

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ANTIANGİYOGENİK
TEDAVİNİN VEGF, NOS VE ERK YOLAKLARINA ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Fatma KARACA**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. V. Sevinç İNAN**

Manisa, 2012

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum uzmanlık eğitimi süresince bilimsel desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen ve ayrıca tezimin hazırlanmasında bilgi ve birikimleriyle yol gösteren, benim için çok özel bir yere sahip olan Anabilim Dalı Başkanımız ve değerli hocam Prof. Dr. Sevinç İnan'a;

Hem eğitimim süresince, hem de tezimin deneysel aşamasının gerçekleşmesinde, istatistiksel verilerin oluşturulmasında geniş bilgi birikimlerinden yararlandığım değerli hocalarımız Prof. Dr. Seda Vatansever, Prof. Dr. Kemal Özbilgin ve Prof. Dr. İbrahim Tuğlu'ya;

Tezimin Elektron Mikroskopisi kısmının gerçekleşmesinde emekleri olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu'na,

Tez projemin gerçekleşmesini destekleyen ve tüm sarf malzemelerimizin karşılanmasını sağlayan Rektörlüğümüz Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı' na ve bu çalışmayı yürütebilmemiz için gerekli alt yapı olanaklarına sahip olmamızı sağlayan Dekanlığımıza,

Bugüne kadar yetişmemde büyük emekleri olan, eğitimim sırasında her zaman yanımda hissettiğim, desteklerini ve ilgilerini hiç esirgemeyen sevgili annem, babam, kardeşlerim ve eşime çok çok teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XI
I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Bezinin Temel Yapısı ve Anatomisi.....	3
2.2. Meme Bezi Embriyolojisi.....	6
2.2.1. Normal Meme Gelişimi.....	6
2.2.2. Meme ile ilgili gelişim anomalileri.....	7
2.3. Meme Bezi Histolojisi.....	8
2.3.1. Normal meme bezi.....	8
2.3.2. Gebelik ve laktasyon sırasında meme bezi.....	8
2.3.3. Memenin senil (yaşlılığa bağlı) involüsyonu.....	9
2.4. Meme Patolojisi	
2.4.1. Meme Lezyonları.....	10
2.4.2. Meme Kanseri Tanımı ve Önemi.....	15
2.4.2.1. Meme Kanseri Tanımı ve Önemi.....	15
2.4.2.2. Meme Kanserinin Etiyolojisi.....	16

2.4.2.3. Meme Kanserinin Evrelemesi.....	18
2.4.2.4. Meme Kanserinin Prognostik Faktörleri.....	19
2.5. Meme Kanseri Hücre Hatları	
2.5.1. MCF-7.....	21
2.5.2. MDA-MB-231.....	22
2.6. Anjiyogenez ve Tümör Anjiyogenezi.....	23
2.7. Anjiyogenik Yolaklar.....	24
2.7.1. VEGF.....	26
2.7.2. Tie.....	27
2.7.3. PDGF.....	27
2.7.4. FGF.....	27
2.7.5. TGF- β	28
2.7.6. EGF ve TGF- α	28
2.7.7. NOS.....	28
2.7.8. ERK.....	32
2.8. İlaçlar	36
2.8.1. Paklitaksel	36
2.8.2. Antianjiyogenik ilaçlar.....	39
2.8.2. 1. Propranolol.....	40
2.8.2.2. Talidomid.....	43
III. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Meme kanser hücre hatlarının açılması.....	47
3.2. Hücrelerin dondurulması.....	47
3.3. Hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi.....	47
3.4. Hücrelerin pasajlanması.....	47
3.5. İlaç dozlarının belirlenmesi.....	48
3.5.1. MTT testi.....	48
3.6. İndirek İmmunohistokimyasal yöntem.....	48
3.7. Elektron Mikroskopi takip yöntemi.....	51

IV. BULGULAR.....	53
4.1. Hücre hattı ikilenme zamanı ve ilaç dozlarının MTT bulguları....	54
4.2. İndirek immunohistokimya bulguları.....	59
4.3. Ultrastrüktürel bulgular.....	73
V. TARTIŞMA	75
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	86
VII. ÖZET.....	87
VIII. İNGİLİZCE ÖZET.....	89
IX. KAYNAKLAR.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
MDA-MB-231	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation - 7
VEGF	: Damar endotel büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	: Damar endotel büyüme faktörü reseptör-2 (Vascular endothelial growth factor reseptör-2)
HPL	: İnsan plasental laktojen (Human placental lactogen)
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
TNM	: Tümör, node, metastaz sınıflaması
WNT7B	: Wingless-type MMTV integration site family, member-7B
HER-2	: İnsan östrojen reseptör-2 (Human estrogen receptor-2)
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor)
TGF α	: Dönüştürücü büyüme faktörü- alfa (Transforming growth factor - α)
p53	: Protein 53
MMP	: Matriks metallo proteinaz
ER	: Estrogen receptor (Östrojen reseptör)
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2 (B-hücre lenfoma 2)

Kısaltma	Açıklama
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü (Basic fibroblast growth factor)
HGF/SF	: Hepotocyte growth factor / scatter factor (Hepatosit büyüme faktörü)
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü- alfa (Transforming growth factor - β)
TNF- α	: Tümör nekroz faktör - α
PDGF	: Platelet derived growth factor
RAS	: Rat sarkoma virüsü
HIF-1	: Hypoxia-inducible transcription factor-1
Tie	: Tyrosine kinase with Immunoglobulin and epidermal growth factor homology
Ang-1	: Angiopoietin-1
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
FMN	: Flavin mononükleotit
ONOO-P	: Peroksinitrit
ONOOH	: Peroksinitröz asit
cGMP	: Halkasal guanozin monofosfat
NOS1	: Nitrik oksit sentaz
ERK	: Hücre dışı reseptör kinaz (Extracellular receptor kinase)
NGF	: Sinir büyüme faktörü (Nerve growth factor)
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
TNF	: Tümör nekroz faktörü
RANKL	: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
TLR	: Toll like receptor
Raf	: Rapidly accelerated fibrosarcoma

Kısaltma	Açıklama
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
MAPKKK-REF	: MAPK kinaz kinaz
PI3-K	: Fosfoinozidit-3-kinaz
JNK	: JUN kinaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
NF kappa-B	: Nüklear faktör kappa B
PGE2	: Prostaglandin E2
ROS	: Reaktif oksijen türevi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DAB	: Diaminobenzidin
PBS	: Fosfat tamponlu salin
Raf	: Ras ilişkili faktör (Ras associated factor)
FBS	: Fetal sığır serumu
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IC ₅₀	: %50 inhibitör konsantrasyonu
EGCG	: Epigallokateşin gallat
c-kit	: Mezenşimal kök hücre belirteci
PFS	: Progresyon free survival
5-FU	: 5-fluorouracil
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
AP-1	: Aktivatör protein-1
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 1. Memenin Şematik Anatomisi	4
Şekil 2. Meme bezinin lenfatik drenajı ve rejyonel lenf nodlarının yerleşimi	5
Şekil 3. MAPK/ERK sinyali ve kanser belirteçleri	33
Şekil 4. Ras-Raf-MEK-ERK yolağının prototipik görüntüsü	34
Şekil 5. İnfantil hemanjiyoma (İH) propranololün etki ettiği moleküler süreç.	42
Şekil 6. VEGF, NOS ve MAPK (ERK) sinyal yolları ve anjiyogenez	86

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa No
Tablo 2.4.1.	Meme Lezyonları	10
Tablo 2.7.1.	Önemli Anjiogenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları	25
Tablo 2.7.7.1.	NOS Sınıflaması	30
Tablo 2.8.1.1.	Kanser İlaçlarının Sınıflandırılması	37
Tablo 2.8.2.	Antianjiyogenik Ajanların Etki Mekanizmaları	40
Tablo 3.6.1.	Kullanılan Primer Antikorlar	49
Tablo 3.6.2.	İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü	50
Tablo 3.7.1.	Elektron Mikroskopi Takip Protokolü	52
Tablo 4.1.1.	MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin 24. 48. ve 72. saatlerde elde edilen sayımları	54
Tablo 4.1.2.	MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan Paklitaksel (PX), Propranolol (PR) ve Talidomid (TD) ilaçlarının MTT sonucu elde edilen IC ₅₀ dozları.	56
Tablo 4.1.3.	MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan Paklitaksel (PX), Propranolol (PR) ve Talidomid (TD) ilaçlarının MTT sonucu elde edilen IC ₅₀ dozları.	56
Tablo 4.1.4.	MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında	57

ilaç dozlarının IC₅₀ değerlerini saptamak için yapılan
MTT testinin analizi.

Tablo 4.1.5.	MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında ilaç dozlarının IC ₅₀ değerlerini saptamak için yapılan MTT testinin analizi.	57
Tablo. 4.2.1.	MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının H-Skor ve immünoreaktivite değerlendirmesi.	69
Tablo. 4.2.1.	MCF-7 meme kanseri hücre hattının H-Skor ve immünoreaktivite değerlendirmesi.	70
Tablo 4.2.3.	MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı immunohistokimyasal analizi.	71
Tablo 4.2.3.	MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı immunohistokimyasal analizi.	72

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa No
Resim 4.1. MDA-MB-231 (A) ve MCF-7 (B) insan meme kanseri hücre hatlarına ait hücrelerin faz kontrast mikroskop görüntüleri	53
Resim 4.1.1. Kültüre edilen hücrelerin 24. saat görüntüleri A: MDA-MD 231, B: MCF-7 hücrelerinin görünümü.	55
Resim 4.1.2. Kültüre edilen hücrelerin 48. saat görüntüleri A: MDA-MD 231, B: MCF-7 hücrelerinin görünümü.	55
Resim 4.1.3. Kültüre edilen hücrelerin 72. saat görüntüleri A: MDA-MD 231, B: MCF-7 hücrelerinin görünümü.	55
Resim 4.2.1. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattının anti-VEGF primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	59
Resim 4.2.2. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattının anti-VEGFR2 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	60
Resim 4.2.3. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattının anti-iNOS primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	61
Resim 4.2.4. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattının anti-eNOS primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	62

Resim 4.2.5. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattının anti-ERK 1/2 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	63
Resim 4.2.6. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının anti-VEGF primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	64
Resim 4.2.7. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının anti-VEGFR2 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	65
Resim 4.2.8. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının anti-iNOS primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	66
Resim 4.2.9. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının anti-eNOS primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	67
Resim 4.2.10. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının anti-ERK 1/2 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.	68
Resim 4.3.1. Kontrol grubuna ait insan MDA-MB-231 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat	73
Resim 4.3.2. İnsan MDA-MB-231 hücrelerinin Paklitaksel uygulaması yapıldıktan 48 saat sonraki elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat	73
Resim 4.3.3. Kontrol grubuna ait insan MCF-7 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat	74
Resim 4.3.4. İnsan MCF-7 hücrelerinin Paklitaksel uygulaması yapıldıktan 48 saat sonraki elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat	74

I. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda akciğer kanserinden sonra görülen ikinci en sık kanser tipidir ve kanser nedeni ölümlerin içinde de beşinci sırayı almaktadır. Meme kanseri, erken yakalandığında tedavi edilebilir bir hastalıktır. Günümüzde meme kanserinin tedavi yöntemleri başta cerrahi olmak üzere, hormon tedavileri, kemoterapiler, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere beş grupta toplanır. Araştırılan yeni moleküler yolaklar ve ilaçlar ile daha uzun etkili ve daha az yan etkisi olan, mortalite ve morbidite üzerine olumlu etkiler sağlayabilecek tedavi olanakları oluşturulmaktadır. Meme kanseri etiyopatogenezi ve tedavisi konusunda moleküler düzeyde yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Malign tümörlerin hem büyüme hızını ve hem de varlıklarını sürdürmelerini sağlayan damarların oluşumunun önlenmesi ve hatta ortadan kaldırılması, son zamanlarda kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak anjiyogenezi ve antianjiyogenik ilaçların geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalardaki ilginç örnekler talidomid ve propranololdür. Talidomid gebe kadınlarda teratojenik etkilerinin görülmesi üzerine kullanımı kısıtlanmasıyla birlikte, varolan kapillerlerden yeni kan damarları oluşmasını (anjiyogenez) engellemesi özelliğinin saptanması sonucu, gebe olmayan kanser hastaları için uygun bir ilaç olarak yeniden kullanımı gündeme gelmiştir. Propranolol'ün ise özellikle VEGF ve VEGFR2 üzerine etkili olduğu bildirilmiş ve infantil hemanjiyom vakalarında kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada, invitro olarak metastaz, invazyon ve hücre göçü açısından farklı iki insan meme kanser hücre hattında (MDA-MB-231 ve MCF-7); antikemoterapötik (Paklitaksel) ve antianjiyogenik (Propranolol ve Talidomid) ilaç uygulamalarının anjiyogenez mekanizmalarında yer alan yolaklarla

(VEGF, NOS ve ERK) ilişkisinin indirek immunohistokimyasal yöntemle ve ince yapı düzeyinde değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada, meme kanseri gelişimde anjiyogenik yolakların önemli olduğu, kanser hücre hatlarında VEGF, VEGFR2, iNOS (NOS2), eNOS (NOS3) ve ERK immunoreaktivitelerinin artmış olduğu, antikemoterapötik ilaç uygulamalarına ek olarak antianjiyogenik ilaç uygulamaları ile tedavi sonrasında immunoreaktivitelerin azaldığı immunohistokimyasal olarak izlendi. Anjiyogenik süreçlerde rol oynayan moleküler yolakların invaziv MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında daha aktif olduğu, bu hücre hattında antianjiyogenik ilaç uygulamalarının daha etkili olduğu gözlemlendi. İnce yapı düzeyinde invaziv ve metastatik hücre hattı olan MDA-MB-231 ve daha az invaziv olan MCF-7 hücre hatlarında ilaç uygulamaları ile hücrelerin apoptoza gittikleri ve antianjiyogenik ilaç uygulamalarının etkili olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, meme kanseri tedavisinde antikemoterapötik tedavinin yanı sıra, antianjiyogenik ilaçların adjuvan olarak eklenmelerinin invazyon ve metastaz açısından tümör gelişimini ve büyümesini baskılaması açısından önemli olacağı düşünüldü.

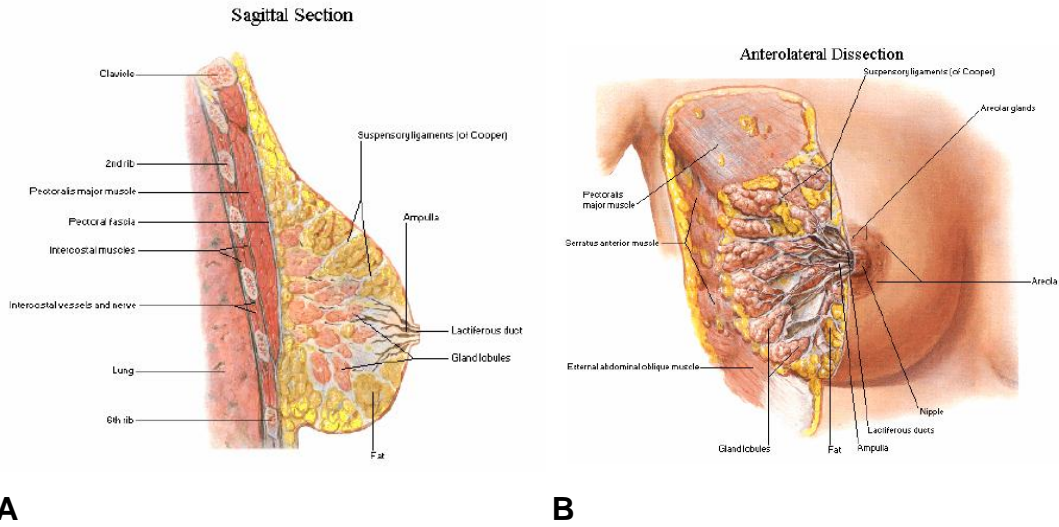
II. GENEL BİLGİLER

2.1. Memenin Temel Yapısı ve Anatomisi

Meme bezi (glandula mammae) fibröz fasya ile çevrelenmiş, toraksın ön duvarında ikinci ve altıncı interkostal aralıklar arasında, medialde sternum, lateralde ön aksiler çizgi arasında yer alan modifiye apokrin bir bezdir. Meme üzerindeki kendisini kuşatan derisi, üzerinde bulunduğu pektoralis major kası ve fasyası ile birlikte anatomik bir bütündür (1).

Meme, stroma ve parankimadan oluşur. Stroma destek doku, parankima memenin işlevsel dokusudur. Stroma fibröz bağ dokusu ile loblar arası yağ dokudan ibarettir. Parankim 15-20 adet lobi gl. Mammariae' den oluşur (**Şekil 2.1.A**). Loblar da lobulilere bölünmüştür. Bir lobun ürettiği süt salgısı ductus lactiferus ile drene edilir. Ductus lactiferus papillaya kadar ilerler ve porus lactiferusa açılır. Areola mammae tabanında, ductus lactiferus' ta oluşan genişlemeye sinüs lactiferi denir (2).

En çıkıntılı noktası olan papilla mammaria (meme başı) pigmentten zengin olan areola mammae ile çevrilidir (3). Meme başı, genellikle 4. kosta hizasında bulunur. Areola 15–60 mm. çapında, pigmente bir yapıdır ve sinir uçları, yağ ve ter bezleri bulundururken kıl follikülü içermez. Areola derisi pürtüklüdür; bu pürtüklerin içinde gl. Areolares (montgomery bezleri) olarak adlandırılan yağ bezleri vardır (**Şekil 2.1.B**). Gebelik süresince daha da gelişen bu bezler, yaptıkları yağ salgısı ile emme esnasında olabilecek maserasyonu önlerler (2).



A

B

Şekil 2.1. Memenin Şematik Anatomisi (4)

Memenin kan akımı birkaç yolla sağlanır.

- 1) Arteria thoracica interna (a. mammaria interna): A. subclavia'nın birinci bölümünden çıkan a. thoracica interna, apertura toracis superior'dan göğüs boşluğuna girer. Burada sternum'un dış kenarından 1-1,5 cm uzaklıkta olarak 6. kıkırdak kaburganın arka yüzünde aşağı doğru uzanır. Arter ilk 6 interkostal aralık hizasında rr. perforantes dallarını verir. Bunlardan ayrılan rr. mammarii medialis memenin kanlanmasına katılırlar.
- 2) Arteria axillaris: A. axillaris'in iki dalı (a. thoracoacromialis, a. thoracica lateralis) meme beslenmesine katılır.
- 3) Aa. intercostales posteriores: Pars thoracica aortae'den çıkarak interkostal aralıklarda uzanan 3., 4. ve 5. aa. intercostales posteriores'lerin r. cutanei laterales'lerinin rr. mammarii laterales dalları meme beslenmesine katılır (2, 3).

Toraks duvarı ve memeyi direne eden üç ana ven bulunmaktadır:

1. *İnternal torasik venin perforan dalları,*
2. *Aksiler venin dalları,*
3. *Posterior interkostal venlerin perforan dalları'dır.*

Vertebral venöz dallar meme kanserinin metastazı için ikincil bir yol oluşturabilir. Bu pleksus vertebraları geçerek, kafa tabanından sakruma

kadar uzanır. Venöz kanallar bu pleksus ile toraks, abdomen ve pelvis organlarının venleri arasında uzanır. Bu pleksuslar akciğer metastazı olmadan vertebra, kafatası, pelvis ve santral sinir sistemine olan metastazları açıklar (2).

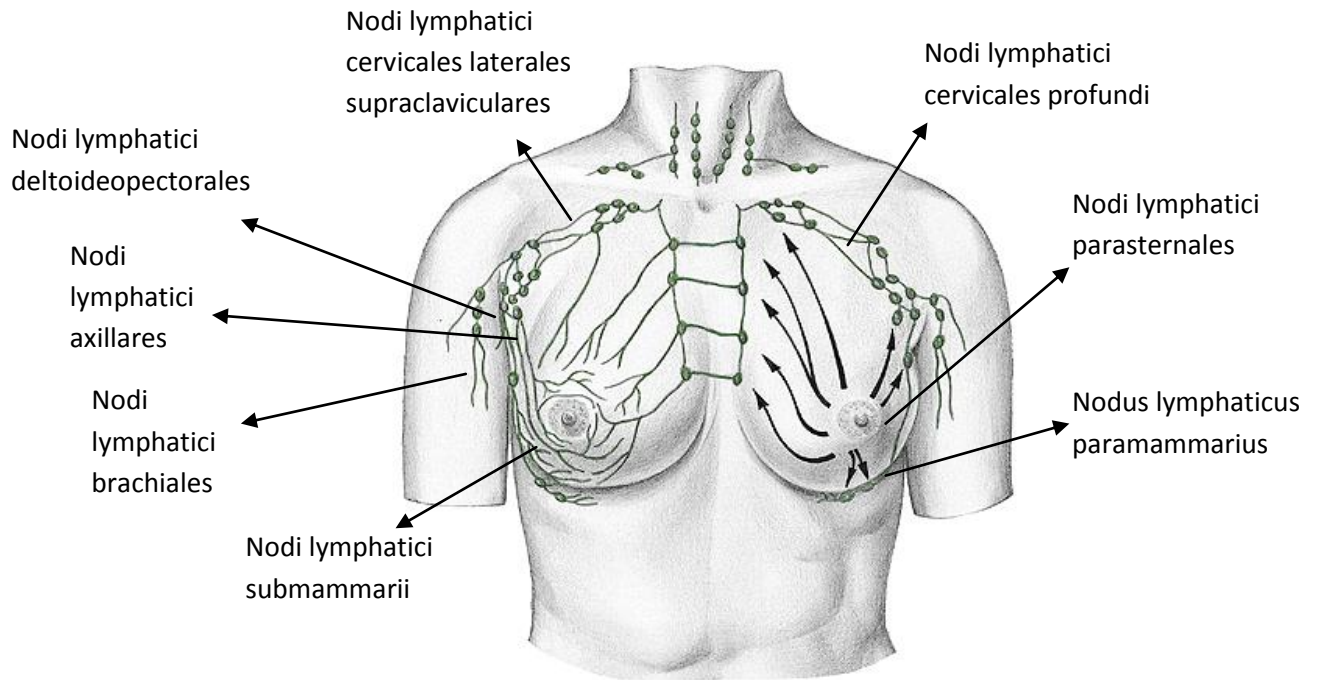
Memenin lenfatik drenajı önemli olup kanser hücrelerinin metastazında önemli rol oynar. Lenfanın çoğunluğu esas olarak memenin dış yan çeyreklerinden aksillaya (% 75'den fazlası) olurken, kalanı ise internal mammarian zincire olmaktadır (3).

Metastatik yayılım ve anatomopatolojik yapıyı belirlemek için kullanılan diğer bir değişik yöntemde lenf nodülleri üçe ayrılırlar (**Şekil 2**).

Düzey I lenf nodülleri: Pektoralis minör kasının lateral kenarının lateralinde bulunan lenf nodülleridir.

Düzey II lenf nodülleri: Pektoralis minör kasının arkasında bulunan lenf nodülleridir.

Düzey III lenf nodülleri: Pektoralis minör kasının medial kenarının medialinde bulunan lenf nodülleridir (1).



Şekil 2.2. Meme bezinin lenfatik drenajı ve rejyonel lenf nodlarının yerleşimi (5)

2.2. Meme Bezi Embriyolojisi

2.2.1. Normal Meme Gelişimi

Meme bezleri, değişmiş ve ileri derecede özelleşmiş apokrin ter bezleridir. Meme her iki cinsiyette embriyonel hayatın 2. ayında gövdenin yan tarafında oluşmaya başlar ve yüzeysel fasiyanın iki yaprağı arasında yerleşmiştir (6).

Meme tomurcukları, meme kristalarından embriyolojik gelişmenin 6. haftasında epidermisin altında yatan mezenşimin içine maksilladan kasiğa kadar uzanan süt çizgisi denen ektodermal bir kalınlaşma olarak ilerlemesiyle başlar. Bu değişiklikler mezenşimden indüklenen etkilerle meydana gelmektedir (7). Her bir primer meme tomurcuğu kısa sürede süt kanalları ve dallarını geliştiren **sekonder meme tomurcuklarını** oluşturur. Primitif süt kanalları tüm fetal yaşam süresince büyümeye ve dallanmaya devam eder. Üçüncü trimester döneminde cinsiyet hormonları fetal dolaşıma girer ve memedeki epitel dallanmalarının kanalizasyonuna yol açar. Böylece doğumda sayıları 15-20' yi bulan meme duktusları gelişmiş olur. Meme bezlerinin fibröz bağ dokusu ve yağ dokusu çevredeki mezenşimden gelişir. Yeni doğan erkek ve kız bebeklerin rudimenter meme bezleri, aynı olup genellikle büyüktürler. Bu bezler, sıklıkla 'cadı sütü' olarak adlandırılan bazı salgıları yaparlar. Bu geçici değişiklikler, maternal hormonların plasenta membranından fetal dolaşıma geçmesi sonucu meydana gelir (8). Geç fetal dönemde, meme bezlerinin olduğu alandaki epidermis çökerek derin olmayan meme çukurunu oluşturmaktadır. Doğumdan sonra ise bu çukurlardan meme uçları yükselir ve doğumda ana süt kanalları oluşmaktadır.

Memenin şekil, büyüklük ve durumu kadının hayatı boyunca sürekli bir değişim içerisinde. Memeler puberteye kadar çok yavaş büyür. Pubertede 10-12 yaşları arasında overlerin hormon salgılaması ile meme ve genital organların maturasyonu başlar. Puberteden sonra her bir menstrual siklusta, gebelik ve laktasyonda değişiklikler gözlenir. Menapozda ise memelerde involüsyon izlenir.

2.2.2. Meme ile ilgili gelişim anomalileri

1. Jinekomasti (Gynecosmastia)

Bu durum erkek meme dokusunun aşırı gelişimini tanımlayan bir ifadedir. Erkeklerdeki rudimenter meme bezleri normalde doğum sonrası gelişim göstermez ancak jinekomastili yenidoğan erkek çocuklarda, maternal seks hormonları glandüler dokuyu uyarmaktadır. Püberte ortalarında erkek çocukların yaklaşık üçte ikisinde, çeşitli derecelerde meme hiperplazisi gelişir (8,9).

2. Meme başlarının yokluğu (athelia) ve memelerin yokluğu (amastia)

Bu nadir doğuştan anomaliler, tek (unilateral) veya çift taraflı (bilateral) olarak ortaya çıkabilir. Bunlar, meme çıkıntılarının gelişme yetersizliği veya kaybolması sonucu görülür. Genellikle gonadların yokluğu ve Turner sendromuyla beraber görülür (8).

3. Meme aplazisi

Pübertede her iki bezin aynı hormonlara maruz kalmasına rağmen, belirgin farklılıklar göstermeleri, anomali olarak dikkate alınır. Bu olgular, sıklıkla kasların ve genellikle pektoralis major kasının rudimenter gelişimiyle ilgilidir (10).

4. Fazla sayıda meme ve meme başları

Fazla sayıda meme (polymastia) veya meme başları (polythelia) dışı popülasyonunun yaklaşık %1'inde görülür ve kalıtsal bir durumdur. Çoğunlukla normal memenin hemen altında gelişir daha az olarak aksilla ve abdominal bölgelerde görülür (10).

2.3. Meme Bezi Histolojisi

2.3.1. Normal meme bezi

Meme bezleri 15-20 kadar birleşik tübüloelveler bezden oluşmuştur. Meme bezleri tek bir kanala açılan birkaç küçük kanaldan (lobülüs, alveol) oluşur. Epiteli iki sıra hücrelerle döşelidir. Dışta yassı, kasılma özelliği olan, devamlılık göstermeyen miyoepitel tabakası bazal membrana oturmuştur. Lümeneye bakan yüzde ise prizmatik veya kübik epitel hücreleri vardır. Bu hücreler süt üretimini gerçekleştirir. Memenin fonksiyonel birimi terminal duktal lobüler ünitedir. Lobülde üretilen süt terminal, segmental ve laktiferöz duktuslardan geçerek meme başına açılan laktiferöz sinüslere boşalır (11). Meme bezi gebelik öncesi dönemde meme başına açılan kanallar sisteminden ibarettir. Gebelik sırasında kanallar dallara ayrılır ve bir lopçuğu oluşturan alveollerden veya asinüslerden oluşmuş keselerde sonlanırlar. Gebelik oluştuğunda yağ dokusundan zengin stroma içinde östrojen, progesteron ve prolaktin, HPL etkisiyle alveoller gelişir. Apopkrin salgı yapan meme bezlerinde doğumu izleyerek oksitosin hormonunun etkisiyle miyoepitelyal hücrelerin kasılması sonucu süt meme başından dışarıya verilir. Göğüslerin ilk gelişmesi ise büyük ölçüde östrojen etkisiyle pubertede gerçekleşir (11).

2.3.2. Gebelik ve laktasyon sırasında meme bezi

Meme bezleri, gebelik sırasında başlıca östrojen, progesteron, prolaktin ve insan plasental laktojen hormonu gibi eş zamanlı olarak artan hormonların etkisiyle yoğun bir biçimde büyür. Bu hormonların etkilerinden biri terminal kanalların uçlarındaki alveollerin çoğalmasındır. Alveoller emzirme sırasında aktif süt salgılayıcı bir yapı kazanan epitel hücrelerinin oluşturduğu küresel topluluklardır. Alveol hücrelerinin üst stoplazmalarında birkaç yağ damlacığı ve süt proteinlerinin oluşturduğu bir yada birkaç kümelenme içeren membranla çevrili salgı vakuolleri görülebilir. Salgı vakuollerinin ve yağ damlacıklarının sayısı emzirme döneminde büyük ölçüde artar. Alveol epiteli hücreleri ve bazal lamina arasında yıldız (stellat) biçiminde miyoepitelyal hücreler bulunur. Bağ dokusu ve yağ dokusunun miktarı, emzirme sırasında parenkimaya göre önemli ölçüde azalır.

Emzirme sırasında süt, alveollerin epitel hücreleri tarafından üretilir ve alveollerin lümenlerinde ve süt kanallarının içinde toplanır. Salgılayıcı hücreler küçülür, alçak kübik hücreler haline gelir ve sitoplazmalarında esas olarak nötral trigliseridleri içeren, çeşitli boyutlarda küre şeklinde damlacıklar içerirler. Bu lipid damlacıkları hücrelerden çıkarak lümene geçer ve bu süreç içinde apikal hücre membranının bir kısmıyla çevrelenirler. Lipidler insan sütünün %4'ünü oluşturur.

Salgılayıcı hücrelerde lipid damlacıklarının yanısıra kazein ve diğer süt proteinlerinden oluşan granüller içeren, membranla sarılı çok sayıda vakuol vardır. Süt proteinleri arasında çeşitli kazeinler, alfa-laktalbümin ve palzmositler tarafından üretilen immunglobulin A yer alır. Proteinler insan sütünün yaklaşık %1,5'ünü oluşturur. Süt şekeri olan laktoz, glukoz ve galaktozdan sentezlenir ve insan sütünün yaklaşık %7'sini oluşturur (12).

Doğumdan sonra meme bezlerinin ilk salgısına kolostrum adı verilir. Normal süttten daha az yağ ve daha fazla protein içerir ve yenidoğana özellikle bağırsak lümeni içinde bir dereceye kadar pasif bağışıklık sağlayan antikordardan (Ig A gibi) zengindir (11).

Meme yoluyla süt vermenin kesilmesiyle (sütten kesme), gebelik sırasında gelişen alveollerin çoğu apoptozis yoluyla bozulur. Bu bozulma hücresel bileşenlerin otofajik absorpsiyonu biçiminde olabileceği gibi hücrelerin bir bütün olarak dökülmesi şeklinde de gerçekleşebilir. Ölü hücreler ve kalıntılar makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır (12).

2.3.3. Memenin senil (yaşlılığa bağlı) involüsyonu

Menopozdan sonra meme bezlerinin gerilemesi, boyutlarının küçülmesi ve salgılayıcı kısımların ve bir dereceye kadar kanalların gerilemesi/atrofisi ile gerçekleşir. Gerileme değişiklikleri bağ dokusunda da ortaya çıkar (12).

2.4. Meme Patolojisi

2.4.1. Meme Lezyonları

Meme lezyonları benign lezyonlar, yüksek riskli lezyonlar ve malign lezyonlar olmak üzere 3 kısımda incelenir (**Tablo 2.4.1**).

Tablo 2.4.1. Meme Lezyonları

Benign Lezyonlar	Yüksek Riskli Lezyonlar	Malign Lezyonlar
Fibroadenom	LCİS (Lobüler Karsinoma İnsitu)	İDC - NOS (İnvaziv Duktal Karsinom-Spesifiye Edilmemiş Tipi)
Papillom	ADH (Atipik Duktal Hiperplazi)	IDC - Spesifiye edilmiş tip Müsinöz Karsinom Tübüler Karsinom Medüller Karsinom Papiller Karsinom
Yağ nekrozu	DCİS (Duktal Karsinoma İn situ)	ILC (İnvazif Lobüler Karsinom)
Apse	Meme Başının Paget Hastalığı	
Fibrokistik Değişiklik Kistler Fibrozis Adenozis Apokrin metaplazi		

1- BENİGN LEZYONLAR:

A. Fibroadenom: Fibroadenom lobülün fibröz ve glandüler elemanlarının fokal kitle olarak tanımlanan, 20-30 yaş grubundaki kadınlarda en sık görülen benign tümördür. Fibroadenoma skleroze adenozis, papiller apokrin metaplazi, epitelyal kalsifikasyonlar ve/veya 3 mm'den büyük kistik yapılar eşlik ediyor ise kompleks fibroadenom olarak isimlendirilir. Kompleks fibroadenom olgularında meme kanseri gelişme riski, nonkompleks fibroadenomlara göre daha fazladır (15).

B. Papillom: İntraduktal papillom, meme kanallarının epitelinden kaynaklanan benign neoplazmlardır. Genellikle asemptomatiktir, ancak meme başı akıntısı tipik bulgusudur. Papillomlar; genellikle duktal karsinoma in situ, nadiren invazif papiller kanserle ilişkili olabilir (16).

C. Yağ nekrozu: Yağ nekrozu sık görülen ve klinik olarak önemli bir lezyondur. Asemptomatik olabilen ya da ele gelen kitle, hassasiyet, cilt kalınlaşması ve meme başında çekilmeye yol açabilen benign bir patolojidir. Günümüzde en sık sebebi önceden geçirilmiş cerrahi ve radyoterapidir (1).

D. Apse: Meme apseleri ve mastit genellikle pospartum dönemde veya laktasyonun başlangıcında görülür. Akut mastitte, meme şiş, hassas, ödemli ve cilt kırmızıdır. Staphylococcus aureus en sık enfeksiyon ajanıdır. Tedavide cerrahi drenaj ve antibiyotikler kullanılır (1).

E. Fibrokistik Değişiklik: Daha çok klinik olarak palpe edilebilen bir kitle şeklinde kendini gösteren, menstürel siklusla ilişkili mastalji şikayetleri ve hassasiyetten oluşan klinik bir sendromdur. Fibrokistik değişiklikler primer olarak terminal duktal lobüler birimi etkiler. Histopatolojik olarak fibrokistik değişiklik; kistler, adenozis, fibrozis ve duktal hiperplazi olarak özetlenebilir (10, 13).

a. Kistler: Kist oluşumu memede çok sıktır ve en sıklıkla duktus tıkanıklığına bağlıdır. Obstrükte ektatik duktus veya terminal duktal lobüler üniteden kaynaklanabilirler.

b. Fibrozis: Memenin fibröz konnektif dokusunun benign bir proliferasyonudur. Klinik olarak lastik kıvamında palpe edilebilir bir kitle olarak kendini gösterebilir (1).

c. Adenozis: Lobül başına olan asiner birimlerin sayısında bir artıştır. Histolojik olarak lobül hiperplazisinden sklerozan adenozis, fibrozis ve kalsifikasyonlar görülmektedir.

d. Apokrin metaplazi: Küboidal hücrelerin yuvarlak nükleuslu, zengin granüler eozinofilik stoplazmalı, sekresyon yapan kolumnar hücrelere değişmesi ile karakterizedir. Apokrin metaplazinin varlığı ileride gelişebilecek bir karsinom riskini arttırmaz (1).

2- YÜKSEK RİSKLİ LEZYONLAR:

A. Lobular Karsinoma İn Situ (LCIS):

Görülme insidansı yaklaşık olarak %0.8-6 arasında bildirilmiştir. Olguların klinik olarak karakteristik bir bulgusu yoktur ve çoğunlukla fibroadenom gibi benign lezyonlar ve lobüllerde kalsifikasyon odakları tek anormallik olabilir. LCIS olgularında invazif lobüler karsinom gelişme riski normal popülasyonun yaklaşık 7-10 katıdır. Histolojik olarak lobüller genişlemiştir ve yuvarlak çekirdekli, nisbeten düzgün, yuvarlak, küçük-orta boy hücrelerle doludur (10,17).

B. Atipik Duktal Hiperplazi (ADH):

Düşük gradlı DCIS'in sitolojik ve yapısal özelliklerinin önemli bir kısmını taşıyan duktus epitel hücrelerinin çoğalmasındır. ADH'lilerin yaklaşık yarısı klonaldır ve mikrosatellit DNA instabilitesi gösterir. Modern görüntüleme çağında anlamlı lezyonların yaklaşık %10'unda ADH vardır. Ancak çoğu zaman insidental olarak tanı konur (1,10,14).

C. Duktal Karsinoma İn Situ (DCIS):

Duktal karsinoma in situ, memenin duktuslarından köken alan, duktus boyunca yayılan ve bazal tabakayı aşmayan bir malignensi olup, kanserin preinvazif formudur. DCIS çok değişik histolojik görünümlere sahiptir. Yapısal paternler solid, kribriform ve papiller tipindedirler. Bu tiplerin herhangi birinde nekroz varolabilir. Nükleer görünüm düşük dereceli ve monomorfik bir görünümünden yüksek dereceli ve heterojen karaktere doğru değişim gösterir.

DCIS'lerde kalsifikasyona sıkça rastlanır ve bu kalsifiye nekrotik bir doku ya da sekretuar materyelden dolaydır. DCIS'in prognozu iyidir, uzun süreli sağkalım oranı %97'nin üzerindedir (10, 13, 18).

D. Meme Başının Paget Hastalığı:

Meme başının paget hastalığı DCIS'in laktiferöz duktuslar boyunca ilerlemesi ve meme başı derisinin tutulmasıdır. Mikroskopide epidermis içerisinde berrak stoplazmalı, iri atipik çekirdekli belirgin nukleuslu tümör hücreleri (Paget hücreleri) görülür. Malign hücreler normal epidermal bariyerleri aşarak yüzeye kadar ulaşırlar. Klinik görünüm genellikle meme başı ve areola derisi üzerinde unilateral kabuklanma gösteren bir eksudanın varlığı ile karakterlidir. Vakaların ortalama yarısında altta invaziv bir karsinom vardır (13).

3. MALİGN LEZYONLAR:

İnvaziv Meme Kanseri Tipleri:

Kadınlarda invazif kanserlerin %90'ından fazlası duktal kökenlidir. İnvazif duktal karsinomların yaklaşık %70 ile %80'i spesifik edilmemiş invazif duktal kanser (IDC-NOS) olarak kategorize edilir. Bununla beraber invazif duktal kanserler nadir görülen farklı histolojik tipte birkaç kategori içerir, bunlar; medüller, müsinöz (kolloid), tübüler ve papiller karsinomlardır (13).

A. İnvaziv Duktal Karsinom-Spesifiye Edilmemiş Tipi (IDC-NOS):

IDC-NOS meme kanserlerinin %70-80'idir ve duktal karsinoma olarak adlandırılırlar (13). Mikroskopik görünüm oldukça heterojendir ve iyi diferansiye tübül formasyonları ve düşük dereceli nukleuslu tümörlerden anaplastik hücre tabakalarının oluşturduğu tümörlere kadar giden histolojik görünümlerle karşılaşılabilir (13). Makroskopik olarak çoğu lezyonlar spiküle ve irregüler kenarlıdır. Daha az sıklıkta ise IDC lezyonları düzgün kenarlı ve lobüle şekillidir. Lenfovasküler alanlara veya sınırlara invazyon izlenebilir. İlerlemiş kanserler deride çukurlaşmaya, meme başında retraksiyon yada göğüs duvarına fiksasyona yol açarlar. Ortalama üçte ikisi östrojen veya progesteron reseptörleri eksprese eder ve ortalama üçte bir vakada ERBB2'nin overekspresyonu söz konusudur (10, 13).

B. İnvaziv Duktal Karsinom-Spesifiye Edilmiş Alt Tipleri:

a. Müsinöz Karsinom:

Kolloid, muköz, mukoid ya da jelatinöz karsinoma olarak da bilinir. Pür müsinöz karsinomlar tüm IDC'lerin %2'sinden azını oluştururlar. Genellikle geniş ve sınırlıdır, ancak kapsüle değildir ve fibroadenomla karışabilirler. Makroskopik olarak tümörler çoğu kez yumuşak ve jelatinöz niteliktedir, çoğu hormon reseptörleri eksprese eder ve nadiren bu tümörlerde ERBB2 overekspresyonu izlenir (13).

b. Tübüler Karsinom:

Tübüler karsinom nadiren palpabl kitleler şeklinde izlenir fakat mamografide tespit edilen 1cm'den küçük hacimli invaziv karsinomların yaklaşık % 10'unu oluştururlar. Bunlar genellikle düzensiz mamografik dansiteler şeklinde görülürler. Mikroskopik olarak karsinomlar düşük dereceli nukleuslara sahip iyi gelişmiş tübüllerden oluşmuşlardır. Genellikle küçüktürler ve aksiller lenf nodlarına nadiren metastaz yaparlar; dolayısıyla iyi prognoza sahiptirler (13).

c. Medüller Karsinom:

Medüller karsinom nadir bir alt gruptur ve vakaların ortalama %2'sini oluşturur. Bunlar, büyük anaplastik hücrelerin oluşturduğu tabakalardan ibarettir ve geniş periferik lenfositik infiltrasyon gösteren iyi sınırlı tümörlerdir. Bu kanserlerde fibrotik stromanın nispeten eksikliği, kitleyi yumuşak, dolgun görünümlü hale getirir. Düzgün kenarlı olmaları nedeniyle fibroadenom ile karışabilirler. BRCA1 mutasyonları ile birliktelik gösteren kadınlarda artan bir sıklıkla ortaya çıkar. Ancak medüller karsinomlu çoğu kadın taşıyıcı değildir (13).

d. Papiller Karsinom:

Çok nadir görülür. İnvaziv kanserlerin %1'inden azdır. Klinik özellikler invaziv duktal karsinoma benzer ancak prognozu daha iyidir (10).

C. İnvazif Lobüler Karsinom (ILC):

ILC meme kanserlerinin %10 kadarını oluşturur. Diğer alt tiplere göre daha fazla bilateral olur. Vakaların üçte ikisi LCIS ile birliktedir. Hücreler tek tek stroma içinde dağılmıştır ve sıklıkla diziler yada zincirler şeklinde (indian

file, single file) uzanırlar. Bazen bunlar kanseröz yada normal görünümlü asinüsleri yada duktusları kuşatırlar ve karakteristik kabul edilen ökü z gözü görünümü” oluştururlar. Çoğu palpabl kitleler yada mamografik dansitelerle karşımıza çıkmasına karşın, önemli bir alt grup desmoplastik yanıt sız diffüz invaziv bir paterne sahip ve klinik olarak okült olabilir. Lobüler karsinomlar, duktal karsinomlardan daha sık olmak üzere, serebrospinal sıvıya, seröz satıhlara, over ve uterusu ve kemik iliğine metastaz yapar. Bu karsinomların hemen hemen tamamı hormon reseptörleri eksprese eder. Fakat ERBB2 ekspresyonu çok nadir yada yoktur (10, 13, 20,25).

2.4.2 Meme Kanseri

2.4.2.1. Meme Kanserininin Tanımı ve Önemi

Meme, süt bezleri ve burada üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşur. Bu süt bezleri ve kanalları döşeyen hücrelerin, kontrol dışı çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmelerine **meme kanseri** denir.

Sık görülmesi, sıklığının giderek artması, erken evrelerde tedavi edilebilir olması, günümüz koşullarında tanınmasının olanaklı olması, meme kanserinin önemini artırmaktadır.

Kanserin toplumda sıklığının bilinmesi, etyolojisinde rol oynayabilecek faktörlerin araştırılması, saptanması ve yok edilmesine yardımcı olabileceği gibi, meydana gelen kanserlerin erken tanısına, tedavi sonuçlarının değerlendirilmesine ve etkili tedavi yöntemlerinin saptanmasına da yardımcı olacaktır.

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen maling tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (21). Batı dünyasında kanserden ölümler arasında, kadınlarda akciğer kanserinden sonra, meme kanseri ikinci sıklıkta gelmektedir (22).

Meme kanseri erken yakalandığında tedavi edilebilir bir hastalıktır. En iyi tedavi yöntemleri ile evreye bağlı olarak, on yıllık hastalıksız sağ kalım süresi % 10 ile % 98 arasında değişmektedir.

Günümüzde meme kanserinin tedavi yöntemleri başta cerrahi olmak üzere, hormon tedavileri, kemoterapiler, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere beş grupta toplanır (1).

Henüz meme kanserini kesin önleyen bir yöntem mevcut değildir. Ancak kemoterapötik tedavilere ek olarak uygulanabilecek alternatif tedaviler hem kemoterapötik tedavinin zararlı etkisini en aza indirmek amacıyla hem de tedavi seçeneklerinin artması açısından önemli olacaktır.

2.4.2.2. Meme Kanserinin Etiyolojisi

Meme kanserinin etyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber bazı risk faktörlerinin meme kanserinin oluşumunda çok önemli olduğu bilinen bir gerçektir. Bunlar;

- 1) Bu risk faktörlerinin başında heredite gelir. Heredite bazen etyolojide çok etkindir, örneğin annesi ve kızkardeşlerinde meme kanseri bulunan kadınlarda meme kanseri görülme oranı normal popülasyona göre 50 kat daha fazladır. Bunlarda meme kanseri daha çok premenopozal dönemde görülür ve sıklıkla bilateraldir.
- 2) Risk faktörleri arasında yaşın da büyük önemi vardır. Puberteden önce meme kanseri hemen hemen hiç duyulmamıştır. 35 yaşın altında görülme oranı %1-3 iken, bu yaştan itibaren gittikçe artmaya başlar. En sık görüldüğü yaş grubu olarak 50-60 yaş arası söylenebilir.
- 3) Benign meme hastalıkları, özellikle fibrokistik hastalığın meme kanserinin risk faktörlerinin arasında sayılması halen tartışmalıdır. Ancak çalışmalar göstermiştir ki fibrokistik hastalığı bulunan kadınların %70'inde meme kanseri ile bir ilişki bulunmamaktadır. Kadınların %30 kadarında özellikle fibrokistik hastalıkla birlikte atipik hiperplazi bulunanlarda ve birde aile hikayesi varsa meme kanseri riski artmaktadır.
- 4) Diyetteki yağ miktarı ile meme kanseri arasındaki epidemiyolojik ilişki oldukça kuvvetlidir. Birçok hayvan modellerinde gösterildiği gibi diyetteki hayvansal yağların %10 dan fazla olması meme kanseri riskini arttırmakta buna karşın diyetteki yağın %5'in altında olması

özellikle yağ içermeyen bir diyetle beslenme tümörün büyümesini dahi inhibe edebilmektedir.

- 5) Meme kanseri etyolojisinde hormonal faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Mekanizması çok açık olmamakla birlikte sıçanlarda tekrarlayan östrojen enjeksiyonları ile meme kanseri oluşturulabilmektedir. Meme kanseri riskini arttıran diğer faktörler arasında menarşın erken başlaması, kadının ilk doğumunu geç yaşlarda yapması, hiç doğum yapmama ve menopozun geç olması sayılabilir. Ayrıca bir memede kanser saptanması diğer meme için önemli bir risk faktörüdür (10, 14,24).

Meme kanseri tedavi edilebilir bir hastalıktır. Son yıllarda meme kanseri tedavisinde oldukça önemli gelişmeler olmuştur. Bir çok tedavi olanakları ortaya çıkmıştır. Bu olanaklar önemli ölçüde hastalığın saptandığı safhaya göre değişmektedir. Hastalık ne kadar erken safhada saptanırsa tedavi olanağı ve seçeneği o kadar fazla olmaktadır (1). Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal , genetik tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. Meme kanserinin cinsine yayılımına ve metastaza göre tercih edilmektedir.

Hedefe yönelik tedavide, daha çok tümöre özgü ve daha az yan etkili tedaviler amaçlanılmaktadır. Literatürde anjiyogenez mekanizmalarının kanser gelişimi ve invazyonunda önemli olduğu, kanserin büyümesi ve ilerlemesi için anjiyogenez mekanizmalarının aktive olması gerektiği belirtilmektedir (23).

Meme kanseri tanısı konduktan sonra evresinin saptanması, kanserin hangi aşamada olduğu, nasıl seyredeceği, tedavi yaklaşımlarından hangisinin seçileceği konusunda önemli bilgiler sunmaktadır. Evrelemede American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in TNM sınıflaması kullanılmaktadır. T; tümör büyüklüğü, N; bölgesel lenf bezlerinin tutulumu, M; uzak metastazları göstermektedir. 1997 AJCC TNM sınıflaması aşağıdaki gibidir (24).

2.4.2.3. Meme Kanserinin Evrelemesi

TNM Evrelemesi :

	Tümör büyüklüğü	Bölgesel lenf bezleri tutulumu	Uzak metastaz
Evre 0 :	T is	N0	M0
Evre I :	T 1	N0	M0
Evre IIA :	T 0	N1	M0
	T 1	N1	M0
	T 2	N0	M0
Evre IIB :	T 2	N1	M0
	T 3	N0	M0
Evre IIIA :	T 3	N0	M0
	T 3	N1	M0
	T 0-3	N2	M0
Evre IIIB :	T 4	Herhangi bir N	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre IV :	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tx : Tümör büyüklüğü bilinmiyor

T0 : Tümör yok

Tis : Karsinoma in situ ve/veya tümoral kitle yapmayan Paget kanseri

T1 : Tümör büyüklüğü 2 cm veya daha azdır

T2 : Tümör büyüklüğü 2 cm' den fazla fakat 5 cm' den azdır

T3 : Tümör büyüklüğü 5 cm' den fazla

T4 : Göğüs duvarı veya meme cildine yayılım gösteren herhangi bir büyüklükteki tümörü ifade eder. (kostalar, interkostal kaslar ve musc. serratus ant.'a yayılım olabilir ama pektoral kaslara infiltrasyon içermez)

N : Bölgesel lenf nodları

N0 : Bölgesel lenf ganglionlarına metastaz yok

N1 : Aynı taraflı aksiller LAP hareketli

N2 : Aynı taraflı aksiller LAP' lar birbirine ya da altındaki veya üstündeki dokulara infiltre

N3 : Aynı taraflı supraklavikular veya infraklavikular LAP şüpheli veya kolda ödem

Mx : Uzak metastazın varlığı değerlendirilemiyor

M0 : Uzak metastaz yoktur

M1 : Uzak metastaz vardır

2.4.2.4. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler

Tanı konulduğunda invaziv kanserlerin yarısı metastaz yapmışken, insitu kanserlerin metastaz kapasitesi yoktur.

- 1- *Tümör çapı*: Primer karsinomun hacmi 1cm'den küçük invaziv karsinomlar lenf nod metastazlarının yokluğunda mükemmel bir sağkalıma sahiptir ve sistemik bir tedaviye gereksinim duymazlar.
- 2- *Lenf nod tutulumu ve metastazlı lenf nodlarının sayısı*: Aksiller nod tutulumu yokluğunda, beş yıllık sağ kalım oranı %90'a yaklaşır. Her tutulan lenf nodu ile birlikte sağkalım oranı azalmaktadır ve 16 yada daha fazla lenf nodu tutulumlu vakalarda bu oran %50'nin altındadır. Tam bir aksiller diseksiyon yerine mobiditesi daha az alternatif yöntem olarak sentinel nod biyopsileri ileri sürülmektedir.
- 3- *Tümörün derecesi*: Meme kanserlerinin derecelendirilmesinde en sık kullanılan sistem ile tübül formasyonu, nükleer derece ve mitoz oranı değerlendirilerek karsinomlar üç gruba ayrılmaktadır. İyi diferansiye tümörlerin prognozu, kötü diferansiye tümörlere oranla anlamlı bir şekilde daha iyidir.
- 4- *Tümörün histolojik tipi*: Özel histolojik tipe sahip meme tümörlerinin (tübüler, medüller, lobüler, papiller, müsinöz) prognozu duktal karsinomlara oranla daha iyidir.
- 5- *Lenfovasküler invazyon*: Özellikle lenf nod metastazı olmayan olgularda tümör çevresi vasküler yapılar içerisinde tümör izlenmesi kötü prognoz belirtisidir.

- 6- *Östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığı yada yokluğu*: Reseptör pozitifliği olgunun biraz daha iyi bir prognoza sahip olduğunun bir göstergesidir. Reseptör pozitifliğinin araştırılması olgunun tedaviye yanıtı açısından önem taşır. Böyle bir antiöstrojen tedaviye (ooferektomi veya tamoxifen) en yüksek oranda (%80) yanıt östrojen ve progesteron reseptörlerin pozitif olduğu olgularda görülmektedir.
- 7- *Tümörün proliferatif oranı*: Proliferasyon, mitoz sayımı, flow sitometri ve hücre siklus proteinlerinin immunohistokimyasal belirleyiciler ile saptanabilir.
- 8- *İnflamatuvar karsinom*: Memede şişme ve deride kalınlaşma şeklinde kendini gösterir. Her zaman kötü prognozu işaret eder (10, 13, 17).

2.5. Meme Kanseri Hücre Hatları

2.5.1. MCF-7 Hücre Hattının Özellikleri

Meme kanserine model hücre hatlarından biri olan MCF-7 hücreleri, 69 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomlu beyaz ırk bir bayan hastanın meme epitel dokusundan 1970 yılında elde edilmiştir (19). Bu tarihten itibaren, östrojen reseptörü pozitif (ER+) MCF-7 hücre hattıyla daha çok hormon-bağımlı meme kanseri çalışmaları yapılmıştır (131).

Morfolojisi epitelyal olup, tirozin kinaz reseptörü ailesinden olan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi protein sentezi yapmaktadır. WNT7B onkogeninin ve HER-2 geninin ekspresyonu normaldir. MCF-7 hücrelerinin sitogenetik analizlerinde; kromozom sayılarındaki anormal artış ve azalış, hatalı eşleşmiş bazların onarım sisteminde bozukluklar görülmektedir. DNA tamir genlerindeki mutasyonlar veya tamir proteinlerinin az veya aşırı salgılanması, direnç gelişiminde önemli bir faktördür (26). Hatalı eşleşmiş bazların onarımında görev alan MLH1 ve MSH2 tamir proteinleri MCF-7 hücrelerinde mutasyona uğradığı için, hücreler antikanser ajanlara karşı direnç geliştirmektedir (26). Birçok insan kanserinin meydana gelmesinde olduğu gibi meme kanserinde de hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1' de mutasyonlar oluşmaktadır.

MCF-7 hücre hattında apoptoz mekanizmasında önemli rolleri olan kaspaz -6, -7 ve -9, Bcl-2 ekspresyonu normal şekilde olmaktadır. Ayrıca p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi de normaldir. MCF-7 hücrelerinin çoğalmasında; östrojen ekspresyonu aşırı artmış ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF' den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-ErbB-2 ekspresyonu görülmektedir (27,28).

2.5.2. MDA-MB-231 Hücre Hattının Özellikleri

MDA-MB-231 hücreleri 51 yaşındaki meme adenokarsinomalı bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (29). Meme kanseri hücrelerinin göç, çoğalma ve invazyon gibi özelliklerini modelleyen bu hücre hattı, metastatik kanseri *in vitro* koşullarda çalışılmak için uygun bir modeldir.

Östrojen reseptör negatif olan MDA-MB-231 hücreleri normal meme hücrelerinin gösterdiği özelliklerini kaybetmiştir (133).

Hem MCF-7 hem de bu hücre hattında WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcut olup HER-2 geninin ekspresyonu da normaldir. Epitelyal morfolojide olan MDA-MB-231 hücreleri, EGF ve TGF α gibi büyüme faktörleri sentezler. Ayrıca, tümör baskılayıcı gen, p53, MMP-1, 2 ve 9 ve vimentin gibi invazyon faktörlerinin de ekspresyonu vardır (30, 31). MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen bu değişimler, tümör ilerlemesi, metastaz oluşumu ve apoptoza direnç kazanmasıyla ilgilidir (32, 33).

MCF-7 hücre hattında p53 ekspresyonu normal iken, bu hücre hattında aşırı olmaktadır (34, 35, 36). Mutant p53 geni içeren MDA-MB-231 hücreleri, erken tümör gelişiminde apoptozdan kaçmaktadır (37).

Epitelyal özellik gösteren her iki hücre hattının da *in vitro* koşullarda çoğaltıldıklarında bazı farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. MCF-7 hücreleri küme oluşturarak çoğalırken, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre göçü daha fazladır ve daha hızlı çoğalmaktadırlar.

2.6. Anjiyogenez Ve Tümör Anjiyogenezi

Anjiyogenez, var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi olarak tanımlanmaktadır (38). Anjiyogenez, fizyolojik ve patolojik anjiyogenez olarak iki kısımda incelenebilir. Fizyolojik anjiyogenez; yara iyileşmesi, menstrüel siklusta korpus luteum oluşumunda, embriyogenezin implantasyon ve plasentasyon süreçlerinde ve gebelikte izlenir.

Patolojik anjiyogenez; inflamasyon, tümör gelişimi, kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit), diabetes mellitus (retinopati), myokard infarktüsü ve iskemi gibi hastalıklarda gözlenmektedir.

Anjiyogenez, aktivatör ve inhibitörler arasındaki dengenin genetik ve çevresel etkenlerle bozulması sonucunda, özgün büyüme faktörlerine endotel hücrelerinin cevabı ve çoğalma kapasiteleri ile hücre dışı matriks proteinlerine bağlı olarak gelişmektedir (39-41).

Sürecin üç fazı vardır;

1- Başlangıç, 2- Çoğalma ve yayılım, 3- Olgunlaşma.

KontROLSÜZ anjiyogenez, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki dengenin bozulmasıyla meydana gelir. Anjiyogenezi etkileyen faktörler arasındaki dengenin anjiyogenez aktivatörleri lehine değişmesi tümör büyümesi ve invazyonu için gerekli en önemli adımdır ve çeşitli basamaklardan oluşur.

Bu basamaklar ;

1. VEGF ve NO'nun önemli olduğu vazodilatasyon,
2. Matriks metalloproteaz (MMP)'lerin (Tip-IV kollajenazlar, gelatinazlar, MMP-2 ve MMP-9) rol oynadığı bazal membran ve matriks yıkımı,
3. Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu,
4. Lümen oluşumu (tüp formasyonu),
5. Maturasyon (olgunlaşma ve kan akımı).

Tümör ilişkili anjiyogenezin bu basamakları; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna aracılık eden hücre dışı matriks bileşenlerine bağlıdır (39).

Anjiyogenez, meme kanserinde hem lokal tümör büyümesi hemde uzak metastaz açısından çok önemli bir rol oynamaktadır (40). Meme kanser

dokusuna bitişik hiperplastik mürin meme papillomları ve histolojik olarak normal lobüller şeklinde oluşturulan prelinik modeller anjiyogenezin meme hiperplazisinin tümöre dönüşmesine öncülük ettiğini göstermiştir (41). Tümör hücrelerine anjiyogenezi uyaran peptidlerin transfeksiyonu; tümör büyümesi, invazyonu ve metastazı arttırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan, anjiyogenez inhibitörlerinin tümör hücrelerine transfeksiyonu büyümeyi ve metastazı azaltmıştır (42). Klinikopatolojik korelasyon da anjiyogenezin meme kanseri ilerlemesindeki merkezi rolünü doğrulamaktadır. Yüksek vasküler dansiteye sahip fibrokistik lezyonlar meme kanseri riski ile önemli ölçüde ilişkilidir (43). Histopatolojik olarak duktal karsinoma in situ lezyonlarında artmış mikrodamar dansitesi ve artmış VEGF ekspresyonu gösterilmiştir (44).

2.7. Anjiyogenik Yolaklar

Fizyolojik proanjiojenik ve anti anjiyogenik faktörler arasında ince bir denge vardır. Tümörün proliferasyonuna bağlı gelişen tümör içi asidite, inflamasyon ve hipoglisemi de anjiyogenezi uyarmaktadır. Anjiyogenik tümör fenotipi; yüksek mikrodamar yoğunluğu ile karakterizedir. Aynı zamanda anjiyogenik fenotip kötü prognoz ile de ilişkilidir. Anjiyogenezde birçok ajan rol alır. Bu ajanlar tümör hücreleri, monosit ve fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden yada kollojen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkabilirler (45).

Bazı önemli anjiyogenik yolaklar **Tablo 2.7.1'de** özetlenmiştir.

Tablo 2.7.1. Önemli Anjiyogenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları (39).

FAKTÖR	ETKİ MEKANİZMASI
Vascular Endothelial Growth factor (VEGF)	Endotelyal mitojen, Yaşam süresi faktörü, Permeabilite arttırıcı
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF / FGF-2)	Endotelyal mitojen, Anjiyogenez arttırıcı Yaşam süresi faktörü, Flk-1 Ekspresyon indükleyici
FGF-1, FGF-3, FGF-4	Endotelyal mitojen Anjiyogenez arttırıcı
Transforming Growth Factor - α (TGF- α)	Endotelyal mitojen Anjiyogenez arttırıcı VEGF ekspresyonu indükleyici
Epidermal Growth Factor	Zayıf endotelyal mitojen VEGF ekspresyonu indükleyici
Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor (HGF/SF)	Endotelyal mitojen, Anjiyogenez arttırıcı
Transforming Growth Factor - β (TGF- β)	Endotelyal büyüme inhibisyonu Anjiyogenez arttırıcı VEGF ekspresyonu uyarıcı
Tumor Necrosis Factor - α (TNF- α)	Endotelyal mitojen Anjiyogenez arttırıcı VEGF ekspresyonu uyarıcı
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	Endotelyal mitojen Endotelyal motilite faktörü Anjiyogenez arttırıcı

2.7.1. VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor)

Anjiyogenik moleküller içinde anjiyogenezin en potent uyarıcısı ve üzerinde en çok durulanı VEGF' dir. Tümör progresyonuna bağlı gelişen hipoksik durumlarda anjiyogeneze VEGF aracılık etmektedir. VEGF homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya da aminoasit sayılarına göre 121, 165, 189, 206 ve 145 gibi isoformları bulunmaktadır (38,46). VEGF endotel hücrelerinde etkisini gösterebilmesi için temel olarak üç reseptöre bağlanmaktadır. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir (46).

Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır, lenfanjiyogenezden sorumludur. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; MAPK-kinaz bağımlı fosfolipaz A₂, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin çoğalma, göç ve diferansiyasyonunu sağlar. VEGF ayrıca anjiyogenezin VEGF-bağımlı bir mediyatörü olan nitrik oksid (NO) salınımını arttırmaktadır. VEGF'in NO sentaz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO endotel hücre göçünde rol alır. Başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, FGF, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır. Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF' e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon ve veziküler organeller böylece vasküler permeabiliteyi arttırmakta ayrıca kemik iliğinden endotelial öncü hücrelerin de periferik dolaşıma geçmesinde önemli rol oynamaktadır. Endotel hücreleri için göç özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matris yıkımından sorumlu olan MMP'lar ile ürokinaz, kollojenaz ve plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (38, 46, 47).

2.7.2. Tie (Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology)

VEGF reseptörlerine benzer olarak bir diğer grup reseptör tirozin kinaz üyesi de anjiyogenez oluşumuyla ilgilidir. Bu grup, endotele özgü Tie (Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology) reseptör ailesi olarak bilinir. Tie1 ve Tie2 reseptörleri özellikle endotel hücreleri üzerinde bulunur ve embriyonik vasküler yapının gelişmesi için gereklidirler (46, 48). Bu reseptörler anjiyogenezi endojen olarak artmasını sağlayan Angiopoietin-1 (Ang-1)' in reseptörleridir. Ang-1 kapiller damarları güçlendirir, perisitleri düzenleyerek endotel hücrelerin yaşamasını sağlar ve yeni oluşan damar yapısını güçlendirir (46, 49). Ang-1, Tie2 reseptörü için doğal bir agonist iken Ang-2, endotel hücreleri için farklı olarak antagonist etki gösterir. Ang-1, VEGF gibi endotel hücreleri için mitojenik etki göstermeden endotel hücrelerinin kendi arasındaki ve çevredeki düz kas, perivasküler alan yada ekstrasellüler matriks ile olan ilişkisini güçlendirir. Ang2 ise Ang1'e ters etki olarak damarlanma düzenini bozar ve yoğun olarak yeni oluşan damar bölgelerinde artmış olarak bulunur. Ang2'nin bu destabilizör etkisi belki de vasküler yapıyı tümör dokusunda VEGF gibi mutajen ajanlara daha duyarlı kılmaktadır (50).

2.7.3. PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)

Timidin fosforilaz etkisi gösterir ve timidini timine defosforilleyerek serbest radikal oluşumunu artırmak süretiyle anjiyogenez genlerini aktive eder (46, 51).

2.7.4. FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2, bFGF)

FGF-2 heparine bağlanan anjiyogenik proteindir. FGF, endotel hücrelerinde çoğalma ve ambriyogenez sürecinde epiblast hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Ayrıca, bFGF doğrudan veya dolaylı olarak endotel hücre aktivitesini düzenler. Potent bir endotel hücre uyarıcısı olan bFGF; endotelde göç, çoğalma ve tüp formasyonundan

sorumludur. bFGF ile VEGF'in anjiyogenez üzerinde sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. Fakat farklı olarak bFGF'siz ortamda yapılan fare deneylerinde damar oluşumunun gözlenmesi bFGF'in özellikle erişkin vasküler yapının korunması ve yara iyileşmesinde etkili olduğunu düşündürmüştür. PDGF ve bFGF de heparine bağlı peptid yapıda büyüme faktörleri olup VEGF gibi tirozin kinaz reseptörleri üzerine etki ederek dimerizasyon, otoposforilasyon ve sonuçta mitogen activated protein kinaz (MAPK) gibi hücre içi kinazların aktivasyonunu sağlarlar. Böylece aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri uyarılarak hücre göçünü sağlayıcı genlerde cevap oluşturulur (46, 47).

2.7.5. TGF- β (Transforming Growth Factor- β)

TGF- β tümör anjiyogenezindeki rolünü endotel hücreleri üzerindeki kemotaktik etkisi ile gerçekleştirir. Bunu Tenaskin gibi endotel hücrelerinin yapışmasını ve göçünü sağlayan matris proteinlerinin yapımını artırarak gerçekleştirir. Bu sayede tümör hücrelerinin invazyon ve metastazına da olanak sağlamaktadır (52). Ayrıca VEGF ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonunu da uyararak anjiyogenezde proliferatif aşamada da rol alır (46).

2.7.6. EGF ve TGF- α

Bir tirozin kinaz reseptörü olan EGF reseptörlerine bağlanırlar. Her ikisi de endotel hücreleri için mitojenik etki göstererek anjiyogenezi uyarırlar (47).

2.7.7. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), suda çözünebilir, reseptöre bağımlı olmadan kolayca diffüze olabilen ve dayanıklı olmayan renksiz bir gaz, önemli bir haberci moleküldür (53). Kimyasal özellikleri ilk olarak 1772'de Joseph Priestly tarafından tanımlanmış ve in vivo olarak varlığı 1914' de Sir Henry Dale tarafından rapor edilmiştir (54). 1970' lerde etki mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmalar artmış ve 1987' de EDRF'nin (endotel kaynaklı gevşetici faktör) NO olduğu gösterilmiştir (55). NO moleküler oksijen, süperoksit anyonları ve hem proteinleri etkileşim gösterdiğinden biyolojik sistemlerdeki

yarılanma ömrü çok kısadır; örneğin kandaki yarılanma ömrü 10-20 saniye kadardır. NO vazodilatasyon, solunum, hücre göçü, immün cevap ve apoptoz olmak üzere çok çeşitli önemli fizyolojik olayları düzenlemektedir (53). NO yaklaşık 140 kDa molekül ağırlığında, sitokrom P450 redüktaz enzimine benzerlik gösteren karmaşık bir enzim olan Nitik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenmektedir. Bu olayda moleküler oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ise yardımcı faktörlerdir. Flavin adenin dinükleotit (FAD) ve flavin mononükleotit (FMN) ise NO sentezi için yardımcı faktörlerdendir (56).

Nitrik oksit radikali, superoksit anyon radikali (OB_2PB-P) ile peroksinitriti ($ONOO-P$) oluşturmak üzere hızla reaksiyona girer. Bu bir serbest radikal değildir fakat kısa ömürlü ve ön maddelerinden çok daha fazla aktif bir moleküldür (57). Her ne kadar peroksinitrit ($ONOO-P$) kararlı bir yapıya sahip olsa da fizyolojik pH da, protonlanması ile OH gibi davranan ve kuvvetli bir oksidan madde olan peroksinitröz asit ($ONOOH$) oluşturur ve bu konjuge asit çok kararsız olup, hızla nitrat (NO_3^-)'a dönüşür (58). NO'nun biyolojik aktivitesi cGMP-bağımlı ve cGMP-bağımsız yollar olarak sınıflandırılır, her ikisi de fizyolojik ve patolojik durumlara bağımlıdır (59). cGMP-bağımlı protein kinazlar, siklik-nükleotid-geçit iyon kanalı ve cGMP-düzenlenmiş fosfodiesteraz birçok hücrel etkiye aracılık etmektedir.

Endotel hücrelerinden salınan NO'in hücre koruyucu olarak davrandığı da düşünülmektedir. Çünkü damar düz kas hücrelerinde gevşeme yaparak kan akışını arttırabilir, trombosit agregasyonunu inhibe eder, serbest radikalleri uzaklaştırır, damar endoteline lökosit adezyonunu ve damar duvarından lökosit göçünü inhibe eder (60). Diğer taraftan aktive makrofaj ve Kupffer hücrelerinden salınan NO ve metabolitleri, tümör hücrelerine sitotoksiktir ve tümör hücresi mitokondrisinin fonksiyon bozukluğuna neden olur (61).

Malign tümörlerde NO, neovaskularizasyon, damar geçirgenliğinin artması, tümör ve komşu dokuda vazodilatasyon gibi birçok olayda rol alır. Kan akımının düzenlenmesi ve damar geçirgenliğinde artma sağlayarak tümör hücrelerinin beslenmesini ve oksijen sağlanmasını kolaylaştırırken diğer yandan da lökosit endotel etkileşiminin azalması ile konakçı immün

mekanizmasını bozmaya yardım eder. NO'in tümörlerdeki bu fonksiyonları tümör gelişimini güçlü bir şekilde kolaylaştırır (62, 63).

Tablo 2.7.7.1. NOS Sınıflaması

Özellikleri	nNOS	eNOS	iNOS
Yerleşim	Sinir ve iskelet kası hücreleri	Trombositler ile endotel ve endokart/miyokart hücreleri	Makrofaj, lökosit, kondrosit, hepatosit, astrosit, fibroblast, nötrofil, eozinofil, lenfosit ve keratinositler ile damar düz kası, endotel, endokart/miyokart, mast, mikroglia, dendritik, Langerhans, Kupffer, Schwann ve sinir hücreleri
Hücre içi yerleşim	Membrana bağımlı	Membrana bağımlı (etkisiz) veya sitozolik (etkin)	Sitozolik
Başlıca fizyolojik işlevi	Sinirsel aşırım	Vazodilatasyon	Sitotoksisite
Patofizyolojik olaylardaki rolü	Müsküler distrofi, iskemi-reperfüzyon	Endotelial işlevsizlik, hiperkolesterolemi, hipertansiyon	Yangı ile belirgin hastalıklar

NOS enziminin nöronal NOS (nNOS, NOS1), indüklenebilir NOS (iNOS, NOS 2) ve endotelial NOS (eNOS, NOS3) olmak üzere üç değişik izoformu bulunmaktadır. Her üç izoformunda benzer yapı ve katalitik durum içermektedir. Tüm NOS'lar aktiviteleri için benzer miktarda L-arginin, BH4 ve NADPH gerektirmektedir. NOS izoformları transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyeleri farklı açılardan düzenlerler (64).

nNOS (NOS1) ; Aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. Santral ve periferik sinir sisteminde nörotransmitter ve hücre içi sinyal molekülü gibi hareket

etmektedir. Daha çok nöral dokularda bulunmakta ve ilk olarak nöronlardan identifiye edilmiştir. Lokalizasyonu membrana bağlıdır. İnme ve nörodejeneratif hastalıklarda nörotoksik bir medyatördür (64, 65).

iNOS (NOS2) ; Aktivitesi kalsiyumdan bağımsızdır. 17. kromozomdaki genlerce kodlanır. Lokalizasyonu sitozoldür. İlk olarak makrofaj ve monositlerden identifiye edilmiştir. Kardiyomyosit, hepatosit, nöron, mikrogliyal hücreler, nötrofiller, vasküler endotel hücre ve düz kas hücresinde bulunur. Endotoksin, interlökin1 (IL-1), gama-IFN, TNF-alfa, iNOS'u indükleyen ajanlardır. Glukokortikoidler, IL-4, IL-10 ise mRNA transkripsiyonunu inhibe eden ajanlardır. iNOS için en önemli indüksiyonu sitokinler yaparlar ve uzun bir zamanda fazla miktarda NO üretimi gerçekleşir (66). nNOS ve eNOS kısa zaman aralığı için az miktarda NO üretirken, iNOS için önce transkripsiyonal aktivasyon oluşur ve saatlerce süren, geniş miktarlarda NO üretimi oluşur (64).

eNOS (NOS3) ; Aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. İlk olarak endotelden identifiye edilmiş olup trombosit, myokard hücresi, endokard hücresi, mast hücre ve nötrofillerde de bulunur. Sitokrom p- 450 redüktaz ile yüksek düzeyde homoloji gösterir. Hücre membranına yerleşmiştir eNOS ve nNOS içeren hücreler, damar endotelinde asetilkoline, beyinde glutamata cevap olarak fizyolojik miktarlarda NO üretirler (67).

iNOS' un salınımı inflamatuvar uyarı ile artarken nNOS ve eNOS esas olarak daha fazla veya daha az salınabilir (68). NOS substrat olarak yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjinini kullanır ve ürün olarak NO ile L-sitrülin oluşur (69-71).

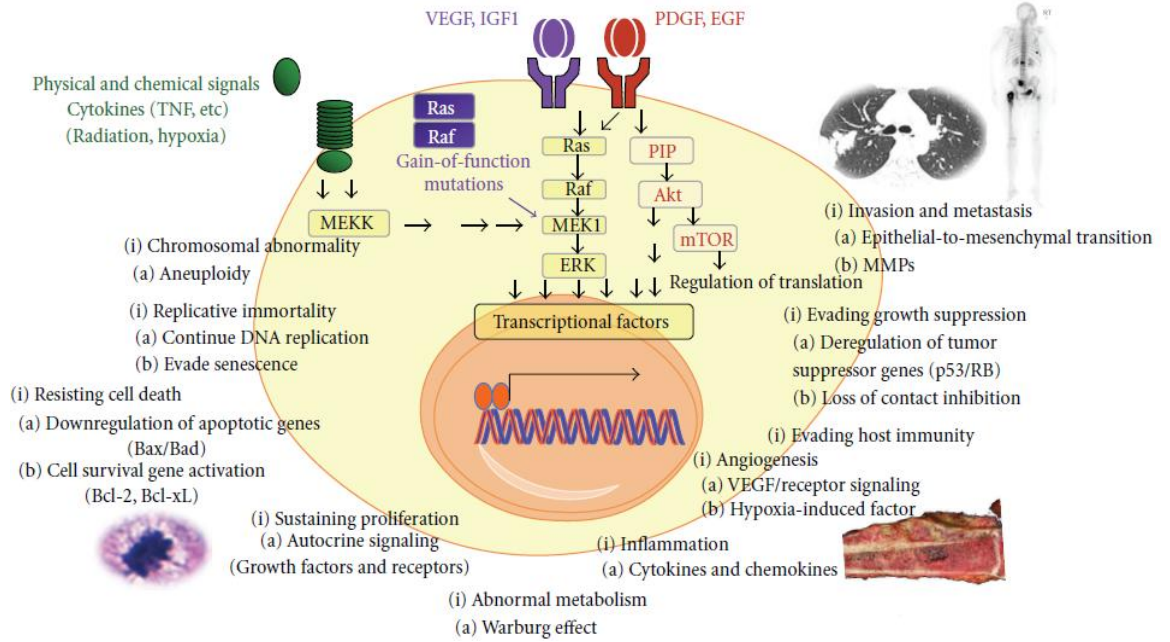
Kronik inflamasyon, tümör gelişimini ve kanserin ilerlemesini arttırmaktadır (72). iNOS, izoformu tarafından üretilen NO kronik inflamasyon ile kanserin ilerlemesini sağlayan önemli bir proinflamatuvar medyatördür (73). iNOS salgısının artması prekanseröz lezyonlarda tanımlanmıştır ve çok sayıda çalışma iNOS'un potansiyel bir kanser biyobelirteci olarak kullanıldığını, tümör dokusunda yüksek iNOS sentezinin melanom, prostat ve meme kanseri gibi birçok kanser tipinde hastanın kötü prognozu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (74, 75).

Daha yakın zamanlarda, iNOS salınımının tümörün derecesi, mutant p53, ve tümör mikrovaskülarizasyonu gibi yaşam süresini gösteren belirteçler ile direkt korelasyon gösterdiği ve kötü prognozlu meme kanserine sahip ER negatif kadınlarda spesifik yaşam süresini beş ve on yıl olarak belirleyen bir belirteç olduğu bulunmuştur (76).

2.7.8. ERK1/2 (Extracellular Receptor Kinase)

MAPK yolağı, hücre dışı düzenlenen protein kinazlar (ERK) olarak da bilinmektedir. MAPK'lar üç farklı fosforillenme aşaması geçirerek düzenlenmektedir. En üstte bulunan MAPK kinaz kinaz (MAPKKK-REF) bir serin-treonin kinazdır ve enzimle aktivasyonu ile bir sonraki MAPKK-MEK aşamasını düzenler. MEK tirozin ile fosforillenerek, sinyal iletiminin başlıca efektör proteini olan MAPK'ı aktive eder. MAPK sadece sitoplazmik bir protein değildir, aynı zamanda çekirdeğe girerek gen transkripsiyon faktörlerini fosforile eder. Memelilerde ERK1/2, ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, p38MAPKg, ERK7, ERK8, JNK 1/2/3 ve p38MAPKa/b/d olmak üzere 9 farklı MAPK tanımlanmıştır. JNK hücre içi sinyal yollarında özellikle hücre döngüsünde G1-S fazına geçişte ve apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (77).

MAPK/ERK yolağı onkogenik büyüme faktörü ve proinflamatuvar uyarıcı olarak bilinen birçok sinyale aracılık etmektedir. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen MAPK/ERK yolağı, proinflamatuvar uyarıcılar ve mutasyona uğramış Ras/Raf yolağı kanser hücrelerinde karakteristik fenotipik değişikliklere öncülük ederler (78) (**Şekil 3**).



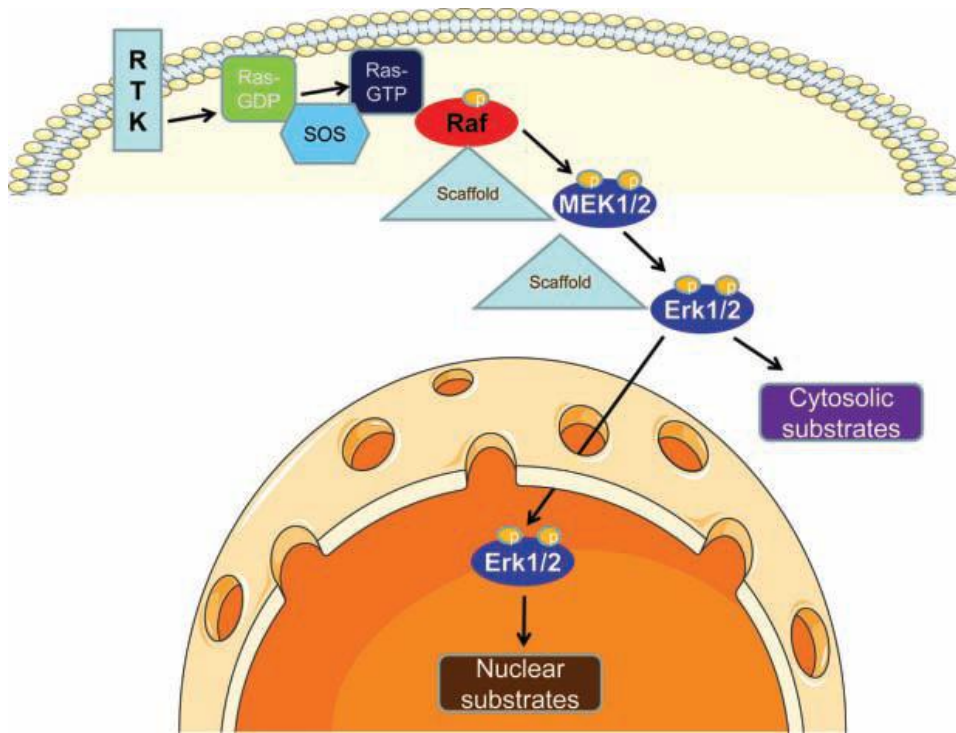
Şekil 3: MAPK/ERK sinyali ve kanser belirteçleri (78).

MAPK sinyal yolu, normal hücrelerde olduğu gibi birçok kanser hücresinde de proliferasyon için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerinden oluşmaktadır. Tüm Raf proteinleri MEK1/2 kinazı substrat olarak paylaşırlar. MEK1/2 ERK1/2'yi aktive etmekte ve bu yolakta birçok hücre proliferasyonu, diferansiyasyon, göç ve apoptoz gibi birçok hücre fonksiyonu düzenlemektedir (79,80). Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) proteini Ras ve MEK-ERK yolları arasında önemli bir bağlantı olarak yer alır. Normal hücrelerde büyüme faktörlerince aktive edilmiş reseptör tirozin kinazlarca (RTK lar) oluşturulan sinyalleri çekirdeğe ileterek gen ekspresyonunun aktivasyonuna yol açarlar (**Şekil 3**).

Geniş bir aralıkta yer alan çok çeşitli diğer hücre dışı ve hücre içi uyarılarca da aktive edilebilirler ve değişmiş gen ekspresyonuna ilave olarak etkiyi ortaya çıkarırlar. Tümör hücrelerinde, RTK lar veya RAS'ın onkogenik aktivasyonu sonucu MAPK sinyalleşmesi sıklıkla artmıştır. Bu MAPK yolağı aynı zamanda klasik mitojenik kaskad veya standart yolak olarak da düşünülmektedir (81).

Reseptör tirozin kinazın (RTKs) aktive olması Ras proteini GDP'nin GTP'ye dönüşmesini aktive eden SOS faktörünü kuvvetlendirir. Aktive olan Ras-GTP Raf'a bağlanarak bunu aktive eder. Aktif olan Raf, MEK'i fosforiller, bu da ERK'i fosforilleyerek aktive eder. Raf, MEK ve ERK fosforilasyon kaskadı tek dizi iken, ERK hem çekirdek, hem de sitozolde bulunan 150'den fazla substrat ile ilişkilidir (82).

Kanser hücrelerinin anjiyogenik yollara etkisi ile PKA bağımlı olan MAPK yolağı aktive olmakta ve hücrede gen ekspresyonu ve DNA sentezi uyarılmaktadır (83). Standart yolak gibi, bu modüller hücre proliferasyonunu, apoptozu, hücre farklılaşmasını veya spesifik hücre fonksiyonlarını uyarabilir (84) (**Şekil 4**).



Şekil 4. Ras-Raf-MEK-ERK yolağının prototipik görüntüsü (84).

İnsan kanserlerinde bileşenleri arasında primer bir mutasyon hedefini içeriyor gibi görünmemektedir. İlginçtir ki farklı MAPK yolları arasında örneğin MAPKK'lar seviyesinde çeşitli çapraz iletimler mevcuttur.

Bunlara ek olarak JUN proteini transkripsiyonal olarak ERK-MAPK yolağınca uyarılırken; JUN kinaz (JNK) MAPK yolağının aktivasyonu sonucu fosforile edilir. Böylece, normal hücre proliferasyonu esnasında bu iki MAPK yolağı sinerjistik olarak çalışırlar. Hem ERK ve hem de JNK MAPK yolakları RAS proteinlerince aktive edilebilirler (85).

İnsan kanserlerindeki yüksek RAS mutasyonu prevalansı, kanser hücrelerinin temel özellikleri ile ilişkili çeşitli yolakların merkezi düzenleyici işlevi ile açıklanmıştır. Bu çeşitli etkiler arasında, RAS'ın artmasını uyarıcı reseptör tirozin kinazların onkogenik aktivasyonunda olduğu gibi; ERK-MAPK yolağının aktivasyonu RAS mutasyonu olan kanserlerde hücre çoğalmasının uyarılması için en gerekli bileşenlerden biri gibi görünmektedir. Bu görüşü destekleyen birçok kanıttan biri, çeşitli kanserlerde özellikle melanomda öne çıkan RAS ve BRAF genlerinde karşılıklı ortaya çıkan mutasyonlardır (86).

GTPas'ın Ras süperailisi hücre çoğalması ve farklılaşmasını içeren çok önemli düzenleyici anahtardır. Onkogenik Ras mutasyonu %5'den daha az meydana gelmektedir ve Ras proteininin fazla ekspresyonu meme kanserinde tanımlanmıştır. Rac ve Rho proteinlerinin fazla ekspresyonu metastatik meme kanseri ve invaziv potansiyelin artışı ile ilişkili görülmüştür. Ras proteinleri meme kanserinde HER1, HER2, IGF-1 ve ER α gibi büyüme faktör reseptörleri tarafından uyarılmaktadır. Ras sırasıyla hücre yaşam süresi ve çoğalmasını sağlayan Raf/MEK/ERK ve PI3K/Akt kinaz kaskatını aktive etmektedir (87).

Onkogenezi yöneten moleküler yolakların anlaşılmasının artması ile modern hedef tedavi rejimleri güncel tedavi modellerinin etkisini arttırabilir. MAPK-ERK kanserin belirleyicileri olan proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve inflamatuvar cevap gibi onkogenik fenotiplerin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Bu nedenle, MAPK/ERK inhibitörleri belli kanser tiplerinde umut verici hedef tedaviler olarak ortaya çıkmıştır (88).

2.8. İlaçlar

Anjiyogenez gelişimi, tümör gelişen hastalarda prognostik önemini korumakta ve kansere karşı verilen savaşta önemli bir hedef olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada antikemoterapötik tedavi yanı sıra anti anjiyogenik tedavi olarak yeni uygulamaya giren talidomidin ve henüz hemanjiyom olgularında hemanjiyomun küçülmesine neden olduğu bildirilen propranolol uygulamalarının meme kanseri tedavisindeki yeri ve etki mekanizmaları moleküler düzeyde araştırılmış olacaktır. Meme kanseri tedavisinde antikemoterapötik ve anti anjiyogenik tedavinin moleküler mekanizmalarına ışık tutulacaktır.

2.8.1. Paklitaksel

Paklitaksel, çeşitli solid tümörlere karşı aktif kemoterapötik bir ajan şeklinde, belli kanser türlerine karşı da radyoterapinin duyarlılığını arttırmak üzere kullanılan ve *Taxus brevifolia* isimli pasifik porsuk ağacının kabuklarından elde edilen sitotoksik etkili bir ajandır (89). Taksan diterpenoid ailesine bağlı bu ilacın adı Taksol® olarak da bilinmektedir (90).

Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları

Kemoterapi vücudu saran mikroorganizmaları veya parazitleri konakçıya zarar vermeden yok edebilen veya gelişmelerini durdurabilen ilaçlarla yapılan tedavi şeklidir.

Sadece çoğalmakta olan hücrelere etkili olan kemoterapötik ilaçlara; döngüye spesifik ilaçlar denir. Döngüye spesifik olmayan ilaçlar, çoğalmakta olan hücrelere daha etkili olmalarına karşın büyüme hızı düşük olan tümörlerin tedavisinde etkilidirler. Kanser tedavisinde yararlanılan ilaçlar daha farklı mekanizmalarla da etki göstermektedirler. Bu ilaçların başlıcaları (91) şöyle sıralanabilir; **(Tablo 2.8.1.1)**

- a-) Pürin ve pirimidin nükleotid prekürsörlerinin sentezini engelleyerek ya da DNA ve RNA sentezinde bunların yerlerini alarak etki gösteren ilaçlar
- b-) DNA fonksiyonlarını bozarak etki gösteren ilaçlar
- c-) Hücre yapısındaki nükleofilik gruplara kovalent bağlarla bağlanarak etki gösteren ilaçlar

d-) Mikrotübüllerin polimerize ve depolimerize şekilleri arasındaki dengeyi bozarak etki gösteren ilaçlar.

e-) Hormon uyarısı ile sitoplazmik reseptörlere bağlanıp gelişme ve büyüme hızını yavaşlatarak etki gösteren ilaçlar.

Farklı etki mekanizmalarına sahip kanser ilaçları Tablo 'da görüldüğü gibi altı grupta toplanabilir.

Tablo 2.8.1.1. Kanser İlaçlarının Sınıflandırılması

Antimetabolitler Sitarabin Fludarabin 5-florourasil 6-merkaptopürin Metotraksat 6-Tiyoguanin	Antibiyotikler Bleomisin Daktinomisin Daunorobisin Doksorubisin İdaurubisin Plikamisin	Alkilleyici ilaçlar Korbustin ve Lomustin Siklofosfamid ve Mekloreタミン Streptozotosin
Mikrotübül İnhibitörleri Novelbin Paklitaksel (Taksol) Vinblastin	Steroid Hormonlar ve Antagonistleri Amino glutetimidler Estroj enler Flutamid Prednizon Löprolid	Diğerleri Asparaginaz Sisplatin ve Kaboplaün Estopozid İnterferonlar Radyoaktif İzotoplar

Genel olarak bütün bu ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak pratikte ilaçlar kanser hücrelerine seçici etki göstermemekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri ise etkilemektedir (91).

Mikrotübüller, α ve β alt ünitelerinden oluşan, tübülün heterodimerlerinin dinamik bir denge içinde polimerleşmesinden oluşan hücresel yapılardır. Bu yapılar, esas olarak hücre bölünmesi sırasında mitotik apareyin oluşumunda rol oynamakla birlikte, hücre içi protein, vezikül, mitokondri ve diğer komponentlerin transportu, sinyal iletimi, hareket (motilite) yeteneği ve hücre şeklinin korunmasını içeren çok sayıda vital interfaz reaksiyonlarından da sorumludurlar (92).

Ayrıca mikrotübül dinamiklerinin baskılanması p53 gibi transport proteinlerin interfaz mikrotübül fonksiyonlarını bozmaktadır (93). Mikrotübüller taksanlar, epotilonlar ve Vinka alkaloidleri gibi antikanser ilaçlar için hedeftirler. Paklitaksel, hücresel tübülün yapısına bağlanıp, hücre bölünmesi ve diğer hücresel fonksiyonlarda önemli bir kademe olan mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübül yapısını stabil hale getirmektedir (94). Bunun sonucu olarak, hücrelerin G2/M fazında birikmesi ile hücre siklusu bloke olmaktadır (95).

Mikrotübül dinamiği, hücre proliferasyonunda önemli bir rol üstlenirken, mikrotübül dinamiğinin inhibisyonu ise birçok anti-mitotik bileşiğin anti-tümör etkilerinin mekanistik temeli olarak görünmektedir (96).

Paklitaksel (Taxol) küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde umut verici olmuştur. Paklitaksel mikrotübül ayrılmasını önlemekte ve apoptoz ile hücre ölümünü indüklemektedir. Paklitaksel ile tedavi edilmiş tümör hücreleri hücre döngüsünün G2-M fazında arrest olmakta bu da apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (97). Paklitaksel meme kanseri ve diğer birkaç solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (98).

Dosetaksel ve paklitaksel metastatik meme kanserinde tek başına kullanılan aktif maddelerdir. Özellikle her ikisinin de antrasiklin ile uygulanan standart tedavinin başarısız olduğu hastalarda belirgin etkinlikleri görülmüştür (99).

Paklitaksel'in meme kanserine karşı antitümör etkisinin belirlenmesi için çeşitli tedavi şekilleri denenmiştir. İlk olarak 1991 yılında tek başına paklitaksel kullanılmasıyla metastatik meme kanserinde % 56 oranında bir cevap elde edilmiştir. Paklitaksel alan hastalarda yapılan çalışmalarda genel olarak cevap oranları ilk basamak metastatik tedavide % 32-62, ikinci veya daha sonraki basamaklarda ise % 21-48 olarak bulunmuştur. Paklitaksel'in optimum dozu ve tedavinin uygulanış şekli halen tartışmalıdır (100).

Paklitaksel'in faz II çalışmaları sırasında etkili olduğu saptandığı ilk tümör tiplerinden birisi ovaryum kanseridir. Paklitaksel ovaryum kanserlerinin primer ve sekonder basamak tedavilerinde etkili bir bileşik olarak bulunmuştur. Daha önce platinyum ile tedavi edilmiş hastaların paklitaksel ile tedavilerinde % 20-

37 oranında yanıt alınmıştır. Paklitaksel ve sisplatin daha önce hiç tedavi almamış hastalarda faz III çalışmalarında kullanılmıştır. Bu şekilde kullanımı standart sisplatin-siklofosamid tedavisi ile karşılaştırılmış, paklitaksel verilen grupta daha iyi sonuç alınmıştır. Son yıllarda paklitaksel ovaryum kanserlerinin tedavisi için en uygun bileşik olarak bildirilmiştir (101). Faz I ve II çalışmalarında paklitakselin belirlenen yan etkileri, kemik iliği baskılanmasına bağlı olarak gelişen nötropeni, saç dökülmesi, gastrointestinal sistem etkileri ve HSR'dir. Nötropeni her iki ilaç içinde doz sınırlayıcı bir toksisitedir (102).

2. 8. 2. Antianjiyogenik ilaçlar

Genellikle tümörlerin büyüme hızı erken dönemde yüksektir. Ancak büyümeye devam ettikçe beslenmesini ve oksijen ihtiyacını karşılayacak olan damarsal yapılar aynı hızla gelişmediğinden tümörün büyüme hızı giderek yavaşlar. Bu şekilde malign tümörlerin hem büyüme hızını ve hem de varlıklarını sürdürmelerini sağlayan damarların oluşumunun önlenmesi ve hatta ortadan kaldırılması, son zamanlarda kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak anjiyogenezi ve antianjiyogenik ilaçların geliştirilmesini gündeme getirmiştir (103).

Etki mekanizmaları farklı çok sayıda anti anjiyogenik ajan üzerinde klinik çalışmalar devam etmektedir. Bu ajanlar etkilerini VEGF, COX-2 ve diğer farklı yollar üzerinden göstermektedirler (**Tablo 2.8.2.**).

Tablo. 2.8.2. Antianjiyogenik Ajanların Etki Mekanizmaları

Antianjiyogenik Ajanların Etki Mekanizmaları	
VEGF yolunun inhibisyonu	Diğer inhibisyon yolları
1)Tirozin kinaz inhibitörleri	1)EGFR inhibitörleri İntegrin antagonistleri
2)Monoklonal antikolar -Bevasizumab	2)Endojen anjiyogenez inhibitörleri
3)VEGF yolunu farklı yollardan inhibe edenler -Hücre sel immünoterapi	3)Tirozin fosfataz inhibitörleri 4)Talidomid 5)Raf-1 yolu

2.8.2. 1. Propranolol

Propranolol, beta adrenerjik antagonist, β_1 ve β_2 -adrenoreseptörü aynı affinite de inhibe eden, ve genellikle hipertansiyon hastalığının tedavisinde kullanılan selektif olmayan bir beta blokör ilaçtır (104). Başarılı bir şekilde geliştirilen ilk beta blokördür. Propranolol parsiyel agonistik etkileri olmayan saf antagonisttir. Lipofilik özelliklerinden dolayı membran-stabilize edici karakterde göstermektedir (105).

Yaygın olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılan non-selektif β -adrenerjik reseptör antagonisti (β -AR) olan propranololün etkisi son zamanlarda keşfedilmiş olup 4 yıldır şiddetli infantil hemanjiom vakalarının tedavisi için uygulanmaktadır (106). 20 yıl öncesindeki ilk kaynaklar β -ARs'ün kanserin ilerlemesindeki rolünü bulmuş olmasına rağmen (107) propranololün hemanjiyom tedavisindeki rolü tesadüfi olarak gözlenmiş ve β -blokörde denilen β -ARs antagonistlerinin antianjiyogenik ve anti-kanser özellikleri keşfedilmiştir. Bir takım in vitro çalışmalar propranololün özellikle

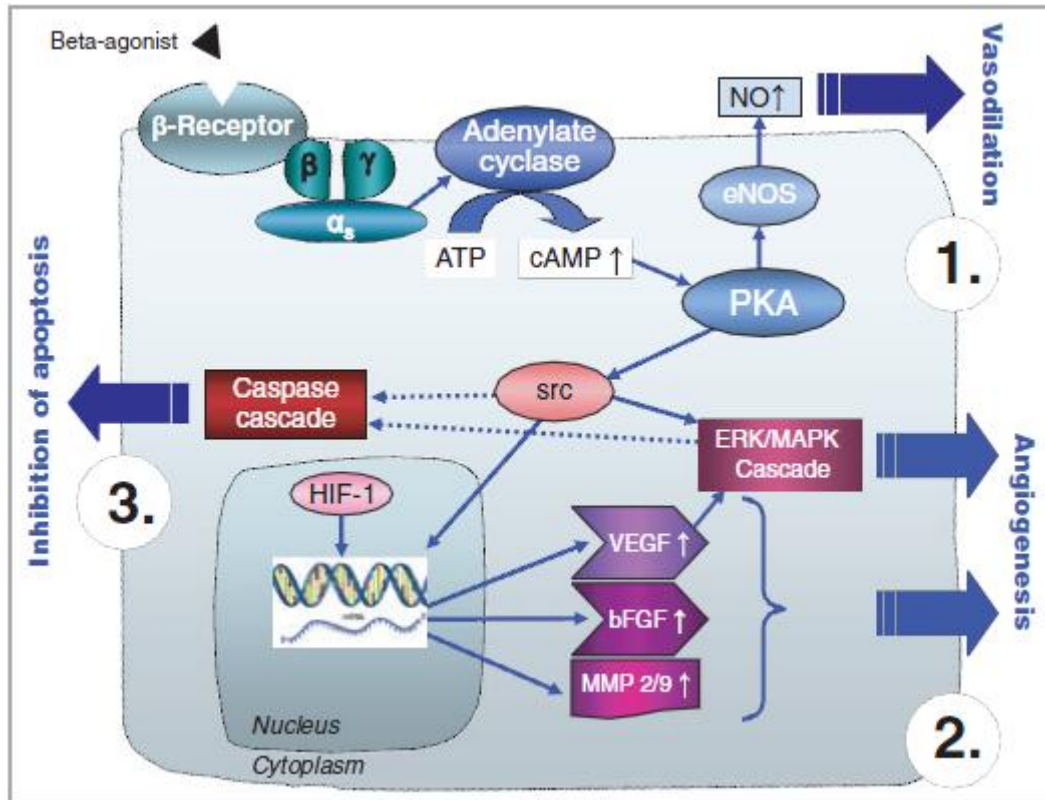
akciğer adenokarsinomu, kolon kanseri, meme kanseri, over kanserine karşı anti-proliferatif, göç önleyici ve sitotoksik özelliklerini göstermiştir (108). Propranololün in vitro güçlü antianjiyogenik etkisi vasküler endotel hücreler üzerindeki mekanizmalarla ve hem stromal hem de kanser hücrelerinde pro-anjiyogenik sinyali azaltması ile meydana geldiği bulunmuştur (109). Kansere karşı olan bu umut verici durumlar insan kanserlerinin in vivo farklı hayvan modellerinde uygulanmasıyla da doğrulanmıştır (110). Propranololün kimyasalla indüklenmiş akciğer ve pankreas kanseri modellerinde kanseri güçlü önleyici etkisi bulunmuştur (111). Ayrıca, yeni bulunan prelinik meme, over kanseri modellerinde propranololün özellikle stresle indüklenmiş tümör büyümesini ve metastatik yayılımı antianjiyogenik ve immunbaskılayıcı mekanizmalar ile inhibe ettiği gösterilmiştir (112).

Hemanjiomlar bebeklik çağının en sık görülen iyi huylu damarsal tümörleri olup damarların endotel denilen iç çeper hücrelerinde hızlı hücre çoğalması tipik özellikleridir. Hemanjiomlar tüm infantların %5-10 ile prematür bebeklerde %30'un üzerinde görülmektedir. Kız bebeklerde, prematüre doğanlarda, doğum ağırlığı 1500 gram'ın altında olanlarda daha sık görülürler (113). İnfantil hemanjiomlar asemptomatik olabilen veya fonksiyon kaybına neden olan ya da hayatı tehdit edici komplikasyonlara kadar değişik klinik tablolarda karşımıza çıkabilir. Subglottik ve trakeal infantil hemanjiomlar hayatı tehdit edici tümörlerdir. Baş ve boyunda yer alan kutanöz hemanjiomlar ise estetik sorunlara veya hastamızda olduğu gibi fonksiyon kaybına neden olabilir, (114) yinede infantil hemanjiomların %85-90'ı sonuçta spontan olarak gerilemektedir. Hemanjiomların medikal tedavisinde steroidler, lazer cerrahisi, vinkristin, interferon veya siklofosamid kullanılsa da son yıllarda nonselektif bir beta-bloker ajan olan propranolol ile oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (115). Propranolol tedavisi komplikasyon oranının düşük olması, noninvaziv olması, tedaviye yanıtın hızlı olması ve ucuz olması nedeniyle ilk seçenek olarak kullanılmaktadır (116).

İlk kez 2008 yılında Leaute ve Lebreze tarafından kutanöz infantil hemanjiomu olan hastalarda kullanılmış ve oldukça etkili olduğu görülmüştür

(114). Propranolol hemanjiom içinde vasokonstrüksiyona neden olur. Tedaviden hemen sonra 1-3 gün içinde erken dönem etkisi nitrik oksit salınımının azalmasına bağlı olarak tümör renginde solma ve palpasyonla yumuşama fark edilir. Orta dönem etkisi proanjyogenik sinyallerin bloke olmasıyla (VEGF, bFGF, MMP2/9) büyümenin gerilemesi görülmektedir. Uzun dönem etkisinde ise endotel hücrelerinde apoptozun artmasıyla karakterize tümörün gerilemesi meydana gelmektedir (113).

Propranololün İH'da kullanılmasının yanı sıra son çalışmalarda bu ilacın nöroendokrin düzenlemeye, adrenerjik nörotransmitterler olan epinefrin ve norepinefrin salınımına ve sempatik sinir sistemi aktivasyonuna etkisi açısından meme kanseri ilerlemesini önleyici etkisine odaklanılmıştır. Bu çalışmalar adrenerjik sinyalin direk tümör hücresine veya mikroçevreye etki ederek meme kanseri ilerlemesi ve metastazında gerekli olan birçok yolu düzenlediği gösterilmiştir (117) (**Şekil 5**).



Şekil 5: İnfantil hemanjioma (İH) propranololün etki ettiği moleküler süreç (113).

Şekilde beta-adrenerjik antagonistin yokluğunda İH'un patofizyolojik durumu açıklanmaktadır. 1) Vasküler tonusun kontrolü: Beta adrenerjik agonist NO salınımı ile vazodilatasyona sebep olmuştur. Bunun tersine propranolol gibi bir beta-adrenerjik antagonist ise NO salınımını durdurarak vazokonstriksiyona sebep olacaktır. 2) Anjiyogenez: Beta adrenerjik agonist proanjiyogenik faktörleri [büyüme faktörleri (VEGF and bFGF) ve (MMP-2 and MMP-9)] proanjiyogenik kaskadı aktive ederek (ERK/MAPK kaskad) anjiyogeneze öncülük edecektir.

Beta blokör ise tam tersi bu yolları durdurarak anjiyogenezi engelleyecektir. (3) Apoptoz: Beta adrenerjik agonist src/MAPK yoluyla apoptozu inhibe edecektir (**Şekil 5**).

2.8.2.2. Talidomid

Talidomid [*N*-phthalimido)-glutarimide] mide bulantısı için sedatif olarak reçete edilen ancak teratojenik etkisinin görülmesi üzerine piyasadan çekilen sentetik glutamik asit derivativesi olan bir ilaçtır (118). 1950'lerde lepra tedavisinde oldukça yaygın kullanılmakta iken, daha sonra bulantı-kusma ilacı olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Ancak ilacı kullanan gebe kadınların fetüslerinde ekstremite anomalisi- fekomeli başta olmak üzere teratojenik etkilerinin görülmesi üzerine kullanımı kısıtlanmıştır. Bu ilacın kullanımı gebe kadınlarda uygun olmamakla birlikte, varolan kapillerlerden yeni kan damarları oluşmasını engellemesi özelliği saptanması sonucu, gebe olmayan kanser hastaları için uygun bir ilaç olarak yeniden kullanımı gündeme gelmiştir (119).

Ayrıca, talidomidin immunmodülatör ve anti-inflamatuar etkileri de keşfedilince olağanüstü bir dönüş yapmış ve çeşitli pro-inflamatuar ve otoimmün durumların tedavisinde kullanılmıştır (120). Bu ilaç antianjiyogenik aktiviteye sahip, plazma hücrelerinin G1'de büyümesini veya apoptozu uyaran ve sitokin sekresyonu üzerine immünmodülatör etki gösteren bir ajandır (121). Özellikle multiple myelom olmak üzere dermatolojik, enfeksiyonlar, otoimmün ve hematolojik hastalıklarda şuan kullanılmaktadır (122).

Talidomid multipl myelomun tedavisinde antianjiyogenik etkisinin bir sonucu olarak umut verici sonuçlar göstermiştir (123). Çeşitli çalışmalara rağmen talidomidin kesin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Talidomidin etkisi nuklear faktör kappa-B (NF-B), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), VEGF ve prostaglandin E2 (PGE2) gibi sitokinlerin sentezini baskılamasıyla ilişkili olabileceği gibi in vitro ortamda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırmasıyla da ilişkilidir (124). Klinik çalışmalar talidomidin, multiple myelomun yanı sıra kaposi sarkoma, göğüs kanseri, prostat kanseri ve beyin tümörlerinde, antianjiyogenik etkisi nedeniyle, tedavi açısından etkili bir ilaç olabileceğini ortaya koymuştur (125).

III.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız bilimsel etik kurul onayı (0028) alındıktan sonra; Celal Bayar Üniversitesi (CBÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 2010-098 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmada, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında bulunan hücre kültürü laboratuvar ortamı, biyogüvenlik kabini, 37 °C - %5 CO₂ içeren inkübatör, inverted mikroskop, su banyosu, etüv, santrifüj, azot tankı ve Olympus marka mikroskop kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal sarf mazlemeleri ve hücre hatları CBÜ-BAP tarafından sağlanmıştır.

Çalışma 6 grup altında yapılmıştır.

1. Kontrol Grubu Meme kanseri;

1. **K-A.** İnvaziv (MDA-MB-231) insan meme kanseri hücre hattı
1. **K-B.** Az invaziv (MCF-7) insan meme kanseri hücre hattı

2. Meme kanseri + Paklitaksel grubu;

2. **A-Px.** İnvaziv (MDA-MB-231) ve Paklitaksel eklenen grup
2. **B-Px.** Az invaziv (MCF-7) ve Paklitaksel eklenen grup

3. Meme kanseri + Propranolol verilen grup;

3. **A-Pr.** İnvaziv (MDA-MB-231) ve Propranolol eklenen grup
3. **B-Pr.** Az invaziv (MCF-7) ve Propranolol eklenen grup

4. Meme kanseri + Talidomid verilen grup;

4. **A-Td.** İnvaziv (MDA-MB-231) ve Talidomid eklenen grup
4. **B-Td.** Az invaziv (MCF-7) ve Talidomid eklenen grup

5. Meme kanseri + Paklitaksel + Propranolol verilen grup;

5. A-Px+Pr. İnvaziv (MDA-MB-231) ve Paklitaksel ile Propranolol kombine verilen grup

5. B-Px+Pr. Az invaziv (MCF-7) ve Paklitaksel ile Propranolol kombine verilen grup

6. Meme kanseri + Talidomid + Paklitaksel verilen grup;

6. A- Px+Td. İnvaziv (MDA-MB-231) ve Talidomid ile Paklitaksel kombine verilen grup

6. B- Px+Td. Az invaziv (MCF-7) ve Talidomid ile Paklitaksel kombine verilen grup

Metastatik özelliği yüksek MDA-MB-231 (ECACC-European Collection of Cell Cultures – Cat No: 92101203 LOT: 08A006 p.18) ve metastetik özelliği düşük bir hücre hattı olan MCF-7 (ECACC Accession no 86012803 Lot No: 10K025 pass:9) hücre hatlarında paklitaksel (sindaxel 30mg/5ml flk. Sc. Sindan Pharma Bükreş, Romanya), propranolol (Dideral; Propranolol HCl, 40 mg Sanofi Synthelabo İlaç A.Ş.) ve talidomid (Sigma T144-100mg, USA) ilaçlarının IC₅₀ dozları belirlenerek, sitotoksosite ve primer antikor dağılımlarına etkisi indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi.

MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre hattı alındıktan sonra, hücre kültürü laboratuvarımızda, RPMI-1640 (R8758 Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA), % 10 Fetal bovine serum (FBS) (F9665, Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA), % 1 L-Glutamin (G7513-Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) ve % 1 antibiyotik-(penisilin-streptomisin) (P4333-Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) içeren medyum ile dilüe edilerek 4 kültür kabına eşit olarak paylaştırıldı. Kültür kaplarında, % 5 karbondioksit içeren, 37°C nemli inkübatörde çoğaltılmaya bırakıldı. İki günde bir medyumları değiştirilerek, konfluent olunca Tripsin-EDTA (T4049- Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) solusyonu ile 37°C ile 5 dakika bırakılarak hücreler alınıp, 1000 rp'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra pasajlandı. 4. pasaja kadar yeterli miktarda çoğaltılan hücreler önce -80°C'de ardından azot tankı içerisinde, dondurma medyumunu ile yedeklendi.

Aynı pasajdaki hücreler gruplar için ayrı kültür kaplarına bölünerek ilaç uygulamalarına geçildi. Deneyler üç kez tekrarlandı.

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri 24 kuyucuklu kültür kapları ve 96 kuyucuklu eliza kültür kapları içerisine konulduktan sonra, ilaç olarak Paklitaksel, Talidomid ve Propranolol uygulamaları yapılarak 48. saatteki etkileri değerlendirildi.

Proliferasyon indeksleri tripan mavisi ile boyanarak sayım yapılarak değerlendirildi. İlaç IC₅₀ değerleri MTT testi yapılarak belirlendi.

3.1. Meme kanseri hücre hatlarının açılması

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kuru buz içerisinde teslim alındıktan sonra hemen hücre kültürü ortamında steril şartlarda 37 °C de su banyosu içerisinde kapak kısmından tutulup sallanarak çözülmesi beklendi (yaklaşık 1-2 dk). Bu işlem yapılmadan önce ısınmış olan kültür vasatından 5 ml santrifüj tüpüne konuldu. Tamamen çözülmüş stok hücre vialı alkol ile silindikten sonra hava akışlı kabin içerisine alındı. Vial içerisinden 2 ml kültür vasatı olan pipet ile hücre alındı ve santrifüj tüpüne aktarıldı. Pipetaj yapılarak hücre ile kültür vasatının karışması sağlandı. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş tüpün içindeki süpernatant atıldı. Ardından hücre içine vasat konularak kültür kabına alındı.

3.2. Hücrelerin dondurulması

Yeterli sayıda hücre üretildikten sonra hücrelerin bir kısmı kültür vasatı, %90 FBS ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) (D2650, Sigma, St. Louis, USA) içeren dondurma kültür vasatında 1'er ml.'lik vialer içerisinde dondurularak (-80 °C) ve ardından sıvı azot tankına alınarak saklandı.

3.3. Hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi

Gruplardan elde edilen hücreler 24 gözlü kültür kaplarındaki hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı ardından hücre üzerine 1 ml vasat eklendi. Her gözdeki hücre ile vasat karışımından 100µl ve tripan mavisinden de 100µl alınarak homojen bir

şekilde karıştırıldıktan sonra thoma lamında hücre sayımları yapılarak ekildi. Hücreler ilk sayım yapıldığında her bir göze MDA-MB-231 hücresinden 15.10^3 ve MCF-7 hücresinden, 15.10^3 olacak şekilde ekildi. Ardında üç gün boyunca her gün kabın üçer tane gözü Tripsin-EDTA ile kaldırılarak hücre sayımı yapıldı.

3.4. Hücrelerin pasajlanması

Her iki hücre hattının kültür vasatları iki günde bir değiştirildi ve MCF-7 sekiz günde bir MDA-MB-231 ise dört günde bir pasaj yapıldı. Hücreler ilaç etkilerinin farklılıklarının belirlenmesi çalışması amacı ile immunohistokimyasal dağılımlarının incelenmesi için 24 gözlü kültür kaplarına ve ultrastrüktürel yapı bozukluklarının saptanması için ise 6 gözlü kültür kaplarına pasajlandı.

3.5. İlaç dozlarının belirlenmesi

MCF 7 ve MDA-MB 231 hücre hatlarında uygulanacak Paklitaksel, Propranolol ve Talidomid ilaçlarının IC_{50} dozları hücre sitotoksite testi (MTT) ile belirlendi. Bunun için hücreler 3 adet 96'lı kültür kabına her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre olacak şekilde pasajlandı ve 24 saat inkübe edildi. Hücrelere ilaç uygulamalarının etkileri 48. saatte değerlendirildi. Kontrol gruplarına ilaç uygulaması yapılmadı ve PBS eklendi.

3.5.1. MTT testi

Tedaviden sonra ilaç sitotoksitesini ölçmek için 5 mgr. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (M5655-Sigma, USA) 20 ml. distile suda iyice homojen sarı renk alana kadar çözüldü. Bu stok solüsyonu kabul edildi ve 20 ependorfa her birine 1 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere $-20^{\circ}C$ 'de saklandı. MTT testi yapıldığında ise 1 ependorf 1:10 oranında PBS ile dilüe edildi. 96'lık kültür kaplarından her bir kuyucukta bulunan kültür vasatı çekilip atıldı. Hücreler bir kez steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanarak hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 μ L konuldu ve $37^{\circ}C$ 'de 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda MTT solüsyonu atıldı ve her bir

kuyucuğa 100 µL DMSO (A 3672, AppliChem, Darmstadt, Germany) eklenerek absorbans 570 nm' de spektrofotometrede ölçüldü. Ölçülen değerler ilaç elenmeyen kuyucuklardaki değerler ile karşılaştırılarak ilaçların hücrelerin yarısını öldüren dozlar belirlendi böylece ilaç IC₅₀ dozları hesaplandı.

3.6. İndirekt immünohistokimyasal yöntem

24 kuyucuklu kültür kabında çoğaltılan hücreler 48. saatteki ilaç uygulamalarını takiben kültür vasatı atıldı, hücreler bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra %4' lük paraformaldehit ile 30 dk. fikse edildi. Fiksasyondan sonra 3 kez 5 dk. PBS ile yıkandı. %3 lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulandı (5 dk) ve 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için %0,1 lik Triton-X 100 (T8787 -Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) ile 15 dk. inkübe edildikten sonra 3 defa PBS ile yıkandı. 1 saat blocking uygulamasından sonra yıkamadan anti-VEGF, anti-VEGFR2, anti-iNOS, anti-eNOS ve anti-ERK1/2 antikorları ile 1 gece inkübe edildi Kullanılan antikor özellikleri **Tablo 3.6.1**'de belirtilmiştir. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra ikincil antikorlar biotin (30 dk.) ve ardından streptavidin (30 dk.) uygulandı. İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra 3 defa PBS ile yıkamalar yapıldı. DAB kromojeni uygulanarak immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrıldı ve primer antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirildi. Distile su ile yıkanan örnekler kapatma mediumu (Clear Mount, Mounting Medium Ref: 008110 Invitrogen, USA) ile kaplanarak kapatıldı ve fotoğrafları ışık mikroskobu ile çekildi. İmmunohistokimya Protokolu **Tablo 3.6.2.**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6.1 Kullanılan Primer Antikorlar

Primer antikor	Katalog No	Özellik	Firma	Dilüsyon
Anti-VEGF	sc- 7269	Anti- Mouse monoclonal IgG	Santa Cruz (CA, USA)	1:100
Anti-VEGFR2	251747	Anti- Mouse monoclonal	Abbotec, San Diego, USA	1:100
Anti- iNOS	Sc- 651	Anti-Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz (CA, USA)	1:100
Anti-eNOS	Sc- 654	Anti-Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz (CA, USA)	1:100
Anti-ERK1/2	251140	Anti-Rabbit polyclonal	Abbotec, San Diego, USA	1:100

Tablo 3.6.2. İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü

No	İşlem	Madde	Süre
1	Yıkama	PBS	2x5 dk
2	Fiksasyon	% 4' lük Paraformaldehit	30 dk.
3	Yıkama	PBS	2x5 dk.
4	Bloklama	%3' lük H2O2	5 dk.
5	Yıkama	PBS	3x5 dk.
6	Permeabilizasyon	%0.1 lik Triton-X 100	15 dk.
7	Yıkama	PBS	3x5 dk.
8	Bloklama	Blocking serumu	1 saat
9	Primer antikor	Anti-VEGF Anti-VEGFR2 Anti-NOS2 Anti-NOS3 Anti-ERK1/2	1 gece (+4°C)
10	Yıkama	PBS	3x5 dk.
11	Sekonder Antikor	Biotinlenmiş antikor	30 dk.
12	Yıkama	PBS	3x5 dk.
13	Sekonder Antikor	Streptavidin HRP	30 dk.
14	Yıkama	PBS	3x5 dk.
15	Boyama	DAB	5 dk.
16	Yıkama	Distile su	3x5 dk.
17	Kapatma	Kapatma mediumu	

3.7. Elektron mikroskopi takip yöntemi

Hücreler tripsinle kaldırılarak toplandı. 1000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantı atıldı ve %2,5' luk gluteraldehit ile 2 saat fikse edildi (+4 °C). Tekrar santrifüj edilerek 2 saat süreyle tekrar gluteraldehit ile fikse edildi. Santrifüjden sonra tamponla 2 kez 10' ar dk. yıkandı. Post fiksasyon için %1' lik Osmium tetroksit ile karanlıkta +4 °C' de 2 saat fikse edildi. A+B fosfat tampon solusyonu (A Solüsyonu: 3,628 gram KH₂PO₄+400 ml distile su B Solüsyonu: 4,744 gram Na₂HPO₄+400 ml) distile su ile yıkandı. Dehidratasyon için sırasıyla %70 ve %80 alkolden 10 dk., absolü alkolden de 2 kez 10 dk. süreyle geçirildi. İnfiltrasyon için 1/1 oranında absolü alkol ve propilen oksitte 30 dk. bekletildikten sonra 15' er dk. 2 kez saf propilen oksitten (R1080, Agar Scientific, Essex, UK) geçirildi. Daha sonra 2:1 oranında propilen oksit ve saf araldit karışımında (Araldite CY 212 20 ml, DDSA 22 ml, BDMA 1.1 ml, Dibutilphtalate 0.5 ml) 1 saat, 1:2 oranında propilen oksit ve saf araldit karışımında 1 saat bekletilen hücreler saf aralditte bir gece +4 °C' de bekletildi. Ertesi gün saf araldit ile kapsüllere gömüldü. Polimerizasyon için sırasıyla 37°C, 45 °C ve 60°C etüvde birer gün bekletildi. Polimerize olan araldit bloklardan ultra mikrotomda yarı ince ve ince kesitler alındı (**Tablo 3.6.1**). İnce kesit almak için Leica Ultramikrotom ile 140 nm kalınlığında seri kesitler hazırlandı. Havuzdaki kesitler kloroform buharına tutularak düzeltildi ve kesitler, penset ile tutularak gridin mat yüzüne alındı. Kurutma kağıdının üzerinde kurutulan gridler kutularda saklandı. İnce kesitler ultramikrotom ile alındıktan sonra kurşun sitrat ve uranil asetat ile kontrastlama yapılarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında JEOL 1014 elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

Tablo 3.7.1. Elektron Mikroskopi Takip Protokolü

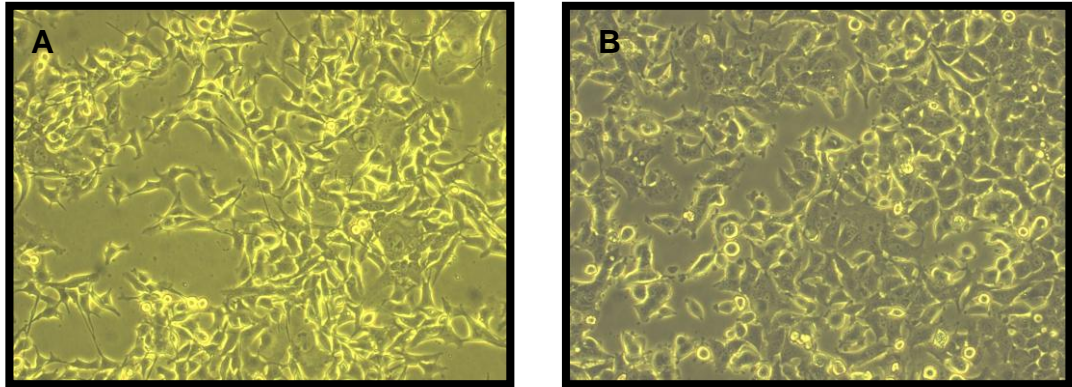
No	İşlem	Madde	Süre
1	Hücrelerin toplanması	Tripsin	5 dk.
2	Santrifüj		5 dk.-1000 rpm
3	Primer fiksasyon	%2.5'lik Gluteraldehit	2 saat
4	Santrifüj		5 dk.-1000 rpm
	Primer fiksasyon	%2.5'lik Gluteraldehit	2 saat
	Santrifüj		5 dk.-1000 rpm
5	Yıkama	A+B tampon solusyonu A Solüsyonu: 3,628 gram KH ₂ PO ₄ +400 ml distile su B Solüsyonu: 4,744 gram Na ₂ HPO ₄ +400 ml distile su	10 dk.
6	Santrifüj		5 dk.-1000 rpm
7	Yıkama	A+B tampon solusyonu	10 dk.
8	Santrifüj		5 dk.-1000 rpm
9	Sekonder fiksasyon	%1' lik Osmium tetroksit	1 saat
10	Santrifüj		5 dk.-1000 rpm
11	Yıkama	A+B tampon solusyonu	10 dk.
12	Dehidratasyon	% 70 alkol % 80 alkol % 100 alkol % 100 alkol	10 dk. 10 dk. 10 dk. 15 dk.
13	İnfiltrasyon	1:1 absölv alkol+propilen oksit Propilen oksit-I Propilen oksit-II 2:1 Propilen oksit+saf araldit 1:2 Propilen oksit+saf araldit Saf araldit	30 dk. 15 dk. 15 dk. 1 saat 1 saat 1 gece
14	Gömme	Saf araldit	
15	Polimerizasyon	37 °C 45 °C 60 °C	24 saat 24 saat 24 saat

IV. BULGULAR

Bu çalışmada, invaziv özellikleri açısından farklı iki insan meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231 ve MCF-7), anti anjiyogenik ilaç uygulamalarının VEGF, NOS ve ERK yollarına etkileri indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi.

İnvaziv insan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin kültüre edildiklerinde yuvarlak görünümde oldukları, kültürün ikinci gününde hücresel uzantılarının fazla olduğu ve kültür kabına tamamen yapıştıkları gözlemlendi **(Resim 4.1.A)**.

Daha az invaziv MCF-7 hücrelerinin ise kültüre edildiklerinde epiteloid hücreye benzer görünümde oldukları ve kültürün dördüncü gününde hücrelerin kültür kabına tamamen yapıştıkları gözlemlendi **(Resim 4.1.B)**.



Resim 4.1. MDA-MB-231 (A) ve MCF-7 (B) primer meme kanseri hücre hatlarına ait hücrelerin faz kontrast görüntüleri. X200.

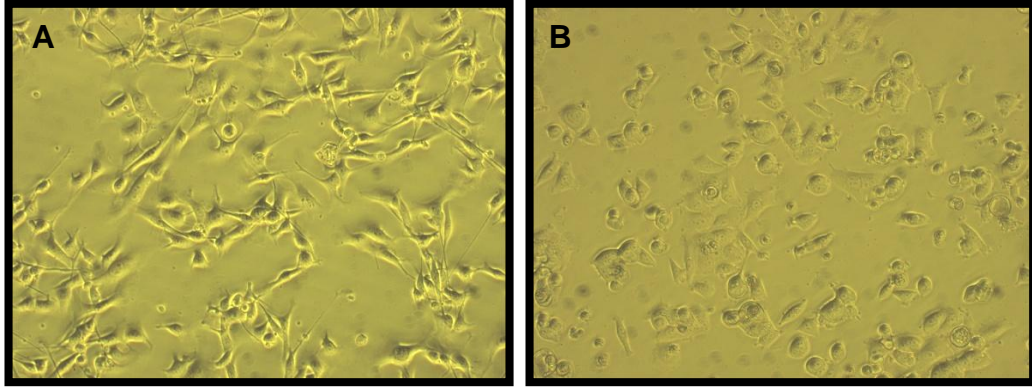
4.1. Hücre hatlarının ikilenme zamanı ve ilaç dozlarının MTT bulguları

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri, 15.10^3 olarak 24 gözlü kültür kaplarına sayım yapılarak ekildikten 24, 48 ve 72 saat sonra elde edilen değerleri **Tablo 4.1.**'de gösterilmiştir. Kültüre edilen hücrelerin 24, 48 ve 72 saat sonraki görüntüleri sırasıyla **Resim 4.2.**, **Resim 4.3.** ve **Resim 4.4.**'de izlenmektedir.

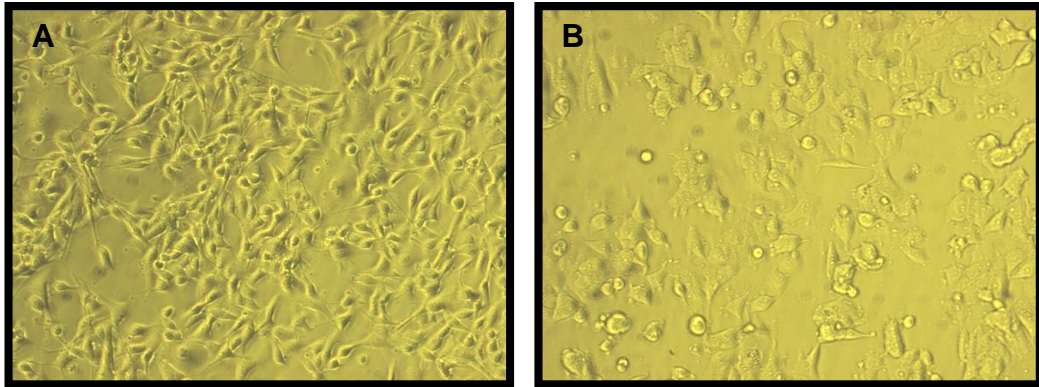
MDA-MB-231 hücrelerin çoğalma hızının MCF-7 hücrelerine oranla daha hızlı olduğu, tripan mavisi ile hücre sayımı yapılarak ikilenme zamanlarının MDA-MB-231 için 24 saat, MCF-7 için ise 72 saat olduğu belirlendi.

Tablo. 4.1.1. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen sayımları

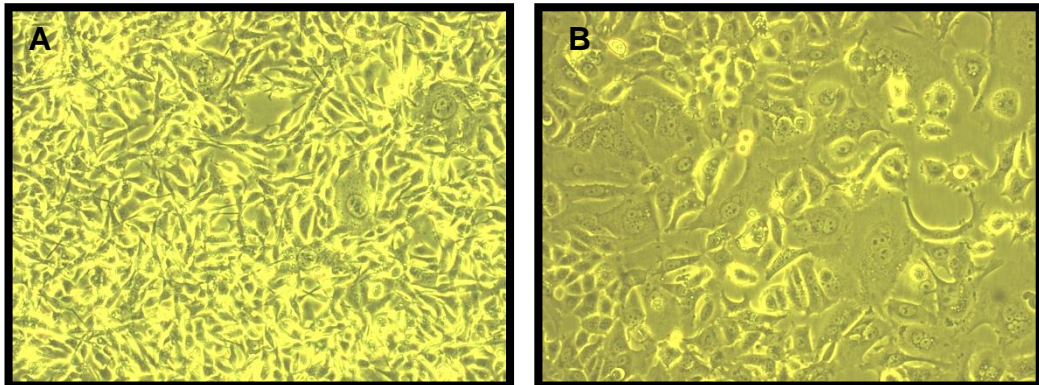
	MDA-MB-231	MCF-7
Ekilen hücre sayısı	15.10^3	15.10^3
24 saat sonraki hücre sayısı	3.10^4	2.10^4
48 saat sonraki hücre sayısı	5.10^4	25.10^3
72 saat sonraki hücre sayısı	1.10^5	3.10^4



Resim. 4.1.1. Kültüre edilen hücrelerin 24. saat görüntüleri
A: MDA-MD 231, B: MCF-7 hücrelerinin görünümü. X200.



Resim. 4.1.2. Kültüre edilen hücrelerin 48. saat görüntüleri
A: MDA-MD 231, B: MCF-7 hücrelerinin görünümü. X200.



Resim. 4.1.3. Kültüre edilen hücrelerin 72. saat görüntüleri
A: MDA-MD 231, B: MCF-7 hücrelerinin görünümü. X200.

Hücrelerin ikilenme zamanları değerlendirildikten sonra ilaç uygulamaları için doz belirlenmesi için MTT testi uygulandı. MDA-MB 231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerinde Paklitaksel (PX), Propranolol (PR) ve Talidomid (TD) ilaçlarının 48 saat etkilerinin değerlendirilmesi için saptanan IC₅₀ (Hücrelerin %50'sinin yaşayabildiği ilaç dozu) dozları ve analizi **Tablo 4.1.2., 4.1.3., 4.1.4., ve 4.1.5.'** de gösterilmiştir.

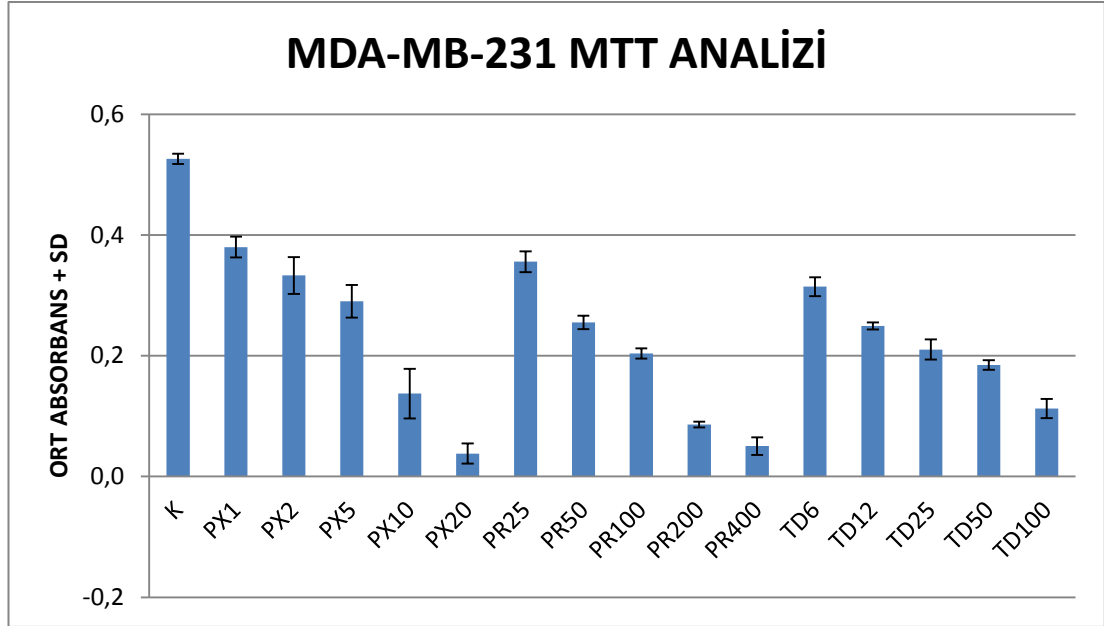
Tablo 4.1.2. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan Paklitaksel (PX), Propranolol (PR) ve Talidomid (TD) ilaçlarının MTT sonucu elde edilen IC₅₀ dozları.

MDA-MB-231						DOZLAR		
K	PX	PR	TD	PX+PR	PX+TD	PX	PR	TD
0.470	0.525	0.535	0.512	0.518	0.535	İlaç yok		
0.415	0.023	0.027	0.192	0.031	0.030	20 nm	400µm	100 µm
0.492	0.029	0.057	0.223	0.295	0.210	10 nm	200 µm	50 µm
0.478	0.319	0.222	0.228	0.338	0.315	5 nm	100 µm	25 µm
0.395	0.341	0.267	0.254	0.325	0.313	2,5 nm	50 µm	12,5 µm
0.483	0.344	0.336	0.279	0.306	0.312	1,12 nm	25 µm	6,25 µm
0.341	0.192	0.176	0.139	0.167	0.156			
0.032	0.033	0.036	0.036	0.037	0.038			

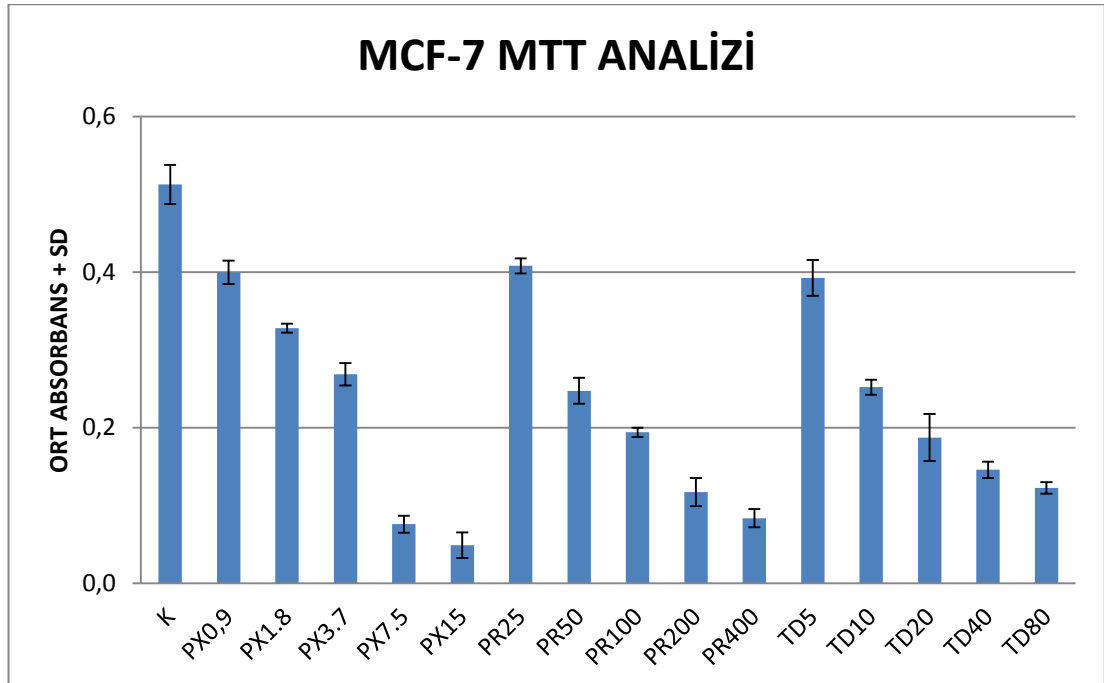
Tablo 4.1.3. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan Paklitaksel (PX), Propranolol (PR) ve Talidomid (TD) ilaçlarının MTT sonucu elde edilen IC₅₀ dozları.

MCF-7						DOZLAR		
K	PX	PR	TD	PX+PR	PX+TD	PX	PR	TD
0.504	0.470	0.467	0.493	0.557	0.541			
0.389	0.029	0.041	0.196	0.032	0.028	15 nm	400µm	80 µm
0.372	0.037	0.144	0.198	0.240	0.238	7,5 nm	200 µm	40 µm
0.390	0.281	0.183	0.218	0.276	0.326	3,7 nm	100 µm	20 µm
0.338	0.310	0.232	0.242	0.256	0.295	1,8 nm	50 µm	10 µm
0.340	0.366	0.412	0.367	0.237	0.193	0,9 nm	25 µm	5 µm
0.239	0.173	0.124	0.150	0.190	0.149			
0.035	0.037	0.033	0.035	0.035	0.036			

Tablo 4.1.4. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında ilaç dozlarının IC₅₀ değerlerini saptamak için yapılan MTT testinin analizi.



Tablo 4.1.5. MCF-7 meme kanseri hücre hattında ilaç dozlarının IC₅₀ değerlerini saptamak için yapılan MTT testinin analizi.



MTT sonuçlarına göre IC₅₀ değerleri MDA için; PX: 5 nmol, PR: 50 µm, TD: 12,5 µm ve MCF- 7 için PX: 3,7 nmol, PR: 50 µm, TD: 10 µm olarak belirlendi (**Tablo 4.1.4. ve 4.1.5.**).

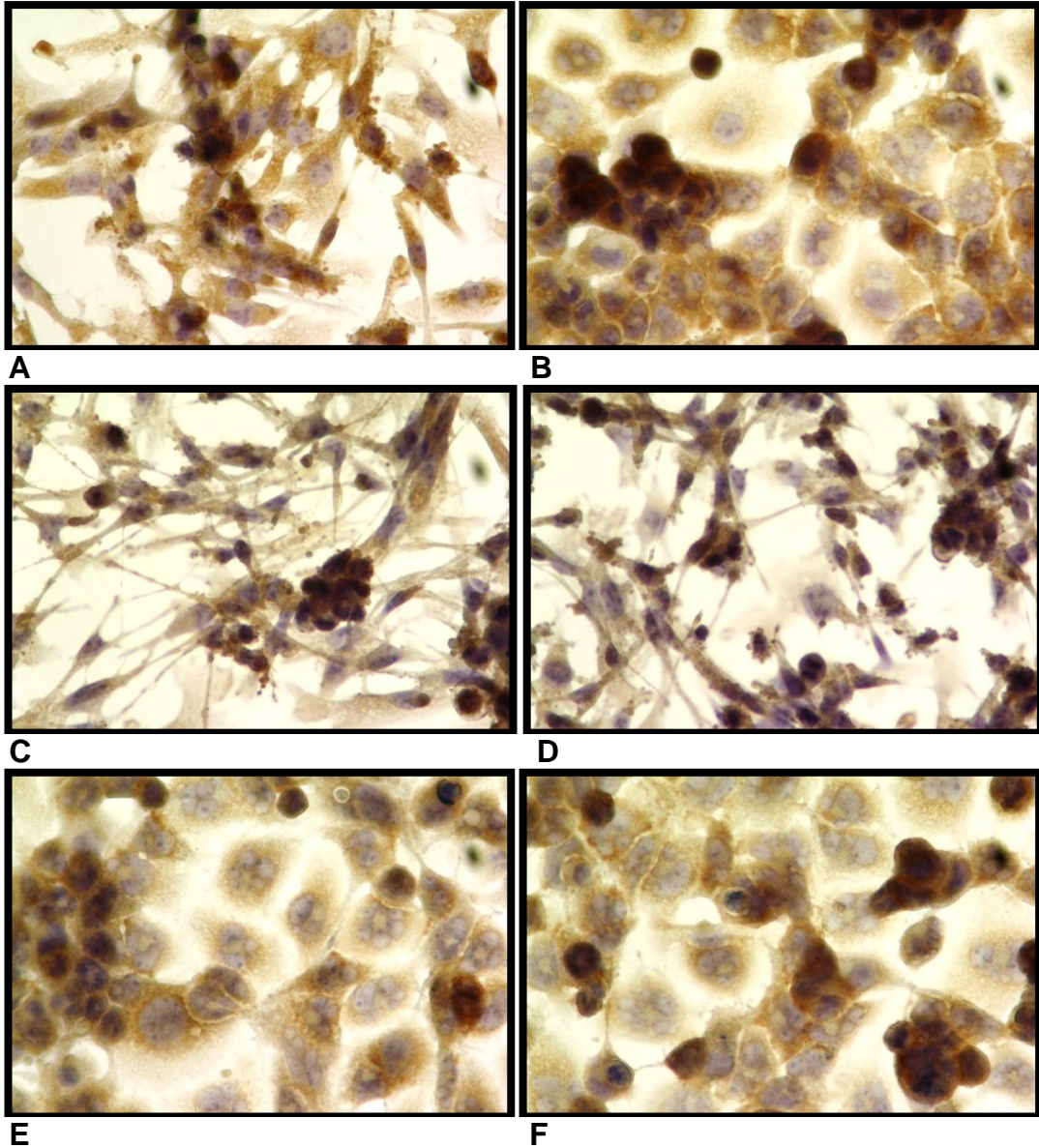
İlaç uygulamaları için hücreler 24 gözlü kültür kaplarına steril yuvarlak lameller yerleştirildi ve üzerine 100 µl FBS eklenerek oda sıcaklığında 30 dak. beklendi. Ardından FBS tekrar çekildi ve hücreler ekildi, yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonunda belirlenen IC₅₀ dozlarında ilaç uygulamalarından 48. Saat sonrasında ilaçların etkileri sonucunda yuvarlak lameller üzerinde bulunan hücrelerin yarısına yakın kısmının yuvarlak görünümde olduğu ve kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendi.

Yuvarlak lamel üzerinde bulunan hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra % 4 paraformaldehit ile 30 dakika tespit edilerek rutin avidin-biyotin-peroksidaz yöntemine uygun olarak anti VEGF, anti VEGFR2, anti iNOS (NOS2), anti eNOS (NOS3) ve anti ERK1/2 primer antikörleri kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle boyandı. İmmunoreaktivite şiddetleri hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++) olarak skorlandı. Boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma şiddetleri ile H-Skor hesaplanarak, gruplar arasında karşılaştırmalı olarak ANOVA istatistik testi ile değerlendirildi.

4.2. İndirekt immunohistokimya bulguları:

VEGF İmmunoreaktivitesi:

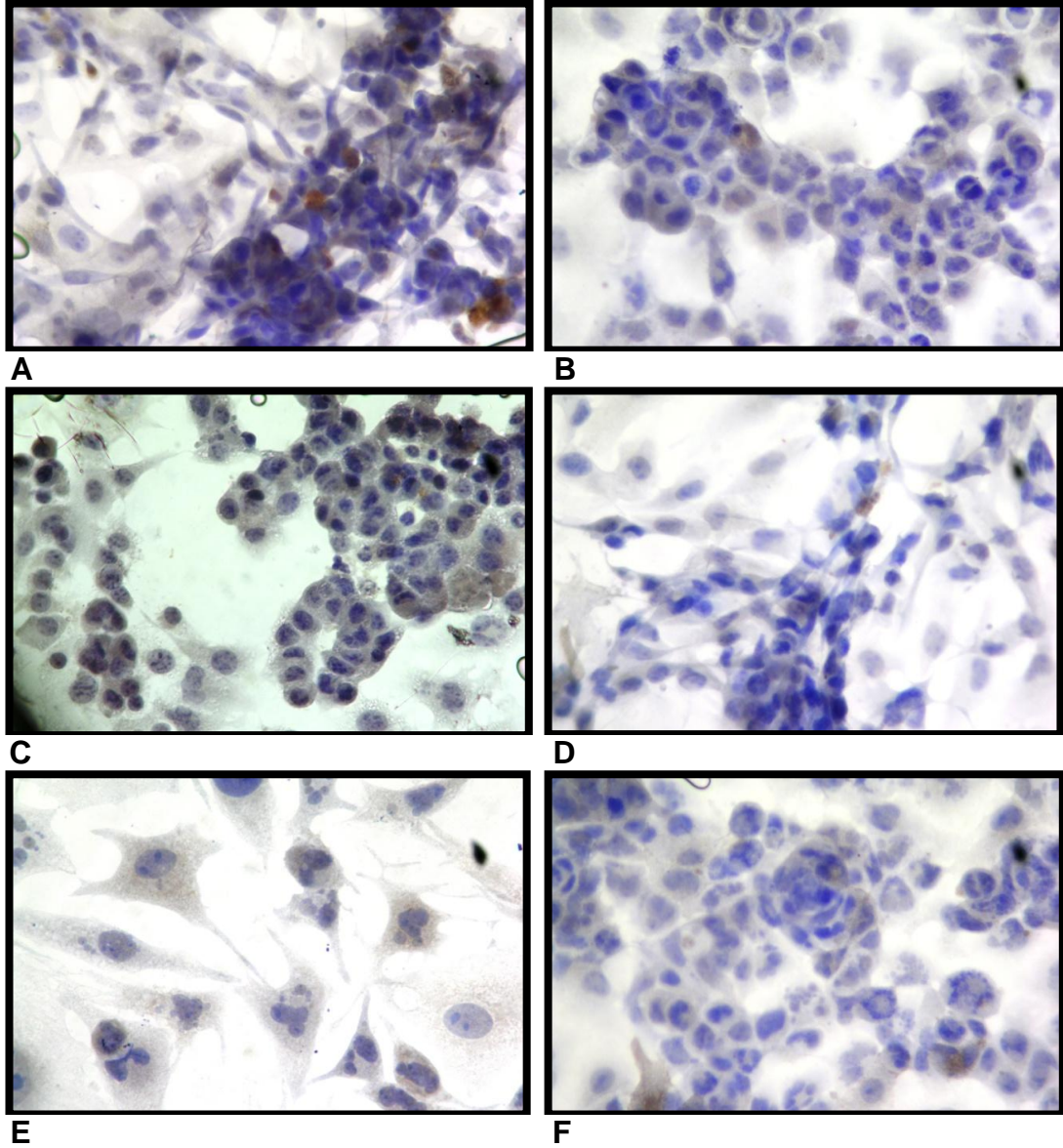
Kontrol grubu MDA-MB 231 meme kanser hücrelerinde **VEGF** immunoreaktivitesi şiddetli (+++) gözlenirken; Paklitaksel (PX) grubunda orta (++); Propranolol (PR) grubunda hafif/orta (+/++), Talidomid (TD) hafif (+) PX+PR ve PX+TD gruplarında ise immunoreaktivitesi kontrol ve PX gruplarına göre azalmış (+/++) olarak izlendi (**Resim 4.2.1.**).



Resim 4.2.1. MDA-MB-231 hücre hattının anti-VEGF primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

VEGFR2 İmmunoreaktivitesi:

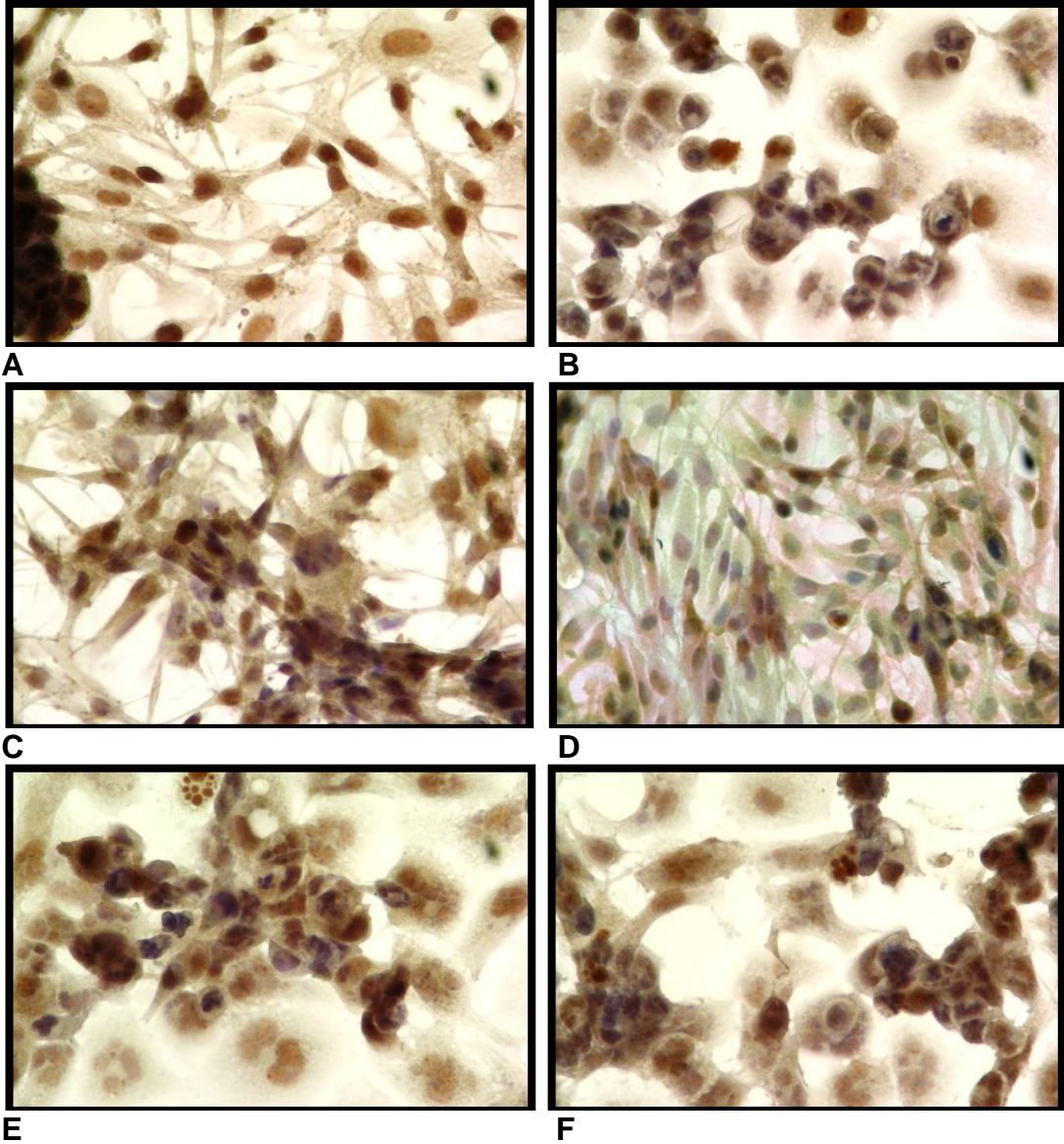
Kontrol grubu MDA-MB 231 meme kanser hücrelerinde VEGFR2 immunoreaktivitesi hafif/orta (+/++) gözlenirken; PX, PR, TD, PX+PR ve PX+TD gruplarında ise hafif (+) olarak izlendi (**Resim 4.2.2.**).



Resim 4.2.2. MDA-MB-231 hücre hattının anti-VEGFR2 primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

iNOS İmmunoreaktivitesi:

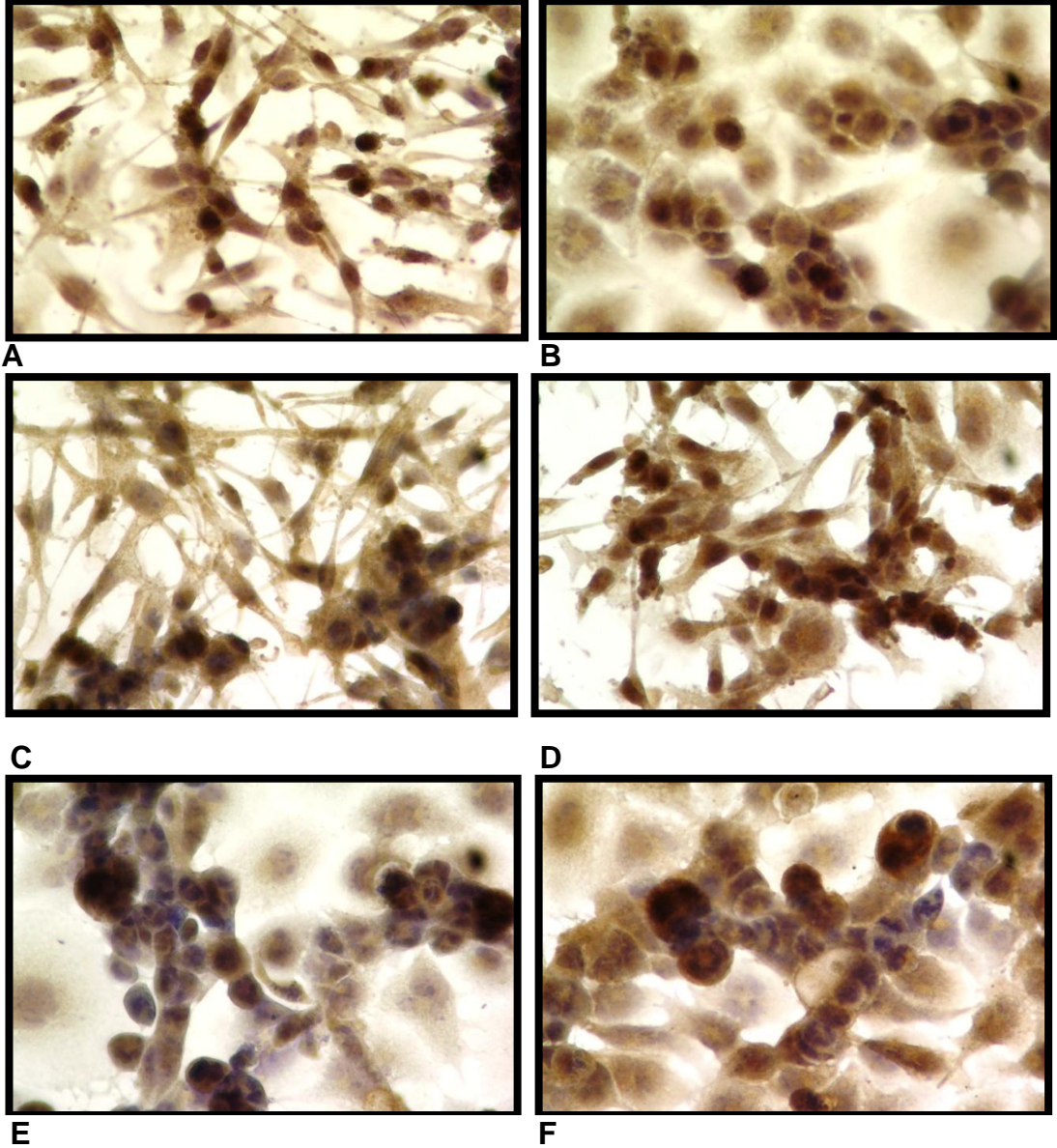
Kontrol grubunda MDA-MB 231 meme kanser hücrelerinde iNOS çok şiddetli izlenirken (++++) PX ve PR gruplarında orta TD grubunda ise hafif olarak izlendi. İlaçların kombine uygulandığı gruplarda ise iNOS kontrol grubuna göre PX+PR grubunda orta, PX+TD grubunda ise hafif/orta olarak değerlendirilmiştir. (Resim 4.2.3.).



Resim 4.2.3. MDA-MB-231 hücre hattının anti-iNOS primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

eNOS İmmunoreaktivitesi:

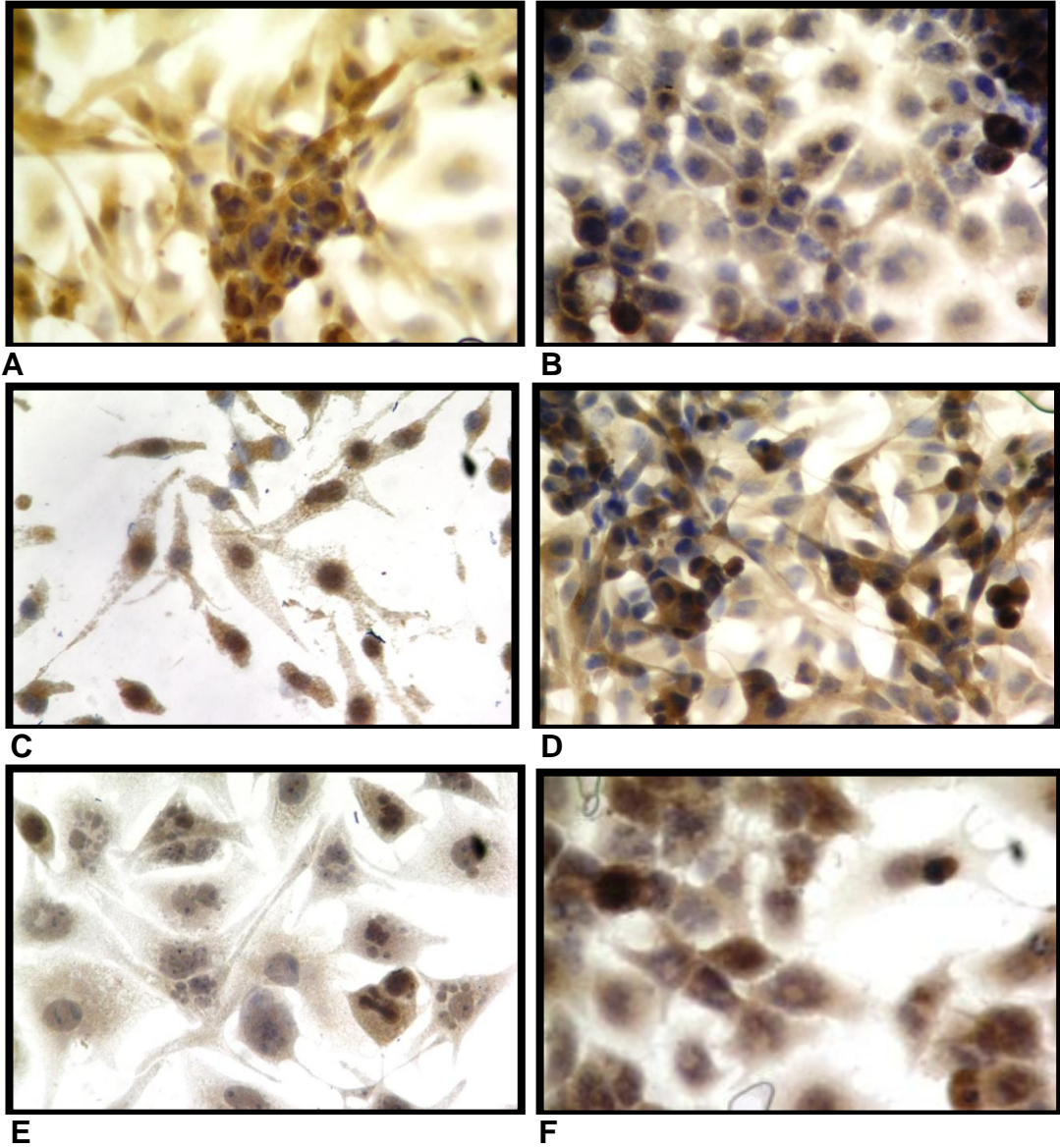
Kontrol grubu MDA-MB 231 meme kanser hücrelerinde eNOS çok şiddetli (++++) olarak gözlenirken; PX grubunda orta/şiddetli (++/+++), PR grubunda eNOS orta (++) ve TD grubunda ise orta/şiddetli (++/+++), PX+PR grubunda hafif /orta (+/++) ve PX+TD grubunda ise orta (++) olarak gözlenmiştir (**Resim 4.2.4**).



Resim 4.2.4. MDA-MB-231 hücre hattının anti-eNOS primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

ERK1/2 immünoreaktivitesi:

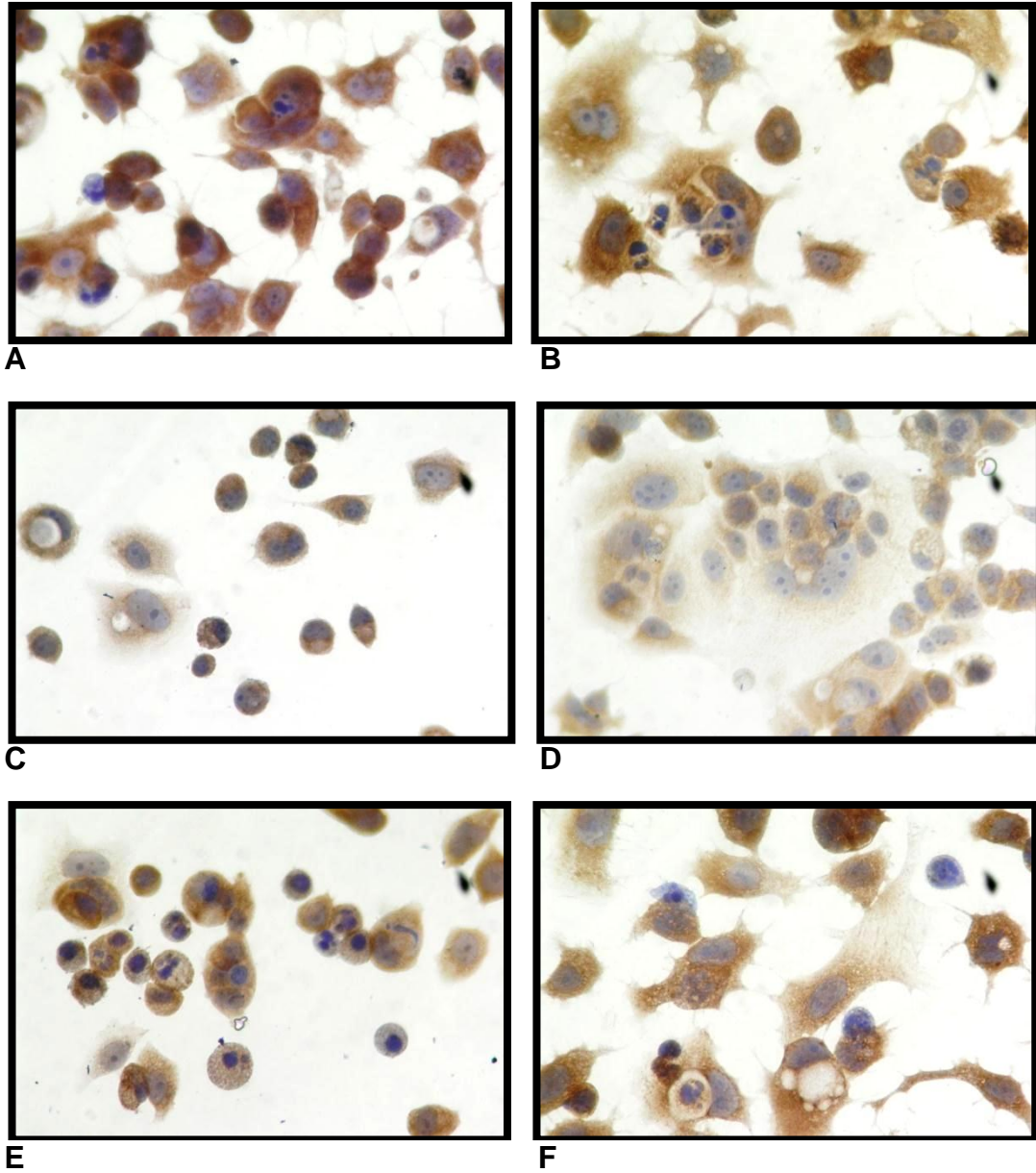
Kontrol grubu MDA-MB 231 meme kanser hücrelerinde ERK1/2 şiddetli (+++) olarak gözlenirken; PX grubunda hafif/orta (+/+), TD ve PR gruplarında orta (++) olarak izlenmiştir. PX+PR grubunda hafif (+) ve PX+TD grubunda ise hafif/orta (+/++) olarak gözlenmiştir (**Resim 4.2.5**).



Resim 4.2.5. MDA-MB-231 hücre hattının anti-ERK 1/2 primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

VEGF İmmünoreaktivitesi:

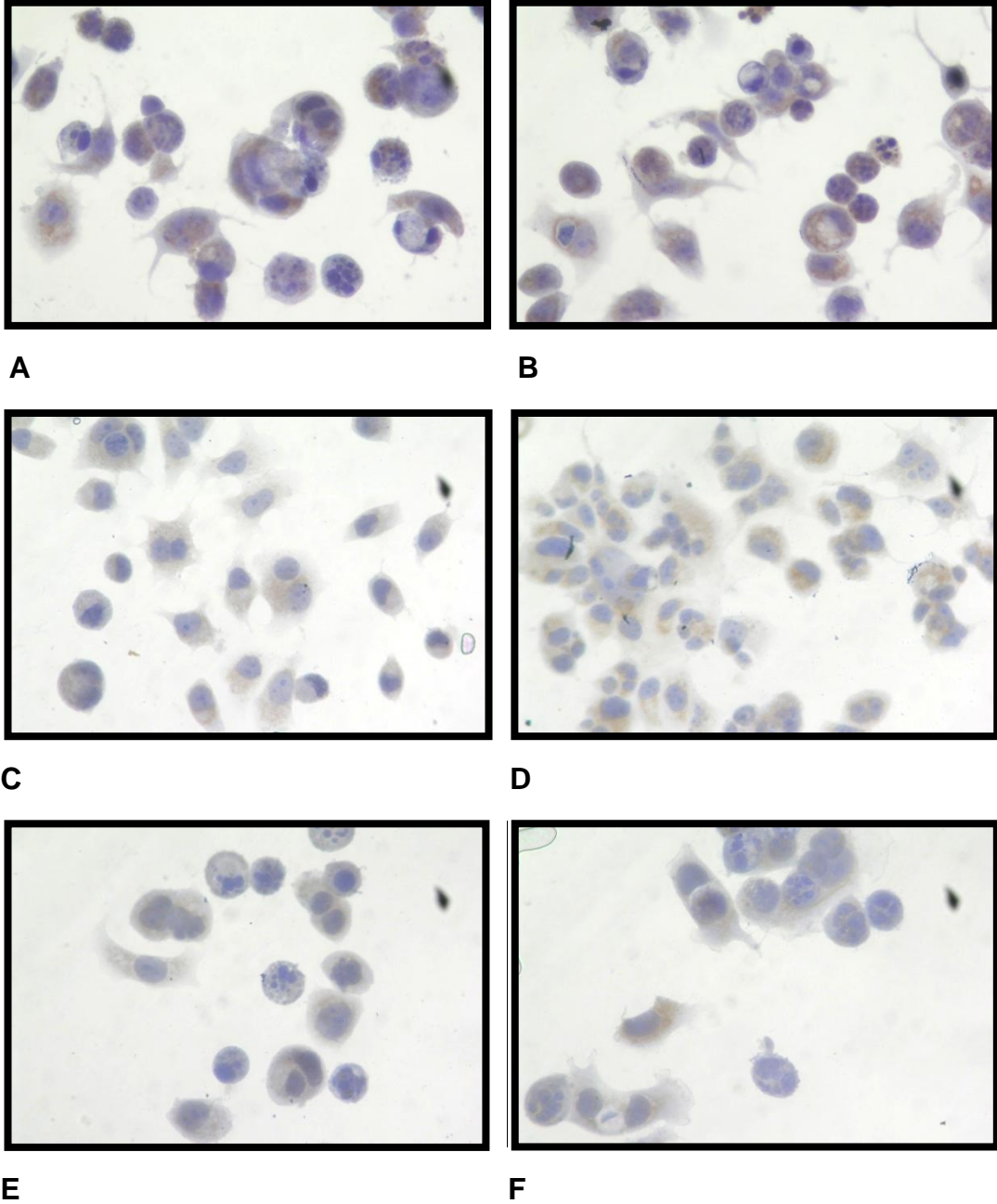
Kontrol grubu MCF-7 meme kanser hücrelerinde VEGF immunoreaktivitesi şiddetli (+++) gözlenirken; PX grubunda orta (++); PR ve TD gruplarında hafif (+), PX+PR ve PX+TD gruplarında ise VEGF immunoreaktivitesi hafif/orta (+/++) olarak izlendi (**Resim 4.2.6**).



Resim 4.2.6. MCF-7 hücre hattının anti-VEGF primer antikorunu kullanarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

VEGFR2 immünoreaktivitesi:

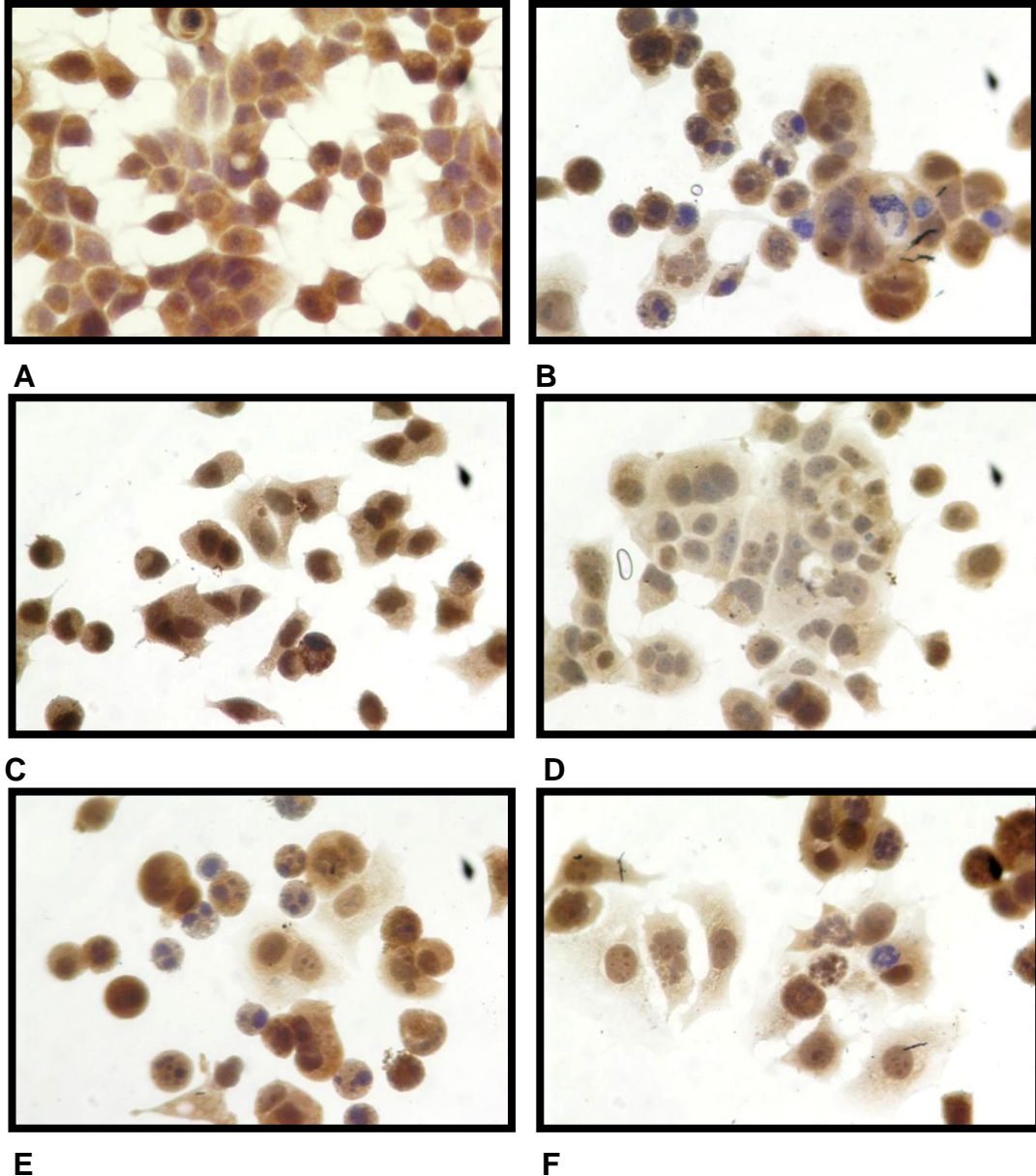
Kontrol grubu MCF-7 meme kanser hücrelerinde VEGFR2 immunoreaktivitesi hafif/orta (+/++) gözlenirken; PX, PR , TD, PX+PR ve PX+TD gruplarında ise hafif (+) olarak izlendi (**Resim 4.2.7**).



Resim 4.2.7. MCF-7 hücre hattının anti-VEGFR2 primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

iNOS immünoreaktivitesi:

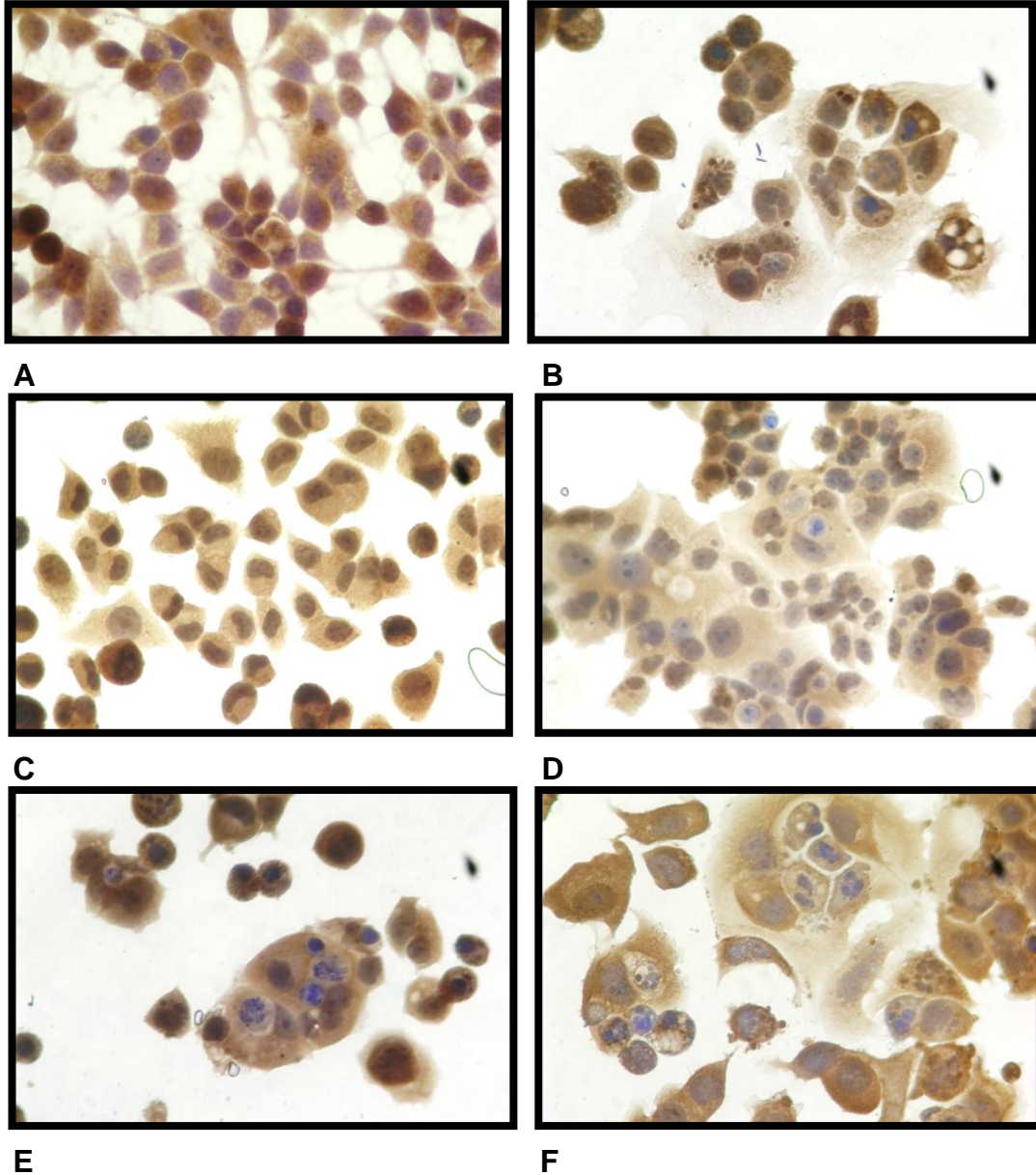
Kontrol grubunda MCF-7 meme kanser hücrelerinde iNOS çok şiddetli izlenirken (++++) PX grubunda hafif/orta, PR grubunda orta, TD grubunda ise hafif olarak izlendi. İlaçların kombine uygulandığı gruplarda ise iNOS kontrol grubuna göre PX+PR ve PX+TD gruplarında hafif/orta olarak değerlendirilmiştir (**Resim 4.2.8**).



Resim 4.2.8. MCF-7 hücre hattının anti-iNOS primer antikorunu kullanarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

eNOS İmmünoreaktivitesi:

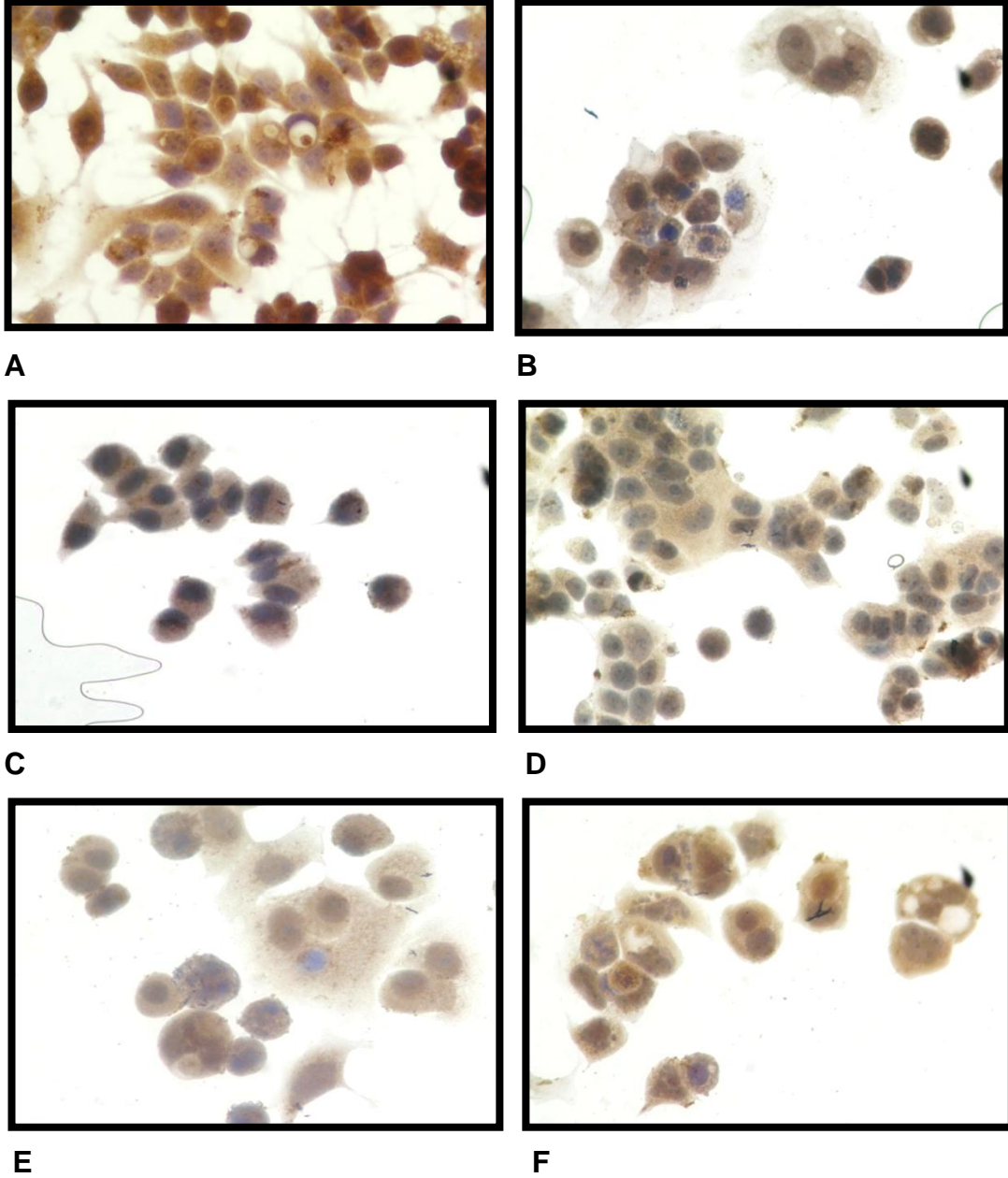
Kontrol grubu MCF-7 meme kanser hücrelerinde eNOS çok şiddetli (++++) olarak gözlenirken; PX ve PR gruplarında orta (++) , TD grubunda ise hafif/orta (+/++) olarak izlenmiştir. PX+PR ve PX+TD gruplarında ise hafif/orta (+/++) olarak gözlenmiştir (**Resim 4.2.9**).



Resim 4.2.9. MCF-7 hücre hattının anti-eNOS primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

ERK1/2 İmmünoreaktivitesi:

Kontrol grubu MCF-7 meme kanser hücrelerinde ERK1/2 şiddetli (+++) olarak gözlenirken; PX grubunda hafif/orta (+/+), TD ve PR gruplarında hafif (+) olarak izlenmiştir. PX+PR ve PX+TD gruplarında ise hafif/orta (+/++) olarak gözlenmiştir (**Resim 4.2.10**).



Resim 4.2.10. MCF-7 hücre hattının anti-ERK 1/2 primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A- Kontrol, B- Paklitaksel (Px), C- Propranolol (Pr), D- Talidomid (Td), E- Paklitaksel + Propranolol (Px+Pr), F- Paklitaksel+ Talidomid (Px+Td), X400

Boyanan hücreler ve boyanma şiddetleri sayılarak H-Skor değerlendirilmeleri elde edildi. İstatistiksel test ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Tüm immunoreaktivite sonuçları **Tablo 4.2.1** ve **Tablo 4.2.2**'de gösterilmiştir.

Tablo. 4.2.1. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının H-Skor ortalamaları ve standart deviasyon (SD) değerlendirmesi.

ORT	K	PX	PR	TD	PX+PR	PX+TD
VEGF ± SD	357,33 ± 25,32	243,33 ± 6,11	183,67 ±10,02	142,33 ±13,65	165,67 ±30,07	198,00 ±22,34
VEGFR2 ± SD	128,33 ±20,21	93,00 ±7,94	95,00 ±8,89	98,00 ±15,00	109,00 ±29,87	93,00 ±8,54
iNOS ± SD	441,33 ±41,68	189,33 ±20,65	272,33 ±17,16	167,00 ±22,07	260,00 ±18,08	146,33 ±35,81
eNOS ± SD	432,67 ±15,04	285,33 ±12,90	266,33 ±28,36	298,67 ±37,31	165,00 ±22,00	202,67 ±55,18
ERK ½ ± SD	328,33 ±9,71	186,00 ±8,54	265,33 ±26,84	285,33 ±8,74	229,00 ±35,09	167,33 ±37,10

Tablo 4.2.2. MCF-7 meme kanseri hücre hattının H-Skor ortalamaları ve standart deviasyon (SD) değerlendirmesi.

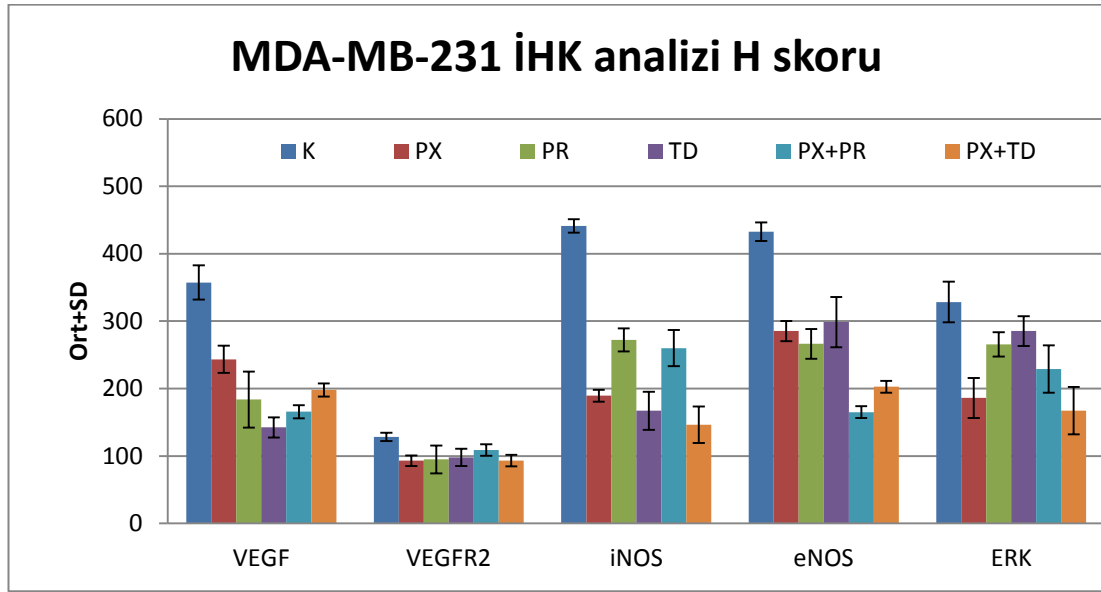
ORT	K	PX	PR	TD	PX+PR	PX+TD
VEGF ± SD	357,33 ±31,64	223,33 ±6,11	147,00 ±28,93	155,00 ±6,24	155,67 ±57,05	198,00 ±32,08
VEGFR2 ± SD	108,33 ±17,56	93,33 ±7,77	105,67 ±15,82	105,00 ±7,00	115,67 ±25,01	116,33 ±21,36
iNOS ± SD	458,00 ±8,00	186,00 ±11,53	245,67 ±42,83	167,00 ±22,07	190,00 ±77,70	189,67 ±80,82
eNOS ± SD	452,67 ±22,05	232,00 ±20,81	252,33 ±41,88	204,33 ±22,28	218,33 ±28,59	206,00 ±52,74
ERK ½ ± SD	318,33 ±8,62	192,67 ±41,31	125,33 ±43,25	142,67 ±42,85	195,67 ±21,08	181,67 ±68,39

H-skor : Toplam alanda yüz hücre sayıldı. Hücreler boyanma şiddetlerine göre (1) hafif, (2) orta, (3) şiddetli ve (4) çok şiddetli olarak skorlandı.

Boyanma üç kere tekrarlandı. Boyanma şiddetleri H-skor yapılarak istatistiksel olarak ANOVA istatistik testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Toplam boyanan hücre sayısı (%) X (Boyanma şiddeti + 1) : formülü ile H-skor, 1 – 500 arasında olacak şekilde değerlendirildi.

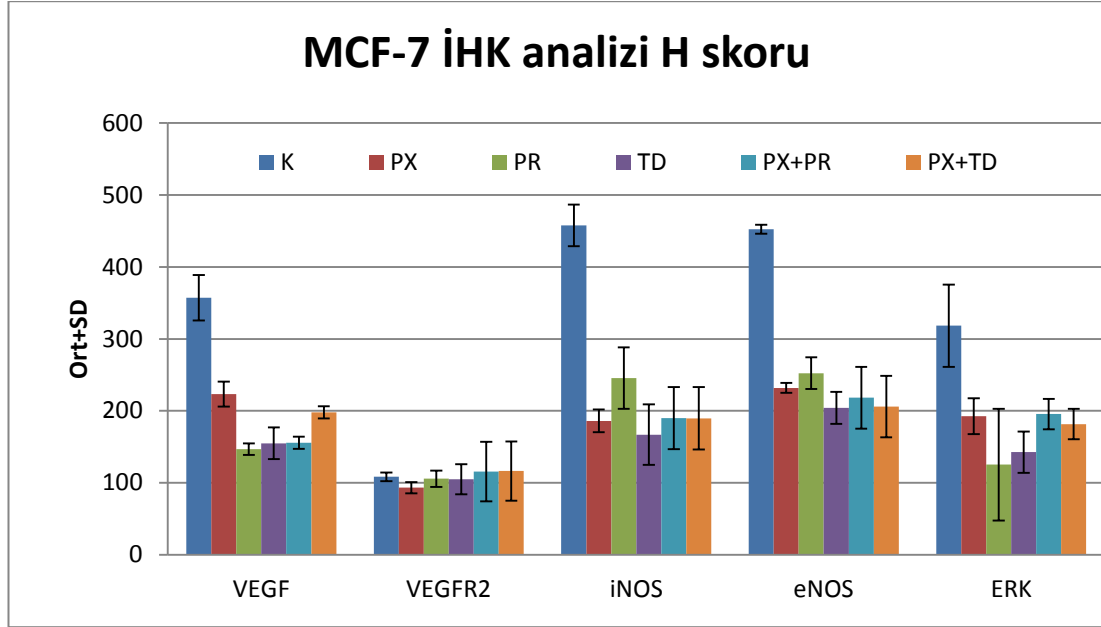
MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine ait H-skor değerlendirmeleri **Tablo 4.2.3.** ve **Tablo 4.2.4.**'de gösterilmiştir. Kontrol grubu MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarında, VEGF, iNOS, eNOS ve ERK1/2 immunoreaktivitelerinin ilaç uygulamaları ile One way ANOVA ve Tukey-Kramer Multipl karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak anlamlı azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 4.2.3. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı immunohistokimyasal analizi



VEGF		iNOS	
K-VEGF vs PX, PR, TD, PX+PR, PX+TD	*** P<0.001	K- iNOS vs PX, PR, TD, PX+PR, PX+TD	*** P<0.001
PX VEGF vs PR	* P<0.05	Px iNOS vs PR	** P<0.01
PX VEGF vs TD	*** P<0.001	PX iNOS vs PX+PR	* P<0.05
PX VEGF vs PX+PR	** P<0.01	PR iNOS vs TD	** P<0.01
TD VEGF vs PX+TD	* P<0.05	PR iNOS vs PX+TD	*** P<0.001
VEGFR2		TD iNOS vs PX+PR	* P<0.05
K-VEGFR2 vs PX, PR, TD, PX+PR, PX+TD	P> 0.05	PX+PR iNOS vs PX+TD	** P<0.01
eNOS		ERK 1/2	
K- eNOS vs PX,PR	** P<0.01	K-ERK1/2 vs PX, PX+TD	*** P<0.001
PX eNOS vs PX+PR	* P<0.05	K- ERK1/2 vs PX+PR	** P<0.01
TD eNOS vs PX+PR	*** P<0.001	PX ERK1/2 vs PR	* P<0.05
TD eNOS vs PX+TD	** P<0.01	PX ERK1/2 vs TD	** P<0.01

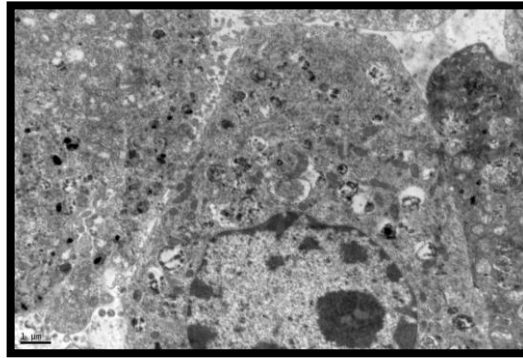
Tablo 4.2.4. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı immunohistokimyasal analizi



VEGF		iNOS	
K- VEGF vs PR, TD, PX+PR, PX+TD	*** P<0.001	K- iNOS vs PX, TD, PX+PR, PX+TD	*** P<0.001
K- VEGF vs PX	** P<0.01	K- iNOS vs PR	** P<0.01
VEGFR2		eNOS	
K-VEGFR2 vs PX, PR, TD, PX+PR, PX+TD	P> 0.05	K- eNOS vs PX, TD, PX+PR, PX+TD	*** P<0.001
ERK 1/2		K- eNOS vs PR	** P<0.05
K-ERK1/2 vs PX, PX+PR, PX+TD	* P<0.05	PX eNOS vs PR	* P<0.05
K- ERK1/2 vs PR	*** P<0.001	PR eNOS vs TD	** P<0.01
K- ERK1/2 vs TD	** P<0.01	PR eNOS vs PX+PR	* P<0.05
PX ERK1/2 vs PR	* P<0.05	PR eNOS vs PX+TD	* P<0.05

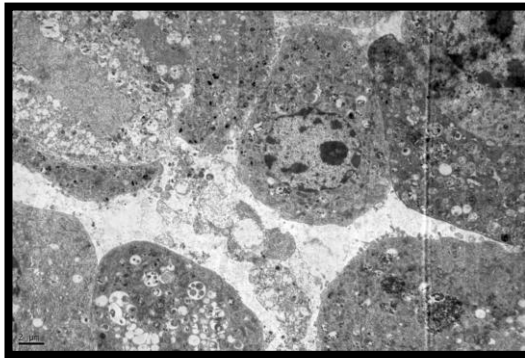
4.3. Ultrastrüktürel Bulgular

Kontrol grubuna ait insan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin elektron mikroskopik değerlendirilmesinde, hücrelerin belirgin çekirdekçik içeren, aktif ökromatik çekirdeği olduğu, organel yönünden (mitokondri, ribozom, granüllü endoplazmik retikulum) zengin hücre özellikleri gösterdiği izlenmiştir. Sitoplazma içinde yaygın mikroflamanlar yer aldığı görülmüştür **(Resim 4.3.1)**.

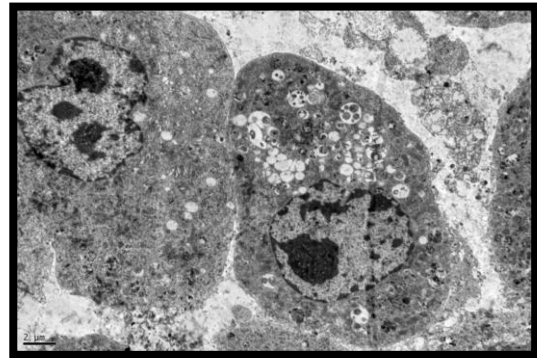


Resim 4.3.1. Kontrol grubuna ait insan MDA-MB-231 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1 μ m

Paklitaksel uygulanan gruptan elde edilen hücrelerin 48. saat elektron mikroskopik değerlendirilmesinde, hücrelerin çekirdeklerinde girinti ve intendasyonlar, sitoplazmasında geniş vakuoller, lizozom benzeri heterojenik veziküller ve apoptozise giden hücre görüntüleri gözlenmiştir **(Resim 4.3.2)**.



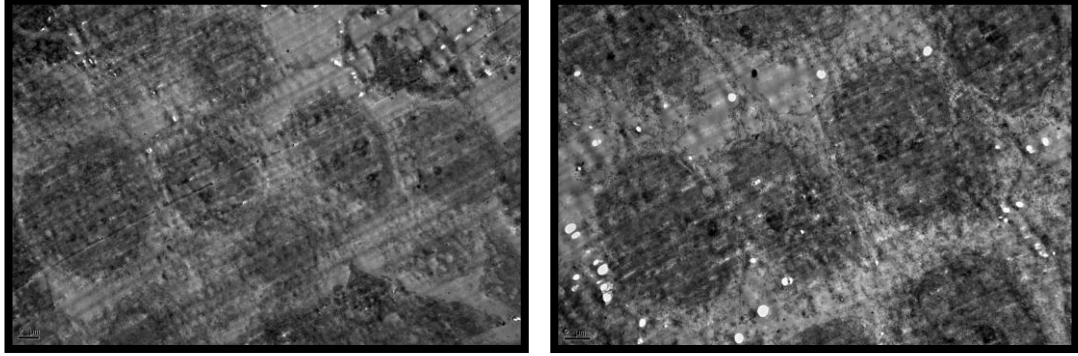
A



B

Resim 4.3.2. İnsan MDA-MB-231 hücrelerinin Paklitaksel uygulaması yapıldıktan 48 saat sonraki elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat A, B Bar : 2 μ m

Kontrol grubuna ait insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntülerinin değerlendirilmesinde, meme kanseri hücrelerinin yuvarlak çekirdek ve 1-2 çekirdekçik içerdiği, kromatini ince ve perifere dağılmış olduğu gözlenmiştir (**Resim 4.3.3.**).

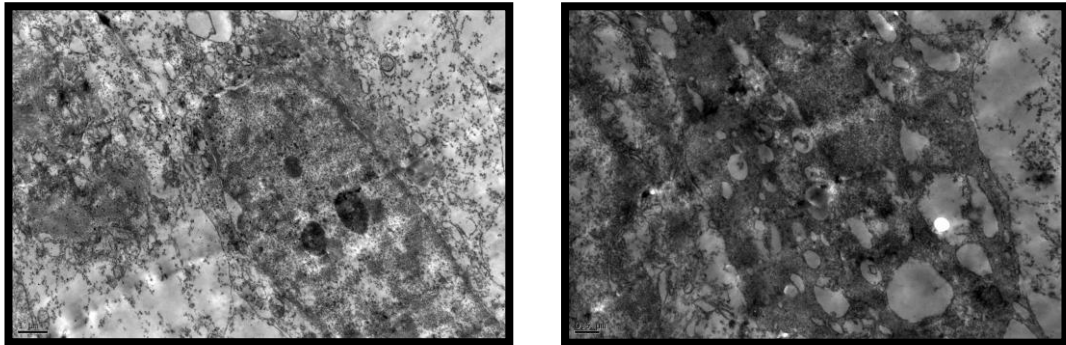


A

B

Resim 4.3.3. Kontrol grubuna ait insan MCF-7 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat, A, B Bar : 2 μ m

Paklitaksel uygulaması yapıldıktan 48 saat sonra insan MCF-7 hücrelerinin elektron mikroskopik değerlendirilmesinde, hücrelerin hücre membranları parçalandığı ve sitoplazmada proteoliz, nekroz bulguları olduğu gözlemlendi. Hücrelerarası bağlantıların azalmış olduğu ve parçalanmış mikrotübül kümeleri izlenmiştir (**Resim 4.3.4.**).



A

B

Resim 4.3.4. Paklitaksel uygulaması yapıldıktan 48 saat sonra insan MCF-7 hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri. Uranil asetat-kurşun sitrat, A Bar : 1 μ m , B Bar : 0,5 μ m

V. TARTIŞMA

Çalışmamızda, invitro olarak metastaz ve invazyon açısından farklı olan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre hatlarında; bir antikemoterapötik ilaç olan Paklitaksel yanısıra, antianjiyogenik olarak bildirilen Talidomid ve Propranolol ilaç uygulamalarının anjiyogenez mekanizmalarında yer alan VEGF, NOS ve ERK yolları ile ilişkisinin indirek immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle değerlendirilmesi yapıldı. Antianjiyogenik ilaç uygulamaları ile kanser hücre hatlarında immunoreaktivitelerin azalmış olduğu izlendi.

Kadınlardaki dört kanserden biri memede yerleşmekte olup, meme kanseri en sık kanserden ölüm nedenidir (126). Meme kanserinin ülkemizdeki sıklığının mevcut verilere göre, 20-40/100.000, olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle meme kanserine yönelik teşhis ve tedavi çalışmaları günümüzde önemli bulunmaktadır. Meme kanserinin etyolojisinde başlıca genetik faktörler, yaş, benign meme hastalıkları, diyetle yağ içeriği fazla besinlerin tüketilmesi, hormonal faktörler yer almaktadır (11, 20). Meme kanseri tedavisinde son yıllarda önemli gelişmeler olmuştur; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal, genetik tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır (1). Hedefe yönelik tedavide, daha çok tümöre özgü ve daha az yan etkili tedaviler amaçlanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda meme kanserinin tedavisinde çeşitli kemoterapötik ilaç uygulamaları yapılmakta ancak ilaca karşı duyarsızlık ve çoklu ilaç dirençlerinin gelişmesi nedeniyle meme kanserinin tedavisinde, invazyon ve metastazların önlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Meme kanseri gelişmesinde tümörlerin büyüme hızı erken dönemde yüksektir. Ancak büyümeye devam ettikçe beslenmesini ve oksijen ihtiyacını karşılayacak olan damarsal yapılar aynı hızla gelişmediğinden tümörün büyüme hızı giderek yavaşlar. Malign tümörlerin hem büyüme hızını

hem de varlıklarını sürdürmelerini sağlayan damarların oluşumunun önlenmesi ve hatta ortadan kaldırılması, son zamanlarda kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak anjiyogenezi ve antianjiyogenik ilaçların geliştirilmesini gündeme getirmiştir (103). Bizim çalışmada da antianjiyogenik açıdan yeni kullanılan ilaçlar tek başına ve kemoterapötik ilaçlarla kombine olarak kullanıldı.

Dokularda anjiyogeneze, stimülasyon ve inhibisyon arasındaki dengenin bozulması sonrasında ortaya çıkmaktadır. Anjiyogeneze yol açan uyarının inhibisyonu, antianjiyogenik ilaçlarla sağlanabilmektedir (127). Tümör hücrelerinin büyümesine neden olan anjiyogeneze sırasında çeşitli büyüme faktörleri, prostaglandinler, HIF gibi moleküller ortama salınarak anjiyogeneze uyarımını başlatabilir. Anjiyogeneze uyarımının etkisizleştirilmesiyle, henüz kapiller düzeyde büyüme evresinde iken tümör anjiyogeneze cevabı önenebilir. Bu durum, etkin bir basamakta inhibisyon yaratılmasıyla anjiyogenezin tamamıyla ortadan kaldırılabilceğini düşündürmüştür (127). Çalışmada anjiyogeneze mekanizmasında önemli olan yollara ışık tutulmaya çalışıldı.

Meme kanseri gibi solid tümörlerin gelişim, invazyon ve metastaz yeteneğine sahip olabilmeleri, anjiyogeneze varlığına bağlıdır. Metastaz oluşumunda tümör hücreleri, önce primer tümör bölgesinde çoğalır, interstisyel stromaya girer, buradaki kan damarları yoluyla dolaşıma katılırlar. Dolaşıma katılan kanser hücreleri hedef organa ulaşarak, hedef organın prekapiller venüllerinde endotel bazal membranına penetre olarak metastatik kolonileri başlatırlar (128). Kanser hücreleri anjiyogenezi hızlandıran büyüme faktörleri salgılamaktadır. Böylece artan oksijen ve besin gereksinimi yeni damar oluşumlarıyla karşılanmış olur. Bu olay tümör hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastatik yayılımının başlamasına olanak sağlar.

Çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında anjiyogenik yolların (VEGF, VEGFR2, NOS, ERK) varlığını ve antianjiyogenik ilaçların (Paklitaksel (PX), Propranolol (PR), Talidomid (TD), PX+PR ve PX+TD) bu yollar üzerine etkilerini değerlendirmek üzere, uygun kültür ortamında hücreler çoğaltılarak, ikilenme zamanları MDA-MB-

231 için 24 saat, MCF-7 için ise 72 saat olarak belirlendi. Metastaz özelliğinin, hücre göçü potansiyelinin ve çoğalmasının daha fazla olduğu bildirilen MDA-MB-231 hücrelerinin daha az invaziv olarak bilinen MCF-7 (129) hücrelerine göre daha hızlı çoğaldığı gözlemlendi. Furtado ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da MDA-MB- 231 hücrelerinin daha hızlı çoğaldığı ve konfluent olduğu bildirilmiştir (130).

Çalışmada; MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarında, meme kanseri tedavisinde kemoterapötik olarak en sık kullanılan ve etki mekanizması mikrotübül organizasyonunu etkilemek olan paklitaksel seçilmiştir. Kemoterapötik olarak kullanılan paklitaksel additif olarak antianjiyogenik özellikleri olduğu ileri sürülen talidomid ve propranolol belirlenmiştir. Uygulanan ilaç dozlarının %50 inhibitör konsantrasyonunu (IC_{50}) tespit etmek amacıyla öncelikle literatüre uygun olacak şekilde doz aralıkları belirlenmiş ardından MTT testi yapılarak çalışmamızda uygulanacak optimum dozlar belirlenmiştir.

Antikemoterapötik tedavide meme kanserinde kullanılan en önemli ajanlardan biri paklitaksel'dir (131). Paklitakselin başlıca etki mekanizması, tübülün dimerlerinde mikrotübülleri etkileyerek mikrotübül depolimerizasyonunu durdurmak ve normal hücre dinamik reorganizasyonu inhibe etmektir. Bu etkisi, G2/M' safhasında hücre senkronizasyonuna sebep olur ve sonuçta apoptoz yoluyla hücre ölümü gerçekleşir (132). Paklitakselin doz bağımlı etkisinin; in vitro ortamda endotel hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği, fare korneasında yapılan deneyde b Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) ile uyarılan yeni damar oluşumu sürecini azalttığı ve in vivo olarak transgenik meme kanserinde tümör anjiyogenezini engellediği gösterilmiştir (133). Bu yüzden paklitakselin ya apoptozu uyararak ya da anjiyogenezini engelleyerek kanser tedavisinde kullanılan önemli bir ajan olduğu düşünülmektedir (134).

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda IC_{50} 'lerin MDA-MB-231 için 2.4 nM; MCF-7 hücrelerinde ise 7.2 nM olduğu bulunmuştur (135). Pires ve arkadaşlarının MCF-7/DX1 hücreleri ile ilgili yaptıkları çalışmada paklitaksel dozunu 7.5 nM olarak belirlemişlerdir (136).

Başka bir makalede paklitaksel için $IC_{50} \text{ MDA-MB-231} = 6.5 \pm 1.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ ve $IC_{50} \text{ MCF7} = 2.2 \pm 0.7 \times 10^{-7} \text{ M}$ olarak bulunmuştur (137). Tommasi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise paklitaksel dozu MDA-MB-231 için $2 \pm 0.14 \text{ nMol}$, MCF-7 için ise $25 \pm 2.35 \text{ nMol}$ olarak belirlenmiştir (138).

Çalışmada, paklitaksel uygulama dozu MCF-7 için 3.7 nm, MDA-MB-231 için ise 5 nm olarak belirlendi. Daha yüksek uygulanan Paklitaksel dozlarında hücre ölümü çok olduğu belirlendiği için, tam etkiyi görmek amacıyla IC_{50} 'ye uygun olacak şekilde düşük doz uygulanmıştır.

Bir beta blokör olarak bilinen ve bu amaçla uygulanan propranolol'ün anjiyogenik mekanizmaları etkileyerek anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (104). Propranololün infantil hemanjiyom vakalarında kullanılan yeni bir ajan olması ve meme kanseri vakalarında da denenmeye başlanması açısından bizim çalışmamızda yer almıştır. Propranolol ile ilgili yapılan bir çalışmada MDA-MB-231 dahil dokuz insan kanser hücre hattında yapılan deneyde doz aralığının 50-100 μM arasında olduğu bulunmuştur (110). Ayrıca T hücreleriyle yapılan bir çalışmada uygulanan Propranolol dozu 100 microM olarak belirlenmiştir (139). Çalışmamızda yapılan MTT testinde Propranolol için 400 ile 25 microM arasındaki doz aralıklarında ilaç uygulamaları yapıldı ve 50 μM dozunun IC_{50} 'ye uygun olduğu görüldü ve hücrelere bu belirlenen propranolol dozu uygulandı.

Talidomid ise kullanımı gebe kadınlarda uygun olmamakla birlikte, varolan kapillerlerden yeni kan damarları oluşmasını (anjiyogenez) engellemesi özelliğinin saptanması sonucu, gebe olmayan kanser hastaları için uygun bir ilaç olarak yeniden kullanımı gündeme gelmiştir (120). Birçok solid tümörde kullanılan ve denenilen bu ilacın meme kanserindeki etkisi çalışmamızda incelenmiştir. Vacca ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda talidomidin multipl myelomlu hastalarda otokrin ve parakrin anjiyogenik düğümü azaltan antianjiyogenik anahtar bir ajan olduğunu göstermişlerdir (140). Diğer bazı hastalıkların tedavisinde olduğu gibi kanser tedavisinde de, iki ve daha fazla ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. İlaç kombinasyonlarının kullanım nedeni, tek bir ilaçla tedavide etkin bir sonuç alınamamasıdır.

Kanserli hastalarda toksik etkileri farklı olan sitotoksik ilaçlar ve etkilerini farklı bölgelerde ve farklı mekanizmalarla gösteren ilaçlar, daha güçlü etki göstermelerini sağlamak amacıyla kombinasyon şeklinde kullanılmaktadırlar. Böylece ilaçların artırılmış ve güçlendirilmiş sitotoksik etkileri tümörün kontrol altına alınmasını kolaylaştırırken, diğer taraftan da herbiri daha düşük dozda kullanılarak hastaya olan toksik etkilerin de en aza indirgenmesi sağlanmaktadır (141). Bu nedenle bizim çalışmamızda da antikemoterapötik ilaç olan paklitaksel ile antianjiyogenik olduğu ileri sürülen talidomid ve propranololün birlikte kullanımını uygun görülmüştür.

Talidomid klinik çalışmaların farklı aşamalarında hematolojik kanserler, solid tümörler dahil renal hücreli karsinom, over, meme ve prostat kanseri gibi malign hastalıkların tedavisinde antianjiyogenik etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (142). Talidomidin α -globin üzerine etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada hücelere son konsantrasyon 0.01 to 100 μ M olacak şekilde verilmiştir (143). Talidomidin embriyonik bodylerde antianjiyogenik etkisine bakılan bir çalışmada ise embriyonik bodyler 3-8 gün boyunca 10 ile 100 μ g/ml arasında tedavi edilmiştir (144).

Çalışmada; talidomid uygulama dozu MCF-7 için 10 μ m, MDA-MB-231 için ise 12,5 μ m olarak belirlendi. Yapılan MTT testinde talidomidin yüksek dozlarda da paklitaksel kadar hücre sayısını azaltmadığı görüldü. Paklitakselin hücre siklusunun mitoz safhasını etkilediğinden hücreleri apoptoza götürdüğü ancak talidomidin daha çok antiinflamatuvar özellikte olması nedeniyle hücre ölümüne neden olmadığı düşünüldü.

Belirlenen ilaç dozlarının kanser hücre hatlarına uygulamaları sonucunda 48. saatte, hücrelerin yarısına yakınının kültür tabağına yapışmış olduğu ve canlılığını sürdürdüğü izlendi. Bu hücreler paraformaldehit ile fikse edilerek immunohistokimyasal uygulamalar gerçekleştirildi.

Çalışmamızda indirek immunohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda, kontrol grubu MDA-MB 231 ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde VEGF immunoreaktivitesi şiddetli gözlenirken; her iki hücre hattında da ilaç uygulamaları ile (Paklitaksel (PX), Propranolol (PR), Talidomid (TD), PX+PR ve PX+TD) anjiyogenik yolak olan VEGF immunoreaktivitesinin anlamlı

olarak azaldığı görüldü. Ancak metastatik MDA-MB-231 ve metastatik olmayan MCF-7 hücre hatlarında VEGF immunoreaktiviteleri açısından istatistiksel farklılık bulunmadı. Kanser hücrelerinin kendine gerekli olan büyüme sinyallerini üretebilme, apoptozdan kaçabilme, sınırsız çoğalma, sürekli anjiyogenez, genomik kararsızlık gibi çeşitli özellikleri vardır. Anjiyogenik yollar bunlardan sadece birinin etkisini göstermektedir. Kanser hücrelerinin bunun dışında da bir çok faktörden etkilendiğinden anlamlı bir fark oluşmadığı düşünüldü.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) güçlü ve selektif bir endotelial mitojen faktör olup endotel hücrelerin göçü ve çoğalmasında önemli rol oynamaktadır (145). Normal ve malign dokuda yeni kan damarı oluşumunu sağlayarak anjiyogenik cevabın tamamlanmasını sağlamaktadır. VEGF akciğer, tiroid, meme, gastrointestinal sistem, over ve diğer tümörlerde (146) salgılanabilmekte ve endotel hücrelerinde VEGFR1 (Flt-1) ve VEGFR2 (Flk-1) olmak üzere başlıca iki tirozin kinaz reseptörü ile yeni damar oluşumunu sağlamaktadır (147). Meme kanseri hücreleri ve meme stromal hücrelerinden de salgılandığı gösterilmiş olup, bu da VEGF'in meme kanseri gelişimi ve anjiyogenezde aktif rol oynadığını göstermektedir (148).

Çalışmamızda kontrol grubu MDA-MB 231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre hattında VEGFR2 immunoreaktivitesi hafif/orta gözlenirken; ilaç uygulanan gruplarda ise hafif olarak izlendi. Her iki hücre hattında da kontrol grubu ile ilaç uygulamaları yapılan gruplar arasında immünoreaktivitelerin şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

VEGF/VEGFR yolağı üzerine yapılan son çalışmalar yeni antianjiyogenik ajanların gelişmesine yol açmıştır. Klinik çalışmalar bu yolların inhibisyonunun tümör çapını, metastazı ve kan damarı oluşumunu azalttığını göstermiştir (149). VEGF/VEGFR yolağını içeren PI3K/AKT, Ras/Raf/MAPK ve fosfolipaz -Cg/protein kinaz C (PLCg/PKC) gibi çeşitli moleküler yolak ve sinyal kaskadları vardır (150,151).

Hem VEGFR1 hem de VEGFR2 damar endotelinden salgılanmasına rağmen VEGF'in anjiyogenik aktivitesi esas olarak VEGFR2 yoluyla olmaktadır. VEGFR2 anjiyogenik sinyalde predominant bir reseptördür.

Aktivasyonu endotel hücre göçü, çoğalması, farklılaşması, yaşam süresi kadar damar geçirgenliği ve dilatasyonunu düzenlemektedir (152). Soltau ve arkadaşlarına göre; VEGFR1'inaktivasyonu VEGF'in büyüme ve yaşam süresi üzerine etkili olmakta bu yüzden VEGFR1 VEGF'e bağlanarak ve VEGF'in VEGFR2'ye bağlanmasını engelleyerek anjiyogenez üzerinde negatif bir düzenleyici olarak fonksiyon görebilmektedir (152, 153).

Çalışmamızda VEGFR2'nin immunohistokimyasal değerlendirmesinde kontrol grubunda immunoreaktivitenin çok fazla olmaması VEGFR1 aktivitesinin çok arttığı için VEGF'in VEGFR2'ye bağlanmasını engellemiş olabileceğini düşündürdü.

Anjiyogenez meme kanseri dahil birçok kanser tipinde invazyon ve metastaz açısından önemli bir süreçtir (154). Tümör çevresindeki mikrodamar yoğunluğu artmadığı sürece tümörlerin belirli bir boyuta geçerek büyümesi mümkün olmayabilir (155), ve tümöre yakın damarların yoğunluğu metastaz yeteneğini etkileyebilmektedir (156). Meme kanseri ile ilgili olarak VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunun birçok meme kanser türlerinde yüksek olduğu (157); primer meme tümörlerinde VEGF ekspresyonu ile mikrodamar yoğunluğu arasında bir korelasyon olduğu; meme kanserli hastalarının sağ kalım oranının VEGF ekspresyonu ile ters ilişkili olduğu ve yüksek VEGF seviyelerine sahip hastaların prognozunun kötü olduğu bildirilmiştir (158).

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında prolin, arginin, askorbik asit ve epigallokateşin gallat (NM) gibi maddelerin anjiyogenez etkisine bakılan bir çalışmada VEGF yolağına bakılmış ve bu maddelerin meme kanserinde anjiyogenezi ve invazyonu azalttığı gösterilmiştir (159).

Çalışmada VEGF kanser hücre hattında artmış iken, talidomid uygulamasında daha fazla olmak üzere azalmış olarak bulunmuştur. Talidomidin etki mekanizması olarak VEGF'i inhibe ettiğine dair yayın bulunmaktadır (160). Talidomidin hem direk olarak hem de kombinasyonda VEGF azalmasına neden olduğu ve bunun ileri kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Lenalidomid (Revlimid Celgene) oral immün düzenleyici ilaç olup talidomid derivativesidir. Tümör hücre hatlarında kaspaz

bağımlı apoptoza neden olduğu, in vivo ortamda yeni damar oluşumunu sağlayan bFGF ve VEGF'i inhibe ettiği ve endotel hücre migrasyonu için gerekli olan AKT/PKB fosforilasyonunu engellediği, proanjyogenik TNF- α üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (161).

Çalışmamızda, meme kanseri hücre hatlarında VEGF immunoreaktivitesinin artmış olarak bulunması yukarıda belirtilen literatürler ile (157, 158) uyumlu bulunmuş olup, metastatik MDA-MB-231 ve daha az metastatik olan MCF-7 hücre hatlarında VEGF immunoreaktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü.

VEGF'nin pek çok insan meme tümörlerinde ekspresyonu ve bunun düzeyi, hastalık için önemli bir dizi klinik özellik ile ilişkilendirilmektedir. Meme kanseri hücrelerinde VEGF salgısını kontrol eden mekanizmaların tincelenmesi, bu hastalığın bazı temel özelliklerinin anlaşılması açısından önemli olacaktır.

Çalışmada, iNOS ve eNOS immunoreaktiviteleri kontrol grubunda MDA-MB 231 ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde çok şiddetli izlenirken, her iki hücre hattında da ilaç uygulamaları ile iNOS ve eNOS immunoreaktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü.

Nitrik oksid'in (NO) endotel hücre büyümesi (162), apoptoz, göç (163), ve özellikle anjiyogenez (164) üzerine önemli farklı biyolojik fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. NO'nun fonksiyonu diğer serbest radikaller, metal iyon ve proteinlerle etkileşime, konsantrasyona ve hücre tipine ve genetik yapıya bağlı olduğu için, karsinogenezdeki spesifik rolünü tespit etmek zordur. iNOS salgısının çeşitli insan kanserlerinde arttığı bulunmuştur (165). Ancak e NOS farklı kanserle ilgili olayları (anjiyogenez, apoptozis, hücre döngüsü, invazyon ve metastaz) düzenlediği ileri sürülmüştür (166). Kronik inflamasyonun tümör gelişimi ve kanserin ilerlemesine yol açtığı bilinmektedir (167). iNOS (NOS2) da kronik inflamasyona bağlı kanserin ilerlemesinde önemli bir proinflamatuvar medyatördür (168). NOS2'nin ekspresyonunun artışı prekanseröz lezyonlarda gösterilmiştir (167) ve birçok çalışmada NOS2'nin potansiyel bir kanser belirteci olarak kullanıldığını ve tümörde eksprese edilen yüksek NOS2'nin melanom, prostat ve meme kanseri gibi birçok

kanser tipinde hastanın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir (169, 170). Son çalışmalarda NOS2 ekspresyonunun tümörün evresi, P53 mutasyonu ve tümör damarlanmasını içeren yaşam süresini belirleyici genel belirteçler ile korele olduğu ve ER negatif meme kanserli hastaların beş ve on yıllık yaşam süresini belirleyici olduğu bulunmuştur (171). Ayrıca, proinflamatuvar mikroçevre ile ilişkili tümör NOS2 direk olarak tümör pAkt seviyesi ve p-kaspaz-9 ve pBAD'ı içeren yolları aynı meme kanseri tümörlerinde aktive etmektedir (172). Akt sinyal yolağına ek olarak NO'nun eşik seviyesinin p53 fosforilasyonu, HIF-1 alfa, protein transasyonu ve proliferasyon yollarını içeren kanserin ilerlemesi ve anjiyogenezi belirleyen medyatörleri indüklediği bulunmuştur (173, 174).

eNOS NOS'un tümör vasküler endotel hücrelerinde etkili olan başlıca izoformudur. Patolojik durumlar altında, eNOS B16 melanomada anjiyogenezi uyaran dominant uyarıcıdır (175). Brouet ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kaveolin-1 tarafından bazal eNOS'un inhibe edilmesi eNOS'u parçalayan bir proteininin, tümördeki NO-bağımlı kan akımını azalttığı ve tümörün büyümesini geciktirdiği gösterilmiştir (176).

eNOS'un L-arginin analogları ile inhibe edilmesi meme kanserinde hem tümör kan akımını hem de mikrovasküler geçirgenliği azaltmaktadır (177). eNOS aktivasyonu proanjiyogenik VEGF tarafından endotel hücre fosforilasyonu ile olabilmektedir (178). VEGF'in uyarılmasına cevap olarak fosfoinositol 3-kinaz (PI3K) ve ardından Akt fosforilasyonu olmaktadır. Akt aktivasyonu direk olarak eNOS'u fosforile etmekte ve buda geçici olarak NO artışına yol açmaktadır (179). Bizim çalışmada da NO sentezinin kanserli hücrelerde artmış olmasına rağmen ilaç verilen gruplarda azalmasının VEGF'e yanıt olarak Akt ve ERK fosforilasyonu sonucu olduğu düşünüldü.

ERK1/2 immunoreaktivitesi kontrol grubu MDA-MB 231 ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde şiddetli olarak gözlenirken; PX grubunda hafif/orta, TD ve PR gruplarında orta olarak izlenmiştir, MCF-7 hücre hattında TD ve PR gruplarında ise hafif olarak izlenmiştir. İlaçların kombine uygulandığı gruplarda ise her iki hücre hattında da immünoreaktiviteler kontrol grubuna göre azalmış olarak izlenmiştir.

VEGF endotel hücrelerinde MEK-ERK yolağının güçlü bir aktivatörüdür (180). Bresslin ve arkadaşları yaptıkları in vitro bir çalışmada VEGF'in ERK1/2 ve NO tarafından da etkinliğinin arttığını yani bu yolakların etkileşim içinde olduklarını ve sonuçta anjiyogenezde önemli olduklarını vurgulamışlardır (181). ERK1/2'nin anjiyogenez ile ilişkisine bakılan farklı bir çalışmada VEGF'in Ras yolağını aktive ettiği bu aşamanın VEGF tarafından ayrılmasının anjiyogenez, migrasyon gibi hücre sel değişiklikler için gerekli olduğu gösterilmiştir (182). Endotel hücreleri anjiyogenezde, dokuda oluşan iskemiye yanıt olarak meydana gelen fizyolojik ve patolojik yeni damar oluşumunda ve tümör büyümesi ve metastazda kritik rol oynamaktadırlar (183). İnvitro olarak planlanan çalışmamızda kullandığımız anjiyogenik yolakların meme kanseri hücre hatlarında artmış olmasına rağmen ilaç gruplarında azalmış olması uygulanan ilaçların bu yolaklar üzerinden etki ederek anjiyogenezi azaltabileceği düşünüldü.

Raf fosforilenmiş bir ajan olarak mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) kaskadını aktive eden ve Ras etkisini azaltan bir ajandır. Raf'ın üç izoformu vardır; A-Raf, B-Raf ve Raf-1. Bunların %7'si insan kanserlerinde rapor edilmiştir. Sorafenib (Bay 43-9006) VEGFR1, 2, 3, PDGFR β , c-kit ve flt-3 gibi diğer hedefler ile Raf kinaz aktivitesini inhibe eden böylece hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi bloke eden ve apoptoza sebep olan küçük bir moleküldür (184). Metastatik meme kanserli (MMK) faz II çalışmalarda, sorafenib hastalığın ilerlemesini durdurmuş ve bunu tümör hacmini azaltıp tümör büyüme hızını değiştirerek sağlamıştır. Böylece, sorafenibin standart tedavilerle kombinasyonu hastalığın stabilizasyonu gibi hedef ajanların etkisinin daha hassas olmasını sağlamıştır. MMK'i olan hastalar en azından bir kez kemoterapi rejiminden sonra oral sorafenib tedavide minimal bir ilerleme sağlamıştır (185). Sorafenibin tek-ajan olarak kullanıldığı hastalarda sonuç, gelecekteki araştırmalar için cesaret kırıcı olmuştur. Buna rağmen, sorafenibin kapesitabin ile kombinasyonu meme kanserli hastalarda PFS'i (progresyon free survival) 4.1' den 6.4 aya ilerletmiştir. Şu anda, faz III çalışmalar sorafenibinin kapesitabin veya plasebo ile kombinasyon tedavisini

lokal ilerlemiş veya metastatik HER2-negatif meme kanserinde karşılaştırmaktadır (186).

Propranolol ile ilgili yapılan bir çalışmada β -adrenergik blokajın ERK/AKT yolağını etkileyerek güçlü bir antiproliferatif etki gösterdiği vurgulanmıştır (187). Ayrıca Seya ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada umbilikal ven endotel hücrelerine Propranolol uygulamasının VEGF, NOS, ERK yollarına etkisine bakılmış olup ilacın bu yolları baskıladığı gösterilmiştir (188).

Çalışmada; Propranolol uygulanan kanser hücre hatlarında VEGF, NOS ve ERK1/2 olan anjiyogenik yollardaki boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu görüldü. Bunun da özellikle hemanjiyom tedavisinde kullanılan Propranololün β -blokör etkisinden dolayı meydana gelen vazokonstriksiyon, antianjiyogenik ve olaylar sonucunda olduğu düşünüldü. Propranololün Paklitakselle kombine uygulandığı gruplarda da yine kontrol grubuna göre immunoreaktivite şiddetinde azalma oldu ancak bu azalmanın Propranololün tek uygulandığı gruplara göre anlamlı bir farklılık göstermedi. Pasquier ve arkadaşlarının Propranolol ve kemoterapik olarak 5-fluorouracil (5-FU) veya Paklitaksel uyguladıkları meme kanseri hücre hatları dahil farklı hücre hatlarında Propranololün antianjiyogenik etkisinin kombine uygulanan gruplarda daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu çalışmada uygulanan paklitaksel dozları yüksek doz olarak uygulanmış olup düşük doz uygulandığında kombinasyonun anlamlı bir fark göstermediği görülmüştür (189).

İnce yapı düzeyindeki incelemelerde, kontrol grubu olan meme kanser hücre hatlarında sitoplazmalarının oldukça geniş ve organelden zengin oldukları, sitoplazma içinde yaygın mikroflamanlar yer aldığı ve aktif çekirdek içerdikleri görülmüştür. Paklitaksel uygulamasının apoptozisi indükleyerek hücre çoğalmasını azaltmış olduğu elektron mikroskop altındaki incelemelerde morfolojik olarak izlenmiştir.

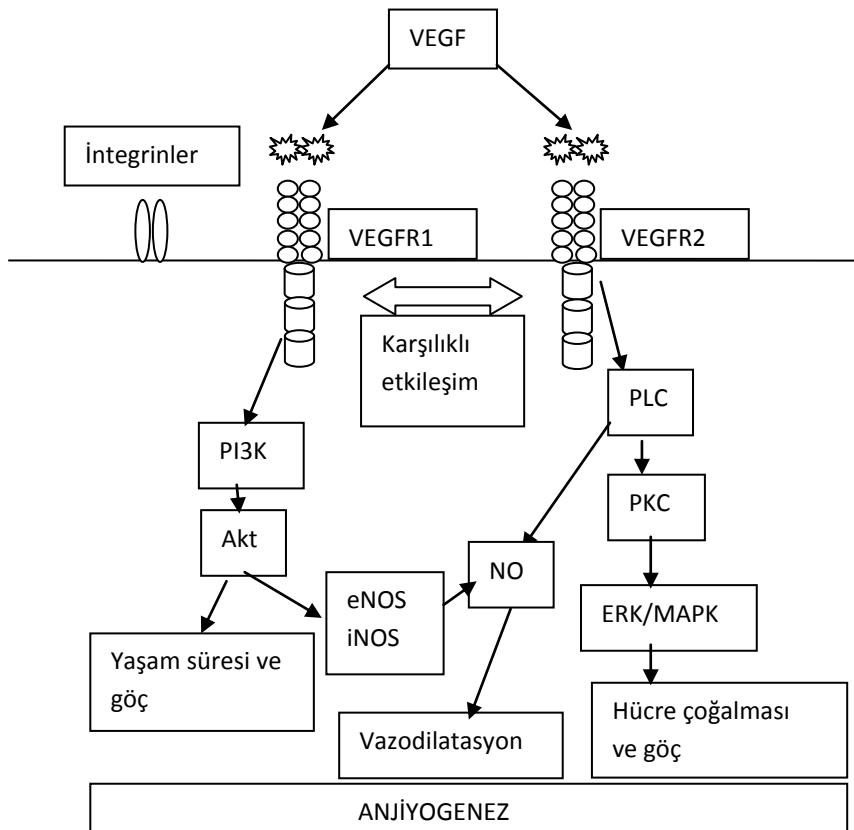
Çalışmada; meme kanseri hücre hatlarında VEGF, ERK1/2 ve NOS yolları incelenmiştir. Tüm bu yolların immunohistokimyasal incelenmesi sonucunda kontrol grubu olarak seçtiğimiz MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarında artmış immünoreaktivite göstermişlerdir. Ancak iki

hücre hattı arasında bu yollarda immunoreaktivitenin şiddeti açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. İnvitro şartlarda kanser hücrelerinin çoğalma ve anjiyogenik faktörleri salgılamak için aktive olabildikleri ancak invivo şartlarda, farklı mikroçevrede invazyon yönünden farklı davranış özellikleri sergileyebilecekleri düşünülmüştür.

Meme kanserinde anjiogenezin düzenlenmesinin anlaşılması tümör büyümesi ve metastazı, farmakolojik tedaviler ve tümör insidansının azalması için alınacak önlemler açısından sorumlu mekanizmaların anlaşılmasında önemli ipuçları verebilecektir (190).

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda invaziv olan MDA-MB-231 ve daha az invaziv olan MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarında uygulanan antianjiyogenik ilaçların birbirleriyle etkileşim içinde olan VEGF, NOS (vazodilatasyon) ve ERK1/2 (hücre çoğalması ve göçü) gibi anjiyogenik yollar üzerinden etki göstererek tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediği sonuçta uygulanan bu ilaçların meme kanseri gelişimi ve metastazı üzerine etkili olabileceği düşünüldü (**Şekil 6**). İn vitro yaptığımız çalışmanın desteklenmesi ve ilaç etkilerinin daha belirgin olarak görülebilmesi için in vivo çalışmalara da ihtiyaç vardır.



Şekil 6. VEGF, NOS ve MAPK (ERK) sinyal yolları ve anjiyogenezin mekanizması.

ÖZET

Meme kanseri hücre hatlarında antianjiyogenik tedavinin VEGF, NOS ve ERK yolaklarına etkisinin değerlendirilmesi

Kadınlarda en sık görülen ve öldürücü olan kanserlerden olan meme kanserinin gelişmesi ve ilerlemesindeki kesin nedenler, bu konuda birçok çalışma yapılmasına karşın tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda, anjiyogenez mekanizmalarının kanser gelişimi ve çoğalmasında önemli olduğu, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı için anjiyogenez mekanizmalarının aktive olması gerektiği belirtilmektedir. Son yıllarda, antikekoterapötik tedaviye adjuvan olarak antianjiyogenik tedavinin eklenmesinin tümör gelişimini engellediği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada; invitro olarak invazyon yönünden farklı iki meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231 ve MCF-7) antikekoterapötik (Paklitaksel) tedaviye adjuvan olarak uygulanan antianjiyogenik (Talidomid ve Propranolol) tedavinin VEGF, NOS ve ERK yolaklarına etkisinin indirek immuno-histokimyasal ve ince yapı düzeyinde araştırılması amaçlandı.

Soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırılan hücreler uygun şartlarda açıldıktan sonra %10 FCS, %1 L-glutamine, %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 kültür vasatına alınarak, 37°C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. Her iki günde bir kültür vasatları değiştirildikten sonra 2. haftada hücreler pasaj yapılarak çoğaltıldı ve ikilenme zamanları belirlendi. Kültüre devam edilen hücreler yeterli miktara ulaştıkları zaman Paklitaksel, Talidomid ve Propranolol ilaç uygulamaları IC₅₀ dozları belirlenerek yapıldı ve 48 saat sonunda değerlendirildi. Hücreler üzerindeki ilaç etkileri MTT testi ile ve avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile anti-VEGF, anti-VEGFR2 (KDR), anti-eNOS, anti-iNOS ve anti-ERK1/2 primer antikorları indirek immunohistokimyasal olarak incelendi. Yarı-kantitatif olarak elde edilen

sonuçlar ANOVA ve Tukey-Kramer Multipl karşılaştırma testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İnce yapı düzeyinde değerlendirmek üzere hücreler tripsinle kaldırılarak toplandı ve %2,5' luk gluteraldehit ile fikse edildi. Ardından saf araldit ile kapsüllere gömüldü. Ultramikrotomla alınan ince kesitler, JEOL 1014 elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

Tripan mavisi ile hücre sayımı yapılarak çoğalma hızlarına bakılan hücrelerin ikilenme zamanları MDA-MB-231 için 24 saat, MCF-7 için ise 72 saat olduğu belirlendi. MTT testi ile hücrelere uygulanacak ilaç dozlarının IC₅₀ değerleri MDA için; PX: 5 nmol, PR: 50 m, TD: 12,5 m ve MCF- 7 için PX: 3,7 nmol, PR: 50 m, TD: 10 m olarak bulundu.

İmmünohistokimyasal uygulamada MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde kontrol gruplarının VEGF, iNOS, eNOS ve ERK1/2 immünoreaktivitesi Şiddetli ve/veya çok Şiddetli artmış iken PX, PR, TD ve kombine uygulanan ilaç gruplarında boyanma Şiddeti anlamlı veya çok anlamlı olarak azaldı. VEGFR2'nin immünohistokimyasal değerlendirmesinde kontrol grubu ve ilaç uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Elektron mikroskop ile incelemede meme kanseri hücre hatlarına uygulanan paklitaksel uygulamasının mikrotubul organizasyonunu bozarak ve apoptozisi indükleyerek hücre çoğalmasını azaltmış olduğu gözlendi.

Sonuçta bu çalışma ile kemoterapötik olarak uygulanan paklitaksele ek olarak anti anjiyogenik ila uygulamalarının damarlarda vazodilatasyon, hücre oğalması, g ve yaşam süresini etkilemesi sonucunda anjiyogenezi azaltması veya nlemesi açısından meme kanserinin tedavisinde önemli olduğu dşnlmştr.

İNGİLİZCE ÖZET

Evaluation of anti-angiogenic therapy on the effects of VEGF, NOS ve ERK pathway in breast cancer cell line

Breast cancer is one of the most common cancer types in the world. Although a lot of studies have been done about the development and the progression of breast cancer, the exact cause of the issue is not known exactly. In various studies it has been reported that angiogenesis mechanisms are important in cancer development and invasion and for cancer growth and progression, angiogenesis mechanisms should be activated. It has also been reported that in addition to anti chemotherapeutic treatment, anti angiogenic treatment usage is effective for the prevention on the tumor progression.

The aim of this study was to investigate the evaluation of the pathways in the mechanisms of angiogenesis and in addition to anti-chemotherapeutic (paclitaxel) to anti-angiogenic treatment (thalidomide and propranolol) in the breast cancer cell lines which are different with regard to invasion (MDA-MB-231 and MCF-7), by using immunohistochemical and ultrastructural methods.

After opening under suitable conditions the transported to the laboratory in cold chain cells were reproduced in RPMI-1640 medium with 10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% antibiotic, including 5% CO₂ in a 37°C humid incubator. When the cells which are continue to culture reached a sufficient level, drugs

of IC_{50} were calculated and paclitaxel, propranolol and thalidomide were applied and at the end of 48 hours was evaluated. The cells mediums changed every two days, then in the second week the cells were replicated by subculturing and the doubling time of the cells were determined.

Drug effects on cells by MTT assay with avidin-biotin-peroxidase method with anti-VEGF, anti-VEGFR2 (KDR), anti-eNOS, anti-iNOS and anti-ERK1/2 primer antibodies investigated by indirect immunohistochemical method.

Semi-quantitative scores will be used to compare and the groups evaluated using the ANOVA statistical and Tukey Kramer Multiple Comparisons Test.

The cells were trypsinized and fixed with 2.5% glutaraldehyde for the investigation of ultrastructural level and embedded in to pure araldite.

Semi-thin sections from ultramicrotome were evaluated by JEOL 1014 electron microscope.

Seen from the growth rates of the cells with trypan blue cell counts, the doubling time were determined 24 hours for MDA-MB-231 cells and 72 hours for MCF-7 cells. With MTT test, IC_{50} values are applied to the cells dosage for MDA-MB-231 cells; PX: 5 nmol, PR: 50 μ m, TD: 12.5 μ m and for MCF-7 cells PX: 3.7 nmol, PR: 50 μ m, TD: 10 μ m were established.

We observed that, immunoreactivity of control group of VEGF, iNOS, eNOS and ERK1/2 in the cells of MDA-MB-231 ve MCF-7 cell line was increased with strong and/or stronger, while those of in PX, PR, TD and combine treatment was decreased either significant or very significant. There was no significant differences among groups including control for the VEGFR2 immunoreactivity.

The results from electron microscope showed that paclitaxel treatment disturbed microtubule organization and induced apoptosis to reduce cell proliferation in breast cancer cell line

Eventually with this study, application of anti chemotherapeutic therapy which is paclitaxel, in addition with anti angiogenic therapy in the treatment of breast cancer, vascular vasodilation, cell proliferation, migration, survival ultimately thought to be important in the prevention or reduce of angiogenesis.

KAYNAKLAR

- 1- Sayek İ. Temel Cerrahi . Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 895-1012.
- 2- Topografik anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000: 150-154.
- 3- Temel klinik anatomi. Ankara: Güneş Kitabevi, 2006: 60-64.
- 4- Netter FH. The netter collection of medical illustrations (Çev. Tıraş B, Güler İ.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2012: 245-250.
- 5- Putz R, Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası Cilt 2. İstanbul: Beta Basım Yayım Dağıtım, 2001: 55.
- 6- Sadler T.W. Langman medikal embriyoloji (Çev. Başaklar AC, Sönmez K). Ankara: Palme Yayıncılık, 2005: 421-423.
- 7- Carlson BM. Human embryology and developmental biology, St Louis, Mosby-Year Book, 1994.
- 8- Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi (Çev. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 520-522.
- 9- Schneider S.F, Harrison S.I, Siegel B.L. Self-Castration by a Man with Cyclic Changes in Sexuality Psychosomatic Medicine 1965;1: 53-70.
- 10- Rosai J. Surgical Pathology Tenth Edition Volume 2, Elsevier Mosby, USA, 2011: 1660-1732
- 11- Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi (Çev. Demir R). Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 601-605.
- 12- Junqueira LC, Carneiro J. Temel histoloji (Çev. Solakoğlu S, Aytekin Y). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 452-455.

- 13-Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji 7. Edisyon. İstanbul: Nobel Tıp Tıp Kitabevleri, 2003: 705-717.
- 14-Kayhan Ö. Genel cerrahi ders kitabı. Ankara: Hacettepe Taş, 1996: 127-148.
- 15-Durak M.G., Karaman I., Canda T., Balcı P., Harmancıoğlu Ö. Cystic Fibroadenoma of the Breast: A Case Report TJP 2011; 27:3, 254-256.
- 16-Ueng SH, Mezzetti T, Tavassoli FA. Papillary neoplasms of the breast: a review. Arch Pathol Lab Med 2009; 133:893 -907.
- 17-Schnitt SJ: Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. Mod pathol 14: 213, 2001.
- 18-Lambert K, Patani N, Mokbel K. Ductal carcinoma in situ: recent advances and future prospects. Int J Surg Oncol 2012; 2012:347385.
- 19- Kars MD, İşeri ÖD, Arpacı FT. Meme kanseri MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristin'e karşı gelişmiş çoklu ilaç direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile belirlenmesi. Onkoloji Dergisi 2009; 24(4):153-158.
- 20- Şahin D, Özbay NÖ. Tusem Patoloji ve Histoloji. Ankara: Tusem Tıbbi Yayıncılık. 2007: 385-396.
- 21-Aslan F.E., Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. The journal of breast health 2007; 3:2, 063-068.
- 22- Aydınтуğ S. Meme kanserinde erken tanı. Sted 2004; 226-228.
- 23-Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the Tumor Microenvironment: Focus on Angiogenesis. Journal of Oncology 2012;2012:281261.
- 24-Winer EP, Morrow M, Osborne CK, Haris JR. Malignant Tumors of the Breast In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg (eds). Cancer Principles and Practice of Oncology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 1651-1717.
- 25- Schnitt SJ, Morrow M. Lobular carcinoma in situ: current concepts and controversies. Semin Diagn Pathol 1999; 16: 209–23.
- 26- Schwarz, V.A., Hornung, R., Fedier, A., Fehr, M.K., Walt, H., Haller, U., Fink, D. Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient

- and proficient tumour cells. *British Journal of Cancer* 2002; 86: 1130 – 1135.
- 27-Kısım A. (-)-Gossypol (AT-101) ve rekombinant insan APO2/TRAIL' in tekli ve kombine dozlarının meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması. Tez J. Manisa; Celal Bayar Üniversitesi, 2010.
- 28-Satya-Prakash KL et al. Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1981; 3: 61-73.
- 29-O'Connor P.M, Jackman J, Bae I, Myers T.G, Fan, S et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57: 4285-4300.
- 30- Bartsch J.E, Staren E.D, Appert H.E. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res* 2003; 110: 383-392.
- 31-Geisler S, Al B.D, Johnsen H, Aas T, Geisler J, Akslen L.A, Anker G, Lonning P.E. TP53 gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5582-5588.
- 32- Greenblatt M.S, Bennett W.P, Hollstein M, Haris C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor genes: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
- 33-Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan M.A, Haris, C.C, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607–614.
- 34-Lü X, Deng Q, Li H, Suo Z. Altered characteristics of cancer stem/initiating cells in a breast cancer cell line treated with persistent 5-FU chemotherapy. *Exp Ther Med*. 2011; 2(5):821-826.
- 35- Lu X, Errington J, Curtin N.J, Lunec J, Newell D.R. The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2114–2123.

- 36-Hui L, Zheng Y, Yan Y, Bargonetti J, Foster D.A. Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* 2006; 25: 7305–7310.
- 37-Sporn M.B, Roberts A.B. Suppression of carcinogenesis by retinoids: interactions with peptide growth factors and their receptors as a key mechanism. *Princess Takamatsu Symp* 1985; 16: 149-158.
- 38-Yazır Y. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF):reseptörleri ve fonksiyonları. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 29 (3): 128-136.
- 39- Güllü İH. Anjiyenez ve antianjiyenez faktörleri. *Türk Farmakoloji Derneği 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi Kitabı*. Trabzon. 2007: 126-137.
- 40- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186,
- 41- Jensen HM, Chen I, DeVault MR, et al. Angiogenesis induced by “normal” human breast tissue: A probable marker for precancer. *Science* 1982; 218:293-295.
- 42-Miller K, Sledge GW: Dimming the blood tide. Angiogenesis, antiangiogenic therapy and breast cancer, in Nabholz JM (ed). *Breast Cancer Management Application of Clinical and Translational Evidence to Patient Care*, 2nd ed. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 287-308.
- 43- Guinebretiere JM, Le Monique G, Gavaille A, et al. Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 635-636.
- 44- Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 86:614-619, 1994
- 45- Klagsburn M., D’Amore P.A. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-70
- 46- Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 517-24

- 47- Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function IUBMB Life, 2001; 52: 61-6.
- 48- Sato TN, Qin Y, Kozak CA et al. Tie-1 and Tie-2 define another class of putative receptor tyrosinase kinase genes expressed in early embryonic vascular system. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 9355-9358.
- 49- Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD et al. Angiotensin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. Curr Biol 1998; 8: 529-32.
- 50- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407: 242-8.
- 51- Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. J Clin Oncol 1995; 13: 765-82.
- 52- Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. Am J Pathol 1995; 146: 293-309.
- 53- Lancaster JR Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. Nitric Oxide 1997; 1: 18-30.
- 54- Erbaş D. Nitrik oksit: Fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü. Klinik Gelişim 1998; 11: 376-380.
- 55- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 288: 373-376.
- 56- Muntané J, De la Mata M. Nitric oxide and cancer World J Hepatol 2010; 2(9): 337-344.
- 57- Espey MG, Thomas DD, Miranda KM, Wink DA. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 11127-11132.
- 58- Janero DR. Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation. Free Radic Biol Med 2000; 15 (28): 1495-1506.
- 59- Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase Circ Res 2003; 93: 96-105.

- 60- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329 (27): 2002-2012.
- 61- Fukumura D, Yuan F, Endo M, Jain RK. Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol* 1997; 150 (2): 713-725.
- 62- Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: Lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews* 1998; 17: 107-118.
- 63- Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riverosmoreno V. and Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 1994; 54, 1352-1354.
- 64-Çiftçi Ö Meme kanserlerinde prostaglandin E2 (PGE2) oluşumu ve nitrik oksit (Tez) Cerrahpaşa Üniversitesi, 2207.14-16 s.
- 65- Mungrue IN, Bredt DS. nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *J Cell Sci* 2004; 117: 2627–2629.
- 66- Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, Paakkö P, Kinnula V, Soini Y. Inducible Nitric Oxide Synthase Expression, Apoptosis, and Angiogenesis in in situ and Invasive Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 2408-2416.
- 67- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109-142.
- 68- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615.
- 69- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 473-476.
- 70- Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008; 49(4-6): 134-140.

- 71- Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik TJ. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
- 72- Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mut Res* 2008; 659: 15–30.
- 73- Wink DA, Ridhour LA, Hussain PS, Harris CC. The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric oxide* 2008; 19: 65–67.
- 74-Loibl S, Buck A, Strank C, von Minckwitz G, Roller M, et al. The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 265–71.
- 75- Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, et al. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4768–75.
- 76- Glynn SA, Boersma BJ, Dorsey TH, Yi M, Yfantis HG, et al. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J Clin Invest* 2010; 120: 3843–54.
- 77- Engstrom W, Ward A, Moorwood K. The role of scaffold proteins in JNK signalling, *Cell Prolif* 2010; 43: 56–66.
- 78- J.-P. Bayley and P. Devilee, "The warburg effect in 2012," *Current Opinion in Oncology*, vol. 24, no. 1, 2012; 62–67.
- 79- S.W. Seo, D. Lee, H.Minematsu et al. "Targeting extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling has therapeutic implications for inflammatory osteolysis," *Bone*, vol. 46, no. 3, 2010; 695–702.
- 80- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2004; 5: 875-885.
- 81-Zhang X, Pickin KA, Bose R, Jura N, Cole PA, Kuriyan J. Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature* 2007;450:741-4.
- 82-Yoon S, Seger R. The extracellular signalregulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24: 21-44.

- 83- Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factors, *Science* 2001; 235: 442-47.
- 84- Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, Kriegsheim AV, and Kolch W. Raf Family Kinases: Old Dogs Have Learned New Tricks. *Genes & Cancer* 2011; 2(3) 232– 260.
- 85- Chadee DN, Xu D, Hung G, et al. Mixedlineage kinase 3 regulates B-Raf through maintenance of the B-Raf/Raf-1 complex and inhibition by the NF2 tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4463-8.
- 86- Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1878-90.
- 87- Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser yolları. *ARŞİV* 2011; 20: 187.
- 88- Daouti S, Wang H, Li WH, Higgins B, Kolinsky K, Packman K et al. Characterization of a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor with a Unique Mechanism of Action for Cancer Therapy. *Cancer Res* 2009; 69(5):1924-32.
- 89- Özcan AG. Cytoprotective effects of amifostine and cysteamine on cultured normal and tumor cells treated with paclitaxel in terms of mitotic index and 3Hthymidine labeling index. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, 56: 221-229.
- 90- Fitzpatrick F.A., and Wheeler R. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), Docetaxel (Taxotere®), and related agents. *International Pharmacology* 3 2003; 1699-1714.
- 91- Hitchings G.H. "Rational design of anticancer drugs: here, imminent or illusive. In, *Development of Target-Oriented Anticancer Drugs*", *Progress in Cancer Research and Therapy* Vol. 28, Raven Press, New York, 1983; 227-238.
- 92- Heald R, Nogales E. Microtubule dynamics. *J Cell Sci* 2002;115:3–4.
- 93- Giannakakou P, Nakano M, Nicolaou KC, et al. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by

- suppression of microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10855–60.
- 94- SC Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2002; 2: 1–17.
- 95- Schiff P.B. and Horwitz S.B. Taxol stabilizes microtubules in Mouse fibroblast cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1561-5.
- 96- Honore S, Kamath K, Braguer D, Wilson L, Briand C, Jordan MA. Suppression of microtubule dynamics by discodermolide by a novel mechanism is associated with mitotic arrest and inhibition of tumor cell proliferation. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1303–11.
- 97- Georgiadis MS, Russel EK, Gazdar AF, et al. Paclitaxel cytotoxicity against human lung cancer cell lines increases with prolonged exposure durations. *Clin Cancer Res* 1998; 3: 449-54.
- 98- Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Cooper MR, Hayes DF, Tkaczuk KH, Fleming G, Holland JF, Duggan DB, Carpenter JT, Frei E 3rd, Schilsky RL, Wood WC, Muss HB, Norton L. Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003, 21: 976-983.
- 99- Rowinsky, E.K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.* 1997; 48, 353-374.
- 100-Crown, J. Evolution in the treatment of advanced breast cancer *Semin. Oncol.* 1998: 25(5), Suppl. 12, 12-17.
- 101-Caldas, C, McGuire, W.P. Paclitaxel (Taxol) therapy in ovarian carcinoma *Semin. Oncol.* 1993: 20(4), Suppl. 3, 50-55.
- 102-Rowinsky E.K, Eisenhauer A, Chaudhry V, Arbusk S.G, Donehower, R.C. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol) *Semin. Oncol* 1993; 20(4), Suppl. 3, 1-15.

- 103-Bouck N, Stellmach V, Hsu S.C. How Tumors Become Angiogenic. *Adv. Cancer Res* 1996; 69, 135-174.
- 104-Storch C.H. and Hoeger P.H. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action 2010; 1365-2133.
- 105-Westfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonists and antagonists. In: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds), 11th edn. New York, McGraw-Hill, 2006; 271–95.
- 106-Zimmermann AP, Wiegand S, Werner JA, Eivazi B. Propranolol therapy for infantile haemangiomas: review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 338-342.
- 107-Schuller HM, Cole B. Regulation of cell proliferation by beta-adrenergic receptors in a human lung adenocarcinoma cell line. *Carcinogenesis* 1989; 10: 1753-1755.
- 108-Drell TL, Joseph J, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 63-70.
- 109-Hajighasemi F, Hajighasemi S. Effect of propranolol on angiogenic factors in human hematopoietic cell lines in vitro. *Iran Biomed J* 2009; 13: 223-228.
- 110-Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino R et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* 2011; 797-809.
- 111-Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Schuller HM. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. *Anticancer Drugs* 2009; 20: 477-482.
- 112-Sloan EK, Priceman SJ, Cox BF, Yu S, Pimentel MA, Tangkanangnukul V, Arevalo JM, Morizono K, Karanikolas BD, Wu L, Sood AK, Cole SW. The sympathetic nervous system induces a

- metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 7042-7052.
- 113-Bertrand J, Sammour R, McCuaig C, Dubois J, Hatami A, Ondrejchak S, Boutin C, Bortoluzzi P, Laberge LC, Powell J. Propranolol in the treatment of problematic infantile hemangioma: review of 35 consecutive patients from a vascular anomalies clinic. *J Cutan Med Surg* 2012;16(5):317-23.
- 114-Léauté-Labrèze C, Taïeb A. Efficacy of beta-blockers in infantile capillary haemangiomas: the physiopathological significance and therapeutic consequences. *Ann Dermatol Venereol* 2008; 135: 860-862.
- 115-Zimmermann AP, Wiegand S, Werner JA, Eivazi B. Propranolol therapy for infantile haemangiomas: review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74: 338-342
- 116-Denoyelle F, Leboulanger N, Enjolras O, et al. Role of Propranolol in the therapeutic strategy of infantile laryngotracheal hemangioma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73: 1168-1172.
- 117-Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 10-15.
- 118-Lenz W, Knapp K. Thalidomide embryopathy. *Arch Environ Health*. 1962; 5: 100-105.
- 119-Richardson P, Hideshima T, Anderson K. Thalidomide: Emerging Role In Cancer Medicine. *Annual Review of Medicine* 2002; 53, 629-657.
- 120-Eriksson T, Bjorkman S, Hoglund P. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 365-376.
- 121-Dmoszynska A, Rolinski J, Bojarska-Junak A, Manko J, Jawniak D, Walter-Croneck A, Soroka-Wojtaszko M. Influence of thalidomide on Bcl2 expression and proangiogenic cytokine levels in short-term culture of peripheral blood and bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients. *Pol J Pharmacol* 2001; 53: 709–713.

- 122-Stephens TD, Fillmore BJ. Hypothesis: thalidomide embryopathy-proposed mechanism of action. *Teratology* 2000; 61: 189-195.
- 123-Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Anti-tumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341:1565-1571.
- 124-Li X, Liu X, Wang J, et al. Thalidomide downregulates the expression of VEGF and bFGF in cisplatin-resistant human lung carcinoma cells. *Anticancer Res* 2003; 23: 2481-2487.
- 125-Eleutherakis-Papaiakovou V, Bamias A, Dimopoulos M. A. Thalidomide in cancer medicine. *Annals of Oncology* 2004; 15: 1151–1160.
- 126-Özmen V. Dünya’da ve Türkiye’de Meme Kanseri. *The Journal of Breast Health* 2008; 7-9.
- 127- Billington DC. Angiogenesis and its inhibition: potential new therapies in oncology and non-neoplastic diseases. *Drug Des Discov* 1991, 8(1):3-35.
- 128- Ataergin AS, Özet A, Arpacı F. Kanser Tedavisinde Anjiyogenez İnhibitörlerinin Yeri *Klin Tıp Bilimleri* 1999; 19:100-105.
- 129-Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Da Silva D. Differential expression of phosphofruktokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Mol Genet Metab* 2010; 100: 372–378.
- 130-Furtado CM, Marcondes MC, Sola-Penna M, de Souza MLS, Zancan P. Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis. *PLoS ONE* 2012; 7(2): e30462.
- 131-Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93: 2325–2327.
- 132-Blajeski AL, Kottke TJ, Kaufmann SH. A multistep model for paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. *Exp Cell Res* 2001; 270: 277–288

- 133-Lau DH, Xue L, Young LJ, Burke PA, Cheung AT. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 1999; 14: 31–36.
- 134-Okugawa H, Yamamoto D, Uemura Y, Sakaida N, Tanano A, Tanaka K and Kamiyama Y. Effect of periductal paclitaxel exposure on the development of MNU-induced mammary carcinoma in female S–D rats. *Breast Cancer Research and Treatment* 2005; 91: 29–34.
- 135-Nakayama S, Torikoshi Y, Takahashi T, Yoshida T, Sudo T, Matsushima T et al. Research article Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells *Breast Cancer Research* 2009; 11:R12.
- 136-Pires MM, Emmert D, Hrycyna CA, and Chmielewski J. Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Paclitaxel Resistance by Reversibly Linked. *Indiana Mol Pharmacol* 2009; 75: 92–100.
- 137-Thollet A, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, Collins C et al. ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells *Mol Cancer* 2010; 9: 291.
- 138-Tommasi S, Mangia A, Lacalamita R, Bellizzi A, Fedele V. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. *Int J Cancer* 2007; 120(10): 2078-85.
- 139-Boilard E and Surette M E. Anti-CD3 and Concanavalin A-induced Human T Cell Proliferation Is Associated with an Increased Rate of Arachidonate-Phospholipid Remodeling. Lack of involvement of group IV and group VI phospholipase A2 in remodeling and increased susceptibility of proliferating T cells to CoA-independent transacyclase inhibitor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(20):17568-75.
- 140-Vacca A, Scavelli C, Montefusco V, Di Pietro G, Neri A, Mattioli M, et al. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5334–46.

- 141-Ölgen S, Bıçak I, Nebioğlu D. Angiogenesis and new aspects of cancer chemotherapy. *Ankara Ecz. Fak. Derg* 2002; 31(3); 193-214.
- 142-Eisen T, Boshoff C, Mak I, et al. Continuous lowdose thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82:812-7.
- 143-Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, Chin K, and Rodgers GP. Thalidomide induces α -globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. *Blood* 2007; 110(8):2864-71.
- 144-Sauer H, Gunther J, Hescheler J and Wartenberg M. Thalidomide Inhibits Angiogenesis in Embryoid Bodies by the Generation of Hydroxyl Radicals. *Am J Pathol* 2000; 156(1):151-8.
- 145-Ferrara, N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995; 36: 127–137.
- 146-Yoshiji H, Gomez D. E, Shibuya M. & Thorgeirsson U. P. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer *Cancer Res.* 1996; 56: 2013–6.
- 147-Terman B. I, Dougher-Vermazen M, Carrion M. E, Dimitrov D, Armellino D. C, Gospodarowicz D. & Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992; 187: 1579–1586.
- 148-Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1041–56.
- 149-Veeravagu A, Hsu AR, Cai W, Hou LC, Tse VC, Chen X. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2007; 2: 59–71.

- 150-Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel MM. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2224–2243.
- 151-Jiang BH, Liu LZ. AKT signaling in regulating angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 19–26.
- 152-YM Zhang, BL Dai, L Zheng, YZ Zhan, J Zhang, WW Smith, XL Wang, YN Chen and LC He. A novel angiogenesis inhibitor impairs lovo cell survival via targeting against human VEGFR and its signaling pathway of phosphorylation. *Cell Death and Disease* 2012; 11: 1038-2012.
- 153-Soltau J, Dreves J. Mode of action and clinical impact of VEGF signaling inhibitors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 649–662.
- 154-Kolch. W, Maniny-Baron. G, Kieser. A, and MarmÃ©.D. Regulation of the expres sion of the VEGF/VPS and its receptors: role in tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat* 1995; 36: 139-155.
- 155-Folkman. J. Angiogenesis and breast cancer. *J. Clin. Oncol* 1994; 12: 441-443.
- 156-Claffey K. P. and Robinson G. S. Regulation of vegf/vpf expression in tumor cells-consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 165-176.
- 157-Toi. M, Kondo. S, Suzuki. H, Yamamoto, Y, Inada. K, Imazawa. T, Taniguchi. T, and Tominaga. T. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer (Phila.)* 1996; 77: 1101-1106.
- 158-Gasparini. G, Toi. M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanalani M, Matsubara, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Su/uki H and Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J. Nati. Cancer Inst* 1997; 89: 139-147.
- 159- Roomi M. W, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A and Rath M. In vitro and in vivo antitumorigenic activity of a mixture of lysine, proline,

- ascorbic acid, and green tea extract on human breast cancer lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Med Oncol* 2005; 22:2:129129-138.
- 160-Krajewska J, Olczyk T, Roskosz J, Paliczek-Ciešlik E, Kukulska A, Śmietana A, Kaczmarek-Borowska B, Jarzqb B. Treatment with sorafenib in advanced thyroid cancer-a case report. *Endokrynol Pol* 2010; 61(5): 492-6.
- 161-Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 314-22.
- 162-Gooch K. J, Dangler C. A, and Frangos J. A. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *J. Cell Physiol* 1997; 171:252–258.
- 163-Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Müller-Esterl W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 2006; 396: 401-409.
- 164-Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Investig* 1998; 101:2567–2578.
- 165-Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, Ziche M. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 587-596.
- 166-Ying L, Hofseth LJ. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 1407-1410.
- 167- Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mut Res* 2008; 659: 15–30.
- 168-Wink DA, Ridnour LA, Hussain PS, Harris CC. The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric oxide* 2008; 19: 65–67.
- 169-Brennan PA, Dennis S, Poller D, Quintero M, Puxeddu R, et al. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008; 30: 208–14.

- 170-Cronauer MV, Ince Y, Engers R, Rinnab L, Weidemann W, et al. Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity: possible implications for prostate cancer progression. *Oncogene* 2007; 26: 1875–84.
- 171-Glynn SA, Boersma BJ, Dorsey TH, Yi M, Yfantis HG, et al. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J Clin Invest* 2010; 120: 3843–54.
- 172-Prueitt RL, Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Thomas DD, et al. Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 120: 796–805.
- 173-Pervin S, Singh R, Hernandez E, Wu G, Chaudhuri G. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 289–99.
- 174-Thomas DD, Espey MG, Ridnour LA, Hofseth LJ, Mancardi D, et al. Hypoxic inducible factor 1 alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8894–9.
- 175-Kashiwagi S, Izumi Y, Gohongi T, Demou ZN, Xu L, Huang PL, Buerk DG, Munn LL, Jain RK, Fukumura D: NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissueengineered blood vessels. *J Clin Invest* 2005; 115:1816–1827.
- 176-Brouet A, DeWever J, Martinive P, Havaux X, Bouzin C, Sonveaux P, Feron O: Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *FASEB J* 2005; 19: 602–604.
- 177-Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK: The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 521–534.
- 178-Fulton D, Gratton JP, Sessa WC: Posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:818–824.

- 179-Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399:597–601.
- 180-Strowski M. Z, Cramer T, Schafer G, Juttner S, Walduck A, Schipani E, Kemmner W, Wessler S, Wunder C, Weber M, et al. Helicobacter pylori stimulates host vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) gene expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB J* 2004; 18, 218-220.
- 181-Breslin J. W, Pappas P. J, Cerveira J. J, Hobson R. W, and Duran W. N. VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2003; 284, H92–H100.
- 182-Meadows KN, Bryant P, and Pumiglia K. Vascular Endothelial Growth Factor Induction of the Angiogenic Phenotype Requires Ras Activation. 2001; 49289–49298.
- 183-Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med* 2000; 6: 389–395.
- 184-Moreno-Aspitia A, Morton RF, Hillman DW, Lingle WL, Rowland KM Jr, Wiesenfeld M, et al. Phase II trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer previously exposed to anthracyclines or taxanes: North Central Cancer Treatment Group and Mayo Clinic Trial N0336. *J Clin Oncol* 2009; 27: 11-5.
- 185-Baselga J, Roche H, Costa F, Segalla GM, Pinczowski H, Ciruelos EM et al. SOLTI-0701: A Multinational Double-Blind, Randomized Phase 2b Study Evaluating the Efficacy and Safety of Sorafenib Compared to Placebo When Administered in Combination with Capecitabine in Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer (BC). *Cancer Res* 2009; 69: 497.
- 186-Lorusso P, Krishnamurthi S, Rinehart JR, Nabell L, Croghan G, Verterasian M et al. A phase 1-2 clinical study of a second generation

oral MEK inhibitor, PD 0325901 in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3011.

187-Annabi B, Vaillancourt-Jean E, Weil AG, Béliveau R.

Pharmacological targeting of β -adrenergic receptor functions abrogates NF- κ B signaling and MMP-9 secretion in medulloblastoma cells. *OncoTargets and Therapy* 2010;3 219–226.

188-Seya Y, Fukuda T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. Effect of

norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells *European Journal of Pharmacology* 2006; 553: 54–60.

189-Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino FR,

Pouchy C et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and antitumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment *Oncotarget* 2011; 2: 797 – 809.

190-Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors *FEBS Letters* 2006; 580: 2879–2887.