



## Palbosiklib'in Triple Negatif Meme Kanseri Hücre Hatları (MDA-MB-231 ve MDA-MB-468) Üzerine Sitotoksik Etkisi

Gülcan Bulut<sup>1</sup>, Harika Atmaca<sup>2</sup>, Burçak Karaca<sup>3</sup>

1 Defne Hastanesi, Medikal Onkoloji Bölümü, Hatay, Türkiye

2 Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi, Moleküler Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

3 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Medikal Onkoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş: 09.03.2021; Revizyon: 09.11.2021; Kabul Tarihi: 15.11.2021

### Öz

**Giriş ve amaç:** Triple negatif meme kanseri, en agresif meme kanseri türüdür ve kemoterapiden başka bir tedavi seçeneği yoktur. Palbosiklib (PD), Siklin Bağımlı Kinaz (CDK4/6) aktivitelerini inhibe eder. PD, düşük nanomolar konsantrasyonlarda Rb genlerini sağlam olan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve DNA replikasyonunu baskılar. Rb yolu meme kanseri fenotipine göre farklılık gösterdiğinden, PD tedavisine duyarlılık da değişir. PD'nin hormonoterapiyle kombine edilmesi hormon pozitif meme kanseri tedavisinde iyi bir seçenektir. Bu çalışmada PD'nin triple negatif meme kanseri hücre hatlarındaki (MDA-MB-231 ve MDA-MB-468) sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

**Yöntemler:** Triple negatif bu hücre hatları uygun besi yerine ekilip; uygun inkübatörde çoğaltıldı. Yeterli canlı hücre sayısına ulaşınca besiyerindeki hücreler deney planına göre planlanan dozda palbosiklib ile muamele edildi. XTT hücre canlılığı Kiti kullanılarak hücre canlılığı 24,48 ve 72. saatte ölçüldü. Hücrelerin %50 sini öldüren doz: IC50 değerleri CalcuSyn v2.0 yazılımı ile hesaplandı. Her deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Grafikler ve istatistiksel analiz Graphpad 5.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Data analizi için ANOVA, ardından Dunnet test uygulandı.  $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** Palbosiklib; MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde artan konsantrasyonlarda (1-50  $\mu\text{M}$ ) zamana bağlı sitotoksik etki gösterdi ( $p \leq 0.05$ ). 72. saatteki IC50 değeri ise 26.2  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. Aynı şekilde, PD artan konsantrasyonlarda (1-50  $\mu\text{M}$ ) MDA-MB-468 hücre hattı üzerinde zamana bağlı sitotoksik etki gösterdi ( $p \leq 0.05$ ). 72. saatteki IC50 değeri ise 34.2  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı.

**Tartışma ve Sonuç:** Hızlı proliferen olan triple negatif meme kanserinde CDK4 ve CDK 6 sistemini hedeflemek ve palbosiklib ile olası hücresel arresti sağlamak bu çalışmanın primer amacıydı ve bu hücre kültür deneyi ile palbosiklibin kanserli hücreler üzerinde doz ve zamana bağlı olarak artan sitotoksitesi gösterildi. Bu çalışma; ilaç kombinasyonu çalışmalarına ve in vivo çalışmalar ışık tutacak niteliktedir.

**Anahtar kelimeler:** Palbosiklib, sitotoksite, triple negatif, meme kanseri.

DOI: 10.5798/dicletip.1037795

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Gulcan Bulut, Medical oncologist, Defne Hospital, Uğur Mumcu street, 31030 Antakya, Hatay, Turkey e-mail: gulcanbulut07@gmail.com

## Cytotoxic Effect of Palbociclib on Triple Negative Breast Cancer Cell Lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-468)

### Abstract

**Objective:** Triple negative breast cancer is the most aggressive breast cancer, and there is no other treatment option than chemotherapy. Palbociclib (PD) inhibits CDK4 / 6 activities. Since the Rb pathway differs according to breast cancer phenotype, sensitivity to PD treatment also varies. In this study, cytotoxic effects of PD in triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-468) were investigated.

**Method:** These triple negative cell lines were transplanted into the appropriate medium; propagated in the appropriate incubator. When a sufficient number of viable cells reached, the cells in the medium were treated with palbociclib at the planned dose according to the experimental plan. Cell viability was measured at 24, 48 and 72 hours using the XTT cell viability Kit. IC50 values were calculated with CalcuSyn v2.0 software. Graphs and statistical analysis were done using Graphpad 5.0 software. For data analysis; ANOVA followed by Dunnet tested.  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

**Results:** Palbociclib showed a time-dependent cytotoxic effect with increasing concentrations (1-50  $\mu\text{M}$ ) on the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines ( $p \leq 0.05$ ). IC50 value at 72 hours was calculated as 26.2  $\mu\text{M}$  for MDA-MB231 and as 34.2  $\mu\text{M}$  for MDA-MB468.

**Conclusion:** Targeting the CDK4 and CDK 6 system in rapidly proliferating triple negative breast cancer and providing possible cellular arrest with palbociclib was the primary purpose of this study, and the increased cytotoxicity of the drug on cells depending on dose and time was demonstrated in this experiment. This study will shed light on drug combination studies and in vivo studies.

**Keywords:** Palbociclib, cytotoxicity, triple negative, breast cancer.

### GİRİŞ

Triple negatif meme kanseri (TNMK); tüm meme kanserlerinin %12-20'sini oluşturan, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) amplifikasyonundan yoksun agresif meme kanseri alttürüdür<sup>1</sup>. Triple (-) meme kanseri yüksek gradeli tümörlerdir ve daha genç yaşta görülür. TNMK'nin diğer meme kanseri tiplerine göre daha kötü prognozudur<sup>2</sup>. Çünkü TNMK, diğer meme kanseri alt tiplerinde hasta prognozunu iyileştiren geleneksel endokrin veya HER2 hedefli tedavilere cevap vermez. Şimdiye kadar kemoterapiye (KT) ek olarak uygulanabilecek etkili bir hormonal tedavisi veya hedeflenmiş tedavisi yoktur. Son zamanlarda, gen ekspresyon analizlerine göre oldukça heterojen bir grup olan TNMK; bazal-benzeri (BL1 and BL2), immunomodulator (IM), mezenkimal (M), mezenkimal stem-benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptör (LAR) alttip olmak üzere 6 tip olarak tanımlanmıştır<sup>3</sup>. En büyük kısmını %60-70 ile bazal benzeri tip

oluşturur ki bu grupta da BRCA mutasyonuna daha sık rastlanmaktadır<sup>4</sup>. Androjen reseptörü eksprese eden LAR tipi tüm TNMK'in %10-15 ini oluşturup anti-androjenler ile tedavi edilebilmektedir<sup>5</sup>. Her bir grup için ayrı ayrı tedaviler geliştirilmeye devam etmektedir. Özellikle kemoterapi dışında immunoterapiler, PARP inhibitörleri, anti-androjen tedaviler umut vaat etmektedir.

Palbosiklib (PD-0332991, Pfizer); pyridoprimidin bileşiklerinden geliştirilmiş ağızdan alınabilen siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6)'ın selektif inhibitörü olarak etkinlik gösterir<sup>6</sup>. CDK4 / 6 - RB1 eksen, hücre döngüsünü G1 fazında kontrol eder ve kanser gelişimi için bu eksen düzeninin bozulması gerekmektedir. Siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsünün kontrolünde temel rol oynar. CDK'lardaki ve düzenleyicilerindeki genetik değişikliklerin insidansının bazı kanserlerde yüksek olması CDK'ları kanser gibi proliferatif hastalıklarda tedavi hedefi haline getirmiştir. Bu nedenle CDK

spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi için önemli sayıda çalışma başlatılmıştır. Kimyasal olarak çok çeşitli, CDK1, CDK2 ve CDK5'e yüksek afiniteye sahip inhibitör geliştirilmiş ve kanser tedavisinde kullanılmak üzere birçoğunun klinik denemeleri başlamıştır<sup>7,8</sup>. CDK'lardan 4 tanesi hücre bölünmesinde rol alır CDK1, G2 fazından M fazına geçişi düzenlerken; CDK2, CDK4 ve CDK6 ise G1'den S fazına geçişi düzenler. G1'den S fazına geçiş için Retinoblatoma (Rb) proteininin aktive edici alt üniteleri olan D tipi siklinler ile kompleks haldeki CDK4 veya CDK6 tarafından fosforillenmesi gerekir. RB'nin hiperfosforillenmesi E2 ailesi transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla gerçekleştirdiği gen ekspresyonunu baskılama fonksiyonunu azaltır ve sonuç olarak DNA replikasyonu için gerekli protein ürünlerinin sentezine yol açar. Bu nedenle, CDK4 ve CDK 6'nın katalitik alt ünitesi G1/S geçişini ve hücre bölünmesini düzenleyen önemli bir kontrol noktasıdır<sup>9</sup>. Meme kanserlerinin %20-35'inde Rb ekspresyonu olmayıp, meme kanserlerinin çoğunda mevcuttur. Rb ekspresyon kaybı en sık triple negatif meme kanserleri alt tipinde rastlanmaktadır<sup>10</sup>. Rb inaktivasyonu proliferasyon kontrolünün kaybına ve invaziv fenotipe dönüşe neden olur. Rb'nin kaybı fonksiyonel olduğunda hücre-hücre adezyonunun bozulmasına ve epitelyal-mezenkimal dönüşümüne yani potansiyel olarak metastazın artışına neden olur. Rb'nin deregulasyonunun östrojen reseptör (ER) pozitif meme kanserlerinde kötü prognoza, neden olduğu gösterilmiştir<sup>11</sup>. Meme kanserlerinin çoğunda Rb fonksiyonel olduğu halde, CDK4/6-siklin D yolağını pek çok nedenden dolayı bozulmuş olabilir. Siklin D1 meme kanseri gelişimi ve oluşumu için önemlidir. Siklin D1 amplifikasyonu meme kanserlerinin %15'inde görülmesine karşın, protein over ekspresyonu %50'den fazlasında görülür<sup>12</sup>. Siklin D'in iki izoformundan biri olan siklin D1 artışı; meme kanserinin nüksü, uzak

metastazlar ve yaşam süresindeki azalmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>18</sup>. CDK4/6-siklin D heterodimerinin oluşumu için Cip/Kip ailesi proteinlerine ihtiyaç vardır. RB yolağını düzenleyen siklin E miktarlarının artışı ve p27/Kip1 kaybı meme kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Tümör baskılayıcı olarak bilinen CDK inhibitörü p16'nın inaktivasyonu ise invaziv meme kanserlerinin %50'sinde görülmektedir. P16'nın inaktivasyonu hücre bölünmesinin kontrolünün kaybına ve proliferasyonun artışına neden olur<sup>13</sup>. Rb yolağı meme kanseri alt gruplarında değişiklikler göstermektedir. Luminal A tümörlerde Rb genellikle sağlamken, triple negatif tümörlerde Rb kaybı gözlenir. Siklin D1 amplifikasyonuna genellikle luminal B tümörlerde ve triple negatif tümörlerde rastlanır. Her-2 pozitif meme kanserlerinde ise CDK4 ve siklin D1 amplifikasyonu gözlenmektedir<sup>14</sup>. Meme kanserlerinin en büyük alt grubu; hormon reseptör pozitif olup, proliferasyon için östrojen sinyalizasyonuna ihtiyaç duyar. Östrojen hücrelerin G1den S fazına geçişini indükler. Postmenopozal kadınlarla yapılan bir randomize çalışmada, hormonoterapi tedavisi görmüş Rb sağlam hastalar tedaviden anlamlı derecede fayda sağlarken, Rb'si fonksiyonel olmayan hastalarda fayda sağlanamamıştır<sup>15</sup>. Bir CDK4/6 inhibitörü olan palbosiklib ER pozitif HER2 negatif meme kanserinde PALOMA1 çalışmasında letrazolle birlikte PFS de 10,2 aya karşılık 20,2 ay fark oluşturup FDA onayı almıştır<sup>16</sup>. PALOMA2 ve PALOMA3 ile de progresyonsuz sağ kalımda önemli iyileşmeler göstermiş ve tedavi stratejisi haline gelmiştir<sup>17-18</sup>. Fakat sitotoksik kemoterapiler dışında tedavileri ihtiyaç duyan triple negatif meme kanserinde etkinliğinin araştırıldığı yayınlanmış bir klinik çalışma bulunmamaktadır. Clinical Trials.gov'a bakıldığında triple negatif, androjen reseptörü pozitif kanserde bikalutamib ile kullanımını

araştıran bir tek faz 1 çalışmaya rastlandı (Identifier: NCT02605486).

MDA-MB231 ve MDA-MB468 hücre hatları ise Rb ekspresyon kaybı olmayan triple negatif meme kanserine örnek model oluşturan hücre hatlarıdır<sup>19</sup>. Literatürde triple negatif hücre hatlarında palbosiklibin etkilerinin araştırıldığı iki adet çalışmaya rastlandı. Birinci yayın McClendon ve arkadaşları tarafından triple (-) meme kanseri hücre hatlarında palbosiklib ile antrasiklinlerin antagonistik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmış ve Rb gen defekti ile ilişkilendirilmiştir. Rb geni defektif tümörlerde kombinasyonun etkin olabileceği sonucunu varılmıştır<sup>20</sup>. İkinci yayın Ge Qin ve arkadaşları tarafından Palbosiklib'in hücre hatlarından biri MDA-MB231 olmak üzere meme kanseri hücre hatlarında c-Jun/COX-2 yolağı üzerine etkinliğini araştırmak amacıyla kurulmuştur<sup>21</sup>.

Çalışmamızın amacı; palbosiklib ile olası hücre arrestini eden BL-1 örnek olan MDA-MB468 hücre hattı ve MSL hücre hattına örnek olan MDA-MB231 hattındaki sitotoksik etkilerini ortaya koymaktır ve ileri düzey çalışmalara taşınmaktır.

## YÖNTEMLER

Çalışma; 2016-2019 yılları arasında, Ege Üniversitesi Tülay Aktaş Onkoloji hastanesi hücre kültür laboratuvarında in vitro olarak çalışılmıştır. Ticari olarak sağlanan devamlı hücre kültürü deneyi olduğundan etik kurul gerekliliği olmayan çalışmalar grubundadır ve Üniversite Bilimsel araştırma fonu (Proje No: 16-TIP-040) tarafından desteklenmiştir.

### **İnsan Triple Negatif Meme Kanseri Hücre Hatlarının Laboratuvar Ortamına Adaptasyonu ve Çoğaltımı**

Çalışmada triple negatif fenotipe sahip MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatları kullanılmıştır. Meme hücre hatları Dulbecco's Modified Eagle's medium besiyeri kullanılarak

idame ettirildi. Mikrobiyal ve fungal enfeksiyonu önlemek için besiyerine penisilin-streptomisin ilave edildi. Hücreler 37 °C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörlerde çoğaltıldı ve çalışma sırasında sıvı azot içinde dondurularak saklandı<sup>22</sup>.

### **Hücrelerin Sayımı**

Hücreler, deneylerde kullanılacak miktarlarda hazırlanabilmesi için sayım işlemine tabi tutuldu. Hücrelerin kültür kabının zemininde tutunarak oluşturdukları hücre tabakası 5 ml Tripsin EDTA ile 5 dakika muamele edilerek hücre tabakasının zeminden ayrılması sağlandı. Steril santrifüj tüpüne alınan hücre çözeltisi santrifüj işleminden sonra süpernatantı atılarak dibe çöken hücre pelleti besiyeri ile seyreltildi. Homojenize edilen hücre süspansiyonundan 50 µl alınıp ve 50 µl Tripkan mavisini ile karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnek, hemositometre lamına aktarıldı ve lamdaki boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak hücre süspansiyonunun ml'sindeki canlı hücre sayısı belirlendi. Sonuçlar otomatik hücre sayım cihazı kullanılarak doğrulandı<sup>23</sup>.

### **Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

Tetrazolium tuzlarından biri olan XTT [ 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2Htetrazolium-5-carboxanilide] hücre canlılığı ölçümünde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, metabolik olarak aktif hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan XTT'nin suda çözünebilir turuncu renkli formazan tuzuna çevrilmesine dayanır. XTT uygulaması gerçekleştirildikten sonra örnekler çok modlu plaka okuyucu tarafından analiz edilerek meydana gelen renk değişimine göre çoğalan hücre miktarları belirlenmektedir. XTT analizi sayesinde meme hücrelerine uygulanan ajanların IC<sub>50</sub> dozları (hücrelerin %50'sini öldüren ilaç dozu) belirlenebilmiştir. Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür plakalarına (10.000 hücre/kuyucuk) ekilecek olan hücreler, ajanların artan dozlarıyla 24, 48 ve 72 saat

boyunca muamele edildi. Her kuyucuğa XTT solüsyonundan 100 µl eklendi ve CO<sub>2</sub>'li inkübatörlerde 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. Hücrelerin çoğalma değerleri 490 nm dalga boyunda çok modlu plaka okuyucu ile optik yoğunluğun belirlenmesi ile elde edilen değerlerle hesaplandı.

#### IC50 değerlerinin Hesaplanması

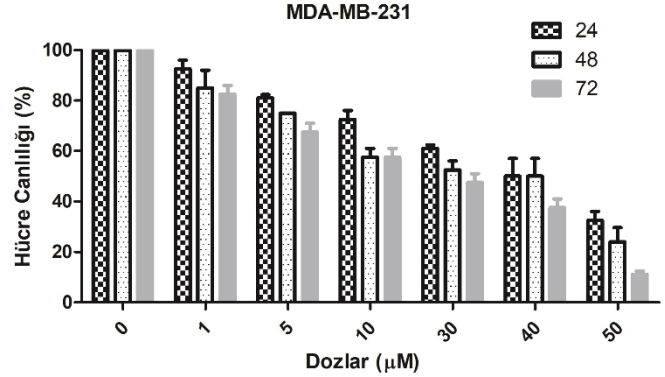
PD'nin meme kanseri hücre hatlarındaki IC50 değerleri CalcuSyn v2.0 yazılımı kullanılarak 24., 48. ve 72. saatler için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

#### İstatistiksel Analiz

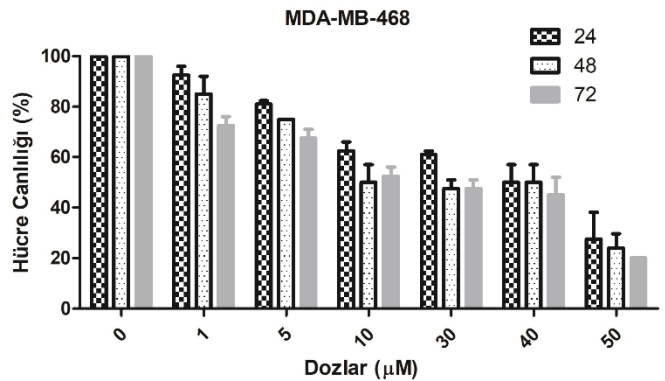
Her deney 3 kuyucukta 3 tekrarlı gerçekleştirildi. Grafikler ve istatistiksel analiz Graphpad 5.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. IC50 değerlerinin hesaplanmasında Calcusyn programı kullanıldı. Data analizi için ANOVA, ardından Dunnet test uygulandı.  $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### BULGULAR

PD'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkileri Şekil 1 ve Tablo 1'de görüldüğü gibi, PD (1-50 µM) artan konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde zamana bağlı sitotoksik etki gösterdi ( $p \leq 0.05$ ). PD'nin 24. saatteki IC50 değeri 71.2 µM, 48. saatteki IC50 değeri 62.6 µM, 72. saatteki IC50 değeri ise 36.2 µM olarak hesaplandı. PD'nin MDA-MB-468 hücre hattı üzerindeki etkileri şekil 2 ve tablo 1'de görüldüğü gibi; PD (1-50 µM) artan konsantrasyonlarda MDA-MB-468 hücre hattı üzerinde zamana bağlı sitotoksik etki gösterdi ( $p \leq 0.05$ ). PD'nin 24. saatteki IC50 değeri 39.2 µM, 48. saatteki IC50 değeri 42.2 µM, 72. saatteki IC50 değeri ise 34.2 µM olarak hesaplandı (1-50 µM).



Şekil 1: PD'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki zamana ve doza bağlı sitotoksik etkisi.



Şekil 2: PD'nin MDA-MB-468 hücre hattı üzerindeki zamana ve doza bağlı sitotoksik etkisi

Tablo 1: PD'nin MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hattı üzerinde 24. Saat, 48. Saat ve 72. Saatteki IC50 değerleri

Palbosiklib (µM)	24. saat	48. saat	72. saat
MDA-MB-231	71.2	62.6	36.2
MDA-MB-468	39.2	42.2	34.2

#### TARTIŞMA VE SONUÇ

Palbosiklib (PD); siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6)'ın selektif inhibitörü olarak etkinlik gösterir<sup>8</sup>. ER pozitif meme kanserinde etkinliği kanıtlandı ve pratiğimize yansıdı. Triple negatif meme kanseri; agresif seyirlidir ve tüm meme kanserlerinin %12-20'sini oluşturur. Kemoterapi dışında tedavi alternatifi yoktur<sup>1</sup>.

Yeni tedavi modaliteleri geliştirilmesine ihtiyaç duyulan hasta grubudur. Kanser tedavisinde ilaç direnci başarıyı etkileyen nedenlerden biridir. İlaç direncinin önde gelen nedenlerinden birisi ise genetik mutasyonlarıdır. Hücre içi çeşitli sinyal yollarında gözlenen değişimlerin ilaç direncine neden olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı, Palbosiklib'in yeni tedavi seçeneklerine gereksinim duyan triple negatif meme kanserinde olası etkinliğinin in vitro modellerde araştırılmasıdır. Son zamanlarda, CDK4/6 komplekslerini hedeflemenin, östrojen reseptörü pozitif tümörleri olan meme kanseri hastalarının hayatta kalmasını arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, meme kanseri hücreleri PD'nin artan konsantrasyonlarıyla (1-50  $\mu\text{M}$ ) 24, 48 ve 72 saat sürelerince muamele edildi. Hücre canlılığının ölçülmesinde XTT testi (Roche, Germany) kullanıldı. Palbosiklib'in IC50 değerleri CalcuSyn 2.1 (Biosoft, İngiltere) yazılımında hesaplandı. Grafiklerin çizimi ve verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, ABD) yazılımı ile yapıldı. Palbosiklib'in artan konsantrasyonlarıyla (1-50  $\mu\text{M}$ ) 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılıkları hesaplandı. PD'nin triple negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücre hattı için 72. saatteki IC50 değeri ise 36.2  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. MDA-MB-468 için ise PD'nin 72. saatteki IC50 değeri 34.2  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. BL-1'e örnek olan MDA-MB-468 için palbosiklib IC50 değerleri daha düşük olsa da iki hücre hattında da benzer etkinlik gösterildi. Literatürde PD'nin meme kanseri hücre hatlarında etkilerinin araştırıldığı çalışmalar kısıtlıdır, triple negatif meme kanseri hücre hatlarındaki etkileri ise henüz gösterilmemiştir. Petrossian ve arkadaşları PD'nin 0-5000 nM konsantrasyonlarda etkilerini araştırmış, IC50 değerini 5. günde 0.1  $\mu\text{M}$  olarak hesaplamışlardır. Çalışmamızla paralel olarak PD, MCF-7 hücreleri üzerinde artan konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir<sup>24</sup>. Brown ve arkadaşlarının mide

kanseri hücrelerinde yaptığı in vitro çalışmada, PD'nin mide kanseri hücre hatlarında sitotoksik ve otofajik etkilerinin olduğunu göstermişlerdir<sup>25</sup>. Bu çalışmada PD'nin IC50 değerini 96. saatte 0.5  $\mu\text{M}$  olarak hesaplamışlardır. Capparelli ve arkadaşlarının PD ile yaptığı diğer bir çalışmada ise IC50 değerleri 36. saatte 1  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır<sup>26</sup>. PD için hesaplanan IC50 değerlerindeki bu farklılık kullanılan hücre tipinin farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi, IC50 dozunun hesaplandığı zaman diliminin farklı olmasından da kaynaklanabilir. PD, meme kanseri gibi Rb proteini sağlam olan hücrelerin çoğalmasında düşük nanomolar konsantrasyonlarda inhibe eder ve DNA replikasyonunu baskılar<sup>25,26</sup>. RB proteini olmayan hücrelerde ise etkili bulunmamıştır. In vivo olarak, meme kanseri xenograft'larında tümör büyümesinde neredeyse tamamen baskılanma tespit edilmiştir. PD'nin CDK4/6-siklin D spesifik olarak inhibe etmesi onkogenik olayların inhibisyonuna neden olurken, nispeten daha inaktif ve bölünmeyen durumdaki normal dokularda etkisi daha azdır<sup>26-28</sup>. Rb yolağı meme kanseri fenotipine göre farklılık gösterdiğinden, PD'ye olan sensitivite de farklılık göstermektedir. Finn ve ark. meme kanseri alt tiplerini çalışmış ve luminal özellikli ER-pozitif hücre hatlarının daha sensitif olduğunu, bazal tiplerin ise resistant olduğunu göstermiştir. Tamoksifene resistan hücre hatlarında PD monoterapisi etkili olmakla birlikte kombinasyonda artan aktivite gözlenmiştir<sup>23</sup>. Hormonal terapiye dirençli meme kanseri modellerinde, ER antagonistlerinin etkisinden farklı olarak PD proliferasyonu baskılamaktadır ve hücre döngüsünde duraksamaya neden olur. Artan Rb ve siklin D1 ile azalan p16 seviyeleri PD'ye sensitivite ile ilişkili bulunmuştur. PD'ye dirençli bazı non-luminal hücre hatlarında fosforile Rb görülmektedir. Bu direnç mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, CDK 4/6 mutasyonları, CDK 1/2, siklin

E bağımlılığının artışı ve CDK negatif regülatörlerinin kaybı gibi durumlar dirence sebep olabilir. Klinik açıdan anlamı fonksiyonel Rb gerekli ancak bu ajana cevabın öngörülmesinde yeterli değildi<sup>25,29</sup>. PD Hücre döngüsünü hedef alan ilaçlarla kombine edildiğinde artan etki gözlenmiştir. ER pozitif hücre hatlarında Tamoksifen ile sinerjistik; HER2 amplifiye hücre hatlarında ise Trastuzumab ile sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir<sup>21</sup>. Rb 'si fonksiyonel ve nonfonksiyonel meme kanseri fare modellerinde karboplatinle PD kombine edildiğinde, Rb 'si fonksiyonel olan modellerde aditif etki gözlenmiştir. Rb'si fonksiyonel triple negatif meme kanseri hatlarında PD hücreleri doksorubisin sitotoksitesinden korur. Ayrıca, aynı hücre hattı (MDA-MB-231) paklitaksel muamelesinden önce PD ile sürekli muamele edildiğinde hücre sayısında artışa neden olur. Antrasiklinlerle taksanların etki mekanizmaları farklı olsa da her iki ilaç sınıfı da DNA hasarı meydana getirir. PD, G1 fazında duraklamaya neden olarak Rb si sağlam hücrelerde bu iki sınıf ilacın neden olduğu apoptozisten hücreyi korur. CDK 4/6 inhibisyonu DNA tamir oranını değiştirmez ancak homolog rekombinasyon tamirinden non-homolog uçların birleştirilmesi tamir sistemine geçişe neden olur. CDK 4/6 inhibisyonu sitotoksik terapinin apoptotik etkisini antagonize etmekle kalmayıp, hataya yatkın tamir sistemlerini aktive ederek hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Bu çalışmanın aksine, başka bir çalışmada ise paklitaksel uygulamasından 24 saat önce sürekli PD uygulanması sitotoksitede artışa neden olmuştur. CDK 4/6 inhibitörü ile muamele edilen hücreler senkronize halde S fazına geçeceği için bu fazda sitotoksik DNA hasarına daha yatkın olabilirler. Yine de bu sonuçların doğrulanmaya ihtiyacı vardır.

Sonuç olarak; TNBC agresif seyirli bir tümördür. CDK4 ve CDK6 hücre proliferasyonunda etkin rol oynar, hücrelerin DNA sentez fazına girişini

yöneten enzimler olup aktivitelerinin pek çok kanser tipinde attığı bilinmektedir. Bu çalışmada hızlı proliferasyon olan triple negatif meme kanseri hücre hatlarında CDK4 ve CDK 6 sistemini hedeflemek ve palbosiklib ile olası hücresel arrestin sağlanabileceği gösterildi. In vitro olarak triple negatif meme kanserinde Palbosiklib'in sitotoksik etki gösterdiği bu çalışma ile ortaya koyuldu. Yeni çalışmalarda seçilecek sitotoksik ajanlarla kombinasyonun bu etkinliği arttıracığı düşünülmektedir.

**Etik Kurul Kararı:** Ticari olarak sağlanan devamlı hücre kültürü deneyi olduğundan etik kurul gerekliliği olmayan çalışmalar grubundadır.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

**Finansal Destek:** Üniversite Bilimsel araştırma fonu (Proje No: 16-TIP-040) tarafından desteklenmiştir.

**Declaration of Conflicting Interests:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** It was supported by Ege university scientific reseach fund ( Project number: 16-TIP-040 )

## REFERANSLAR

1. Prat A, Pineda E, Adamo B, et.al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015; 24: 26–35.
2. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et.al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 4429–34.
3. Brian D Lehmann 1, Joshua A Bauer, et.al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011; 121: 2750–67.
4. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et.al. Immunohistochemical and clinical characterization

of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5367–74.

5. Barton VN, Nicholas C. D'Amato, Michael A. Gordon et al. Androgen receptor biology in triple negative breast cancer: a case for classification as AR+ or quadruple negative disease. *Horm Cancer.* 2015; 6: 206–13.

6. Finn R, Dering J, Conklin D, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: 77.

7. Asghar U., Witkiewicz A. K., Turner N. C. et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015 Feb; 14: 130-46.

8. Vidula N., & Rugo H. S. et al. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors for the treatment of breast cancer: a review of preclinical and clinical data. *Clin Breast Cancer* 2016 Feb; 16: 8-17.

9. Pavletich N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 1999 Apr 16; 287: 821-8.

10. Witkiewicz A. K., & Knudsen E. S. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res.* 2014; 16: 207.

11. Ertel A., Dean J. L., Rui H., et al. RB-pathway disruption in breast cancer: differential association with disease subtypes, disease-specific prognosis and therapeutic response. *Cell cycle*, 2010; 9: 4153-63.

12. Casimiro MC, Crosariol M, Loro E, et al. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer.* 2012; 3: 649-57.

13. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol.* 2013; 6: 88.

14. Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, et al. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1998; 58: 3508-12.

15. Clark AS, Karasic TB, DeMichele A, et al. Palbociclib (PD0332991)-a Selective and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor: A Review of Pharmacodynamics and Clinical Development. *JAMA Oncol.* 2016; 2: 253-60.

16. Richard S Finn, John P Crown, Istvan Lang, et al. The cyclindependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/ TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 25–35.

17. Im SA, Mukai H, Park IH, et al. Palbociclib Plus Letrozole as First-Line Therapy in Postmenopausal Asian Women With Metastatic Breast Cancer: Results From the Phase III, Randomized PALOMA-2 Study. *J Glob Oncol.* 2019; 5: 1-19.

18. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 425-39.

19. Brian D. Lehmann, Joshua A. Bauer, Xi Chen, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies *Clinical Inv* 2011; 121: 2750-67.

20. McClendon AK, Dean JL, Rivadeneira DB, et al. CDK4/6 inhibition antagonizes the cytotoxic response to anthracycline therapy. *Cell Cycle.* 2012; 11: 2747-55.

21. Qin G, Xu F, Qin , et al Palbociclib inhibits epithelial- mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-jun/Cox-2 signaling pathway. *Oncotarget.* 2015;12:41794-808.

22. İlhan S. Kurkuminin Kök Hücre Koruyucu ve Farklılaştırıcı Etkisinde Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 Alfa'nın Rolü. *Dicle Tıp Dergisi*, 2020; 47: 881-8.

23. İlhan S. Essential Oils from *Vitex agnus castus* L. Leaves Induces Caspase-Dependent Apoptosis of



Human Multidrug-Resistant Lung Carcinoma Cells through Intrinsic and Extrinsic Pathways, *Nutrition and Cancer*, 2021; 73: 694-702.

24. Petrossian K, Kanaya N, Lo C., et.al. ER $\alpha$ -mediated cell cycle progression is an important requisite for CDK4/6 inhibitor response in HR+ breast cancer. *Oncotarget*, 2018; 9: 27736.

25. Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, et.al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell cycle*. 2012; 11: 3599-610.

26. Valenzuela, C. A., Vargas, L., Martinez, V., et.al. Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 2017; 360: 390-96.

25. Freedman GM, Anderson PR, LiT, Nicolaou N. Local-Regional Recurrence of Triple Negative Breast

Cancer after Breast-Conserving Surgery and Radiation. *Cancer* 2009; 115: 946-51.

26. Dawood S. Triple-negative breast cancer: epidemiology and management options. *Drugs* 2010; 70: 2247-58.

27. Panoff JE, Hurley J, Takita C, et al. Risk of locoregional recurrence by receptor status in breast cancer patients receiving modern systemic therapy and post-mastectomy radiation. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128: 899-906.

28. Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, et.al. Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breastconserving therapy. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2852-58.

29. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns and treatment of patients with triple negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009; 9: 73-81.