

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİG1R UPREGÜLASYONU-DOWNREGÜLASYONUNDA
TIC10/ONC201'İN MDA-MB-231 ve MCF-7 MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA nNaV1.5 ve aNaV1.5 ÜZERİNE ETKİSİ

Doktora Tezi

Tarık MECİT

Danışman
Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

2.Danışman
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Kars-2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİG1R UPREGÜLASYONU-DOWNREGÜLASYONUNDA
TIC10/ONC201'İN MDA-MB-231 ve MCF-7 MEME KANSERİ
HÜCRE HATLARINDA nNaV1.5 ve aNaV1.5 ÜZERİNE ETKİSİ**

Doktora Tezi

Tarık MECİT

**Danışman
Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU**

**2.Danışman
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Kars-2022

**Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir. Proje
No: 2020-TS-16**

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora programı çerçevesinde Tarık MECİT tarafından hazırlanmış olan “Sig1r Upregülasyonu-Downregülasyonunda TIC10/ONC201’in MDA-MB-231 ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatlarında nNaV1.5 ve aNaV1.5 Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca oy ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.02.2022

Adı Soyadı

İmza

Prof. Dr. Erdal MATUR

Prof. Dr. Doğan KURT

Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Doç. Dr. Oğuz MERHAN

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nungün vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Canlılık faaliyetlerini kesintisiz bir şekilde sürdüren organizmada hücre doğal koşullar içerisinde kontrollü bir şekilde bölünür, büyür ve gelişir. Normal şartlar altında doku ve organ bütünlüğünü koruyarak metabolik faaliyetlerin aksamadan sürdürülmesine imkân sağlar. Kanseri hücreleri ise bu kontrolden uzak, sınırlarını metabolizmayı ölüme götürecektir kadar geniş tutan bir aktivite içerisinde. Kanseri hücreleri açısından metabolik sınırları ihlal etmek, organizma tarafından baskılanamadığından oldukça kolay olmaktadır. Bu kolaylıkla birlikte öncelikle bulunduğu yeri sonrasında ise dâhil olduğu bütün sistemi istila etmeye çalışmaktadır.

Meme kanseri kadınlar arasında çok yaygın olan ve yaşam kalitesini oldukça düşüren bir hastalıktır. Tanısı konulan her 8 kanser türünden biri olarak yayılmaya devam etmektedir. Tedavisindeki yeni yaklaşımlara rağmen, kanserin tam olarak aydınlatılamayan mekanizmasından dolayı birçok bilinmezliği beraberinde getirmektedir. Aydınlatılmaya ihtiyaç duyulan konuların bazıları da hücrelerin metastatik yetenekleri, invazivlikleri ve migasyon hızlarına etki eden faktörler olarak bilinmektedir. Kanseri hücrelerinde metastatik yeteneğin uyarılabilir hücre membranlarının karakteristik özelliği olan akımlarla ve membran kanallarının varlıklarıyla ilişkisi bulunduğu dair kanıtlar mevcuttur. Bu kanıtlar özellikle ileri derecede metastatik meme kanseri hücre hatlarında voltaj-kapılı Na^+ kanallarıyla (VGSC) ilişkilidir. Bu kanallarda meydana gelen aktivitelerin kanseri hücrelerinde migrasyonu ve invazyonu destekledikleri belirlenmiştir. VGSC'lerinden Nav1.5 kanalının *in vitro* olarak kanseri hücrelerinde ileri metastatik yetenekle ilişkisi bildirilmiştir. Bununla birlikte zayıf metastatik yetenekli ve sağlıklı hücrelerin voltaj-kapılı sodyum kanallarını ya çok az ya da hiç eksprese etmedikleri de gösterilmiştir.

Meme hücrelerinin fizyolojik işlevlerinde meydana gelen farklılaşmalar Na^+ kanalları aracılığı ile başlayarak, hem kendi içinde hem de hücreler arası iletişim ile diğer hücrelerle bir bağ kurarak yayılmasına zemin oluşturmaktadır. Kanseri hücrelerinde ise bazı karmaşık ve bilinmez fonksiyonların devreye girmesi ile kontrolsüz bir gelişim söz konusu olmaktadır. İyi bir gözlemcinin mükemmel bir dikkat ile er veya geç bu bilinmezlikleri, gerek kendinden öncekilerin uykusuz gecelerini aydınlatan ilham verici fikirlerle, gerek kendisi ile bilgiyi aramaya koyulan

yol arkadaşlarıyla, gerekirse kendi ömrü yetmeyerek, bıraktığı kırıntılarla kendinden sonra gelen araştırmacıların açığa kavuşturacaklarına olan inancım tamdır. Yeter ki bu gözlemci kesin bir kanıya varmadan önce, öngörüsünün sessizliğinde ve düşüncesinin dengeli tutumunda eylemsel olarak gerçekleşen duyuşsal alışverişin sonuçlarını almayı uman bir gözlemci olsun. Ancak belki o zaman kanserin tam ve sistemli bir kontrolü söz konusu olabilir. Bu anlamda yaptığımız araştırmanın bu yolda atılacak adımları bir sonraki aşamaya geçirecek bir basamak olmasını umut etmekteyiz.

Akademik hayata giriş hayat boyu öğrenmenin çabası ve öğrenciliğin ısrarı ile mümkündür. Bu yolculukta akademik tecrübelerini daima tebessümle aktaran, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen lisanüstü eğitimimde büyük katkısı olan danışmanım Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU'na, tecrübeleriyle hücre kültürü çalışmalarımda destek olan 2.danışmanım Doç. Dr. Özkan ÖZDEN'e, tez çalışmamın tüm aşamasında olan ve her zaman çözüm odaklı yaklaşımları ve sakinliği ile problemleri çözmemizde yardımcı olan Dr. Barış YILDIZ'a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ'e, hücre kültürü çalışmalarımda ufuk açıcı fikirlerinden dolayı Doç. Dr. Muhammed Yayla'ya, dönem arkadaşım Pelin TOKALI'ya, her daim yanımda olan arkadaşım Dr. Öğ. Mesut YİĞİT'e, İlkur BOZYEL'e ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Bu ısrarlı yolda varlığını eksik hissettirmeyen annem Ayşe MECİT'e ve desteklerini her zaman gördüğüm ve yılmadan, bıkmadan yanımda olan sevgili ablalarım Meltem MECİT, Zübeyde MECİT YETKİN, Züleyha MECİT, Mevlüdiye BARUTCU'ya, abim Mehmet MECİT'e, kardeşim Burak MECİT'e, her zaman her şeyin en güzelini hakettiklerini düşündüğüm tüm yeğenlerime ve babam Osman MECİT'e şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	III
SİMGE VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
RESİMLER DİZİNİ	XVI
TABLolar DİZİNİ	XVII
ÖZET	XVIII
SUMMARY	XX
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanser Türleri	7
2.1.1.1. Meme Kanseri	8
2.1.1.2. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması	11
2.1.1.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	12
2.1.1.4. Meme Karsinogenezinde Genler	13
2.1.1.5. Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler	16
2.1.1.5.1. <i>cerB-2</i> Onkogeni	17
2.1.1.5.2. <i>c-Mcy</i> Onkogeni	17
2.1.1.5.3. <i>RAS</i> Onkogeni	18
2.1.1.6. Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcı Genler	18
2.1.1.6.1. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> Genleri	19
2.1.1.6.2. <i>TP53</i> Geni	20
2.1.1.7. Meme Kanserinde Metastaz	21

2.1.1.8.	Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri	23
2.2.	Apoptozis	24
2.2.1.	Apoptozisin Oluşum Mekanizmaları	26
2.2.1.1.	İntrinsik Yol	28
2.2.1.2.	Ekstrinsik Yol	31
2.2.2.	TNFRS ve Ligandları	34
2.2.2.1.	TRAIL	36
2.2.2.2.	TRAIL Aracılı Hücre Ölümünün Kansere Tedavilerindeki Avantajları	37
2.3.	TRAIL İndükleyici Ajan Olarak TIC10'un (ONC201) Keşfi, Etki Mekanizması ve Güncel Faz Çalışmaları	39
2.4.	Şaperonlar	44
2.4.1.	Sigma Reseptörü	45
2.4.2.	Sig1r'nin Fizyolojik İşlevleri ve Kansere İlişkisi	46
2.4.3.	Sigma1r Agonist ve Antagonistlerinin Kansere Araştırmalarındaki Yeri ve Kullanımı	50
2.5.	İyon Kanalları	51
2.5.1.	Sodyum Kanalları	53
2.5.2.	Nav1.5	57
2.5.3.	aNav1.5 ve nNav1.5'in Fizyolojik İşlevleri ve Kansere ilişkisi	57
2.5.3.1.	Meme Kanserinde aNav1.5 ve nNav1.5	59
2.5.3.2.	aNav1.5 ve nNav1.5 İnhibitörlerinin Kansere Araştırmalarındaki Yeri ve Kullanımı	61
2.6.	TIC10/ONC201, Sigma1r ve Nav1.5'lerin İlişkisi	62
3.	MATERYAL VE METOD	64
3.1.	Materyal	64

3.1.1.	Hücre Hatları	64
3.1.2.	Primerler	64
3.1.3.	Kimyasallar	65
3.1.4.	Kullanılan Cihaz, Alet ve Sarf Malzemeler	66
3.2.	Metod	68
3.2.1.	Hücre Kültürü	68
3.2.2.	Proliferasyonun Belirlenmesi	71
3.2.3.	Hücre Örneklerinin Toplanması	71
3.2.4.	Total RNA İzolasyonu	71
3.2.5.	Total RNA Örneklerinin NanoDrop Spektrofotometre Yardımıyla Miktar ve Kalitelerinin Tayini	72
3.2.6.	cDNA Kütüphanesi	72
3.2.7.	Gerçek Zamanlı PCR-Real Time PCR (RT-PCR)	72
3.2.8.	Hücre Çizik Testi (Wound Healing Assay)	73
3.2.9.	Jele PCR Ürünlerinin Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi	74
3.2.10	İstatistiksel Analizler	75
4.	BULGULAR	76
4.1.	Hücre Proliferasyon Düzeylerinde Tespit Edilen Değişiklikler	76
4.1.1.	SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Proliferasyona Etkisi	76
4.1.2.	SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin MCF-7 Meme Hücre Kanseri Hattında Proliferasyona Etkisi	80
4.2.	Gen Ekspresyon Seviyelerinde Tespit Edilen Değişiklikler	83

4.2.1.	MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin aNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri	83
4.2.2.	MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin nNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri	84
4.2.3.	MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin aNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri	85
4.2.4.	MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin nNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri	86
4.3.	SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin Hücre Migrasyon Düzeylerine Etkileri	87
4.3.1.	MDA-MB-231 hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin Hücre Migrasyon Düzeylerine Etkileri	87
4.3.2.	MCF-7 hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin Hücre Migrasyon Düzeylerine Etkileri	92
4.3.3.	PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektrophorez Görüntüleri	96
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	97
6.	KAYNAKLAR	104
7.	ÖZGEÇMİŞ	121

SİMGE VE KISALTMALAR

α : Alfa

AKT : Protein Kinase B-Protein Kinaz B

Apaf1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1

APF : Alpha Fetoprotein

AT : : Ataxia Telangiectasia

ATF4 : Activating Transcription Factor 4

ATP : Adenosine Triphosphat

BAD : BCL-2 Associated Agonist Of Cell Death

BAK : BCL-2 Antagonist Killer 1

BAX : BCL-2 Associated X Apoptozis Regulator

β : Beta

BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2

BCL-XL : B-Cell Lymphoma-Extra Large

BID : Bh3 Interacting Death Agonist

BIM : BCL-2 -Like 11

BiP : Binding immunoglobulin protein

BOK : BCL-2 Related Ovarian Killer

BRCA1 : Breast Cancer Type 1

BRCA2 : Breast Cancer Type 2

Ca^+ : Kalsiyum

CD31 : Cluster of Differentiation 31

CDK2 : Cyclin Dependent Kinase 2

CDK4 : Cyclin Dependent Kinase 4

CED-9 : Cell Death Abnormality Gene 9

CHOP : C/EBP homologous protein

Cl: Klor

CSF : Koloni Stimüle Edici Faktör

Ct : Threshold cycle

DcR1 : Decoy Receptor 1

DcR2 : Decoy Receptor 2

DD : Death Domain

DED : Death Effector Domain

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA : Deoksiribo Nükleikası

DR-4 : Death Reseptor 4

DR5 : Death Reseptor 5

E1B-19K : Adenovirus E1B Protein

EGF : Epidermal Büyüme Faktörü

E-kadherin : Epitelyal katerin

eIF2a : Eukaryotic Initiation Factor 2

ER : Endoplazmik Retikulum

erbB1 : Epidermal Growth Factor

ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase

FADD : Fas-Associated Protein With Death Domain

FGF : Fibroblast Growth Faktör

FGF3 : Fibroblast Growth Faktör 3

FHIT : Fragile Histidine Triad Protein

FLIP : FLICE(FADD-like IL-1 β -converting enzyme)

Foxo3a : Forkhead box O3

GRB2 : Growth Factor Receptor-Bound Protein-2

GRF : Büyüme Faktörü Reseptörüne

GTP : Guanosine Triphosphat

HER-2 : Human Epidermal Growth Reseptör 2

HPV : Human Papilloma Virüs

Hsp60 : 60 Kilodalton Heat Shock Proteins

Hsp70 : 70 Kilodalton Heat Shock Proteins

IGF1 : Insulin-like Growth Faktor1

IGF2 : Insulin-like Growth Faktor2

IP3 : Inositole Triphosphat

IP3R3 : IP3 reseptör tip-3

IRE1 : ER stres sensörü 1

ISR : Integrated Stress Responce

IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL-2 : İnterlökin-2

JNK : Jun N-terminal Kinase

K⁺ : Potasyum

kDa : kiloDalton

Lev : Levobupivacaine

Lid : Lidocaine

LOH : Loss of Heterozygosity

MAM : A 170 Amino Acid Domain

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

Mdm2 : Mouse Double Minute 2 Homolog

mm : Milimetre

MMP : Matriks Metalloproteinazlar

MOMP : Major Outer Membrane Porin

MÖ : Milattan Önce

mRNA : Messenger RNA

MYC : V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

Na⁺ : Sodyum

N-CAM : Neural Cell Adhesion Molecule

NCDD : Nomenclature Committee on Cell Death

NF- κ B : Nuklear Factor kappa-B

NHE-1 : Na⁺/H⁺ değiştirici izoform-1

NOXA : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-İnduced Protein 1

p53 : Protein53

PDGF : Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü

pH : Power of Hydrogen

PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

PUMA : The P53 Upregulated Modulator Of Apoptosis

RB1 : Retinoblastoma Protein

RCC : Renal Cell Carsinoma

RNA : Ribo Nucleicacid

RT-PCR : Real Time-Polimerase Chain Reactions

S_{Ag} : Sigma Reseptör Agonisti SKF10047

S_{An} : Sigma Reseptör Antagonisti BD1047

Ser253 : Phospho-FoxO3a

Ser294 : Phospho-Progesterone Receptor

Sig1r : Sigma reseptör 1

Sig2r : Sigma reseptör 2

T : TIC10/ONC201

TGF : Transforme Edici Büyüme Faktör

TGF α : Transforming Growth Factor α

TGF- α : Transfer büyüme faktörü alfa

TIC10 : TRAIL İnducing Compound 10

TNF : Tumor Nekrosis Factor

TNF-R1 : Tumor Nekrosis Factor

TNFRSF : TNF Receptor Superfamily

TNFSF : Tumor Nekrosis Factor Super Family

TP53 : Tumor Protein

TRADD : Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated DEATH Domain Protein

TRAF2 : TNFR-associated Factor-2

TRAIL : Tumor Related Apoptosis İnducing Ligand

TSAg : TIC10/ONC201- SKF10047

TSAgLev : TIC10/ONC201-SKF10047-LEVOPUIVACAINE

TSAgLid : TIC10/ONC201-BD1047-LIDOCAINE

TSAn : TIC10/ONC201- BD1047

TSAnLev : TIC10/ONC201-BD1047-LEVOPUIVACAINE

TSAnLid : TIC10/ONC201-SKF10047-LIDOCAINE

uPA : urokinase-type Plasminogen Activator

UV : Ultraviyole

vb : Ve benzerleri

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VGSC : Voltage Gated Sodium Channel

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

yy : Yüz Yıl

Zn : Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No	
Şekil 1.	Normal ve Kanserli Hücre Bölünmesi	4
Şekil 2.	Kanser Risk Faktörleri	6
Şekil 3.	En yaygın kanser türleri	7
Şekil 4.	Memenin Yapısı	8
Şekil 5.	Meme Kanseri Risk Faktörleri	9
Şekil 6.	Meme Kanseri Histolojik Sınıflandırma	11
Şekil 7.	Meme Kanseri Moleküler Sınıflandırma	12
Şekil 8.	Meme Kanserinde Çok Aşamalı Karsinogenez	15
Şekil 9.	Programlı Hücre Ölümü Tipleri	25
Şekil 10.	Memeli Hücresindeki Apoptozis Yolakları. İntrinsik ve Ekstrinsik Yolaklar	27
Şekil 11.	İntrinsik Apoptotik Yolak. BCL-2 ailesi etki mekanizması	30
Şekil 12.	Apoptozisin Ekstrinsik Yolağında TNF-α ve TNFR-1 reseptör	32
Şekil 13.	Apoptozisin Ekstrinsik Yolağında Fas ve FasL	32
Şekil 14.	TRAIL-R Aracılı Hücre Ölümü	33
Şekil 15.	TIC10/ONC201 Yapısal Formülü	39
Şekil 16.	TIC10/ONC201 Etki Mekanizması	40
Şekil 17.	İnsan kanser hücre hatlarının, in vitro çalışmada ONC201'e karşı duyarlılık yanıtı	43
Şekil 18.	Sigma Reseptörünün Tahmini Moleküler Yapısı	46
Şekil 19.	Sig1r'ın aktivasyonu ile oluşan sinyal yolağı	47
Şekil 20.	ER'de Sigma1 reseptörünün biyolojik aktiviteleri	49
Şekil 21.	İyon kanalı yapısı	51
Şekil 22.	İyon Kanalları	52

Şekil 23.	Sodyum Kanalı Alt Birimleri	54
Şekil 24.	MDA-MB-231 hücre hattı proliferasyon düzeyleri	77
Şekil 25.	MCF-7 hücre hattı proliferasyon düzeyleri	80
Şekil 26.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında aNav1.5 gen ekspresyon değişimi	83
Şekil 27.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında nNav1.5 gen ekspresyonu değişimi	84
Şekil 28.	MCF-7 meme kanseri hücre hattında aNav1.5 gen ekspresyonu değişimi	85
Şekil 29.	MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında nNav1.5 Gen Ekspresyon Değişimleri	86
Şekil 30.	Grupların MDA-MB-231 hücre hattı 48.saat Wound Healing test değerleri	88
Şekil 31.	MCF-7 hücre Hattı 48.saat Wound Healing test değerleri	92
Şekil 32.	PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri	96

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. MDA-MB-231 Hücre Hattında 48. saat Hücre Sağkalımı Görüntüleri	78
Resim 2. MDA-MB-231 Hücre Hattında 48.saat Hücre Sağkalımı Floresan diasetat Boyama Görüntüleri	79
Resim 3. MCF-7 Hücre Hattında 48. saat Hücre Sağkalım Görüntüleri	81
Resim 4. MCF-7 Hücre Hattında 48. saat Hücre Sağkalım Floresan diasetat Boyama Görüntüleri	82
Resim 5. MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol, SIG1RAn ve SIG1RAg gruplarının Wound-Healing alan görüntüleri	89
Resim 6. MDA-MB-231 hücre hattında Kontrol, T, TSAn ve TSAg gruplarının Wound-Healing alan görüntüleri	90
Resim 7. MDA-MB-231 hattında Kontrol, TSAnLev, TSAnLid, TSAgLev ve TSAgLid Gruplarının Wound-Healing alan görüntüleri	91
Resim 8. MCF-7 hattında Kontrol, SIG1RAn ve SIG1RAg gruplarının Wound-Healing alan görüntüleri	93
Resim 9. MCF-7 hattının Kontrol, T, TSAn, TSAg Gruplarının Wound-Healing alan görüntüleri	94
Resim 10. MCF-7 hattında Kontrol, TSAnLev, TSAnLid, TSAgLev ve TSAgLid gruplarının Wound-Healing alan görüntüleri	95

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. TNF Reseptör Süperailisi ve Ligandları	34
Tablo 2. VGSC'ler tarafından düzenlenen metastatik hücre davranışları	55
Tablo 3. nNav1.5, aNav1.5 ve β -actin'in amplifikasyonunda kullanılacak primerler ve annealing sıcaklıkları	65
Tablo 4. Gruplar ve yapılan analizler	70

ÖZET

Tüm dünyada kadınlar arasında akciğer kanserinden sonra en yaygın görülen kanser çeşidi meme kanseridir. Görülme sıklığı gittikçe artmakta olup kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır. Sağlıklı meme dokusu hücrelerinin farklılaşarak kanserli hücrelere dönüşmesinin sebepleri araştırılmaktadır. Özellikle kanser hücresi oluştuktan sonra metastatik yetenek kazanması ve agresif bir şekilde doku ve organları istila etmesinin ardında yatan moleküler nedenler sıkı bir şekilde araştırılmakta ve aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Hücre içi ve hücre dışı dengenin korunmasında hayati bir rol oynayan voltaj kapılı sodyum kanallarının alt birimleri olan $nNav1.5$ ve $aNav1.5$ 'in gen ifadelerindeki değişikliklerin meme kanseri hücrelerinde metastaz ile ilişkili olduğu ve kanserdeki mekanizması, işlevleri ve rolü aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Bu amaçla MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları kullanıldı. Her bir hat için kontrol, SIG1RAn, SIG1RAg, T (TIC10/ONC201-antikanser ajan), TSAn, TSAg, TSAnLev, TSAnLid, TSAgLev ve TSAgLid olmak üzere 10 farklı grup oluşturuldu. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında Sigma reseptör 1 antagonisti ve agonisti ile kemoterapötik ajan ve Na^+ kanal blokörlerinin kullanılmasının hücre sağkalımı, Na^+ kanallarının ekspresyonu ve kanser hücrelerinin migrasyon hızları üzerine etkileri belirlendi.

MDA-MB-231 hücre hattında kemoterapötik ajan ile birlikte SIG1R agonisti ve Na^+ kanal blokörlerinin uygulandığı gruplar hücre sağkalımının en az olduğu gruplar olarak belirlendi ($p<0.001$). MCF-7 hücre hattında hücre sağkalımının en az olduğu grup kemoterapötik ajanın uygulandığı grup olarak tespit edildi ($p<0.001$)

İleri derecede metastatik MDA-MB-231 hücre hattında yapılan uygulamada $aNav1.5$ Na^+ kapılarının SIG1R antagonisti ile baskılandığı tespit edildi. Bununla birlikte yapılan uygulamalarda $nNav1.5$ kapılarının etkilenmediği ve ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu belirlendi. Daha zayıf metastatik yetenekli MCF-7 hücre hattında yapılan uygulamalarda $aNav1.5$ kapıları ekspresyon seviyelerinin kemoterapötik ajan grubu dışındaki gruplarda azaldığı tespit edildi. $nNav1.5$ kapılarının ekspresyon seviyeleri SIG1R antagonisti-agonisti ile kemoterapötik ajanın birlikte uygulandığı grupta belirgin derecede azaldığı belirlendi.

Grupların hücre migrasyon hızlarının ölçüldüğü çizik deneyinde MDA-MB-231 hücre hattında hücre migrasyon hızının en yavaş olduğu grupların kemoterapötik ajan ve kemoterapötik ajanla birlikte SIG1R agonistinin uygulandığı gruplar olduğu tespit edildi ($p<0.001$). MCF-7 hücre hattında ise en yavaş migrasyon hızına sahip grubun kemoterapötik ajanla birlikte SIG1R agonistinin uygulandığı grup olduğu gözlemlendi ($p<0.001$).

İleri metastatik karakterli meme kanseri hücrelerinde SIG1R agonistinin ve kemoterapötik ajanın Na^+ kapıları üzerinde negatif bir etkiye sahipken, SIG1R antagonistinin Na^+ kapılarını azalttığı görüldü. SIG1R agonisti ile kemoterapötik ajanın Na^+ kapılarındaki yükselme ile birlikte hücre sağkalımı ve migrasyon oranını düşmesini sağladığı görüldü. Daha az metastatik yetenekteki hücrelerde ise SIG1R agonist-antagonistlerinin hem Na^+ kapılarını azalttığı hem de hücre sağkalımı ve migrasyon oranlarını birlikte azalttığı tespit edildi. Bu hücre hattında antikanser ajanının Na^+ kapılarından bağımsız olarak hücre sağkalımı ve migrasyon hızını azalttığı belirlendi. Sonuç olarak ileri metastatik yetenekli meme kanser hücrelerinde kullanılan antikanser ajanın Na^+ kapılarından bağımsız olarak hücre ölümüne yol açtığı, SIG1R angonist ve antagonistlerinin de Na^+ kanallarından bağımsız olarak etki gösterdiğini tespit ettik. Daha az metastatik hücrelerde ise SIG1R agonist ve antagonistlerinin Na^+ kanallarını azaltarak hücre ölümüne yol açtığını belirledik.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, SIG1R, Sodyum Kapıları, TIC10/ONC201, TRAIL.

SUMMARY

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide, after lung cancer. Its incidence is increasing, and it ranks first in cancer-related deaths. The reasons for the differentiation of healthy breast tissue cells into cancerous cells are being investigated. The molecular reasons behind the metastatic ability and aggressive invasion of tissues and organs, especially after the cancer cell has formed, are being studied and tried to be clarified. It is aimed to elucidate that changes in gene expressions of nNav1.5 and aNav1.5 which are subunits of voltage-gated sodium channels that play a vital role in maintaining intracellular and extracellular balance, are associated with metastasis in breast cancer cells and their mechanism, functions and role in cancer.

For this purpose, MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines were used. For each line, 10 different groups were created as Control, SIG1RAn, SIG1RAg, T (TIC10/ONC201-anticancer agent), TSAn, TSAg, TSAnLev, TSAnLid, TSAgLev and TSAgLid. The effects of using Sigma receptor 1 antagonist and agonist, chemotherapeutic agent and Na⁺ channel blockers on cell survival, expression of Na⁺ channels and migration rates of cancer cells in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines were determined.

In the MDA-MB-231 cell line, the groups in which SIG1R agonist and Na⁺ channel blockers were applied together with the chemotherapeutic agent were determined as the groups with the lowest cell survival ($p < 0.001$). In the MCF-7 cell line, the group in which the cell survival was minimized was determined as the group in which the chemotherapeutic agent was administered ($p < 0.001$)

It was determined that the aNav1.5 Na⁺ gates were suppressed by the SIG1R antagonist in the application performed on the highly metastatic MDA-MB-231 cell line. However, it was determined that the nNav1.5 gates were not affected in the applications and their expression levels were high. It was determined that the expression levels of aNav1.5 gates decreased in groups other than the chemotherapeutic agent group in applications performed on the weaker metastatic capable MCF-7 cell line. It was determined that the expression levels of nNav1.5 gates

were significantly decreased in the group in which SIG1R antagonist-agonist and chemotherapeutic agent were administered together.

In the scratch experiment in which the cell migration rates of the groups were measured, it was determined that the groups with the slowest cell migration rate in the MDA-MB-231 cell line were the groups in which the chemotherapeutic agent and the SIG1R agonist were administered together with the chemotherapeutic agent ($p<0.001$). In the MCF-7 cell line, it was observed that the group with the slowest migration rate was the group in which the SIG1R agonist was administered together with the chemotherapeutic agent ($p<0.001$).

It was observed that SIG1R agonist and chemotherapeutic agent had a negative effect on Na^+ gates in advanced metastatic breast cancer cells, while SIG1R antagonist reduced Na^+ gates. It was observed that the SIG1R agonist and the chemotherapeutic agent decreased the rate of cell survival and migration with the increase in Na^+ gates. On the other hand, in cells with less metastatic ability, SIG1R agonist-antagonists were found to both decrease Na^+ gates and decrease cell survival and migration rates together. In this cell line, it was determined that the anticancer agent decreased cell survival and migration rate independently of Na^+ gates. As a result, we determined that the anticancer agent used in advanced metastatic breast cancer cells caused cell death independently of Na^+ gates, and SIG1R agonists and antagonists acted independently of Na^+ channels. We determined that SIG1R agonists and antagonists caused cell death by reducing Na^+ channels in less metastatic cells.

Key words: Breast Cancer, SIG1R, TIC10/ONC201, Sodium Channels, TRAIL.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Makro ve mikro ölçekte her sistem belli bir denge içerisinde ve sürekli olarak bu dengeyi korumak üzere mekanizmalarını yeni oluşan şartlara göre düzenlemektedirler. Sistemlerin belli bir denge içerisinde bulunmaları durumu homeostazis olarak adlandırılmaktadır. Homeostazis ekzojen ve endojen kaynaklı bozulmalara uğrayabilmektedir. Homeostazisin bozulması, sistemlerin yeni oluşan duruma adapte olamadığı zamanlarda yok oluşla sonuçlanmaktadır. Hücre de mikro ölçekte bir sistem olarak belli bir denge içerisinde fizyolojik faaliyetlerini sürdürmekte ve bu dengeyi birçok mekanizma ile korumaya çalışmaktadır. Dengenin artık korunamaması hücrenin ölümü ile sonlanmaktadır. Hücrenin doğal süreçlerinden ayrılarak kontrolünün kaybedildiği durumlardan birisi de kanserdir. Kanser hücrenin kontrolsüz ve sürekli bölünmesi olarak tanımlanmakta ve dahil olduğu sistemde homeostazisi bozan kompleks hastalık mekanizmalardan birisi olarak yer almaktadır. Tüm dünyada yaygınlık gösteren ve çevresel faktörlerden genetik faktörlere, çeşitli nedenleri olan kanserin bulunduğu dokuya göre adlandırılan birçok türü bulunmaktadır. Kanser türlerinden meme kanseri ise kadınlar arasında en sık görülen kanserlerden biri olarak giderek yayılmakta ve kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır. Meme kanserleri yaş, kilo, madde bağımlılıkları, uzun menstrüasyon dönemleri, hormon replasman tedavileri, ilerleyen yaşlarda doğum yapmak gibi faktörlere bağlı olarak meydana gelebilmektedir (American Cancer Society 2015, Tyczynski ve ark. 2002, King ve ark. 2003). Meme kanseri bazen yıllarca sürebilen evrelerden geçtikten sonra oluşmaktadır. Başlangıçta süt aktaran duktus (kanal sistemi) epiteli içerisinde bulunan kanser hücreleri daha sonra bazal membranlardan ilerleyerek bağ dokusuna geçiş yapmaktadırlar. Bağ dokusuna geçiş aşamasında karşılaştıkları kan damarları ve lenfler aracılığıyla metastaz yeteneklerini de kullanarak öncelikle yakın dokulara daha sonra diğer organlara yayılmaktadırlar. Tedavi edilmediği takdirde uzak doku ve organlara yayılarak ölüme sebebiyet vermektedir. Meme kanserine bağlı ölüm sebepleri diğer organlara metastaz yapmış meme kanseri hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Aydıntuğ 2004).

Sigma reseptörleri karaciğer, böbrek ve beyin dâhil olmak üzere birçok organın plazmatik, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum (ER) zarlarına yerleşmiş olan bir

dizi reseptör ailesidir. Sigma reseptörleri ER’de lipid yapıdaki zar tabakasında yerleşmiş, mitokondri aracılı apoptozda görev alan bir şaperon olarak tanımlanmaktadır. Sigma-1 reseptörlerinin hücre hatlarında Nav1.5’leri modüle ettiği ve bu modülasyonu meme kanseri hücrelerinde upregüle ederek gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda sigma-1 reseptörlerinin Nav1.5’leri modüle ederek meme kanseri hücre hatlarında metastatik davranışlara, ekspresyonlarında bir artış ile aracılık edebileceği tespit edilmiştir (Aydar ve ark. 2016).

Plazma zarında yer alan iyon kanalları ana elemanlar olarak hücrede dengenin korunmasından proliferasyona kadar temel fizyolojik koşul için gereklidir. Son yıllarda iyon kanallarının kanser hücrelerinin gelişiminde ve büyümesinde önemli işlevleri olduğu anlaşılmıştır. Hücrenin doğal fizyolojik koşullar içerisinde faaliyetlerini sürdürmesinden, işlevlerini yitirerek veya kontrolü kaybederek kanser hücresine dönüşmesi esnasında iyon kanallarının gen düzeyinde ekspresyonunu etkileyebilen veya aktivitelerinde bir değişikliğe yol açan bir takım değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişikliklere bağlı olarak iyon kanalları ile kanser hücresinde doğal koşullarını belirleyerek hücre sağkalımıyla, ölüm mekanizmasını devreye sokarak apoptozisle, hücrenin migrasyonu ve metastazıyla ilişkilendirilmektedir (Prevarskaya ve ark. 2010). İleri derecede metastatik yetenek kazanmış olan kanser hücrelerinde iyon kanallarının aktivitelerinin artmış olması kanserle ilişkilendirilmiştir. Metastatik meme kanseri hücre hatlarında voltaj-kapılı Na^+ kanallarının artmış ekspresyonları tespit edilmiştir (Diaz ve ark. 2007). Na^+ kanallarının yüksek aktivasyonları ile hücrenin motilitesinde, endositozda ve invazyonda önemli rol oynamaktadırlar. İyon kanallarından özellikle voltaj-kapılı Na^+ alt kapılarından Nav1.5’in ileri derecede metastatik meme kanseri hücrelerinin gelişimleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber zayıf metastaz yetenekli hücre hatlarında ya da sağlıklı hücre hatlarında voltaj-kapılı Na^+ kanallarının ekspresyonlarının ileri metastatik meme kanseri hücre hatlarında çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Fraser ve ark. 2005).

TNFSF üyelerinden olan TRAIL’in birçok hücrede ekspresyonu gerçekleşmektedir (Pitti ve ark. 1996). TRAIL metabolizmada oldukça yaygın bir şekilde ifade edilmekte ve geniş yelpazede etkisini göstermektedir. TRAIL, ilgili hücre zarında yer alan TRAIL reseptörüne bağlandıktan sonra ölüm aracılı apoptozisin aktivasyonunu başlatmaktadır. TRAIL’in ilgi çekici özelliklerinden bir tanesi hem

hücre zarında transmembran proteini olarak yer alması hem de matriks metalloproteinaz enzimleri aracılığıyla kesilip, ekstraselular matrikse salgılanarak apoptozisi indüklemeye yeteneğinde olmasıdır (Spierings 2004, Shin ve ark. 2006). TRAIL'in, hücre kültürü çalışmalarında ortaya konulan sonuçlarla birlikte, kanser hücrelerinde apoptozis sürecine çok fazla katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Hemen hemen tüm kanser türlerinde, hücre kültürü çalışmalarında TRAIL'in apoptozise neden olarak hücre ölümünü başlattığı rapor edilmiştir (Gura 1997). TIC10/ONC201 de TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandın minik bir molekülü olarak değerlendirilen p53'ten bağımsız olarak indükleyici bir anti kanser ajan aday olarak tanımlanmıştır (Allen ve ark. 2013, Allen ve ark. 2015). TIC10/ONC201, öncelikle anti tümör işlevi görerek kanser mekanizmasını denetleyecek ve aynı zamanda da kanser mekanizmasını baskılayacak ve doğal olarak TRAIL vazifesi göreceği anti tümör özellikte bir kemoterapötik ajan olarak çalışmalarda kullanılmaya başlandı. TIC10 ile tedavi edilmeye çalışılan kanser hücrelerinde TRAIL mRNA seviyeleri gözlemlenmelerinde, TIC10 aracılı TRAIL upregülasyonunun muhtemel olarak düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Allen ve ark. 2013).

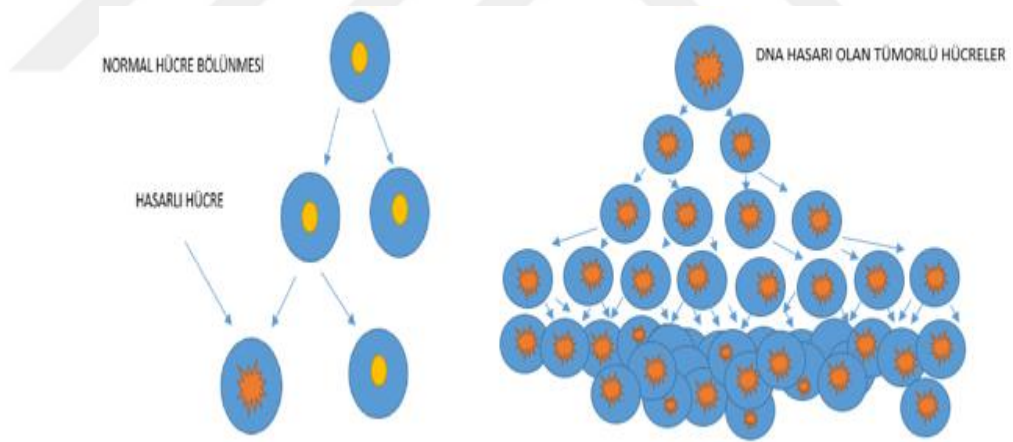
Güncel ve son faz çalışmaları günümüzde devam etmekte olan antikanser ajanı TIC10/ONC201'in metastatik yetenek kazanmış kanser hücreleri için umut verici çalışmaları mevcuttur. Bununla birlikte ekspresyon düzeyi yüksek SIG1R'in kemoterapötik ajanlara karşı direnci henüz aydınlatılmış değildir. Sodyum kanalları olan aNav1.5 ve nNav1.5'in SIG1R ile aynı sinyalizasyon yolu üzerinde bulunarak kötü prognoz ve metastaz ile ilişkili bir biomarker olarak tanımlanmaya başlaması çalışmamıza gerekçe teşkil etmektedir.

Yaptığımız çalışmada SIG1R modülasyonunda antikanser ajan olan TIC10/ONC201 uygulanmasının nNav1.5 ve aNav1.5 ekspresyonlarına etkilerinin ortaya çıkarılması, nNav1.5 ve aNav1.5 kanallarının seçici blokörleri ile etkisiz hale getirilerek antikanser ajanın MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin anlaşılması ve SIG1R antagonisti-agonisti ile downregülasyonu-upregülasyonunda nNav1.5 ve aNav1.5 sodyum kanalları ekspresyonunda ne gibi değişiklikler olacağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser tarih boyunca insan için süregelen bir problem olmuştur. Çok fazla çeşidi olan kanser “canlı organizmada var olan bir veya birden çok hücrenin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, büyümesi ve çoğalması sonucu oluşan kötü huylu tümörler” olarak tanımlanmaktadır. Tıp hekimliğinin babası olarak bilinen ve Milattan Önce (MÖ) 460-370 yılları arasında yaşamış olan Hipokrat ülser oluşturma yeteneğindeki tümörler için “*carcinos*” terimini, ülser oluşturmayan tümörler içinse “*carcinoma*” terimini kullanmıştır. Kanser hücrelerinin sahip oldukları, bir elin parmakları gibi görünen uzantılardan dolayı yengeçlere benzediği için yine MÖ yaşamış bir başka hekim olan Celcus “*cancer*” (yengeç) terimini kullanmaya başlamıştır. Kanserli hücreler normal bir dokunun bölünme hızından çok daha hızlı bir şekilde bölünme ve çoğalma yeteneğindedirler (Şekil 1).



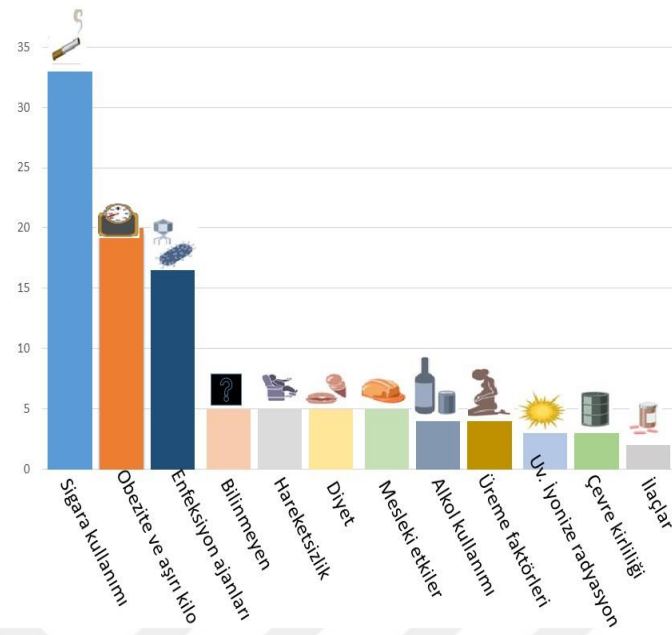
Şekil 1. Normal ve kanserli hücre bölünmesi.

Milattan öncesinde var olan kayıtlarda kanserden bahsedilmiştir. İnsan ve hayvanlarda mevcut kanser türleri oldukça çeşitli olup ilk kayıtlara antik Mısır’da, mumyalarda, fosilleşmiş kemikler üzerinde osteokarsoma olarak adlandırılan kemik tümörü izlerine rastlanmıştır. Yine aynı şekilde fosil mumyalarda tümör olarak adlandırılabilen kafatası kemikleri başta olmak üzere, boyun ve baş kısmında benzer

dezenformasyonlara rastlanmıştır. Yine Antik Mısır kayıtlarında bulunan ve Edwin Smith Papirüsü adı verilen yazılı eserde kanser tanısı konulan hastalıkların varlığından bahsedilmiştir. Yazıtta kanserin tedavi edilemez boyutta bir illet olduğu kayıt altına alınarak, yüzeysel durumdaki tümörlerin cerrahi operasyonlarla kesilerek atılmaya çalışıldığından bahsedilmiştir. Dokularda tespit edilen tümörlere ise bir çeşit yakma işlemi olan dağlama yönteminin kullanıldığı kayıt edilmiştir (Stiefel ve ark. 2006).

18. yüzyılın (yy) ortalarında İtalyan Doktor Giovanni Morgagni'nin ilk defa uygulamaya koyduğu otopsi sayesinde tümörlü dokuların daha detaylı incelenmesine olanak sağlanmış ve kanser hakkında etraflı bilgilerin elde edilmesi söz konusu olmuştur. Yine 18. yy'da yaşamış olan İskoç Doktor John Hunter bazı kanser türlerinde klasik yöntemleri deneyerek cerrahi operasyonlarla tedavi edilebileceğini öne sürmüştür. 19. yy'a gelindiğinde ileri gözlemler için modern mikroskopun keşfiyle kanserli hücrelerin patolojik olarak incelenmesine başlanmıştır. 20. yy başlarında Japon bilim insanlarının yapmış oldukları çalışma ile ilk kez deneysel şartlarda kanser oluşturulmuştur. Yapılan araştırmada ilk kez kanser oluşturulan deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar kanserin etiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır (Henschen, 1968).

Kanserin meydana gelmesinde sebep olarak gösterilen nedenler çeşitlilik arz etmektedir. Sigara kullanımı, çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları, genetik faktörler, iltihaba sebep olan ajanlar, bakteri ve parazitler, meslek hayatında maruz kalınan ağır metaller gibi kimyasal türevleri, alkolizm, radyasyon gibi nedenler kanserle ilişkisi ortaya konmuş olan risk faktörleridir (Şekil 2) (Clavel, 2007).

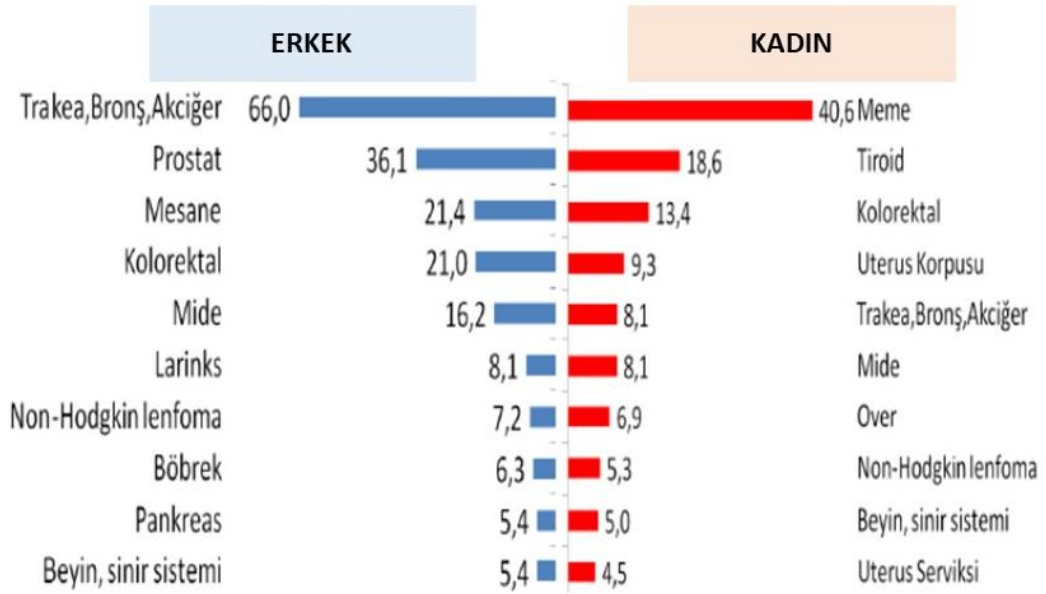


Şekil 2. Kanser risk faktörleri (Sawyer ve ark. 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).

Teknolojik gelişmelerin hızlı bir şekilde ilerlemesi ile hücre biyolojisinin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalar kanserli hücrelerin patolojisinin daha net anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Son yıllarda onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin keşfiyle moleküler düzeyde kanser tanımlamaları yapılmaya başlanmıştır. Günümüze gelindiğinde ise kanser bulunduğu organ veya doku türüne, köken aldığı hücreye göre değişik isimler ile tanımlanmaktadır. Onlarca çeşidi tanımlanan kanserin 200'den daha fazla olabileceği tahmin edilmektedir (Sawyer ve ark. 2013). Kompleks mekanizmalara sahip olan kanserin sosyal ve bireysel hayatın, teknolojinin olumsuz etkileri ile daha da karmaşıklaşmasıyla, bireylerden popülasyonlara, moleküler farklılıklardan genetik düzeydeki değişikliklere kadar çeşitli basamaklarda ifade ettiği anlamlar da farklılaşmıştır. İnsan genom projesinin nihayete erdirilerek yapılan genomik çalışmalar kanserin birbirinden farklı genomik değişikliklerle ortaya çıkabileceğini göstermiştir (Arnedos ve ark. 2014).

2.1.1. Kanser Türleri

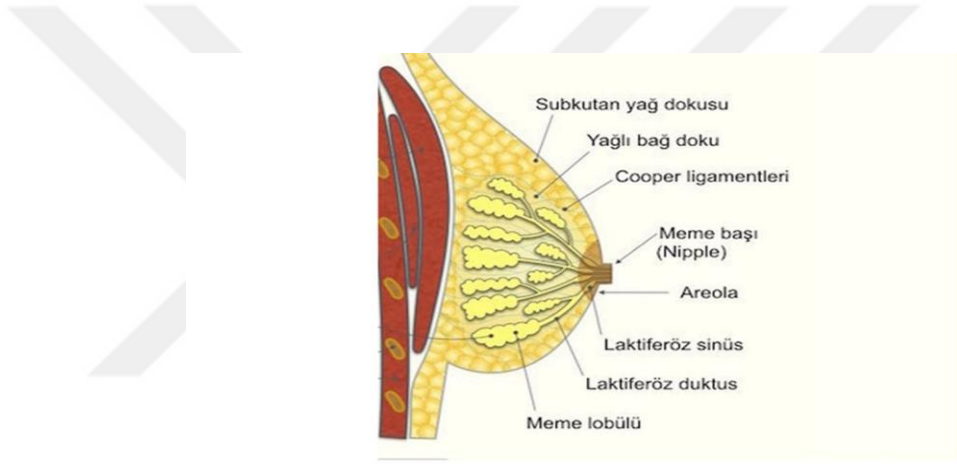
Canlı vücudunda var olan herhangi bir hücrede meydana gelen mutasyon vb. farklılıklar sonucunda ortaya çıkabilen kanser, hem davranış çeşitliliği hem de tedaviye verilen yanıt bakımından önemli ölçüde değişiklikler gösteren ve bu değişikliklere göre sınıflandırılmış 100’den fazla kanser türü tanımlanmıştır. Tüm dünyada hem ölümcül olması açısından hem de yaygınlığı açısından ilk sırada akciğer kanseri yer almaktadır. Akciğer kanserini görülme sıklığı açısından meme kanseri ve ardından prostat ve kolorektal kanserler takip etmektedir. Erkeklerde ve kadınlarda görülme sıklığı açısından kanser türleri çeşitlilik göstermektedir. Erkeklerde en sık görülen prostat kanseri iken kadınlarda meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Şekil 3) (Aydın 2019).



Şekil 3. En yaygın kanser türleri (Aydın 2019’den değiştirilerek alınmıştır).

2.1.1.1. Meme Kanseri

Meme, süt üretimi için özelleşmiş meme lobları, üretilen sütü meme ucuna ileten süt kanalları, süt kanallarının etrafını sarmalayan yağ doku ve bu yağ dokunun oluşturduğu stromadan meydana gelir (Şekil 4). Memeli canlılarda türe bağlı olarak çeşitli sayılarda (2-12 arasında) gelişmiş memeler yavrunun belli bir gelişim aşamasına kadar besin ihtiyacını karşılamak üzere süt üretmek ve salgılamaktan sorumludurlar.



Şekil 4. Memenin yapısı (<https://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-anatomisi/>' den alınmıştır)

Görülme sıklığı açısından meme kanseri, akciğer kanserinin ardından dünyada en yaygın ikinci kanser türüdür. Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında da ikinci sırada yer almakta ve kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenlerinin başını çekmektedir (Hutchinson, 2010). Dünya çapında yılda yaklaşık 1,500,000 kadına meme kanseri teşhisi konulmakla birlikte yaklaşık 500,000 kadın da meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Amerikan kanser topluluğu istatistiklerine göre Amerika'da meme kanserinden dolayı yılda 40,000-50,000 arası kadının hayatını kaybetmesi beklenmektedir (Siegel ve ark. 2016). Ülkemizde kadınlar arasında meme kanseri vakalarının tüm kanser türleri içerisinde yaklaşık %40 oranında olduğu bilinmektedir.

2000’li yıllara doğru ülkelerin endüstriyellesmesine bağlı olarak meme kanseri vakalarında artış görülmektedir. Bu artışa rağmen, günümüze kadar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde teknolojik yenilikler neticesinde üretilen araçlarla tarama programlarının yaygınlaşması ve multidisipliner çalışmalar ile birlikte adjuvan sistemik tedavi yöntemlerinin söz konusu olması sonucunda meme kanserine bağlı ölümlerde oldukça azalma gözlemlenmektedir (Kavanos 2006).

Meme kanseri risk faktörleri oldukça çeşitlilik arz etmektedir. Bireyi, yaşı ve cinsiyeti, beslenme şekli, yaşadığı coğrafya vb. birçok yönden etkileyecek faktörler meme kanseri oluşumu açısından risk oluşturmaktadır (Şekil 5). Meme kanseri risk faktörleri içerisinde cinsiyet ve yaş en önemli iki faktördür. Erkeklerde meme kanseri çok nadir de olsa görülebilmekte ve insidans oranı çok düşük seyretmektedir. Amerika’da yılda yaklaşık 2,000 civarında erkekte meme kanseri teşhis edilmekte ve yaklaşık 500 ölüm gerçekleşmektedir. Risk faktörlerinin başında cinsiyet gelmekte ve kadınlarda 35-39 yaşları arasında meme kanseri vakalarında oldukça hızlı artış görülmektedir. Kadınların menstrual döngülerinin tamamen sonlanmasına kadar artmakta, 50’li yaşlar ve sonrasında ise yavaş bir şekilde seyretmekte, 80 yaşından sonrasında ise durmaktadır (Anderson ve ark. 2005, Benson ve ark. 2009).

Meme Kanseri Risk Faktörleri		Risk büyüklüğü
RISK FAKTÖRLERİ	İLERLEYEN YAŞ	++
	COĞRAFİK ALAN	++
	MEME KANSERİ AİLE ÖYKÜSÜ	++
	BRCA1 ve BRCA2 GENLERİNDE MUTASYONLAR	++
	İLİŞKİLİ GENLERDE MUTASYON (p53, ATM, NBS1, LKB1)	++
	İYONİZE RADYASYONA MARUZİYET (çocuklukta)	++
	BENİGN MEME HASTALIKLARI GEÇMİŞİ	++
	GEÇ MENAPOZ (>54)	++
	ERKEN MENARŞ (<12)	++
	HİÇ DOĞUM YAPMAMA VE İLK DOĞUMUN GEÇ OLMASI	++
	YÜKSEK MAMOGRAFİK MEME YOĞUNLUĞU	++
	HORMON TAKVİYESİ	+
	ORAL GEBELİK ÖNLEYİCİLER	+
	MENAPOZ SONRASI OBEZİTE	+
	UZUN BOY	+
	ALKOL TÜKETİMİ (~1 günde)	+
	IGF-1 (insülin-benzeri büyüme faktörü-I) YÜKSEKLİĞİ	++
	YÜKSEK PROLAKTİN SEVİYESİ	+
	DOYMUŞ YAĞ VE FAZLA PIŞMIŞ ET TÜKETİMİ	+

Şekil 5. Meme kanseri risk faktörleri (Dumitrescu ve Cotarla, 2005’ten değiştirilerek alınmıştır)

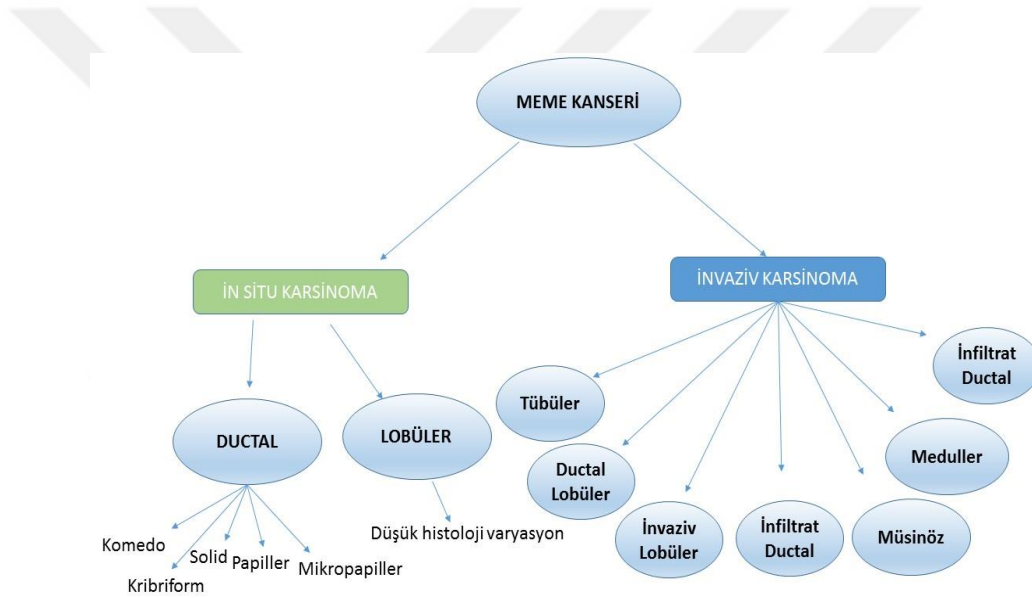
Yaş ve cinsiyet dışında coğrafi durum da meme kanseri vakalarının sayılarında ve meme kanserine bağlı ölüm sayılarında değişikliklere neden olabilmektedir. Endüstriyel öncülüğe sahip Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya gibi bölgelerde bulunan ülkelerde görülen meme kanseri vaka ve ölüm sayıları daha az endüstriyel gelişmelerin olduğu Asya ve Afrika gibi bölgelerde bulunan ülkelere kıyasla oldukça yüksektir (Byrne ve ark. 1995).

Meme kanserinin meydana gelmesinde cinsiyet, yaş, ırk gibi risk faktörlerinin yanı sıra bireyin ergenlikten menapoza kadar geçen doğurganlık hikâyesi, ailede meme kanseri vakasının olup olmaması gibi genetik faktörler ve çevre faktörleri de oldukça önem arz etmektedir. Doğurganlık açısından östrojen hormonuna maruz kalınan sürenin erken menarş ve geç menapoz gibi nedenlerden dolayı normalinden uzun sürmesi, hiç doğum yapmamış olmak veya ilk doğumun geç yapılması gibi durumlar meme kanseri görülme sıklığının artmasıyla yakından ilişkilidir (Hsieh ve ark. 1990, Colditz ve Roster, 2000). Genetik faktör meme kanseri açısından ciddi bir risk faktörüdür. Aile bireylerinden birinde görülen meme kanseri vakası, bireyin yakalanma riskini yaklaşık 2 kat artırmaktadır. Genetik çalışmalarının artması ve kanserin moleküler yapısının daha iyi anlaşılmasına başlamasıyla birlikte kalıtsal meme kanseri ile ilişkilendirilen Breast Cancer Type 1 (BRCA1), Breast Cancer Type 2 (BRCA2), Tumor Protein 53 (TP53) ve Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) gibi çeşitli genler tanımlanmıştır. Tanımlanan genlerde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon ile meme kanserinin meydana gelmesi neredeyse kaçınılmaz görülmektedir (The Lancet 2001).

Meme kanseri risk faktörleri sadece yaş, cinsiyet vb. gibi nedenlere bağlı kalmamakta ve bireyin sosyoekonomik durumu, radyasyona maruziyet, hormon replasman tedavisi gibi faktörlerin de risk oluşturabileceği bilinmektedir (Kelsey ve ark. 1981).

2.1.1.2. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

Histolojik olarak meme kanseri iki sınıfa ayrılmaktadır. İn-situ karsinom ve invaziv karsinom olarak iki ve her bir kategori kendi altında yapısal farklılıklar gösteren çeşitli alt sınıflara ayrılmaktadır. İn-situ karsinom sitolojik olarak birbirinden ductal ve lobüler olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Ductal meme karsinomu en yaygın görülen meme karsinomu olarak bilinmekte ve beş farklı alt sınıfa (Komedo, Papiller, Mikropapiller, Solid ve Kribriform) ayrılmaktadır (Şekil 6) (Malhotra ve ark. 2010).



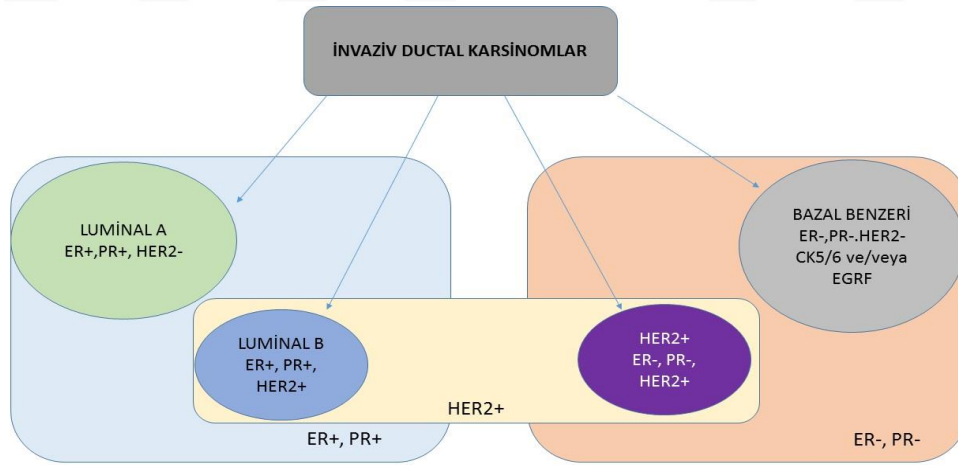
Şekil 6. Meme kanseri histolojik sınıflandırma (Malhotra ve ark. 2010'dan değiştirilerek alınmıştır).

Meme kanseri hücrelerinin öncelikle yakın çevredeki doku ve organlara genel olarak ise tüm vücuda yayılma eğilimi saldırgan-istilacı özelliğini ortaya koymaktadır. İnvaziv olarak adlandırılan kanser hücrelerinin bu yayılmacı yönü in-situ karsinomlara benzer özellikte histolojik olarak farklılaşan alt tiplerdeki heterojen tümörler olarak değerlendirilmektedir. İnvaziv meme karsinomları grubunda yer alan başlıca tümör çeşitleri; tübüler, ductal lobüler, invaziv lobüler, infiltrat ductal, müsinöz, meduller ve

infiltrat ductal olarak sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırma içerisinde yer alan alt tipler istila yetenekleri açısından değerlendirildiğinde infiltrat ductal meme kanseri tüm lezyonların %80'ini oluşturmaktadır (Li ve ark. 2005, Lester ve ark. 2009).

2.1.1.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

Son yıllarda gen profillerinin analizlerine yönelik çalışmaların artması ile tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi meme kanserinde de farklı moleküler alt tipler tespit edilmiştir (Şekil 7). Klinik çalışmaları açısından farklı boyutlarda heterojenlik gösteren meme kanseri moleküler anlamda “Hormon reseptör pozitif” ve “Hormon reseptör negatif” olarak iki ana başlık ile sınıflandırılmıştır. Hormon reseptör pozitif meme kanserleri iki alt tipte incelenmektedir. Luminal A ve Luminal B olarak adlandırılan bu iki alt tip luminal sitokeratinlerinin oldukça yüksek ifade edilmeleri sebebiyle bu şekilde adlandırılmışlardır. Aynı zamanda normal meme dokusu luminal epitelyal hücrelerin genetik markerlarının da yüksek ifadeleri ile bilinmektedirler (Geyer ve Reis-Filho 2009, Schnitt 2010, Maciejczyk 2013).



Şekil 7. Meme kanseri moleküler sınıflandırma (ER: Estrogen Reseptör, PR: Progesteron Reseptör, HER2: Human Epidermal Growth Reseptör 2) (Sandhu ve ark. 2010'dan değiştirilerek alınmıştır).

Luminal A tipi hormon reseptör pozitif grubundan olan meme kansinomu tüm meme kanserleri içerisinde yaklaşık olarak %60 oranında yer kaplamaktadır. Luminal A tipi tümörler genellikle iyi prognoz özelliği göstermekte ve hormon tedavileri ile yanıt alınmaktadır (Satiriou ve Puztai 2009).

Luminal B tipi tümör hormon reseptör pozitif sınıfında yer alan bir diğer meme kanser tümörüdür. Tüm meme kanserleri içerisinde yaklaşık %15 yer kaplamakta ve prognoz açısından değerlendirildiğinde orta düzey olarak kabul edilmektedir. Luminal A tipi ile benzerlik göstermekle birlikte daha fazla agresif, yayılcı ve kötü prognoz özelliği ile öne çıkmaktadır (Schnitt 2010, Malhotra ve ark. 2010).

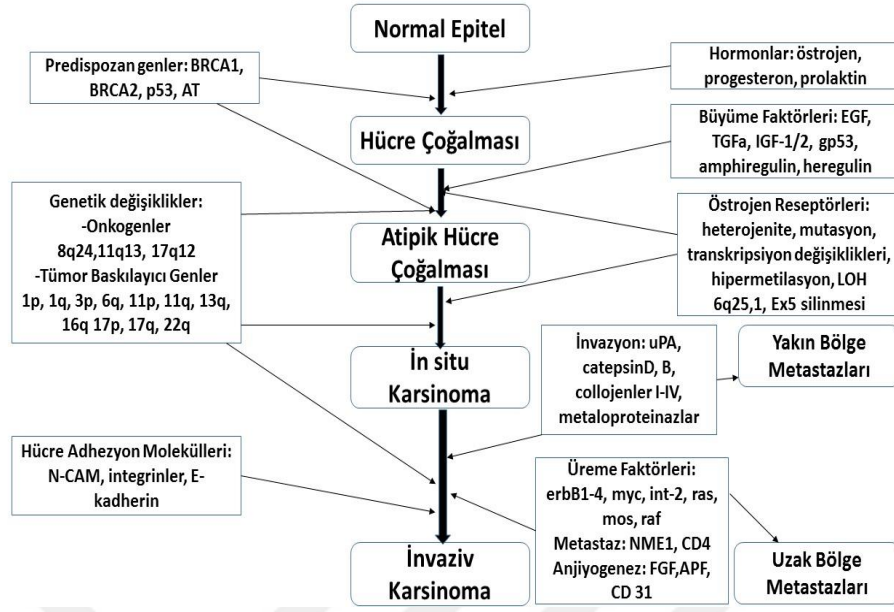
Hormon reseptör negatif meme kanserleri olarak adlandırılan moleküler sınıflandırmada ise Human Epidermal Growth Reseptör 2 (HER-2) pozitif ve bazal-benzeri gruplar yer almaktadır. HER-2 pozitif tüm meme kanserlerinin %15'ini oluşturmakta ERBB-2 geninin yüksek ifadesine karşın hormon reseptörlerinin düşük ifadeleri veya hiç ifade edilmemeleri ile karakterizedir (Schnitt 2010, Maciejczyk 2013). HER-2 pozitif oldukça yüksek farklılaşma yeteneğinde ve hızlı bir şekilde lenf nodüllerine metastaz yapma eğiliminde olması ile sınıflandırmadaki diğer meme kansinomlarına göre çok daha kötü prognoz ile değerlendirilmektedir. Bazal-benzeri gruplar hormon reseptör negatif meme kanseri grubunda yer alan bir diğer tümör grubudur. Tüm meme kanserleri içerisinde %15 orana sahip olup gen çalışmaları neticesinde değil de patolojik çalışmalar sonucu ortaya konması ile diğer alt tiplerden ayrılmaktadır ve aynı zamanda kötü prognoz yeteneğindedir (Laaskso ve ark. 2005, Moinfar 2008).

2.1.1.4. Meme Karsinogenezinde Genler

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de kanser mekanizması tek bir hücreden dokuya, dokulardan organlara sıçramasına kadar kompleks bir yapıya sahiptir. Meme kanserinin tümör oluşana kadar ki süreci bu kompleks yapıdan dolayı çok aşamalı karsinogenez olarak tanımlanmaktadır (Şekil 8). Meme kanserinin evrimi ve genetik açıdan predispozan etmenlerin somatik farklılaşmalarla etkileşimi oldukça

karmaşıktır. Hormonlardan büyüme faktörlerine, predispozan genlerden genetik değişikliklere, östrojen reseptörlerinden tümör baskılayıcı genlere ve onkogenlere kadar çok aşamalı komplike bir sistem mevcuttur. Bu çok aşamalı karsinogeneizde normal epitelyal hücre öncü kötü huylu anormal hücreye dönmekte ve sonrasında klonlanma yöntemi ile hücre çoğalması gerçekleşmekte ardından öncü kötü huylu lezyona ve daha sonra da in situ karsinoma evresine geçmektedir (Beckmann ve ark. 1997). İn situ karsinoma evresinde meydana gelen lezyonlar saldırgan tutum gösterip invaziv hale geldikten sonra lenf ve kan damarları vasıtasıyla önce yakın doku ve organlara ardından tüm vücuda yayılarak bağışıklık sistemini etkisiz hale getirerek metastaz evresine geçmektedir. Tümör oluşum süresince gerçekleşen her bir adımda kanser hücresi seçici olarak bir avantaj elde etmektedir. Kanser hücresinin kazandığı bu avantajlar neticesinde büyüme ve yeni özelliklere sahip olacağı genetik sürecin içerisine girmektedir. Genetik süreç içerisinde meydana gelen olaylar kromozomların translokasyonu, genlerin kuvvetlendirilmesi-redunanzı ve nokta mutasyonları olduğu gibi kromozom yitikleri, gen duplikasyonları da yer almaktadır. Meydana gelen bu olaylar genlerin ifadesinde bir takım değişiklikler ile sonuçlanmakta ve sonrasında tümör oluşum süreci başlatılmaktadır (Kenemans ve ark. 2008).

Tümöröenezis olarak adlandırılan tümör oluşum sürecinde hücre içinde meydana gelen olaylarda değişik etkiler gösteren üç farklı gen grubu mevcuttur. *Onkogenler* olarak adlandırılan ve normal fonksiyonlara sahip proto-onkogenlerin mutasyonu ile oluşan gen grubu, hücre büyümesinde önemli rolü ile kanser oluşumuna neden olan bir faktördür. Proto-onkogenler hücrede büyüme, çoğalma ve farklılaşma için alınan sinyalleri zardan çekirdeğe kadar iletmekle görevli olan genlerdir. Meydana gelen mutasyonlar ile proto-onkogenlerin yapısında oluşacak hasar, genin yapısını değiştirir ve hücrenin kontrol mekanizması ortadan kaldırır (Gelman 1998).



Şekil 8. Meme kanserinde çok aşamalı karsinogenez (BRCA1/2: Breast Cancer type 1/2 susceptibility protein, AT: Ataxia telangiectasia, p53: Protein53, N-CAM: Neural Cell Adhesion Molecule, E-kadherin: Epitelyal katerin, uPA: urokinase-type Plasminogen Activator. erbB1: epidermal growth factor, int-2: FGF3, FGF: Fibroblast Growth Faktor, APF: Alpha Fetoprotein, CD31: Cluster of Differentiation 31, TGFα: Transforming Growth Faktor a, IGF1/2: Insulin-like Growth Faktor1/2, LOH: Loss of Heterozygosity) (Beckmann ve ark. 1997'den değiştirilerek alınmıştır).

Bir diğer gen grubu *tümör supresör genler* onkogenler ile birlikte kanser oluşum sürecinde rol alır ve zıt yönlü bir çalışma sergiler. Tümör supresör genler hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve hücre ölümüne sebep olan unsurları engelleyen proteinleri ifade etmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin bu ifadesi hücrenin büyümesinde görevli genlerin üzerindeki kontrolü ile tümör oluşumunu engellemektedir. Meydana gelen genetik farklılıklar ile tümör baskılayıcı genlerin yapı ve işlevlerinde oluşacak hasar, tümör baskılayıcı genlerin hücre büyümesi üzerindeki kontrolünü ortadan kaldırarak kanserin gelişimine katkı sağlamaktadır (Fearon ve Bommer 2008). Meme kanseri tümörgenezisinde üçüncü ve son grup DNA'nın yapı ve bütünlüğünü korumak üzere hasar mekanizması olarak işlevi olan *DNA tamir genleri* olarak adlandırılan gruptur. İyonize radyasyon, UV ve birçok kimyasal ajan DNA'ya zarar vermekte ve mutasyonlara neden olmaktadır. DNA'nın kendini tekrarlama aşamasında meydana gelen hatalar da mutasyonlara neden olmaktadır. DNA hasar mekanizması oluşan bu mutasyonları en düşük seviyede tutacak bazı DNA

tamir genlerine sahiptir. Bu genlerde oluşacak mutasyonlar ise oluşan mutasyonları önleyemediği gibi DNA onarımına engel teşkil etmekte ve birikmesine sebep olmaktadır. Bir süre sonra hücrede meydana gelen birikme, hücrenin tamir kapasitesini aşarak DNA'nın kendini tekrarlama evresinde ortadan kaldırılamayan hasarlar ile birlikte yeni mutasyonların temel kaynağına dönüşmektedir (Loeb 2001, Wilson 2002).

2.1.1.5. Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler

Meme kanseri araştırmalarında yapılan gen analizleri, kanser oluşumunun bazı onkogenlerin aktivasyonuna yol açan bazı genetik değişiklikler ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Fearon ve Bommer 2008). Kanser oluşumuna onkogenlerin katkısı hakkında iki farklı hipotez öne sürülmüştür. Onkogenlerin ekspresyon seviyesindeki kantitatif değişiklikler ve onkogen yapısında meydana gelen değişiklikler olarak belirtilen bu hipotezler onkogenlerin kanser oluşumuna nasıl etki gösterdiklerini anlamak açısından açıklayıcı olmaktadır. Onkogen aktivasyonuna sebep olan moleküler mekanizmalar gen redunanzı-amplifikasyonu, nokta mutasyonları veya kromozomal mutasyon mekanizmalarıdır. Bu moleküler mekanizmalarda meydana gelen mutasyonlar ile ortaya çıkan onkogenler ve bu onkogenlerin ürünleri hücrede tutundukları bölgelerde spesifik etkileri ile hücrenin fizyolojik aktivitesinde bir takım değişiklikler oluşturmaktadırlar. Proto-onkogenler, dizilerindeki tek bir bazın değişmesi ile onkogenlere dönüşebilmektedirler. Somatik hücrelerde onkoproteinlerin sentezlenmesine yol açarak hücre bölünmesi ve gelişimini uyarıp kanser meydana getirmektedir. Meme kanserinde hücresel yollar tüm kanser türlerinde olduğu gibi genetik mekanizmalar tarafından etkilenmekte ve biyolojik olayların sıkı ilişkisi göz önüne alındığında teşhis ve tedaviye yönelik uygulamalar sorun olmaya başlamaktadır. Meme kanserinde etkili olan ve proto-onkogenlerin mutasyonları sonucu meydana gelen onkogenler *cerB-2*, *c-myc*, *CCND1*, *Cyclin E* ve *RAS* genleri olarak bilinmektedir (Osborne ve ark. 2004).

2.1.1.5.1. *cerB-2* Onkogeni

HER-2/Neu veya p185 adlarıyla da bilinmekte olan *cerB-2*, 185 kDa (kilodalton) büyüklüğünde 17.kromozomda q12'ye yerleşmiş, hücre bölünmesine ve farklılaşmasına katılmaktadır. Meme kanseri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilen *cerB-2* geni, gen amplifikasyonu ve yüksek ekspresyon sebebiyle kanser patogenezeine katılmaktadır. *cerB-2* plazma membranına yerleşmiş ve meme kanseri çalışmalarında ve tedavisinde oldukça fazla üzerinde durulan onkogenlerden biridir (Kurebayashi 2001). HER'in tüm üyeleri (HER/1,2,3,4) arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon *cerB-2* sinyal yolağını aktif hale getirmektedir. *cerB-2* geninin amplifikasyonu ya da protein miktarının fazla ifade edilmesi meme kanseri vakalarında neoplastik hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Kopya sayısının artması ile tümörün şiddeti arasındaki ilişki oldukça anlamlı olarak ifade edilmiştir. Metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinde *cerB-2* 'nin kopya sayısı kötü prognozla yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalar *cerB-2* geninin tek başına bile prognostik bir faktör olabileceğini göstermiştir (Allred ve ark. 1992).

2.1.1.5.2. *c-Myc* Onkogeni

8q24 kromozomuna yerleşmiş 62 kDa büyüklüğünde, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozla ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir fosfoprotein olan *c-Myc* geninin amplifikasyonu hücre döngüsünde bozulmaya neden olarak p53'e bağlı yoldan hücreyi apoptoza yollamaktadır (Facchini ve ark. 1998). *c-myc* 'nin fazla ekspresyonu veya gen yapısındaki mutasyonlar meme kanserine neden olmaktadır. Meme karsinomlarının yarıya yakınında *myc* proto-onkogeni normal sayısından birkaç kat fazla klonlanmış olduğu, invaziv duktal meme karsinomlarında ise *myc* geninde bir takım değişiklikler olduğu belirtilmiştir. *c-myc*, hücre döngüsünün G1 ve S aşamalarındaki geçiş mekanizmasında regülatör görevinde olan siklin ve siklin bağımlı kinaz proteinlerinden *cyclin D1-D2*, *cyclin E*, *CDK2*, *CDK4* ve *p27* genlerini stimüle ederek veya aktive ederek hücre metabolizmasını hızlandırıp, hücrenin çoğalmasına ve genomik istikrarsızlığa neden olmaktadır. Apoptotik mekanizmada ise IL-3 proteini eksikliğinde *c-myc* geninin ekspresyonunda artış, hücre

döngüsünün S aşamasına geçişini gerçekleştirerek hücrede ölüm oranını hızlandırmaktadır (Liao ve Dickson 2000).

2.1.1.5.3. RAS Onkogeni

G proteinleri ailesinden olan ve 21 kDa büyüklüğe sahip olan *Ras* proteinleri guanozin nükleozitlerini bağlama yeteneğindedirler. Önemli bir sinyal iletim molekülü olarak plazma membranında büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın yerleşmişlerdir. Memeli canlılarda *Ras* genleri sırasıyla 1., 11. ve 12. kromozomlarda yer alan *N-Ras*, *H-Ras* ve *K-Ras* olarak kayıt edilmiştir (Osborne ve ark. 2004). GTP ile aktif hale gelirler ve protein kinazlar ile mitozun aktifleşmesinde görev alırlar. *Ras* onkogenik özelliğine nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunda meydana gelen artışlarla sahip olur. Meme kanserinde *Ras* onkogenlerinde en fazla görülen mutasyon şekli aşırı ifade edilmesidir. *H-ras*'ın aşırı ekspresyonu lenf nodüllerine sıçramış metastazlarda ve ileri evre tümörlerde görülmüştür. *Ras*'ın yüksek ekspresyonu hiperplastik harabiyetler ile kıyaslandığında invaziv meme karsinomalarında daha yüksek bulunmuştur (Gelman 1998).

2.1.1.6. Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcı Genler

Meme kanserinde, kanser hücrelerinin oluşumu ve ardından tümör dokusunun meydana gelmesinde onkogenik faktörlerde gerçekleşen farklılıklarla birlikte birçok biyolojik ve hücre metabolik yollarda görev alan tümör supresör genlerin de inaktivasyonuna sebep olan çeşitli genetik değişimler söz konusudur (Osborne ve ark. 2004). Tümör supresör genlerin aktivasyonu hücrenin dönüşümünü engellemekte, inaktivasyonu ise kanser hücrelerinde büyüme ve çoğalma için gerekli olan proteinleri kodlamaktadır. Tümör supresör genlerin inaktivasyonları farklı genetik mekanizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Kromozomal delesyonlar, intragenik mutasyonlar ve metilasyon aracılı transkripsiyonel susturulma ya da proteolizis artışı sonucu oluşan ekspresyon kayıpları gibi mekanizmalar tümör supresör genleri inaktive ederek apoptoz, DNA hata tamiri, sinyal iletimi, hücre döngüsü gibi hücrenin önemli fizyolojik fonksiyonlarını etkilemektedir. Meme kanseri üzerine yapılan araştırmalar

tümör supresör genlerin çeşitli fonksiyonları ve hücrel yerleşimleri ile meme karsinogenezinde önemli yeri olduğunu ortaya koymuştur. Öncelikle ailesel meme kanserinin ortaya çıkmasında önemli rolü olan *BRCA1* ve *BRCA2* genleri genetik çalışmaları açısından dikkat çekmekte ve bu genlerle birlikte *TP53*, *PTEN*, *FHIT* ve *RB1* genleri tümör supresör genleri içerisinde yer almaktadır (Oliveira ve ark. 2005).

2.1.1.6.1. *BRCA1* ve *BRCA2* Genleri

Meme kanserinin meydana gelme sürecinde çeşitli genlerin rollerinin bulunmasıyla birlikte, teşhis konulan vakaların %5'i ile %10'unda otozomal geçiş görülmektedir. Özellikle kalıtsal sürekliliği korumada işlevsel proteinleri üretmekte olan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin germ hücrelerindeki mutajenik varyasyonları genetik meme kanseri oluşumunda rol oynamaktadır. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri meme kanseri oluşumunda ailesel meme kanseri sınıflandırmasına dâhil edilmişlerdir. Ailede meme kanseri hikâyesi mevcut olduğu durumlarda bireyin meme kanserine yakalanma riski %50-85 oranlarında olduğu belirtilmiştir (Wooster ve ark. 1994, Griffith ve Olin 2012).

BRCA1 geni 1863 amino asitlik proteinleri kodlayan bir gen olarak 17q21. kromozomda yer almaktadır. *BRCA2* geni ise 3418 amino asitlik proteinleri kodlayan gen olarak kromozom 13q12'de yer almaktadır. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kodladığı proteinlerin, hücre çoğalmasının denetiminde tümör baskılayıcı proteinler, transkripsiyon denetiminde yer alan proteinler, hücre döngüsünün denetimin basamaklarının önemli proteinleri ve DNA hasar ve tamir mekanizmasında rol alan proteinler ile yakın ilişkili oldukları belirtilmiştir (Wooster ve ark. 1994, Griffith ve Olin 2012). Genetik sürekliliğin denetiminde işlevsel olan DNA hasarında ve hasar sonucu tamir mekanizmasında rol alan tümör baskılayıcı gen özelliği gösteren *BRCA1* ve *BRCA2* genleri başta meme kanseri olmak üzere pankreas, prostat ve yumurtalık kanserlerinde mutasyonlarla birlikte aktivasyonlarını kaybetmektedirler. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar, kodladıkları proteinlerin de aktivasyonlarını kaybetmelerine neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürmektedirler (Wooster ve ark. 1994, Griffith ve Olin 2012).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinde oluşacak mutasyonlar ailesel meme kanseri vakalarının yaklaşık %10'undan sorumlu olmaktadır. Meme kanseri sınıflandırmasına bakıldığında büyük bir oran teşkil eden triple-negatif meme kanserinin tanı, teşhis ve tedavisinde, kalıtsal yatkınlık genleri olarak *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonların detaylı incelenmesi oldukça önem arz etmektedir (Griffith ve Olin 2012).

BRCA1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan kanser vakalarına bakıldığında erken yaş meme kanserleri göze çarpmaktadır. Bu tip erken yaş kanserleri kötü prognoz, invaziv duktal karsinoma ve triple negatif kanserler olarak tanımlanmaktadır. *BRCA2* geni mutasyonlarının sonucunda oluşan meme kanseri ise invaziv lobüler ya da tübüler lobüler sınıfta konumlandırılmaktadır. *BRCA2* mutasyonu sonucu oluşan meme kanserleri ileri evre kanserleri olarak değerlendirilmekte, çevre ve yaşlılık etkisi sonucunda meydana gelen, bir diğer ifade şekliyle de DNA hasarının zamanla birikmesi ile oluşan kanser türleri arasında gösterilmektedir (Wooster ve ark. 1994, Alpert ve Haffty 2004).

BRCA1 ve *BRCA2* genlerinde oluşan mutasyonun toplumsal oranlamalarında farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Genetik olarak bazı etnik gruplarda oldukça özel mutasyon çeşitleri belirlenmiştir. Aşkenazi Yahudilerinde ve Ruslarda “*founder mutation*” olarak bilinen bir mutasyon çeşidinin, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde bu ırklara özgü olarak varlığı tespit edilmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde genlerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde Türk nüfusunda bu mutasyon oranlarının yaklaşık %10 civarında olduğu belirlenmiştir (Roa ve ark. 1996, Egeli ve ark. 2006).

2.1.1.6.2. TP53 Geni

Tümör gelişiminde rol aldığı ortaya konulan p53'ün mutasyonlarından biri olarak kabul edilen TP53, DNA tamir mekanizması, apoptozis, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve hücre döngüsünün kontrolünde görev alan bir gendir. P53 genlerindeki mutasyonu önleyerek, mekanizmada stabiliteyi korumadaki rolüne atıfla “genlerin koruyucusu olarak tanımlanmış” ve TP53, tümör protein P53, tümör

supresör p53 gibi isimlendirilmiştir (Strachan ve Read 1999). TP53 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 20 kb'lık bir alanda 11 ekzonluk bir gen tarafından kodlanmaktadır (Varley ve ark. 1997). P53 ilk tanımlandığı dönemlerde birçok tümör çeşidinde aktivasyon gösterebileceği hipotezi üzerinde durulmuştur (Polager ve Ginsberg 2009). Neredeyse tüm tümör türlerinden en az yarısında p53'ün mutasyonları gözlemlenmiştir ve bu mutant genlerin birden fazla mekanizma ile aktive edileceği bildirilmiştir. Bu mekanizmalardan birisinde DNA virüsü proteinleri kodlamakta ve p53'ü inaktif hale getirmektedir. Gerçekleşen döngü ile birlikte Human Papilloma Virüsü (HPV) 16 ve 18 serviks kanserinde tespit edilmiştir (Levine ve Oren 2009, Ferenczy ve Franco 2002). Bir başka mekanizma ise upregulasyon mekanizmasıdır. P53'ün önemli bir negatif düzenleyicisi olan Mouse Double Minute 2 Homolog (Mdm2), p53'ü strese uzak tutmaya yardımcı olur. Mdm2'nin bazı tümörlerde aşırı ifadesi p53'ün inaktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Marine ve Lozano 2010). TP53 geninde meydana gelen değişimlerle birlikte oluşan mutasyonların meme kanserindeki sıklığı yaklaşık olarak %30'dur. TP53 mutasyonu tespit edilen bireylerde HER2'nin aşırı redunansı belirlenmiştir ve mutasyonların tümör alt tipleriyle ilişkili olacağı belirtilmiştir (Dumay ve ark. 2013).

2.1.1.7. Meme Kanserinde Metastaz

Metastaz, tümör hücrelerinin orjinlerinden ayrılarak uzak doku ve organlara yerleşip sekonder tümörler oluşturmasıyla belirgin olan, migrasyon ve invazyon gibi tümör hücrelerinin göçü ve ulaştıkları bölgeyi istila etmesi gibi süreçleri de kapsayan kontrolsüz faaliyetler olarak adlandırılmaktadır. İntravazasyon olarak da ifade edilen metastaz oluşumu belli bir süreçten meydana gelmektedir. Bu süreç içerisinde kanser hücresi kendisini tedavi için kullanılan takviye ajanlara ve bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılmasına yönelik girişimlere karşı dirençli olmak adına bir takım özellikler edinmektedir. Sahip olduğu bu özellikler kanser ile mücadelede işleri zorlaştırmakta ve bu nedenle uzak bölge metastazları kanser açısından kötü prognoz olarak değerlendirilmektedir. Metastaz, kanser hücrelerinin yeni oluşan veya oluşmakta olan damarlar aracılığı ile dolaşıma girmesi, lenf sistemine girerek farklı

lenf nodları aracılığıyla sekonder tümörler oluşturması ve vücut boşluklarından bitişik doku veya organlara geçmesi şeklinde yayılmaktadır (Lüleyap 2008, Maricic 2006).

Kanserin metastaz yaptığı doku ve organlara yayılımı tümörün çeşidine, bulunduğu yere ve metastatik hücrenin dağılım yoluna bağlı olarak değişim göstermektedir. Kanser hücrelerinin en fazla metastaz yaptığı yerler karaciğer dokusu, beyin, akciğer, kemik dokusu ve adrenal bezler olarak bilinmektedir. İlk olarak 19.yy'da Stephen Paget, metastaz yapmış meme kanserinden hayatını kaybeden 700 kadına yaptığı otopside kanser hücrelerinin dokulara yerleşme eğilimlerinin özelleşmiş olduğunu tespit etmiştir. Paget çalışmasında meme kanseri hücrelerinin fizyolojik kalsiyum ihtiyaçlarının, kalsiyum açısından zengin olan kemiklere metastaz yaptıklarını ortaya koymuştur (Wong ve Pavlakis 2011).

Metastatik kanserde tedavi, genellikle metastazı uzaklaştırmak ya da nötralizasyonunu sağlamayı, lokalize metastazları terapi ile yok etmeyi ve yeni oluşumları engellemeyi hedeflemektedir. Lokal kanser tedavisinde cerrahi müdahaleler etkili olmaktadır. Sistemik kanserde ise cerrahi öncesi veya cerrahi sonrası kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavileri söz konusu olmaktadır. Tedavilerden herhangi birinin veya kombinasyonlarının tercih edilmesi kanser türüne, metastatik olup olmadığına, sayı ve yerleşim yerine, yaş, genel durum gibi birçok faktöre bağlıdır. Metastatik kanserlerde her geçen gün etkili ve tolere edilebilir tedaviler bulunması için çalışmalar artmakta ve yeni yöntemler hedeflenmektedir (Sosic ve ark 2003, Burdall ve ark 2003).

Meme kanseri araştırmalarında ortaya konan verilere göre invaziv meme kanserli hastalar tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık %30'unu, kansere bağlı ölümlerin ise %15'i kadarını oluşturduğu belirtilmiştir. Primer meme kanserine maruz kalan hastaların, meme kanserinin moleküler biyolojisi üzerine çalışmalar ve bu çalışmalara bağlı gelişmeler, erken tanı yöntemleri ve çeşitlenen tedavi olanaklarına rağmen, tedavileri sonrasında yaklaşık %35'inde meme kanserinin tekrardan ortaya çıktığı görülmektedir (Abramovitz ve Leyland-Jones 2006). Uygulanan tedavilerin metastatik meme kanseri hastalarının yaşam sürelerini uzattığı görülse de kanser

hücrelerinin geliştirmiş oldukları direnç ve direnç mekanizmalarının karmaşıklığı kanserin tekrardan ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konan bazı veriler, hormon reseptör pozitif meme kanseri vakalarının yarıya yakınında endokrin tedavide kullanılan tamoksifen adlı ilaca karşı yanıt alınmadığını göstermektedir. Uygulanan kemaoterapi ajanlarına karşı %40 oranında bir yanıt alınmasına rağmen triple-negatif meme kanserli hastalarda rezidüel hastalık varlığı ve tekrar ortaya çıkma riskinin ilişkili olabileceğı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile meme kanserinin yeniden ortaya çıkması ve metastaz sürecinde etkili olan moleküler mekanizmaların farklılık gösterdiğine dair bilimsel görüşler öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda ortaya konan veriler, meme kanserinde metastatik boyutun davranışsal açıdan saldırgan, fenotipik açıdan değışen, primer kanser hücreleri içerisinde bulunan hücre alt populasyonlarının moleküler profillerinde oluşan genetik ve epigenetik farklılıklardan meydana geldiğini göstermektedir (Bertram 2000, Vannini ve ark. 2015).

2.1.1.8. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde genel olarak cerrahi yöntem, radyoterapik yöntem ve kemoterapik yöntem kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerine ek olarak hormon terapisi ve biyolojik yöntemler de kanser tedavisine farklı yaklaşımlar olarak temel tedavi yöntemlerine destek olarak uygulanmaktadır. Tedavide kullanılan yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Kanser bireye has bir hastalık olması, tedaviye alınan yanıtların her bir bireyde farklılık arz etmesi sebebiyle tek ve kesin bir tedaviden söz etmek neredeyse imkânsızdır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları yalnız başına olabildiğı gibi gerekli şartlarda önce cerrahi müdahale ardından da radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları yapılabilmektedir (Baykara 2016).

Meme kanserinde radyoterapi, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak üzere yüksek enerjiye sahip ışınların veya yüksek enerjili partiküllerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Meme, koltuk altı bölgeleri veya göğüs duvarında cerrahi müdahale sonrasında kalmış olan kanser hücrelerini öldürmek amacıyla tercih

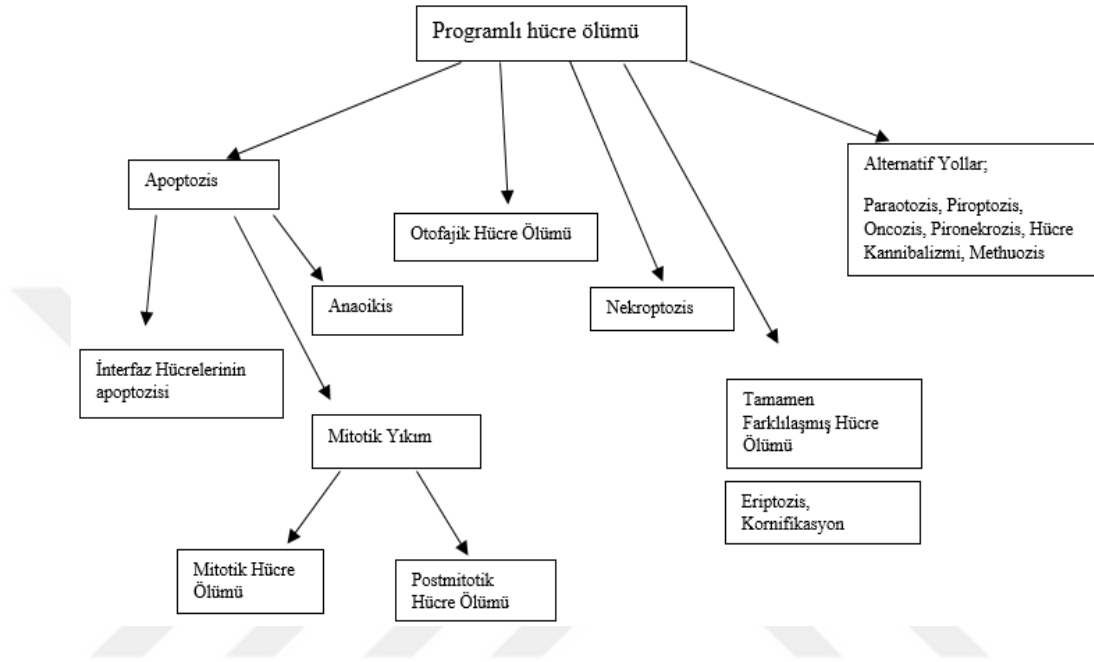
edilmektedir. Meme kanseri semptomları olan ve özellikle merkezi sinir sistemine veya kemik dokusuna yayılmış olan hücreleri öldürmek için de kullanılabilir (Darby ve ark. 2011).

Sistemik terapi olarak da adlandırılan kemoterapi aynı zamanda hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviyi de kapsamaktadır. Kan dolaşımından geçen ve vücudun hemen her yerini etkileyen bir tedavi yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Kemoterapik ajanlar hızlı çoğalma yeteneğindeki kanser hücrelerini hedef alırken hormon tedavisi kanserli hücreleri ve dolayısıyla dokuyu etkileyen hormonların salınımını azaltma, artırma veya bloke etme gibi aktivasyonlar gösterebilen bir mekanizmaya sahiptir (American Cancer Society 2017).

2.2. Apoptozis

Apoptozis hücrenin programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır. Kanserde, hücrenin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi, hasarlı bir şekilde bölünmüş olan veya denetim mekanizmalarından kaçan hücrelerin ortadan kaldırılması gibi birçok metabolik sorunun mekanizmasını tanımlayabilmek adına önemli bir yer tutmaktadır. Normal doku ve organların homeostazisi için düzenlenmiş olan ve aynı zamanda nekrotik olmayan belli bir program döngüsünde hücreyi ölüme götüren sürecin tamamı “apoptoz” veya “apoptozis” olarak adlandırılmaktadır (O’Brien ve Kirby 2008, White 2011). Hücre Ölümü Adlandırma Komitesinin (Nomenclature Committee on Cell Death- NCDD) son güncellemesi ile birlikte çeşitli hücre ölüm tipleri tanımlanmıştır. NCDD’ye göre intrinsik apoptoz, ekstrinsik apoptoz, mitokondriyal geçirgenliğe bağlı nekroz, nekroptozis, piroptozis, parthanatos, entotik hücre ölümü, lizozom bağımlı hücre ölümü, otofaji bağımlı hücre ölümü, immünojenik hücre ölümü, hücre senesens ve mitotik katastrofi hücre ölüm tipleri şeklinde yaklaşık 15 çeşit programlı hücre ölümü literatürde yer almıştır (Şekil 9) (Galluzzi ve ark. 2018). Üzerinde araştırmaların yapıldığı yaygın olanları ise otofajik ölüm, nekroptozis ve apoptozis olarak tanımlanmıştır (Savitskaya ve Onishchenko 2015). Oldukça özenli bir şekilde düzenlenmiş olan programlı hücre ölümü; hücrenin normal işleyişi, immün sistemin düzgün bir şekilde gelişimi, hormonal atrofi ve daha birçok gelişimsel mekanizmadan

sorumludur. Hücrenin çekirdeğinde, kromozomlara kodlanmış olan hücre intiharı girişimi olarak da tanımlanmış olan apoptozisin, bu intihar işlemi ile doku homeostazinde, viral enfeksiyonlarda, fizyolojik hücre ölümünde ve mutasyona karşı savunmada önemli rol oynamaktadır (Kam ve Ferch 2000, Martinez ve ark. 2010).



Şekil 9. Programlı hücre ölümü tipleri (Savitskaya ve Onishchenko 2015’den değiştirilerek alınmıştır).

Programlı hücre ölüm çeşitlerinden olan nekroz ile apoptoz karıştırılmamalıdır. Nekrozun nedenleri ile apoptozisin nedenleri farklılık arz etmektedir. İskemi, hipoksi, hipertermi, litik viral enfeksiyonlar, toksik maddeler ve aşırı oksidatif stres nekrozu meydana getiren nedenlerdir. Apoptozda ise büyüme hormonu eksikliği, insan bağışıklık eksikliği virüsü, hücre yaşlanması, antineoplastik ilaçlar, tümör hücreleri, çok da aşırı olmayan oksidatif stres, TNF reseptör aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler oluşum nedenleri arasında yer almaktadır (D’Archy 2019). Moleküler anlamda apoptozis intrinsik ve ekstrinsik sinyal yolları ile gerçekleşmektedir. Ekstrinsik sinyal yolunda hücre yüzeyinde yer alan bir ölüm reseptörüne, ilgili bir ligandın bağlanması ile başlamaktadır. Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait reseptörlerdir ve TNF-R1, CD95 (Fas), TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 gibi reseptörleri içermektedir. Bir ölüm ligandı hücre yüzeyindeki bir ölüm reseptörüne bağlandığında

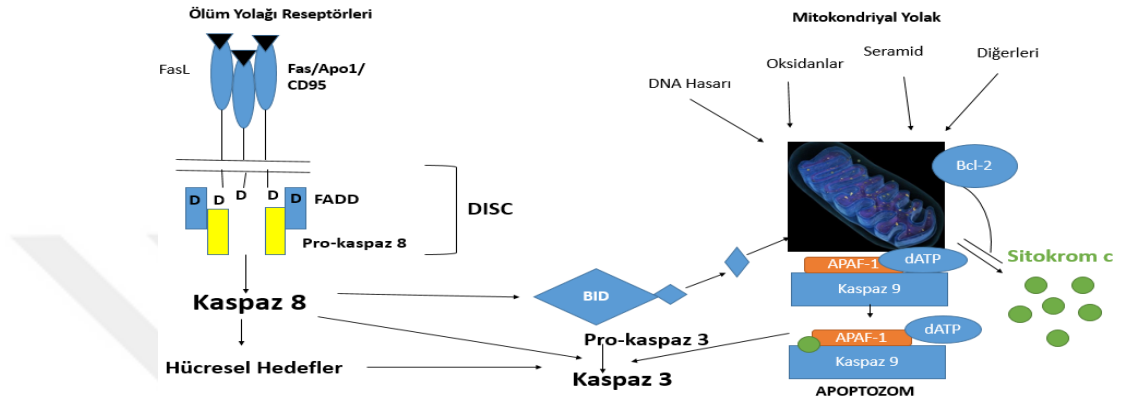
hücre ölüm sinyali verilmiş olmaktadır. Kaspaz-8 seviyelerine bağlı olarak efektör kaspazlar aktive edilmektedir. Yüksek kaspaz-8 seviyelerinde, aktif kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'ü ve diğer efektör kaspazları aktive ederken, düşük seviyelerde proapoptotik sinyaller tarafından BCL-2 aile üyesi Bid'in kaspaz-8 aracılı uyarısı ile gerçekleşmektedir. Bid proteini intrinsik sinyal yolunun aktivasyonuna sebep olarak sitokrom C'nin mitokondriden salınmasına neden olmaktadır (Ashkenazi ve Dixit 1998, Esposti MD 2002).

Apoptozisin intrinsik sinyal yolağındaki süreç ise DNA hasarı ve sitokinlerin yokluğu gibi çeşitli uyaranlar ve hücre içerisinde meydana gelen streslere yanıt olarak oluşup ilerlemektedir. BCL-2 ailesi içerisinde etkileşime giren bazı protein grupları mitokondriyal membrandaki sinyal yolağını kontrol etmektedir. Sadece üç protein alt grubu bu sinyal yolağını kontrol etmekte, BCL-2 gen ailesinden bazı üyeler apoptozisi indüklerken (Bid, Bad, Bax), bazı üyeler de (Bcl-xl) apoptozisi inhibe etmektedir (Chao ve Korsmeyer 1998).

2.2.1. Apoptozisin Oluşum Mekanizmaları

Apoptozis belirli bir düzen içerisinde belirli hücrelerin ortadan kaldırılması, yine belirlenmiş hücrelerin uyaranlar aracılığı ile dışarıdan uyarılması ve de hücrenin otokontrol mekanizması ile kendi kendisini tetikleme şeklinde gerçekleşmektedir. Apoptozisin genel olarak; indüklenme veya tetikleme, pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu, hedef proteinlere saldıran kaspazların kaskadı, organellerin bozulması ve yeniden organizasyonu, hücrenin apoptotik baloncuklara bölünmesi, fagositoz için apoptotik baloncukların hazırlanması gibi adımları takip ettiği bildirilmiştir (Savitskaya ve Onishchenko 2015). Plazma membranı, mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aparatı, lizozomlar, çekirdek, sentrozom ve sentrioller gibi birçok organelin apoptozisin oluşum aşamasında görev aldığı bilinmektedir (Savitskaya ve Onishchenko 2015). Apoptozisin temelde 5 farklı oluşum mekanizmasına-yolağına sahiptir. Bu mekanizmalardan en yaygın olanları, metabolik ve hipoksik stres ile tetiklenen intrinsik yolak, diğeri ise ölüm ligandları olarak bilinen Fas-L ya da TNF- α gibi dışarıdan gelen uyarılar ile tetiklenen ekstrinsik yolaktır (Şekil. 10). Diğer temel

yolaklar DNA hasarında p53 ile aktivasyonu gerçekleşen kaspaz-2 bağımlı yolak, yine kaspazın doğrudan aktive olması ile granzim-B yolağı ve son olarak da DNA fragmentasyonu ile başlayan granzim-A yolağıdır (Grilo ve Mantalaris 2019).



Şekil 10. Memeli hüresindeki apoptozis yolaklar. İntrinsik ve ekstrinsik yolaklar (BID: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (Bh3 interacting death agonist); Apaf1: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1); DISC: Ölüme neden olan sinyal kompleksi (Death-inducing signaling complex) (Celepli ve ark. 2020'den değiştirilerek alınmıştır).

İntrinsik apoptoz; iyonize radyasyon, mitokondride meydana gelen hasar, ileri derecede mutajenik simülasyon, onkojene bağlı olarak gerçekleşen hücre ölümü ve büyüme faktörü gibi bazı uyaranların eksikliğinden veya yokluğundan kaynaklı uyaranlar ile aktive olmaktadır. Bu uyaranlar intrinsik yolaktaki temel regülatör proteini olan BCL-2 proteinlerinin kompleks düzenlenmesine izin vermektedir. Apoptozisin modülasyonunda kalsiyum iyonları, seramid molekülleri, *c-myc* genleri, p53 proteinleri ve başta mitokondri olmak üzere bazı organeller görev almaktadır. Ayrıca hücre içerisindeki kalsiyum iyonu düzeyinde meydana gelebilecek artışlar ve hücrenin pH'ında oluşan azalış apoptozisi uyarmaktadır (Singh ve ark. 2019).

Fas ve FasL tümör nekroz ailesinde yer alan ve transmembran proteinleri olarak adlandırılan proteinlerdir. FasL'in Fas'a bağlandığı esnada apoptozis başlatılmaktadır. Fas ve FasL hücrede immün yanıtın sonlanmasında oldukça

önemlidir. Fas'ın ifadesinin miktarı apoptozisin direnç mekanizması için oldukça önem arz etmektedir. Fas'ın aracı olduğu apoptoziste bazı proteazların aktivasyonu gereklidir (Pfeffer ve Singh 2018). Hücre içerisinde p53 proteini hem DNA'yı bağlamakta hem de p21'i stimüle etmektedir. Sikline bağımlı kinaz ile kompleks oluşturan p21 hücre bölünmesini engellemektedir. Ancak p53'te meydana gelebilecek olan bir mutasyon CDK2'nin bağlanmasını engellemekte ve bu durumdan kaynaklı olarak p21 ile oluşturmaya gereken kompleks oluşmamakta ve yine sonuç olarak hücre çoğalması için durdurma sinyali meydana gelmemektedir. Durdurma sinyalinin oluşmadığı bu durumda da hücrelerin kontrolsüz çoğalması devam etmektedir (D'Archy 2019).

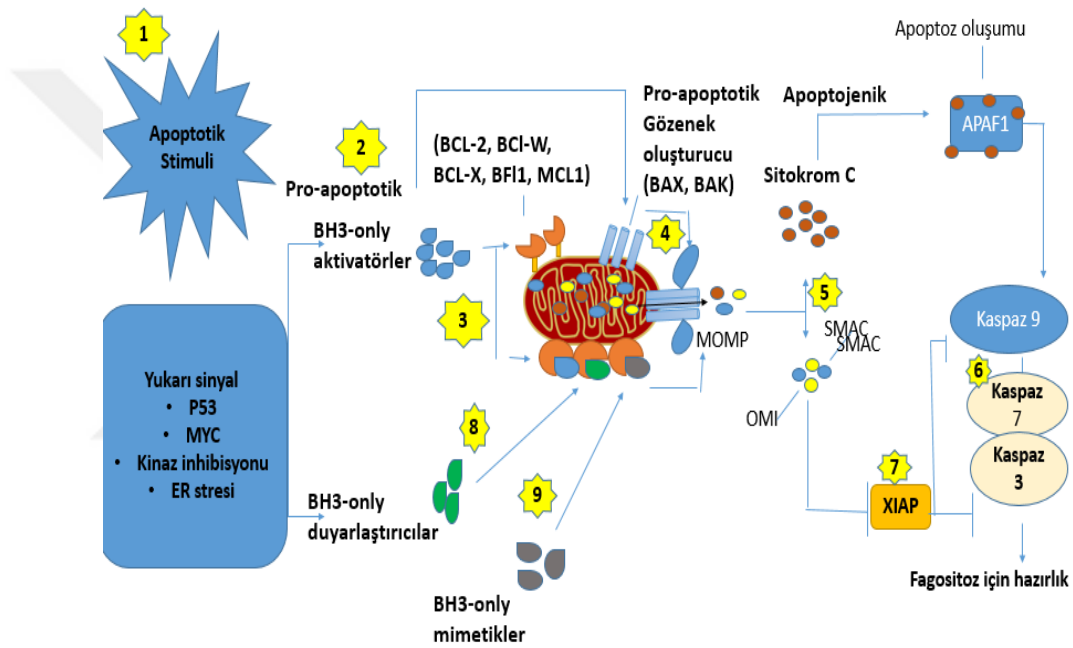
İntrinsik apoptozisin başlangıcında adaptör protein görevi gören Apaf-1 ile mitokondri üzerinden doğrudan sitozole geçen sitokrom C ve inaktif halde bulunan prokaspaz-9'un aktif haldeki kaspaz-9'a dönüşmesi ile meydana gelmektedir. Diğer yandan ekstrinsik apoptoz, adım adım olmak üzere sırasıyla FasL ve TNF- α 'nın hücre membranındaki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanması ile inaktif halde bulunan kaspaz-8'i aktif kaspaz-8'e dönüştürmesi ile meydana gelmektedir. İntrinsik yolda aktivasyonu gerçekleşen kaspaz-9 ile ekstrinsik yoldaki aktivasyonu gerçekleşen kaspaz-8'in her biri sıra ile önce kaspaz-3 ardından kaspaz-6 ve daha sonra kaspaz-7'yi aktive etmektedirler (Elmore 2007).

2.2.1.1. İntrinsik Yol

İntrinsik apoptoz bazı uyarıcıların yokluğunda aktive olmaktadır. Bu uyarıcılar iyonize radyasyon nedeniyle oluşan genotoksik hasar, endoplazmik retikulumda meydana gelen stres, mitokondride çeşitli nedenlere bağlı oluşan hasar, aşırı bir şekilde ilerlemiş mutajenik stimülasyon ve onkojene bağlı hücre ölümü durumları veya büyüme faktörü gibi uyaranlardır. BCL-2 proteinleri proapoptotik işleve sahip olduğu kadar aynı zamanda antiapoptotik yolda da önemli rol oynamaktadır. BCL-2 ailesi üyeleri intrinsik mitokondriyal apoptotik süreçteki merkezi regülatör proteinlerdir. BCL-2 aile üyeleri hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar verirler. BCL-2'nin üyeleri; BCL-2 ilişkili X apoptoz regülatörü (BCL-2 associated X apoptozis regülatör

-BAX), BCL-2 ile ilişkili hücre ölüm proteini agonisti (BCL-2 associated agonist of cell death –BAD), BCL-2 antagonist katili 1 (BCL-2 antagonist killer 1- BAK), BH3 etkileşim ölüm alan agonisti (BH3-interacting domain death agonist-BID), BCL-Xs ve apoptozisi inhibe eden BCL-2, E1B-19K, CED-9, BCL-X₁ olmak üzere geniş bir apoptozis regülatörü olarak tanımlanmış protein ailesi olarak bilinmektedir (Singh ve ark. 2019, Du Toit 2013). Bu protein ailesine mensup olan üyeler birbirleri ile homo- ve heterodimerler oluşturmaktadırlar. Hücresinin yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmesi veya ölümünün gerçekleşmesi üyeler arasındaki denge durumuna bağlıdır. Hücresinin çekirdeğinde kromozomlarda gerçekleşen translokasyonlar ve genlerdeki amplifikasyonlar aile üyelerinin ekspresyon düzeylerini değiştirebilmektedir (Cimmino ve ark. 2005). Şimdiye kadar 25 tane BCL-2 ailesi üyesi tanımlanmıştır (Shamas-Din ve ark. 2013). Aile üyesi olan her bir proteinin homoloji alanları ve alfa sarmalı bulunmaktadır. BH3'ün etkileşim içerisinde olması, apoptotik aktivasyonu kontrol eden homo- ve heterodimerlerin oluşturulmasına izin veren BH3-hidrofobik kanal mekanizması aracılığıyla BCL-2'nin etkileşimini düzenlemekten sorumludur. Etkileşim için bağlanma kanallarının ve BH3 domainlerinin amino asit dizilimlerdeki ufak değişiklikler bu etkileşimlerin özgüllüğünü belirlemektedir. BH'ın apoptozisten sorumlu olan temel alanı BH3 olarak tanımlanmıştır (Flores-Romero ve Garcia-Saez 2019). BCL-2 ailesinin içerdiği BH domainlerine göre temel olarak üç farklı protein grubuna ayrımı tanımlanmıştır. Birinci protein grubu; apoptoz karşıtı aktivasyon gösteren BCL-2 protein grubudur ve bütün BH alanlarını (BH1, BH2, BH3 ve BH4) içermektedir. BCL-XL, MCL1, BCL-W ve A1 proteinleri bu antiapoptotik aktiviteye sahip olan grupta yer almaktadırlar. Mitokondri membranında yer alan ve proapoptotik özellik gösteren BAX ve BAD proteinlerini bloke ederek apoptozisi önleyen BCL-2 grubundaki proteinler apoptoziste oldukça önemli rol oynamaktadırlar. Bir diğer protein grubu ise antiapoptotik aktiviteden ziyade BAX ve BAD gibi proapoptotik aktivite gösteren BCL-2 proteinleri olarak tanımlanmıştır. Antiapoptotik aktivite gösteren BCL-2 proteinlerinin sahip olduğu tüm alanların aksine sadece 3 BH (BH1, BH2 ve BH3) alanı içermektedir. Ayrıca BAX ve BAK proteinlerinin yanı sıra BOK gibi proteinler de bu ikinci grup olan proapoptotik BCL-2 grubunda yer almaktadır. İlk grup protein ailesinin sahip olduğu blokaj yeteneğinden ziyade dış mitokondriyal zarındaki

geçirgenliğin artmasını sağlayarak apoptotik faktörlerin sitozole salınmasına izin verir. Son ve 3. protein grubu ise yine ikinci grup gibi proapoptotik aktiviteye sahip olan BCL-2 proteinleri olarak tanımlanmıştır. Bu son grupta yer alan proteinler ise diğer grupların aksine sadece BH3 alanı içermekte ve direkt olarak mitokondriyal BAX ve BAK ile etkileşimde bulunarak birtakım yapısal değişikliklere sebep olmaktadır. BID, BIM, PUMA ve NOXA gibi proteinler bu gruba örnek teşkil etmektedirler ve bu proteinler mitokondrinin dış zarının geçirgenliği için hayati önem taşımaktadır (Şekil 11) (Kale ve ark. 2018).



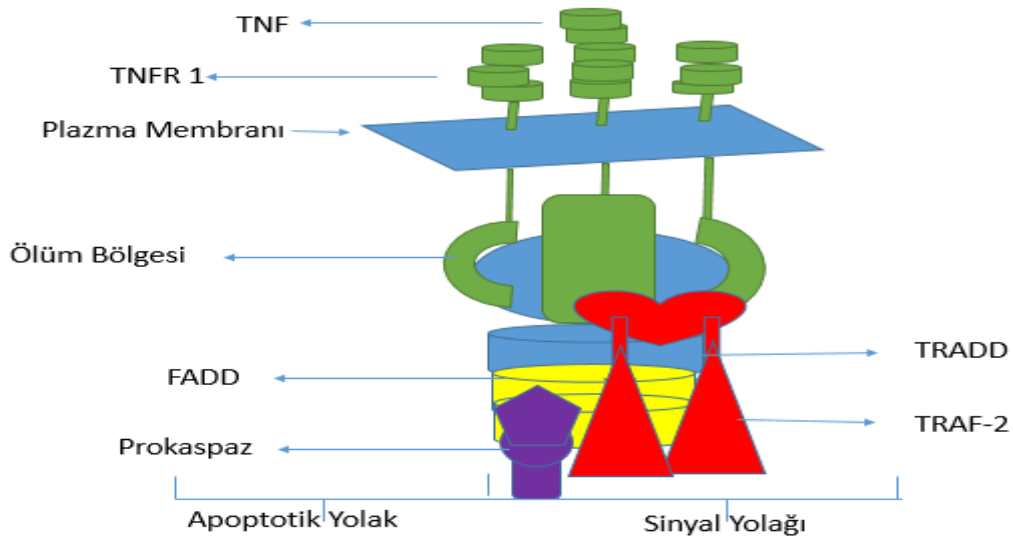
Şekil 11. İntrinsik apoptotik yolak. BCL-2 ailesi etki mekanizması (Celepli ve ark.2020'den değiştirilerek alınmıştır).

BCL-2 proteinlerinden BAX ve BAK'ın mitokondrinin dış zarında gözenekler oluşturabilme yeteneğinde olduğu bilinmektedir. Mitokondrinin dış membran yüzeyinde yerleşmişlerdir ve Apaf-1 ile bağlanmaktadır. Hücre iç hasar durumu söz konusu olduğunda Apaf-1 serbestlenmekte ve (Major Outer Membrane Porin) MOMP ekspresyonu artmaktadır. Bu artış intrinsik apoptotik yolun temel ve ana adımı olarak görülmektedir. MOMP artışı ile birlikte sitokrom C'nin sitozole salınımı gerçekleşmektedir. Serbest kalmış olan sitokrom C ve Apaf-1, kaspaz-9'a bağlanarak ATP'nin de komplekse katılmasıyla Apoptozom adındaki yapı oluşmaktadır.

Apoptozomun oluşması ile birlikte kaspaz kaskadı başlatılmış olmaktadır (Şekil 13). MOMP'ın artırılması veya azaltılması BCL-2'nin pro ve postapoptotik proteinleri aracılığıyla kontrol edilmektedir. Fizyolojik olarak mitokondrinin dış membranı 5 kDa'luk moleküllere karşı geçirgenlik gösterirken MOMP artışı ile birlikte mitokondriyal porlardan 100 kDa'luk moleküllerin geçişi gerçekleşebilmektedir (Peña-Blanco ve García-Sáez 2018, Kalkavan ve Green 2018).

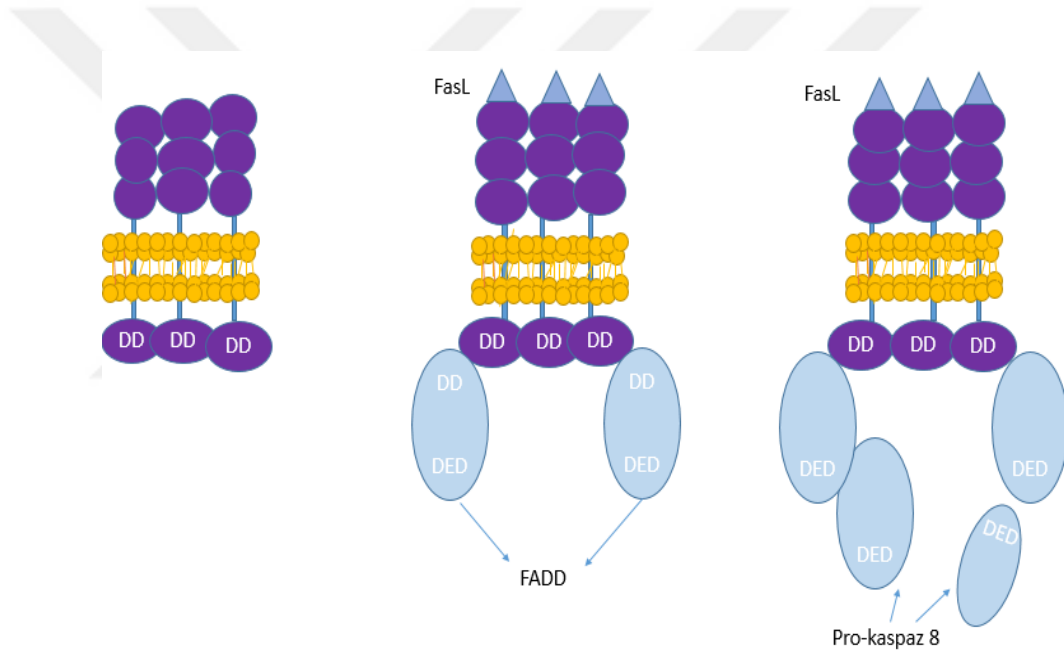
2.2.1.2. Ekstrinsik Yol

Apoptozisin ekstrinsik apoptotik yoluna baktığımızda aktivasyonu gerçekleştirmiş olan T hücrelerini, natural killer hücrelerini ve makrofajları, hedef hücrelerin zar yapısındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlatıldığını görmekteyiz. Fas ve TNF reseptörleri integral proteinlerdir. Tamamlayıcı ölüm aktivatörleri olarak bilinen FasL ve TNF- α 'nın bağlanması ile prokaspaz-8 kaspaz-8'e dönüşerek kaspaz kaskadının aktive edilmesi gerçekleşmiş olur (Şekil 12, 13) (Choo ve ark. 2019).



Şekil 12. Apoptozisin ekstrinsik yolağında TNF- α ve TNFR-1 reseptör (Celepli ve ark. 2020'den değiştirilerek alınmıştır) FADD: Ölüm etki alanına sahip Fas ile ilişkili protein.

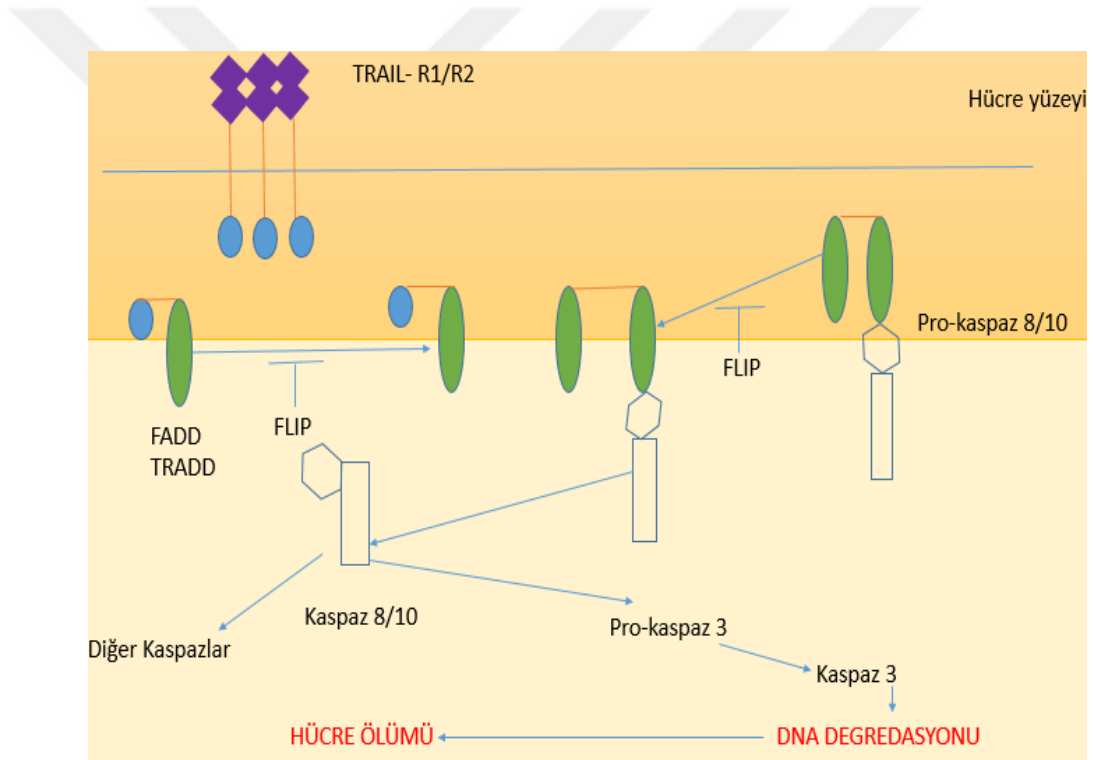
Apoptoziste ölüm reseptörü olarak bilinen reseptörler DR3 (APO-3) DR4 (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1), DR5 (TRAIL R2), DR6 ve CD95 (Fas/APO-1) reseptörleridir. Hücre ölümü için gönderilen hücre ölüm sinyalleri hedef hücrenin üzerinde yer alan TNF ailesi ölüm reseptörlerine bağlanarak etkinleşir. TNF ailesinin bir molekülü olan TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)’ın hem metabolik formunun hem de çözünme yeteneğinde olan formunun birçok kanser türünde marker olarak kullanılmaktadır. Ayrıca otoimmün hastalıklarda da ölüm reseptörleri ile birlikte apoptozisi indüklediği ve bu yönüyle çözünebilir TRAIL olarak bilinen sTRAIL’ın apoptoziste bir gösterge olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Choo ve ark. 2019).



Şekil 13. Apoptozisin Ekstrinsik Yolağında Fas ve FasL (DD: Death Domain; Ölüm Bölgesi, DED: Ölüm efektör alanı) (Celepli ve ark. 2020’den değiştirilerek alınmıştır).

Apoptozisin ölüm ligandları FasL, TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand TRAIL, APO3/APO2 ligandı ve TNF- α ligandları olarak kabul edilmektedir. Burada en iyi bilinen ve en fazla ilgi çeken reseptör-ligand ikilileri FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 çiftleridir (Şekil 14). Fas ile bağlantılı olan ölüm bölgesi (FADD) ve TNF reseptörü ile bağlantılı ölüm bölgesi (TRADD) moleküller uyarlayıcı proteinler olarak ölüm reseptörlerine alınmaktadır. Prokaspaz 8 ve prokaspaz 10 ölümün gerçekleşmesi

için gerekli olan sinyal kompleksi olan DISC'i oluşturmak üzere uyarlayıcı proteinlere bağlanmaktadır. Kaspaz-8 ve Kaspaz-10'un aktivasyonu DISC tarafından gerçekleştirilmektedir. Aktivasyonu gerçekleşmiş olan kaspaz 8 ile kaspaz 10, yürütücü kaspazlar olarak tanımlanan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder. Aynı zamanda acımasız kaspazlar olarak tanımlanabilen kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu gerçekleştiğinde hücre ölümü için ihtiyaç duyulan proteinlerin hücre iskeletlerinin imha süreci başlatılmış olur (Pfeffer ve Singh 2018). Bu durumun yanı sıra kaspaz-10'dan bağımsız olarak kaspaz-8 BID'yi parçalayıp mitokondriden sitokrom C'nin sitozole salınmasına yardımcı olarak intrinsik yolu aktive etmektedir (Choo ve ark. 2019).



Şekil 14. TRAIL-R Aracılı Hücre Ölümü (FLIP: FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) (Celepli ve ark. 2020'den değiştirilerek alınmıştır).

2.2.2. TNFRS ve Ligandları

Sitotoksik etkisi bulunan ve lenfositler tarafından üretilmekte olan lenfotoksin 19. yüzyılın sonlarına doğru keşfedilmiş ve TNF α olarak isimlendirilmiştir. Lenfotoksinin keşfinden sonra makrofojlar tarafından üretilen ve başlangıçta TNF olarak adlandırılan, sitotoksik etkiye sahip bir başka maddenin, moleküler yapılarının benzerlik gösterdiğinin anlaşılması üzerine daha sonra TNF β olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda da bu iki maddenin reseptörleri TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) (Tablo 1) olarak adlandırılmıştır ve Tablo 1’de gösterildiği şekilde TNFRSF’nin ligandları adlandırılarak eşleştirilmiştir.

Tablo 1. TNF Reseptör Süperailesi ve Ligandları (Mak ve Saunders 2006’dan değiştirilerek alınmıştır).

İsim	Ligand	Downstream Sinyal Molekülleri	Aktivite
TNFR1 (TNFR2p55, CD120a)	TNF, LT α	TRADD, FADD, TRAF1, 2	Enflamasyon, akut faz yanıtı, hücre sağ kalımı, bakteriyel toksik şok
TNFR2 (TNFRp75, CD120b)	TNF, LT α	TRAF1, 2, 3	Enflamasyon, Timosit proliferasyonu
Fas (CD95, APO-1)	TNF, LT α	FADD	Apoptozis
NGFR (p75 ^{NGFR})	FasL	TRAF6	Nöronal büyüme uyarımı, NF-KB aktivasyonu, apoptoz, duyuşal nöron gelişimi ve işlevi
CD40	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5	TRAF1, 2, 3, 5, 6	B hücre proliferasyonu, gelişimi ve birlikte uyarımı, izotip değiştirme, apoptoz, sitotoksik T hücre yanıtları
CD30	CD40L(CD154,gp39)	TRAF1, 2, 3, 5	Hücre ölümü
DR3	TWEAK (VEGI)	TRADD, FADD	Apoptozis
DR4 (TRAILR-2, CD261)	TRAIL (CD253)	FADD	Apoptozis
DR5 (TRAILR-2, CD262)	TRAIL (CD253)	FADD	Apoptozis
OPGL-R (RANK, ODAR)	OPGL (RANKL, TRANCE)	TRAF1, 2, 3, 5, 6	Osteoklast farklılaşması ve/veya aktivasyonu, dentritik hücrenin hayatta kalması ve işlevi
4-1BB (CD137)	4-1BBL (CD137L)	TRAF1, 2	T hücre birlikte uyarımı
CD27	CD70 (CD27L)	TRAF2, 5	T hücre gelişimi ve aktivasyonu
OX40 (CD134)	OX40L (CD252)	TRAF2, 3	B hücre farklılaşması ve ikincil lg yanıtları, aktive edilmiş hücrelerin endoteliuma yapışması

Keşfedilmesinin ardından sahip olduğu sitotoksik etkilerin kanser hücreleri üzerine etkileri tespit edilen TNF ailesi ligandlarının Tablo.1’de de gösterildiği üzere apoptozis, hücre sağkalımı, farklılaşma ve hücre ölümü gibi birçok fizyolojik olayda

yer aldığı belirtilmiştir (Mak ve Saunders 2006). TNF reseptör süper ailesinin apoptoziste işlevsel olan reseptörleri hücre zarı üzerinde yer almaktadırlar. İşlevsel olan bu reseptörler, reseptör-ligand kompleksinin bağlanması ile gerçekleşmekte olan yapısal değişimi hücrenin derinliklerine ileten ve ölüm bölgesi olarak adlandırılan (Death Domain-DD) yapıyı bünyesinde bulundurmaktadırlar. Ancak TNF reseptör süper ailesinin bazı reseptörleri DD bölgesi içerirken bazı reseptörler bu alanları içermemektedir. Ölüm bölgelerini içermeyen TNFRS'nin reseptörleri de yem reseptörleri adını almakta ve hücre zarına gelen ligandlarla kompleks oluşturarak yoğunluğu azaltmaktadırlar. Yem reseptörlerinin tümör yapısında artan maligniteye bağlı olarak ekspresyonlarının arttığına ve bazı yolaklar ile apoptoza aracılık ettiğine dair tespitler ortaya konmuştur (Haridas ve ark. 1998).

Ölüm bölgelerini içeren Fas, CD261 (DR4), CD262 (DR5), DR3, TNFR2 ve TNFR1 reseptörlerinde aktif olarak reseptörün sitoplazmasında DD'lerin sonrasında bulunan adaptör proteinler aktif bir şekilde rol almaktadırlar. Fas, CD261 ve CD262 reseptörlerine ilgili ligandların bağlanmasının ardından ölüm bölgelerinden sonra FADD yolu üzerinden kaspaz-8'in aktif olması gerçekleştirilerek kaspaz kaskadı başlatılır. Ölüm bölgelerini içeren reseptörlerden DR3, DR6, TNFR1'e bağlanan ligandlarla birlikte TRADD ile etkileşime girmekte ve nihayetinde TRAF2 (TNFR-Associated Factor-2) üzerinden sinyalizasyon başlatabilmektedir. Yine farklı bir adaptör proteini olan GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein-2) ile de etkileşime giren DR6 bu yol üzerinden de sinyalizasyon başlatabilmektedir. Ölüm bölgelerini içermeyen reseptörler farklı adaptör proteinleri ile sinyal yolaklarında sinyalizasyon mekanizmalarında aktivitelerini gösterebilmektedir. Aracı konumdaki bu adaptör proteinleri vasıtasıyla sitoplazmaya iletilen sinyal, reseptörlere ve durumlarına göre değişmekte ve aynı zamanda apoptozise, proliferasyona ve farklılaşma gibi hücrede çeşitli süreçlere yol açmaktadır. TNF reseptör süper ailesine üye reseptörler aracılığı ile hücre içinde aktivasyonu başlatan sinyaller NF-KB (Nuklear Factor kappa-B), JNK (Jun N-terminal Kinase), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ve kaspaz kaskadını içeren bir dizi yolu da tetiklemektedir.

2.2.2.1. TRAIL

TNF-related apoptozis-inducing ligand “Tümör Nekroz Faktör-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand” (TRAIL) kromozomal olarak 3. kromozomda bulunan tümör nekroz faktör süper ailesi üyelerinden olan TNFSF10 tarafından kodlanan ve ağırlığı 32 kDa uzunluğu ise 281 aminoasit boyunda ve 5 ekzonlu bir transmembran proteinidir. TNFSF’nin diğer üyelerine nazaran farklılık gösteren ve hücre membranına bağlanan TRAIL’in, sitokinleri stimüle etmesinin ardından birçok hücrede ekspresyonu gerçekleşmektedir. TRAIL yaklaşık %30 oranında FasL ile ve yaklaşık olarak %20 oranında da TNF- α ile benzerlik göstermektedir. TRAIL, APO-21 olarak da adlandırılmıştır (Pitti ve ark. 1996). TRAIL metabolizmada oldukça yaygın bir şekilde ifade edilmekte ve geniş yelpazede etkisini göstermektedir. Monositler, natural killer hücreleri, sitotoksik T hücreleri, nöronlar, epitel hücreleri gibi birçok hücre tarafından sentezlenmekte ve ilgili hücrede bulunan TRAIL alıcılarına bağlanmaktadır. TRAIL, ilgili hücre zarında yer alan TRAIL reseptörüne bağlandıktan sonra ölüm aracılı apoptozisin aktivasyonunu başlatmaktadır. TRAIL’in ilgi çekici özelliklerinden bir tanesi hem hücre zarında transmembran proteini olarak yer alması hem de matriks metalloproteinaz enzimleri aracılığıyla kesilip, ekstraselular matrikse salgılanarak apoptozisi indükleme yeteneğinde olmasıdır (Spierings 2004, Shin ve ark. 2006). TRAIL’in, hücre kültürü çalışmalarında ortaya konulan sonuçlarla birlikte, kanser hücrelerinde apoptozis sürecine çok fazla katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Hemen hemen tüm kanser türlerinde, hücre kültürü çalışmalarında TRAIL’in apoptozise neden olarak hücre ölümünü başlattığı rapor edilmiştir (Gura 1997). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda gelişim açısından anormallik olmadan sağkalım sürelerinde fazla değişiklik olmadığı ancak bazı kanser türlerinde TRAIL’in oluşumunda artış olduğu gözlemlenmiştir. Hem hücre kültürü çalışmalarında hem de modellenmiş olan farelerde yapılan çalışmalar baz alındığında TRAIL kanser tedavisinde potansiyel olarak kullanılan bir hedef olagelmıştır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalara göz atıldığında TRAIL’in oldukça önemli bir yer tuttuğu ortaya konulmuştur. Örneğin bir bakteri çeşidi ile enfekte olan makrofajların ortadan kaldırılmasına ve bakterinin çoğalmasına TRAIL’in engel olduğu bir çalışmanın sonucu olarak bildirilmiştir (Steinwede ve ark. 2012).

TRAIL, fizyolojik koşullarda proapoptotik yolda ölüm reseptörleri olan DR-4 ve DR-5 ile yine aynı yolda DcR1 ve DcR2 yem reseptörlerine bağlanmaktadır. TRAIL ve bağlandığı reseptörleri double kompleks yapılar şeklinde homotimer yapı oluşturmaktadır. TRAIL, DcR1 ve DcR2 yem reseptörlerine bağlanarak, aynı oranda bağlanma afinitesine sahip ölüm reseptörleri ile yarışmaktadır. Ancak X ışını kristalografisinde gösterilebilen çözünür haldeki TRAIL molekülünün trimetrik yapısına bakıldığında, kompleksin sahip olduğu üç monomerin arasında yapısal bütünlük bulunmakta ve aktivasyon için gerekli olan çinko (Zn) atomu yine monomerler arasında yer almaktadır. TRAIL'in bağlantı sağladığı ölüm reseptörleri ile birlikte oluşan kompleks yapının hücre içi ölüm alanları eş zamanlı olarak lokalize olmakta ve hücre ölüm sinyalleri aktifleşmektedir (Luo ve ark. 1998).

2.2.2.2. TRAIL Aracılı Hücre Ölümünün Kanser Tedavilerindeki Avantajları

TRAIL'in birçok varyantı olabileceği gibi şimdiye kadar tespit edilmiş olan 9 varyantı bulunmaktadır. Tüm bu varyantlar arasında sadece tek izoformu kanser için seçici apoptotik özelliğe sahiptir. Bir araştırma sonucuna göre alfa, beta ve gama olmak üzere üç tane TRAIL izoformu tanımlanmıştır. TRAIL alfa ve beta sitoplazma içerisinde konumlanmış iken TRAIL gama hücre membran yüzeyinde yerleşik haldedir (Özören ve El-Deiry 2002). Çeşitli hastalıklarda TRAIL'in ekspresyonunda değişiklikler tespit edilmiştir. Meme kanserli hastalardan alınan kan örneklerinde TRAIL mRNA düzeyinde azalma tespit edilmiş, sağlıklı örneklerde yapılan bir başka çalışmada ise ekspresyonunda artış tespit edilen bazı genlerin TRAIL upregulasyonu ile ilişkilendirildiği ve kanser hastalarında kemoterapiye yanıt olarak p53 geni bölgesinde yer aldığı tespit edilmiştir (Koornstra ve ark. 2003, Ho ve ark. 2011). Multipl skleroz ve sistemik lupus eritematozus hastalıklarına sahip bireylerde yapılan çalışmalara bakıldığında TRAIL düzeylerinde yükselme gözlemlenmiş ve hastalıkların patogeneğinde rol aldığı sonucu üzerine değerlendirmelerde bulunulmuştur. Baş ve boyun bölgesi metastazına sahip meme kanserli örneklerde TRAIL mRNA seviyelerinin downregüle olduğu ortaya konulmuştur. Aynı şekilde metastatik prostat ve kolon kanserlerinde TRAIL gen ekspresyonunda azalmalar tespit edilmiştir (Wood ve ark. 2008, Wang ve ark. 2011). Ayrıca apoptoz sürecinde

bağışıklık sisteminde TRAIL'in düzenleyici etkisi de göze çarpmaktadır. TRAIL'in gen ekspresyonu düzenlenmesi interferon stimülasyonuna yanıt oluşturan kompleks transkripsiyon mekanizmaları ile düzenlenmektedir. Diğer tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyon faktörlerine benzer bir şekilde TRAIL de immün hücre aktivasyonu sürecinin denetimi altındadır (Wang ve ark. 2011).

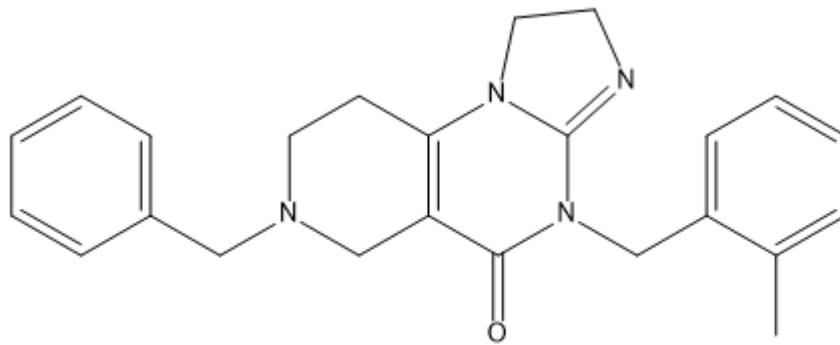
Çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu gerçekleşen proapoptotik reseptörleri kanser tedavisinde potansiyel hedefler olarak görülmüş ve son yıllarda detaylı araştırmalara konu olmuştur. Apoptotik yollardan olan ekstrinsik yolak, hücre artışı ve yaşam zincirindeki ana düzenleyici olan p53'ün denetiminden bağımsız olarak aktive edilebilmektedir. Ekstrinsik yolak aktifleştikten sonra bazı özelliklerini kaybeden p53 geninin yetersizliğinde uygulanmakta olan kemoterapötik yöntemlerden olan geleneksel kemoterapiye karşı direnç engellenebilmektedir. Bu yüzden TRAIL aktivasyonunu sağlayan ajanların, iyonize radyasyon ve kemoterapötik maddeler ile birlikte kullanımı yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine imkân tanıyabilmektedir. Bu yaklaşımı değerlendirerek yapılan araştırmalarda kanser hücrelerinde apoptoz hızında değişiklikler olduğu tespit edilmiştir (Wang ve ark. 2011). TNFSF üyelerinden TNF-alfa'dan inflamasyonları artırıcı etkisinden dolayı terapötik maksatlı kullanımlarda uzak kalınmıştır. FAS ve FAS-ligand agonisti antikorlar ise kan hücrelerinde apoptoza, karaciğerde de ölümcül hasara yol açtığı için klinik çalışmalarda uzak durulan TNFSF üyeleri olmuştur. Ancak TRAIL'in ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'i hedef alan veya TRAIL etkisi gösteren (ONC201/TIC10 gibi) kemoterapötik ajanların prelinik modellerde ve 1.faz çalışmalarda daha iyi adapte oldukları gözlemlenmiştir. Araştırmamıza temel oluşturan kemoterapötik ajan olan ONC201 veya bir diğer adıyla TRAIL Inducing Compound 10 (TIC10)'un TRAIL etkisi gösteren bir ajan olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Ortaya konulan sonuçlarla birlikte TRAIL'in antitümör etkisi üzerine yoğunlaşan araştırmacılar artmakta ve devam eden çalışmaların daha da geliştirilmesi için projeler yapılmaktadır (Wang ve ark. 2011).

Bununla birlikte TRAIL ile indüklenen apoptoziste bazı direnç mekanizmaları gelişmektedir. Yapılan çalışmalarda DR4 ve DR5 reseptör düzeyleri ile apoptozis stimülasyonuna duyarlılık arasında bir ilişki bulunamamıştır. TRAIL hedeflenmiş

terapötik tedavi geliştirmeye odaklı yaklaşımlar genel olarak duyarlılık ve biomarker bulunmasına yönelik olarak yapılmıştır. TRAIL'in indüklediği apoptoziste birçok süreç mekanizmaya dâhil olmaktadır. Ölüm reseptörlerinden ve ölüm sinyallerinden bağımsız olarak TRAIL'in yem reseptörleri olan DcR1 ve Dcr2 TRAIL ile bağlanabilmektedir. TRAIL'in ölüm reseptörleri DR4 ve DR5 O-glikozilasyon ya da endositoz aracılığıyla TRAIL ile indüklenen apoptoz üzerine etki göstermektedirler. TRAIL sinyal yolağını düzenleyen faktörlerden biri de kaspaz-8'in epigenetik açıdan knock-out hale getirilmesidir. Aynı zamanda c-FLIP molekülü de TRAIL sinyal yolağının önemli bir inhibitör proteini olarak TRAIL ile indüklenen apoptozda gelişen direnç mekanizmalarından biri olarak literatürde yerini almış bulunmaktadır (Mohamed ve ark. 2018).

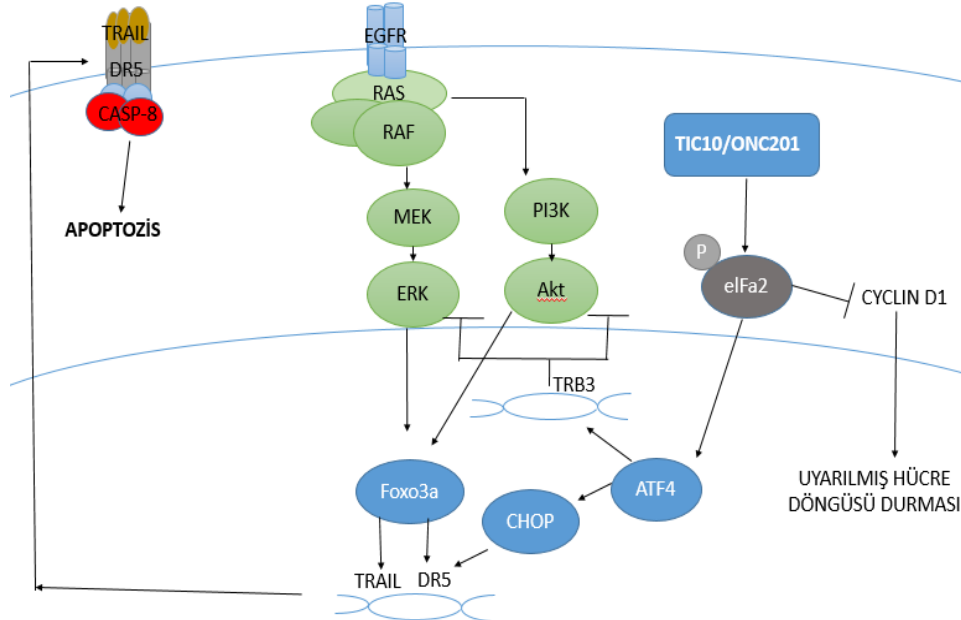
2.3. TRAIL İndükleyici Ajan Olarak TIC10'un (ONC201) Keşfi, Etki Mekanizması ve Güncel Faz Çalışmaları

Küçük bir molekül ve imipridone farmostik ailesinin kurucu üyelerinden birisi olan TIC10 aynı zaman da ONC201 veya NSC350625 şeklinde isimlendirilmektedir. Moleküler yapısı (Şekil 15) kimyasal formülü $C_{24}H_{26}N_4O$ şeklinde olan bir bileşik olarak belirtilmiştir. Bileşik, TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandın minik bir molekülü olarak değerlendirilen p53'ten bağımsız olarak indükleyici bir anti kanser ajan adayı olarak tanımlanmıştır (Allen ve ark. 2013, Allen ve ark. 2015).



Şekil 15. TIC10/ONC201 Yapısal Formülü.

TRAIL kanserin birçok türünde oldukça güçlü bir apoptozis indükleyicisidir. Hücre yüzeyinde proapoptotik yolda ölüm reseptörleri ile kompleks oluşturarak iç ve dış apoptotik yolların aktifleşmesini sağlamaktadır (Allen ve ark. 2013). Kanseri türlerinde bağışıklık sisteminin denetlenmesinde önemli bir efektör olarak TRAIL, normal sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermeden proksimal tübül hücrelerinde apoptozisi tetikleyen, bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde koşullu olarak eksprese edilen bir proteindir. Bilim insanları TRAIL'in bu harika özelliklerini taşıyan, önceliği doğal olarak anti tümör işlevi görecektir, kanser mekanizmasını denetleyecek ve aynı zamanda da kanser mekanizmasını baskılayacak ve doğal olarak TRAIL vazifesi görecektir anti tümör özellikte bir kemoterapötik ajan olarak tanımladıkları TIC10/ONC201'i deneylerde kullanmaya başladılar. TIC10 etki mekanizması hakkında bilgiler keşfedildiği sıralar yetersizdi. Fakat araştırmacıların yoğun ilgi ve üstün gayretleri ile etki mekanizması aydınlatılmaya başlandı (Şekil 18). Yapılan ilk çalışmalarla birlikte biyokimyasal analizlerde TIC10 ile tedavi edilmeye çalışılan kanser hücrelerinde TRAIL mRNA seviyeleri gözlemlenmelerinde, TIC10 aracılığıyla TRAIL upregülasyonunu muhtemelen olarak transkripsiyonel olduğu gösterilmiştir (Allen ve ark. 2013).

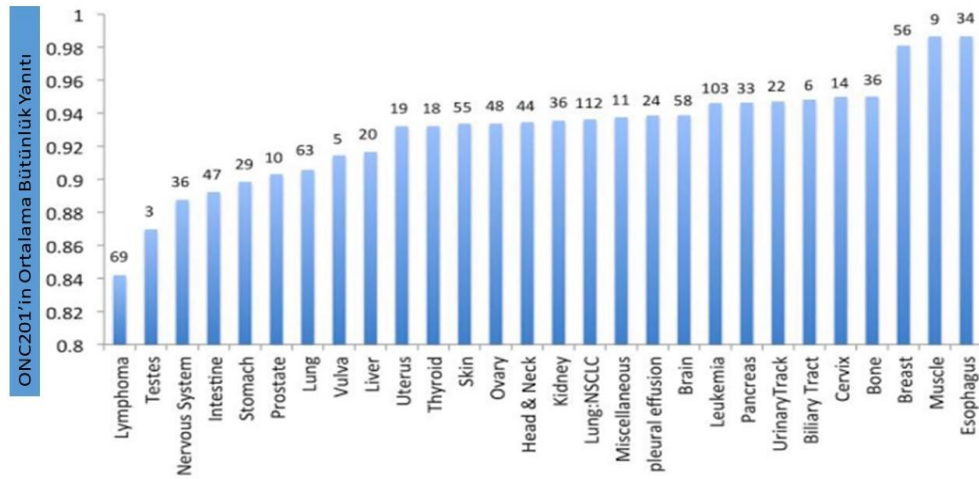


Şekil 16. TIC10/ONC201 etki mekanizması (Allen ve ark. 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).

Temel görevi endoplazmik retikulumdan (ER) golgiye protein taşınmasını engelleme olan Brefeldin A, TIC10 gibi küçük molekül olarak adlandırılan bileşiklerdendir. Araştırmalar sonucunda kanser hücrelerinde kemoterapötik uygulama sonrası 36-48 saatlerde TIC10 ve brefeldin ile indüklenmiş olan TRAIL'in bu komplekste "geç aşama downstream sinyal/efektör" mekanizması olabileceği izlenimini uyandırmıştır. İki küçük molekülün karşılaştırılmasında, her iki bileşiğin de *in vivo* olarak aktif oldukları Protein Kinase B-Protein kinaz B (AKT) ve Extracellular signal-regulated kinase-ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) inaktivasyonunu içermekte olan downregüle sinyalizasyonlarla sonuçlandığı ortaya konulmuştur (Allen ve ark. 2013). Ancak dikkat çekici bir nokta olarak brefeldinin sağlıklı hücreler için toksik etki göstermesinden farklı olarak malign hücrelerde TIC10 hücre ölümü uyarımında yüksek seçicilik göstermiştir. Kansere karşı mücadelede anti tümör ajanı olarak keşfi kabul edilen ve "TRAIL Inducing Compound 10" (TIC10) olarak adlandırılan ONC201 olumlu terapötik içeriği, genotoksisiteden uzak oluşu ve ilaca benzer kimyasal özellikleri nedeniyle klinik geliştirmede öncü bir bileşik olarak kullanılmaktadır. Farmosötik açıdan değerlendirilmeye alınarak kan-beyin bariyerinin penetrasyonunu sağlayan, dirençli kanser hücre hatlarında p53'ten bağımsız etkinlik gösteren ve *in vivo* tek doz anti tümör aktivitesi olan bir ajan olarak yerini almıştır (Allen ve ark. 2013, Allen ve ark. 2015). TRAIL gen promotörü içindeki bağlanma bölgelerine sahip transkripsiyon faktörleri ve gen ekspresyon görüntüleme çalışmalarında gözlemlenen mRNA değişikliklerinin potansiyel transkripsiyonel düzenleyicileri arasındaki örtüşmenin *in silico* analizleri de gerçekleştirilmiştir. Araştırmacıların çapraz referans olarak da değerlendirdikleri bu durum TRAIL gen promotörü içinde bir bağlanma bölgesine sahip olan Foxo3a'nın ONC201'e yanıt olarak aktive edilebileceğini göstermiştir. Hedeflenen Foxo3a gen bölgesinin ONC201 aracılığıyla upregülasyonu yapılan çalışmayla ortaya konmuş ve TRAIL'in transaktivasyonunu sağlamak üzere çekirdeğe yöneldiği belirtilmiştir (Allen ve ark. 2013, Allen ve ark. 2015). Hücre kültürü çalışmalarında Foxo3a regülatörleri, sağkalım indükleyici kinazlar olan Akt ve ERK, ONC201 ile indüklenen Foxo3a'nın aktivasyonuna ve çekirdeğe translokasyonuna sinerjistik etki gösteren regülatörler olarak tanımlanmıştır. Yine ONC201 downstream TRAIL indüklenmesinden önce tedavi sonrası dolaylı olarak Akt ve ERK'i etkisiz bırakmaktadır. ONC201

uygulanmasının ardından Akt ve ERK inaktivasyonunun gerçekleşmesi sırasıyla Foxo3a, Ser253 ve Ser294 üzerindeki enzimatik hedef bölgelerinde fosforilasyonda bir azalmaya neden olmuştur. Yapılan genetik ve farmakolojik deneylere göre Akt ve ERK inaktivasyonunun hem Foxo3a hem TRAIL üzerine hem de kanser hücrelerini apoptozise götürme anlamında üçlü bir sinerjist etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Allen ve ark. 2013). ONC201'in geç apoptotik etkilerini yönlendirecek upstream sinyalizasyonu anlayabilmek adına hem kolorektal kanser hücrelerinde hem de lenf kanseri hücrelerinde gen ekspresyon görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Gen ekspresyon görüntüleme tekniği ile yapılan çalışmalarda HTC116 ve kolorektal RKO hücrelerinde ONC201 uygulamasına karşılık ER'da 11-Gen stres yanıtı sinyalizasyonunun upregülasyonu tespit edildi. Araştırmalara prospektif yaklaşıldığında 11-gen sinyalizasyonu ONC201 uygulamasından sonra zaman bağlı olarak lenfoma hücrelerinde upregüle edildi. ONC201 mekanizmasına bakıldığında, ONC201 tarafından indüklenen genlerin birçoğunun ATF4 tarafından düzenlendiği ve ATF4 transkripsiyonel hedef geni olan ve C/EBP homologous protein (CHOP) olarak adlandırılan gen için bağlanma bölgelerine sahip olduğu belirtilmektedir (Ishizawa ve ark. 2016). ATF4'ün upregülasyonu CHOP ve CHOP'un hedef geni olan DR5'in ekspresyonunu düzenleyerek apoptozu desteklemektedir. Hem CHOP'un hem de DR5'in ekspresyonunda gen ekspresyon görüntüleme çalışmaları sonucunda ONC201 uygulamasından kaynaklı zamana bağlı artış gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda da ATF4'ün ONC201 uygulamasına yanıt olarak kanser hücrelerinde aktifleştiği araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (Yoshida ve ark. 2005, Zou ve ark. 2008). ONC201'e dirençli olarak çoğaltılan, ONC201 duyarlı yetişkin RKO hücrelerinde, ONC201'in apoptozise katkıda bulunmadığı ve hücre canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir. Direnç kazanmış hücrelerde yapılan çalışmaya göre ATF4 sinyal yolu, Akt/ERK/Foxo3a/TRAIL sinyal yolları ile ONC201'in etkileşime girmediği tespit edilmiştir (Kline ve ark. 2016). ER stresi ATF4/CHOP sinyal yolağı, aminoasit yetersizliği, demir eksikliği veya viral enfeksiyonlara bağlı olarak hücre ölümü gibi olaylara yanıt olarak hücre ölümünü tetiklemek üzere gelişmekte olan "entegre stres yanıtı" "Integrated Stress Responce" (ISR) aracılığıyla ATF4/CHOP yolunu indüklemektedir. ISR ökaryotik hücrelerde protein sentezini azaltan ve iç veya çevresel streslere cevap olarak belirli genlerin upregülasyonunu

sağlayan bir hücrel yanıt tepkisidir. ISR artan ökaryotik başlatma faktör iki (eIF2a) fosforilasyonuna neden olarak meydana gelen etkileri indüklemektedir. eIF2a fosforilasyonu ise genel olarak translasyonda bir azalmaya sebep olur fakat seçici bir şekilde ATF4 azalmış olan bu translasyonun upregülasyonunu sağlayarak önemli bir katkıda bulunur ve bu durum da sonuç olarak CHOP'u indüklemektedir (Han ve ark. 2013, B'Chir ve ark. 20013, Endo ve Lipkowitz 2016). ISR'e uygun bir şekilde ONC201 eIF2a'nın fosforilasyonunu indüklemekte ve bu da antikanser etkisinin downstream sinyalizasyonuna neden olmaktadır (Kline ve ark. 2016). ONC201 ve protozom inhibitörleri arasındaki efektör sinyal yollarının örtüşmesiyle tutarlı olarak çeşitli kanser hücreleri hatlarında klinik öncesi denemelere göre lenfoma ve multiplmiyelom hücreleri en fazla duyarlı olan hücreler olarak tespit edilmiştir (Şekil 18). Ayrıca ONC201 kaynaklı apoptozis veya hücre büyümesinin durması mantle hücreli lenfomanın bir markeri olarak XIAP ve Cyclin D1 ekspresyonunun downregülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Allen ve ark. 2016).



Şekil 17. İnsan kanser hücre hatlarının, *in vitro* çalışmada ONC201'e karşı duyarlılık yanıtı (Allen ve ark. 2016'dan değiştirilerek alınmıştır, sütun üzerindeki sayılar her bir hücre için test edilen hat sayısını göstermektedir).

Cell-free deneylerde ONC201'in ISR aktivasyonu ile ilişkilendirilmiş proteozomlar, proteazlar, HSP70, HSP90 ya da deubiquitinazlar gibi hedefleri veya kinazları, epigenetik modölatörleri ve fosfodiesterazları doğrudan hedeflemediği tespit edilmiştir. Bu yaklaşım sonucu ONC201'in bilinen kemoterapötik ajanların aksine hedef mekanizmaların çoğunu devreye sokmamakta ancak aynı hedef mekanizmaları etkileyen farklı tetikleyiciler aracılığıyla ISR'i aktive etmektedir (Allen ve ark. 2016).

Tüm bu çalışmalarla ONC201 sağlıklı hücrelere zarar vermeden net bir etkinlik ortaya koyan, benzersiz bir tetikleyici vazifesi görerek kanser hücrelerinde erken evre ISR aktivasyonu aracılığıyla anti kanser mekanizmasını koordine etmektedir. Bu sinyalizasyon yolağında meydana gelen metabolik aktivitelerin aydınlatılması ile araştırmacılar ONC201'in onkolojide yeni bir hedef ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir (Allen ve ark. 2016).

2.4. Şaperonlar

Proteinler yanlış veya erken kıvrılmaları düzenlemek için bir regülatöre veya yardımcı proteine ihtiyaç duyarlar. Bazı durumlarda yapılarındaki düzenlemeleri bir regülatöre ihtiyaç duymadan yapabilirken bazen de başlangıçta sentezlendiği halden farklı bir hale geçmek üzere kıvrılırlar ve belli bir yapıda kalarak düzenlenmeye ihtiyaç duyarlar. Bu şekilde yanlış ve/veya erken kıvrılmış-katlanmış proteinlerin metabolik olarak uygun hale gelmesini sağlayan yardımcı proteinler şaperon olarak adlandırılırlar. Şaperonlar proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak, erken katlanmaya engel olmak ve yanlış katlanmış proteinleri düzelterek onarımı mümkün olmayan proteinleri de ortadan kaldırmak üzere proteinlerin üç boyutlu hale gelmesi işleminde oldukça hayati rol oynayan yardımcı proteinlerdir. Tüm memeli proteinlerin yarısından fazlasının katlanmasına refakat ederler (Güneş 2013).

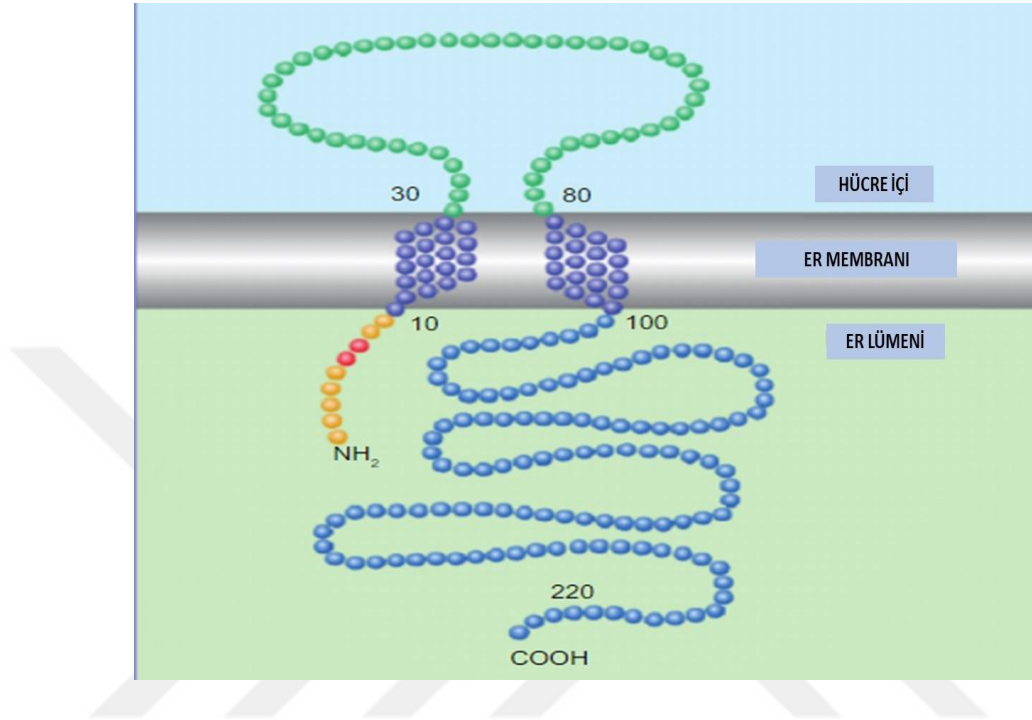
Şaperonlar proteinlerin katlanmalarında veya açılmalarında bir regülatör görevi görmektedirler. Protein-protein, protein-DNA ve protein-RNA komplekslerinde oldukça etkili regülatörler olarak tanımlanmaktadır (Hartl ve Hayer-Hartl 2002). Şaperonlar proteinlere öncül davranış sergileyerek polipeptidlerin

katlanması ile ilgili aktivasyon gösterirler. Proteinlerin yapısına dâhil olup herhangi bir değişikliğe yol açmazlar. Yapılan çeşitli araştırmalar proteinlerin kıvrılmaları esnasında şaperonların aktif oldukları metabolik faaliyetlerde polipeptid zincirinde oluşabilecek hatalı kıvrımların, yanlış katlanmaların önlendiğini göstermiştir. Moleküler şaperonlar ve şaperoninler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Moleküler şaperonlara örnek olarak ısı şok proteinleri de denilen Hsp70, Binding immünoglobulin protein (BiP), Şaperoninlere örnek ise Hsp60, GroEL gibi proteinler verilebilir. Moleküler şaperonlar katlanmamış ya da kısmen hatalı katlanmış proteinlere bağlanarak düzeltilmelerine yardımcı olmaktadır. Şaperoninler ise doğrudan bağlanarak proteinlerin doğru katlanmalarını sağlamaktadırlar (Hartl ve Hayer-Hartl 2002). Son zamanlarda aktivasyonu spesifik ligandlar tarafından aktive/deactive edilebilen bir reseptör olan Sigma Reseptör 1 (Sig1r)'de şaperon olarak tanımlanmıştır (Tsai ve ark. 2009).

2.4.1. Sigma Reseptörü

Sigma reseptörleri karaciğer, böbrek ve beyin dahil olmak üzere çeşitli organların plazmatik, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum (ER) zarlarına lokalize olan bir reseptör ailesidir. Sigma reseptörleri ER'de lipid yapıdaki zar tabakasında yerleşmiş, mitokondri aracılı apoptozda görev alan bir şaperon olarak tanımlanmaktadır. Bir ER şaperonu olarak kompleks oluşturmaktadır. Daha önce opioid reseptörü olarak tanımlanmasına rağmen ortaya çıkan çeşitli özelliklerinden dolayı şaperon olarak adlandırılmıştır. Sigma reseptörlerinin, Sigma reseptör 1(Sig1r) ve Sigma reseptör 2 (Sig2r) olarak iki ayrı tipi mevcuttur (Booth ve ark. 1999, Ruscher ve Vieloch 2015). Moleküler ağırlığı 25 kDa olan Sig1r'ın ilk kez klonlanması 1996'da gerçekleştirilmiştir. Kobay karaciğeri, insan kanser türleri, rat beyini ve fare böbreğinden klonlanan Sig1r, IGMAR, OPRS1 gibi isimlerle adlandırılmıştır. Klonlanan gen 9p13'te lokalizedir. Klasik reseptör ailelerinden farklı özellikleri ile dikkat çeken sigma reseptörleri ER'de bulunan diğer proteinlerden de farklılaşmış bir halde hücre zarı, ER, mitokondriyal zar, nükleer klif ve lizozomlarda eksprese edilmektedir (Zeng ve ark. 2007, Wheeler ve ark. 2000). Ligandları hem hücre koruyucu etkiye hem de sitotoksik etkiye sahip olabilmektedir. Sig1r agonistlerinin

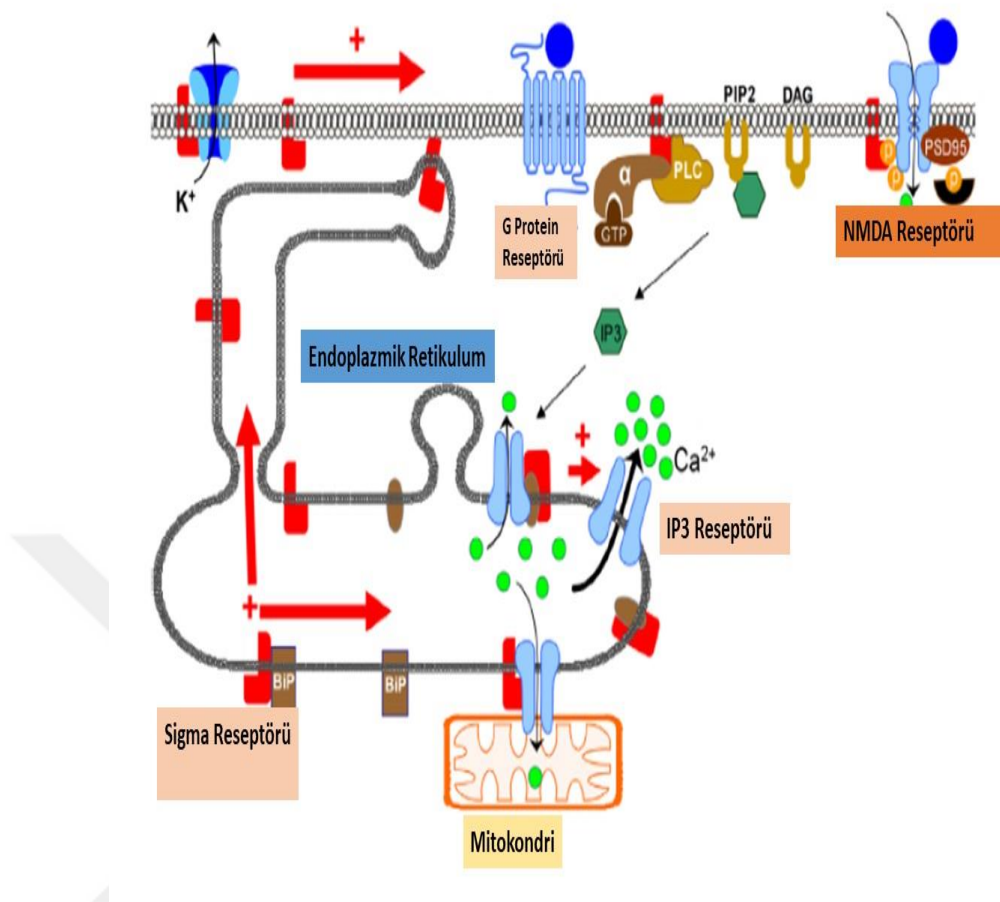
nöroproteksiyon, nörit büyümesi, trofik faktör üretimi, mikroglial aktivasyon, mitokondriyal bütünlüğü desteklemek ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltma gibi yetenekler sergilemektedirler.



Şekil 18. Sigma Reseptörünün Tahmini Moleküler Yapısı (Zincir amino asitleri yansıtmaktadır) (Hayashi ve Su'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.4.2. Sig1r'nin Fizyolojik İşlevleri ve Kanser İlişkisi

Yapılan çalışmalarda transmembran proteinleri olarak da tanımlanan Sig1r'nin translokasyon yapabildiği de ortaya konulmuştur. Sigma-1 reseptörü, plazma zarı, endoplazmik retikulum ve perinükleer alanlarda bulunmakta ve meme kanseri hücre hatlarında ve dokularında upregüle edilmiş halde bulunmaktadır. ER'de sfingosinler bakımından oldukça bol bulunan lipid tabaka içerisine yerleşmiş ve aynı zamanda ER'den plazma membranına doğru da translokalize halde olduğu bildirilmiştir (Hayashi ve Su 2003, Hayashi ve Su 2005, Mavlyutov ve Ruoho 2007, Aydar ve ark. 2016).

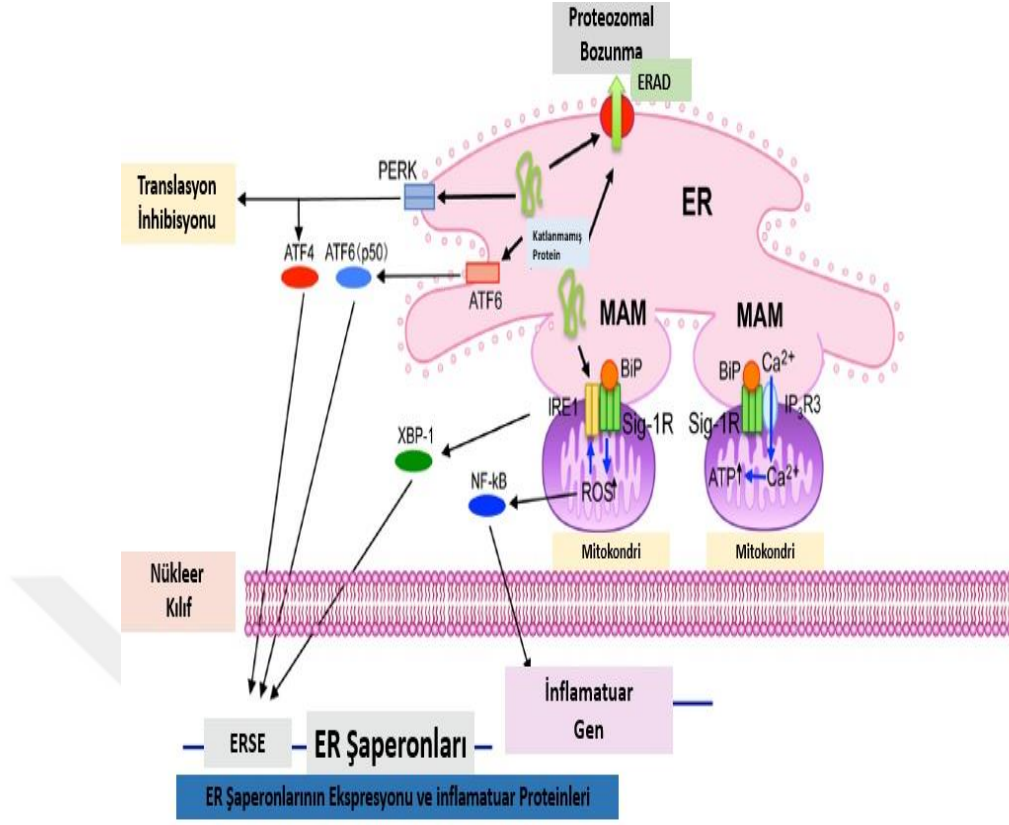


Şekil 19. Sig1r'in aktivasyonu ile oluşan sinyal yolağı (Zamanillo ve ark., 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).

Sigma reseptörlerinin bazı kanser türlerinde oldukça yüksek ekspresyonuna rastlandığı bildirilmiştir. Tespit edilen sonuçlara göre sigma reseptörlerinin tümör büyümesinde rol aldığı açıklanmıştır. Sigma reseptörünün ekspresyonundaki değişimin tümör hücrelerinin agresifliği ile ilişkili olduğu, metastatik yeteneği gelişmiş olan kanser hücrelerinde oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sig1r'ın kanserle ilişkilendirilmiş birçok metabolik mekanizmayı değiştirme ve düzenleme yeteneğinde olduğu ortaya konmuştur (Rui ve ark. 2016). Sig1r voltaj duyarlı kanalların ve ligand kapılı kanalların değişikliğinde ve düzenlenmesinde rol alarak hayati bir önem arz etmektedirler. ER'de bulunan diğer şaperonlar ile etkileşimde bulunarak yanlış katlanan veya katlanmayan proteinlerden kaynaklanan ER-stres sensörü olarak da görev almaktadırlar (Şekil 19) (Rossi ve ark. 2011).

Sig1r'ın ligandlarının iyon kanallarının aktiviteleri, nöronal tetikleme, kanser büyümesi, apoptozis gibi hücrel fonksiyonları düzenlediği bildirilmiştir (Mavlyutov ve ark. 2010). Eşsiz bir durumda olan Sig1r ligandları deney hayvanlarında patolojik koşullarda özellikle mitokondriyal strese terapötik etki göstermektedir (Hayashi ve Su 2004, Hayashi ve Su 2007).

ER şaperonlarından bir tanesi de, lümende yer alan ve yeni sentezlenmiş olan proteinleri bağlayan ve sonraki katlanmalara hazır hale getiren BiP'dir. BiP'in Sig1r ile birleşmesi sonucunda Sig1r aktivitesi düzenlenmektedir. Sig1r'in BiP ile kompleksi ile serbest haldeki Sig1r kıyaslandığında, serbest haldeki Sig1r'ın maksimum düzeyde şaperon aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Hayashi ve Su, 2007). Sigma reseptörlerinin hücre membran yapısındaki voltaj kapılı kanallarla da ilişkili oldukları belirtilmiştir. Sigma reseptörlerinin yüksek ekspresyon aktivitesinde voltaj kapılı kanallar bloke olmaktadır (Mueller ve ark. 2013). ER'de metabolik aktiviteler sonucunda meydana gelen ER-stresinde Sig1r oldukça aktif durumdadır (Şekil 20). Şekil 20 gösterildiği üzere Sig1r mitokondri ile ilişkili zar (MAM)'da oldukça yüksek ekspresyona sahiptir. Sig1r düzenleyici-düzelticiler olan homo-oligomerler oluşturma yeteneğinde olan ve deaktif halde BiP ile etkileşime girebilen bir şaperondur. Homo-oligomerlerin düzensizleşmesine yol açar ve BiP'in Sig1r'dan ayrılmasına neden olan Sig1r agonistlerinin komplekse dahil olması ile birlikte Sig1r aktivasyon kazanır. Sig1r MAM'da IP3 reseptör tip-3 (IP3R3)'ü stabilize ederek mitokondriyal akışı ve ATP sentezinde Ca^{2+} akışını düzenlemektedir. Yine ER stresinde veya oksidatif streste MAM'da ER stres sensörü 1 (IRE1)'i stabilize etmektedir. Tüm bu metabolik faaliyetlerle birlikte Sig1r transkripsiyon faktörlerinin (XBP-1, NF-Kb) düzenlenmelerini sağlayarak stres ilişkili protein ekspresyonunda regülatör görevi görür (Şekil 21).



Şekil 20. ER’de Sigma1 reseptörünün biyolojik aktiviteleri (Hayashi 2019’dan değiştirilerek alınmıştır).

Yapılan bir çalışmada Sig1r’ın knockdown edilmesi ile birlikte oksidatif stres oluşumu ile birlikte ER stresinin tetiklendiği ve hücresel proliferasyonu engellediği bildirilmiştir (Happy ve ark. 2015). Sig1r agonistlerinin iskemik durumlar, diyabet, inflamasyon ve toksisitenin neden olduğu oksidatif stresi önleyerek hücresel sağkalımı desteklediği, antagonistlerinin de tümör hücresi sağkalımını engellediği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Ayrıca Sig1r agonistleri nöroproteksiyon, nörit büyümesi, trofik faktör üretimi, mikroglial aktivasyon, mitokondriyal bütünlüğü desteklemek ve aktif oksijen türlerinin üretimini azaltma gibi yetenekler sergilemektedirler (Hayashi ve Su 2007, Narayanan ve ark. 2011).

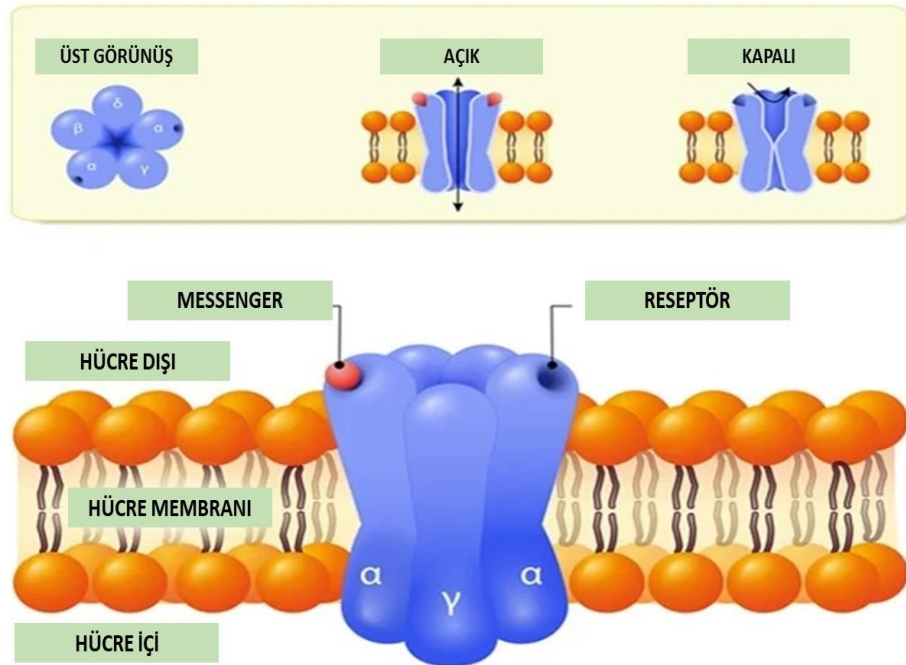
2.4.3. Sigma1r Agonist ve Antagonistlerinin Kanser Araştırmalarındaki Yeri ve Kullanımı

Sig1r'ın manipüle edilmesi hücre korucuyu etki ile birlikte sitotoksik etki de gösterebilmektedir. Sig1r agonistlerinin oksidatif strese karşı antioksidan gibi etki göstererek hücre sağkalımında rol oynadığı bildirilmiştir. Antagonistlerinin de kanser hücrelerinde hayatta kalımı etkileyerek apoptozu tetiklediği ortaya konmuştur. Sig1r antagonist aracılı apoptoziste Sig1r agonistlerinin SKF-10047 (Alozosine, WIN-19631, N-Allynormetazosine, NANM, NAN gibi adlandırmaları da vardır) tarafından inhibe edildiği yapılan çalışmaların sonuçları ile birlikte gösterilmiştir. Ticari adı SKF-10047 olan, metazosine bağlı benzomorfan ailesinden sentetik bir opioid analjeziğidir. Opioid aktivitesine ek olarak Sig1r agonisti ilaç olarak deneysel çalışmalarda popüler bir ilaçtır (Casy ve Partfitt, 2013). Sig1r agonistleri nöroproteksiyon, nörit büyümesi, trofik faktör üretimi, mikrogial aktivasyon, mitokondriyal bütünlüğü desteklemek ve aktif oksijen türlerinin üretimini azaltma gibi yetenekler sergilemektedirler. Sig1r antagonistlerinin sistemik olarak uygulanmasının yan etkileri bir tarafa bırakılacak olursa meme kanseri ksenograftlarının, büyümesini önemli derecede inhibe ettiği bildirilmiştir (Narayanan ve ark. 2011, Hayashi ve Su 2007, van Waarde ve ark. 2015). Sig1r antagonistlerinden olan BD1047'nin meme ve kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmektedirler. Sig1r agonistleri olarak adlandırılan bileşikler diyabet, inflamatuvar reaksiyonları ve iskemik durumlarda oksidatif strese ve hücre sağkalımında etki gösterirken antagonistleri olan bileşikler tümör hücre sağkalımını engelleyerek hücre ölümünü tetiklemektedir (Waarde ve ark. 2010, Narayanan ve ark. 2011). Yapılan bir çalışmada Sig1r agonisti olan SKF-10047'nin uygulandığı gruplarda tek başına tümör büyümesini değiştirmedeği gözlemlendi. Sig1r antagonisti olan bir bileşik ile birlikte SKF-10047 uygulandığı grupta ise kanser hücresi büyümesini önemli ölçüde azalttığı, bu azaltma etkisinin de en azından reseptör bölgelerinde Sig1r antagonisti tarafından koordine edildiği bildirilmiştir (Happy ve ark. 2015). Literatürde yer alan çalışmalar Sig1r agonistlerinin upregüle edilmesinin, kanser hücrelerinde Sig1r antagonisti tarafından tetiklenen apoptozu koruduğunu bildirmektedir (Hayashi ve Su 2010, Narayanan ve ark. 2011, Do ve arkd. 2013). Yine bazı çalışmalara göre de knockdown edilen Sig1r'ın ER stresi ve reaktif oksijen türleri

tarafından indüklenen apoptozisi desteklediği bildirilmiştir (Hayashi ve Su, 2010, Meunier ve Hayashi 2010). Sigma reseptörlerinin hücrede oynadığı aktif rollerinin yanı sıra, kanser hücresi üzerinde de bilinen bu rollerini tüm yönleriyle aydınlatmak ve çağın ciddi sağlık problemlerinin başında gelen kanserin bütün yönlerini detaylı olarak incelemeye yardımcı olacaktır.

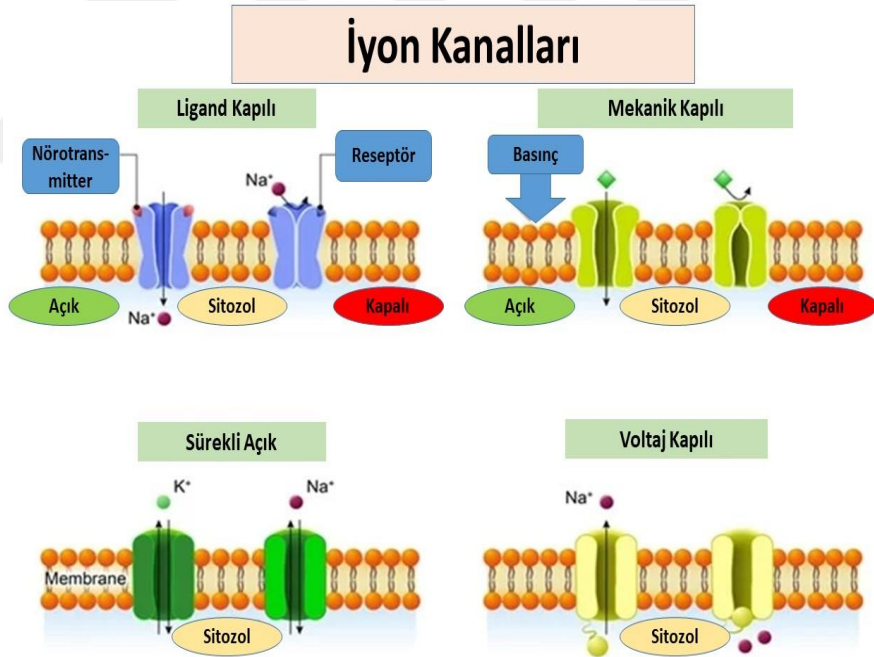
2.5. İyon Kanalları

Hücre membranı hücre içi ve hücre dışı sıvılar arasında difüzyon imkânı sağlayan ve iyon dengesine katkıda bulunan önemli bir sınır olarak görev yapmaktadır. İyonların hücre zarı aracılığıyla geçişi bazı yapısal mekanizmalar sayesinde gerçekleşmektedir. İyon kanalları olarak adlandırılan bu yapılar intraselüler ve ekstraselüler alan arasında transportu sağlamaktadırlar (Şekil 21). Bu mekanizmalar sodyum (Na^+), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{2+}) ve klor (Cl^-) gibi iyonların elektrokimyasal gradiyentleri yönünde akışına izin vermektedirler.



Şekil 21. İyon kanalı yapısı (<https://www.news-medical.net/health/Importance-of-Ion-Channels-in-the-Body.aspx> değiştirilerek alınmıştır, Erişim Tarihi: Oct 25, 2018).

İyon kanalları iyon geçirgenlikleri açısından değerlendirildiklerinde kapılı iyon kanalları (gated) ve kapısız iyon kanalları (non-gated) olarak ayrılmaktadırlar. Non-gated iyon kanalları herhangi bir kapanma durumu söz konusu olmaksızın sürekli olarak iyon geçişine izin vermekte, gated iyon kanalları ise bazı durumlarda kapanarak iyon geçişini durdurmaktadırlar. Gated iyon kanalları; bir ajanın veya nörotransmitterin kapı üzerinde yerleşmiş olan bir reseptöre bağlandığı durumda aktivasyon gösteren ligand kapılı iyon kanalları, hücre iskeletinde meydana gelen gevşeme-gerilme durumu ile aktivasyon gösteren basınca duyarlı mekanik kapılı iyon kanalları olarak gruplandırılmaktadır. Son olarak da hücrede meydana gelen aksiyon potansiyelindeki değişimlere bağlı olarak aktivasyon gösteren voltaj kapılı iyon kanalları olarak 3 gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 22). Son zamanlarda yapılan araştırmalarla birlikte iyon kanallarının kanser hücresi gelişiminde ve tümör dokusunun büyümesinde ciddi fonksiyonları olduğu gösterilmektedir.



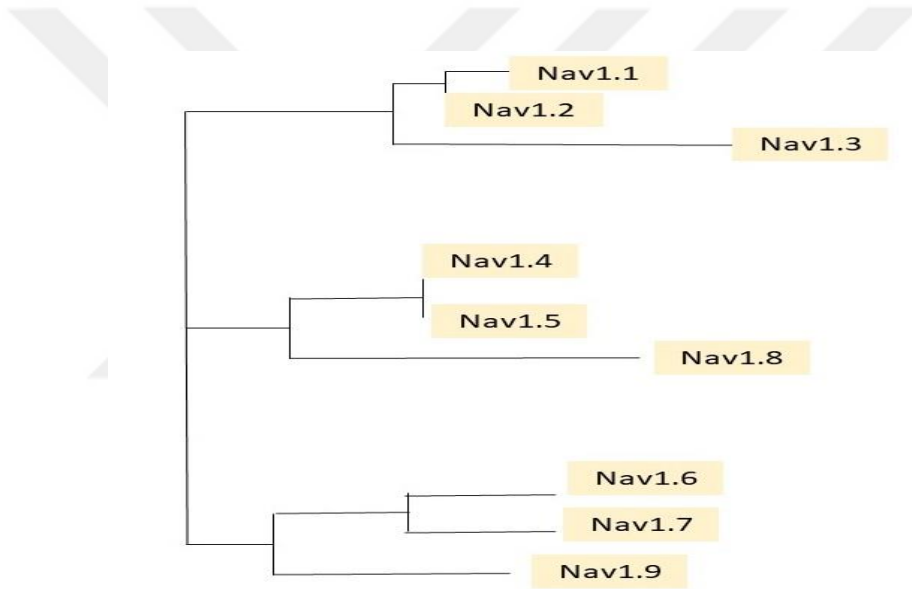
Şekil 22. İyon Kanalları (<https://www.news-medical.net/health/Importance-of-Ion-Channels-in-the-Body.aspx> değiştirilerek alınmıştır, Erişim Tarihi: Oct 25, 2018).

Sağlıklı bir hücre mutasyonlar sonucunda veya denetim mekanizmalarının kontrolünden çıkarak kanser hücresine dönüşürken iyon kanallarını etkilemekte ya da iyon kanallarının metabolik aktivasyonlarının değişmesine neden olabilen genetik farklılıklara neden olmaktadır. İyon kanalları kanser hücrelerinde bölünme, çoğalma, büyüme, intraselüler-ekstraselüler madde alışverişi, enzim aktivasyonlarında meydana gelebilecek değişiklikler, salgılama ve gen ifadesinde azalma-artmalara neden olabilmektedirler. Kanser-iyon kanalları ilişkisi anlamında, iyon kanallarının proliferasyon ve apoptozis, migrasyon hızı ve bazı kanser türlerinde farklı kanalların ekspresyon düzeyleri gibi iki temel basamak üzerinde durulmaktadır (Prevarskaya ve ark. 2010). Hücre proliferasyon çalışmalarında iyon kanallarının aktiviteleri gözlemlenmiş, temel olarak iki şekilde etkilendiği bildirilmiştir. Her hücrenin intraselüler iyon, pH ve hücre volümü gibi homeostazisi sabit tutmak için iyon kanallarının fonksiyonel aktivitelerine ihtiyaç duymaktadır. Öte yandan iyon kanallarının hiperpolarizasyonu, hücre siklusunda özelleşmiş denetim noktalarında gereklidir ve bu gerekliliği ile proliferasyonda belirli ve önemli rol almaktadır (Kunzelmann 2005).

2.5.1. Sodyum Kanalları

Sodyum kanalları, hücre membranından Na^+ iyonlarının hücre içine ve dışına ileten zar proteinleridirler. Katyon kanalları süper ailesi olarak adlandırılan aile üyesidirler. Katyon kanalları süper ailesi üyeleri kanal kapısının açılmasına sebep olan tetikleyiciye göre isimlendirilmektedirler. Sodyum kanalları Nav kanalı veya Voltage Gated Sodium Channel (VGSC) olarak adlandırılmaktadırlar. VGSC'ler por yapısı meydana getiren α alt birimi ve bu α alt birim ile ilişkili bir β alt birimden oluşmaktadır. Voltaj kapılı sodyum kanalları (Nav), sıçan fundusu, insan ve köpek jejunumu, memeli kolonunda olmak üzere gastrointestinal düz kasta bulunurlar. VGSC'ler, β alt birimleri gibi proteinlerle ilişkili büyük α alt birimlerden oluşmaktadırlar. Bir α alt birim sodyum kanalının çekirdeğini oluşturmakta ve tek başına işlevsel olarak aktivite göstermektedir. α alt birim proteini hücrede eksprese edildiğinde diğer modülatör proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmese dahi Na^+ 'u iletebilecek VGSC'ler aktive olmaktadır. VGSC'lerin temelde, kapalı, açık ve inaktif olmak üzere 3 ana yapısı

mevcuttur. VGSC'lerin membran geçiş alanlarında tespit edilmiş 9 üyesi bulunmaktadır. Nav1.1'den Nav1.9'a kadar adlandırılan bu proteinler SCN1A-SCN11A genleri tarafından kodlanmaktadır. Aminoasit dizilimlerindeki yakınlığa bağlı olarak bu proteinler arasında muhtemel evrimsel ilişki şekilde gösterilmektedir (şekil 23) (Tfelt-Hansen ve ark. 2010). Tek bir aile olarak sınıflandırılmış ve isimler sayısal sırayla verilmiştir. İsim, bir alt simge (Nav) olarak belirtilen ana fizyolojik düzenleyici (voltaj) ile birlikte ana nüfuz eden iyonun (Na) kimyasal sembolünden oluşmaktadır. Alt simgeyi takip eden sayı, gen alt ailesini gösterir ve ondalık noktadan sonraki sayı, spesifik kanal izoformunu (örneğin Nav1.1) tanımlamaktadır (Goldin 2001).



şekil 23. Sodyum kanalı alt birimleri.

Sadece aminoasit dizilerindeki farklılıklardan değil aynı zamanda ekspresyon profilleri ve kinetikleri açısından da ayırt edilebilmektedir. VGSC'lerin işlevsel olan ünitesi α alt birimdir. Selektif olarak, por oluşturma yeteneğinden dolayı, kanal açabilmektedir. VGSC'lerin her biri farklı bir gen tarafından kodlanmakta ve bundan dolayı her biri farklı dokularda farklı işlevler yapabilmektedir. VGSC'lerde tanımlanmış 4 β alt birimden $\beta 1$, $\beta 3$ ile kovalent olmayan, $\beta 2$ ve $\beta 4$ alt birimi ile disulfid bağ yaparak aktivasyon içerisinde olurlar. Bu β alt birimleri genellikle α alt birimleri için zemin hazırlayarak plazma zarına yerleşmesine ve sinyalizasyona olanak sağlar.

β alt birimlerinden VGSC β 1'in de meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücre adhezyon molekülü görevinden bahsedilmiştir (Morgan ve ark. 2000, YU ve ark. 2003, Ratcliffe ve ark. 2000, Chioni ve ark. 2009). VGSC'lerin özellikle meme kanseri ve prostat kanserinde genelde ise meme ve prostat kanserlerine ek olarak melanoma, kolon, lenfoma hücrelerinde regülasyon görevinde olduğu bildirilmiştir (Brackenbury 2012) (Tablo 2).

Tablo 2. VGSC'ler tarafından düzenlenen metastatik hücre davranışları (Brackenbury 2012'den değiştirilerek alınmıştır).

Hücreyel Aktivite	Kanser Türü	İlgili Alt Birimler
Büyüme Süreci	Meme, Prostat	Nav1.5, Nav1.7, β 1
Galvanotaksis	Meme, Prostat	Nav1.5, Nav1.7
Yara İyileşmesi	Meme, Prostat	Nav1.5, Nav1.7, β 1, β 2
Migrasyon	Meme, Prostat	Nav1.5, Nav1.7
Endositik Membran Aktivitesi	Meme, Prostat, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	Nav1.5, Nav1.7
Adezyon	Meme, Prostat	Nav1.5, Nav1.7, β 1, β 2
Gen Ekspresyonu	Meme, Prostat, Kolon	Nav1.5, Nav1.7, β 1
İnvazyon	Meme, Prostat, Kolon, Lenfoma, Melanoma	Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, β 1, β 2

Metastatik ve invaziv kanser hücrelerinde VGSC'lerin aktivitesi için farklı hipotezler mevcuttur (Roger ve ark. 2006). Bunlardan bir tanesi epitelyal kanser hücrelerin aksiyon potansiyeli üretebilme yeteneği kazanmalarını kapsar. Bu durum prostat kanserinde invazyon yeteneği kazanmış, artan invaziv yetenekle ilişkili olan

nöroendokrin fenotip özellik elde ettikleri gözlemine dayanmaktadır. Bir başka hipotez olarak dinlenme potansiyelinde kesintiye uğramayan sodyum girişi ile ilişkilendirilen durum mevcuttur. Bu hipoteze göre de dinlenme potansiyeli esnasındaki sodyum girişi enzim salgılanması ve aktivasyonların değişmesi ile birlikte proteaz regülasyonunu etkileyen kalsiyum ve proton dengesini değiştirmektedir. Salgılanmakta olan bu enzimler kanser hücrelerinin göç işlevlerini, aktin hücre düzenlemesi ve ekstraselüler matriksin sindirilmesi aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Roger ve ark. 2006, Fiske ve ark. 2006).

Kanser hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar incelendiğinde VGSC'lerin etkilediği, düzenlediği veya değiştirdiği yolların mekanizmalarının aydınlatıldığı çalışmalar sınırlıdır. VGSC'lerin etkilediği ve/veya düzenlediği mekanizmalar içerisinde, iyon kanalları ve hücrelerin metastaz yapma yeteneklerinin ilişkili olduğu durum araştırmacılar tarafından ilgi çekmiştir (Onkal ve Djamgoz 2009). VGSC'ler ile hücre içine alınan Na^+ akımlarının hücre iç kısmında alkalizasyona, hücrenin dış kısmında da asidifikasyona neden olmaktadır. Bu durumla beraber Na/H değiştiricisi özellikli NHE1'in VGSC'lerle birlikte ekspresyonunun gerçekleşmesi hücre içine Na^+ , hücre dışına H iyonu akımını artırdığını ve bu şekilde de ekstraselüler matriks çatısının yıkımı ve kanser hücrelerinin invazyonunu artırdığı bildirilmiştir (Gillet ve ark. 2009, Brisson ve ark. 2011). Çeşitli araştırmalarda da VGSC'lerin kanser hücrelerinde gen ekspresyonlarını düzenliyor olabileceğinden bahsedilmiş ve kolorektal kanser türlerinde VGSC'lerin metastatik yetenekli kanser hücrelerinin invazyonu ile ilişkisi olduğu düşünülen bir genin işlevini düzenledikleri ve bu gen aracılı sinyallerin invazyonu denetleyen sinyal yollarının regüle edebilecekleri öne sürülmüştür (Chioni ve ark. 2009, Brackenbury ve Djamgoz, 2006, Mycielska ve ark. 2005, Lopez-Santiago ve ark. 2007, House ve ark. 2010). Yapılan araştırmalara göre tahmin edilen bir başka mekanizma ise VGSC'lerin hücre içinde Ca^{2+} seviyelerini düzenleyerek kanser hücrelerinde regülatör olarak görev yapıyor olmalarıdır. VGSC aracılığı ile artan Na akımları, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını sinyalizasyonla açılmalarını sağlamaktadır. Artmış kalsiyum iyonlarının kanser hücrelerinde invadopodları etkileyerek onları şekillendirmekte ve bu yolla da onların invazivliğini

etkileyebilmektedirler (Dravid ve ark. 2004, Fekete ve ark. 2009, Carrithers ve ark. 2009).

2.5.2. Nav1.5

Voltaj kapılı sodyum kanalı α ailesinin belirlenmiş 9 alt biriminden biri olan Nav1.5'in adult ve neonatal yapıda iki formu bulunmaktadır. Adult formu olan adultNav1.5 (aNav1.5) neonatalNav1.5 (nNav1.5) şeklinde isimlendirilmektedir. Burada aNav1.5'ten bahsederken aslında Nav1.5'in kendisinden bahsetmekteyiz. Nav1.5 adult formu temsil etmekte, yenidoğan formu ise neonatal form olarak ifade edilmektedir. Hücre kültürü araştırmaları ve dahası moleküler araştırma yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar doğrultusunda meme kanseri hücre hatları ve dokularında VGSC α 'nın Nav1.5 izoformunun 6.ekzonunda 1.bölgede 3.segment ve 4.segment arasında kırılma nedeniyle meydana gelen neonatal (nNav1.5) formunun daha baskın olduğu belirtilmiştir (Chioni ve ark. 2009). Belirli bir tetrodotoksine dirençli sodyum kanalı olan Nav1.5 (SCN5A tarafından kodlanır), insan düz kas hücrelerinde ve ince bağırsak ve kolonun Cajal interstisyel hücrelerinde eksprese edilir. Memeli gastrointestinal düz kasında, Nav kanalları yavaş dalgalar için uyarıcı gibi görünmektedir ve Nav1.5'in farmakolojik bloğu kabızlık ile ilişkili olduğundan, Nav1.5 insan gastrointestinal kanalında oldukça işlevsel kabul edilmektedir. Nav1.5'i kodlayan SCN5A aynı zamanda kardiyomistlerde oldukça yoğun bir şekilde eksprese edilmektedir (Gellens ve ark. 1992, Strege ve ark. 2007).

2.5.3. aNav1.5 ve nNav1.5'in Fizyolojik İşlevleri ve Kanser ilişkisi

Metastazis olarak adlandırılan, kanser hücresinin istilacı mantıkla hareket ederek sıçramalar yaptığı dönem, kanserli bireyin hayatının kanser hücreleri tarafından en fazla tehdit edildiği dönemidir. Kanser hücresinin iyi huylu veya kötü huylu formları metastaz yapıp yapmadığına bakılarak ayrılabilir. Kanser araştırmalarında çeşitli iyon kanallarının incelenmesi sonucunda tümör hücrelerinin metastazında VGSC'lerin rol oynadığı tespit edilmiştir. SCLC olarak adlandırılan küçük hücreli akciğer karsinomunda VGSC'lerin varlığı uzun zamandır biliniyordu ve

yapılan araştırmalarla da daha önce ortaya konulmuştu (Marx ve ark. 1991, Wonderlin ve Strobl 1996). Yapılan bir çalışmada, araştırmacı kanser hücrelerinde hücre metastazı ve VGSC'lerin ekspresyonu arasındaki ilişkiyi tespit ederek literatüre eklemiştir (Grimes ve ark. 1995). VGSC'lerin gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler gelişimsel olarak regle edilen neonatal kırpılmış varyant olarak ifade edilmesinden ileri gelmektedir. Sinir sisteminde oluşan tümörlerde ve meme kanseri hücrelerinde Nav1.5'in ekspresyonundaki değişiklikler gelişimsel olarak düzenlenmiş embriyonik/neonatal kırpılmış varyantlar olarak ifade edilerek kanserdeki önemine dikkat çekilmiştir (Fraser ve ark. 2005, Chioni ve ark. 2005, OU ve ark. 2005).

Meme kanseri hücrelerinde yapılan araştırmalara bakıldığında, fonksiyonel VGSC'lerin ileri evre metastatik meme kanseri hücrelerinde eksprese edildiği tespit edilmiştir. *İn vitro* alışmalarda, odaklanılan meme kanseri hücre hatlarında VGSC'lerin proliferasyonla ilgili değil metastatik yetenekte olan meme kanseri hücrelerinde invazyonla ilişkili olduğunu tespit edilmiştir (Roger ve ark. 2003, Fraser ve ark. 2005). VGSC'lerin metastazın basamakları olan motilitede ve endositozda rol aldığı belirtilmiştir. Metastatik meme kanseri hücrelerinde ve dokularında nNav15'te upregülasyon belirlenmiştir. Analizleri yapılan örneklerin upregüle nNav1.5 ekspresyonu ve metastaz arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir (Fraser ve ark. 2005). Nav1.5'in ekspresyonunun metastatik meme kanseri hücrelerinde 1000 kata kadar upregüle edildiği gösterilmiştir (Diss ve ark. 2005, Diaz ve ark. 2007).

İnsan meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB-231 ve MCF-7 karşılaştırıldıklarında VGSC'lerin protein ekspresyonlarının zayıf metastatik yetenekli MCF-7'de MDA-MB-231'e göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

VGSC α 'nın Nav1.5 izoformunun 6.ekzonunda 1.bölgede 3.segment ve 4.segment arasında kırpılma nedeniyle meydana gelen neonatal (nNav1.5) formunun daha baskın olduğu daha önce belirtmiş yapılan çalışmalarla sonuçların ortaya konduğunu belirtmiştik. Nav1.5'in bu neonatal formunun ekspresyonunun beyin dâhil birçok dokuda büyüme ve gelişmeyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak yetişkin bireylerde ekspresyonu ciddi oranda downregüle olmasına rağmen, iskelet kası

hücrelerinde ve beyin dokusu hücrelerinde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Normal şartlarda neonatal bireylerde yetişkinlere oranla ekspresyonun upregülasyonu tespit edilmiştir (Raymond ve ark. 2004).

2.5.3.1. Meme Kanserinde aNav1.5 ve nNav1.5

Metastatik açıdan diğer kanser hücre hatlarına göre mutasyona uğramış ve bu yetenekleri gelişmiş olan meme kanseri hücrelerinde yapılmış olan farklı çalışmalarda fonksiyonel olarak gelişmiş olan VGSC'lerin sadece ileri derecede metastatik yetenek kazanmış olan meme kanseri hücrelerinde var olduğu tespit edilmiştir (Roger ve ark. 2003, Fraser ve ark. 2005). Hücrede gerçekleşen metabolik olayların hücresel davranış üzerinden incelenmesi sonucunda, voltaj kapılı sodyum kanallarının hücre çoğalmasından çok kanser hücresinin istilacı yönüyle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. nNav1.5'in özellikle metastatik kanserde eksprese edildiği bildirilmiş, Nav1.5'in bu formunun neonatal gelişimine katkıda bulunurken, postnatal periyotta eksprese edilmediği tespit edilmiştir (Monk ve Holding 2001). Nav1.5 ve nNav1.5'in ekspresyonlarına bakıldığında metastatik meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231'de, daha zayıf metastaz yeteneğine sahip olan bir başka meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'ye göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Kamarulzaman ve ark. 2017, Zhang ve ark. 2018). Nav1.5'in spesifik olarak metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin zarında bulunduğu, sağlıklı hücreler ve yine meme kanseri hücre hattı olan daha az metastaz yeteneğinde olan MCF-7 hücrelerinde ise bulunmadığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada meme kanserlerinde neonatal formun metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde, daha zayıf metastatik yetenekteki MCF-7 hücrelerinden yaklaşık olarak 1800 kat daha yüksek ekspresyonu tespit edilmiştir (Fraser ve ark. 2005). Son olarak yapılan çalışmalarla birlikte, meme kanseri hücrelerinde Sig1r'ın nNav1.5 ile birlikte metastatik aktiviteyi artırdığı öngörülmekte ve VGSC'lerin bir birimi olan Nav1.5 alt kapısının insan meme kanserinde önemli rol aldığı düşünülmektedir (Balasuriya ve ark. 2012, Aydar ve ark. 2016). Nav1.5 metastatik kaskadda yer alarak, farklı hedefler üzerinde hareket etmektedir. Bir araştırmada Nav1.5 tarafından taşınan Na^+ akımlarının, Na^+/H^+ değiştirici izoform-1 (NHE-1) aracılığıyla meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB-231 hücrelerinde

invazivliğı artırdığı belirtilmiştir. H^+ akışının önemli bir düzenleyicisi olarak NHE-1, MDA-MB-231 hücrelerinin kaveoleleri (hücre membranının fonksiyonel elemanlarınca zengin içeriğe sahip oluşumlardır) içerisinde yer alan lipid depolarında VGSC'lerin alt birimi olan Nav1.5 ile birlikte eksprese edilmektedir. NHE-1 ve Nav1.5 MDA-MB-231 hücrelerinde metastatik süreçte birlikte yer almaktadırlar (Brisson ve ark. 2011). Nav1.5'in yüksek metastatik yetenekli meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231'de bulunduğu, sağlıklı ve zayıf metastatik yetenekli meme kanseri hücre hatlarında bulunmadığından bahsetmiştik. Aynı şekilde Na^+ içe doğru akımlar yüksek metastaz yetenekli MDA-MB-231'de tespit edilmiş ancak zayıf metastatik yetenekli olan meme kanseri hücre hatlarında ve normal hücrelerde tespit edilememiştir. Yine, benzer şekilde NHE-1 mRNA ekspresyonları yüksek metastatik yetenekte olan MDA-MB-231'de upregüle halde, zayıf metastatik yetenekli meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de downregüle halde ve normal hücrelerde ise hiçbir şekilde ekspresyonları tespit edilememiştir (Chen ve ark. 2019). Yapılan araştırmalar plazma membran potansiyelinin hücre döngüsünün ilerlemesinde, kanser hücrelerinin farklılaşmasında ve göç potansiyeliyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Sundelacruz ve ark. 2009, Yang ve Brackenbury 2013). Çalışmaların sonuçları, çoğalan tümör hücrelerinin plazma membran potansiyelini depolarize ettiğini, terminal olarak farklılaşmış normal hücrelerin ise hiperpolarize plazma membran potansiyeli ile karakterize edildiğini göstermiştir. Yine bir çalışma ile MDA-MB-231 hücrelerinde dinlenme potansiyelinde olan plazma membranının depolarizasyonuna Nav1.5 tarafından taşınan kararlı durumda olan Na^+ akımının katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Binggeli ve Cameron 1980, Marmo ve ark. 1994, Fraser ve ark. 2005, Yang ve ark. 2020). VGSC'lerin hücrenin metabolik faaliyetlerinin devamı için hayati rol oynadığı oldukça açıktır. Bununla birlikte öncelikle sağlık olmak üzere sosyal ve ekonomik olarak da ciddi bir sorun teşkil etmekte olan meme kanserinde, kanser hücresinin proliferasyonuna, gelişimine, metastazına veya bir başka açıdan yaklaşmak gerekirse yok edilmesine ne denli katkı sağladıklarının bilinmesi, mekanizmalarının tüm yönleriyle aydınlatılması için laboratuvar çalışmaları ve ileri klinik çalışmaları oldukça faydalı olacaktır.

2.5.3.2. aNav1.5 ve nNav1.5 İnhibitörlerinin Kanser Araştırmalarındaki Yeri ve Kullanımı

Lokal anestezikler sadece hedeflenmiş reseptörleri bloke etmekte ve ilgili bölge dışında anestezi etkisi göstermemektedirler. Uygun dozajda kullanıldığında uygulama bölgesinde dokular arasında, hücreler arasında ve hücre içerisinde sinyal iletimini kesmektedirler. Hücre membranını stabilize ederek depolarizasyona engel olmakta, Na^+ ve K^+ iyonlarına karşı geçirgenliği bozan membran stabilizörleri olarak adlandırılmaktadırlar. Birçok çalışmada anestezinin kanserli hastaların sağkalımı ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. Özellikle lokal anestezinin kanserin yeniden nüksetmesi veya nüksetme riskinin azalmasıyla ilişkisinin olduğu öne sürülmüştür. Bu tahminleri açıklamak araştırmacıları lokal anestezik maddelerin opioidleri ve şaperonları koruyucu etkisini araştırmaya itmiştir. Opioidler kanser hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmekle ilişkilendirilmiştir. Bir opioid olarak tanımlanmakta iken daha sonra sahip olduğu özellikler nedeniyle şaperonlar sınıfına da giren Sigr'ın da bu süreçte katkısı olduğu tahmin edilmektedir (Votta-Velis ve ark. 2013, Singleton ve ark. 2015, Weng ve ark. 2016, Sekandarzad ve ark. 2017).

Lidocaine ve levobupivacaine lokal anestezik madde olarak bilinen ve hedef bölgede seçici olarak davranan ve bu özelliğinden dolayı oldukça sık kullanılan iki anestezik maddedir. nNav1.5 ve aNav1.5 lidocaine ve levobupivacaine tarafından selektif olarak inhibe edilmektedir. Yapılmış çalışmalarda lidocaine'in seçici olarak aNav1.5'i inhibe ettiği ve yine seçici olarak levobupivacaine'in ise nNav1.5'i inhibe ederek aktivasyon gösterdiği bildirilmiştir (Elajnaf ve ark. 2018). Bir çalışmada lidocaine'in meme kanserinde hücre sağkalımı ve hücre göçü ile ilişkisi bulunduğu bahsedilmiş, ratlarda da tümör büyümesini inhibe ettiğine dair gözlemlerde bulunmuşlardır (Chamaraux-Tran ve ark. 2018). Meme kanseri hücre hatlarında, hücre canlılığı, göçü ve hücre bölünmesi üzerinde plazma konsantrasyonları ve üzerinde yaygın olarak kullanılan altı lokal anesteziğin karşılaştırıldığı bir çalışmada, levobupivacaine'in hücre göçü ve canlılığı üzerinde etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Levobupivacaine'in meme kanseri hücre hatları olan, hem ileri metastatik yetenekli MDA-MB-231 hücrelerinde hem de zayıf

metastatik MCF-7 hücrelerinde migrasyonu inhibe anlamında etki ettiği rapor edilmiştir (Li ve ark. 2018). Lidocaine ve levobupivacaine'in kanser araştırmalarında kullanılmasına rağmen antitümör mekanizmalarının tam olarak bilinmemesi kanser hücrelerinin büyüme ve göç etme sürecindeki etkileri net olarak açıklanmaya değer görülmektedir.

2.6. TIC10/ONC201, Sigma1r ve Nav1.5'lerin İlişkisi

TRAIL'in kanserin birçok türünde oldukça güçlü bir apoptozis indükleyicisi olduğunu belirtmiştik. Hücre yüzeyinde proapoptotik yolakta ölüm reseptörleri ile kompleks oluşturarak iç ve dış apoptotik yolların aktifleşmesini sağlayarak kanser hücrelerinin sağkalımı için ciddi bir inhibitör olarak yer almaktadır. Kanser türlerinde bağışıklık sisteminin denetlenmesinde önemli bir efektör olarak TRAIL, normal sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermeden proksimal tübül hücrelerinde apoptozisi tetikleyen, bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde koşullu olarak eksprese edilen bir proteindir. Aynı etkiyi gösteren kemoterapik ajan olarak TIC10/ONC201 deneylerde kullanılmaktadır. TIC10 etki mekanizması hakkında bilgiler ilk dönemlere göre oldukça detaylandırılmış durumda. Yapılan ilk çalışmalarla birlikte biyokimyasal analizlerde TIC10 ile tedavi edilmeye çalışılan kanser hücrelerinde TRAIL mRNA seviyeleri gözlemlenmesinde, TIC10 aracılı TRAIL upregülasyonunu muhtemel olarak transkripsiyonel olduğu gösterilmiştir. Sig1r'in upregülasyonunda ve downregülasyonunda kanser hatlarında TRAIL tarafından apoptozda önemli derecede etkisinin olduğu yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Sig1r kanser türlerinde kanser hücrelerinin proliferasyonunda ve invazyonunda görev almakta ve upregüle edilmektedir. Yapılan çalışmalara göz atıldığında Sig1r doğrudan bir etkileşim ile çeşitli iyon kanallarını modüle etmektedir. VGSC'lerin alt birimlerinden biri olan Nav1.5'in de Sig1r ile etkileşimde olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Tüm bu bilgiler ışığında TRAIL aracılı apoptozda, TRAIL'in vazifesini yapıyor olan TIC10/ONC201 kemoterapik ajanının Sig1r'in agonist ve antagonisti ile upregülasyonu ve downregülasyonunda, reseptörün modüle ettiği VGSC'lerin alt birimlerinden olan Nav1.5'in ekspresyon düzeyinde ne gibi değişiklikler olacağını

merak etmekteyiz. Belirlenen hipoteze göre çalışmanın sonucunda şu soruların yanıtlarının araştırılması hedeflenmiştir;

- 1- TRAIL'e karşı Sig1r aracılı gelişen dirençte VGSC alt birimi olan Nav1.5'lerin yanıtı ne olur?
- 2- Sig1r'ı agonisti ile upregüle edildiğinde, TIC10/ONC201'in etkisine karşı Nav1.5'lerin yanıtı ne olur?
- 3- Sig1r'ı antagonisti ile downregüle edildiğinde TIC10/ONC201'in etkisine karşı Nav1.5'lerin yanıtı ne olur?
- 4- Meme kanseri hücre hatlarında kemoterapötik ajan olarak TIC10/ONC201 uygulamasının hücre sağkalımı ve hücre göçüne ne gibi etkisi olur?
- 5- Meme kanseri hücre hatlarında Sig1r agonisti SKF10047 uygulanmasının hücre sağkalımı ve hücre göçüne ne gibi etkisi olur?
- 6- Meme kanseri hücre hatlarında Sig1r antagonisti BD1047 uygulanmasının hücre sağkalımı ve hücre göçüne ne gibi etkisi olur?
- 7- Meme kanseri hücre hatlarında nNav1.5 ve aNav1.5 inhibitörleri olan Lidocaine ve Levobupivacaine uygulamasının hücre sağkalımı ve hücre göçüne ne gibi etkisi olur?

3. MATERYAL VE METOD

Çalışma 2020-TS-16 proje koduyla Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş ve Kafkas Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Hatları

İnsan meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231 ve MCF-7) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi ve Kayseri Erciyes Üniversitesi Gen-Kök (Genom ve Kök Hücre Merkezi)'ten temin edildi.

3.1.2. Primerler

nNav1.5, aNav1.5 ve β -actin primerlerinin amplifikasyonda kullanılan reverse ve forward dizilimleri Tablo 3'te gösterildiği şekilde BİOKİM Teknik Sistemler Firması aracılığı ile temin edilmiş ve annealing sıcaklıkları reaksiyon kurulum esnasında yine Tablo 3'te gösterildiği şekilde belirlenmiştir.

Tablo 3. nNav1.5, aNav1.5 ve β -actin'in amplifikasyonunda kullanılan primerler ve annealing sıcaklıkları

Genler	Reverse ve Forward Primer Dizisi	Annealing sıcaklığı	Döngü Sayısı
aNav1.5	5'-CATCCTCACCAACTGCGTGT-3' 5'-ACATTGCCCAGGTCCACAAA-3'	60°C	40
nNav1.5	5'-CATCCTCACCAACTGCGTGT-3' 5'-CCTAGTTTTTCTGATACA-3'	58°C	40
β -actin	5'-TCACCCACATGTGCCCATCTACGA-3' 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'	58°C	40

3.1.3. Kimyasallar

- RPMI 1640 Medium 500 mL -Thermo Fisher - 21875034
- Leibovitz's L-15 Medium 500 ml- Thermo Fisher - 11415064
- PBS (10X), pH 7.4 500 mL- Thermo Fisher - 70011036
- Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red 100 mL-Thermo Fisher– 25200056
- Total RNA Kit-Eco Tech - E2075
- RT-PCR Supermix- SolisBio Dyne -5x HOT FIREPol® EvaGreen® 08-36-00001
- Cell Viability Detection Kit 8- EcoTech - CVDK-8
- cDNA Reverse Transcription Kit- Thermo Fisher – 4368814
- Lidocaine (Synonyms: Lignocaine) 10 gr- MedChem Express - HY-B0185-10gr
- Levobupivacaine hydrochloride (Synonyms: (S)-(-)-Bupivacaine monohydrochloride) 50 mg- MedChem Express - HY-B0653A- 50mg
- TIC10 (Synonyms: ONC-201) 50mg- medChem Express - HY- 15615A- 50mg

- (+)-SKF 10047 hydrochloride, 10 mg- Santa Cruz - sc-204282
- BD-1047 dihydrobromide 5 mg- MedChem Express - HY-16996A- 5mg
- DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO)- BioShop Canada - DMS555.500 – Reagent Grade 500ml

3.1.4. Kullanılan Cihaz, Alet ve Sarf Malzemeler

- Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiscan SkyHigh, ref: A51119700)
- Vorteks (Velp scientifica, F202A0173)
- Hassas terazi (OHAUS, PR224)
- Derin dondurucu (-80°C), (MDF-DU300H)
- Derin dondurucu (PANASONİC, Pharmaceutical Refrigeratör, MPR-215)
- Buzdolabı (VESTEL, Türkiye)
- Ayarlanabilir Otomatik pipetler (10-100 µl, 100-1000 µl, Ependorf, Varipette, Germany)
- İnkübatör (PANASONİC, Co₂ Incubator, MCO-17046041)
- Biyogüvenlik Kabini (X Bio, MSC CLASS II)
- PCR (Applied Biosystems, MiniAmp Plus, Thermo cycler, A37029)
- Real Time (Applied Biosystems, StepOne Plus™ S/N: 720012158)
- Görüntüleme Cihazı (Invitrogen, iBright CL1000, A32747)
- Otoklav (Nüve OT 40L)
- Invert Mikroskop (Invitrogen, AMF4300, K0218-155H-0354)
- Santrifüj (HERMLE Z 216 MK)
- Santrifüj (HERMLE Z 130 M)
- Santrifüj (HERMLE Z 326 K)
- Buz Makinası (ITV, Icemakers, 102204)

- Elektroforez (BioRad, PowerPac Basic, 041BR312026)
- Azot Tankı (Worthington Industries, LS3000)
- Serolojik Pipet- Lp Italiana - L161010- 10mL
- Serolojik Pipet- Lp Italiana - L160510- 5mL
- Cryo Tüp 2mL- Biosigma - N403522
- Santrifüj Tüpü 50mL- Isolab - 078.02.003
- Santrifüj Tüpü 15mL- Isolab - 078.02.001
- Filtreli Pipet Ucu- Filtreli, DNase, Rnase And Pyrogen- Free, 10 µl- Tarsons - E527100
- Filtreli Pipet Ucu- Filtreli, DNase, Rnase And Pyrogen- Free, 200 µl- Tarsons - E527104
- Pipet Ucu- 1000 µl, Taksimatlı, Eppendorf- Tarsons - E521016
- Mikrosantrifüj Tüp - P.P - 2,0 mL- Isolab - 078.03.003
- Pipet Pompası- Superior - C584102
- 96 well Tissue Culture Plate- SPL – 30096
- 6 well Cell Culture Plate- SPL – 30006
- Sıvı Aktarım Kabı 30mL- Isolab - 006.13.030
- Sıvı Aktarım Kabı 55mL- Isolab - 006.13.055
- Petri Kutusu- Lamtek - LT1002170
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL 20 plates- Thermo Fisher - 4346906
- Sıvı Aktarım Kabı 30mL- Isolab - 006.03.030

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları, sıvı azot içerisinde çıkartılarak, %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin ve streptomisin antibiyotik solüsyonu içeren 10mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile steril petri kabına ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Yapılan tüm uygulamalar BCL-2 sınıfı biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir.

İlk ekimden sonraki 12. saatte hücre hatları inverted mikroskop altında, petri tabanına tutunduklarının belirlenmesine müteakip mediumları değiştirildi ve belirtilen inkübasyon koşullarına geri bırakıldı. Hücrelerin %70 oranında yoğunluğa ulaşması için gereken süre olan 48-72 saat inkübatörde bekletildi. Bu sürenin sonunda hücrelerin, inverted mikroskop altında %70 oranında çoğaldığının belirlenmesinin ardından, hücrelerin mediumları atılarak 4mL steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkanarak hücre artıkları ve atıkları uzaklaştırıldı daha sonra 2mL tripsin ile 37°C'de 3-4 dakika inkübe edilip petri tabanından ayrılmaları sağlandı. 90mm çaplı petri ve 96'lık plate ekimlerinde miktarlarının (hücre/mL) belirlenmesi için, 10µL hücre süspansiyon örneği 10µL trypan blue ile pipetlenerek Countess™ II Automated Cell Counter cihazında hücre sayıları belirlendi. 90mm çaplı petri kutularına yapılan ekimlerde petri başına 3×10^5 hücre ekildi. 96'lık platelere yapılan ekimlerde ise kuyucuk başına 1000 hücre ekimi yapıldı.

Çalışmamız *in vitro* olarak MDA-MB-231 ve MCF7 insan meme kanser hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Grupların metodolojik kurguları ve hangi gruplara hangi analizlerin yapıldığı Tablo 4'te belirtilmiştir. Hücreler spesifik medium ve inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir. ONC201'in EC₅₀ dozunun belirlenmesi için her hücre hattı 24 saat boyunca 1-15µM arasında değişen ONC201 dozuna maruz bırakıldı (Yuan ve ark. 2017'den uyarlanmıştır). ONC201'in EC₅₀ dozunun belirlenmesinin ardından, istenilen yoğunluklarda çoğalan MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinin, Tablo 4'de belirtilen madde-doz uygulamalarında hücre proliferasyonun

değerlerinin belirlenmesi için 96'lık steril platelere kuyucuk başına 1000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat ve 48 saat sonraki hücre sayıları 450nm filtreli plate okuyucuda belirlendi. MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinin Tablo 4'te belirtilen madde-doz uygulamaları sonucunda etkilenen hücre migrasyon ve interaksiyon karakteristiklerinin belirlenmesi içinse Wound Healing analizi yapıldı. Bu amaca yönelik olarak hücreler 6 kuyucuklu steril petrilere, kuyucuk başına 4000 hücre olarak ekim yapılmasının ardından hücrelerin plate tabanında %90 oranında üremeleri sağlandı ve bu yoğunluğun ardından steril 100 µL pipet ucu yardımıyla her kuyucuğun çapına denk gelecek doğrultuda düz bir hat oluşturuldu. Bu aşamadan sonra ise hücrelerin bu boşluğa yürümesi 0, 12, 24 ve 48. saatlerde fotoğraflama işlemi ile belirlendi ve migrasyon uzaklığı PSCS6 (Photoshop6) yazılımı yardımıyla ölçüldü.

90mm çaplı steril petrilere 3×10^5 miktarındaki hücrelerin Tablo 4'te belirtilen gruplar çerçevesinde ekilerek, yine Tablo 4'te belirtilen madde-doz uygulamaları sonucunda, aNav1.5 ve nNav1.5 mRNA ekspresyon profillerinin RT-PCR ile belirlenmesi için hücre örnekleri toplandı. Bu aşamadan sonra örneklerden total RNA izolasyon basamakları gerçekleştirilerek cDNA kütüphanesi oluşturuldu. cDNA kütüphanesinin elde edilmesinden sonra ise Tablo 5'te belirtilen primerler yardımıyla RT-PCR reaksiyonları kuruldu.

Son olarak elde edilen verilerden, veri setinin karakteristik özellikleri doğrultusunda gerekli istatistiki analizler IBM SPSS 26.0 yazılımı yardımıyla yapıldı.

ONC201'in doz uygulamaları Yuan ve ark. (2017) tarafından, farklı kanser hücre hatları üzerinde yapılan çalışmadan elde edilen verilerden yola çıkarak belirlenmiştir. SKF10047 (Sig1r agonist) doz miktarı Das ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmadan uyarlanmıştır. BD1047 (Sig1r antagonist) doz miktarı Brailoiu ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmadan uyarlanmıştır. Levobupivacaine ve Lidocaine doz miktarı ise Elajnaf ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmadan uyarlanmıştır.

Tablo 4. Gruplar ve yapılan analizler

Grup Adı		Açıklama
MDA-MB-231	Hücre Proliferasyonu ve Wound Healing Assay*	Kontrol
		Herhangi bir uygulama yapılmadı
		ONC201
		ONC201'in EC ₅₀ dozu verildi
		SKF10047 (Sig1r Agonisti)
		10µM SKF10047 verildi
		ONC201+ SKF10047
		ONC201'in EC ₅₀ dozu ile 10µM SKF10047 verildi
		BD1047 (Sig1r Antagonisti)
		25µM BD1047 verildi
		ONC201 + BD1047
		ONC201'in EC ₅₀ dozu ile 25µM BD1047 verildi
MCF7	Hücre Proliferasyonu ve Wound Healing Assay*	ONC201 + SKF10047 + Levobupivacaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM SKF10047 ve 1µM Levobupivacaine verildi
		ONC201 + SKF10047 + Lidocaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM SKF10047 ve 10µM Lidocaine verildi
		ONC201 + BD1047 + Levobupivacaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM BD1047 ve 1µM Levobupivacaine verildi
		ONC201 + BD1047 + Lidocaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM BD1047 ve 10µM Lidocaine verildi
		Kontrol
		Herhangi bir uygulama yapılmadı
		ONC201
		ONC201'in EC ₅₀ dozu verildi
		SKF10047
		10µM SKF10047 verildi
		ONC201 + SKF10047
		ONC201'in EC ₅₀ dozu ile 10µM SKF10047 verildi
		BD1047
		25µM BD1047 verildi
		ONC201 + BD1047
		ONC201'in EC ₅₀ dozu ile 25µM BD1047 verildi
		ONC201 + SKF10047 + Levobupivacaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM SKF10047 ve 1µM Levobupivacaine verilecek grup
		ONC201 + SKF10047 + Lidocaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM SKF10047 ve 10µM Lidocaine verildi
		ONC201 + BD1047 + Levobupivacaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM BD1047 ve 1µM Levobupivacaine verildi
		ONC201 + BD1047 + Lidocaine
		ONC201'in EC ₅₀ dozu, 10µM BD1047 ve 10µM Lidocaine verildi

3.2.2. Proliferasyonun Belirlenmesi

Proliferasyonların deneyde kullanılan maddeler tarafından (ONC201, SKF10047, BD1047, Lidocain ve Levobupivacain) değişimlerinin belirlenmesi amacıyla Cell Viability Detection-8 Kit (Eco-Tech, Turkey) kullanıldı. Hücreler 96'lık steril platelere, kuyucuk başına 1000 hücre (100 μ L'de) ekildi. İlk ekimin ardından hücrelerin plate tabanına yapışması ve yoğunluklarını arttırması için 24 saat spesifik inkübasyon koşullarında inkübe edildi. Süre sonunda ilgili madde veya madde kombinasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin, 24 ve 48 saat sonunda ise Cell Count-8 Kit kullanım protokolüne uygun bir şekilde spektrofotometrik olarak sayıları belirlendi.

3.2.3. Hücre Örneklerinin Toplanması

Steril petrilerde üretilen hücreler toplanma sürelerinin sonunda mediumlarından uzaklaştırılarak 4mL fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkama işleminin sonunda bu tampon aspire edilerek tekrar 2mL fosfat tamponu eklendi ve hücreler petri tabanından kazınarak buz üzerinde steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Eppendorf tüplerine aktarılan örnekler 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve buz üzerinde süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından -80°C dondurucuya bırakıldılar.

3.2.4. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu E2075 Katalog numaralı Eco Pure Total RNA Kit (Eco-Tech, Turkey) ile kit protokolüne uygun şekilde yapıldı.

3.2.5. Total RNA Örneklerinin NanoDrop Spektrofotometre Yardımıyla Miktar ve Kalitelerinin Tayini

Thermo Nanodrop 2000 cihazı ile RNA örnekleri, RNA çözeltilerinin hazırlanmış olduğu elution buffer kör olarak okutulularak ölçümleri yapıldı. Düşük

yoğunluk ve kalitedeki örneklerin elde edilmesi halinde izolasyon tekrarlandı. Her örnek için okuma 3 tekrarlı yapıldı.

3.2.6. cDNA Kütüphanesi

cDNA (Complementary DNA) kütüphanesinin oluşturulması için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, 4368814, ABD) kullanıldı. Yürütülen tüm basamaklar kit protokolünde belirtilen yönergeler doğrultusunda yapıldı. Total RNA izolatlarından eşit miktarda alınması için gereken miktar nanodrop ölçüm sonuçlarına göre hesaplanarak belirlendi.

3.2.7. Gerçek Zamanlı PZR-Real Time PCR (RT-PCR)

Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Real Time-Polimerase Chain Reactions (RT-PCR), PCR aşamasındaki her döngünün sonucu olarak ürünler birikirken eş zamanlı olarak nükleik asit kümülatif amplifikasyonunun gözlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan SYBR Green gibi özel boyalar amplifikasyonun gözlenmesini sağlayan ürünlerdir. SYBR Green DNA çift sarmalına bağlanarak floresan ışıma yapıp amplifikasyon miktarının saptanmasını sağlamaktadır. Her döngü sonunda oluşan çift zincirli PCR ürün miktarları ölçülerek daha kesin veya daha göreceli kantitatif analizlerin yapılmasına olanak sağlayan RT-PCR klasik PCR'ın sınırlarını aşmaktadır (Nolan ve ark. 2006). RT-PCR'da cDNA ürünlerinin amplifikasyonu sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı ilk döngü sayısı eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) olarak adlandırılmaktadır. Ct değeri hedeflenen veri sekansının çalışılan örnekteki kopya sayısı ile ters orantı içindedir ve sonuç olarak ekspresyon miktarı ne kadar yüksek ise Ct değeri o kadar düşüktür (Wong ve Medrano 2005).

cDNA amplifikasyonlarının sağlanması için Brackenbury ve ark. (2007) tarafından belirtilen primer ve reaksiyon koşulları kullanılmıştır (Tablo 3). House Keeping gen β -actin içinse Xing ve ark. (2014) tarafından belirtilen primer ve reaksiyon koşulları kullanılmıştır. Tüm reaksiyonlar Applied Biosystem

StepOnePlus™ Real-Time PCR System ile SYBR™ Green PCR Master Mix kullanılarak yapıldı ve tüm işlemler üretici firmanın protokolleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Threshold amplifikasyon siklusu (CT) Applied Biosystem StepOnePlus™ cihaz yazılımı yardımıyla otomatik olarak belirlendi. Her örnek reaksiyonu triple çalışıldı.

Grupların aNav1.5 ve nNav1.5 genlerinin RT-PCR sonrası elde edilen verileri B-aktin geniyle normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerinin 1'den büyük olması gen ekspresyonunda meydana gelen artışı, 1'den küçük olması ise gen ekspresyonunda meydana gelen azalışı ifade etmektedir.

3.2.8. Hücre Çizik Testi (Wound Healing Assay)

Yara iyileşmesi deneyi birçok yönden avatajlı olmakla birlikte basit, ucuz, kolay uygulanabilir ve *in vitro* hücre çalışmalarında migrasyon ve invazyon değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Temelde üç adımdan oluşmaktadır. Öncelikle hücreleri petri kabına veya flaska monolayer şeklinde ekim yapmak ve daha sonra kanal şeklinde petri veya flask boyunca çizik çekmek suretiyle yara oluşturmak, daha sonra da sıfıncı saatten itibaren deney süresince görüntüleme yaparak kanalın kapanma süre ve uzunluğunu ölçüp görüntüleri istatistiksel olarak karşılaştırıp değerlendirmede bulunmak şeklinde gerçekleştirilir.

Meme kanseri hücreleri 6-kuyulu plaklara 15×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat kadar inkübasyona bırakıldı. Sonrasında uygun ilgili kimyasalların uygulaması gerçekleştirildi. Uygulama sonrası her bir kuyu için 100 µl'lik pipet ucu ile çizik atılarak yara modelleri oluşturuldu. Yüzeyden kalkmış hücre ve kalıntıları uzaklaştırmak için kuyular PBS ile yıkanarak temizlendi. Hemen ardından inverted mikroskopta her kuyu için oluşturulan yaraların 6 farklı bölgesinden görüntü alındı ve 0. saat görüntüleri olarak kaydedildi. Hücreler daha sonra inkübatöre 48 kadar inkübasyona bırakıldı. Oluşturulan yaralar üzerindeki 6 ayrı noktadan mesafeler görüntülenerek 0, 12, 24 ve 48.saatler için görsel olarak karşılaştırıldı ve PSC6

programı aracılığı ile kapanmaların mesafesi ölçülerek elde edilen veriler istatistiksel analiz için kayıt edildi.

3.2.9. Jele PCR Ürünlerinin Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi

Tüm PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezde 60 dakika boyunca 90V'da yürütülerek UV görüntülemeleri yapılmıştır.

- 2 mL 50x TAE tamponu, dH₂O ile 100mL'ye tamamlanmıştır.
- 1gr agaroz tartılarak 1. basamaktaki karışımın üzerine eklendi ve mikrodalga fırında agaroz eriyinceye dek, karışım belirli zaman aralıklarında karıştırılarak ısıtılmıştır.
- Homojen olarak çözünen agaroz çözeltisinin her 20 mL için 1 mL Etidyumbromür karışıma eklenerek elektroforez kasetlerine dökülmüş ve jelin oluşması için 25-30 dakika bekletilmiştir.
- Elektroforez kasetlerine takılan taraklar jel oluşumunun ardından çıkartılarak elektroforez tankının içerisine konulmuştur.
- Elektroforez tankının içerisine, iletkenliğin sağlanması için 50x TAE tamponundan, dH₂O yardımıyla 1x TAE çözeltisi hazırlanarak agaroz jelin üzerini yaklaşık 1cm aşacak şekilde eklenmiştir.
- Agaroz jel kuyucuklarının en başına ve en sonuna 1µl 100bp'lik marker + 2µl yükleme boyası, örnek kuyucuklarına ise 10µl PCR ürünü + 2µl yükleme boyası pipetlenerek konulmuştur.
- Tüm jel yürütmeleri 60 dakika boyunca 100V'de koşturulup ve son olarak UV görüntüleme sisteminde bant fotoğrafları çekilmiştir.

3. 2. 10. İstatistiksel Analizler

Deney sonrasında elde edilen tüm veriler IBM SPSS 26.0 yazılımına aktarılarak veri seti oluşturuldu. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlı değerler $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ şeklinde 3 kısma ayrıldı. Oluşturulan veri setindeki tüm

parametrelere Shapiro-Wilk normallik testi ve Levene Homogeneity of Variance Testi uygulandı. Bu aşamanın ardından parametrik ve homojen olduğu belirlenen parametrelere, gruplar arası karşılaştırma için (3 ve üzeri grup) One-Way ANOVA testi uygulandı ve $p < 0.05$ durumunda Equal Variances Assumed Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden veri karakteristiğine en uygun test olan Tamhane ve Bofferoni testi uygulandı. 0 ve 48 saatlik grup içi karşılaştırmalarda ise (2 zaman değeri) verilerin parametrik olduğu tespit edildikten sonra Independent Samples T Testi uygulandı. Parametrik test sonuçlarında ortalama $\pm$ standart sapma kullanarak çubuk grafikler elde edildi.



4. BULGULAR

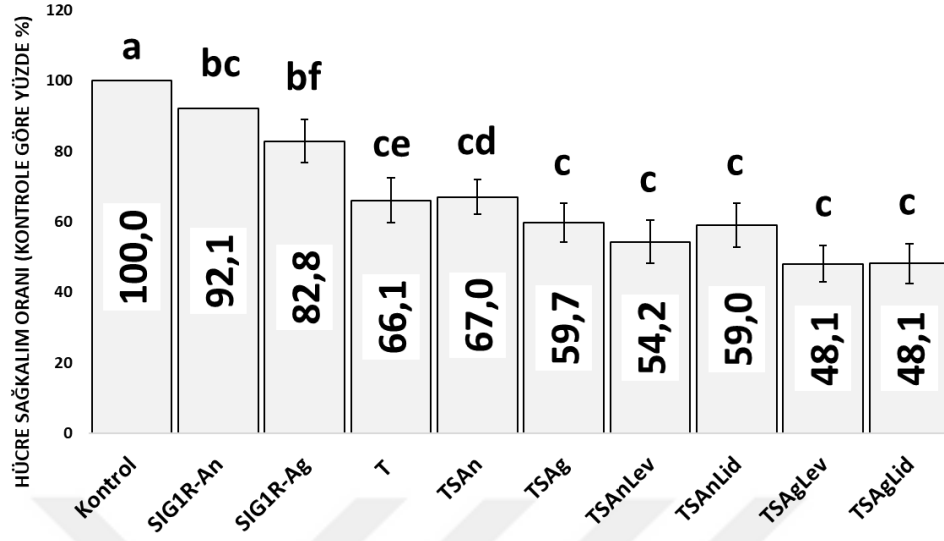
4.1. Hücre Proliferasyon Düzeylerinde Tespit Edilen Değişiklikler

4.1.1. SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kanalları İnhibitörlerinin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Proliferasyona Etkisi

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında grupların hücre sağkalım düzeylerinde belirlenen değişiklikler Şekil 24’de gösterilmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SIG1RAn hariç uygulama gruplarında hücre sağkalım düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$). Bununla birlikte SIG1RAn grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hücre sağkalım düzeylerinin değişmediği tespit edildi. TSAgLev ve TSAgLid gruplarında hücre sağkalım düzeylerinin kontrol ve deneme gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmış olduğu ve grupların hücre sağkalım düzeylerinin %48.1 olduğu belirlendi ($p<0.001$). Deneme grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında en fazla hücre sağkalım düzeyinin %92.1 ile SIG1RAn ve %82.8 ile SIG1RAg gruplarında olduğu gözlemlendi ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$).

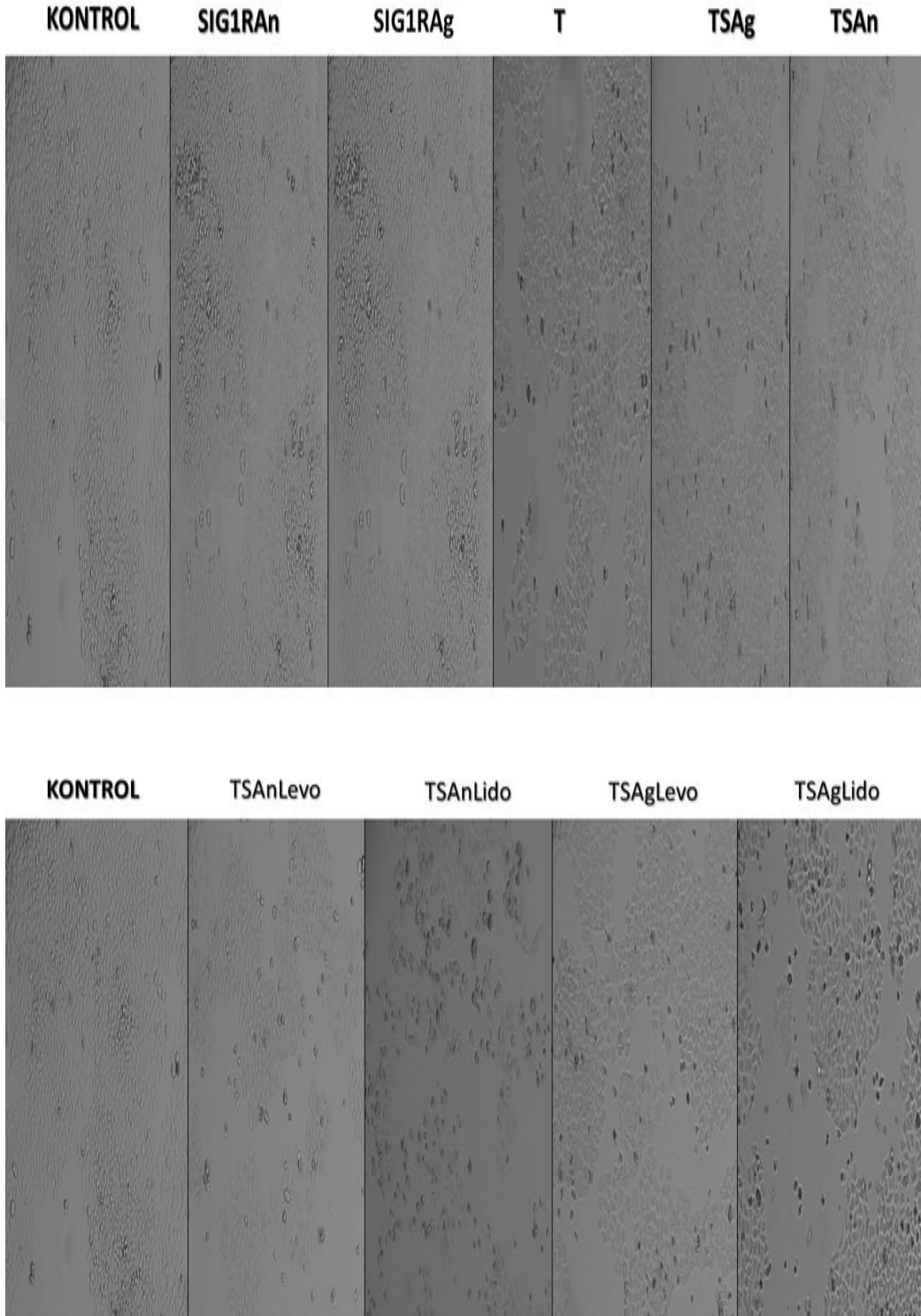
MDA-MB-231



Şekil 24. MDA-MB-231 hücre hattı proliferasyon düzeyleri (a-c, a-cd, bc-cd, c-bc, cd-c, ce-c:

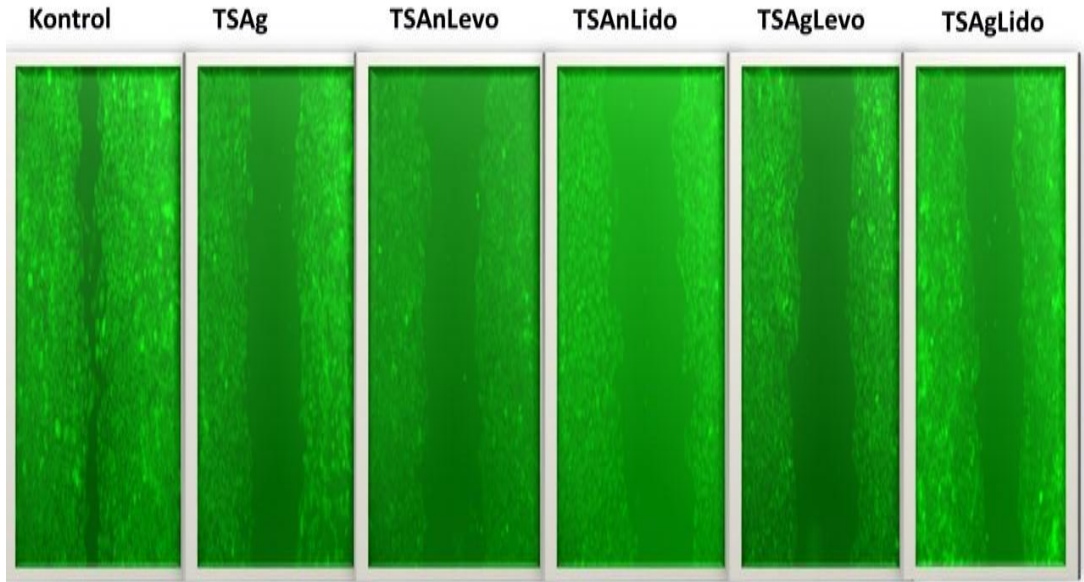
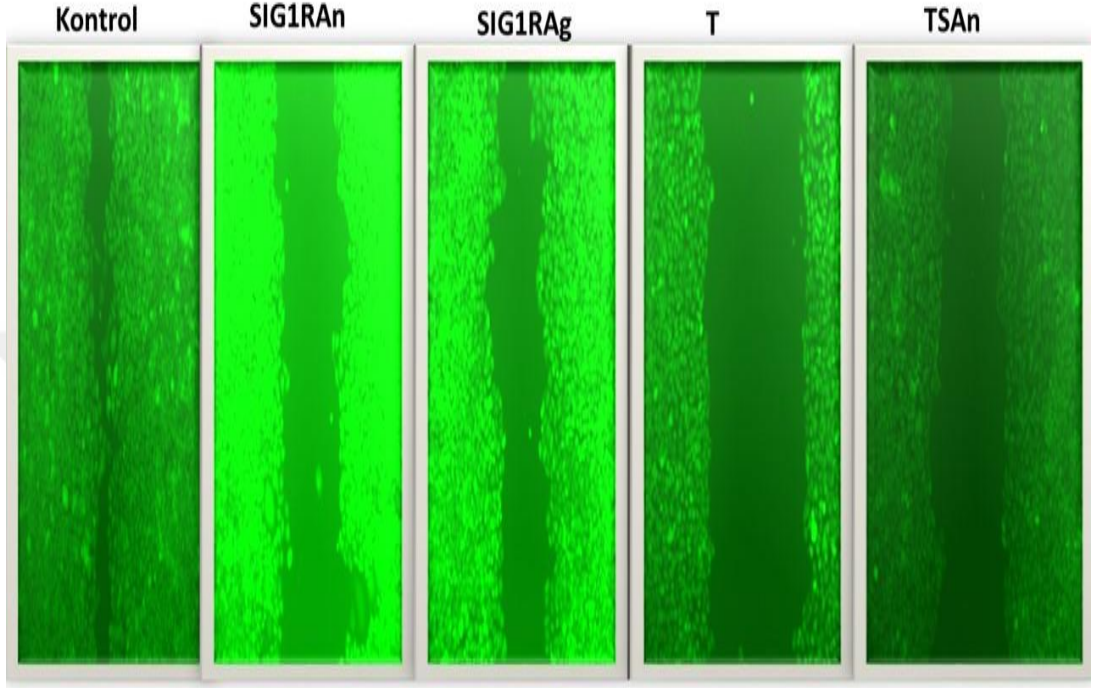
p<0.001, a-b, a-bf, bf-cd: p<0.01, b-c, bf-c, bf-cd, bf-ce, ce-bc: p<0.05, SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAG: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201-SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn - Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201-SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

MDA-MB-231 Hücre Hattında Hücre Sağ Kalımı Üzerine Etkiler



Resim 1. MDA-MB-231 Hücre Hattında 48. saat Hücre Sağkalımı Görüntüleri

MDA-MB-231 Hattında Çizik Deneyi Floresan diasetat ile Boyanmış 48.saat görüntüleri

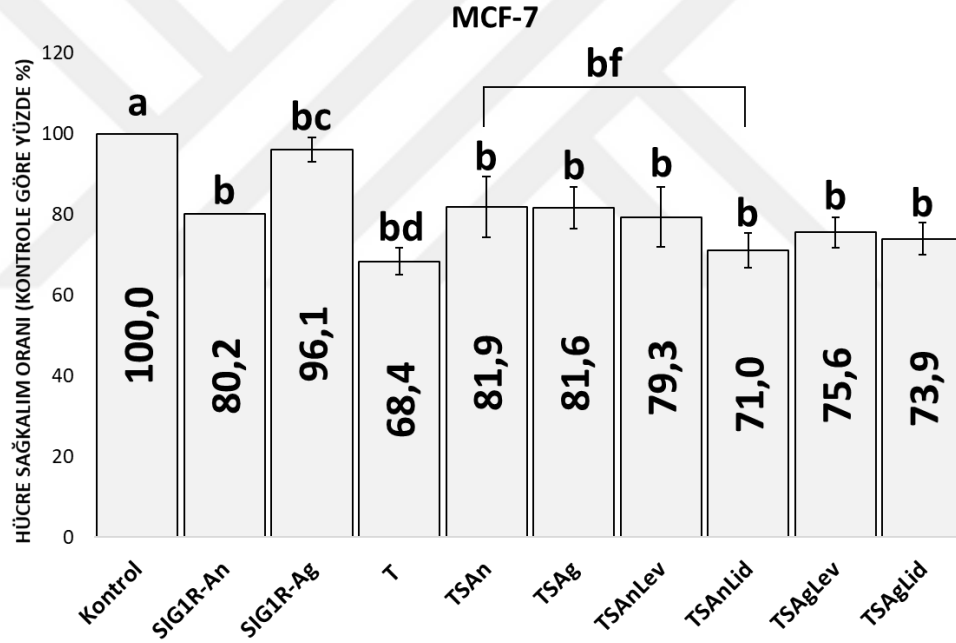


Resim 2. MDA-MB-231 Hücre Hattında 48.saat Hücre Çizik Testi Floresan diasetat Boyama Görüntüleri

4.1.2. SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin MCF-7 Meme Hücre Kanseri Hattında Proliferasyona Etkisi

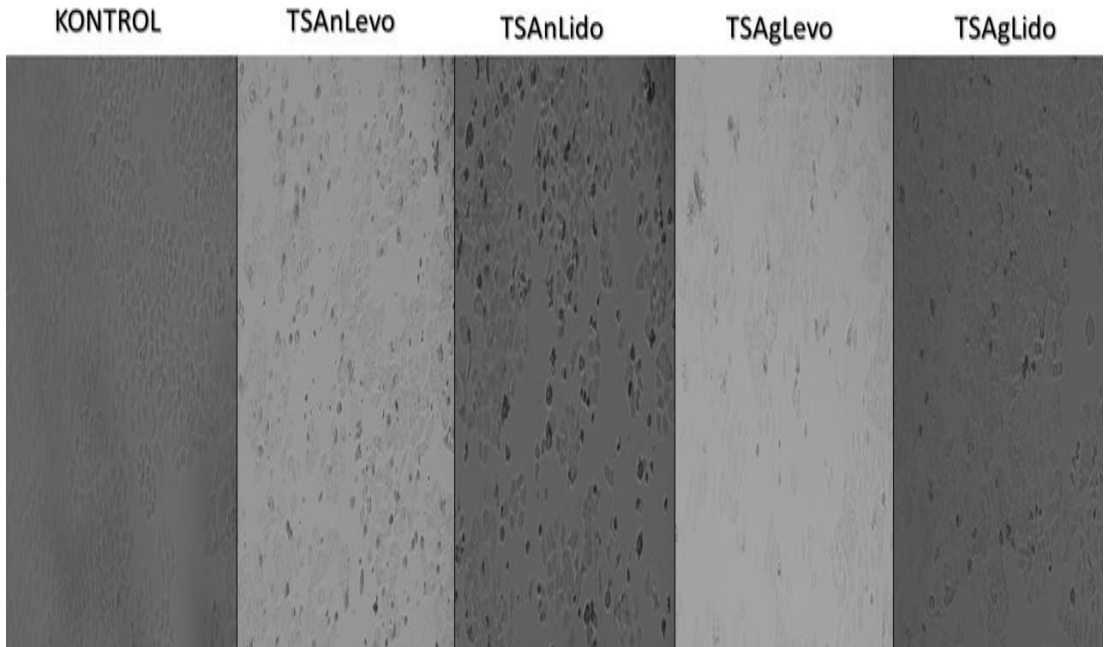
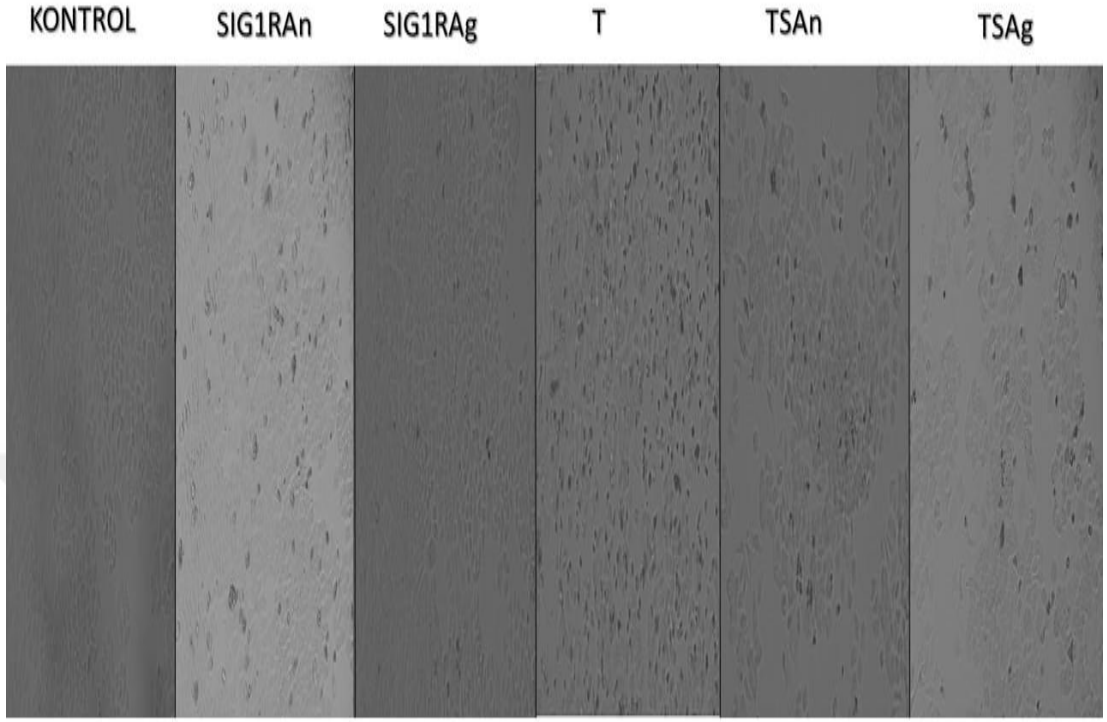
MCF-7 meme kanseri hücre hattında grupların hücre sağkalım düzeylerinde belirlenen değişiklikler Şekil 25’de gösterilmiştir.

Kontrol grubu ile istatistiksel olarak yapılan karşılaştırmalarda hücre sağkalım düzeylerinin deneme gruplarında belirgin düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0.001$). Deneme grupları kendi içinde karşılaştırıldığında hücre sağkalım düzeylerinin SIG1Rag grubuna göre diğer gruplarda belirgin derecede düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Bununla birlikte % 68.4 hücre sağkalımı ile en düşük düzeyin T grubunda olduğu belirlendi ($p<0.01$)



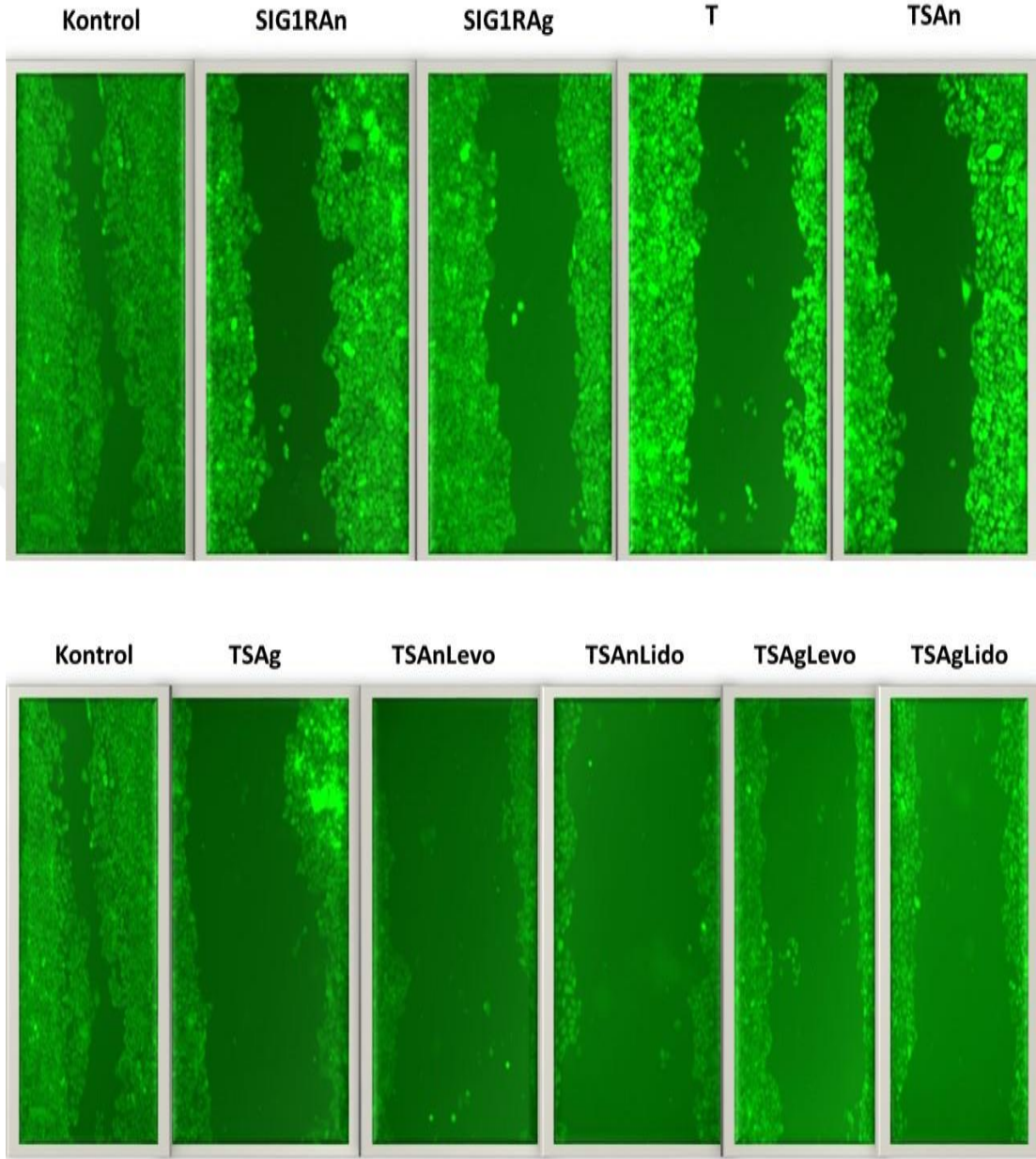
Şekil 25. MCF-7 hücre hattı proliferasyon düzeyleri (a-b, b-bc, a-bd, bc-bd, : $p<0.001$, b-bd: $p<0.01$, b-bf: $p<0.05$, SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1Rag: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1Rag, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1Rag - Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201- SIG1Rag -Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

MCF-7 Hücre Hattında Hücre Ölümü Üzerine Etkiler



Resim 3. MCF-7 Hücre Hattında 48. saat Hücre Sağkalım Görüntüleri

MCF-7 Hattında Çizik Deneyi Floresan diasetat ile Boyanmış 48.saat görüntüleri



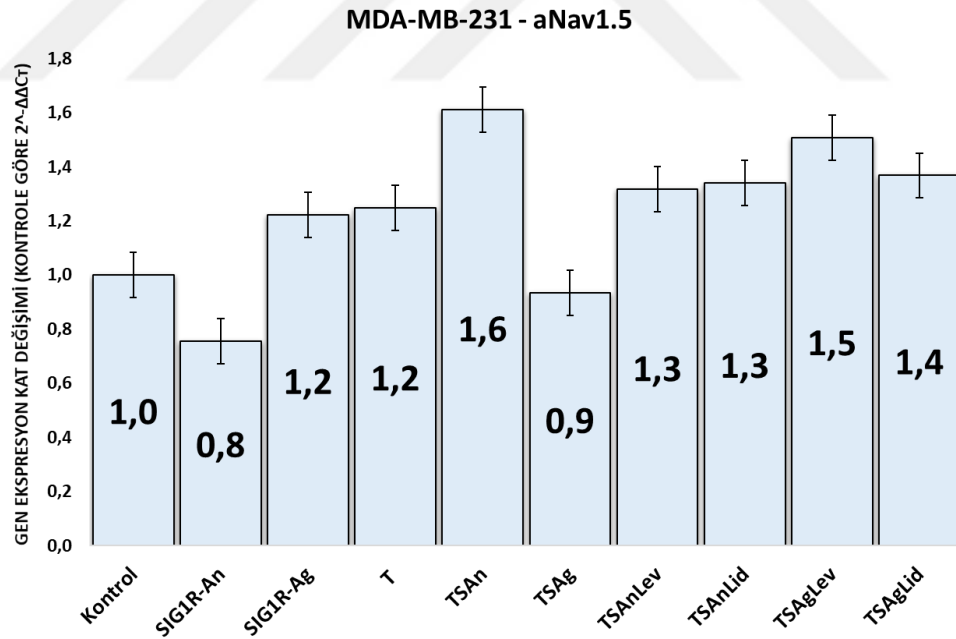
Resim 4. MCF-7 Hücre Hattında 48. saat Hücre Çizik Testi Boyama Görüntüleri

4.2. Gen Ekspresyon Seviyelerinde Tespit Edilen Değişiklikler

4.2.1. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin aNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı aNav1.5 gen ekspresyonu değişimleri Şekil 26’da gösterilmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında aNav1.5 gen ekspresyon düzeylerinde yapılan karşılaştırmada kontrol grubuna göre deneme gruplarının aNav1.5 gen düzeylerinin SIG1RAn ve TSAg grupları dışında arttığı gözlemlendi. SIG1RAg ve T gruplarında 1.2 kat, TSAn grubunda 1.6 kat, TSAnLev ve TSAnLid gruplarında 1.3 kat, TSANLev grubunda 1.5 kat ve TSANLid grubunda 1.4 kat artış belirlendi. SIG1RAn (0.8)ve TSAg (0.9) gruplarında ise kontrol grubuna göre belirgin azalma olduğu tespit edildi.

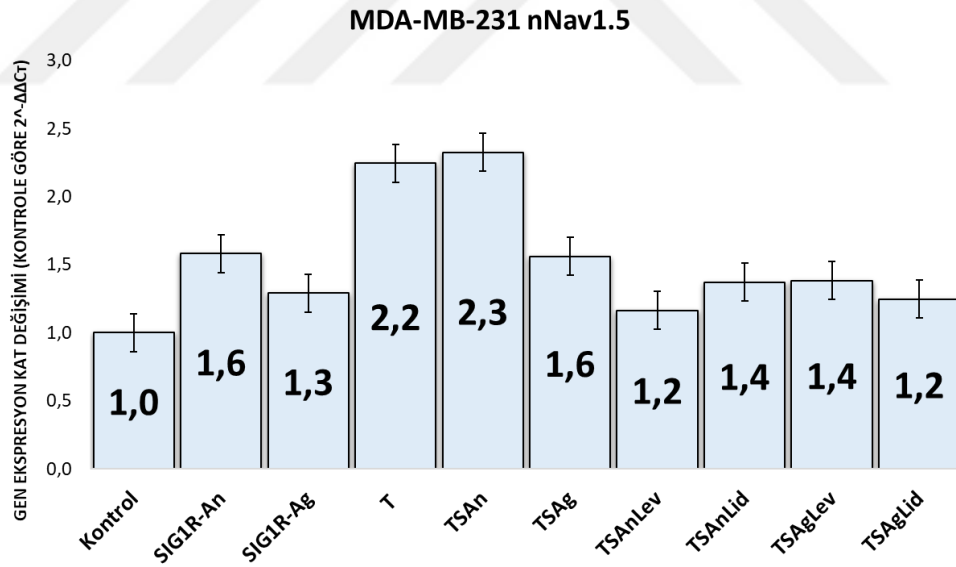


Şekil 26. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında aNav1.5 Gen Ekspresyon Değişimleri (SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAg: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAg, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAg -Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201- SIG1RAg -Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

4.2.2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kanalları İnhibitörlerinin nNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında nNav1.5 gen ekspresyonu değişimleri Şekil 27’de gösterilmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada deneme gruplarında nNav1.5 gen ekspresyon düzeylerinin belirgin olarak arttığı tespit edildi. Deneme grupları arasında yapılan karşılaştırmada nNav1.5 düzeylerinin T grubunda 2.2 kat ve TSAn grubunda 2.3 kat artarak diğer gruplara göre önemli miktarda yüksek olduğu gözlemlendi.



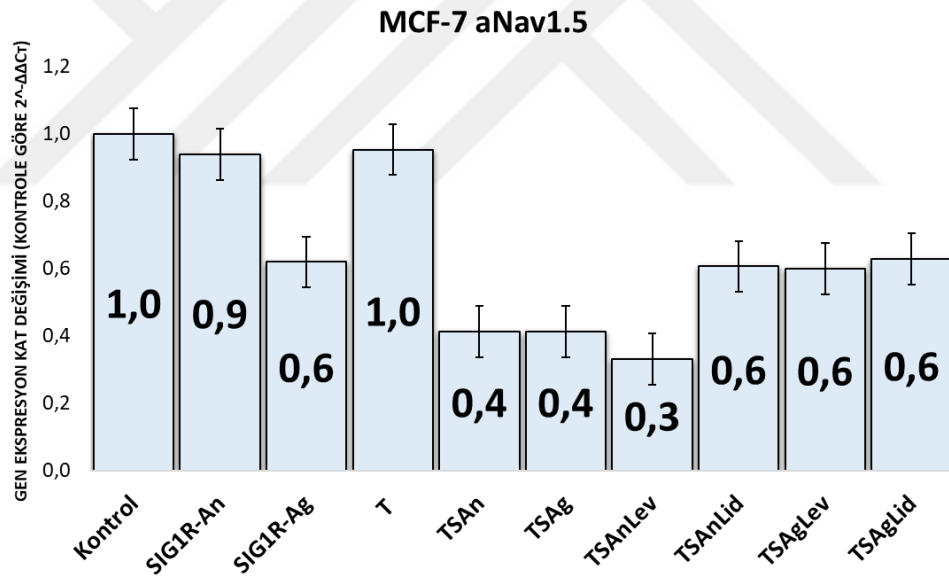
Şekil 27. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında nNav1.5 Gen Ekspresyon

Değişimleri (SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAG: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAG, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAG -Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201- SIG1RAG -Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

4.2.3. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin aNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri

MCF-7 meme kanseri hücre hattında aNav1.5 gen ekspresyonu değişimleri Şekil 28’de gösterilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada deneme gruplarında aNav1.5 gen ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aNav1.5 gen ekspresyon düzeylerinin en fazla sırasıyla (0,4, 0,4, 0,3 kat) TSAnLev, TSAn, TSAg gruplarında azaldığı görüldü.



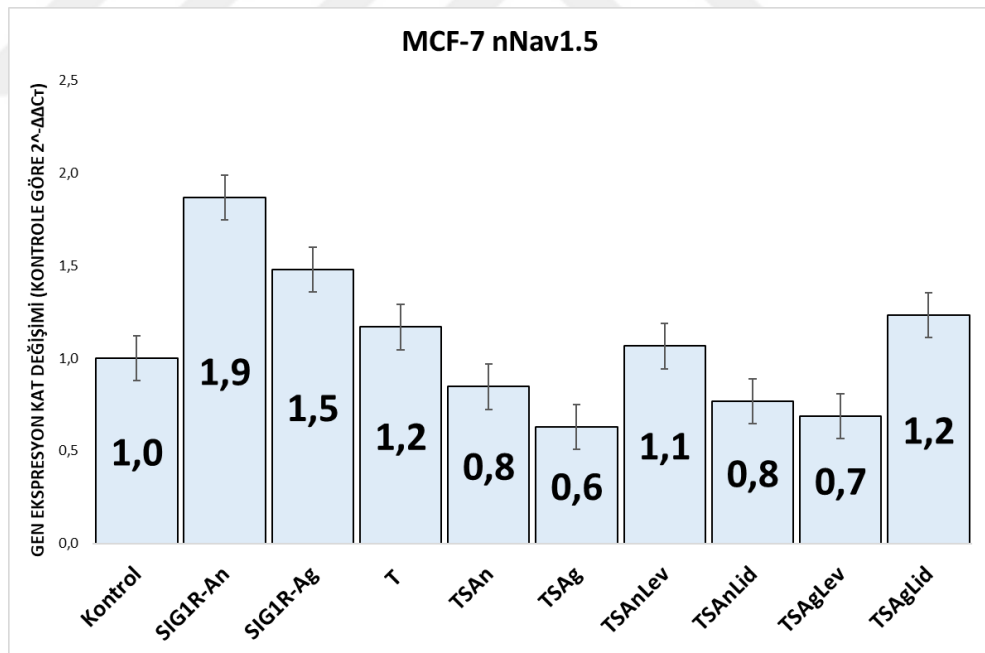
Şekil 28. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında aNav1.5 Gen Ekspresyon Değişimleri

(SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAG: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAG, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAG -Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201- SIG1RAG -Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

4.2.4. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kapıları İnhibitörlerinin nNav1.5 Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkileri

MCF-7 meme kanseri hücre hattında nNav1.5 gen ekspresyonu değişimleri Şekil 29’da gösterilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında nNav1.5 gen ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada uygulama gruplarında sırasıyla TSAn grubu 0.8 kat, TSAg grubu 0.6 kat ve TSAnLid grubunda 0.8 kat olarak azalma gözlemlendi. Diğer uygulama grupları SIG1RAn 1.9 kat, SIG1RAg 1.5 kat, T 1.2 kat, TSAnLev 1.1 kat ve TSAgLid grubunda 1.2 kat artış tespit edildi. nNav1.5 gen ekspresyon düzeylerinde uygulama grupları arasında en fazla artış 1.9 kat ile SIG1RAn grubunda görülürken, en fazla azalma ise 0.6 kat ile TSAg grubunda belirlendi.



Şekil 29. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında nNav1.5 Gen Ekspresyon Değişimleri

(SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAg: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAg, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAg -Lidocaine, TSAGLev: TIC10/ONC201-SIG1RAg-Levobupivacaine, TSAGLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

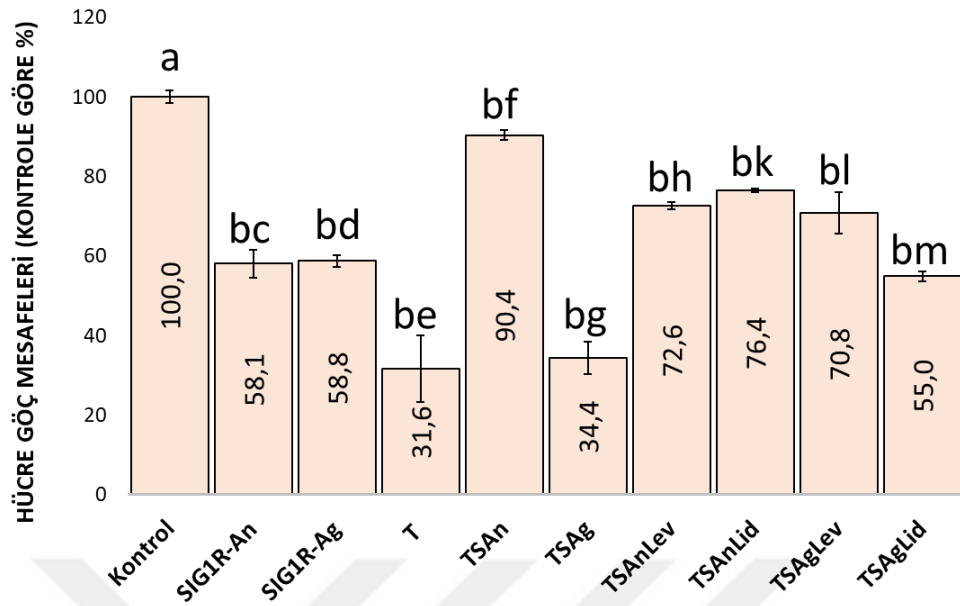
4.3. SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kanlıları İnhibitörlerinin Hücre Migrasyon Düzeylerine Etkileri

MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında, grupların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen veriler Şekil 30, 31'ea ve grupların 0, 12, 24 ve 48. saatlerinde belirlenen Wound-Healing testi alan görüntüleri Resim 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'da verilmiştir.

4.3.1. MDA-MB-231 hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kanlıları İnhibitörlerinin Hücre Migrasyon Düzeylerine Etkileri

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında grupların Wound Healing testi 48 saat karşılaştırmaları Şekil 30'da gösterilmiştir.

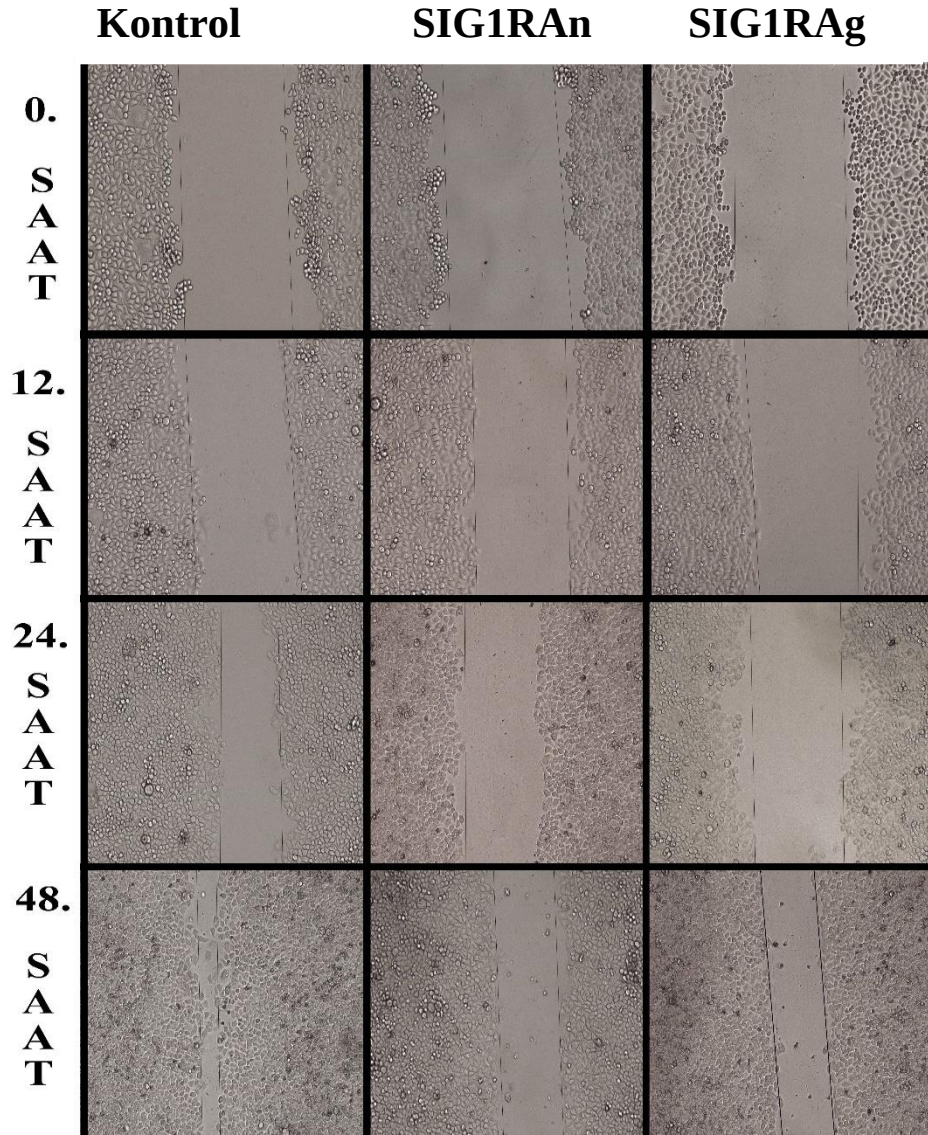
MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada deneme gruplarında yarık mesafesinde hücre migrasyonunun belirgin şekilde daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Deneme grupları arasında istatistiksel olarak yapılan karşılaştırmalarda hücre migrasyon hızı kontrol grubuna en yakın olan %90.4 ile en fazla TSAn grubunda belirlenirken, en az %31.6 ile T ve %34.4 ile TSAg gruplarında tespit edilmiştir ($p<0.001$).



Şekil 30. Grupların MDA-MB-231 hücre hattı 48.saat hücre çizik test değerleri (a-b, a-bc, a-bd, a-be, a-bh, a-bf, a-bg, a-bk, a-bl, a-bm, bm-bd, bm-be, bm-bf, bm-bg, bm-bh, bm-bk, bl-bd, bl-be, bl-bf, bl-bg, bl-bh, bl-bk bk-bc, bk-bd, bk-be, bk-bg, bk-bh, bg-bc, bg-bd, bg-be, bg-bf, bg- bh, b-bc, bc-bd, bd-bh, be-bc, be-bd, be-bh, bf-bc, bf-bd, bf-be, bf-bh, bc-bh, bh-bm_p<0.01, SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAG: Sigma Reseptör Agonisti T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAG, TSAnLev: TIC10/ONC201-SIG1RAn-Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAG -Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201- SIG1RAG-Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, kontrol, SIG1RAn ve SIG1RAG gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri Resim 5’te verilmiştir.

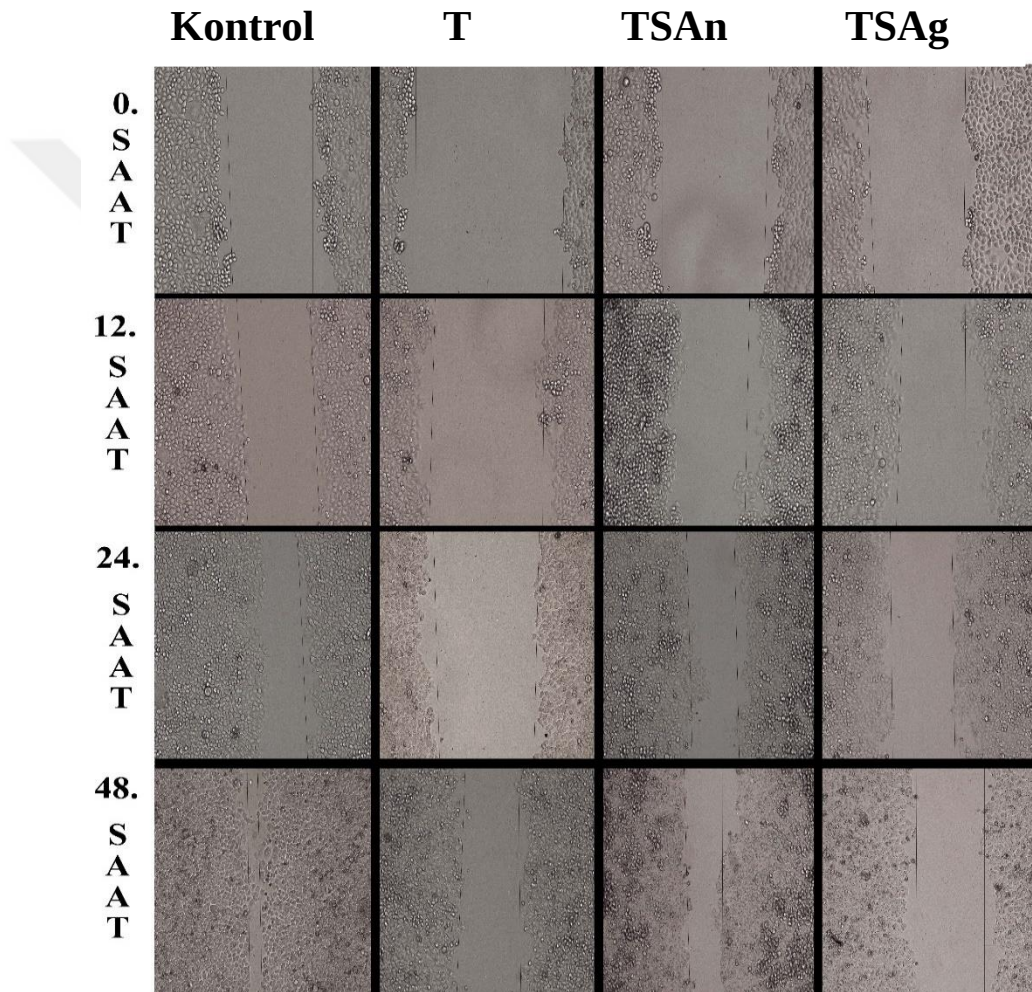
Kontrol ve deneme gruplarının yarık alanında 0-48.saat arasında hücre migrasyonunda belirgin bir artış varken, kontrol grubuna göre SIG1RAn ve SIG1RAG gruplarının yarık alanında hücre migrasyonları 48.saatte daha yavaş olduğu gözlemlendi.



Resim 5. MDA-MB-231 hücre hattında kontrol, SIG1RAn ve SIG1RAg gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri (SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAg: Sigma Reseptör Agonisti).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, kontrol, T, TSAn ve TSAg gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri Resim 6’da verilmiştir.

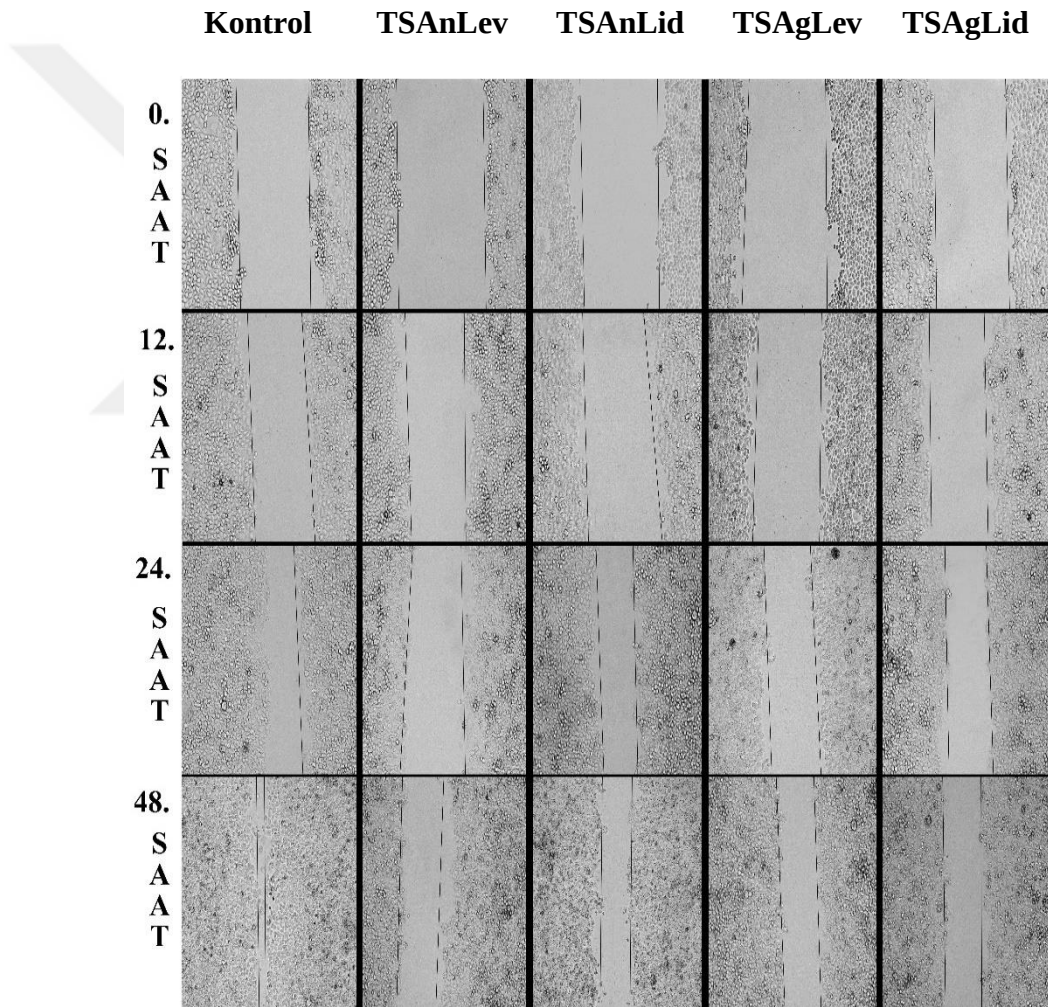
MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre deneme gruplarının yarık alanında hücrelerin migrasyonunun 48.saatte daha yavaş olduğu ve gözlemlendi. Deneme grupları arasında TSAn grubunun yarık alan mesafesinin, TSAg ve T gruplarına göre daha küçük olduğu tespit edildi.



Resim 6. MDA-MB-231 hücre hattında kontrol, T, TSAn ve TSAg gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri (T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAg).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol, TSAnLev, TSAnLid, TSAgLev ve TSAgLid Gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri Resim 7’de verilmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre deneme gruplarının yarık alan mesafesinin 24.saatte daha geniş olduğu gözlemlendi. Deneme grupları arasında 48.saatte yarık alan mesafesinde en fazla kapanmanın TSAnLid grubunda olduğu tespit edildi.

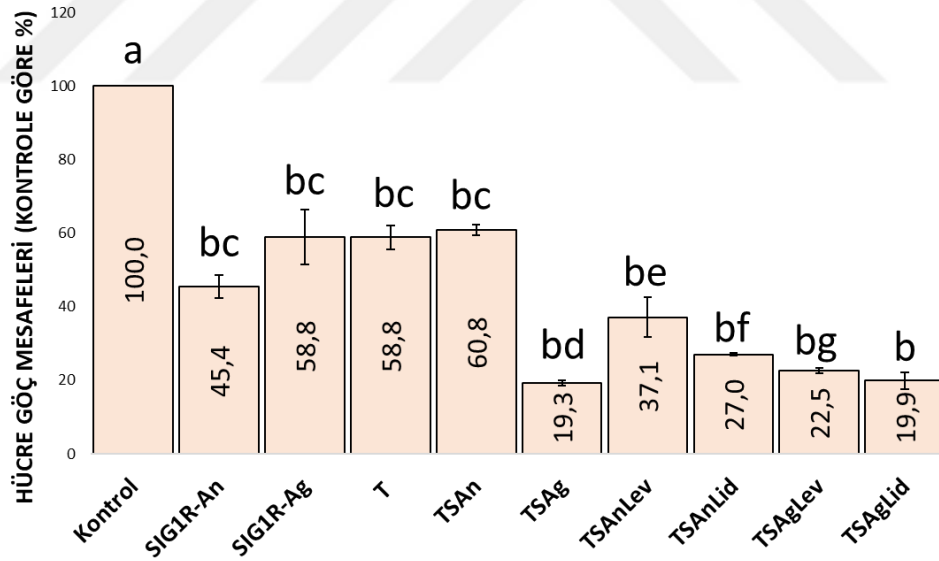


Resim 7. MDA-MB-231 hattında kontrol, TSAnLev, TSAnLid, TSAgLev ve TSAgLid gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri (TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1Rag-Lidocaine, TSAgLev: TIC10/ONC201- SIG1Rag-Levobupivacaine, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocaine)

4.3.2. MCF-7 hattında SIG1R Agonist-Antagonisti, TIC10/ONC201 ve Sodyum Kanalları İnhibitörlerinin Hücre Migrasyon Düzeylerine Etkileri

MCF-7 meme kanseri hücre hattında hücre çizik testi karşılaştırmaları Şekil 31’te gösterilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada deneme gruplarında yarıık mesafesinde hücre migrasyonunun belirgin şekilde daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Deneme grupları arasında en hızlı hücre migrasyonu %58.8 ile SIG1RAg, yine %58.8 ile T ve %60.8 ile TSAn gruplarında görülürken ($p<0.001$, $p<0.01$), sırasıyla %19.3, %19.9, %22.5, %27 ve %37.1 ile TSAg, TSAnLid, TSAgLev ve TSAgLid gruplarında migrasyon hızının kontrol grubuna göre en düşük seviyede olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

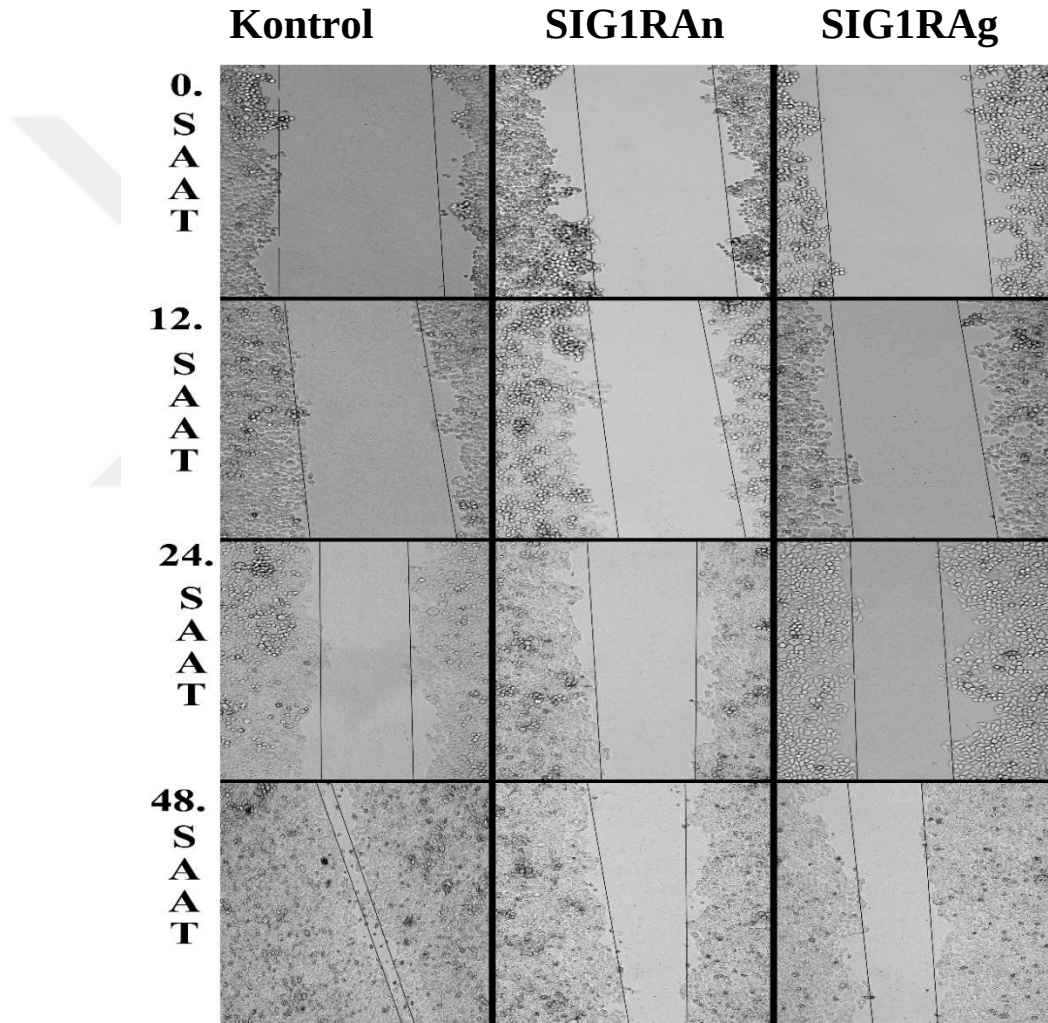


Şekil 31. MCF-7 hücre Hattı 48.saat hücre çizik test değerleri (a-b, a-bc, a-bd, a-be, a-bf, a-bg, b-bgbg-

bc, bg-bd, bg-be-bf b-bf, bf-bc, bf-bd, bf-be, be-bc, be-bd, b-be, b-bc, bc-bd, b-bd $p<0.001$, SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti, SIG1RAg: Sigma Reseptör Agonisti, T: TIC10/ONC201, TSAn: TIC10/ONC201-SIG1RAn, TSAg: TIC10/ONC201- SIG1RAg, TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn - Levobupivacame, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAg -Lidocame, TSAgLev: TIC10/ONC201-SIG1RAg -Levobupivacame, TSAgLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn -Lidocame)

MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol, SIG1RAn ve SIG1RAg gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri Resim 8’de verilmiştir.

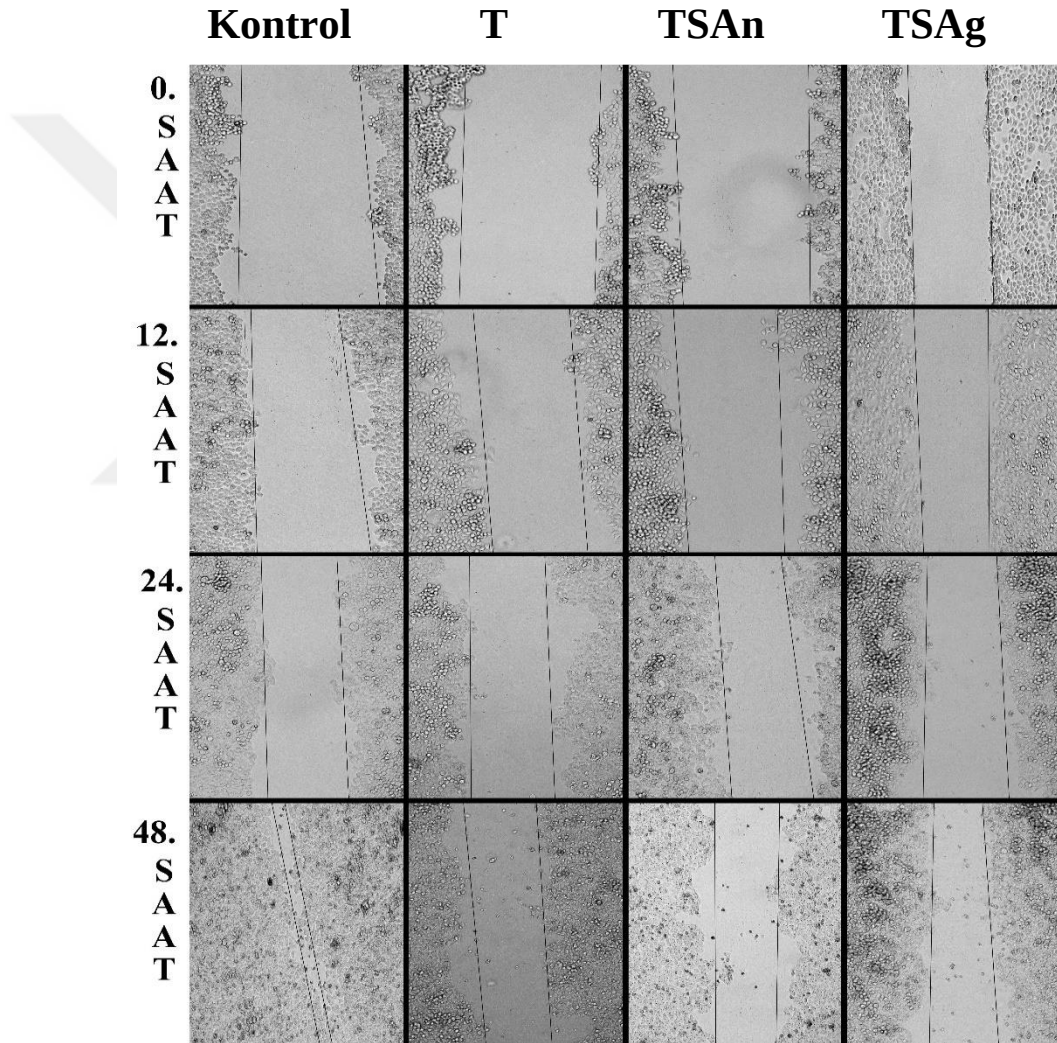
MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre deneme gruplarının yarık alan mesafesinin 48.saatte daha geniş olduğu gözlemlendi. Deneme gruplarının yarık alanında 0.saate göre 48.saatte yarık alan mesafesinin daraldığı tespit edildi.



Resim 8. MCF-7 hattında kontrol, SIG1RAn ve SIG1RAg gruplarının hücre çizik test alan görüntüleri (SIG1RAn: Sigma Reseptör Antagonisti BD1047, SIG1RAg: Sigma Reseptör Agonisti SKF10047).

MCF-7 meme kanseri hücre hattında, kontrol, T, TSA_n, TSA_g gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri Resim 9’de verilmiştir.

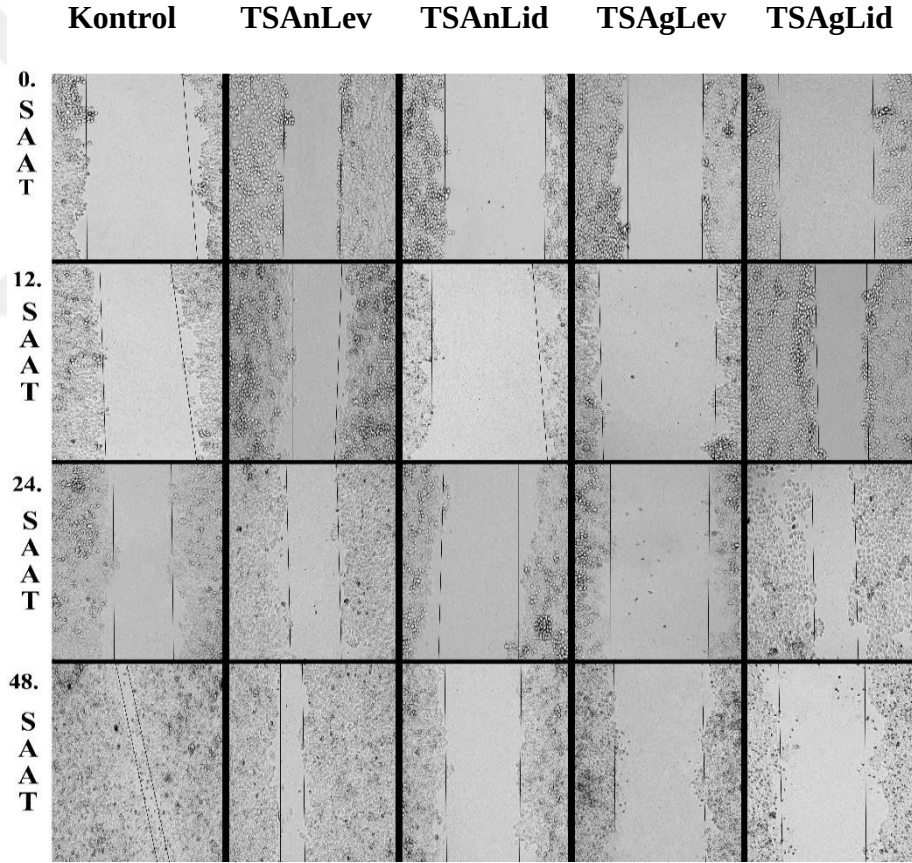
MCF-7 meme kanseri hücre hattında deneme gruplarının yarık alan mesafesinin kontrol grubuna göre 48.saatte daha geniş olduğu belirlendi. Deneme gruplarının yarık alanında 0.saate göre 48.saatte yarık alanında belirgin kapanma olduğu gözlemlendi.



Resim 9. MCF-7 hattının kontrol, T, TSA_n, TSA_g Gruplarının hücre çizik test alan görüntüleri (T: TIC10/ONC201, TSA_n: TIC10/ONC201- SIG1RAn, TSA_g: TIC10/ONC201- SIG1RAg)

MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol, TSAnLev, TSAnLid, TSAGLev ve TSAGLid gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri Resim 10’da verilmiştir.

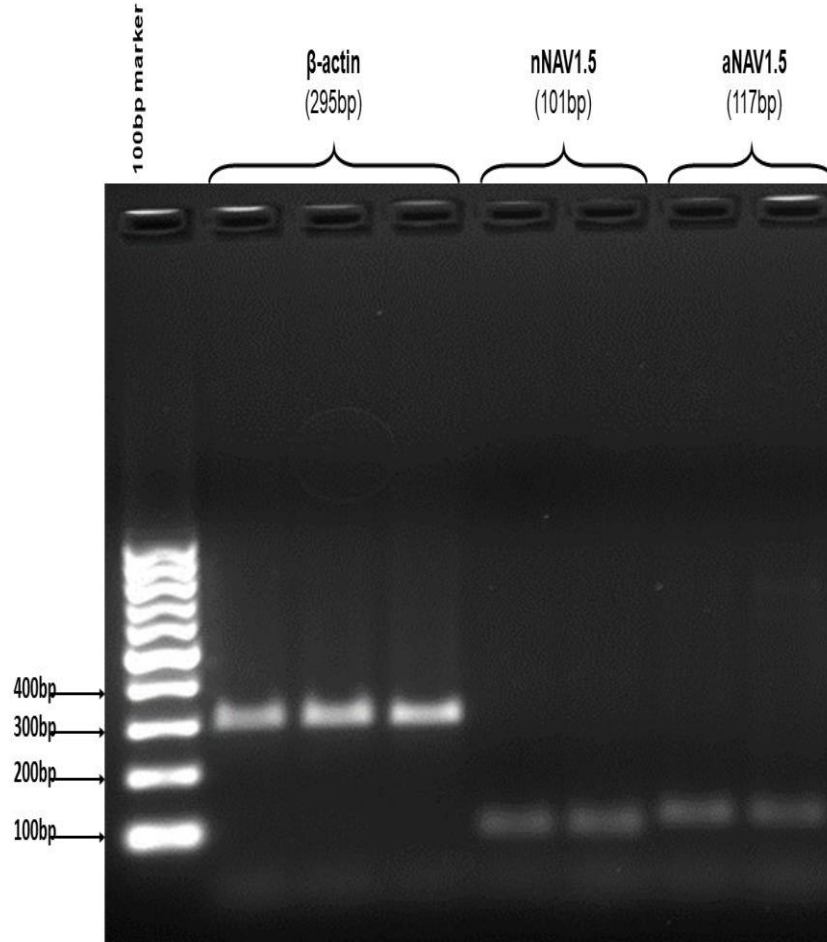
MCF-7 meme kanseri hücre hattında deneme gruplarının yarık alan mesafesinin kontrol grubuna göre 48.saatte daha geniş olduğu belirlendi. Bununla birlikte 48.saatte TSAnLev grubunda yarık alanındaki mesafenin kontrol grubuna yakın olduğu tespit edildi. Bütün deneme gruplarının 0.saate göre 48.saatte yarık alan mesafelerinin daraldığı gözlemlendi. 12.saatte deneme gruplarından TSAnLid ve TSAGLev gruplarında yarık alan mesafesinde genişleme gözlenmekle birlikte bu genişlemenin 24.saatten itibaren azaldığı belirlendi.



Resim 10. MCF-7 hattında kontrol, TSAnLev, TSAnLid, TSAGLev ve TSAGLid gruplarının hücre çizik testi alan görüntüleri (TSAnLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn - Levobupivacaine, TSAnLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn - Lidocaine, TSAGLev: TIC10/ONC201- SIG1RAn - Levobupivacaine, TSAGLid: TIC10/ONC201- SIG1RAn - Lidocaine).

4.3.3. PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforez Görüntüleri

PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 90 voltta 60 dakika koşturulması sonrasında elde edilen bant görüntüleri Şekil 32’de gösterilmektedir.



Şekil 32. PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser basit bir ifade ile hücre bölünmesinin ve büyümesinin kontrolden çıkmış bir şekilde organizmada yayılması olarak ifade edilebilir. Bazı faktörlere bağlı olarak farklılaşan hücrelerin bulundukları yerde veya daha uzak mesafelerdeki doku ve organlara doğru göç ederek denetimden uzak, kontrolsüz bir şekilde büyümeleri neticesinde meydana gelen malignite özellikli hastalıkların bütünü olarak da tanımlanabilir. Genetik nedenlere bağlı gerçekleşebildiği gibi, çevresel faktörler de kanserin gelişiminde rol oynamaktadır. Kanser türleri gelişmiş tanı yöntemleri ile birlikte kolayca teşhis edilebilmektedir. Teşhis edildikten hemen sonra alternatif yöntemler ile tedavi edilebilmekte olsa da dünya çapında ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kanser kaynaklı ölümlerin yılda 8 milyona yaklaşması ile tüm dünyada meydana gelen ölüm nedenleri arasında kanser ilk sıralarda yer almaktadır. Kadınlar arasında en sık görülen kanser türleri meme, tiroid, kolorektal, akciğer ve rahim kanserleri olarak tanımlanmıştır. Kadınlarda tanı konulmuş kanser vakalarının yaklaşık %25'i meme kanseri olmaktadır. Kansere bağlı ölümlerde ise meme kanseri yaklaşık %15 ile yüksek orana sahiptir. İstatistiklere göre her 100 kadından 13'ü invaziv meme kanserine yakalanma riski taşımaktadır. (Garcia ve ark. 2007, Keklikoglou ve ark. 2012, Hu ve ark. 2018, Özdoğan 2020). Hücreden dokulara, dokulardan tüm metabolizmaya kadar kanserleşme sürecinde hedeflenen genomik kodlar insanın tüm genomu boyunca mevcut olan çeşitli genler üzerinde yazılmış bir halde bulunmaktadır. İnsan genomunda yer alan tüm genleri anlama ve aydınlatma projesi kapsamında, genetik haritamızın 20.000-25.000 adet genden ibaret olduğu tahminleri yürütülmektedir. Bu genetik dizilim içerisinde yer alan 3.500-4.500 adetlik gen bölümü kanserin tek bir hücreden başlayıp artık metastatik yetenek kazanarak başka doku ve organlara sıçradığı son evresine kadar yer alan bazı proteinleri kodlamaktadır. Fonksiyonlarını yitirmiş veya bozularak asıl özelliklerinden başka özellikler edinmiş bir gen, kodlanan bu proteinlerden bir tanesinin anormal düzeyde çoğalmasına, beklenmedik ve dönüşü mümkün olmayan katlanmalar gerçekleştirmesine ve beklenen düzeyin altında ya da hiçbir şekilde ekspresyon göstermemesine neden olabilmektedir.

Kanserin mekanizması ile ilgili araştırmalarda son yıllarda çalışılmaya başlanmış olan voltaj kapılı kanalların farklı tipleri meme, akciğer, mide, pankreas gibi kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir (Quadid-Ahidouch ve ark. 2001, Abdul ve Hoosein 2002a, Abdul ve Hoosein 2002b, Lastraioli ve ark. 2004, Kim ve ark. 2004). Voltaj kapılı potasyum kanallarının hücre proliferasyonunda rol aldıkları ve kanser hücrelerinde upregüle oldukları bildirilmiştir (Day ve ark. 2001). Birçok araştırmada voltaj kapılı kalsiyum kanallarının çeşitli kanser türlerindeki gen ekspresyonlarının upregüle olduğundan bahsedilmiştir (Wang ve ark. 2000, Peng ve ark. 2001). Meme kanseri, prostat ve küçük hücreli akciğer kanserinde VGSC'lerin motilite, membran aktivitesi, adhezyon ve invazyon gibi metastaz ile ilişkili hücresel davranışlardan sorumlu olduğu ve kanserin yayılımında rol aldığı bildirilmektedir (Fraser ve ark. 2005, Onganer ve Djamgoz 2005). İyon kanallarının metastatik yetenek kazanmış farklı kanser türlerinde ölçülmüş ekspresyon düzeylerinin kanser hücrelerinin proliferasyon, apoptozis ve migrasyon hızı üzerinde etkilerinin olabileceğı düşünölmektedir (Prevarskaya ve ark. 2010). Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada VGSC'lerin hücre adhezyon molekülü olarak görev aldığından bahsedilmiştir. VGSC'ler neredeyse tüm kanser türlerinde hücresel faaliyetlerde görev alırken özellikle meme kanseri hücrelerinde regölatör görevi yaptığı belirtilmektedir (Brackenbury 2012). Metastatik yetenekli MDA-MB-231 meme kanseri hatlarında VGSC'lerin alt ünitesi olan Nav1.5'lerin ekspresyonlarında bir artma tespit edildiğı bildirilmiştir. Çalışmalarda VGSC'lerin kanser hücrelerinde gen ekspresyonlarını düzenlediğinden ve metastatik yetenek kazanmış kanser hücrelerinin invazyonu ile ilişkisi olduğu düşünölen bir genin işlevini de düzenlediğı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmaya göre düzenlenen gen aracılı sinyaller kanser hücrelerinin invazyonunu denetleyen yolları regöle edebilmektedir (Mycielska ve ark. 2005, Brackenbury ve Djamgoz 2006, Lopez-Santiago ve ark. 2007, Chioni ve ark. 2009, House ve ark. 2010). Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir araştırmada nNav1.5'in metastatik kanserde daha fazla eksprese edildiğı bildirilmiş ve invazyonla ilişkili olabileceğı düşünölmüştür (Kamarulzaman ve ark. 2017, Zhang ve ark. 2018). Metastatik meme kanseri hücre hatlarında ve dokularında yapılan moleküler araştırmalarda Nav1.5'in ekspresyonu ile metastaz mekanizması ilişkilendirilmektedir. Nav1.5'in ekspresyonunun ileri metastatik yetenekli meme kanseri hücre hatlarında bin kat kadar

upregüle olduğu gösterilmiştir (Fraser ve ark. 2005, Diss ve ark. 2005, Diaz ve ark. 2007). VGSC'lerin düzenlenmesinde çeşitli büyüme faktörleri ve hormonlar ekspresyonlarını veya aktivitelerini etkileyerek rol almakta iken bir şaperon olarak protein katlanmalarında ve düzenlenmesinde görev alan Sigma Reseptör 1'in iyon kanalları aktivitelerini kanser hücrelerinde yapısal değişiklik ve ekspresyon seviyelerinde düzenleme anlamında modüle ettiğinden bahsedilmiştir (Avila ve ark. 2003, Liu ve ark. 2003, Rossi ve ark. 2011). Meme kanseri hücre hatlarında ise Sig1r'ın modülasyonunun metastatik davranışları etkileyebileceği ve bu etkinin de VGSC'lerin upregülasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Fraser ve ark. 2005, Nelson ve ark. 2015). Sig1r tarafından modüle edildiği belirtilen iyon kanallarının kesin mekanizması bilinmemekle beraber elde edilen sonuçlarla birlikte bir kompleks oluşturduğu yönünde değerlendirmelerde bulunulmuştur (Balasuriya ve ark. 2012). Aydar ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada Sig1r'ın modülasyonunun VGSC'lerin meme kanseri hücrelerinin metastatik davranışlarını etkilediğinden bahsetmişlerdir.

Sigma reseptörleri bir çok dokuda endoplazmik retikulum (ER) zarlarına lokalize olan bir reseptör ailesidir. Protein katlanmalarından sorumlu bir regülatör olarak sigma reseptörleri ER'da lipid yapıdaki zar tabakasında yerleşmiş, mitokondri aracılı apoptozda görev almaktadırlar. Sigma reseptörlerinden biri olan Sig1r plazma zarı, ER, perinükleer alanda yer almakta ve kanser hücre hatlarında, özellikle meme kanseri hücre hatları ve dokularında ekspresyonu upregüle halde bulunmaktadır (Rui ve ark. 2016, Aydar ve ark. 2016). Sig1r'ın protein katlanmalarında regülatör göreviyle birlikte iyon kanalları aktiviteleri, nöronal tetikleme, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve programlı hücre ölümüne katkıda bulunmak gibi çeşitli özellikleri olduğu da bildirilmektedir (Mavlyutov ve ark. 2010). Sig1r'ın manipüle edilmesi hücre korucuyu etki ile birlikte sitotoksik etki de gösterebilmektedir. Sig1r agonistlerinin oksidatif strese karşı antioksidan gibi etki göstererek hücre sağkalımında rol oynadığı bildirilmiştir. Antagonistlerinin de kanser hücrelerinde hayatta kalımı etkileyerek apoptozu tetiklediği ortaya konmuştur. Deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada Sig1r ligandlarının özellikle mitokondriyal strese terapötik etki gösterdiği belirtilmektedir (Hayashi ve Su 2007). Sig1r antagonistlerinin meme kanseri ksenograftlarının büyümesini ve kanser hücre proliferasyonunu inhibe

ettiği bildirilmiştir (Narayanan ve ark. 2011, van Waarde ve ark. 2015). Bizim yaptığımız bu araştırmada; Sig1r'ın downregülasyonunda ileri derece metastatik ve zayıf metastatik meme kanser hücrelerinde özellikle yetişkin sodyum kapılarının ekspresyon seviyelerinde azalma ile birlikte hücre ölüm oranlarının yükseldiğini gördük. Buna karşın neonatal sodyum kanalları ekspresyon seviyelerinin ise yüksek kaldığını tespit ettik. Yaptığımız çalışmada Sig1r upregülasyonunda ileri metastatik ve zayıf metastatik meme kanser hücrelerinde neonatal sodyum kapılarının ekspresyon seviyesinin yükseldiğini, bu yükselmeye hücre ölümünün eşlik ettiğini tespit ettik. Sig1r'ın kemoterapötik ajanla birlikte ileri metastatik meme kanseri hücrelerinde sodyum kapılarının ekspresyonunu artırırken, zayıf metastatik meme kanseri hücrelerinde downregüle ettiğini gözlemledik. Bu farklı sonucun başka bir mekanizma veya mekanizmalar ile de sodyum kapılarının modüle ya da regüle ediliyor olmasından kaynaklanabileceğini düşündük. Sig1r agonistlerinin oksidatif stres hasarına karşı anti oksidan gibi etki göstererek tedavi edici bir sonuç göstermesi ile birlikte manipüle edildiği takdirde sitotoksik etki gösterdiği de bildirilmiştir. Çalışmamızda Sig1r agonistleri uygulanan gruplarda meydana gelen sitotoksik etkinin, Sig1r'ın bu etkisinden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Sig1r upregülasyonunda ileri metastatik ve zayıf metastatik meme kanseri hücrelerinin ölüm oranları ile birlikte sodyum kanallarının gen ekspresyonları da artmıştır. Bu durumun Sig1r upregülasyonunun sodyum kapılarını upregüle edecek şekilde düzenlediğini belirledik. Belirlemiş olduğumuz bu sonuç kemoterapötik ajanla birlikte uygulama yapıldığında değişiklik arz etmektedir.

Yaptığımız çalışmada sodyum kapıları blokörlerinin Sig1r upregülasyonu-downregülasyonunda kemoterapik ajanın etkisini artırarak hücre ölüm oranını yükseltmesine rağmen, ileri metastatik yetenekli meme kanseri hücrelerinde sodyum kapılarının gen ekspresyonlarının artmasına kemoterapik ajanın etkisinin olmadığını tespit ettik. Bu durumda Sig1r upregülasyonu-downregülasyonunda gen ekspresyonundaki artış, sodyum kanallarının üzerinde Sig1r ile birlikte başka düzenleyici mekanizmaların varlığını da düşündürmektedir. Zayıf metastatik yetenekli meme kanseri hücre hatlarında VGSC'lerin yetişkin ve neonatal formlarında ekspresyonlarını farklı etkilemiştir. Bu durum ise neonatal formun zayıf metastatik

hücrelerde ekspresyonlarının ya çok az olması ya da hiç eksprese edilmemeleri ile ilişkilendirilmiştir. Elajnaf ve ark. (2018), VGSC'lerin alt birimleri olan nNav1.5 ve aNav1.5'un lidocaine ve levobupivacaine anestezikleri aracılığıyla seçici olarak inhibe edilebildiğini göstermiştir. Aynı çalışmada lidocaine'in seçici olarak aNav1.5'i ve levobupivacaine'in ise nNav1.5'i inhibe ederek aktivasyon gösterdiği de bildirilmiştir. Başka bir araştırmada (Chamaraux-Tran ve ark. 2018), lidocaine'in meme kanserinde proliferasyonu azalttığından ve hücre göçünde azaltıcı bir etkisi olduğundan, ratlarda ise tümör büyümesini baskıladığından bahsedilmiştir. Levobupivacaine'in yine hücre migrasyonunda ve canlılığında azaltıcı bir etkisinden ve hem ileri metastatik hem de zayıf metastatik meme kanser hücrelerinde inhibe edici etkisinden söz edilmiştir (Li ve ark. 2018). Yapılan literatür taramasında meme kanseri hücrelerinde Sig1r'nin Nav1.5'leri modüle ederek metastatik aktiviteyi artırdığını ve Nav1.5'in meme kanserinde önemli rol aldığı düşündürülen çalışmalar (Balasuriya ve ark. 2012, Aydar ve ark. 2016) bulunmakla birlikte TIC10/ONC201 ve Sig1r upregülasyonu-downregülasyonunda sodyum kanalları blokörlerinin kombine uygulamasının ko-regüle edici etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmadı. Bu yönüyle ortaya konulan verilerle literatüre sağlanan katkı bilimsel açıdan değerlidir.

Kemoterapötik ajan olarak klinik çalışmalarında kullanılmaya başlayan ve faz 3 deneyleri gerçekleştirilmekte olan TIC10/ONC201, TRAIL indükleyici ajandır. TNFSF ailesi üyelerinden olan TRAIL, p53'ten bağımsız olarak programlı hücre ölümü için sinyalizasyonu sağlamakta önemli bir rol almaktadır. TRAIL, proapoptotik ölüm reseptörleri olan Death Receptor 4 (DR4) ve Death Receptor 5 (DR5) ile iç veya dış apoptotik yolların birleşmesi ile birçok kanser türünde oldukça güçlü bir apoptoz indükleyicisi olarak kabul edilmektedir. TRAIL etkisini seçici olarak sadece kanser hücrelerinde göstermesinden dolayı da oldukça önemlidir (Allen ve ark. 2013). Metastatik özellik kazanmış, invazyon yeteneğindeki ileri evreye ulaşmış kanserde mutasyon geçirmiş olan p53, programlı hücre ölümünde direnç mekanizması sağlamaktadır. Gelişen direnç mekanizmasından uzakta, p53'ten bağımsız bir şekilde hücre ölümünün gerçekleşmesi oldukça önemlidir. TRAIL aracılı gerçekleşen programlı hücre ölümünde sinyalizasyon, mitokondriyal yolk aracılı gerçekleşirken, aynı zamanda mitokondriden bağımsız bir şekilde de hücre ölüm sinyalleri

gönderebilmektedir. TRAIL'in mitokondriden ve p53'ten bağımsız olmasının yanısıra göze çarpan önemli bir etkisi de sadece kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek sağlıklı hücreler üzerinde hücre ölümüne yönelik bir etki göstermemesidir. Kanser hücrelerine uygulanan TIC10'un TRAIL mRNA ekspresyonunu artırarak, TIC10 aracılı TRAIL upregülasyonu ile hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (Allen ve ark. 2013). Allen ve ark. (2015), yaptıkları araştırma ile kanser hücrelerinde TIC10'un, hücre ölümünde oldukça seçici davranarak sadece kanser hücrelerini hedef aldığını, sağlıklı hücrelere hiçbir zarar vermediklerini bildirmişlerdir. ONC201 uygulanmasının ardından Protein Kinaz B (Akt) ve Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) sinyal yollarının inaktivasyonlarının gerçekleştiği sırasıyla, Foxo3a (hücre ölümü için gerekli genlerin upregülasyonu veya anti-apoptotik proteinlerin downregülasyonu yoluyla apoptoz için bir tetikleyici olarak işlev gören gen), Ser253 (fosforillenmiş Foxo3a) ve Ser294 (fosforillenmiş-progesteron reseptörü) üzerindeki enzimatik hedef bölgelerinde fosforilasyonda bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Genetik ve farmakolojik deneylerden sonra yapılan moleküler analizler sonucunda ise Akt ve ERK inaktivasyonunun hem Foxo3a hem TRAIL üzerine hem de kanser hücrelerini apoptozise götürme anlamında üçlü bir sinerjist etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Yoshida ve ark. 2005, Zou ve ark. 2008, Ishizawa ve ark. 2016, Kline ve ark. 2016). ONC201'in kanser hücrelerini ölüme götürmede seçici davranışı, moleküler anlamdaki etkileri ve diğer kemoterapötik ajanlar ve tedavi yöntemleriyle kıyaslandığında hiçbir yan etkisinin olmaması oldukça dikkat çekicidir. Çalışmamızda bu kemoterapötik ajanı uyguladığımız gruplarda hücre ölümünü belirgin bir şekilde artırdığını tespit ettik. TIC10/ONC201'in meme kanserinde ileri metastatik ve zayıf metastatik hücrelerde hücre ölümünü belirgin şekilde tetiklediğini ortaya koyduk. TIC10/ONC201'in hücre ölümünü artırması ile sodyum kanallarının ekspresyon seviyeleri arasında bir ilişki olmadığını tespit ettik. Buradan yola çıkarak bu antikanser ajanının hücre ölümü üzerine etkisini sodyum kanallarının gen ekspresyonlarını artırmak veya azaltmak üzerinden göstermediğini tespit etmiş olduk.

Araştırmamızda kullandığımız iki farklı meme kanseri hücre hattından biri olan MDA-MB-231 hücre hattının ileri metastatik olması nedeniyle, bu hücrelerde bizim araştırma alanımızın dışında etkinlik gösteren farklı mekanizmaların devreye

girebileceği ve uygulanan modülasyon ve regülasyon mekanizmalarına farklı yanıtlar vermiş olabileceğini düşündük. Aynı zamanda, sodyum kapılarının başka reseptör aileleri tarafından da kontrol edilebilme ihtimalini göstermiş olduk. Benzer şekilde, sodyum kapılarının bloke edilmesi, TIC10/ONC201 ve Sig1r agonist-antagonistlerinin birlikte uygulanması, meme kanser hücrelerinde hücre migrasyon hızını belirgin düzeyde azaltmıştır. Bu araştırma, Sig1r agonist-antagonistinin ve TIC10/ONC201 kemoterapötik ajan ile birlikte Lidocaine-Levobupivacaine uygulamasının ilk kez yapılıyor olması dışında, literatüre meme kanser hücrelerinde hem sodyum kanalları üzerinde hem de hücre sağkalımının azaltılmasında bu uygulamaların etkilerinin gösterilmesi bakımından yeni bir bakış açısı sunmuştur.

Sonuç olarak zayıf ve ileri metastatik meme kanserinde Sig1r upregülasyonu-downregülasyonunda anti kanserojen olan TIC10/ONC201'in kanser hücrelerinin apoptotik sürecine, tek başına özellikle sodyum kapıları üzerinden etkisinin zayıf olduğunu, bununla birlikte sodyum kapı blokörleri ve Sig1r agonist-antagonistleri ile beraber kullanılmasının kanser hücrelerinde apoptozisi belirgin olarak arttırdığını tespit ettik. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda sodyum kapıları üzerinde düzenleyici olarak sadece Sig1r'ın tek başına bulunmadığı başka sinyal yollarının veya başka mekanizmaların da devreye girebileceğini görmüş olduk. Sodyum kapılarının sinyalizasyonunu düzenleyen diğer reseptör veya reseptör aileleri ile ilişkisinin araştırılması meme kanseri hücrelerindeki başka reseptörlerin etki mekanizmasının tam olarak anlaşılmasına da olanak sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Abdul M, Hoosein N. "Expression and Activity of Potassium Ion Channels in Human Prostate Cancer", Cancer Letters, 2002b, Vol. 186, pp. 99-105.

Abdul M, Hoosein N. "Voltage-Gated Potassium Ion Channels in Colon Cancer", Oncology Reports, 2002a, Vol.;9(5), pp. 961-964.

Abramovitz M., & Leyland-Jones B. (2006). A systems approach to clinical oncology: focus on breast cancer. Proteome science, 4(1), 1-15.

Aliustaoğlu M. (2009). Temel Kanser Fizyopatolojisi. Klinik Gelişim, 22(3), 46-49.

Allen J. E., Kringsfeld G., Mayes P. A., Patel L., Dicker D. T., Patel A. S DOLLOFF NG., MESSARIS E., SCATA KA., WANG W., ZHOUGEN JY., WU S., El-Deiry, W. S. (2013). Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects. Science translational medicine, 5(171), 171ra17-171ra17.

Allen J. E., Kringsfeld, G., Patel, L., Mayes, P. A., Dicker, D. T., Wu, G. S., & El-Deiry, W. S. (2015). Identification of TRAIL-inducing compounds highlights small molecule ONC201/TIC10 as a unique anti-cancer agent that activates the TRAIL pathway. Molecular cancer, 14(1), 1-10.

Allred DC., Clark GM., Tandon AK., Molina R., Tormey DC., Osborne CK., Mansour EG., Abeloff M., Eudey L. (1992). HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. Journal of Clinical Oncology, 10(4), 599-605.

Alpert T. E., & Haffty B. G. (2004). Conservative management of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. Clinical breast cancer, 5(1), 37-42.

American Cancer Society. (2015). Cancer facts & figures 2015. American Cancer Society.

Anderson W. F., Jatoi I., & Devesa S. S. (2005). Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI's SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome. Breast cancer research and treatment, 90(2), 127-137.

Arnedos M., Vielh P., Soria J. C., & Andre F. (2014). The genetic complexity of common cancers and the promise of personalized medicine: is there any hope?. The Journal of pathology, 232(2), 274-282.

Ashkenazi A, Weller (2001) M: Soluble Decoy Receptor 3 is Expressed by Malignant Gliomas and Suppresses CD95 Ligand-induced Apoptosis and Chemotaxis. Cancer research, 61(6):2759–2765.

- Ashkenazi A., & Dixit V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *science*, 1305-1308.
- Avila G., Monjaraz E., Espinosa J. L., & Cota G. (2003). Downregulation of voltage-gated sodium channels by dexamethasone in clonal rat pituitary cells. *Neuroscience letters*, 339(1), 21-24.
- Aydar E., Onganer P., Perrett R., Djamgoz M. B., & Palmer C. P. (2006). The expression and functional characterization of sigma (σ) 1 receptors in breast cancer cell lines. *Cancer letters*, 242(2), 245-257.
- Aydar E., Stratton D., Fraser S. P., Djamgoz M. B., & Palmer C. (2016). Sigma-1 receptors modulate neonatal Na v 1.5 ion channels in breast cancer cell lines. *European Biophysics Journal*, 45(7), 671-683.
- Aydın Tuğba (2019). Alkol ve Kanser İlişkisi. 1-7 Mart Yeşilay Haftası.
- Aydıntuğ S. (2004). Meme kanserinde erken tanı. *Sted*, 13(6), 226-8.
- B'chir W., Maurin A. C., Carraro V., Averous J., Jousse C., Muranishi Y., Parry L., Stepien G., Fafournoux P., Bruhat A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*, 41(16), 7683-7699.
- Balasuriya D., Stewart A. P., Crottès D., Borgese F., Soriani O., & Edwardson J. M. (2012). The sigma-1 receptor binds to the Nav1. 5 voltage-gated Na⁺ channel with 4-fold symmetry. *Journal of biological chemistry*, 287(44), 37021-37029.
- Baykara O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Beckmann M. W., Niederacher D., Schnürch H. G., Gusterson B. A., & Bender H. G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine*, 75(6), 429-439.
- Benson J. R., Jatoi I., Keisch M., Esteva F. J., Makris A., & Jordan V. C. (2009). Early breast cancer. *The Lancet*, 373(9673), 1463-1479.
- Bertram J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
- Binggeli R., & Cameron I. L. (1980). Cellular potentials of normal and cancerous fibroblasts and hepatocytes. *Cancer research*, 40(6), 1830-1835.
- Brackenbury W. J. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels*, 6(5), 352-361.

Brackenbury W. J., & Djamgoz M. B. (2006). Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *The Journal of physiology*, 573(2), 343-356.

Brisson L., Gillet L., Calaghan S., Besson P., Le Guennec J. Y., Roger S., & Gore J. (2011). Na V 1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H⁺ efflux in caveolae. *Oncogene*, 30(17), 2070-2076.

Burdall S. E., Hanby A. M., Lansdown M. R., & Speirs V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe?. *Breast cancer research*, 5(2), 1-7.

Byrne C., Schairer C., Wolfe J., Parekh N., Salane M., Brinton L. A., Hoover R., Haile R. (1995). Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(21), 1622-1629.

Carrithers M. D., Chatterjee G., Carrithers L. M., Offoha R., Iheagwara U., Rahner C., Graham M., Waxman S. G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8114-8126.

Casy A. F., & Parfitt R. T. (2013). Opioid analgesics: chemistry and receptors.

Celepli S., Bigat İ., Celepli P., & Karagin P. H. (2020) Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroentroloji* 24/3

Chamaraux-Tran T. N., Mathelin C., Aprahamian M., Joshi G. P., Tomasetto C., Diemunsch P., & Akladios C. (2018). Antitumor effects of lidocaine on human breast cancer cells: an in vitro and in vivo experimental trial. *Anticancer research*, 38(1), 95-105.

Chao D. T., & Korsmeyer S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, 16(1), 395-419.

Chen Q., Liu Y., Zhu X. L., Feng F., Yang H., & Xu W. (2019). Increased NHE1 expression is targeted by specific inhibitor cariporide to sensitize resistant breast cancer cells to doxorubicin in vitro and in vivo. *BMC cancer*, 19(1), 1-13.

Chioni A. M., Brackenbury W. J., Calhoun J. D., Isom L. L., & Djamgoz M. B. (2009). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: Voltage-gated Na⁺ channel β 1 subunit. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(5), 1216-1227.

Chioni A. M., Brackenbury W. J., Calhoun J. D., Isom L. L., & Djamgoz M. B. (2009). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: Voltage-gated Na⁺ channel β 1 subunit. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(5), 1216-1227.

- Chioni A. M., Fraser S. P., Pani F., Foran P., Wilkin G. P., Diss J. K., & Djamgoz M. B. (2005). A novel polyclonal antibody specific for the Nav1. 5 voltage-gated Na⁺ channel 'neonatal'splice form. *Journal of neuroscience methods*, 147(2), 88-98.
- Choo Z. E., Loh A. H. P., & Chen Z. X. (2019). Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers. *Cancers*, 11(11), 1623.
- Cimmino A., Calin G. A., Fabbri M., Iorio M. V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik SE., Aqeilan RI., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C., Kipps TJ., Negrini M., Croce C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13944-13949.
- Clavel J. (2007). Progress in the epidemiological understanding of gene–environment interactions in major diseases: cancer. *Comptes rendus biologiques*, 330(4), 306-317.
- Colditz G. A., & Rosner B. (2000). Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *American journal of epidemiology*, 152(10), 950-964.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet*, 358(9291), 1389-1399.
- Correa Geyer F., & Reis-Filho J. S. (2009). Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet?. *International journal of surgical pathology*, 17(4), 285-302.
- D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
- Day ML, Winston N, McConnell JL, Cook D, Johnson MH. "tiK⁺ toK⁺: An Embryonic clock?", *Reproduction, Fertility, and Development*, 2001, Vol. 13, pp. 69-79.
- Degli Esposti, M. (2002). The roles of Bid. *Apoptosis*, 7(5), 433-440.
- Diaz D., Delgadillo D. M., Hernández-Gallegos E., Ramírez-Domínguez M. E., Hinojosa L. M., Ortiz C. S., Berumen J., Camacho j., Gomora J. C. (2007). Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *Journal of cellular physiology*, 210(2), 469-478.
- Diss J. K. J., Stewart D., Pani F., Foster C. S., Walker M. M., Patel A., & Djamgoz M. B. A. (2005). A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 8(3), 266-273

Do W., Herrera C., Mighty J., Shumskaya M., Redenti S. M., & Sauane M. (2013). Sigma 1 Receptor plays a prominent role in IL-24-induced cancer-specific apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 439(2), 215-220.

Dravid S. M., Baden D. G., & Murray T. F. (2004). Brevetoxin activation of voltage-gated sodium channels regulates Ca^{2+} dynamics and ERK1/2 phosphorylation in murine neocortical neurons. *Journal of neurochemistry*, 89(3), 739-749.

Du Toit A. (2013). Balance through a bivalent regulator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(9), 546-547.

Dumay A., Feugeas J. P., Wittmer E., Lehmann-Che J., Bertheau P., Espié M., ... & de Thé H. (2013). Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *International journal of cancer*, 132(5), 1227-1231.

Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, et al: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378(9804), 1707-1716.

Egeli U., Cecener G., Tunca B., & Tasdelen I. (2006). Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish women with breast and/or ovarian cancer and their relatives. *Cancer investigation*, 24(5), 484-491

Elajnaf T., Baptista-Hon D. T., & Hales T. G. (2018). Potent inactivation-dependent inhibition of adult and neonatal NaV1.5 channels by lidocaine and levobupivacaine. *Anesthesia & Analgesia*, 127(3), 650-660.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Endo Greer Y., & Lipkowitz S. (2016). ONC201: Stressing tumors to death. *Science signaling*, 9(415), fs1-fs1.

Facchini L. M., & Penn L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *The FASEB Journal*, 12(9), 633-651.

Fearon E., & Bommer G. (2008). Progressing from gene mutations to cancer.

Fearon E., & Bommer G. (2008). Progressing from gene mutations to cancer.

- Fekete Á., Franklin L., Ikemoto T., Rózsa B., Lendvai B., Sylvester Vizi, E., & Zelles, T. (2009). Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca²⁺ elevation: implication for epilepsy. *Journal of neurochemistry*, 111(3), 745-756.
- Fiske J. L., Fomin V. P., Brown M. L., Duncan R. L., & Sikes R. A. (2006). Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 493-500.
- Flores-Romero H., & García-Sáez A. J. (2019). The incomplete puzzle of the BCL2 proteins. *Cells*, 8(10), 1176.
- Fraser S. P., Diss J. K., Chioni A. M., Mycielska M. E., Pan H., Yamaci R. F., Pani F., Siwy Z., Krasowska M., Grzywna Z., Brackenbury WJ., Theodorou D., Koyutürk M., Kaya H., Battaloglu E., De Bella MT., Slade MJ., Tolhurst R., Palmieri C., Jiang J., Latchman DS., Coombes RC., Djamgoz M. B. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical cancer research*, 11(15), 5381-5389.
- Fuchs Y., & Steller H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., ... & Turk B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Garcia M., Jemal A., Ward E. M., Center M. M., Hao Y., Siegel R. L., & Thun M. J. (2011). *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007. T, 1, 52.
- Gellens M. E., George A. L., Chen L. Q., Chahine M., Horn R., Barchi R. L., & Kallen R. G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 554-558.
- Gelmann E. P. (1998). Oncogenes in human breast Cancer. *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases*, 1, 499-517.
- Gillet L., Roger S., Besson P., Lecaille F., Gore J., Bougnoux P., Lalmanach G., Le Guennec J. Y. (2009). Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8680-8691.
- Goldin A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology*, 63(1), 871-894.
- Griffiths C. L., & Olin J. L. (2012). Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. *Journal of pharmacy practice*, 25(3), 319-323.

- Grilo A. L., & Mantalaris A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*, 37(3), 459-475.
- Grimes J. A., Fraser S. P., Stephens G. J., Downing J. E. G., Laniado M. E., Foster C. S., Abel PD., Djamgoz M. B. A. (1995). Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS letters*, 369(2-3), 290-294.
- Gura T. (1997). How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science*, 277(5327), 768-768.
- Han J., Back S. H., Hur J., Lin Y. H., Gildersleeve R., Shan J., Yuan CL., Krokowski D., Wang S., Hatzoglou M., Kilberg MS., Sartor MA., Kaufman R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature cell biology*, 15(5), 481-490.
- Happy M., Dejoie J., Zajac C. K., Cortez B., Chakraborty K., Aderemi J., & Sauane M. (2015). Sigma 1 Receptor antagonist potentiates the anti-cancer effect of p53 by regulating ER stress, ROS production, Bax levels, and caspase-3 activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 456(2), 683-688.
- Haridas V, Darnay BG, Natarajan K, Heller R, Aggarwal BB, (1998): Overexpression of the p80 TNF Receptor Leads to TNF-dependent Apoptosis, Nuclear Factor- κ B Activation, and c-Jun Kinase Activation. *The Journal of Immunology*, 160(7):3152–3162.
- Hartl F. U., & Hayer-Hartl M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
- Hayashi T., & Su T. P. (2003). σ -1 Receptors (σ 1 binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 718-725.
- Hayashi T., & Su T. P. (2004). σ -1 receptor ligands. *CNS drugs*, 18(5), 269-284.
- Hayashi T., & Su T. P. (2005). The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Current neuropharmacology*, 3(4), 267-280.
- Hayashi T., & Su T. P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell*, 131(3), 596-610.
- Henschen F. (1968). Yamagiwa's Tar Cancer and Its Historical Significance. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, 59(6), 447-451.
- Ho T.C., Chen S.L., Shih S.C., Chang S.J., Yang S.L., Hsieh J.W., Cheng H.C., Chen L.J. and Tsao Y.P. (2011) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) promotes tumor cell death by inducing

macrophage membrane tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M111.266064

House C. D., Vaske C. J., Schwartz A. M., Obias V., Frank B., Luu T., Sarvazyan N., Irby R., Strausberg RL., Hales TG., Stuart JM. Lee N. H. (2010). Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer research*, 70(17), 6957-6967.

Hsieh C. C., Trichopoulos D., Katsouyanni K., & Yuasa S. (1990). Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *International journal of cancer*, 46(5), 796-800.

<https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/> , Erişim Tarihi: 04.05.2021

Hu X., Wang J. I. E., He W. A. N., Zhao P. A. N., & Ye C. (2018). MicroRNA-433 targets AKT3 and inhibits cell proliferation and viability in breast cancer. *Oncology letters*, 15(3), 3998-4004.

Hutchinson L. (2010). Challenges, controversies, breakthroughs. *Nature reviews clinical oncology*, 7(12), 669-670.

Ishizawa J., Kojima K., Chachad D., Ruvolo P., Ruvolo V., Jacamo RO., Borthakur G., Mu H., Zeng Z., Tabe Y., Allen JE., Wang Z., Ma W., Lee HC., Orlowski R., Sarbassov DD., Lorenzi PL., Huang X., Neelapu SS., McDonnell T., Miranda RN., Wang M., Kantarjian H., Konopleva M., Davis RE., Andreeff M. (2016). ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies. *Science signaling*, 9(415), ra17-ra17.

Kale J., Osterlund E. J., & Andrews D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 65-80.

Kalkavan H., & Green D. R. (2018). MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 46-55.

Kam P. C. A., & Ferch N. I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, 55(11), 1081-1093.

Kamarulzaman N. S., Dewadas H. D., Leow C. Y., Yaacob N. S., & Mokhtar N. F. (2017). The role of REST and HDAC2 in epigenetic dysregulation of Nav1. 5 and nNav1. 5 expression in breast cancer. *Cancer cell international*, 17(1), 1-12.

Kanavos P. The rising burden of cancer in the developing world. *Annals of Oncology* 17 (Supplement 8): viii15–viii23,2006

- Keklikoglou I., Koerner C., Schmidt C., Zhang J. D., Heckmann D., Shavinskaya A., Allgayer H., Gückel B., Fehm T., Schneeweiss A., Sahin Ö., Wiemann S., Tschulena U. (2012). MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene*, 31(37), 4150-4163.
- Kelsey J. L., Fischer D. B., Holford T. R., LiVolsi V. A., Mostow E. D., Goldenberg I. S., & White C. (1981). Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 67(2), 327-333.
- Kenemans P., Verstraeten R. A., & Verheijen R. H. M. (2008). Reprint of Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 61(1-2), 141-150.
- Kim C. J., Cho Y. G., Jeong S. W., Kim Y. S., Kim S. Y., Nam S. W., LEE SH., YOO NJ., LEE JY., Park W. S. (2004). Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *Apmis*, 112(9), 588-94.
- King M. C., Marks J. H., & Mandell J. B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643-646.
- Kline C. L. B., Van den Heuvel A. P. J., Allen J. E., Prabhu V. V., Dicker D. T., & El-Deiry W. S. (2016). ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2 α kinases. *Science signaling*, 9(415), ra18-ra18.
- Koornstra J. J., Kleibeuker J. H., van Geelen C. M., Rijcken F. E., Hollema H., de Vries E. G., & de Jong S. (2003). Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(3), 327-335.
- Kumar V., Cotran R. S., & Robins, S. L. (1992). *Basic Pathology*. ED. 5th.
- Kunzelmann K. (2005). Ion channels and cancer. *The Journal of membrane biology*, 205(3), 159-173.
- Kurebayashi J. (2001). Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer*, 8(1), 45-51.
- Laakso M., Loman N., Borg Å., & Isola J. (2005). Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Modern pathology*, 18(10), 1321-1328.
- Lastraioli E., Guasti L., Crociani O., Polvani S., Hofmann G., Witchel H., Bencini L., Calistri M., Messerini L., Scatizzi M., Moretti R., Wanke E., Olivotto M., Mugnai G., Arcangeli A. (2004). hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer research*, 64(2), 606-611.

Lawrence T. S., Ten Haken R. K., & Giaccia A. (2008). Principles of radiation oncology. Cancer: principles and practice of oncology. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Lee S. H., Shin M. S., Kim H. S., Lee H. K., Park W. S., Kim S. Y., Lee JH., Han SY., Park JY., Oh RR., Kang CS., Kim KM., Jang JJ., Nam SW., Lee JY., Yoo N. J. (2001). Somatic mutations of TRAIL-receptor 1 and TRAIL-receptor 2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 20(3), 399-403.

Lee S. H., Shin M. S., Kim H. S., Lee H. K., Park W. S., Kim S. Y., Lee JH., Han SY., Park JY., Oh RR., Jang JJ., Han JY., Lee JY., Yoo N. J. (1999). Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer research*, 59(22), 5683-5686.

Lester S. C., Bose S., Chen Y. Y., Connolly J. L., de Baca M. E., Fitzgibbons P. L., ... & Smith B. L. (2009). Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 133(10), 1515-1538.

Levine A. J., & Oren M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews cancer*, 9(10), 749-758.

Li C. I., Uribe D. J., & Daling J. R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer*, 93(9), 1046-1052.

Li R., Xiao C., Liu H., Huang Y., Dilger J. P., & Lin J. (2018). Effects of local anesthetics on breast cancer cell viability and migration. *BMC cancer*, 18(1), 1-12.

Liao DJ, Dickson RB. C-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7(3):143-164,2000

Liu C. J., Dib-Hajj S. D., Renganathan M., Cummins T. R., & Waxman S. G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1. 5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1029-1036.

Liu P., Ramachandran S., Seyed M. A., Scharer C. D., Laycock N., Dalton W. B., Williams H., Karanam S., Datta MW., Jaye DL., Moreno C. S. (2006). Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer research*, 66(8), 4011-4019.

Lopez-Santiago L. F., Meadows L. S., Ernst S. J., Chen C., Malhotra J. D., McEwen D. P., Speelman A., Noebels JL., Maier SKG., Lopatin AN., Isom L. L. (2007). Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 43(5), 636-647.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., & Wang X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481-490.

Lüleyap H. Ü. (2008). Moleküler genetiğin esasları. Nobel Kitabevi.

Maas C., Verbrugge I., de Vries E., Savich G., Van de Kooij L. W., Tait S. W. G., & Borst J. (2010). Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death & Differentiation*, 17(10), 1613-1623.

Maciejczyk A. (2013). New prognostic factors in breast cancer. *Adv Clin Exp Med*, 22(1), 5-15.

Mak T. W., & Saunders M. E. (2006). The Humoral Response: B Cell Development and Activation. *The Immune Response*, 209–245.

Malhotra G. K., Zhao X., Band H., & Band V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955-960.

Maricic M. (2006). The use of zoledronic acid for Paget's disease of bone. *Current osteoporosis reports*, 4(1), 40-44.

Marine J. C., & Lozano, G. (2010). Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 17(1), 93-102.

Marmo A. A., Morris D. M., Schwalke M. A., Iliev I. G., & Rogers S. (1994). Electrical potential measurements in human breast cancer and benign lesions. *Tumor biology*, 15(3), 147-152.

Martinez M. M., Reif R. D., & Pappas D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical methods*, 2(8), 996-1004.

Marx A., Siara J., & Rüdél R. (1991). Sodium and potassium channels in epithelial cells from thymus glands and thymomas of myasthenia gravis patients. *Pflügers Archiv*, 417(5), 537-539.

Mavlyutov T. A., Epstein M. L., Andersen K. A., Ziskind-Conhaim L., & Ruoho A. E. (2010). The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience*, 167(2), 247-255.

Meunier J., & Hayashi T. (2010). Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor κ B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 388-397.

Mohamed A. A., Kandeel S. H., Zaghlal H. E., Osman N. F., Helwa M. A., & Bedier H. M. (2018). TRAIL receptor 1 polymorphism and cancer risk: a systematic review. *Menoufia Medical Journal*, 31(3), 730.

Moinfar F. (2008). Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology*, 75(2), 119-131.

Monk M., & Holding C. (2001). Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene*, 20(56), 8085-8091.

Morgan K., Stevens E. B., Shah B., Cox P. J., Dixon A. K., Lee K., Pinnock RD., Hughes J, Richardson PJ., Mizuguchi K. Jackson A. P. (2000). $\beta 3$: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(5), 2308-2313.

Mueller II B. H., Park Y., Daudt III D. R., Ma H. Y., Akopova I., Stankowska D. L., Clark AF., Yorio T. (2013). Sigma-1 receptor stimulation attenuates calcium influx through activated L-type Voltage Gated Calcium Channels in purified retinal ganglion cells. *Experimental eye research*, 107, 21-31.

Mycielska M. E., Palmer C. P., Brackenbury W. J., & Djamgoz M. B. (2005). Expression of Na⁺-dependent citrate transport in a strongly metastatic human prostate cancer PC-3M cell line: regulation by voltage-gated Na⁺ channel activity. *The Journal of physiology*, 563(2), 393-408.

Narayanan S., Bhat R., Mesangeau C., Poupaert J. H., & McCurdy C. R. (2011). Early development of sigma-receptor ligands. *Future medicinal chemistry*, 3(1), 79-94.

Nolan T., Hands R. E., & Bustin S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.

O'Brien M. A., & Kirby R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 18(6), 572-585.

Oliveira A. M., Ross J. S., & Fletcher J. A. (2005). Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Pathology Patterns Reviews*, 124(suppl_1), S16-S28.

Olivier M., Petitjean A., Marcel V., Petre A., Mounawar M., Plymoth A., de Fromental CC., Hainaut P. (2009). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer gene therapy*, 16(1), 1-12.

Onganer P. U., & Djamgoz M. B. A. (2005). Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na⁺ channel expression in vitro. *The Journal of membrane biology*, 204(2), 67-75.

Osborne C., Wilson P., & Tripathy D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The oncologist*, 9(4), 361-377.

Ou Y., Niu X. L., Ren F. X., Zhang Y., & Ling F. D. (2005). Expression of L-type calcium channel alpha1C subunit in adult rat heart. *Di 1 jun yi da xue xue bao= Academic Journal of the First Medical College of PLA*, 25(11), 1400-1404.

Ouadid-Ahidouch H., Le Bourhis X., Roudbaraki M., Toillon R. A., Delcourt P., & Prevarskaya N. (2001). Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether. a-gogo K⁺ channel. *Receptors & channels*, 7(5), 345-356.

Özören N., & El-Deiry W. (2002). Heat shock protects HCT116 and H460 cells from TRAIL-induced apoptosis. *Experimental cell research*, 281(2), 175-181.

Pai S. I., Wu G. S., Özören N., Wu L., Jen J., Sidransky D., & El-Deiry W. S. (1998). Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer research*, 58(16), 3513-3518.

Parkin D. M. (2004). International variation. *Oncogene*, 23(38), 6329-6340.

Peña-Blanco A., & García-Sáez A. J. (2018). Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), 416-431.

Pfeffer C. M., & Singh A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.

Pitti R. M., Marsters S. A., Ruppert S., Donahue C. J., Moore A., & Ashkenazi A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), 12687-12690.

Polager S., & Ginsberg D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 738-748.

Prevarskaya N., Skryma R., & Shuba Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine*, 16(3), 107-121.

Ratcliffe C. F., Qu Y., McCormick K. A., Tibbs V. C., Dixon J. E., Scheuer T., & Catterall W. A. (2000). A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase β . *Nature neuroscience*, 3(5), 437-444.

Raymond C. K., Castle J., Garrett-Engle P., Armour C. D., Kan Z., Tsinoremas N., & Johnson J. M. (2004). Expression of alternatively spliced sodium channel α -subunit genes: unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46234-46241.

Roa B. B., Boyd A. A., Volcik K., & Richards C. S. (1996). Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nature genetics*, 14(2), 185-187.

Roger S., Potier M., Vandier C., Besson P., & Le Guennec J. Y. (2006). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy?. *Current pharmaceutical design*, 12(28), 3681-3695.

Rossi D., Pedrali A., Urbano M., Gaggeri R., Serra M., Fernández L., Fernández M., Caballero J., Ronsisvalle S., Prezzavento O., Schepmann D., Wuensch B., Peviani M., Curti D., Azzolina O., Collina S. (2011). Identification of a potent and selective $\sigma 1$ receptor agonist potentiating NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(21), 6210-6224.

Rui M., Rossi D., Marra A., Paolillo M., Schinelli S., Curti D., Tesei A., Cortesi M., Zamagni A., Laurini E., Pricl S., Schepmann D., Wunsch B., Urban E., Pace V., Collina S. (2016). Synthesis and biological evaluation of new aryl-alkyl (alkenyl)-4-benzylpiperidines, novel sigma receptor (SR) modulators, as potential anticancer-agents. *European journal of medicinal chemistry*, 124, 649-665.

Savitskaya M. A., & Onishchenko G. E. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80(11), 1393-1405.

Sawyers CL., Abate-Shen C., Anderson KC., Barker A., Baselga J., Berger NA., Margaret F., Jemal A., Lawrence TS., Li CI., Mardis ER., Neumann PJ., Pardoll DM., Prendergast GC., Reed JC., Weiner GJ. (2013). AACR cancer progress report 2013. *Clinical Cancer Research*, 19(20 Supplement), S1-S98

Schnitt S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23(2), S60-S64.

Sekandarzad M. W., van Zundert A. A., Lirk P. B., Doornebal C. W., & Hollmann M. W. (2017). Perioperative anesthesia care and tumor progression. *Anesthesia & Analgesia*, 124(5), 1697-1708.

Shamas-Din A., Kale J., Leber B., & Andrews D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008714.

Shina JN., Parka SY., Chaa JH., Parka JY., Leea BR., Jungc SA., Leec ST, Yund CW., Seole DW, Kim TH. (2006). Generation of a novel proform of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein that can be reactivated by matrix metalloproteinases. *Experimental cell research*, 312(19), 3892-3898.

Siegel R. L., Miller K. D., & Jemal A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.

Singh R., Letai A., & Sarosiek K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193.

Singleton P. A., Moss J., Karp D. D., Atkins J. T., & Janku F. (2015). The mu opioid receptor: a new target for cancer therapy?. *Cancer*, 121(16), 2681-2688.

Šošić D., Richardson J. A., Yu K., Ornitz D. M., & Olson E. N. (2003). Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF- κ B activity. *Cell*, 112(2), 169-180.

Sotiriou C., & Puzstai L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(8), 790-800.

Spierings D. C., de Vries E. G., Vellenga E., van den Heuvel F. A., Koornstra J. J., Wesseling J., Hollema H., de Jong S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821-831.

Steinwede K., Henken S., Bohling J., Maus R., Ueberberg B., Brumshagen C., Brincks EL., Griffith TS., Welte T., Ulrich AM. (2012). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 1937-1952.

Strachan T., & Read A. P. (1999). *Human molecular genetics 2/*; Tom Strachan and Andrew P. Read.

Strege P. R., Mazzone A., Kraichely R. E., Sha L., Holm A. N., Ou Y., Lim I., Gibbons SJ., Sarr MG., Farrugia G. (2007). Species dependent expression of intestinal smooth muscle mechanosensitive sodium channels. *Neurogastroenterology & Motility*, 19(2), 135-143.

Sundelacruz S., Levin M., & Kaplan D. L. (2008). Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PloS one*, 3(11), e3737.

Tfelt-Hansen J. A. C. O. B., Winkel B. G., Grunnet M., & Jespersen T. (2010). Inherited cardiac diseases caused by mutations in the Nav1. 5 sodium channel. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 21(1), 107-115.

Tsai S. Y., Hayashi T., Mori T., & Su T. P. (2009). Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 9(3), 184-189.

Tyczynsky J., Bray F., & Parkin D. (2002). Breast cancer in Europe, ENCR, European Cancer II: Outcomes six weeks post surgery. *Psycho-Oncology*, 5, 295-303.

van Waarde A., Rybczynska A. A., Ramakrishnan N. K., Ishiwata K., Elsinga P. H., & Dierckx, R. A. (2015). Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2703-2714.

Vannini, F., Kashfi K., & Nath N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*, 6, 334-343.

Varley J. M., Evans D. G., & Birch J. M. (1997). Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *British journal of cancer*, 76(1), 1.

Votta-Velis E. G., Piegeler T., Minshall R. D., Aguirre J., Beck-Schimmer B., Schwartz D. E., & Borgeat A. (2013). Regional anaesthesia and cancer metastases: the implication of local anaesthetics. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 57(10), 1211-1229.

Wang P., Lu Y., Li C., Li N., Yu P., & Ma D. (2011). Novel transcript variants of TRAIL show different activities in activation of NF- κ B and apoptosis. *Life sciences*, 89(23-24), 839-846.

Weng M., Chen W., Hou W., Li L., Ding M., & Miao C. (2016). The effect of neuraxial anesthesia on cancer recurrence and survival after cancer surgery: an updated meta-analysis. *Oncotarget*, 7(12), 15262.

Wheeler K. T., Wang L. M., Wallen C. A., Childers S. R., Cline J. M., Keng P. C., & Mach R. H. (2000). Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *British journal of cancer*, 82(6), 1223-1232.

Wilson J. F. (2002). Elucidating the DNA damage pathway: researchers find that Chk2 links ATM upstream of the p53 tumor suppressor gene.(Hot Papers). *The Scientist*, 16(2), 30-32.

Wonderlin W. F., & Strobl J. S. (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *The Journal of membrane biology*, 154(2), 91-107.

Wong M. H., & Pavlakis N. (2011). Optimal management of bone metastases in breast cancer patients. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 3, 35.

Wong M. L., & Medrano J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

Woods D. C., Alvarez C., & Johnson A. L. (2008). Cisplatin-mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumor cells. *Gynecologic oncology*, 108(3), 632-640.

Wooster R., Neuhausen SL., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Tran T., Averill D., Fields P., Marshall G., Narod S., Lenoir GM., Lynch H., Feunteun J., Devilee P., Cornelisse CJ., Menko FH., Daly PA., Ormiston W., Mcmanus R., Pye C., Lewis CM., Canon-Albirght LA., Peto J., Ponder BAJ., Skolnick MH., Easton DF., Goldgar DE., Stratton MR. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2090.

Yang M., & Brackenbury W. J. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in physiology*, 4, 185.

Yang M., James A. D., Suman R., Kasprovicz R., Nelson M., O'Toole P. J., & Brackenbury W. J. (2020). Voltage-dependent activation of Rac1 by Nav1.5 channels promotes cell migration. *Journal of cellular physiology*, 235(4), 3950-3972.

Yu FH1, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(20), 7577-7585.

Yuan X., Kho D., Xu J., Gajan A., Wu K., & Wu G. S. (2017). ONC201 activates ER stress to inhibit the growth of triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(13), 21626.

Zamanillo D., Romero L., Merlos M., & Vela J. M. (2013). Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *European journal of pharmacology*, 716(1-3), 78-93.

Zeng C., Vangveravong S., Xu J., Chang KC., Hotchkiss RS., Wheeler KT., Shen D., Zhuang ZP., Kung HF., Mach RH.(2007). Subcellular localization of sigma-2 receptors in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer research*, 67(14), 6708-6716.

Zhang B., Deng Z., Zeng B., Yang S., Chen X., Xu X., & Wu J. (2018). In-vitro effects of the FS50 protein from salivary glands of *Xenopsylla cheopis* on voltage-gated sodium channel activity and motility of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 29(9), 880-889.

Zou W., Yue P., Khuri F. R., & Sun S. Y. (2008). Coupling of endoplasmic reticulum stress to CDDO-me-induced up-regulation of death receptor 5 via a CHOP-dependent mechanism involving JNK activation. *Cancer research*, 68(18), 7484-7492.

