

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARACİĞER METASTAZI OLUŞTURULMUŞ
DENEYSEL METASTATİK MEME KANSERİ FARE
MODELİNDE PEGİLE DOKSORUBİSİN VE
FLUOKSETİN KOMBİNASYONUNUN
ANTİNEOPLASTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esin TATLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

KARACİĞER METASTAZI OLUŞTURULMUŞ
DENEYSEL METASTATİK MEME KANSERİ FARE
MODELİNDE PEGİLE DOKSORUBİSİN VE
FLUOKSETİN KOMBİNASYONUNUN
ANTİNEOPLASTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esin TATLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Gül ÖZBEY

Bu tez, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-1466 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 21/06/2018

İmza

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Gül ÖZBEY
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Selvinaz TAŞATARGİL
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin

Esin TATLI

İmza



Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Gül ÖZBEY

İmza



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca desteğini benden hiç esirgemeyen, bilgilerini tecrübesini benimle paylaşan fikirleriyle bana hep yol gösteren manevi olarak her zaman yanımda olan değerli danışman hocam sayın Dr.Öğr.Üyesi Gül Özbey'e,

Yüksek Lisans eğitiminin süresince göstermiş oldukları yardımlar için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Araştırmamın her aşamasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen manevi olarak hep yanımda olan değerli arkadaşlarım Devrim Topçu ve Merve Önder'e,

Sevgili aileme hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri ve bana her zaman inandıkları için tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Metastaz potansiyelinin yüksek olmasına bağlı olarak zayıf prognoza ve sınırlı tedavi seçeneklerine sahip olan üçlü negatif meme kanseri, en agresif meme kanseri alt tipidir. Üçlü negatif meme kanserinin uzak metastazlarında temel sorun ilaç direncidir. Bu tez çalışmasının amacı, fare metastatik meme kanseri modelinde pegile lipozomal doksorubisin ve fluoksetinin sinerjistik etkilerini araştırmaktır.

Yöntem: 4TLM fare meme kanseri karaciğer metastazı hücreleri dışı balb-c farelerin sağ memedeki yağ dokusuna enjekte edildi. Fareler 4 gruba randomize edildi: kontrol (0.1 ml/gün serum fizyolojik), fluoksetin (0.4 mg/kg/gün), pegile lipozomal doksorubisin (kümülatif olarak 17.5 mg/kg) ve pegile lipozomal doksorubisin (kümülatif olarak 17.5 mg/kg) - fluoksetin (0.4 mg/kg/gün) kombinasyonu. Tedavi boyunca primer tümör hacmi vernier kaliperi kullanılarak izlendi. Fareler 4. haftanın sonunda feda edildi. IL-6, IL-10, IL17A ve IFN-gama karma lökosit kültürü süpernatantlarında ELISA ile ölçüldü. Akciğer metastazları makroskopik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Primer tümör hacmi ve akciğer metastazları, pegile lipozomal doksorubisin ve pegile lipozomal doksorubisin-fluoksetin ile tedavi edilen gruplarda azaldı. Pegile lipozomal doksorubisin-fluoksetin tedavisi IL-10, IL17A ve IFN-gama düzeylerini arttırdı, IL-6 düzeylerini ise azalttı.

Sonuç: Pegile lipozomal doksorubisin ve pegile lipozomal doksorubisin-fluoksetin tedavileri primer tümör ve akciğer metastazları için etkin bulundu. Sitokin düzeyleri sadece pegile lipozomal doksorubisin-fluoksetin kombinasyonu ile değişti. Pegile lipozomal doksorubisin-fluoksetin kombinasyonu, farklı dozlarda primer tümör ve metastaz parametrelerini değiştirebilir.

Anahtar Kelimeler: pegile lipozomal doksorubisin, fluoksetin, meme kanseri

ABSTRACT

Objective: Triple-negative breast cancer is the most aggressive breast cancer subtype that has poor prognosis and limited effective treatment options due to the high metastasis potential. Drug resistance is a major therapeutic obstacle in metastatic triple-negative breast cancer treatment. In this thesis study, our objective was to investigate the synergistic effects of pegylated liposomal doxorubicin and fluoxetine in mice metastatic breast cancer model.

Method: Female mice were inoculated into right mammary fat pad with 4TLM murine breast cancer liver metastasis cells. Mice were randomized into four groups: control (0.1 ml/day, serum physiologic), fluoxetine (0.4 mg/kg/day), pegylated liposomal doxorubicin (cumulative dose of 17.5 mg/kg) and pegylated liposomal doxorubicin (cumulative dose of 17.5 mg/kg) - fluoxetine (0.4 mg/kg/day) combination. Primary tumor volume was monitored by using vernier caliper during the treatment. Mice were sacrificed at the end of the 4th week. IL-6, IL-10, IL17A and IFN-gamma were measured in mix leukocyte culture supernatants by ELISA. Lung metastasis was evaluated macroscopically.

Results: Primary tumor volume and number of lung metastasis decreased in groups treated with pegylated liposomal doxorubicin and pegylated liposomal doxorubicin-fluoxetine combination. Pegylated liposomal doxorubicin-fluoxetine treatment increased IL-10, IL17A and IFN-gamma levels, but decreased IL-6 levels.

Conclusion: Pegylated liposomal doxorubicin and pegylated liposomal doxorubicin-fluoxetine treatments were found to be effective for primary tumor and lung metastasis. Cytokine levels was changed only by pegylated liposomal doxorubicin-fluoxetine combination. Pegylated liposomal doxorubicin-fluoxetine combination, could influence primary tumor and metastasis parameters in different doses.

Key words: pegylated liposomal doxorubicin, fluoxetine, breast cancer

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Metastatik meme kanseri	2
2.2. Kanserde direnç mekanizmaları	3
2.3. Tümör mikroçevresinin önemi	4
2.4. Meme kanseri metastazlarında sitokinlerin önemi	5
2.4.1. İnterlökin-6	6
2.4.2. İnterlökin-10	8
2.4.3. İnterlökin-17A	8
2.4.4. İnterferon-gama	9
2.5. Pegile lipozomal doksorubisin	11
2.6. Fluoksetin	12
2.7. Pegile lipozomal doksorubisin ve fluoksetinin birlikte kullanımı	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	14
3.2. Kullanılan sarf malzemeler	14
3.3. Kullanılan cihazlar	15
3.4. İn vivo deneyler	15
3.4.1. Deney hayvanları	15
3.4.2. Deney protokolü	15
3.4.3. Primer tümörün takibi ve akciğer metastazların belirlenmesi	16
3.5. Karma lökosit kültürü	16
3.6. ELISA yöntemi ile sitokin düzeylerinin belirlenmesi	17
3.6.1. İnterlökin-6	17
3.6.2. İnterlökin-10	18
3.6.3. İnterlökin-17A	19
3.6.4. İnterferon-gama	21

3.7. İstatistiksel analizler	22
4. BULGULAR	23
4.1. Primer tümör bulguları	23
4.2. Akciğer metastazı bulguları	26
4.3. Karma lökosit kültürü bulguları	27
4.3.1. İnterlökin-6	27
4.3.2. İnterlökin-10	28
4.3.3. İnterlökin-17A	29
4.3.4. İnterferon-gama	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1A.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin primer tümör üzerindeki etkileri (1. Hafta)
- Şekil 1B.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin primer tümör üzerindeki etkileri (2. Hafta)
- Şekil 1C.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin primer tümör üzerindeki etkileri (4. Hafta)
- Şekil 2.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin akciğer metastazları üzerindeki etkileri
- Şekil 3.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkileri
- Şekil 4.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IL-10 düzeyleri üzerindeki etkileri
- Şekil 5.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IL-17A düzeyleri üzerindeki etkileri
- Şekil 6.** 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IFN-gama düzeyleri üzerindeki etkileri

SİMGELER ve KISALTMALAR

4T1	:	Fare metastatik meme kanseri hücre dizisi
4TLM	:	Fare metastatik meme kanseri karaciğer metastazı hücre dizisi
4TLM ^{RT}	:	Radyoterapi uygulanmış fare metastatik meme kanseri karaciğer metastazı hücre dizisi
AIDS	:	Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu
B16	:	Fare melanoma hücre dizisi
BRCA	:	Meme kanseri antijeni
BTP	:	Bayırturpu peroksidazı
C-26	:	Fare kolon karsinomu hücre dizisi
C3-TAg	:	Genetik olarak C3 (1)-T-Antijeni oluşturulmuş fare modeli
CD4	:	Farklılaşma kümesi molekülü 4
CD44	:	Farklılaşma kümesi molekülü 44
CD8	:	Farklılaşma kümesi molekülü 8
Con A	:	Konkanavalin A
CXC5	:	Sistein-X-sistein kemokin 5
DH	:	Dendritik hücre
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DOXO	:	Doksorubisin
ELISA	:	Enzim bağlı immün test
ER	:	Östrojen reseptörü
ESM	:	Ekstrasellüler matriks
FAK	:	Fokal adhezyon kinaz
FLU	:	Fluoksetin
FSS	:	Fötal sığır serumu
FTTÇ	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
g	:	Gram

GM-CSF	:	Granulosit–makrofaj koloni stimüle edici faktör
Gp 130	:	Glikoprotein 130
HCT-15	:	İnsan kolon adenokarsinomu hücre dizisi
HER2	:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IFN	:	İnterferon
IL-1	:	İnterlökin-1
IL-10	:	İnterlökin-10
IL-12	:	İnterlökin-12
IL-17A	:	İnterlökin-17A
IL-18	:	İnterlökin-18
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-6R	:	İnterlökin-6 reseptörü
IL-8	:	İnterlökin-8
IRF	:	İnterferon düzenleyici faktör
i.p.	:	İntraperitoneal
JAK	:	Janus kinaz
kg	:	Kilogram
KKH	:	Kanser kök hücresi
KW	:	Kruskal Wallis testi
L	:	Litre
LIF	:	Lösemiye inhibe eden faktör
LM	:	Karaciğer metastazlarından elde edilen hücre dizisi
LPS	:	Lipopolisakkarid
MAPK	:	Mitojenle aktive edilen kinaz
MCA	:	Sıçan hepatoma hücre dizisi
MCF7	:	İnsan meme adenokarsinomu hücre dizisi
MCF7/ADR ^R	:	Adriamisine dirençli insan meme adenokarsinomu hücre dizisi

MHC	:	Major doku uygunluk kompleksi
MIP-1 α	:	Makrofaj inflamatuvar protein-1 α
MKH	:	Mezenkimal kök hücre
MKKM	:	Meme kanseri karaciğer metastazları
ml	:	Mililitre
NFAT	:	Aktive T hücrelerinin nüklear faktörü
PEG-DOXO	:	Pegile doksorubisin
pg	:	Pikogram
PI3K	:	Fosfoinozitol-3 kinaz
PLD	:	Pegile lipozomal doksorubisin
PR	:	Progesteron reseptörü
RET	:	Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş
RNA	:	Ribonükleik asit
RPMI	:	Roswell Park Memorial Enstitüsü medyumunu
RT	:	Radyoterapi
SSA	:	Sığır serumu albümini
SSGI	:	Selektif serotonin geri alım inhibitörleri
STAT1	:	Sinyal dönüştürücü ve aktivatörü 1
STAT3	:	Sinyal dönüştürücü ve aktivatörü 3
T11/TP53	:	Ortotopik sinjenik kemirgen transplant modeli
TGF-beta	:	Tümörle indüklenen transforme edici büyüme faktörü beta
THR	:	T hücre reseptörü
TIL	:	Tümöre infiltre olmuş lenfosit
TM	:	Tümör mikroçevresi
TMB	:	Tetrametilbenzidin
TNF-alfa	:	Tümör nekrozis faktör- alfa
ÜNMK	:	Üçlü negatif meme kanseri

XR-75-1 : İnsan meme duktal karsinomu hücre dizisi



1. GİRİŞ

Kadınlarda en sık görülen kanser türünü oluşturan meme kanserinde karaciğer metastazları sağ kalım oranlarını düşürmektedir (Tampellini ve ark., 1997). Dünya genelinde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerde metastatik meme kanseri ikinci sırada yer almaktadır (Poonia ve ark., 2017). Meme kanserine bağlı mortalitenin en önemli sebeplerinden birisi de uzak organ metastazlarıdır (Soni ve ark., 2015). Heterojen hücre gruplarından oluşan kanser hücrelerinden bazılarının metastatik özellik kazanmasında tümör mikroçevresi ile etkileşimleri önemlidir (Soni ve ark., 2015).

Metastatik meme kanserinde kemoterapötik direnci sağ kalım oranlarını düşürmektedir (Velaei ve ark., 2016). Meme kanseri metastazlarının tedavisinde sık kullanılan DOXO tümör hücrelerinde sitotoksitenin yanında immünojenik apoptozis de oluşturmaktadır (Casares ve ark., 2005). Ancak DOXO'nun pegile lipozomal formülasyonunun immünmodülatör etkilerinden dolayı (Mantia-Smaldone ve ark., 2014) tümör mikroçevresi ile etkileşiminin doksorubisine göre farklılıklar gösterdiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Pawar ve ark., 2017).

Depresyon tedavisinde sık kullanılan bir SSGİ olan FLU deneysel meme kanseri modellerinde in vitro olarak sitotoksite oluştururken, in vivo uygulandığında sitokin/kemokin salıverilimini değiştirerek metastazı kolaylaştırıyor olabilir. Ayrıca, FLU'nun in vivo ve in vitro uygulaması ile elde edilen sonuçların çelişkili olması, tümör mikroçevresinde sitokin/kemokin salıverilimini değiştirmesi ile ilgili olabilir. Bu tez projesi ile metastatik meme kanserinde PLD ve FLU'nun primer tümör, metastaz ve sitokin/kemokin salıverilimi üzerindeki etkileri in vivo olarak ilk kez araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metastatik Meme Kanseri

Kadınlarda dünya genelinde en sık görülen kanser türünü oluşturan meme kanseri (Torre ve ark., 2015), kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Velaie ve ark., 2016). Her yıl yaklaşık olarak 1 milyon kadın meme kanseri tanısı almakta ve 400.000 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Jemal ve ark., 2010; Kamangar ve ark., 2006). Meme kanserinin fenotipik ve genotipik olarak heterojen bir kanser türü olması, meme kanseri tedavisini zorlaştırmaktadır (Fertig ve ark., 2015; Wu ve ark., 2015). Primer meme kanserleri ÜNMK, HER2 negatif, luminal A ve luminal B olmak üzere moleküler olarak 4 alt grupta incelenmektedir (Fertig ve ark., 2015). Karakteristik moleküler özellikleri ve klinik seyirleri birbirinden farklı olan 4 primer meme kanseri alt grubu içerisinde, en agresif ve metastatik olanı ÜNMK alt tiptir. ÜNMK tip, meme kanseri hücrelerindeki tipik reseptörler olan ER, PR ve HER2 reseptörünü eksprese etmemektedir (Lehmann ve ark., 2011).

Tüm meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturan bazal (üçlü-negatif) meme kanseri genç kadınlarda daha sık görülmektedir (Morris ve ark., 2007). ÜNMK'de genellikle tanı anında primer tümörün daha büyük, histolojik sınıflandırması daha ileri, lenf nodu metastazı bulunan ve biyolojik olarak daha agresif olduğu görülür (Haffty ve ark., 2006; Morris ve ark., 2007). ÜNMK'de primer tümörde cerrahi öncesi kemoterapiye yanıt oranları yüksek olsa da, ÜNMK hastalarında meme kanserinin diğer alt tiplerine göre uzak organ metastazlarına daha sık rastlanmakta ve prognozun oldukça düşük olduğu görülmektedir (Haffty ve ark., 2006; Dent ve ark., 2007). ÜNMK'de prognozun düşük olmasının nedenlerinden bir tanesi de, tümörün hormon reseptörleri (ER, PR, HER2) eksprese etmemesinden dolayı hormonal tedaviye yanıt vermemesidir (Eroles ve ark., 2010). Bu nedenle ÜNMK'de tedavi ancak yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesi ile mümkündür (Fertig ve ark., 2015).

Kadınlarda meme kanseri, kanser ölümlerinin başında yer almaktadır (Torre ve ark., 2015). 2012 verilerine göre meme kanserinin insidansı 1.7 milyon, meme kanserine bağlı mortalite sayısı ise 521.900 olarak bildirilmiştir (Torre ve ark., 2015). Meme kanserinin kadınlar arasında tüm kanserlerin %25'ini ve kanserle ilişkili ölümlerin %15'ini oluşturduğu (Torre ve ark., 2015), meme kanserinin tedavisi sırasında

meydana gelen ölümlerin ise yaklaşık olarak %90'ının metastaza bağlı olarak geliştiği saptanmıştır (Clarke ve ark., 2005; Soni ve ark., 2015). Meme kanseri hastalarının tanı anında yaklaşık olarak %20-%30'unun uzak metastaz geliştirdiği bilinmektedir (Kennecke ve ark., 2010; Redig ve ark., 2013). Kemik, karaciğer, akciğer ve beyin, meme kanseri metastazları için uygun dokular olarak kabul edilmektedir (Gerratana ve ark., 2015; Foulkes ve ark., 2010). Karaciğer metastazı tanısı alan meme kanseri hastalarında sağ kalım oranı (24-33 ay) oldukça düşüktür (Tampellini ve ark., 1997). MKKM nasıl oluştuğu ve mekanizmaları giderek daha fazla anlaşılmaya başlanmıştır (Ma ve ark., 2015). MKKM ile meme kanserinin spesifik alt tipleri arasında doğrudan bir ilişki saptanamamasına karşın, ilişkili oldukları düşünülmektedir (Smid ve ark., 2008; Rodriguez-Pinilla ve ark., 2006; Duan ve ark., 2013). MKKM ile ilgili araştırmalardan elde edilen bilgilerle göre meme kanserinde karaciğer metastazı için önerilen modellerden bir tanesi de Ma ve ark. tarafından bildirilmiştir (Ma ve ark., 2015). Bu modele göre MKKM'nin oluşması aşağıdaki sırayla gelişir; 1) intravazasyon: invaziv meme kanseri hücreleri, tümör içerisindeki kan damarlarının endotelini geçerek kan dolaşımına ulaşır. 2) sirkülasyon; meme kanseri hücreleri kan dolaşımında sağ kalabilmek için hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarını kaybederler. 3) marjinyasyon: kan dolaşımındaki tümör hücreleri karaciğer sinüzoidlerindeki endotelial hücrelere kaderinler, integrinler ve CD44 gibi adhezyon molekülleri aracılığıyla tutunurlar. 4) ekstravazasyon: karaciğer sinüzoidlerinde tutunmuş olan meme kanseri hücreleri sinüzoidal endotelial hücrelerin endotelial duvarını geçerek karaciğerde yerleşir ve prolifer olmaya başlar. 5) kolonizasyon: meme kanseri hücreleri sağ kalarak ve hipoksiyi indükleyen faktörlerle düzenlenen genler, ER, PR, HER2 ekspresyonları ve anjiyogenezi değiştirerek karaciğerdeki mikroçevreyi regüle eder ve makrometastazlar oluştururlar.

2.2. Kanserde Direnç Mekanizmaları

Karsinoma hücreleri içerisinde hangi hücrelerin tedaviye dirençli olduğu ve/veya metastaz yapabildiği ile ilgili iki teori kabul edilmektedir (Zahreddine ve ark., 2013). KKH modeline göre, metastatik hücrelerin kök hücre özellikleri taşıdığı/edindiği ve pek çok tedaviye dirençli olduğu bilinmektedir (Charafe-Jauffret ve ark., 2009). KKH modelinde, tümör hücrelerinin küçük bir kısmını oluşturan ve KKH olarak adlandırılan bazı hücreler tümörü başlatma özelliğine sahiptir (Teicher 2006; Nguyen

ve ark., 2012). Bu hipoteze göre, KKH'ler normal dokudaki kök hücrelerin ya da progenitor hücrelerin kendi kendini tamir mekanizmalarının disregülasyonu sonucu oluşurlar (Zahreddine ve ark., 2013). Kendi kendini tamir mekanizmalarının disregülasyonunun yanısıra DNA onarımının etkinliğinin artması (Park ve ark., 2005; Potten ve ark., 2002; Cai ve ark., 2004), hücre siklusundaki değişiklikler (Venezia ve ark., 2004), antiapoptotik proteinlerin ve ilaç taşıyıcı proteinlerin aşırı ekspresyonları (Wang ve ark., 2003; Krishnamurthy ve ark., 2004; Gottesman ve ark., 2002) gibi moleküler mekanizmalardaki farklılıklar KKH'lerin kemoterapötiklere dirençli olma halini açıklayabilir. Tümör içerisindeki KKH hücre popülasyonunun varlığı, bu hücrelerin yukarıda sayılan özelliklerinden dolayı hücre döngüsüne bağlı olarak etkilerini gösteren geleneksel kemoterapi stratejilerini etkisiz kılmaktadır (Zahreddine ve ark., 2013).

Çevresel etkenlere bağlı ilaç direnci modeline göre ise, kanser hücrelerinin tümör mikroçevresindeki faktörlere bağlı olarak direnç kazandığı kabul edilmektedir (Zahreddine ve ark., 2013). Kanser hücreleri ilaçlara maruz kaldıklarında koruyucu mekanizmalarının aktivasyonu ve genetik değişiklikler sonucu daha dirençli bir fenotip kazanarak kendi mikroçevrelerini de değiştirirler (Braun ve ark., 2000; Meads ve ark., 2009). Kanser tedavisi sonucunda sağkalan ve relapsa neden olabilen bu dirençli hücreler KKH olabilir ya da olmayabilir (Meads ve ark., 2009; Bidard ve ark., 2008; Matsunaga ve ark., 2003). Çevresel etkenlere bağlı ilaç direnci modeli mikroçevredeki hem solubl faktörlere hem de hücre adhezyon moleküllerine bağlı gelişebilir (Zahreddine ve ark., 2013). Solubl faktörlere bağlı ilaç direnci, sitokinler, kemokinler ya da büyüme faktörleri gibi mikroçevrede yer alan fibroblastlar gibi diğer hücrelerden salgılanan faktörlerle tümör hücrelerinde gen transkripsiyonunun değiştirilmesi ile meydana gelebilir (Meads ve ark., 2009).

2.3. Tümör Mikroçevresinin Önemi

Son yıllarda yapılan çalışmalarda TM'deki farklılıkların meme kanseri hücrelerinin fenotipini değiştirebildiği ve TM ile kanser hücreleri arasında karşılıklı etkileşimler olduğu gösterilmiştir (Holzel ve ark., 2013). TM ile kanser hücresi arasındaki karşılıklı etkileşimler hem primer tümördeki büyümeyi ve hem de uzak organ metastazlarını etkilediğinden, TM üzerinde etkileri olan kemoterapötiklerin kullanılması metastatik meme kanserinin tedavisinde akılcı bir strateji olabilir (Fertig

ve ark., 2015). Stromal hücreler, ESM ve solubl faktörlerden oluşan TM ile tümör hücreleri arasındaki intersellüler sinyalizasyon meme kanseri hücrelerinde büyüme ve metastazı indükleyebilir (Lee ve ark., 2014). Bu nedenle meme kanserinde yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmaların önemli bir kısmı TM'ye odaklanmıştır (LaBarge 2010; McMillin ve ark., 2013; Narunsky ve ark., 2014). Tümör hücrelerinde ilaç yanıtı sadece hücredeki intrinsik faktörlerle değil, TM'deki hücrelerin salgıladığı faktörler tarafından da kontrol edilir. TM'yi oluşturan stromal hücreler, fibroblastlar, immün hücreler, vasküler endotel hücreleri ve ESM, sadece antikanser ilaçlara tedavi yanıtını belirlemekle kalmaz aynı zamanda tümör hücrelerindeki proliferasyonu, invazyonu ve metastazı da kontrol ederler (Paget 1989; Villanueva 2013). TM'den salgılanan sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri uzak organ metastazlarını ve buna bağlı olarak meme kanserinde mortaliteyi etkilemektedir (Paget 1989; Hanahan ve ark., 2011). Memeli hücrelerinden salgılanan ve hücre içi sinyalizasyonda önemli rollere sahip solubl proteinler olarak tanımlanabilen sitokinler, tümör hücrelerinde büyümeyi, ilaç direncini ve metastazı indükleyen inflamatuvar sinyallere aracılık ederler (Elinav ve ark., 2013).

2.4. Meme Kanseri Metastazlarında Sitokinlerin Önemi

Meme kanserinin etyolojisi multifaktöriyeldir ve gelişim süreci on yıllara yayılabilir. Tümördeki çeşitli hücrelerin her birinden salgılanan faktörler, tümör hücrelerinin birbirleri ve TM ile sinyalizasyonunu düzenleyerek, meme kanserinin gelişimini ve metastazı regüle ederler (Lee ve ark., 2014). Özellikle de salgılanan faktörlerden sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri uzak metastazı ve sonrasında mortaliteyi etkilerler (Hanahan ve ark., 2011).

İmmün sistem yanıtındaki değişikliklerin meme kanserine yol açtığı gösterilmiştir (McArthur ve ark., 2016). Tümörögenesis sürecinde immün sistem yanıtının zayıf olması, TIL'lerin TM'deki sitokinler tarafından inhibe edilmesi ile de açıklanmaktadır (Velaei ve ark., 2016). Meme kanserinin zayıf immünojenik özelliğe sahip olması immün sistem tarafından tanınmasını zorlaştırmaktadır (Pedersen ve ark., 2017). Ek olarak, bazı sitokinlerin tümör büyümesini inhibe eden ve hatta bazı durumlarda gerilemesine neden olan dendritik hücreler, lenfokinle aktive olmuş doğal öldürücü hücreler gibi antitümör efektörlerin oluşumunu ve/veya etkilerini arttırdığı da yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Kitamura ve ark., 2015).

Son yıllarda, klinik seyri oldukça değişken olan meme kanserinde sitokinlerin prognoz faktörleri olabileceği bildirilmiştir (Knupfer ve ark., 2007). İmmün sistemin hem doğuştan gelen hem de kazanılmış kısımlarının antitümöral yanıtta önemli rollere sahip olduğunun gösterilmesi, araştırmaların immün sistem ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimi sağlayan sitokinler gibi tümör mikroçevresindeki çeşitli faktörler üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur (Ben-Baruch 2003; Dranoff 2004).

Sitokinler hedef hücrelerin aktivasyonunu, farklılaşmasını ve/veya proliferasyonunu inhibe ya da stimüle ederek immün yanıtın yoğunluğunu ve süresini düzenleyen düşük moleküler ağırlığa sahip solubl proteinler ya da glikoproteinlerdir (Yao ve ark., 2016). TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, IL-10'yı kapsayan sitokinler ve interferonlar immün sistemi kontrolünde önemli rollere sahiptirler. Makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılan ve parakrin ya da otokrin etkileriyle hedef hücrelerinin fonksiyonunu değiştirebilen sitokinler yapısal ve fonksiyonel olarak birçok ortak özelliklere sahiptirler: (1) glikolize olmaya eğilimli polipeptidlerdir, (2) çok düşük konsantrasyonlarında (pg/ml, ng/ml) biyolojik aktivite gösterirler, (c) etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak gösterirler, (d) pleitropiktirler, (e) aditif, sinerjistik ya da antagonistik etkilere sahiptirler. Çeşitli sitokin ve kemokinlerin yukarıdaki belirtilen ortak özellikleri bulunmasına karşın, meme kanserinin başlangıcı ve progresyonunda farklı rolleri bulunmaktadır (Esquivel-Velazquez ve ark., 2015).

2.4.1. İnterlökin-6

IL-6, 4 alfa heliks yapıda bir glikoproteindir. IL-6, IL-6R'nün 80 kDa'luk alt ünitesine bağlanarak bir polipeptid zincir sinyal transdüktörü olan Gp130 ile heterodimerize olur. Bu reseptör kompleksinin oluşumu, Gp130 proteinin sitoplazmik kısmının fosforile edilmesini sağlayan JAK'ın aktivasyonu ve fosforilasyonuna neden olur (Hibi ve ark., 1990; Kishimoto ve ark., 1995). Gp130 proteinin sitoplazmik kısmının fosforilasyonu ise gen transkripsiyonunu düzenleyen MAPK, PI3-kinaz, STAT1 ve STAT3 gibi hücre içi yolların aktivasyonu ile sonuçlanır (Heinrich ve ark., 1998).

IL-6'nın meme karsinomunda hem antitümöral hem de protümöral etkileri olduğu bildirilmiştir (Knupfer ve ark., 2007). Meme kanseri hastalarında yapılan

çalışmaların çoğunda serum IL-6 düzeylerinin negatif prognoz belirtisi olduğu bildirilmesine karşın (Kozlowski ve ark., 2003; Yokoe ve ark., 2000; Jiang ve ark., 2000; Bozcuk ve ark., 2004; Zhang ve ark., 1999), erken dönemdeki invazif meme kanseri hastalarında yakın zamanda yapılan bir çalışmada IL-6 ve IL-10'nun iyi prognoz belirteçleri oldukları gösterilmiştir (Ahmad ve ark., 2017). IL-6 ve IL-6R'deki DNA, RNA ve protein düzeylerindeki değişimlerin kanser prognozu ile, IL-6'daki polimorfizmlerin ise meme kanseri riski ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Yao ve ark., 2016).

Meme kanseri hücre dizilerinde yapılan in vitro çalışmalarda da IL-6 ile ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Doksorubisine maruz bırakılarak çoklu ilaç direnci oluşturulmuş MCF7/ADR^R meme kanseri hücrelerinin süpernatantlarında, parenteral duyarlı MCF7 hücre dizilerine göre daha yüksek IL-6 seviyeleri tespit edilmiştir (Conze ve ark., 2001). Yukarıdaki çalışmanın bulgularının tersine Chiu ve ark., MCF7 ve ZR-75-1 ER (+) insan meme kanseri hücre dizilerinde 6 gün boyunca 5 ng/ml IL-6 tedavisinin bir apoptozis belirtisi olan DNA fragmentasyonunu indüklediğini göstermişlerdir (Chiu ve ark., 1996). IL-6'nın apoptozisi indükleyici etkilerine karşın meme kanseri hücrelerinde motiliteyi artırarak metastazı kolaylaştırdığı da bildirilmiştir (Arihiro ve ark., 2000; Verhasselt ve ark., 1992). Asgeirsson ve ark., IL-6'nın meme kanseri hücre dizilerinde hücre adhezyonunu ve E-kaderin ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (Asgeirsson ve ark., 1998). Yukarıdaki çalışmaların bulguları doğrultusunda IL-6'nın etkilerinin tümör hücresinin hücre siklusunun hangi evrede bulunduğuna göre değiştiği söylenebilir (Knupfer ve ark., 2007).

Meme kanseri hücre dizilerinde ER'nün IL-6 ekspresyonunu azalttığı ve dolayısıyla ER (-) tümör hücrelerinde invazyon ve metastaz kapasitesinin artabileceği bildirilmiştir (Bhat-Nakshatri ve ark., 2004). Fibroblastlardan salıverilen IL-6'nın, ER ekspresyonunu azalttığı ve luminal meme kanseri hücrelerinde tamoksifene olan direnci arttırdığı gösterilmiştir (Sun ve ark., 2014). Ek olarak, fibroblastlardan ya da MKH'den salıverilen IL-6, STAT3 sinyalizasyonuna bağlı mekanizmalar yoluyla meme kanseri hücrelerinde büyümeyi, invazyonu ve migrasyonu arttırdığı da gösterilmiştir. ÜNMK'de diğer meme kanseri alt tiplerine göre IL-6'nın daha yüksek düzeylerinin eksprese edildiği gösterilmiştir. IL-6 geninin ekspresyonunun azaltılmasının deney hayvanlarında tümör gelişimini ve büyümesini inhibe ettiği

bildirilmiştir (Hartman ve ark., 2013). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, IL-6R/JAK kompleksinin, RET/FAK kompleksi ile etkileşerek ER (+) meme kanseri hücrelerinde migrasyon ve invazyonu modüle ettiği gösterilmiştir (Brocke-Heidrich ve ark., 2004).

Yukarıda özetlenen literatür bilgileri IL-6'nın meme kanserinin alt tiplerine, hastanın hangi evrede olduğuna, tümörün ilaca duyarlı olup olmamasına bağlı olarak hem protümöral hem de antitümöral etkileri olabileceğini, ancak metastazları kolaylaştırabileceğini göstermektedir.

2.4.2. İnterlökin-10

IL-10, karsinomlarda iki yönlü etkilere sahip bir başka sitokindir, hem antitümöral hem de protümöral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Hamidullah ve ark., 2012). Sitokin sentez inhibitörü faktörü olarak da bilinen IL-10, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF, MIP-1 α , LIF gibi birçok sitokini inhibe ettiği gibi kendi salıverilimini de inhibe eder (Moore ve ark., 1993).

IL-10 meme kanserinin başlangıcı ve progresyonunda karmaşık bir role sahiptir. IL-10'nun doğal öldürücü hücrelerinin ya da CD8⁺ veya CD4⁺ T hücrelerinin aktivitesini artırarak antitümöral etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Kundu ve ark., 1996; Mocellin ve ark., 2005). Yukarıdaki bulgulara zıt olarak, IL-10'nun kansere karşı oluşan immün yanıtı baskıladığı ile ilgili yayınlar da literatürde mevcuttur (Pinzon-Charry ve ark., 2005; Venetsanakos ve ark., 1997). IL-10'nun tümöral immün yanıtı baskılama mekanizmaları arasında, doğuştan ve edinilmiş tümöral immün yanıtlar arasındaki etkileşimin inhibisyonu ve tümör hücrelerinden salıverilen faktörlerle dendritik hücre fonksiyonlarının inhibe edilmesi yer almaktadır (Pinzon-Charry ve ark., 2005). Yani IL-10, immünsüpresyonu indükleyerek ve tümör hücrelerinin immünsürveyanstan kaçışına yardım ederek protümöral etkiler de gösterebilmektedir. Diğer modüle edici faktörlerin ortamdaki varlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak IL-10, meme kanserinde hem inhibitör hem de proliferatif etkiler oluşturabilmektedir (Hamidullah ve ark., 2012).

2.4.3. İnterlökin-17A

IL-17, T helper 17, gama delta T hücreleri, doğal öldürücü hücrelerinden salıverilen proinflamatuvar bir sitokindir (Welte ve ark., 2015). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, IL17'nin kanserde progresyonu arttırdığını göstermiştir. IL17A'nın tümör

hücrelerinde sağkalımı, invazifliği arttırdığı, myeloid türevi süpresör hücrelerle etkileşerek antitümör immün yanıtı baskıladığı ve IL17A'nın bu etkilerine CD8⁺ T hücre aktivitesinin baskılanması, CD8⁺ T hücre aktivitesini baskılayan myeloid türevi süpresör hücrelerin arttırılması, tümör hücrelerinde CXCL5 ekspresyonunun arttırılmasının da aracılık ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ma ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2008; Welte ve ark., 2015). IL17A'nın inhibe edilmesinin ise tümöre infiltre olmuş lenfositlerle oluşan sitotoksisiteyi arttırarak kolon ve akciğer kanseri fare modellerinde tümör süpresyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Reppert ve ark., 2011; Hayata ve ark., 2013). Yukarıdaki bulgularla uyumlu olarak 4T1 fare meme kanseri modelinde tümörle indüklenen TGF- β CD8⁺ T hücrelerinde IL-17 salıverilimini arttırdığı, 4T1 fare metastatik meme kanseri hücre dizilerinde IL-17 uygulamasının apoptozisi azalttığı, 4T1 hücreleri ile oluşturulan fare metastatik meme kanseri modelinde IL-17R geni silindiğinde apoptozisin arttığı ve in vivo olarak tümör büyümesinin azaldığı bildirilmiştir (Nam ve ark., 2008). Literatürde IL17A'nın meme kanserinde zayıf prognoz ile ilişkili olduğu ve tümör hücrelerinde IL17 reseptör ekspresyonunun arttığını bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Welte ve ark., 2015). ER (-) meme kanseri hastalarından alınan tümör dokularında yapılan bir çalışmada ise IL17A ve diğer bazı sitokin düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Chavey ve ark., 2007). Fare meme kanseri modelinde yapılan bir başka çalışmada IL17 tedavisi tümör büyümesini ve anjiyogenezi arttırmıştır (Du ve ark., 2012). Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında, bu tez projesinde çalıştığımız sitokinler içerisinde IL-17A düzeylerinin hem primer tümör progresyonu ve hem de metastazlar ile pozitif korelasyon gösterebileceği söylenebilir.

2.4.4. İnterferon-gama

IFN'ler sitokin sınıfı içinde yer alan homodimerik solubl proteinlerdir ve konakçı hücrelere viral replikasyon ile interfere olma yeteneklerinden dolayı bu isim verilmiştir (Isaacs ve ark., 1957). IFN'ler interferon-alfa ve interferon beta'dan oluşan Tip I IFN'ler, Tip II interferon IFN-gama ve en son keşfedilen Tip III IFN, IFN-deltadan oluşur (Yao ve ark., 2016). Tip II IFN (IFN-gama) ise IFN-gama reseptörüne bağlandıktan sonra JAK1/2 proteinlerinin, JAK1/2 proteinleri de STAT1 proteinlerinin aktivasyonuna yol açar. Aktive olan STAT1 proteinleri ise dimerize olarak nükleusta IFN-gamanın transkripsiyonel etkilerini oluşturur (Wang ve ark., 1998).

Literatürde IFN-gamanın kanser hücrelerinde sitotoksik etkilere sahip olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Yao ve ark., 2016). IFN-gama uygulamasının, multipl over kanser hücre dizilerinde hücre ölümünü indüklediği (Wall ve ark., 2003), over kanseri hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada da IFN-gamanın kaspaz bağımlı apoptozisi ve hücre siklusu arrestini indüklediği bildirilmiştir (Barton ve ark., 2005). IFN-gamanın direkt etkileri dışında sitotoksik T hücreleri aracılığı ile oluşturduğu indirekt etkileri de bulunmaktadır (Yao ve ark., 2016). Ekzojen uygulanan IFN-gamanın, MHC I/II proteinlerini arttırarak kanser hücre dizilerini sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan lizise daha duyarlı hale getirildiği Propper ve ark. tarafından gösterilmiştir (Propper ve ark., 2003). Bu çalışmalar kanser hücrelerinde tip II IFN sinyalizasyonunun hem immün hücreler aracılı hem de immün hücrelerden bağımsız mekanizmalarla sağkalımı inhibe ettiğini göstermektedir (Yao ve ark., 2016).

IFN-gama aktivitesi ve ekspresyonundaki azalmaların tümör büyümesini arttırdığı da bildirilmiştir. MCA ve B16 hücreleri ile oluşturulmuş in vivo malign melanom modellerinde, IFN-gama geni silinmiş ya da tümör gelişimi sırasında önemli bir IFN-gama kaynağı olan gama delta T hücrelerinden yoksun farelerde yabancı farelerden daha fazla tümör geliştirdiği gösterilmiştir (Gao ve ark., 2003). İnsandaki birçok karsinomada, azalan IFN-gama ve IFN-gama reseptörü RNA ve protein ekspresyon düzeyleri rekürrens ve tümörde malignansinin artmasıyla ilişkili bulunmuştur (Yao ve ark., 2016). IFN-gamanın, tümör hücreleri üzerinde direkt etkileri ile ya da IL-12'nin tümör baskılayıcı etkileri aracılığıyla primer tümör üzerinde inhibitör etki gösterdiği de in vivo hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (Nastala ve ark., 1994).

Metastatik odakların yerleşmesi sırasında da IFN-gama sinyalizasyonunun disregüle olması oldukça önemli bir role sahiptir. IFN-gama ya da IFN-gama reseptör geni silinmiş in vivo kanser modellerinde, tümör gelişiminin yanında metastazlarında artmış olduğu gösterilmiştir (Kaplan ve ark., 1998). Akciğer metastazı oluşturulmuş fare modelinde yapılan bir başka çalışmada IFN-gama ve IFN-gama tarafından indüklenen transkripsiyon faktörü IRF-1'in, doğal öldürücü hücreler aracılı metastatik hücre yıkımında gerekli olduğu gösterilmiştir (Ksienzyk ve ark., 2011). Aynı çalışmada IFN-gama uygulaması metastatik akciğer nodüllerinin sayısını azaltmış ve bu etki doğal öldürücü hücre popülasyonunun selektif olarak azaltıldığı veya IRF-1 geninin silindiği farelerde ortadan kalkmıştır (Ksienzyk ve ark., 2011).

Yukarıdaki bulgularla ters olarak, IFN-gamanın TM'de tümör hücrelerinin eradikasyonunu azalttığı (Mojic ve ark., 2017), self-toleransı ve immün evazyonu arttırdığı da bildirilmiştir (Lin ve ark., 2017; Nirschl ve ark., 2017; Mo ve ark., 2018). IFN-gamanın kanser üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar, sadece tümörün başlaması ve progresyonunda değil aynı zamanda tümör immünojenisitesinin oluşturulmasında ve tümör hücrelerinin immünoevazif özellikler kazanmasında da etkileri olduğunu göstermektedir (Dighe ve ark., 1994; Kaplan ve ark., 1998). IL-6 ve IL-10 ile benzer şekilde IFN-gama da karsinomlarda ve metastazlar üzerinde iki yönlü etkiler göstermektedir.

2.5. Pegile Lipozomal Doksorubisin

Antikanser (terapötik) etkilerini DNA sentez inhibisyonu yoluyla oluşturduğu kabul edilen antrasiklin grubu ilaçlar arasında yer alan DOXO (adriamisin), sağ kalım oranlarındaki üstünlüğü nedeniyle meme kanseri tedavisinde uygulanan kemoterapi protokollerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydinlik ve ark., 2017). Son yıllarda yapılan çalışmalar doksorubisinin de içinde bulunduğu bazı kemoterapötiklerin antikanser etkilerinin sadece sitotoksik etkilerinden kaynaklanmadığını göstermiştir (Wu ve ark., 2018). Sitotoksik ilaçlardan bazılarının indüklediği tümör hücre ölümünün immün sistem hücrelerini indükleyerek sitokin/kemokin salıverilimini değiştirebileceği ve immün sistem üzerindeki bu etkilerinin terapötik etkilerine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Apetoh ve ark., 2008). DOXO, tümör hücreleri üzerinde immünojenik apopitozis oluşturmakta yani tümör hücrelerinde sitotoksik etki oluşturmaya ek olarak immün hücrelerdeki antitümöral yanıtı da indüklemektedir (Casares ve ark., 2005). İn vivo tümör modellerinde DOXO'nun tümör aşılari ile birlikte uygulandığında tümör aşılariinin etkinliğini artırması (Machiels ve ark., 2001; Eralp ve ark., 2004), immünstimülator sitokinlerle birlikte uygulandığında sinerjistik etki oluşturmaları (Ehrke ve ark., 2000; Ewens ve ark., 2006), DOXO'nun immünojenik ilaçlarla kombinasyonunun terapötik etkide artma oluşturabileceğini önermiştir. Ancak kümülatif doz-bağımlı kardiyotoksisite ve hematotoksik yan etkiler DOXO'nun kullanımını sınırlamaktadır (O'Brien ve ark., 2004).

DOXO'nun terapötik indeksini arttırmak için geliştirilmiş nanopartikül formülasyonu PLD, metastatik meme kanseri, ileri evre over kanseri, ileri evre multipl myelom ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkom hastalarında kullanılmaktadır (Duggan ve ark.,

2011). Nanopartiküllerin immün sistem üzerindeki etkileri ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar nanopartiküllerin immünsupresif etki oluşturduğunu bildirirken, diğerleri immünstimülatör etki oluşturduğunu göstermektedir (Prabhakar ve ark., 2013; Dobrovolskaia ve ark., 2007). DOXO ve PLD'nin sistemik ve tümör dokusundaki biyoyararlanımının in vivo meme kanser modellerinde (C3-Tag, T11/TP53Null) karşılaştırıldığı bir çalışmada iki ilacın plazma eğri altında kalan alan değerleri benzer olmasına karşın, PLD'nin tümör dokusuna DOXO'ya kıyasla 2 kat daha fazla geçtiği gösterilmiştir (Song ve ark., 2018). Aynı çalışmada farklı tümör mikroçevrelerine sahip in vivo C3-Tag, T11/TP53Null meme kanseri modellerinde PLD'nin etkilerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla PLD'nin antitümöral etkisini belirleyen faktörlerden bir tanesi de tümör mikroçevresidir. PLD immüfenotip olarak farklılıklar gösteren BRCA (-) ve yabancı-tip over kanseri modellerinde in vivo uygulandığında etkilerinin tümör mikroçevresine göre değiştiği de gösterilmiştir (Mantia-Smaldone ve ark., 2014). İn vivo over kanseri fare modelinde PLD ve IL18'in birlikte uygulandığı bir çalışmada sinerjistik antitümöral etki oluştuğu görülmüştür (Alagkiozidis ve ark., 2009). Preklinik çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar sonrasında yapılan Faz I çalışmasında PLD-IL18 kombinasyonunun güvenilirliği ve farmakokinetik profili belirlenmiş, Faz II çalışmaları için uygun bir ilaç adayı olarak gösterilmiştir (Simpkins ve ark., 2013).

2.6. Fluoksetin

SSGİ etkinlik ve güvenilirliklerinin yüksek olması nedeniyle depresyon tedavisinde en sık kullanılan antidepresan ilaç grubudur. SSGİ'lerin prototipi olan FLU 1988 yılından beri depresyon ve anksiyete tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antidepresandır (Slingsby 2002). Yakın dönemde yapılan çalışmalarda SSGİ'lerin antitümöral etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Kannen ve ark., 2012; Gil-Ad ve ark., 2008; Serafeim ve ark., 2003; Amit ve ark., 2009; Abdul ve ark., 1995). Ancak SSGİ'lerin meme kanseri üzerindeki etkileri konusunda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. FLU mikromolar dozlarında insan meme kanseri hücre dizilerinde proliferasyonu inhibe ederken (Zhang ve ark., 2013; Volpe ve ark., 2003), dimetilbenzantrazen ile indüklenen in vivo sıçan meme kanseri modelinde tümör sıklığını arttırmıştır (Brandes ve ark., 1992). Epidemiyolojik çalışmalarda ise antidepresan kullanımının meme kanseri riskini arttırmadığı gösterilmiştir (Coogan ve ark., 2005; Wernli ve ark., 2009). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada in

vivo uygulanan FLU tümör mikroçevresinde sitokin/kemokin salıverilimini değiştirmiştir (Ghosh ve ark., 2015). FLU in vitro ve in vivo uygulanması ile elde edilen sonuçlardaki çelişkiler, ilacın hem hücre proliferasyonu hem de sitokin/kemokin salıverilimi üzerinde etkileri olmasından kaynaklanıyor olabilir.

2.7. Pegile Lipozomal Doksorubisin ve Fluoksetinin Birlikte Kullanımı

Depresyon prevalansının %10-25 arasında olduğu tahmin edilen meme kanseri tanısı almış kadınlar arasında da antidepresan ilaç kullanımı yaygındır (Fann ve ark., 2008; Suppli ve ark., 2011). Bu durum depresyon tedavisinde en sık kullanılan antidepresan ilaç grubu SSGİ'lerin kemoterapötiklerle eş zamanlı kullanılma olasılığını arttırmaktadır. DOXO ve FLU'yu birlikte içeren lipozomal formülasyonun insan meme kanseri hücre dizilerinde (Ong ve ark., 2011), DOXO ve FLU'nın in vivo olarak uygulamasının ise kolon kanseri fare modellerinde (C-26, HCT-15) (Argov ve ark., 2009; Peer ve ark., 2004) sinerjistik etki oluşturabileceği gösterilmiştir. Ancak literatürde metastatik meme kanserinde PLD-FLU kombinasyonunun in vivo uygulanmasının primer tümör ve metastaz üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

SSGİ'lerin prototipi olan FLU'nun meme kanseri üzerindeki etkileri ile ilgili in vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Metastatik meme kanserinde ilk seçenek kemoterapötiklerden kabul edilen DOXO, tümör hücreleri üzerinde sitotoksisite oluşturmasının yanında immünojenik apoptozis de oluşturduğu için ilacın etkinliği açısından tümör mikroçevresi önemlidir. PLD etki ve yan etki profillerindeki üstünlük nedeniyle metastatik meme kanserinde doksorubisine göre daha sık kullanılmaktadır. DOXO'nun etkinliğini arttırmak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla geliştirilmiş PLD'nin tümör mikroçevresi üzerinde etkileşimi ortamda FLU bulunduğunda farklılaşabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Fluoksetin hidroklorid (Sigma Aldrich, F132)
2. Pegile Lipozomal Doksorubisin (CAELYX® 2 mg/ml konsantre infüzyon çözeltisi)
3. RPMI 1640 besiyeri (Thermo Scientific, 11875093)
4. L-glutamin 200 mM (Thermo Scientific, 25030)
5. 2-merkaptoetanol (Sigma Aldrich, M6250)
6. Fötal sığır serumu (Thermo Scientific, 10270106)
7. Gentamisin (Genta® 80 mg, 2 ml ampül)
8. Lipopolisakkarid (Sigma Aldrich, 62325)
9. Konkanavalin-A (Sigma Aldrich, C5275)
10. Sodyum klorür (Sigma Aldrich, S9888)
11. Potasyum klorür (Sigma Aldrich, P3911)
12. Sodyum fosfat monobazik (Sigma Aldrich S9638)
13. Potasyum dihidrojen fosfat (Sigma Aldrich, P5655)
14. Fare IL-6 ELISA kiti (Biolegend, 431303)
15. Fare IL-10 ELISA kiti (Biolegend, 431403)
16. Fare IL-17A ELISA kiti (Biolegend, 432503)
17. Fare IFN gama ELISA kiti (Biolegend, 430803)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. Hücre kültür pleyti (Falcon)
2. Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml) (BD)
3. Hücre dondurma tüpleri (TRP)
4. 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (BD)
5. 6 kuyucuklu hücre kültür pleyti (BD)
6. 12 kuyucuklu hücre kültür pleyti (BD)
7. Steril serolojik pipet (BD)
8. Steril mikropipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Gilson)
9. Otomatik mikropipetler
10. Enjektör (1 ml, 5 ml, 10 ml)

11. Thoma lam (Marienfeld- C964730)
12. Eppendorf tp (LP)

3.3. Kullanılan Cihazlar

1. Santrifüj (Eppendorf)
2. Mikro santrifüj (Eppendorf)
3. Class II LaminAir(Esco)
4. Iık mikroskobu (Olympos)
5. CO2 inkübatörü (%5 CO2) (Termo)
6. Sıvı azot tankı
7. Buzdolabı (+4) (Beko)
8. Laboratuar tipi derin dondurucu(-86) (Termo)
9. Vortex (Velp)
10. Su banyosu (Memmert)
11. Otoklav (Nüve)
12. Derin dondurucu (-20) (Beko)

3.4. İn Vivo Deneyle

3.4.1. Deney Hayvanları

Çalışmada 6-8 haftalık, 20-30 gram ağırlığında dii balb-c farelerde 4TLM hücreleri ile oluşturulan metastatik meme kanseri fare modeli oluşturuldu. 4TLM hücreleri Dr. Erin'in daha önceki çalışmalarında 4T1 primer tümörleri ile oluşturulan in vivo metastatik meme kanseri oluşturulmuş farelerin karaciğer metastazlarından seçilerek dizi haline getirilen hücrelerdir (Erin ve ark., 2009). 4T1 hücreleri ise balb/c farelerde spontan olarak gelimi metastatik meme kanserlerinden Lelekakis M. ve ark. tarafından izole edilen ve sık kullanılmakta olan hücrelerdir (Lelekakis ve ark., 1999).

3.4.2. Deney Protokolü

Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları nitesinde yapılan deney boyunca hayvanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsünde 20-22°C ısıda tutulmuş, standart yem ve çeşme suyu verildi. Deney gruplarına 4 hafta boyunca i.p. olarak aşağıda belirtilen tedavi protokolü uygulandı:

- Grup I : Serum fizyolojik, 0.1 ml/gün (n=7)
Grup II : FLU, 0.4 mg/kg/gün, 0.1 ml (n=9)
Grup III : PLD, 1. hafta 10 mg/kg, 2. hafta 5 mg/kg, 3. hafta 2.5 mg/kg, 0.2 ml (n=9)
Grup IV : FLU, 0.4 mg/kg/gün, 0.1 ml ve PLD, 1. hafta 10 mg/kg, 2. hafta 5 mg/kg, 3. hafta 2.5 mg/kg, 0.2 ml (n=9)

Tedavi süresi boyunca primer tümör takibi yapıldı. 4 hafta boyunca deney protokolü uygulandıktan sonra ketamin-ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilen hayvanların akciğer dokuları Bouin solüsyonunda fikse edildi, lenf nodu ve dalak dokuları ise steril olarak 1X FTTÇ içerisinde kültüre edilmek üzere alındı.

Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan izin alınmış (AKHADYEK, 2015.05.09) ve çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 09.12.2015 tarih ve TYL-2016-1261 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.4.3. Primer Tümörün Takibi ve Akciğer Metastazların Belirlenmesi

Primer tümör takibi haftada 1 kez Vernier kaliperi kullanılarak yapılmıştır. Sağ meme dokusunda bulunan primer tümörün eni (mm) ve boyu (mm) kaliper kullanılarak ölçüldükten sonra tümörün hacmi $V = L \times W/2 \times W/2$ (V = tümör hacmi, L = tümörün boyu, W = tümörün genişliği) formülü kullanılarak mm^3 olarak hesaplanmıştır. Bouin's fiksatifinde bekletilen akciğer dokularında makroskopik olarak metastaz sayısı gözle sayılarak belirlenmiştir.

3.5. Karma Lökosit Kültürü

Hayvanlar sakrifiye edildikten hemen sonra steril olarak 1x FTTÇ içerisine alınan dalak ve lenf nodlarından, laminar kabinde $40\mu m$ 'lik steril süzgeç kullanılarak 3 kez 1x FTTÇ ile yıkanan hücre süspansiyonları %10 FSS içeren RPMI besiyeri içerisinde her kuyucukta 3-4 milyon hücre olacak şekilde 48 kuyucuklu plaklara ekildikten hemen sonra $3 \mu g/ml$ LPS, $5 \mu g/ml$ ConA ve 10 gray RT uygulanmış 4TLM hücreleri ile (4TLM^{RT}) indüklendi. Hücrelerin üzerindeki süpernatantlar uyarımdan 40 saat sonra toplanarak IL-6, IL-10, IL17A ve IFN-gama için ELISA yöntemi çalışılana kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.6. ELISA Yöntemi ile Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

3.6.1. IL-6 Düzeyinin Belirlenmesi:

Solüsyonlar:

1. Kaplama solüsyonu : FTTÇ
2. Yıkama solüsyonu : Tween 20'nin %0,05 oranında FTTÇ içinde hazırlanması ile elde edildi.
3. Deney solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
4. Bloklama solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
5. Durdurma Solüsyonu : 2 N H₂SO₄

Standartların ve Antikorların Hazırlanması:

1. Yakalayan antikor : Kaplayıcı tampon çözelti (FTTÇ) içinde 1/500 oranında hazırlandı.
2. Belirleyen antikor : Deney solüsyonu içinde 1/250 oranında hazırlandı
3. Enzim :Avidin-BTP'nin deney solüsyonunun içinde 1/40 oranında hazırlanması ile elde edildi.
4. Substrat : H₂O₂ ve TMB'nin 1:1 oranında hazırlanması ile elde edildi.
5. Standartlar : Stok standart 1 ml bidistile H₂O ile sulandırıldı. Deney sırasında kullanılan 1. standart (1000 pg/ml), 2.5 µl stok standartın 300 µl deney dilüenti içerisinde çözülmesi ile hazırlandı. Diğer standartlar, 150 µl deney dilüenti kullanılarak azalan konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deney Protokolü:

1. 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğu 100 µl olacak şekilde yakalayan antikor kaplandıktan sonra pleytin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
2. 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 300µl bloklama solüsyonu dağıtıldı.

3. 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilen 96 kuyucuklu pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100µl olacak şekilde standart ve örnekler yüklendi.
4. 2 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl belirleyen antikor dağıtıldı.
5. 2 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl avidin-BTP dağıtıldı.
6. 20 dk oda ısısında inkübe edilen pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl substrat dağıtıldı.
7. Karanlıkta oda ısısında bekletilen pleytte renk değişimine göre yaklaşık 20 dk sonra reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldıktan sonra elde edilen spektrofotometrik değerler KC junior programı kullanılarak pg/ml olarak hesaplandı.

3.6.2. IL-10 Düzeyinin Belirlenmesi:

Solüsyonlar:

1. Kaplama solüsyonu : FTTÇ
2. Yıkama solüsyonu : Tween 20'nin %0,05 oranında FTTÇ içinde hazırlanması ile elde edildi.
3. Deney solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
4. Bloklama solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
5. Durdurma Solüsyonu : 2 N H₂SO₄

Standartların ve Antikorların Hazırlanması:

1. Yakalayan antikor : Kaplayıcı tampon çözelti (FTTÇ) içinde 1/250 oranında hazırlandı.
2. Belirleyen antikor : Deney solüsyonu içinde 1/120 oranında hazırlandı
3. Enzim :Avidin-BTP'nin deney solüsyonunun içinde 1/40 oranında hazırlanması ile elde edildi.

4. Substrat : H₂O₂ ve TMB'nin 1:1 oranında hazırlanması ile elde edildi.
5. Standartlar : Stok standart 500 µl deney solüsyonu ile sulandırıldı. Deney sırasında kullanılan 1. standart (4000 pg/ml), 14 µl stok standartın 286 µl deney dilüenti içerisinde çözülmesi ile hazırlandı. Diğer standartlar, 150 µl deney dilüenti kullanılarak azalan konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deney Protokolü:

1. 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğu 100 µl olacak şekilde yakalayan antikor kaplandıktan sonra pleytin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
2. 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 300µl bloklama solüsyonu dağıtıldı.
3. 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilen 96 kuyucuklu pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100µl olacak şekilde standart ve örnekler yüklendi.
4. 2 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl belirleyen antikor dağıtıldı.
5. 2 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl avidin-BTP dağıtıldı.
6. 20 dk oda ısısında inkübe edilen pleyt 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl substrat dağıtıldı.
7. Karanlıkta oda ısısında bekletilen pleytte renk değişimine göre yaklaşık 20 dk sonra reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldıktan sonra elde edilen spektrofotometrik değerler KC junior programı kullanılarak pg/ml olarak hesaplandı.

3.6.3. IL-17A Düzeyinin Belirlenmesi:

Solüsyonlar:

1. Kaplama solüsyonu : Kit içerisinde yer alan 5X oranındaki kaplama solüsyonunun (pH 9.5) bidistile H₂O ile 1X şeklinde hazırlanması ile elde edildi.

2. Yıkama solüsyonu : Tween 20'nin %0,05 oranında FTTÇ içinde hazırlanması ile elde edildi.
3. Deney solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
4. Bloklama solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
5. Durdurma Solüsyonu : 2 N H₂SO₄

Standartların ve Antikorların Hazırlanması:

1. Yakalayan antikor : Kaplama solüsyonu içinde 1/250 oranında hazırlandı.
2. Belirleyen antikor : Deney solüsyonu içinde 1/120 oranında hazırlandı
3. Enzim :Avidin-BTP'nin deney solüsyonunun içinde 1/1000 oranında hazırlanması ile elde edildi.
4. Substrat : Kit içerisinde yer alan TMB solüsyonu kullanıldı.
5. Standartlar : Stok standart 200 µl deney solüsyonu ile sulandırıldı. Deney sırasında kullanılan 1. standart (1000 pg/ml), 9 µl stok standartın 291 µl deney dilüenti içerisinde çözülmesi ile hazırlandı. Diğer standartlar, 150 µl deney dilüenti kullanılarak azalan konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deney Protokolü:

1. 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğu 100 µl olacak şekilde yakalayan antikor kaplandıktan sonra pleytin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
2. 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 300µl bloklama solüsyonu dağıtıldı.
3. 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilen 96 kuyucuklu pleyt 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100µl olacak şekilde standart ve örnekler yüklendi.
4. 2 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl belirleyen antikor dağıtıldı.

5. 1 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl avidin-BTP dağıtıldı.
6. 30 dk oda ısısında inkübe edilen pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl substrat dağıtıldı.
7. Karanlıkta oda ısısında bekletilen pleytte renk değişimine göre yaklaşık 30 dk sonra reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldıktan sonra elde edilen spektrofotometrik değerler KC junior programı kullanılarak pg/ml olarak hesaplandı.

3.6.4. IFN-gama Düzeyinin Belirlenmesi:

Solüsyonlar:

1. Kaplama solüsyonu : 8,4 gr. NaHCO₃ ve 3,56 gr. Na₂CO₃'ün 1 L bidistile H₂O'da, pH 9,5 olacak şekilde hazırlanması ile elde edildi.
2. Yıkama solüsyonu : Tween 20'nin %0,05 oranında FTTÇ içinde hazırlanması ile elde edildi.
3. Deney solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
4. Bloklama solüsyonu : SSA'nın %1 oranında FTTÇ içinde sulandırılması ile hazırlandı.
5. Durdurma Solüsyonu : 2 N H₂SO₄

Standartların ve Antikorların Hazırlanması:

1. Yakalayan antikor : Kaplayıcı tampon çözelti (FTTÇ) içinde 1/250 oranında hazırlandı.
2. Belirleyen antikor :Deney solüsyonu içinde 1/250 oranında hazırlandı
3. Enzim :Avidin-BTP'nin deney solüsyonunun içinde 1/1000 oranında hazırlanması ile elde edildi.
4. Substrat : Kit içerisinde yer alan TMB solüsyonu kullanıldı.
5. Standartlar : Stok standart 200 µl deney solüsyonu ile sulandırıldı. Deney sırasında kullanılan 1. standart (2000 pg/ml), 24 µl stok standartın 286 µl deney dilüenti içerisinde çözülmesi ile hazırlandı. Diğer

standartlar, 150 µl deney dilüenti kullanılarak azalan konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deney Protokolü:

1. 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğu 100 µl olacak şekilde yakalayan antikor kaplandıktan sonra pleytin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak gece boyu +4°C’de inkübe edildi.
2. 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 300µl bloklama solüsyonu dağıtıldı.
3. 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilen 96 kuyucuklu pleyt 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100µl olacak şekilde standart ve örnekler yüklendi.
4. 2 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl belirleyen antikor dağıtıldı.
5. 1 saat oda ısısında inkübe edilen pleyt 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl avidin-BTP dağıtıldı.
6. 30 dk oda ısısında inkübe edilen pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µl substrat dağıtıldı.
7. Karanlıkta oda ısısında bekletilen pleytte renk değişimine göre yaklaşık 30 dk sonra reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldıktan sonra elde edilen spektrofotometrik değerler KC junior programı kullanılarak pg/ml olarak hesaplandı.

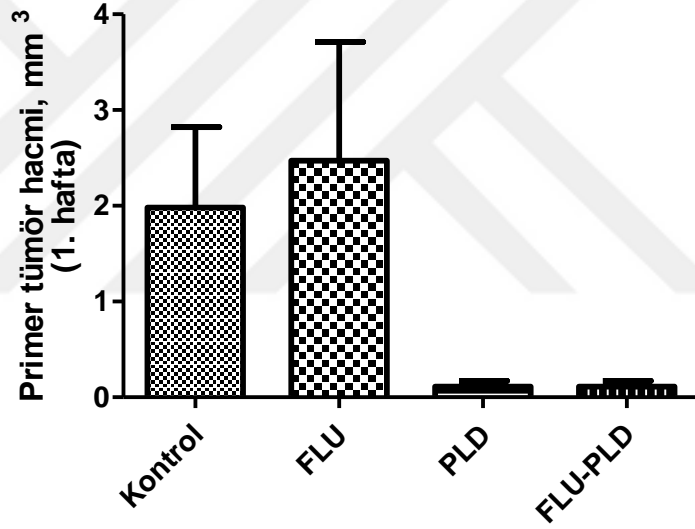
3.7. İstatistiksel analizler:

Tüm grupları karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi ya da Kruskal Wallis testi, posthoc analizlerde ise Tukey testi ya da Dunn testi kullanıldı. İstatistiksel analizler GraphPad Prism Windows 5.04 programında yapıldı, p değeri 0.05’den küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

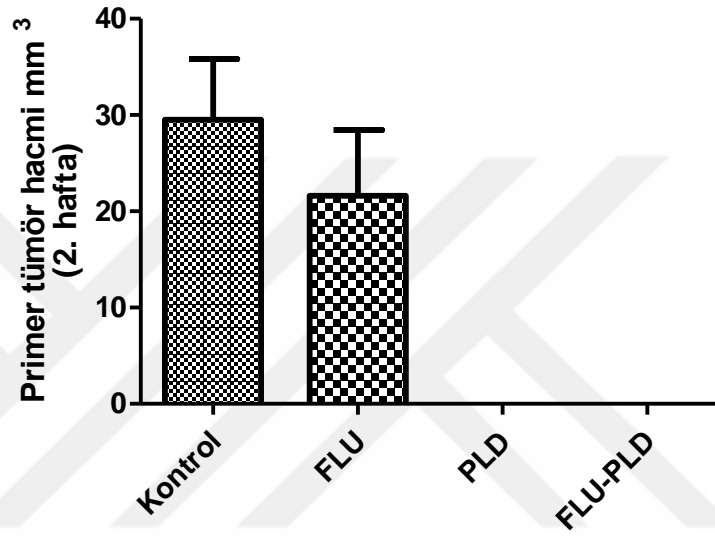
4.1. Primer Tümör Bulguları

Kontrol, FLU, PLD ve FLU-PLD gruplarının primer tümör hacimleri 1., 2. ve 4. haftalarda karşılaştırılmıştır. 1. haftada tüm gruplar arasında primer tümör hacimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.0008$). Posthoc analizler uygulandığında ise kontrol ile FLU grupları ($p>0.05$) ve PLD ile FLU-PLD grupları ($p>0.05$) arasında fark olmadığı ancak, kontrol grubunun primer tümör hacminin PLD ($p<0.05$) ile FLU-PLD ($p<0.05$) grubundan, FLU grubunun primer tümör hacminin ise PLD ($p<0.05$) ile FLU-PLD ($p<0.05$) gruplarından daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 1A).



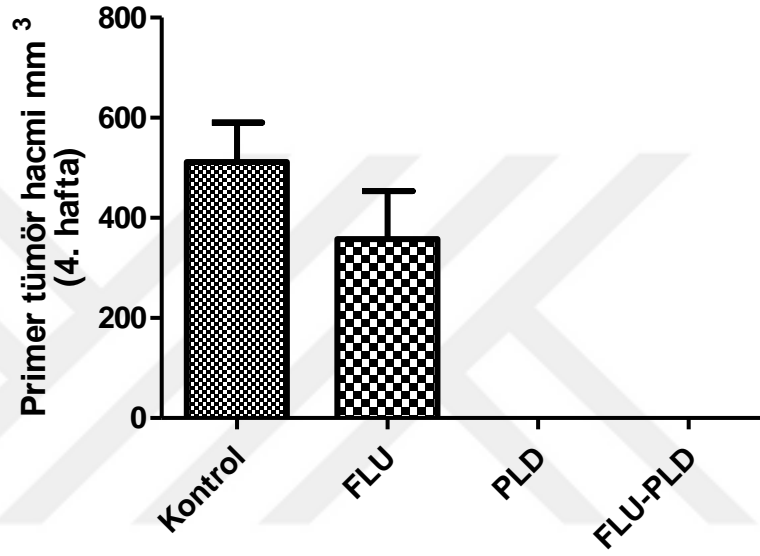
Şekil 1A. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin primer tümör üzerindeki etkileri (1. Hafta)

2. Haftada tüm gruplar arasında primer tümör hacimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0.0001$). Posthoc analizler uygulandığında ise 1. Hafta bulguları ile benzer şekilde kontrol ile FLU grupları ($p > 0.05$) ve PLD ile FLU-PLD grupları ($p > 0.05$) arasında fark olmadığı ancak, kontrol grubunun primer tümör hacminin PLD ($p < 0.0001$) ile FLU-PLD ($p < 0.0001$) grubundan, FLU grubunun primer tümör hacminin ise PLD ($p < 0.05$) ile FLU-PLD ($p < 0.05$) gruplarından daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 1B).



Şekil 1B. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin primer tümör üzerindeki etkileri (2. Hafta)

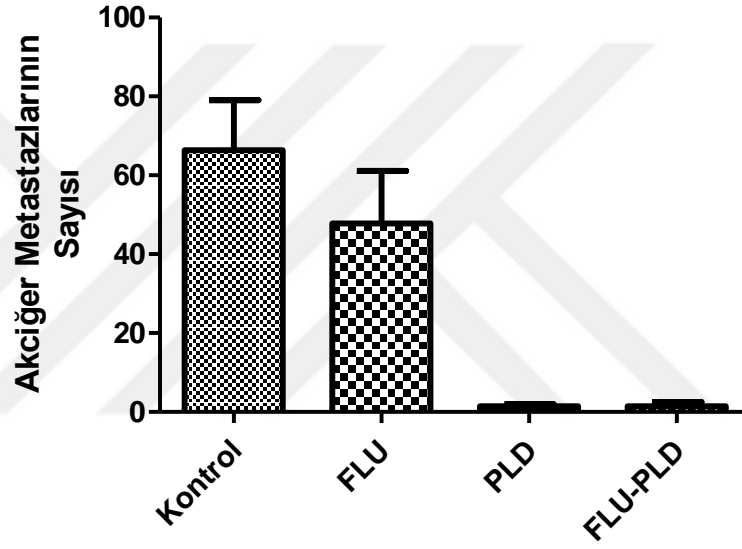
4. Haftada tüm gruplar arasında primer tümör hacimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0.0001$). Posthoc analizler uygulandığında ise 1. Hafta bulguları ile benzer şekilde kontrol ile FLU grupları ($p > 0.05$) ve PLD ile FLU-PLD grupları ($p > 0.05$) arasında fark olmadığı ancak, kontrol grubunun primer tümör hacminin PLD ($p < 0.0001$) ile FLU-PLD ($p < 0.0001$) grubundan, FLU grubunun primer tümör hacminin ise PLD ($p < 0.05$) ile FLU-PLD ($p < 0.05$) gruplarından daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 1C).



Şekil 1C. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin primer tümör üzerindeki etkileri (4. Hafta)

4.2. Akciğer Metastazı Bulguları

Makroskopik akciğer metastazlarının sayısı kontrol, FLU, PLD ve FLU-PLD grupları arasında karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.0005$). Posthoc analizler uygulandığında ise kontrol ile FLU grupları ($p>0.05$), FLU ile PLD grupları ($p>0.05$) ve PLD ile FLU-PLD grupları ($p>0.05$) arasında fark olmadığı, ancak kontrol grubunun akciğer metastazlarının PLD ($p<0.05$) ile FLU-PLD ($p<0.01$) grubundan, FLU grubunun akciğer metastazlarının ise FLU-PLD ($p<0.05$) gruplarından daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 2).

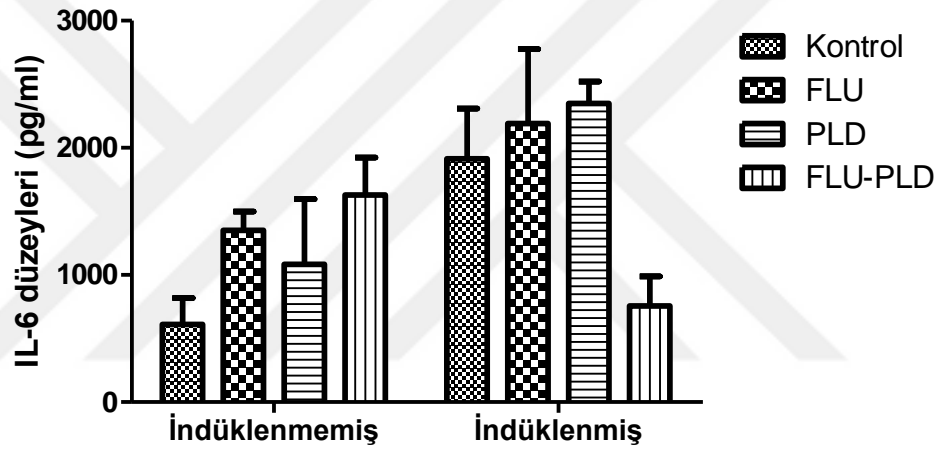


Şekil 2. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinde FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin akciğer metastazları üzerindeki etkileri

4.3. Karma Lökosit Kültürü Bulguları

4.3.1. İnterlökin-6 düzeyleri

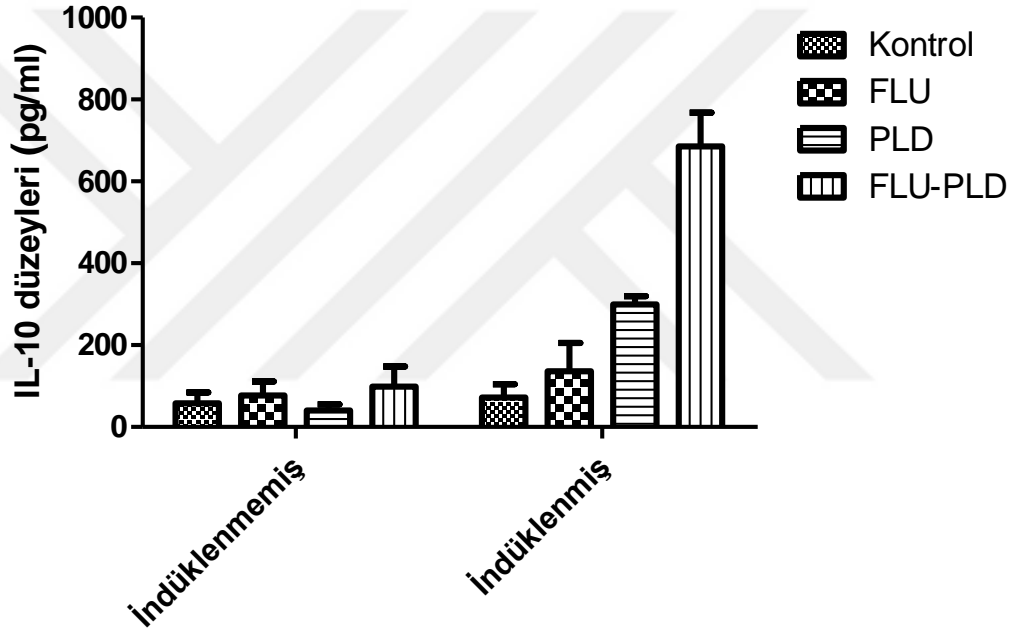
Karma lökosit kültürü süpernatantlarında indüklenmiş ve indüklenmemiş IL-6 düzeyleri kontrol, FLU, PLD ve FLU-PLD grupları arasında karşılaştırılmış ve indüklenmiş grupta, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (F= 3.569, p=0.0378). Posthoc analizler uygulandığında, IL-6 düzeylerinin FLU-PLD grubunda DOXO grubundan daha düşük olduğu (p<0.05) görülmüştür. İndüklenmemiş grupta ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (KW=2.757, p=0.4306) (Şekil 3).



Şekil 3. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkileri

4.3.2. İnterlökin-10 düzeyleri

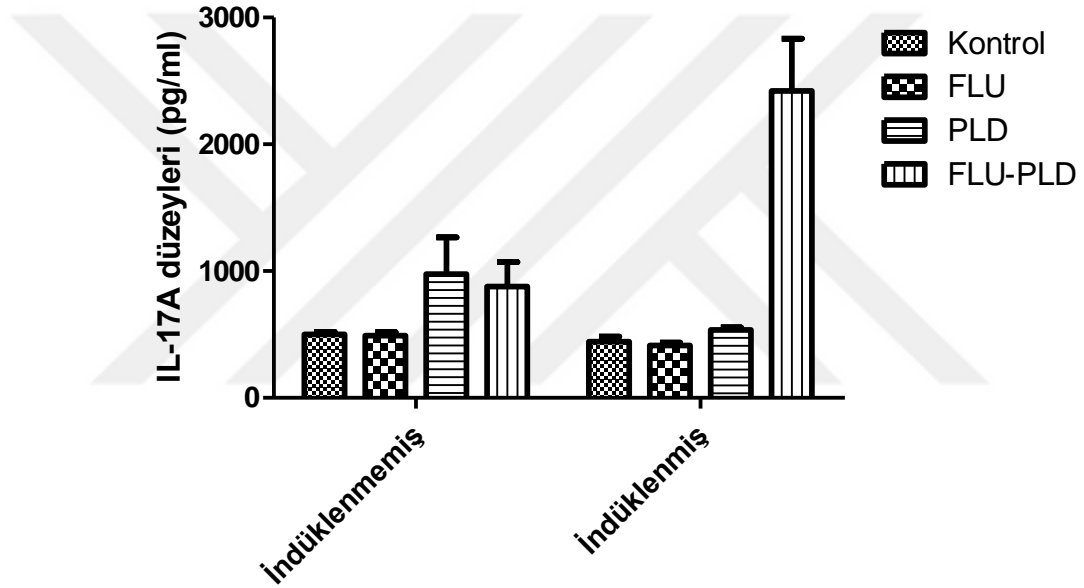
Karma lökosit kültürü süpernatantlarında indüklenmiş ve indüklenmemiş IL-10 düzeyleri kontrol, FLU, PLD ve FLU-PLD grupları arasında karşılaştırılmış ve indüklenmiş grupta, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (KW=18.21, p=0.0004). Posthoc analizler uygulandığında, IL-10 düzeylerinin FLU-PLD grubunda hem kontrol (p<0.0001) hem de FLU (p<0.05) gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür. İndüklenmemiş grupta ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (KW=2.757, p=0.4306) (Şekil 4).



Şekil 4. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IL-10 düzeyleri üzerindeki etkileri

4.3.3. İnterlökin-17A düzeyleri

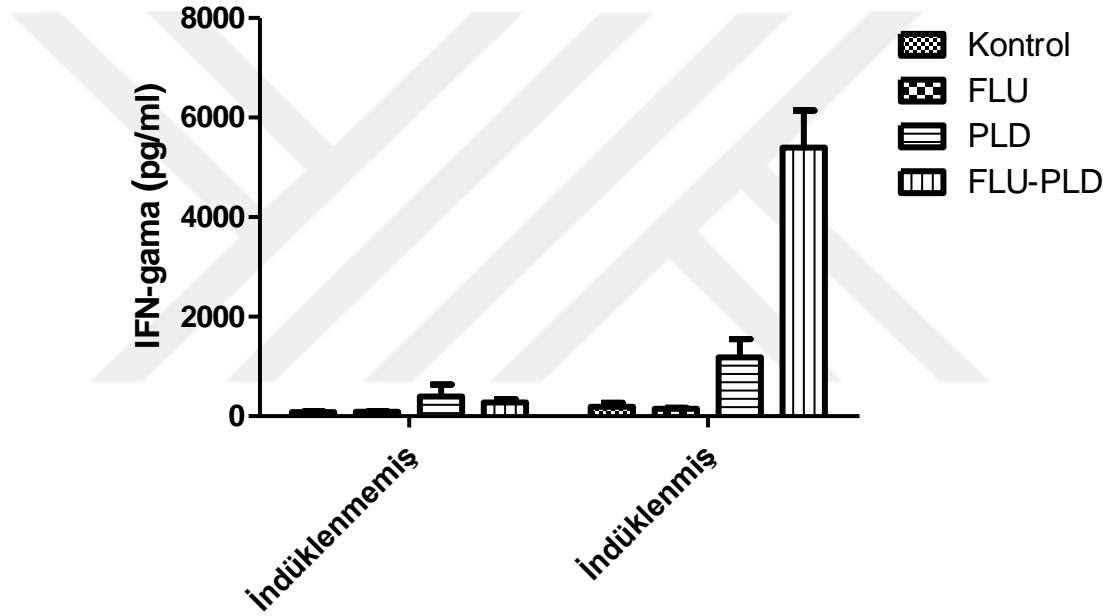
Karma lökosit kültürü süpernatantlarında indüklenmiş ve indüklenmemiş IL-17A düzeyleri kontrol, FLU, PLD ve FLU-PLD grupları arasında karşılaştırılmış ve indüklenmiş grupta, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($F=22.12$, $p<0.0001$). Posthoc analizler uygulandığında, IL-17A düzeylerinin FLU-PLD grubunda kontrol ($p<0.0001$), FLU ($p<0.0001$) ve PLD ($p<0.0001$) gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür. İndüklenmemiş grupta ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($KW= 3.927$, $p=0.2695$) (Şekil 5).



Şekil 5. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen ve karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IL-17A düzeyleri üzerindeki etkileri

4.3.4. İnterferon-gama düzeyleri

Karma lökosit kültürü süpernatantlarında indüklenmiş ve indüklenmemiş IFN-gama düzeyleri kontrol, FLU, PLD ve FLU-PLD grupları arasında karşılaştırılmış ve indüklenmiş grupta, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (F=35.32, p<0.0001). Posthoc analizler uygulandığında, IFN-gama düzeylerinin FLU-PLD grubunda kontrol (p<0.0001), FLU (p<0.0001) ve PLD (p<0.0001) gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür. İndüklenmemiş grupta ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (F=6.776, p=0.0794) (Şekil 5).



Şekil 6. 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare metastatik meme kanseri modelinden elde edilen karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU, PLD ve FLU-PLD tedavilerinin IFN-gama düzeyleri üzerindeki etkileri

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde kadınlarda meme kanserine bağlı mortalite hızı erken tanıya bağlı olarak azalsa da, ÜNMK kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır (Farre ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Meme kanseri alt tipleri içerisinde agresif ve metastatik niteliğinden dolayı en düşük sağkalım ÜNMK'dedir (Song ve ark., 2018). ÜNMK'da konvansiyonel kemoterapötik uygulamaları ilaç direnci ve nüks zamanının kısalması nedeniyle tedavinin etkinliği sınırlıdır (Mander ve ark., 2018). Prognozun zayıf ve tedavi seçeneklerinin sınırlılığı olduğu ÜNMK'da yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulduğundan (Mander ve ark., 2018), son zamanlarda yapılan çalışmalar ÜNMK'da metastazı önlemeye yönelik bir başka deyişle anti-metastatik etkinliği arttıran tedavi seçeneklerine odaklanmaktadır (Zardavas ve ark., 2013).

MMK hastalarında sağ kalıma etki eden uzak organ metastazları en sık kemik, karaciğer, akciğer ve beyin dokularında görülmektedir (Wu ve ark., 2017). ÜNMK en sık kemik dokusuna, ikinci sıklıkta ise karaciğer dokusuna metastaz yapmakla birlikte, en agresif metastaz türünü oluşturan akciğer metastazları ise ÜNMK hastalarında mortalitenin en önemli nedenidir (Wu ve ark., 2017). Bu nedenle bu tez çalışmasında farede spontan olarak gelişmiş metastatik meme kanseri hücre dizilerinin (4T1) karaciğer metastazlarından elde edilmiş hücre dizileri (4TLM) ile oluşturulmuş in vivo meme kanseri modelinde hem primer tümör hem de akciğer metastazları üzerindeki etkiler sitokin düzeyleri ile birlikte çalışılmıştır.

Kemoterapötiklerin pegile edilmiş formülasyonlarının farmakokinetik özellikleri farklılıklar gösterdiğinden toksisite açısından tercih edilmekle birlikte, ÜNMK'da primer tümör ve özellikle de metastazlar üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (Su ve ark., 2017). Pegile formülasyonların da içinde bulunduğu nanoilaçların tümördeki vasküler yapının geçirgenliğinde artma ve lenfatik drenajın bozulması nedeniyle tümör dokusunda birikmeleri, terapötik indeksin arttırılarak toksik etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır (Su ve ark., 2017). Bununla birlikte DOXO'nun tümör hücrelerinde sitotoksosite oluştururken immünojenik apoptozise de neden olması, PLD'nin tümör mikroçevresi üzerindeki etkilerinin ve metastaz üzerindeki etkilerinin araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Depresyon tanısı almış meme kanserli kadınlar arasında antidepresan ilaç kullanımının daha fazla olduğu bildirildiğinden (Fann ve ark., 2008; Suppli ve ark., 2011), SSGİ'lerin kemoterapötiklerle eş zamanlı kullanıldığında sağ kalımı nasıl etkileyeceği önem taşımaktadır. Bu bağlamda yan etki profilindeki üstünlük nedeniyle DOXO'ya göre daha fazla tercih edilmeye başlanan PLD'nin ortamda FLU bulunduğu tümör mikroçevresi üzerindeki etkilerinin araştırılmasının gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu tez çalışmasında, 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare ÜNМК modelinde PLD ve FLU'nun primer tümör ve akciğer metastazları üzerindeki etkileri araştırılırken, aksiller lenf nodu ve dalak hücrelerinden elde edilen karma lökosit kültüründe IL-6, IL-10, IL-17A ve IFN-gama düzeyleri de çalışılmıştır.

Literatürde, in vivo ÜNМК modellerinde DOXO ve FLU'nun birlikte kullanımı ile ilgili yayınlara rastlanmamakla birlikte in vitro olarak insan meme kanseri hücre dizilerinde (MCF-7, MCF-7^R) DOXO ve FLU'yu birlikte içeren lipozomal formülasyonun sinerjistik etki oluşturabileceği bildirilmiştir (Ong ve ark., 2011). İnsan kolon kanseri hücre dizileri ile farede oluşturulan tedaviye dirençli ksenograft modelde DOXO (kümülatif 6 mg/kg) ve FLU (1 mg/kg) ayrı ayrı uygulandığında da sinerjistik etkiler izlenmiş, primer tümör hacminin DOXO'nun tek uygulamasına göre DOXO-FLU uygulamasında daha fazla azaldığı gösterilmiştir (Argov ve ark., 2009). Zayıf immünojenik özelliğe sahip olduğu bilinen meme kanserinde immünojenik apoptozis oluşturan DOXO ile tedavi avantaj sağlarken, immün kaçışa neden olabilen PLD ile tedaviye antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen FLU tedavisinin eklenmesinin uzak metastazları arttırması beklenebilir. Ancak bu tez çalışmasında primer tümör ve akciğer metastazları açısından 4 hafta boyunca 0.4 mg/kg/gün uygulanan FLU tedavisi ile kümülatif olarak 17.5 mg/kg uygulanan PLD tedavisi arasında fark görülmemiştir. Bu sonuçların nedeni PLD tedavisi ile neredeyse tam kür sağlanmasından kaynaklanabilir. PLD'nin düşük dozda uygulanacağı grupların eklenmesi FLU'nun primer tümör ve akciğer metastazları üzerindeki etkilerinin netleşmesini sağlayabilir.

Meme kanserinde TM'deki tümör hücreleri ve diğer hücrelerden salıverilen sitokin ve kemokinlerin uzak metastazları etkilediği bilinmektedir. Bu çalışmada 4TLM hücreleri ile oluşturulmuş fare ÜNМК modelinde aksiller lenf nodu ve dalak hücrelerinden elde edilen karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU-PLD

tedavisinin IL-10, IL-17A ve IFN-gama düzeyini arttırdığı, IL-6 düzeyini ise azalttığı görülmüştür. Meme kanseri hastalarında serum IL-6 düzeyleri ile prognoz arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların sonuçları, serum IL-6 düzeylerindeki artışın hem negatif hem de pozitif prognoz belirtisi olabileceğini gösterirken (Kozłowski ve ark., 2003; Yokoe ve ark., 2000; Jiang ve ark., 2000; Bozcuk ve ark., 2004; Zhang ve ark., 1999; Ahmad ve ark., 2017), in vivo ve in vitro deneysel çalışmaların sonuçları da benzer şekilde IL-6'nın hem antitümöral/antimetastatik hem de protümöral/prometastatik etkileri olabileceğini bildirmiştir (Knupfer ve ark., 2007; Chiu ve ark., 1996; Arihiro ve ark., 2000; Verhasselt ve ark., 1992; Asgeirsson ve ark., 1998). FLU-PLD tedavisi ile indüklenmiş IL-6 düzeyinin azalması, bu çalışmada eğer akciğer metastazlarında PLD grubu ile FLU-PLD grubu arasında fark bulunsaydı deneysel ÜNMK modelinde metastaz IL-6 ilişkisi hakkında yorum yapılabilirdi. Ancak elimizdeki bulgularda FLU ve PLD tedavilerinin birlikte uygulanmasının IL-6 düzeylerini azalttığını söyleyebiliriz.

IL-6'ya benzer şekilde hem IL-10'un (Hamidullah ve ark., 2012; Kundu ve ark., 1996; Mocellin ve ark., 2005; Pinzon-Charry ve ark., 2005; Venetsanakos ve ark., 1997) hem de IFN-gamanın (Yao ve ark., 2016; Wall ve ark., 2003; Propper ve ark., 2003; Gao ve ark., 2003; Nastala ve ark., 1994; Kaplan ve ark., 1998; Ksienzyk ve ark., 2011; Mojic ve ark., 2017; Lin ve ark., 2017; Nirschl ve ark., 2017; Mo ve ark., 2018) antitümöral/antimetastatik ve protümöral/prometastatik etkileri gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda FLU-PLD grubunda IL-10 ve IFN-gama düzeylerinin artması, primer tümör hacminin ve akciğer metastazlarının azalması ile ilişkili olabilir. Literatürde yer alan IL17A düzeyleri ile ilgili çalışmalarda ise diğer sitokinlerden farklı olarak protümöral/prometastatik etkilerin ön planda olduğu bildirilmiştir (Welte ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2008; Reppert ve ark., 2011; Hayata ve ark., 2013; Nam ve ark., 2008; Chavey ve ark., 2007; Du ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda ise literatür bulguları ile zıt olarak primer tümör hacminin ve akciğer metastazlarının sayısının azaldığı FLU-PLD grubunda IL17A düzeyleri artmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu tez çalışmasında, 4TLM hücreleri ile metastatik meme kanseri oluşturulan dişi balb-c farelerde PLD ve FLU-PLD tedavileri hem primer tümör hacmini hem de akciğer metastazlarını azaltmıştır. Ancak çalışmamızda kümülatif olarak 17.5 mg/kg dozda uygulanan PLD ile primer tümör hacmi ve akciğer metastazlarının neredeyse tamamen gerilemiş olması, 4 hafta boyunca 0.4 mg/kg/gün uygulanan FLU tedavisinin etkilerini maskeleyebilir. Bu nedenle, PLD dozunun azaltılarak FLU-PLD kombinasyonunun primer tümör hacmi ve metastazları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, FLU'nun etkilerinin daha net gözlemlenmesini sağlayabilir.

2. 4TLM hücreleri ile metastatik meme kanseri oluşturulan dişi balb-c farelerden elde edilen karma lökosit kültürü süpernatantlarında FLU-PLD tedavisi IL-10, IL-17A ve IFN-gama düzeylerini arttırırken, IL-6 düzeyini azaltmıştır. Literatüre bakıldığında IL-6, IL-10 ve IFN-gamanın hem antitümöral/antimetastatik hem de protümöral/prometastatik etkileri gösterilmiş olmasına karşın, IL17A ile ilgili yayınlarda protümöral/prometastatik etkilerin ön planda olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında IL-17A düzeylerinin artmış olması FLU'nun PLD ile kombinasyonunda izlenen protümöral/prometastatik etkilerinin, PLD dozunun kümülatif olarak 17.5 mg/kg kullanılmasından dolayı gözlemlenememiş olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Abdul M, Logothetis CJ, Hoosein NM. Growth-inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines. *J Urol* 1995;154:247-250.

Ahmad N, Ammar A, Storr SJ, Green AR, Rakha E, Ellis IO, Martin SG. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2017.

Alagkiozidis I, Facciabene A, Carpenito C, Benencia F, Jonak Z, Adams S, Carroll RG, Gimotty PA, Hammond R, Danet-Desnoyers GA, June CH, Powell DJ, Jr., Coukos G. Increased immunogenicity of surviving tumor cells enables cooperation between liposomal doxorubicin and IL-18. *J Transl Med* 2009;7:104.

Amit BH, Gil-Ad I, Taler M, Bar M, Zolokov A, Weizman A. Proapoptotic and chemosensitizing effects of selective serotonin reuptake inhibitors on T cell lymphoma/leukemia (Jurkat) in vitro. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009;19:726-734.

Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008;14:141-151.

Argov M, Kashi R, Peer D, Margalit R. Treatment of resistant human colon cancer xenografts by a fluoxetine-doxorubicin combination enhances therapeutic responses comparable to an aggressive bevacizumab regimen. *Cancer Lett* 2009;274:118-125.

Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer* 2000;7:221-230.

Asgeirsson KS, Olafsdottir K, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM. The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine* 1998;10:720-728.

Aydinlik S, Erkisa M, Cevatemre B, Sarimahmut M, Dere E, Ari F, Ulukaya E. Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 2017;1861:49-57.

Barton C, Davies D, Balkwill F, Burke F. Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in IFN-gamma-induced apoptosis that are enhanced with cisplatin. *Eur J Cancer* 2005;41:1474-1486.

Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2003;5:31-36.

Bhat-Nakshatri P, Campbell RA, Patel NM, Newton TR, King AJ, Marshall MS, Ali S, Nakshatri H. Tumour necrosis factor and PI3-kinase control oestrogen receptor alpha protein level and its transrepression function. *Br J Cancer* 2004;90:853-859.

Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, Nos C, de Rycke Y, Thiery JP, Sigal-Zafrani B, Mignot L, Sastre-Garau X, Pierga JY, Institut Curie Breast Cancer Study G. Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin Cancer Res* 2008;14:3306-3311.

Bozcuk H, Uslu G, Samur M, Yildiz M, Ozben T, Ozdogan M, Artac M, Altunbas H, Akan I, Savas B. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cytokine* 2004;27:58-65.

Brandes LJ, Arron RJ, Bogdanovic RP, Tong J, Zaborniak CL, Hogg GR, Warrington RC, Fang W, LaBella FS. Stimulation of malignant growth in rodents by antidepressant drugs at clinically relevant doses. *Cancer Res* 1992;52:3796-3800.

Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000;18:80-86.

Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Loffler D, Koczan D, Thiesen HJ, Burger R, Gramatzki M, Horn F. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 2004;103:242-251.

Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol* 2004;32:585-598.

Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Metivier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005;202:1691-1701.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* 2009;9:202.

Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissiere F, Laune D, Roques S, Lazennec G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res* 2007;9:R15.

Chiu JJ, Sgagias MK, Cowan KH. Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 1996;2:215-221.

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;366:2087-2106.

Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, Rincon M. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:8851-8858.

Coogan PF, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L. Use of selective serotonin reuptake inhibitors and the risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 2005;162:835-838.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:4429-4434.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994;1:447-456.

- Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2007;2:469-478.
- Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:11-22.
- Du JW, Xu KY, Fang LY, Qi XL. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. *Mol Med Rep* 2012;6:1099-1102.
- Duan XF, Dong NN, Zhang T, Li Q. The prognostic analysis of clinical breast cancer subtypes among patients with liver metastases from breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2013;18:26-32.
- Duggan ST, Keating GM. Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drugs* 2011;71:2531-2558.
- Ehrke MJ, Verstovsek S, Maccubbin DL, Ujhazy P, Zaleskis G, Berleth E, Mihich E. Protective specific immunity induced by doxorubicin plus TNF-alpha combination treatment of EL4 lymphoma-bearing C57BL/6 mice. *Int J Cancer* 2000;87:101-109.
- Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 2013;13:759-771.
- Eralp Y, Wang X, Wang JP, Maughan MF, Polo JM, Lachman LB. Doxorubicin and paclitaxel enhance the antitumor efficacy of vaccines directed against HER 2/neu in a murine mammary carcinoma model. *Breast Cancer Res* 2004;6:R275-283.
- Erin N, Wang N, Xin P, Bui V, Weisz J, Barkan GA, Zhao W, Shearer D, Clawson GA. Altered gene expression in breast cancer liver metastases. *Int J Cancer* 2009;124:1503-1516.
- Eroles P, Bosch A, Bermejo B, Lluch A. Mechanisms of resistance to hormonal treatment in breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2010;12:246-252.

Esquivel-Velazquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35:1-16.

Ewens A, Luo L, Berleth E, Alderfer J, Wollman R, Hafeez BB, Kanter P, Mihich E, Ehrke MJ. Doxorubicin plus interleukin-2 chemoimmunotherapy against breast cancer in mice. *Cancer Res* 2006;66:5419-5426.

Fann JR, Thomas-Rich AM, Katon WJ, Cowley D, Pepping M, McGregor BA, Gralow J. Major depression after breast cancer: a review of epidemiology and treatment. *Gen Hosp Psychiatry* 2008;30:112-126.

Farre PL, Scalise GD, Duca RB, Dalton GN, Massillo C, Porretti J, Grana K, Gardner K, De Luca P, De Siervi A. CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 2018;9:13848-13858.

Fertig EJ, Lee E, Pandey NB, Popel AS. Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. *Sci Rep* 2015;5:12133.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938-1948.

Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 2003;198:433-442.

Gerratana L, Fanotto V, Bonotto M, Bolzonello S, Minisini AM, Fasola G, Puglisi F. Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2015;32:125-133.

Ghosh S, Mukherjee S, Choudhury S, Gupta P, Adhikary A, Baral R, Chattopadhyay S. Reactive oxygen species in the tumor niche triggers altered activation of macrophages and immunosuppression: Role of fluoxetine. *Cell Signal* 2015;27:1398-1412.

Gil-Ad I, Zolokov A, Lomnitski L, Taler M, Bar M, Luria D, Ram E, Weizman A. Evaluation of the potential anti-cancer activity of the antidepressant sertraline in human colon cancer cell lines and in colorectal cancer-xenografted mice. *Int J Oncol* 2008;33:277-286.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.

Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5652-5657.

Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:11-21.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.

Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, Tsimelzon A, Hill J, Panupinthu N, Zhang Y, Mazumdar A, Hilsenbeck SG, Mills GB, Brown PH. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res* 2013;73:3470-3480.

Hayata K, Iwahashi M, Ojima T, Katsuda M, Iida T, Nakamori M, Ueda K, Nakamura M, Miyazawa M, Tsuji T, Yamaue H. Inhibition of IL-17A in tumor microenvironment augments cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes in tumor-bearing mice. *PLoS One* 2013;8:e53131.

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 (Pt 2):297-314.

Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990;63:1149-1157.

Holzel M, Bovier A, Tuting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer* 2013;13:365-376.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-267.

Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1893-1907.

Jiang XP, Yang DC, Elliott RL, Head JF. Reduction in serum IL-6 after vaccination of breast cancer patients with tumour-associated antigens is related to estrogen receptor status. *Cytokine* 2000;12:458-465.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24:2137-2150.

Kannen V, Hintzsche H, Zanette DL, Silva WA, Jr., Garcia SB, Waaga-Gasser AM, Stopper H. Antiproliferative effects of fluoxetine on colon cancer cells and in a colonic carcinogen mouse model. *PLoS One* 2012;7:e50043.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7556-7561.

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010;28:3271-3277.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86:1243-1254.

Kitamura T, Pollard JW. Therapeutic potential of chemokine signal inhibition for metastatic breast cancer. *Pharmacol Res* 2015;100:266-270.

Knupfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:129-135.

Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst* 2003;48:82-84.

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 2004;279:24218-24225.

Ksienzyk A, Neumann B, Nandakumar R, Finsterbusch K, Grashoff M, Zawatzky R, Bernhardt G, Hauser H, Kroger A. IRF-1 expression is essential for natural killer cells to suppress metastasis. *Cancer Res* 2011;71:6410-6418.

Kundu N, Beaty TL, Jackson MJ, Fulton AM. Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:536-541.

LaBarge MA. The difficulty of targeting cancer stem cell niches. *Clin Cancer Res* 2010;16:3121-3129.

Lee E, Fertig EJ, Jin K, Sukumar S, Pandey NB, Popel AS. Breast cancer cells condition lymphatic endothelial cells within pre-metastatic niches to promote metastasis. *Nat Commun* 2014;5:4715.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-2767.

Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, Anderson RL. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:163-170.

Lin CF, Lin CM, Lee KY, Wu SY, Feng PH, Chen KY, Chuang HC, Chen CL, Wang YC, Tseng PC, Tsai TT. Escape from IFN-gamma-dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci* 2017;24:10.

Ma R, Feng Y, Lin S, Chen J, Lin H, Liang X, Zheng H, Cai X. Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis. *J Transl Med* 2015;13:64.

Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor

immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res* 2001;61:3689-3697.

Mander S, You DJ, Park S, Kim DH, Yong HJ, Kim DS, Ahn C, Kim YH, Seong JY, Hwang JI. Nafamostat mesilate negatively regulates the metastasis of triple-negative breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 2018;41:229-242.

Mantia-Smaldone G, Ronner L, Blair A, Gamerman V, Morse C, Orsulic S, Rubin S, Gimotty P, Adams S. The immunomodulatory effects of pegylated liposomal doxorubicin are amplified in BRCA1--deficient ovarian tumors and can be exploited to improve treatment response in a mouse model. *Gynecol Oncol* 2014;133:584-590.

Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M, Kato J, Hirayama Y, Sakamaki S, Kohda K, Miyake K, Niitsu Y. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* 2003;9:1158-1165.

McArthur HL, Page DB. Immunotherapy for the treatment of breast cancer: checkpoint blockade, cancer vaccines, and future directions in combination immunotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2016;14:922-933.

McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:217-228.

Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009;9:665-674.

Mo X, Zhang H, Preston S, Martin K, Zhou B, Vadalía N, Gamero AM, Soboloff J, Tempera I, Zaidi MR. Interferon-gamma Signaling in Melanocytes and Melanoma Cells Regulates Expression of CTLA-4. *Cancer Res* 2018;78:436-450.

Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005;78:1043-1051.

Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The Dark Side of IFN-gamma: Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci* 2017;19.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.

Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, Schwartz GF, Park PK, Rosenberg AL, Brill K, Mitchell EP. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 2007;110:876-884.

Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, Laurence A, Michalowska A, Mamura M, Lonning S, Berzofsky JA, Wakefield LM. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res* 2008;68:3915-3923.

Narunsky L, Oren R, Bochner F, Neeman M. Imaging aspects of the tumor stroma with therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 2014;141:192-208.

Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 1994;153:1697-1706.

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012;12:133-143.

Nirschl CJ, Suarez-Farinas M, Izar B, Prakadan S, Dannenfels R, Tirosh I, Liu Y, Zhu Q, Devi KSP, Carroll SL, Chau D, Rezaee M, Kim TG, Huang R, Fuentes-Duculan J, Song-Zhao GX, Gulati N, Lowes MA, King SL, Quintana FJ, Lee YS, Krueger JG, Sarin KY, Yoon CH, Garraway L, Regev A, Shalek AK, Troyanskaya O, Anandasabapathy N. IFN-gamma-Dependent Tissue-Immune Homeostasis Is Co-opted in the Tumor Microenvironment. *Cell* 2017;170:127-141 e115.

O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, Kieback DG, Tomczak P, Ackland SP, Orlandi F, Mellars L, Alland L, Tandler C, Group CBCS. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional

doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004;15:440-449.

Ong JC, Sun F, Chan E. Development of stealth liposome coencapsulating doxorubicin and fluoxetine. *J Liposome Res* 2011;21:261-271.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8:98-101.

Park Y, Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med* 2005;56:495-508.

Pawar VK, Singh Y, Sharma K, Shrivastav A, Sharma A, Singh A, Meher JG, Singh P, Raval K, Bora HK, Datta D, Lal J, Chourasia MK. Doxorubicin Hydrochloride Loaded Zymosan-Polyethylenimine Biopolymeric Nanoparticles for Dual 'Chemoimmunotherapeutic' Intervention in Breast Cancer. *Pharm Res* 2017;34:1857-1871.

Pedersen MH, Hood BL, Beck HC, Conrads TP, Ditzel HJ, Leth-Larsen R. Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncoimmunology* 2017;6:e1305531.

Peer D, Dekel Y, Melikhov D, Margalit R. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res* 2004;64:7562-7569.

Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 2005;83:451-461.

Poonia N, Lather V, Pandita D. Mesoporous silica nanoparticles: a smart nanosystem for management of breast cancer. *Drug Discov Today* 2017.

Potten CS, Owen G, Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* 2002;115:2381-2388.

Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A, Grodzinski P, Blakey DC. Challenges and key considerations

of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* 2013;73:2412-2417.

Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP, Bahl P, Thavasu P, Balkwill F, Turley H, Dobbs N, Gatter K, Talbot DC, Harris AL, Ganesan TS. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:84-92.

Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med* 2013;274:113-126.

Reppert S, Boross I, Koslowski M, Tureci O, Koch S, Lehr HA, Finotto S. A role for T-bet-mediated tumour immune surveillance in anti-IL-17A treatment of lung cancer. *Nat Commun* 2011;2:600.

Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, Palacios J. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:1533-1539.

Serafeim A, Holder MJ, Grafton G, Chamba A, Drayson MT, Luong QT, Bunce CM, Gregory CD, Barnes NM, Gordon J. Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. *Blood* 2003;101:3212-3219.

Simpkins F, Flores A, Chu C, Berek JS, Lucci J, 3rd, Murray S, Bauman J, Struemper H, Germaschewski F, Jonak Z, Gardner O, Toso J, Coukos G. Chemoimmunotherapy using pegylated liposomal Doxorubicin and interleukin-18 in recurrent ovarian cancer: a phase I dose-escalation study. *Cancer Immunol Res* 2013;1:168-178.

Slingsby BT. The Prozac boom and its placebogenic counterpart -- a culturally fashioned phenomenon. *Med Sci Monit* 2002;8:CR389-393.

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, Foekens JA, Martens JW. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 2008;68:3108-3114.

Song X, Zhou X, Qin Y, Yang J, Wang Y, Sun Z, Yu K, Zhang S, Liu S. Emodin inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis of triple negative breast cancer via antagonism of CXCL12 secreted from adipocytes. *Int J Mol Med* 2018.

Soni A, Ren Z, Hameed O, Chanda D, Morgan CJ, Siegal GP, Wei S. Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am J Clin Pathol* 2015;143:471-478.

Su YC, Burnouf PA, Chuang KH, Chen BM, Cheng TL, Roffler SR. Conditional internalization of PEGylated nanomedicines by PEG engagers for triple negative breast cancer therapy. *Nat Commun* 2017;8:15507.

Sun X, Mao Y, Wang J, Zu L, Hao M, Cheng G, Qu Q, Cui D, Keller ET, Chen X, Shen K, Wang J. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer. *Oncogene* 2014.

Suppli NP, Deltour I, Damkjaer LH, Christensen J, Jensen AB, Kroman NT, Johansen C, Dalton SO. Factors associated with the prescription of antidepressive medication to breast cancer patients. *Acta Oncol* 2011;50:243-251.

Tampellini M, Berruti A, Gerbino A, Buniva T, Torta M, Gorzegno G, Faggiuolo R, Cannone R, Farris A, Destefanis M, Moro G, Deltetto F, Dogliotti L. Relationship between CA 15-3 serum levels and disease extent in predicting overall survival of breast cancer patients with newly diagnosed metastatic disease. *Br J Cancer* 1997;75:698-702.

Teicher BA. *Cancer Drug Resistance*: Humana Press; 2006.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.

Velaei K, Samadi N, Barazvan B, Soleimani Rad J. Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *Breast* 2016;30:92-100.

Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer* 1997;75:1826-1830.

Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2004;2:e301.

Verhasselt B, Van Damme J, van Larebeke N, Put W, Bracke M, De Potter C, Mareel M. Interleukin-1 is a motility factor for human breast carcinoma cells in vitro: additive effect with interleukin-6. *Eur J Cell Biol* 1992;59:449-457.

Villanueva MT. Cell signalling: Breaking down the defenses. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:65.

Volpe DA, Ellison CD, Parchment RE, Grieshaber CK, Faustino PJ. Effects of amitriptyline and fluoxetine upon the in vitro proliferation of tumor cell lines. *J Exp Ther Oncol* 2003;3:169-184.

Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* 2003;9:2487-2496.

Wang S, Tyring SK, Townsend CM, Jr., Evers BM. Interferon-mediated activation of the STAT signaling pathway in a human carcinoid tumor. *Ann Surg Oncol* 1998;5:642-649.

Wang S, Yang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Oncol* 2003;30:133-142.

Wang Y, Zhu M, Yuan B, Zhang K, Zhong M, Yi W, Xu X, Duan X. VSP-17, a New PPARgamma Agonist, Suppresses the Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer via Upregulating the Expression of E-Cadherin. *Molecules* 2018;23.

Welte T, Zhang XH. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm* 2015;2015:804347.

Wernli KJ, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Newcomb PA. Antidepressant medication use and breast cancer risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2009;18:284-290.

Wu J, Waxman DJ. Immunogenic chemotherapy: Dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Lett* 2018;419:210-221.

Wu Q, Li J, Zhu S, Wu J, Chen C, Liu Q, Wei W, Zhang Y, Sun S. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study. *Oncotarget* 2017;8:27990-27996.

Wu T, Wang X, Li J, Song X, Wang Y, Wang Y, Zhang L, Li Z, Tian J. Identification of Personalized Chemoresistance Genes in Subtypes of Basal-Like Breast Cancer Based on Functional Differences Using Pathway Analysis. *PLoS One* 2015;10:e0131183.

Yao M, Brummer G, Acevedo D, Cheng N. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. *Adv Cancer Res* 2016;132:265-367.

Yokoe T, Iino Y, Morishita Y. Trends of IL-6 and IL-8 levels in patients with recurrent breast cancer: preliminary report. *Breast Cancer* 2000;7:187-190.

Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol* 2013;4:28.

Zardavas D, Baselga J, Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:191-210.

Zhang GJ, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:1427-1432.

Zhang Y, Zhou T, Duan J, Xiao Z, Li G, Xu F. Inhibition of P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi mediated resistance by fluoxetine in MCF-7/ADM cells. *Biomed Pharmacother* 2013;67:757-762.

Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, Yilmazer A, Paish EC, Ellis IO, Patel PM, Jackson AM. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2008;10:R95.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esin	Uyruğu	T.C
Soyadı	TATLI	Tel no	05318741632
Doğum tarihi	18.07.1990	e-posta	tatliesin@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Fevzi Çakmak Lisesi	2007
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi	2013
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD	2018
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Klinik Araştırma ve Saha Koordinatörü	ATLAS CRO	06.03.18-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Karaciğer metastazi oluşturulmuş deneysel metastatik meme kanseri fare modelinde pegile doksorubisin ve fluoksetin kombinasyonunun antineoplastik etkilerinin araştırılması	Bilimsel araştırma projeleri	2016-2018
Meme kanserinde CXC kemokinlerinin regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmaların araştırılması: CXC Kemokin Reseptör 2 antagonistlerinin anti-tümöral etkilerine karşı olası direnç mekanizmaları	TUBİTAK	2015-2017

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

1. Özbey G, Dalaklıoğlu S, Özdem S, Uzun G, Tatlı E, Erin N. Erken Dönemdeki Doksorubisin- Fluoksetin Kardiyotoksisitesinde Biyokimyasal Belirteçler. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2018;1:25-31.

2. Özbey G, Taşatargil S, Özdem S, Uzun G, Tatlı E, Erin N. Doksorubisin-Fluoksetin Kombinasyonunun Uygulanması Sırasında Oluşabilen Kardiyotoksisiteyi, Erken Dönemde Biyokimyasal Belirteçler İle Belirleyebilir miyiz? Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Uluslararası Katılımlı Kongre Lab&Expo 2017, Antalya, 1-5 Ekim 2017, sayfa 116-116, (sözlü bildiri)