



**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE MUSKARİNİK
ASETİLKOLİN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ ETKİLERİNİN
HÜCRESEL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Buse Nur KAHYAOĞULLARI

MUĞLA-2025

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE MUSKARİNİK
ASETİLKOLİN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ ETKİLERİNİN
HÜCRESEL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

Buse Nur KAHYAOĞULLARI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Turan DEMİRCAN**

MUĞLA-2025

TEZ ONAYI

Buse Nur KAHYAOĞULLARI tarafından hazırlanan “Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Muskarinik Asetilkolin Reseptör Modülatörü Etkilerinin Hücresel ve Moleküler Düzeyde İncelenmesi” başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	(İmza)
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Turan DEMİRCAN Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	(İmza)
Üye	Prof. Dr. Ali ÖZMEN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	(İmza)

Tez savunma tarihi: 23.06.2025

Bu tez Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirmektedir.

Prof. Dr. Müesser ÖZCAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan metinleri sahiplerinden yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / MSKÜ Açık Erişim Sisteminde erişime açılabilir.

☐ Tezimle ilgili patent başvurusu yapılacağından veya patent alma süreci devam ettiğinden Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile tezimin mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl erişime açılmasının ertelenmesini talep ediyorum.

☐ Tezimde yeni teknik, materyal ve metotlar kullanıldığından ve henüz makaleye dönüşmemiş olduğundan Enstitü Yönetim Kurul kararı ile mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay tezimin erişime açılmasının ertelenmesini talep ediyorum.

23.06.2025

(İmza)

Buse Nur KAHYAOĞULLARI

ETİK BEYAN

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Muskarinik Asetilkolin Reseptör Modülatörü Etkilerinin Hücresel ve Moleküler Düzeyde İncelenmesi” isimli çalışmada tezin planlanmasından yazımına kadar tüm süreçlerde etik ilkelere bağlı kaldığımı, tezime ilişkin bilgi ve belgeleri akademik ve bilimsel etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimde kullandığım tüm görsel ve yazılı materyallerin kaynağını gösterdiğimi, yararlandığım eserlerin tümünün kaynaklar bölümünde yer aldığını, tezimin Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

23.06.2025

(İmza)

Buse Nur KAHYAOĞULLARI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde, bilimsel ve akademik gelişime her daim rehberlik eden, bilgi ve deneyimleriyle hem akademik hem de insani değerler konusunda örnek aldığım kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Turan DEMİRCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen, akademik gelişime katkıda bulunan MSKÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ ve Doç. Dr. Esin SAKALLI ÇETİN'e şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan, karşılaştığım her zorlukta sevgi ve sabırla beni destekleyen biricik annem Ayten KAHYAOĞULLARI ve babam Nihat KAHYAOĞULLARI'na; beni her daim destekleyen ve sevgileriyle güç veren aileme sonsuz minnettarım.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım, deneylerimde, araştırmalarımnda ve her türlü uğraşımda desteğini her zaman hissettiğim kıymetli arkadaşım Mervenur YAVUZ'a ve tüm Demircan Lab üyelerine teşekkür ederim.

Bu süreçte karşılaştığım tüm zorluklarda sabrını, anlayışını ve sevgisini benden esirgemeyen Aygün AKGÜL'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bu süreçte, akademik hayatımın yanı sıra kişisel gelişime de katkıda bulunan, bana her zaman destek olan, samimiyetini ve desteğini her zaman hissettiğim Doç. Dr. Evren GÜMÜŞ hocama ve değerli ağabeyim Yusuf KAPLAN'a teşekkür ederim.

Bu yolculuğumda yanımda olan tüm değerli arkadaşlarıma ve isimlerini burada anamasam da bana destek olan herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE MUSKARİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ ETKİLERİNİN HÜCRESEL VE MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

ÖZET

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve heterojen yapısı nedeniyle tedavi edilmesi zor kanser türlerinden biri olarak bilinir. Muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR'lar), parasempatik sinir sistemi üzerinde düzenleyici işlevler üstlenen reseptörlerdir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, mAChR modülasyonunun birçok kanser türünde anti-kanserojen etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, arekadin but-2-ynil ester tosilat (ABET) bileşiği, muskarinik M2 reseptör aktivatörü olarak değerlendirilen bir bileşik olarak meme kanseri hücrelerinde anti-kanserojen etkileri açısından incelenmiştir. Moleküler docking analizleri, ABET'in M2/M4 muskarinik reseptörlerine bağlanma afinitesini belirlemek için kullanılmıştır. Sonrasında, ABET'in MDA-MB-231 ve MCF-7 MK hücre hatlarında hücre canlılığı, proliferasyonu, klonojenikliği ve migrasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Hesaplamalı analizler, ABET'in M2 ve M4 reseptörlerine tercihli bir şekilde bağlandığını göstermiştir. İn-vitro deneyler, ABET'in MK hücrelerinde hücre canlılığını, büyümesini, klonojeniklik ve migrasyonu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. ABET, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsünü durdurmuş, MCF-7 hücrelerinde ise apoptoz sürecini tetiklemiştir. Ayrıca, ABET, hücre döngüsü ve proliferasyonla ilişkili CCND1, CDK6 ve MKI67 genlerinin ekspresyonunu downregüle etmiştir. ABET, MK hücrelerinde hücre büyümesini, hayatta kalmayı ve migrasyonu inhibe eden potansiyel bir tedavi ajanı olarak öne çıkmıştır. ABET'in anti-kanserojen etkilerinin doğrulanabilmesi ve tedavi potansiyelinin daha fazla araştırılabilmesi için ek in-vivo çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Meme kanseri, Akciğer Kanseri, Muskarinik reseptör agonisti, arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET)

INVESTIGATION OF THE CELLULAR AND MOLECULAR EFFECTS OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR MODULATOR ON BREAST CANCER CELLS

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent malignancy among women and is considered one of the most challenging cancers to treat due to its heterogeneous nature. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs), known for their regulatory roles within the parasympathetic nervous system, have recently gained attention for their potential involvement in tumor biology. Emerging evidence suggests that modulation of mAChRs may exert anticancer effects in various malignancies. In this study, arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET), a selective muscarinic M2 receptor agonist, was evaluated for its antitumoral activity in breast cancer cells. Molecular docking simulations were performed to assess the binding affinity of ABET to M2 and M4 muscarinic receptor subtypes. Subsequently, the biological effects of ABET on cell viability, proliferation, clonogenic potential, and migration were examined using MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. Computational results indicated that ABET preferentially binds to M2 and M4 receptors. In vitro assays revealed that ABET significantly suppressed cell viability, growth, clonogenicity, and migration in both cell lines. Furthermore, ABET induced cell cycle arrest in MDA-MB-231 cells and triggered apoptosis in MCF-7 cells. Quantitative PCR analyses demonstrated that ABET downregulated the expression of proliferation- and cell cycle-associated genes, including CCND1, CDK6, and MKI67. These findings suggest that ABET may represent a promising therapeutic candidate by impeding cancer cell growth, survival, and motility. Nevertheless, further in vivo studies are warranted to validate its antineoplastic potential and therapeutic applicability.

Keywords: Cancer, Breast cancer, Lung cancer, Muscarinic receptor agonist, Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser Biyolojisi	4
2.2. Meme Kanseri (BC).....	6
2.3. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri (mAChR)	11
2.4. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri (mAChR) ve Kanser İlişkisi	12
2.5. Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET)	13
3. YÖNTEM.....	16
3.1. Araştırma Modeli.....	16
3.2. Araştırma Evren ve Örneklemi/Araştırma Materyali	16
3.3. Veri Toplama Araçları	16
3.4. Veri Toplama Süreci.....	16
3.5. Deneysel Kurgu.....	16
3.6. İstatistiksel Analiz	25
3.7. Etik Onay	25
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	25
4. BULGULAR	26
4.1. ABET'in M2 ve M4 Reseptörlerine Bağlanma Potansiyeli In-silico Moleküler Yerleştirme Analizi ile Ortaya Konmuştur.....	26
4.2. ABET, BC Hücre Canlılığını Önemli Ölçüde Azalttı ve Doza Bağlı Sitotoksisteye Neden Oldu.....	27
4.3. ABET Koloni Oluşumunu Doza Bağlı Olarak İnhibe Etti.....	28
4.4. ABET Ankraj Bağımsız Hücre Proliferasyonunu Baskılamıştır	29
4.5. ABET BC Hücrelerinde Migrasyon Kapasitesini Kısıtlamıştır.....	30
4.6. BC Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerinde ABET'in Etkisinin İncelenmesi	32

4.7. BC Hücrelerinde ABET'in Neden Olduğu Apoptozun Tayini.....	33
4.8. ABET, Proliferasyon ve Apoptoz İle İlişkili Genlerin Transkripsiyonel Profilinde Değişime Neden Olmuştur.....	35
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
6.1. Sonuçlar	46
6.2. Öneriler	47
KAYNAKLAR.....	49
EKLER	58
Ek 1: ETİK KURUL ONAYI.....	58
Ek 2: KURUM İZİN ONAYI.....	59
Ek 3: ÖZ GEÇMİŞ.....	60



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABET	: Arecaidine
ANKRD1	: Ankrin tekrar domain 1
BC	: Meme kanseri
BCL2	: B-hücre lenfoma 2
CCND1	: Siklin D1
CDK4	: Siklin bağımlı kinaz 4
CDK6	: Siklin bağımlı kinaz 6
CFA	: Koloni oluşturma testi (Colony formatin assay)
DNMT1	: DNA metiltransferaz 1
EdU	: 5-etinil-2'-deoksiuridin
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IC50	: Yarı maksimal inhibitör konsantasyon
M1-M5	: Muskarinik asetilkolin reseptörü alt tip 1-5
mAChR	: Muskarinik asetilkolin reseptörü
MKI67	: Proliferasyon işaretleyicisi Ki-67
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı PCR
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
WHA	: Yara iyileştirme deneyi ("Wound healing assay")

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tipik kanser hücresi özellikleri	5
Şekil 2.2. Çok aşamalı kanser oluşum süreci	5
Şekil 2.3. mAChR alt tiplerinin hücre içi uyarıcı ve inhibe edici etkileri	12
Şekil 2.4. Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET) molekülünün kimyasal yapısı	14
Resim 3.1. MCF7 hücrelerinin mikroskop görüntüleri	18
Resim 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüleri	18
Şekil 4.1. ABET'in M2 ve M4 muskarinik asetilkolin reseptörlerine bağlanma konfirmasyonlarının in-silico moleküler yerleştirme ile modellenmesi.....	26
Şekil 4.2. ABET uygulaması üzerine MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinin yaşamsallığı ve IC50 değerleri	27
Şekil 4.3. ABET, BC hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur	29
Şekil 4.4. ABET'in BC hücrelerinde ankraj bağımsız hücre proliferasyonunun etkisi	30
Şekil 4.5. ABET uygulaması sonrası BC hücrelerinde yara iyileşme analizi sonuçları.....	31
Şekil 4.6. ABET uygulaması sonrası MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde EdU proliferasyon analizi sonuçları.....	32
Şekil 4.7. ABET'in apoptoz üzerindeki etkilerinin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde değerlendirilmesi	34
Şekil 4.8. ABET uygulamasının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri	35

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Meme kanseri alt tipleri ve özellikleri	8
Tablo 3.2. qRT-PCR deneylerinde kullanılan gen belirteçleri	24



1. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin başlıca nedenlerindendir (Xu vd., 2023). Meme kanseri en çok 45 yaş ve üzeri kadınlarda görülmektedir fakat son yıllarda premenopozal dönemde ve 40 yaş altı kadınlarda da anlamlı bir artış gözlenmektedir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre, meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında en sık tanı konulan kanser türü olup, gelişmiş ülkelerde ileri yaş grubunda yoğunlaşmakla birlikte genç yaş grubunda da artış eğilimi göstermektedir (Sung vd., 2021). Ayrıca, ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nün SEER veritabanına göre, 2000'li yıllardan itibaren 40 yaş altı kadınlar arasında meme kanseri insidansında hafif ama istikrarlı bir artış eğilimi gözlenmektedir (Sung vd., 2021). Meme kanseri heterojen yapısı nedeniyle tedaviye yanıt vermede farklılıklar göstermektedir ve bu durum güncel tedavi seçeneklerinden olumlu etki alınmasını güçleştirmektedir (Harbeck ve Gnant, 2017). Meme kanseri biyolojik özelliklerine göre hormon reseptör pozitif (HR+), HER2 pozitif ve üçlü negatif (TNBC) olmak üzere üç alt tipe ayrılır. Bu üç alt tip hastalığın prognozu, tedaviye verilen yanıt veya gösterilen direnç açısından belirleyicidir (Perou vd., 2000). Hormon reseptör pozitif meme kanseri, tümör hücrelerinde östrojen ve/veya progesteron reseptörlerinin pozitif olması ile karakterizedir ve endokrin tedavi seçenekleri uygulanmaktadır (Harbeck vd., 2019). HER2 pozitif meme kanseri alt tipinde HER2 geninin aşırı ekspresyonu mevcuttur ve yüksek proliferasyon ile karakterizedir (Harbeck vd., 2019). Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ise östrojen, progesteron ve HER2 ekspresyonu açısından negatiftir. Bu nedenle endokrin tedavi veya HER2 pozitif alt tipte uygulanan tedavilere yanıt vermez. Diğer alt tiplere göre daha agresif bir seyir göstermekle beraber metastaz yapma eğilimi yüksektir (Harbeck vd., 2019).

Muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR), merkezi ve periferik sinir sisteminde asetilkolin aracılığı ile işlev gören G proteinine bağlı bir reseptör ailesidir (Español vd., 2007). mAChR'ler solunum sistemi, kardiyovasküler sistem ve sindirim sistemi gibi çeşitli sistemlerde görev alır. M1, M2, M3, M4 ve M5 olmak üzere beş çeşit mAChR mevcuttur. Bu alt tipler farklı görevler üstlenirler. M1, M3 ve M5 seçici olarak Gq/11 G-proteinlerine bağlanarak PLC'nin aktivasyonuna ve ardından DAG ve IP3'te artışlara yol açarak hücre içi kalsiyumun artmasına neden olur. M2 ve M4 ise Gi G-

proteinlerini aktive ederek adenilat siklazı inhibe eder ve hücre içi cAMP konsantrasyonlarını azaltır (Tsimpili ve Zoidis, 2025). Sinir sisteminin yanı sıra, bu reseptörler periferik dokularda da bulunur ve hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozu düzenler (Español vd., 2007). Son yıllarda yapılan araştırmalarda düzensiz mAChR sinyalleşmesinin tümör oluşumu ile ilişkili olduğu ve çeşitli kanserlerin oluşumu veya ilerlemesinde rol oynadığı ortaya konmuştur (Ferretti vd., 2012). mAChR alt tiplerinden M2 reseptörünün potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak öne çıktığı görülmüş ve apoptozu indükleyerek kanser gelişimini engellediği gösterilmiştir (Ferretti vd., 2012). Örneğin, glioblastoma modellerinden yapılan çalışmalarda, M2 reseptörlerinin uyarılması kanser hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonunda negatif bir etki göstererek terapötik bir potansiyeli olduğunu vurgulamıştır (Ferretti vd., 2012). Benzer olarak over karsinomunda yapılan bir çalışmada, M2 reseptörünün aktivasyonunun tümör hücresi proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu arttırdığı ortaya koyulmuştur (Taggi vd., 2022). Bu sonuçlar M2 reseptörünün tümör baskılayıcı bir özellikte olabileceğini desteklemiştir. Ayrıca, mAChR'lerin modülasyonu, hücrenin yaşamsallığı ve proliferasyonunun kontrolü için oldukça önemli olan MAPK/ERK ve PI3K/Akt gibi önemli hücre içi sinyal yollarını da etkileyebilir (Español vd., 2007). Bu nedenle kanserle olan mücadelede mevcut kanser tedavilerine ek olarak mAChR hedefli tedavilerin entegrasyonu, geleneksel tedavilerde karşılaşılan direncin aşılmasına ve antikanser tedavilerin etkinliğinin artırılmasına yönelik yenilikçi bir strateji olarak değerlendirilebilir (Taggi vd., 2022).

Arekaidin but-2-inil ester tosilat (ABET), areka cevizinden izole edilen bir alkaloid olan arekaidinin sentetik bir türevi olup mAChR'ler için seçici bir ligand olarak geliştirilmiştir (Sugawara vd., 2022; Thakur ve Mehrotra, 2021). ABET, mAChR alt tiplerine özgün yapısal özellikler sergiler; özellikle M2 reseptörlerine yüksek afinite göstermekte ve kardiyovasküler sistemde tipik kolinerjik etkiler ortaya çıkarmaktadır (Malomouzh vd., 2007; Yavuz vd., 2025; C. Zhang vd., 2016). Ayrıca, güçlü bir M2 reseptör seçici agonisti olan arekaidin but-2-inil ester tosilat (ABET), fare modellerinde zimosan kaynaklı lökosit göçünün engellenmesi yoluyla anti-inflamatuar özellikler sergilemektedir (Liu vd., 2002). Bu nedenle hem nöronal hem de nöron dışı dokularda reseptör aracılı sinyal yollarını nasıl modüle ettiğini araştırmak, nörotransmisyon, düz kas kontraksiyonu ve bez salgısı gibi fizyolojik süreçlerde muskarinik reseptörlerinin rolünü aydınlatmak için değerli bir araç olabileceği gösterilmiştir (Sugawara vd., 2022).

Tüm bunlara ek olarak belirtmek gerekir ki, ABET'in antikanser potansiyeli henüz kanser modeli deneylerinde kapsamlı olarak incelenmemiştir.

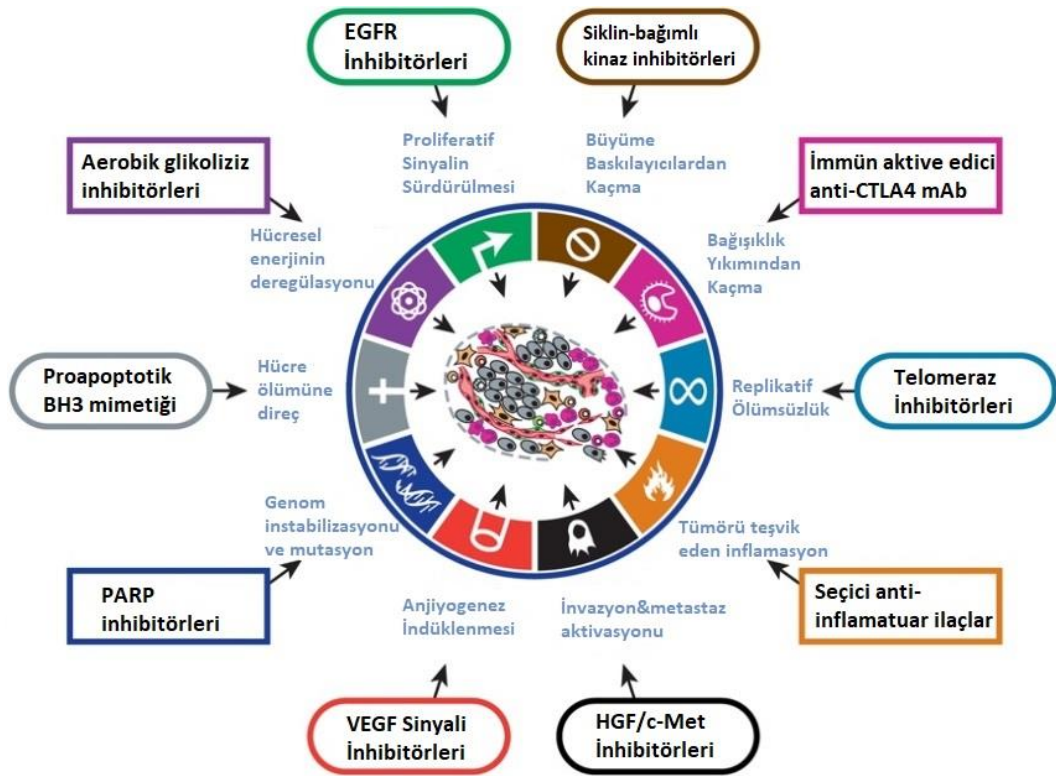
Bu çalışmada meme adenokarsinounda daha önce çalışılmamış olan ABET'in, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında çok yönlü anti-karsinojenik özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. ABET uygulaması, hücre canlılığı, koloni oluşumu, üç boyutlu sferoit oluşumu ve hücre göçü gibi kötü huylu özelliklerde belirgin azalma sağlamıştır. Çalışmadaki bulgular genel olarak ABET'in meme kanseri tedavisinde umut vaat eden bir anti-karsinojenik ajan olarak konumlandırılabilceğini ve reseptör hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için değerli bilgiler sunmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Biyolojisi

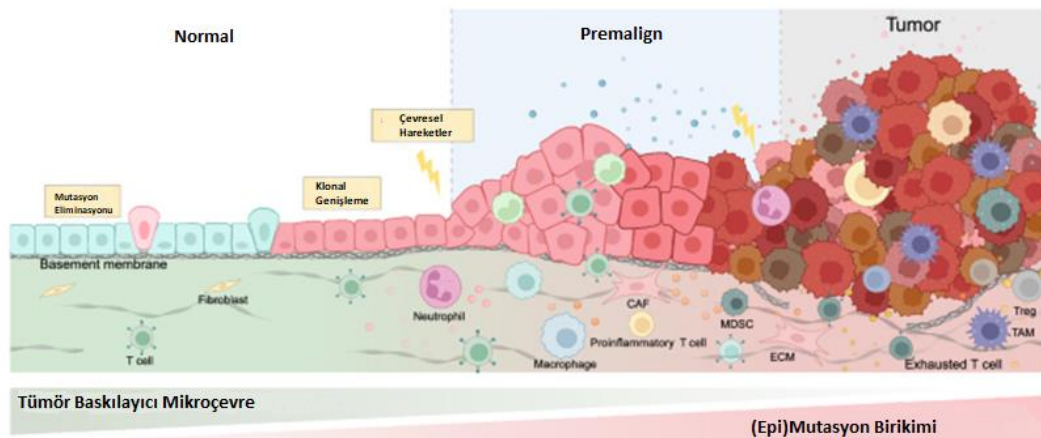
Kanser, bir organ veya dokuda bulunan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve çoğalmaya başlayarak tümörleri oluşturması olarak tanımlanmaktadır (Bailar ve Gornik, 1997). Aynı zamanda tüm dünyada başlıca ölüm nedenlerinden biri olan çok faktörlü bir hastalıktır (Sung vd., 2021). Kanser oluşumu çok aşamalı bir süreç olarak tanımlanır ve bu oluşuma karsinogenez denmektedir (Diori Karidio ve Sanlier, 2021). Karsinogenez aşamasında hücrelerde ardı ardına meydana gelen mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler gözlemlenir. Meydana gelen bu mutasyonlar ve epigenetik değişimler hücrede birikerek malign bir fenotip oluşturmaktadır (Cree, 2011; Diori Karidio ve Sanlier, 2021). Hücrede oluşan mutasyonların büyük bir kısmı tümör baskılayıcı mekanizmalar sayesinde düzeltilmektedir (S. Zhang vd., 2024). Fakat meydana gelen bazı değişimler hücreye daha fazla çoğalma yeteneği kazandırabilir ve bunun sonucunda küçük hücre toplulukları oluşabilir. Bu topluluklar direkt olarak doku veya organın normal işleyişinde bir değişime neden olmayabilir (S. Zhang vd., 2024). Fakat ek bir içsel veya çevresel uyarı ile karşılaşıldığında bu küçük hücre toplulukları kontrolsüz bir biçimde çoğalarak karsinogenezi başlatır (Hanahan ve Weinberg, 2011; S. Zhang vd., 2024). Küçük değişiklikleri barındıran bu hücrelerde meydana gelen çoğalma eğilimi ile biriken mutasyonlarda ve epigenetik değişikliklerde de artış meydana gelir. Bu değişimler birikmeye devam ettikçe hücreler immün sistemden kaçma, çevre dokulara yayılma, büyüme baskılayıcılardan kaçış, genom instabilitesi gibi tipik kanser hücresi özelliklerini göstermeye başlar (Hanahan ve Weinberg, 2011) (Şekil 2.1.).



Kaynak: Hanahan ve Weinberg, 2011

Şekil 2.1. Tipik kanser hücresi özellikleri

Zamanla tümörün meydana geldiği çevre de değişime uğrayarak immün sistemin baskılayıcı etkilerinin azalması, inflamasyonun artması, fibroblastların kanserle ilişkili fibroblast (CAF) denen hücrelere dönüşmesi ve hücre dışı matriks yapısının değişimi gibi tipik kanseri destekleyici özellikler gösteren bir yapı haline gelmektedir (Kalluri, 2016; Zhang vd., 2024). Tüm bu olaylar çok aşamalı karsinogenezi oluşturmaktadır (Zhang vd., 2024) (Şekil 2.2.).



Kaynak: Zhang vd., 2024

Şekil 2.2. Çok aşamalı kanser oluşum süreci

2.2. Meme Kanseri (BC)

Meme kanseri (BC), kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturur ve kadınlarda en sık görülen malignite olarak bilinmektedir. Dünya çapında akciğer kanserini geride bırakarak en sık tanı alan kanser konumuna gelmiştir (Sung vd., 2021). Meme kanserinin küresel düzeyde görülme sıklığı, coğrafi bölgelere göre önemli farklılıklar göstermektedir; yaşa göre standardize edilmiş yıllık insidans oranları bazı Afrika ve Asya ülkelerinde 100.000 kişide 40'ın altındayken, Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya-Yeni Zelanda gibi bölgelerde bu oran 80 ila 94 arasında değişmektedir (Sung vd., 2021). Bu farklılıklar gelişmiş ülkelerde tarama programları ve yaşam tarzı faktörleriyle ilişkiliyken, gelişmekte olan ülkelerde henüz insidans daha düşüktür ancak hızla artmaktadır (Sung vd., 2021).

Meme kanserinde sağkalım oranları büyük ölçüde hastalığın evresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada evre I, II, III ve IV meme kanserlerinde 5 yıllık göreceli sağkalım oranları sırasıyla %100, %89.7, %71.4 ve %29.1 olarak rapor edilmiştir. Bu veriler, erken evrede tanı konulan hastaların sağkalım oranlarının daha yüksek olduğunu göstermektedir (Mangone vd., 2022). Buna ek olarak 45-74 yaş arası kadınlarda 5 yıllık sağkalım oranı %93.9 iken, 75 yaş ve üzeri kadınlarda bu oran %74.1 olarak belirtilmiştir. Bu veriler, yaşın sağkalım üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir (Mangone vd., 2022).

Meme kanserinde prognozu belirleyen en önemli faktörlerin başında tümörün TNM evresi denen tümör boyutu (T), aksiller lenf nodu metastazlarının varlığı ve sayısı (N) ve uzak metastaz durumu (M) hastalığın seyrini belirleyici önemli değişkenlerdir (Zeichner vd., 2015). Tanı anında tümörün 2 cm'den küçük olması ve lenf nodu tutulumu bulunmaması, genel olarak daha iyi bir sağkalım ile ilişkilidir. Fakat tümörün büyük olması, birden fazla lenf nodunu tutması veya metastaz varlığı olumsuz prognostik faktörlerdendir (Yersal ve Barutca, 2014).

Meme kanseri, morfolojik ve moleküler özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Meme kanseri, morfolojik ve moleküler özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Histopatolojik olarak en sık rastlanan invaziv tümör tipi, "no spesifik tip" olarak da adlandırılan invaziv duktal karsinomdur; olguların yaklaşık %70-80'ini invaziv duktal

karsinom oluşturur (Badowska-Kozakiewicz vd., 2017). İkinci en yaygın tip olan invaziv lobüler karsinom ise vakaların yaklaşık %10'udur (Badowska-Kozakiewicz vd., 2017). Daha nadir histolojik tipler arasında medüller, müsinöz, tübüler ve papiller karsinomlar sayılabilir. Ancak benzer histolojik görünümüne sahip tümörler bile moleküler düzeyde farklı davranışlar gösterebildiğinden, günümüzde klinikte tüm meme kanserleri moleküler alt tiplerine göre de sınıflandırılmaktadır (Yersal ve Barutca, 2014). Meme tümörleri, reseptör ifadeleri ve gen ekspresyon profilleri esas alınarak Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif ve üçlü negatif gibi dört ana moleküler alt tipe ayrılmaktadır. Luminal A alt tip, östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatif ve düşük proliferasyon (Ki-67 düşük) özellikleriyle tanımlanır. Luminal A tümörler genellikle daha düşük histolojik grade'e sahiptir ve diğer alt tiplere kıyasla daha yavaş büyüme eğilimindedir. uminal B alt tipte ise hormon reseptör pozitifliği devam etmekle birlikte tümör ya HER2 pozitif ya da proliferasyon indeksi (Ki-67) yüksektir. Luminal B tümörler luminal A'ya göre daha yüksek grade'li olup nüks etme oranları daha fazladır ve tedaviye yanıtları görece daha kötü seyreder (Yersal ve Barutca, 2014). HER2-pozitif (HER2-zengin) alt tip, HER2 gen amplifikasyonu sonucu HER2 proteininin aşırı eksprese edildiği, ancak ER/PR negatif olan tümörleri kapsar (Dass vd., 2021). HER2 pozitif tümörler, HER2 sinyal yolunun aşırı aktif olması nedeniyle hızlı büyüme ve yayılma potansiyeline sahiptir (Yersal ve Barutca, 2014). HER2 pozitif tümörler için hedefe yönelik tedaviler geliştirilmeden önce HER2-pozitif alt tip, luminal alt tiplere göre çok daha kötü bir prognoz gösterirken; günümüzde trastuzumab gibi anti-HER2 tedavilerinin kullanılması ile bu alt tipte sağkalım belirgin bir biçimde artmıştır. Fakat genel olarak HER2 pozitif hastalık biyolojik olarak agresif karakterini korumaktadır (Yersal ve Barutca, 2014). Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ise hormon reseptörleri (ER ve PR) ile HER2 ekspresyonunun hiçbirinin bulunmadığı alt tip olarak tanımlanır (Dass vd., 2021). TNBC'de hedeflenebilecek spesifik bir reseptör bulunmadığı için, bu alt tipte tedavi çoğunlukla kemoterapiye dayanmaktadır ve diğer moleküler alt tiplerle karşılaştırıldığında hastalığın seyri genellikle daha agresiftir. Genom düzeyinde yapılan analizler, bu tümörlerin kendi içinde de farklı biyolojik özellikler taşıyan alt gruplara (örneğin bazal-benzeri, mesenkimal) ayrılabilindiğini ortaya koymaktadır; ancak bu alt gruplar için klinik uygulamada standart hale gelmiş farklı tedavi protokolleri henüz mevcut değildir (Dass vd., 2021) (Tablo 1).

Tablo 2.1. Meme kanseri alt tipleri ve özellikleri

Alt Tip	Reseptör	Tedavi Yaklaşımı	Kaynak
Luminal A	ER+, PR+ HER2- Düşük Ki-67	Endokrin tedavi (tamoksifen veya aromataz inhibitörleri); genellikle kemoterapi gerekmez	(Yersal ve Barutca, 2014)
Luminal B	ER+, PR± HER2± Yüksek Ki-67	Endokrin tedavi + kemoterapi; HER2 pozitifse anti-HER2 tedavi eklenir	(Ades vd., 2014)
HER2 Pozitif	HER2+ ER-/± PR-/±	Anti-HER2 tedavi (trastuzumab, pertuzumab) + kemoterapi	(Swain vd., 2015)
Üçlü Negatif (TNBC)	ER-, PR- HER2-	Kemoterapi; bazı durumlarda immünoterapi (PD-L1 pozitifse) veya PARP inhibitörleri (BRCA mutasyonu varsa)	(Telli vd., 2018)

Meme kanserinin oluşumunda çeşitli genetik değişiklikler söz konusudur. Özellikle daha çok lüminal tip tümörlerde görülen PIK3CA mutasyonları ve TNBC veya HER2 pozitif alt tiplerde sıklıkla görülen TP53 mutasyonları somatik mutasyonlar arasında en sık görülen gen değişimleridir (Jiang vd., 2014; Pereira vd., 2016). Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sinde ise ERBB2 (HER2) geninde amplifikasyon veya aşırı ekspresyon bulunur. Bu mutasyon sonucunda tümörlü hücrelerde HER2 reseptörü aşırı miktarda üretilir ve agresif bir fenotip görülür. Bu mutasyona sahip hastalarda anti-HER2 tedavisi hedefe yönelik meme kanseri tedavisi için önemli bir belirteçtir (Yersal ve Barutca, 2014).

Meme kanserlerinin geneli sporadiktir fakat %5 ila %10 kadarı genetik kaynaklı gelişmektedir. Genetik yatkınlığa bağlı olarak gelişen meme kanserlerinin en bilinen nedeni BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen değişimlerdir. Bu mutasyona sahip bireylerde meme kanseri geliştirme olasılığı diğer bireylere göre çok daha yüksektir (Arpino vd., 2016). BRCA1 mutasyonuna sahip bireylerde genellikle TNBC alt sınıfı meme kanseri gelişmektedir (Dass vd., 2021). Kalıtsal meme kanserleri düşük sıklıkla olsa da TP53, PTEN, STK11 ve PALB2 gibi genlerin mutasyonuna bağlı olarak da gelişebilir (Dass vd., 2021). Meme kanserinde gözlenen genetik farklılıklar, hastalığın moleküler düzeyde çeşitlenmesine yol açmakta ve her hastada tümör biyolojisinin kendine özgü özellikler taşıyabileceğini göstermektedir (Yersal ve Barutca, 2014). Bu nedenle günümüzde tedavi stratejileri, tümörün bireysel moleküler

yapısına göre şekillendirilmekte ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlar giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Meme kanserinde tanı ve evreleme, klinik muayenenin yanı sıra görüntüleme ve biyopsi ile konulur. Erken tanıda en önemli yöntem düzenli tarama mamografisidir. Özellikle 50–69 yaş arası kadınlarda uygulanan mamografi taraması, meme kanserine bağlı ölüm oranlarını anlamlı ölçüde azaltmıştır (Zielonke vd., 2020). Mamografi, düşük doz X-ışını kullanarak meme dokusunu iki boyutlu olarak görüntüleyen ve asemptomatik bireylerde dahi klinik olarak fark edilmeyen lezyonların saptanmasına olanak tanıyan temel bir tarama yöntemidir (Nicosia vd., 2023; Oeffinger vd., 2015). Özellikle genç ve yoğun fibroglandüler meme yapısına sahip bireylerde, mamografinin duyarlılığı azalabileceğinden ultrasonografi (USG) ek bir görüntüleme yöntemi olarak kullanılmaktadır (Corsetti vd., 2008). USG, kistik yapıların solid lezyonlardan ayrımını sağlamada etkili olup, mamografide belirlenen şüpheli alanların daha ayrıntılı değerlendirilmesine katkıda bulunur (Berg vd., 2008). Bir diğer tanı yöntemi olan manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ise BRCA1 veya BRCA2 mutasyonu bulunan yüksek riskli bireylerde hem tarama hem de tanı koymada yüksek duyarlılığı nedeni ile tercih edilen ileri düzey bir görüntüleme tekniğidir (Saslow vd., 2007).

Meme kanseri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi çeşitli yöntemlerin bir kombinasyonu ile tedavi edilir. Erken evre meme kanserlerinde tümörün cerrahi olarak çıkarılması ana tedavi yöntemidir. Bu tedavinin ardından kalan dokulara radyoterapi uygulanarak onkolojik bir güvenlik sağlanır. Tümör dokusunun daha yaygın olduğu bireylerde mastektomi denen memenin tümünün alınması işlemi uygulanabilir. Uygulanan cerrahi işlemlerin ardından tümörün özelliklerine göre adjuvan tedaviler planlanmaktadır. HER2 negatif, hormon reseptör pozitif ve düşük risk taşıyan tümörler için genellikle endokrin tedaviler uygulanmaktadır. HER2-pozitif tümörlerde, cerrahi tedavinin ardından yaklaşık 1 yıl süreyle trastuzumab bazlı anti-HER2 hedefe yönelik tedavi verilmektedir. Trastuzumab'ın kemoterapiyle kombinasyonu, HER2 pozitif erken evre hastalarda nüks riskini belirgin azaltmış; metastatik hastalarda ise sağkalımı anlamlı derecede uzatmıştır (J. Wang ve Wu, 2023). TNBC'li hastalarda ise genellikle vücutta olası metastatik hastalığı temizleyerek nüks riskini azaltmayı amaçlayan adjuvan tedaviler ve kemoterapi uygulanmaktadır (Joensuu ve Gligorov, 2012). Özellikle kemoterapi uygulamaları TNBC alt tipine sahip hastalar için tedavinin bel

kemiğidir. Meme kanserinde sıklıkla antrasiklinler (doksorubisin veya epirubisin) ve taksanlar (paklitaksel veya dosetaksel) kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Antrasiklinler, DNA baz çiftleri arasına interkale olarak ve topoizomerez-II enzimini inhibe ederek tümör hücrelerinde letal DNA çift zincir kırıkları oluşturur (Minotti vd., 2004). Taksanlar ise hücre içerisinde mikrotübüllere bağlanarak hücre bölünmesini metafaz aşamasında durdurur ve bunun sonucunda tümör hücresi apoptoza gider (Foland vd., 2005). Kemoterapi ajanlarının kombinasyon halinde kullanımı, farklı etki mekanizmaları ile tümöre karşı sinerjik etki yaratır ve direnç gelişme riskini azaltır (Wang ve Wu, 2023). Buna karşın kemoterapinin önemli kısıtlılıkları ve yan etkileri mevcuttur. Kemoterapi ilaçları yalnızca hedef alınan bölgedeki tümörlü hücreleri hedef almazlar. Özellikle vücutta hızlı bölünen hücreleri de etkilediği için miyelosüpresyon, saç dökülmesi, bulantı-kusma gibi yan etkilere yol açarak hastaların tedavi süresince yaşam kalitesini oldukça düşürmektedirler. Antrasiklinler yüksek kümülatif dozlarda kardiyotoksisite (kalp kasında hasar) yapabilirken, taksanlar periferik nöropatiye neden olabilmektedir (Wang ve Wu, 2023). Bu yan etkilere ek olarak uzun süreli kemoterapi uygulamaları sonucunda, tümör hücreleri kemoterapiye karşı direnç kazanarak hastalığın metastatik özelliklerinin ortaya çıkması ve hastalığın yeniden ilerlemesi ile sonuçlanabilir (Wang ve Wu, 2023). Metastatik meme kanseri tedavisinde uygulanacak sistemik yaklaşım, tümörün biyolojik alt tipi ve hastanın önceki tedavi öyküsüne göre kişiye özel olarak belirlenir. Hormon reseptör pozitif olgularda, genellikle CDK4/6 inhibitörleri ile verilen hormon tedavisi ilk tercih olarak uygulanırken; HER2 pozitif hastalarda ise trastuzumab ve pertuzumab gibi hedefe yönelik ilaçlar kemoterapi ile birlikte standart tedavi seçeneğini oluşturur (Burguin vd., 2021). Üçlü negatif metastatik hastalarda ise ana tedavi olarak kullanılan kemoterapide yeni onaylanan immünoterapi ilaçları (anti-PD-1 antikoru pembrolizumab gibi) özellikle PD-L1 ekspresyonu pozitif üçlü negatif hastalarda kemoterapiyle kombine olarak yaşam süresini uzatmada önemli ilerlemeler sağlamıştır (Wang ve Wu, 2023).

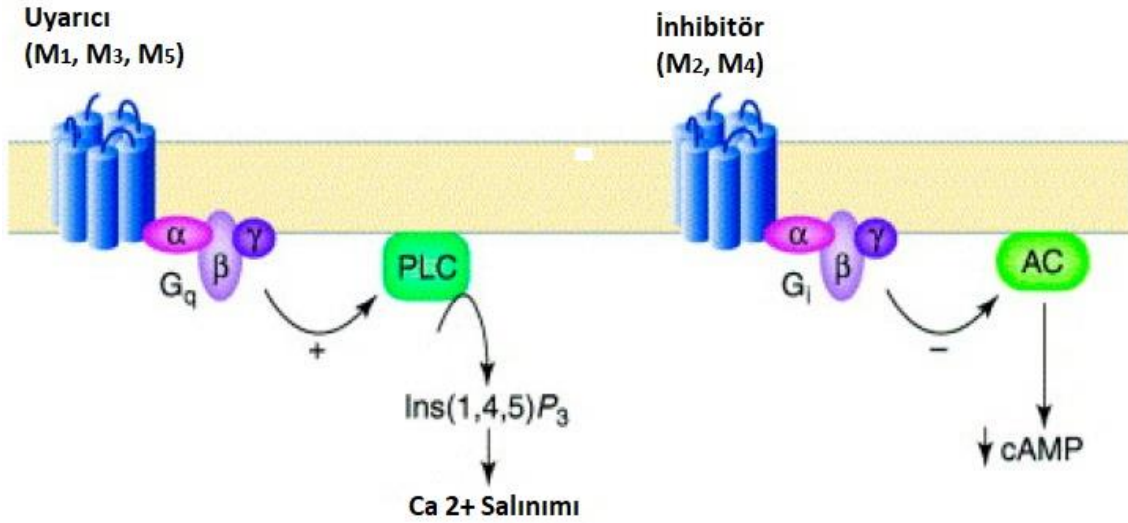
Özetle meme kanseri tedavileri çok çeşitli olup hastalığın alt tipine göre kişiselleştirilmektedir. Erken evre meme kanserlerinde iyileşme şansı daha yüksekken özellikle ileri evre ve metastatik meme kanserlerinin tedavileri oldukça zordur. Bu nedenle güncel çalışmalar ile yeni moleküler hedefler bulmak, hastaların yaşam kalitesini düşürmeden uygulanabilecek yeni ilaçları kullanıma sunmak ve kişiye özgü tedavi seçenekleri oluşturmak umut edilmektedir.

2.3. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri (mAChR)

Muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR), parasempatik sinir sisteminin temel etkilerini gerçekleştirerek vücutta çeşitli fizyolojik süreçleri modüle eden ve vücutta yaygın olarak bulunan G proteinine bağlı reseptörlerdir (Calaf vd., 2022). Bu reseptörler kalp atış hızının yavaşlatılması, düz kas kasılması, ekzokrin bezlerden salgı (tükürük, mide asidi vb.) gibi parasempatik etkileri düzenlerler (Calaf vd., 2022). Beş farklı muskarinik asetilkolin reseptör alt tipi (M1–M5), insan genomunda sırasıyla CHRM1 ila CHRM5 genleri aracılığıyla sentezlenmektedir ve bu alt tiplerin her biri özgün fizyolojik işlevleri yerine getirmek üzere yapılandırılmıştır (Calaf vd., 2022). M1 reseptörleri, başta serebral korteks ve hipokampus gibi beyin yapılarında yoğunlaşmış olup, öğrenme, bellek ve dikkat gibi bilişsel işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynar (Wess, 2004). M2 alt tipi, özellikle kalpte (atriyal miyokard) ve presinaptik sinir uçlarında bulunur; burada hem kalp atım hızını yavaşlatarak kardiyak inhibisyon sağlar hem de asetilkolin salınımının otoreseptör aracılı kontrolünü yürütür (Kruse vd., 2012). M3 reseptörleri, düz kaslar (bronklar, bağırsaklar, mesane) ve ekzokrin bezlerde (tükürük, mide asidi bezleri) yaygın olarak yer alır; bu reseptörler düz kas kasılmasını uyararak parasempatik yanıtların gerçekleşmesini sağlar (Kruse vd., 2012). M4 ve M5 reseptörleri ise özellikle merkezi sinir sisteminde, striatum ve substantia nigra gibi dopamin-regülatuar bölgelerde bulunur; bu alt tipler dopamin salınımının modülasyonunda görev alarak motor kontrol, ödül-motivasyon davranışları ve psikotropik ilaç hedeflemesinde rol üstlenir (Shin vd., 2015).

mAChR'ler etkiledikleri G protein ailesine göre hücre içinde farklı işlevler gösterirler. M1, M3 ve M5 alt tipleri Gq/11 alt ünitesine bağlanarak fosfolipaz C- β (PLC) enzimini aktive eder ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG) denen ikincil mesajcıların artışına yol açar (Tsimpili ve Zoidis, 2025). Ardından IP3 endoplazmik retikulumdaki reseptörlere bağlanır ve hücre içerisindeki Ca^{2+} miktarının artışına neden olur. Artan hücre içi Ca^{2+} ve DAG ile protein kinaz C (PKC) enzimi aktif hale gelir. Bu yol ile hücre içinde Ca^{2+} artışı ve kinaz aktivasyonu üzerinden uyarıcı etki gösterilmiş olur. M2 ve M4 alt tipleri Gi proteini ile etkileşime girer. Bu etkileşim ile adenilat siklaz enzimi enjekte edilir ve hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesi düşer. cAMP seviyesinin düşmesi ile protein kinaz A (PKA) aktivitesi azalır.

Bunun sonucunda G_i aracılı sinyalleme cAMP düşüşü ile inhibitör bir etki yaratır (Tsimpili ve Zoidis, 2025) (Şekil 2.3.).



Kaynak: Tsimpili ve Zoidis, 2025

Şekil 2.3. mAChR alt tiplerinin hücre içi uyarıcı ve inhibe edici etkileri

Muskarinik reseptörlerin aracılığı ile aktif olan bu hücre içi sinyal yolları sayesinde hücrede çeşitli yanıtlar meydana gelir. Ca^{2+} seviyesinin hücre içerisinde arttığı M1, M3 ve M5 reseptörlerinin G_q proteini ile etkileşime girdiği sinyal yolağı ile kas kasılması, sekresyon gibi olaylar gerçekleşir. Buna ek olarak Ca^{2+} bağımlı kinazlar ile gen ekspresyonu değişiklikleri meydana gelebilir (Tsimpili ve Zoidis, 2025). Ek olarak bu yolağın aktivasyonu ile mitojen aktive protein kinaz (MAPK/ERK) denen yolak aktive olarak hücre farklılaşması ve proliferasyonu etkilenir (Calaf vd., 2022). G_q bağımlı sinyalizasyonun diğer bir etkisi; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi tirozin bağımlı kinazların transaktivasyonu sonucu büyüme faktörlerinin aktive olarak mitojenik etki yaratmasıdır (Calaf vd., 2022). M2 ve M4 reseptörlerinin rol oynadığı G_i aracılı yolak ile PKA seviyelerinin azalması sonucunda kalp kası hücrelerinde β -adrenerjik uyarının karşıtı bir etki meydana gelerek kasılma gücü azalır (Tsimpili ve Zoidis, 2025). Tüm bu bilgiler mAChR'lerin hücre içi sinyal iletiminde ve çeşitli fizyolojik olaylarda önemli düzenleyiciler olduğunu göstermektedir.

2.4. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri (mAChR) ve Kansere İlişkisi

Son yıllarda mAChR'lerin fizyolojik modülatör rollerinin yanı sıra çeşitli kanserlerde düzenleyici rollerinin olduğunu gösterilmiştir (Calaf vd., 2022). Tümör

hücrelerinin yanı sıra tümör mikroçevresinde yer alan sinir uçları ve immün hücreler tarafından ACh salgılanarak mAChR'ler uyarılabilir ve bu durum tümör hücresinde proliferasyon, invazyon veya anjiyogenezle ilişkili malign sinyalleri tetikleyen çeşitli sinyal yollarını devreye sokabilir (Calaf vd., 2022).

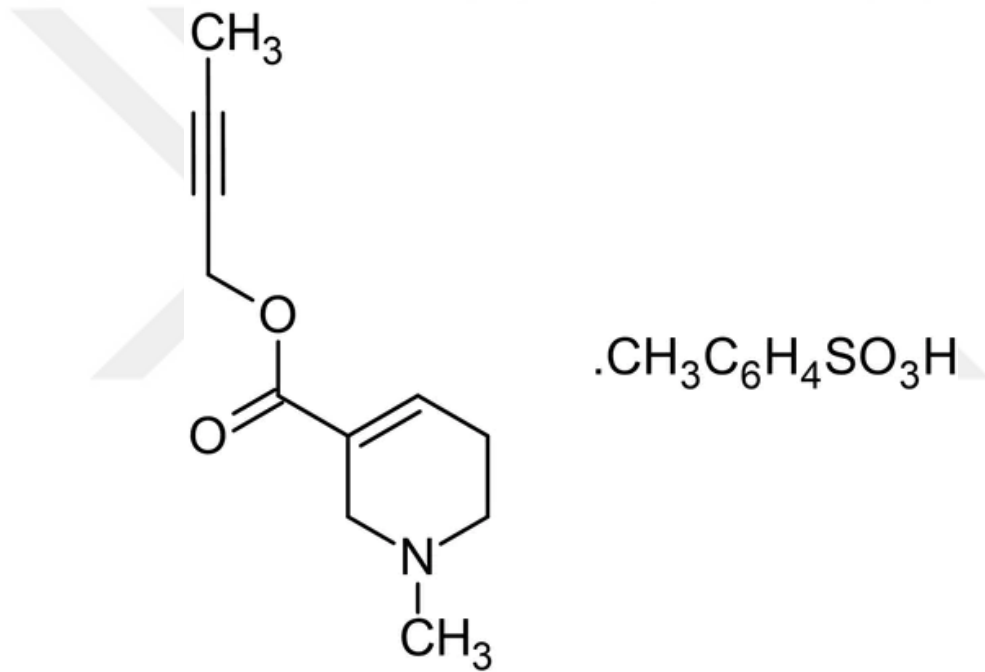
Bazı kanser türlerinde, M2 muskarinik asetilkolin reseptörünün (mAChR) aktivasyonu, hücresel proliferasyonu baskılayan ve apoptozu destekleyen sinyallerin devreye girmesine aracılık edebilmektedir (Español vd., 2021). Özellikle MCF-7 meme kanseri hücre hattında yürütülen deneylerde, M2 spesifik agonistlerin uygulanması sonucunda hücre döngüsünün durakladığı ve apoptotik hücre ölümünde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Calaf vd., 2022). Glioblastoma hücrelerinde gerçekleştirilen benzer çalışmalar, M2 reseptör aktivasyonunun mitojenle uyarılan ERK1/2 yollarını inhibe ederek tümör hücre proliferasyonunu belirgin şekilde azalttığını ortaya koymuştur (Español vd., 2021). Bununla birlikte, M2 reseptör uyarımının tümör mikroçevresinde anjiyogenezi kısıtlayan moleküllerin ekspresyonunu artırarak damar oluşumunu inhibe edebileceği de rapor edilmiştir (Calaf vd., 2022). Bazı prelinik modellerde, M2 stimülasyonunun oksidatif stres mekanizmalarını aktive ettiği ve bunun sonucunda hücresel hasarın artarak tümör hücrelerinin büyüme kapasitesini sınırladığı bildirilmiştir (Español vd., 2021). Bu veriler, M2 alt tipinin sadece tümör progresyonunu modüle etmekle kalmayıp, aynı zamanda antiproliferatif tedavi stratejileri için de umut vadeden bir hedef olduğunu göstermektedir (Calaf vd., 2022).

Yapılan çalışmalarda mAChR agonistlerinin kanser hücrelerinde büyümeyi uyarırken antagonistlerin büyümeyi baskılayabildiği; bu etkinin meme, akciğer, kolon, mide, pankreas, prostat, over, glioblastom gibi birçok kanser türünde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Calaf vd., 2022; Ferretti vd., 2012; Taggi vd., 2022; Yavuz vd., 2025). Muskarinik reseptör alt tipleri normal dokularda genellikle düşük seviyelerde eksprese edilirken, malign dokularda aşırı ekspresyon gösterebilir. Bu durum, mAChR'leri hem bir prognostik biyobelirteç hem de seçici hedeflenebilirlik potansiyeli açısından ilgi çekici kılmaktadır (Calaf vd., 2022; Español vd., 2021).

2.5. Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET)

mAChR'ler, parasempatik sinir sisteminde temel düzenleyiciler olarak rol alırlar ve nöronal olmayan hücrelerde de önemli görevler üstlendiği bilinmektedir. Son

dönemlerde yapılan çalışmalar, mAChR aktivitesinin çeşitli kanser türlerinde anti-karsinojenik etkilerinin olabileceğini göstermiştir (Tsimpili ve Zoidis, 2025). Bu bağlamda, bir mAChR alt tipi olan M2 reseptörünü spesifik olarak aktive ettiği bilinen bir bileşik olan ABET'in kanser biyolojisindeki etkilerini aydınlatmak önem taşımaktadır. ABET, arekolin türevi bir agonist olup özellikle M2 mAChR'yi hedef alarak hücre içi sinyal iletim yollarını etkilemektedir (Tsimpili ve Zoidis, 2025). ABET'in insan vücudundaki biyolojik etkilerinin ve moleküler genetik düzeydeki rollerinin anlaşılması hem hücrel sinyal ağlarının aydınlatılması hem de çeşitli kanser türlerinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır (Calaf vd., 2022) (Şekil 2.4.).



Kaynak: Abcam, 2025

Molekül, arekolin türevi bir alkin ester ile p-toluen sülfonat (tosilat) grubunun birleşiminden oluşmakta ve bu yapı, M2 muskarinik asetilkolin reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanmasını sağlamaktadır.

Şekil 2.4. Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET) molekülünün kimyasal yapısı

ABET günümüzde klinik kullanımda onaylanmış bir ilaç değildir. Fakat Zhang ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada anestezi altındaki sıçanların beyincik korteksine ABET mikroenjeksiyonu yapılmış ve doz bağımlı olarak ortalama arteriyel basınç (MAP) ve kalp atış hızında (HR) azalma gözlemlenmiştir (C. Zhang vd., 2016).

ABET'in M2 reseptörünü aktive ederek hücre içi sinyal yollarındaki etkisi, kanser hücrelerinde proliferasyon ve hayatta kalma mekanizmalarını hedef alarak tümör gelişimini engellemesini sağlayabilir (Guerriero vd., 2023). M2 reseptör aktivasyonunun kanser hücrelerinde otofajiyi tetiklediği ve bu süreç üzerinden hücre ölümüne katkıda bulunduğu saptanmıştır (Guerriero vd., 2023). Glioblastoma kök hücrelerinde M2 agonistlerinin uyarılması, PI3K/Akt/mTORC1 yolunu inhibe edip AMP-aktive protein kinaz (AMPK) düzeylerini yükselterek otofajik akışı artırmakta ve nihayetinde apoptoza yol açmaktadır (Guerriero vd., 2023). Benzer şekilde, muskarinik M2 agonistlerinin mesane kanseri hücrelerinde proliferasyon ve invazyonu engelleyebildiği, glioma hücrelerinde ise yaşam süresini kısaltabildiği bildirilmiştir (Tsimpili ve Zoidis, 2025). Bu bulgular, ABET'in MAPK/ERK ve PI3K/Akt gibi hücre içi sinyal ağlarını hedef alarak çok çeşitli tümör tiplerinde antikarsinojenik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bilgiler ışığında ABET, kanser tedavisinde yeni bir terapötik aday olarak öne çıkmaktadır.

3. YÖNTEM

3.1. Araştırma Modeli

Bu çalışma dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olan ve çeşitli tedavi yöntemleri denenmesine rağmen tedavilerin oluşturduğu yan etkilerin sıkça görüldüğü ve ölüm oranlarının yüksek olduğu meme kanserinin tedavisine yönelik yeni moleküllerin kullanılabilirliğini araştırmak ve yeni tedavi yöntemleri oluşturabilmek amacıyla yapılmıştır.

3.2. Araştırma Evren ve Örneklemi/Araştırma Materyali

Çalışmada MCF-7 (ATCC Katalog Numarası: HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC Katalog Numarası: HTB-26) hücre hatları kullanılmıştır. Anti-karsinojenik etkiyi araştırmak için yapılan tüm deneyler en az 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır.

3.3. Veri Toplama Araçları

Çalışmanın verileri hücre kültürü çalışmaları, MTT, koloni formasyon ve sferoid formasyon analizleri, yara iyileşme deneyi, apoptoz oranının ölçüldüğü akış sitometrisi gibi moleküler analizler kullanılarak toplanmıştır.

3.4. Veri Toplama Süreci

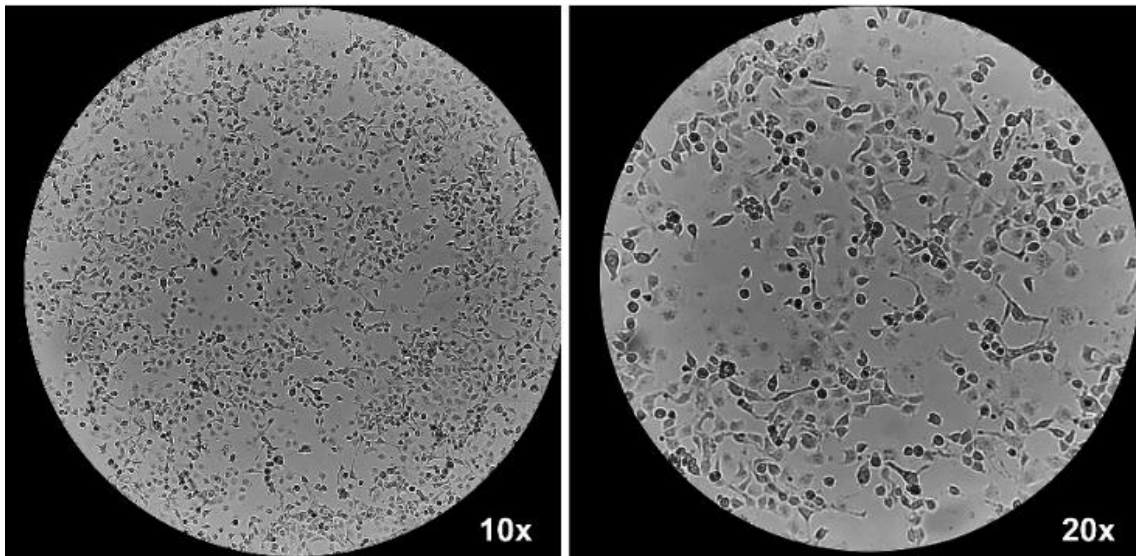
Çalışmada yapılan tüm deneylerde hücre kültürü çalışmalarının steril yürütülmesi ve koruyuculuk amacıyla laboratuvar önlüğü, eldiven gibi koruyucu ekipmanlar kullanılarak deneyler yürütülmüştür.

3.5. Deneysel Kurgu

In-silico Moleküler Yerleştirme (Docking) Analizi: ABET'in hedef reseptör proteinleriyle olası bağlanma etkileşimlerini tahmin edebilmek amacıyla, moleküler yerleştirme (docking) yaklaşımı uygulanmıştır. Bu kapsamda, ABET molekülüne ait SMILES formatı PubChem veri tabanından elde edilmiş ve yapısal modeli Open Babel programı kullanılarak .pdb dosyasına dönüştürülmüştür (O'Boyle vd., 2011). Muskarinik asetilkolin reseptörlerinin iki alt tipi olan M2 ve M4 reseptörlerine ait üç boyutlu protein yapıları, sırasıyla PDB ID: 4MQS (Kruse vd., 2013) ve PDB ID: 7TRS (Vuckovic vd., 2023) kodlarıyla RCSB Protein Data Bank'ten temin edilmiştir (Burley

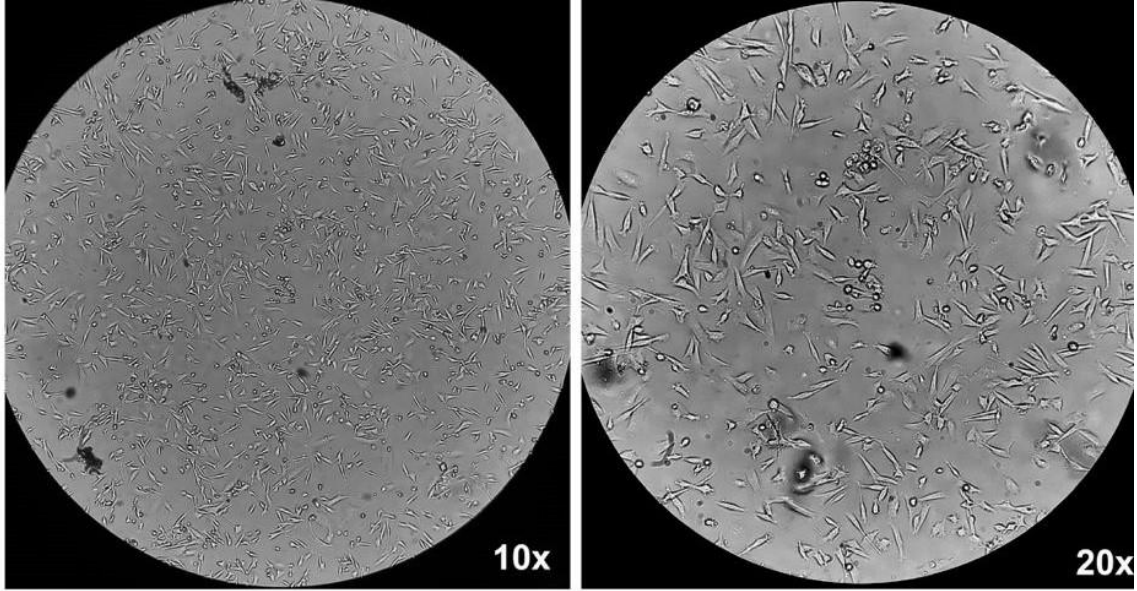
vd., 2023). Yerleştirme analizleri, bu proteinlerin aktif bölgelerine odaklanarak AutoDock Vina yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiş, analizler PyRx arayüzü üzerinden yürütülmüştür. M2 reseptörü için grid koordinatları $-1, -15, 18 \text{ \AA}$, M4 reseptörü için ise $109, 105, 112 \text{ \AA}$ olarak belirlenmiş ve her iki analizde de grid aralığı $0.375 \text{ \AA}$ olacak şekilde tanımlanmıştır. En düşük bağlanma enerjisine sahip yerleşim pozisyonu (docking pose) daha ileri analizler için seçilmiştir. Elde edilen bağlanma modelleri ve ligand-reseptör etkileşimleri PyMOL görselleştirme aracı ve ProteinsPlus platformu kullanılarak analiz edilmiştir (Fährrolfes vd., 2017).

Hücre Kültürü: Deneylerde kullanılacak olan MCF-7 (ATCC Katalog Numarası: HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC Katalog Numarası: HTB-26) hücre hatları %1 Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep; Kat. No: 15140-122, Gibco) ve %10 ısılyolla inaktive edilmiş fetal bovin serum (FBS; Kat. No: A4766801, Gibco) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Kat. No: D6429, Sigma) besiyeri kullanılarak %5 CO₂ içeren ve 37°C nemli inkübatör ortamında kültür edilerek çoğaltılmıştır. Kültür besiyerleri iki günde bir değiştirilerek pasaj işlemi hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında gerçekleştirilmiştir. Moleküler deneylerde kullanılacak olan hücreler toplanırken 0.25% Tripsin-EDTA (Kat. No: 25200056, Gibco) kullanılmıştır. Hücreler 0.4% Tripan Mavisi Solüsyonu (Kat. No: 15250661, Gibco) ve toma hücre sayım lamı (Kat. No: I.075.03.002.001, Isolab) ile sayılmıştır. Toplanan ve sayımı yapılan hücreler deneylerde üçer replika olacak şekilde ekilmiştir ve analizler en az iki kez tekrarlanmıştır.



Resim 3.1. MCF7 hücrelerinin mikroskop görüntüleri

Sol tarafta MCF7 hücrelerinin ışık mikroskobu ile 10X magnifikasyon altında alınan görüntüsü, sağ tarafta ise MCF7 hücrelerinin ışık mikroskobu ile 20X magnifikasyondaki görüntüsü gösterilmektedir.



Resim 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop görüntüleri

Sol tarafta MDA-MB-231 hücrelerinin ışık mikroskobu ile 10X magnifikasyon altında alınan görüntüsü, sağ tarafta ise MDA-MB-231 hücrelerinin ışık mikroskobu ile 20X magnifikasyondaki görüntüsü gösterilmektedir.

İlacın Hazırlanması: Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate (ABET) (Katalog Numarası: #AB141318-10MG) Abcam firmasından satın alınmıştır. İlacın hazırlanması sırasında üretici firmanın protokolü takip edilmiştir. Protokole göre ABET DMSO (Pan Biotechnology, #P60-36720100) içerisinde çözülerek 5 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan stok alikotlanarak -20°C 'de saklanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere stok ilaç çözeltisi kültür ortamı ile 0.00001 mM, 0.0001 mM, 0.001 mM, 0.01 mM ve 1 mM oranlarında seyreltilerek çalışma konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Canlılık ve IC50 Değerinin Belirlenmesi: MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında, yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC50) değerlerinin belirlenmesi ve hücre yaşamsallığını ölçmek amacıyla CellTiter 96® Non-Radioactive

Cell Proliferation Assay kiti (Promega, #G4000) kullanılmıştır. MTT testi hücre yaşamsallığını ölçmek amacıyla gerçekleştirilmektedir. MTT deneyinin temel prensibi yaşayan hücrelerin mitokondriyal aktivitesinin sürekliliğine dayanmaktadır. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi tetrazolyum tuzu MTT'nin formazan kristallerine dönüştürülmesi ile yansıtılır. Hücreler tarafından oluşturulan formazan kristalleri çözünebilir ve dolayısıyla formazan konsantrasyonunun ölçülmesi ile yaşayan hücre sayısındaki artış veya azalış tespit edilebilir. Formazan konsantrasyonu plaka okuyucu kullanılarak 570 ve 750 nm dalga boyunda elde edilen optik yoğunluk ile belirlenir (van Meerloo vd., 2011). Deneylerde, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları her bir kuyucukta 1×10^4 hücre içerecek ve üçer replika olacak şekilde ekilmiştir. 0.1 mL hacminde hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plakalara (Thermo Fisher Scientific) ekilerek 24 saat hücrelerin tutunmaları sağlanmıştır. 24 saatlik tutunmanın ardından belirtilen 0.00001 mM, 0.0001 mM, 0.001 mM, 0.01 mM ve 1 mM ABET konsantrasyonları, vehicle kontrolü (kültür ortamında %10 DMSO) ve tedavisiz kontrol (yalnızca kültür ortamı) grupları olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından kit içerisindeki MTT boyası (#PartG402A, Promega) her kuyucukta 15 µl olacak şekilde eklenerek 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kit içerisinde bulunan "solubilization solution/stop mix" (#PartG401A, Promega) her kuyuya 100 µl olacak şekilde eklenerek formazan kristali oluşumu durdurulmuştur. Ardından hücreler gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Gece boyu inkübasyonun ardından SpectraMax®i3 (Molecular Devices) cihazı kullanılarak 570/750 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler, R yazılımı (v4.3.2) ve "drc" paketi kullanılarak analiz edilmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Grafiksel sunumlar ise "ggplot2" paketi yardımıyla oluşturulmuştur. Belirlenen IC₅₀ değerleri, ileri aşamada gerçekleştirilen işlevsel deneylerde referans olarak kullanılmıştır.

Koloni Oluşturma Testi (CFA): CFA hücrelerin tek bir hücreden bir topluluğu oluşturma özelliğini inceleyerek yaşamsallığını test eden in-vitro bir yöntemdir (Franken vd., 2006). Bu deneyde ABET'in MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşturma yeteneğini nasıl etkilediğini değerlendirmek için CFA testi yapılmıştır. Çalışmada, her bir 96 kuyulu plaka kuyusuna 2×10^3 hücre eklenmiş ve hücreler, ABET'in $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} ve $2 \times IC_{50}$ konsantrasyonlarıyla işleme tabi tutulmuştur. Kontrol grubu için sadece standart kültür ortamı kullanılmıştır. Kontrol hücrelerinin yaklaşık

%80 yoğunluğa ulaşması sonrasında deney sonlandırılmıştır. Hücreler 20 dakika boyunca oda sıcaklığında 0.15 mL %100 metanol (Merck, #1.06009.2511) ile sabitlenmiş, ardından 0.1 mL %0,2 kristal violet çözeltisi (Sigma, #C077) ile 15 dakika boyunca boyanmıştır. Boyama işlemini takiben, kuyular iki defa deiyonize su ile yıkanarak temizlenmiş ve plakalar oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakılmıştır. 50 hücreden fazla içeren koloni yapıları, mikroskopta 4× büyütme oranı ile görüntülenmiş ve sayısal analizler ImageJ yazılımı (v1.8.0) üzerinden, ColonyCounter eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yara İyileştirme Deneyi (WHA): Yara iyileştirme deneyi hücre migrasyonunu test etmek için yaygın olarak kullanılan standart bir yöntemdir (Pastar vd., 2018). WHA testi ABET'in hücre göçü üzerine olan etkisini incelemek amacıyla uygulandı. Her iki hücre hattı için 24 kuyucuklu plakalara (Thermo Fisher Scientific) bir kuyucukta 1×10^5 hücre üçer replika olacak şekilde ekildi ve hücreler tam yoğunluğa ulaşana kadar kültür ortamında inkübe edildi. Konfluansa ulaşan hücre tabakasında 200µl pipet ucu ile dikey olarak çizilerek homojen yaralar oluşturuldu. Çizim işlemini takiben, hücreler IC₅₀ konsantrasyonundaki ABET içeren ortamla ve ABET içermeyen tedavisiz kontrol ortamı ile muamele edildi. Yara bölgesinin oluşturulmasının ardından 0., 6. ve 24. saatlerde faz-kontrast mikroskobu kullanılarak oluşturulan çiziklerin görüntüleri alındı. Elde edilen görüntüler, ImageJ yazılımında yer alan MRI Wound Healing eklentisi kullanılarak analiz edildi ve 6. ile 24. saatlerdeki yara kapanma oranları, başlangıçtaki yara alanına (0. saat %100 kabul edilerek) göre normalize edilerek hesaplandı.

Soft Agar Testi ile Sferoid Oluşumunun Analizi: Transforme hücrelerin yüzeyden bağımsız olarak çoğalma yeteneği karsinogenezin temel bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Borowicz vd., 2014). Hücrelerin yüzeye tutunmadan da çoğalıp çoğalamayacağını anlamak için soft agar yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle, önce alt katman 900µl DMEM ve 100µl %0,5 agar (Sigma, #A1296-500G) 9:1 (v/v) oranında ısı bloklayıcı (Thermofisher Scientific) kullanılarak 70°C'de karıştırılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan karışım 12 kuyucuklu kültür plaklarına (Thermo Fisher Scientific) dökülerek oda sıcaklığında yaklaşık yarım saat inkübe edilmiştir. Katılacak bu tabakanın üzerine, her bir kuyuya 12.000 hücre düşecek şekilde yine %0,5 oranında agar ve hücre kültürü medyumunu karışımı içinde hazırlanan hücre süspansiyonu eklenmiştir. Üst tabakanın katılmasının ardından her kuyunun üzerine 0.8 mL

hacminde IC50 oranında ABET içeren karışım deney grubu hücreleri olacak şekilde ve ABET içermeyen DMEM kontrol grubu olacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. Her bir grup için üçer replika yapılmıştır. Hücreler, 21 gün boyunca uygun koşullarda inkübe edilmiş ve bu süreçte besiyerleri (kontrol veya ilaç içeren) haftada iki kez tazelenmiştir. Süre sonunda oluşan hücre kümeleri (sferoid yapılar), mikroskopta 4x büyütme ile görüntülenmiş ve boyutları ImageJ 1.52v yazılımı kullanılarak ölçülmüştür.

Apoptoz Oranının Tespiti: Bu deneyde ABET'in MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin apoptozunu nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Hücrelerde apoptozun değerlendirilmesi için Alexa Fluor®488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kiti (Thermo Fisher Scientific, #Kat. No: V13242) kullanılarak akım sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Anneksin V boyama hücrelerin apoptoza uğrama durumunu floresan işaretli boyalar ile tespit etmeye yarayan in-vitro bir yöntemdir (Lakshmanan ve Batra, 2013). Normal fizyolojik koşullarda hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin fosfolipitleri apoptoz sinyali ile hücre membranının dışına taşınır. Hücre dışına taşınan fosfatidil serin molekülleri Anneksin V tarafından tespit edilir. Nekroz veya apoptoz dışı hücre ölümleri ise kit içerisinde bulunan ve hücre dışına sızan DNA içeriğine bağlanan PI boyası ile tespit edilir.

MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri her bir kuyuya 1ml 1×10^5 hücre ve üçer replika olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara (Thermo Fisher Scientific) eklenmiş ve tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler IC50 konsantrasyonunda ABET içeren medyum (deney grubu) ve ABET içermeyen medyum (kontrol grubu) ile muamele edilmiştir. Uygulamadan 24 saat sonra hücreler 1ml soğuk PBS (Kat. No: 003002, Gibco) ile toplanmış ve santrifüj işlemiyle pelet haline getirilmiştir. Elde edilen hücre peletleri 100µl 1X Annexin bağlama tamponu ("annexin-binding buffer") içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve her örneğe 5 µL Alexa Fluor®488 işaretli Annexin V ile 1 µL 100 µg/mL propidium iyodür olacak şekilde PI solüsyonu (working solution) ilave edilmiştir. Boyama işlemi, oda sıcaklığında ve ışık almayan bir ortamda 15 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası, 400 µL 1X anneksin bağlama solüsyonu hücreler üzerine eklenerek örnekler BD Accuri™ C6 Plus akım sitometresi ile analiz edilmiştir. Apoptozda olan hücreler, Annexin V pozitif olup PI negatif olanlar (erken apoptoz) ve her iki boyaya da pozitif tepki verenler (geç apoptoz) olarak sınıflandırılmıştır.

Hücre Proliferasyonu Testi: EdU boyama, 2008 yılında Salic ve diğerleri tarafından geliştirilen ve yeni sentezlenen DNA'nın işaretlenmesi için kullanılan in-vitro bir tekniktir (Salic ve Mitchison, 2008). Bu tekniğe göre, 5-etinil-2'-deoksiuridin (EdU) yeni sentezlenen timidin analoglarıyla “click” kimyasal reaksiyonu gerçekleştirir ve floresan işaretli boyaların kullanımı ile bunların tespitine imkân verir. ABET'in MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalma kapasiteleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Click-IT™ EdU Hücre Proliferasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, #C10337) kullanılarak deneysel analiz gerçekleştirilmiştir.

Deney için 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 1×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve tutunmaları için 24 saatlik inkübasyon uygulanmıştır. Inkübasyonun ardından IC50 oranında ABET içeren medyum ve kontrol grubu olarak sadece standart kültür ortamı içeren medyum ile değiştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerdeki DNA sentezini incelemek amacıyla son konsantrasyonu $10 \mu\text{M}$ EdU olacak şekilde $1 \mu\text{l}$ EdU hücrelere eklenerek hücreler 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında hücreler toplanarak 3 ml 1% BSA (Kat. No: BSA-1s, Capricorn) içeren PBS ile yıkanmış ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant atılıp kalan pellet $100 \mu\text{L}$ “Click-iT® fixative” fiksativi kullanılarak 15 dakika oda sıcaklığında ışısız ortamda inkübe edilmiştir. 15 dakikalık inkübasyonun sonrasında hücreler 3 ml %1 BSA içeren PBS ile yıkanarak aynı koşullarda tekrar santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılarak hücreler $100 \mu\text{L}$ 1X “Click-iT® saponin-based permeabilization and wash reagent” isimli saponin-bazlı permeabilizasyon ve yıkama ajanı içerisinde süspanse edilerek tekrar 15 dakika ışısız ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından üretici protokolü takip edilerek $500 \mu\text{L}$ Click-iT® reaksiyon kokteyli hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon kokteyli hücrelerin bulunduğu tüplere eklenmiştir ve 30 dakika inkübe edilmiştir. Inkübe edilen hücreler 3 ml %1 BSA içeren PBS ile tekrar yıkanarak aynı koşullarda santrifüjlenmiştir. Bu sürecin ardından hücreler sabitlenmiş, zar geçirgenliği sağlanarak boyamaya uygun hale getirilmiş ve Alexa Fluor®488 ile işaretli azid molekülü ile reaksiyona sokulmuştur. Hücre çekirdekleri aynı zamanda DAPI ile kontrast boyamaya tabi tutulmuştur. Mikroskopik görüntüleme Nikon Eclipse Ts2 cihazı ile gerçekleştirilmiş, elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. EdU ile işaretlenmiş (EdU^+) hücreler çoğalan hücreleri, DAPI^+ hücreler ise toplam hücre popülasyonunu temsil

edecek şekilde sayılmış; proliferasyon oranı, $(\text{EdU}^+ \text{ hücre sayısı} / \text{DAPI}^+ \text{ hücre sayısı}) \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır.

Gen Ekspresyonu Analizi: ABET uygulamasının hücrelerde oluşturduğu transkripsiyonel değişimleri değerlendirmek için kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Bu deney için kullanılan gen belirteçleri Tablo 3.2’de özetlenmiştir. Deney kapsamında, her bir kuyuya 3×10^5 hücre gelecek şekilde 6 kuyucuklu kültür plaklarına hücreler yerleştirilmiş ve ardından 24 saat süreyle IC50 düzeyinde ABET içeren ortamla ya da sadece kontrol kültür ortamı ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler lizize edilerek toplam RNA, NucleoSpin RNA Plus kiti yardımıyla izole edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin bütünlüğü %1 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş, konsantrasyonları ve saflıkları ise NanoPhotometer® N50 (IMPLEN) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra M-MuLV Reverse Transcriptase enzimi ile RNA’lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin ifade düzeyleri, literatürde tanımlanmış primer dizileri kullanılarak SYBR Green temelli qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışmada incelenen genler arasında hücre döngüsü ve proliferasyonla ilişkili *CCND1*, *CDK6* ve *MKI67* yer almış; bu genlerin relatif ifade düzeyleri, referans gen olarak seçilen *GAPDH*’ye normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. qRT-PCR deneylerinde kullanılan gen belirteçleri

Belirteç İsmi	Sekans Bilgisi
BAX İleri	5'-CAAACCTGGTGCTCAAGGCCC
BAX Geri	5'-GGGCGTCCCAAAGTAGGAGA
BCL2 İleri	5'-CTGGTGGACAACATCGCCCT
BCL2 Geri	5'-TCTTCAGAGACAGCCAGGAGAAAT
BIRC5 İleri	5'-CCGTTGCGCTTTCCTTTC
BIRC5 Geri	5'-CGCACTTCTCTCCGCAGTTTC
Akt İleri	5'-CAACTTCTCTGTGGCGCAGTG
Akt Geri	5'-GACAGGTGGAAGAACAGCTCG
PUMA İleri	5'-GACCTCAACGCACAGTACGAG
PUMA Geri	5'-AGGAGTCCCATGATGAGATTGT
CCND1 İleri	5'-TGAAGGAGACCATCCCCCTG
CCND1 Geri	5'-TGTTCAATGAAATCGTGCGG
CCNE1 İleri	5'-AAATGGCCAAAATCGACAGG
CCNE1 Geri	5'-CGAGGCTTGACGTTGAGTT
CDK4 İleri	5'-CTGTGCCACATCCCGAACTG
CDK4 Geri	5'-GCCTCTTAGAAACTGGCGCA
CDK6 İleri	5'-CCGAAGTCTTGCTCCAGTCC
CDK6 Geri	5'-GGGAGTCCAATCACGTCCAA
CDKN1A İleri	5'-TACCCTTGTGCCTCGCTCAG
CDKN1A Geri	5'-GGCGGATTAGGGCTTCCTCT
CDKN1B İleri	5'-AGACTGATCCGTCGGACAGC
CDKN1B Geri	5'-CACAGAACCGGCATTTGGG
GADD45A İleri	5'-GATGCCCTGGAGGAAGTGCT
GADD45A Geri	5'-GATGCCCTGGAGGAAGTGCT
TP53 İleri	5'-GCGTGTTTGTGCCTGTCCTG
TP53 Geri	5'-TGGTTTCTTCTTTGGCTGGG
DNMT1 İleri	5'-AGAACGCCTTTAAGCGCCG
DNMT1 Geri	5'-CCGTCCACTGCCACCAAAT
MKI67 İleri	5'-TGTGCCTGCTCGACCCTACA
MKI67 Geri	5'-TGAAATAGCGATGTGACATGTGCT
PCNA İleri	5'-TTTGGTGCAGCTCACCTG
PCNA Geri	5'-CGCGTTATCTTCGGCCCTTA
ATM İleri	5'-GGTATAGAAAAGCACCAGTCCAGTATTG
ATM Geri	5'-GGTATAGAAAAGCACCAGTCCAGTATTG
BRCA1 İleri	5'-GCATGCTGAAACTTCTCAACCA
BRCA1 Geri	5'-GTGTCAAGCTGAAAAGCACAAATGA
BRCA2 İleri	5'-AGACTGTACTTCAGGGCCGTACA
BRCA2 Geri	5'-GGCTGAGACAGGTGTGGAAACA
MP9 İleri	5'-CCTTGTGCTCTTCCCTGGAG
MP9 Geri	5'-GGCCCCAGAGATTTCGACTC
GAPDH İleri	5'-GCAAATTCCATGGCACCGT
GAPDH Geri	5'-TCGCCCCACTTGATTTTGG

3.6. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiş ve çiftler arası karşılaştırmalar Student t-testi ($p < 0,05$) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler “rstatix” paketi kullanılarak R (v4.3.2)'de gerçekleştirilmiştir.

3.7. Etik Onay

Bu çalışma için etik kurul onayına ihtiyaç duyulmamıştır.

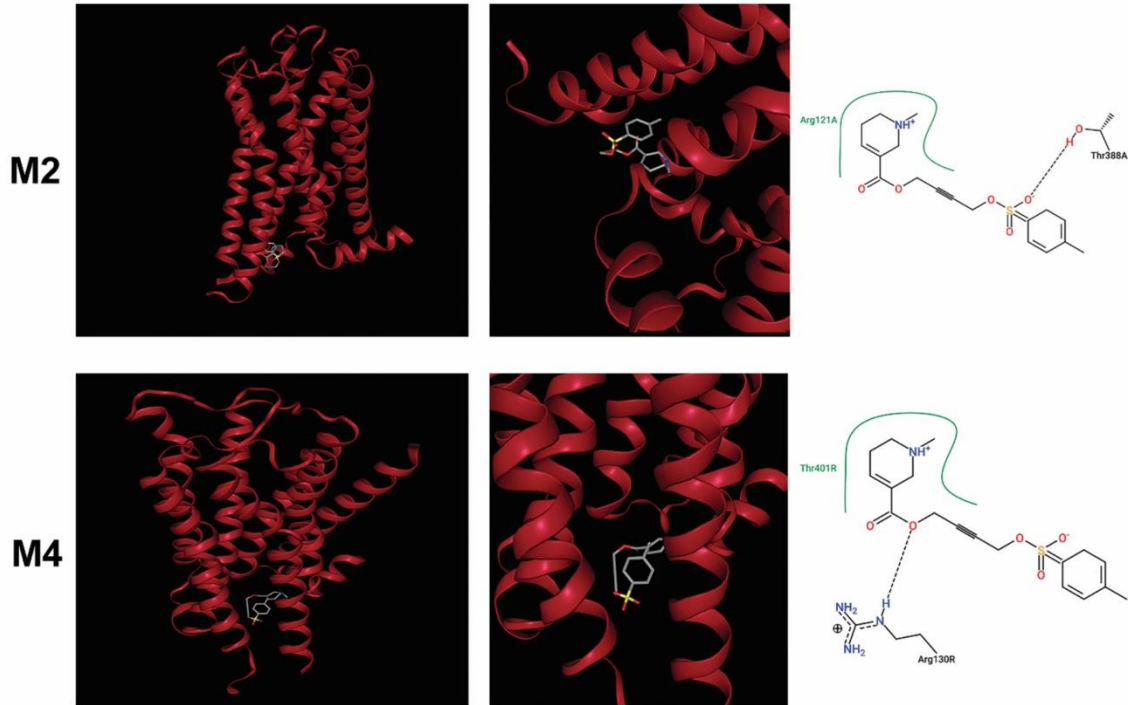
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışma ABET'in BC hücre hatları üzerinde anti-karsinojenik etki gösterdiğini raporlamıştır. ABET ve kanser ilişkisi ile ilgili kısıtlı çalışmaların varlığı ve ABET'in daha önce BC üzerinde anti-karsinojenik etkisini gösteren çalışmaların olmaması bu çalışmanın özgün tarafını oluşturmaktadır. Buna karşın çalışmanın bazı sınırlılıkları mevcuttur. Kontrol grubu olarak kullanılabilecek sağlıklı meme kanseri hücre hatlarının çalışmada bulunmaması başlıca sınırlılıklardan biridir. Öte yandan ABET'in yarattığı anti-karsinojenik etkinin spesifik olarak izlediği yol bilinmemektedir ve ABET'in bu etkilerini kanıtlayabilecek in-vivo bir çalışma yapılmamıştır. In-vivo çalışmaların olmaması nedeniyle ABET'in biyoaktivitesi hakkında fikir sahibi olunamamıştır.

4. BULGULAR

4.1. ABET'in M2 ve M4 Reseptörlerine Bağlanma Potansiyeli In-silico Moleküler Yerleştirme Analizi ile Ortaya Konmuştur

ABET'in hücresel etkilerinin ardında yatan moleküler mekanizmaları daha iyi anlayabilmek amacıyla, bu bileşiğin muskarinik asetilkolin reseptörleriyle olan etkileşimi in-silico moleküler yerleştirme (docking) analizleriyle incelenmiştir. ABET'in literatürde farklı hücre tiplerinde M2 reseptörü üzerinde agonistik etkiler gösterdiği ve kolinomimetik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, hedeflediği reseptörlerle etkileşim mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, ilk olarak ABET'in M2 reseptörü ile doğrudan bağ kurup kuramayacağı sanal moleküler yerleştirme yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Buna ek olarak, M2 ve M4 alt tipleri yapısal benzerlikler taşıdığı ve benzer hücresel sinyal yollarını aktive ettikleri için, ABET'in M4 reseptörü ile de olası bağlanma potansiyeli değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).

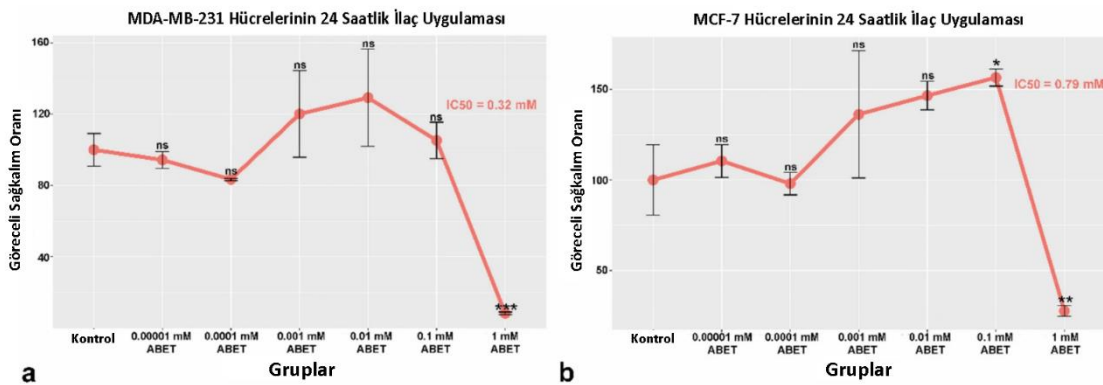


Şekil 4.1. ABET'in M2 ve M4 muskarinik asetilkolin reseptörlerine bağlanma konfirmasyonlarının in-silico moleküler yerleştirme ile modellenmesi

ABET molekülü ile M2 ve M4 muskarinik asetilkolin reseptörleri arasındaki olası etkileşimleri gösteren moleküler yerleştirme simülasyonları Üst panelde, ABET'in M2 reseptörüne bağlanma konumları ve etkileşim biçimleri yer almaktadır. Alt panelde ise benzer simülasyonlar M4 reseptörü için gösterilmiştir. Sol taraftaki görseller, ABET ile reseptörlerin üç boyutlu bağlanma modellerini genel hatlarıyla ortaya koymaktadır. Orta panel, sol panelde gösterilen bağlanma bölgesinin yakınlaştırılmış (zoom) versiyonunu sunarak ligand-reseptör etkileşimlerini daha ayrıntılı biçimde yansıtmaktadır. Sağ panelde ise, ilgili reseptörlerle ABET arasında oluşan bağ türleri, anahtar etkileşim noktaları ve amino asit kalıntılarına dayalı etkileşim haritaları verilmiştir.

4.2. ABET, BC Hücre Canlılığını Önemli Ölçüde Azalttı ve Doza Bağlı Sitotoksisiteye Neden Oldu

MTT analizi ABET'in MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında doza bağlı olarak sitotoksik etkisini ortaya koymak için yapılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde maksimum ABET konsantrasyonu (1mM) hücre canlılığını %9'a ($p < 0.001$) düşürürken (Şekil 4.2A); MCF7 hücrelerinde %24'e ($p < 0.01$) düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.2B). Kullanılan diğer konsantrasyonlarda ise (0.00001 mM, 0.0001 mM, 0.001 mM, 0.01 mM) hücre canlılığı çeşitli oranlarda etkilenmiş olsa da bu değişim istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda, MDA-MB-231 hücre hattı için yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değeri 0.32 mM, MCF-7 hücre hattı için ise 0.79 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. ABET uygulaması üzerine MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinin yaşamsallığı ve IC_{50} değerleri

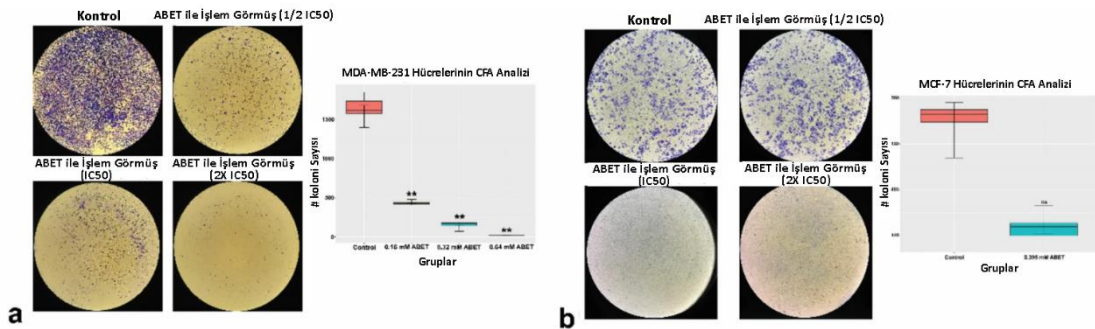
ABET uygulamasının meme kanseri hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkilerini gösteren grafikler sunulmuştur. (a) MDA-MB-231 hücrelerinin, (b) ise MCF-7 hücrelerinin ABET'e maruz kaldıktan sonraki hayatta kalma yüzdeleri verilmiştir.

Farklı ABET konsantrasyonlarında gözlenen canlılık değişimleri, doz bağımlı sitotoksik etkinin varlığını ortaya koymaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ***p <0.001; **p <0.01; *p <0.05; ns: anlamsız (non-significant). IC₅₀: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyon. ABET: Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate

4.3. ABET Koloni Oluşumunu Doza Bağlı Olarak İnhibe Etti

ABET uygulamasının BC hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, IC₅₀ değeri belirlendikten sonra koloni formasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Koloni formasyon analizi sonuçları, ABET'in hücresel çoğalma kapasitesini doza bağımlı biçimde baskıladığını ortaya koymuştur (Şekil 4.3). MDA-MB-231 hücre hattında, 0.16 mM (½ IC₅₀) ABET uygulaması sonucunda koloni sayısında yaklaşık 3.9 katlık bir azalma meydana gelmiş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p <0.01). Dozun IC₅₀ seviyesine çıkarılmasıyla (0.32 mM) koloni sayısında yaklaşık 10.6 katlık bir azalma gözlenmiş; konsantrasyonun iki katına (0.64 mM) yükseltilmesiyle bu oran yaklaşık 87 kata ulaşmıştır (p <0.01) (Şekil 4.3.A). Bu bulgular, ABET'in özellikle yüksek dozlarında hücrelerin uzun vadeli yaşama ve koloni oluşturma kapasitelerini belirgin şekilde engellediğini göstermektedir.

Diğer bir meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de ise, IC₅₀ (0.79 mM) ve 2× IC₅₀ (1.58 mM) konsantrasyonlarında ABET uygulaması sonucunda koloni oluşumunun tamamen durduğu saptanmıştır. Ancak ½ IC₅₀ (0.395 mM) düzeyindeki uygulamada koloni sayısında gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir (Şekil 4.3.B). Bu sonuçlar, ABET'in MCF-7 hücreleri üzerinde de güçlü antiproliferatif etkilere sahip olduğunu, ancak bu etkinin anlamlı düzeye ulaşmasının daha yüksek dozlarda gerçekleştiğini düşündürmektedir.

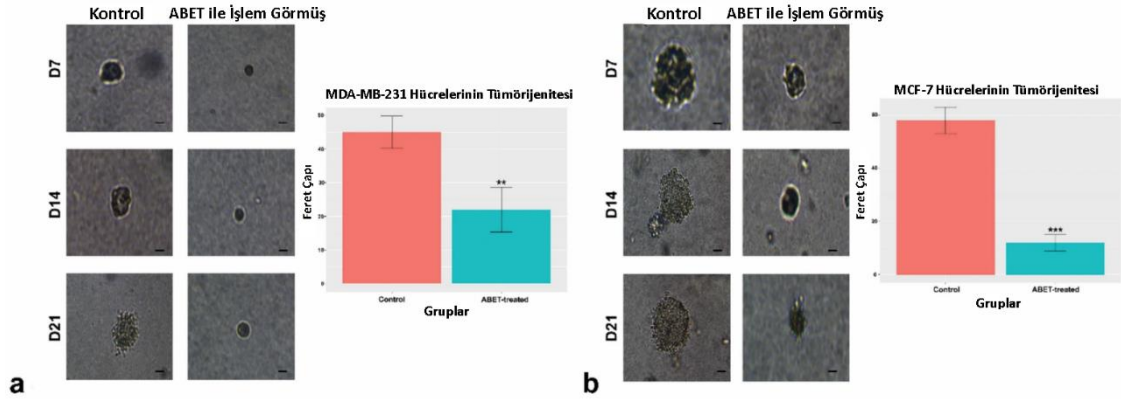


Şekil 4.3. ABET, BC hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur

ABET uygulaması, meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesini belirgin şekilde azaltmıştır. (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine ABET'in etkileri gösterilmektedir. Her iki hücre hattında da ABET, koloni oluşumunu doza bağlı olarak baskılamıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: $p < 0.01$; ns: anlamsız (non-significant). IC_{50} değerleri, MDA-MB-231 için 0.32 mM, MCF-7 için ise 0.79 mM olarak belirlenmiştir. ABET: Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate. Mikroskopik görüntüler 4X büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu: 50 μm

4.4. ABET Ankraj Bağımsız Hücre Proliferasyonunu Baskılamıştır

ABET'in, hücrelerin yüzey tutunmasına ihtiyaç duymaksızın çoğalma kapasitesini ne ölçüde etkilediğini değerlendirebilmek için yumuşak agar (soft agar) yöntemi uygulanmıştır. (Şekil 4.4.). Bu teknik, özellikle kanser hücrelerinin in vitro ortamda ankrajdan bağımsız büyüme yeteneğini ölçmek için kullanılan bir yaklaşımdır ve tümör hücrelerinin transformasyon düzeyini doğrudan yansıtır. Uygulanan deneylerde, ABET'in bu bağlamda proliferasyonu baskılayıcı etkilerinin belirgin şekilde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinden oluşan sferoit yapılar incelendiğinde, kontrol grubunda ortalama Feret çapı 45 mikrometre iken, ABET ile muamele edilen hücrelerde bu değer anlamlı biçimde 22 mikrometreye kadar düşmüştür ve bu yaklaşık iki kat küçülmeye karşılık gelmektedir ($p < 0.01$) (Şekil 4.4.A) MCF-7 hücre hattında ise bu etki çok daha dramatik bir şekilde gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ortalama 58 mikrometre olarak ölçülen sferoit çapı, ABET uygulaması sonrası 12 mikrometreye düşmüştür. Bu yaklaşık 4.8 katlık küçülme istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$) (Şekil 4.4.B). Bu sonuçlar, ABET'in yalnızca koloni oluşturma gibi yapışma temelli proliferatif özellikleri değil, aynı zamanda hücrelerin matrikse bağımlı olmaksızın çoğalma ve hacim kazanma yeteneklerini de etkili biçimde baskıladığını ortaya koymaktadır. Söz konusu bulgular, ABET'in tümör hücrelerinin agresif fenotipine karşı güçlü bir inhibitör potansiyele sahip olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.4. ABET'in BC hücrelerinde ankraj bağımsız hücre proliferasyonunun etkisi

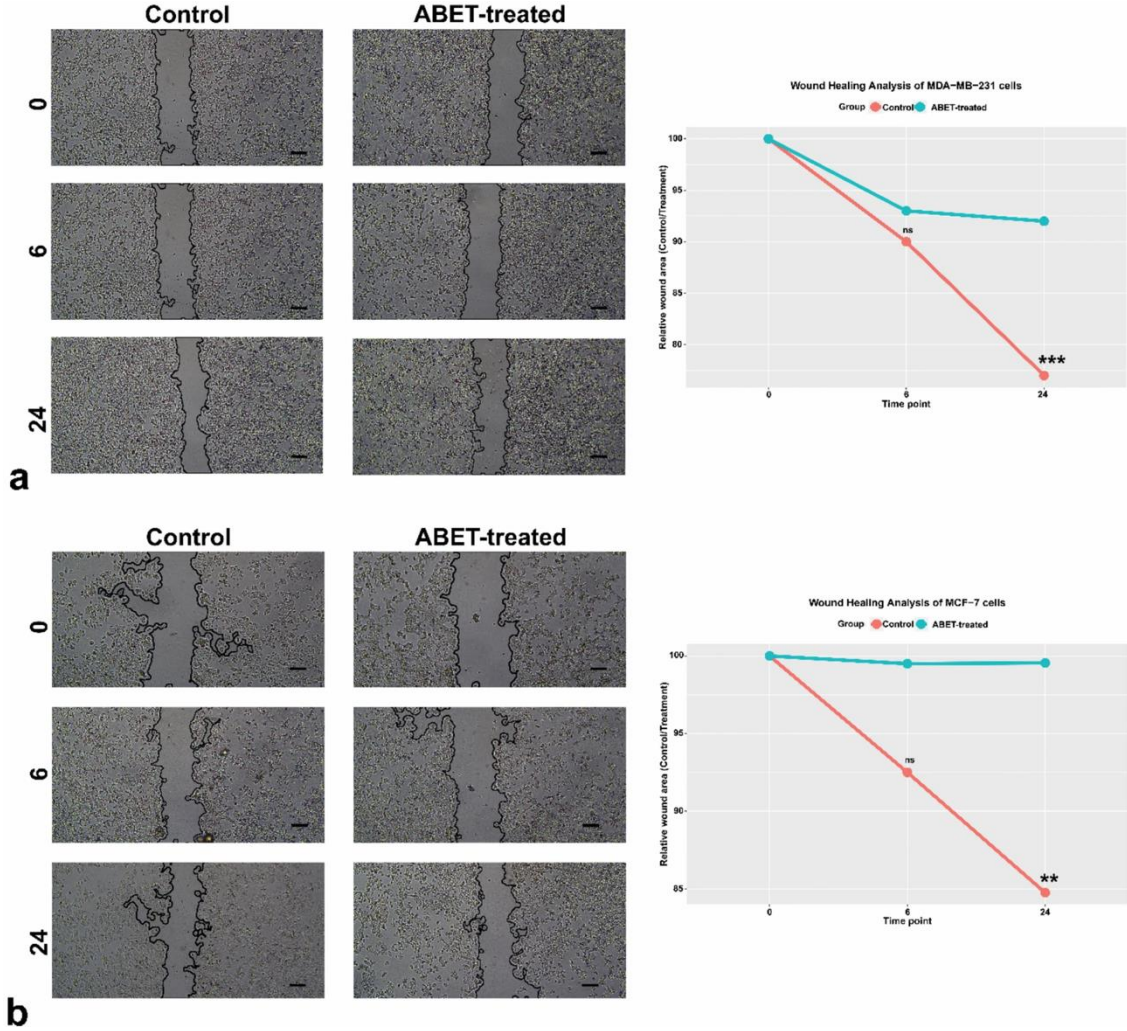
ABET uygulaması, meme kanseri hücrelerinin ankrajdan bağımsız büyüme yeteneğini anlamlı düzeyde azaltmıştır. (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-7 hücrelerinin kontrol ve ABET ile muamele edilmiş gruplarında oluşan sferoit yapılar gösterilmektedir. ABET tedavisi, her iki hücre hattında da sferoit çapında belirgin küçülmelere yol açmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. D: gün. ABET (Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate), MDA-MB-231 hücreleri için 0.79 mM, MCF-7 hücreleri için 0.32 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır. Mikroskopik görüntüler 20X büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu: 50 μ m

4.5. ABET BC Hücrelerinde Migrasyon Kapasitesini Kısıtlamıştır

ABET'in tümör hücrelerinde gözlenen baskılayıcı etkileri doğrultusunda, bu bileşiğin hücre göçü üzerine olan etkisini değerlendirmek üzere yara iyileşme (wound healing) analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, ABET uygulamasının hücrelerin migrasyon kapasitesini sınırladığını ortaya koymuştur (Şekil 4.5.). MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubuna ait hücreler, çizik oluşturulduktan sonraki 6. saatte yara alanının yaklaşık %10'unu kapatmıştır fakat bu değer istatistiksel anlamda anlamlı bulunmamıştır. 24. saat sonunda kapanma oranı %23'e ulaşarak anlamlı düzeye ulaşmıştır ($p < 0.001$). Buna karşın, ABET ile muamele edilen MDA-MB-231 hücreleri aynı sürelerde sırasıyla %8 (6. saat) ve %9 (24. saat) kapanma göstermiştir; her iki ölçümde de istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 4.5.A).

MCF-7 hücrelerinde de benzer bir eğilim gözlenmiştir. Kontrol grubundaki hücreler 6. saatte %8 oranında yara kapanması gösterirken bu oran istatistiksel olarak anlam ifade etmemiştir. Ancak 24. saatte yara alanının %16'sının kapanması anlamlı

bulunmuştur ($p < 0.01$). ABET ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde ise hem 6. hem de 24. saat sonrasında yara alanındaki kapanma oranı %1'in altında kalmış ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır (Şekil 4.5.B).

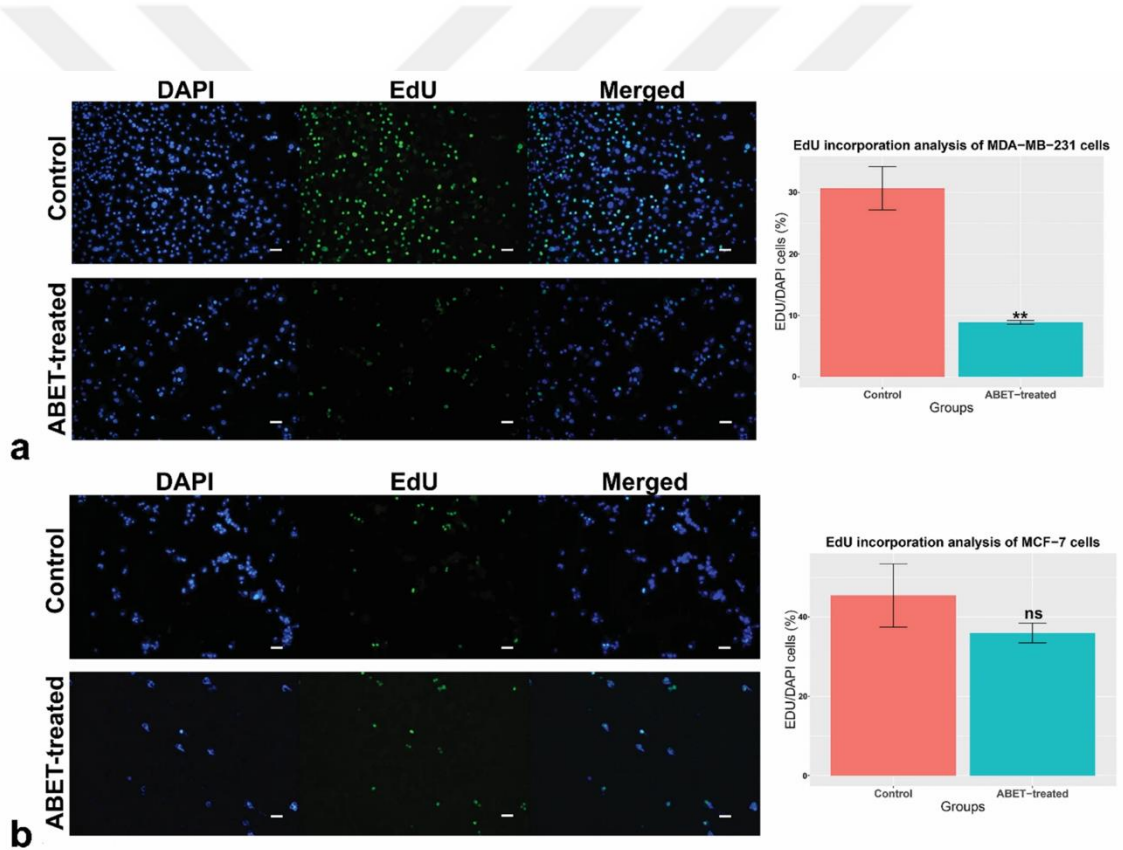


Şekil 4.5. ABET uygulaması sonrası BC hücrelerinde yara iyileşme analizi sonuçları

ABET tedavisi, meme kanseri hücrelerinin göç yeteneğini baskılamıştır (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-7 hücrelerinde, yara iyileşme analizi ile değerlendirilen yara kapanma oranları sunulmaktadır. ABET uygulanan gruplarda yara alanının kapanması kontrol gruplarına kıyasla azalmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ns: anlamsız (non-significant). ABET (Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate), MDA-MB-231 hücrelerinde 0.79 mM, MCF-7 hücrelerinde ise 0.32 mM konsantrasyonunda uygulanmıştır. Mikroskopik görüntüler 4X büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

4.6. BC Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerinde ABET'in Etkisinin İncelenmesi

Elde edilen önceki bulgular doğrultusunda, ABET'in hücre çoğalması (proliferasyon) üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı biçimde incelemek amacıyla EdU inkorporasyon analizi gerçekleştirilmiştir. EdU testi BC hücrelerini ABET ile muamele ettikten sonra proliferasyonun ne ölçüde değiştiğini incelemek amacıyla yapılmıştır (Şekil 4.6.). EdU sonuçları MDA-MB-231 hücre hattında meydana gelen proliferasyonun yaklaşık 3,5 kat azaldığını göstermiştir (Şekil 4.6.A). MDA-MB-231 hücrelerindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Öte yandan, MCF-7 hücrelerinde proliferasyonda yalnızca 1.2 katlık bir azalma gözlenmiştir. Fakat MCF-7 hücrelerinde meydana gelen bu fark anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır (Şekil 4.6.B).



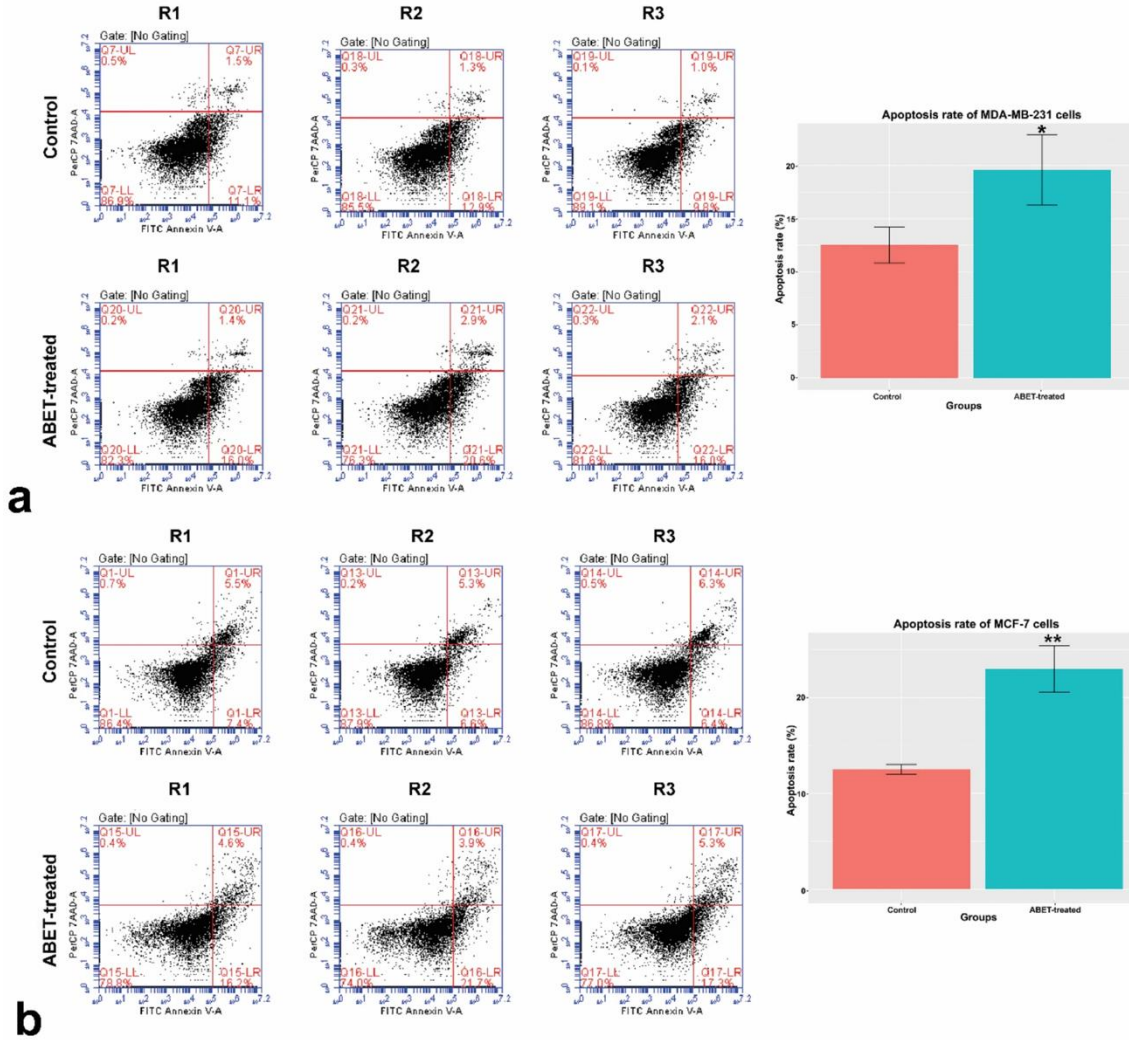
Şekil 4.6. ABET uygulaması sonrası MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde EdU proliferasyon analizi sonuçları

ABET tedavisi, meme kanseri hücrelerinden MDA-MB-231 hücre hattının proliferasyonunu anlamlı şekilde baskılamıştır. (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-7 hücrelerinde, EdU ile değerlendirilen proliferasyon oranları gösterilmektedir. ABET uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon oranı kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde azalmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ** $p < 0.01$, ns: anlamsız

(non-significant). ABET (Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate), MDA-MB-231 hücrelerinde 0.79 mM, MCF-7 hücrelerinde ise 0.32 mM konsantrasyonunda uygulanmıştır. Mikroskopik görüntüler 20X büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu: 50 μ m

4.7. BC Hücrelerinde ABET'in Neden Olduğu Apoptozun Tayini

ABET'in MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında apoptoza neden olup olmayacağını görmek üzere Anneksin-V-PI boyaması apoptoz tayini testinde kullanılmıştır. Gerçekleştirilen analiz sonucunda her iki hücre hattında da apoptotik hücre oranında artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.). ABET uygulaması sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik hücre oranında 1.6 kat artış olduğunu gözlemlenmiştir. ($p < 0.05$) (Şekil 4.7.A). MCF-7 hücrelerinde ise bu artış daha belirgindir; apoptotik hücre oranı yaklaşık 1.9 kat artış göstermiştir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Şekil 4.7.B). Bu veriler, ABET'in MDA-MB-231 hücre hattında proliferasyonu baskıladığı ve her iki hücre hattında da apoptozu indüklediğini, ayrıca MCF-7 hücrelerinin ABET'e karşı apoptotik yanıt açısından daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir.

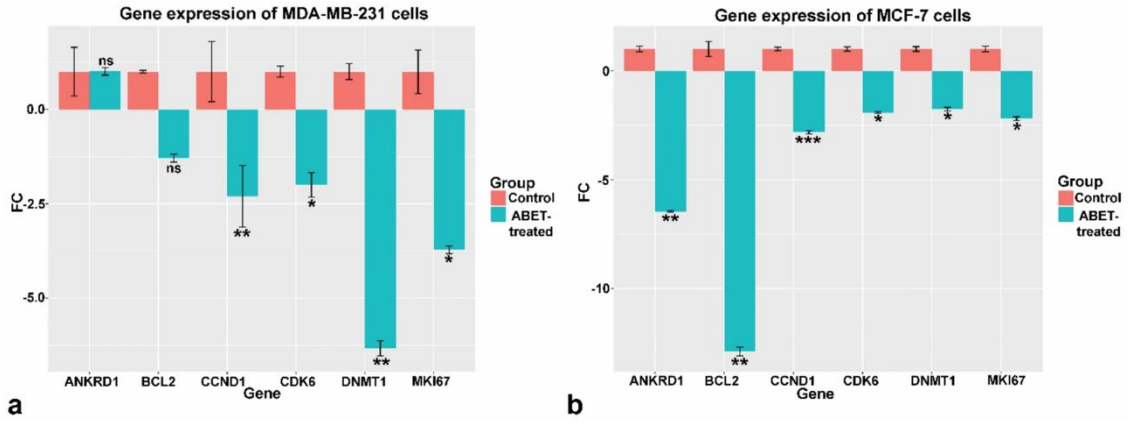


Şekil 4.7. ABET'in apoptoz üzerindeki etkilerinin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde değerlendirilmesi

ABET uygulaması, meme kanseri hücrelerinde apoptoz sürecini anlamlı düzeyde indüklemiştir. (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-7 hücrelerinde, kontrol ve ABET ile muamele edilen gruplara ait akım sitometrisi (flow cytometry) analizlerinin sonuçları sunulmuştur. Her iki hücre hattında da apoptoz oranlarında artış gözlemlenmiş, bu artış özellikle MCF-7 hücrelerinde daha belirgin olmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0.01$; $p < 0.05$. R: tekrar sayısı. Akış sitometrisi diyagramlarındaki dört kadrant şu şekilde yorumlanmaktadır: sol üst kadrant nekrotik/ölü hücreleri, sağ üst kadrant geç apoptozda olan hücreleri, sol alt kadrant canlı hücreleri ve sağ alt kadrant erken apoptoz aşamasındaki hücreleri temsil etmektedir. Şekildeki çubuk grafikler, erken ve geç apoptozda bulunan hücrelerin toplam oranı baz alınarak oluşturulmuştur. ABET (Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate), MDA-MB-231 hücrelerinde 0.79 mM, MCF-7 hücrelerinde ise 0.32 mM konsantrasyonunda uygulanmıştır.

4.8. ABET, Proliferasyon ve Apoptoz İle İlişkili Genlerin Transkripsiyonel Profilinde Değişime Neden Olmuştur

ABET uygulamasının önceki deney setlerinde gözlemlenen anti-karsinojenik etkisinin hücre düzeyindeki etkilerini moleküler düzlemde daha iyi anlayabilmek amacıyla hücresel yaşlanma, DNA tamiri ve apoptoz ile ilişkili bazı temel genlerin ekspresyon profili analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda yapılan kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) çalışmaları, hücre döngüsü ve proliferasyonla ilişkili bazı temel genlerin ifade düzeylerinde anlamlı azalmalar olduğunu ortaya koymuştur. Gen ekspresyonlarındaki değişimler kontrol ve ABET ile muamale edilen MDA-MB-231 hücreleri ve MCF-7 hücreleri için ayrı ayrı karşılaştırılmıştır (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. ABET uygulamasının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri

ABET uygulaması, meme kanseri hücrelerinin gen ekspresyon profillerinde anlamlı değişikliklere yol açmıştır. (a) MDA-MB-231 ve (b) MCF-7 hücrelerinde, hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifade düzeyleri qRT-PCR ile analiz edilmiştir. ABET tedavisi, her iki hücre hattında da bazı genlerin ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalma ile sonuçlanmıştır. Kat değişimi (FC; fold-change) değerlerine göre hesaplanan gen ifadeleri, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns: anlamsız (non-significant). ABET (Arecaidine but-2-ynyl ester tosylate), MDA-MB-231 hücrelerinde 0.79 mM, MCF-7 hücrelerinde ise 0.32 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsünü düzenleyen CCND1 geninin ekspresyonu yaklaşık 2.3 kat azalmışken (p < 0.01), MCF-7 hücre hattında bu azalma 2.82 kata kadar ulaşmıştır (p < 0.001). Hücre döngüsünün ilerlemesinde rol oynayan

CDK6 geninin ifadesi, MDA-MB-231'de 2,0 kat ($p < 0.05$), MCF-7'de ise 1.92 kat ($p < 0.05$) düzeyinde azalmıştır. Hücre proliferasyonunun belirteci olan MKI67 geninde ise sırasıyla 3.71 kat ($p < 0.01$) ve 2.2 kat ($p < 0.05$) oranında anlamlı düşüşler gözlenmiştir.

Bunun yanı sıra, meme kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen DNMT1 geninin ekspresyon seviyesi, ABET ile işlem gören MDA-MB-231 hücrelerinde 6,33 kat ($p < 0.01$), MCF-7 hücrelerinde ise 1.76 kat ($p < 0.05$) düşmüştür. Ayrıca yalnızca MCF-7 hücrelerinde gözlenen bir diğer önemli bulgu, hücre iskeleti organizasyonu ve tümör progresyonu ile ilişkili ANKRD1 geninin 6.46 kat ($p < 0.01$) ve anti-apoptotik özellikleriyle bilinen BCL-2 geninin 12.9 kat ($p < 0.01$) düzeyinde baskılanmış olmasıdır. Bu bulgular, ABET'in hücre döngüsü regülasyonu, çoğalma ve apoptoz süreçlerini moleküler düzeyde etkileyerek tümöral fenotipi zayıflattığını düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, sahip olduğu moleküler çeşitlilik ve klinik farklılıklar nedeniyle tedavisi oldukça karmaşık olan bir kanser türüdür. Tümör hücrelerinin hormon reseptörü ekspresyonundaki değişkenlik, genetik ve epigenetik düzeydeki düzensizlikler, tümör mikroçevresine adaptasyon kabiliyeti ve kemoterapötik ajanlara karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları, mevcut tedavi stratejilerinin etkinliğini ciddi ölçüde sınırlamaktadır (Obidiro vd., 2023). Bu nedenle, mevcut tedavi yaklaşımlarına alternatif olabilecek ya da onları destekleyebilecek yeni moleküler hedeflerin ve terapötik ajanların belirlenmesi, etkili bir meme kanseri tedavisi geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda, kolinerjik sistemin non-nöronal komponentlerinin, özellikle mAChR'lerin kanser biyolojisindeki rolleri giderek daha fazla ilgi çekmektedir (Muñoz ve Calaf, 2023). Muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR), klasik olarak parasempatik sinir sistemi aracılığıyla fizyolojik işlevleri düzenleyen G proteinine bağlı reseptörlerdir (Calaf vd., 2022). Muskarinik asetilkolin reseptör ailesi beş farklı alt tipten oluşmakta olup (M1–M5), bu alt tiplerin hücre içi sinyal yolları birbirinden farklı özellikler sergiler (Calaf vd., 2022). Özellikle M2 alt tipi, Gi/o proteinleri aracılığıyla etki göstererek hücre içi cAMP düzeylerinin azalmasına neden olur ve bu mekanizma üzerinden hücre çoğalması gibi biyolojik süreçleri baskılayıcı sinyalleri devreye sokabilir (Ockenga vd., 2013). Kanser hücrelerinde muskarinik reseptörlerin ekspresyon düzeyleri ve fonksiyonları, tümörün hücresel kökenine ve moleküler alt tipine göre değişiklik gösterebilir (Muñoz ve Calaf, 2023). Mevcut bulgular, Gq proteinine bağlı çalışan ve hücre içi kalsiyum artışına yol açan M3 alt tipinin bazı kanser türlerinde proliferatif ve invaziv davranışları desteklediğini göstermektedir (Fizman vd., 2007; Halder ve Lal, 2021). Buna karşın, Gi proteini ile bağlantılı olan M2 reseptörlerinin, birçok tümör modelinde hücre büyümesini yavaşlatıcı ve apoptozu tetikleyici yönde etki gösterdiği yönünde artan kanıtlar bulunmaktadır (Cristofaro vd., 2018; Ferretti vd., 2012; Guerriero vd., 2023; Yavuz vd., 2025).

Bu tez kapsamında kullanılan ABET arekolin türevi bir agonist olup M2 muskarinik reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanan ve daha önce inflamasyon

modellerinde değerlendirilen bir kolinomimetik ajandır (Liu vd., 2002; Tsimpili ve Zoidis, 2025). ABET'in farklı kanser türleri üzerindeki biyolojik etkilerine dair literatürde kapsamlı ve sistematik bulgular henüz sınırlıdır. Bu eksiklikten yola çıkarak, çalışmamızda ABET'in meme kanseri hücre hatlarında sahip olabileceği potansiyel anti-tümör etkiler detaylı olarak araştırılmıştır.

In silico moleküler docking analizleri, ABET'in M2 ve M4 reseptörlerine özgül bağlanma eğiliminde olduğunu göstermiştir. (Şekil 4.1.). M2 reseptörü ile Arg121 gibi kritik bölgelerle hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler yoluyla kurulan bu bağlanma, ilacın reseptör düzeyindeki özgünlüğüne işaret etmektedir ve farklı çalışmalar ile de desteklenmiştir (Guerriero vd., 2023; Kruse vd., 2013). Bu sonuç, ABET'in M2 reseptörü için seçici aktivasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde M3 reseptörünün non-selektif bir agonist olan karbakol ile uyarılması kısa vadede hücre içi kalsiyum düzeylerini artırarak M3 reseptörü aracılığıyla proliferasyon, göç ve anjiyogenezi hızlandırdığını ortaya koymuştur (Sales vd., 2019). Ancak aynı çalışmada, daha yüksek konsantrasyonlarda veya daha uzun süreli muskarinik uyarımın hücre ölümüne yol açtığı, bu çift yönlü etkinin de reseptör alt tiplerinin farklı ekspresyon profilleri ve uyarım koşullarına bağlı olduğu vurgulanmıştır (Sales vd., 2019). Dolayısıyla, muskarinik yolun terapötik hedeflenmesinde selektivitenin kritik olduğu sonucuna varılabilir. ABET gibi seçici bir M2 reseptör agonistinin kullanılması, diğer alt tiplerin istenmeyen proliferatif sinyallerini en aza indirerek, anti-tümör etkiyi maksimize etme potansiyeline sahiptir. Bu özellik, ABET'i meme kanseri gibi M2 reseptörü eksprese eden kanser türlerinde güvenli ve etkili bir antikanser ajan haline getirebilir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, arekaidin but-2-ynil ester tosilat (ABET) molekülünün meme kanseri hücrelerinde belirgin antiproliferatif ve antimigratuvar etkilere sahip olduğunu göstermektedir. ABET, hem triple-negatif fenotipteki MDA-MB-231 hücrelerinde hem de luminal tip MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığını ve çoğalmasını doza bağlı biçimde azaltmış, kolon oluşumunu engellemiş ve hücre göçünü baskılamıştır. Özellikle, ABET MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdururken, MCF-7 hücrelerinde belirgin apoptotik hücre ölümü indüklemiştir (Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.). Bu sonuçlar, muskarinik reseptör aktivitesinin modüle edilmesiyle çeşitli malignitelerde antikanser etkiler elde

edilebileceğine dair var olan çalışmalar ile uyumludur. Örneğin; yüksek invazivlik ve tedaviye direnç göstermesi ile bilinen glioblastoma multiforme (GBM) üzerine yapılan çalışmalarda Alessandrini ve arkadaşları, M2 muskarinik reseptörlerinin glioblastoma kök hücrelerinde proliferasyonu ve hayatta kalmayı hücrelerde mitotik ilerlemenin bozulmasına ve apoptozun artmasına bağlı olarak negatif yönde modüle ettiğini göstermiştir (Alessandrini vd., 2015). Ayrıca, Di Bari ve arkadaşları, M2 reseptörünün seçici agonistlerle uyarılmasının hücre çoğalmasını engellediğini, oksidatif stres ile sitotoksik ve genotoksik etkilere neden olduğunu, bunun da hücrelerde otofaji yolunu tetiklediğini ortaya koymuştur. M2 aracılı otofajik yanıtın, kanserde yaygın biçimde aktif olan PI3K/AKT/mTOR yolaklarının baskılanması ve AMPK aktivasyonunun artmasıyla ilişkili olduğu, neticede apoptoz oranının da yükseldiği rapor edilmiştir (Di Bari vd., 2021). Bu bulgular, M2 muskarinik reseptörlerinin glioblastoma tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir. Pacini ve arkadaşları, M2 reseptör agonisti Arecaidine'in T24 mesane kanseri hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu anlamlı şekilde azalttığı ve bu etkinin spesifik olarak M2 reseptör aracılı olup, M1 veya M3 reseptörlerinin bloke edilmesinin arecaidine'in antiproliferatif etkisini engellemediği gösterilmiştir (Pacini vd., 2014). Bu bulgu, M2 reseptörlerinin mesane kanseri tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Taggi ve arkadaşları, M2 agonisti olan arecaidine'in propargil esteri (APE) kullanılarak oluşturulan M2 reseptör aktivasyonunun SKOV-3 ve TOV-21G over kanseri hücrelerinde hücre büyümesini ve hayatta kalmayı inhibe ettiğini, ayrıca G2/M fazında hücre döngüsü duraksamasına ve apoptoza yol açtığını bildirmiştir (Taggi vd., 2022).

Tüm bu çalışmalara ek olarak elde ettiğimiz bulgular, özellikle meme kanseri bağlamında mevcut literatürle uyum göstermektedir. Triple-negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada, muskarinik agonistlerin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının tümör ilerlemesini yavaşlatabileceğini ortaya koymuştur (A. J. Español vd., 2020). Español ve arkadaşları, düşük konsantrasyonda kullanılan karbakol (geniş spektrumlu bir muskarinik reseptör agonisti) veya M2 alt tipine seçici bir agonist olan APE'nin paklitaksel ile kombinasyonunun, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını belirgin şekilde düşürdüğünü ve hücre göçünü anlamlı biçimde baskıladığını göstermişlerdir. Ek olarak bu kombinasyon tedavisinin çoklu ilaç direnç pompası ABCG2 ve büyüme faktörü reseptörü EGFR ekspresyonunu da düşürerek hem in vitro hücre kültüründe hem de in

vivo çıplak fare modellerinde anti-anjiyogenik ve anti-tümör etkiler oluşturduğunu belirtmişlerdir (A. J. Español vd., 2020). Özellikle, hormonal tedavilere yanıt vermeyen veya hedefe yönelik güncel ajanlara direnç geliştirmiş TNBC alt tiplerinde, muskarinik M2 yolunun hedeflenmesi önemli bir alternatif strateji olabilir. Bu yönüyle ABET, meme kanserinin tedavisinde kullanılmakta olan konvansiyonel ajanlara kıyasla farklı bir etki mekanizması sunmaktadır.

Bu bulguların tümü M2 reseptörlerinin aktivitesinin çeşitli kanserlerde proliferasyon karşıtı ve pro-apoptotik bir yolak olarak işlev gördüğünü vurgulamaktadır ve yeni bir terapötik hedef olarak önemli bir rol oynayabileceğini göstermekte; aynı zamanda çalışmamıza destek sağlamaktadır.

ABET'in BC hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisini daha iyi anlayabilmek amacıyla belirli anti-proliferatif genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi sonucunda hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler bulunmuştur (Şekil 4.8). Özellikle, tedavi sonrası onkogeneze ve hücre döngüsü ile bağlantılı bazı genlerin (ör. *CCND1*, *CDK6* ve *MKI67*) transkript düzeyleri her iki hücre hattında da anlamlı ölçüde azalırken apoptoz ve metastazla ilişkili *ANKRD1* ve *BCL2* gen ekspresyonunda özellikle MCF-7 hücrelerinde belirgin bir düşüş saptanmıştır. Bu değişiklikler, ABET'in antiproliferatif ve proapoptotik etkilerini moleküler düzeyde desteklemektedir.

Ankyrin Repeat Domain 1 (*ANKRD1*) geni kodladığı ankyrin tekrar domainli protein sayesinde hücrede gen ekspresyonunu düzenleyici bir kofaktör olarak görev yapar ve kanserde metastaz ile ilişkili bir gendir (Diskul-Na-Ayudthaya vd., 2024). Triple-negatif ve yüksek metastatik meme kanseri hücrelerinde *ANKRD1*'in aşırı eksprese edildiği, bunun NF- κ B ve MAGE-A6 sinyal yollarını aktive ederek tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz potansiyelini artırdığı gösterilmiştir (Diskul-Na-Ayudthaya vd., 2024). *ANKRD1* gen ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinde ABET uygulaması sonrasında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8.). *ANKRD1*'in metastaz ve invazyonu destekleyici bir rol oynadığı göz önüne alındığında, ABET uygulaması sonrasında *ANKRD1* ekspresyonunun azalması bu bileşiğin anti-invaziv özellikleri ile uyumludur. Literatürde *ANKRD1*'in genetik olarak baskılanması, meme kanseri hücrelerinin göç ve invazyon kapasitelerinde belirgin bir düşüşe yol

açtığı belirtilmiştir (Diskul-Na-Ayudthaya vd., 2024). Bu bağlamda, ABET'in MCF-7 hücrelerinde ANKRD1 ekspresyonunu azaltması, literatürle tutarlı olarak anti-metastatik bir etkiyi işaret etmektedir. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinde ANKRD1 ekspresyonunda belirgin bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.8.). Bu durum literatürde beklenenle tam olarak örtüşmemektedir, çünkü daha agresif fenotipli MDA-MB-231'de de ANKRD1'in azalması öngörülmektedir. Fakat MDA-MB-231 hücrelerinin TP53 geninde mutasyon taşıması sebebiyle p53 sinyal yolunun aktif olmaması bu durumun bir sebebi olabilir (Wong, 2021). MDA-MB-231 hücrelerinde ABET'in ANKRD1 seviyelerini belirgin bir şekilde azaltamaması, bu bileşiğin bu hücrelerdeki anti-metastatik etkilerinin farklı mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu durum, hücre iskeleti dinamikleri veya diğer genlerin düzenlenmesi gibi alternatif yolların devreye girdiğini işaret edebilir. Buna karşılık, MCF-7 hücrelerinde ANKRD1'in baskılanması, ABET'in özellikle epitelial karakteristikler sergileyen hücre hatlarında metastazı engelleyici bir etkiye sahip olduğunu gösterebilir. Bu bulgu, ABET'in hücre tipine bağlı olarak farklı anti-metastatik mekanizmalar kullanabileceğini ortaya koymaktadır.

B-Cell Lymphoma 2 (BCL2) geni intrinsik apoptotik yolda görev yapan önemli bir anti-apoptotik faktördür ve hücrelerde mitokondriyal dış zar permeabilitesini engelleyerek programlanmış hücre ölümünü baskılar (Honma vd., 2015). Birçok kanser türünde BCL2 geninin aşırı ekspresyonu sonucunda tümör hücrelerinde hayatta kalmayı arttırarak ve tedaviye direnç gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir (Honma vd., 2015). BCL2 geninin çeşitli tümörlerde tedavi sonrası kötü prognoz veya tedaviye direnç ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Honma vd., 2015). Sonuçlarımızda MCF-7 hücrelerinde ABET uygulaması sonrasında *BCL2* gen ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlenmiş ve bu durum hücrelerde artmış apoptoz ile paralel seyretmiştir (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.). Östrojen reseptör pozitif meme kanseri hücrelerinde, apoptotik uyarıların BCL-2 seviyelerini azaltarak hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir (24). Örneğin, tamoksifen ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde, BCL2'nin mRNA ve protein düzeylerinde gözlenen azalmadan dolayı hücre ölümünü tetikleyen bir süreçle bağlantılı olduğu söylenmiştir (Zhang vd., 1999). ABET'in MCF-7 hücrelerinde BCL2 ekspresyonunu baskılaması durumu da hücreleri apoptoza daha duyarlı hale getirmesi açısından literatürle örtüşmektedir. Bu durum, ABET'in proapoptotik etkisinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde ABET

tedavisi sonrasında *BCL2* ekspresyonunda belirgin bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4.8.). Bu durum, literatürde üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinin genellikle düşük bazal BCL-2 düzeylerine sahip olması ile örtüşmektedir (Honma vd., 2015). ABET'in MDA-MB-231 hücrelerinde BCL-2 ekspresyonunu belirgin şekilde değiştirmemesi, TNBC'ye özgü düşük BCL-2 seviyeleri ve farklı apoptotik direnç mekanizmaları ile uyumlu bir durum olarak değerlendirilebilir. Bu hücre hattında ABET'in esas etkisinin hücre döngüsünü durdurarak proliferasyonu baskılamak olduğu, apoptozun ise daha geri planda kaldığı düşünülebilir.

Cyclin D1 (CDK1) Hücre döngüsünün G₁/S geçişinde önemli bir düzenleyicidir ve hücrelerin bölünmeye hazırlanmasında kritik bir rol oynar. Bu protein, CDK4/6 kinazları ile birleşerek retinoblastoma (RB) proteininin fosforilasyonunu tetikler. Fosforile olan RB proteini, E2F transkripsiyon faktörlerini serbest bırakır ve bu faktörlerin aktif hale gelmesi, hücrenin S fazına geçişini sağlar (Montalto ve De Amicis, 2020). Normal hücrelerde CCND1 geninin ekspresyonu sıkı bir biçimden kontrol edilir fakat kanser hücrelerinde bu genin aşırı ekspresyonu sıklıkla mevcuttur. Kanser hücrelerindeki bu CCND1 aşırı ekspresyonu nedeniyle kontrolsüz büyüme meydana gelmektedir (Montalto ve De Amicis, 2020). Özellikle aşırı CCND1 düzeylerini BC'de ele alacak olursak; meme kanserlerinin yaklaşık yarısında bu gende meydana gelen amplifikasyonlar veya aşırı ekspresyonlar ile karşılaşılır (Montalto ve De Amicis, 2020). ABET tedavisi sonrasında, CCND1 gen ekspresyonunun hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hatlarında belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.8.). Bu azalma ABET'in hücre döngüsünü durdurucu etkisiyle doğrudan ilişkilidir ve literatürde beklenen yöndedir. Hücre proliferasyonunun baskılanması durumunda Cyclin D1 seviyelerinin düşmesi yaygın bir olgudur (Wang vd., 2024). CDK1'in baskılanması sonucunda hücre döngüsünün G₁ fazında durarak hücre çoğalmasını baskılar (Wang vd., 2024). Bu bağlamda, ABET'in CCND1 ekspresyonunu azaltması, hücrelerin G₁ aşamasında ilerlemesini engelleyerek proliferasyonun baskılanmasına katkıda bulunuyor olabilir. Bu etki, her iki hücre hattında da gözlenen hücre çoğalmasının azalmasıyla uyumlu görünmektedir (Şekil 4.6.). Bu da ABET'in anti-proliferatif etkisinin bir yansıması olarak değerlendirilebilir.

Siklin Bağımlı Kinaz 6 (CDK6) geni G₁ fazında siklin D ile kompleks oluşturur ve aktif hale gelerek RB proteininin fosforilasyonunu sağlar. Bu özelliği sayesinde

CDK4 ile G1 fazından S fazına geçişin temel düzenleyicilerinden birisidir (X. Wang vd., 2024). Pek çok kanserde CDK6'nın aşırı ekspresyonu sonucunda mitojenik sinyaller olmaksızın hücre bölünmesi meydana gelir (Wang vd., 2024). Özellikle hormon reseptör pozitif meme kanserlerinde siklin D-CDK4/6 ekseninin sıkça bozulduğu ve bu yüzden CDK4/6 inhibisyonunun bu kanserlerde etkin bir tedavi stratejisi olduğu bilinmektedir (Wang vd., 2024). FDA onaylı CDK4/6 inhibitörleri (palbosiklib, ribosiklib, abemaciclib gibi) endokrin tedavi ile kombine edilerek HR+ metastatik meme kanseri hastalarında etkili tedavi sağlanabilmektedir (Wang vd., 2024). Çalışmamızda BC hücrelerine ABET uygulamasının *CDK6* geninin ekspresyonunu her iki hücre hattında da anlamlı biçimde düşürdüğü görülmüştür (Şekil 4.8). Bu sonuç *CCND1* geninde gözlenen düşüş ile ele alındığında ABET'in G1 ve S fazındaki geçişte görevli olan siklin D1-CDK4/6 kompleksini baskıladığını göstermektedir ve bu bulgular ABET'in antiproliferatif etkisinin moleküler bir göstergesidir.

DNA Metiltransferaz 1 (DNMT1) geni hücre bölünmesi sırasında genomik DNA'nın metilasyonundan sorumludur (Wong, 2021). DNMT1, replikasyon sırasında oluşan çatalda, yeni sentezlenen ipliğe ebeveynden gelen metilasyon işaretlerini kopyalayarak epigenetik bilgilerin sürekliliğini sağlamaktadır (Wong, 2021). Bu işlevleri sayesinde genomda kararlılık sağlar ve gen regülasyonunda önemli bir rol alır. Özellikle tümör supresör genlerin promotor bölgelerini metilleyerek ekspresyonlarını azaltabilir ve böylece kanserli hücrelerde apoptozu baskılayarak proliferasyonu arttırıcı bir etki gösterebilir (Honma vd., 2015). Örneğin, TNBC'de DNMT1 seviyelerinin yüksekliği bu tümörlerin kötü prognoz göstermesine katkıda bulunan bir etken olarak tanımlanmıştır ve DNMT1 geni bu alt grup için potansiyel bir tedavi olarak önerilmektedir (Wong, 2021). DNMT1'i hedef alan demetilasyon ajanlarının (örneğin decitabin gibi) TNBC hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu tetiklediği deneysel çalışmalarla desteklenmiştir (Wong, 2021). Li ve arkadaşlarının çalışmasında, DNMT1'in susturulmasının veya inhibitör uygulamasının, meme kanseri hücrelerinde epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili genlerin ifadesini değiştirdiği gösterilmiştir. Özellikle E-cadherin düzeylerinde artış, N-cadherin ve Vimentin ekspresyonunda azalma gözlenmiş ve bu değişimler hücrelerin invazyon ve göç kabiliyetini baskılamıştır. Ayrıca DNMT1'in baskılanması, tümör ilişkili makrofajların (TAM) tümör hücreleri üzerindeki metastatik etkisini de azaltmış, bu da DNMT1'in tümör

mikroçevresinde metastazı kolaylaştıran bir rol oynadığını göstermiştir (Li vd., 2022). Elde ettiğimiz sonuçlar, ABET'in DNMT1 ekspresyonunu azaltmasının antineoplastik etkilerinin bir parçası olduğunu göstermektedir. Literatürde sıklıkla yüksek DNMT1 seviyelerinin olumsuz bir prognozla ilişkili olduğu belirtilirken, ABET'in bu enzimi baskılayarak hücrelerde faydalı bir epigenetik yeniden düzenlemeyi tetikleyebileceği öne sürülebilir.

MKI67 (Marker of Proliferation Ki-67) geni, hücre bölünmesi sırasında aktif olan Ki-67 antijenini kodlayan bir gendir. Ki-67 proteini, hücre döngüsünün aktif aşamaları olan geç G1, S, G2 ve M fazlarında bulunur, ancak dinlenme durumundaki G0 fazında yer almaz (Zhang vd., 2021). Bu nedenle, Ki-67 hücrelerin çoğalma potansiyelini yansıtan güvenilir bir gösterge olup, tümör patolojisinde yaygın şekilde kullanılan bir proliferasyon belirtecidir (Zhang vd., 2021). Cerrahi olarak çıkarılabilir meme kanseri vakalarında, tümör hücrelerindeki Ki-67 indeksi prognostik bir gösterge olarak kabul edilir ve yüksek Ki-67 oranları, daha hızlı çoğalan ve daha kötü klinik seyir gösterme potansiyeline sahip tümörlerle ilişkilidir (Zhang vd., 2021). ABET tedavisi sonrasında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında MKI67 gen ekspresyonunun belirgin ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Ki-67 düzeylerindeki bu düşüş, ABET'in hücre proliferasyonunu baskıladığını doğrudan yansıtmaktadır. Literatürde de çeşitli antiproliferatif tedavilerin Ki-67 indeksini düşürdüğü iyi bilinmektedir; örneğin neoadjuvan endokrin tedavi alan hastaların tümör biyopsilerinde birkaç haftalık tedavi sonunda Ki-67 oranlarının belirgin şekilde azaldığı ve bunun tedavinin etkinliğine işaret ettiği gösterilmiştir (Zhang vd., 2021). Hücre kültürü düzeyinde de, proliferasyonu engelleyen ajanlar uygulandığında MKI67 geninin transkripsiyonunun azaldığı ve Ki-67 protein seviyelerinin düştüğü saptanmıştır (Zhang vd., 2021). MDA-MB-231 hücrelerinde ABET uygulamasıyla Ki-67 pozitif hücre oranının düşmesi, hücre döngüsünün G1 fazında durdurulduğunu ve çok az hücrenin bölünmeye devam ettiğini göstermektedir. Benzer şekilde, MCF-7 hücrelerinde de ABET tedavisi sonrası canlı kalan hücrelerde proliferatif aktivitenin azaldığı, Ki-67 ekspresyonunun düşmesinden anlaşılmaktadır. Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar literatürdeki tablo ile örtüşmektedir ve genel olarak ABET tedavisinin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında gen ekspresyonu düzeyinde oluşturduğu etkiler, ilacın antiproliferatif ve proapoptotik özellikleriyle uyumlu bir moleküler profil ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, ABET'in meme kanseri hücre hatlarında sergilediği antiproliferatif, antimigratuvar ve apoptotik etkiler, muskarinik M2 reseptörünün onkolojik tedavide umut vadeden bir hedef olduğunu teyit etmektedir. Literatürde farklı kanser türlerinde M2 agonistleri ile gözlemlenen benzer antitümör aktiviteler bu çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Bu sonuçların ve varsayımların etkili bir tedaviye dönüşebilmesi adına kapsamlı moleküler araştırmaların ardından in-vivo testler olası toksisite çalışmaları da yapılmalıdır. Bu çalışma yalnızca ABET'in kanser üzerindeki etkisine değil; son zamanlarda araştırılan muskarinik reseptör hedefli kanser araştırmalarına da katkı sağlamaktadır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Meme kanseri (BC), mevcut tedavi seçeneklerinin sınırlı etkinliği nedeniyle küresel bir sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir. Bu bağlamda, BC tedavisine yönelik yenilikçi tedavi yaklaşımlarının ve yeni ilaçların geliştirilmesi kritik bir gerekliliktir. Bu çalışmada, M2 muskarinik reseptörün seçici bir agonisti olan ABET'in, meme kanseri hücre modellerinde potansiyel antineoplastik etkileri ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

Yapılan moleküler yerleştirme (docking) analizleri ABET'in M2 ve M4 muskarinik reseptörlerine güçlü bir bağlanma eğilimi gösterdiğini ortaya koymuş ve bu reseptörlerin aracılık ettiği biyolojik etkilerin yapısal temelini desteklemiştir. Moleküler ve hücresel düzeyde gerçekleştirilen deneylerle, ABET uygulamasının meme kanseri hücrelerinde hücre yaşamsallığı, klonojenik kapasite, göç yeteneği, proliferasyon, apoptoz oranları, tümör oluşumu ve gen ekspresyon profillerindeki değişimler üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Yapılan deneyler, ABET uygulamasının hücrelerin yapışmaya dayalı ve bağımsız klonojenik kapasitesini baskıladığını, hareketliliklerini azalttığını ve genel hücre canlılığını düşürdüğünü göstermiştir.

Özellikle dikkat çeken bir bulgu, ABET'in farklı meme kanseri hücre hatlarında hücre tipine özgü farklı biyolojik tepkilere yol açtığını ortaya koymuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde hücre çoğalmasının belirgin şekilde yavaşladığı gözlemlenirken, MCF-7 hücrelerinde apoptoz oranında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu farklılık, ABET'in hücreler üzerindeki etkilerinin hücre tipine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Ek olarak, gen ekspresyon analizleri, ABET tedavisinin hücre büyümesi ve hayatta kalma ile doğrudan ilişkili olan bazı önemli genlerin (CCND1, CDK6, MKI67) ve epigenetik düzenlemeyi sağlayan DNMT1'in ekspresyonunu baskıladığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, ABET'in hücre çoğalması, hücre döngüsü ilerleyişi ve DNA onarım mekanizmalarını hedef alarak kanser hücrelerinde biyolojik işlevleri

değiştirebileceğini göstermektedir. Elde edilen bu veriler ışığında ABET'in M2 muskarinik reseptörünü hedef alan yenilikçi bir meme kanseri tedavisi sunabilecek potansiyelde olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır.

6.2. Öneriler

Bu çalışma ile ABET'in meme kanseri tedavisinde güçlü bir aday olabileceği düşünülmektedir. Fakat bu potansiyelin klinik uygulamaya geçebilmesi için daha kapsamlı ve çok yönlü araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İlk olarak, ABET'in etkinliğinin ve güvenliğinin in-vivo modellerde, yani hayvan deneylerinde değerlendirilmesi gerekmektedir. In-vivo bir modelleme ile ABET'in biyoyararlanımı, doku dağılımı, metabolik kararlılığı ve olası sistemik toksisite profili hakkında kritik verilere ulaşılarak güçlü bir aday olup olmadığı konusunda önemli veriler elde edilmesi sağlanabilir.

Ayrıca, ABET'in M2 ve M4 muskarinik reseptör alt tiplerine bağlanma özelliklerinin ve bu reseptörlerin hücresel işlevler üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir. Reseptör spesifikliğin ve sinyal yollarının aydınlatılması, ABET'in etki mekanizmasının netleştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu amaçla, gen susturma veya aşırı ekspresyon modelleriyle M2 ve M4 reseptörlerinin seçici olarak hedeflenmesi, ABET'in hangi reseptör üzerinden daha güçlü bir terapötik etki sağladığını belirlemeye olanak tanıyabilir.

Bu çalışmada ABET'in yalnızca meme kanseri hücre hatları (BC) üzerinde incelenmiş olması, ilacın sağlıklı meme hücreleri üzerindeki etkileri hakkında sınırlı bilgi sunmaktadır. Ancak, potansiyel bir terapötik ajanın klinik güvenliği ve seçiciliği açısından, ABET'in sağlıklı meme hücrelerinde de test edilmesi kritik öneme sahiptir. Sağlıklı hücrelerde ABET'in toksisiteye yol açmadan kanser hücrelerine özgü etkiler gösterebilmesi, tedavinin güvenliğini ve spesifikliğini doğrulamak için gereklidir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalar ABET'in sağlıklı meme hücrelerinde hücre çoğalması, apoptoz ve gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmalı, kanser hücrelerine kıyasla bu hücrelerde nasıl bir biyolojik yanıt oluşturduğunu ortaya koymalıdır.

Gelecekteki araştırmalar, ABET'in diğer kanser tedavileriyle birlikte kullanım potansiyelini de değerlendirmelidir. Hedefe yönelik tedaviler, kemoterapi ajanları veya

immünoterapiler ile kombinasyonlarının ABET'in terapötik etkinliğini nasıl etkilediği incelenmelidir. Özellikle, hücre döngüsünü düzenleyen ajanlar, DNA hasarını onaran enzimlerin inhibitörleri veya bağışıklık yanıtını modüle eden bileşiklerle sinerjik etkiler oluşturup oluşturmadığı araştırılmalıdır. Bu tür kombinasyon stratejileri, ABET'in daha düşük dozlarda etkinlik göstererek yan etki riskini azaltma ve tedavi etkinliğini artırma potansiyeline ışık tutabilir.

Bu öneriler, ABET'in meme kanseri tedavisinde klinik bir seçenek olarak potansiyelini daha belirgin hale getirerek bu molekülün mevcut tedavi protokollerine entegre edilebilmesi için sağlam bilimsel veriler sunabilir.



KAYNAKLAR

- Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, ... , Piccart M (2014). Luminal B breast cancer: Molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(25), 2794-2803. DOI.org/10.1200/JCO.2013.54.1870
- Alessandrini F, Cristofaro I, Di Bari M, Zasso J, Conti L ve Tata AM (2015). The activation of M2 muscarinic receptor inhibits cell growth and survival in human glioblastoma cancer stem cells. *International Immunopharmacology*, 29(1), 105-109. DOI.org/10.1016/j.intimp.2015.05.032
- Arpino G, Pensabene M, Condello C, Ruocco R, Cerillo I, Lauria R, Forestieri V, Giuliano M, De Angelis C, Montella M, Crispo A ve De Placido S (2016). Tumor characteristics and prognosis in familial breast cancer. *BMC Cancer*, 16(1), 924. DOI.org/10.1186/s12885-016-2962-1
- Badowska-Kozakiewicz AM, Liszcz A, Sobol M ve Patera J (2017). Retrospective evaluation of histopathological examinations in invasive ductal breast cancer of no special type: An analysis of 691 patients. *Archives of Medical Science: AMS*, 13(6), 1408-1415. DOI.org/10.5114/aoms.2015.53964
- Bailar JC ve Gornik HL (1997). Cancer undefeated. *The New England Journal of Medicine*, 336(22), 1569-1574. DOI.org/10.1056/NEJM199705293362206
- Berg WA, Blume JD, Cormack JB, Mendelson EB, Lehrer D, Böhm-Vélez M, ... , ACRIN 6666 Investigators. (2008). Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA*, 299(18), 2151-2163. DOI.org/10.1001/jama.299.18.2151
- Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK ve Winn RA (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 92, e51998. DOI.org/10.3791/51998
- Burguin A, Diorio C ve Durocher F (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 808. DOI.org/10.3390/jpm11080808
- Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chao H, Chen L, ... , Zardecki C (2023). RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): Delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D488-D508. DOI.org/10.1093/nar/gkac1077

- Calaf GM, Crispin LA, Muñoz JP, Aguayo F ve Bleak TC (2022). Muscarinic Receptors Associated with Cancer. *Cancers*, 14(9), Article 9. DOI.org/10.3390/cancers14092322
- Corsetti V, Houssami N, Ferrari A, Ghirardi M, Bellarosa S, Angelini O, ... , Ciatto S (2008). Breast screening with ultrasound in women with mammography-negative dense breasts: Evidence on incremental cancer detection and false positives, and associated cost. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 44(4), 539-544. DOI.org/10.1016/j.ejca.2008.01.009
- Cre, IA (2011). *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (C. 731). Humana Press. DOI.org/10.1007/978-1-61779-080-5
- Cristofaro I, Spinello Z, Matera C, Fiore M, Conti L, De Amici M, ... , Tata AM (2018). Activation of M2 muscarinic acetylcholine receptors by a hybrid agonist enhances cytotoxic effects in GB7 glioblastoma cancer stem cells. *Neurochemistry International*, 118, 52-60. DOI.org/10.1016/j.neuint.2018.04.010
- Dass SA, Tan KL, Selva Rajan R, Mokhtar NF, Mohd Adzmi ER, Wan Abdul Rahman WF, ... , Balakrishnan, V (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(1), 62. DOI.org/10.3390/medicina57010062
- Di Bari M, Tombolillo V, Alessandrini F, Guerriero C, Fiore M, Asteriti IA, ... , Tata AM (2021). M2 Muscarinic Receptor Activation Impairs Mitotic Progression and Bipolar Mitotic Spindle Formation in Human Glioblastoma Cell Lines. *Cells*, 10(7), 1727. DOI.org/10.3390/cells10071727
- Diori Karidio I ve Sanlier SH (2021). Reviewing cancer's biology: An eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33(1), 32. DOI.org/10.1186/s43046-021-00088-y
- Diskul-Na-Ayudthaya P, Bae SJ, Bae YU, Van NT, Kim W ve Ryu S (2024). ANKRD1 Promotes Breast Cancer Metastasis by Activating NF- κ B-MAGE-A6 Pathway. *Cancers*, 16(19), Article 19. DOI.org/10.3390/cancers16193306
- Español AJ, de la Torre E, Fisman GL ve Sales ME (2007). Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression. *Life Sciences*, 80(24-25), 2281-2285. DOI.org/10.1016/j.lfs.2006.12.017
- Español AJ, Salem A, Di Bari M, Cristofaro I, Sanchez Y, Tata AM ve Sales ME (2020). The metronomic combination of paclitaxel with cholinergic agonists inhibits triple negative breast tumor progression. Participation of M2 receptor subtype. *PloS One*, 15(9), e0226450. DOI.org/10.1371/journal.pone.0226450

- Español A, Salem A, Sanchez Y ve Sales ME (2021). Breast cancer: Muscarinic receptors as new targets for tumor therapy. *World Journal of Clinical Oncology*, 12(6), 404-428. DOI.org/10.5306/wjco.v12.i6.404
- Fährrolfes R, Bietz S, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Otto T, ... , Rarey M (2017). ProteinsPlus: A web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W337-W343. DOI.org/10.1093/nar/gkx333
- Ferretti M, Fabbiano C, Di Bari M, Ponti D, Calogero A ve Tata AM (2012). M2 muscarinic receptors inhibit cell proliferation in human glioblastoma cell lines. *Life Sciences*, 91(21-22), 1134-1137. DOI.org/10.1016/j.lfs.2012.04.033
- Fiszman GL, Middonno MC, de la Torre E, Farina M, Español AJ ve Sales ME (2007). Activation of muscarinic cholinergic receptors induces MCF-7 cells proliferation and angiogenesis by stimulating nitric oxide synthase activity. *Cancer Biology ve Therapy*, 6(7), 1106-1113. DOI.org/10.4161/cbt.6.7.4330
- Foland TB, Dentler WL, Suprenant KA, Gupta ML ve Himes RH (2005). Paclitaxel-induced microtubule stabilization causes mitotic block and apoptotic-like cell death in a paclitaxel-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 22(12), 971-978. DOI.org/10.1002/yea.1284
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J ve van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-2319. DOI.org/10.1038/nprot.2006.339
- Guerriero C, Manfredelli M, Matera C, Iuzzolino A, Conti L, Dallanocce C, ... , Tata AM (2023). M2 Muscarinic Receptor Stimulation Induces Autophagy in Human Glioblastoma Cancer Stem Cells via mTOR Complex-1 Inhibition. *Cancers*, 16(1), 25. DOI.org/10.3390/cancers16010025
- Halder N ve Lal G (2021). Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 660342. DOI.org/10.3389/fimmu.2021.660342
- Hanahan D ve Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. DOI.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harbeck N ve Gnant M (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134-1150. DOI.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, ... , Cardoso F (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 66. DOI.org/10.1038/s41572-019-0111-2

- Honma N, Horii R, Ito Y, Saji S, Younes M, Iwase T ve Akiyama F (2015). Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer*, 15(1), 698. DOI.org/10.1186/s12885-015-1686-y
- Jiang YZ, Yu KD, Bao J, Peng WT ve Shao ZM (2014). Favorable prognostic impact in loss of TP53 and PIK3CA mutations after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Research*, 74(13), 3399-3407. DOI.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0092
- Joensuu H ve Gligorov J (2012). Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 6, vi40-45. DOI.org/10.1093/annonc/mds194
- Kalluri R (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582-598. DOI.org/10.1038/nrc.2016.73
- Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, ... , Kobilka BK (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482(7386), 552-556. DOI.org/10.1038/nature10867
- Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, ... , Kobilka BK (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 504(7478), 101-106. DOI.org/10.1038/nature12735
- Lakshmanan I ve Batra SK (2013). Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio-protocol*, 3(6), e374. DOI.org/10.21769/bioprotoc.374
- Li Z, Wang P, Cui W, Yong H, Wang D, Zhao T, ... , Bai J (2022). Tumour-associated macrophages enhance breast cancer malignancy via inducing ZEB1-mediated DNMT1 transcriptional activation. *Cell ve Bioscience*, 12(1), 176. DOI.org/10.1186/s13578-022-00913-4
- Liu J, Evans MS ve Lee TJF (2002). Presynaptic muscarinic M(2)-receptor-mediated inhibition of N-type Ca(2+) channels in cultured sphenopalatine ganglion: Direct evidence for acetylcholine inhibition of cerebral nitrenergic neurogenic vasodilation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), 397-405. DOI.org/10.1124/jpet.302.1.397
- Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE ve Vyskočil F (2007). Muscarinic M1 acetylcholine receptors regulate the non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction via NO-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 102(6), 2110-2117. DOI.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04696.x

- Mangone L, Marinelli F, Bisceglia I, Braghiroli M B, Damato A ve Pinto C (2022). Five-year relative survival by stage of breast and colon cancers in northern Italy. *Frontiers in Oncology*, 12. DOI.org/10.3389/fonc.2022.982461
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G ve Gianni L (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229. DOI.org/10.1124/pr.56.2.6
- Montalto FI ve De Amicis F (2020). Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. *Cells*, 9(12), 2648. DOI.org/10.3390/cells9122648
- Muñoz JP ve Calaf GM (2023). Acetylcholine, Another Factor in Breast Cancer. *Biology*, 12(11), 1418. DOI.org/10.3390/biology12111418
- Nicosia L, Gnocchi G, Gorini I, Venturini M, Fontana F, Pesapane F, ... , Cassano E (2023). History of Mammography: Analysis of Breast Imaging Diagnostic Achievements over the Last Century. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1596. DOI.org/10.3390/healthcare11111596
- Obidiro O, Battogtokh G ve Akala EO (2023). Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics*, 15(7), Article 7. DOI.org/10.3390/pharmaceutics15071796
- O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T ve Hutchison GR (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. DOI.org/10.1186/1758-2946-3-33
- Ockenga W, Kühne S, Bocksberger S, Banning A ve Tikkanen R (2013). Non-Neuronal Functions of the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Genes*, 4(2), 171-197. DOI.org/10.3390/genes4020171
- Oeffinger KC, Fontham ETH, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YCT, ... , Wender R (2015). Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. *JAMA*, 314(15), 1599-1614. DOI.org/10.1001/jama.2015.12783
- Pacini L, De Falco E, Di Bari M, Coccia A, Siciliano C, Ponti D, ... , Calogero A (2014). M2muscarinic receptors inhibit cell proliferation and migration in urothelial bladder cancer cells. *Cancer Biology ve Therapy*, 15(11), 1489-1498. DOI.org/10.4161/15384047.2014.955740
- Pastar I, Wong LL, Egger AN ve Tomic-Canic M (2018). Descriptive vs mechanistic scientific approach to study wound healing and its inhibition: Is there a value of translational research involving human subjects? *Experimental dermatology*, 27(5), 551-562. DOI.org/10.1111/exd.13663



- Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HKM, Provenzano E, Bardwell HA, ... , Caldas C (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications*, 7, 11479. DOI.org/10.1038/ncomms11479
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, ... , Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. DOI.org/10.1038/35021093
- Sales ME, Español AJ, Salem AR, Pulido PM, Sanchez Y ve Sanchez F (2019). Role of Muscarinic Acetylcholine Receptors in Breast Cancer: Design of Metronomic Chemotherapy. *Current Clinical Pharmacology*, 14(2), 91-100. DOI.org/10.2174/1574884714666181203095437
- Salic A ve Mitchison TJ (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2415-2420. DOI.org/10.1073/pnas.0712168105
- Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach M O, Lehman CD, ... , American Cancer Society Breast Cancer Advisory Group (2007). American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(2), 75-89. DOI.org/10.3322/canjclin.57.2.75
- Shin JH, Adrover MF, Wess J ve Alvarez VA (2015). Muscarinic regulation of dopamine and glutamate transmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(26), 8124-8129. DOI.org/10.1073/pnas.1508846112
- Sugawara S, Nakaya Y, Matsumura S, Hirose K, Saito Y, Kaneko R, ... , Kobayashi M (2022). Neural Subtype-dependent Cholinergic Modulation of Neural Activities by Activation of Muscarinic 2 Receptors and G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel in Rat Periaqueductal Gray Neurons. *Neuroscience*, 506, 1-13. DOI.org/10.1016/j.neuroscience.2022.10.012
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A ve Bray F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. DOI.org/10.3322/caac.21660
- Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, ... , CLEOPATRA Study Group. (2015). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372(8), 724-734. DOI.org/10.1056/NEJMoa1413513

- Taggi M, Kovacevic A, Capponi C, Falcinelli M, Cacciamani V, Vicini E, ... , Tata AM (2022). The activation of M2 muscarinic receptor inhibits cell growth and survival in human epithelial ovarian carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 123(9), 1440-1453. DOI.org/10.1002/jcb.30303
- Telli ML, Hellyer J, Audeh W, Jensen KC, Bose S, Timms KM, ... , Ford JM (2018). Homologous recombination deficiency (HRD) status predicts response to standard neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 168(3), 625-630. DOI.org/10.1007/s10549-017-4624-7
- Thakur N ve Mehrotra R (2021). Carcinogenic Alkaloids Present in Areca Nut. İçinde V.B. Patel ve V.R. Preedy (Ed.), *Handbook of Substance Misuse and Addictions: From Biology to Public Health* (ss. 1-21). Springer International Publishing. DOI.org/10.1007/978-3-030-67928-6_84-1
- Tsimpili H ve Zoidis G (2025). A New Era of Muscarinic Acetylcholine Receptor Modulators in Neurological Diseases, Cancer and Drug Abuse. *Pharmaceuticals*, 18(3), Article 3. DOI.org/10.3390/ph18030369
- van Meerloo J, Kaspers GJL ve Cloos J (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. İçinde I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (ss. 237-245). Humana Press. DOI.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Vuckovic Z, Wang J, Pham V, Mobbs JI, Belousoff MJ, Bhattarai A, ... , Thal DM (2023). Pharmacological hallmarks of allostery at the M4 muscarinic receptor elucidated through structure and dynamics. *eLife*, 12, e83477. DOI.org/10.7554/eLife.83477
- Wang J ve Wu SG (2023). Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 15, 721-730. DOI.org/10.2147/BCTT.S432526
- Wang X, Zhao S, Xin Q, Zhang Y, Wang K ve Li M (2024). Recent progress of CDK4/6 inhibitors' current practice in breast cancer. *Cancer Gene Therapy*, 31(9), 1283-1291. DOI.org/10.1038/s41417-024-00747-x
- Wess J (2004). Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 423-450. DOI.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121622
- Wong KK (2021). DNMT1: A key drug target in triple-negative breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 72, 198-213. DOI.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.010

- Xu Y, Gong M, Wang Y, Yang Y, Liu S ve Zeng Q (2023). Global trends and forecasts of breast cancer incidence and deaths. *Scientific Data*, 10(1), 334. DOI.org/10.1038/s41597-023-02253-5
- Yavuz M, Kahyaogullari BN ve Demircan T (2025). Anti-carcinogenic effects of arecaidine but-2-ynyl ester tosylate on breast cancer: Proliferation inhibition and activation of apoptosis. *Molecular Biology Reports*, 52(1), 278. DOI.org/10.1007/s11033-025-10385-7
- Yersal O ve Barutca S (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 412-424. DOI.org/10.5306/wjco.v5.i3.412
- Zeichner SB, Ambros T, Zaravinos J, Montero AJ, Mahtani RL, Ahn E R, ... , Vogel CL (2015). Defining the Survival Benchmark for Breast Cancer Patients with Systemic Relapse. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9, 9-17. DOI.org/10.4137/BCBCR.S23794
- Zhang A, Wang X, Fan C ve Mao X (2021). The Role of Ki67 in Evaluating Neoadjuvant Endocrine Therapy of Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 687244. DOI.org/10.3389/fendo.2021.687244
- Zhang C, Sun T, Zhou P, Zhu Q ve Zhang L (2016). Role of Muscarinic Acetylcholine Receptor-2 in the Cerebellar Cortex in Cardiovascular Modulation in Anaesthetized Rats. *Neurochemical Research*, 41(4), 804-812. DOI.org/10.1007/s11064-015-1755-2
- Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, ... , Takenoshita S (1999). Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(10), 2971-2977.
- Zhang S, Xiao X, Yi Y, Wang X, Zhu L, Shen Y, ... , Wu C (2024). Tumor initiation and early tumorigenesis: Molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1-36. DOI.org/10.1038/s41392-024-01848-7
- Zielonke N, Gini A, Jansen EEL, Anttila A, Segnan N, Ponti A, ... , EU-TOPIA consortium (2020). Evidence for reducing cancer-specific mortality due to screening for breast cancer in Europe: A systematic review. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 127, 191-206. DOI.org/10.1016/j.ejca.2019.12.010

EKLER

Ek 1: ETİK KURUL ONAYI

20.06.2025

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜNE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Buse Nur KAHYAOĞULLARI'nın “Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Muskarinik Asetilkolin Reseptör Modülatörü Etkilerinin Hücresel ve Moleküler Düzeyde İncelenmesi” başlıklı tez çalışması için etik kurul izni gerektirecek herhangi bir uygulama yer almamıştır.

Doç. Dr. Turan DEMİRCAN
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Ek 2: KURUM İZİN ONAYI

20.06.2025

**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜNE**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Buse Nur KAHYAOĞULLARI'nın "Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Muskarinik Asetilkolin Reseptör Modülatörü Etkilerinin Hücresel ve Moleküler Düzeyde İncelenmesi" başlıklı tez çalışmasının laboratuvar aşamalarında bireysel laboratuvarımız kullanılmış olup herhangi bir izin alınmamıştır.

Doç. Dr. Turan DEMİRCAN
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Ek 3: ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buse Nur KAHYAOĞULLARI
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) : Yüksek Lisans Öğrencisi (MSKÜ,2025)
Lise : Karşıyaka Lisesi
Lisans : Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Yüksek Lisans : Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Çalıştığı Kurum / Kurumlar ve Yıl :
Yayınları (SCI ve diğer) : Yavuz, M., Kahyaogullari, B. N., ve Demircan, T. (2025). Anti-carcinogenic effects of arecaidine but-2-ynyl ester tosylate on breast cancer: proliferation inhibition and activation of apoptosis. *Molecular Biology Reports*, 52(1), 1-12.
Diğer Konular :