

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**SUBSTANCE P ANTAGONİSTLERİNİN**  
**FARE MEME KANSERİ METASTAZI ÜZERİNE**  
**ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Esra NİZAM**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2016**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**SUBSTANCE P ANTAGONİSTLERİNİN  
FARE MEME KANSERİ METASTAZI ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Esra NİZAM**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nuray ERİN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
(Proje No: 214.02.0122.010) ve TÜBİTAK (Proje no:214S389) Tarafından Desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezimizden Yararlanılabilir.”

**Antalya, 2016**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 12 Şubat 2016

**Tez Danışmanı** : **Prof. Dr. Nuray ERİN**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı



**Üye** : **Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM**  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı



**Üye** : **Doç. Dr. Mustafa YILDIZ**  
Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi  
Onkoloji Anabilim Dalı



**ONAY:**

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../ 2016 tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Narin DERİN**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Meme kanserine bağlı mortalitenin en önemli sebebi uzak metastazlara bağlı yaşamsal fonksiyonların bozulmasıdır. Meme kanserinin sık metastaz yaptığı organlar kemik, karaciğer, akciğer ve beyindir. Etkin tedavi yöntemleri geliştirebilmek için metastaz yapabilen hücrelerin özelliklerinin belirlenmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin bu hücrelerde ayrıca araştırılması gerekmektedir.

Tachykinin ailesinden olan Substans P (SP), hem nöronlarda hem de nöron dışı hücrelerde bulunmakta, nörojenik inflamasyonda, ağrının duyumsanmasında ve immün sistemin regülasyonunda rol oynamaktadır. SP'nin kanser gelişimi üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu konunun netleşebilmesi için Substance P reseptörleri olan NK1 (neurokinin 1) ve NK2 (neurokinin 2) reseptörlerine spesifik antagonistlerinin farklı metastatik meme kanser modellerinde etkilerinin ayrıntılı çalışılması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı fare metastatik meme kanseri hücre modellerinde Substance P antagonistlerinin etkilerini araştırmaktır.

Çalışmamızda fare metastatik meme kanser hücresi (4T1) ve bu hücrenin karaciğere (4TLM), beyine (4TBM) ve kalbe (4THM) metastazlarında ve metastatik olmayan fare meme kanser hücresinde (67NR), NK1 reseptör antagonisti (RP 67580) ve NK2 reseptör antagonisti (GR 159897) nin hücre proliferasyonu üzerine in-vitro etkileri araştırılmıştır. Hücre içi sinyal yolları proteinleri AKT, ERK ve P38'in fosforilasyonları üzerine etkileri western blot ile tayin edilmiştir. Ayrıca anjiyojenik bir faktör olan MIP-2 (Makrofaj Inflammatory Protein 2)'nin sekresyonundaki değişiklikler elisa yöntemi ile tayin edilmiştir.

Bulgularımıza göre, metastatik hücrelerde NK1 ve NK2 reseptörü daha fazla eksprese edilmektedir. SP ve SP-metil esterinin hücreler üzerinde mitojenik etkisi görülmedi. NK1 reseptör antagonisti (30 µM) metastatik hücre dizilerinde sitotoksik etki gösterdi ve AKT fosforilasyonunu arttırdı. NK2 reseptör antagonisti (30 µM) ise proliferasyonu baskıladı fakat P38 fosforilasyonunu arttırdı ve bu etki 10 µM SP ile değişmedi. NK2R antagonisti (30 µM) 4TBM ve 4THM'de MIP-2 sekresyonunu arttırdı. Bu etkinin sitokin salınımında rol oynayan P38 fosforilasyonundaki artış ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** SP, NK1 reseptör antagonisti, NK2 reseptör antagonisti, Metastatik meme kanseri, MIP-2.

## ABSTRACT

Distant metastasis is the leading cause of death in breast carcinoma. Breast carcinoma metastasizes frequently to bone, liver, and brain. In order to devise effective treatments, features of the cancer cells metastasized to distant organs should be explored and new treatments should be tested on metastatic cells.

Substance P, a member of Tachykinin family is found in both neuronal and non-neuronal cells. The role of Substance P in cancer progression and dissemination is not entirely known and there are conflicting results in the literature. In order to clarify these differences, specific antagonists of NK1 (neurokinin 1) and NK2 (neurokinin 2) receptors which mediate the effects of Substance P should be used in different metastatic cancer models. In this study, we aimed to examine the effect of substance p and of its antagonists in different metastatic breast cancer models.

In our this study, we investigated the effect of NK1 and NK2 receptor antagonists (RP 67580 and GR 159897) on the proliferation of the metastatic breast cancer cells (4THM, 4TBM, 4TLM) as well as the parental cells (4T1) and non-metastatic cells (67NR). The effects of antagonists on phosphorylation of AKT, ERK and p38, proteins that play a critical role in intracellular signaling pathways, were examined using Western Blot. Given the fact that SP and its receptors (NK1 and NK2) play a significant role in regulation of inflammation, we also examined the changes in secretion of MIP-2, an inflammatory and angiogenic factor using ELISA.

We found that NK1 and NK2 receptors were over expressed in metastatic breast cells compared to non-metastatic cells. SP and SP methyl ester did not alter the growth rate of metastasis breast cancer cells. NK1 receptor antagonist at 30  $\mu$ M dose (relatively high dose) inhibited cell growth and induced cell death. In accordance, NK1R antagonists enhanced phosphorylation of Akt. This effect was not observed in 67NR, non-metastatic breast cancer cells. NK1R antagonist, however, significantly suppressed proliferation of 67NR cells, an effect less prominent than metastatic cells. NK2 receptor antagonist (30  $\mu$ M) also suppressed cell proliferation in all cell lines examined but the effect was less than the effects of NK1R antagonist. Differently NK2R antagonist also increased phosphorylation of P38 and increased MIP-2 secretion. SP did not alter the effects of NK1R and NK2R antagonists on cell proliferation

**Key Words :** SP, NK1 receptor antagonist, NK2 receptor antagonist, metastatic breast cancer , MIP-2.

## TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca benimle değerli tecrübelerini, bilgilerini ve fikirlerini paylaşan, çalışmam için bana fırsat üreten değerli danışmam hocam sayın Prof.Dr. Nuray ERİN'e

Tüm maddi ve manevi destekleri için, bitmek bilmeyen sorularımı her zaman sabırla cevaplayan, pozitif enerjileri ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım şule KALE, Mslime TANRISEVEN ve zlem AKDENİZ DUYMUŐ'a

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim sayın hocalarım Doc.Dr. Azmi YERLİKAYA ve Prof.Dr. Sadi ÖZDEM'e

Aynı laboratuvar ortamını paylaştığımız, sevgili arkadaşlarım Gkce ERDOğAN, Esra ÇELEN, Mustafa Gökhan ERTOSUN, Suray PEHLİVANOğLU, Gökhan GRĐŐEN, Fatma Zehra HAPİL ve Sayra DİLMAÇ'a

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Çıktığım bu yolda desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana benden daha çok inanan, ilk ğretmenlerim annem ve babam Gülnaz ve Durali TAVŞAN'a,

En iyi arkadaşım, anne yarım, benim canım teyzem, Nurcan őEN'e

Her takıldığımda sabırla, tekrar ve daha güçlü olarak ayağa kalkmamı sağlayan, her adımda yanımda yürüyen sevgili eşim Cihan NİZAM'a,

Benimle her zaman gurur duyan aileme ve tüm dostlarıma, içtenlikle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	
<b>2.1. Kanser</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Hücre içi Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1. Protein kinazlar ve sinyal iletimi</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1.1. MAP kinaz sinyal iletim yolu</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1.2. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1.3. PI-3 kinaz/protein kinaz B sinyal iletim yolu ve kanser</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Metastaz</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Meme kanseri</b>	<b>12</b>
<b>2.4.1. Meme Kanseri Tarihçesi</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2. Meme kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi</b>	<b>14</b>
<b>2.4.3. Meme Kanserinin Oluşumu</b>	<b>14</b>
<b>2.4.4. Meme Kanseri Metastazı</b>	<b>15</b>
<b>2.4.4.1. Meme Kanseri Metastazında Organ Tropizmi</b>	<b>16</b>
<b>2.4.4.2. Yeni Dokuya Adaptasyon- Mikroçevre</b>	<b>17</b>
<b>2.4.4.3. Pre-Metastatik Ortam ( Niche )</b>	<b>18</b>
<b>2.4.4.4. Pre-Metastatik Ortamın Moleküler Teşviki</b>	<b>18</b>
<b>2.4.4.5. Meme Kanseri Metastaz Oluşumunu İlerleten Genler</b>	<b>20</b>
<b>2.5. SP ve Reseptörleri</b>	<b>22</b>
<b>2.6. Makrofaj İnflamatuar Protein-2 (MIP-2)</b>	<b>25</b>

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

<b>3.1.</b>	<b>Hücre Kültürü Yöntemi</b>	<b>27</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>27</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler</b>	<b>27</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar</b>	<b>28</b>
<b>3.1.4.</b>	<b>Besiyerinin Hazırlanması</b>	<b>28</b>
<b>3.1.5.</b>	<b>Hücre Dizilerinin Hazırlanması</b>	<b>28</b>
<b>3.1.6.</b>	<b>Hücrelerin Dondurulması</b>	<b>29</b>
<b>3.1.7.</b>	<b>Hücre Standartlarının Hazırlanması</b>	<b>30</b>
<b>3.1.8.</b>	<b>SP, SP metil ester ve Antagonistlerinin Hazırlanması</b>	<b>30</b>
<b>3.1.9.</b>	<b>Hücre Kültüründe SP ve Antagonistlerin Etkilerinin Araştırılması</b>	<b>30</b>
<b>3.2.</b>	<b>Western Blot Yöntemi</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Hücre lizatlarının hazırlanması</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>Western Blot Yönteminde Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>32</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>Western Blot Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>33</b>
<b>3.2.5.</b>	<b>Jellerin hazırlanması</b>	<b>34</b>
<b>3.2.6.</b>	<b>Örneklerin jele yüklenmesi, SDS-PAGE, Transfer İşlemi</b>	<b>35</b>
<b>3.2.7.</b>	<b>Antikorlarla işaretleme</b>	<b>36</b>
<b>3.2.8.</b>	<b>Stripping Solüsyonu (Strip-Off solüsyonu)</b>	<b>36</b>
<b>3.2.9.</b>	<b>Görüntüleme</b>	<b>36</b>
<b>3.3.</b>	<b>Elisa Yöntemi</b>	<b>37</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Örneklerin Hazırlanması</b>	<b>37</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Elisa Yöntemi ile MIP-2 Tayininde Kullanılan Antikorlar ve Solüsyonlar</b>	<b>37</b>

## **BULGULAR**

<b>4.1.</b>	<b>Nörokinin 1 ve Nörokinin 2 Reseptör Ekspresyonu</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Hücre Dizilerinde Nörokinin-1 Reseptör Ekspresyonu</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>Hücre Dizilerinde Neurokinin-2 Reseptör Ekspresyonu</b>	<b>40</b>
<b>4.2.</b>	<b>Hücre Kültürü Sonuçları</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1.</b>	<b>Subtans P'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi</b>	<b>40</b>



<b>4.2.2.</b>	<b>Substans P -Metil esterin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi</b>	<b>41</b>
<b>4.2.3.</b>	<b>NK1R Antagonisti (RP67580) ve SP İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi</b>	<b>42</b>
<b>4.2.3.1.</b>	<b>4TBM Hücre Hattı</b>	<b>42</b>
<b>4.2.3.2.</b>	<b>4TLM Hücre Hattı</b>	<b>43</b>
<b>4.2.3.3.</b>	<b>4THM Hücre Hattı</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3.4.</b>	<b>4T1 Hücre Hattı</b>	<b>45</b>
<b>4.2.3.5.</b>	<b>67NR Hücre Hattı</b>	<b>46</b>
<b>4.2.4.</b>	<b>NK2R Antagonisti (GR159897) ve SP İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi</b>	<b>47</b>
<b>4.2.4.1.</b>	<b>4TBM Hücre Hattı</b>	<b>47</b>
<b>4.2.4.2.</b>	<b>4TLM Hücre Hattı</b>	<b>49</b>
<b>4.2.4.3.</b>	<b>4THM Hücre Hattı</b>	<b>50</b>
<b>4.2.4.4.</b>	<b>4T1 Hücre Hattı</b>	<b>51</b>
<b>4.2.4.5.</b>	<b>67NR Hücre Hattı</b>	<b>52</b>
<b>4.3.</b>	<b>Elisa Sonuçları</b>	<b>54</b>
<b>4.3.1.</b>	<b>4TBM ve 4THM hücre dizilerinde NK1R ve NK2R Antagonistlerinin MIP-2 Sekresyonu Üzerine Etkisi</b>	<b>54</b>
<b>4.3.1.2.</b>	<b>NK1R Antagonistinin MIP-2 Sekresyonu Üzerine Etkisi</b>	<b>54</b>
<b>4.3.1.3.</b>	<b>NK2R Antagonistinin MIP-2 Sekresyonu Üzerine Etkisi</b>	<b>56</b>
<b>4.4.</b>	<b>Western Blot Sonuçları</b>	<b>58</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>Hücre içi sinyal yollarında rol alan Akt, Erk ve p38 proteinlerinin fosforilasyonları üzerine NK1R, NK2R antagonistlerinin ve SP'nin etkisi</b>	<b>58</b>
<b>4.4.1.1.</b>	<b>4TBM Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu</b>	<b>58</b>
<b>4.4.1.2.</b>	<b>4TBM Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu</b>	<b>59</b>
<b>4.4.1.3.</b>	<b>4TBM Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu</b>	<b>59</b>
<b>4.4.1.4.</b>	<b>4TLM Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu</b>	<b>60</b>
<b>4.4.1.5.</b>	<b>4TLM Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu</b>	<b>60</b>
<b>4.4.1.6.</b>	<b>4TLM Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu</b>	<b>61</b>
<b>4.4.1.7.</b>	<b>4THM Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu</b>	<b>61</b>
<b>4.4.1.8.</b>	<b>4THM Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu</b>	<b>62</b>
<b>4.4.1.9.</b>	<b>4THM Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu</b>	<b>62</b>

<b>4.4.1.10.</b>	<b>4T1 Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu</b>	<b>63</b>
<b>4.4.1.11.</b>	<b>4T1 Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu</b>	<b>64</b>
<b>4.4.1.12.</b>	<b>4T1 Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu</b>	<b>64</b>
<b>4.4.1.13.</b>	<b>67NR Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu</b>	<b>65</b>
<b>4.4.1.14.</b>	<b>67NR Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu</b>	<b>65</b>
<b>4.4.1.15.</b>	<b>67NR Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu</b>	<b>66</b>
	<b>TARTIŞMA</b>	<b>67</b>
	<b>SONUÇLAR</b>	<b>71</b>
	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>73</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>80</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>APS</b>	:	Amonyum persülfat
<b>BSA</b>	:	Bovine serum albumin
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleikasit
<b>ECL</b>	:	Enhanced kemilüminesan
<b>EDTA</b>	:	Etilendiamintetraasetikasit
<b>EGFR</b>	:	Epidermal büyüme faktör reseptörü
<b>ERK1/2</b>	:	Ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz 1/2
<b>GAPDH</b>	:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<b>GTP</b>	:	Guanidintrifosfat
<b>GDP</b>	:	Guanidindifosfat
<b>GR-159897</b>	:	Nörokinin 2 reseptör antagonisti
<b>HER2</b>	:	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü
<b>IFN</b>	:	İnterferon
<b>IL</b>	:	İnterlökin
<b>K</b>	:	Kontrol grubu
<b>MAPK</b>	:	Mitogen aktived protein kinase
<b>MIP-2</b>	:	Makrofaj İnflamatuar Protein -2
<b>mRNA</b>	:	Mesajcı RNA
<b>NF-κB</b>	:	Nükleer faktör Kappa B hücresi
<b>NKR</b>	:	Nörokinin reseptörü
<b>NK1-R</b>	:	Nörokinin-1 reseptörü
<b>NK2-R</b>	:	Nörokinin-2 reseptörü
<b>PBS</b>	:	Fosfat tuz tamponu
<b>PBS-T</b>	:	Fosfat tuz tamponu- Tween-20 solüsyonu
<b>PKB</b>	:	Protein Kinaz B
<b>PVDF</b>	:	Polivinilidin florür
<b>RNA</b>	:	Ribonükleikasit
<b>RP-67580</b>	:	Nörokinin 1 reseptör antagonisti
<b>SDS</b>	:	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi

<b>SP</b>	:	Substans P
<b>TEMED</b>	:	Tetrametiletildiamin
<b>TNF</b>	:	Tümör nekroz faktörü
<b>UV</b>	:	Ultraviyole ışın

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1. Malign Tümörlerin temel özellikleri ve kanser tedavisindeki başlıca hedefler	4
2. MAP ailesi ve sinyal iletimi	7
3. Protein kinaz B/Akt yolunun işlevleri	9
4. MAPK ve protein kinaz B yollarının apoptozis mekanizmalarına etkileri	10
5. Metastaz basamakları	11
6. Metastatik süreçte vasküler-endotelial duvarın yıkılması. L-P selektinler ve trombositlerin rolü	16
7. Metastazda organa özgü bariyerler	17
8. Organla özgü metastaz oluşumunda rol oynayan genetik faktörler	21
9. SP aracılı NK-1 reseptör aktivasyonu ve etkileri	24
10. MIP-2 sekresyonuna aracılık eden hücre içi sinyal mekanizmaları	26
11. Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin şematik gösterimi	29
12. Nörokinin 1 reseptör (NK1R) ekspresyonu	39
13. Nörokinin 2 reseptör (NK2R) ekspresyonu	40
14. Substance P'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi	41
15. Substance P metil esterinin hücre proliferasyonu üzerine etkisi	41
16. Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4TBM hücre dizisinin fotografik görüntüleri	42
17. 4TBM'de NK1R antagonistinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	43
18. Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4TLM hücre dizisinin fotografik görüntüleri	43
19. 4TLM'de NK1R antagonistinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	44

20. Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4THM hücre dizisinin fotografik görüntüleri	45
21. 4THM'de NK1R antagonistinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	45
22. Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4T1 hücre dizisinin fotografik görüntüleri	46
23. 4T1'de NK1R antagonistinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	46
24. Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 67NR hücre dizisinin fotografik görüntüleri	47
25. 67NR'de NK1R antagonistinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	47
26. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4TBM hücre dizisinin fotografik görüntüleri	48
27. 4TBM'de NK2R antagonistinin (GR159897: GR-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	48
28. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4TLM hücre dizisinin fotografik görüntüleri	49
29. 4TLM'de NK2R antagonistinin (GR159897: GR-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	50
30. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4THM hücre dizisinin fotografik görüntüleri	51
31. 4THM'de NK2R antagonistinin (GR159897: GR-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	51
32. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4T1 hücre dizisinin fotografik görüntüleri	52
33. 4T1'de NK2R antagonistinin (GR159897: GR-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	52

34. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 67NR hücre dizisinin fotografik görüntüleri	53
35. 67NR'de NK2R antagonistinin (GR159897: GR-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler	53
36. 4TBM'de NK1R antagonisinin MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi	54
37. 4THM'de NK1R antagonisinin MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi	55
38. 4TBM'de NK2R antagonisinin MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi	56
39. 4THM'de NK2R antagonisinin MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi	57
40. 4TBM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin AKT üzerine etkisi	58
41. 4TBM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin ERK üzerine etkisi	59
42. 4TBM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin P38 üzerine etkisi	59
43. 4TLM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin AKT üzerine etkisi	60
44. 4TLM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin ERK üzerine etkisi	60
45. 4TLM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin P38 üzerine etkisi	61
46. 4THM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin AKT üzerine etkisi	61
47. 4THM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin ERK üzerine etkisi	62
48. 4THM hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin P38 üzerine etkisi	63
49. 4T1 hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin AKT üzerine etkisi	63
50. 4T1 hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonisinin ERK üzerine etkisi	64

51. 4T1 hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonistinin P38 üzerine etkisi	<b>65</b>
52. 67NR hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonistinin AKT üzerine etkisi	<b>65</b>
53. 67NR hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonistinin ERK üzerine etkisi	<b>66</b>
54. 67NR hücre dizisinde SP ,NK1R ve NK2R antagonistinin P38 üzerine etkisi	<b>66</b>



## GİRİŞ ve AMAÇ

### 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Günümüzde lokalize olan malignansilerin tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen metastatik hastalıklar için etkili bir tedavi yoktur. Meme kanseri kadınlarda önde gelen ölüm sebeplerindendir. Meme kanseri teşhisi koyulan hastalarda ölümlerle sonuçlanan metastaz oluşumu gözlenmektedir[1-2]. Kanser hastalarının hayatta kalması için etkili bir şekilde metastazın tedavisi ya da oluşumunun önlenmesi gerekmektedir [3]. Bunun için de yeni tedavi yaklaşımlarına, yeni terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Duyu sinirlerinin kapsaisine duyarlı alt grubu vücutta yaygın olarak bulunmakta ve özellikle akciğer gibi meme kanserinin metastaz yaptığı organları inerve etmektedir. Dokularda bulunan kapsaisine duyarlı duyu sinir sonlanmaları **Substance P**, calcitonin geni ilişkili peptit gibi nöropeptitler içermekte ve bu nöropeptitler hem lokal kan akımını hem de **immün sistemi** etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, nöropeptitlerin mikroçevreden kaynaklanan ve meme kanserinin gelişimini yavaşlatan moleküllerden olduğu bulunmuştur [4-5]. Spesifik olarak duysal sinirlerin inaktivasyonu 4T1 meme kanser metastazını arttırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde vagus sinir aktivitesinin metastaz gelişimini azalttığı da gösterilmiştir [6-7]. Bu bulgular duyu sinirlerinden salgılanan faktörlerin kanser gelişimini engelleyici olduğunu düşündürmektedir [4, 7] .

Tachykinin ailesinden olan Substans P (SP), hem nöronlarda hem de nöron dışı hücrelerde bulunmakta, nörojenik inflamasyonda, ağrının duyumsanmasında ve immün sistemin regülasyonunda rol oynamaktadır. SP'nin kanser gelişimi üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmaların bir kısmı Substance P'nin tümör gelişimini indüklediği yönüdeyken bazı çalışmalar tersini göstermektedir. Örneğin Substance P invazif melanomda, atipik nevide, epitelooid nevide eksprese edildiği gösterilmiş, kanser gelişimini indüklediği öne sürülmüş ve NK1R antagonistlerinin kanserde tedavi amaçlı kullanılabilceği söylenmiştir [8]. NE ve ark. çalışmalarında ise Substance P'nin B16F10 melanom hücrelerinin çoğalmasını in-vitro'da azalttığı gösterilmiştir [9] . Benzer şekilde Substance P geninin susturulmasının kolon ve gastrik kanser gelişimine neden olduğu düşünülmektedir [10].

Her ne kadar yukarıda bahsedilen çalışmalar metastatik meme kanserinde Substance P'nin koruyucu olduğunu düşündürmekte ise de bu konuda doğrudan yapılmış bir çalışma yoktur. Bu çalışmanın amacı fare metastatik meme kanseri hücre modellerinde Substance P ve antagonistlerinin etkilerini araştırmaktır.

Substance P primer olarak neurokinin 1 reseptörü (NK1R) üzerinden etki etmektedir. Ayrıca daha düşük afinitede neurokinin 2 reseptörü (NK2R)'ne bağlanarak reseptör aktivasyonuna neden olmaktadır. Substance P'nin bu etkisinin hangi reseptör üzerinden geliştiğini bulmak amacıyla fare NK1R'lerine afinitesi daha yüksek olan non-peptid yapıda RP67580 (10-30µM dozunda) adlı antagonistin varlığında hücre proliferasyonunun nasıl değiştiğinin araştırılması, benzer şekilde NK2R üzerinde de etki gösterebileceği göz önüne alınarak NK2 reseptör antagonisti GR159897'nin de (10-30µM dozunda) hücre proliferasyonu üzerine etkisinin araştırılmasının yanında hücre içi sinyal yollarında rol oynayan pAKT, pERK, P38 gibi proteinlerin fosforilasyonları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Aynı zamanda SP/NKR'ün immünolojik etkileri de göz önüne alınarak anjiyojenik bir faktör olan MIP-2 (makrofaj inflamatuvar protein 2)'nin sekresyonundaki değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, bir hücre ya da hücre grubunun, organizmanın sahip olduğu kontrol mekanizmalarının etkisinden çıkıp kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Organizmada bu kontrol mekanizmalarının doğru çalışmaması durumunda normal hücreler yapı ve fonksiyon değiştirerek tümör karakteri kazanabilirler [11]. Bu nedenle kanser, hücrede meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [12].

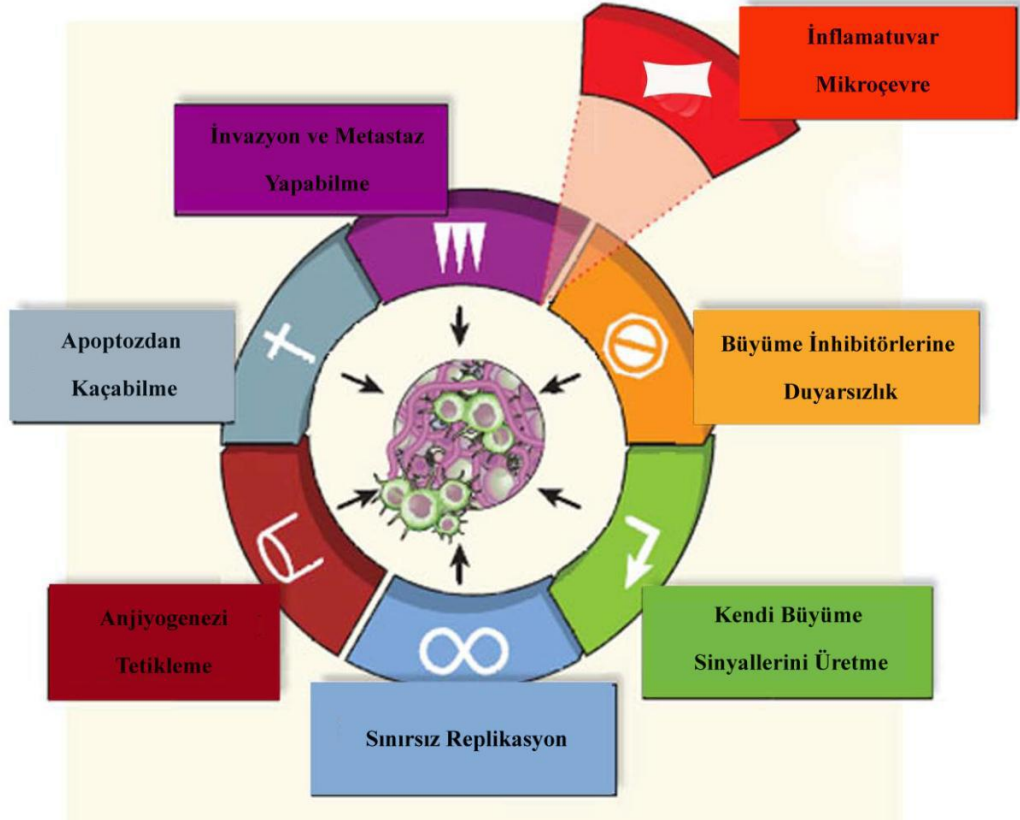
Normal hücreler komşu hücrelere veya hücre dışı matrikse adezyon molekülleri aracılığıyla tutunarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu adezyon noktalarında yoğun elektron plakları oluşur, hücrelerin ameboid uzantılarında yavaşlama ve sonuç olarak da durma gözlenir. Bu durum hücrelerin kontak inhibisyon etkisinden kaynaklanmaktadır. Ancak tümör hücrelerinde kontak inhibisyon özelliği bulunmaz. Bu da tümör hücrelerinin durma potansiyeline sahip olmadığının bir göstergesidir. Bu nedenle; tümör hücreleri buldukları organda proliferasyon olarak kitlesel gelişim gösterirler. Bu hücreler organ dışına çıkmadan sadece bulunduğu organda kitlesel artışa giderse bunlara “benign” yani iyi huylu tümör hücreleri denir. Ancak, bazı tip tümör hücreleri köken aldığı odaktan ayrılıp farklı odaklar oluşturmak üzere başka bölgelere hareket etme eğilimindedirler. İşte tümör hücrelerinin primer odaktan ayrılarak uzak mesafelere yayılması “metastaz” olarak, metastaz yapma yeteneğine sahip hücreler de “malign” yani kötü huylu tümör hücreleri olarak tanımlanmaktadır [13].

Yıllardır devam eden çalışmalar sonucunda bilim, kanser tipine bağlı olmaksızın, tüm malignan hücrelerde var olan altı temel özelliği ortaya çıkardı. Bu özellikler:

- 1-Dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama,
- 2-Büyüme durdurucu sinyallere karşı duyarlı olmama,
- 3-Programlı hücre ölümünden kaçabilme,
- 4-Yaşlanmaya direnç gösterme ve sınırsız üreme potansiyeline sahip olma,
- 5-Yeni kan damarları oluşturabilme,

6-Farklı dokulara saldırabilme ve bir bölgeden diğerine taşınabilme (metastaz)

Kanserin belirteçleri olarak belirlenen bu özelliklerin her biri, kanser tedavisi için farklı hedefler olarak kabul edilmekte ve kanser ile olan savaşın seyrini de etkilemektedir [11] (Şekil 1).



Şekil 1. Malign Tümörlerin temel özellikleri ve kanser tedavisindeki başlıca hedefler [14]

## 2.2. Hücre içi Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser

Hücrede embriyogenez, çoğalma (proliferasyon), büyüme, farklılaşma (diferantiation) ve yaşamını sürdürme için hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminin devamı önemli ve gereklidir. Bir hücre dışarıdan sinyal almazsa apoptoza gider, ölür. Hücreye dışarıdan gelen uyarılar veya diğer hücrelerden gelen sinyaller her bir hücre tarafından algılanır. Uygun şekilde hücre içine ulaştırılarak hücre için önemli olan cevaplar oluşturulur. Burada sinyallerin hücreye geldikten sonra hücre tarafından algılanması hücre içi sinyal iletim mekanizmaları ile olmaktadır. İnsan

genomunda görev yapan genlerin yaklaşık beşte birinin bu görevde yer alması bile bu yolların hücre için ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır [15-16].

Karsinogenezin temelinde hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve differansiyasyon (farklaşma) gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır [16]. Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içindeki sinyal iletim yolları olmakta, sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırarak başta kanser olmak üzere farklı hastalıklara yol açmaktadır [17]. Başka bir ifadeyle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır.

Hücrede sinyal iletiminde protein kinazlar önemlidir. Protein kinazlar uygun sinyal aldığı anda diğer proteinlerdeki serin, tirozin ve histidin amino asidine fosfat ekler. Hedef proteine fosfat eklenmesi (fosforilasyon) proteinin enzim aktivitesini, hücresel lokalizasyonunu veya diğer proteinler ile ilişkisini değiştirir. Kinazlar gereksinimi olan fosfatı genellikle ATP'den alırlar. Kinazlar kendilerine bağlanan bir takım düzenleyici moleküller ile inhibe olurlar [18].

### **2.2.1. Protein kinazlar ve sinyal iletimi**

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır [17]. Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır. Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar.

Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır [19-20].

Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süperailisinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır [20]. RTK'lar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içerirler. İstirahat halindeki hücrelerde, RTK'nın inaktif ve aktif konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle

başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur [17].

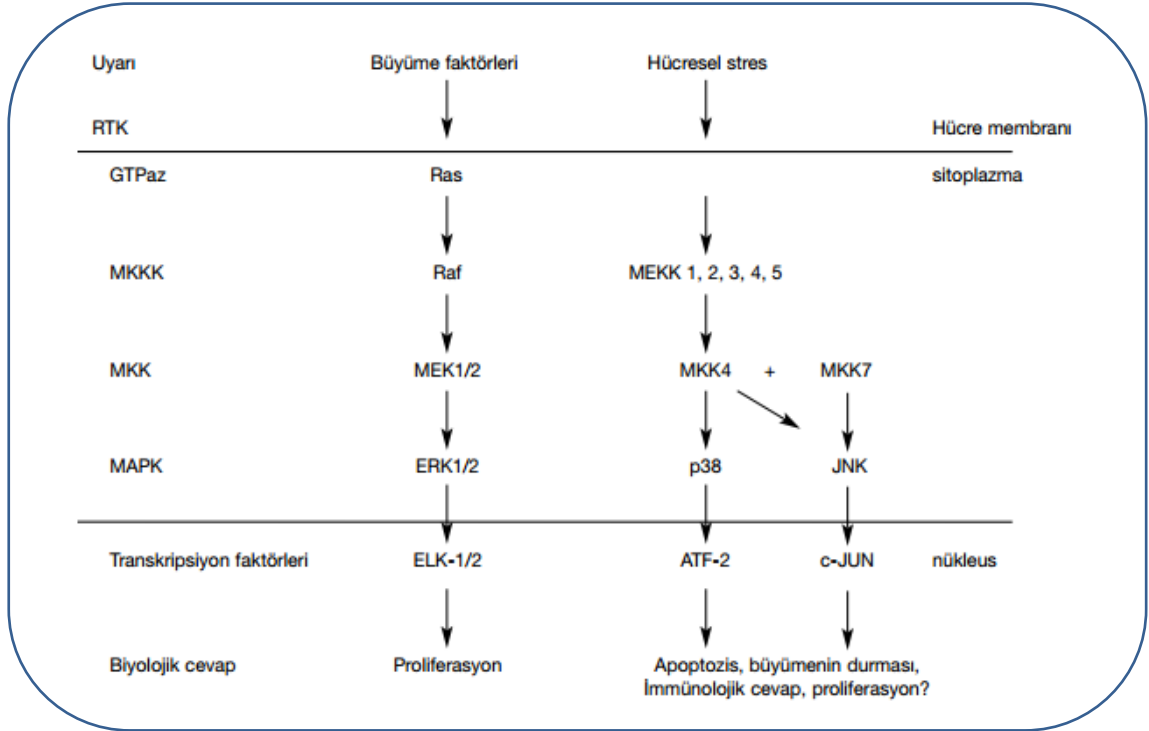
Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve “Janus Family Kinases (JAK)” proteinleri yer almaktadır [17]. İstirahat halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya nukleustaki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi malign fenotipe özgü hücrel olayları hızlandırır [21-22].

#### **2.2.1.1.MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu**

MAP kinazlar, “Mitogen-activated protein kinases” süper ailesinde yer alırlar [23]. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenez, yaşama, çoğalma, diferansiyasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır [24].

1. “p38 MAP kinaz ailesi”,
2. “Extracellular signal regulated kinase (ERK)” ailesi,
3. “c-Jun NH<sub>2</sub>- terminal kinase (JNK)” ailesi.

MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nukleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Şekil 2 ) [25].



**Şekil 2.** MAPK ailesi ve sinyal iletimi . ATF: “Activating transcription factor”, ERK: “Extracellular signal regulated kinase”, GTP: “Guanosine triphosphate”, JNK: “c-Jun N-terminal kinase”, MAPK: “Mitogen-activated protein kinase”, MEK: “Mitogen extracellular signal regulating kinase”, MEKK: “MAPK/ERK kinase kinase”, MKK: “MAPK kinase”, MKKK: “MAPK kinase kinase”, p38: “p38 kinase”, RTK: “Receptor tyrosine kinase”.

### 2.2.1.2. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiasyon faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf protoonkogendir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan (farnesilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar [25-26]. Raf kinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar Faz I-II aşamalarında sürmektedir [26]. İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur [25]. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle,

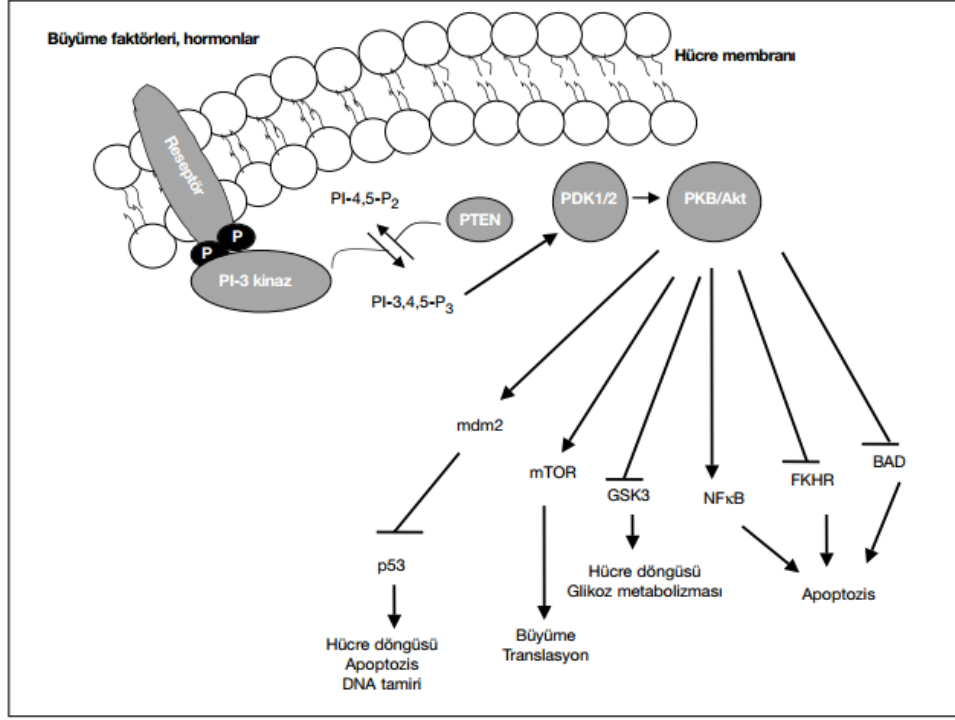
hücresinin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır. Diğer yandan, farnezil transferaz inhibitörleri Ras aktivasyonunu önlerler. Klinik çalışmalar, bu ajanların antitümöral etkilerinden tedavide yararlanılabilme olasılığını güçlendirmektedir [27]. Ras iletim yolu ile tetiklenen transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşır. Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinozitol-3 kinaz (PI-3K) yolunu uyarımalarında Ras'ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik Ras, PI-3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılar [28]. İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken alır. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozisin baskılanması karsinogenez sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturur.

### **2.2.1.3.PI-3 kinaz/protein kinaz B sinyal iletim yolu ve kanser**

Fosfoinozitol-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir [29]. Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (şekil 2) [17]. Protein kinaz B, Akt1 ve Akt2 genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genler, viral v-akt onkogeninin insanda bulunan homologlarıdır [30].

Protein kinaz B aktivasyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkileri de karsinogenez sürecinde önem taşır. p21 proteini hücre döngüsünün erken G1 fazında siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (cdk4/6) kompleksi üzerinde pozitif uyarıcı etki yapmaktadır. Protein kinaz Bp21'in stabil formunun oluşumunu tetikler ve hücre döngüsünün ilerlemesine uyarıcı yönde etki eder. Buna ek olarak, p21'in degradasyonunu uyarıyan proteini de inhibe etmektedir [29].

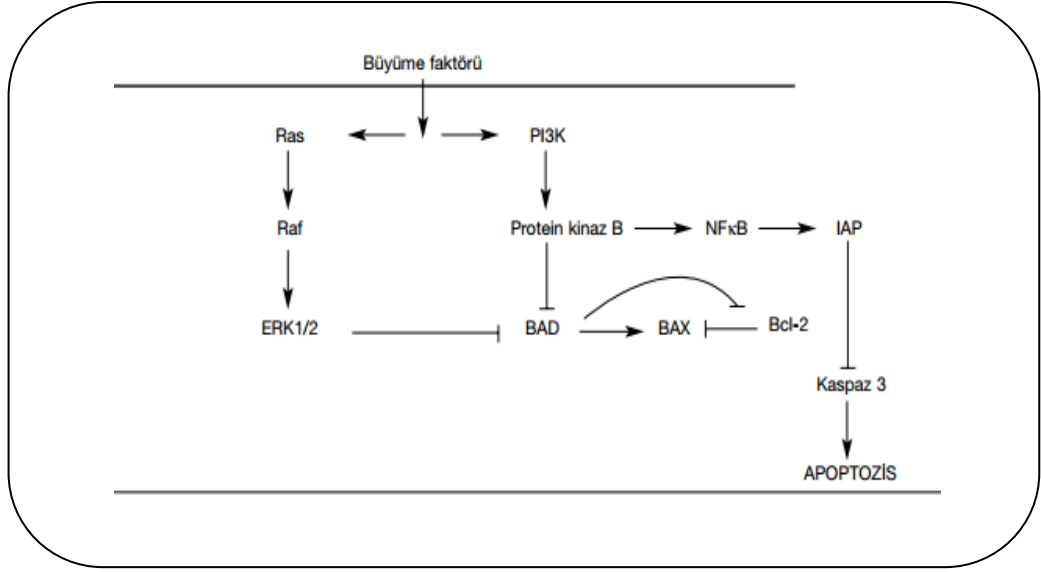




Şekil 3. Protein kinaz B/Akt yolunun işlevleri [17].

Hücre döngüsünün inhibitör proteinlerinden p27'nin siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksine bağlanması için, sitoplazmadan hücre çekirdeğine yer değiştirmesi gerekir. Onkogenik uyarı halinde (PTEN mutasyonu, HER2 veya EGFR aktivasyonu) bu protein fosforilasyona uğrar. Bunun sonucunda, p27 sitoplazmaya geri döner ve hücre döngüsündeki inhibitör etkisi ortadan kalkar [28]. Bu çalışmalar, sürekli ve/veya kontrolsüz protein kinaz B uyarısı ile tümör hücrelerinin çoğalması arasındaki doğrudan ilişkiyi göstermektedir [31-33].

Protein kinaz B uyarısının doğrudan etkili olduğu hücre işlevlerinden biri de apoptozistir (Şekil 4) [29]. PKB, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz 9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NFκB uyarısı ile de antiapoptotik cevabı desteklemektedir [29].



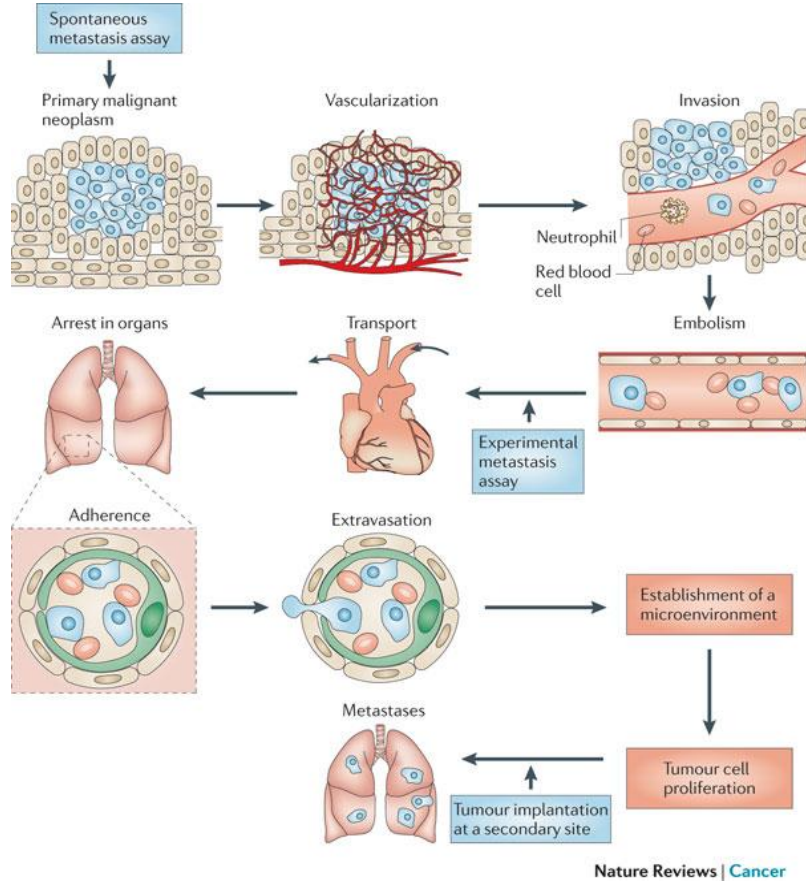
Şekil 4. MAPK ve protein kinaz B yollarının apoptozis mekanizmalarına etkileri [29].

### 2.3. Metastaz

Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Lokal invazyon, intravazasyon, hematogenik ve lenfojenik yayılma, ekstrasvazasyon ve kolonizasyon gibi birbirileri ile ilişkili çok basamaklı olaylar zinciri ile gerçekleşir (Şekil 5).

İlk olarak, büyümekte olan tümör kitlesi ihtiyacı olan besin ve oksijen kaynağını sağlayabilmek için besin kaynaklarına doğru ilerlemek zorundadırlar. Belirli bir büyüklüğe ulaşan tümör kitlesi, birtakım anjiyogenik faktörleri sentezleyerek yeni damarların oluşumunu uyarırlar ve sonra komşu hücrelerle olan bağlarını koparıp primer tümör dokusundan ayrılırlar. Tümör hücreleri daha sonra ekstraselüler matrikse geçerek burada ilerlerler ve çevre dokulara ulaşırlar ya da dolaşım sistemine geçip uzak dokuları işgal ederler. Bu sayede yaşamlarını ve çoğalmalarını sürdürürler [34].

Tümör hücreleri dolaşıma geçtikten sonra kan yoluyla uzak organlara doğru yol alırlar. Dolaşıma çıkan tümör hücreleri, kanda yer alan immün hücrelerin saldırısına maruz kalmamak için, bir an önce dokuya gitme eğilimindedirler. Dolaşımdan ayrılacakları zaman da, damarın endotel hücreleri ve bazal membranlarını aşarak endotel dışına ulaşmalıdırlar. Tümör hücreleri ulaştıkları yeni organlarda yeniden büyüme eğilimindedirler ve yine kapiller ağ oluşturmak üzere anjiyogenezi tetiklerler [35].



Şekil 5. Metastaz basamakları [36].

Kanser ölümlerinin büyük bir kısmı tedaviye direnç gösteren metastazlardan dolayı olmaktadır. Kanser hücrelerinin primer ve sekonder bölgelerdeki biyolojik çeşitliliği metastaz tedavisinde ciddi bir engel oluşturmaktadır. Bu çeşitlilik kendini biyolojik ve immünolojik özelliklerde gösterebildiği gibi genetik olarak da ortaya çıkmaktadır. Enzimler, hücre morfolojisi, salgılanan büyüme faktörleri, hücre yüzey reseptörleri, kemoterapötiklere yanıt, invazyon yeteneği ve metastaz yeteneği gibi çok geniş alanda heterojenite görülebilmektedir [37].

Primer ve sekonder tümörlerde meydana gelen bu çeşitliliğin nedenini ya da nedenlerini bulmak ve bunun altında yatan mekanizmaların aydınlatılması kanser araştırmalarının temel amacı olmuştur. Ancak bu şekilde kansere ve metastazlarına etkili tedavi yöntemleri geliştirmek mümkün olacaktır.

## 2.4. Meme Kanseri

### 2.4.1. Meme Kanseri Tarihçesi

Meme kanserinin tanı ve tedavisine tarihsel olarak bakıldığında, insanlığın 5000 yıldır bir mücadele içinde olduğu görülmektedir. Meme, eksternal bir organ olduğundan dolayı meydana gelen patolojik değişiklikler gözle görülebilmektedir. Bu durum kanserle ilgili çalışmaları üzerine çekmiştir.

Meme hastalıklarına ait en eski bilgiler Mısır papirüsünde bulunmuştur. Milattan önce 3000-2500 yılları arasında Eski Mısır'da İmhotep tarafından yazıldığı tahmin edilmektedir. Bu tarihi belgelerde cerrahi müdahalenin yapıldığı 48 hastadan bahsedilmektedir. Bu yapıtta elle dokunulduğunda hissedilebilen tümörlerin bulunduğu memenin tedavi edilemeyeceği anlatılmaktadır.

Klasik Yunan' da (MÖ 460-160), 300 yıl boyunca Hipokrat' ın bedenin kan, sarı safra, kara safra ve flegmden (aşırı mukus) oluştuğu hipotezi geçerli olmuştur. Bu hipoteze göre meme kanseri bu dört maddenin arasında meydana gelen dengesizlik olarak oluşmaktadır. Ayrıca Hipokrat kanlı meme başı akıntısı ile gelen meme kanseri bir hastayı tanımlamıştır. Menopoz ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi saptamıştır [38].

Tarihte ilk kez meme kanserini mastektomi ve aksiller küraj ile tedavi eden hekim olan Leonides, koterizasyon ve damar bağlama tekniklerini kullanarak memeyi kesip çıkarmıştır [39].

İlk başarılı Lumpektomi ameliyatını yapan Paris'te yaşayan Hollanda'lı doktor Adrian Helvetius (1661-1741) olmuştur. John Hopkins Üniversitesi'nde William Halsted tarafından XIX. yüzyılın sonlarında geliştirilen radikal mastektomi, meme kanseri ameliyatlarının standart yöntemi olmuştur. Bu metot da rutin olarak tüm meme, lenf bezleri, pektoralis major ve minor kasları, interkostal kasların yüzeyel fasyaları ile birlikte blok halinde çıkarılmaktadır.

Bu yöntem daha sonraki altmış yıl Dr.Haagensen'in yaptığı modifikasyonlarla ağırlığını korumuştur. Yirminci yüzyılın ortalarından sonra radikal mastektomi, yerini daha ılımlı cerrahilere bırakmıştır [40].

W. Fabry ve J. Schultes 16. yüzyılın sonlarında meme ameliyatının teknik detaylarını anlatan bir kitap yazmışlardır. 17. ve 18. yüzyıllarda meme ameliyatının sadece deneyimli cerrahlar tarafından yapılması kararı alınmıştır. Bu dönemde memenin ve aksiller lenf nodüllerinin anatomisi ve ilişkisi anlaşılmış ve kanser ameliyatları sırasında çıkarılması kabul edilmiştir [41].

18. yüzyılda A. Leewenhoek tarafından mikroskobun icadıyla canlı hücre inceleme çalışmaları başlamıştır. 19. yüzyılda Berlin'den J.Müller, M.Schleiden ve T.Schwann insan vücudunun canlı hücrelerin kompozisyonundan oluştuğunu saptadılar. Müller kanserin de yaşayan hücrelerden oluştuğunu belirtmiş ancak bu hücrelerin normal hücrelerden farklı olduğunu bildirmiştir. C.Tiersch ve W.von Waldeyer ise metastazın, ana tümörden ayrılan hücreler tarafından oluşturulduğunu saptamışlardır. C. Moore meme ve aksilla lenf nodüllerinin “en bloc (bir bütün halinde)” çıkarılmasının hastalığın yaygınlaşmasını engelleyeceğini savunmuştur [41].

1939 yılında Gray meme kanserinin lenfatik yayılmasının yayılma yolu ile değil embolizasyon ile olduğunu, kan damarı ile yayılmanın uzak metastazlardan sorumlu olduğunu savunmuştur. B. Fisher'e göre bu durum daha farklıydı. B. Fisher, meme kanserinin sistemik bir hastalık olduğunu ve hastalığın nasıl seyredeceğinin beden ile kanser arasındaki biyolojik savaş sonucu belirleneceğini ileri sürmüştür. Dolayısıyla lokal tedavi yerine sistemik tedavilerin uygulanmasının daha doğru olacağını savunmuştur. Bu düşünce kemoterapinin önünü açmıştır. Birinci Dünya Savaşında kullanılan hardal gazının kemik iliği depresyonu yaptığının anlaşılması bugünkü modern kemoterapinin temelini atmıştır [42].

20. yüzyılın sonuna gelindiğinde meme kanserinin gerçek nedeni hala saptanmamıştır. Ancak tümörün oluşmasına yol açabilecek hücresel büyüme faktörleri, hücre içi haberleşme yolları ve hangi genlerin ne tür bozulmalar ile karşılaştığında meme kanseri oluşturduğuna dair geniş bilgilere ulaşılmıştır.

21. yüzyıl başında genetikte başlayan gelişmeleri gen ekspresyon taramalarını komperatif genom hibridizasyonu (CGH) veya tek nükleotid polimorfizm taraması (SNP) takip etmiştir. Bu tekniklerle yapılan araştırmalar meme kanserinin tek tip bir hastalık olmadığını göstermiştir. Meme tümörünün biyolojik davranışı ve çeşitli kemoterapilere nasıl cevap vereceği bu yeni moleküler sınıflama ile önceden saptanabilir hale gelmiştir. Ancak hala çok sayıda yapılması gereken çalışma bulunmaktadır. Özellikle genomik çalışmalar ilerledikçe meme kanserini anlamamız ve hedefe yönelik ilaçlar geliştirmemiz mümkün olacaktır [43].

#### **2.4.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi**

Meme kanseri epitel kökenli hücrelerin kanserleşmesi sonucu oluşan ve kadınlarda en sık görülen malign tümör olarak bilinmektedir. ABD, Kanada gibi ülkelerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada diğer ülkelerde ise birinci sırada en çok ölüme neden olan kanser türü meme kanseridir. Meme kanseri yıllık 400.000'e yakın ölüme neden olmaktadır. Bu ölümlerin %55'i gelişmiş ülkelerde, %45'i ise gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkmaktadır. Meme kanserinden olan ölümler tüm kanser ölümlerinin % 6'sını oluşturmaktadır. Dünyada ortalama her yıl 10 milyon yeni kanser olgusunun varlığı bilinmektedir. Bu olguların bir milyonu (%10) meme kanseridir [44].

Türkiyede ise en sık görülen kanserler 1999 yılına göre Akciğer kanseri (%19.7 insidans 776/100.000) ve meme kanseridir (%9.4 insidans 372/100.000). Kadınlarda en sık görülen kanser, meme kanseri (%24.1 insidans 732/100.000) ikinci sıklıkta görülen kanser türü ise mide kanseridir (%6.9 insidans 212/100.000) [44].

Meme kanseri ile ilişkili pek çok risk faktörü (yaş ve cinsiyet, ırk ve etnisite, iyi huylu meme hastalıkları, meme kanseri öyküsü, yaşam şekli ve beslenme alışkanlığı, reproduktif ve hormonal faktörler, iyonize radyasyona maruz kalmak, sigara içmek ve çevresel faktörler) tanımlanmıştır. Meme kanserinde en önemli risk faktörlerinden birisi yaştır. Hastalık gelişme riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalık görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu kanser türünün 30 yaşına kadar oldukça az görülmesine rağmen özellikle 65 yaşından sonra lineer bir artış gösterdiği belirtilmektedir. Bu riskin 65-80 yaş arasındaki kadınlarda, daha genç kadınlara göre yaklaşık olarak 5,8 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir [45]. Ülkemizde de bu durum genel tablodan farklı değildir. Meme kanseri vakalarının sadece %5' lik bir kısmının 35 yaş altında görüldüğü belirtilmiştir [46].

#### **2.4.3. Meme Kanserinin Oluşumu**

Normal hücreler belirli bir kontrol mekanizması içerisinde bölünür ancak söz konusu kanser hücreleri olduğunda bu mekanizma kontrolden çıkmıştır. Kanser hücrelerinde normal hücre döngüsü kontrolü kaybolur ve uygunsuz bir şekilde bölünürler. Hücre bölünmesinde genetik kontrol mekanizması çok önemlidir. Çünkü hücrenin davranışını kontrol etmek ve düzenlemek karmaşık bir sinyal alış verişiyle gerçekleşir. Hücrenin ne zaman bölüneceği, farklılaşacağı veya öleceği, hücrenin aldığı sinyaller doğrultusunda gerçekleşir. Mutasyon sonucu bu ağda meydana gelebilecek bir bozukluk hücrelerin daha hızlı bölünmesine neden olacaktır. Fakat hücrelerin daha hızlı bölünmesi kanserli hücre oluştuğu anlamına gelmez.

Klasik tümör gelişiminde, normal bir epitel hücre premalignant atipik hücreye dönüşür. Daha sonra bu tip lezyonlar invaziv olur ve dağılırlar. Dağılan lezyonlar immün sistemden kurtuldukları takdirde metastaz oluştururlar.

Duktal hiperplazi meme kanseri başlangıcının ilk işaretidir. Bu esnada düzgün dağılım göstermeyen epitel hücrelerinde çoğalma görülmektedir. Bu hücreler başlangıçta iyi huyludur. Ancak kişide genetik olarak kanser riskinin yüksek olması hiperplaziden atipik hiperplaziye dönüşümün olmasına neden olur. Daha sonra duktal veya lobular olarak karsinom gelişir. Bu durumda atipikleşme sonrası malign özellikteki hücrelerin artışı başlar. Son olarak hücreler bazal membrandan ayrılarak komşu dokulara doğru yayılım gösterirler [47].

#### **2.4.4. Meme Kanseri Metastazı**

Bir çok tümörün mikroskobik olarak yayılabilmesi için 1 mm<sup>3</sup>' lük bir hacime ulaşması gerekmektedir. Meme kanserinin mamografiyle tespit edilebilmesi için 3-5 mm, palpe edilebilmesi için 10 mm bir büyüklüğe ulaşması gerekmektedir.

Metastaz oluşumuna bakıldığında iki temel durumun söz konusu olduğu görülmektedir. Bunlardan bir tanesi tümör hücrelerinin sahip olduğu genotip ve fenotiplerin değişerek farklı hücre popülasyonları oluşturması bir diğeri ise tümör hücre özellikleriyle metastaz süreci arasındaki ilişki ve mikroçevredir. İntegrin reseptörler, büyüme faktörlerinin aşırı salgılanması, matriks metalloproteazlar, hücre adezyonu, hücre döngüsü kontrolü ve anjiyogenik faktörler metastaz biyolojisinde önemli role sahiptirler.

Kanser metastazının patogenezinde hem tümör hemde konakçı hücrelerin intrinsik özellikleri önemlidir. Temel olarak kan akımıyla taşınan kanser hücrelerinin organlara spesifik olarak gitmesini ve orada büyümesini konakçı organ ile kanser hücresi arasındaki moleküler etkileşim belirlemektedir.

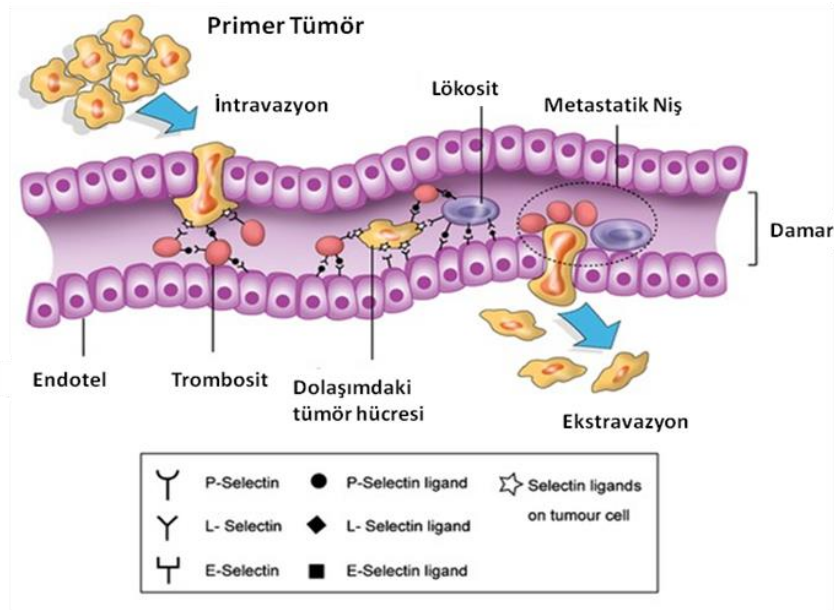
Neoplastik dönüşümden sonra kanser hücreleri hızla proliferasyona başlar. Oluşan tümör kitlesi ilk önce basit difüzyonla, daha sonraki evrelerde ise oluşan yeni kan damarları ile beslenir. Yeni kan damarlarının oluşması anjiogenezis ile gerçekleşir. Tümör 1-2 mm büyüklüğe ulaştığında yeni kan damarlarına ihtiyaç duyar. Kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılması ile metastaz süreci başlamış olur. Tümör hücreleri daha sonra dolaşıma girerler. Dolaşıma katılan tümör hücrelerinin en çok kullandığı yol lenfatiklerdir. Çünkü lenfatiklerde penetrasyon için direnç çok zayıftır. Dolaşımda bulunan tümör hücreleri yeni organın küçük kapillerlerinde sıkışır, açığa çıkmış olabilen subendoteyal bazal membrana yapışırlar. Dolaşımın kesilmesini ekstrasvazasyon izler ve yeni organda kanser

hücreleri çoğalarak metastatik süreci tamamlar. Mikrometastazlar konakçı tarafından parçalanır. Parçalanamadığı takdirde büyük metastazlar için zemin hazırlanmış olur.

#### 2.4.4.1.Meme Kanseri Metastazında Organ Tropizmi

Primer tümörden ayrılan metastatik hücrenin başka bir dokuya ulaşım kolonize olabilmesi için birçok etkenin elverişli olması gerekmektedir.

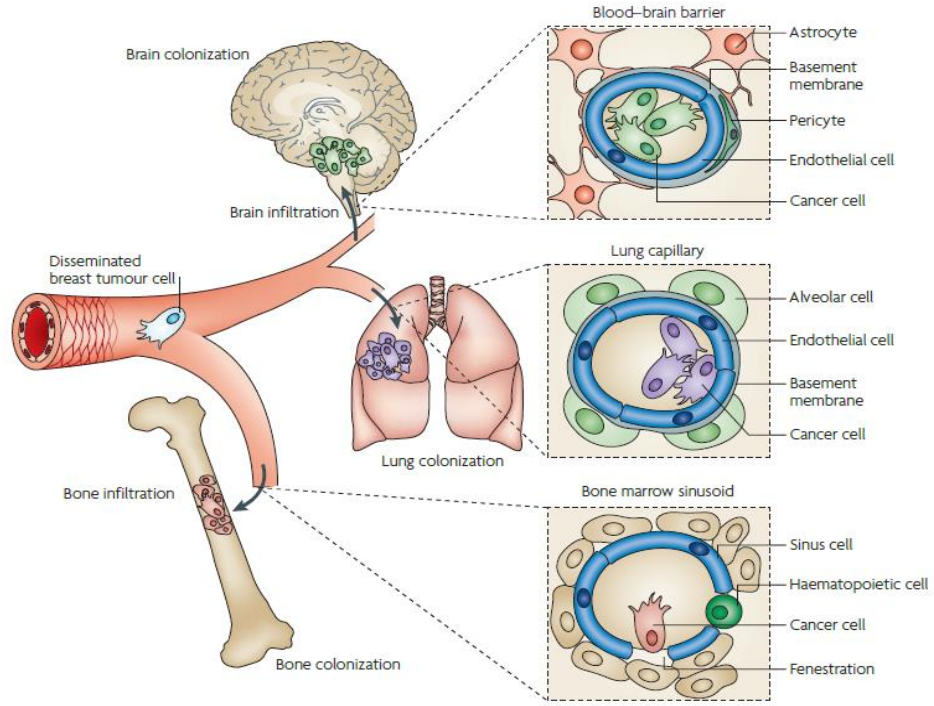
Uzak organlara gitmek için dolaşıma katılan hücrelerin ilk karşılaşacağı engel özellikle endotelial hat- vasküler duvardır. Trombositler, lökositler, L ve P selektinleri ile tümör hücreleri metastazı kolaylaştıran bir kompleks oluşturur. Bu sayede damar duvarında emboli gibi bir tutuklanma meydana gelir. Bu sebepten dolayı selektin ligandlarının ekspresyonundaki artış metastatik gelişimle ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Şekil 6) [48-49].



Şekil 6 : Metastatik süreçte vasküler-endotelial duvarın yıkılması. L-P selektinler ve trombositlerin rolü [50].

Kemik iliği ya da karaciğer gibi bazı organlarda mikrodamarların yapısında geçirgen sinüsoidler bulunmaktadır. Sinüsoidler kanser hücrelerinin ekstravazyonu için geçirgendir ve kanser hücreleri için zayıf bir duvardır. Aksine birçok diğer organlarda endotelial hücreler kanser hücrelerinin özgürce penetre olabileceği bir bariyer oluşturmaz. Kendine özgü bariyere sahip olan beyin, kan-beyin bariyerinden dolayı tümör hücreleri için zor bir bariyerdir (Şekil 7).





Şekil 7. Organa özgü bariyerler [51] .

#### 2.4.4.2.Yeni Dokuya Adaptasyon- Mikroçevre

Yayılan kanser hücrelerinin metastatik kolonizasyonu için ikinci önemli engel de yabancı dokuya adapte olabilmeleridir. Fizyolojik olarak normal hücreler kendilerinin spesifik orijinal dokularında sağ kalabilir, proliferer olurlar ve o dokunun dışında yapamazlar. Aksine yayılan kanser hücreleri genellikle orijinlerinden çok farklı doku ve organlarda büyüebilme kapasitesi kazanabilirler.

Önemli bir etken olan mikroçevre, tümör hücresinin etrafını kuşatan damarlar, moleküller ve hücrelerden oluşmaktadır. Tümör hücresi hedef organlarda mikroçevresiyle uyumlu olabildiği ölçüde büyür ve proliferer olur. Bu kavram yeni değildir, Stephen Paget tarafından 1989’da toprak ve tohum (Soil and Seed) hipotezi olarak önerilmiştir. Stephen Paget’ e göre ikincil organa başarılı bir kolonizasyon, tümör hücresinin kendi iç özelliklerine (tohum) ve mikroçevrenin (toprak) destekleyici özelliğine bağlıdır. Bu karşılıklı işbirliği hayatta kalmayı ve proliferer olmayı sağlar [35, 52].

Tümör hücreleri, tümör gelişiminin başlarında etrafını kuşatan stroma ile çift yönlü bir ilişki kurar. Ondan sonra tümör-stroma etkileşimleri metastaza doğru tümör gelişimine sebep olur. Bükülme ve kutuplaşma, immün yanıtın baskılanması,

anjiyogenezis, büyüme, hayatta kalma ve motilite faktörlerinin salımı ile tümör hücreleri kendi lehine etkiler ortaya çıkarır [53].

#### **2.4.4.3.Pre-Metastatik Ortam ( Niche )**

Pre-metastatik ortamın inşası, uygun olmayan organlara yayılan tümör hücrelerinin hayatta kalması için önemli bir anahtardır.

Kaplan ve ark. kemik iliği kökenli hücrelerinin ( bone marrow derived mobilized cells) **akciğer metastatik kolonizasyonu** için uygun mikroçevre sağlamada rolünün olduğunu aydınlatmıştır [54].

Kemik iliği kökenli hücreler, primer tümörlerin yaydığı faktörler tarafından harekete geçirilir ve doğrudan metastaz alanlarına primer tümör hücrelerinden önce ulaşır. Kemik iliği kökenli hücreler, VEGFR1, CD133, CD34 ve c-Kit eksprese ederler, bunlar hematopoietik progenitör (kök hücre benzeri) hücrelerinin karakteristik markerlarıdır. Toplanan VEGFR1<sup>+</sup> hücreler spesifik faktörlerin sekresyonu aracılığıyla farklı tümör hücre tiplerinin hangi dokuya metastaz yapabileceğini belirleyebilir. Bir başka moleküler mekanizma; VEGFR1<sup>+</sup> kemik iliği kökenli hücreleri tarafından VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$  integrin) ekspresyonu fibronektinle etkileşimleri için gereklidir. Kemik iliği kökenli hücreler, MMP sekresyonunu da stimüle etmektedir. Metalloproteinazlar ise ekstraselüler matriksi ve vasküler duvarı parçalayarak tümör hücrelerinin hareketini kolaylaştırır [55].

#### **2.4.4.4. Pre-Metastatik Ortamın Moleküler Teşviki**

Hem kemik iliği kökenli hücrelerde hem de stromal hücrelerdeki VEGFR1 sinyali , vasküler geçirgenliği tümör hücrelerinin sağkalımını ve epitelyal mezenşimal geçişi (EMT) sağlayarak tümör hücrelerinin endotelial göçünü kolaylaştırır. Hiratsuka ve ark., premetastatik akciğerde makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından MMP-9'un indüklenmesi için VEGFR1 gerekliliğini vurgulamışlardır. İnflamatuar kemoatraktanlardan S100A8 ve S100A9 ise sadece primer tümör mikroçevresinde rolü yoktur aynı zamanda pre-metastatik akciğere CD11b<sup>+</sup> miyeloid hücrelerinin toplanmasına ve TLR-4 aracılı NF-kB sinyalini aktive ederek tümör hücrelerinin hayatta kalmasına sebep olmaktadır [56].

Erlar ve ark., premetastatik nişin oluşumunda hayati bir molekül olarak lizil oksidaz (LOX) tanımlamışlardır. LOX akciğer bazal membranında fibronektinle birlikte lokalizedir. Tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve CD11b<sup>+</sup> myeloid hücrelerinin toplanmasını kolaylaştıran uygun ekstraselüler matriks için çapraz bağlar oluşturur. Sonuç olarak bu moleküllerin **akciğer metastazında** önemli rol oynadığı bilinmektedir [57].

Metastaz oluşumunda ekstraselüler matriksin önemi;

**Akciğere** giren meme kanseri tümör hücreleri kolonizasyonu başlatmak için **stromal osteopontin** ekspresyonuna ihtiyaç duyar. Periostin Wnt sinyalinin indüklenmesi ve Wnt ligandlarının toplanması aracılığıyla **akciğerde** meme kanseri kök hücrelerinin yayılmasını teşvik eder. Normal kök hücrelerde eksprese edilen ekstraselüler matriks protein tenascin-C, agresif meme kanseri kök hücrelerinde de eksprese edilir ve mikrometastazın büyümesini ve hayatta kalmasını ilerleterek **pulmoner** metastaz oluşumuna sebep olur. Kemokinler de **kemik metastazı** oluşumunda anahtar rol oynar. Bunlardan bazıları ; CXCL12 (SDF1- stroma kökenli faktör): Hedef organlara yerleşimi kolaylaştırır. CXCL12/CXCR4: Meme, prostat, ovaryum kanserlerinde **kemikte** pre-metastatik niş oluşturur. CCL12/CCR7, CCL22/CCR4: Meme kanseri hücrelerinin yayılmasını teşvik eder. Bu kemokin reseptörlerini bulunduran tümör hücreleri, spesifik kemokin ligandlarını salgılayan osteoblastlardan dolayı kemik mikroçevresinde çoğalabileceği verimli bir toprak bulur [58].

Son 40 yıldır yapılan çalışmalar, metastatik tropizmi yöneten çeşitli moleküler mekanizmaları ve alana özgü büyüme mediyatörlerini açıklamıştır. Özellikle meme kanserinin spesifik olarak organa özgü metastazına aracılık eden gen ekspresyonları tanımlanmıştır. Bu genler, yabancı mikroçevre tarafından koyulan engeller ve kanser hücrelerinin intrinsik özellikleri arasında uyumsuzlukların üstesinden gelerek organa özgü metastatik yayılmayı organize eder. Metastatik hücrelerin organ seçilimi, sekonder ve primer dokular tarafından belirlenerek uzağa adapte olma programlarını kapsar. Bu çift yönlü metastatik tropizma özelliği, meme kanseri hücrelerinin niçin farklı organlara örneğin; akciğer, kemik karaciğer ya da beyine, metastaz yaptığını açıklayabilir.

Her metastatik alan için farklı genetik programlar gelişmiştir. Fakat metastazın organ spesifik mekanizmaları evrensel değildir. Farklı kanserler, örneğin; meme, prostat ya da akciğer farklı sinyal yollarının aktivasyonu ile ve farklı moleküler programları geliştirerek benzer hedef organlara metastaz yapabilir. Akciğer ve pankreas gibi bazı karsinomalar kısa zamanda metastaz oluşturabilirken; meme gibi diğer karsinomaların metastaz oluşumu yıllar alabilir. Bu, pankreas gibi kanserlerin yeni mikroçevreye meme kanserinden daha hızlı bir şekilde adapte olduğunu gösterir [52].

#### **2.4.4.5. Meme Kanseri Metastaz Oluşumunu İlerleten Genler**

Organa özgü metastazın moleküler araçlarını tanımlamak için deneysel modellerde ve klinik örneklerde kanser hücreleri üzerinde gen ekspresyon profil deneyleri oluşturulmuştur. Elde edilen sonuçlar göstermişlerdir ki meme kanseri hücrelerinin, spesifik hedef organlara kolonize olmasını sağlayan genetik programlar edinirler.

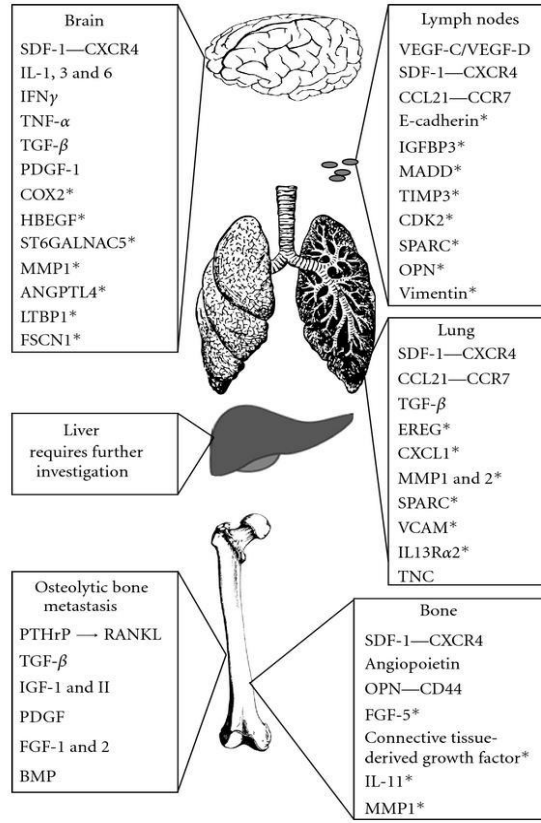
Yapılan deneylerle 3 temel kategori önermişlerdir: Başlama, ilerleme ve virülans.

Metastazı başlatan genler; Primer tümör alanlarında hücre büyümesine, bu alanlardan kaçmaya ve invazive sebep olur.

Metastaz gelişim genleri ; Tümör anjiyogenezi, inflamasyon, emt ya da immün kaçıışı sağlayarak metastazı ilerletir.

Metastaz virülans genleri ; Sekonder organlara kolonize olan tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar.

Primer tümörlerde bu genlerin ekspresyonuna bakılarak hastalarda organa özgü metastaz oluşumu tahmin edilebilir. Son gözlemlerin ışığında düşünülmelidir ki; deneysel tümörlerde metastatik hücreler yeniden tohumlanma (re-seeding) mekanizması tarafından metastatik alanlardan, primer tümör alanlarına tekrar dönebilir. Primer tümör boyutu, yüksek proliferasyon oranı ve kötü prognoza sebep olan agresif metastatik davranışlar arasında bir korelasyon vardır.



**Şekil 8.** Meme kanserinin beyne, karaciğere, lenf nodlarına, akciğere ve kemiğe organ- spesifik metastaz oluşurtmasında rol oynayan genetik faktörler [59].

Kemiğe, akciğere ve beyine organa özgü metastaz oluşumunu teşvik eden meme kanser genleri tanımlanmıştır. Onlar; proinflamutar moleküller ve kemokinler/reseptörler (örn: COX-CXCL12/CXCR4), matris degrade edici ve modifiye edici enzimler (örn: MMP1/2, LOX), adhezyon ve ekstraselüler matris molekülleri (örn: VCAM-1, TNC, OPN), transkripsiyon faktörleri (örn: ID1, KLF17), intaselüler sinyal proteinleri (örn: SRC, NF- $\kappa$ B), hücreler arası iletişimde rol oynayan proteinleri (JAGGED1, CTGF)dir. Bazı genler tohumlanmayı teşvik ederken (ST6GALNAC5, AGPTL4) bazıları da kolonizasyonu (örn: OPN, CXCR4) teşvik eder.

## 2.5. Substans P ve Reseptörleri

İnsan tachykininleri TAC1, TAC3, ve TAC4 genleri tarafından kodlanmakta ve substance P, neurokinin A, ve neurokinin B peptidlerini içermektedir. Substance P yara iyileşmesinden ağrı duyumu ve akut inflamasyona uzanan pek çok önemli fizyolojik düzenlemede yer almaktadır [60-61]. Bu peptitler sırasıyla G-protein ile eşleşen (G Protein Coupled Receptors), NK1, NK2, ve NK3 tachykinin reseptörlerini aktive etmektedirler. Hem SP hem de NK reseptörleri beyinde, omurilikte ve periferel sinir sisteminde yaygın olarak bulunurlar ancak meme, ovaryum prostat pankreas, lösemi ve glioblastoma dahil birçok kanser türünde aşırı eksprese edilmektedir [62-63].

Meme kanserinde , SP ve reseptörü yaygın olarak onkogenik özellikler edinirler ve kemik iliği metastaz oluşumuna aracılık ederler [64-67]. SP ile NK-1 reseptörün uyarılması sonucu , PI3K, NF-kB yolağı, ve MAPK aktifleşmektedir . Ayrıca NK-1 reseptörü aracılığı ile SP, sinyal aktive edici reseptörlerin yanında , sinyal transdüksiyonunu indüklemektedir. Bu reseptörler tirozin kinaz aktiviteli reseptörleri içerir. Bunlara EGFR ve Her2 'yi de içeren ErbB familyasına ait reseptörler örnek verilebilir. SP' nin bu etkisi birçok hücre tipinde tanımlanmıştır [68-70]. Ayrıca SP, bir matrijelmatrix üzerinde yer alan endotelial hücrelerden-kapiller benzeri yapıların oluşumunu indükleyerek anjiyogeneziste rol oynamaktadır[71]. SP aracılı NK-1 reseptörünün aktivasyonu endotelial hücrelerin proliferasyonunun indüklenmesiyle neovaskularizasyon sürecini doğrudan uyarılmaktadır. Çalışmalara göre, SP'nin anjiyogenik etkisi mikrovasküler yapılar üzerindeki NK-1 reseptör ile ortaya çıkmaktadır [72] .

Genellikle tümör hücrelerinin plazma membranlarında immunreaktif NK-1 reseptörleri aşırı eksprese edilmektedir [73]. Bu bağlamda NK-1 reseptörlerin immunohistokimyasal metodlarla görünürlüğü, reseptörü aşırı eksprese olmuş tümörlerin tanımlanmasını ve teşhisini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca NK-1 reseptör antagonistlerinin kullanımı ile yeni terapötik yaklaşımlar sunmaktadır [74].

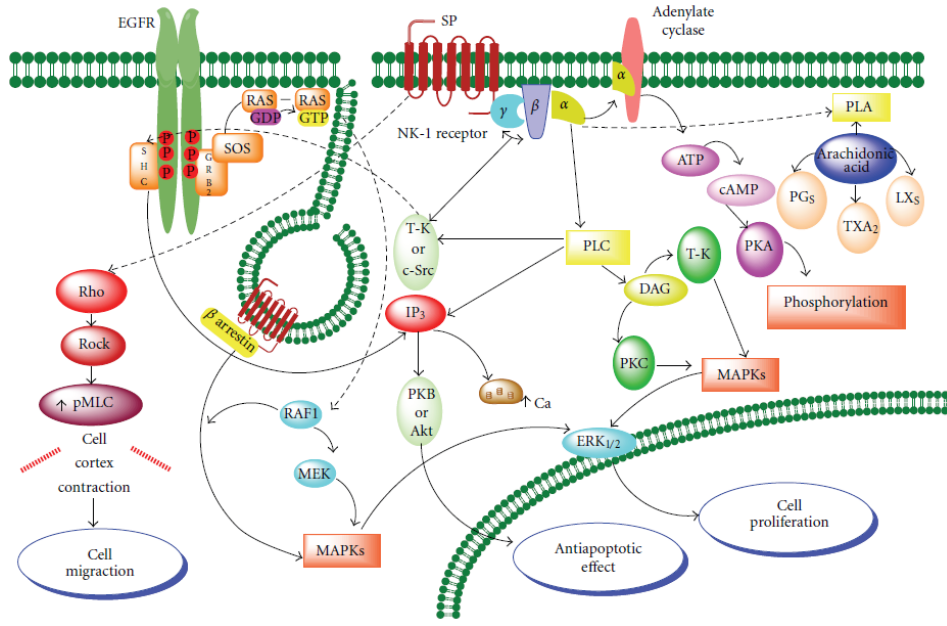
Yapılan çalışmalara göre insanlarda ve ratlarda NK-1 reseptörün farklı izoformları bulunmaktadır. İzoformların büyüklüğü 46 kDa 'dan 54 kDa'a kadar değişmektedir. Örneğin insan lenfositlerinde glikolize edilmiş NK-1 reseptörünün moleküler ağırlığı 58 kDa iken IM9 lenfoblastlarda 33 kDa ve 38 kDa olarak ki formu bulunmaktadır. Geçtiğimiz birkaç yılda, birçok insan tümör hücre dizilerinde, NK-1 reseptörün çok daha fazla izoformu (75, 54-58, 46, ve33-38 kDa ) bulunmuştur. farklı kanser tiplerinde eksprese edilen NK-1 reseptörün,farklı

izoformlarının, farklı rollerinin olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden çalışmalarda reseptörlerin fonksiyonlarının tanımlanması yeni terapötik yaklaşımlara imkan sağlayacaktır [75].

Tümör hücrelerinde eksprese edilen NK-1 reseptörün yalnızca niteliği değil aynı zamanda niceliği de önemlidir. Çünkü insan pankreatik kanser hücre dizilerinde normal hücreler ile karşılaştırıldığında 25-36 kat artan NK-1 reseptör ekspresyonu görülmektedir. Dahası, ileri tümör aşamasında olan hastaların örneklerinde NK-1 reseptör ekspresyonu önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. Normal insan hücrelerinde NK-1 reseptörün sayısı insan tümör hücrelerine göre daha düşüktür (örneğin; İnsan kan T lenfositlerinde 7.000-10.000 NK1 reseptör/hücre, astrocytoma hücrelerinde 40.000/hücre) [76-77]. NK-1 reseptör ekspresyon yüzdesinin malignansi ile doğru orantılı olduğunu gösterilmiştir. örneğin glioblastoma, astroctomaya göre daha fazla NK-1 reseptör eksprese etmektedir [78]. Ayrıca primer astrocytoma/glioblastoma hücre dizileri kültürlenmiş astrocytoma/glioblastoma hücre dizilerinden daha fazla NK-1 reseptör ekspresyonu sergilemektedir. Sonuç olarak NK-1 reseptörünü kodlayan mRNA ekspresyonu malign dokularda artmış fakat benign dokularda artmıştır (meme biyopsileri) [67].

### **2.5.1. NK-1 Reseptör Aktivasyonu ve Sinyali**

SP tercihen G proteini ile eşleşen NK-1 reseptörüne bağlanır. Bu reseptörler serpetin reseptörleri olarak da adlandırılır. Bu G kompleksi 3 farklı alt üniteden oluşur. Bunlar GDP/GTP ' yi bağlayan  $G\alpha$  alt ünitesi,  $G\beta\gamma$  kompleksi oluşturan  $G\beta$  and  $G\gamma$  alt üniteleri . Bir agonist ile reseptör aktifleştiği zaman GTP/ GDP değişimi için  $G\alpha$  alt ünitesi indüklenir ve  $G\beta\gamma$  dimerinden ayrılır.  $G\alpha$  ve  $G\beta\gamma$  (Src kinaz) reseptörden ayrılarak kendi sinyal kaskadını indükler. G proteini  $G\beta\gamma$  alt üniteleri ras- bağımlı kaskadın shc, grb2 ve src gibi komponentlerini toplar. Böylece raf-1, MAP kinaz , ve spesifik bir aktivatör ERK1/2 aktifleşir [79]. SP , NK-1 reseptörüne bağlandığı zaman ise MAPK kaskadında rol alan ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1) ve p38MAPK üyeleri aktifleşir. 3 farklı MAPK vardır ; extracellular signal-regulated kinase (ERKs), c-Jun NH2 terminal kinase (JNKs), ve p38 MAPK. Hepsinin ortak özelliği, proteinlerin fosforilasyonu sonucu gen ekspresyonunun değişmesidir. Bu yolların aktifleşmesi hem büyüme hem de apoptozisin indüklenmesine sebep olur (Şekil 9) [80-81].



**Şekil 9.** SP aracılı NK-1 reseptör aktivasyonu, hücre proliferasyonuna antiapoptotik etkiye ve hücre migrasyonuna neden olur [82] .

Literatürlere göre, SP ile NK-1 reseptörün aktivasyonu, fosfoinositid hidrolizi, kalsiyum mobilizasyonu ve MAPK aktivasyonuna sebep olmaktadır. NK-1 reseptörünün aktivasyonu, onkojenler ile ilişkili mitojenezis, anjiyogenezis, hücre migrasyonu ve metastaz ile ilişkili sayısız proseslere öncülük etmektedir. Bu nedenle SP ve NK-1 reseptör etkileşimi tümör çevresinde oldukça etkili olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda SP, NK-1 reseptör aracılı, astrocytoma, melanoma, nöroblastoma, glioma, gastrik karsinoma, pankreatik, larinks, kolon, retinoblastoma, lösemi ve meme kanseri başta olmak üzere birçok insan kanseri hücre dizilerinde mitojen etki göstermektedir [63, 83].

Tumor gelişimi ve yayılımında tümör hücresi kadar tümörü çevreleyen hücrelerle etkileşimi (mikroçevre) de rol oynamaktadır. Substance P'yi de içeren Tachykinin ailesi nöropeptitler tümör mikroçevresinde yer alan makrofajlar, endotel hücreleri ve epitelyum tarafından sentezlenmektedir [63]. Ayrıca NK1R ekspresyonunu göstermeyen tümörlerin hepsinin peritümöral damar yapılarında NK1R ekspresyonu gözlenmiştir [84]. Substance P'nin damar gelişimini ve endotel proliferasyonunu arttırdığı göz önüne alındığında NK1R antagonistlerinin anti-anjiyogenik etki gösterebileceği düşünülmektedir [72]. Ayrıca NK1R aktivasyonunun hücrelerin malign transformasyonunda rol oynadığı ve kemik metastazını arttırdığı düşünülmektedir [67, 85]. NK-1 antagonisti L-733, 060'un kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre dizilerinde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [85].

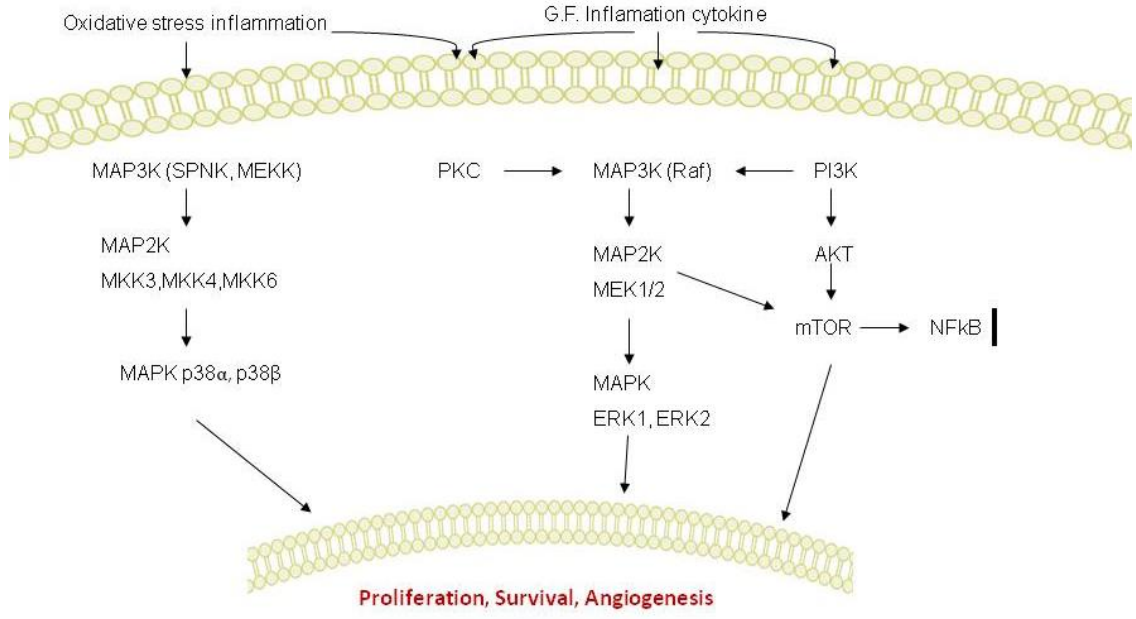


Spesifik insan NK1R antagonistlerinin (MEN 11,467 ve MEN 11,149 5mg/kg) immün sistemi çöktürülmüş farelerde glioma gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir [86]. Benzer şekilde immün sistemi çöktürülmüş farelerde NK1R antagonistlerinin meme ve kolon kanserinin lokal gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir [87-88]. Her ne kadar bu çalışmalar in-vivo ortamda yapılmış olsa da immün sistemi çöktürülmüş farelerde yapıldığı için Substance P'nin tümör gelişimi ve metastaz üzerindeki gerçek etkilerini göstermeyebilir.

Literatürdeki bilgiler Substance P'nin sitotoksik immüniteyi indüklediğini ve bu yolla düşünülenin tersine kanser gelişimini yavaşlatabileceğini göstermektedir. Örneğin Substance P'nin Natural Killer (NK) hücrelerinin ve sitotoksik T hücrelerinin aktivitesini ve IFN  $\gamma$  sekresyonunu arttırdığı bilinmektedir [17, 89-90]. IFN  $\gamma$  nın tümör antijenlerine spesifik sitotoksik T hücre (CD8) oluşumunda kritik önemi olduğu bilinmektedir Anti-tümöral immüntenin gelişmesinde çok önemli olan Dentritik hücre fonksiyonunun da Substance P tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Dentritik hücrelerin Substance P reseptörü olan NK1R'yi içerdiği bilinmektedir [91]. NK1R aktivasyonunun Dentritik hücre aktivasyonuna ve Interlökin 12 (IL-12) üretimine neden olduğu bulunmuştur [92]. 2012'de yapılan bir çalışmada Substance P'nin aktive ettiği NK2R'nün aktivasyonunu dentritik hücre aktivitesine bağlı oluşan ve anti-tümöral etki gösteren tip 1 immün yanıtın oluşmasını sağladığı gösterilmiştir [93]. Aktive olmuş dentritik hücreler kanser immünoterapisinde kullanılmaktadır ve kısmi olumlu etkileri gösterilmiştir. [94-96]. Dolayısıyla bütün bu çalışmalar Substance P ve reseptörlerinin kanser patogeneziindeki rolünün tek bir yöne çekilemeyeceğini ve kanserin fenotipine, mikroçevre ile etkileşimine, oluşturduğu immün yanıtı göre Substance P ve antagonistlerinin etkisinin farklı olacağını düşündürmektedir.

## **2.6. Makrofaj İnflamatuar Protein-2 (MIP-2)**

MIP-2, CXCL2 nin fare homologudur ve kendi reseptörü CXCR2'nin aktivasyonu ile tümör hücrelerinin büyümesine ve transformasyonuna sebep olur. CXCR2 ligandının fare homologu CXCL2 ya da mıp-2 (insanda IL-8) inflamatuvar yanıt sırasında nötrofil infiltrasyonunu uyarmaktadır [97]. Ayrıca CXCR2 aracılı tümör hücre büyümesine ve transformasyonuna sebep olmaktadır [98-99]. Son yapılan çalışmalarda, mıp-2 'nin primer tümörlerin % 7.5'unda, metastatik tümörlerin % 19.9 'unda amplifikasyonu rapor edilmiştir [100]. Literatürdeki verilere göre mıp-2, özellikle CXCR2 aracılı nötrofil kümelenmesi ile anjiyogenezisi indüklemektedir [101]. Anjiyogenezis ise tümör gelişimini destekleyerek metastaz oluşumuna aracılık etmektedir.



Şekil 10. MIP-2 sekresyonuna aracılık eden hücre içi sinyal mekanizmaları [102].

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Hücre Kültürü Yöntemi

Metastatik meme kanseri hücre dizilerinde SP'nin NK1R ve NK2R antagonistlerinin proliferasyon üzerine etkilerini belirlemek için hücre kültürü yöntemi kullanıldı.

#### 3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X) (Biochrom- F4815)
2. Non-essential amino asid (Biochrom - K 0293)
3. Tyrpsin-EDTA (%0.25) (Sigma-T4049)
4. Gentamisine (Genta)
5. Sodium pirüvat 100 mM (Santa Cruz)
6. 2-Mercaptoethanol 1000X (Merck)
7. Fetal Bovine Serum (Biochrom)
8. Cell Proliferation Reagent (WST-1) (Roche- 11644807001)
9. NK1R antagonisti 10 mg RP 67580 (Tocris)
10. NK2R antagonisti 10mg GR 67580 (Tocris)
11. Substans P 5mg RP 10178 (Genscript)
12. SP-Methyl ester 5 mg RP10184 (Genscript)

#### 3.1.2. Hücre Kültüründe 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 serological 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 tüp (LP)

### 3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar

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

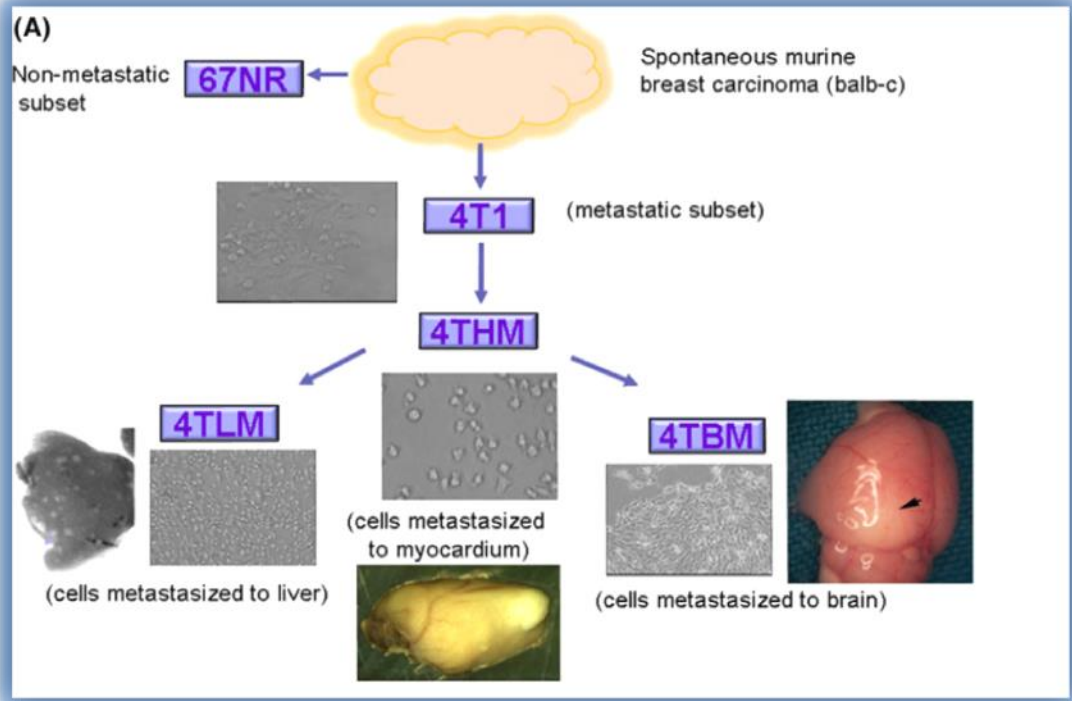
### 3.1.4. Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solusyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir.

Çalışmamızda ilk önce besiyeride kullanılacak olan tüm tüm çözeltiler su banyosunda 37 °C'ye getirildi. DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X) (Biochrom) sıvı besiyeri) içerisinde %5 FBS ( ısıyla inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamin, 0,02 mM non-essential aminoasit, 1 mM sodyum pirüvat olacak şekilde besi ortamı hazırlandı. Kullanılmadığı sürece +4°C'de saklandı.

### 3.1.5. Hücre Dizilerinin Hazırlanması

Çalışmada, danışmanım Prof.dr. Nuray ERİN'in geliştirdiği meme kanseri hücre dizileri kullanılmıştır. Bu hücreler Balb-c fareden elde edilen 4T1 meme kanser hücreleri ile onun metastatik alt gruplarıdır. Spesifik olarak 4THM hücreleri: 4T1 primer tümörlerden kalp kasına ve perikarda metastaz yapan hücreler, 4TLM hücreleri: 4THM hücreleri ile oluşan primer tümörlerden karaciğere metastaz yapan hücreler, 4TBM hücreleri: 4THM hücrelerinin beyine metastaz yapan alt grubudur (Şekil 11).



Şekil 11. Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin şematik gösterimi [103].

Sıvı nitrojen tankında kullanılmak üzere dondurulan stok hücre dizileri uygun koşullarda çözdürülmüştür. Bunun için, hücreleri içeren cryo tüp 37 °C su banyosunda kısa bir süre (20 sn) bekletildi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Cryo tüplerin dış yüzeyi alkolle temizlendi ve lamina flow steril kabin içerisine alındı. Hücreler % 5 fetal bovin serum (FBS), 0.02 mM esansiyel olmayan amino asit karışımı, 1 mM sodyum-pirüvat, 4 mM L-glutamin ve 80 mg gentamisin ilave edilmiş DMEM-F12 besi yeri kullanılarak, 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub>’li etüvde kültürlendi. Petrilerdeki doluluk oranı % 80-90 olunca, hücreler, deney için optimize edilen oranlarda, steril petri veya kuyucuklu plaklara bölündü.

### 3.1.6. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı uygun şekilde donduruldu. Bunun için 4 ml serumsuz besiyeriye 400 µl DMSO ve 800 µl FBS eklenerek dondurma solüsyonu hazırlandı. Hücre kültür petrisini dolduran hücreler 1ml tripsin ile kaldırıldı ve %5 FBS içeren besiyeri eklenerek 3 dk 700 rpm’ de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pelletin üzerine yoğunluğuna göre 1-3 ml dondurma solüsyonu eklendi ve pipet yardımı ile homojen duruma getirildi. Ardından hücre süspansiyonları cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli olarak dondurmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 24 saat –

80°C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen (-196 °C) tankına transfer edildi.

### **3.1.7. Hücre Standartlarının Hazırlanması**

Hücreler 10 kat sulandırılıp thoma lamında sayıldı. İlk standart 120 bin ve sonrakiler yarı yarıya olacak şekilde dilue edildikten sonra 96 kuyucuklu plateye ekildi. Her bir hücre hattı için bu işlemler yapıldı. 24 saat inkubasyonun sonunda her bir kuyucuğa besiyeri ile hazırlanan %10' luk Cell Proliferation Reagent (WST-1) (ROCHE) 100 µl verildi. 3 saat inkübasyona bırakıldı. 3 saat sonra spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen değerler KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı.

### **3.1.8. SP, SP metil ester ve Antagonistlerinin Hazırlanması**

Substans P (Genscript RP-10178) ara stoğu 10mM olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 5mg substans p, 371 µl %1 BSA (bovine serum albumin) içeren distile suda steril koşullarda çözüldü ve filtreden geçirildikten sonra küçük deney tüplerine bölünerek -20°C'de saklandı. Substans P (Genscript RP-10184) ara stoğu 10mM olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 5mg substans p metil ester , 367 µl DMSO (dimetil sülfoksit) ile steril koşullarda çözüldü ve filtreden geçirildikten sonra küçük deney tüplerine bölünerek -20°C'de saklandı.

NK1R antagonisti (Tocris RP67580-10mg) ve NK2R antagonistinin (Tocris GR159897-10mg) ara stokları 10mM olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 10 mg antagonist 2,25µl DMSO içerisinde steril koşullarda çözüldü ve filtreden geçirildikten sonra küçük deney tüplerine bölünerek -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.1.9. Hücre Kültüründe SP ve Antagonistlerin Etkilerinin Araştırılması**

Hücre sayımı için kültür kaplarının tabanına yapışmış olan hücrelerin kaldırılması gerekmektedir. Bunun için hücreler, 2 ml %5 FBS içeren Dmem besiyeri ile yıkanıp üzerine 1ml Tripsin/EDTA çözeltisi eklendi. Kısa bir süre oda ısısında inkube edildi (30-90sn). Hücreler arası bağların gücü, hücre hattına göre değişkenlik gösterdiği için tripsinle inkubasyon süresi her bir hücre hattında sabit tutulmamıştır. Hücre kümeleri platen tabanından ayrılmaya başlayınca hafif pipetaj yapıldı tripsin-hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve tüplere 2ml besiyeri eklendi. İçinde hücre süspansiyonu bulunan santrifüj tüpü, 700 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi, çökelti atıldı ve hücrelerin yoğunluğuna göre çökelti üzerine 2-5 ml besiyeri ilave edildi. Kısa bir pipetleme işlemi sonrasında hücreler homojenize edilerek tek tek sayılabilecek duruma getirildi. Toma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Bunun için öncelikle küçük deney tüplerine 900 µl besiyeri ve 100 µl hücre

süspansiyonu eklenerek (10 kat sulandırarak) hafif pipetaj yapıldı. Thoma lamı alkolle temizlenip üzerindeki mikrokareleri örtecek şekilde bir lamel kapatıldı. Daha sonra, hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp lamelin hemen altından mikrokarelerin bulunduğu bölgeyi kaplayacak şekilde lam üzerine bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan preparatta canlı hücreler ışık mikroskobu kullanılarak 40x büyütmede sayıldı. Thoma lamı üzerinde 4 bölgedeki canlı hücrelerin toplam sayısı bulunduktan sonra 1 ml'deki hücre sayısı ve sulandırma katsayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına her bir kuyucukta 200 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra tedaviye başlangıç anındaki hücre sayısını belirleyebilmek için 96 kuyucuklu plakın bir sırasındaki kuyucuklara 100 µl %10 WST-1 koyuldu. 3 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 420-600 nm dalga boyunda okuma yapıldı ve bu grup time zero (T0) olarak adlandırıldı. Her bir hücre dizisi kulanacağımız ajanların belirlediğimiz konsantrasyonları (SP 10-0,001 µM, NK1R antagonisti (RP67580-10mg) ve NK2R antagonisti (GR159897-10mg) (30, 10 µM ) ile muamele edildi. İlaçlar 200 µl %5 FBS içeren besiyeri ortamında hücrelere uygulandı. Bu işlemden sonra hücreler 72 saat inkübe edildi. 72sa inkubasyonun ardından hücre proliferasyonundaki değişiklikleri belirlemek için kuyucuklardaki süpernatantlar atılıp 100'er µl %10 WST-1 kiti uygulaması ile tedavi sonlandırıldı. Etüvde 3 sa inkubasyonun sonunda spektrofotometrede 420-600 nm dalga boyunda okutulan değerler KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı. Hücre sayılarındaki doza bağlı inhibisyonun kontrole göre yüzdeleri hesaplanarak değerlendirildi.

### **3.2. Western Blot Yöntemi**

Kullandığımız metastatik meme kanseri hücre dizilerinde NK1R ve NK2R ekspresyonlarının gösterilmesinin yanı sıra uyguladığımız ajanların farklı dozları ile hücre içi sinyal yollarında önemli rolleri olan AKT , ERK ve P38 fosforilasyonundaki değişiklikleri belirlemek ve semikantitatif olarak protein seviyelerini karşılaştırmak için western blot tekniği uygulandı.

#### **3.2.1. Hücre lizatlarının hazırlanması**

Steril ortam koşullarında, laminar flowda hücreler tripsinizasyon ile kültür kaplarından toplandıktan sonra tripsini uzaklaştırmak için santrifüjlendi. Tüpün dibine çöken hücre pelletini %5 FBS içeren besiyeri ile dilüe edip 10 kat sulandırarak Thoma lamı ile 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı. İhtiyacımız olan hücre miktarı için elimizdeki hücre süspansiyonunun sulandırma miktarı bulundu. 6 kuyucuklu plaklara 400.000'er hücre ekildikten sonra üzerine 2'şer ml %5 FBS içeren besiyeri eklendi, 48 sa inkubasyonun (%5 CO<sub>2</sub>, 37°C koşullarında) ardından, hücre dizilerine SP (10 µM, 0,1 µM), NK1R ve NK2R antagonisti (30 µM, 10 µM) %5 FBS içeren besiyeri

ortamında (tedavi hacmi her kuyucuk için 1 ml ) uygulandı. Her hücre dizisinde, kontrol amacı ile tedavi edilmeyen bir grup oluşturuldu. 40 sa inkubasyonun ardından ilaçlı besiyeri, pipetle (hücreleri plakın tabanından kaldırmadan) hassas bir şekilde çekildi. 500 µl 1x PBS ile hücrelerin yüzeyi hafif bir şekilde yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Daha sonra her kuyucuğa 150 µl proteaz inhibitörü içeren lizis buffer eklendi. Seri bir şekilde hücreler, separater ile plakın tabanından sıyrıldı. Daha sonra pipet kullanarak elde ettiğimiz lizatlar buz içerisindeki küçük tüplere aktarıldı ve örnekler -80°C' de saklandı.

### **3.2.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini**

Kullanılan Solüsyonlar:

#### **1µg/µl BSA**

0,1 g stok BSA (10mg/ml) (#sc-2323 Santa cruz)

10ml Distile su

Bu solüsyondan 100µl alınarak 900µl distile su ile 1ml'ye tamamlanır.

#### **Bradford Ayıracı (#1-800-4; BIORAD)**

3ml Bradford Reagent

12 ml Distile su

Western-Blot tekniği için hazırlanan lizatlar -80°C'den çıkartıldı ve buz üzerinde çözümleri için beklendi. Çözünen lizatlar vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10000 rpm'de 1 dk süreyle santrifüj edildi ve lizatlar yeniden buz üzerine alındı. Pipet yardımıyla süpernatant kısımları yeni ependorflara aktarıldı. 96 kuyucuk içeren plakın ilk sıraları okuyucunun daha anlaşılır ölçüm yapabilmesi için boş bırakıldı. Her bir lizat için ikinci sıranın ikinci kuyucuğundan başlanarak aşağı doğru her kuyucuğa 1µg/µl BSA'dan 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15µl koyuldu. Aynı kuyucuklara lizatlardan da 1µl örnek koyuldu. Her kuyucuğa 100µl bradford ayıracı eklenerek örnekler ölçüm için hazır hale getirildi. Multiscan spektrum yardımıyla 595nm'de ölçüm yapıldı. Çıkan sonuçlar Microsoft Office Excel programına yazıldı. BSA'lardan alınan değerler X eksenini; konsantrasyonlar ise Y eksenini olacak şekilde veriler düzenlendi ve grafik çizildi. Elde edilen grafiğin eğim formülüne göre lizatlardaki protein miktarları hesaplandı. Western-Blot protokolü için, her örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.

### **3.2.3. Western Blot Yönteminde Kullanılan Kimyasallar**

- Tris Base : Applichem Cat No: 77-86-1
- Glisin : Sigma Cat No: 85H07821
- Metanol : Merck: 106007 Tween20 : Cayman Cat No : 400035



- Temed : Appllichem Cat No : 110-18-9
- Akrilamid : Biorad Cat No : 161-0156
- Amonyum Persulfat: Appllichem Cat No : 7727-54-0
- Sodyum Dodesilsulfat : Sigma Cat No : 114H0311
- Merkaptoetanol (%98, 100 ml): Sigma Cat No: M3148
- Bromofenol Mavisi (25 gr): Sigma Cat No: B0126
- Bovine Serum Albumin (100 gr): Sigma Kat No: A7906
- PVDF-Plus, Transfer Membranı, (0.45 µM, 30cmx3m): Milipore Kat No: ISEQ00010
- ECL Clarity Western Blotting Substrate 500 ml: BIO-RAD Kat No : 170-5061
- Marker (Protein Ladder (100 µl): Thermo scientific Kat. No : 26619
- Primer Antikor Rabbit pAKT: Cell signaling Kat no: 4060L
- Primer Antikor Rabbit pERK: Cell signaling Kat no: 9106L
- Primer Antikor Rabbit pP38: Cell signaling Kat no: 4511L
- Sekonder Antikor Anti-Rabbit: Santacruz Kat no: sc-2004
- Sekonder Antikor Anti-Mouse: Santacruz Kat no: sc-2005
- Primer Antikor GAPDH: Meridian Kat no: H86504M

#### 3.2.4. Western Blot Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar:

- **Resolving Buffer:**  
1,5M TrisBase pH: 8.8  
1 lt.'si için 181,64 gr Trisbase tartılır ve distile suda çözülür.
- **Stacking Buffer:**  
0,5M TrisBase pH:6,8  
1 lt si için 60,5 gr trisbase tartılır ve distile suda çözülür.
- **10x Running Buffer:**  
15 gr. TrisBase ve 94 gr. Glisin tartılır. 50 ml %10 filtrelenmiş SDS eklendikten sonra 1'lt ye distile su ile tamamlanır.
- **10x TBS:**  
Yıkama solüsyonu hazırlamak için stok olarak kullanılır. 24.2 gr Tris base, 80gr NaCl tartılır. 800 ml ddH2O içerisinde çözülür. pH : 7.6'ya ayarlanır 1lt'ye kadar ddH2O ile tamamlanır. Yıkama için 1 lt **1x TBS** ve 1ml **Tween 20** karışımı hazırlanır.
- **2x SDS Loading Dye**

20ml ddH<sub>2</sub>O + 20ml stacking buffer +20ml %10 SDS + 40ml gliserol +6 mg bromofenol blue karıştırılır ve her birinde 950ul olacak şekilde ependorflara bölünür -80'e kaldırılır , kullanılacağı zaman çeker ocakta 50ul B-merkaptolan eklenir.

- **%10 APS**

Taze hazırlanmalıdır.

0,1 gr APS 1 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözülür.

- **Transfer Buffer:**

3,75gr glisin ve 7,25gr TrisBase tartılır ve 1 lt distile suda çözülür. Solüsyona kullanılacağı zaman 250 ml metanol eklenir. +4 °C 'de soğutulmuş kullanılır.

- **Akrilamid/Bisakrilamid:**

29:08 oranında karıştırılarak hazırlanır.

- **Commasive Blue :**

200ml asetik asit, 1800ml H<sub>2</sub>O, 0,5 gr comassie blue karışımı 1 sa karıştırılır filtreden geçirilir.

- **Bloklama Solüyonu:**

%1'lik Bovine Serum Albumin (BSA)

1gr BSA 100ml 1x TBS-t içerisinde çözülerek hazırlanır.

- **Chemiluminescent Solüyonu:** BIO-RAD Kat No : 170-5061

- **Triton-X Lizis Tamponu**

100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl<sub>2</sub>-Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadat (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche-cat. no: 11 836 145 001). Solüsyon pH: 7,4 (pH metre: Hanna Instruments pH 211)' e ayarlandı.

- **Jellerin hazırlanması**

Jellerin döküleceği camlar alkol ile silinerek temizlendi ve jel dökme aparatına yerleştirildi. Tüm proteinler için %10'luk ayırma ve yürütme jeli kullanıldı.

**i) % 10'luk Alt jelin hazırlanması**

11,55 ml distile su, 7,5 ml 4X alt jel hazırlama tamponu, 10,5 ml akrilamid-bisakrilamid, 300 µl %10'luk APS, 300 µl % 10 SDS, 30µl Tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı.

**ii) % 10'luk Üst jelin hazırlanması**

6 ml distile su, 2,5 ml 4X üst jel hazırlama tamponu, 1,25 ml akrilamid-bisakrilamid, 100 µl %10'luk APS, 100 µl % 10 SDS, 10µl Tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı.

Jeller 15 ml'lik falkonlarda hazırlandı ve ilk önce alt jel, içerisine TEMED dökülür dökülmez, camlar arasına pipetle aktarıldı. Üst yüzeyin düzgün olması için

jelin üst kısmına %1 SDS eklendi ( SDS, yoğunluk farkından dolayı alt jele karışmamakta). Alt jel polimerize olmadan üst jelin içerisine TEMED eklenmedi. Alt jel polimerize olduktan hemen sonra, %1 SDS uzaklaştırıldı ve üst jele TEMED eklenerek alt jelin üzerine aktarıldı kuyucukları oluşturacak olan tarak hava kabarcıkları kalmayacak şekilde üst jele yerleştirildi ve polimerize olması beklendi.

### 3.2.6. Örneklerin jele yüklenmesi, SDS-PAGE, Transfer İşlemi

Jeller polimerize olurken, toplam hacmi 60 µl olacak şekilde; 40 µl örnek 20 µl 2X SDS yükleme boyasıyla karıştırıldı. Kısa bir vorteksin ardından, örnekler 10.000 rpm'de 20 sn santrifüjlendi. 4 dk 95°C'de kaynatıp aynı şekilde santrifüj yaparak örnekleri yüklemeye hazır hale getirdik. Ardından cam setler arasında polimerleştiğinden emin olduğumuz üst jeldeki tarak çıkarıldı. Cam setler, elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1X yürütme tamponuyla belirtilen miktarlarda doldurulduktan sonra örnekler (60 µl) üst jel üzerindeki kuyucuklara protein leader (7 µl) başta olacak şekilde yüklendi. Western tankı güç kaynağına bağlandı ve 120 V'da proteinler aynı hizaya gelip alt jele geçene kadar yürütüldü. Bütün örnekler alt jele geçtiğinde 150 V'da arttırıldı ve proteinler jelin sonuna kadar yürütüldü. Örneklerdeki proteinler, elektrik akımı aracılığı ile moleküler ağırlığı büyük olanlar üstte, küçük moleküler ağırlıklı olanlar altta kalacak şekilde jelin alt kısmına doğru yürümektedir. Örnekler jelin en alt kısmına gelince sistemi kapatarak, yürütme işlemi tamamladık.

Jeldeki yürüme tamamlandıktan sonra transfere geçildi. Sistem kapatıldıktan sonra camlar yürütme tankından çıkarıldı, jelin soğuması için camlar hafif akan suyun altına kısa bir süre bırakıldı. Camlar açılıp jeller çıkarıldı ve transfer tamponunda kısa bir süre ıslatıldı. SDS-PAGE devam ederken, transfer için uygun boyutlarda kesilmiş PVDF membran, transferde kullanılacak watman kağıtları ve süngerler hazırlandı. Transfer işlemi için membran dışındaki malzemeler transfer tamponunda ıslatıldı. Membran ise methanolde 1dk ıslatıldı. Ve sırasıyla ; Siyah-sünger- whatman kağıdı (2 kat olabilir) –**Jel** –**Membran**-whatman kağıdı-sünger-beyaz olacak şekilde sandivic hazırlandı. Her defasında cam baget ile roll edilerek jel ile membran arasındaki hava kabarcıklarının çıkması sağlandı. Aparat transfer tankına yerleştirildi, sandivicin yüzeyini kapatacak kadar 1x transfer tamponu eklendi. Tank buz içerisinde gece boyu 40 V'da transfere bırakıldı. Ertesi sabah transferi tamamlamak için sistem kapatıldı. Transferden sonra membran 1 dk methanolde fikse edildi. Ardından bloklama işlemi için membran 1xTBS –tween20 ile hazırlanan %5 süt tozu ile 2sa inkubasyona bırakıldı ( oda koşullarında shaker üzerinde). Bu esnada yürütme ve transfer işlemi kontrol etmek için, jel commasive blue ile 15 dk boyandı. Daha sonra destain solüsyonu ile yıkanarak protein bantları

görünür hale getirildi. Örneklerin eşit miktarda yüklendiğinden, yürütme ve transfer işleminin doğruluğundan emin olmak için jel üzerindeki bantlar kontrol edildi.

### **3.2.7. Antikorlarla işaretleme**

Bloklama işleminden sonra, primer antikorla işaretleme bölümüne geçildi. Primer antikorların hazırlığı için 1X TBS-tween20 içerisinde %1 oranında BSA çözdürüldü. Bu solüsyon enjektör yardımı ile filtreden geçirildikten sonra kullanıldı. NK1R ve NK2R (1/1500), pAKT (1/1000) , pERK (1/2000), p-P38 (1/1500) ve GapDH (1/15.000) primer antikorları optimum olarak belirlenen dilüsyonlarda hazırlandı. Membranlar işaretlenecek olan proteinlerin moleküler ağırlığına göre, membran üzerindeki protein leader belirteçleri baza alınarak kesildi ve antikorları ile inkübasyona bırakıldı. Primer antikorla işaretleme yapmak için optimum inkübasyon süresi olarak gece boyu çalışıldı. İnkübasyon sonunda membranlar 1x TBS-tween20 ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı. Yıkama sonrasında sekonder antikorla işaretleme yapıldı. NK1, NK2R, pAKT, pERK ve pP38 için Anti-tavşan IgG sekonder antikor, GapDH için anti-fare sekonder antikor ile işaretleme yapıldı ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda membranlar son kez TBST ile 10'ar dakika aralıklar ile 3 kez yıkandı. Görüntülemeye hazır hale getirildi.

### **3.2.8. Stripping Solüsyonu (Strip-Off solüsyonu)**

- 20 ml % 10 SDS
- 12.5 ml stacking buffer
- 67,5 ml dH<sub>2</sub>O

Manyetik karıştırıcıda 55 °C' ye ısıtıldı. Sonra 704 µl β-merkaptöetanol eklenir. Membran 60 °C' de 30 dk shakerda strip-off solüsyonu ile muamele edilir. (β-merkaptöetanol olduğu için kapaklı bir kaptaki yapılmalıdır). 45 dk PBS-T ile shakerda yıkanır. (β-merkaptöetanol uzaklaştırılmalı, 10 dk da bir PBS-T yi değiştirilmeli.) % 5'lik süt tozu ile 1 saat bloklanır. Blotlanmış-ışaretlenmiş membranı farklı bir antikorla işaretlemeden önce temizlemek için yapılır.

### **3.2.9. Görüntüleme**

Membranlar; chemiluminisans substrat ile 2 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde filme (#AI0241 032 2; Kodak) aktarıldı. Filmlerin membran üzerinde inkübasyon süresi protein bant görüntüsündeki yoğunluğa göre değişmektedir. Bantlar Konica Minolta SRX-101A cihazı kullanılarak fotoğraflandı.

### 3.3. Elisa Yöntemi

Metastaz oluşumunda önemli rolünün olduğu bilinen makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) sekresyonu üzerine SP antagonistlerinin etkisini araştırmak için Elisa yöntemi kullanıldı.

#### 3.3.1. Örneklerin Hazırlanması

4TBM ve 4THM hücre dizileri % 80 yoğunluğa ulaştıktan sonra steril koşullarda 1ml tripsin ile pipetaj yapılarak platen tabanından kaldırıldı. 3 ml % 5 FBS içeren besiyeri ortamında tripsinize edilen hücreler toplandı. Tripsini uzaklaştırmak için 3 dak. 700 rpm'de santrifüj yapılarak hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 5 ml besiyeri ile dilüe edildikten sonra sayım yapıldı. Sayım için hücre dizileri 10 kat ( 900 µl besiyeri + 100 µl hücre ) sulandırıldı. Pipetaj ile homojenize edildikten sonra 100µl hücre süspansiyonundan alınıp toma lamı ile lamel arasına yayıldı. Mikroskop yardımı ile hücreler sayıldı. 96 kuyulu plakın her kuyusunda 200 µl'de 2500 hücre olacak şekilde hesaplandı ve hücreler ekildi. Etüvde 48 sa inkubasyona bırakıldı. 48 sa inkubasyonun ardından ; tedaviden önceki hücre sayısını belirlemek için (T0) bir grup hücre %10 wst kiti ile 3 saat inkübe edildi. Daha sonra spektrofotometrede absorbans değeri ölçülerek hücre sayısı belirlendi. Tedavi grupları için hücre dizileri serumlu ve serumsuz ortamlarda NK1R ve NK2R antagonisti (10-30 µl ) ile muamele edildi ve inkubasyona bırakıldı. 48 saat inkubasyonun ardından tüm grupların besiyerileri toplandı ve -80°C'de saklandı.

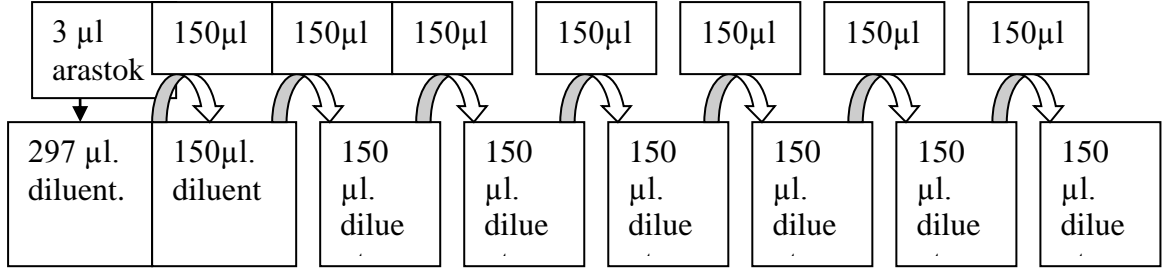
Bunların yanı sıra hücre sayısı ile MIP-2 sekresyonu arasında bağlantı olup olmadığını araştırmak için %10 wst-1 kiti ile proliferasyon tayini yapıldı.

#### 3.3.2. Elisa Yöntemi ile MIP-2 Tayininde Kullanılan Antikorlar ve Solüsyonlar

**Capture Ab:** Kit içindeki 50µg capture Ab içine 500µl ddH2O eklenir(0,1µg/ml). Alikotlanır, -20 dolapta saklanır. (1ml PBS + 1µl capture Ab)

**Tracer Ab:** Kit içindeki 25µg tracer Ab içine 500µl ddH2O eklenir, alikotlanıp -20dolapta saklanır. (1µl detection stok+1ml diluent)

**Standart:** Kit içindeki standart içine 50µl ddH2O eklenir(ana stok, 20000ng/ml). 100 kez sulandırılıp ara stok (200 ng/ml) yapılır(5µl ana stok+500µl ddH2O) 1. standart : 2000 pg/ml ile başlıyor.



**Diluent:** %0,2 Tween20 + %5 FBS in PBS

**Blocking buffer:** %5 FBS in PBS

**Wash Buffer:** %0,05 Tween20 in PBS

**HRP:** 1:1000 oranında hazırlanır. 4ml diluent + 4 $\mu$ l HRP

**Substrat:** TMB A ve B 1:1 oranında karıştırılır. Işıktan korunur.

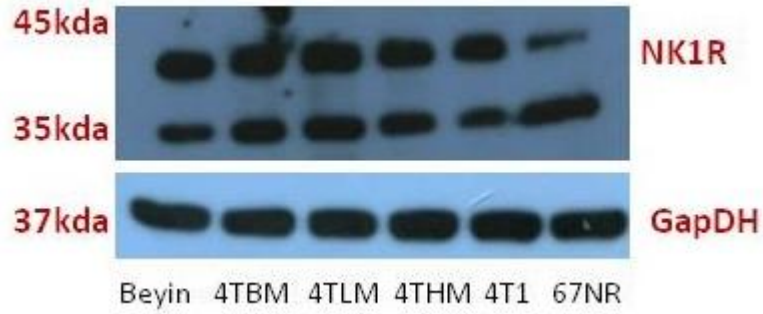
**Stabilizer (5X):** 4 ml ddH<sub>2</sub>O + 1 ml stabilizer

## BULGULAR

### 4.1. Nörokinin 1 ve Nörokinin 2 Reseptör Ekspresyonu

#### 4.1.1. Hücre Dizilerinde Nörokinin-1 Reseptör Ekspresyonu

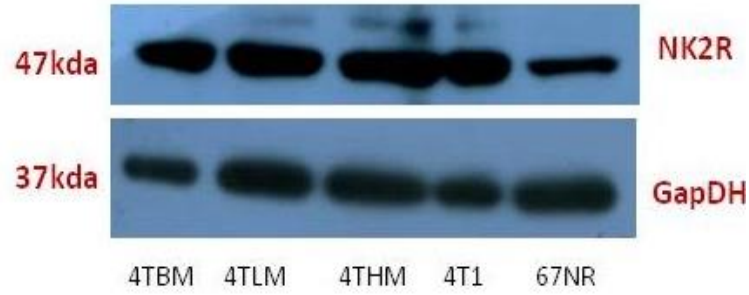
Nörokinin 1 (NK1R) ekspresyonu, metastatik (4T1, 4TBM, 4TLM, 4THM) ve metastatik olmayan (67NR) hücre dizilerinden elde edilen lizatlarda gösterilmiştir. Bunlara pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere dişi balb-c farenin beyin dokusundan elde edilen lizatlar kullanılmıştır. NK1R'ün tüm hücre hatlarında 35 kDa ve 45 kDa'da ekspresyon edildiği gözlemlendi. Ancak 67NR (metastatik olmayan) hücre dizisinde NK1R'ün 45 kDa'daki ekspresyonu diğer hücre dizileri ve beyin doku lizatına göre daha düşük olduğu görüldü. Örneklerin eşit miktarda protein içerdiği gösterilmek üzere GapDH (glikoz 6 fosfat dehidogenaz) ekspresyon düzeyleri kontrol olarak kullanıldı (Şekil12).



**Şekil 12.** Metastatik (4T1, 4TBM, 4TLM, 4THM) ve metastatik olmayan (67NR) hücre dizilerinde Nörokinin 1 reseptör (NK1R) ekspresyonu. Hücre lizatlarında NK1R ekspresyonu. Pozitif kontrol olarak beyin doku lizatı kullanılmıştır. NK1R'ne spesifik tavşan fare NK1R antikoru (Thermo-scientific kat.no. : PA1-32229 dilüsyon: 1/1500) kullanılarak belirlenmiştir. Eşit düzeyde protein yüklenip yüklenmediği GAPDH düzeyi gösterilerek belirlenmiştir (Meridian life science kat no: H86504M dilüsyon: 1/100.000)

#### 4.1.2. Hücre Dizilerinde Neurokinin-2 Reseptör Ekspresyonu

Nörokinin 2 (NK2R) ekspresyonu, metastatik (4T1, 4TBM, 4TLM, 4THM) ve metastatik olmayan (67NR) hücre dizilerinden elde edilen lizatlarda gösterilmiştir. NK2R'ün tüm hücre hatlarında 47 kDa'da aynı düzeyde eksprese edildiği gözlemlendi. Ancak 67NR (metastatik olmayan) hücre dizisinde NK2R'ün diğer hücre dizilerine göre daha düşük miktarda eksprese edildiği görüldü. Örneklerin eşit miktarda protein içerdiği gösterilmek üzere GapDH (glikoz 6 fosfat dehidogenaz) ekspresyon düzeyleri kontrol olarak kullanıldı (Şekil13 ).



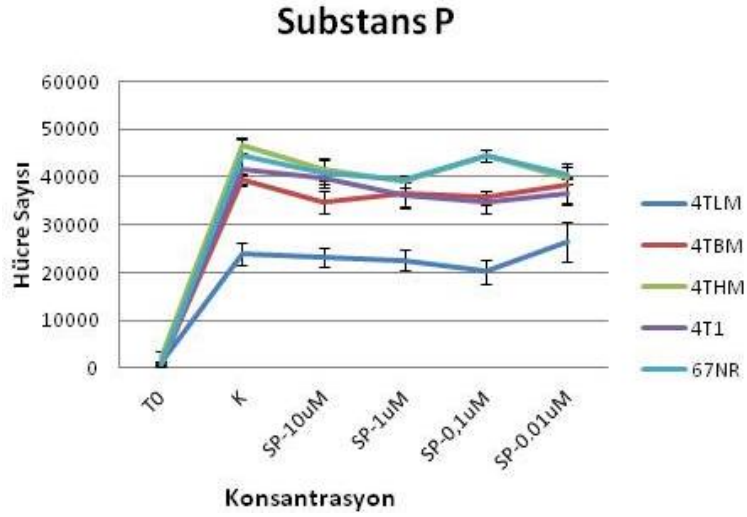
**Şekil 13.** Metastatik (4T1, 4TBM, 4TLM, 4THM) ve metastatik olmayan (67NR) hücre dizilerinde Nörokinin 2 reseptör (NK2R) ekspresyonu. NK2R'ne spesifik tavşan fare NK2R antikoru (Abcam kat. no : ab124998 dilüsyon: 1/2000) kullanılarak belirlenmiştir. Eşit düzeyde protein yüklenip yüklenmediği GAPDH düzeyi gösterilerek belirlenmiştir. (Meridian life science kat no: H86504M dilüsyon: 1/100.000)

#### 4.2. Hücre Kültürü Sonuçları

##### 4.2.1. Substans P'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

Substans P'nin 10 $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, dozları ile metastatik (4TBM, 4TLM, 4THM, 4T1) ve metastatik olmayan (67NR) hücre dizileri muamele edildi, hücre proliferasyonları üzerine etkisi araştırıldı. Sonuç olarak SP uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 14).

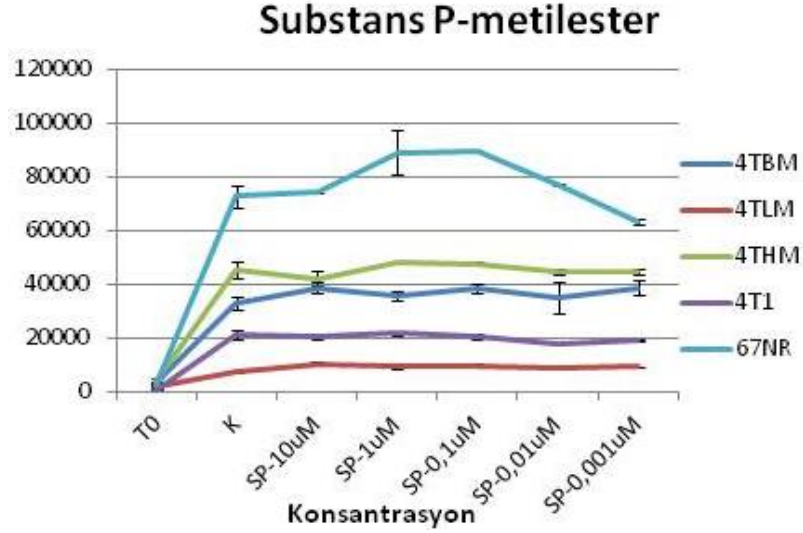




Şekil 14. 4TBM, 4TLM, 4THM, 4T1 ve 67NR hücre hattında Substance P'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.

#### 4.2.2. Substans P -Metilesterin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

Substans P- Metil esterin ( seçici NK1R agonisti) 10µM, 1 µM, 0,1µM, 0,01 ve 0,001 µM, dozları ile metastatik (4TBM, 4TLM, 4THM, 4T1) ve metastatik olmayan (67NR) hücre dizileri mumale edildi, hücre proliferasyonları üzerine etkisi araştırıldı. Sonuç olarak SP-metilesterin hücre proliferasyonu üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 15).

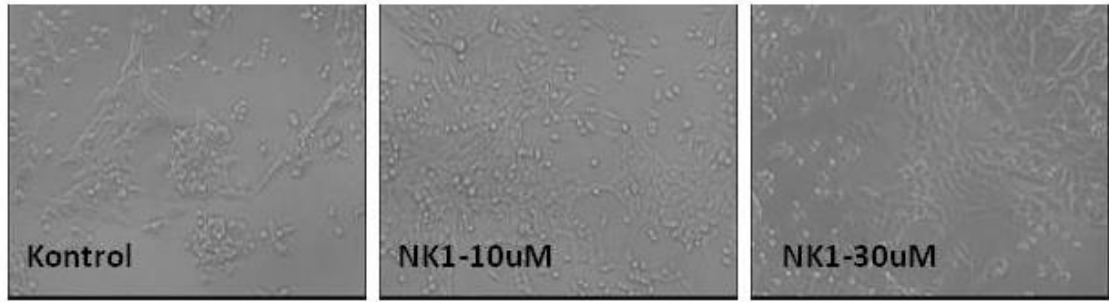


Şekil 15. 4TBM, 4TLM, 4THM, 4T1 ve 67NR hücre hattında Substans P metil esterin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.

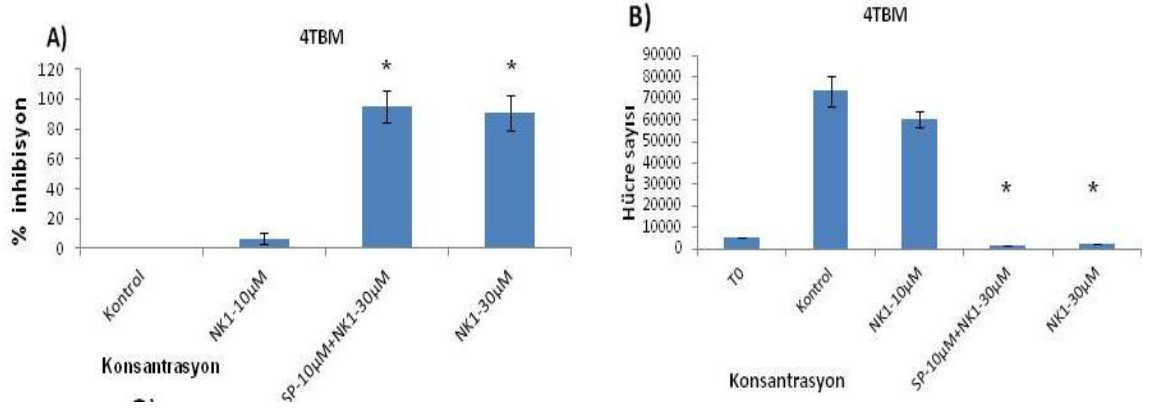
### 4.2.3. NK1R Antagonisti (RP67580) ve SP İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

#### 4.2.3.1. 4TBM Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK1R antagonistinin 10  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M konsantrasyonları 4TBM hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10  $\mu$ M dozu ile NK1R antagonistinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4TBM hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK1R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 17' de görüldüğü gibi NK1R antagonisti 30  $\mu$ M dozda hücrelerin ölmesine neden oldu ve bu etkinin SP 10  $\mu$ M kombine uygulaması ile geriye dönmediği görüldü ( hücre sayısı, başlangıç sayısından düşüktür). 10  $\mu$ M dozda NK1R antagonisti uygulandığında ise proliferasyon üzerinde anlamlı bir etki görülmemiştir (Şekil 17).



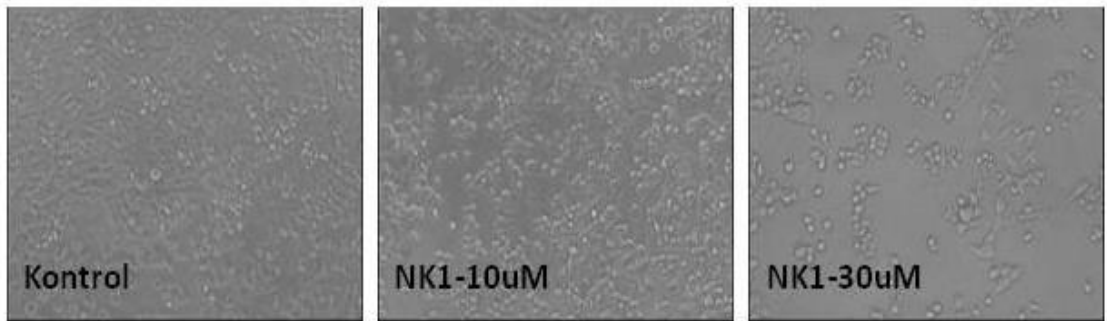
**Şekil 16.** Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4TBM hücre dizisinin fotografik görüntüleri.



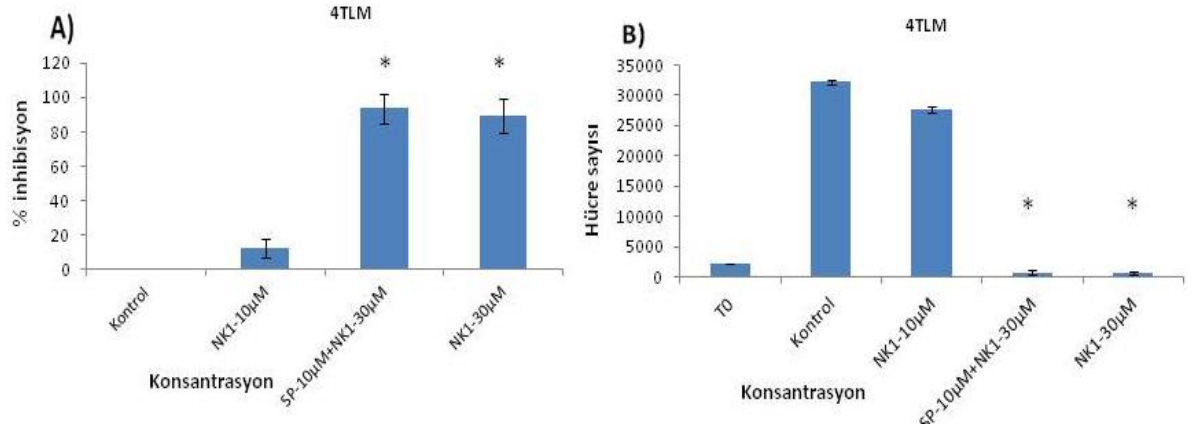
**Şekil 17.** 4TBM hücrelerinde farklı dozlarda NK1R antagonisinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; RP 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30µM RP- ve 30 µM RP ile 10 µM SP uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\*p<0.05). T0:nbaşlangıç hücre sayısı.

#### 4.2.3.2.4TLM Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK1R antagonisinin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 4TLM hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK1R antagonisinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4TLM hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK1R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 19 da görüldüğü gibi NK1R antagonisti 30 µM dozda hücrelerin ölmesine neden oldu ve bu etkinin SP 10 µM kombine uygulaması ile geriye dönmediği görüldü (hücre sayısı, başlangıç sayısından düşüktür). 10 µM dozda NK1R antagonisti uygulandığında ise proliferasyon üzerinde anlamlı bir etki görülmemiştir.



**Şekil 18.** Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4TLM hücre dizisinin fotografik görüntüleri.

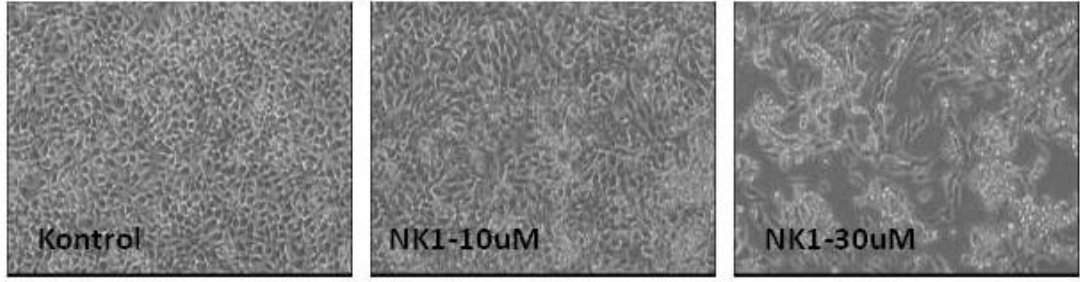


**Şekil 19.** 4TLM hücrelerinde farklı dozlarda NK1R antagonistinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; RP- 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30 µM RP- ve 30 µM RP ile 10 µM SP uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\*p<0,05).

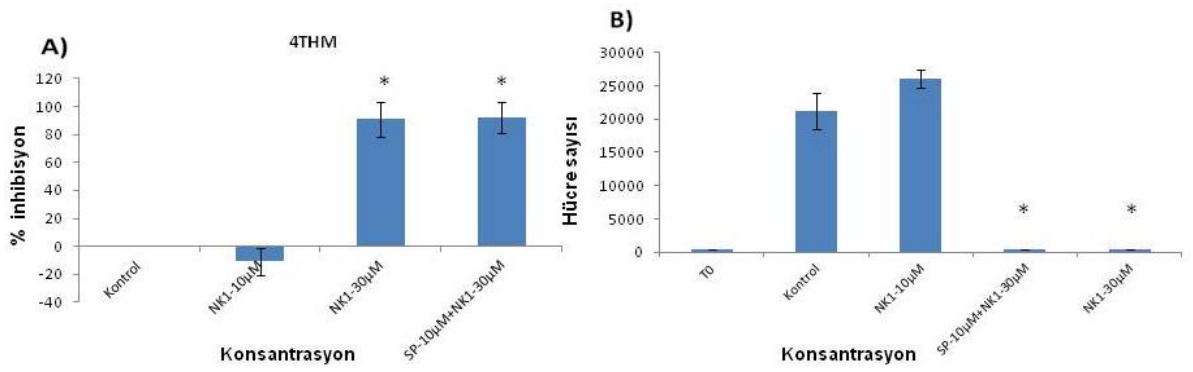
#### 4.2.3.3. 4THM Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK1R antagonistinin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 4THM hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK1R antagonistinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4THM hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK1R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi.

Şekil 21' de görüldüğü gibi NK1R antagonisti 30 µM dozda hücrelerin ölmesine neden oldu ve bu etkinin SP 10 µM kombine uygulaması ile geriye dönmediği görüldü (hücre sayısı, başlangıç sayısından düşüktür). 10 µM dozda NK1R antagonisti uygulandığında ise proliferasyon üzerinde anlamlı bir etki görülmemiştir (Şekil 21).



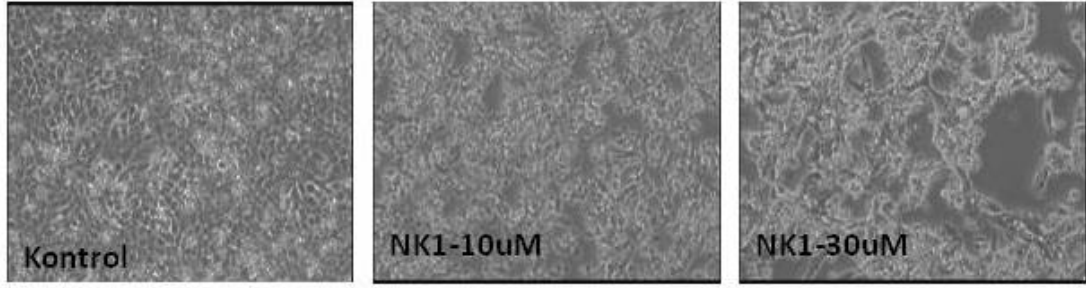
**Şekil 20.** Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4THM hücre dizisinin fotografik görüntüleri.



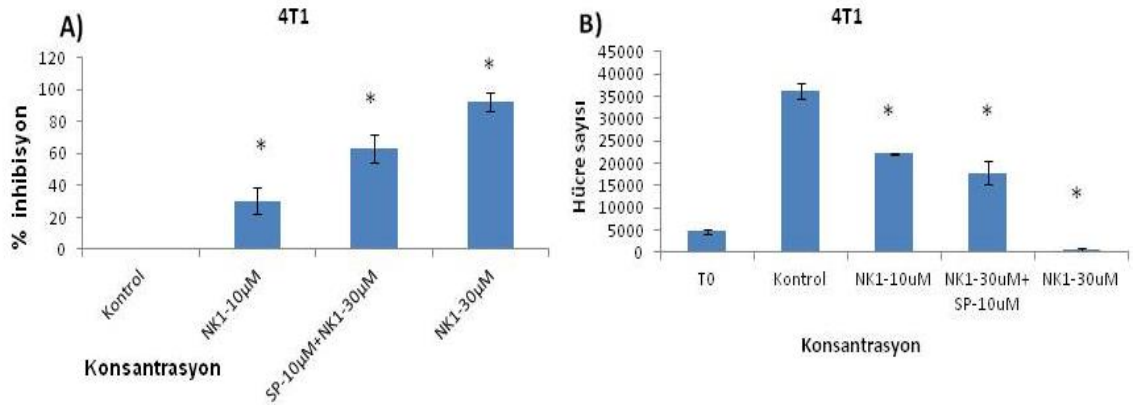
**Şekil 21.** 4THM hücrelerinde farklı dozlarda NK1R antagonisinin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; RP- 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30 µM RP- ve 30 µM RP ile 10 µM SP uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\*p<0,05).

#### 4.2.3.4. 4T1 Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK1R antagonisinin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 4T1 hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK1R antagonisinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4T1 hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK1R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil -de görüldüğü gibi NK1R antagonisti 30 µM dozda hücrelerin ölmesine neden oldu ve bu etkinin SP 10 µM kombine uygulaması ile kısmen geriye döndüğü yine de proliferasyonu anlamlı olarak baskıladı (saptandı. (\*p<0,05 olduğu için anlamlı kabul edilmekte.) 10 µM dozda da NK1R antagonisti proliferasyonu anlamlı olarak baskılamıştır (Şekil 23).



**Şekil 22 :** Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 4T1 hücre dizisinin fotografik görüntüleri.



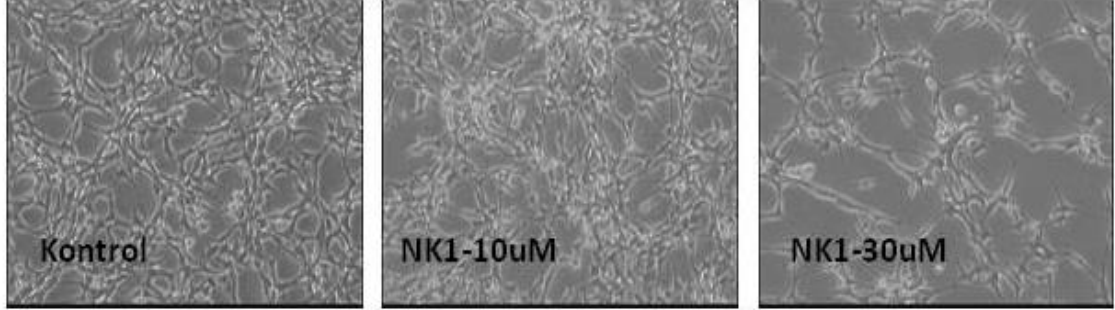
**Şekil 23.** 4T1 hücrelerinde farklı dozlarda NK1R antagonistin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; RP- 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30 µM RP- uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.5. 67NR Hücre Hattı

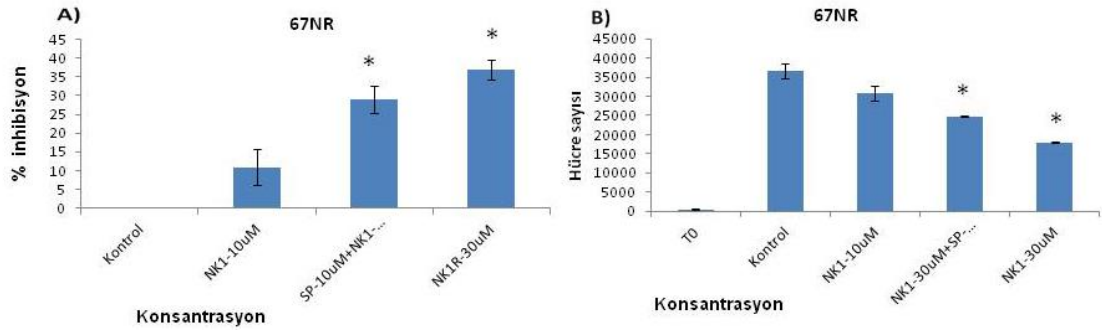
Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK1R antagonistin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 67NR hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK1R antagonistin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 67NR hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK1R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil --de görüldüğü gibi NK1R antagonisti 30 µM dozda hücre proliferasyonunu baskıladı ve bu etkinin SP 10 µM kombine uygulaması ile kısmen geriye döndüğü



yine de bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, proliferasyonu anlamlı olarak baskıladığı saptandı. (\* $p < 0,05$  olduğu için anlamlı kabul edilmekte.) 10  $\mu\text{M}$  dozda da NK1R antagonisti proliferasyonu kısmen baskılamıştır (Şekil 24).



**Şekil 24.** Farklı dozlarda NK1R antagonisti ile mumele edilen 67NR hücre dizisinin fotografik görüntüleri.



**Şekil 25.** 67NR hücrelerinde farklı dozlarda NK1R antagonistin (RP6780: RP-) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; RP- 10  $\mu\text{M}$  ve 30  $\mu\text{M}$  **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30  $\mu\text{M}$  RP- uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı (\* $p < 0,05$ ).

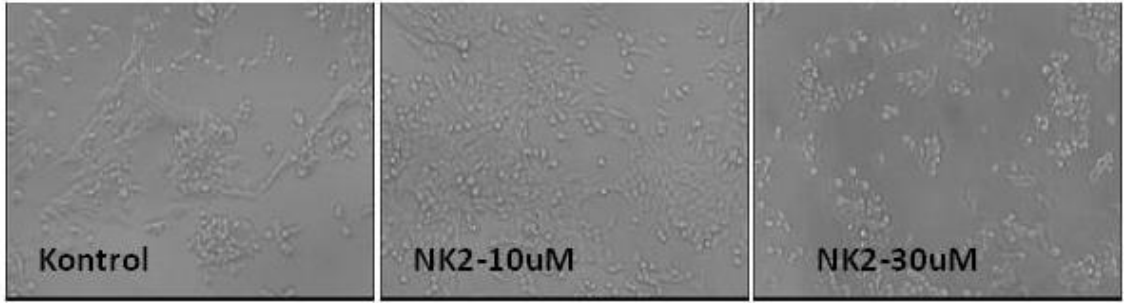
#### 4.2.4. NK2R Antagonisti (GR159897) ve SP İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

##### 4.2.4.1. 4TBM Hücre Hattı

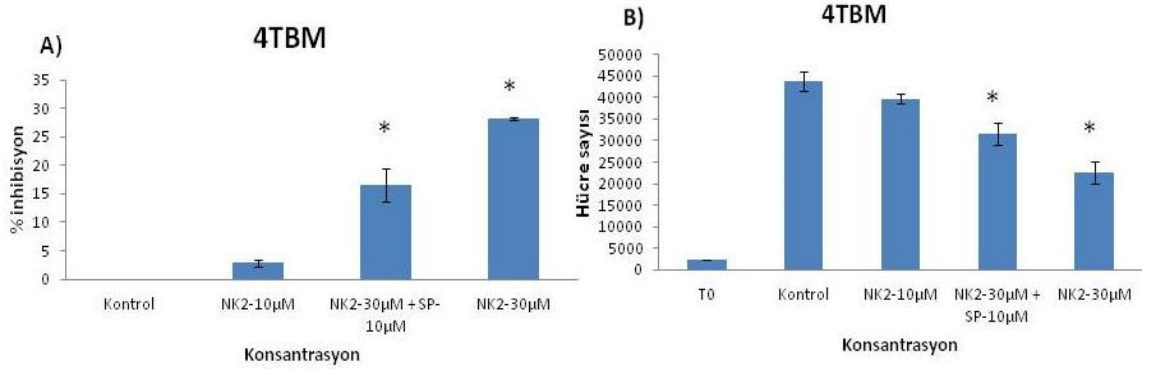
Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK2R antagonistin 10  $\mu\text{M}$  ve 30  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları 4TBM hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10  $\mu\text{M}$  dozu ile NK2R antagonistin kombine uygulamasının etkileri

araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4TBM hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK2R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi.

Şekil 27' de görüldüğü gibi NK2R antagonisti 30  $\mu$ M dozda hücre proliferasyonunu baskılamıştır ve bu etkinin SP 10  $\mu$ M kombine uygulaması ile anlamlı olarak geriye dönmediği görüldü. 10  $\mu$ M dozda NK2R antagonisti uygulandığında ise proliferasyon üzerinde anlamlı bir etki görülmemiştir.



Şekil 26. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4TBM hücre dizisinin fotografik görüntüleri.

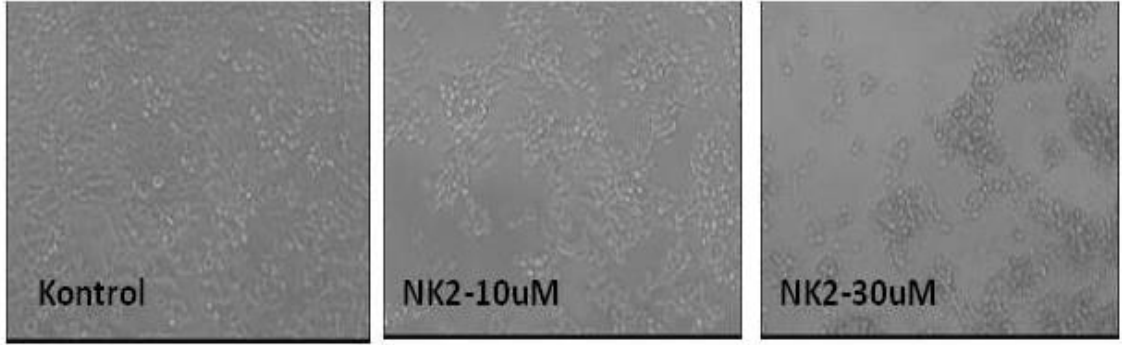


Şekil 27. 4TBM hücrelerinde farklı dozlarda NK2R antagonistin (GR159897: GR) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; GR- 10  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30  $\mu$ M GR- uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\* $p < 0,05$ ).

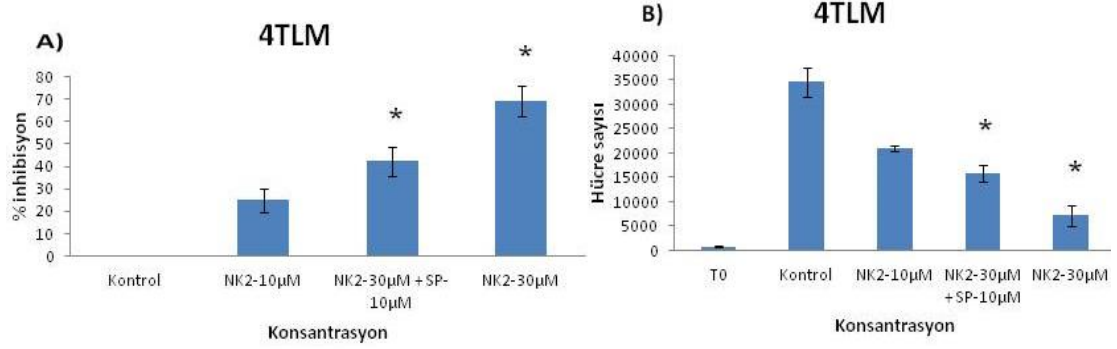


#### 4.2.4.2. 4TLM Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK2R antagonisinin 10  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M konsantrasyonları 4TLM hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10  $\mu$ M dozu ile NK2R antagonisinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4TLM hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK2R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 29'da görüldüğü gibi NK2R antagonisti 30  $\mu$ M dozda hücre proliferasyonunu baskılamıştır ve bu etkinin SP 10  $\mu$ M kombine uygulaması ile kısmen geriye döndüğü yine de kontrol grubuna göre anlamlı olarak proliferasyonun baskılandığı görüldü. NK2R antagonisinin düşük dozu da (10  $\mu$ M) 4TLM hücre proliferasyonunu baskılamıştır. İstatistiksel olarak anlamlıdır. (\* $p$ <0,05).



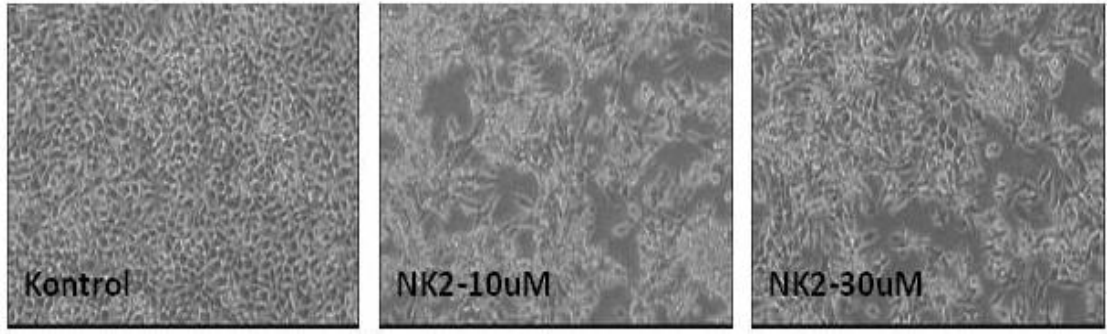
**Şekil 28.** Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4TLM hücre dizisinin fotografik görüntüleri



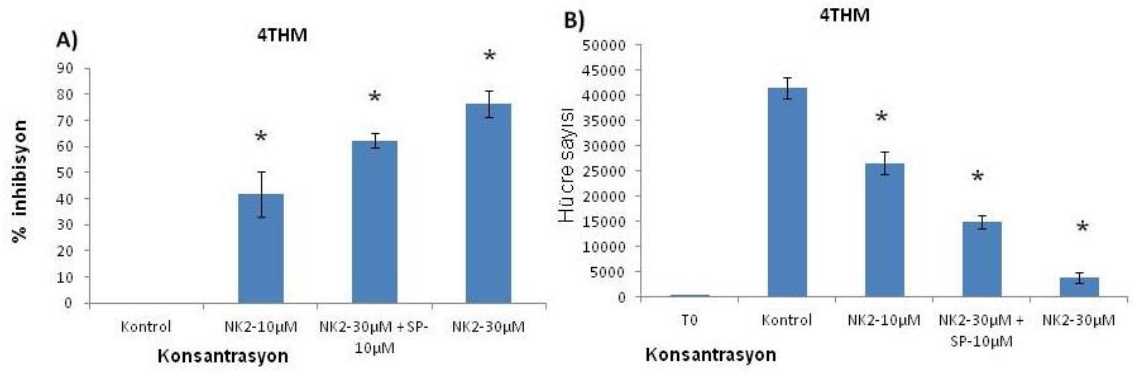
**Şekil 29.** 4TLM hücrelerinde farklı dozlarda NK2R antagonistinin (GR159897: GR) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; GR- 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir 30 µM v 10 µM uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\*p<0,05).

#### 4.2.4.3. 4THM Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK2R antagonistinin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 4THM hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK2R antagonistinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4THM hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK2R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 31' de görüldüğü gibi NK2R antagonisti 30 µM dozda hücre proliferasyonunu baskılamıştır ve bu etkinin SP 10 µM kombine uygulaması ile kısmen geriye döndüğü yine de kontrol grubuna göre anlamlı olarak proliferasyonun baskılandığı görüldü. Düşük dozda da NK2R antagonisti 4THM hücre dizisinin proliferasyonunu baskılamıştır.



**Şekil 30.** Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4THM hücre dizisinin fotografik görüntüleri.

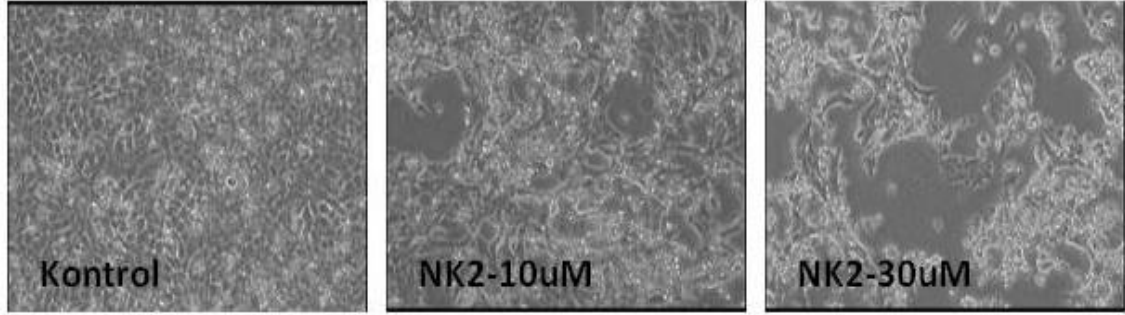


**Şekil 31.** 4THM hücrelerinde farklı dozlarda NK2R antagonistin (GR159897: GR) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; GR- 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30 µM v 10 µM GR- uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\*p<0,05)

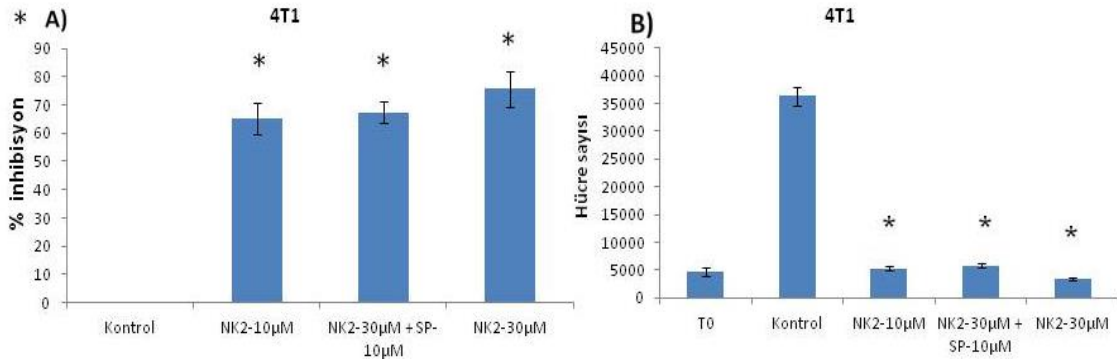
#### 4.2.4.4. 4T1 Hücre Hattı

Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK2R antagonisinin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 4T1 hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK2R antagonisinin kombine uygulamasının etkileri araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 4T1 hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK2R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 33' de görüldüğü gibi NK2R antagonisti 30 µM dozda hücre proliferasyonunu baskılamıştır ve bu etkinin SP 10 µM kombine uygulaması ile kısmen geriye

döndüğü yine de kontrol grubuna göre anlamlı olarak proliferasyonun baskılandığı görüldü. Düşük dozda da NK2R antagonisti 4T1 hücre dizisinin proliferasyonunu baskılamıştır.



**Şekil 32.** Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 4T1 hücre dizisinin fotografik görüntüleri.



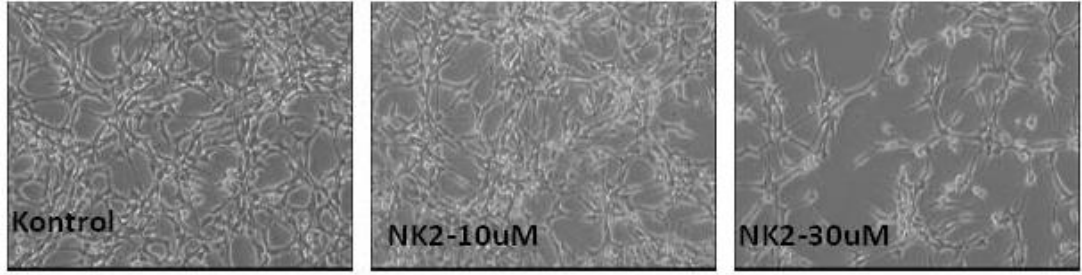
**Şekil 33.** 4T1 hücrelerinde farklı dozlarda NK2R antagonisinin (GR159897: GR) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; GR- 10 µM ve 30 µM **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30 µM v 10 µM GR- uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\*p<0,05).

#### 4.2.4.5. 67NR Hücre Hattı

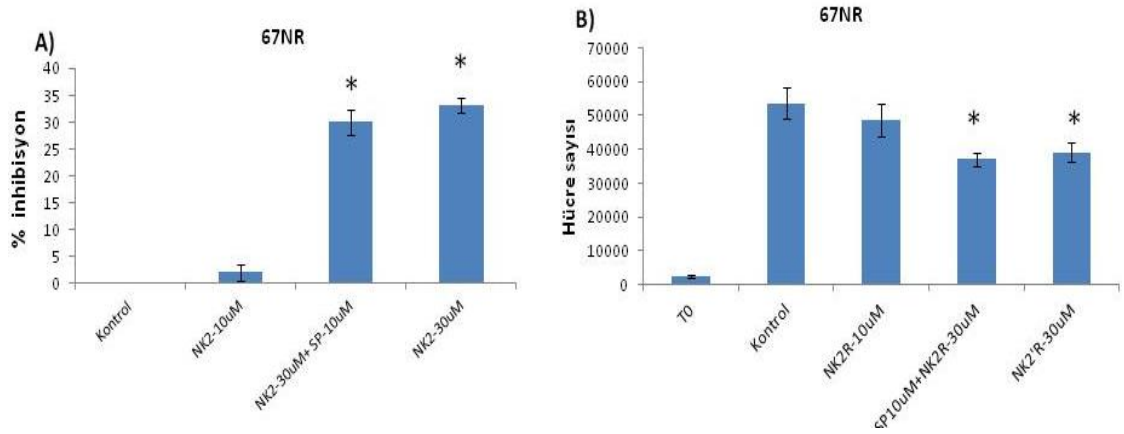
Hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak için NK2R antagonisinin 10 µM ve 30 µM konsantrasyonları 67NR hücre dizisine uygulandı. Bunun yanında hücre proliferasyonu üzerine tek başına anlamlı bir etkisini görmediğimiz substans p (SP)'nin 10 µM dozu ile NK2R antagonisinin kombine uygulamasının etkileri

araştırıldı. Metotta anlatıldığı gibi 67NR hücre dizisinin proliferasyonu üzerine etkisi NK2R antagonisti ve SP ile birlikte tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi.

Şekil 35' te görüldüğü gibi NK2R antagonisti 30  $\mu$ M dozda hücre proliferasyonunu baskılamıştır ve bu etkinin SP 10  $\mu$ M kombine uygulaması ile kısmen geriye döndüğü yine de kontrol grubuna göre anlamlı olarak proliferasyonun baskılandığı görüldü. Düşük dozda (10  $\mu$ M) NK2R antagonisti ise 67NR hücre dizisinin proliferasyonunu etkilememiştir.



Şekil 34. Farklı dozlarda NK2R antagonisti ile mumele edilen 67NR hücre dizisinin fotografik görüntüleri.



Şekil 35. 67NR hücrelerinde farklı dozlarda NK2R antagonistin (GR159897: GR) ve Substans P (SP) kombine uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisini gösteren grafikler; GR- 10  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M **A)** Kontrolle göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. **B)** Dört tekrardan ortalamayı yansıtan deneyin sonucu görülmektedir. 30  $\mu$ M GR- uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (\* $p < 0,05$ ). Ancak bu inhibisyon diğer hücre dizilerine göre 67NR'de oldukça düşüktür.

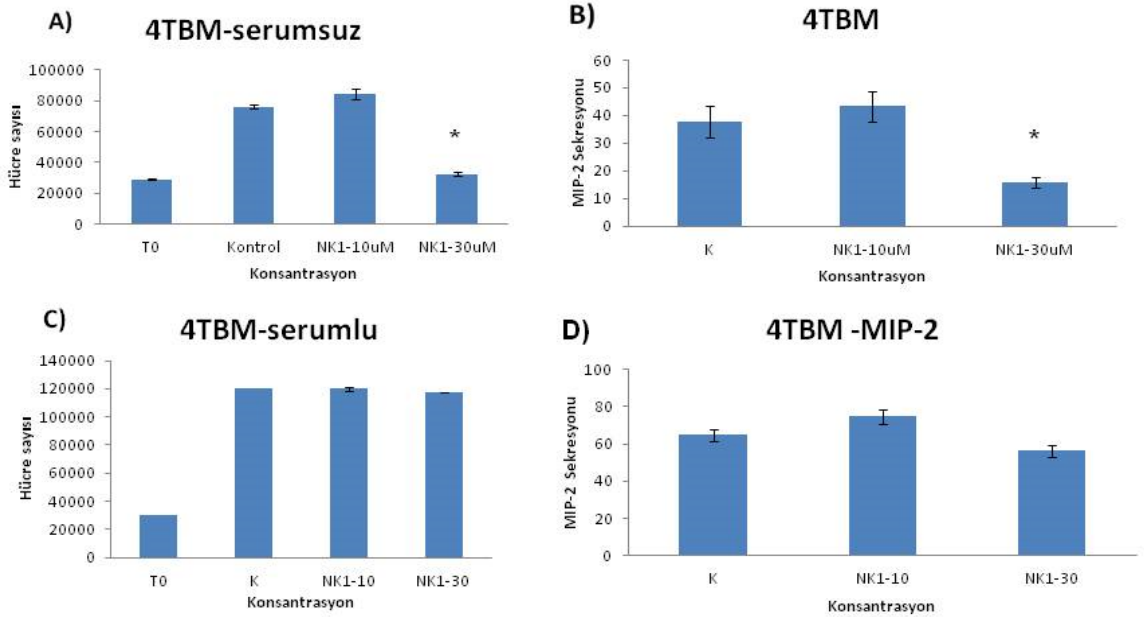
### 4.3. Elisa Sonuçları

#### 4.3.1. 4TBM ve 4THM hücre dizilerinde NK1R ve NK2R Antagonistlerinin MIP-2 Sekresyonu Üzerine Etkisi

##### 4.3.1.2. NK1R Antagonistinin MIP-2 Sekresyonu Üzerine Etkisi

###### 4TBM Hücre Hattı

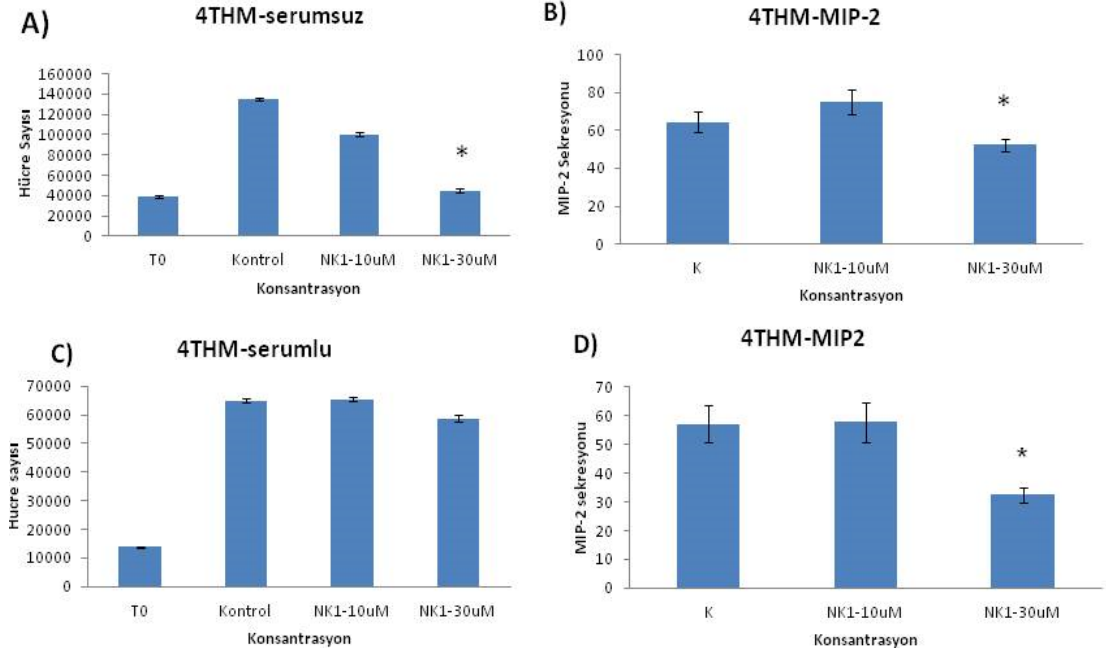
4TBM hücre dizisinde NK1R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Uygulanan tedaviler hücre proliferasyonunu da etkilediği için MIP-2 sekresyonu üzerine olası etki 5% FBS içeren ve düşük serumlu (%0,2 FBS) ortamda hücre proliferasyonundaki değişiklikler ile birlikte değerlendirilmiştir. Serumlu ortamda tedavi grupları arasındaki proliferasyon farkı ortadan kalkmaktadır. Sonuçlara göre MIP-2 sekresyonu hücre proliferasyonundan bağımsız olarak NK1R antagonistinden etkilenmektedir. 10 $\mu$ M NK1R antagonisti 4TBM hücre dizisinde MIP-2'nin sekresyonunu etkilemezken; 30 $\mu$ M NK1R antagonisti MIP-2 sekresyonunu inhibe etmiştir. Bu fark serumsuz ortamda istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 36) (\*p<0,05).



**Şekil 36.** 4TBM hücre dizisinde NK1R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi. Olası etki 5% FBS varlığında ( Panel C ve D) ve %0,2 FBS (Panel A ve B) de verilmiştir. Proliferasyon sonuçları Panel A ve C , MIP-2 sekresyonu Panel B ve D'de gösterilmektedir. (\*p<0,05).

### 4THM Hücre Hattı

4THM hücre dizisinde NK1R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Uygulanan tedaviler hücre proliferasyonunu da etkilediği için MIP-2 sekresyonu üzerine olası etki 5% FBS içeren ve düşük serumlu (%0,2 FBS) ortamda hücre proliferasyonundaki değişiklikler ile birlikte değerlendirilmiştir. Serumlu ortamda tedavi grupları arasındaki proliferasyon farkı ortadan kalkmaktadır. Sonuçlara göre MIP-2 sekresyonu hücre proliferasyonundan bağımsız olarak NK1R antagonistinden etkilenmektedir. 10  $\mu$ M NK1R antagonisti 4THM hücre dizisinde MIP-2'nin sekresyonunu etkilemezken; 30  $\mu$ M NK1R antagonisti MIP-2 sekresyonunu inhibe etmiştir. Bu fark serumlu ve serumlu ortamda istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 37) (\* $p < 0,05$ ).



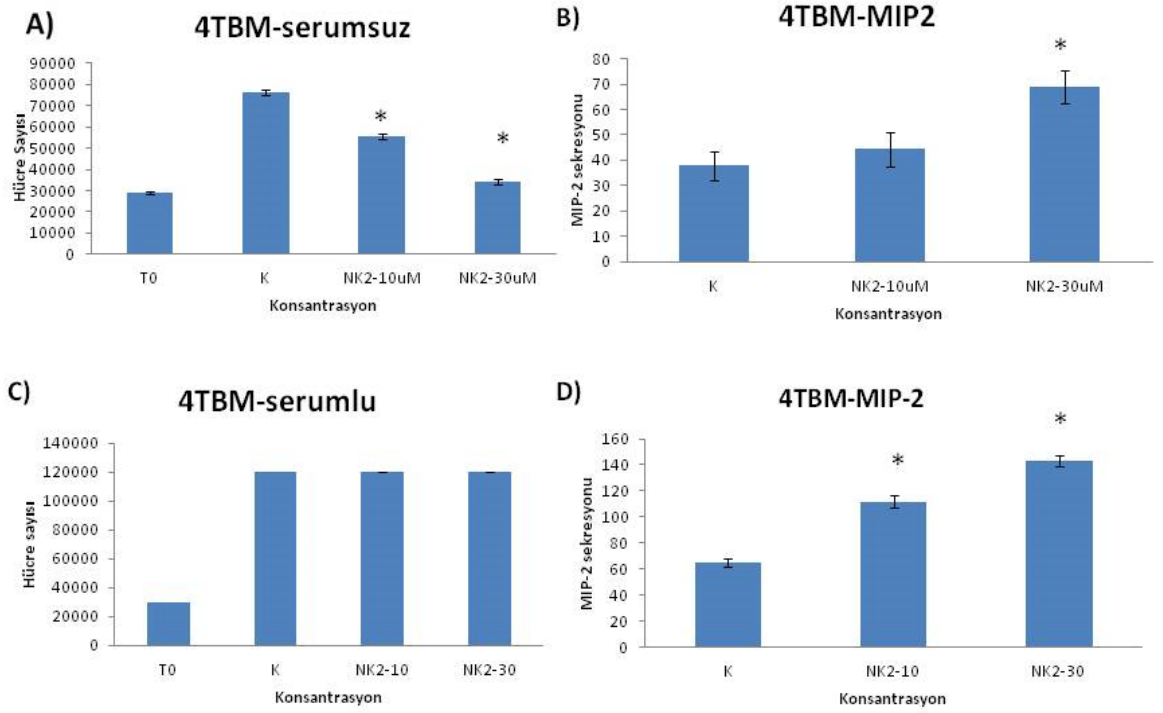
**Şekil 37.** 4THM hücre dizisinde NK1R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi. Olası etki 5% FBS varlığında ( Panel C ve D ) ve %0,2 FBS (Panel A ve B ) de verilmiştir. Proliferasyon sonuçları Panel A ve C , MIP-2 sekresyonu Panel B ve D'de gösterilmektedir. 30  $\mu$ M NK1R antagonisti her iki ortamda da hücre proliferasyonundan bağımsız olarak MIP-2'nin sekresyonunu inhibe etmiştir (\* $p < 0,05$ ). 10  $\mu$ M NK1R antagonisti 4THM hücre dizisinde MIP-2 sekresyonunu etkilememiştir.



### 4.3.1.3. NK2R Antagonistinin MIP-2 Sekresyonu Üzerine Etkisi

#### 4TBM Hücre Hattı

4TBM hücre dizisinde NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Uygulanan tedaviler hücre proliferasyonunu da etkilediği için MIP-2 sekresyonu üzerine olası etki 5% FBS içeren ve düşük serumlu (%0,2 FBS) ortamda hücre proliferasyonundaki değişiklikler ile birlikte değerlendirilmiştir. Serumlu ortamda tedavi grupları arasındaki proliferasyon farkı ortadan kalkmaktadır. Sonuçlara göre MIP-2 sekresyonu hücre proliferasyonundan bağımsız olarak NK2R antagonistinden etkilenmektedir. Her iki ortamda 30  $\mu$ M NK2R antagonisti 4TBM hücre dizisinde MIP-2'nin sekresyonunu arttırmaktadır. Düşük doz (10  $\mu$ M) NK2R antagonisti ise MIP-2 sekresyonunu serumlu ortamda arttırmaktadır (\*p<0,05). Serumsuz ortamda düşük doz NK2R antagonisti MIP-2 sekresyonunu etkilememektedir ( Şekil 38).

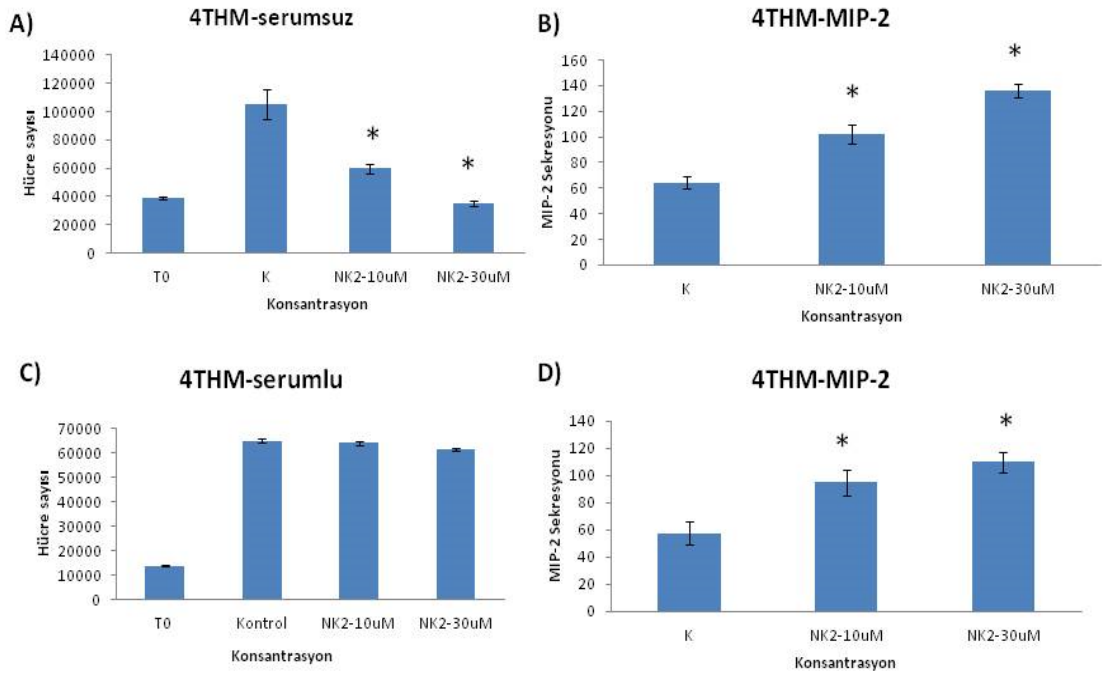


**Şekil 38.** 4TBM hücre dizisinde NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi. Olası etki 5% FBS varlığında ( Panel C ve D ) ve %0,2 FBS (Panel A ve B ) de verilmiştir. Proliferasyon sonuçları Panel A ve C , MIP-2 sekresyonu Panel B ve D'de gösterilmektedir. 30  $\mu$ M NK2R antagonisti her iki ortamda da hücre proliferasyonundan bağımsız olarak MIP-2'nin sekresyonunu arttırmıştır. 10  $\mu$ M NK2R antagonisti 4TBM hücre dizisinde MIP-2 sekresyonunu yalnızca serumlu ortamda arttırmaktadır(\*p<0,05) , serumsuz ortamda ise etkilememektedir.



#### 4THM Hücre Hattı

4THM hücre dizisinde NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Uygulanan tedaviler hücre proliferasyonunu da etkilediği için MIP-2 sekresyonu üzerine olası etki 5% FBS içeren ve düşük serumlu (%0,2 FBS) ortamda hücre proliferasyonundaki değişiklikler ile birlikte değerlendirilmiştir. Serumlu ortamda tedavi grupları arasındaki proliferasyon farkı ortadan kalkmaktadır. Sonuçlara göre MIP-2 sekresyonu hücre proliferasyonundan bağımsız olarak NK2R antagonistinden etkilenmektedir. Her iki ortamda da NK2R antagonisti (10 ve 30  $\mu$ M) 4THM hücre dizisinde MIP-2'nin sekresyonunu arttırmaktadır (Şekil 39) (\* $p$ <0,05).



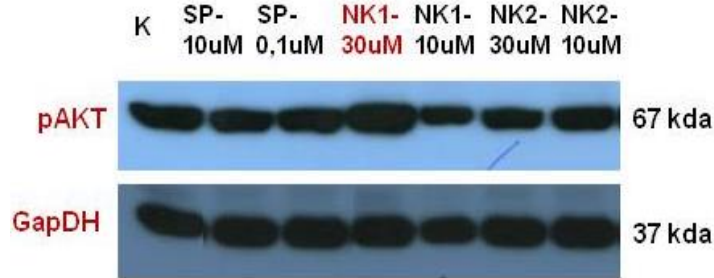
**Şekil 39.** 4THM hücre dizisinde NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) MIP-2 sekresyonu üzerine etkisi. Olası etki 5% FBS varlığında ( Panel C ve D ) ve %0,2 FBS (Panel A ve B ) de verilmiştir. Proliferasyon sonuçları Panel A ve C , MIP-2 sekresyonu Panel B ve D'de gösterilmektedir. 30 ve 10  $\mu$ M NK2R antagonisti her iki ortamda da hücre proliferasyonundan bağımsız olarak MIP-2'nin sekresyonunu arttırmıştır (\* $p$ <0,05).

#### 4.4. Western Blot Sonuçları

**4.4.1. Hücre içi sinyal yollarında rol alan Akt, Erk ve p38 proteinlerinin fosforilasyonları üzerine NK1R, NK2R antagonistlerinin ve SP'nin etkisi**  
4TBM, 4TLM, 4THM, 4T1 ve 67NR hücre dizilerinde kullanılan ajanların hücre proliferasyonları üzerindeki etkileri görüldükten sonra hangi yollar üzerinden bu etkilerin ortaya çıktığı araştırıldı. Bunun için hücre dizileri NK1R, NK2R antagonistleri ve SP ile muamele edildikten sonra hücre lizatları toplandı. Daha sonra hücre lizatlarından western blot yöntemi ile hücre içi sinyal yollarında rol alan proteinlerin (AKT, ERK ve P38) ekspresyonlarındaki değişiklikler belirlendi.

##### 4.4.1.1. 4TBM Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu

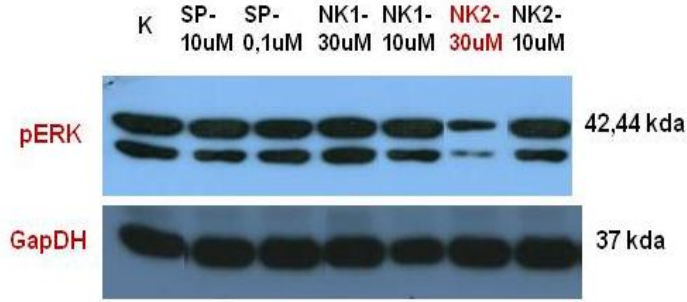
4TBM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) AKT fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre NK1R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda AKT fosforilasyonunu arttırmaktadır (Şekil 40).



**Şekil 40.** 4TBM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) AKT fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.2. 4TBM Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu

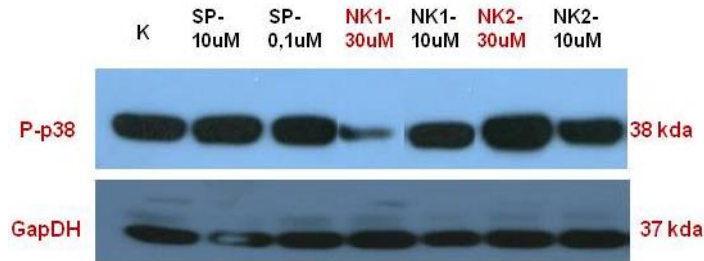
4TBM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre NK2R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda ERK fosforilasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 41).



**Şekil 41.** 4TBM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.3. 4TBM Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu

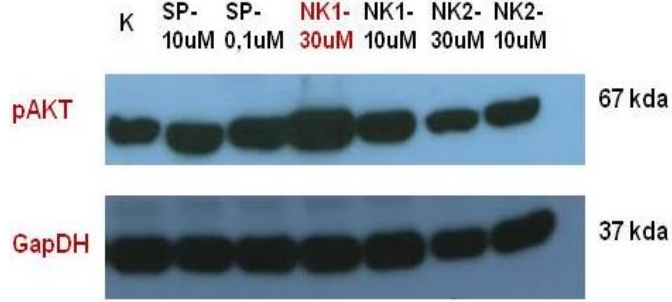
4TBM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) P38 fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre NK1R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda P38 fosforilasyonunu inhibe ederken 30  $\mu$ M NK2R antagonisti arttırmaktadır (Şekil 42).



**Şekil 42.** 4TBM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) P38 fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.4. 4TLM Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu

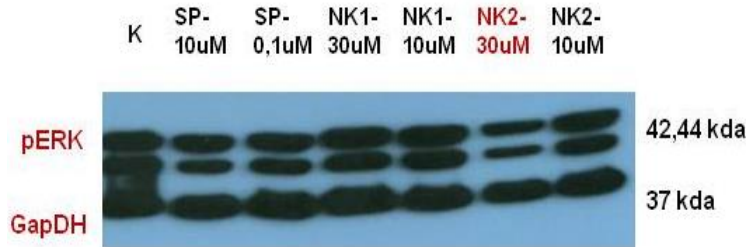
4TLM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) AKT fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre NK1R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda AKT fosforilasyonunu arttırmaktadır (Şekil 43).



**Şekil 43.** 4TLM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) AKT fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.5. 4TLM Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu

4TLM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre NK2R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda ERK fosforilasyonunu azaltmaktadır (Şekil 44).

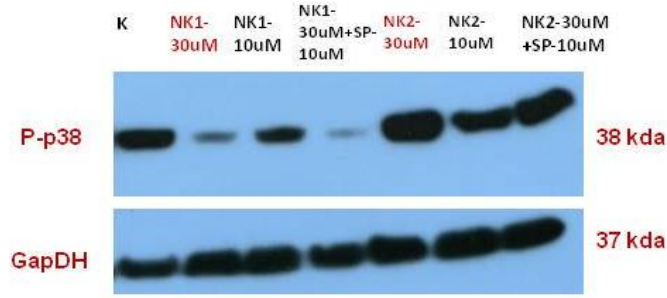


**Şekil 44.** 4TLM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.6. 4TLM Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu

4TLM hücre dizisinde, NK1R ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulamasının P38 fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi.

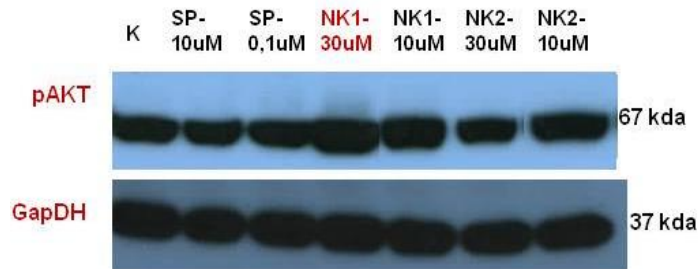
Buna göre ; P38 fosforilasyonunu 30  $\mu$ M NK1R antagonisti ve 10  $\mu$ M SP kombine uygulaması azaltırken ; 30  $\mu$ M NK2R antagonisti tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte arttırmaktadır (Şekil 45).



Şekil 45. 4TLM hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ve SP(10  $\mu$ M) ile kombine tedavilerinin P38 fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.7. 4THM Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu

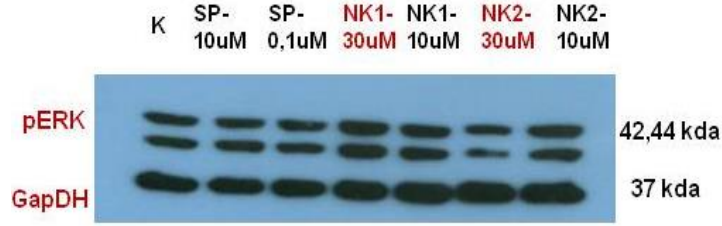
4THM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) AKT fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre NK1R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda AKT fosforilasyonunu arttırmaktadır (Şekil 46).



Şekil 46. 4THM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) AKT fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.8. 4THM Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu

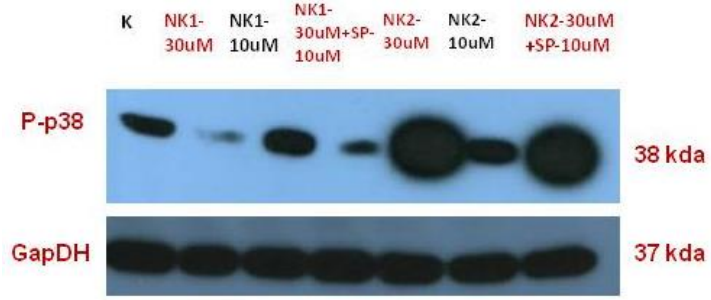
4THM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M)' nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre , ERK fosforilasyonunu 30  $\mu$ M NK1R antagonisti arttırken; NK2R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda azaltmaktadır (Şekil 47).



Şekil 47. 4THM hücre dizisinde SP (10 ve 0,1  $\mu$ M) nin, NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.9. 4THM Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu

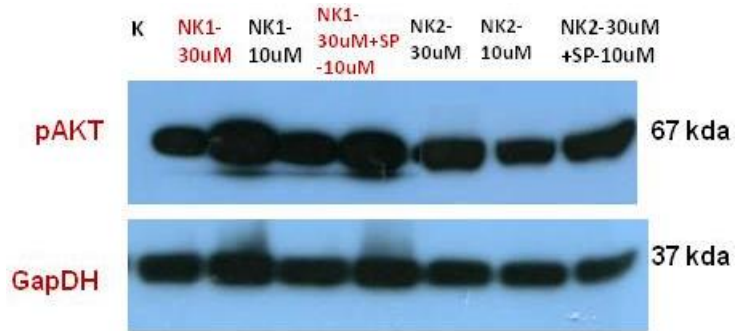
4THM hücre dizisinde, NK1R ve NK2R antagonistinin (10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulamasının P38 fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre ; P38 fosforilasyonunu 30  $\mu$ M NK1R antagonisti ve 10  $\mu$ M SP kombine uygulaması azaltırken ; 30  $\mu$ M NK2R antagonisti tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte arttırmaktadır (Şekil 48).



**Şekil 48.** 4THM hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ve SP(10  $\mu$ M) ile kombine tedavilerinin P38 fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.10. 4T1 Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu

4T1 hücre dizisinde NK1R ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulamasının AKT fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre ; AKT fosforilasyonunu 30  $\mu$ M NK1R antagonisti tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulaması arttırmaktadır (Şekil 48).

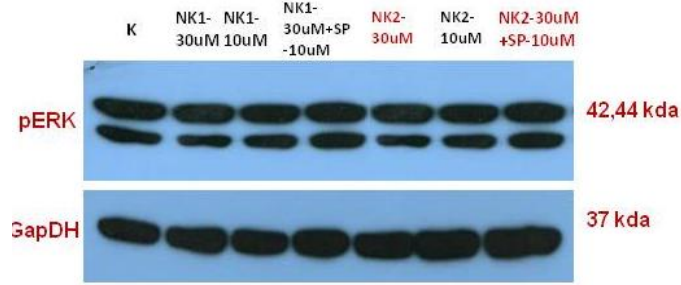


**Şekil 49.** 4T1 hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ve SP(10  $\mu$ M) ile kombine tedavilerinin AKT fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.



#### 4.4.1.11. 4T1 Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu

4T1 hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) tek başına ve SP ile birlikte uygulamasının ERK fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre , Ajanlar ERK fosforilasyonunun etkilemedi (Şekil 50).

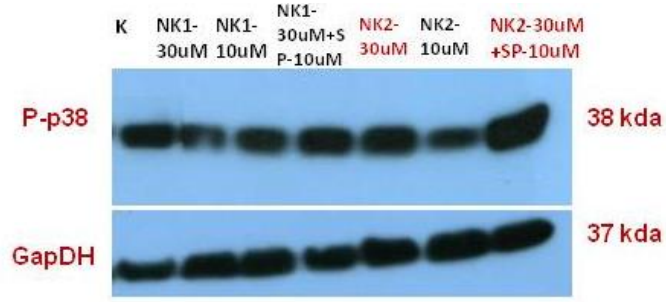


**Şekil 50.** 4T1 hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ve SP(10  $\mu$ M) ile kombine tedavilerinin ERK fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.12. 4T1 Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu

4T1 hücre dizisinde, NK1R ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulamasının P38 fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre ; P38 fosforilasyonuna 30  $\mu$ M NK1R antagonisti ve 10  $\mu$ M SP kombine uygulamasının herhangi bir etkisi olmazken ; 30  $\mu$ M NK2R antagonisti tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte arttırmaktadır (Şekil 51).

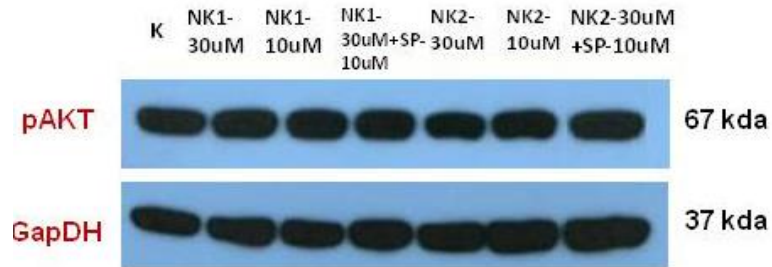




**Şekil 51.** 4T1 hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ve SP(10  $\mu$ M) ile kombine tedavilerinin P38 fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.13. 67NR Hücre Hattında AKT Fosforilasyonu

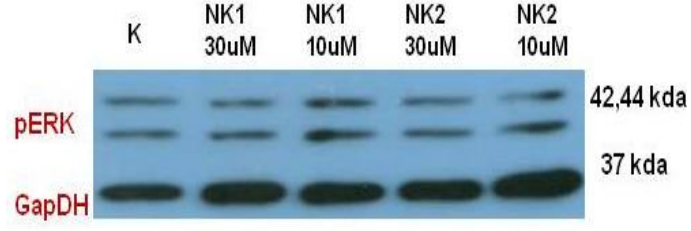
67NR hücre dizisinde NK1R ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) tek başına ve 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulamasının AKT fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre ; metastatik olmayan meme kanseri hücre dizisi 67NR'de AKT fosforilasyonu uygulamalardan etkilenmedi (Şekil 52).



**Şekil 52.** 67NR hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ve SP(10  $\mu$ M) ile kombine tedavilerinin AKT fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.14. 67NR Hücre Hattında ERK Fosforilasyonu

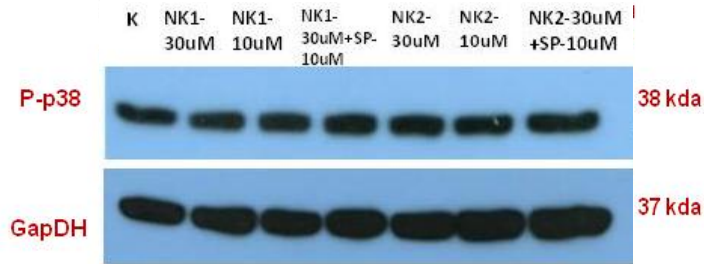
67NR hücre dizisinde NK1R ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre ; ERK fosforilasyonu uygulamalara bağlı olarak değişmedi (Şekil 53).



**Şekil 53.** 67NR hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) ERK fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

#### 4.4.1.15. 67NR Hücre Hattında P38 Fosforilasyonu

67NR hücre dizisinde, NK1R ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) P38 fosforilasyonu üzerine etkisi tayin edildi. Buna göre ; P38 fosforilasyonu uygulamalara bağlı olarak değişmedi (Şekil 54).



**Şekil 54.** 67NR hücre dizisinde NK1R antagonistinin ve NK2R antagonistinin ( 10 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonda) P38 fosforilasyonu üzerine etkisi. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Kadınlarda önemli bir sağlık problemi olan meme kanseri erken teşhis edilemediğinde, tedavi seçeneklerinin sınırlılığında dolayı ölümcül olmaktadır. Meme kanserine bağlı mortalitenin en önemli sebebi uzak metastazlara bağlı yaşamsal fonksiyonların bozulmasıdır [104]. Meme kanserinin sık metastaz yaptığı organlar kemik, karaciğer, akciğer ve beyindir.

Substance P'nin kanser gelişimi üzerindeki etkisi ise tam olarak bilinmemektedir. Çalışmaların bir kısmı Substance P'nin tümör gelişimini indüklediği yönüdeyken diğer çalışmalar tersini göstermektedir [4-5, 8-10, 105]. Bu durum hem kanser patogeneğinde farklı mekanizmaların farklı zamanlarda ve farklı şartlarda ortaya çıkmasına hem de kanserin heterojen yapısına bağlı olabilir. Ayrıca kanserin tipi ve kullanılan modeller de sonuçlar arasındaki farklılıkları açıklayabilir. Bu konunun netleşebilmesi için Substance P reseptörleri olan NK1 ve NK2 reseptörlerine spesifik antagonistlerinin farklı modellerde etkilerinin ayrıntılı çalışılması gerekmektedir. Bildiğimiz kadarıyla spesifik NK1R ve NK2R antagonistleri kullanılarak meme kanseri metastazı üzerinde yapılmış çalışma yok denecek kadar azdır.

Bu çalışmada, SP ve antagonistlerinin rolleri meme kanserinde sık görülen metastaz modelleri üzerinde *in-vitro* ayrıntılı deneylerde ilk defa araştırılmıştır. Ayrıca *in-vitro* deneyler metastatik olmayan meme kanseri hücre hattı (67NR) kullanılarak gözlenen etkilerin hücre agresifliğiyle ilişkisi araştırılmıştır. Hücre proliferasyonu üzerine etkileri ile birlikte hücre büyümesi ve çoğalmasına aracılık eden moleküler mekanizmalardaki değişiklikleri ve bunlara bağlı olarak anjiyojenik etkisi ile metastaza aracılık ettiği bilinen maktofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) sekresyonundaki etkiler araştırılmıştır.

Önceki bilgilerle uyumlu olarak kullandığımız meme kanseri hücre dizilerinde NK1R ve NK2R'ün eksprese olduğu ama reseptör ekspresyonunun metastatik hücrelerde metastatik olmayan hücrelere göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Substans P'nin NK1R ve NK2R'leri üzerinden mitojenik etki gösterdiği öne sürülmektedir [8]. Bu olasılığı araştırmak için SP ve SP-metil esterin ( seçici NK1R agonisti) 0,001 µM- 10µM konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre SP hücre proliferasyonunu etkilemediği gibi, AKT, ERK ve p38 fosforilasyonunu da etkilememiştir. Dolayısıyla SP'nin direkt mitojenik etkisi metastatik meme kanseri hücrelerinde bulunmamaktadır. Bu durum kısmen literatürle çelişmektedir. Diğer taraftan NK1R antagonisti yüksek konsantrasyonlarda (30µM) hücre proliferasyonunu tamamen baskıladı ve kısmen sitotoksik etki gösterdi. Bu etki özellikle metastatik olan 4T1, 4THM, 4TLM ve 4TBM hücrelerinde belirgindi ve bu hücreler arasında etki birbirine benzer bulundu. İlginç olarak NK1R'nün 45kDa alt ünitesinin metastatik hücrelere göre çok daha az eksprese edildiği 67NR hücrelerinde NK1R antagonistinin inhibitör etkisi çok daha az olmuştur (%100 inhibisyona karşın %35 düzeyinde inhibisyon).

İlginç olarak NK1R antagonistinin etkisi hücrelerin önemli bir kısmında SP ile geriye dönmemiştir. Bu durum NK1R antagonisti ile SP'nin reseptör üzerinde bağlanma yerlerinin farklı olabileceğini ve tümör hücrelerinde NK1R'nün antagonistlerinin daha fazla etkisi olduğunu işaret etmektedir. Farklı bir NK1 antagonistine (L-733, 060) kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre dizilerinde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [85] ve sonuçlarımız bu bulgularla uyumludur. Günümüzde tümör hücrelerinde apoptozisi indükleyen mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Ancak NK1 reseptör antagonistleri hem DNA sentezini hem de MAPK yolağı aracılığı ile hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir [106-108]. Bizim hücrelerimizde MAPK yolağında yer alan ERK1/2 aktivasyonunda bir değişiklik olmadı. İlginç olarak NK1R antagonisti AKT aktivasyonunu arttırdı. Bu durum kronik antagonist kullanımında anti-proliferatif etkiye karşı direnç gelişeceğini göstermektedir.

NK2R antagonisti (GR159897)'nin *in-vitro* anti-tümöral etkileri NK1R antagonistine göre daha az bulunmuştur. Diğer taraftan NK1R antagonisti ile olduğu gibi NK2R antagonistine de en dirençli hücre, reseptörü en az eksprese eden 67NR hücreleri olmuştur. İlginç olarak NK2R yoğunluğu diğer metastatik hücrelerden az olmayan 4TBM hücreleri de NK2R antagonistinin anti-proliferatif etkilerine kısmen dirençli bulunmuştur. Bu durum NK2R'nün etkilerinin hücre alt tiplerine göre farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. NK2R antagonisti 30µM'da ERK fosforilasyonunu 4TBM, 4TLM ve 4THM'de azalttı. Bu durum NK2R antagonistinin anti-proliferatif etkilerinde MAPK yolağının yer alabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan 30µM NK2R antagonisti P38 fosforilasyonunu arttırmıştır.

Tümör gelişimi ve yayılımında tümör hücresi kadar tümörü çevreleyen hücrelerle etkileşimi (mikroçevre) de rol oynamaktadır. Substance P'yi de içeren Tachykinin ailesi nöropeptitler, tümör mikroçevresinde yer alan makrofajlar, endotel hücreleri ve epitelyum tarafından sentezlenmektedir [63]. İnsan tachykininleri TAC1, TAC3, ve TAC4 genleri tarafından kodlanmakta ve SP, neurokinin A, ve neurokinin B peptidlerini içermektedir. Substance P yara iyileşmesinden ağrı duyumu ve akut inflamasyona uzanan pek çok önemli fizyolojik düzenlemede yer almaktadır [60-61]. Bu peptitler sırasıyla G-protein ile eşleşen (G Protein Coupled Receptors), NK1, NK2, ve NK3 tachykinin reseptörlerini aktive etmektedirler [63]. NK1 ve NK2 reseptörlerinin insan meme kanseri hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir [67, 109]. Ayrıca NK1R eksprese etmeyen tümörlerin hepsinin peritümöral damar yapılarında NK1R ekspresyonu gözlenmiştir[84]. SP'nin damar gelişimini ve endotel proliferasyonunu arttırdığı göz önüne alındığında NK1R antagonistlerinin anti-anjiogenik etki gösterebileceği düşünülmektedir [72]. Ayrıca NK1R aktivasyonunun hücrelerin malign transformasyonunda rol oynadığı ve kemik metastazını arttırdığı düşünülmektedir [67, 85]. NK-1 antagonisti L-733, 060'ün kemoterapiye dirençli meme kanseri hücre dizilerinde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [85]. Bu sonuçlarla uyumlu olarak NK1R antagonisti 30µM NK1R antagonisti ile anjiogenik ve inflamatuvar bir kemokin olan MIP-2 [102] sekresyonunu anlamlı olarak azalttı.

Diğer taraftan SP'nin daha düşük afinite ile bağlandığı NK2R'ün inhibisyonu MIP-2 sekresyonunda önemli bir artışa neden oldu. MIP-2 sekresyonundaki bu artış sitokin salınımlarında rol oynadığı bilinen P38' fosforilasyonundaki artış ile ilişkili olabilir.

Literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak bu çalışmada da NK1 ve NK2 reseptör antagonistleri hücre proliferasyonunu belirgin olarak inhibe etmiştir. Fakat NK1R antagonisti anti-apoptotik etki gösteren AKT aktivasyonuna neden olmuştur. Ayrıca NK2 reseptör antagonistleri ile metastaza aracılık eden anjiyogenez tetiklediği bilinen MIP-2, meme kanserinin beyine ve kalbe metastaz yapan hücre dizilerinde belirgin olarak artmıştır. Bu bulgular NK1 ve NK2R antagonistlerinin terapötik etkinliğini sınırlar niteliktedir.

Dolayısıyla önceki çalışmalar ve buradan elde edilen sonuçlar Substans P ve reseptörlerinin kanser patogeneziindeki rolünün tek bir yöne çekilemeyeceğini ve kanserin fenotipine, mikroçevre ile etkileşimine, oluşturduğu immün yanıtı göre Substans P ve antagonistlerinin etkisinin farklı olacağını göstermektedir. Her ne kadar literatürden birden fazla derlemede NK1R ve NK2R antagonistlerinin kanser

tedavisinde kullanılabileceklerine dair bilgiler bulunsa da, kanser tedavisinde, hangi durumlarda ve hangi süre ile bu antagonistlerin kullanılabileceğinin belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, farklı organlara metastaz yapmış fare meme kanser hücrelerinin proliferasyonları üzerine Subtans p ve antagonistlerinin etkisi, bununla birlikte ortaya çıkan sitotoksik etkilerin altında yatan sebepler, moleküler düzeyde araştırılmıştır. Bunun için, hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenleyen hücre içi sinyal yollarında rol oynayan proteinlerin fosforilasyonlarında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca Substance p reseptörlerinin fare meme kanserinin beyine metastazı 4TBM ve kalbe metastazı 4THM hücre dizilerinde anjiyojenik bir faktör olan MIP-2 sekresyonu üzerine etkileri tayin edilmiştir. Sonuç olarak ;

**1.** Metastatik ve metastatik olmayan hücre dizilerinde NK1R ve NK2R eksprese olmaktadır. Ancak reseptörlerin ekspresyonu metastatik hücrelerde ve beyin dokusunda metastatik olmayan hücrelere göre daha yüksektir. Bu durum, tümörün ileri safhasında metastatik nitelikler edinmesiyle reseptör ekspresyonlarındaki artış arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir.

**2.** SP ve SP-metil esterin ( seçici NK1R agonisti) 10 $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 0,01 ve 0,001  $\mu$ M, konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etki görülmediği gibi, AKT, ERK ve p38 fosforilasyonunu da etkilemedi.

**3.** NK1R antagonisti 30  $\mu$ M konsantrasyonda, metastatik hücre dizileri 4TBM , 4TLM, 4THM ve 4T1 'de sitotoksik etki göstermiştir ve bu etki 4TBM, 4TLM ve 4THM'de 10  $\mu$ M SP ile birlikte uygulandığında geriye dönmemiştir. Ancak 4T1 hücre dizisinde kombine tedavi ile sitotoksik etki görülmemiştir, ancak proliferasyon baskılanmıştır (%70). 67NR hücre dizisinin proliferasyonu da anlamlı olarak baskılanmıştır fakat sitotoksik etki görülmemiştir. Metastatik hücre dizileri üzerinde 30  $\mu$ M NK1R antagonisti ve SP 10 $\mu$ M ile birlikte uygulaması sitotoksik etki gösterirken ; metastatik olmayan 67NR hücre dizisinde bu etki görülmemektedir. Düşük doz (10  $\mu$ M) NK1R antagonistinin hücre proliferasyonu üzerine inhibisyon etkisi %0 -%20 olarak hesaplanmıştır.

**4.** NK2R antagonisti (30 $\mu$ M) metastatik hücre dizilerinde (4TBM , 4TLM, 4THM ve 4T1) ve metastatik olmayan 67NR'de proliferasyonu anlamlı olarak azaltmıştır. Ancak bu etki NK2 reseptörün daha fazla eksprese edildiği metastatik hücre

dizilerinde daha fazladır. NK2R antagonisti düşük konsantrasyonda (10  $\mu$ M) 4T1 hücre dizisinin proliferasyonunu belirgin olarak (% 65) inhibe ederken; 4TBM ve 67NR hücre hatlarında %5, 4TLM 'de % 25, 4THM'de %40 olarak hesaplanmıştır. 30  $\mu$ M NK2R ile birlikte 10 $\mu$ M SP uygulandığında ise 4TBM, 4TLM ve 4THM'de etki kısmen geriye dönmüştür. 4T1 ve 67NR hücre dizilerinde 10 $\mu$ M SP ile birlikte uygulaması, 30  $\mu$ M NK2R antagonistinin etkisini tersine çevirmemektedir.

**5.** 30  $\mu$ M NK1R antagonisti, 4TBM ve 4THM hücre dizisinde hem serumlu hem de serumsuz ortamda MIP-2 sekresyonunu azaltmıştır. Bu etki hücre proliferasyonundan bağımsızdır. 10 $\mu$ M NK1R antagonistinin etkisi görülmemiştir. NK2R antagonisti ise 30  $\mu$ M konsantrasyonda serumlu ve serumsuz ortamda her iki hücre dizisinde MIP-2 sekresyonunu arttırmaktadır. Bu etki hücre proliferasyonundan bağımsızdır. Düşük dozda (10  $\mu$ M) NK2R antagonisti 4TBM'de MIP-2 sekresyonunu etkilemez iken, 4THM'de anlamlı olarak arttırmıştır.

**6.** Hücre içi sinyal yolları proteinleri AKT, ERK ve P38'in fosforilasyonunu SP ve antagonistleri 67NR hücre dizisinde etkilemedi. Aksine metastatik meme kanseri hücre dizileri 4TBM, 4TLM, 4THM ve 4T1 'de 30 $\mu$ M NK1R antagonisti AKT fosforilasyonunu belirgin olarak arttırmıştır. NK2R antagonisti 30 $\mu$ M'da ERK fosforilasyonunu metastatik hücre dizilerinde azaltmıştır. Aynı zamanda P38 fosforilasyonunu NK2R antagonisti 30 $\mu$ M'da metastatik hücre dizilerinde arttırmıştır ve bu etki 10 $\mu$ M SP ile değişmemiştir. 30  $\mu$ M NK1R antagonisti ise P38 fosforilasyonu 4TBM, 4TLM ve 4THM'de belirgin olarak azaltmıştır.



## KAYNAKLAR

1. Rabbani, S.A. and A.P. Mazar, Evaluating distant metastases in breast cancer: from biology to outcomes. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. 26(3-4): p. 663-74.
2. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 2011. 147(2): p. 275-92.
3. Ding, L., et al., Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*, 2010. 464(7291): p. 999-1005.
4. Erin, N., et al., Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. *Anticancer Res*, 2004. 24(2B): p. 1003-9.
5. Erin, N., et al., Capsaicin-induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 99(3): p. 351-64.
6. Erin, N., et al., Vagotomy enhances experimental metastases of 4THMpc breast cancer cells and alters substance P level. *Regul Pept*, 2008. 151(1-3): p. 35-42.
7. Erin, N., et al., Activation of vagus nerve by semapimod alters substance P levels and decreases breast cancer metastasis. *Regul Pept*, 2012. 179(1-3): p. 101-8.
8. Esteban, F., et al., A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(1): p. 137-45.
9. Korcum, A.F., et al., Radiotherapy-induced decreases in substance P levels may potentiate melanoma growth. *Mol Med Rep*, 2009. 2(2): p. 319-26.
10. David, S., et al., Aberrant silencing of the endocrine peptide gene tachykinin-1 in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 378(3): p. 605-9.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
12. Ponder, B.A., Cancer genetics. *Nature*, 2001. 411(6835): p. 336-41.
13. Chiang, A.C. and J. Massague, Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*, 2008. 359(26): p. 2814-23.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
15. Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P., *Molecular Biology of the Cell* 5. 2008, New York.
16. Doğan AL, G.D., Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. . *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004. 35: p. 34-42.
17. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001. 411(6835): p. 355-65.
18. Manning, G., et al., The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1912-34.

19. Pawson, T., M. Raina, and P. Nash, Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett*, 2002. 513(1): p. 2-10.
20. Pawson, T., Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*, 2002. 38 Suppl 5: p. S3-10.
21. Jones, R.J., V.G. Brunton, and M.C. Frame, Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer*, 2000. 36(13 Spec No): p. 1595-606.
22. Frame, M.C., Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1602(2): p. 114-30.
23. Liem, A.A., et al., The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *Eur J Surg Oncol*, 2002. 28(6): p. 679-84.
24. Plataniias, L.C., Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, 2003. 101(12): p. 4667-79.
25. Kolch, W., Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 2000. 351 Pt 2: p. 289-305.
26. Lee JT, M.J., The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, 2002. 16 p. 486-507.
27. Karp JE, L.J., Kaukmann SH, et al. , Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001. 97: p. 3361-9.
28. Blalock WL, N.P., Steelman LS, et al. , Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia* 2003. 17: p. 1058-67.
29. Chang, F., et al., Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 2003. 17(3): p. 590-603.
30. Staal, S.P., Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(14): p. 5034-7.
31. Viglietto G, M.M., Bruni P, et al. , Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002. 8: p. 1136-44.
32. Shin I, Y.M., Rojo F, et al. , PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*, 2002. 8: p. 1145-52.
33. Liang J, Z.J., Petrocelli T, et al., PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27- mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002. 8: p. 1153-60.
34. Steeg, P.S., Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 2006. 12(8): p. 895-904.
35. Fidler, I.J., The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 453-8.
36. Francia, G., et al., Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 2011. 11(2): p. 135-41.

37. Eckhardt, B.L., et al., Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. 11(6): p. 479-97.
38. Norton, L., Use of dose-dense chemotherapy in the management of breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2006. 4(1): p. 36-7.
39. Beenken SW, W.F., Bland K, History of the therapy of breast cancer in *The Breast*. 2004: Elsevier. 5-18.
40. Kalaycı G, A.K., Demirkol K, Ertekin C, Kalaycı G, Acarlı K, Demirkol K, Ertekin C, *Meme hastalıkları ve tarihçe*. 2002: Nobel.
41. Sanders, P., Crisis and Controversy: Historical Patterns in Breast Cancer Surgery *CBMH/BCHM* 1991: p. 77-99.
42. Winchester, D.J., Hudis, C.A., Norton, L., *Breast Cancer*. 2006: p. 1-14.
43. Habel, L.A., et al., A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*, 2006. 8(3): p. R25.
44. Eser, Meme Kanserinde Prognostik Faktörlerin Hastalık Tekrarı ve Hastalısız Yaşam Üzerine Etkisi, in *Genel Cerrahi ABD*. 2003, Akdeniz Üniversitesi Antalya.
45. Singletary, S.E., Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*, 2003. 237(4): p. 474-82.
46. Ozmen, V., et al., Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. *World J Surg Oncol*, 2009. 7: p. 37.
47. Kenemans, P., R.A. Verstraeten, and R.H. Verheijen, Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 2004. 49(1): p. 34-43.
48. Muller, A., et al., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001. 410(6824): p. 50-6.
49. Wang, J., R. Loberg, and R.S. Taichman, The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(4): p. 573-87.
50. Maraveyas, A., et al., Malignant melanoma as a target malignancy for the study of the anti-metastatic properties of the heparins. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(4): p. 777-84.
51. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(4): p. 274-84.
52. Massague, J., New concepts in tissue-specific metastases. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2003. 1(10): p. 576-7.
53. Lorusso, G. and C. Ruegg, New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2012. 22(3): p. 226-33.
54. Kaplan, R.N., et al., VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005. 438(7069): p. 820-7.
55. Kaplan, R.N., B. Psaila, and D. Lyden, Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(4): p. 521-9.
56. Hiratsuka, S., et al., Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(12): p. 1369-75.

57. Rafii, S. and D. Lyden, S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(12): p. 1321-3.
58. Peinado, H., S. Lavotshkin, and D. Lyden, The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*, 2011. 21(2): p. 139-46.
59. Chu, J.E. and A.L. Allan, The Role of Cancer Stem Cells in the Organ Tropism of Breast Cancer Metastasis: A Mechanistic Balance between the "Seed" and the "Soil"? *Int J Breast Cancer*, 2012. 2012: p. 209748.
60. Eglezos, A., Modulation of the immune response by tachykinins'. *Immunol Cell Biol* 1991. 69 (Pt 4): p. 285-294.
61. Pernow, B., 'Substance P. *Pharmacol Rev*, 1983. . 35, : p. 85-141.
62. Munoz, M., M. Rosso, and R. Covenas, The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*, 2011. 12(6): p. 909-21.
63. Palma, C., Tachykinins and their receptors in human malignancies. *Curr Drug Targets*, 2006. 7: p. 1043-1052.
64. Castro, T.A., M.C. Cohen, and P. Rameshwar, The expression of neurokinin-1 and preprotachykinin-1 in breast cancer cells depends on the relative degree of invasive and metastatic potential. *Clin Exp Metastasis*, 2005. 22(8): p. 621-8.
65. G. Rao, P.S.P., S. P. Idler et al., Facilitating role of preprotachykinin-I gene in the integration of breast cancer cells within the stromal compartment of the bone marrow: a model of early cancer progression," *Cancer Research*, vol. . 2004. no. 8: p. 2874-2881.
66. A. S. Singh, "Oncogenic and metastatic properties of preprotachykinin-I and neurokinin-1 genes," *Vascular Pharmacology*, 2006. vol. 45: p. no. 4, pp. 235-242,.
67. Singh, D., et al., Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(1): p. 388-93.
68. V. Almendro, S.G.1.-R., and P. Gasc ´ on,, Tyrosine kinase receptor transactivation associated to G proteincoupled receptors *Current Drug Targets*, 2010. 11: p. 1169-1180.
69. I. Castagliuolo, L.V., J. Liu, and C. Pothoulakis,, "Epidermal growth factor receptor transactivation mediates substance P-induced mitogenic responses in U-373 MG cells," *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275: p. 34, pp.26545-26550.
70. H.W.Koon, D.Z., X.Na,M. P.Moyer, andC.Pothoulakis,, "Metalloproteinases and transforming growth factor- $\alpha$  mediate substance p-induced mitogen-activated protein kinase activation and proliferation in human colonocytes., *Journal of Biological Chemistry* 2004. 279: p. 44, 45519-45527.
71. C. J. Wiedermann, B.A., B. Sitte, N. Reinisch, P. Schratzberger, and and C. M. K ¨ ahler, "Induction of endothelial cell differentiation into capillary-like structures by substance P" *European Journal of Pharmacology*, , 1996. 298: p. no. 3, pp. 335-338, 1996.
72. Ziche, M., et al., Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, 1990. 40(2): p. 264-78.

73. M. Rosso, M.J.R.-F.i., R. Coveñas, M. V. Salinas- and a.M.M.n. Martín, The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumor Biology*, 2008. 29,: p. no. 4, pp. 245-254.
74. S. Schulz, R.S., C. Röcken, C. Mawrin, and S. Schulz,, “Immunolocalization of full-length NK-1 tachykinin receptors in human tumors,” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*,, 2006. vol. 54, : p. no. 9, pp. 1015-1020, 2006.
75. M. Muñoz, M.R., A. Pérez et al.,. Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines,”. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, , 2005. vol. 46, : p. no. 7, pp. 2567-2570, 2005.
76. D. G. Payan, J.P.M., and M. L. Organist, “, Binding characteristics and affinity labeling of protein constituents of the human IM-9 lymphoblast receptor for substance P,” *Journal of Biological Chemistry*, 1986. vol. 261: p. 4321-14329
77. C. J. Fowler and G. Brannstrom, “Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 1994. vol. 16: p. 21-28.
78. I. M. Hennig, J.A.L., U. Horisberger, and J. C.Reubi, “, Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization,”. *International Journal of Cancer*, , 1995. vol. 61, : p. no. 6, pp. 786-792, 1995.
79. Y. C.Ma, J.H., S. Ali, W. Lowry, and X. Y. Huang, “,” Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*, 2000. vol. 102 p. 635-646.
80. S. Horstmann, P.J.K., and G. D. Borasio,, Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 1998. vol. 52,: p. 483-490
81. Z. Xia, M.D., J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. and Greenberg, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 1995. vol. 270, : p. 1326-1331.
82. Muñoz, M., M. Rosso, and R. Covenas, A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*, 2010. 17(6): p. 504-16.
83. M.Muñoz, A.P.e., M. Rosso, C. Zamarriego, and R. Rosso,, Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Research*, 2004. 14: p. 183–188.
84. Hennig, I.M., et al., Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*, 1995. 61(6): p. 786-92.
85. Mayordomo, C., et al., Targeting of substance P induces cancer cell death and decreases the steady state of EGFR and Her2. *J Cell Physiol*, 2012. 227(4): p. 1358-66.
86. Palma, C., et al., Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer*, 2000. 82(2): p. 480-7.
87. Bigioni, M., et al., Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs*, 2005. 16(10): p. 1083-9.
88. Prasad, S., et al., Substance P analogs containing alpha,alpha-dialkylated amino acids with potent anticancer activity. *J Pept Sci*, 2007. 13(8): p. 544-8.

89. Levite, M., Nerve-driven immunity. The direct effects of neurotransmitters on T-cell function. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 917: p. 307-21.
90. Blum, A., et al., Interleukin-12 (IL-12) and IL-23 induction of substance p synthesis in murine T cells and macrophages is subject to IL-10 and transforming growth factor beta regulation. *Infect Immun*, 2008. 76(8): p. 3651-6.
91. Fuertes, M.B., et al., Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *J Exp Med*, 2011. 208(10): p. 2005-16.
92. Janelsins, B.M., et al., Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood*, 2009. 113(13): p. 3017-26.
93. Kitamura, H., Kobayashi, M., Wakita, D., Nishimura, T., , Neuropeptide signaling activates dendritic cell-mediated type 1 immune responses through neurokinin-2 receptor *J Immunol*, 2012. 18: p. 4200-4208.
94. Steinman, R., Banchereau, J., , Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 2007. 449: p. 419-426.
95. Hokey, D.A., et al., Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity. *Cancer Res*, 2005. 65(21): p. 10059-67.
96. Chi, K.H., et al., Combination of conformal radiotherapy and intratumoral injection of adoptive dendritic cell immunotherapy in refractory hepatoma. *J Immunother*, 2005. 28(2): p. 129-35.
97. Cacalano, G., et al., Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science*, 1994. 265(5172): p. 682-4.
98. Dhawan, P. and A. Richmond, Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol*, 2002. 72(1): p. 9-18.
99. Bordoni, R., et al., Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA) in the growth of normal melanocytes, nevocytes, and malignant melanocytes. *J Cell Biochem*, 1990. 44(4): p. 207-19.
100. Acharyya S, O.T., Vanharanta S, Malladi S, Kim J., M.-T.K. Morris PG, Leversha M, Hogg N, Seshan, and N.L. VE, Brogi E, Massague J, CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* (2012). 150: p. 165–178.
101. Scapini P, M.M., Tecchio C, Minghelli S, Di CE, Tanghetti and A.A. E, Lowell C, Berton G, Noonan DM, Cassatella MA, CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol* 2004. 172: p. 5034-5040.
102. Erin, N., Nizam, E., Tanriover, G., Koksoy, S., Autocrine control of MIP-2 secretion from metastatic breast cancer cells is mediated by CXCR2: a mechanism for possible resistance to CXCR2 antagonists. *Breast Cancer Research Treatment*, 2015. 150: p. 57–69.
103. Erin, N., et al., Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. 139(3): p. 677-89.
104. Hortobagyi, G.N., et al., The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*, 2005. 6(5): p. 391-401.

105. Erin, N., Activation of vagus nerve by semapimod alters substance P levels and decreases breast cancer metastasis. *Regul Pept*, 2012. 179: p. 101-108.
106. Munoz M, R.M., Covenas R., The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*, 2011. 12: p. 909-21.
107. Akazawa T, K.S., Goldsmith LE, and e. al., A constitutively active form of neurokinin 1 receptor and neurokinin 1 receptor-mediated apoptosis in glioblastomas. *J Neurochem* 2009. 109: p. 1079-86.
108. DeFea KA, V.Z., O'Bryan EM, and e. al., The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97: p. 11086-91.
109. Reddy, B., RE-1-silencing transcription factor shows tumor-suppressor functions and negatively regulates the oncogenic TAC1 in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106: p. 4408-4413.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Esra NİZAM 1989 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Dumlupınar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2011-2012 yıllarında Dumlupınar Üniversitesi Eğitim Fakültesi’nden Pedagojik Fomasyon Sertifikasını aldı. 2013 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı.