastatik TNMK hastalarının tedavisinde, atezolizumab artı

nab-paklitaksel rejiminin daha fazla fayda sağladığı gösterilmektedir. Bu nedenle, atezolizumab ve nab-paklitaksel kombinasyon rejimi, Mart 2019'da lokal ileri veya metastatik PD-L1-pozitif TNMK'nin tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Schmid, Rugo, et al., 2020). Ancak progresyonsuz sağkalım beklentisini karşılayamadığı gerekçesiyle IMpassion131 negatif verileri (Miles et al., 2021) ve KEYNOTE-355 pozitif verilerinin (Cortes et al., 2020) yayınlanmasının ardından onay, Ağustos 2021'de geri çekilmiştir.

Meme kanseri klinik çalışmaları içerisinde kemoterapi ile kombinasyon tedavilerini ilave çok sayıda klinik çalışma yer almaktadır. TONIC çalışmasında, Dox ile indüksiyon tedavisi ile, nivolumaba en yüksek yanıt oranı verdiği ve tümörde bazı immün aktivasyon kanıtları olduğu bildirilmektedir (Voorwerk et al., 2019). Neoadjuvan çalışmalarda, KEYNOTE-522, GeparNuevo ve IMpassion031 denemelerinin tümü, anti-PD-1/PD-L1'in kemoterapi tedavisine eklenmesinin yanıt oranlarını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilirken (Loibl et al., 2019; Mittendorf et al., 2020; Schmid, Cortes, et al., 2020), NEOTRIP denemesi bunu göstermemektedir (Gianni et al., 2022). Ayrıca KEYNOTE-522, GeparNuevo ve IMpassion031 çalışmalarında antrasiklinler ve siklofosfamid kullanılırken, NeoTRIP'te ise ameliyattan önce sadece taksanlar ve karboplatin kullanılmaktadır. Pembrolizumab ile antrasiklin içermeyen bir rejimi birleştiren tek kollu NeoPACT çalışmasında da patolojik tam yanıt oranının nispeten yüksek(%60) olduğu rapor edilmektedir (Sharma et al., 2022).

Metastatik TNMK'de randomize, çift kör, plasebo kontrollü faz 2b ALICE (NCT03164993) güncel çalışmasında düşük doz metronomik siklofosfamid ile birlikte pegile lipozomal Dox'a, atezolizumabın eklenmesinin güvenliliği ve etkililiğini değerlendirilmektedir (Kyte, Røssevold, Falk, & Naume, 2020; Røssevold et al., 2022). Kemoterapinin, atezolizumab duyarlılığını tetikleyeceği hipotezine dayanarak ve aynı zamanda Dox'un pegile lipozomal formunun da, steroid ihtiyacını ortadan kaldırmak, kalp üzerindeki olumsuz yan etkileri en aza indirme ve sürekli tedaviye izin verme açılarından seçildiği vurgulandı. Düşük doz siklofosfamidin de $T_{reg}$ seviyelerini düşürdüğü rapor edilmektedir (Ghiringhelli et al., 2007).

Yapılan çalışmalar doğrultusunda, meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde tümöre immünolojik karakter kazandırması ve immünoterapiye

duyarlılığın arttırılmasını sağlaması ile kemoterapinin immünoterapinin etkinliği üzerinde etkisi büyüktür.

### 2.8. PD-1/ PD-L1 Hedefli Küçük Molekül İnhibitörleri

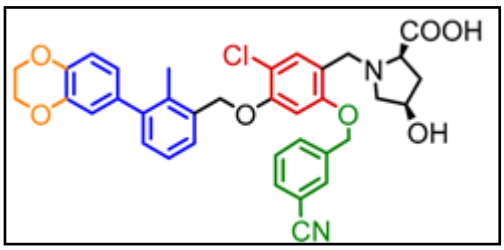
Son yıllarda, PD-1/PD-L1 eksenini hedefleyen ajanların, TNMK immünoterapisinde araştırma odağı haline gelmesi ile yapılan çalışmalar doğrultusunda; pembrolizumab ve atezolizumab gibi bazı PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin cesaret verici klinik aktivite sonuçları gösterdiği bildirilmektedir (Adams et al., 2019; Schmid, Rugo, et al., 2020). CTLA-4, PD-1 ve PD-L1 inhibitörleri şu anda klinikte kullanılan en başarılı olan inhibitörlerdir. FDA tarafından onaylanan bu ilaçlar şu anda antikor yapılı olsa da (Vaddepally, Kharel, Pandey, Garje, & Chandra, 2020), küçük molekül inhibitörlerini geliştirmek için yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Antikor temelli olarak uzun ve maliyetli bir üretim sürecinden geçen bu ilaçlardan farklı olarak küçük molekül inhibitörlerinden özellikle peptit yapılı inhibitörler, katı faz sentezi gibi kimyasal reaksiyonlarla sentezlenebilmekte, bu da üretim maliyetini antikorlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük hale getirmektedir (Jaradat, 2018). Birçok avantaja sahip peptitler, antikorlara benzer şekilde hedefe karşı yüksek afinite ve özgüllük göstermektedir ve protein-protein etkileşimlerine girmeye uygundurlar. Molekül boyutu antikorlardan daha küçük olduğu için dokulara penetrasyon özellikleri genellikle antikorlardan daha iyidir (Marqus, Pirogova, & Piva, 2017). Ayrıca, bazı peptitler, antikorların elde edemediği bir özellik olan hücre zarından içeri girebilme potansiyeli taşımaktadır (Guidotti, Brambilla, & Rossi, 2017). Hedefe yönelik yüksek özgüllükleri, kısa yarı ömürleri ve düşük immünojeniklikleri nedeniyle de peptitler, çok az yan etki gösterir. Bir diğer önemli özellik ise kemoterapide ciddi organ yetmezliğine neden olan spesifik organlarda birikimin peptit tedavisinde görülmemesidir (Marqus et al., 2017).

PD-1/PD-L1 bağlantısını ana hedef olarak ele alan araştırmacılar, PD-1/PD-L1 kompleksinin kristal yapısı ile birlikte PD-1/PD-L1 arayüzündeki PD-1'in kritik yapısını belirleyerek ilk olarak 29 amino asit dallı bir peptit olan AUNP-12 (NP-12) peptidini geliştirdiler. AUNP-12'nin, PD-1/PD-L1'in bağlantısını inhibe ettiğini ve PD-L1 varlığında lenfositlerin çoğalma kapasitesini geri döndürdüğü, ayrıca inhibitörün immünomodülatör aktivitesinin in vivo olarak doğrulandığı, önemli antitümör ve anti-metastatik etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Sasikumar et al., 2019). Bununla birlikte

aralarında CA-170 gibi klinik çalışmalarda da yer alan pek çok küçük molekül inhibitörlerinin geliştirildiği rapor edilmektedir (Sasikumar & Ramachandra, 2022).

## 2.9. BMS-1166




**Şekil 2-5: BMS-1166 inhibitörünün kimyasal yapısı (Guzik et al., 2019)**

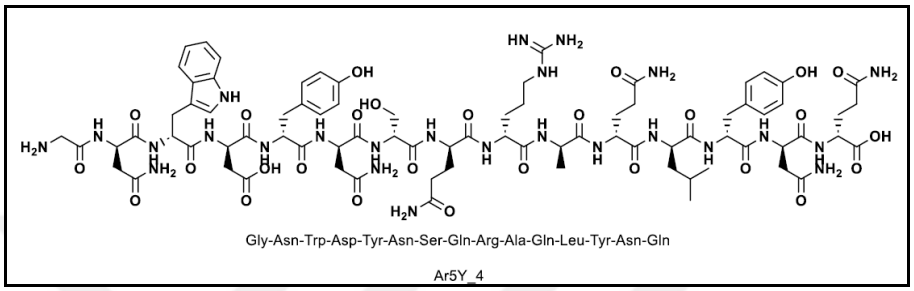
Şekilde verilen BMS-1166 inhibitörüne ait yapıda gösterilen farklı fonksiyonlara sahip gruplar ayrıca renklendirilmiş olup turuncu uzatıcı, mavi biaril çekirdek, kırmızı aril grup, yeşil eter bağlı grup, siyah ise çözündürücü olarak yer almaktadır (Guzik et al., 2019).

Bristol Myers Squibb (BMS) tarafından PD-L1'i hedefleyen ve PD-1 ile arayüz oluşturan PD-L1 bölgesine bağlanan bir dizi küçük moleküllü inhibitör geliştirilmiş ancak bu inhibitörlerin inhibe edici mekanizmasının PD-L1/PD-1 etkileşiminin doğrudan inhibisyonunu içermediği, bu küçük moleküllerin bağlanmasıyla PD-L1 dimerizasyonunun indüklenmesi ile gerçekleştiği belirtilmektedir (Guzik et al., 2017; Zak et al., 2016).

Sentezlenen diğer BMS moleküllerine kıyasla BMS-1166'nın hücre hatları üzerinde daha düşük toksisite ve daha iyi hücre bazlı aktiviteler gösterdiği bildirilmektedir (Skalniak et al., 2017). Küçük moleküllerin bağlanma bölgesi, "kriptik-ortosterik" bölge olarak adlandırılmakta ve doğası gereği hidrofobik bir yapı sunmaktadır (L. Mittal, Tonk, Awasthi, & Asthana, 2021). Bifenil bileşiği olan ve PD-L1 homodimerinin kristal yapısında 1.4 nM gibi düşük bir $IC_{50}$ değerinin bildirildiği (Guzik et al., 2017), BMS-1166 uygulaması ile, PD-L1'in endoplazmik retikulumdan (ER) golgi aparatına taşınmasını engelleyerek PD-L1 glikozilasyonunu spesifik olarak etkilediği gösterilmektedir. Ek olarak, PD-L1'in yetersiz glikozile edilmiş formunun ER'de hızlı bozunmaya uğradığı gözlenmektedir (F.-F. Chen, Z. Li, D. Ma, & Q. Yu, 2020). Bu bulgular, BMS-1166 ile tedavinin ER içinde PD-L1'in dimerizasyonunu ve

bozunmasını indüklediği, böylece daha fazla glikozilasyonu önlediği ve ER ilişkili protein degredasyonuna yol açtığı bir mekanizma önermektedir. Ayrıca, BMS-1166'nın, akciğer kanseri hücreleri ve T hücreleri ko-kültüründe PD-L1/PD-1 etkileşimi yoluyla T hücresi inaktivasyonunu önlediği gösterilmektedir (F. F. Chen, Z. Li, D. Ma, & Q. Yu, 2020).

## 2.10. Human PD-L1 Inhibitor IV




**Şekil 2-6: Human PD-L1 inhibitör IV (Ar5Y_4) inhibitörünün kimyasal yapısı ve peptit dizisi**

(Q. Li et al., 2016) (Sobral, Luz, Almeida, Videira, & Pereira, 2023)

İnsan PD-L1 peptit inhibitörü IV, PD-1'e bağlanmakta ve PD-1/PD-L1 bağlantısını inhibe etme potansiyeli taşımaktadır. Moleküler formülü $C_{80}H_{113}N_{25}O_{27}$'dir.

Literatürde belirtildiği üzere, hPD-L1'in hPD-1'e bağlanması üzerinde büyük bir etki gösteren "Ar5Y_4" peptit ismine ve GNWDYNSQRAQLYNQ aminoasit dizisine sahiptir. IFN-γ ile indüklenen HCT116 kolon kanser hücre hattı ve Jurkat hücre hattının ko-kültürü ile oluşan T hücre inaktivasyonunun; 250 μM ve 24 saat olarak Ar5Y_4 uygulaması ile Jurkat T hücrelerinin IL-2 üretiminin %67'sini geri kazandırıldığı ve bunu da hPD-1 ve hPD-L1'in etkileşimini bloke ederek Jurkat T hücrelerinin baskılanmış işlevini eski haline getirerek gerçekleştirdiği gösterilmektedir (D'Errico, Machado, & Sainz, 2017; Q. Li et al., 2016).

## 2.11. Kanserde ilaç direnci

İlaç direnci, temel yaklaşımla bir ilacın tedavide yararlı bir yanıt oluşturmak için gerekenden daha düşük bir etkinliğe sahip olması olarak tanımlanmaktadır. Özellikle kemoterapi başarısızlığı ile ilişkili ana faktörlerden biridir (Gottesman, 2002; Nikolaou, Pavlopoulou, Georgakilas, & Kyrodimos, 2018; Vasan, Baselga, & Hyman, 2019).

İlk aşamalarda tümör yükünü sınırlamada etkili olan çeşitli tedavi seçeneklerinden; hem kemoterapi hem de hedefe yönelik tedavi yöntemlerine rağmen,

kanser hücreleri hala kaçmayı başararak mevcut tümörde progresyona sebep olmakta veya uzak organlara metastaz yapabilmektedir. Tedavinin başında "*de novo"* olarak ve çoğunlukla da uzun süreli tedavi yanıtlarında "edinilmiş" olarak adlandırılan kanser hücrelerinde genomik, transkriptomik ve epigenetik başta olmak üzere çok sayıda değişiklik ile direnç mekanizmaları gelişmektedir (Gottesman, 2002).

İlaç direnci, kanser hücreleri ve tümör mikroçevresi arasındaki etkileşimler, kanser hücresinin heterojen yapısı, kanser kök hücreleri, kanserle ilişkili makrofajlar ve immün hücrelerin modülasyonu dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla ilişkilendirilebilmektedir. Kemoterapi ile tümör mikroçevresi değişimi ile ilaç direnci ile sonuçlanan bir süreç gerçekleşmektedir (Housman et al., 2014).

Kanser ilaçları vücudumuzda aynı zamanda, sitokrom p450 sistemi (CYP450), glutatyon-S-transferaz (GST) süperailesi, üridindifosfo-glukuronozil transferaz (UGT) süperailesi olmak üzere ilaç aktivasyonu ve inaktivasyonu ile görevli mekanizmalar aracılığı ile de direnç geliştirebilmektedir (Housman et al., 2014).

Kanser ilaçlarının taşınmasında, hücrelere ulaşmasında başlıca rolü olan ve ilaç direnci mekanizmalarında önemli bir yer tutan membran transport sistemi; iyon kanalları, transporterlar, aquaporinler ve ATP bağımlı transport proteinlerinden oluşmaktadır. İlaçların taşınmasında kullanılan transport mekanizması ATP bağımlı transport proteinleridir. Bu protein ailesinin en önemli üyelerini ABC transport proteinleri oluşturmaktadır (Vasiliou, Vasiliou, & Nebert, 2009).

### 2.12. Çoklu İlaç Direnci (MDR)

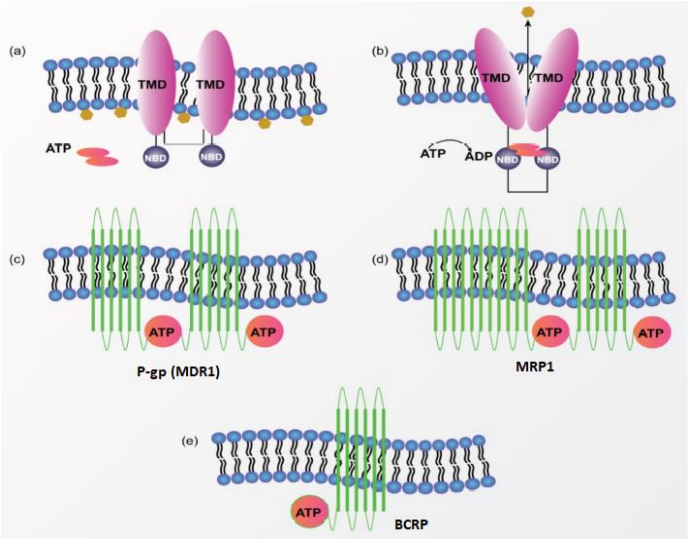
Kemoterapi tedavisinden sonra hayatta kalabilen hücreler genellikle çoklu ilaç direnci (MDR) kazanmaktadırlar. MDR ile, antikanser ilaçların kanser hücrelerinden atılımı kolaylaştırılmakta ve ilaç emilimi azaltılmaktadır. Bu mekanizma membran taşıyıcı protein aktivitesine bağlı olmakla birlikte, MDR ile çoğu kanser hücrelerinin kemoterapiye olan direnci açıklanabilmektedir (Zahreddine & Borden, 2013).

İlaç direncinde kilit rol oynayan ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları temel olarak ilaç akışını destekleyen ve ilacın hücredeki etkisini engelleme potansiyeli olan bir transmembran protein ailesidir. ABC taşıyıcıları; hücrelerin ve hücresel veziküllerin plazma zarlarında bulunan, birçok hidrofobik bileşiği, derişim farkına karşı, hücre dışına pompalayan büyük bir ATP-bağımlı taşıyıcı aileden oluşmaktadır (Vasiliou et al.,

2009). Bu taşıyıcılar, ATP bağımlıdır ve ATP'nin hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi, substratların membran boyunca taşınmasında kullanmaktadır.

İnsan ABC transport proteinleri, 49 üyesi bulunan büyük bir membran protein kompleksidir. Sekans benzerliği esas alınarak ABCA'dan ABCG'ye kadar isimlendirilmiş yedi alt aileye ayrılmaktadır (Z. Chen et al., 2016). ABC taşıyıcıları ATP'nin bağlandığı çift nükleotit-bağlanma bölgesi (*nucleotide-binding domain*: NBD) adı verilen ve 6 heliksli iki membran geçiş domaini (transmebrane domain: TMD) içermektedir (Z. Chen et al., 2016; Ejendal & Hrycyna, 2002). Bu domainler yapısal olarak tek bir polipeptit zincirde yer alıyorsa tam taşıyıcı, iki ayrı birim şeklinde dimer oluşturması gereken taşıyıcılar yarı taşıyıcı olarak tanımlanmaktadır (Glavinas, Krajcsi, Cserepes, & Sarkadi, 2004). Ortak bir yapısal katlanma gösteren ve benzer üç boyutlu yapılara sahip olan NBD'ler ATP bağlantısı ve ATPaz ile hidroliz etmekten sorumludurlar. Ayrıca sahip oldukları motiflere göre sınıflandırılmaktadırlar (Rice, Park, & Pinkett, 2014) (Şekil 2-7).

Başlıca P-gp (ABCB1), çoklu ilaç direnci ilişkili protein (ABCC alt ailesindeki MRP'ler) ve bir ABC yarı taşıyıcısı olan ABCG2 proteinidir. MDR-1 ve ABCG2, tercihen büyük hidrofobik, pozitif yüklü molekülleri çıkarırken, MRP ailesinin üyeleri hem hidrofobik yüksüz molekülleri hem de suda çözünür anyonik bileşiklerin dışarı pompalanmasında görev almaktadır (Glavinas et al., 2004).




**Şekil 2-7: P-gp, MRP-1 ve BCRP'nin hücre membranındaki konumları ve ATP bağlantısı** (Rizwanullah et al., 2021)

(a) Çift transmembran domaini ve çift nükleotit bağlama domaini içeren ABC taşıyıcısı. İç membrandaki turuncu renkli yapı, substrat moleküllerini göstermektedir. (b) ATP'nin bağlanması, sonuçta bir konformasyonel değişikliğe ve substrat molekülünün membrandan dışarı atılmasına yol açan NBD'nin birleşmesine neden olmaktadır. (c) ABC taşıyıcılarından biri olarak P-gp'nin genel yapısı, 12 TMD ve ATP bağlanması için 2 domain içerir. (d) MRP1, P-gp transport sistemine benzer şekilde 12 TMD ve ATP bağlanması için 2 domain içerir, fakat aynı zamanda amino-terminal ucunda fazladan 5 TMD içermektedir. (e) BCRP, 6 TMD ve TMD'nin amino-terminal ucunda ATP bağlanması için sadece 1 domain içermektedir (Rizwanullah et al., 2021).

MDR1, ABCB ailesinin ilk üyesidir. Antrasiklinler, taksanlar ve mitoksantron gibi bazı kemoterapi ilaçlarına bağlanarak bu ilaçların hücre dışına atılmasından sorumlu bir $Ca^{2+}$'a bağımlı bir akış pompası olan P-gp'yi kodlamaktadır (C.-j. Chen et al., 1986; Endicott & Ling, 1989; Ernest, Rajaraman, Megyesi, & Bello-Reuss, 1997). MDR-1 geni 7p21 kromozomunda lokalizedir. 1280 amino asitten ve 12 transmembran segmentten oluşmaktadır. P-gp, apikal membran taşıyıcısıdır ve normalde fizyolojik olarak böbrek, plasenta, karaciğer, böbreküstü bezleri, bağırsak ve kan-beyin bariyeri hücrelerinde yer almaktadır (Abdallah, Al-Abd, El-Dine, & El-Halawany, 2015). Terapötiklerin veya toksinlerin yokluğunda P-gp, fizyolojik olarak koruyucu bir rol oynamaktadır. Aşırı ekspresyonu ile birçok tümör hücresinde çoklu ilaç direncine neden olmaktadır (Nooter & Herweijer, 1991).

MRP-1, ABCC protein ailesinin en önemli üyesidir (Fletcher, Williams, Henderson, Norris, & Haber, 2016). Epiteliyal hücrelerin bazolateral yüzeyinde yer alan MRP-1, glutatyon konjugatlarının eliminasyonunda da görev alan bir organik anyon taşıyıcısıdır. MRP-1, P-gp'den farklı olarak, negatif yüklü doğal kaynaklı ilaçları ve ilaç metabolitlerini taşımaktadır (Gottesman, 2002). MRP-1'in aşırı ekspresyonunun direnç geliştirdiği kemoterapötiklere örnek olarak antrasiklinler, vinca alkaloidleri, kamptotesinler, metotreksat, mitoksantron verilebilmektedir (Kathawala, Gupta, Ashby Jr, & Chen, 2015; Munoz, Henderson, Haber, & Norris, 2007).

ABCG2, mitoksantron veya antrasikline dirençli hücrelerde bulunmuştur (Gottesman, 2002). BCRP proteini bir TMD ve bir NBD içeren ilk yarı taşıyıcı olma özelliği taşımaktadır (Kathawala et al., 2015). Genellikle plazma membranında konumlanmış olup fizyolojik olarak intestinal hücrelerin apikal yüzeylerinde, karaciğer kanaliküler membranında, luminal yüzeylerde ve endotel hücrelerde yüksek oranda

eksprese edildiği gösterilmektedir (Z. Chen et al., 2016; Kathawala et al., 2015). ABCG2'nin, Dox, 5-Fluorourasil, metotreksat, irinotekan, mitoksantron ve benzeri ilaçları hücre dışına taşıdığı bilinmektedir (Mo & Zhang, 2012).

### 2.13. Meme Kanserinde İlaç Direncinin Moleküler Mekanizmaları

Meme kanserinde hücresel ilaç direnci mekanizmaları; hücre zarı ilaç emilimini, taşınmasını ve dışarı atılımını, taşıyıcı proteinleri, kanserle ilgili genleri (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler), deoksiribonükleik asit (DNA) onarımını, kanser kök hücrelerini, TME'yi ve epitelyal-mezenkimal geçişleri (EMT) içerir (Ji et al., 2019).

Özellikle meme kanserinin TNMK alt tipinde antrasiklinlere ve taksanlara karşı dirençten sorumlu üç ABC taşıyıcısı tanımlanmıştır: MRP-1, ABCG2 ve MDR-1 pompasıdır (Leonessa & Clarke, 2003; Scharenberg, Harkey, & Torok-Storb, 2002). ABCG2, aşırı eksprese edildiğinde meme kanseri hücresinin Dox direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ma, Wu, Li, Sun, & Wang, 2017). Yine MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde ABCB1 ve ABCG2'nin aşırı ekspresyonu ile PTX direncinin tetiklendiği gösterilmektedir (Rong et al., 2020). Meme tümörlerinde MDR1 gen ekspresyonu, P-glikoprotein ve alfa estrojen reseptörü (ERα), kemoterapi ilaçlarının neoplastik hücrelerden dışarı akışını sağlayarak ve DNA metilasyonunu aktive ederek kemoterapi direncini indükleyebilmektedir (S. Chen et al., 2018). ABCG2'nin TNMK direncindeki önemi ile uyumlu olarak, büyüme hormonu reseptörünün inhibisyonu yoluyla ekspresyonunun azalması ile TNMK hücrelerinin kemoterapiye duyarlı hale getirildiği gösterilmektedir (Arumugam et al., 2019).

Kanserde genel olarak ilaç direnci mekanizmalarından her ne kadar ABC kaset proteinlerini içeren çoklu ilaç direnci proteinlerinin araştırılmasına odaklanılsa da farklı metabolik yolaklar ve post-translasyonel modifikasyonlar da direnç mekanizmaları içerisinde yer almaktadır.

Meme kanserinde ilaç direnci proteinlerini hedefleyen mikroRNA'lar (miRNA) ile ilaç direncinin düzenlendiği bildirilmektedir (Mansoori, Mohammadi, Davudian, Shirjang, & Baradaran, 2017). Transtzumab ile PTEN, PDCD4 ekspresyonunun miR-21 (De Mattos-Arruda et al., 2015), Epirubisin ile ABCG2 ekspresyonunun miR-25 (Wang et al., 2014), Dox ile MRP-1 ekspresyonunun miR-134 (Wang et al., 2014) aracılığıyla ilaç direncini düzenlendiği yönündeki çalışmalar yer almaktadır.

## 2.14. Paklitaksel ve İlaç Direnci

PTX, meme kanserleri için birinci basamak kemoterapötik bir ilaçtır. PTX, mikrotübüller ile etkileşime girerek mitoz sırasında mikrotübüllerin parçalanmasını önlemektedir (N. Kumar, 1981). Mikrotübül stabilizasyonu ile hücreler G2'den M fazına geçememektedir (Fuchs & Johnson, 1978; Schiff, Fant, & Horwitz, 1979; Schiff & Horwitz, 1980, 1981). Bu şekilde hücrelerin çoğalması engellenmektedir. PTX'in diğer bir etkisi, anti-apoptoz proteini B hücre lenfoma-2'yi (Bcl-2) inhibe etmesi ve kanser hücrelerinde apoptozu indüklemesidir (Haldar, Jena, & Croce, 1995). Ayrıca kanser hücreleri, uzun süreli kullanımdan sonra PTX'e karşı direnç geliştirmektedir.

PTX, yumurtalık ve meme kanseri başta olmak üzere çeşitli solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Raab et al., 2020; Zhu & Chen, 2019). Bu ilaca direnç, tedavi başarısızlığının ve sonuç olarak tümörün ilerlemesinin ana nedenidir. PTX direnci ile çeşitli mekanizmalar ilişkilendirilmiştir; mekanizmalardan biri, hücrelerden atılımını gerçekleştiren PTX'in etkisini azaltarak P-gp'nin aşırı ekspresyonudur (Němcová-Fürstová et al., 2016).

PTX'in rolü aynı zamanda tümör büyümesi ile ilişkili immün hücrelerin hem uyarılması hem de baskılanması ile ortaya konulmaktadır. Öte yandan, immün hücrelerin baskılanması, kanser gelişimine karşı konakçı immün yanıt üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilmektedir (Javeed et al., 2009). Dahası PTX'in, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında, NK hücreleri, DC hücreleri ve sitotoksik T lenfositlerin aktivasyonunu indükleyen TNF-α veya IL-12 dahil olmak üzere sitokin salgılanmasına yol açan makrofajların uyarılması yoluyla konakçı immünitesinin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmektedir (Larionova et al., 2019; Wanderley et al., 2018).

TNMK hastalarından elde edilen klinik verilerle, uzun süreli PTX tedavisi alan hastaların yaklaşık yarısının bariz PTX direnci gösterdiği ve tümörün ilerlediği gösterilmektedir (Jiang et al., 2014; Jones et al., 2005). Bu nedenle ilaç direnci, TNMK'de PTX tedavisinin ana sorunu olmaktadır (Jiang et al., 2014). Özellikle TNMK tedavisinde PTX'in farklı ilaçlarla kombinasyonu ile PTX direncinin azaltılması ve genel sağkalımın arttırılması yönünde birçok mekanizmanın hedeflendiği çok sayıda klinik çalışma yapılmaktadır (Nawara et al., 2021).

İmmünoterapi ve geleneksel antitümör kemoterapötiklerin entegrasyonu, meme kanseri tedavisi için kombinasyon stratejilerinin tasarımını desteklemektedir (Emens &

Middleton, 2015). Daha önce de Bölüm 2.7'de bahsedildiği gibi, Nab-PTX ile kombinasyon halinde PD-L1'i hedefleyen bir mAb olan atezolizumab, TNMK'de iyi etkinlik göstermiş olup hastaların hem progresyonsuz hem de genel sağkalımını uzatmakla birlikte ve bu etkinin özellikle tümörlerinde PD-L1 ekspresyonu olan hastalarda belirgin olduğu bildirilmektedir (Schmid et al., 2018).

### 2.15. Doksorubisin ve İlaç Direnci

Dox, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Dox, antrasiklin türü bir antibiyotik olarak çift sarmallı DNA'ya bağlanarak interkalasyon gerçekleştirmektedir. Bunun yanısıra Dox, topoizomeraz II'nin (Topo II) aktivasyonunun inhibisyonu ile DNA kırıkları, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ile hücrelerde serdest radikal hasarı oluşturarak sitotoksik etkiler göstermektedir. Temel olarak, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, hücrelerin G2-M fazında durdurulmasının uyarılması ve apoptoz mekanizmalarını kullanmaktadır. Dox'un hücreler üzerindeki etkisinin faza özgü olmadığı ancak S ve G2 fazındaki hücrelerin G1'deki hücrelere göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Micallef & Baron, 2020). Dox, kanser progresyonunda tümörü uyarıcı etki gösteren PI3K/Akt/mTOR aktivasyonu, anjiyogenez ile ilişkili VEGF ekspresyonunun artışı, ROS oluşturma potansiyeli ile apoptoz artışının yanı sıra ROS düzeylerini azaltmakta görevli hücre sinyal yolaklarının aktivasyonu ile birçok mekanizmayı kapsayan P-gp ekspresyon artışı ile bağlantılı olarak Dox direncini geliştirmektedir. Bunun yanı sıra yüksek glukoz düzeyleri ve hipoksik koşullar altında HIF1-α ekspresyon artışı ve farklı miRNA'lar aracılığıyla da P-gp bağlantılı ilaç direncinin düzenlendiğini bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır (Mirzaei et al., 2022).

Dox'un meme kanseri hücrelerinde, ilaç direncini ve tümör büyümesini indükleyerek kötü prognoza neden olabildiği çalışmalar bulunmaktadır (X. Li, Lu, Liang, Liu, & Fan, 2005). P-gp, Dox'un da dahil olduğu çeşitli hidrofobik antikanser ilaçlara bağlanabilme ve bu ilaçların substratı olarak iş görmektedir (Bogman, Peyer, Török, Küsters, & Drewe, 2001).

Meme kanserinde PD-L1'in susturulması ile Dox'un apoptotik etkilerinin arttığı gösterilmektedir. PD-1/PD-L1 inhibisyonu ile, meme kanseri hücrelerinde MDR1/P-gp ekspresyonunu inhibe ederek Dox'un etkinliğini arttırabileceği önerilmektedir (S. Liu et al., 2017). Mürin meme kanseri modelinde Dox'un neden olduğu ilaç direncinin ve

tümör büyümesinin, tümör hücrelerini koruyan MAPK/ERK yolağının adaptif rolü ile ortaya çıkabileceği rapor edilmektedir (Christowitz et al., 2019).

Çalışmamızda immün hücrelerle oluşturulan *in vitro* meme kanseri modelinde, iki farklı küçük molekül inhibitörü kullanımı ile PD-1/PD-L1 inhibisyonunun sağlanması ve bu etkinin Dox ve PTX ile olası ilaç direnci potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu uygulamalarla monosit ve lenfosit hücreleri ve iki farklı genetik yapıya sahip meme kanseri hücre hatlarında oluşturduğu etkiler saptanmaya çalışılmıştır.

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. GEREÇ

### 3.1.1. Hücre Hatları:

Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinoma), MCF-7 (insan meme adenokarsinoma), THP-1 (insan akut monositik lösemi) hücre hatları Prof. Dr. Serap Kuruca'nın (İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.) hücre arşivinden tedarik edilmiştir. Ayrıca bir diğer hücre hattı olan Jurkat (akut T hücre lösemisi) hücre hattı Doç. Dr. Duygu Yaşar Şirin (Namık Kemal Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji AD.) ve Öğr. Gör. Hatice Pilevneli (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi) tarafından tez çalışmasında kullanılmak üzere hediye edilmiştir.

### 3.1.2. Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri:

#### 3.1.2.1. Jurkat Hücre Hattı

Jurkat hücreleri, akut T hücresi lösemisini, T hücresi sinyallerini ve viral girişe, özellikle HIV'e duyarlı çeşitli kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu incelemek için kullanılan ölümsüzleştirilmiş bir insan T lenfosit hücreleri dizisidir. Interlökin-2 (IL-2) üretimine sahiptir (Abraham & Weiss, 2004).T hücre reseptör sinyal iletiminde yer alan genlerden *PTEN, CTLA-4*, *SHIP1* ve *SYK* mutasyonları, genom stabilitesinden yer alan genlerden *TP53*, *BAX* ve *MSH2* mutasyonları, O-bağlı glikozilasyon ile ilişkili genlerden *COSMC* mutasyonlarına sahip olduğu bildirilmektedir (Gioia, Siddique, Head, Salomon, & Su, 2018).

#### 3.1.2.2. THP-1 Hücre Hattı

THP-1, akut monositik lösemili 1 yaşındaki bir erkeğin kanından kültüre edilmiş bir insan monositik lösemi hücre hattıdır. Çok sayıda kriter açısından doğal monosit türevli makrofajlara benzerler. HL-60, U937, KG-1 veya HEL hücreleri gibi diğer insan miyeloid hücre hatları ile karşılaştırıldığında, farklılaşmış THP-1 hücreleri daha çok doğal monosit türevli makrofajlar gibi davranır (Auwerx, 1991). MLL ve MLLT-3 genleri ile; *TP73* ve CDKN2A, CDKN2B ve PTEN genlerinde mutasyon tespit edilmiştir (Adati, Huang, Suzuki, Suzuki, & Kojima, 2009).

### 3.1.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattı

Metastatik meme adenokarsinom1u olan 51 yaşındaki beyaz ırk bir kadının plevral efüzyonundan oluşturulan epitelyal, insan meme kanseri hücre hattıdır (Cailleau, Olive, & Cruciger, 1978). Östrojen, progesteron ve E-kaderin negatiftir ve P53 mutasyonu bulunmaktadır. Hücreler ayrıca HER2 büyüme faktörü reseptöründen yoksun olduklarından, TNMK için iyi bir modeldir. ER ekspresyonunun yokluğu, MDA-MB-231 hücresinin tamoksifen dahil olmak üzere anti-hormon bazlı tedavilere karşı duyarsızlığına neden olmaktadır. MDA-MB-231 hücreleri *in vitro* ortamda invazivdir ve ortotopik olarak implante edildiklerinde spontan olarak lenf düğümlerine metastaz yapan ksenograftlar üretmektedir (Chavez, Garimella, & Lipkowitz, 2010; Gest et al., 2013; Islam & Resat, 2017).

### 3.1.2.4. MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7, 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz bir kadından izole edilmiş bir meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücre hattının ismi, 1973'te Herbert Soule ve arkadaşları tarafından üretildiği Detroit'teki enstitüye atıfta bulunan Michigan Cancer Foundation-7'nin kısaltmasından gelmektedir (Soule, Vazquez, Long, Albert, & Brennan, 1973). MCF-7 meme kanseri hücre hattı non-invaziv bir "Luminal A" alt tipidir ve kemoterapiye, özellikle Paklitaksel'e (PTX) oldukça duyarlıdır (Abu Samaan, Samec, Liskova, Kubatka, & Büsselberg, 2019). Ayrıca MCF-7 hücre hattında, *PIK3CA,* E545K, *GATA3* mutasyonları olmakla birlikte, *TP53* gen mutasyonu bulunmamaktadır (Usary et al., 2004). MCF-7 hücre hattı, fonksiyonel östrojen ve EGF reseptörlerine sahiptir, büyüme için östrojen ve EGF'ye bağlıdır. MDA-MB-231 hücreleri ise daha agresif, hormondan bağımsız meme kanseri için bir modeldir. MCF-7 hücrelerinde, MDA-MB-231 hücrelerinde olduğundan iki kat daha fazla nötral glikolipid bulunmaktadır (Nohara, Wang, & Spiegel, 1998).

**Tablo 3-1: Kullanılan kimyasallar**

| Malzeme adı | Özellik/Kod |
|---|---|
| **Fetal Sığır Serumu (FBS)** | Hyclone (SV30160.03) |
| ***Dulbecco's Modified Eagle Medium*** **(DMEM) (Low glucose)** | Sigma (D2902-10X1L) |
| ***Roswell Park Memorial Institute*** **(RPMI) 1640** | Sigma (R6504-10X1L) |
| **Tripsin** | DIFCO (1:250) (0152-15-9) |
| **Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)** | Santa Cruz (sc-29092) |
| **Sodyum bikarbonat** | ISOLAB (969.106.1000) |
| **Penisilin/Streptomisin(10,000 U/mL)** | Gibco 15140122 |
| **Fosfat tamponu (PBS)** | Lonza (DPBS with Ca and Mg) |
| ***Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*** **(MTT)** | Sigma (M5655) |
| **Dimetil sülfoksit (DMSO)** | Glentham (GK2245-1lt) |
| **Tripan Mavisi(%0,4)** | Sigma (T8154) |
| **PD-1 antikoru (PE)** | Biolegend (329906) |
| **PD-L1 antikoru (PE)** | Biolegend (329706) |
| **MDR-1 antikoru (PE)** | Biolegend (348606) |
| **ABCG2 antikoru (PE)** | Biolegend (332008) |
| **MRP-1 antikoru (Alexa Fluor 488)** | Biolegend (370306) |
| **BMS-1166** | Selleckchem (S8859) |
| **Human PD-L1 Inhibitor IV** | Anaspec Inc. (AS-65584) |
| **Phytohemagglutinin-M (PHA-M)** | Biosera (LM-T1740/5) |
| **Doksorubisin** | Glentham Life Sciences (GA4969) |
| **Paklitaksel** | Glentham Life Sciences (GA4564) |

**Tablo 3-2: Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan CD Belirteçleri**

| CD belirteci-Florokrom | Marka/Kod |
|---|---|
| **CD2-APC** | Immunotech France (REF B49213) |
| **CD4-T4 ECD** | Beckman Coulter, CA92821 (REF 6604727) |
| **CD5-APC** | Immunotech France (REF A60790) |
| **CD8-PC7** | Beckman Coulter, CA92821 (REF 737661) |
| **CD10-PE** | Immunotech France (REF A07760) |
| **CD13-ECD** | Immunotech France (REF B24026) |
| **CD19-APC** | Immunotech France (REF A94681) |
| **CD33-PC5.5** | Immunotech France (REF B36289) |
| **CD34-PC7** | Immunotech France (REF A21691) |
| **CD45-KrO** | Beckman Coulter (REF B36294) |
| **CD57-FITC** | Immunotech France (REF B49188) |
| **HLA-DR-Pasifik Mavisi** | Immunotech France (REF B36291) |

**Tablo 3-3: Kullanılan Alet ve Cihazlar**

| Adı | Marka/Model |
|---|---|
| **Hassas Terazi** | DENVER (U.S.A) |
| **pH-Metre** | HANNA Instrument |
| **Laminar akımlı kabin (Sınıf 2)** | Markasız (yerli üretim) |
| **Buzdolabı** | Bosch |
| **$CO_2$ inkübatörü** | Nuaire-Nu 5500E (PSU-2T HEPA filtreli) |
| **Santrifüj** | Hettich Rotina 46R |
| **Mikropipet (1-10, 20-200, 100-1000)** | Eppendorf |

| | |
|---|---|
| **Otomatik Pipetör** | ISOLAB |
| **Azot tankı** | Taylor-Wharton |
| **Vorteks** | Nuve mix |
| **Invert mikroskop** | Olympus |
| **Neubauer lamı** | Marienfeld |
| **Işık ve floresan mikroskobu** | Nikon Eclipse Ts2 |
| **ELISA plak okuyucu** | Allsheng (FlexA-200) |
| **Derin Dondurucu** | ALTUS |
| **Akım Sitometre** | Beckman Coulter Navios EX |

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Hücre Kültürü

#### 3.2.1.1. Kültür Ortamı Hazırlığı

**RPMI Hücre Kültürü Ortamı:** L-glutamin içeren RPMI-1640 üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde fetal sığır serumu (FBS), %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklenmektedir. Hazırlanan komplet (tam) RPMI hücre kültürü ortamı, 4°C'de saklanmaktadır. RPMI kültür ortamı, süspanse karakter taşıyan Jurkat ve THP-1 hücre hatları için kullanıldı.

**DMEM Hücre Kültürü Ortamı:** DMEM (düşük glukoz içeren) komplet hücre kültürü ortamı son konsantrasyonu % 10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin eklenerek hazırlandı. Saklama koşulları +4°C'dedir. DMEM kültür ortamı, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları için kullanıldı.

#### 3.2.1.2. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azotta dondurulmuş olarak saklanan hücreler alınarak, 37°C su banyosunda ısıtıldı. Hücreler 1500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı (meme kanseri hücreleri). Süspanse hücreler için 300 g'de 5 dk süre ile yapılan santrifüj sonrası tüm hücre pelletleri taze kültür ortamı ile süspanse edilerek 1 kez yıkama yapıldı. Sonrasında tekrar santrifüj edilerek dondurulan hücrede yer alan

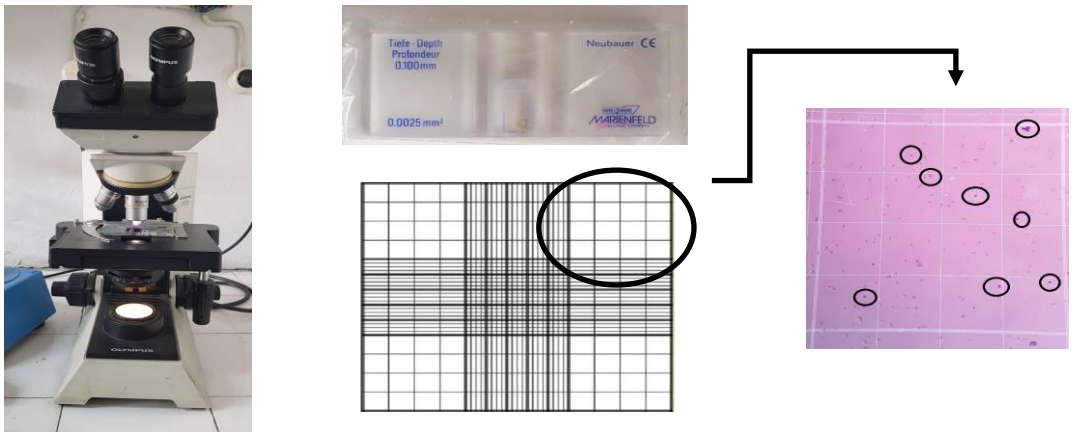
DMSO'nun tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Ardından tüm hücreler taze kültür ortamı ile süspanse edildikten sonra pellet yoğunluğuna göre 25 $cm^2$ ya da 75 $cm^2$ lik flasklara ekimleri yapıldı.

### 3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Kültüre edilen hücrelerin yoğunluğu %70-80 aralığına ulaştığında hücrelerin pasajlanması yapıldı.Bu amaçla öncelikle kültür ortamı uzaklaştırıldı, ardından flask steril PBS ile yıkanıp uzaklaştırıldıktan sonra Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücrelerin birbirlerinden ve kültür kabından ayrılması sağlandı ve kültür ortamı ilavesi ile bir falkon tüpte toplandı. Son aşamada, tüpe toplanan bu hücre süspansiyonundan bir miktar alınıp (10 µL) Tripan Mavisi ile hücre sayımı yapıldıktan sonra uygun miktardaki hücreler flasklara ekilerek çoğaltılmak üzere etüve kaldırıldı.

### 3.2.1.4. Hücre sayımı

Hücreler santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp hücre pelleti taze kültür ortamı ya da PBS ilavesi ile tekrar süspanse edildi. Tripan mavisi (%0,4) boyasından 10 µL ve hücre süspansiyonundan da eşit hacimde 10 µL olarak karıştırıldı. Neubauer lamına 10 µL hacimde karşım aktarıldı. Boyamanın takibi mikroskopta yapıldı. Hücre membranı bozulmuş ölü hücreler mavi boyayı içine alırken, canlı hücreler daha parlak bir görünüm sergileyerek Tripan mavisi boyasını içine almadı. Neubauer lamında en az 4 karenin sayılmasına ve karelerde sayılan hücre sayısının homojen olmasına özen gösterildi.




**Şekil 3-1: Mikroskopta hücre sayımı, Neubauer lamı ve lamda hücre görüntüleri**

Şekilde sırasıyla ışık mikroskobu, neubauer lamı ve lama ait çizgiler ve hücre sayımında çekilen hücre fotoğrafı görülmektedir. Fotoğrafta yuvarlak olarak işaretli hücreler, tripan mavisi boyasını almış ölü hücrelerdir (Şekil 3-1).

**Hücre sayısının hesaplanması:**

1 ml hacimdeki toplam hücre sayısı = Lamda sayılan hücre ortalaması (4 karenin ortalaması) x Dilüsyon faktörü x 10.000

### 3.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması

Pasajlama işlemine benzer şekilde Tripsin-EDTA ile flask tabanından kaldırılan hücreler falkonda toplanarak santrifüj sonrası elde edilen pelet hücre dondurulmak üzere önce taze kültür ortamı ile süspanse edildi. Süspansiyon sonrasında 400 µl hücreden alınarak üzerine, 500 µl FBS ve son olarak 100 µl DMSO eklenerek dondurma için özel kapaklı tüplerin (kriyotüplerin) içerisinde karıştırıldı. Gece boyu -20 °C'de bekletilen hücreler ardından ertesi gün sıvı azot tankına kaldırıldı.

### 3.2.2. MTT Canlılık Testi

MTT testi kantitatif bir yöntem olarak hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesinin kantitasyonunun sağlanması yöntemin temel prensibidir. MTT sıklıkla sitotoksik ajanların etkinliklerinin test edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) suda çözünen bir tetrazolium tuzudur ve testte kullanılan reaktif PBS ile hazırlanmaktadır. Reaktifin çalışma mekanizmasını, tetrazolium halkasının mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanması sonucu MTT reaktifinin mor renkli formazan kristallerine dönüşmesi oluşturmaktadır. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri ile doğru orantılıdır. Oluşan bu formazan kristalleri izopropanol veya DMSO gibi çözücüler kullanılarak çözünebilmekte, oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak ölçümü gerçekleştirilmektedir. 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile kantitatif bir analiz yapılmaktadır (Mossman, 1983).

### 3.2.2.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

Çalışmamızda MTT testi; *in vitro* meme kanseri modelinde hücre sayılarının optimizasyonunda, uygun PHA-M konsantrasyonunun belirlenmesinde, kemoterapi

ajanları olarak, meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan Dox ve PTX ile birlikte PD-1/PD-L1 blokajında yer alan küçük molekül inhibitörleri hücrelerin canlılığına olan etkilerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Çalışmada kullanılan ilaç ve inhibitörlere ait konsantrasyonlar; Doksorubisin, DMSO'da 10 mM; Paklitaksel, DMSO'da 1 mM; BMS1166, DMSO'da 5 mM, Human PD-L1 inhibitör IV konsantrasyonu steril suda 1 mg/mL olarak hazırlanan stok solüsyonlarından kültür ortamı ile seri dilüsyonlar şeklinde uygulama konsantrasyonları hazırlandı.

### 3.2.2.2. MTT Protokolü

MTT reaktifi PBS içerisinde 5 mg/ml konsantrasyonunda çözülerek stok olarak hazırlandı. Belirli sayıda hücre ekimi ve ajan uygulaması sonrasında deney süresi tamamlandıktan sonra, 96 kuyucuklu plakalarda bulunan hücrelerin üzerine hazırlanan MTT stok çözeltisinden 10 µL konularak test başlatıldı (1:10, çalışma konsantrasyonu 0.5 mg/ml). 37°C'de etüvde 3-3,5 saat arası inkübasyon yapıldı. Süre sonunda hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılarak oluşan formazan kristallerinin çözündürme işlemi gerçekleştirildi. Aderent hücreler için ortam tamamen uzaklaştırılıp, 100 µL DMSO ilavesi ile, süspanse hücreler için ise kültür ortamı 50 µL uzaklaştırılıp 150 µL DMSO ilavesi ile kristallerin çözündürme işlemi yapıldı. Homojen bir görünüm elde edildiğinde spektrofotometrik ölçüme geçildi. 570 nm dalga boyunda Allsheng (FlexA-200) cihazında absorbans ölçümü yapıldı (Mosmann, 1983). MTT testine göre 72 saat süre ile, test edilen ilaç ve inhibitörlerin hücreler üzerindeki farklı dozlardaki sitotoksisite yüzdeleri ve yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu ($IC_{50}$) değerleri Graphpad Prism 9 programı kullanılarak belirlendi. Hücrelerin % canlılık oranları aşağıdaki formül ile hesaplandı.

% Canlılık= ($A_ö$/ $A_k$) x100

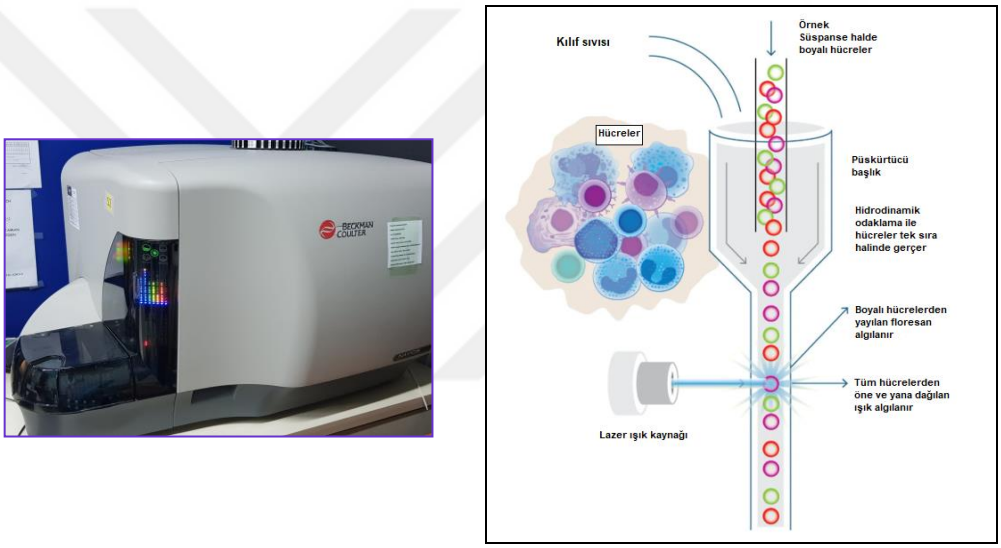
% Sitotoksisite = 1- [($A_ö$/$A_k$) x100]

$A_ö$: Örneğin absorbansı $A_k$: Kontrol grubunun absorbansı

### 3.2.3. Akım Sitometri

Akım sitometrisi, aydınlatılmış bir ışık yolu boyunca sıvı süspansiyonunda akan hücrelerin özelliklerinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Akım sitometrisinin temel prensibi, bir lazerin önünde hidrodinamik olarak odaklanmış sıvı akışındaki süspanse hücrelerin

geçişinin saptanabilmesi, sayılabilmesi, büyüklük ve granülitelerinin belirlenmesi gerçeğine dayanmaktadır. Hücre bileşenleri, florokrom ile doğrudan veya hücre bileşenine bağlanan bir antikora bağlı olarak etiketlenmektedir. Lazer ışını ile uyarılma üzerine, florokrom lazerden gelen ışık enerjisini emer ve ardından enerjinin bir kısmını titreşim ve ısı dağılımı şeklinde ve geri kalanını da foton olarak serbest bırakmaktadır. Bu, emilen fotonun daha düşük bir enerjide, yani kaynaktan daha uzun bir dalga boyunda yeniden yayılmasıyla sonuçlanmaktadır (Şekil 3-2). Ayrıca akım sitometri yöntemi ile, tek bir hücre örneği üzerindeki birden fazla parametre, örnek üzerindeki farklı işaretleri hedefleyen antikor aralığında etiketlenen farklı spektral özelliklere sahip farklı florokromlar kullanılarak aynı anda analiz edilebilmektedir.




**Şekil 3-2: Akım sitometre ve akım sitometrenin çalışma prensibi**

(https://www.streck.com/blog/principles-of-flow-cytometry)

Çalışmamızda akım sitometri; Jurkat ve THP-1 hücrelerinin immünfenotipik karakterizasyonunda, Jurkat hücresinin PHA-M uygulaması ile aktivasyonunun belirlenmesinde yararlanılan PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeylerinin saptanmasında, tüm hücrelerin bazal PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde, ko-kültürde kemoterapi ilacı ve inhibitör uygulamaları sonrası yine PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları ile ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ilaç direnci proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin tespitinde kullanıldı.

### 3.2.4. Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmünfenotipik Karakterizasyonu

Hücre yüzeyinde hücreye özgü belirteçler bulunmaktadır. Özellikle kan hücrelerinde oldukça fazla sayıda belirteç bulunmakla birlikte pek çok kan kanserine spesifik olmak üzere hücre yüzey belirteci panelleri belirlenmiştir. Akım sitometrik olarak saptanan belirteçler yardımıyla hastalık tespiti ve hastalığın takibi gerçekleştirilmektedir. Pek çok hücre türüne ait belirteçler tanımlanmış olup hücreler immünfenotipik olarak karakterize edilebilmektedir. Karakterizasyon işlemi spesifik antikor ve antikora bağlı florokromlar aracılığıyla akım sitometri ile yapılmaktadır.

Deneysel aşamaya geçildiğinde; öncelikli olarak yeterli sayıda çoğaltılan Jurkat ve THP-1 hücreleri süspanse hücreler olduğu için doğrudan 15 ml'lik steril falkona alındı. 300 g'de 10 dk süreyle santrifüj işlemine tabii tutuldu. Hücreler santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet PBS ile yıkandı. Tekrar santifüj edildi. PBS ile çözülen hücreler, mikroskopta tripan mavisi boyası ile Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımları yapıldı. $5x10^6$ hücre/mL olacak şekilde hücre sayıları ayarlandı. Tüpler etiketlenerek deney düzeni oluşturuldu. Her tüpe 100 µL hücre konuldu. Boyasız kontrol tüpüne sadece hücre konulurken, negatif ve pozitif izotipik kontrol gruplarına hücreye ek olarak 20 µL antikor ilave edildi. Taranacak antikorlar ise 100 µL hücre süspansiyonu üzerine 5µL olarak eklendi. Örnekler 30 dk boyunca karanlık ve soğukta inkübe edildi. PBS ilavesi ile 2 kez yıkama yapıldı. Yıkamalar 2000 rpm'de 5 dk olarak gerçekleştirildi. Yıkama sonrası 500 µL PBS eklenerek uygun protokol seçilerek akım sitometri cihazında en az 30000 hücre geçirilerek ölçüm alındı. Tüm örneklerin okutulmasından sonra aynı cihazda analizi yapıldı. Çalışmada Beckman Coulter Navios EX akım sitometre kullanıldı ve verilerin analizi Kaluza programı ile gerçekleştirildi.

Jurkat hücresinde; başta CD4 ve CD8 antikorları olmak üzere, HLA-DR, CD45-KRO, CD2, CD5, CD10, CD13, CD19, CD34 ve CD57 immünfenotipik belirteçleri kullanıldı.

THP-1 hücresinin karakterizasyonunda; immünfenotipik belirteçlerden HLA-DR, CD45-KRO, CD13 ve CD33 kullanıldı.

### 3.2.5. Akım Sitometri Yöntemi ile PD-1, PD-L1 hücre yüzey proteinleri ile ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ilaç direnci proteinlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi

Hücreler ayrı ayrı ve ko-kültür hücreleri birlikte olarak iki farklı şekilde işleme tabii tutuldu. Adherent (plastik yüzeye yapışan) yapıdaki hücreler olan meme kanser hücreleri tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı. 300 g x 10 dk santrifüj yapıldı. Ko-kültürdeki hücreler için hücre büyütme kabının süpernatantında süspanse hücreler olan monosit ve lenfositler yer aldığından süpernatant 15 mL'lik falkona alındı. Devamında adherent hücreler tripsin ile kaldırıldı ve kültür ortamı ilavesi ile aynı tüpe toplandı. 300 g x 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamalar 300 g x 5 dk santrifüj ile yapıldı. Santrifüj sonrası hücreler sayılarak $1x10^6$ hücre/mL olacak şekilde eklenecek PBS miktarı belirlendi. Bu şekilde hazırlanan hücreler Akım Sitometri Laboratuvarı'na getirildi. Burada akım tüplerine 5µL antikor konuldu. Sonrasında vorteks yardımıyla süspanse edilen hücreler 100 µL olarak tüplere ilave edildi. Bu şekilde karanlıkta ve +4 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılan hücreler, süre sonunda 400 µL PBS ilavesi ile 2000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak 500 µL PBS ilavesi ile hücreler vortekslendi ve okutma aşamasına geçildi. Her bir örnek için boyasız negatif kontrol yapılarak cihazın okutma ayarları yapıldı. Uygun protokol belirlendiğinde, tüm örnekler en az 10000 hücre olacak şekilde akım sitometri cihazından geçirildi. Verilerin analizi Navios EX cihazına ait analiz programı ile yapıldı.

### 3.2.6. Jurkat Hücresinin Fitohemaglutinin-M (PHA-M) ile Aktivasyonu

Jurkat CD4 T lenfosit hücresi olduğundan T hücresi aktivasyonunu sağlayan bir mitojen olan PHA-M kullanıldı. PHA, CD4 protein ekpresyonunda herhangi bir değişime yol açmadığından çalışmalarda sıklıkla aktivasyon için kullanılmaktadır (Baran, Kowalczyk, Oz˙ óg, & Zembala, 2001).

Aktivasyon için uygulanacak PHA konsantrasyonuna literatür bilgisi ve üretici talimatlarına ek olarak; mikroskopta hücre morfolojilerinin izlenmesi, hücre canlılığı analizi ve çalışmamız açısından önemli olan PD-1 ekspresyon düzeyi artışının akım sitometrik olarak belirlenmesi ile karar verildi. Jurkat hücrelerinde PHA-M, 0,1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında 72 saat süreyle inkübe edildi. Belirlenen uygun dozlarda PD-1 ekspresyon düzeyi akım sitometri ile tespit edildi.

Ko-kültür aşamasında PD-1 ekspresyon artışına ek olarak kültür ortamına rekombinant PD-1 proteini eklenerek ekspresyon seviyeleri hem PHA-M hem de rekombinant PD-1 proteini ile birlikte değerlendirildi.

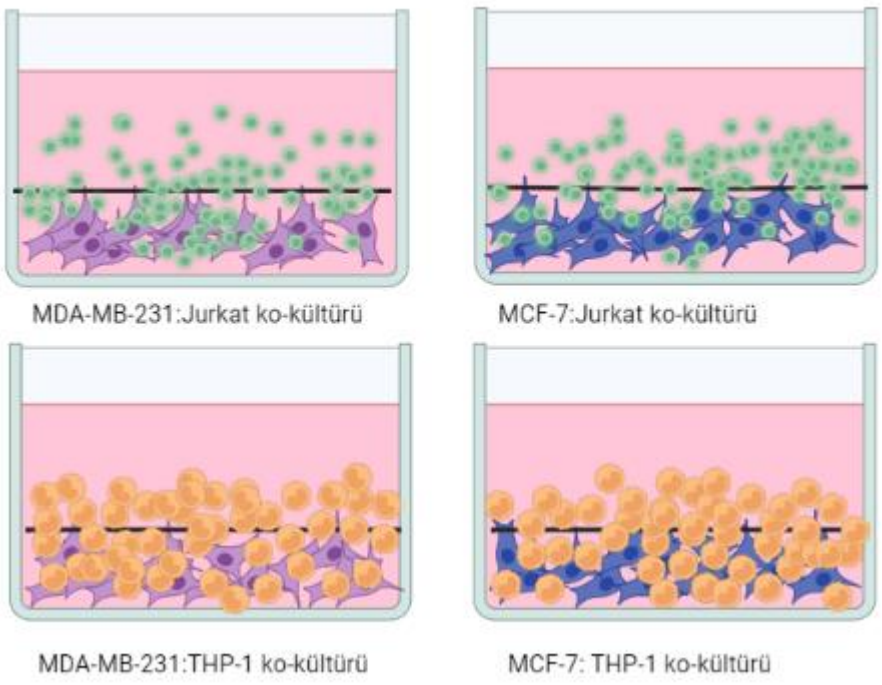
### 3.2.7. *In vitro* Meme kanseri Modelinin oluşturulması

-Modelde yer alan meme kanseri, monosit ve lenfosit hücre sayılarının optimizasyonu

-Hücrelerin bazal PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının belirlenmesi

-Modelde PD-1 ekspresyonunun varlığını temsil etmek üzere gerekli T hücre aktivasyonu için uygun PHA-M konsantrasyonu ve rekombinant PD-1 protein miktarının belirlenmesi aşamaları gerçekleştirildi.

-Model oluşturulurken yapılan tüm optimizasyon çalışmaları ile birlikte aşağıdaki şekilde de görüldüğü üzere hem hücre-hücre teması hem de hücrelerden salınan sitokin ve proteinlerin aynı ortamda bulunması dikkate alındı. Model içerisinde PD-1 eksprese eden Jurkat ve THP-1 hücreleri ile PD-L1 eksprese eden MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri yer almaktadır (Şekil 3-3).




**Şekil 3-3: Monosit ve lenfosit hücreleri ile oluşturulan *in vitro* meme kanseri modeli**

(Biorender.com bilgisayar programı ile çizilmiştir).

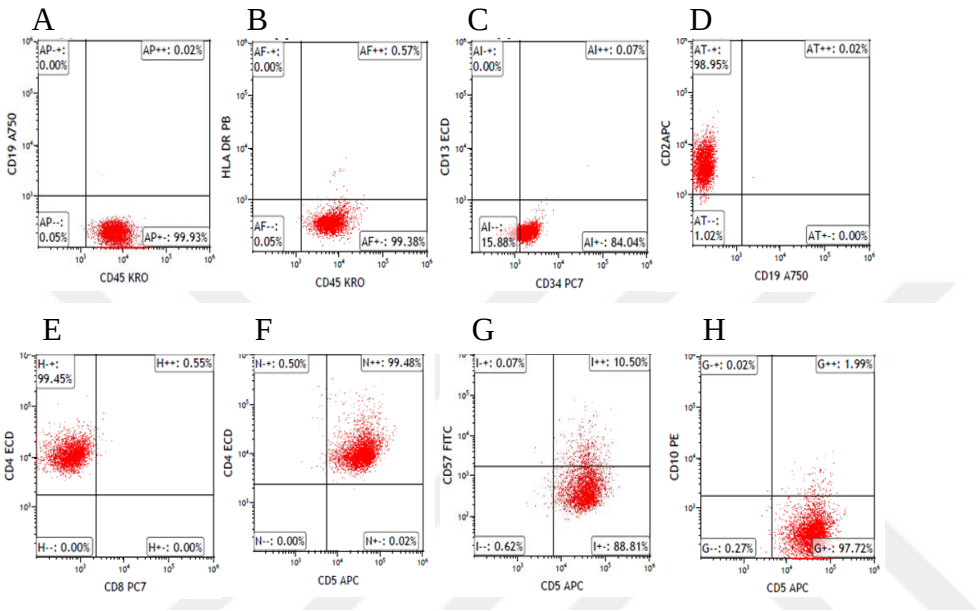
### 3.2.8. İstatistiksel Yöntemler

Tüm istatistiksel analizler için Graphpad Prism 9 yazılımı kullanıldı. Kolmogorov Simirnov testi ile verilerin normal dağılıma uygunluğu belirlendi. Kontrole göre karşılaştırma ve iki farklı verinin karşılaştırılmasında eşleştirilmemiş Student's t testi kullanıldı. Tüm örnekler en az 3 tekrarlı olarak çalışıldı. $p<0,05$ değeri ile veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlılığın gücü $p<0,05$ *, $p<0,01$ ** ve $p<0,001$ *** olarak verildi.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Hücre karakterizasyonu

### 4.1.1. Jurkat Hücresinin Karakterizasyonu

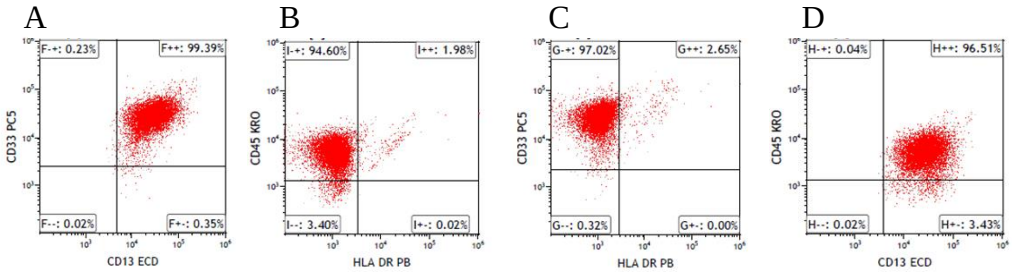



**Şekil 4-1: Jurkat hücresinin lenfositik karakterizasyonu**

**A)** CD19/CD45KRO, **B)** HLA-DR/CD45KRO, **C)** CD13/CD34, **D)** CD2/CD19, **E)** CD4/CD8 **F)** CD4/CD5 **G)** CD57/CD5 **H)** CD10/CD5 farklılaşma kümelerine ilişkin Jurkat hücresine ait akım sitometri ekspresyon seviyeleri

Karakterizasyonu belirleyen CD4, CD2, CD5, CD34, CD45-KrO, CD8, HLA-DR, CD10, CD13, CD19, CD57 ekspresyon düzeyleri incelendi.

### 4.1.2. THP-1 Hücresinin Karakterizasyonu

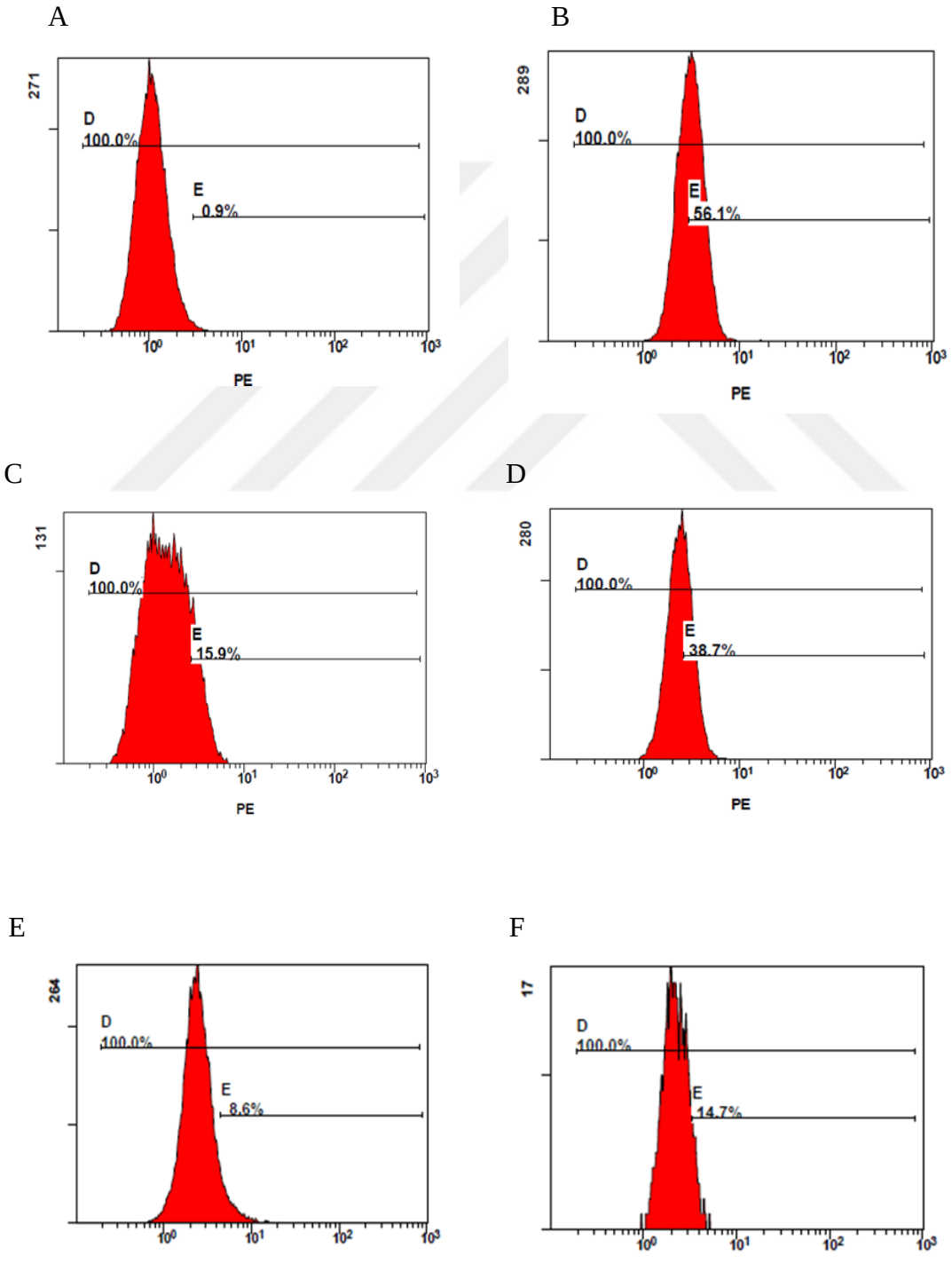



**Şekil 4-2: THP-1 hücresinin monositik karakterizasyonu**

**A)** CD33/CD13, **B)** CD45KRO/HLA-DR, **C)** CD33/HLA-DR, **D)** CD45KRO/CD13 farklılaşma kümelerine ilişkin THP-1 hücresine ait ekspresyon seviyeleri akım sitometrik olarak verilmiştir.

Karakterizasyonu belirleyen CD13, CD33, CD45-KrO ve HLA-DR ekspresyon düzeyleri incelendi.

### 4.2. Hücrelerde bazal düzeyde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları




**Şekil 4-3: Hücrelerin akım sitometrik olarak belirlenen bazal PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları**

**A)** Jurkat hücresinin bazal PD-1 ekspresyonu; **B)** PD-L1 ekspresyonu; **C)** THP-1 hücresinin bazal PD-1 ekspresyonu; **D)** PD-L1 ekspresyonu; **E)** MDA-MB-231 hücresinin bazal PD-L1 ekspresyonu; **F)** MCF-7 hücresinin PD-L1 ekspresyonları verilmektedir.

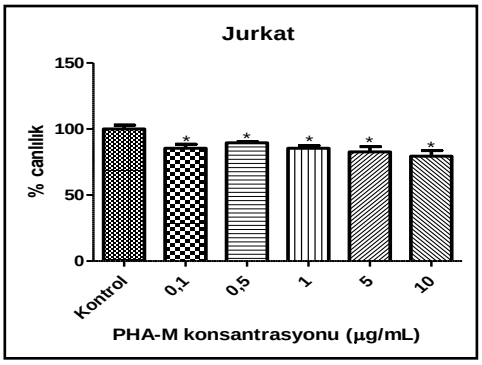
Şekil 4-3'te örnek olarak verilen akım sitometri verilerine göre; Jurkat PD-1 bazal ekspresyonu %0,9, Jurkat PD-L1 bazal ekspresyonu %56,1, THP-1 PD-1 bazal ekspresyonu %15,9, THP-1 PD-L1 bazal ekspresyonu %38,7, MDA-MB-231 PD-L1 bazal ekspresyonu %8,6, MCF-7 PD-L1 bazal ekspresyonu %14,7 olarak belirlendi.

Çalışmaya başlamadan önce hücrelerin karakterizasyonu ve bazal düzeydeki PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının belirlendi. Bu sonuçlar oluşturulacak model için başlangıç değerlerini saptayarak değişimleri incelemek için bir önbilgi niteliği taşıdı. Jurkat hücresinde belirlenen düşük PD-1 ekspresyonu sonrasında hücrelerde T hücre aktivasyon işleminin gerçekleştirilmesine karar verildi. Jurkat hücrelerinin ko-kültür aşamasına geçilmeden 72 saat önce uygun konsantrasyonda PHA ile aktivasyonu sağlandı. Kontrol ile karşılaştırılarak PD-1 ekspresyon düzeyleri değerlendirildi (Şekil 4-4).

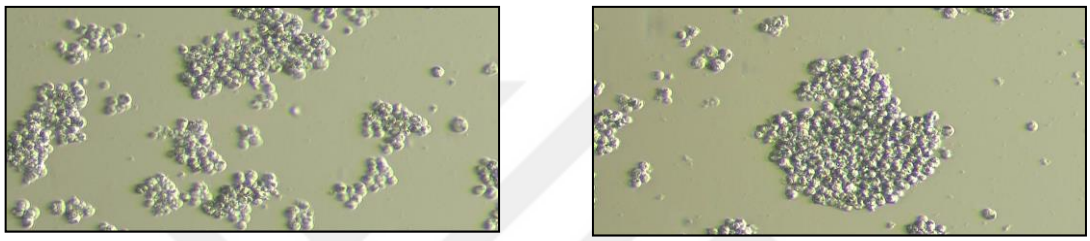
### 4.2.1. Jurkat Hücresinin Fitohemaglutinin (PHA) ile Aktivasyonu

Jurkat hücrelerinde PHA-M, 0,1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulama yapılarak 72 saat süreyle 37 °C %5 $CO_2$ bulunan etüvde inkübe edildi. MTT testi ile öncelikle PHA-M'nin hücre canlılığına herhangi bir etkisinin olup olmadığı saptandı (Şekil 4-4). Mikroskop görüntüleri ile de aktivasyonun varlığı teyit edildi (Şekil 4-4). Belirlenen uygun dozlarda PD-1 ekspresyon düzeyi akım sitometri ile tespit edildi (Tablo 4-1). Ön çalışmalar neticesinde en uygun doz olarak 10 µg/mL belirlendi. Bunun yanı sıra PD-L1 ekspresyonu da akım sitometri ile değerlendirildi.

**A**




**B** **C**



Jurkat Kontrol 72 saat

Jurkat PHA 10 µg/mL 72 saat

**Şekil 4-4: Jurkat Hücresinin Fitohemaglutinin (PHA) ile Aktivasyonu**

A) Jurkat hücrelerinde farklı dozlarda PHA-M uygulaması ile hücre canlılık analizi B) Jurkat Kontrol C) Jurkat 72 saat 10 µg/mL PHA-M uygulamasına ait mikroskop görüntüleri (Inverted mikroskop 10x)

**Tablo 4-1: Farklı konsantrasyonlarda PHA-M uygulanan Jurkat hücrelerinin akım sitometri sonuçlarının kontrole göre PD-1 ve PD-L1 ekspresyon değişimleri**

| **Jurkat hücreleri** | **PHA-M uygulaması** | | |
|---|---|---|---|
| | **1 µg/mL** | **5 µg/mL** | **10 µg/mL** |
| **PD-1 ekspresyonu** | **% 0,1** | **%4,3** | **%9,6** |
| **PD-L1 ekspresyonu** | **%26,8** | **%36,3** | **%41,4** |

Yukarıdaki tabloda Jurkat hücresi için yapılan aktivasyon denemesinde en yüksek PD-1 ekspresyon değişiminin 10 µg/mL PHA-M konsantrasyonu ile olduğu görülmektedir (Tablo 4-1).

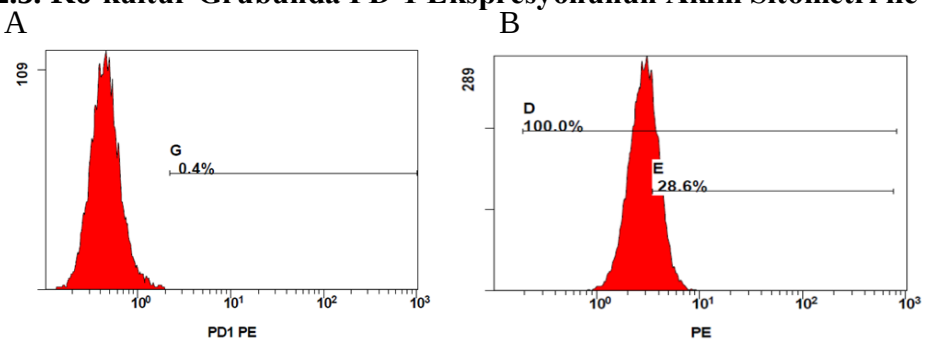
### 4.2.2. *In vitro* Meme Kanseri Modeli

Çalışmamızda, hormon reseptör negatif MDA-MB-231 hücre hattı (ER-PR-her-2-) ve östrojen pozitif MCF-7 hücre hattı (ER+) meme kanseri hücreleri ile akut monositik lösemi hücresi olan THP-1 ve/veya akut lösemi T lenfosit hücresi olan Jurkat hücreleri ile ko-kültür modeli oluşturuldu.

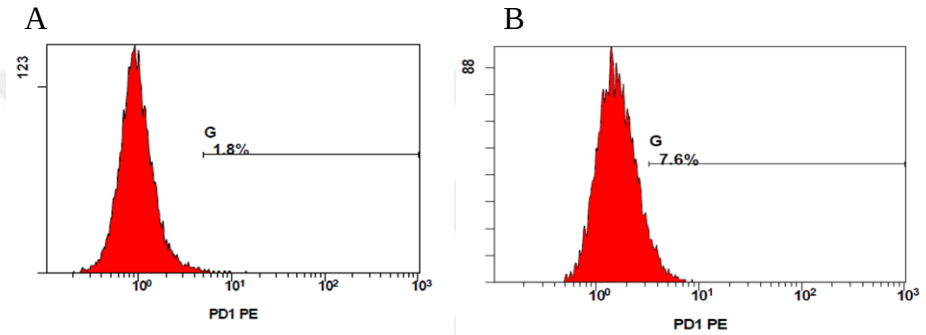
MDA-MB-231, MCF-7 meme kanseri hücreleri, Jurkat ve THP-1 lenfosit ve monosit hücreleri ile; ko-kültür modelinin optimizasyonu için farklı hücre sayısı oranları (1:1, 1:5, 1:10) (monosit: meme kanseri, lenfosit: meme kanseri vb.) şeklinde denenerek uygun hücre sayıları MTT testi ile belirlenerek temel düzeyde bir ko-kültür modeli oluşturuldu. Bu ön çalışmanın sonucuna göre MTT testi ile elde edilen absorbans değerleri doğrultusunda uygun hücre oranları 72 saat için 1:5 olarak belirlendi.

Jurkat hücresi temelinde belirlenen PHA-M uygulamalarına ek olarak hücre kültür ortamına eklenen rekombinant PD-1 proteini ile PD-1 ekspresyonunun varlığı güçlendirildi. Jurkat hücrelerinin bulunduğu ko-kültür gruplarında PD-1 ekspresyonu, 10 µg/mL PHA-M ve literatüre göre uygulanan 1 µg/mL konsantrasyonunda rekombinant PD-1 proteini ilavesi ile değerlendirildi. THP-1 hücrelerinin bulunduğu ko-kültür gruplarında PD-1 ekspresyonunun değerlendirilmesi ise rekombinant PD-1 proteini ilavesi ile gerçekleştirildi.

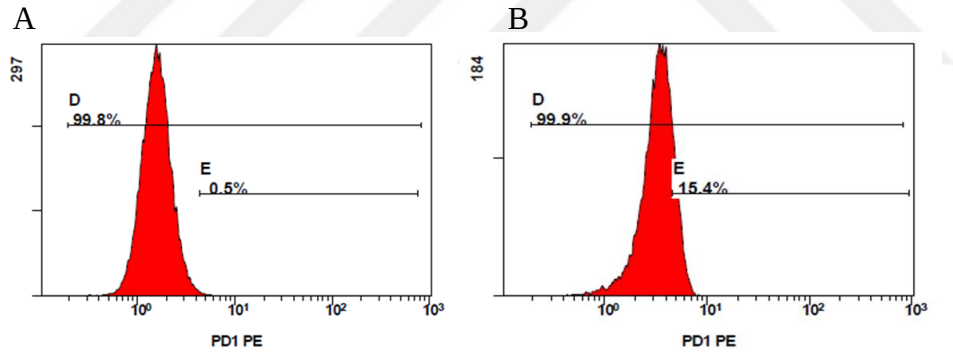
### 4.2.3. Ko-kültür Grubunda PD-1 Ekspresyonunun Akım Sitometri ile Belirlenmesi



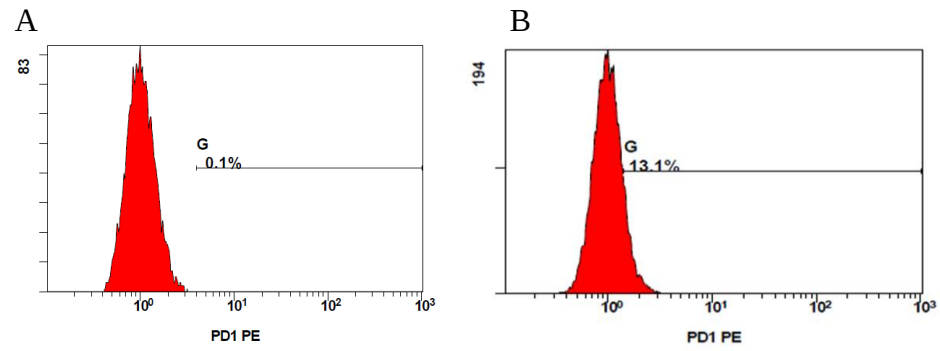

MCF-7: Jurkat Ko-kültürü Kontrol (A) ve 10 µg/mL PHA , 1 µg/mL PD-1 rekombinant proteini (B)




MCF-7: THP-1 Ko-kültürü Kontrol (A) ve 1 µg/mL PD-1 rekombinant proteini (B)




MDA-MB-231: Jurkat Ko-kültürü Kontrol (A) ve 10 µg/mL PHA, 1 µg/mL PD-1 rekombinant proteini (B)




MDA-MB-231: THP-1 Ko-kültürü Kontrol (A) ve 1 µg/mL PD-1 rekombinant proteini (B)

**Şekil 4-5: Ko-kültürdeki hücrelerde PHA-M ve rekombinant PD-1 proteini uygulaması ile PD-1 ekspresyon değişimleri**

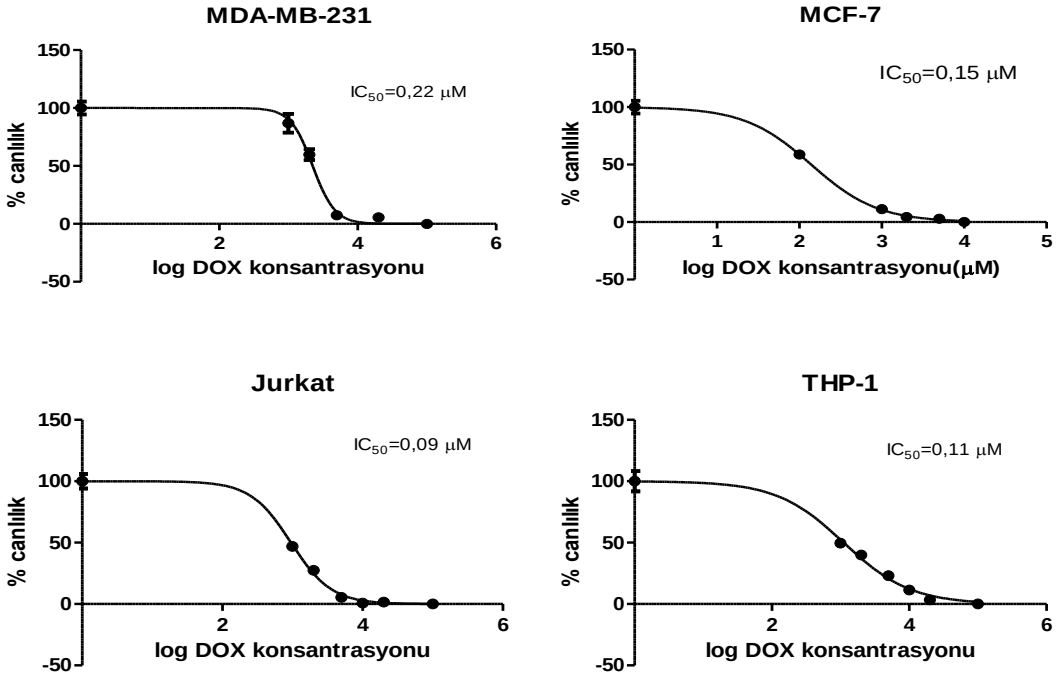
**Tablo 4-2: Ko-kültürdeki hücrelerde PHA-M ve rekombinant PD-1 proteini uygulaması ile PD-1 ekspresyon değişimleri**

| Ko-kültür | Kontrol | PD-1 ekspresyonu |
|---|---|---|
| **MCF-7: Jurkat ko-kültürü** | %0,4 | %28,6 |
| **MCF-7: THP-1 ko-kültürü** | %1,8 | %7,6 |
| **MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü** | %0,5 | %15,4 |
| **MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü** | %0,1 | %13,1 |

Şekil 4-5 ve Tablo 4-2'de gösterildiği gibi tüm ko-kültür gruplarında PHA-M ve rekombinant PD-1 proteininin uygulanmasıyla kontrole göre PD-1 ekspresyon artışları belirlendi.

## 4.3. Kemoterapi İlaçlarının ve PD-1/PD-L1 İnhibitörlerinin Hücre Canlılık Analizleri

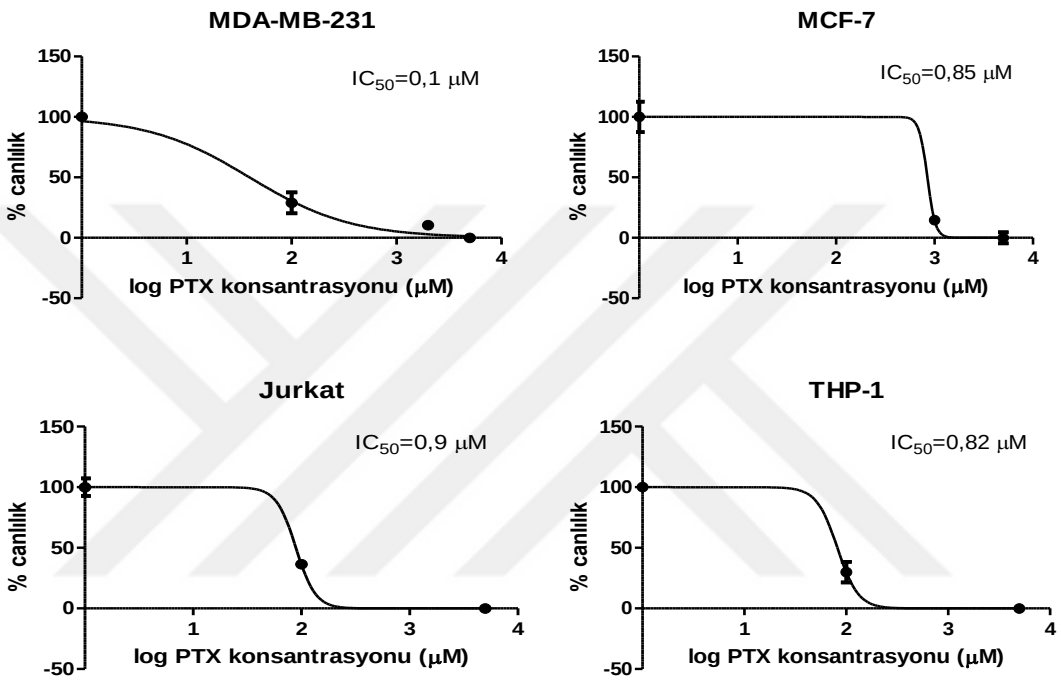
### 4.3.1. Hücrelerde Doksorubisinin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi




**Şekil 4-6: MDA-MB-231, MCF-7, Jurkat ve THP-1 hücrelerinde Dox uygulamasının hücre canlılıklarına etkisi**

Hücrelerde Dox'un 72 saat inkübasyonu ile elde edilen $IC_{50}$ değerleri grafiklerin içerisinde verildi. Tüm hücre grupları arasında 0,09 μM $IC_{50}$ değeri ile Jurkat hücrelerinin tek başına Dox ilacına en duyarlı hücre olduğu tespit edildi (Şekil 4-6), (Tablo 4-3).

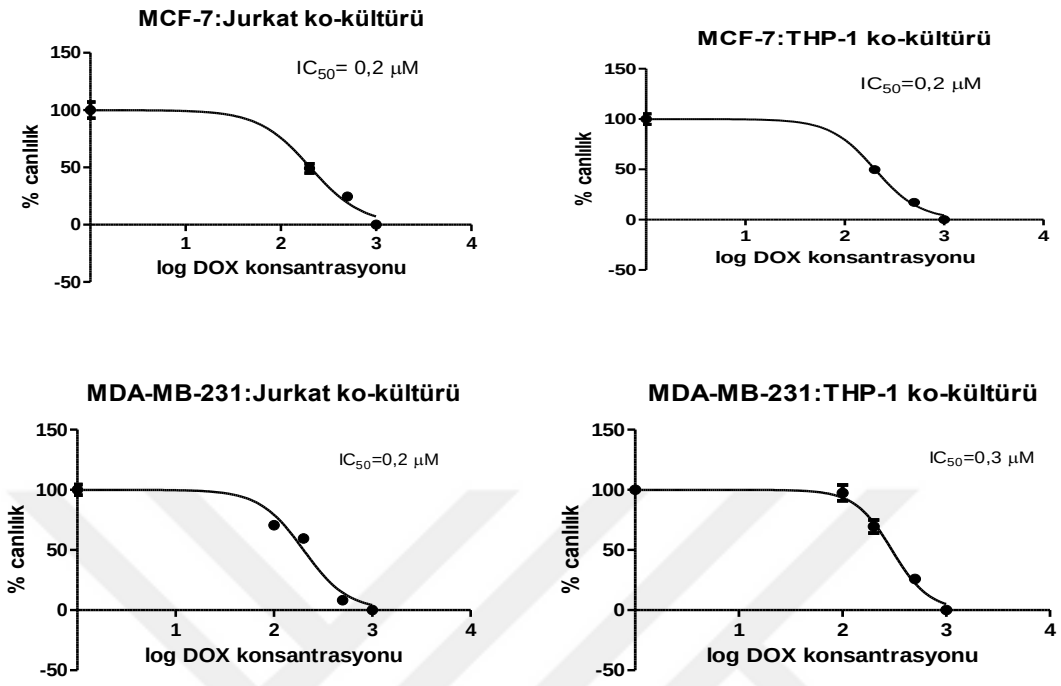
### 4.3.2. Hücrelerde Paklitakselin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi




**Şekil 4-7: MDA-MB-231, MCF-7, Jurkat ve THP-1 hücrelerinde PTX uygulamasının hücre canlılıklarına etkisi**

Hücrelerde PTX'in 72 saat inkübasyonu ile elde edilen $IC_{50}$ değerleri grafiklerin içerisinde (Şekil 4-7) ve aynı zamanda toplu olarak tablo içerisinde de verildi (Tablo 4-3). Çalışmamızda PTX uygulamasına en duyarlı olan hücrenin MDA-MB-231 hücre hattı olduğu gösterildi.

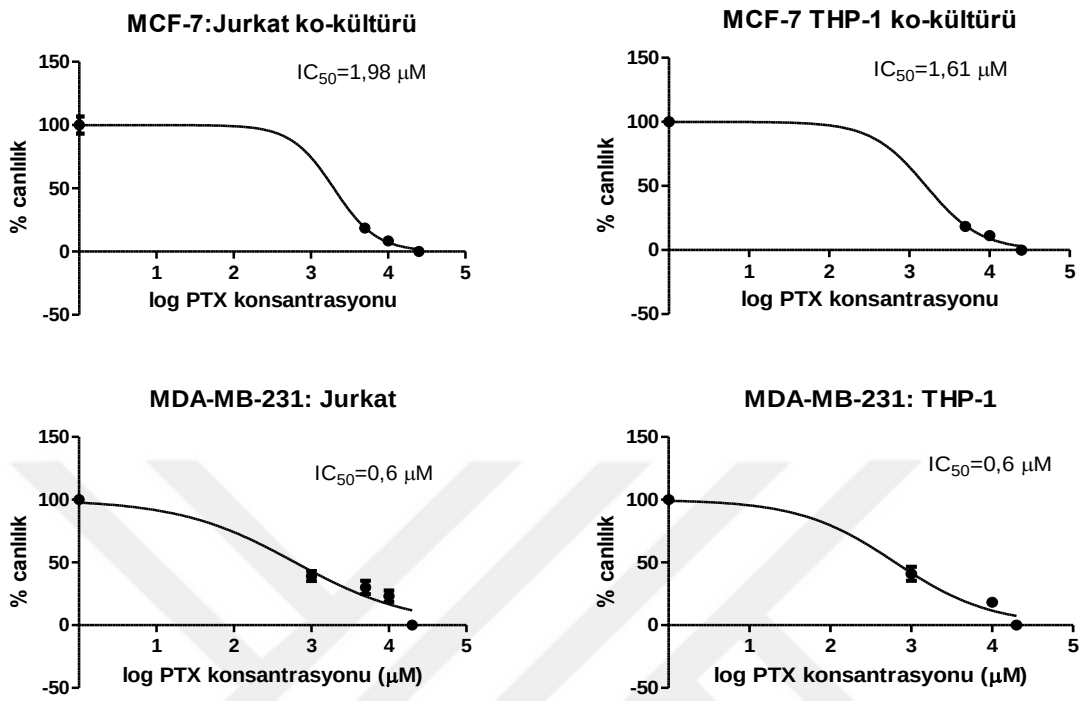
### 4.3.3. Ko-kültür gruplarında Doksorubisinin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi




**Şekil 4-8: MCF-7: Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında Dox'un hücre canlılıklarına etkisi**

Ko-kültür gruplarında Dox'un 72 saat inkübasyonu ile elde edilen $IC_{50}$ değerleri grafiklerin içerisinde verildi. Dox tüm gruplarda 0,01-1 μM konsantrasyon aralığında uygulandı. Elde edilen verilerin analizinden yola çıkılarak, meme kanseri hücreleri ve ko-kültür grupları arasında Dox'a ait $IC_{50}$ değerlerinin çok büyük bir farklılık göstermediği belirlendi (Şekil 4-8).

### 4.3.4. Ko-kültür gruplarında Paklitakselin $IC_{50}$ Dozlarının Belirlenmesi




**Şekil 4-9: MCF-7: Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında PTX'in hücre canlılıklarına etkisi**

Ko-kültür gruplarında PTX'in 72 saat inkübasyonu ile elde edilen $IC_{50}$ değerleri grafiklerin içerisinde verildi. PTX tüm hücrelerde 0,1-25 µM konsantrasyon aralığında uygulandı. PTX uygulaması ile ko-kültür gruplarında tek başına meme kanseri hücreleri ile kıyaslandığında daha yüksek $IC_{50}$ değerleri hesaplandı (Şekil 4-9)(Tablo 4-3).

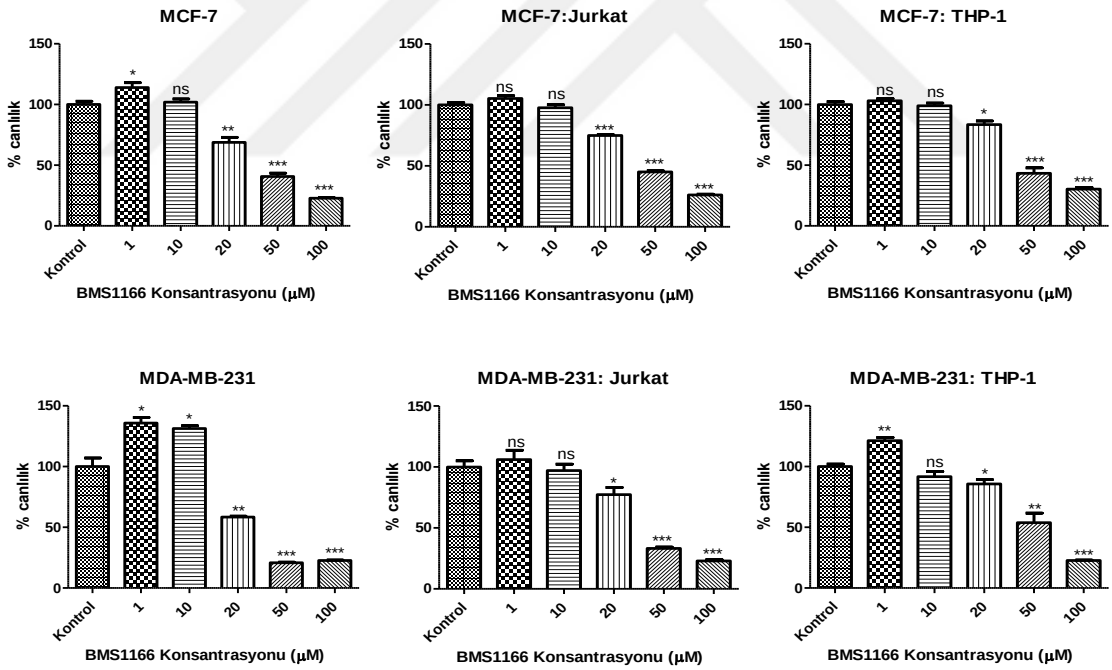
**Tablo 4-3: Hücrelerde ve ko-kültür gruplarında Dox ve PTX'in $IC_{50}$ Değerleri**

| Hücreler/Ko-kültür | DOX | PTX |
|---|---|---|
| **MCF-7** | 0,15 µM | 0,85 µM |
| **MDA-MB-231** | 0,22 µM | 0,1 µM |
| **Jurkat** | 0,09 µM | 0,9 µM |
| **THP-1** | 0,11 µM | 0,82 µM |

| | | |
|---|---|---|
| **MCF-7: Jurkat** | 0,2 µM | 1,98 µM |
| **MCF-7: THP-1** | 0,2 µM | 1,61 µM |
| **MDA-MB-231: Jurkat** | 0,2 µM | 0,6 µM |
| **MDA-MB-231: THP-1** | 0,3 µM | 0,6 µM |

Tablo 4-3'te de verildiği gibi hem MCF-7 hem de MDA-MB-231'in ko-kültür gruplarında PTX uygulaması ile $IC_{50}$ değerlerinin belirgin bir şekilde arttığı gözlendi. Dox uygulaması ile $IC_{50}$ değerlerinde önemli bir değişimin olmadığı gösterildi.

### 4.3.5. Hücrelerde BMS-1166 İnhibitörünün Canlılık Analizi

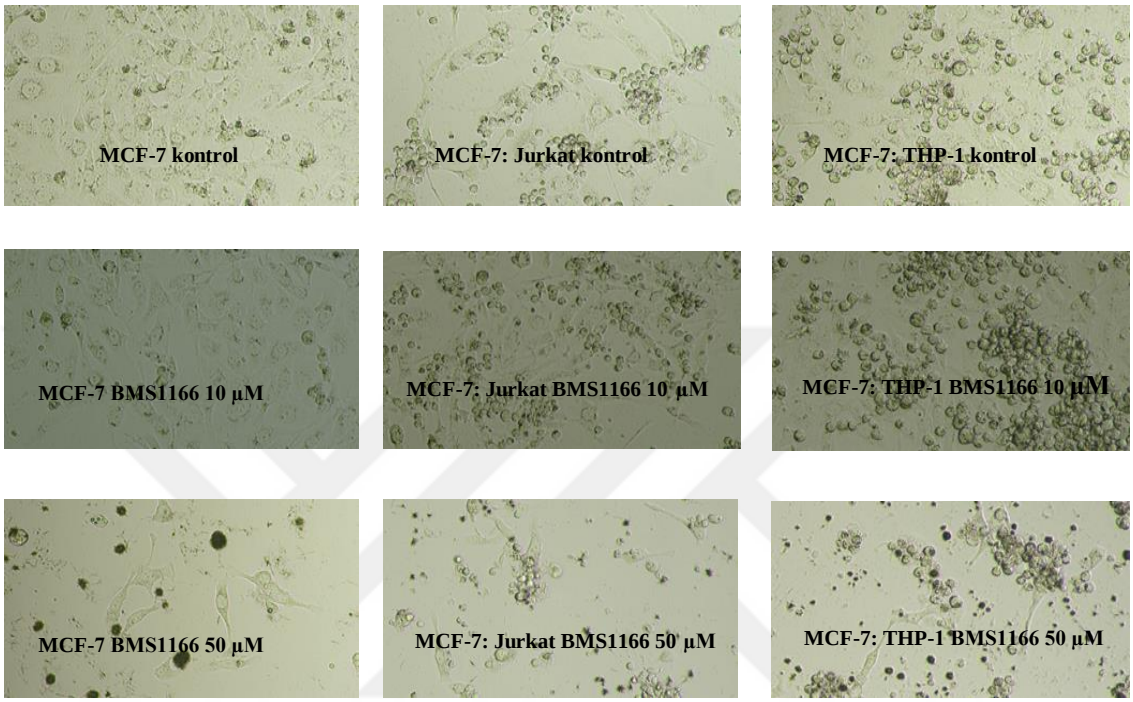



**Şekil 4-10: BMS-1166 inhibitörünün meme kanseri hücreleri ve ko-kültür gruplarında hücre canlılık grafikleri**

BMS-1166 inhibitörü meme kanseri hücrelerinde ve ko-kültür gruplarında, 1-100 µM konsantrasyon aralığında 72 saat uygulanarak MTT testi ile hücre canlılığına etkileri belirlendi (Şekil 4-10).

#### 4.3.5.1. Farklı Dozlarda BMS-1166 inhibitörü Uygulaması Sonrası Mikroskop Hücre Görüntüleri

**a. MCF-7 Hücrelerinde ve Ko-kültür gruplarında BMS-1166 inhibitörü Mikroskop Görüntüleri**

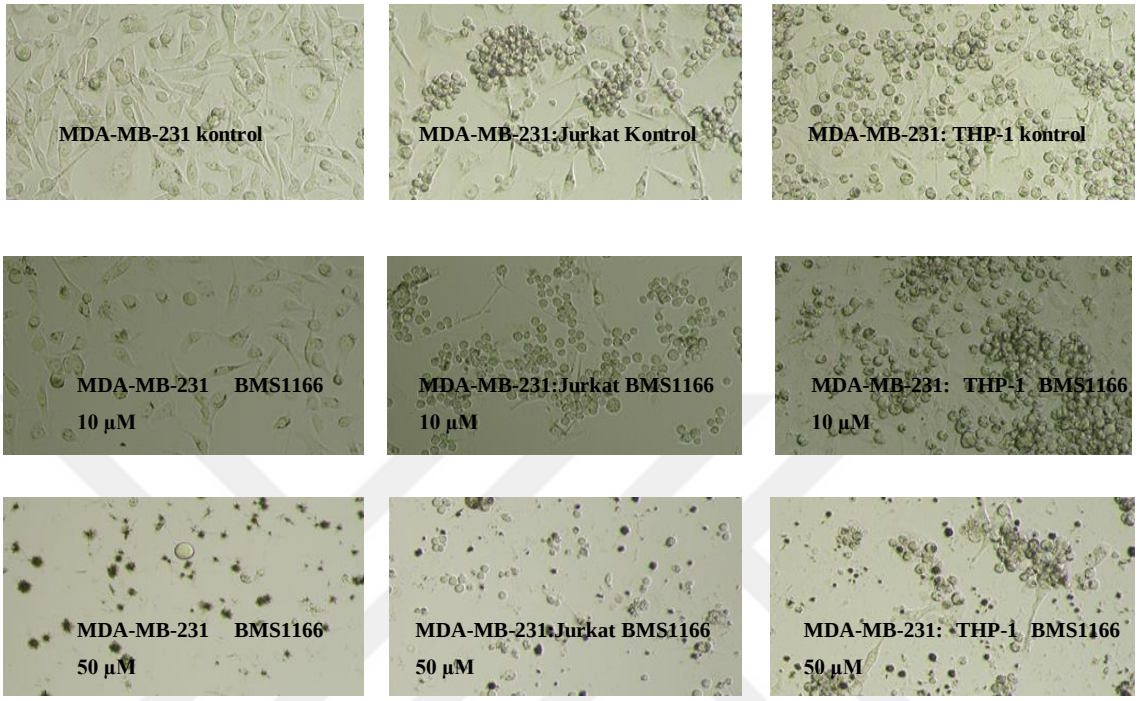



**Şekil 4-11: MCF-7 hücreleri, MCF-7: Jurkat ko-kültürü ve MCF-7: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörünün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x)**

Çalışmada yer alan mikroskop görüntüleri inverted mikroskop ile kaydedilmiş olup 10x büyütme ile verilmektedir.

Şekilde kontrol hücreleri ile BMS-1166 inhibitörünün 10 µM ve 50 µM konsantrasyonlarına ait hücre mikroskop görüntüleri gösterildi (Şekil 4-11). Hücre görselleri ayrıntılı incelendiğinde % 50 inhibitör konsantrasyon değerleri açısından bakılırsa bu hücrelere ait $IC_{50}$ değerlerinin 10 µM'dan yüksek, 50 µM'dan düşük bir konsantrasyonda olabileceği öngörüldü. Bu öngörü, MTT sonuçlarıyla korelasyon gösterdi ve Graphpad Prism ortalama olarak yaklaşık $IC_{50}$ değerleri 20 µM olarak hesaplandı.

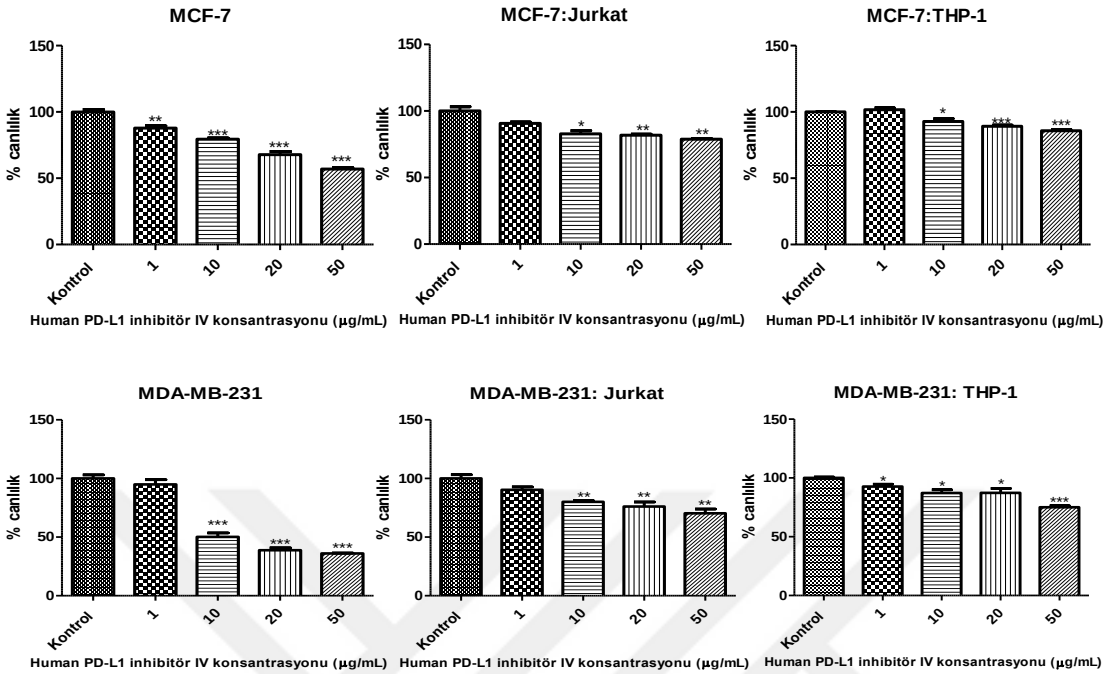
**b. MDA-MB-231 Hücrelerinde ve ko-kültür gruplarında BMS-1166 inhibitörü Mikroskop Görüntüleri**




**Şekil 4-12: MDA-MB-231 hücreleri, MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörünün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x)**

Şekilde kontrol hücreleri ile BMS-1166 inhibitörünün 10 µM ve 50 µM konsantrasyonlarına ait hücre mikroskop görüntüleri yer almaktadır (Şekil 4-12).

### 4.3.6. Hücrelerde Human PD-L1 inhibitör IV'ün Canlılık Analizi

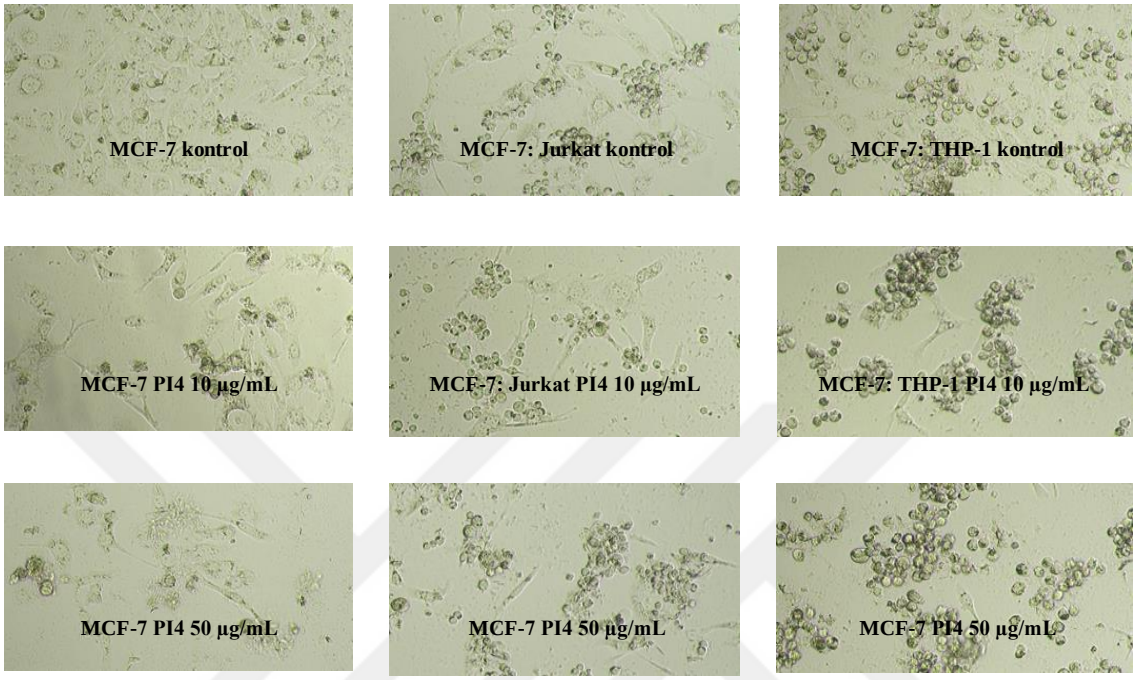



**Şekil 4-13: Human PD-L1 inhibitör IV'ün meme kanseri hücreleri ve ko-kültür gruplarında hücre canlılık grafikleri**

Human PD-L1 inhibitör IV'ün, meme kanseri hücrelerinde ve ko-kültür gruplarında, 1-50 µg/mL konsantrasyon aralığında 72 saat uygulanarak MTT testi ile hücre canlılığına etkileri belirlendi.

#### 4.3.6.1. Farklı Dozlarda Human PD-L1 inhibitör IV Uygulaması Mikroskop Hücre Görüntüleri

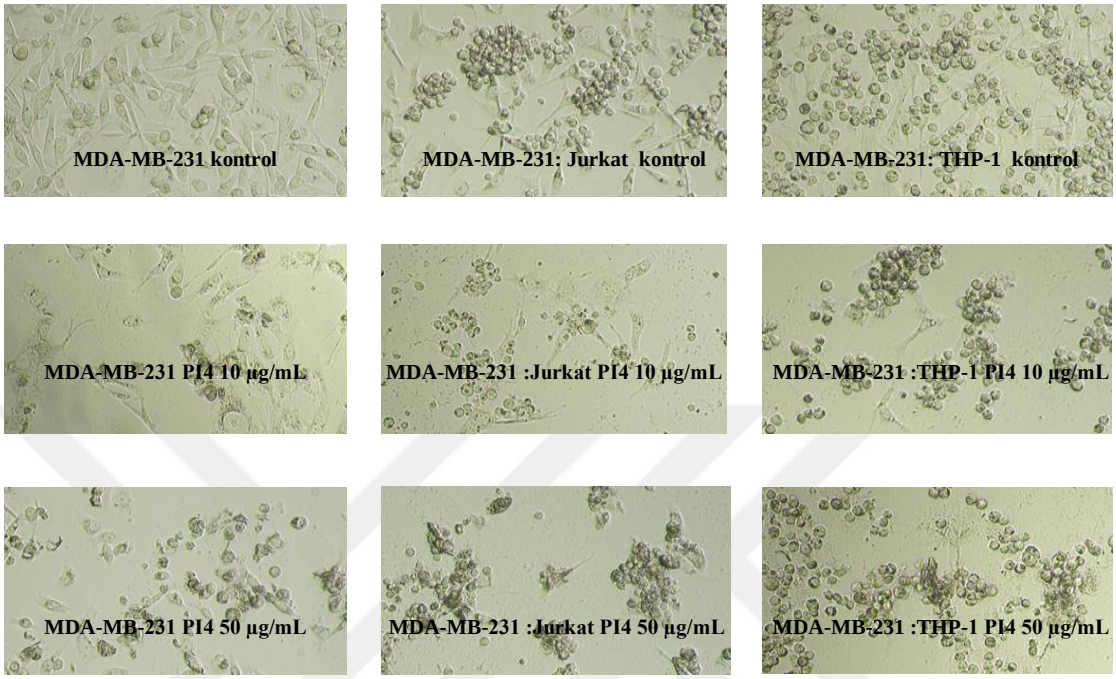
**a. MCF-7 Hücrelerinde Human PD-L1 inhibitör IV Mikroskop Görüntüleri**




**Şekil 4-14: MCF-7 hücreleri, MCF-7: Jurkat ko-kültürü ve MCF-7: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV'ün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x)**

Şekil 4-14'te kontrol hücreleri ve Human PD-L1 inhibitör IV'ün 10 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarına ait hücre mikroskop görüntüleri gösterildi. Bununla birlikte Human PD-L1 inhibitör IV, bazı hücre ve ko-kültür gruplarında % 50 canlılık değerinin altına inemediği için $IC_{50}$ değerleri hesaplanmadı. Sonraki denemelerde kullanılmak üzere uygulama konsantrasyonları, hücre görüntüleri dikkate alınarak belirlendi.

**b. MDA-MB-231 Hücrelerinde Human PD-L1 inhibitör IV Mikroskop Görüntüleri**



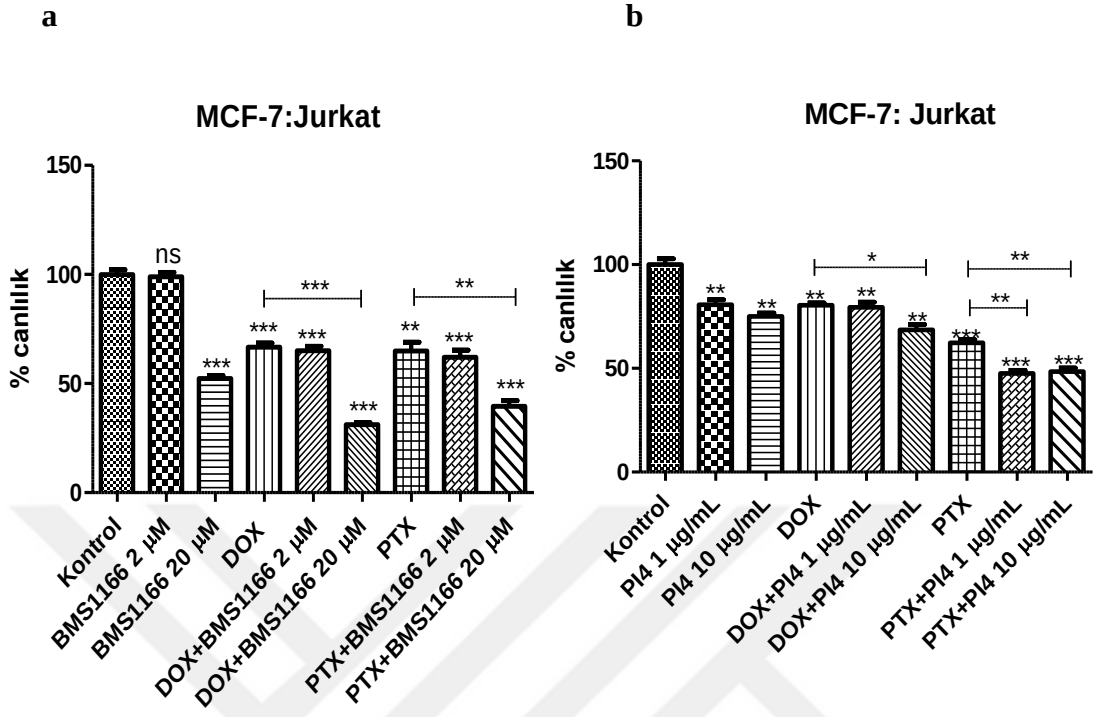

**Şekil 4-15: MDA-MB-231 hücreleri, MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV'ün hücre canlılıklarına etkisinin mikroskop görüntüleri (10x)**

Human PD-L1 inhibitör IV'ün 10 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarına ait hücre mikroskop görüntüleri gösterildi (Şekil 4-15).

### 4.3.7. PD-1/PD-L1 İnhibitörleri ve Kemoterapi İlaçlarının Birlikte Kullanımına ait Hücre Canlılık Analizleri

PHA-M ile 72 saat aktivasyonu sağlanmış Jurkat hücreleri, kültür ortamına ilave edilmiş 1 µg/mL rekombinant PD-1 proteini ve meme kanseri hücreleri ile oluşturulan ko-kültür modelinde, PD-1/PD-L1 blokajında yer alan BMS-1166 inhibitörü 2 µM ve 20 µM olarak ve Human PD-L1 inhibitör IV 1 µg/mL ve 10 µg/mL olarak deneye alındı. Dox ve PTX'in IC50 dozlarında uygulanması ile inhibitörün düşük ve yüksek dozlarının kombinasyonunda canlılık değişimleri değerlendirildi.

### 4.3.7.1. MCF-7: Jurkat Ko-kültürü Hücre canlılık analizleri



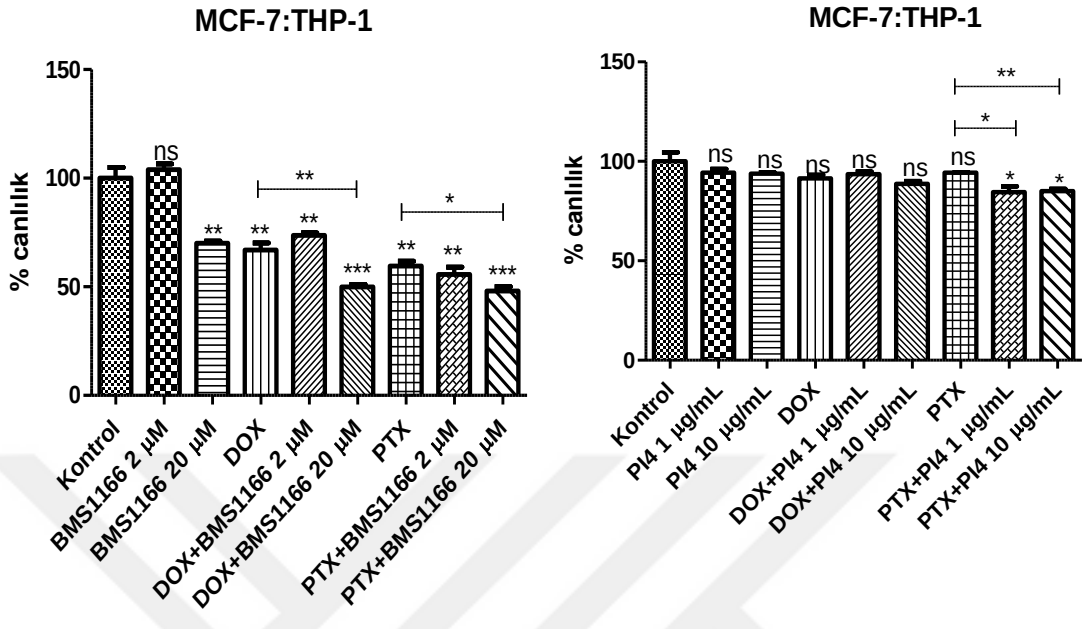

**Şekil 4-16: MCF-7: Jurkat ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri**

BMS-1166 (a) ve Human PD-L1 inhibitör IV (b) Her koşul en az 3 kez tekrarlanmıştır. $p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***, ns=*non-significant* (anlamlı değil).

Veriler doğrultusunda; hem BMS-1166 hem de Human PD-L1 inhibitör IV tek başına ve kombinasyon halinde Dox ve PTX uygulaması ile kontrole göre anlamlı olarak hücre canlılığında azalma tespit edildi. Sadece Dox ve sadece PTX uygulamasına kıyasla da hücre canlılığının istatistiksel olarak analizi yapıldı ve anlamlı olarak azalma saptandı. MCF-7: Jurkat ko-kültüründe BMS-1166 hücre canlılığını azaltmada, PI4'e göre daha etkili olduğu gösterildi (Şekil 4-16).

### 4.3.7.2. MCF-7: THP-1 Ko-kültürü Hücre Canlılık Analizleri

**a** **b**

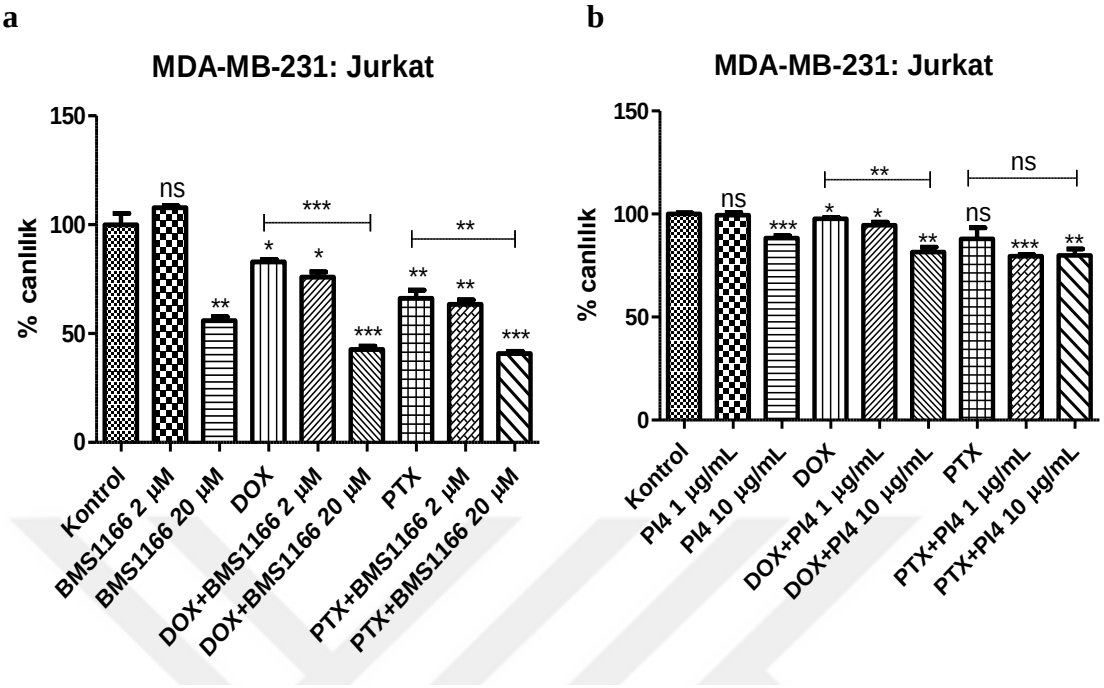



**Şekil 4-17: MCF-7: THP-1 ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri**

BMS-1166 (a) ve Human PD-L1 inhibitör IV (b) Her koşul en az 3 kez tekrarlanmıştır. $p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***, ns=*non-significant* (anlamlı değil).

MCF-7: THP-1 ko-kültürü grubunda BMS-1166 inhibitörünün sitotoksik olarak daha etkili olduğu görülmektedir. Hem Dox hem de PTX kombinasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi. Dox ve PTX uygulaması ile Human PD-L1 inhibitör IV'e ait sonuçlara bakıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalma olarak sadece PTX+ PI4 grubunda gözlendi (Şekil 4-17).

### 4.3.7.3. MDA-MB-231: Jurkat Ko-kültürü Hücre Canlılık Analizleri



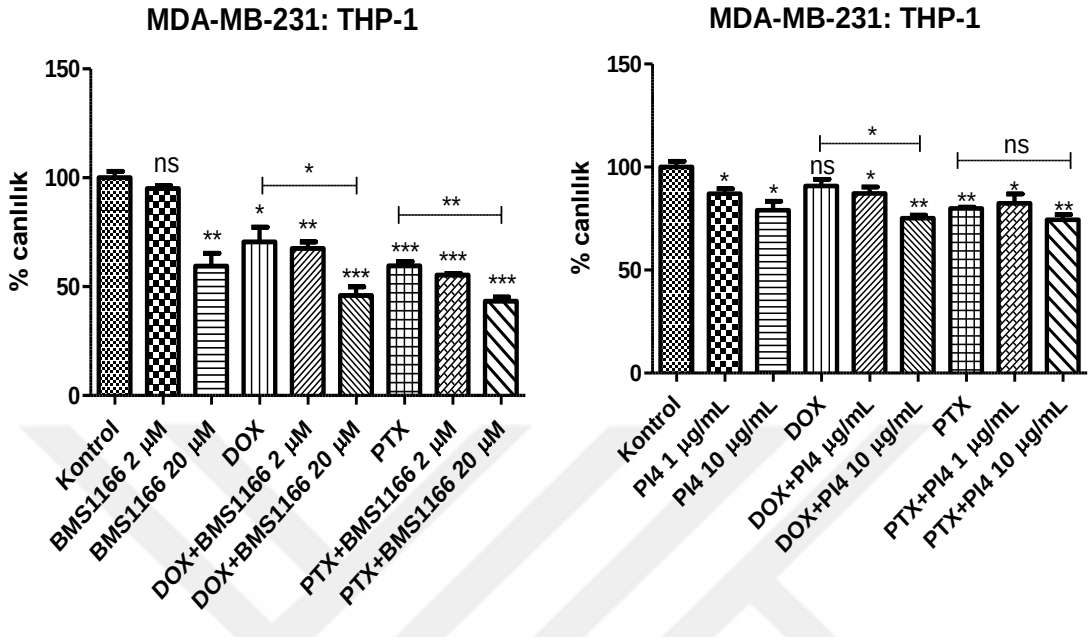

**Şekil 4-18: MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri**

BMS-1166 (a) ve Human PD-L1 inhibitör IV (b) Her koşul en az 3 kez tekrarlanmıştır. $p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***, ns=*non-significant* (anlamlı değil).

MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü grubunda BMS-1166 inhibitörü daha etkin bir şekilde hücre canlılığını azalttı. Hem Dox hem de PTX kombinasyonlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi. Dox ve PTX uygulaması ile Human PD-L1 inhibitör IV'e ait sonuçlara bakıldığında hücre canlılığında belirgin anlamlı bir azalma olarak sadece PTX+ PI4 grubunda gözlendi (Şekil 4-18).

### 4.3.7.4. MDA-MB-231: THP-1 Ko-kültürü Hücre Canlılık Analizleri

**a** **b**



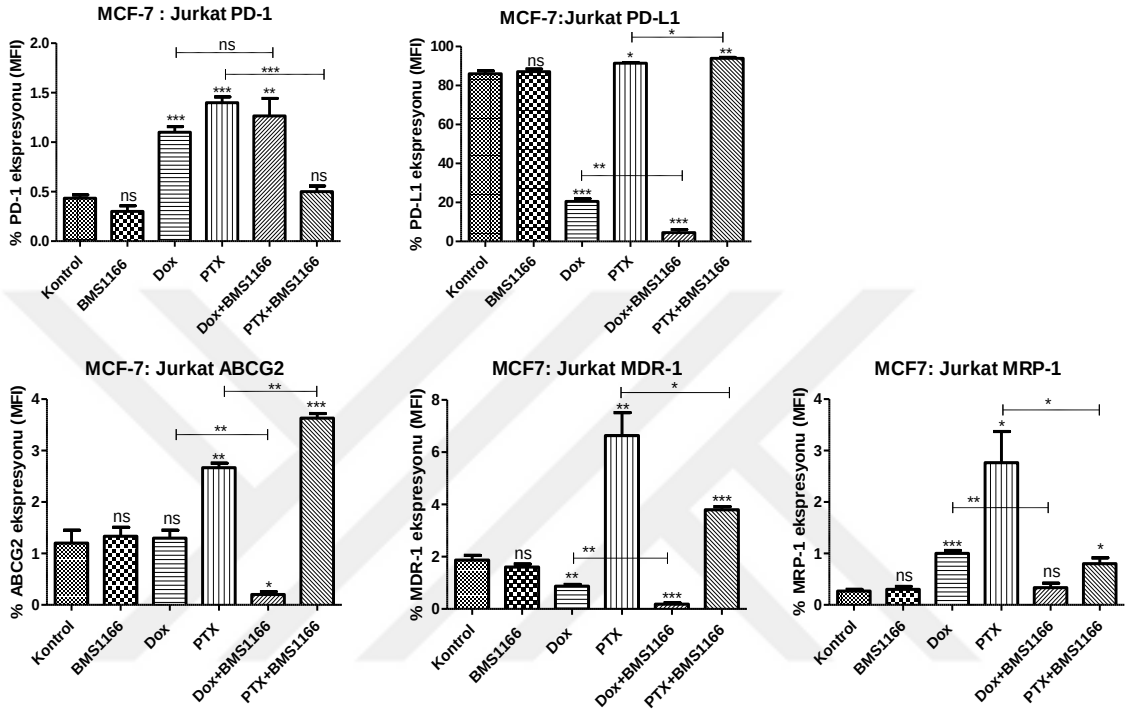

**Şekil 4-19: MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe PD-1/PD-L1 inhibitörleri ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonlarını içeren hücre canlılık analizleri**

BMS-1166 (a) ve Human PD-L1 inhibitör IV (b) Her koşul en az 3 kez tekrarlanmıştır. $p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***, ns=*non-significant* (anlamlı değil).

MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü grubunda yine BMS-1166 inhibitörünün daha etkin bir şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Hem DOX hem de PTX kombinasyonlarında hücre canlılığı anlamlı olarak azaldı. DOX ve PTX uygulaması ile Human PD-L1 inhibitör IV'e ait sonuçlara bakıldığında hücre canlılığında anlamlı olarak azalma belirlendi ancak canlılıktaki azalmanın %30'u aşmadığı tespit edildi.

## 4.4. Akım Sitometri ile Kemoterapi ilaçları ve PD1/PD-L1 inhibitörlerinin Uygulaması ile PD-1, PD-L1 ekspresyonları ve ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının Tayini

### 4.4.1. MCF-7: Jurkat ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-20: MCF-7: Jurkat ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**BMS-1166 uygulaması ile,** PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları ile ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ilaç direnci proteinlerinde kontrole göre kıyaslandığında herhangi anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4-20).

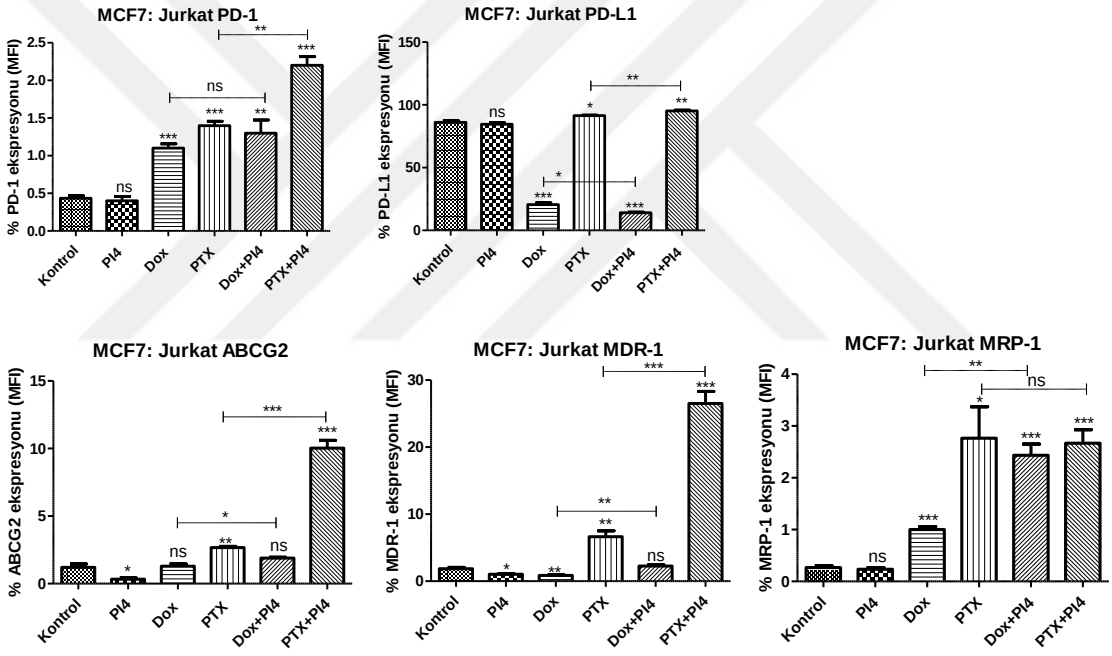
**Dox uygulaması ile,** PD-1 ve MRP-1 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı, PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı, ABCG2 ekspresyonu değişmediği belirlendi (Şekil 4-20).

**PTX uygulaması ile,** PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4-20).

**Dox+BMS-1166 uygulaması ile,** PD-1 ekspresyonunun arttığı, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 Dox uygulamasına ve kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-20).

**PTX+BMS-1166 uygulaması ile,** PD-1 ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit edilmedi ancak PTX e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre ve PTX'e göre arttığı gösterildi. ABCG2 ekspresyonunun da kontrole ve PTX'e göre arttığı belirlendi. MDR-1 ve MRP-1'in ekspresyonunun kontrole göre arttığı ancak PTX'e göre azaldığı saptandı (Şekil 4-20).

### 4.4.2. MCF-7: Jurkat ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-21: MCF-7: Jurkat ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile,** PD-1, PD-L1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre değişmediği ABCG2, MDR-1 ilaç direnci protein ekspresyonlarının kontrole göre kıyaslandığında anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 4-21).

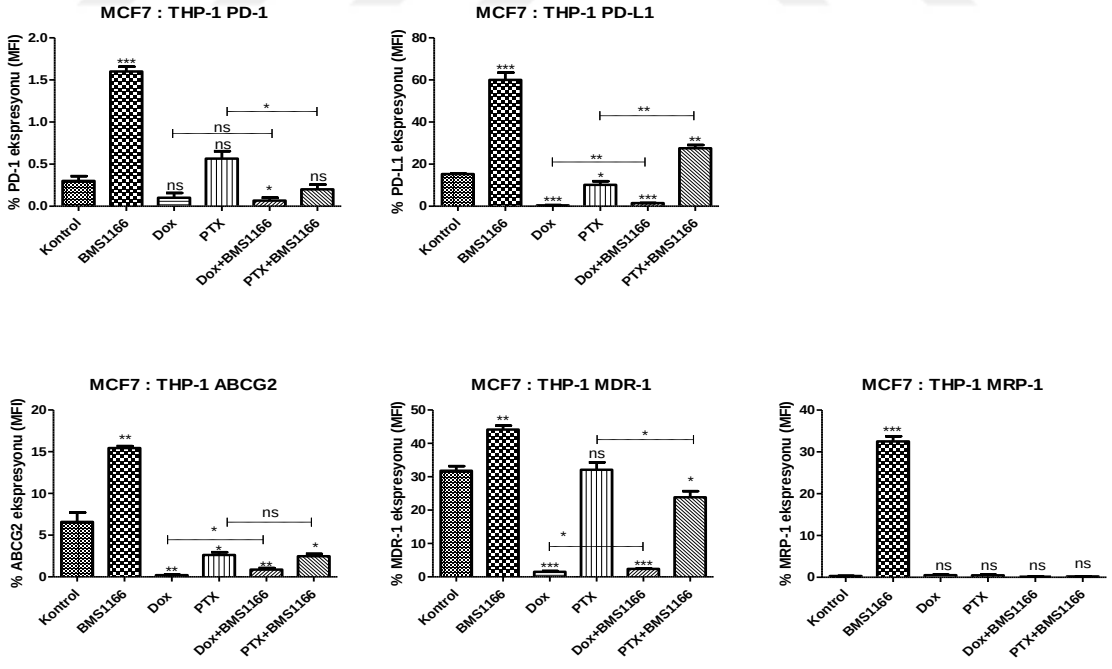
**Dox uygulaması ile,** PD-1 ve MRP-1 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı, PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı, ABCG2 ekspresyonu değişmediği belirlendi (Şekil 4-21).

**PTX uygulaması ile**, PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4-21).

**Dox+ Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun kontrole göre arttığı belirlenirken, Dox'a göre anlamlı bir değişim tespit edilmedi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole ve Dox'a göre azaldığı saptandı. ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarında anlamlı bir fark tespit edilmedi. MRP-1'in Dox uygulamasına ve kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4-21).

**PTX+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile,** PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre arttığı belirlendi. Ayrıca PD-1, PD-L1, ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarının PTX'e göre de arttığı ve MRP-1'in ise PTX'e göre anlamlı bir değişim göstermediği saptandı (Şekil 4-21).

### 4.4.3. MCF-7 THP-1 ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-22: MCF-7: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları ile ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ilaç direnci proteinlerinin ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi (Şekil 4-22).

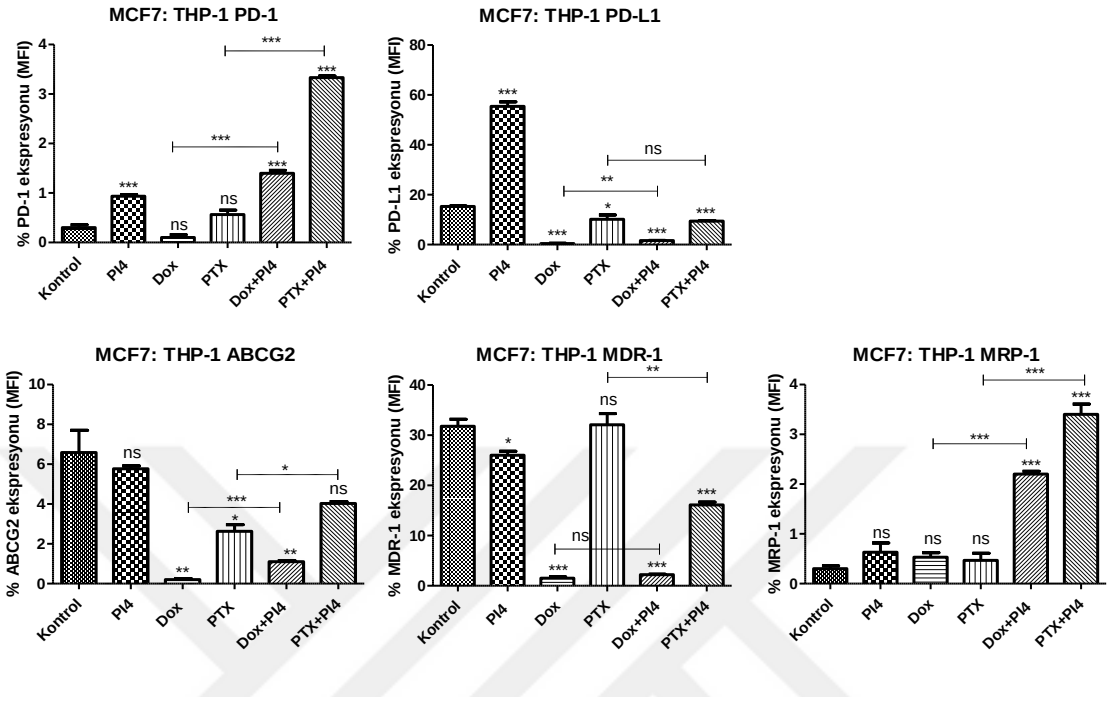
**Dox uygulaması ile**, PD-1 ve MRP-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği, PD-L1, ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarının anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-22).

**PTX uygulaması ile**, PD-1, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları kontrole göre anlamlı olarak bir değişim göstermedi. Bununla birlikte PD-L1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-22).

**Dox+BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı; PD-L1, ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı; Dox'a göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. MRP-1 ekspresyonunda ise anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4-22).

**PTX+BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit edilmedi ancak PTX e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre ve PTX'e göre arttığı gösterildi. ABCG2 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ancak PTX' e göre anlamlı bir fark tespit edilmedi. MDR-1 ekspresyonu kontrole göre ve PTX' e göre anlamlı olarak azaldı. MRP-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı bir fark göstermediği belirlendi (Şekil 4-22).

### 4.4.4. MCF-7 THP-1 ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-23: MCF-7: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1, PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre arttığı belirlenirken, ABCG2 ve MRP-1 ekspresyonlarında kontrole göre herhangi bir anlamlı fark tespit edilmedi (Şekil 4-23).

**Dox uygulaması ile**, PD-1 ve MRP-1 ekspresyonunun anlamlı bir değişimin olmadığı, PD-L1, ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-23).

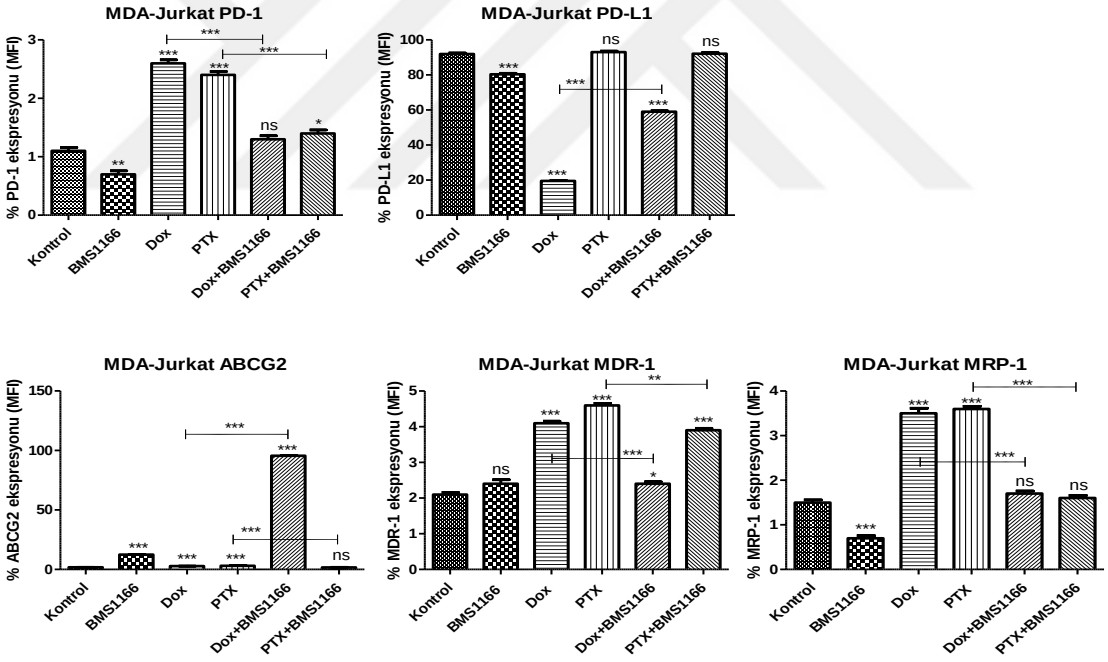
**PTX uygulaması ile,** PD-1, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği, PD-L1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi(Şekil 4-23).

**Dox+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun kontrole ve Dox'a göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. PD-L1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, Dox'a göre anlamlı olarak arttığı saptandı. MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı

belirlendi ve Dox'a göre anlamlı bir fark tespit edilmedi. MRP-1 ekspresyonunun kontrole ve Dox'a göre anlamlı olarak arttığı belirlendi(Şekil 4-23).

**PTX+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun kontrole ve PTX'e göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ve PTX'e göre anlamlı bir fark bulunmadı. ABCG2 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, PTX'e göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. MDR-1 ekspresyonunun hem kontrole hem de PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. MRP-1 ekspresyonunun da kontrole ve PTX'e göre anlamlı olarak arttığı belirlendi(Şekil 4-23).

### 4.4.5. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-24: MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1, PD-L1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. ABCG2 ekspresyonunda anlamlı artış görülürken, MDR-1 ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmedi (Şekil 4-24).

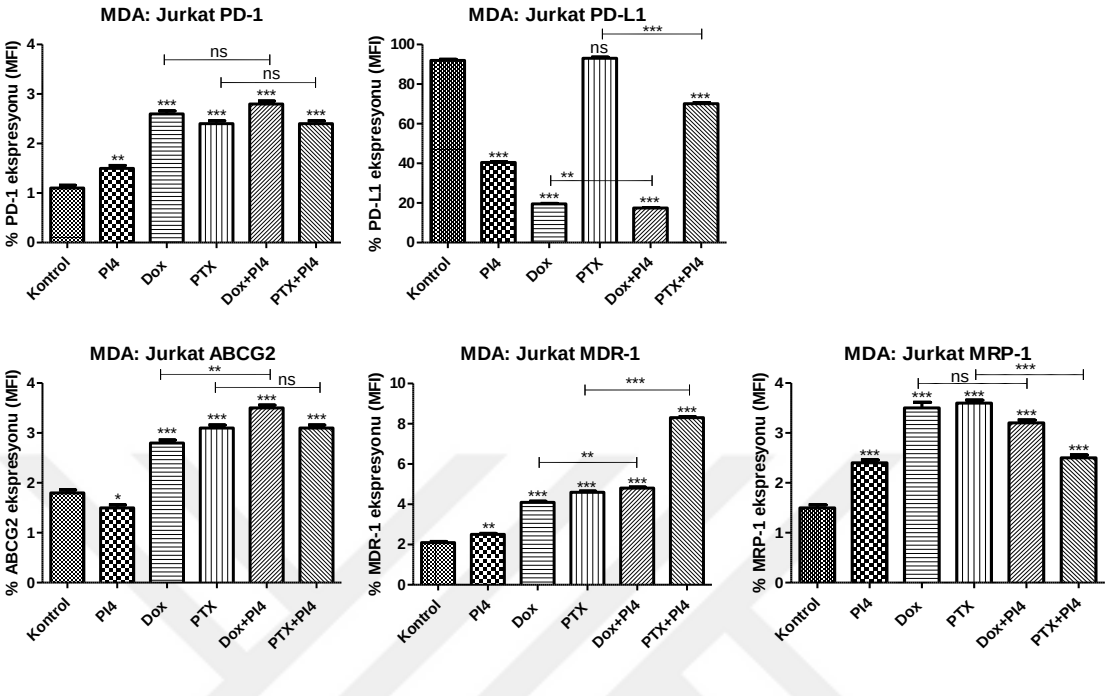
**Dox uygulaması ile**, PD-1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarında kontrole göre anlamlı bir artış belirlenirken, PD-L1 ekspresyonunda ise bu durumun aksine kontrole göre anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 4-24).

**PTX uygulaması ile**, PD-1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlendi ve PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre herhangi bir değişim göstermediği tespit edildi (Şekil 4-24).

**Dox+BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak değişmediği, Dox'a göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, Dox'a göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi. ABCG2 ekspresyonunun kontrole ve Dox'a göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. MDR-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak arttığı, Dox' a göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. MRP-1 ekspresyonunun da kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği ancak Dox'a göre azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4-24).

**PTX+BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak arttığı, PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. PD-L1 ekspresyonunda kontrole ve PTX'e göre anlamlı bir değişim gözlenmedi. ABCG2 ekspresyonunun kontrole göre herhangi bir fark gözlenmezken, PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. MDR-1 ekspresyonu kontrole göre anlamlı olarak artış gösterdiği ve PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. MRP-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı bir fark göstermediği saptandı ancak PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4-24).

### 4.4.6. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-25: MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile,** PD-1, MDR-1, MRP-1 ekspresyonları artarken, PD-L1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre azaldığı belirlendi (Şekil 4-25).

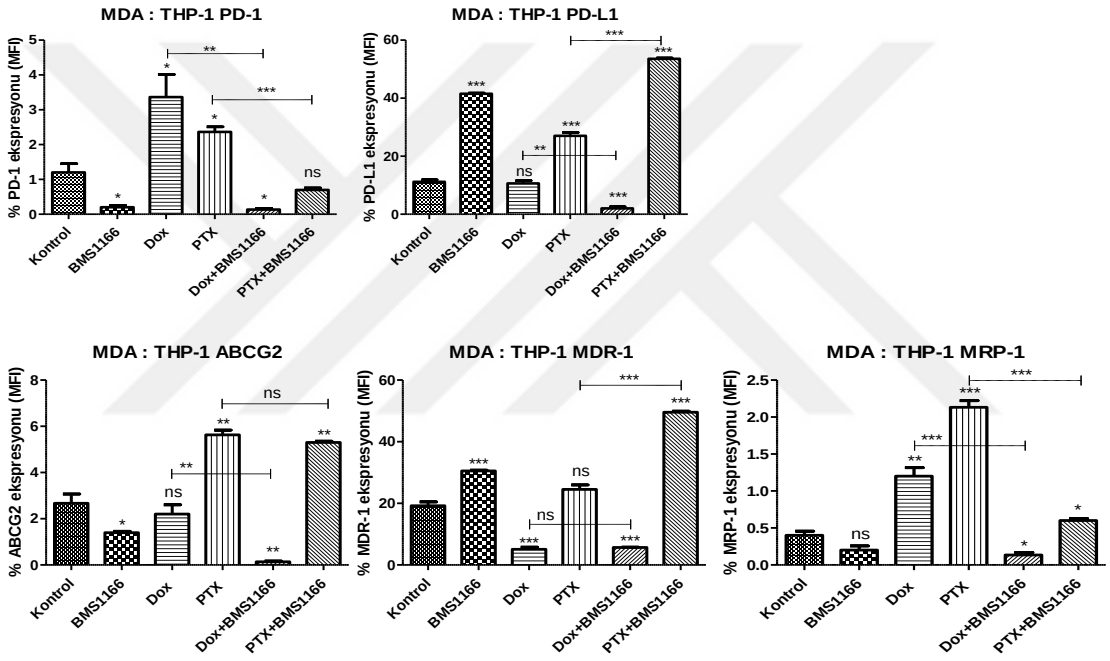
**Dox uygulaması ile,** PD-1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları artarken, PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-25).

**PTX uygulaması ile,** PD-1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı arttığı, PD-L1 ekspresyonunda anlamlı bir değişim olmadığı tespit edildi (Şekil 4-25).

**Dox+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile,** PD-1 ekspresyonunun kontrole göre arttığı ve Dox'a göre anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun hem kontrole göre hem de Dox'a göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonunun hem kontrole göre hem de Dox'a göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi. MRP-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlendi ve Dox'a göre anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4-25).

**PTX+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile,** PD-1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı ve PTX'e göre anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole ve PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. MDR-1 ekspresyonunun hem kontrole hem de PTX'e göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi. MRP-1 ekspresyonunun da kontrole göre arttığı ve PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-25).

### 4.4.7. MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü BMS-1166 inhibitörü Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-26: MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe BMS-1166 inhibitörü ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı, MRP-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi (Şekil 4-26).

**Dox uygulaması ile,** PD-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı, PD-L1 ve ABCG2 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı bir değişim

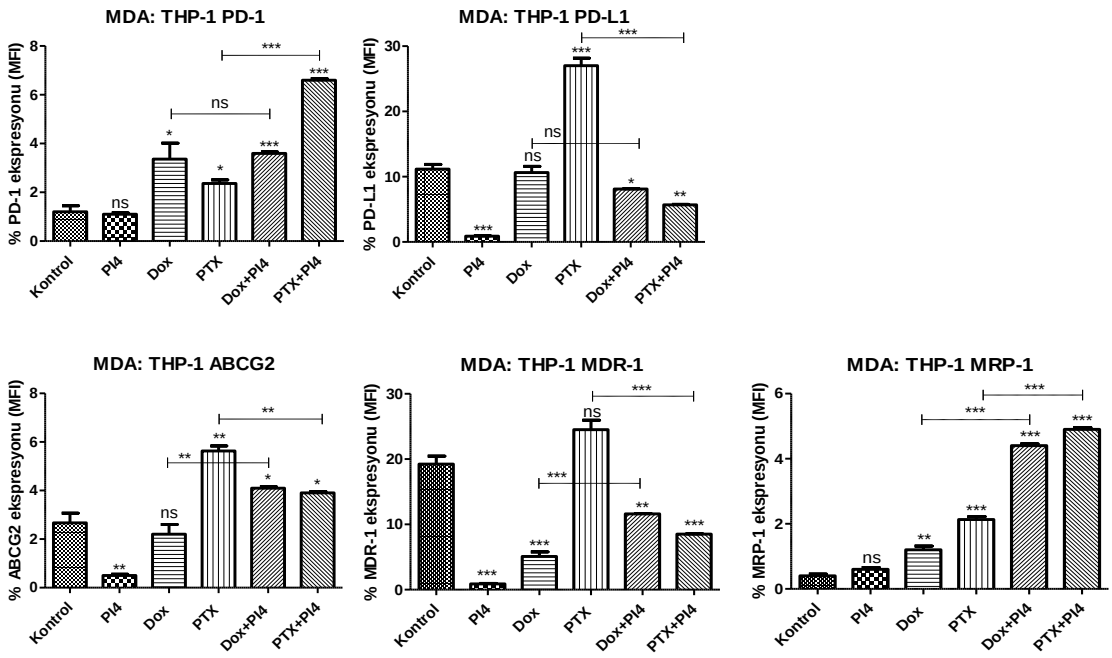
göstermediği, bununla birlikte MDR-1 ekspresyonun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-26).

**PTX uygulaması ile**, PD-1, PD-L1, ABCG2 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı, MDR-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği tespit edildi (Şekil 4-26).

**Dox+BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1, PD-L1, ABCG2 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre ve Dox'a göre anlamlı olarak azaldığı, MDR-1 ekspresyonunun ise kontrole göre azaldığı ancak Dox'a göre anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi (Şekil 4-26).

**PTX+BMS-1166 uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit edilmedi ancak PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole ve PTX'e göre arttığı gösterildi. ABCG2 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlendi ancak PTX' e göre anlamlı bir fark tespit edilmedi. MRP-1 ekspresyonunun kontrole göre arttığı, PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı saptandı (Şekil 4-26).

### 4.4.8. MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü Human PD-L1 inhibitör IV Akım Sitometri Analizi




**Şekil 4-27: MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe Human PD-L1 inhibitör IV ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları ile akım sitometrik olarak belirlenen PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonları**

**Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği, PD-L1, ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-27).

**Dox uygulaması ile**, PD-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı, PD-L1 ve ABCG2 ekspresyonlarında kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmediği, MDR-1 ekspresyonunun ise, kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-27).

**PTX uygulaması ile,** PD-1, PD-L1, ABCG2 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre arttığı ve MDR-1 ekspresyonunda ise kontrole göre anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 4-27).

**Dox+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak arttığı, Dox'a göre anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi. PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azaldığı ancak Dox'a göre anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi. ABCG2 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole göre ve Dox'a göre anlamlı olarak arttığı saptandı. MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı ve Dox'a göre anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4-27).

**PTX+Human PD-L1 inhibitör IV uygulaması ile**, PD-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının kontrole ve PTX'e göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonlarının kontrole göre ve PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. ABCG2 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak arttığı, PTX'e göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-27).

**Tablo 4-4: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında PD-1 ekspresyon değişimi**

| **PD-1 ekspresyonu** | **MCF7: Jurkat** | **MCF-7: THP-1** | **MDA-MB-231: Jurkat** | **MDA-MB-231: THP-1** |
|---|---|---|---|---|
| **BMS-1166** | Değişim yok p=0,1161(ns) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0080 (**) | Azalma p=0,0179 (*) |
| **Dox** | Artış p=0,0006 (***) | Değişim yok p=0,0705 (ns) | Artış p< 0,0001(***) | Artış p=0,0358 (*) |
| **Dox+ BMS-1166** | Artış p=0,0097(**) | Azalma p=0,0249 (*) | Değişim yok p=0,0705 | Azalma p=0,0137(*) |
| **Dox+ BMS-1166** (Dox'a göre) | Değişim yok p=0,4199(ns) | Değişim yok p=0,6433(ns) | Azalma p< 0,0001(***) | Azalma p=0,0076(**) |
| **PTX** | Artış p=0,0001(***) | Değişim yok p=0,0647 (ns) | Artış p< 0,0001(***) | Artış p=0,0159 (*) |
| **PTX+ BMS-1166** | Değişim yok p= 0,3739(ns) | Değişim yok p=0,2879 (ns) | Artış p=0,0213 | Değişim yok p=0,1249 (ns) |
| **PTX+ BMS-1166** (PTX'e göre) | Azalma p=0,0004 (***) | Azalma p=0,0254 (*) | Azalma p=0,0003(***) | Azalma p=0,0004(***) |
| **PI4** | Değişim yok p=0,6433(ns) | Artış p=0,0007 (***) | Artış p=0,0080(**) | Değişim yok p=0,7183 |
| **Dox+PI4** | Artış p=0,0080 (**) | Artış p=0,0002(***) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p=0,0007(***) |
| **Dox+ PI4** (Dox'a göre) | Değişim yok p=0,3349 (ns) | Artış p< 0,0001(***) | Değişim yok p=0,0705(ns) | Değişim yok p=0,7383 (ns) |
| **PTX+PI4** | Artış p=0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p< 0,0001(***) | Artış p< 0,0001(***) |
| **PTX+ PI4** (PTX'e göre) | Artış p=0,0034 (**) | Artış p< 0,0001 (***) | Değişim yok p=1,0000 (ns) | Artış p< 0,0001(***) |

**Tablo 4-5: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında PD-L1 ekspresyon değişimi**

| PD-L1 ekspresyonu | MCF7: Jurkat | MCF-7: THP-1 | MDA-MB-231: Jurkat | MDA-MB-231: THP-1 |
|---|---|---|---|---|
| **BMS-1166** | Değişim yok p=0,6079 (ns) | Artış p=0,0002 (***) | Azalma p=0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **Dox** | Azalma p< 0,0001(***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Değişim yok p=0,6786 (ns) |
| **Dox+ BMS-1166** | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0006 (***) |
| **Dox+ BMS-1166** (Dox'a göre) | Azalma p=0,0017(**) | Artış p=0,0024 (**) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0015 (**) |
| **PTX** | Artış p=0,0254(*) | Azalma p=0,0431 (*) | Değişim yok p=0,2621 (ns) | Artış p=0,0003 (***) |
| **PTX+ BMS-1166** | Artış p= 0,0082 (**) | Artış p=0,0013 (**) | Değişim yok p=0,8792 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PTX+ BMS-1166** (PTX'e göre) | Artış p=0,0144 (*) | Artış p=0,0016 (**) | Değişim yok | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PI4** | Değişim yok p=0,4884 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001(***) | Azalma p=0,0001 (***) |
| **Dox+PI4** | Azalma p< 0,0001(***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0136 (*) |
| **Dox+PI4** (Dox'a göre) | Azalma p=0,0130(*) | Artış p=0,0033 (**) | Azalma p=0,0075 (**) | Değişim yok p=0,0562 (ns) |
| **PTX+PI4** | Artış p=0,0051(**) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0017 (**) |
| **PTX+PI4** (PTX'e göre) | Artış p=0,0054(**) | Değişim yok p=0,6832 (ns) | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) |

**Tablo 4-6: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında ABCG2 ekspresyon değişimi**

| ABCG2 ekspresyonu | MCF7: Jurkat | MCF-7: THP-1 | MDA-MB-231: Jurkat | MDA-MB-231: THP-1 |
|---|---|---|---|---|
| **BMS-1166** | Değişim yok p=0,6868 (ns) | Artış p=0,0015 (**) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0365 (*) |
| **Dox** | Değişim yok p= 0,7512 (ns) | Azalma p=0,0047 (**) | Artış p=0,0003 (***) | Değişim yok p=0,4608 (ns) |
| **Dox+ BMS-1166** | Azalma p=0,0179(*) | Azalma p= 0,0073 (**) | Artış p < 0,0001(***) | Azalma p=0,0034 (**) |
| **Dox+ BMS-1166** (Dox'a göre) | Azalma p=0,0025 (**) | Artış p= 0,0265 (*) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0070 (**) |
| **PTX** | Artış p=0,0053 (**) | Azalma p=0,0278 (*) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p=0,0028 (**) |
| **PTX+ BMS-1166** | Artış p=0,0008 (***) | Azalma p=0,0237 (*) | Değişim yok p=0,2879 (ns) | Artış p=0,0030 (**) |
| **PTX+ BMS-1166** (PTX'e göre) | Artış p=0,0015 (**) | Değişim yok p=0,7232 (ns) | Azalma p< 0,0001 (***) | Değişim yok p=0,1890 (ns) |
| **PI4** | Azalma p=0,0314 (*) | Değişim yok p=0,5100 (ns) | Artış p=0,0213 (*) | Azalma p=0,0061 (**) |
| **Dox+PI4** | Değişim yok p=0,0535 (ns) | Azalma p=0,0081 (**) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p=0,0249 (*) |
| **Dox+PI4** (Dox'a göre) | Artış p=0,0213 (*) | Artış p=0,0004 (***) | Değişim yok p=0,0010 (**) | Artış p=0,0096 (**) |
| **PTX+PI4** | Artış p=0,0002 (***) | Değişim yok p=0,0004 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p=0,0395 (*) |
| **PTX+PI4** (PTX'e göre) | Artış p=0,0002 (***) | Artış p=0,0146 (*) | Değişim yok p=1,0000 (ns) | Azalma p=0,0012 (**) |

**Tablo 4-7: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında MDR-1 ekspresyon değişimi**

| **MDR-1 ekspresyonu** | **MCF7: Jurkat** | **MCF-7: THP-1** | **MDA-MB-231: Jurkat** | **MDA-MB-231: THP-1** |
|---|---|---|---|---|
| **BMS-1166** | Değişim yok p=0,2895 (ns) | Artış p=0,0024 (**) | Değişim yok p=0,0808 (ns) | Artış p=0,0008 (***) |
| **Dox** | Azalma p= 0,0071 (**) | Azalma p< 0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0005 (***) |
| **Dox+ BMS-1166** | Azalma p=0,0009 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) | Artış p=0,0213 (***) | Azalma p=0,0004 (***) |
| **Dox+ BMS-1166** (Dox'a göre) | Azalma p=0,0010 (**) | Artış p=0,0444 (*) | Azalma p< 0,0001 (***) | Değişim yok p=0,4368 (ns) |
| **PTX** | Artış p=0,0061 (**) | Değişim yok p=0,9144 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) | Değişim yok p=0,0503 (ns) |
| **PTX+ BMS-1166** | Artış p= 0,0009 (***) | Azalma p=0,0258(*) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PTX+ BMS-1166** (PTX'e göre) | Azalma p=0,0334 (*) | Değişim yok p=0,0457 (ns) | Azalma p=0,0010 (**) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PI4** | Azalma p=0,0154 (*) | Azalma p=0,0226 (*) | Artış p=0,0080 (**) | Azalma p= 0,0001 (***) |
| **Dox+PI4** | Değişim yok p=0,1933 (ns) | Azalma p=0,0081 (***) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p= 0,0033 (**) |
| **Dox+PI4** (Dox'a göre) | Artış p=0,0018 (**) | Değişim yok p=0,0875 (ns) | Değişim yok p=0,0010 (**) | Artış p=0,0007 (***) |
| **PTX+PI4** | Artış p=0,0002 (***) | Azalma p=0,0004 (***) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0009 (***) |
| **PTX+PI4** (PTX'e göre) | Artış p=0,0006 (***) | Azalma p=0,0022 (**) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p=0,0004 (***) |

**Tablo 4-8: MCF-7:Jurkat, MCF-7: THP-1, MDA-MB-231: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında MRP-1 ekspresyon değişimi**

| MRP-1 ekspresyonu | MCF7: Jurkat | MCF-7: THP-1 | MDA-MB-231: Jurkat | MDA-MB-231: THP-1 |
|---|---|---|---|---|
| **BMS-1166** | Değişim yok p=0,6433 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) | Azalma p= 0,0006 (***) | Değişim yok p=0,0705 (ns) |
| **Dox** | Artış p= 0,0004 (***) | Değişim yok p= 0,0913 (ns) | Artış p=0,0001 (***) | Artış p=0,0034 (**) |
| **Dox+ BMS-1166** | Değişim yok p=0,5185 (ns) | Değişim yok p=0,0668 (ns) | Değişim yok p= 0,0705 (ns) | Azalma p=0,0161 (*) |
| **Dox+ BMS-1166** (Dox'a göre) | Azalma p=0,0032 (**) | Değişim yok | Azalma p=0,0002 (***) | Azalma p=0,0009 (***) |
| **PTX** | Artış p=0,0147 (*) | Değişim yok p=0,3465 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PTX+ BMS-1166** | Artış p=0,0114 (*) | Değişim yok p=0,2879 (ns) | Değişim yok p=0,2879 (ns) | Artış p=0,0363 (*) |
| **PTX+ BMS-1166** (PTX'e göre) | Azalma p=0,0334 (*) | Değişim yok | Azalma p< 0,0001 (***) | Azalma p< 0,0001 (***) |
| **PI4** | Değişim yok p=0,5185 (*) | Değişim yok p=0,1615 (ns) | Artış p=0,0004 (***) | Değişim yok p=0,0705 (ns) |
| **Dox+PI4** | Artış p=0,0006 (***) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **Dox+PI4** (Dox'a göre) | Artış p=0,0032 (**) | Artış p< 0,0001 (***) | Değişim yok p= 0,0808 (ns) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PTX+PI4** | Artış p=0,0008 (***) | Artış p=0,0001 (***) | Artış p=0,0003 (***) | Artış p< 0,0001 (***) |
| **PTX+PI4** (PTX'e göre) | Değişim yok p=0,8869 (ns) | Artış p=0,0003(***) | Azalma p=0,0002 (***) | Artış p< 0,0001 (***) |

Karşılaştırmalar öncelikli olarak kontrole göre yapılmakla birlikte; inhibitörler ile kemoterapi ilaçlarının kombinasyon uygulamaları ayrıca Dox ve PTX ilaçlarına göre de karşılaştırılmış ve tabloda ayrı bir satırda belirtilmiştir İstatistiksel olarak anlamlılıklar *:p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001 olarak verilmiştir. Tabloda yer alan yeşil renk artışı, kırmızı renk azalmayı ifade etmektedir.

# 5. TARTIŞMA

Meme kanseri tedavisinde geleneksel tedavilerin yanı sıra günümüzde immünoterapi uygulamaları da sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte araştırmacıların klinik tedaviye geçmeden önce yapılan *in vitro* moleküler çalışmalar büyük önem taşımaktadır. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarının kanseri taklit edebilmesi için birçok farklı bakış açısından yararlanılmaktadır. Çalışmamızda meme kanserinin immün alt yapısını kullanarak monosit ve lenfosit hücreleriyle birlikte oluşturulan *in vitro* meme kanseri modelimizde kemoterapi ve immünoterapi odaklı uygulamaların PD-1 ve PD-L1 molekülleri ve ilaç direnci arasındaki ilişki incelendi. Oluşturulan in vitro ko-kültür modeli, daha çok ileri evre kanserdeki hücre popülasyonunun dikkate alındığı, hücre sayılarının immün hücre: kanser hücresi (5:1) oranına sahip olduğu ve immün sistemin görece yetersiz olduğu bir model olarak tasarlandı.

Genel hatlarıyla, hem PD-1 proteininin hem de ligandı PD-L1'in işlev bozukluğu ile T hücrelerinin kanser hücrelerine karşı fonksiyonunu bozmakta ve immün sistemin zayıflaması ile kanser hücrelerinin büyümesi için bir fırsat sağlanmaktadır (Sabatier et al., 2015). TNMK'lerin büyük çoğunluğunda, HER2-pozitif ve yüksek riskli luminal tümörler için genellikle kemoterapi önerilmektedir (Hassan, Ansari, Spooner, & Hussain, 2010).

Çalışmamızda meme kanseri hücre hatlarında kemoterapi ilaçlarından Dox ve PTX kullanılmıştır. Yapılan canlılık analizlerine göre, MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saatte Dox'un $IC_{50}$ değerinin 0,22 µM ve PTX'in ise 0,1 µM olduğu belirlendi (Şekil 4-6), (Şekil 4-7). Aynı zamanda ko-kültür gruplarındaki canlılık analizi verilerine göre Dox'un $IC_{50}$ değerinin Jurkat ile olan ko-kültürde 0,2 µM ile değişmediği, THP-1 ile olan ko-kültürde 0,3 µM değeri ile kısmi bir artışın meydana geldiği gösterildi (Şekil 4-8). MDA-MB-231 hücre hattının Jurkat ve THP-1 olan ko-kültür gruplarının her ikisinde de PTX'in 0,6 µM $IC_{50}$ değerine sahip olduğu belirlendi. Bu şekilde MDA-MB-231 hücreleri ile oluşturulan ko-kültür gruplarında Dox uygulaması ile $IC_{50}$ değerlerinin değişmediği, PTX uygulaması ile $IC_{50}$ değerlerinin arttığı (0,1→0,6 µM) tespit edildi. MCF-7 hücrelerinin ko-kültür gruplarına kıyasla Dox uygulaması ile belirgin bir fark gözlenmezken (0,15→0,2 µM), PTX uygulaması ile 2 kat gibi bir $IC_{50}$ değeri artışı MCF-7: Jurkat ko-kültüründe (0,85→1,98 µM); MCF-7: THP-1 ko-

kültüründe (0,85→1,61 µM) belirlendi (Şekil 4-9) (Tablo 4-3). Buna göre, MCF-7 hücreleri ve immün hücrelerle olan ko-kültür gruplarında artan $IC_{50}$ değerleri göz önüne alındığında PTX uygulamasının direnç oluşturma potansiyeli bulunmaktadır. Benzer durum MDA-MB-231 hücreleri için hem Jurkat hem de THP-1 ile olan ko-kültür gruplarında geçerlidir (Şekil 4-9) (Tablo 4-3).

Yapılan bir çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatte Dox'un $IC_{50}$ değerinin 0,38 µM ve PTX'in ise 2,08 µM olduğu gösterilmektedir. Aynı zamanda yine MDA-MB-231 hücrelerinde hem Dox uygulaması ile hem de PTX uygulaması ile PD-L1 gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğu bildirilmektedir (Majidi et al., 2021). Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 hücre hattında, Dox için $IC_{50}$ değeri 0,22 µM konsantrasyonunda 72 saat olarak Majidi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarına benzer seviyede bir $IC_{50}$ değeri tespit edilirken, bunun yanı sıra farklı olarak PTX için 0,1 µM ile daha düşük bir $IC_{50}$ değeri hesaplanmıştır.

Meme kanseri ve immün hücre birlikteliğine ilişkin hem tümör mikroçevresi hem de immünoterapi çalışmalarına preklinik veri sağlaması açısından oluşturduğumuz modelde öncelikle PHA-M ile T hücre aktivasyonu sağlandı. Hem sitotoksik olarak hem de mikroskop görüntüleri ile hücre morfolojisinin değişimini incelediğimiz Jurkat hücrelerinde PHA-M için optimum doz ve süre; 10 µg/mL ve 72 saat olarak belirlendi (Şekil 4-4). Ayrıca inhibitörlerin olası fonksiyonlarını arttırabilmesi ve aynı zamanda tümör hücrelerinde bulunan PD-L1 ekspresyonunun inhibisyonuna katkı sunabilmesi açısından ortama rekombinant PD-1 proteini eklendi. Burada özellikle Jurkat hücrelerindeki PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının akım sitometrik olarak yüzde artış oranları da tespit edildi (Tablo 4-1). Çalışmamıza benzer olarak HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı ve Jurkat hücreleri ile ko-kültür yapılan bir çalışmada; T hücre aktivasyonu için PHA mitojeni kullanılmış olup optimum Jurkat aktivasyonunun PHA ile 2 µg/mL dozunda ve 48 saat süre ile olduğu gösterilmektedir (Z. Li et al., 2020).

Yapılan çalışmalar ve klinik veriler doğrultusunda, PD-L1'in artan ekspresyonunun, kanser türlerinin çoğunda kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde, yüksek PD-L1 ekspresyonunun, PD-1/PD-L1 inhibisyon tedavisine olumlu bir prognostik yanıta sahip olma potansiyeli taşıdığı bildirilmektedir (X. Liu et al., 2020). Aynı zamanda meme kanserinde diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında TNMK'de

yüksek TIL yoğunluğu ile yüksek PD-L1 ekspresyonları bildirilmektedir. TNMK'de tespit edilen yüksek mutasyon oranlarının PD-L1 ekspresyonu ya da immün hücrelerin tümör infiltrasyonuna ne derece katkıda bulunduğu halen bilinmemektedir. Ancak burada temel olarak araştırmalarda CD8 ekspresyonu ve TIL yoğunluğuna odaklanılmaktadır. Intratümöral alanda ve tümör mikroçevresinde yer alan immün hücreler ve bu hücreler arasındaki etkileşimler tümör gelişiminde büyük öneme sahiptir. Biz çalışmamızda farklı olarak $CD4^+$ Jurkat hücreleri ile monositik karakterde THP-1 hücreleri ile meme kanseri hücreleri için immün hücrelerle bir mikroçevre oluşturmayı hedefledik.

Yapılan bir çalışmada; TNMK hücrelerinde, qRT-PCR ve western blot analizlerinin sonuçları, PD-L1-siRNA transfeksiyonu ile, PD-L1'in mRNA ve protein ekspresyonunu önemli ölçüde azaltabildiği gösterilmektedir. Ayrıca PD-L1-siRNA uygulamasının TNMK hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabildiği, TNMK'de PD-L1 ekspresyon artışı ile de TNMK hücrelerinin çoğalmasında temel bir role sahip olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada uygulamanın T hücre fonksiyonunu iyileştirebildiği, $T_{reg}$ gelişiminin baskılandığı ve tümör mikroçevresinin immünsüpresif özelliğini ortadan kaldırabildiği gösterilmektedir. Bu nedenle, PD-L1-siRNA temelli tedavinin, PD-1/PD-L1 eksenini hedeflemek için yeni bir terapötik yöntem olabileceği öngörülmektedir. Sonuçların, IL-2, IFN-γ, TNF-α'da önemli bir artışa ve IL-10 ve TGF-β sitokin gen ekspresyonunda önemli bir azalmaya işaret ettiği bildirilmektedir. PD-L1-siRNA ile susturulmuş meme kanseri hücreleri ile ko-kültürü yapılan T hücrelerinde, yardımcı T hücrelerinin çoğalmasında önemli bir sitokin olan ve kanser önleyici ajan olarak kullanılan IL-2 gen ekspresyonunda artışın meydana geldiği görülmektedir (Lotfinejad et al., 2021). PD-L1 ekspresyonunun azaltılması yönünde ele alınan farklı çalışmalarla bu konuya ait çok sayıda hücresel mekanizmanın aydınlatılması için uğraş verilmektedir.

Literatürde kemoterapi ve PD-1/PD-L1 bağlantısının incelendiği birçok çalışma yer almaktadır. Bailey ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Dox, Etoposit, Busulfan gibi kemoterapi ilaçlarının, PD-L1 gen ekspresyonunu arttırabildiği gösterilmektedir (Bailly, Thuru, & Quesnel, 2020). PTX, Etoposit ve 5-Fluorourasil uygulaması ile MDA-MB-468, MDA-MB-435, MCF-7 hücre hatlarında PD-L1 protein ekspresyonlarının incelendiği başka bir çalışmada üç hücre hattında da ekspresyon artışı

akım sitometrik olarak bildirilmektedir (P. Zhang, Su, Liang, & Fu, 2008). Bizim çalışmamızda PD-L1 ekspresyon seviyelerine bakıldığında, ko-kültür uygulamaları ile MCF-7: Jurkat ko-kültüründe PTX uygulaması ile anlamlı olarak arttığı, farklı olarak Dox ile anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4-20), (Tablo 4-5). Bununla birlikte, MCF-7:THP-1 ko-kültüründe PTX ve Dox uygulamaları ile PD-L1 ekspresyonunun azaldığı gösterildi (Şekil 4-22), (Tablo 4-5). MDA-MB-231 hücreleri ile Jurkat hücrelerinin ko-kültürüne baktığımızda Dox uygulaması ile PD-L1 ekspresyonunun azaldığı, PTX uygulaması ile anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi (Şekil 4-24), (Tablo 4-5). MDA-MB-231:THP-1 ko-kültüründe ise Dox uygulaması ile kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmezken, PTX uygulaması ile anlamlı olarak artış tespit edildi. Bununla birlikte Dox uygulamasına PD-1/PD-L1 inhibitörleri olan BMS-1166 ve PI4 ilavesi ile PD-L1 ekspresyonunda anlamlı olarak azalma belirlendi (Şekil 4-26), (Şekil 4-27), (Tablo 4-5).

Çalışmamızda Dox uygulamasının MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü dışında tüm ko-kültür gruplarında PD-L1 ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı ve inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Dox'un bu etkisinin hem hücre bağımsız hem de inhibitör bağımsız olması dikkat çekicidir. Benzer şekilde, Naba ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Dox uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermekle birlikte bu sonuç bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir (Naba, Tolay, ERMAN, & Yazgan, 2020).

Zhang ve arkadaşlarının çalışması ile karşılaştırma yaptığımızda, MCF-7 hücre hattında PTX uygulaması ile bildirilen PD-L1 ekspresyon artışının (P. Zhang et al., 2008); bizim çalışmamızda MCF-7: Jurkat ko-kültüründe gerçekleştiği, MCF-7: THP-1 ko-kültüründe ise PD-L1 ekspresyonunun azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Dox uygulaması ile Bailly ve arkadaşları tarafından rapor edilen PD-L1 ekspresyon artışının (Bailly et al., 2020), farklı olarak çalışmamızda ko-kültür gruplarında gerçekleşmediği ve MCF-7: Jurkat, MCF-7: THP-1 ve MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürlerinde PD-L1 ekspresyonunun azaldığı, MDA-MB-231:THP-1 ko-kültüründe anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 4-5).

Meme kanseri hücre hatlarında PD-1 ve PD-L1 inhibisyonu ile kombinasyon halinde ERK1/2 inhibitörünün de kullanıldığı çalışmada bizim çalışmada kullandığımız inhibitöre benzer özellikler taşıyan inhibitöre ait $IC_{50}$ değerlerinin östrojen reseptörü

pozitif olan MCF-7 hücrelerinde 3,12 μM ve TNMK hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde ise 1,99 μM olduğu belirtilmektedir (Bräutigam et al., 2021).

PD-1/PD-L1 inhibitörü BMS-1166 ile yapılan bir çalışmada akciğer kanser hücresi PD-L1 eksprese eden PC9 akciğer kanseri hücre hattı ve PD-1 eksprese eden Jurkat hücreleri ile yapılan ko-kültür uygulamasında PD-1'in lizozomal olarak degredasyona uğradığı ve BMS-1166 inhibitörünün bu degredasyonu önlediği bildirilmektedir. BMS-1166'nın, aynı zamanda PD-L1'in endoplazmik retikulumdan golgiye taşınmasını bloke ettiği, PD-L1 glikozilasyonunu ve olgunlaşmasını ortadan kaldırdığı gösterilmektedir. Bu çalışma ile, PD-L1'in post-translasyonel işleme ve matürasyon aşamasının bloke edilmesi ile inhibitörlerin etki mekanizmalarına yeni bir yaklaşım ortaya konulmaktadır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının değerlendirildiği bir model ile BMS-1166 konsantrasyonu 4:1 hücre oranı ile 10 μM dozunda 17 saat olarak uygulanmaktadır (F.-F. Chen et al., 2020). Çalışmamızda ise, BMS-1166 inhibitörü 5:1 oranında hücre ile 20 μM dozunda 72 saat olarak kullanıldı (Şekil 4-10).

BMS-1166 ile yapılan bir başka çalışmada $IC_{50}$ değeri 24 saat için 40 μM olarak belirlendiği bildirilmektedir. PD-1 eksprese eden Jurkat hücreleri ile PD-L1 eksprese eden CHO-K1 hücreleri ile yapılan ko-kültür çalışmasında hücrelerin sırasıyla 10:1 hücre oranları ile sitotoksisite değerlendirmeleri yapılmaktadır (Konieczny et al., 2020).

Meme kanseri hücreleri ile Jurkat ve THP-1 hücreleri ile yapılan ko-kültür uygulamaları neticesinde PD-1/ PD-L1 inhibitörü BMS-1166' nın kullanımı ile MCF-7: THP-1 ko-kültürünün PD-1, PD-L1, ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı belirlendi. MCF-7: Jurkat ko-kültüründe BMS-1166'nın anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlendi. Bununla ilişkili olarak monositler ve östrojen pozitif meme kanseri hücreleri arasındaki etkileşim ortaya konulmaktadır. MCF-7:THP-1 ko-kültüründe PD-1 ve PD-L1 artışına paralel olarak ilaç direnci proteinlerinin de arttığı gözlenmektedir. Yapılan bir çalışmada MCF-7:THP-1 ko-kültüründe migrasyonda küçük bir artış olduğu bildirilmekle birlikte bizim sonucumuzla bağlantılı olarak migrasyon artışının ilaç direnci artan hücrelerde görülmesi ile ilişkilendirilebilmektedir (Ward et al., 2015). Buradan yapılan bir çıkarım olarak preklinik verilerin klinik verilere aktarılması doğrultusunda, örnek teşkil etmesi açısından BMS1166 uygulaması ile östrojen pozitif bir meme kanseri için bir tümör

patolojisi örneğinde monositik popülasyonu yoğun olarak tespit edilen bir hastada PD-L1 artışı ile ilaç direnci ilişkisinin kurulabileceği öngörülmektedir.

BMS-1166'nın tek başına uygulaması PD-1 ekspresyonunun MDA-MB-231 ile olan iki ko-kültür grubunda da azaldığı ve bu şekilde PD-1 inhibisyonunun gerçekleştiği belirlendi. Bununla birlikte MCF-7: THP-1 ko-kültüründe PD-1 ekspresyon artışı gözlendi (Tablo 4-4). BMS-1166 uygulaması ile PD-L1 ekspresyonu değerlendirildiğinde ekspresyonun MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe azaldığı, MDA-MB-231: THP-1 ve MCF-7:THP-1 ko-kültür gruplarında ekspresyonun arttığı tespit edildi (Tablo 4-5). Bu sonuçlara göre BMS-1166 uygulamasının hem PD-1 hem de PD-L1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmektedir (Tablo 4-4), (Tablo 4-5). BMS-1166 uygulaması ile hücre canlılık analiz sonuçlarının da bu sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir (Şekil 4-18). Ayrıca tek başına Dox uygulaması ile azalan hücre canlılığının, BMS-1166 ile kombinasyon uygulaması ile anlamlı olarak daha da azaldığı gösterilmektedir (Şekil 4-18).

Çalışmamızda BMS-1166'nın tek başına uygulaması ile ilaç direnci proteinlerinden ABCG2 ekspresyonunda MCF-7: THP-1 ve MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü grubunda artışa, MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür grubunda da anlamlı olarak azalmaya neden olduğu gözlendi. BMS-1166, Dox ile birlikte uygulandığında; kontrole göre MCF-7: Jurkat, MCF-7: THP-1 ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında ABCG2 ekspresyonunu azalttığı belirlendi. Tek başına Dox ile kıyaslama yapıldığında MCF-7: Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. PTX ve PTX+BMS-1166 uygulamaları ile sadece MCF-7: THP-1 ko-kültürü grubunda azalma olduğu, PTX ile kıyaslandığında MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe ABCG2 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gösterildi (Tablo 4-6). Tek başına PI4 uygulaması ile MCF-7:Jurkat ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültürü gruplarında azalma; Dox+PI4 uygulaması ile MCF-7: THP-1 ko-kültürü grubunda azalma ile PTX+PI4 uygulaması ile tek başına PTX uygulamasına göre ABCG2 ekspresyonunda anlamlı olarak azalma tespit edildi (Tablo 4-6).

BMS-1166'nın tek başına uygulaması ile MCF-7: THP-1 ve MDA-MB-231: THP-1 ko-kültür gruplarında MDR-1 ekspresyonunda artışa neden olduğu gözlendi (Şekil 4-22), (Şekil 4-26). MDR-1 ekspresyonundaki artışın THP-1 aracılı bir etkiyle dolayısıyla monosit popülasyonunun etkisi ile ilaç direncine sebep olabileceği ortaya

konulmaktadır. Hem Dox hem de Dox+BMS-1166 uygulamasında ise; MDA-MB-231: Jurkat ko-kültür grubu dışında diğer ko-kültür gruplarında MDR-1 ekspresyonunda azalma tespit edildi (Şekil 4-24), (Tablo 4-7). Dox'un buradaki ilaç direnci üzerindeki etkisinin baskın olduğunu görmekteyiz. PI4 inhibitörü uygulamalarında ise PI4'ün tek başına uygulamasının yanı sıra Dox ve PTX uygulamaları ve PI4 ile kombinasyonlarında dikkat çeken nokta yine THP-1 bulunan ko-kültür gruplarında MDR-1 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı olarak azalması olmuştur (Tablo 4-7). PI4 ile elde edilen bu sonuçlar BMS-1166 sonuçları ile paralellik gösterse de tek başına BMS-1166'nın MDR-1 ekspresyonunu arttırması etki mekanizması açısından bir farklılık taşıdığını bize göstermektedir.

PTX ve Dox ilaçlarının MDR-1 substratları oldukları bilinmektedir (Schinkel & Jonker, 2012). Lipit, peptit, bilirubin, safra tuzları vb. birçok maddenin farklı transport sistemleri bulunmaktadır. PI4 de peptit yapılı bir inhibitör olarak ABCB üyesi bir ABC taşıyıcısı olan MDR-1'in substratı olabilme potansiyeli taşımaktadır (Martins-Gomes & Silva, 2023). Çalışmamızda PI4 uygulaması ile; MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü dışında tüm ko-kültür gruplarında MDR-1 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. BMS-1166 inhibitörünün ise hem hidrofobik hem de hidrofilik yan gruplar içerdiği bilinmektedir. Bununla birlikte küçük bir molekül yapısına sahip olduğundan ilaç direnci proteinlerinden hepsiyle etkileşime girebilme özelliği taşıyabilmektedir (Konieczny et al., 2020). BMS-1166, MCF-7: THP-1 ko-kültüründe tüm ilaç direnci proteinlerini arttırırken, MCF-7: Jurkat ko-kültüründe kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmedi. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe ABCG2 ekspresyonu artarken, MDR-1 değişmedi ve MRP-1 ekspresyonu azaldı. MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe ABCG2 ekspresyonu azalırken, MDR-1 arttı ve MRP-1 ekspresyonunda değişim gözlenmedi. BMS-1166, MDA-MB-231 ko-kültür grupları açısından tutarlı sonuçlar oluşturmamaktadır ve belki de burada dirençle ilişkili farklı parametrelerin incelenmesi gerekmektedir.

MRP-1 ekspresyon düzeyi ayrı değerlendirildiğinde ciddi bir artış gözlenmemekle birlikte, BMS-1166 uygulaması ile MCF-7: THP-1 ko-kültür grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiş olup, Dox ve PTX uygulaması ile kontrole göre herhangi bir fark gözlenmedi. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültür grubunda BMS-1166 uygulaması ile anlamlı bir azalma belirlendi. THP-1 ko-

kültüründe ise anlamlı bir değişim gözlenmedi. Dox ve PTX uygulaması ile MDA-MB-231: Jurkat ve THP-1 ko-kültür gruplarının ikisinde de anlamlı olarak MRP-1 ekspresyon artışı belirlendi. Yine aynı gruplar değerlendirildiğinde; BMS-1166 ile Dox ve BMS-1166 ile PTX kombinasyon uygulamalarında, tek başına Dox ve PTX uygulamalarına göre BMS-1166'nın MRP-1 ekspresyonlarını anlamlı olarak azalttığı tespit edildi (Tablo 4-8).

Yapılan bir çalışmada meme kanseri dokularında PD-L1 ve MDR-1 ifadeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ve bunun kemoterapi direncine katkıda bulunabileceği gösterilmektedir (Antony et al., 2022). Çalışmamızda, PTX ve Dox uygulamaları temelinde MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü dışında diğer tüm ko-kültür gruplarında doku örnekleri ile benzer şekilde PD-L1 ve MDR-1 ekspresyonlarının paralel sonuçlar gösterdiği bulundu ((Tablo 4-4)-(Tablo 4-8)).

Çalışmamızda PD-1/ PD-L1 bağlantısını hedef alan küçük molekül inhibitörleri kullanıldı. Küçük moleküllerin terapötik antikorlara göre daha düşük üretim maliyetleri, daha yüksek stabilite, tümör penetrasyonun iyi olması, oral uygulamaya uygunluk ve immünojenisite sorunlarının ortadan kaldırılması gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır (Zhan et al., 2016). Bunun yanı sıra sentezi gerçekleştirilen küçük molekül inhibitörlerinin yarı ömürlerinin kısa oluşu, PD-1/PD-L1 bağlantısındaki protein-protein etkileşiminde yer alan hidrofobik arayüzün varlığından ve aynı zamanda sentezlenen moleküllerin peptit yapılı ve küçük moleküler yapılarından dolayı bağlanma ve hücresel süreçte farklı mekanizmalarla degredasyon sorunlarını oluşturma potansiyellerinden dolayı bir takım dezavantajlara da sahiptir. Bu sorunların üstesinden gelmeyi hedefleyen yeni inhibitörleri sentezleme çalışmalarına devam edilmektedir (Q. Wu et al., 2021).

BMS-1166 ve PI4 inhibitörlerinin ilaç direnci ile etkileşimine yönelik literatürde gösterilen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız farklı genetik alt yapılara sahip iki farklı meme kanseri ve iki farklı immün hücre popülasyonu ile oluşturulan *in vitro* meme kanseri modelinde; PD-1/ PD-L1 inhibitörleri ve kemoterapi ilaçlarının uygulandığı, PD-1/PD-L1 bağlantısı ile birlikte ilaç direncinin değerlendirildiği özgün bir çalışmadır.

Çalışmamızda PD-1/PD-L1 bağlantısına en çok etki eden inhibitör BMS-1166 olmuştur. Hem tüm ko-kültür gruplarında hücre canlılığını azaltmış, hem de MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe hem PD-1 hem de PD-L1 ekspresyonunu azaltma başarısı

göstermiştir. Bununla birlikte aynı ko-kültür grubunda, BMS1166 uygulamasının ABCG2 direnç artışına neden olduğu görülmektedir. Ayrıca Dox+BMS-1166 uygulaması ile istisnasız tüm ko-kültür gruplarında PD-L1 ekspresyonunun azaldığı ve ilaç direnci açısından bakıldığında sadece MDA-MB-231: Jurkat ko-kültüründe ilaç direnci artışı gözlenirken, diğer gruplarda ABCG2, MDR-1 ekspresyonlarında gözlenen azalma ile PD-L1 ile paralel sonuçlar elde edilmiştir.

PTX uygulaması yapılan tüm ko-kültür gruplarında PD-L1 ekspresyonu ile ilaç direnci protein ekspresyonları büyük oranda benzer bir profil çizmektedir. PD-L1 ekspresyonu artan MCF-7: Jurkat ko-kültüründe ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 ekspresyonlarının arttığı; MCF-7: THP-1 ko-kültüründe PD-L1 ekspresyonu azalırken ABCG2 ve MDR-1 ekspresyonlarının da azaldığı, MRP-1'in değişmediği gözlenmektedir. MDA-MB-231: Jurkat ko-kültür grubunda PTX ile PD-L1 ekspresyonunun kontrole göre değişmemesine rağmen, tüm ilaç direnci proteinlerinde ekspresyon artışı belirlenmiştir. Yine MDA-MB-231: THP-1 ko-kültüründe PD-L1 ekspresyon artışına paralel olarak ABCG2 ve MRP-1 ekspresyonlarının arttığı, MDR-1 ekspresyonunda anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Çalışmamızda diğer taraftan dikkat çeken bir nokta da; hem BMS-1166 hem de PI4 tarafından PD-L1 ekspresyon azalışının MDA-MB-231: Jurkat ko-kültürü grubunda olmasıdır. Bu veri klinik hasta verileriyle uyumluluk göstermektedir. MDA-MB-231 üçlü hormon negatif moleküler yapıda ve agresif karakterde metastatik bir hücre hattıdır. Jurkat da $CD4^+$ T lenfosit karakterindedir. Bununla birlikte immünoterapinin uygulandığı hasta grubunun ileri evre TNMK hastaları olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda immünoterapi kriterleri için TIL oranları ve PD-L1 pozitifliğinin önemi sıklıkla vurgulanmaktadır (Pelekanou et al., 2017). MDA-MB-231: Jurkat ko-kültür grubu klinikteki hasta grubunun bir temsili niteliği taşıyabilir. Kullanılan iki inhibitörün de PD-L1 ekspresyonunu azalttığı bununla birlikte BMS1166'nın bu ilaç direnci proteinlerinden ABCG2'yi arttırdığı, MRP-1'i azalttığı; PI4'ün ise ABCG2, MDR-1 ve MRP-1 proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. Genel anlamda iki inhibitörün de PD-L1'i azalttığı ve ilaç direncini arttırdığı söylenebilir.

Elde edilen tüm veriler doğrultusunda, kullanılan ilaç ve inhibitörlerin doz ve süreleri, meme kanserinin farklı moleküler alt tipleri ve modelde kullanılan hücre oranları, hücresel moleküler mekanizmaların aktivasyon ve inhibisyon durumlarının

hepsinin tek tek ya da sinerjistik ya da antagonist etki göstererek farklı sonuçlar vermesi, aslında temel olarak kanserde yer alan tüm hücresel mekanizmaların karmaşıklığını ortaya koymaktadır. Çok sayıda değişken varlığında ortaya çıkan veriler, çok yönlü araştırmalar sonucu moleküler mekanizmaların çözümlenmesi ile sistematik literatür bilgisine dönüşmektedir.

Çalışmamıza ait tüm bu bilgiler ışığında bulgularımız, meme kanserine ilişkin olarak geniş bir perspektif ile değerlendirildiğinde, kemoterapi ve immün odaklı tedavilerin birlikteliğinin önemini ortaya koymuştur. Çalışmamız ayrıca, PD-1/ PD-L1 yolağı ile ilişkili olarak kullanılan farklı inhibitörlerin, meme kanserinin farklı hücresel alt tiplerinin, farklı kemoterapi ilaçlarının, monosit ve lenfosit hücrelerinin yer aldığı farklı bir immün mikroçevrenin etkisinde PD-1 ve PD-L1 bağlantısı ile ilaç direnci ilişkisi açısından literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. Kişiselleştirilmiş tıp açısından da bu ilişkilerin detaylandırılarak ortaya konulması büyük önem taşımaktadır. Birçok yönden karmaşık bir mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik sunulan bu bilimsel katkıların gelecek çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR


Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., & El-Halawany, A. M. (2015). P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of advanced research, 6*(1), 45-62.

Abraham, R. T., & Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature reviews immunology, 4*(4), 301-308.

Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules, 9*(12), 789.

Adams, S., Schmid, P., Rugo, H., Winer, E., Loirat, D., Awada, A., . . . Nanda, R. (2019). Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Annals of Oncology, 30*(3), 397-404.

Adati, N., Huang, M.-C., Suzuki, T., Suzuki, H., & Kojima, T. (2009). High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human leukemia THP-1 cell line. *BMC research notes, 2*, 1-7.

Aksoylar, H.-I., Tijaro-Ovalle, N. M., Boussiotis, V. A., & Patsoukis, N. (2020). T cell metabolism in cancer immunotherapy. *Immunometabolism, 2*(3).

Alderton, G. K. (2014). Tumour immunology: turning macrophages on, off and on again. *Nature reviews. Immunology, 14*(3), 136-137.

Allison, K. H. (2012). Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *American journal of clinical pathology, 138*(6), 770-780.

Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Frontiers in pharmacology, 8*, 561.

Antony, G. R., Augustine, P., Parambil, S. T., Littleflower, A. B., Kattoor, J., Krishna, K. J., & Subhadradevi, L. (2022). Immunohistochemical expression of PD-L1 and MDR1 in breast tumors: association with clinico-pathological parameters and treatment outcome. *Clinical and Experimental Medicine*, 1-11.

Arumugam, A., Subramani, R., Nandy, S. B., Terreros, D., Dwivedi, A. K., Saltzstein, E., & Lakshmanaswamy, R. (2019). Silencing growth hormone receptor inhibits estrogen receptor negative breast cancer through ATP-binding cassette sub-family G member 2. *Experimental & molecular medicine, 51*(1), 1-13.

Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia, 47*(1), 22-31.

Bailly, C., Thuru, X., & Quesnel, B. (2020). Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. *NAR cancer, 2*(1), zcaa002.

Balic, M., Thomssen, C., Würstlein, R., Gnant, M., & Harbeck, N. (2019). St. Gallen/Vienna 2019: a brief summary of the consensus discussion on the optimal primary breast cancer treatment. *Breast Care, 14*(2), 103-110.

Baran, J., Kowalczyk, D., Oz˙ óg, M., & Zembala, M. (2001). Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 8*(2), 303-313.

Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology, 11*(10), 889-896.

Blomberg, O. S., Spagnuolo, L., & de Visser, K. E. (2018). Immune regulation of metastasis: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Disease models & mechanisms, 11*(10), dmm036236.

Bogman, K., Peyer, A. K., Török, M., Küsters, E., & Drewe, J. (2001). HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. *British journal of pharmacology, 132*(6), 1183-1192.

Boix-Montesinos, P., Soriano-Teruel, P. M., Arminan, A., Orzáez, M., & Vicent, M. J. (2021). The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. *Advanced drug delivery reviews, 173*, 306-330.

Boussiotis, V. A. (2016). Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *New England Journal of Medicine, 375*(18), 1767-1778.

Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., . . . McMiller, T. L. (2010). Phase I study of single-agent anti–programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of clinical oncology, 28*(19), 3167.

Bräutigam, K., Kabore-Wolff, E., Hussain, A. F., Polack, S., Rody, A., Hanker, L., & Köster, F. (2021). Inhibitors of PD-1/PD-L1 and ERK1/2 impede the proliferation of receptor positive and triple-negative breast cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 147*(10), 2923-2933.

Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: updates and new challenges. *Journal of personalized medicine, 11*(8), 808.

Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*, 911-915.

Cassetta, L., & Pollard, J. W. (2018). Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature reviews Drug discovery, 17*(12), 887-904.

Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., & Lollini, P.-L. (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy, 60*, 319-326.

Chang, H. N., Liu, B. Y., Qi, Y. K., Zhou, Y., Chen, Y. P., Pan, K. M., . . . Fu, C. Y. (2015). Blocking of the PD-1/PD-L1 interaction by ad-peptide antagonist for cancer immunotherapy. *Angewandte Chemie International Edition, 54*(40), 11760-11764.

Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease, 32*(1-2), 35.

Chen, C.-j., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., & Roninson, I. B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell, 47*(3), 381-389.

Chen, F.-F., Li, Z., Ma, D., & Yu, Q. (2020). Small-molecule PD-L1 inhibitor BMS1166 abrogates the function of PD-L1 by blocking its ER export. *Oncoimmunology, 9*(1), 1831153.

Chen, F. F., Li, Z., Ma, D., & Yu, Q. (2020). Small-molecule PD-L1 inhibitor BMS1166 abrogates the function of PD-L1 by blocking its ER export. *Oncoimmunology, 9*(1), 1831153. doi:10.1080/2162402X.2020.1831153

Chen, L., & Han, X. (2015). Anti–PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *The Journal of clinical investigation, 125*(9), 3384-3391.

Chen, S., Wang, H., Li, Z., You, J., Wu, Q.-W., Zhao, C., . . . Zhang, Z.-M. (2018). Interaction of WBP2 with ERα increases doxorubicin resistance of breast cancer cells by modulating MDR1 transcription. *British journal of cancer, 119*(2), 182-192.

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., . . . Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer letters, 370*(1), 153-164.

Chocarro de Erauso, L., Zuazo, M., Arasanz, H., Bocanegra, A., Hernandez, C., Fernandez, G., . . . Kochan, G. (2020). Resistance to PD-L1/PD-1 blockade immunotherapy. A tumor-intrinsic or tumor-extrinsic phenomenon? *Frontiers in pharmacology, 11*, 441.

Chowdhury, F., Dunn, S., Mitchell, S., Mellows, T., Ashton-Key, M., & Gray, J. C. (2015). PD-L1 and CD8+ PD1+ lymphocytes exist as targets in the pediatric tumor microenvironment for immunomodulatory therapy. *Oncoimmunology, 4*(10), e1029701.

Christowitz, C., Davis, T., Isaacs, A., Van Niekerk, G., Hattingh, S., & Engelbrecht, A.-M. (2019). Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. *BMC cancer, 19*(1), 1-10.

Collins, M., Ling, V., & Carreno, B. M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome biology, 6*, 1-7.

Cortes, J., Cescon, D. W., Rugo, H. S., Nowecki, Z., Im, S.-A., Yusof, M. M., . . . Holgado, E. (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *The Lancet, 396*(10265), 1817-1828.

D'Errico, G., Machado, H. L., & Sainz, B. (2017). A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clinical and translational medicine, 6*(1), 1-10.

De Mattos-Arruda, L., Bottai, G., Nuciforo, P. G., Di Tommaso, L., Giovannetti, E., Peg, V., . . . Corsi, F. (2015). MicroRNA-21 links epithelial-to-mesenchymal transition and inflammatory signals to confer resistance to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget, 6*(35), 37269.

Debien, V., De Caluwé, A., Wang, X., Piccart-Gebhart, M., Tuohy, V. K., Romano, E., & Buisseret, L. (2023). Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. *NPJ Breast Cancer, 9*(1), 7.

DeNardo, D. G., & Coussens, L. M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast cancer research, 9*, 1-10.

Deniz, G. (2007). T, B, NK Hücrelerin Değerlendirilmesinde Pratik Yaklaşımlar. *J Int Med Sci, 3*(43), 18-25.

Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., . . . Furlanetto, J. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis

in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The lancet oncology*, *19*(1), 40-50.

Dirix, L. Y., Takacs, I., Jerusalem, G., Nikolinakos, P., Arkenau, H.-T., Forero-Torres, A., . . . Smakal, M. (2018). Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast cancer research and treatment, 167*, 671-686.

Dua, I., & Tan, A. R. (2017). Immunotherapy for triple-negative breast cancer: a focus on immune checkpoint inhibitors. *Am J Hematol-Oncol, 13*, 20-27.

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137-148.

Ejendal, K., & Hrycyna, C. A. (2002). Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Current Protein and Peptide Science*, *3*(5), 503-511.

Emens, L. A., Cruz, C., Eder, J. P., Braiteh, F., Chung, C., Tolaney, S. M., . . . Delord, J.-P. (2019). Long-term clinical outcomes and biomarker analyses of atezolizumab therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer: a phase 1 study. *JAMA oncology*, *5*(1), 74-82.

Emens, L. A., & Middleton, G. (2015). The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer immunology research*, *3*(5), 436-443.

Endicott, J. A., & Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual review of biochemistry*, *58*(1), 137-171.

Ernest, S., Rajaraman, S., Megyesi, J., & Bello-Reuss, E. N. (1997). Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney. *Nephron*, *77*(3), 284-289.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews*, *38*(6), 698-707.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., . . . Luo, W. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, *5*(2), 77-106.

Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*, *26*, 1-9.

Franklin, R. A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M. V., Bivona, M. R., Liu, K., . . . Li, M. O. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*, *344*(6186), 921-925.

Fuchs, D. A., & Johnson, R. K. (1978). Crtologic Evidence that Taxol, an Antineoplastic Agent from Taxus brevifolia, Acts as a Mitotic Spindle. *Cancer treatment reports*, *62*(8), 1219-1222.

Gatalica, Z., Snyder, C., Maney, T., Ghazalpour, A., Holterman, D. A., Xiao, N., . . . Vranic, S. (2014). Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, *23*(12), 2965-2970.

Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., Ibañez-Vea, M., Lorenzo, L., Fernandez-Hinojal, G., . . . Arozarena, I. (2017). PDL1 signals through conserved sequence motifs to overcome interferon-mediated cytotoxicity. *Cell reports*, *20*(8), 1818-1829.

Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.-L., Petit, A., Dulong, C., . . . Laurent, M. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC cancer, 13*(1), 1-14.

Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., . . . Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+ CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy, 56*, 641-648.

Gianni, L., Huang, C., Egle, D., Bermejo, B., Zamagni, C., Thill, M., . . . Russo, S. (2022). Pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant treatment with or without atezolizumab in triple-negative, early high-risk and locally advanced breast cancer: NeoTRIP Michelangelo randomized study. *Annals of Oncology, 33*(5), 534-543.

Gilad, Y., Eliaz, Y., Yu, Y., Han, S. J., O'Malley, B. W., & Lonard, D. M. (2019). Drug-induced PD-L1 expression and cell stress response in breast cancer cells can be balanced by drug combination. *Scientific reports, 9*(1), 15099.

Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R., & Su, A. I. (2018). A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics, 19*, 1-13.

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., & Sarkadi, B. (2004). The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Current drug delivery, 1*(1), 27-42.

Gote, V., Nookala, A. R., Bolla, P. K., & Pal, D. (2021). Drug resistance in metastatic breast cancer: tumor targeted nanomedicine to the rescue. *International journal of molecular sciences, 22*(9), 4673.

Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine, 53*(1), 615-627.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., De Wind, A., . . . Manfouo-Foutsop, G. (2013). CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of clinical investigation, 123*(7), 2873-2892.

Gubin, M. M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J. P., Noguchi, T., . . . Krebber, W.-J. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature, 515*(7528), 577-581.

Guidotti, G., Brambilla, L., & Rossi, D. (2017). Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. *Trends in pharmacological sciences, 38*(4), 406-424.

Guzik, K., Tomala, M., Muszak, D., Konieczny, M., Hec, A., Błaszkiewicz, U., . . . Holak, T. A. (2019). Development of the inhibitors that target the PD-1/PD-L1 interaction—a brief look at progress on small molecules, peptides and macrocycles. *Molecules, 24*(11), 2071.

Guzik, K., Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Musielak, B., Torner, R., . . . Holak, T. A. (2017). Small-molecule inhibitors of the programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction via transiently induced protein states and dimerization of PD-L1. *Journal of Medicinal Chemistry, 60*(13), 5857-5867.

Haldar, S., Jena, N., & Croce, C. M. (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 92*(10), 4507-4511.

Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., & Konishi, I. (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *International journal of clinical oncology, 21*, 462-473.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery, 12*(1), 31-46.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., . . . Cardoso, F. (2019). Breast Cancer In (Vol. 5, pp. 66). Nat Rev Dis Primers.

Hassan, M., Ansari, J., Spooner, D., & Hussain, S. (2010). Chemotherapy for breast cancer. *Oncology reports, 24*(5), 1121-1131.

Hirata, E., & Sahai, E. (2017). Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 7*(7), a026781.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers, 6*(3), 1769-1792.

Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., . . . Hsueh, E. C. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget, 6*(19), 17462.

Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer letters, 368*(1), 7-13.

Islam, T., & Resat, H. (2017). Quantitative investigation of MDA-MB-231 breast cancer cell motility: Dependence on epidermal growth factor concentration and its gradient. *Molecular BioSystems, 13*(10), 2069-2082.

Jaradat, D. s. M. (2018). Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino acids, 50*(1), 39-68.

Javeed, A., Ashraf, M., Riaz, A., Ghafoor, A., Afzal, S., & Mukhtar, M. M. (2009). Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 38*(4), 283-290.

Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., & Cho, W. C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 114*, 108800.

Jiang, Y.-Z., Yu, K.-D., Peng, W.-T., Di, G.-H., Wu, J., Liu, G.-Y., & Shao, Z.-M. (2014). Enriched variations in TEKT4 and breast cancer resistance to paclitaxel. *Nature communications, 5*(1), 3802.

Jones, S., Erban, J., Overmoyer, B., Budd, G., Hutchins, L., Lower, E., . . . Pritchard, K. (2005). Randomized phase III study of docetaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology, 23*(24), 5542-5551.

Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer, 9*(4), 239-252.

Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby Jr, C. R., & Chen, Z.-S. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resistance Updates, 18*, 1-17.

Khamis, Z. I., Sahab, Z. J., & Sang, Q.-X. A. (2012). Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. *International journal of breast cancer, 2012*.

Konieczny, M., Musielak, B., Kocik, J., Skalniak, L., Sala, D., Czub, M., . . . Stec, M. (2020). Di-bromo-based small-molecule inhibitors of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint. *Journal of Medicinal Chemistry, 63*(19), 11271-11285.

Kumar, N. (1981). Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry, 256*(20), 10435-10441.

Kumar, S., Desmedt, C., Larsimont, D., Sotiriou, C., & Goormaghtigh, E. (2013). Change in the microenvironment of breast cancer studied by FTIR imaging. *Analyst, 138*(14), 4058-4065.

Kyte, J., Røssevold, A., Falk, R., & Naume, B. (2020). ALICE: A randomized placebo-controlled phase II study evaluating atezolizumab combined with immunogenic chemotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of translational medicine, 18*(1), 1-7.

Larionova, I., Cherdyntseva, N., Liu, T., Patysheva, M., Rakina, M., & Kzhyshkowska, J. (2019). Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology, 8*(7), e1596004.

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation, 121*(7), 2750-2767.

Leonessa, F., & Clarke, R. (2003). ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocrine-related cancer, 10*(1), 43-73.

Li, Q., Quan, L., Lyu, J., He, Z., Wang, X., Meng, J., . . . Li, H. (2016). Discovery of peptide inhibitors targeting human programmed death 1 (PD-1) receptor. *Oncotarget, 7*(40), 64967.

Li, X., Lu, Y., Liang, K., Liu, B., & Fan, Z. (2005). Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. *Breast cancer research, 7*, 1-9.

Li, X., Wetherilt, C. S., Krishnamurti, U., Yang, J., Ma, Y., Styblo, T. M., . . . Cohen, C. (2016). Stromal PD-L1 expression is associated with better disease-free survival in triple-negative breast cancer. *American journal of clinical pathology, 146*(4), 496-502.

Li, Y., Li, F., Jiang, F., Lv, X., Zhang, R., Lu, A., & Zhang, G. (2016). A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway & translational blockade of immune checkpoints. *International journal of molecular sciences, 17*(7), 1151.

Li, Z., Li, B., Li, L., Wang, G., Li, Y., Fu, R., . . . Ye, G. (2020). The immunostimulative effect and mechanisms of a novel mouse anti-human PD-1 monoclonal antibody on Jurkat lymphocytic cells cocultured with hepatoma cells. *OncoTargets and therapy, 13*, 12225.

Lin, D. Y.-W., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A. G., Su, H.-P., Mikami, B., . . . Garboczi, D. N. (2008). The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*(8), 3011-3016.

Liu, S., Chen, S., Yuan, W., Wang, H., Chen, K., Li, D., & Li, D. (2017). PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget, 8*(59), 99901.

Liu, X., Guo, C. Y., Tou, F. F., Wen, X. M., Kuang, Y. K., Zhu, Q., & Hu, H. (2020). Association of PD-L1 expression status with the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors and overall survival in solid tumours: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer, 147*(1), 116-127.

Loi, S. (2013). Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology, 2*(7), e24720.

Loi, S., Drubay, D., Adams, S., Pruneri, G., Francis, P. A., Lacroix-Triki, M., . . . Demaria, S. (2019). Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: a pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *Journal of clinical oncology, 37*(7), 559.

Loi, S., Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Salgado, R., Denkert, C., Savas, P., . . . Estrada, M. V. (2016). RAS/MAPK activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *Clinical Cancer Research, 22*(6), 1499-1509.

Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., . . . Hitre, E. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol, 31*(7), 860-867.

Loibl, S., Untch, M., Burchardi, N., Huober, J., Sinn, B., Blohmer, J.-U., . . . Hanusch, C. (2019). A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Annals of Oncology, 30*(8), 1279-1288.

Lotfinejad, P., Kazemi, T., Safaei, S., Amini, M., Baghbani, E., Shotorbani, S. S., . . . Silvestris, N. (2021). PD-L1 silencing inhibits triple-negative breast cancer development and upregulates T-cell-induced pro-inflammatory cytokines. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 138*, 111436.

Luen, S., Virassamy, B., Savas, P., Salgado, R., & Loi, S. (2016). The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *The Breast, 29*, 241-250.

Ma, D., Wu, L., Li, S., Sun, Z., & Wang, K. (2017). Vasohibin2 promotes adriamycin resistance of breast cancer cells through regulating ABCG2 via AKT signaling pathway. *Molecular Medicine Reports, 16*(6), 9729-9734.

Majidi, M., Safaee, S., Amini, M., Baghbanzadeh, A., Hajiasgharzadeh, K., Hashemzadeh, S., . . . Baradaran, B. (2021). The effects of chemotherapeutic drugs on PD-L1 gene expression in breast cancer cell lines. *Medical Oncology, 38*, 1-8.

Majzner, R. G., Simon, J. S., Grosso, J. F., Martinez, D., Pawel, B. R., Santi, M., . . . Marty, V. (2017). Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues. *Cancer, 123*(19), 3807-3815.

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Advanced pharmaceutical bulletin, 7*(3), 339.

Marcucci, F., Rumio, C., & Corti, A. (2017). Tumor cell-associated immune checkpoint molecules–Drivers of malignancy and stemness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1868*(2), 571-583.

Marqus, S., Pirogova, E., & Piva, T. J. (2017). Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of biomedical science, 24*(1), 1-15.

Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *The Journal of immunology, 177*(10), 7303-7311.

Martins-Gomes, C., & Silva, A. M. (2023). Natural Products as a Tool to Modulate the Activity and Expression of Multidrug Resistance Proteins of Intestinal Barrier. *Journal of Xenobiotics, 13*(2), 172-192.

Matikas, A., Zerdes, I., Lövrot, J., Richard, F., Sotiriou, C., Bergh, J., . . . Foukakis, T. (2019). Prognostic implications of PD-L1 expression in breast cancer: systematic review and meta-analysis of immunohistochemistry and pooled analysis of transcriptomic data. *Clinical Cancer Research, 25*(18), 5717-5726.

McArthur, H. L. (2016). Checkpoint inhibitors in breast cancer: hype or promise? *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O, 14*(6), 392-395.

Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature, 480*(7378), 480-489.

Meng, Y., Liang, H., Hu, J., Liu, S., Hao, X., Wong, M. S. K., . . . Hu, L. (2018). PD-L1 expression correlates with tumor infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Journal of Cancer, 9*(16), 2938.

Micallef, I., & Baron, B. (2020). Doxorubicin: An overview of the anti-cancer and chemoresistance mechanisms.

Miles, D., Gligorov, J., André, F., Cameron, D., Schneeweiss, A., Barrios, C., . . . Andrade, L. (2021). Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology, 32*(8), 994-1004.

Mirzaei, S., Gholami, M. H., Hashemi, F., Zabolian, A., Farahani, M. V., Hushmandi, K., . . . Orive, G. (2022). Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discovery Today, 27*(2), 436-455.

Missiaen, R., Mazzone, M., & Bergers, G. (2018). *The reciprocal function and regulation of tumor vessels and immune cells offers new therapeutic opportunities in cancer.* Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology, 27*, 16-25.

Mittal, L., Tonk, R. K., Awasthi, A., & Asthana, S. (2021). Targeting cryptic-orthosteric site of PD-L1 for inhibitor identification using structure-guided approach. *Arch Biochem Biophys, 713*, 109059. doi:10.1016/j.abb.2021.109059

Mittendorf, E. A., Philips, A. V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., . . . Akcakanat, A. (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer immunology research, 2*(4), 361-370.

Mittendorf, E. A., Zhang, H., Barrios, C. H., Saji, S., Jung, K. H., Hegg, R., . . . Telli, M. L. (2020). Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet, 396*(10257), 1090-1100.

Mo, W., & Zhang, J.-T. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International journal of biochemistry and molecular biology, 3*(1), 1.

Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of breast cancer therapy. *PET clinics, 13*(3), 339-354.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods, 65*(1-2), 55-63.

Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular grwoth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. immunol. Methods, 65*, 55.

Muenst, S., Schaerli, A., Gao, F., Däster, S., Trella, E., Droeser, R., . . . Gillanders, W. (2014). Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment, 146*, 15-24.

Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., & Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB life, 59*(12), 752-757.

Naba, N. M., Tolay, N., ERMAN, M. B., & Yazgan, A. S. (2020). Doxorubicin inhibits miR-140 expression and upregulates PD-L1 expression in HCT116 cells, opposite to its effects on MDA-MB-231 cells. *Turkish Journal of Biology, 44*(1), 15-23.

Nallasamy, P., Chava, S., Verma, S. S., Mishra, S., Gorantla, S., Coulter, D. W., . . . Challagundla, K. B. (2018). *PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective.* Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Nawara, H. M., Afify, S. M., Hassan, G., Zahra, M. H., Seno, A., & Seno, M. (2021). Paclitaxel-based chemotherapy targeting cancer stem cells from mono-to combination therapy. *Biomedicines, 9*(5), 500.

Němcová-Fürstová, V., Kopperová, D., Balušíková, K., Ehrlichová, M., Brynychová, V., Václavíková, R., . . . Kovář, J. (2016). Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and applied pharmacology, 310*, 215-228.

Netea-Maier, R. T., Smit, J. W., & Netea, M. G. (2018). Metabolic changes in tumor cells and tumor-associated macrophages: a mutual relationship. *Cancer letters, 413*, 102-109.

Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G., & Kyrodimos, E. (2018). The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical & Experimental Metastasis, 35*, 309-318.

Nohara, K., Wang, F., & Spiegel, S. (1998). Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment, 48*, 149-157.

Nooter, K., & Herweijer, H. (1991). Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *British journal of cancer, 63*(5), 663.

Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity, 41*(1), 49-61.

Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., & Zang, X. (2015). Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in molecular medicine, 21*(1), 24-33.

Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., & Honjo, T. (2013). A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature immunology, 14*(12), 1212-1218.

Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International immunology, 19*(7), 813-824.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer, 12*(4), 252-264.

Pelekanou, V., Carvajal-Hausdorf, D. E., Altan, M., Wasserman, B., Carvajal-Hausdorf, C., Wimberly, H., . . . Rimm, D. L. (2017). Effect of neoadjuvant chemotherapy

on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. *Breast cancer research, 19*, 1-11.

Qiu, S.-Q., Waaijer, S. J., Zwager, M. C., de Vries, E. G., van der Vegt, B., & Schröder, C. P. (2018). Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer treatment reviews, 70*, 178-189.

Raab, M., Kobayashi, N. F., Becker, S., Kurunci-Csacsko, E., Krämer, A., Strebhardt, K., & Sanhaji, M. (2020). Boosting the apoptotic response of high-grade serous ovarian cancers with CCNE1 amplification to paclitaxel in vitro by targeting APC/C and the pro-survival protein MCL-1. *International Journal of Cancer, 146*(4), 1086-1098.

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., . . . Lakhani, S. R. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research, 12*(4), 1-12.

Ren, Y., Song, J., Li, X., & Luo, N. (2022). Rationale and Clinical Research Progress on PD-1/PD-L1-Based Immunotherapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *International journal of molecular sciences, 23*(16), 8878.

Rice, A. J., Park, A., & Pinkett, H. W. (2014). Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 49*(5), 426-437.

Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., & Coleman, W. B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *The American journal of pathology, 183*(4), 1113-1124.

Rizwanullah, M., Ahmad, M. Z., Ghoneim, M. M., Alshehri, S., Imam, S. S., Md, S., . . . Ahmad, J. (2021). Receptor-mediated targeted delivery of surface-modifiednanomedicine in breast cancer: recent update and challenges. *Pharmaceutics, 13*(12), 2039.

Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2019). Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *International journal of molecular sciences, 20*(4), 840.

Rong, D., Wang, C., Zhang, X., Wei, Y., Zhang, M., Liu, D., . . . Taouil, A. (2020). A novel taxane, difluorovinyl-ortataxel, effectively overcomes paclitaxel-resistance in breast cancer cells. *Cancer letters, 491*, 36-49.

Røssevold, A. H., Andresen, N. K., Bjerre, C. A., Gilje, B., Jakobsen, E. H., Raj, S. X., . . . Mathiesen, R. R. (2022). Atezolizumab plus anthracycline-based chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer: the randomized, double-blind phase 2b ALICE trial. *Nature medicine*, 1-11.

Sabatier, R., Finetti, P., Mamessier, E., Adelaide, J., Chaffanet, M., Ali, H. R., . . . Bertucci, F. (2015). Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget, 6*(7), 5449.

Sasikumar, P. G., & Ramachandra, M. (2022). Small molecule agents targeting PD-1 checkpoint pathway for cancer immunotherapy: mechanisms of action and other considerations for their advanced development. *Frontiers in Immunology*, 1847.

Sasikumar, P. G., Ramachandra, R. K., Adurthi, S., Dhudashiya, A. A., Vadlamani, S., Vemula, K., . . . Subbarao, K. (2019). A Rationally Designed Peptide Antagonist of the PD-1 Signaling Pathway as an Immunomodulatory Agent for Cancer TherapyPeptide Antagonist of PD-1 Signaling Pathway. *Molecular Cancer Therapeutics, 18*(6), 1081-1091.

Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by

immature human hematopoietic progenitors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 99*(2), 507-512.

Schiff, P. B., Fant, J., & Horwitz, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature, 277*(5698), 665-667.

Schiff, P. B., & Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 77*(3), 1561-1565.

Schiff, P. B., & Horwitz, S. B. (1981). Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry, 20*(11), 3247-3252.

Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2012). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews, 64*, 138-153.

Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., . . . Shaw Wright, G. (2018). Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine, 379*(22), 2108-2121.

Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., . . . Harbeck, N. (2020). Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine, 382*(9), 810-821.

Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., . . . Chui, S. Y. (2020). Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The lancet oncology, 21*(1), 44-59.

Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science, 348*(6230), 69-74.

Sharma, P., Stecklein, S. R., Yoder, R., Staley, J. M., Schwensen, K., O'Dea, A., . . . Crane, G. (2022). Clinical and biomarker results of neoadjuvant phase II study of pembrolizumab and carboplatin plus docetaxel in triple-negative breast cancer (TNBC)(NeoPACT). In: American Society of Clinical Oncology.

Skalniak, L., Zak, K. M., Guzik, K., Magiera, K., Musielak, B., Pachota, M., . . . Tomala, M. (2017). Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget, 8*(42), 72167.

Sobral, P. S., Luz, V. C. C., Almeida, J. M. G. C. F., Videira, P. A., & Pereira, F. (2023). Computational Approaches Drive Developments in Immune-Oncology Therapies for PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *International journal of molecular sciences, 24*(6), 5908.

Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute, 51*(5), 1409-1416.

Sun, C., Mezzadra, R., & Schumacher, T. N. (2018). Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity, 48*(3), 434-452.

Sun, W. Y., Lee, Y. K., & Koo, J. S. (2016). Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *Journal of translational medicine, 14*(1), 1-12.

Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., . . . Zhu, H.-P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences, 13*(11), 1387.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (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), 209-249.

Taube, J. M., Galon, J., Sholl, L. M., Rodig, S. J., Cottrell, T. R., Giraldo, N. A., . . . Rimm, D. L. (2018). Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Modern Pathology, 31*(2), 214-234.

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., . . . Atkins, M. B. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti–PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine, 366*(26), 2443-2454.

Tower, H., Ruppert, M., & Britt, K. (2019). The immune microenvironment of breast cancer progression. *Cancers, 11*(9), 1375.

Tsai, M.-J., Chang, W.-A., Huang, M.-S., & Kuo, P.-L. (2014). Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer. *International Scholarly Research Notices, 2014*.

Tsang, J. Y., Au, W.-L., Lo, K.-Y., Ni, Y.-B., Hlaing, T., Hu, J., . . . Tse, G. M. (2017). PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment, 162*, 19-30.

Usary, J., Llaca, V., Karaca, G., Presswala, S., Karaca, M., He, X., . . . Dressler, L. G. (2004). Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene, 23*(46), 7669-7678.

Vaddepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., & Chandra, A. B. (2020). Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers, 12*(3), 738.

Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature, 575*(7782), 299-309.

Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics, 3*(3), 1-10.

Voorwerk, L., Slagter, M., Horlings, H. M., Sikorska, K., van de Vijver, K. K., de Maaker, M., . . . Ong, S. (2019). Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nature medicine, 25*(6), 920-928.

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama, 321*(3), 288-300.

Wanderley, C. W., Colon, D. F., Luiz, J. P. M., Oliveira, F. F., Viacava, P. R., Leite, C. A., . . . Silva, R. L. (2018). Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent MannerPaclitaxel Drives TAMs to an M1 Profile. *Cancer research, 78*(20), 5891-5900.

Wang, Z., Wang, N., Liu, P., Chen, Q., Situ, H., Xie, T., . . . Chen, J. (2014). MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquiritigenin. *Oncotarget, 5*(16), 7013.

Ward, R., Sims, A. H., Lee, A., Lo, C., Wynne, L., Yusuf, H., . . . Landberg, G. (2015). Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget, 6*(16), 14687.

Weber, C. E., & Kuo, P. C. (2012). The tumor microenvironment. *Surgical oncology, 21*(3), 172-177.

Winer, E. P., Lipatov, O., Im, S.-A., Goncalves, A., Muñoz-Couselo, E., Lee, K. S., . . . Witzel, I. (2021). Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-119): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The lancet oncology, 22*(4), 499-511.

Wu, Q., Jiang, L., Li, S.-c., He, Q.-j., Yang, B., & Cao, J. (2021). Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica, 42*(1), 1-9.

Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer letters, 387*, 61-68.

Yang, L., & Lin, P. C. (2017). *Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression.* Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Yuan, Y., Jiang, Y.-C., Sun, C.-K., & Chen, Q.-M. (2016). Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications. *Oncology reports, 35*(5), 2499-2515.

Zahreddine, H., & Borden, K. L. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in pharmacology, 4*, 28.

Zak, K. M., Grudnik, P., Guzik, K., Zieba, B. J., Musielak, B., Dömling, A., . . . Holak, T. A. (2016). Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1). *Oncotarget, 7*(21), 30323.

Zhan, M.-M., Hu, X.-Q., Liu, X.-X., Ruan, B.-F., Xu, J., & Liao, C. (2016). From monoclonal antibodies to small molecules: the development of inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 pathway. *Drug Discovery Today, 21*(6), 1027-1036.

Zhang, P., Su, D.-M., Liang, M., & Fu, J. (2008). Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis. *Molecular immunology, 45*(5), 1470-1476.

Zhang, X., Schwartz, J.-C. D., Guo, X., Bhatia, S., Cao, E., Chen, L., . . . Almo, S. C. (2004). Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity, 20*(3), 337-347.

Zhang, X., Wang, C., Wang, J., Hu, Q., Langworthy, B., Ye, Y., . . . Fine, J. (2018a). Cancer Immunotherapy: PD-1 Blockade Cellular Vesicles for Cancer Immunotherapy (Adv. Mater. 22/2018). *Advanced Materials, 30*(22), 1870152.

Zhang, X., Wang, C., Wang, J., Hu, Q., Langworthy, B., Ye, Y., . . . Fine, J. (2018b). PD-1 blockade cellular vesicles for cancer immunotherapy. *Advanced Materials, 30*(22), 1707112.

Zhu, L., & Chen, L. (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cellular & molecular biology letters, 24*, 1-11.

**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**

MONOSİT VE LENFOSİT HÜCRELERİYLE OLUŞTURULAN İN VİTRO MEME KANSERİ MODELİNDE PD1, PDL1 İNHİBİSYONU VE İLAÇ DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

| %13 | %11 | %4 | %3 |
|---|---|---|---|
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | dergipark.org.tr<br>İnternet Kaynağı | %3 |
| 2 | acikbilim.yok.gov.tr<br>İnternet Kaynağı | %2 |
| 3 | Yong-Chun Li. "Antioxidative Effects and Anti-proliferative Effects of MeOH, BuOH and Ethyl Acetate Fractionated from Stephania delavayi Diels", Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 03/31/2009<br>Yayın | %1 |
| 4 | hdl.handle.net<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 5 | www.turkjbiochem.com<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | nek.istanbul.edu.tr:4444<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 7 | Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) | <%1 |