T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SEROTONİN RESEPTÖRLERİNİN MEME KANSER HÜCRELERİNDE APOPTOZ SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Venhar ÇINAR

Danışman
Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2020
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SEROTONİN RESEPTÖRLERİNİN MEME KANSER HÜCRELERİNDE APOPTOZ SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Venhar ÇINAR

Danışman
Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2018-8349 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Venhar ÇINAR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"**Serotonin Reseptörlerinin Meme Kanser Hücrelerinde Apoptoz Sinyal Yolağı Üzerine Rollerinin Araştırılması**" adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan **Danışman**

Venhar ÇINAR **Doç. Dr. Zuhal HAMURCU**

Tıbbi Biyoloji AD Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Doç.Dr. Zuhal HAMURCU danışmanlığında **Venhar ÇINAR** tarafından hazırlanan "**Serotonin Reseptörlerinin Meme Kanser Hücrelerinde Apoptoz Sinyal Yolağı Üzerine Rollerinin Araştırılması**" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

/ / 2020

JÜRİ **İmza**

Danışman: Doç.Dr. Zuhal HAMURCU (Tıbbi Biyoloji AD).....

Üye: Prof.Dr. Hamiyet Altuntaş (Tıbbi Biyoloji AD).....

Üye: Doç.Dr. Nilgün GÜRBÜZ (Süleyman Demirel ÜniversitesiTıbbi Biyoloji AD)...

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……..tarih ve ……. sayılı kararı ile onaylamıştır.

…./…./……..

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca danışmanlığımı yapan, tezimin her aşamasında bilgi, öneri, özveri ve her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübesiyle hem akademik hem de sosyal anlamda bana katkı sağlayan çok değerli hocam, Doç.Dr. Zuhal HAMURCU'ya,

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca emeğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof.Dr.Hamiyet Dönmez Altuntaş ve diğer hocalarıma,

Değerli ekip arkadaşlarım Nursultan NURDİNOV, Ahsen GÜLER ve Berfin UĞUR'a

Her zaman yanımda olan mutluluğumu paylaşıp artıran, üzüntümü paylaşıp azaltan varlığı ile güç kazandığım çok değerli dostlarıma,

TDK-2018-8349 kodlu projeme desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tüm hayatım ve eğitimimde bana destek olan, yol gösteren,inanan ve güvenen aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

Venhar ÇINAR

SEROTONİN RESEPTÖRLERİNİN MEME KANSER HÜCRELERİNDE APOPTOZ SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

VENHAR ÇINAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2020

Danışman: Doç.Dr. Zuhal HAMURCU

ÖZET

Kanser dünyada sık rastlanan hastalıklar arasındadır ve meme kanseri de dünya kadınları arasında en sık rastlanan kanserlerdendir. Bunun için günümüzde meme kanseri tedavisine yönelik çalışmalar oldukça önemlidir.

Serotoninin bilinen görevleri dışında son yıllarda kanser hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eden bir mitojen olarak davrandığı da ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda meme kanser hücreleri (agresif meme kanser hücresi olan MDA-MB-231 ve BT-549, non-invazif meme kanser hücresi olan MCF-7 hücreleri) hem serotoninle hem de serotonin reseptör antagonisti olan metergolin ile mumale edildi. Hücre proliferasyonunun analizi için MTS, klon oluşumunu test etmek için klonojenik tespit ve hedef proteinlerin ekspresyonlarınıın analizi için western blot yöntemi kullanıldı. Analiz sonuçlarımıza göre, serotoninin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu üç farklı meme kanser hücrelerinde de önemli oranda arttıdığı, metergolin uygulanan hücrelerde artan metergolin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunun ve koloni oluşumunun üç farklı meme kanser hücrelerinde de önemli oranda azaldığı bulundu. 2, 4, 8 µM ve 48 saat serotonin uygulanan MDA-MB-213 hücrelerinde serotonin reseptör 1D (5-HT1D) ve serotonin reseptör 7 (5-HT7) reseptörlerinin ekspresyonlarının serotonin artan konsantrasyonuyla birlikte arttığı, artan 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin ekspreyonuna bağlı olarak FOXM1 ve aşağı hedefi olan eEF2K, p-EF2 proteinlerinin ekspresyonlarının arttığı bulundu. 30, 35, 40 µM ve 48 saat metergolin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin ekspresyonlarının azaldığı ve bu reseptörlerin ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak FOXM1 ve aşağı hedefi olan eEF2K, p-EF2

proteinelerinin ekspresyonlarının azaldığı bulundu. Hem serotonin uygulanan hem de metergolin uygulanan hücrelerde kaspaz-3 proteininin ekspresyonunda değişiklik olmadığı bulundu.

Sonuçlarımız, litertürde ilk kez serotonin bağlanmasıyla aktifleşen 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin özellikle de aktifleşen 5-HT7 reseptörünün FOXM1 sinyal yolağını uyardığı ve onkogenik FOXM1 sinyal yolağı aracılığı ile hücreleri çoğalmaya teşvik ettiğini gösterdi.

Bu sonuçlar, meme kanser hücrelerinde 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin aktivitesinin kontrol altında tutulmasının tümörün büyümesi ve progresyonu açısından önemli olduğunu ve 5-HT1D, 5-HT7 reseptörlerine spesifik yeni antagonistlerin üretiminin tedavide hastalar için yararlı olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler; 5-HTR1D, 5-HTR7, FOXM1, meme kanseri, metergolin, serotonin

INVESTIGATION OF THE ROLES OF SEROTONINE RECEPTORS ON THE APOPTOSIS SIGNAL PATHWAY IN BREAST CANCER CELLS

VENHAR ÇINAR

Erciyes University, Institute Of Health Sciences

Department of Medical Biology

Master Thesis, August 2020

Supervisor:Ass.Prof. Zuhal Hamurcu

ABSTRACT

Cancer is among the most common diseases in the world, breast cancer is also one of the most common cancers among women in the world.For this, studies on breast cancer treatment are very important today.

Serotonin (5-HT) has recently emerged to act as a mitogen that stimulates the proliferation of cancer cells, apart from its known functions.

In our study, breast cancer cells (aggressive breast cancer cells MDA-MB-231 and BT-549, non-invasive breast cancer cells MCF-7 cells) were treated with both serotonin and metergoline, a serotonin receptor antagonist. MTS was used for analysis of cell proliferation, clonogenic detection to test colony formation and western blot method for analysis of expression of target proteins. According to our analysis results, it was found that cell proliferation and colony formation increased significantly in three different breast cancer cells due to increasing concentrations of serotonin, and cell proliferation and colony formation were significantly reduced in all three different breast cancer cells due to the increased metergoline concentration in metergoline applied cells. In MDA-MB-213 cells treated with 2, 4, 8 µM and 48 hours serotonin, the expression of serotonin receptor 1D (5-HT1D) and serotonin receptor 7 (5-HT7) receptors increased with increasing serotonin concentrations, due to the increased expressions of 5-HT1D and 5-HT7 receptors, FOXM1 and its lower target eEF2K, pEF2. The expression of -EF2 proteins was found to be increased. It was found that the expression of HT1D and 5-HT7 receptors decreased in MDA-MB-231 cells treated with metergoline for 30, 35, 40 µM and 48 hours, and the expression of FOXM1 and its lower target eEF2K, p-EF2

proteins decreased due to the decrease in the expression of these receptors. It was found that there was no change in the expression of caspase-3 protein in cells treated with both serotonin and metergoline.

Our results showed that for the first time in the literature, the 5-HT1D and 5-HT7 receptors activated by serotonin binding, in particular the activated 5-HT7 receptor, stimulate the FOXM1 signaling pathway and stimulate the cells to proliferate via the oncogenic FOXM1 signaling pathway.

These results suggest that controlling the activity of 5-HT1D and 5-HT7 receptors in breast cancer cells is important for tumor growth and progression, and the production of new antagonists specific to 5-HT1D, 5-HT7 receptors may be beneficial for patients in treatment.

Key words; 5-HTR1D, 5-HTR7, breast cancer, FOXM1, metergolin, serotonin

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
ONAY: iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMALAR ve SİMGELER xiii
TABLOLAR LİSTESİ xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ xv
1.GİRİŞ-AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1.KANSER 3
2.2.MEME KANSERİ 4
2.2.1.Risk Faktörleri 5
2.2.1.1.Genetik 5
2.2.1.2.Yaş 5
2.2.13.Cinsiyet 6
2.2.1.4. Hormonal Durum 6
2.3.Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması 6
2.3.1. Luminal A Meme kanseri 7
2.3.2. Luminal B Meme Kanseri 7
2.3.3. HER2 Tip Meme Kanseri 7
2.3.4. Bazal Benzeri Meme Kanseri 8
2.3.4.1. Üçlü reseptör negatif bazal benzeri meme kanseri (TNBC) 8

2.4.Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri 8
2.4.1. Cerrahi 9
2.4.2. Radyoterapi 9
2.4.3. Kemoterapi 9
2.4.4. Hormonal Tedavi 10
2.4.5 Hedefe Yönelik Tedavi 10
2.5.Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması 10
2.6.Forkhead (Fox) Transkripsiyon Faktörleri 11
2.6.1.Forkhead box protein M1(FOXM1) transkripsiyon faktörü 13
2.7.Meme Kanser Hücre Hatları 15
2.7.1.MDA-MB-231 Hücre Hattı 15
2.7.2.BT-549 Hücre Hattı 15
2.7.3.MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı 15
2.8.APOPTOZ 16
2.8.1. İntristik (mitokondriyal) Yol: 16
2.8.2. Ekstrinsik (hücre ölüm sinyalleri ile) Yol: 16
2.9.Kaspazlar 16
2.10.Apoptoz ve Kanser 17
2.11.SEROTONİN 17
2.11.1.Serotonin Biyogenezi 18
2.11.2.Serotonin İle İlgili Moleküller 19
2.11.3.Serotonin Reseptörleri 21
2.11.4.Serotonin ve Kanser 23
2.12.METERGOLİNE 26

3.GEREÇ ve YÖNTEM 27
3.1.Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeleri 27
3.2.YÖNTEM 28
3.2.1. Hücre Kültürü 28
3.2.1.1. Besiyeri Hazırlama 28
3.2.1.2. Hücre Kültürünün Başlatılması 29
3.2.1.3. Hücre Pasajlama 29
3.2.1.4. Hücre Dondurma 29
3.2.1.5. Hücre Sayımı 29
3.3. Solüsyonların Hazırlanması 30
3.3.1. Serotonin hazırlanması 30
3.3.2. Metergolin hazırlanması 30
3.4. MTS Canlılık Analizi 31
3.5. Klonojenik Testi 31
3.6. Western Blot 32
3.7. İstatistiksel Analiz 34
4.BULGULAR 35
4.1. Farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda uygulanan serotoninin üç farklı meme kanser hücrelerinde proliferasyona/canlılığa etkisi 35
4.2. Farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda uygulanan metergolinin üç farklı meme kanser hücrelerinde proliferasyona/canlılığa etkisi 37
4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan serotoninin üç farklı meme kanser hücrelerinde klon oluşumu üzerine etkisi 40
4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan metergolinin üç farklı meme kanser hücrelerinde klon oluşumu üzerine etkisi 43
4.5. Serotonin ve metergolin uygulamasının MDA-MB-231 üçlü reseptör negatif meme kanser hücrelerinde serotonin reseptör ekspresyonu üzerine etkisi 47

4.6. Serotonin ve metergolin uygulamasının MDA-MB-231 üçlü reseptör negatif meme kanser hücrelerinde FOXM1 sinyal yolağı üzerine etkisi 50

4.7. Serotonin ve metergolin uygulamasının MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi 52

5.TARTIŞMA 54

6.KAYNAKLAR 61

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

WHO:	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
BRCA1:	Breast cancer susceptibility gene 1 (Meme kanseri duyarlılık geni 1)
BRCA2:	Breast cancer susceptibility gene 2 (Meme kanseri duyarlılık geni 2)
TP53:	Transkripsiyon faktör 53
PTEN:	Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
ER:	Östrojen reseptörü
PR:	Progesteron reseptörü
HER2:	Human epidermal growth factor receptor (İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü)
TNBC:	Triple negative breast cancer (Üçlü reseptör negatif meme kanseri)
AR:	Androjen reseptör
Fox:	Forkhead box transkripsiyon faktörü
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
TNFR:	Tümör nekroz faktör reseptörü
TPH:	Triptofan hidroksilaz enzimi
5-HT:	5-hidroksitriptamin, serotonin
VMAT:	Vezikül monoamin taşıyıcı
SERT:	Serotonin transporter
MAO:	Monoamin oksidaz
5-HIAA:	5-hidroksindolasetikasit
GPCR:	G proteine bağlı reseptör
ATCC:	American Type Culture Collection

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Serotonin Reseptör Sınıflandırması 22

Tablo 2. Farklı kanser hücreleri üzerine serotoninin uyarıcı etkisi ile ilgili çalışmalar 25

Tablo 3. Kullanılan Cihazlar 27

Tablo 4. Kullanılan Sarf Malzemeleri 28

Tablo 5. MDA-MB-231 hücre hattı için belirlenen serotonin ve metergolin konsantrasyonları 32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanserin özellikleri **3**

Şekil 2. Globocan 2018 kanser insidansı **4**

Şekil 3. Meme lobüler, duktus ve kanalları **5**

Şekil 4. Meme kanseri risk faktörleri ve önlenmesi **5**

Şekil 5. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması **7**

Şekil 6. Meme kanserinde rol alan sinyal yolakları **11**

Şekil 7. Fox gen ailesi üyeleri **12**

Şekil 8. Fox proteinlerinin kanserdeki rolü **13**

Şekil 9. FoxM1 varyantları **13**

Şekil 10. FoxM1 hedef genleri ve regülatörleri **14**

Şekil 11. Serotonin moleküler yapısı **17**

Şekil 12. Serotonin biyosentez ve mekanizması **19**

Şekil 13. SLC6A4 geni **20**

Şekil 14. Serotonin geri alımı ve selektif serotonin geri alım inhibitörü mekanizmasının şematik gösterimi **20**

Şekil 15. Metergoline Moleküler Yapısı **26**

Şekil 16. Thoma lamının sayım yapılan kareleri (Toplam görüş alanı) **30**

Şekil 17. 24 saat serotoninle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücrelerinde proliferasyon oranı **36**

Şekil 18. 48 saat serotoninle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücrelerinde proliferasyon oranı **36**

Şekil 19. 72 saat serotoninle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücrelerinde proliferasyon oranı **37**

Şekil 20. 24, 48 ve 72 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon oranı **38**

Şekil 21: 24 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon oranı **39**

Şekil 22. 48 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **39**

Şekil 23. 72 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **40**

Şekil 24. Serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **41**

Şekil 25. Serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **42**

Şekil 26. Serotonin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **43**

Şekil 27. Metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **45**

Şekil 28. Metergolin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **46**

Şekil 29. Metergolin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **47**

Şekil 30. MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin reseptörleri HTR1D ve HTR7 ekspresyon seviyeleri. **49**

Şekil 31: Serotoninve metergolin ile muamele MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1 sinyal yolağı moleküllerinin ekspresyon seviyeleri. **51**

Şekil 32. Serotonin ve metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu. **53**

1.GİRİŞ-AMAÇ

Kanser, hücrelerde mutasyonların birikmesiyle oluşan ve hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser özelliği kazanmış bir somatik hücre aynı zamanda dış büyüme sinyallerinden bağımsız olarak ve sınırsız çoğalma yeteneğinin yanısıra apoptozdan kaçınma, anjiyojenez, vaskülarizasyon geliştirme ve metastaz yapma özelliklerine de sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Meme kanseri ise dünyada kadınlar arasında en sık rastlanan kanserdir ve 1,5 milyondan fazla kadını etkiler. Üstelik yeni gelişmelere rağmen insidansı artmaya devam etmektedir. Bunun için günümüzde meme kanseri tedavisine ve önlemine yönelik çalışmalar oldukça önemlidir (De Santis ve ark., 2013).

Serotonin (5-HT) diyetle alınan esansiyel aminoasit olan triptofandan üretilen biyojenik bir amindir. Serotonin merkezi sinir sisteminde nörotransmitter, mide-bağırsakta (gut) lokal medyatör, kanda ise vazoaktif ajan (damar etkinleştirici) olarak görev yapar (Sarrouilhe ve Mesnil, 2018). İnsanlarda, dokuya özel ifade edilen yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre sınıflandırılmış yedi serotonin (5-HT) reseptör ailesi bulunmaktadır. Dolayısıyla, serotonin bu reseptörlere bağlanır ve serotonin bağlanmasıyla aktifleşen reseptör hücrede uyarıcı ya da inhibe edici yanıt oluşturmak için bir hücre içi ikincil haberci kaskadını aktive eder.

Son yıllarda, serotoninin bilinen rolleri dışında kanser hücrelerinde mitojenik nörotransmitter olarak hücrelerin çoğalmasını tetiklediği ve bunun da kanser hücrelerinde artan serotonin reseptörüne bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, serotonin kanser hücrelerinde hangi mekanizmayı ya da mekanizmaları kullanarak hücreleri çoğalmaya teşvik ettiği hala bilinmemektedir. Kanser hücrelerinde serotoninin hücre çoğalmasından sorumlu olduğu mekanizmayı ya da mekanizmaları aydınlığa

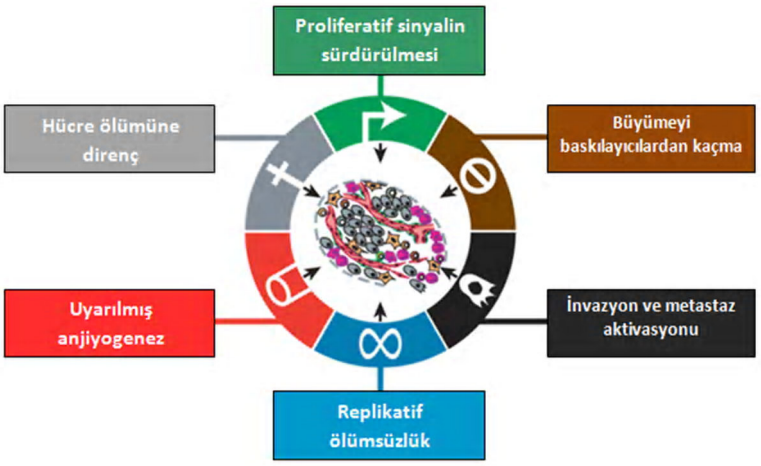
kavuşturmak, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Bu yüzden sunulan tez projesinde, agresif ve non-invazif meme kanser hücrelerinde ifade olduğu bilinen serotonin reseptör 1D (5-HT1D) ve serotonin reseptör 7 (5-HT7)'nin hücre çoğalmasına, hücre çoğalmasında rol oynadığı kabul gören onkogenik transkripsiyon faktör FOXM1 sinyal yolağına ve apoptoz sinyal yolağına etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaç için hücreler hem serotonin ile muamele edilerek 5-HTR1D ve 5-HTR7 reseptörlerinin aktivasyonu, hem de bu reseptörlere spesifik antagonist olan metergolin ile muamele edilerek 5-HTR1D ve 5-HTR7 reseptörlerinin inaktivasyonu sağlandı. Bu reseptörlerin aktive olduğu ve inaktive olduğu durumda meme kanser hücrelerinin proliferasyon ve klonojenik özellikleri, FOXM1 ve FOXM1'in aşağı hedefi olan onkogenik ökaryotik protein translasyon uzama faktör -2 (EF2) bu faktörü fosforilleyen kinaz (eEF2K) ve p-EF2 proteinlerinin ekspresyonu ve apoptozda rol oynayan kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KANSER

Kanser en eski kayıtları MÖ 3000 yılına kadar dayanan ve günümüzde de insanlar arasındaki en yaygın hastalıklardan biridir. Kelime anlamı olarak latince yengeç anlamında 'canker' veya 'carnicos' kelimesinden türemiştir. Bu tabir Hipokrat tarafından ilk defa MÖ 3'te tümörün etrafındaki damarların şişmesini yengecin bacaklarına benzetmesi ile ortaya çıkmıştır (Baykara, 2016).



Şekil 1. Kanserin Özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Kanserin büyüme ve metastazını etkileyen ayırt edici altı özelliği vardır ve bunları anlamak kanser biyolojisinin temellerini oluşturur (Şekil 1) (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser gelişmesinde davranışsal (yüksek vücut kitle indeksi, fiziksel aktivite eksikliği, tütün ve alkol kullanımı), biyolojik (virüs, parazitler gibi), çevresel (UV, radyasyon, iyonlaştırıcı ve kimyasallara maruziyet gibi) ve genetik risk faktörleri rol oynar (Erdem ve ark., 2017).

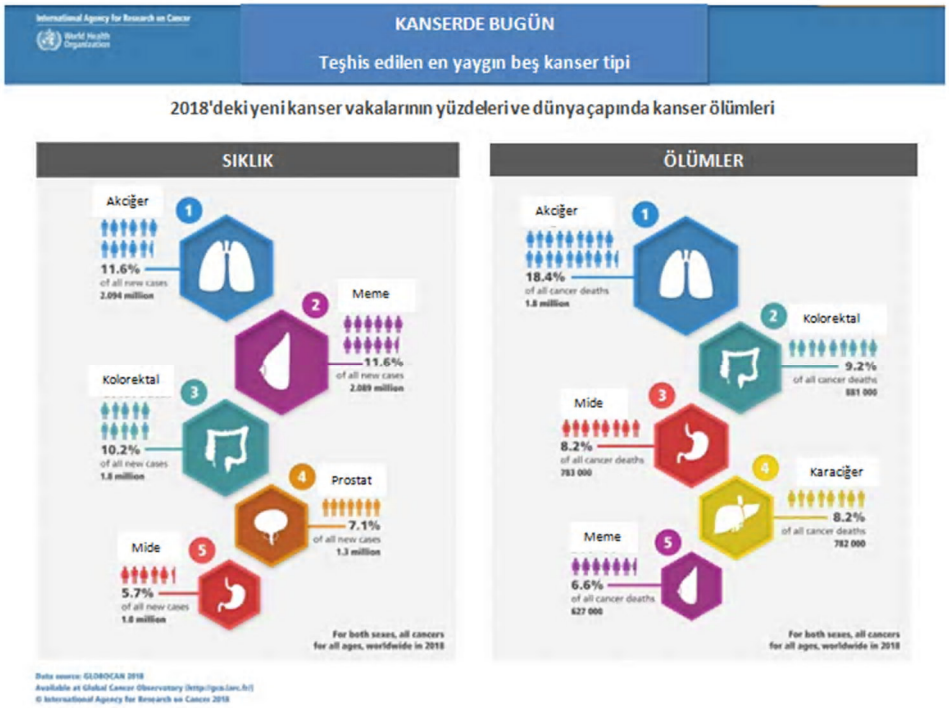
Kanser tedavisi için radyoterapi, kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, hormon terapisi ve gen terapi kullanılabilir. Günümüzde 100'den fazla bilinen kanser türü vardır. Belirli

kanser tipleri için bu standartlaştırılmış tedavi yaklaşımları kullanılsa da kanser aynı zamanda kişisel bir hastalıktır (Baykara, 2016).

2.2.MEME KANSERİ

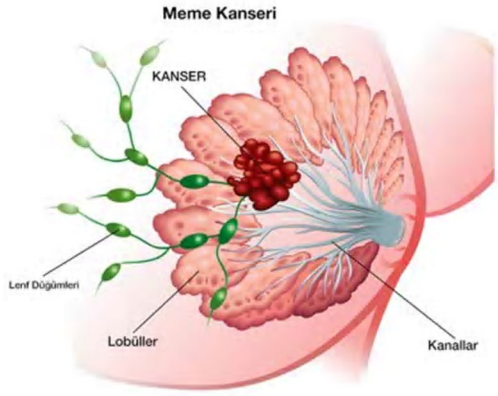
Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization,WHO) Eylül 2018 verilerine göre her 6 ölümden birinin sebebi olup 9,6 milyon ölümden sorumlu hastalıktır. Bu kanser sebepli ölümlerden en yaygın olarak ilk sırada 2,090 milyon meme kanserleri yer almaktadır (Şekil 2) (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Erişim tarihi: 10 Eylül 2019).

İstatistiklere göre de her 8 kadından 1'inde meme kanseri olma olasılığı vardır (DeSantis ve ark., 2013).



Şekil 2. Globocan 2018 kanser insidansı (https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018 Erişim Tarihi: 25.09.2019)

Meme kanseri, lobüller (süt yapımını sağlayan bezlerin oluşturduğu hücreler) ve duktusları (sütün boşaltılmasını sağlayan kanallar) örten epitelyal hücrelerin kontrolsüz hızla çoğalarak maling tümör halini almasıyla sonuçlanan hastalıktır (Şekil 3) (Parkin ve ark., 2001). Kadınlarda görülme olasılığı daha yüksek olan bu kanserin (%22) risk faktörleri arasında; genetik yatkınlık, yaş, cinsiyet, hormonal durum, ailesel öykü, coğrafya gibi pek çok etken vardır (Lee ve ark., 2017).

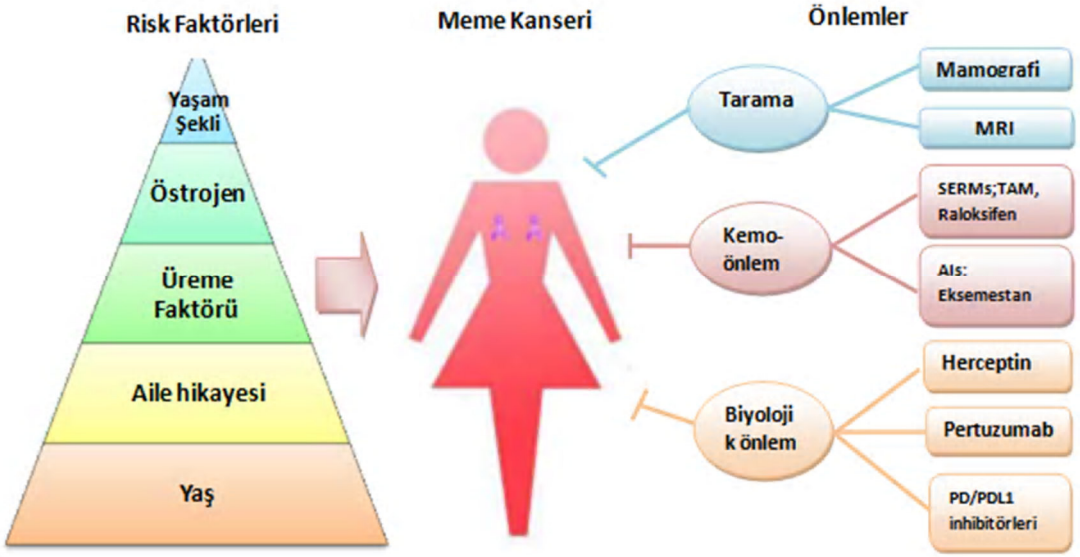


Şekil 3. Meme lobüler, duktus ve kanalları (http://www.cancernews.com.au/breast-cancer/ Erişim Tarihi: 27.09.2019)

2.2.1.Risk Faktörleri

2.2.1.1.Genetik

Meme kanserinin oluşmasında çevresel etkenlerin rolünün büyük olmasının yanı sıra bazı vakalarda genetik yatkınlık olduğu da görülmüştür. Bu vakalar %5-10 civarında olup genetik mutasyonlar saptanmakta ve ailesel olarak tanımlanmaktadır (Osborne ve ark., 2004; Ponder, 1994). Genetik mutasyonlar özellikle *BRCA1 (Breast cancer susceptibility gene 1)* ve *BRCA2 (Breast cancer susceptibility gene 2)* daha az sıklıkla da *TP53(Transkripsiyon faktör 53)* ve *PTEN (Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu)* gibi genlerinde görülür (Akdeniz ve ark., 2018; McKinley ve ark., 1995; Pharoah ve ark., 1997).



Şekil 4. Meme kanseri risk faktörleri ve önlenmesi (Sun ve ark., 2017)

2.2.1.2.Yaş

İlerleyen yaşla birlikte kadınlarda meme kanseri görülme riski artmaktadır. Özellikle menapoza kadar olan zamanda bu risk her 10 yılda bir ikiye katlanmaktadır. Meme kanseri olma riski 25'li yaşlarda 1/19 iken bu oran 75 yaşında 1/11'e kadar yükselmektedir (Key ve ark., 2001; Phipps ve Li, 2010).

2.2.1.3.Cinsiyet

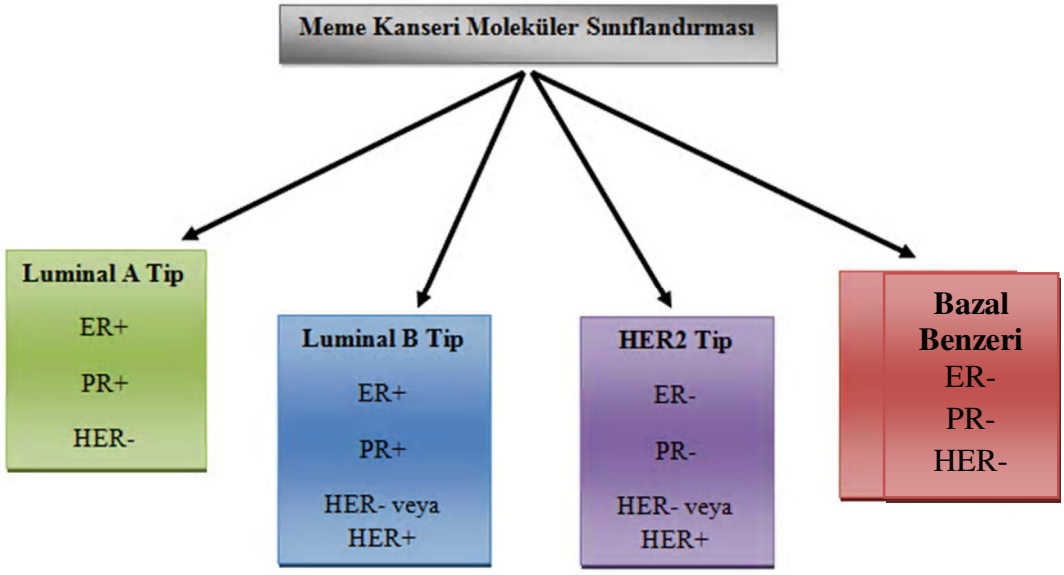
Meme kanser riski kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülür. Tüm meme kanserlerinin %1 kadar erkek vakalarda görülür. Meme kanserinin kadınlarda erkeklere göre daha sık rastlanmasının, kadınların daha fazla hormonal değişikliklere maruz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Jemal ve ark., 2011).

2.2.1.4. Hormonal Durum

Östrojen ve progesteron hormonları meme kanser gelişiminde önemli olup bu hormonlara özgü östrojen (ER) ve progesteron reseptörleri (PR) normal meme epitelyal hücrelerinde bulunur. Dolayısıyla hormon düzeylerindeki değişimlere bağlı olarak meme epitelyal hücrelerin davranışlarında farklılaşma meydana gelebilir. Bu durumda kadınlarda normalden farklı olarak östrojen ya da progesterona maruziyet meme kanser riskini artırmakdır (Hormones ve Group, 2002; Yang ve ark.,2010).

2.3.Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması

Meme kanserleri hormon reseptör varlığına veya yokluğuna göre, hücre büyümesinden sorumlu belirteçler, büyüme faktörü reseptörleri, hücrede fazla aktive olmuş sinyal yolakları, hücre döngüsünde görevli elemanlar gibi pek çok hücreye özgü belirteçler göz önünde bulundurularak moleküler olarak luminal A, luminal B, HER2 (Human epidermal growth factor 2) tip ve bazal benzeri meme kanseri olmak üzere dört gruba ayrılmıştır (Şekil 5) (Perou ve ark., 2000; Yoder ve ark., 2007).



Şekil 5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması (Valentin ve ark., 2012)

2.3.1. Luminal A Meme kanseri

Bu tip tümörler östrojen reseptör pozitif (ER+), progesteron reseptör pozitif (PR+) ve insan epidermal büyüme faktörü -2 negatif (HER2-) özellik gösterir. Meme kanserlerinin %30-70'ini kapsar (Voduc ve ark., 2010). Tedavileri genelde hormon tedavisine yöneliktir. Düşük nüksetme oranına sahiptir. Bu yüzden en iyi prognoz gösteren tiptir (Yoder ve ark., 2007).

2.3.2. Luminal B Meme Kanseri

Bu tip tümörler ER+ ve PR+'tirler. HER2- veya HER2+ (insan epidermal büyüme faktör receptor 2 pozitif) olabilir. Tüm meme kanser vakalarının %10-20'si oluştururlar. Luminal A meme kanserine göre daha kötü prognaza sahiptir ve sağ kalım oranı daha düşüktür (Voduc ve ark., 2010; Koboldt ve ark.,2012).

2.3.3. HER2 Tip Meme Kanseri

HER2 tip meme kanseri östrojen reseptör negatif (ER-) ve progesterone reseptör negatif (PR-) özelliktedir. Bu tümörlerin çoğunda HER2+'tir. Ancak bazılarında HER2- olduğu da görülmüştür. Meme kanserlerinin %5-15'ini oluştururlar (Foukakis ve ark., 2013).

2.3.4. Bazal Benzeri Meme Kanseri

Bu tip meme kanseri üçlü receptör negatif bazal benzeri meme kanseri ve üçlü reseptör negatif olmayan bazal benzeri meme kanseri olmak üzere ikiye ayrılır (Fan ve ark., 2006). Üçlü reseptör negatif olan bazal benzeri meme kanserinde *ER* ve *PR* yanında *HER2* genlerinin ekspresyonları da yoktur. Üçlü negatif olan ve olmayan bazal benzeri meme kanserleri arasındaki en önemli fark HER2 ekspresyonunun olup olmamasıdır. Meme kanserinin üçlü reseptör negatif tipi diğer alt sınıflarına göre daha erken yaşta ortaya çıkar ve en agresif meme kanser tipidir. Prognoz ve metastaz özelliği çok yüksektir (Howlader ve ark., 2014; Yao ve ark., 2017).

2.3.4.1. Üçlü reseptör negatif bazal benzeri meme kanseri (TNBC)

Üçlü reseptör negatif meme kanseri ER, PR ve HER2 reseptörlerinin üçünün de negatif olduğu tiptir ve tüm meme kanserlerinin %10-17'sini oluşturur. Populasyonda daha genç yaşta ortaya çıkar. Nüksetmesi ve ölüm riski yüksek kanser tipidir. Üç reseptöründe eksikliğinden dolayı hormonal tedaviye yanıt vermezler. Dolayısıyla bu hastalar geleneksel tedavi yöntemleri ile tedavi edilemezler (Oakman ve ark., 2011, Badve ve ark., 2011).

2.4.Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın ve ölüm oranı en yüksek kanserler arasındadır. Bu nedenle meme kanser tanı ve tedavisi oldukça önemlidir. Oluşan kanser ağrı ya da elle tutulur bir kitle ile teşhis edilebilirken; mamografi, biyopsi, ultrasond, MRI gibi tekniklerle de tanısı konur (McDonald ve ark., 2016; Shamsi ve Islamian, 2017).

Tedavi yaklaşımları arasında radyoterapi, kemoterapi, cerrahi operasyonlar ve hormonal tedaviler en sık başvurulanlardır. Hangi tedavinin uygulanacağına tümör büyüklüğü, yeri, metastaz durumu, kanser evresi, lenf nodlarının durumu, menapoz gibi durumlara göre karar verilir. Ayrıca hasta yaşı ve hastanın genel sağlık durumu uygulanacak tedavi yöntemini belirleme de etkilidir (Hwang ve ark.,2013).

Tüm bunlara rağmen her zaman yeterli olmayan bu yöntemler dışında özellikle de üçlü reseptör negatif grupta olan hastalar için yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.1. Cerrahi

Kanserde ilk ve en çok tercih edilen yöntemdir. Meme kanserinin yapısına, yerine, metastazına göre de iki farklı şekilde yapılır. İlki bölgesel mastektomi denilen var olan tümörün alındığı işlem, ikincisi de total mastektomi denilen tüm memenin alındığı işlemdir (Fisher ve ark., 2002).

2.4.2. Radyoterapi

Radyoterapi, tümör büyüklüğüne göre eğer büyükse ameliyattan önce tümörü küçültmek için uygulanan, küçükse ameliyattan sonra kalan kanser hücrelerini öldürmek amaçlı yüksek enerjili ışınların kullanıldığı tedavi yöntemidir. Bu yöntemdeki hedef ya doğrudan DNA yapısını bozarak ya da serbest radikal oluşumunu sağlayarak dolaylı yoldan DNA hasarına sebep olarak kanser hücrelerini öldürmektedir (Chew, 2001; https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy. Erişim Tarihi: 21 Eylül 2019.). Radyasyon tedavisinin hastalarda nüks riskinin %70 oranda azalttığı gösterilmiştir. (https://www.breastcancer.org/treatment/radiation Erişim Tarihi: 21 Eylül 2019)

2.4.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerini zayıflatmak, öldürmek ve yeniden ortaya çıkmasını engellemek amacıyla anti-kanser ilaçlar kullanılarak yapılan bir tedavi şeklidir. Bazı durumlarda, kemoterapi tedavisi tümör büyüklüğünü küçültmek için cerrahi işlem öncesi uygulanabilir bu işlem neo-adjuvan tedavi olarak adlandırılır, üçlü reseptör negatif hastalarda da bu yöntem tercih edilir. Bazı durumlarda ise, cerrahi işlem sonrası kemoterapi uygulanarak kalan kanser hücrelerinin temizlenmesi amaçlanır ve bu yöntem adjuvan tedavi yöntemi olarak adlandırılır (Pritchard ve ark., 2006; Micog ve ark., 2007).

Her kanser çeşidine uygulanan kemoterapötikler birbirinden farklıdır. Meme kanseri için özellikle antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin), taksanlar (dosetaksel, paklitaksel), mitoksantron ve vinorelbin kullanılır. Ancak ileri evre meme kanserleri için günümüzde kullanılan bu kemoteröpatikler yeterli etkinliğe sahip değildir ve yeni kemoteröpatiklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Glück, 2005; O'Shaughnessy, 2005) .

2.4.4. Hormonal Tedavi

Meme kanserinde, östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü olmak üzere iki reseptör vardır ve hormon tedavisi bu reseptörleri hedefleyen tedavi şeklidir. Reseptörlerin tümör büyümesine olan katkısını azaltmak için hormonal tedavi şekline başvurulur. Meme kanseri, ER antagonisti tamoksifen ve raloksifen gibi ilaçlarla ER reseptörler inhibe edilerek ya da anastrazol gibi ilaçlarla da direkt östrojen sentezi baskılanarak tedavi edilir (Dowsett, 2001; Vogel ve ark., 2006) .

Bu tedavi ile hücrelerin nüks etme oranlarının azaldığı görülmüştür. Ancak HER2'nin aşırı oranda ifade edildiği meme kanserlerinde hormonal tedaviye karşı direnç vardır. (Cummings ve ark., 1999; Dowsett, 2001).

2.4.5 Hedefe Yönelik Tedavi

Monoklonal antikorların, tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanıldığı, ayrıca diğer uygulanan tedavilerin yan etkilerini azaltmak için başvurulan bir tedavi yöntemidir. Özellikle HER2 pozitif meme kanserlerinde trastuzumab bu amaçla kullanılan ilaçtır. Bunun yanı sıra pertuzumab, neratinib, trastuzumab-emtansin ve lapatinib gibi ilaçlarda yine HER2 pozitif meme kanserleri için kullanılmaktadır. Kemoterapiye göre daha iyi olmasına rağmen yine de yüksek yanıt elde edilememiştir (Romond ve ark., 2005; Slamon ve ark., 2011).

2.5.Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması

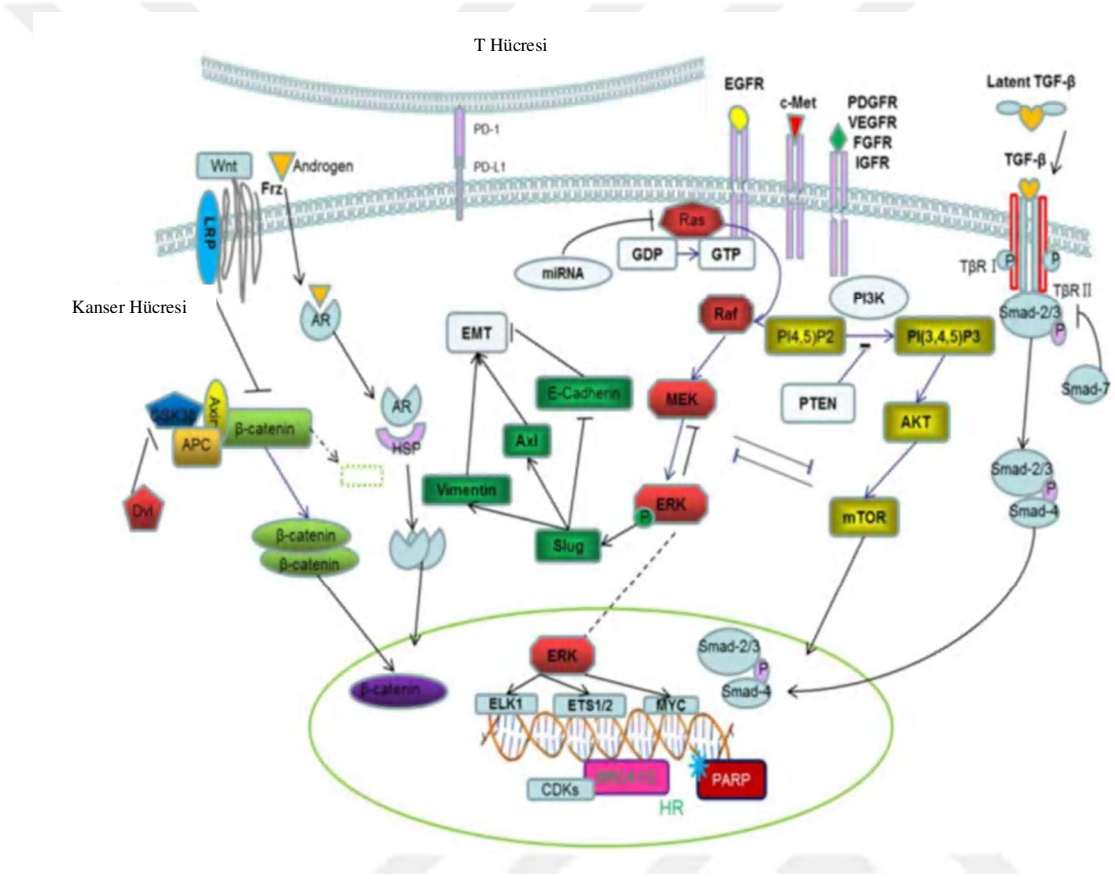
Meme kanserleri her ne kadar moleküler olarak ayrı ayrı sınıflarda incelense de hepsi moleküler heterojeniteye sahiptir ve çoğalma, invazyon, ilaç direnci, metastaz gibi yetenekler ortak yollarla kontrol edilir (Şekil 6). Bu yolaklardaki bir bozulma sonucu aşamalı bir şekilde tümör gelişimi görülür (Michor ve ark., 2004; Hanahan ve Weinberg, 2011) .

Bu bağlamda genel olarak yolaklara bakıldığında reseptör tirozin kinazlar Ras/MAPK ve PI3K/Akt/mTOR yolakları tümör hücre oluşmasını ilerleten bir yol izler (Pearson ve ark., 2001; Cantley, 2002) .

Wnt/β-catenin ve TGF-β/Smad yolakları, ERK'in aktive olmasıyla epitelyal mezenkimal geçişi aktive edip, kanser hücrelerinin göç, invazyon gibi yetenekler kazanmasında rol alırlar (Massagué, 2008; Giltnane ve Balko, 2014).

Üçlü reseptör negatif meme kanserlerinde androjen reseptör (AR) yolağı, hedefledikleri genlerin transkripsiyonunu sağlayarak progresyona katkıda bulunur (Liao ve Dickson, 2002).

Genetik olarak meme kanserlerinin moleküler biyolojisine bakıldığında da en önemli genlerin *BRCA1/2* olduğu görülür. Bu genlerde herhangi bir mutasyon meme kanser gelişimine neden olur (Stevens ve ark., 2013). Ayrıca meme kanser gelişiminde immün kontrol sistemleri de önemlidir. Tümörün immün sistemden kaçışında PD1/PDL1 yolları rol alır (Mittendorf ve ark., 2014).



Şekil 6. Meme kanserinde rol alan sinyal yolakları (Wu ve ark., 2018)

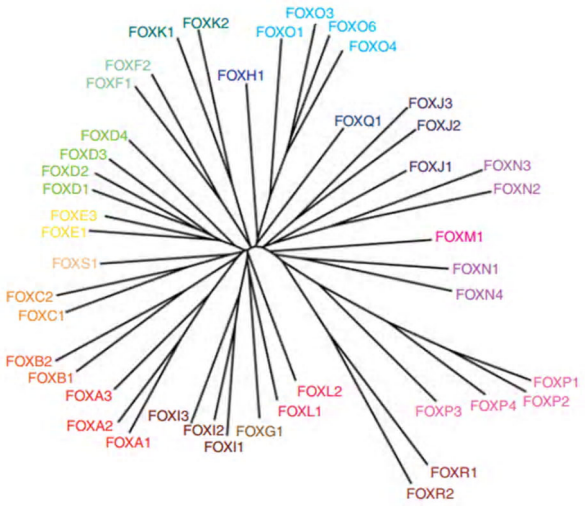
2.6.Forkhead (Fox) Transkripsiyon Faktörleri

İlk olarak Drosophila melanogaster'de bir mutagenez çalışmasında keşfedilen *forkhead (fkh)* geni daha sonra mayalar ve insanlarda da tanımlanmıştır. Mutant Drosophila embriyolarında 'ucu sivri baş' yapısı görülmesinden dolayı bu ismi almıştır. Daha sonra

Forkhead proteinlerinin winged heliks DNA bağlanma bölgeleri içerdiği tespit edilmiştir ve bu bölgelere 'forkhead kutusu (box)' denilmiştir. Farklı özellikte ve fonksiyonda birçok Fox proteini vardır (Weigel ve ark., 1989; Golson ve Kaestner, 2016).

Fox genleri hem yetişkin yaşamında hem de gelişim aşamasında, gastrulasyon düzenlenmesi, metabolizma ve hücre döngü kontrolü, kök hücre niş devamlılığı gibi çok çeşitli biyolojik fonksiyonları kontrol eder (Golson ve Kaestner, 2016). Ayrıca Fox transkripsiyon faktörleri, trofektoderm, karaciğer, pankreas, yumurtalıklar, bağırsak, akciğer, böbrek, prostat, beyin, tiroid, iskelet ve kalp kası, damar doku gibi dokuların normal özellikleri, farklılaşması, bakımı ve işlevi için de gereklidir (Zhu, 2016).

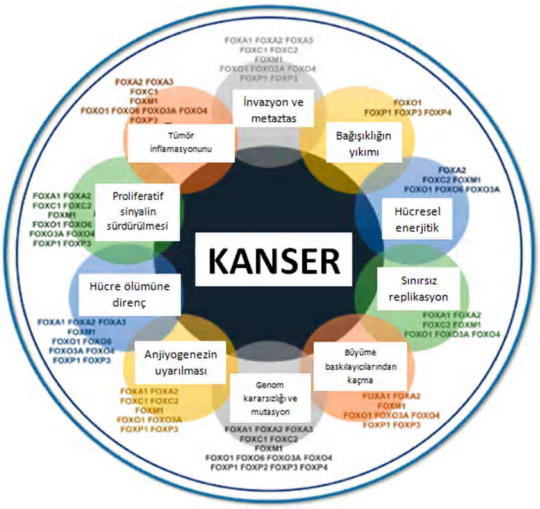
Fox transkripsiyon faktörleri memelilerde 'Forkhead box' bölgelerindeki benzerliklerine göre A'dan S'ye kadar alt sınıflara ayrılmıştır (Şekil 7). Sayılarından dolayı dört grupta incelenebilir: FoxA transkripsiyon faktörleri hücre tiplerinin farklılaşmasında, FoxM1 hücre döngü kontrolünde, FoxO metabolizma ve uzun ömürlülükte ve FoxP grubu ise konuşma ediniminde rol alır (Golson ve Kaestner, 2016). İnsanlarda bu genlerin anormal düzenlenmesi ya da herhangi bir mutasyonu pek çok gelişimsel bozukluklara ve kansere yol açabilir.



Şekil 7. Fox gen ailesi üyeleri (Unhlenhaut ve Treier, 2011)

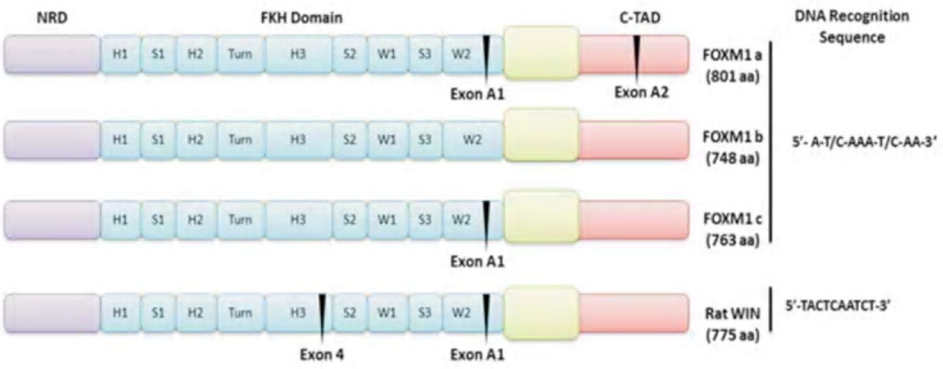
2.6.1.Forkhead box protein M1(FOXM1) transkripsiyon faktörü

İnsanlarda FOXM1 proteini *FOXM1* geni tarafından kodlanan, Fox transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. Özellikle hücre döngüsü ve kanserde önemli bir role sahiptir (Şekil 8). Gelecekteki kanser vakalarının tedavisinde önemli bir hedef olarak görülmüş ve 2010 yılında 'Yılın Altın Molekülü' seçilmiştir(Shen, 2011).



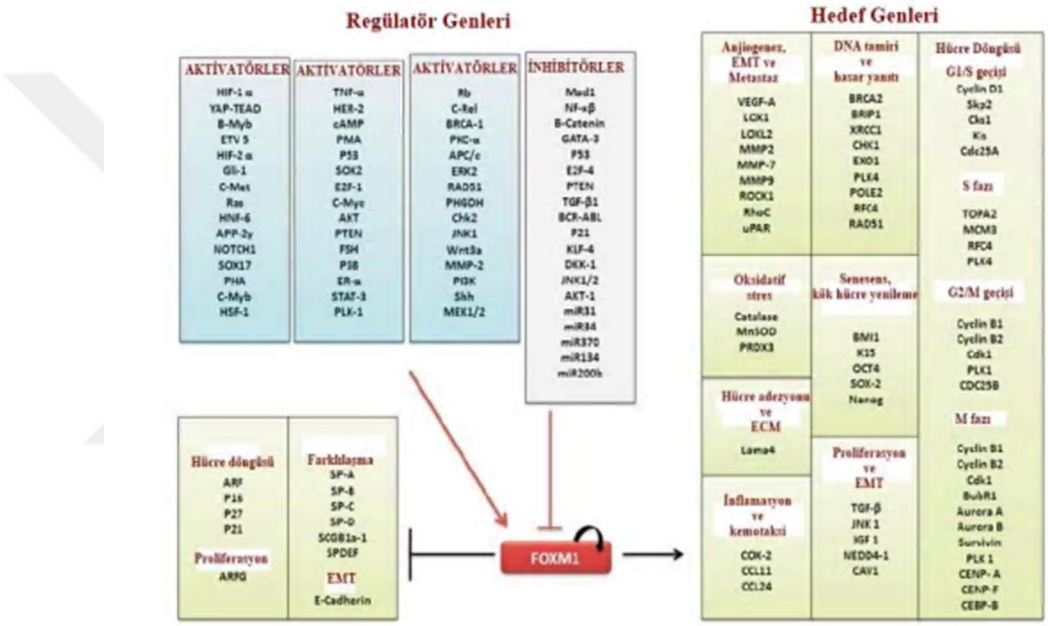
Şekil 8. Fox proteinlerinin kanserdeki rolü (Bach ve ark., 2018)

FoxM1 geni 12.kromozomda yer alır. Kısa kolun 13.33 bandında 10 ekzon içerir. Üç farklı FoxM1 proteini vardır:FoxM1a, FoxM1b ve FoxM1c (Şekil 9). Bunlardan FoxM1a transkripsiyonal represör görevi görürken, FoxM1b ve FoxM1ctranskripsiyonal aktivatörlerdir (Ye ve ark., 1997; Koo ve ark., 2012).



Şekil 9. FoxM1 varyantları (Jaiswal ve ark., 2014)

Transkripsiyon faktör proteini FoxM1 çok sayıda hedef genin ifadesinde rol alır (Şekil 10). Özellikle de hücre döngüsünde görev alan genlerin transkripsiyonel aktivatörü olarak görev yapar. Özellikle G1/S, G2/M geçişleri, kromozomal ayrılma ve sitokinezde rol alan genlerin transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alır. Bunlar dışında FoxM1 proteinleri farklılaşma, senesens, kök hücre yenilenmesi, DNA hasarı yanıtı, oksidatif stresin azaltılması, epitelyal mezenkimal geçiş, anjiyogenez, metastaz ve premetastatik niş oluşumu gibi çok sayıda geni de etkilemektedir (Ye ve ark., 1997; Jaiswal ve ark., 2014).



Şekil 10. FoxM1 hedef genleri ve regülatörleri (Jaiswal ve ark., 2014)

FoxM1'in meme kanserindeki rolüne bakıldığında üçlü reseptör negatif meme kanserlerinde oldukça yüksek ifade edildiği gösterilmiştir (Craig ve ark., 2013). Üçlü reseptör negatif meme kanser hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada da FoxM1'in, hücre çoğalması, sağ kalımı, migrasyon ve invazyonuna neden olduğu ve aynı çalışmada ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz (eEF2K)'ın, İntegrin-β1, LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyonal düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak FOXM1, TNBC tedavisinde birçok onkojenik sinyal yolağını düzenleyen moleküler bir hedef olarak gösterilmiştir (Hamurcu ve ark., 2016).

2.7.Meme Kanser Hücre Hatları

Özellikle kanser gibi birçok hastalığın moleküler mekanizmalarını araştırmak için hücre kültür yöntemleri kullanılır. Hücre kültürü araştırmacıya, önceden tanımlanmış özelliklerinin bilindiği hücre hatları üzerinde in-vitro çalışma olanağı sağlar. Hücre hatları kullanımları kolay, sınırsız çoğalabilen oldukça avantajlı kaynaklardır. Laboratuvarlarda hücre hatları kanser moleküler mekanizması, belirteçlerin tanımlanması ve tedavi için yaklaşım geliştirmek amaçlı kullanılır. Bu bağlamda kullanılan meme kanser hücre hatlarından bazıları şunlardır: MCF7, SKBR-3, BT-20, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468. Sunulan tez çalışmasında MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücreleri kullanılmıştır.

2.7.1.MDA-MB-231 Hücre Hattı

Bu hücre hatları MDA-MB serisinden olup M.D. Anderson Enstitüsü'nde geliştirilmiştir. Açılımı M.D. Anderson-Metastatic Breast şeklindedir (Dohr ve ark., 1995). Metastatik adenokarsinom, plevral efüzyon, üçlü reseptör negatif, agresif ve invaziv karakterdedir. Adherent yani yapışkan özellik gösterir. Kemoterapi duyarlılığı orta derecededir (Holliday ve Speirs, 2011).

2.7.2.BT-549 Hücre Hattı

BT-549 hücre hattı ilk olarak 1978 yılında W.G. Coutinho ve E.Y. Lasfargues tarafından izole edilmiştir. Kaynak doku, 7 bölgesel lenf nodundan 3'üne metastaz yapmış papiller, invaziv bir duktal tümörden oluşur (Lasfargues ve Coutinho, 1978). Metastatik duktal karsinom, üçlü reseptör negatif, agresif ve invaziv karakterdedir. Adherent yani yapışkan özellik gösterir (Littlewood ve ark., 1997).

2.7.3.MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

MCF-7, ilk defa Michigan Kanser Vakfı'nda 69 yaşında meme kanseri olan beyaz ırk bir kadının plevral efüzyonundan türetilmiştir. Vakfın adının baş harfleri ile adlandırılmıştır. MCF-7'de ER bulunduğu ilk kez Dr. Sam Brooks ve Dr. Soule tarafından gösterilmiştir (Levenson and Jordan, 1997). MCF-7 hücrelerinin karakteristik özellikleri şunlardır; invaziv duktal karsinom (süt bezlerinde), plevral efüzyon, ER^{+}, $PR^{+/-}$, $HER2^{-}$, hormonal tedaviye yanıt verir ve genellikle kemoterapiye duyarlıdır. Adherent hücre hattı özelliğindedir, bu sebeple in-vitro kültür çalışmalarında kolaylıkla kullanılabilir (Liu et al., 2017, Lokerse et al., 2017).

2.8.APOPTOZ

Apoptoz, Yunanca'da apo(=ayrı) ve ptozis(=düen) kelimelerinden türemiştir. İlk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından gösterilmiştir (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz hücre içinde normal işleyişin bozulması, DNA hasarı, virüs enfeksiyonu, büyüme faktörleri azalışı, ölüm sinyallerinin uyarılması gibi pek çok durumda meydana gelen programlanmış hücre ölüm şeklidir. Apoptoz, nekrozun aksine doku homeostazını koruyarak hücrenin büzüşmesi ile karakterize temiz bir ölüm şeklidir (Thompson, 1999). Apoptozun gerçekleşmesi için hücre içinden ya da dışından sinyal oluşması gerekir. Bu sinyaller hücre içinde proteaz sistemi olan kaspazları aktive ederek süreci devam ettirir. Kaspazların aktivasyonu intristik (mitokondriyal yol ile) ya da ekstrinsik (hücre ölüm sinyalleri ile) olmak üzere temelde iki yol ile olur (Cruchten ve Broeck, 2002).

2.8.1. İntristik (mitokondriyal) Yol:

Bu yol ile apoptozun düzenlenmesi Bcl-2 gen ailesi üyeleri ile sağlanır. Bcl-2 gen aile üyeleri iki gruptan oluşur bunlar 'pro-apoptotikler' ve 'anti-apoptotiklerdir'. Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa gibi sitozolde bulunan proteinler proapoptotik üyelerdendir ve sitokrom-c ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi proteinlerde antiapoptotik üyelerdir ve kaspazlar aracılığı ile sitokrom-c ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınımını baskılayarak apoptozu inhibe ederler (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001).

2.8.2. Ekstrinsik (hücre ölüm sinyalleri ile) Yol:

Ekstrinsik yol ile apoptozun düzenlenmesi ölüm ligandlarının reseptörlere bağlanması ile gerçekleşir. Bu reseptörler içinde tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) en önemlisidir. Fas, TNFR, DR5 gibi reseptörlere FasL, TNF-alfa, TRAİL gibi ölüm ligandlarının bağlanmasıyla hücre içinde kaspazların aktivasyonu gerçekleştirilir. Böylelikle apoptoz indüklenmiş olur (Pradelli ve ark., 2010).

2.9.Kaspazlar

Kaspazlar apoptozda önemli proteinlerdir. Proteolitik aktivite gösterirler. Proteinleri aspartik asit rezidülerinden keserler. Hücre içinde inaktiftirler uyarıldıklarında aktifleşirler ve bir kere aktif olduklarında hücre ölümü için geri dönüşü olmayan süreç başlar. Kaspazlar genel olarak üç gruba ayrılır. Bunlar başlatıcı (kaspaz-2, -8, -9, -10),

efektör (kaspaz-3, -6, -7) ve enflamatuar (kaspaz -1, -4, -5) kaspazlardır (Rai ve ark.,2005).

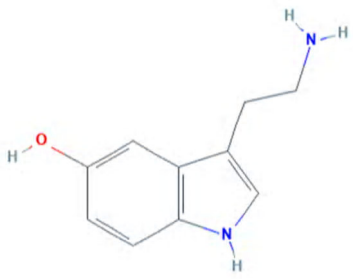
2.10.Apoptoz ve Kanser

Kanser, hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda hücrenin proliferasyonunun artışından ziyade ölümden kaçması olarak tanımlanabilir. Özellikle hücre ölümünden kaçış dendiğinde akla ilk gelen apoptoz mekanizmasıdır. Programlanmış hücre ölüm mekanizması olarak apoptoz kanser hücrelerinde pek çok sebepten dolayı işlemeyen bir mekanizma halini alır. Bunlardan en önemlisi *p53* geninde meydana gelen bir mutasyondur. p53 proteini tümör süpresör olarak görev görür ve hücrede aktive olmasıyla kaspazlara kadar uzanan bir dizi olay ile apoptozu tetikler. Ancak bu gende meydana gelen mutasyon sonucunda hücreler apoptoza uğramaz (Tomatır,2003; Burz ve ark., 2009) .

Ayrıca Blc-2 aile üyeleri de hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotikler olarak görev yapar ve bu gen aile üyelerinin hücre içinde ekspresyon seviyelerindeki değişiklik kanser hücre proliferasyonuna etki eden önemli bir diğer konudur. Bcl-2 proteininin aşırı ekspresyonu hücrede tümörojenezdeki apoptoz ile ilişkilendirilen ilk proteindir (Burz ve ark., 2009).

2.11.SEROTONİN

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), esansiyel aminoasit olan tripofandan üretilen, merkezi sinir sisteminde nörotransmitter, gastrointestinal sistemde lokal mediyatör olarak görev yapan ve kanda da vazoaktif işlevli biyogenik bir monoamindir (Şekil 11) (Sarrouilhe ve Mesnil, 2018).



Şekil 11. Serotonin moleküler yapısı
(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5202#section=2D-Structure Erişim Tarihi: 25.12.2019)

Serotonin izolasyonu ilk olarak 1948 yılında yapıldı. İzolasyonu, trombositlerde bulunan vazokonstriktör bir maddeyi karakterize etmek amaçlı yılları bulan çalışmalar sonucunda gerçekleşti. Maurice Rapport ve Irvine Page 1948 yılında bu çalışmalar sonucunda serotonini karakterize etmeyi başardı (Rapport ve ark., 1948a, 1948b, 1948c). Latince *serum* ve Yunanca *tonic* kelimelerinden türetilerek 'serotonin' adı verildi (Mohammad-Zadeh ve ark., 2008). Bir başka bilim adamı İtalyan Vittorio Erspamer de, gastrointestinal sistem hücreleri olan enterokromaffinlerde enteramin olarak adlandırdığı bir molekül izole etti (Erspamer ve Asero,1952). 1952 yılında da serotonin ve entoramin olarak ayrı ayrı izole edilen moleküllerin aslında aynı 5-hidroksitriptamin olduğu gösterildi (Reid ve Rand, 1952).

Serotonin keşfinden sonra artan çalışmalarla pek çok doku ve organda; beyin, böbrek, akciğer, trombositler ve gastrointestinal sistem gibi, birçok sistemde var olduğu tanımlandı. Serotoninin trombositlerdeki rolü araştırılırken Brodie ve arkadaşları nörotransmitter rolü üzerine dikkatleri çekti (Brodie ve Shore, 1957). Bu doğrultuda 1964 yılına gelindiğinde Dahlstrom ve arkadaşları, serotonerjik sistem denilen beyindeki serotonin içeren spesifik alanları ilk kez keşfettiler. O zamana kadar keşfedilmiş olan üçüncü nörotransmitter oldu ve sinir sisteminde ruh hali, davranış, iştah, uyku gibi durumlarda rolü olduğu düşünüldü (Dahlstrom ve Fuxe, 1964).

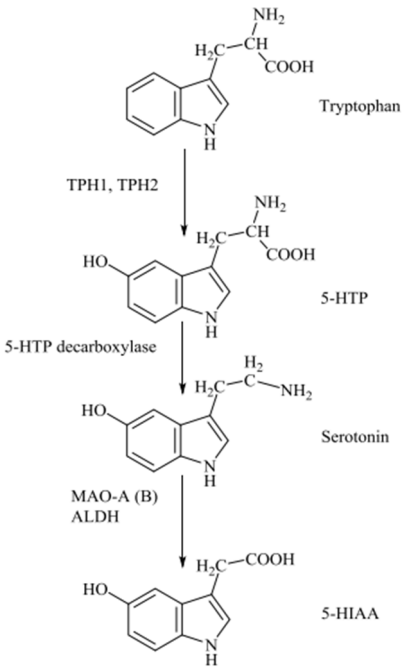
Serotoninin bilinen bu merkezi sinir sistemi üzerine olan etkileri, gastrointestinal sistem ve trombositlerdeki işlevleri dışında çok çeşitli tümörlerde mitojen etkili bir faktör olduğu da gösterilmiştir (Sarrouilhe ve ark., 2015). Bunun sonucunda serotoninin primer tümör büyümesinde, invazyon ve metastazında da rol aldığı düşünülmüş ve böylelikle serotonin kanser çalışmalarında önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir.

2.11.1.Serotonin Biyogenezi

Serotonin, epinefrin, dopamin ve norepinefrine benzer biyojenik monoamin olup triptofan aminoasidinden iki basamakta sentezlenir (Şekil 12). İlk basamakta triptofan hidroksilaz enzimi (TPH) ile triptofana hidroksi grubu eklenir ve ortaya bir ara ürün olan 5-hidroksitriptofan (5-HTP) çıkar. Bu aşamada kullanılan TPH enziminin iki izoformu vardır ve hız sınırlayıcı olarak işler. Bu iki izoformdan biri olan triptofan hidroksilaz enzimi-1 (TPH1) periferde sentezi gerçekleştirirken, triptofan hidroksilaz enzimi-2 (TPH2) bunu merkezi sinir sisteminde yapar. Oluşan 5-HTP'den, 5-

hidroksitriptofan dekarboksilaz enzimi (L-aromatik aminoasit dekarboksilaz) ile karboksil grubu uzaklaştırılarak 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin) elde edilir (Mohammad-Zadeh ve ark., 2008; Sarrouilhe ve ark., 2015) .

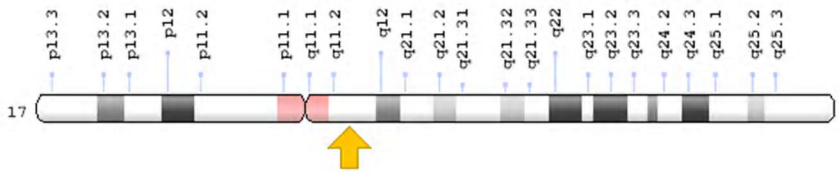
Sentezden sonra serotonin vezikül monoamin taşıyıcılarda (VMAT) biriktirilir ve gerekli olduğu takdirde hücre dışına salınımı gerçekleştirilir. Ortama salınan serotonin, hücre yüzeylerindeki reseptörleri aracılığıyla hücre içinde sinyal iletimini başlatır. Görevi biten serotonin, serotonin transporterleri (SERT) yardımıyla hücre içine geri alınır ve monoamin oksidaz (MAO) enzimiyle metabolize edilir. Oluşan 5-hidroksindolasetikasit (5-HIAA) idrarla atılır (Clark ve ark., 1954; Tanis ve ark., 2008; Welford ve ark., 2016).



Şekil 12. Serotonin biyosentez ve mekanizması (Sarrouilhe ve ark., 2015)

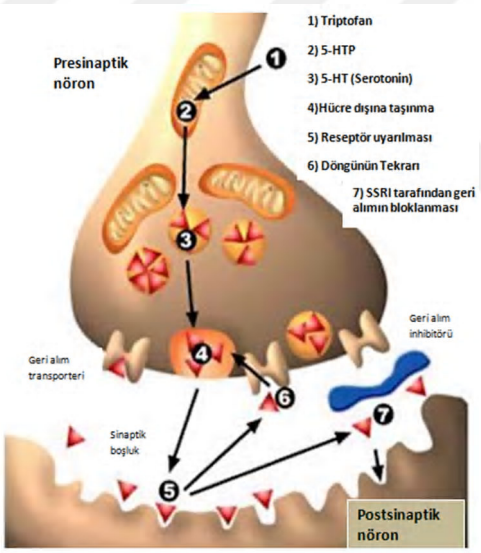
2.11.2.Serotonin İle İlgili Moleküller

Serotonin ile ilişkili yapılardan biri serotonin geri alım taşıyıcılarıdır (SERT). İnsanlarda *SLC6A4* (17q.11-q12) geni tarafından kodlanır (Şekil 13) ve serotonini hücre içine taşıyan monoamin taşıyıcı protein türüdür.



Şekil 13. SLC6A4 geni (https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC6A4#resources Erişim Tarihi:08.01.2020)

Bu genin promotöründeki tekrar uzunluktaki bir polimorfizmin serotonin alım hızını etkilediği ve ani bebek ölüm sendromunda, Alzheimer hastalarında agresif davranışta, travma sonrası stres bozukluğunda ve duygusal travma yaşayanlarda depresyon duyarlılığında rol oynadığı gösterilmiştir. (Greenamyre ve ark., 1987; Meltzer, 1989)



Şekil 14. Serotonin geri alımı ve selektif serotonin geri alım inhibitörü mekanizmasının şematik gösterimi (https://www.avivasysbio.com/wordpress/blog/slc6a4-serotonin-transport-gene Erişim Tarihi: 10.01.2020)

Serotonin taşıyıcıları, serotonini ortamdan alır ve hücre içerisinde yıkımı gerçekleştirilerek serotonin etkisi sonlandırılır (Şekil 14). SERT, sodyum bağımlı serotonin taşıyıcıları olarak da bilinir. Bu protein SSRI (selektif serotonin geri alım inhibitörü) ve trisiklik antidepresan sınıflarının birçok antidepresan ilaçlarının hedefidir (Quadros ve ark., 2010). Serotoninle ilgili SERT, SSRI gibi moleküllerin dışında salgılandığı hücre dışında diğer hücrelerde de etki ettiği serotonin reseptörleri vardır.

2.11.3.Serotonin Reseptörleri

Serotonin metabolizmadaki çeşitli etkilerini reseptörleri aracılığıyla yapar. 750 milyon yıl öncesinden gelişen yüksek memeliler dışında düşük omurgasızlarda da bulunan filogenetik olarak eski bir moleküldür (Peroutka ve Howell, 1994).

İnsanda serotonin reseptörlerinin sınıflandırılmasına bakıldığında 14 tipi olduğu görülür. Bunlar bir çok organda mevcut olup 7 serotonin reseptör ailesine yayılmış haldedir (Tablo 1). Serotoninin hücre içinde oluşturduğu etkiler bağlandığı reseptörlerin özellikleri ve buna bağlı hücre içi sinyal yolu ile belirlenir (Hoyer ve ark., 1994; Sarrouilhe ve Mesnil, 2018).

Serotonin reseptörleri kompleks genler tarafından kodlanır ve 5-HTR1, 5-HTR2... 5-HTR7 olmak üzere sınıflara ayrılır. Bu sınıflarında kendi içinde benzerlik göstermesiyle 5-HTR1D, 5-HTR1B..gibi alt sınıfları vardır. Bu sınıflandırma reseptör antagonist ve agonistleri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda oluşturulmuştur. Serotonin reseptörlerinden altısı G-protein bağlı reseptör iken 5-HTR3 ligand kapılı Na^+ / K^+ iyon kanalı içermesi bakımından diğerlerinden farklıdır (Derkach ve ark., 1989; Mohammad-Zadeh ve ark., 2008).

Tablo 1. Serotonin Reseptör Sınıflandırması (Sarrouilhe ve ark., 2015)

Reseptör Alt Tipi	Sinyal İletim Mekanizması	Agonistler[b]	Antagonistler[b]
1A	G_i/G_0 adenil siklaz	BP554 8-OH-DPAT PAPP	NAN-190 Pindobind SDZ21-009 Spiperon
1B	G_i/G_0 adenil siklaz	CGS-12066A CGS-12066B CP93129	GR127935 Metiyotepin SB216641 SB224289 SDZ21-009
1D	G_i/G_0 adenil siklaz	Sumatriptan	GR127935 Metergolin
1E	G_i/G_0 adenil siklaz		
1F	G_i/G_0 adenil siklaz		
2A	G_q/G_{11} Fosfolipaz C	DOI	Ketanserin Mesulergin Metergolin Ritanserin
2B	G_q/G_{11} Fosfolipaz C	α-ME-HTP	LY272015 Metergolin SB204741 SB228357 Tergurid
2C	G_q/G_{11} Fosfolipaz C	Tegaserod	Mesulergin Metergolin Ritanserin SB228357 Tergurid
3	Ligand kapılı iyon kanalı	Fenilbiguanit	Y25130
4	G_s adenil siklaz	Sisaprid Mozaprid	RS-23597-19
5A	G_i/G_0 adenil siklaz		
5B[a]	G_i/G_0 adenil siklaz		
6	G_s adenil siklaz		
7	G_s adenil siklaz	8-OH-DPAT	Metsergid

[a]:İnsanda yok, [b]:sadece serotoninin karsinogeneze katılımını incelemek için kullanılan agonistler ve antagonistler listelenmiştir.

Serotonin Reseptör 1 (5-HTR1) ailesine bakıldığında, G proteine bağlı reseptörler (GPCR'ler) olup kendi içinde 5-HT1A, -1B, -1D, -1E ve -1F reseptör olmak üzere beş alt tipi vardır. Örneğin 5-HT1A reseptörleri genel olarak merkezi sinir sisteminde serebral korteks, hipokampus, septum, amigdala ve raphe çekirdeğinde yüksek miktarda bulurken gangliyon ve talamusta da mevcuttur. Duygu durum, ruh hali, saldırganlık, iştah gibi hallerde rol alır (Ito ve ark.,1999). 5-HTR2'ler de G protein bağlı reseptörlerdir. 5-HT2A, -2B, -2C olmak üzere üç alt tipi vardır. Bu reseptörler genelde

prefrontal kortekste bulunup bellek, koşullanma gibi bilişsel işlevlerde rol alırken, 5-HT2A reseptörünün merkezi sinir sistemi dışında meme kanser gelişiminde de rol aldığı tespit edilmiştir (Eison ve Mullins, 1996; Sonier ve ark., 2006)

Tek ligand kapılı iyon kanalı olan 5-HT3 reseptörlerinin ise merkezi ve periferal sinir sisteminde psikolojik fonksiyonlar üzerine çeşitli etkileri vardır. Bununla beraber sinirlerin sinaptik iletiminden de sorumludur (Yakel, 2000).

Serotonin cevabı olarak cAMP seviyesinin artmasını sağlayan bir başka GPCR 5-HTR4 reseptörüdür. Özellikle hipokampüste işlevseldir. Çeşitli nörotransmitterlerin salınımından görevlidir (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3360 Erişim Tarihi: 27 Aralık 2020) (Hagena ve Manahan-Vaughan, 2017). cAMP seviyesini negatif etkileyen GPCR ailesi ise 5-HTR5'tir ve 5-HT5A ile -5B olmak üzere iki alt tipi vardır. Hücre içinde Ca^{+2} mobilasyonunun düzenlenmesinde rol alır (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3356 Erişim Tarihi: 27 Aralık 2020). Fizyolojik fonksiyonları halen tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da biliş, kaygı, duyusal algı venöroendokrin fonksiyonlarının olduğu saptanmıştır (Wesolowska, 2002). Neredeyse sadece beyinde üretilen bir başka serotonin reseptörü 5-HTR6'nın ise yaşa bağlı bilişsel bozukluklarda, hafıza ile ilgili problemlerde özellikle alzheimer ve parkinson gibi hastalıklarda önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Messina ve ark., 2002; Kan ve ark., 2004).

Vücut ısısı, sirkadiyen ritim, uykunun düzenlenmesi gibi durumlarda rol alan ve özellikle depresyon tedavilerinde de önemli bir yeri olan 5-HTR7 son serotonin reseptör ailesini oluşturur (Hedlund ve Sutcliffe, 2004; Nikiforuk, 2015).

2.11.4.Serotonin ve Kanser

Serotonin reseptörlerinin tüm bu işlevlerinin yanı sıra, çeşitli karsinoma, karsinoidler ve diğer tümör hücreleri üzerinde büyüme uyarıcı bir etki gösterdiği ortaya konmuştur (Tablo 2).

Erkeklerde en sık görülen ve ölümlerin ana nedenlerinden biri olan prostat kanserleri de serotoninin etki ettiği bir kanser türüdür. Üç prostat hücre hattı üzerine (PC3, DU145,LNCaP) yapılan çalışmalarda tanımlanan serotoninin 5-HT1A, 5-HT1B, 5-

HT2B ve 5-HT4 reseptörleri, tümör büyümesine etki ettiği gösterilmiştir (Abdul ve ark.,1994;1995; Dizeyi ve ark., 2004; 2005).

En yaygın tipi ürotelyal hücre karsinomu olan mesane kanseri, ürotelyum kaynaklı olup yüksek prevalansa sahip bir malign tümör tipidir. İnsan mesane kanser hücre hattı HT1376'da yapılan çalışmada kontrole kıyasla konsantrasyona bağlı olarak serotoninin hücre proliferasyonuna %12 uyarıcı etki ettiği saptanmıştır (Siddiqui ve ark., 2006b).

Akciğer kanseri 4 alt tipinden biri olan küçük hücreli akciğer karsinomu (SCLC) çok agresif ve erken metastaz yapma özelliğine sahiptir. GLC8 hücre hattında serotonin antagonistiyle yapılan bir çalışma serotoninin, 5-HTR1 ile büyümeyi uyardığını göstermiştir (Cattaneo ve ark., 1993). SCLC üzerine yapılan bir başka çalışmada da hem 5-HT1A hem de 5-HT1D reseptörleri üzerinden serotoninin mitojenik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Cattaneo ve ark., 1995).

Yetişkinlerde en yaygın karaciğer kanseri hepatoselüler karsinom olup kötü prognozludur. Genelde karaciğer sirozuna bağlıdır ve özellikle Asya ve Afrika'da görülür. Bu doğrultuda 176 hasta ile yapılan bir çalışmada, 5-HT1A ve 5-HT7 serotonin reseptörleri aynı oranda tanımlanırken tümör dokularında en çok eksprese olan reseptörler 5-HTR1B ve 5-HTR2B olarak bulunmuştur. Aynı zamanda Huh7 ve HepG2 karaciğer hücre hatlarında, 5-HTR1B ile 5-HTR2B antagonistleri ile yapılan çalışmada serotoninin hücre canlılığı ve proliferasyona olan katkısı gösterilmiştir (Soll ve ark., 2012).

Beyin tümörleri arasında yüksek nüks sıklığına sahip ve mültifokal tümör olan gliomalar üzerine serotonin çalışmaları nadir de olsa bir çalışmada proliferasyon, invazyon ve migrasyonun uyarıldığı görülmüştür. Aynı çalışmada 5-HTR2'nin sekiz hücre hattında da eksprese edildiği gösterilmiştir (Merzak ve ark., 1996).

Serotoninin bir başka etki ettiği ve sunulan tez çalışmamızı oluşturan meme kanserleri, dünya çapında kadınlar arasında en yaygın kanserlerdir. Özellikle agresif özelliğe sahip kötü prognozlu olup mevcut tedavi yöntemlerine yanıt vermeyen TNBC'lerde yeni tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyumaktadır. Bu bağlamda üçlü reseptör negatif meme kanser hücreleri ile yapılan bir çalışma da 5-HTR7'nin ekspresyonun fazla olduğu tespit edilmiş ve bu hücrelerde hem proliferasyon hem de invazyonun arttığı belirtilmiştir (Gautam ve ark., 2016). Pai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanser

hücre hattında 5-HTR7 reseptörünün diğer meme kanserlerine oranla daha yüksek oranda ifade olduğu, 5-HTR7'nin meme kanserlerinde prognostik bir belirteç olabileceğini ve meme kanserlerinde 5-HT sistemi üzerine daha fazla araştırma yapılarak meme kanserindeki rolünün ortaya çıkartılmasının gerekliliği önerilmiştir (Pai ve ark., 2009; 2015).

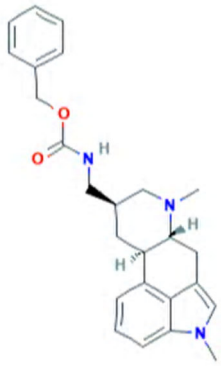
Tablo 2. Farklı kanser hücreleri üzerine serotoninin uyarıcı etkisi ile ilgili çalışmalar (Pai ve ark., 2009; 2015; Sarrouilhe ve ark., 2015)

Tümör Tipi	Hücre hattı veya Hayvan Model	İlgili Reseptör	Referans
Prostat Kanseri	PC3, DU145, LNCaP Xenografted BALB/c mice	5-HT1A	(Abdul ve ark.,1994; 1995; Dizeyi ve ark., 2004)
	PC3, DU145, LNCaP	5-HT2B, 5-HT4	(Dizeyi ve ark., 2005)
	PC3	5-HT1A, 5-HT1B	(Siddiqui ve ark., 2006b)
	PC3, DU145	5-HT1A, 5-HT1B	(Pirozhok ve ark., 2010)
Mesane kanseri	HT1376	5-HT1A, 5-HT1B	(Siddiqui ve ark., 2006a)
Küçük hücreli akciğer kanseri	GLC8	5-HT1A, 5-HT1D	(Cattaneo ve ark., 1993; 1994;1995; Vicentini ve ark., 1996)
Kolorektal karsinom	HT29	5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT3, 5-HT4	(Ataee ve ark.,2010a; 2010b;2010c)
Kolanjiyokarsinom	Mz-chA1, HuH28, HUCC-T1, CCLP-1, SG231, TFK-1	5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT4, 5-HT6	(Alpini ve ark., 2008)
Koryokarsinom	BeWo, JEG-3	5-HT2A	(Oufkir ve ark., 2010)
Meme Kanseri	MCF-7 MDA-MB-231	5-HT2A 5-HTR7	(Pai ve ark., 2009; 2015; Sonier ve ark., 2006)
Hepatoselüler karsinom	Huh7, HepG2, Hep3B Xenografted B/6 mice CCl4-treated mice	5-HT1B, 5-HT2B	(Soll ve ark.,2010;2012)

2.12.METERGOLİNE

Metergolin (moleküler formülü: $C_{25}H_{29}N_3O_2$), ergotaminin N-benziloksikarbonil türevi bir psikoaktif ilaçtır (Şekil 15). Bir 5-HT2 antagonisti, 5-HTR6 için orta afiniteye ve 5-HTR7 için yüksek afiniteye sahiptir (Lee ve ark., 2014). Serotonerjik bir antagonist ve bir dopamin agonisti olarak rol oynar. (https://pubchem. ncbi.nlm.nih.gov/compound/ 28693#section=Molecular-Formula Erişim Tarihi: 13 Ocak 2020)

Bir ergoline alkaloid ve bir karbamat esterdir. İlaç olarak kullanımı mevsimsel duygudurum bozukluğu tedavisi, prolaktin salınımı üzerindeki önleyici etkisi nedeniyle prolaktin hormonu regülasyonu (Delitala, 1977) kadınlarda adet öncesi disforik bozukluk ve antianksiyete tedavisi (Graeff ve ark., 1985) gibi çeşitli klinik durumlarda kullanılmaktadır.



Şekil 15. Metergoline Moleküler Yapısı
(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/28693#section=Molecular-Formula Erişim Tarihi: 13.01.2020)

3.GEREÇ ve YÖNTEM

TYL-2019-9187 kodlu bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenip, projenin deneysel aşamaları Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1.Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeleri

Tablo 3. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Amacı
-80°C Derin dondurucular	Hücrelerin dondurulması, numunelerin saklanması
-20°C Derin dondurucular	Numunelerin ve sarf malzemelerin saklanması
Azot tankı	Hücrelerin dondurulması
Buzdolabı	Sarf malzemelerin saklanması
CO_2 İnkübatörleri	Hücre kültür ortamı
Steril Kabin Lamin Air Class II	Hücre kültür ortamı
Glomax ELISA Reader	Hücre canlılık testi,MTS
Santrifüj	Santrifüj ve hücre kültürü
İnvert Mikroskop	Hücrelerin görüntülenmesi
Tek kanallı pipet seti	Hücre kültürü çalışmalarında
Su banyosu	Hücre kültürü çalışmalarında
Hassas terazi	Tartma işleminde
Pipet tabancası	Hücre kültürü çalışmalarında
Elektroforez Tankı	Western Blot
BioRad, ChemiDoc Görüntüleme Sistemi	Western Blot

Tablo 4. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Kullanılan Sarf Malzemeleri	Amacı
DMEM F12 Medya	Besiyeri hazırlanmasında
Fetal Bovine Serum	Besiyeri hazırlanmasında
Penicillin-Streptomycin	Besiyeri hazırlanmasında
L-glutamine	Besiyeri hazırlanmasında
Trypsin-EDTA	Hücre pasajlamada
25'lik Ve 75'lik Hücre Kültür Flaskı	Hücrelerin çoğaldığı kültür kapları
6 ve 96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakaları	Klonojenik ve sitotoksite için ekim kapları
Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (DPBS)	Hücre kültürü
Serotonin	Hücre kültürü
Metergoline	Hücre kültürü
MTS	Hücre canlılık testi
PMS	Hücre canlılık testi
DMSO	Hücre kültürü
15 ml'lik ve 50 ml'lik Falkon Tüp	Hücre kültürü
Cryo Tüp	Hücre dondurma
5,10 ve 25 ml'lik Serolojik Pipet	Hücre kültürü
Thoma Lamı	Hücre sayımı
Cristal violet	Klonojenik test
Restore Western Blot Stripping Buffer	Western Blot
Ready Gel Tris-HCl Gel	Western Blot
Western ECL Substrate	Western Blot
Protein Ladder	Western Blot
DC Portein Assay Reagent Kit	Western Blot
Phosphatase Reaction Buffer	Western Blot
Protese Inhibitör Coctail	Western Blot
Thick Blot Paper-Filter Paper	Western Blot
Cell Lyzis Buffer	Western Blot
Sodium Florür	Western Blot

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Sunulan tez çalışmada MDA-MB-231, BT-549 üçlü negatif meme kanser hücre hatları ve MCF-7 hücre hattı kullanıldı. Bu hücreler daha önce ATCC (American Type Culture Collection) firmasından alınmış olup çoğaltılarak -196°C'de azot tankında muhafaza edilmiştir.

3.2.1.1. Besiyeri Hazırlama

Üç hücre hattının da (MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7) çoğaltılması, pasajlanması ve dondurulması için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri kullanıldı.

Besiyerine (500 ml), 50 ml fetal sığır serumu (FBS, %10), 5 ml L-glutamin (%1) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (%1) eklenerek hazırlandı.

3.2.1.2. Hücre Kültürünün Başlatılması

Deneyler boyunca tüm hücre kültür çalışmaları steril laminar hava akımlı kabinlerde yapılıp hücreler 37°C %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildi. Daha önce -196°C sıvı azot tankında dondurularak saklanan hücre hatları medyumla yıkandı. Daha sonra yıkanan hücreler 25 cm^2 'lik flasklara ekilerek 37°C %5 CO_2'li inkabatörde kültüre edildi.

3.2.1.3. Hücre Pasajlama

Pasaj işlemi 37°C %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilen hücrelerin çoğalması flasklarda % 70-80 yoğunluğa ulaşınca yapıldı. Kullandığımız hücre hatları yapışkan tipli olduğundan bunların flask tabanından kalkması için tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Tripsin hücreler arası ve hücre yüzey arası bağı kıran ve aynı zamanda toksik olan bir madde olduğu için etkinliğinin ortadan kalkması gerekir. Bunun için, tripsinle muamele edilen hücreler flasklardan medyum içeren 15'lik falkon tüplere alınarak yıkama işlemi yapıldı. Sonrasında hücreler medyum içeren flasklara ekilerek 37°C %5 CO_2'li inkübatörde çoğalması sağlandı.

3.2.1.4. Hücre Dondurma

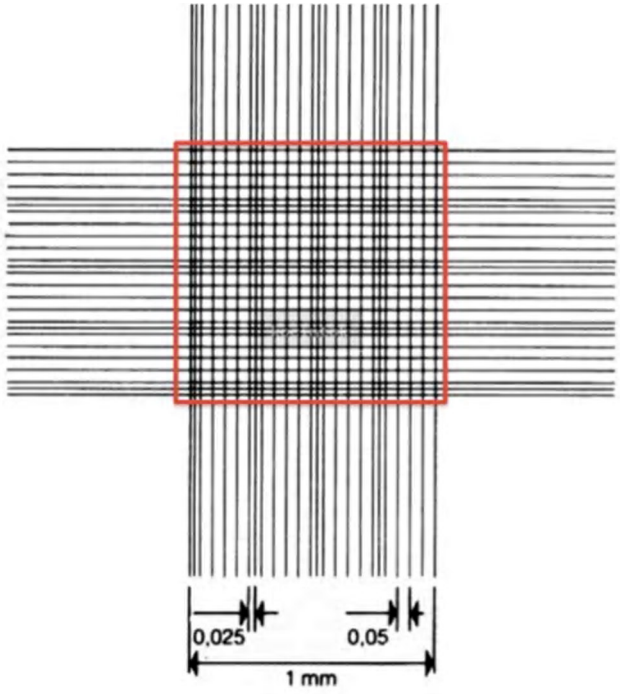
Hücreler her pasaj işleminde değişikliğe uğrar. Hücre yaşlanmasını engellemek, bozunmaların önüne geçmek ve çoğalmış ama kullanılmayacak kadar fazlalıktaki hücrelerin dondurulması gerekir. Bu dondurulmuş hücreler ihtiyaç dahilinde yeniden açılarak kullanılır. Dondurulma esnasında oluşabilecek zararları önlemek ve hücre içi metabolik aktivitenin durdurulması amacıyla DMSO kullanılır. Bu aşamada belirli yoğunluğa erişmiş hücreler tripsin-EDTA yardımıyla flasklardan kaldırılıp 15ml'lik falkonlara alındı. 1500 rpm 5 dakika santrifüjden sonra oluşan pellet DMSO içeren medyum içerisinde önce -80°C'de ve sonra -196 ^{o}C'lik sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

Her bir deney için kullanılacak hücre sayısını saptamak amacıyla hücre sayım işlemi yapıldı. Bunun için thoma lamı kullanıldı. Bu lam yardımıyla yapılan sayımda 0,1 mm^3 hacimde 1 ml'deki hücre sayısı elde edilir. Aşağıda thoma lamı yüzeyi resmedilmiştir (Şekil 16) (Freshney ve ark., 2000). Kırmızı ile işaretli alanda bulunan hücreler mikroskop altında sayıldı. Lamda ayrı ayrı iki bölme vardır ve bu bölmelerin her birine

10 µl olacak şekilde daha önce 1 ml'de çözünen hücreler eklendi ve sayımı yapılarak aşağıda verilen formüle göre hücre sayısı hesaplandı.

1ml'deki hücre sayısı = sayılan bölgelerin ortalama sayısı × 10^4



Şekil 16. Thoma lamının sayım yapılan kareleri (Toplam görüş alanı) (Freshney ve ark., 2000)

3.3.Solüsyonların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan ticari olarak alınmış olan kimyasal maddeler firmaların önerdiği şekilde hazırlanmıştır.

3.3.1. Serotonin hazırlanması

Serotonin, Sigma-Aldrich (H9523-100MG) firmasından temin edildi. Toz halinde olan serotoninden %100 EtOH (etanol)'de vorteks yardımıyla çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Deneylerde kullanılmak üzere istenilen konsantrasyonlar için FBS (-) ile seyreltme işlemi yapıldı. Her bir kullanım için taze stok solüsyon hazırlandı.

3.3.2. Metergolin hazırlanması

Metergoline Sigma-Aldrich(M3668-500MG)firmasından temin edildi. Toz halinde gelen metergolin %100 EtOH'de vorteks yardımıyla çözülerek stok solüsyonu şeklinde hazırlandı. Deneylerde kullanılmak üzere istenilen konsantrasyonlar için FBS (-) ile

seyreltme işlemi yapıldı. Hazırlanan stoklar daha sonra kullanılmak üzere 100 µl olacak şekilde aliquatlandı ve -20˚C'de saklandı.

3.4. MTS Canlılık Analizi

Bir hücrenin çoğalması, hayati fonksiyonlarını yerine getirmesi ve hayatta kalması için gerekli enerji mitokondri tarafından sağlanır. Bu yüzden canlı hücreler ile mitokondriyal dehidrogenaz enzimi arasında doğru orantı vardır. MTS (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) boyası da bu enzim aktivitesini tespitte kullanılan tetrazolium tuzudur. Mitokondriyal dehidrogenaz enzimi MTS'in formazona indirgenmesinde rol alır ve sarı MTS solüsyonu mavi-mor renk almaya başlar. Sonuçta bu olay canlı hücrelerde gerçekleşeceği için 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldığında canlı hücre sayısı elde edilir (Cory ve ark., 1991). Canlılık testi için kullanılan MTS analizi çalışmamızda farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan serotonin ve metergolinin hücrelerin %50'sinin canlı olduğu konsantrasyon oranını (IC:50 değeri) ve zaman aralığını belirlemek için kullanıldı.

Çalışmada MTS testi için uygun hücre sayımı yapılıp 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 100 µl besiyeri içine 1500 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 1-8 µM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat serotonin ile muamele edildi. Kontrol grubu olarak herhangi bir uygulama yapılmayan (muamelesiz), sadece çözücü olarak kullanılan EtOH uygulanan hücreler kullanıldı. Hücreler 1, 5, 10-50 µM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat metergolin ile muamele edildi. kontrol grubu olarak herhangi bir uygulama yapılmayan (muamelesiz), ve sadece çözücü olarak kullanılan EtOH uygulanan hücreler kullanıldı.

Hücrelerin inkübasyon süreleri tamamlandığında her bir kuyucuğa 20 µl MTS/PMS solüsyon karışımından eklenip 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Bu işlemler üç kez tekrarlandı.

3.5. Klonojenik Testi

Klonojenik testi, kanser hürelerinin önemli özelliklerinden olan klon oluşturma yeteneklerini test etmek için kullanılan yaygın bir analiz yöntemidir.

Hücreler inkübasyonlarının 48.saatinde, 1-8 µM konsantrasyonlarda serotonin ve 1, 5, 10-50 µM konsantrasyonlarda metergolin ile muamele edildi. Kontrol grubu olarak

herhangi bir uygulama yapılmayan (muamelesiz) ve sadece çözücü olarak kullanılan EtOH uygulanan hücreler kullanıldı.

Kontrol olarak kullanılan hücrelerin çoğalması her gün mikroskop altında takip edildi ve bu hücreler bulundukları plakaların yüzeyini tamamen kapladıklarında (ekimden 12 gün sonra) tüm hücrelerin inkübasyonları sonlandırıldı. Daha sonra hücreler metanol içeren %5'lik krisatal viyole ile boyandı. Boyama sonrası hücreler distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Sonrasında oluşan koloniler fotoğraflandı ve koloniler sayıldı.

3.6. Western Blot

Western blot, hücrelerdeki hedef bir proteinin ekspresyon seviyesini tespit için kullanılan çok basamaklı bir yöntemdir. Basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

a) Deney kurulması

b) Hücrelerin toplanması, lizis ve protein konsantrasyonu

c) Örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez

d) Jelden membrana transfer ve bloklama

e) Proteinlerin görüntülenmesi

a) Deney kurulması

Deney için kullanılacak hücrelerin (MDA-MB-231) çoğalmasından sonra sayım yapılarak her bir flask içinde (25 cm^2 'lik) 350.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı (350.000 hücre/4 ml besiyeri). Ekim işleminden sonra hücreler 37°C %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. MTS analizine göre belirlenen ve aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda ve saatlerde serotonin ve metergolin ile muamele edildi (Tablo 5). Bir kısım hücrelere ise hiç bir uygulama yapılmadı bir kısım hücrelere ise sadece etanol uygulandı. Hücrelerin inkübasyon süresi dolunca kültür sonlandırıldı ve hücreler toplandı.

Tablo 5. MDA-MB-231 hücre hattı için belirlenen serotonin ve metergolin konsantrasyonları

	MDA-MB-231
	48 saat
SEROTONİN	2, 4, 8 µM

METERGOLİN	30, 35, 40 µM

b) Hücrelerin toplanması , lizis ve protein konsantrasyonu

Toplama işlemi: Her bir flasktan besiyeri uzaklaştırılıp 2 ml tripsin-EDTA eklendi, 3 dk inkübatörde bekletildikten sonra 4 ml besiyeri eklenerek 15'lik falkonlara toplama işlemi yapıldı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüjden sonra elde edilen hücreler lizis edildi.

Lizis işlemi: Bu işlemin amacı hücrelerin parçalanarak proteinlerin izole edilmesini sağlamaktır. Bunun için lizis solüsyonu hazırlandı ve toplanan hücrelerin 80-100 µl lizis solüsyonu içerisinde lizis edildi

Hücre lizis solüsyonu hazılanışı: Ticari olarak alınan 1 ml lizis solüsyonu içine 4 µl sodyum florür (NaF), 10 µl proteaz inhibitör ve 10 µl fosfataz inhibitör eklenerek hazırlandı.

Protein konsantrasyon hesaplama işlemi: Bu aşamada yeni ependorf tüpler dilüsyon için etiketlendi ve 2 µl stok protein üzerine 12 µl dH_2O eklenerek seyreltme işlemi yapıldı. Her bir örnek için seyreltme yapıldıktan sonra protein standartları ile beraber 96'lı plakalara 5'er µl olarak dağıtıldı. Proteinler üzerine ilk olarak reagent A + reagent S karışımından (980 µl reagent A + 20 µl reagent S) 20 µl, daha sonra reagent B'den de 175 µl eklenip 3 dk çalkalayıcıda bekletildi. Ardından 750 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm yapıldıktan sonra her bir örnek için 40µg protein/40µl olacak şekilde dilisyon yapıldı.

c) Örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez

Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışması sağlanması için her bir örnekten 40 µg protein jele yüklendi ve daha sonra yürütme tamponu içerisinde elektrikli ortamda 2-3 saat yürütülerek proteinlerin ayrışması sağlandı.

d) Jelden membrana transfer ve bloklama

Sandviç modeline göre proteinlerin jelden PVDF membrana transferi +4 C^o de buz transfer solüsyonu içerisinde 24 mA akımda bütün gece boyunca sağlandı

Ertesi gün transferden alınan membranlar TBS-T+süt tozu 1,5 saat bloklandı ve sonrasında TBT-T solüsyonu ile yıkama yapıldı.

e) Proteinlerin görüntülenmesi

Bloklama işleminden sonra hazır hale gelen membranlar hedefe yönelik primer antikorlarla (FOXM1: Cell Signaling, EF2K: Proteintech, p-EF2: Cell Signaling, EF2: Cell Signaling, HTR1D: Elabscience, HTR7: YLBiont, kaspaz-3: Cell Signaling) muamele edildi. Bunun için 7 ml TBS-T ve 350 mg süt tozu ile hazırlanmış primer antikorlar ile +4 derecede bir gece çalkalayıcıda bekletildi. Sonrasında membran 3 kez TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Ardından 1 saat sekonder antikorlarda oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi. Bir saat sonunda membranlar yine yıkandı ve ECL solüsyonu kullanılarak görüntüleme cihazında (BIO-RAD ChemiDoc MP Imaging System) görüntülendi.Örneklerimizin yükleme kontrolü olarak β-aktin (Proteintech) kullanıldı. Daha sonra Image J programı kullanılarak bant yoğunlukları ölçüldü.

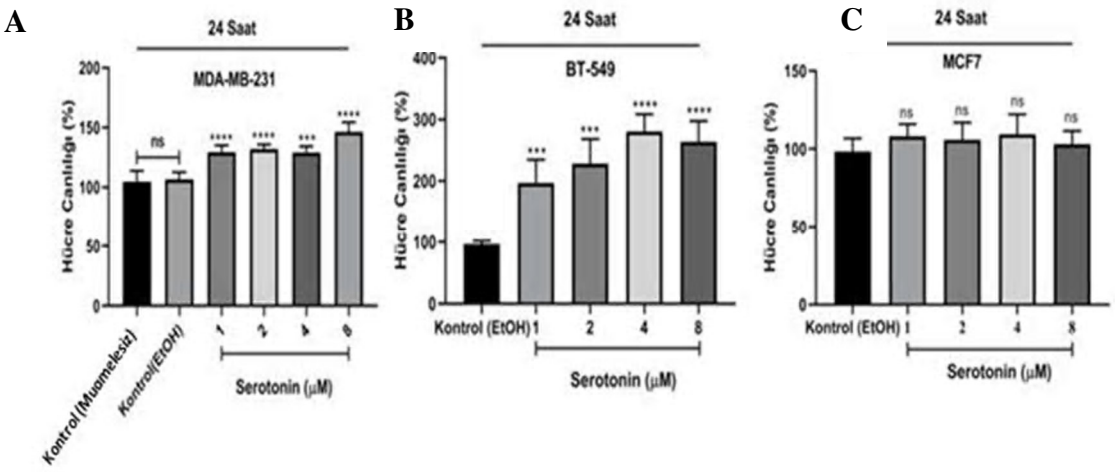
3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler Graphpad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edildi. Analizler için *Student t testi*kullanıldı. P değerinin 0.05'den daha küçük olması durumlarında, gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Her bir deney, 3 tekrar (n=3) olacak şekilde çalışıldı.

4.BULGULAR

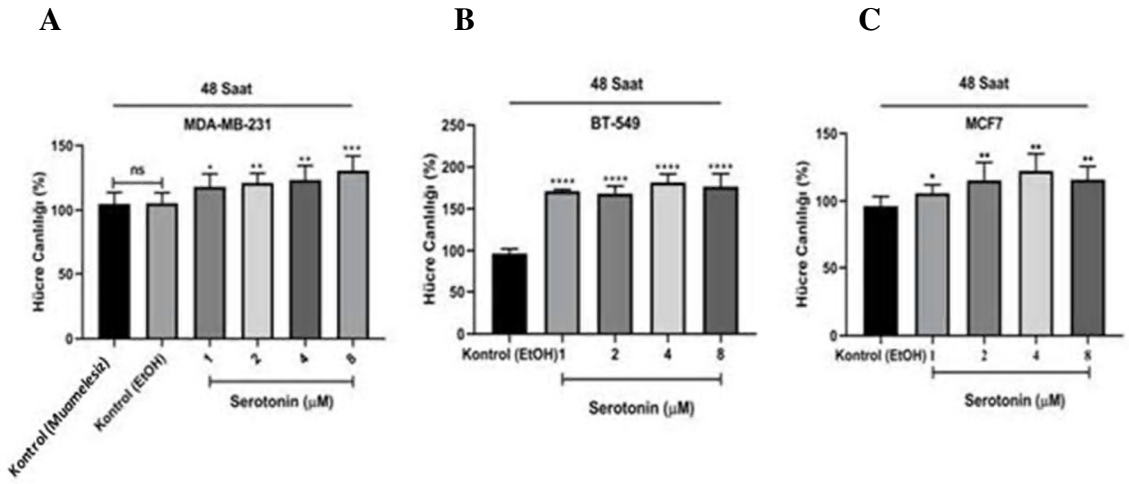
4.1. Farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda uygulanan serotoninin üç farklı meme kanser hücrelerinde proliferasyona/canlılığa etkisi

MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücreleri 24, 48 ve 72 saat 1-8 µM arasında serotonin ile muamale edildi. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (kontrol-muamelesiz) bir kısım hücreler ise 24, 48 ve 72 saat EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan serotoninin hücre canlılığına etkisini analiz etmek için MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre 24 saat 1-8 µM arasında serotonin uygulanan; MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrol hücrelerine göre önemli oranda arttığı, artan serotonin konsantrasyonuna bağlı olarak bu artışın değişmediği bulundu (Şekil 17A,B). 24 saatte EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında hücre canlılığı açısından fark bulunmadı (Şekil 17A). MCF7 hücrelerinde ise 24 saat 1-8 µM arasında serotonin uygulalanan hücrelerde hücre canlılığının kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında değişmediği bulundu. Ayrıca EtOH ile muamele edilen MCF-7 hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında hücre canlılığı açısından bir fark olmadığı bulundu (Şekil 17C).



Şekil 17. 24 saat serotoninle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **A)** 24 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir artış görüldü (***p:<0,001; ****p<0,0001). **B)** 24 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir artış görüldü (***p:<0,001; ****p<0,0001). **C)** 24 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre hücre proliferasyonunda değişiklik bulunmadı (ns: non-significant;anlamsız).

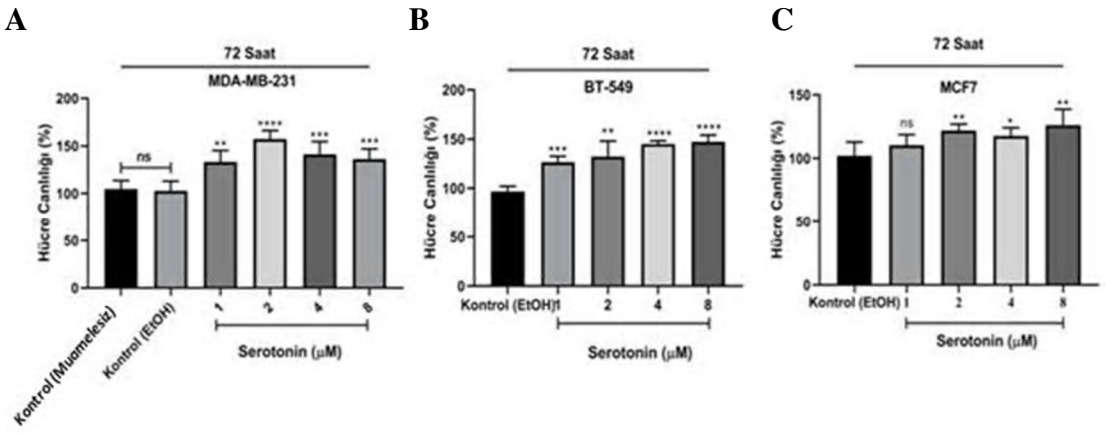
Hücreler 48 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edildiğinde üç hücre hattında da kontrol grubu hücrelerine kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir artış olduğu bulundu. 48 saat EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında hücre canlılığı açısından bir fark bulunmadı (Şekil 18).



Şekil 18. 48 saat serotoninle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **A)** 48 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir artış görüldü (*p<0.05;**p<0.01, ***p<0,001). **B)** 48 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir artış görüldü (***p<0,001). **C)** 48 saat 1-8 µM

serotonin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre hücre canlılığında önemli bir artış bulundu (*p<0.05;**p<0.01).

MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücrelerine 72 saat 1-8 µM serotonin uygulandığında ise üç hücre hattında da kontrol hücrelerine göre hücre canlılığında önemli bir artış olduğu bulundu. 72 saat EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında da hücre canlılığı açısından bir fark bulunmadı (Şekil 19).

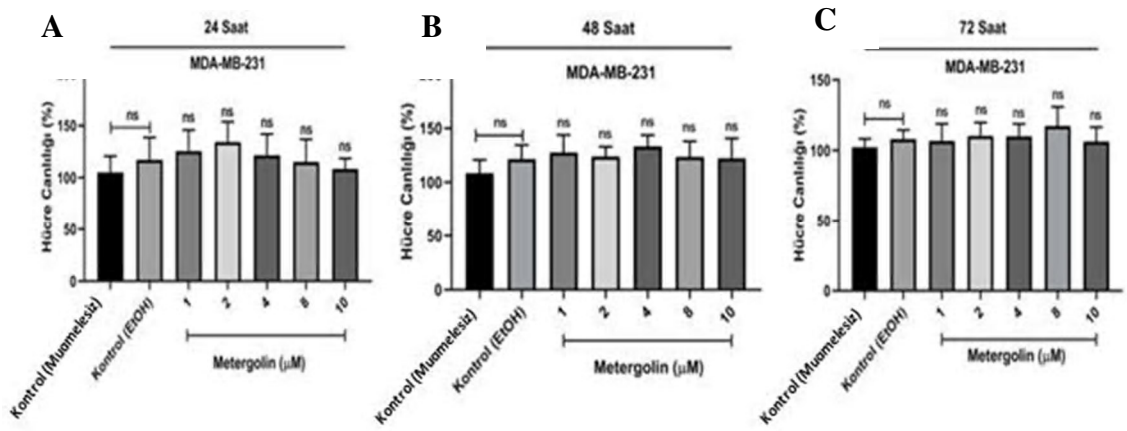


Şekil 19. 72 saat serotoninle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **A)** 72 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir artış görüldü (**p<0.01;***p<0.001; ****p<0,0001). **B)** 72 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir artış görüldü (**p<0.01;***p<0.001; ****p<0,0001). **C)** 72 saat 1-8 µM serotonin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre hücre canlılığında önemil bir artış görüldü (ns: non-significant;anlamsız; *p<0,05; **p<0.01).

4.2. Farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda uygulanan metergolinin üç farklı meme kanser hücrelerinde proliferasyona/canlılığa etkisi

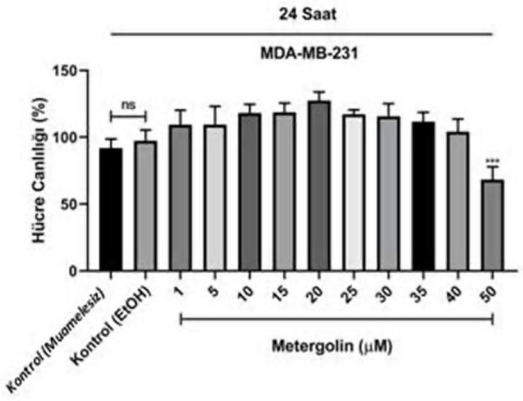
İlk olarak MDA-MB-231 hücrelerine serotonin konsantrasyonları ile aynı oranda 24, 48, ve 72 saat olmak üzere 1-10 µM metergolin uygulandı. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz) bir kısım hücreler ise 24, 48 ve 72 saat EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan metergolin hücre canlılığına etkisini analiz etmek için MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre metergolinin 24, 48 ve 72 saatlerde 1-10 µM konsantrasyonlarında meme kanser hücrelerinde hücre

canlılığına etkisinin olmadığı bulundu (Şekil 20). 24, 48 ve 72 saat EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında da hücre canlılığı açısından bir fark bulunmadı.



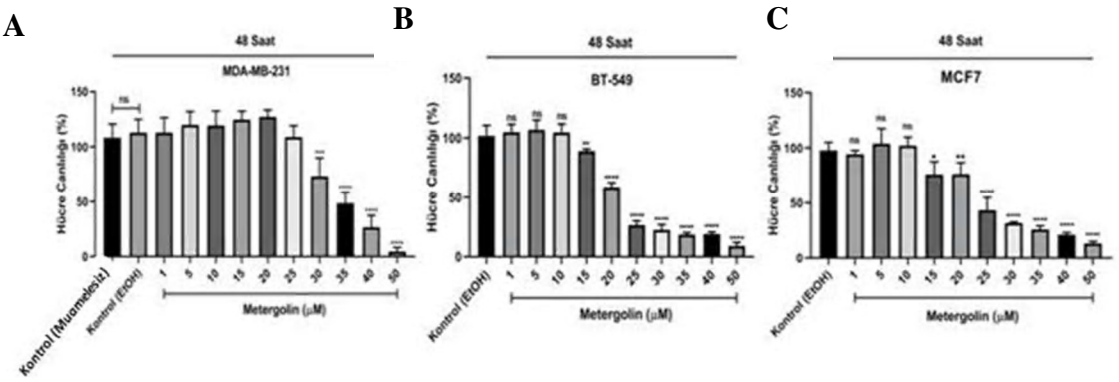
Şekil 20. 24, 48 ve 72 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon oranı. **A)** 24 saat 1-10 μM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir değişiklik görülmedi (ns: non-significant; anlamsız). **B)** 48 saat 1-10 μM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (ns: non-significant; anlamsız). **C)** 72 saat 1-10 μM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre hücre canlılığında değişiklik gözlenmedi (ns: non-significant; anlamsız).

Elde edilen bu bulgulara göre metergolin konsantrasyonunda artış yapıldı. Yine ilk olarak MDA-MB-231 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlerde 1-50 μM olacak şekilde metergolin uygulaması yapıldı. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz) bir kısım hücreler ise 24, 48 ve 72 saat EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan metergolin hücre canlılığına etkisini test etmek için MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre 24 saat 1-50 μM metergolinle muamele edilen hücrelerde sadece 50 μM olan en yüksek konsantrasyonda bir anlamlılık olduğu bulundu (Şekil 21). 48 ve 72 saatlerde ise artan konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrol hücrelerine göre önemli oranlarda azaldığı bulundu (Şekil 22A, Şekil 23A). 24, 48 ve 72 saat EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında da hücre canlılığı açısından fark bulunmadı.

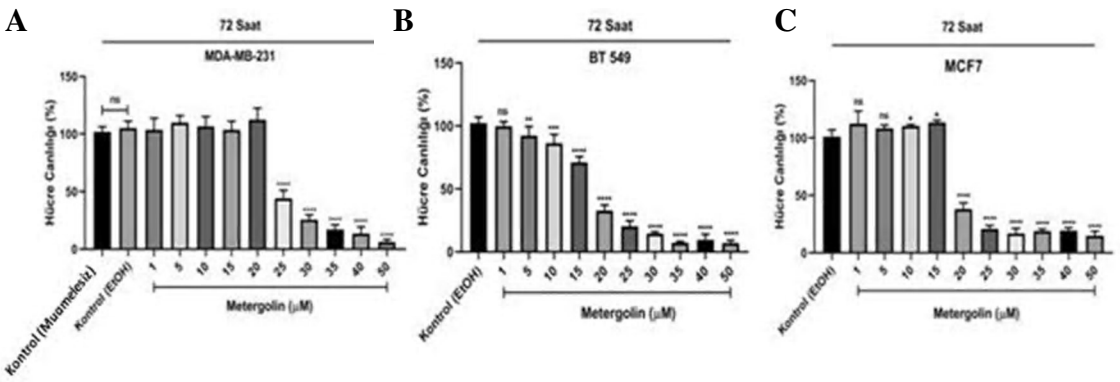


Şekil 21. 24 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon oranı. 24 saat 1-50 μM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre sadece 50 μM konsantrasyonda anlamlı azalış olduğu gözlendi (***p<0,001).

MDA-MD-231 hücrelerinin sonuçlarına göre BT-549 ve MCF7 hücrelerine 48 ve 72 saatlerde 1-50 μM konsantrasyonlarında metergolin uygulaması yapıldı. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz) bir kısım hücreler ise 48 ve 72 saat EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı zaman aralıklarında farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan metergolinin hücre canlılığına etkisini analiz etmek için MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre 48 ve 72 saatlerde 1-50 μM konsantrasyonlarında metergolin uygulaması yapılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı bulundu (Şekil 22B-C, Şekil 23B-C).



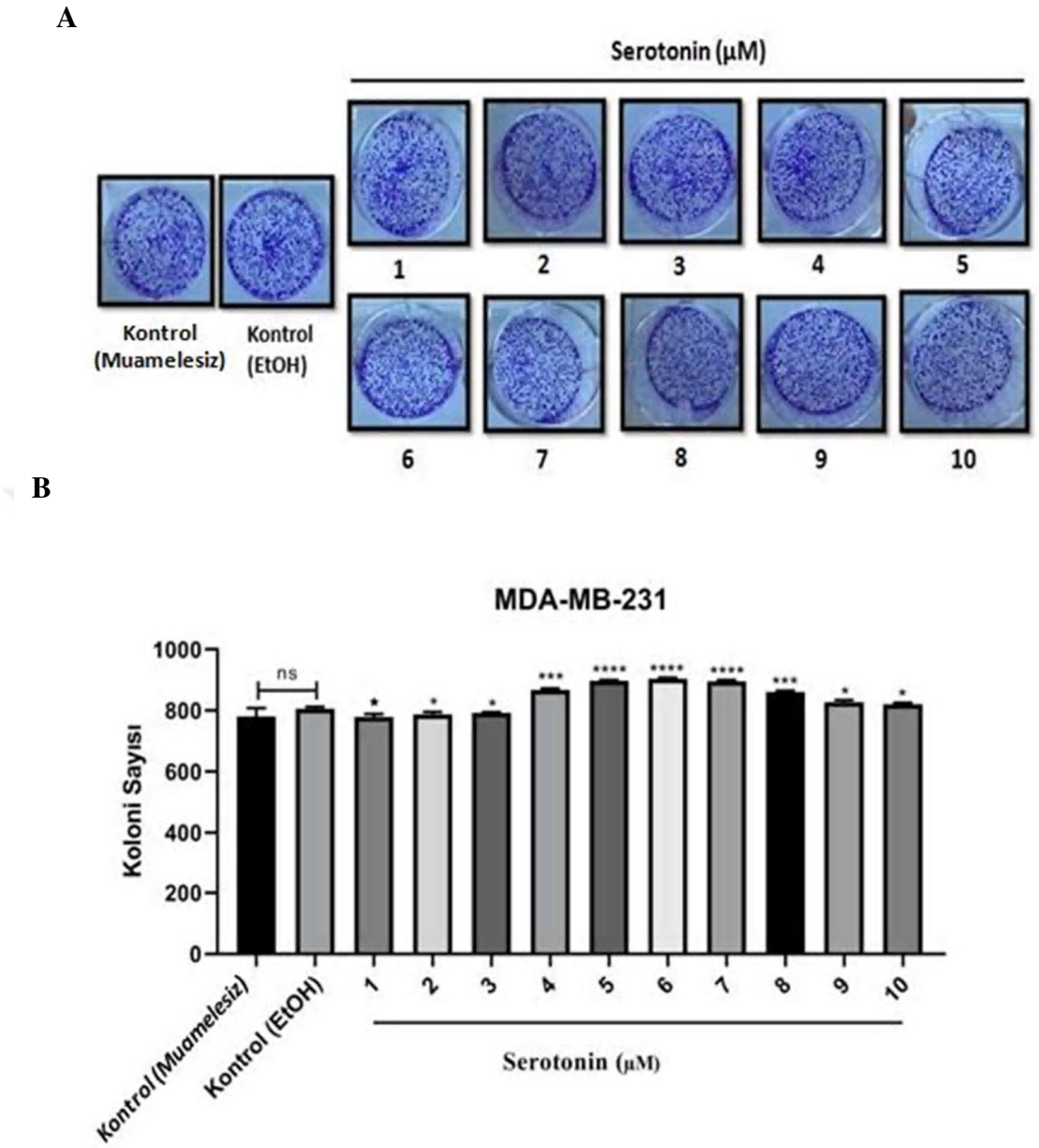
Şekil 22. 48 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **A)** 48 saat 1-10 μM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre 30, 35, 40 ve 50 μM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (***p<0,001; ****p<0,0001). **B)** 48 saat 1-10 μM metergolin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre 15-50 μM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns:non-significant;anlamsız; **p<0.01; ****p<0,0001). **C)** 48 saat metergolin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre hücre canlılığında 15-50 μM konsantrasyonlarında önemli bir azalma görüldü (ns:non-significant;anlamsız; *p<0.05;**p<0.01; ****p<0.0001).



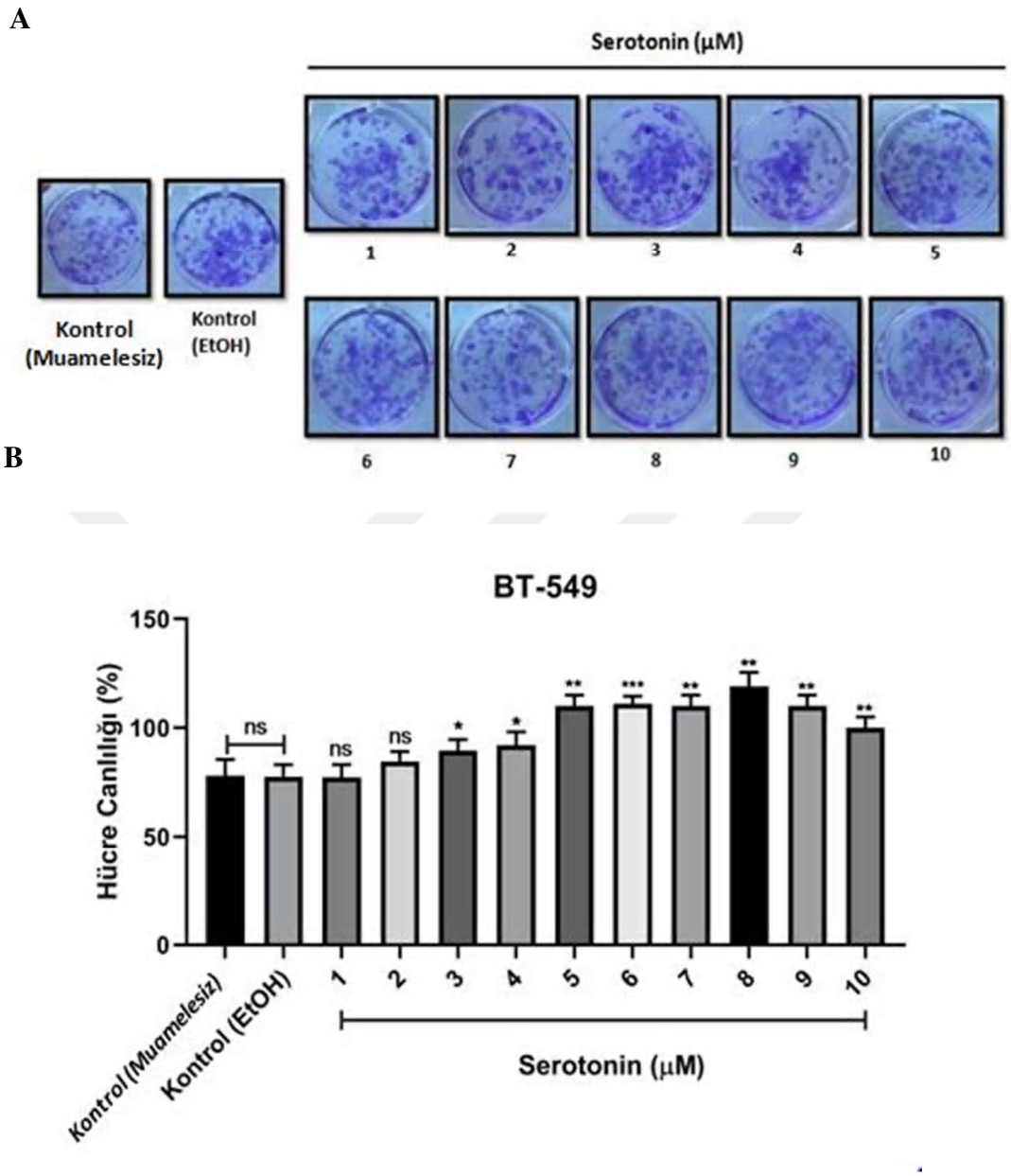
Şekil 23. 72 saat metergolinle muamele edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF7 hücrelerinde proliferasyon oranı. **A)** 72 saat 1-10 μM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre 25-50 μM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns:non-significant; ****p<0.0001). **B)** 72 saat 1-10 μM metergolin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre 5-50 μM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns:non-significant; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001). **C)** 72 saat 1-10 μM metergolin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre hücre canlılığında 10-50 μM konsantrasyonlarında önemli bir azalma görüldü (ns:non-significant;*p<0.05; ****p<0.0001).

4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan serotoninin üç farklı meme kanser hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi

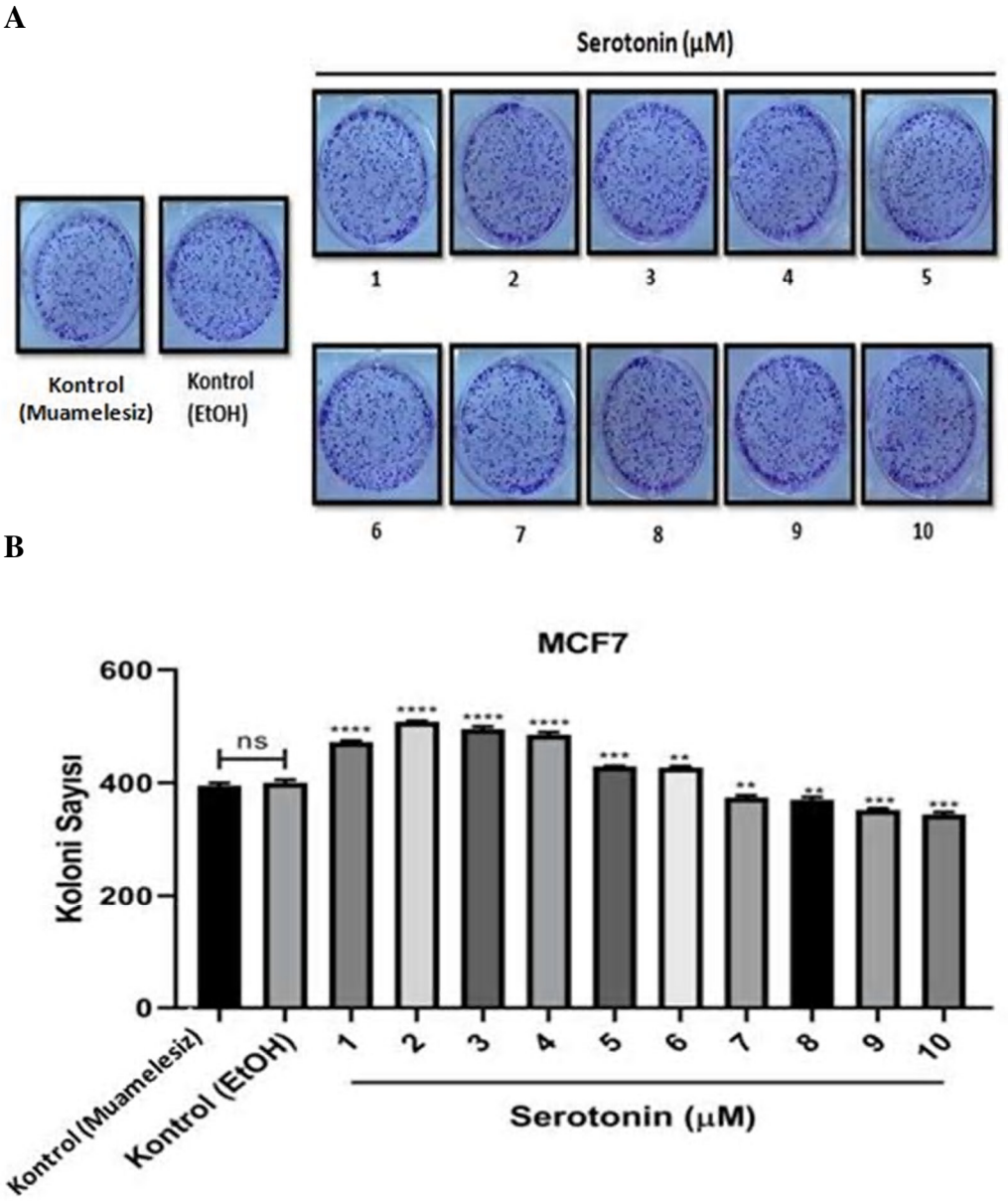
6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücreleri inkübasyonlarının 48. saatinde 1-10 μM arasında serotonin ile muamale edildi. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz) bir kısım hücreler ise inkübasyonlarının 48. saatinde EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan serotoninin hücrelerin koloni oluşturma üzerine etkisini analiz etmek için kristal viyole ile boyanarak klonojenik test yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre serotonin ile muamele edilen hücrelerde koloni sayısında önemli bir artış olduğu bulundu (Şekil 24, 25, 26). EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında da hücre koloni sayısı açısından fark bulunmadı (Şekil 24, 25, 26).



Şekil 24. Serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **A)** 1-10 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **B)** 1-10 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre serotonin uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının artmış olduğu görüldü (ns:non-significant; *p<0.05; ***p<0.001; ****p<0.0001).



Şekil 25. Serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **A)** 1-10 µM serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **B)** 1-10 µM serotonin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre serotonin uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının artmış olduğu bulundu (ns:non-significant; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

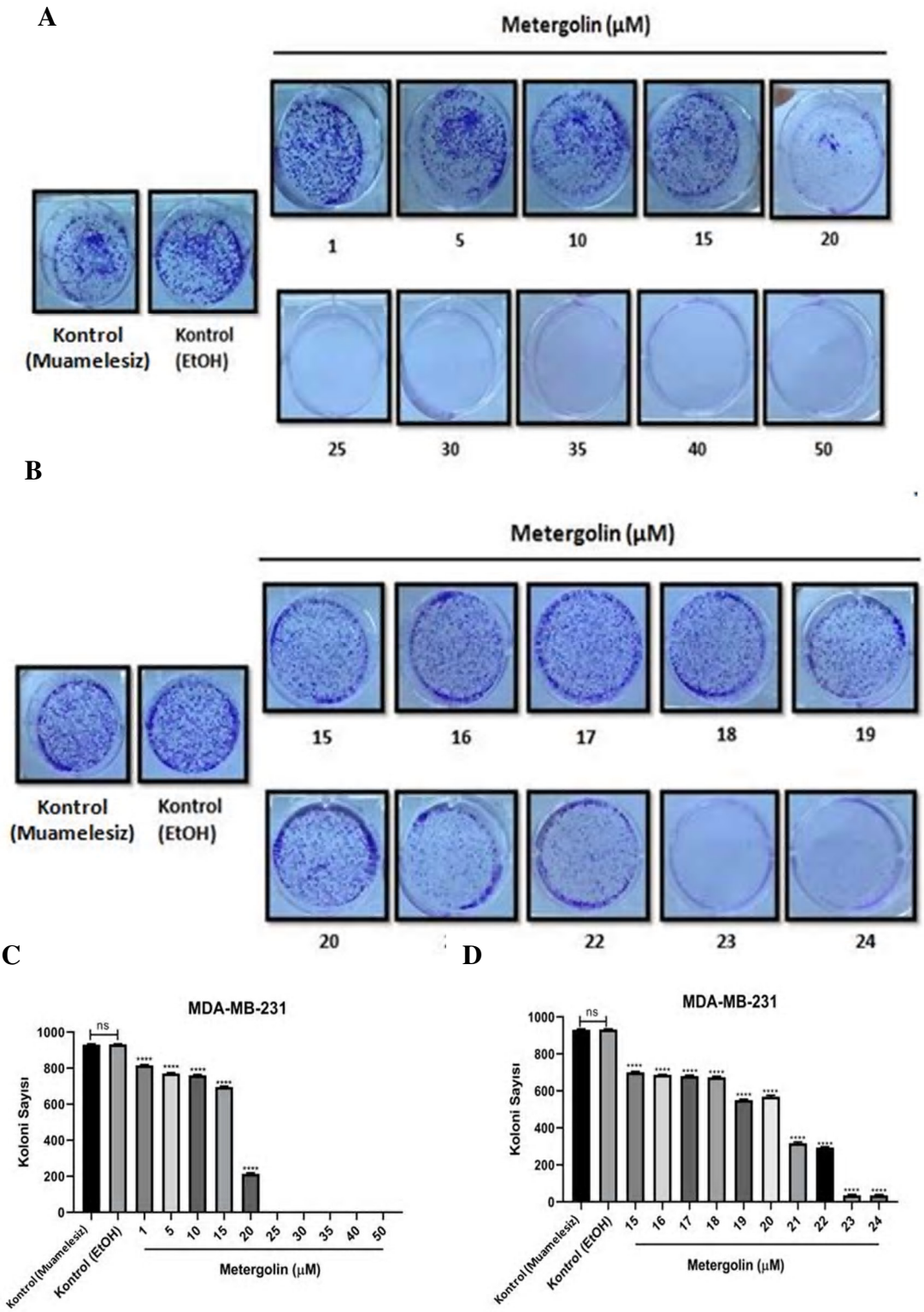


Şekil 26. Serotonin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **A)** 1-10 µM serotonin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **B)** 1-10 µM serotonin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre serotonin uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının artmış olduğu görüldü (ns:non-significant; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan metergolinin üç farklı meme kanser hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisi

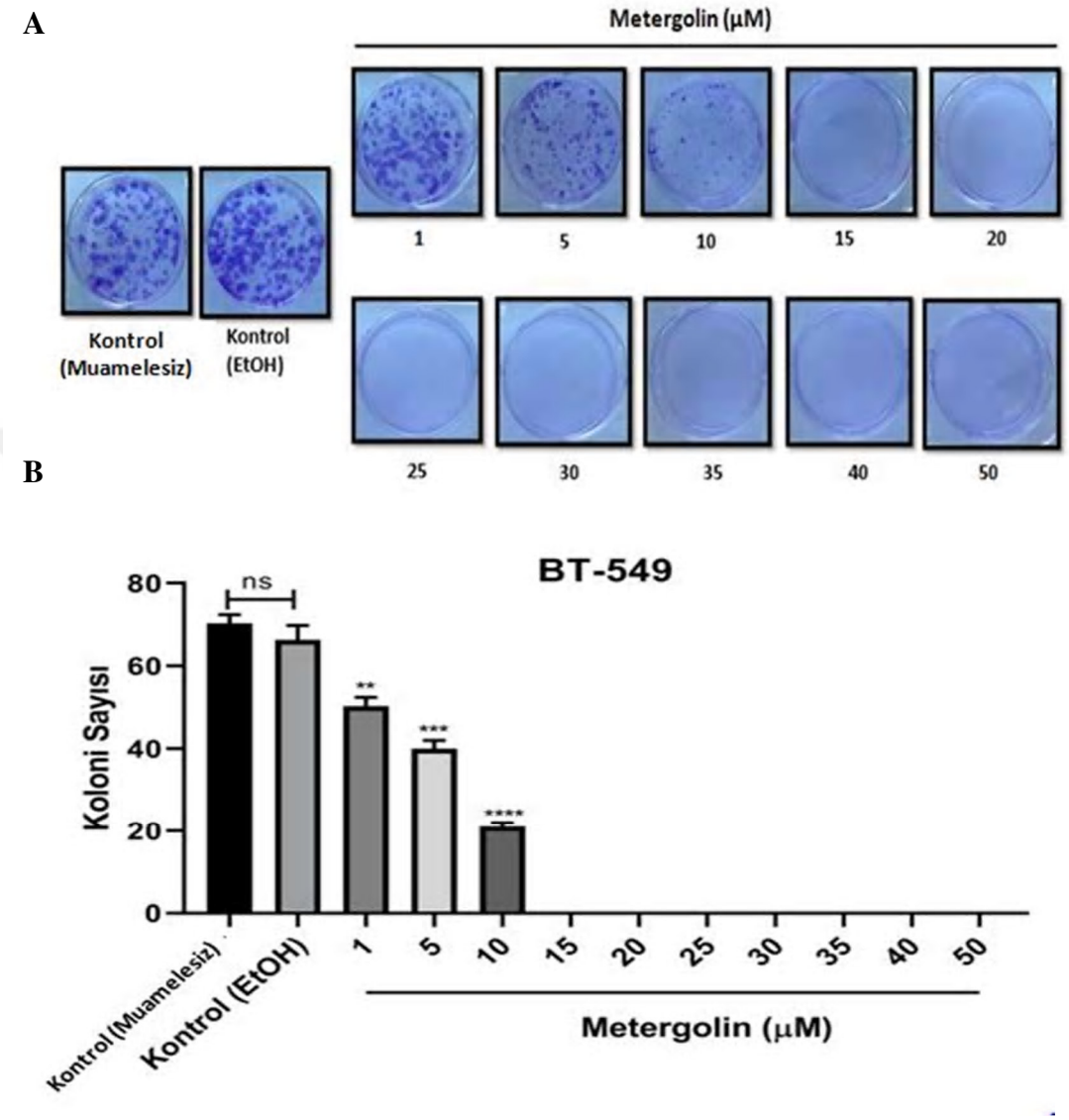
6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen MDA-MB-231, BT-549 ve MCF-7 hücreleri, inkübasyonlarının 48.saatinde 1-50 µM arasında metergolin ile muamale edildi. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz) bir kısım hücreler

inkübasyonlarının 48. saat EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan metergolinin hücrelerin koloni oluşturma üzerine etkisini analiz etmek için kristal viyole ile boyanarak klonojenik test yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre metergolin ile muamele edilen hücrelerde klon sayısında önemli bir azalma olduğu bulundu (Şekil 27, 28, 29). EtOH ile muamele edilen hücrelerle hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler arasında da hücre klon sayısı açısından fark bulunmadı (Şekil 27, 28, 29).

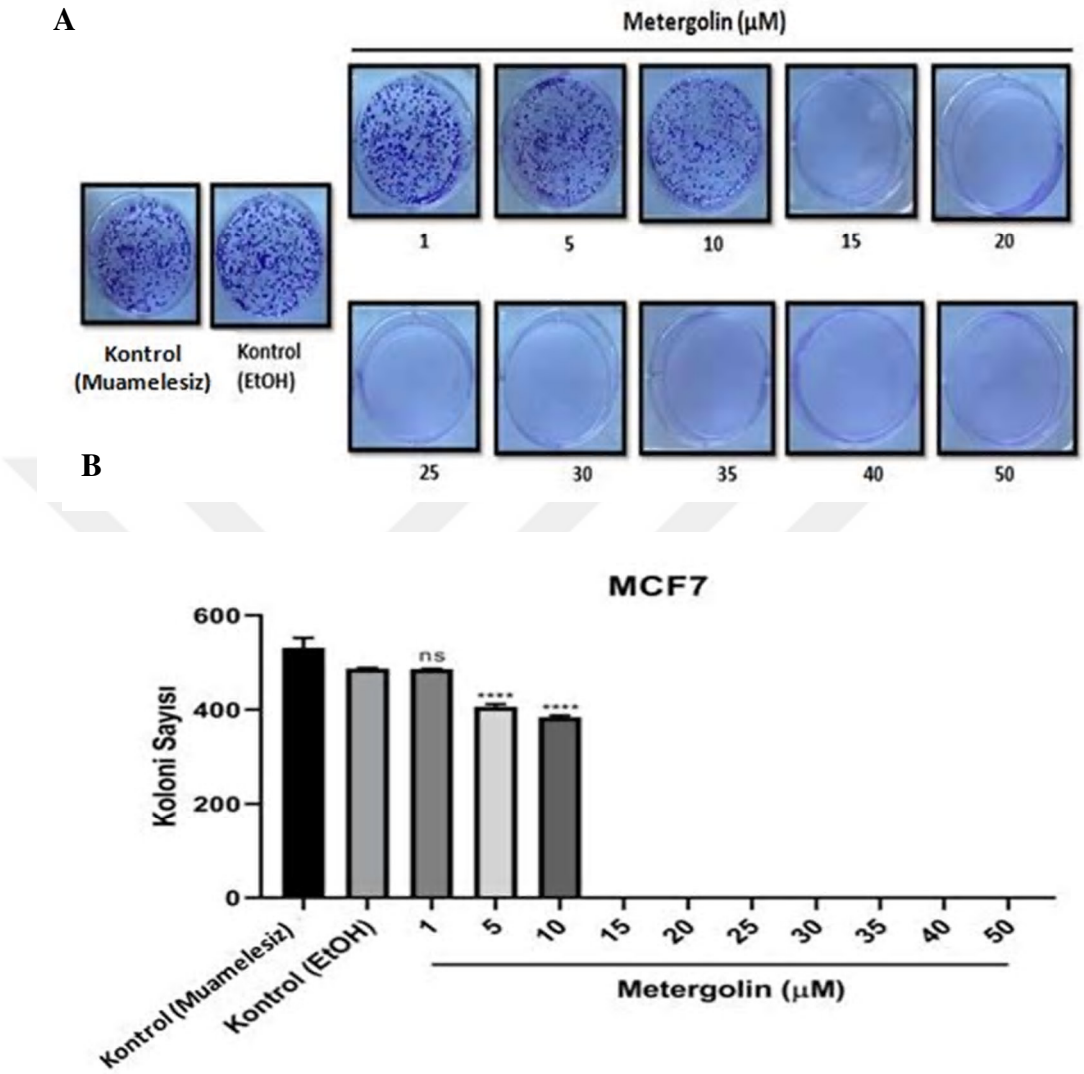


Şekil 27. Metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **A)** 1-50 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **B)** 15-24 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **C)** 1-50 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre metergolin uygulanan hücrelerde önemli oranda koloni sayısının azaldığı görüldü (ns:non-significant: anlamsız; 1-50 µM ***p: <0.0001). **D)** 15-25 µM konsantrasyonlar arasında koloni sayısı azalışının gösterilmesi için yapılan testte 15-24 µM arası konsantrasyonlar ile metergolin uygulaması yapılan MDA-

MB-231 hücrelerinde koloni oluşumunun azaldığı görüldü (ns:non-significant: anlamsız; 15-24 µM ****p: <0.0001).



Şekil 28. Metergolin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **A)** 1-50 µM metergolin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **B)** 1-50 µM metergolin ile muamele edilen BT-549 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre metergolin uygulanan hücrelerde önemli oranda koloni sayısının azaldığı görüldü (ns:non-significant; **p<0.01; ***p<0.001).

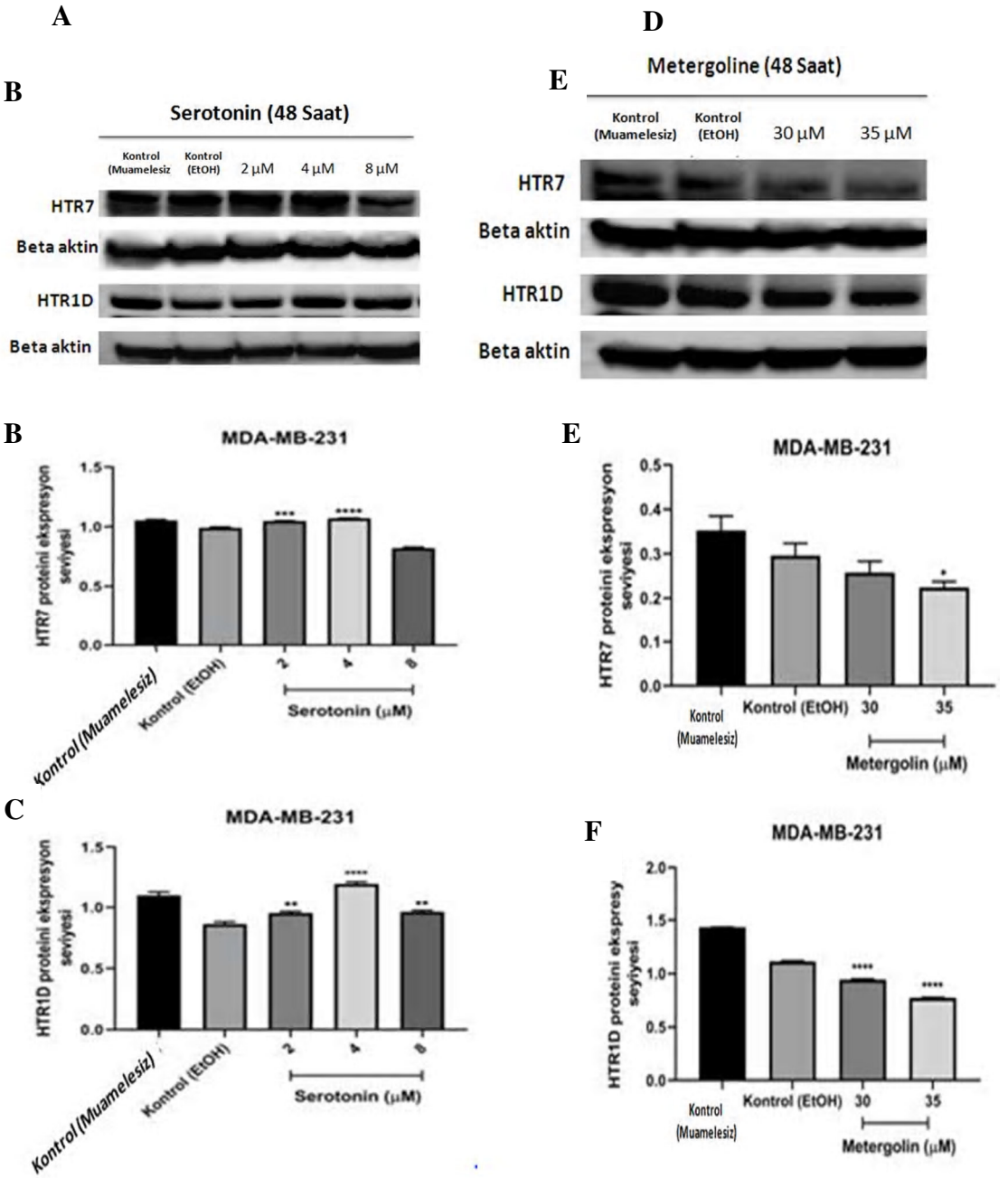


Şekil 29. Metergolin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde koloni oluşum oranı. **A)** 1-50 µM metergolin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. **B)** 1-50 µM metergolin ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre metergolin uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının azaldığı görüldü (ns:non-significant; anlamsız; 5-50 µM ****p:<0,0001).

4.5. Serotonin ve metergolin uygulamasının MDA-MB-231 üçlü reseptör negatif meme kanser hücrelerinde serotonin reseptör ekspresyonu üzerine etkisi

MDA-MB-231 hücrelerinin bir kısmı MTS analiz sonuçlarına göre metergolin ve serotonin ile 48 saat muamele edildi. Hücrelerin bir kısmına hiçbir uygulama yapılmadı (muamelesiz). Bir kısım hücreler ise 48 saat EtOH ile muamele edildi. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca protein izolasyonu yapıldı ve western blot ile HTR7 ve

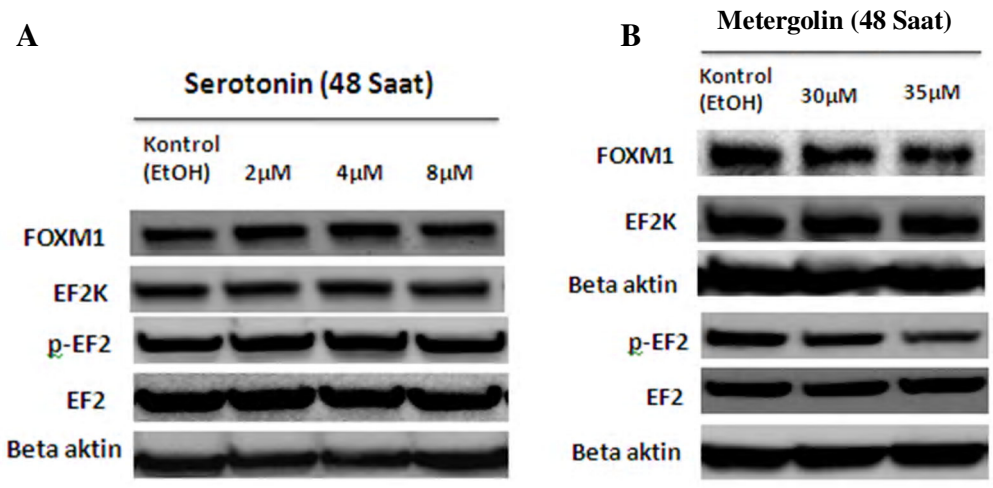
HTR1D proteinlerinin ekspresyonları analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre metergolin ile muamele edilen hücrelerde serotonin reseptörlerinden HTR7 ve HTR1D protein ekspresyonlarında kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre önemli bir oranda azaldığı bulundu (Şekil 30.D,E,F). Serotonin ile muamele edilen hücrelerde ise HTR7 ve HTR1D reseptör ekspresyonlarında kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre önemli bir oranda arttığı olduğu bulundu (Şekil 30A,B,C).

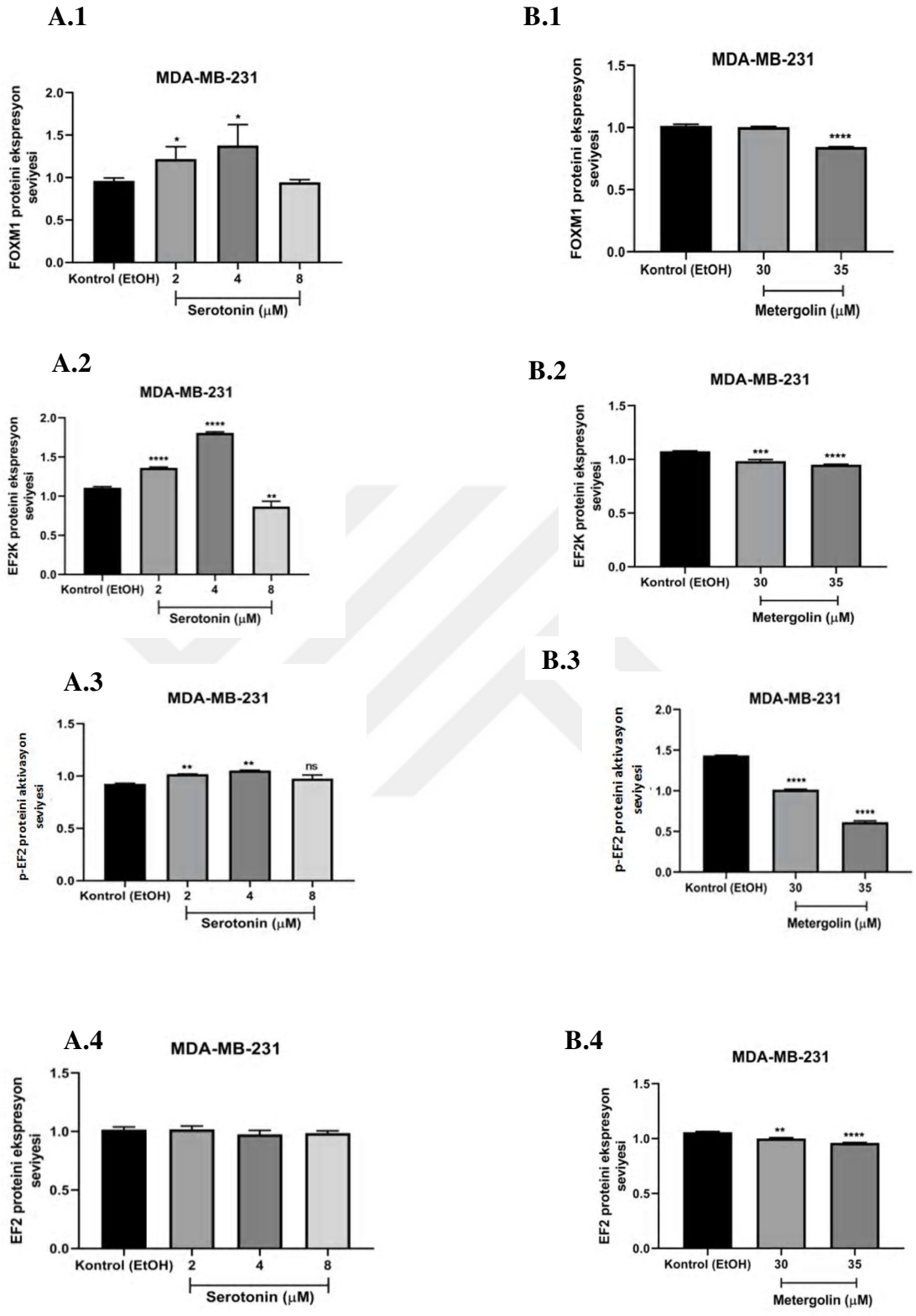


Şekil 30. MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin reseptörleri HTR1D ve HTR7 ekspresyon seviyeleri. **A)** Serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde HTR1D ve HTR7 serotonin reseptörleri ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **B)** 2, 4 ve 8µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre HTR7 reseptör ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bulundu (***p<0.001; ****p<0.0001). **C)** 2, 4 ve 8µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre HTR1D reseptör ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bulundu (**p<0.01; ****p<0.0001). **D)** Metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde HTR1D ve HTR7 serotonin reseptörleri ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **E)** 30µM ve 35 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre HTR7 reseptör ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (*p<0.05). **F)** 30µM ve 35 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre HTR1D reseptör ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (****p<0.0001).

4.6. Serotonin ve metergolin uygulamasının MDA-MB-231 üçlü reseptör negatif meme kanser hücrelerinde FOXM1 sinyal yolağı üzerine etkisi

FOXM1 proteininin üçlü reseptör negatif meme kanserlerinde oldukça yüksek ifade edildiği bilinmektedir (Craig ve ark., 2013). Daha önce yaptığımız çalışmada da agresif meme kanser hücreleri olan MDA-MB-231 ve BT-20 hücrelerinde FOXM1'in ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu ve hücrelerin proliferasyonu ve sağkalımında etkili olduğu bulundu (Hamurcu ve ark., 2016). Sunulan tez çalışmasında seratonin ve metargolinin hücre proliferasyonunda etkili olduğu bulunduğu için. Serotonin ve metergolinin hücre çoğalmasında önemli rol alan FOXM1 ve FOXM1 sinyal yolağı üzerinde etkisi olabileceği hipotezlendi. Bu hipotezimizi test etmek için, metergolin ve serotonin uygulanan MDA-MB-231 üçlü reseptör meme kanser hücrelerinde FOXM1 ve FOXM1'in alt hedefi olan EF2K, p-EF2 ve EF2 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot yöntemi ile analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre serotonin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol olarak EtOH ile muamele edilen hücrelere kıyasla FOXM1, EF2K, p-EF2 proteinlerinde anlamlı bir artış olduğu bulundu (Şekil 31A, A1, A2, A3, A4). Metergolin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ise, kontrol olarak EtOH ile muamele edilen hücrelere kıyasla FOXM1, EF2K, p-EF2 ve EF2 proteinlerinde anlamlı bir azalma bulundu (Şekil B, B1, B2, B3, B4).



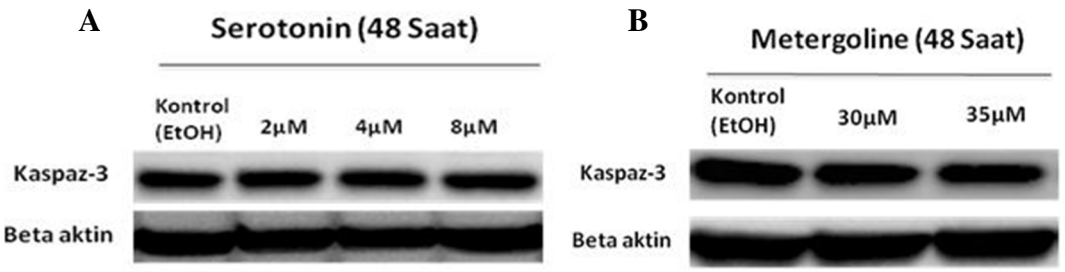


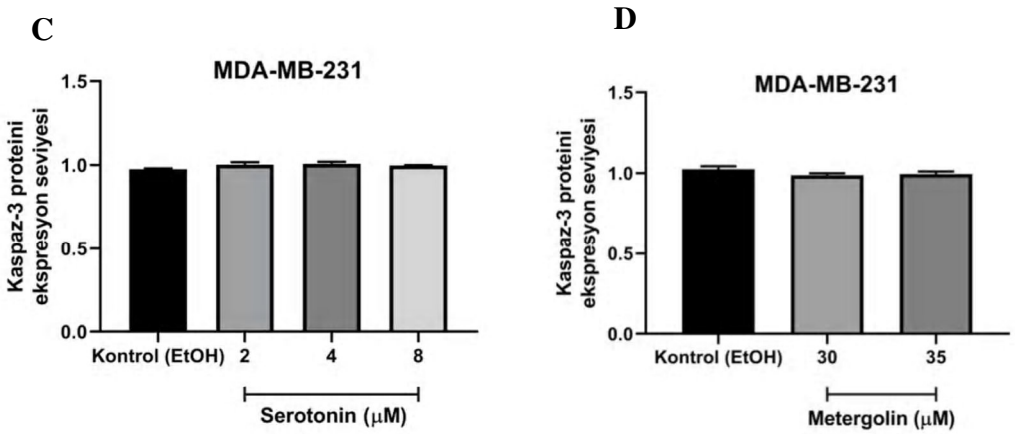
Şekil 31: Serotoninve metergolin ile muamele MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1 sinyal yolağı moleküllerinin ekspresyon seviyeleri. **A)** Serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1 sinyal yolağı elemanları ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **A.1)** 2, 4 ve 8 μM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre FOXM1 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bulundu (*p<0.05). **A.2)** 2, 4 ve 8 μM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak

kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre EF2K ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bulundu (**p<0.01; ****p<0.0001). **A.3)** 2, 4 ve 8 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre p-EF2 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu bulundu (ns:non-significant; **p<0.01). **A.4)** 2, 4 ve 8 µM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre EF2 ekspresyon seviyesinde fark bulunmadı (ns:non-significant; anlamsız). **B)** Metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1 sinyal yolağı elemanları ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **B.1)** 30µM ve 35 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre FOXM1 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (****p<0.0001). **B.2)** 30µM ve 35 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre EF2K ekspresyon seviyesinde anlamlı azalma olduğu bulundu (***p<0.001; ****p<0.0001). **B.3)** 30µM ve 35 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre p-EF2 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (****p<0.0001). **B.4)** 30µM ve 35 µM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre EF2 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (**p<0.01; ****p<0.0001).

4.7. Serotonin ve metergolin uygulamasının MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi

Apoptoz, hücre içinden ya da dışından gelen uyaranlar aracılığı gerçekleşen programlı hücre ölüm şeklidir. Bu uyaranlar arasında büyüme faktörlerinin azalması, sitokinler, p53'ün aktivasyonu, DNA hasarı, Fas/FasL sisteminin aktivasyonu gibi pek çok olay sayılabilir. Apoptoz sürecinin gerekleşmesinde belli başlı bileşenler sorumludur. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinler, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktivasyon faktör-1 (Apaf-1)'dir. Kaspazlar ölüm reseptörleri ile gelen sinyaller doğrultusunda hücre içinde bir seri olayları başlatırlar ve sitokin üreten (kaspaz 1, 4, 5 ,13), protolizis başlatıcı (kaspaz 2, 8, 10) ve uygulayıcı (kaspaz 3, 6, 7) olmak üzere sınıfladırılırlar (Budihardjo ve Oliver, 1999). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda da metergolin ve serotoninin meme kanser hücrelerinde apoptoz üzerine etkisini araştırmak için apotozun son basamağında görevli kaspaz-3 ekspresyon seviyesi western blot analizi ile test edildi EtOH, metergolin ve serotonin ile muamele edilen hücreler arasında total kaspaz-3 ekspresyon seviyesi açısından fark olmadığı bulundu (Şekil 32.A-D).





Şekil 32. Serotonin ve metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu. **A)** Serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-3 proteininin ekspresyon seviyesi. **B)** Metergoline ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-3 proteininin ekspresyon seviyesi. **C)** 2, 4 ve 8 μM serotonin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre kaspaz-3 proteini ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). **D)** 30μM ve 35 μM metergolin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol olarak kullanılan EtOH ile muamele edilen hücrelere göre kaspaz-3 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kadınlarda meme kanseri en sık rastlanılan kanser olup, kanserden ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır (DeSantis ve ark.,2013). Kanser tedavisi için cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve kombinasyonları uygulanabilir. Meme kanserine bakıldığında özellikle kemoterapi tedavi şekli için meme kanserinin tanımlanan alt tipleri önemlidir. Bunlar östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktör reseptörünün varlığı veya yokluğu durumlarına göre ayrılır. TNBC olarak adlandırılan üç reseptörün de eksprese olmadığı meme kanser tipi kemoterapötiklere en çok direnç gösteren ve nüks etme özelliği daha yüksek olan meme kanseri alt tipidir (Brenton ve ark., 2005; Gautam ve ark., 2016). Son on yılda meme kanserlerinin tedavisi için yeni stratejik tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen, hala istenilen yol katedilememiştir. Bu nedenle, meme kanserlerinin özellikle de agresif ve en kötü prognoza sahip olan üçlü reseptör meme kanserlerinin tedavisine yönelik yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Nörotransmitter olan serotoninin (5-HT) normal hücrelerde (vasküler düz kas hücreleri, akciğer fibroblastları ve renal mezenjiyal hücreler) ve tümör hücrelerinde (pankreas karsinoid hücreleri, küçük hücreli akciğer karsinom hücreleri ve kolorektal karsinom) bir büyüme faktörü olarak görev yaptığı bilinmektedir. Hatta son zamanlarda, 5-HT, çeşitli kanser tiplerinde hücre proliferasyonunun ve tümör büyümesinin önemli bir düzenleyicisi olarak gösterilmiştir (Alpini ve ark., 2008; Cattaneo ve ark., 1995; Dizeyi ve ark., 2004; Siddiqui ve ark., 2006a; Oufkir ve ark., 2010). Birçok çalışma serotoninin, hepatosellüler karsinom, melanomun yanı sıra pankreas, prostat, mesane kanserlerinde tümör büyümesi ve metastaza teşvik ettiğini rapor etmektedir. Benzer şekilde 5-HT'nin meme kanser hücrelerindede tümör büyümesi ve metastazda rol aldığı bildirilmiştir. Ancak kanser hücrelerinde serotonin hücre proliferasyonunu stimüle etmesine rağmen, bunu hangi mekanizma ile yaptığı ya da serotoninin sorumlu olduğu mekanizmalar hala belirsizdir. Bu yüzden sunulan çalışmada, mitojenik

nörotransmitter olan serotonin, üçlü reseptör (-) ve ER (+) meme kanser hücrelerinin proliferasyonuna/büyümesine ve hücre proliferasyonunda kilit rol oynayan onkogenik taranskripsiyon faktör FOXM1 sinyal yolağı ve apoptoz sinyal yolağı üzerine etkisi araştırıldı.

İnsanlarda, çeşitli normal ve tümör hücrelerinde dokuya özel ifade edilen yapısal, fonksiyonel ve farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılmış yedi 5-HT reseptör ailesi tanımlanmıştır (5-HT1-7). Bu reseptörlerden altısı G-proteinine bağlı reseptörlerdir. Serotoninin kanser hücrelerindeki etkisinin, kanser hücrelerinde artan serotonin reseptör (5-HTR) sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Sunulan tez çalışmasında üçlü reseptör (-) ve ER (+) meme kanser hücrelerin de 5-HT reseptör ailesinden 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörleri çalışılmıştır.5-HT1D reseptörünün etkisi, hepatasellüler karsinoma, pankreas, kolorektal ve akciğer kanser hücrelerinde araştırılmış olmasına rağmen, meme kanser hücrelerinde yüksek oranda ifade edilen 5-HT1D reseptörünün meme kanser hücrelerine olası etkisi daha önce araştırılmadığı için çalışmamızda bu reseptör seçilmiştir. 5-HT7 reseptörünün meme kanser hücrelerinde ve normal epitelyal meme hücrelerin de ifade edildiği özellikle de üçlü reseptör (-) meme kanser hücrelerinde (ER+) meme kanser hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, normal meme hücrelerinde de 5-HT7 reseptörü ifade olmasına rağmen serotonin bu hücrelerde proliferasyonu stimüle etmediği, serotoninin bu etkisi meme kanser hücrelerinde görüldüğü için çalışmamızda 5-HT7 reseptörü seçilmiştir.

Sunulan çalışmada öncelikle, agresif meme kanser hücreleri olarak iki farklı üçlü reseptör (-) meme kanser hücreleri (MDA-MB-231 ve BT-549) ve ER (+) meme kanser hücreleri (MCF-7) artan konsantrasyonlarda ve farklı zaman aralıklarında serotonin ile muamale edildi. 24 saat serotonin uygulanan agresif meme kanser hücrelerinde artan konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonun arttığı, non-invazif MCF-7 hücrelerinde ise 24 saat proliferasyon uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisinin olmadığı bulundu. 48 ve 72 saat serotonin uygulanan 3 farklı meme kanser hücrelerinde serotoninin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunu artırdığı bulundu. Bu sonuçlarımıza göre, serotonin nispeten daha iyi prognoza sahip olan ER (+) meme kanser hücrelerine göre, agresif meme kanser hücrelerinde, mitojenik etkisinin daha yüksek olduğunu ve hücreleri bölünmesi için daha kısa sürede ve daha hızlı stimüle ettiğini ortaya koymaktadır. Agresif meme kanser hücrelerinde hem akut

hem de kronik etki göstererek hücre proliferasyonunu daha hızlı stimüle etmesinin 5-HT1D ve 5-HT7 reseptör ekspresyonlarının diğer meme kanser hücrelerine göre agresif meme kanserlerinde daha yüksek olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülebilir. Serotonin reseptörlerinin meme kanserlerinde rolü ile ilgili olarak, serotoninin meme bezi gelişiminde rol oynadığı ve hamilelik, emzirme gibi durumlarda meme epitel hücrelerinin homeostazının sağlanmasında görevli olduğu için çalışmalarda genelde östrojen reseptör pozitif MCF-7 (non-invazif) hücreleri kullanılmış olup agresif meme kanser hücrelerinde yapılan sınırlı sayıda çalışma vardır. Serotoninin meme kanser hücrelerinin çoğalmasına etkisini araştıran bazı çalışmalarda, serotoninin üçlü reseptör meme kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu uyardığı ancak MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonuna etkisinin olmadığı gösterilmiştir. (Gautam ve ark., 2016). Benzer şekilde başka bir çalışmada da MCF-7 hücrelerinde hücre büyümesini etkilemediği bildirilmiştir (Blask ve Hill, 1986). Bununla birlikte bazı çalışmalarda MCF-7 hücrelerinde, serotoninin hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Sarrouilhe ve ark., 2015; Sonier ve ark., 2006). MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, serotonin hücre proliferasyonunun yanısıra invazyonunu da artırdığı gösterilmiştir (Gautam ve ark., 2016). Non-invazif MCF-7 hücrelerinde serotoninin mitojenik etkisi ile ilgili kompleks sonuçlar bulunmasına rağmen, hem literatürde yapılan çalışma sonuçları hem de sunulan projenin sonuçları, serotoninin agresif meme kanser hücrelerinde mitojenik etkisinin olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Sunulan çalışmada da, üç farklı meme kanser hücreleri 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerine spesifik antagonist-metergolin ile artan konsantrasyonlarda ve farklı zaman aralıklarında muamale edildi. 24 saat metergolin uygulanan meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği bulundu. Ancak 48 ve 72 saat metergolin uygulanan üç farklı meme kanser hücrelerinde, metergolinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunun baskılandığı bulundu. Daha önce meme kanser hücrelerinde metergolinin hücre proliferasyonuna etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılamamıştır. 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerine spesifik antagonist metergolinin diğer kanser hücrelerinde ise rolünü araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmalarda bizim sonuçlarımıza benzer şekilde küçük hücre dışı akciğer kanser hücrelerinde de metergolinin hücre büyümesini kontrol ettiğini ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Cattaneo ve ark., 1995). Yapılan başka bir çalışmada 5HTR1D, -1E, -5A ve -7 reseptörlerinin meme kanser hasta dokularında ve agresif meme kanser hücreleri

olan AU565, HCC70, BT-549, SK-BR-3 hücrelerinde ifade edildiği ve bu hücreler serotonin antagonisti (5-HT1 için (S)-WAY 100135; 5-HT2 için Pirenperone; 5-HT3 için Dolasetron mesylate; 5-HT3 için Dolasetron mesylate; 5-HT4 için GR-113808; 5-HT5 için SB-699551; 5-HT6 için SB-271046; 5-HT7 için SB-269970) ile muamele edildiğinde hücre canlılığında azalma olduğu gösterilmiştir (Ballou ve ark.,2018). Hem sunulan çalışma verileri hem diğer veriler serotonin reseptörlerinin baskılandığında hücre proliferasyonun önemli oranda azaldığını açıkça göstermektedir.

Sunulan çalışmada, 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin agonisti-serotonin ve antagonisti-metergolin uygulanan üç faklı meme kanser hücrelerinde, serotonin artan konsantrasyonuna bağlı olarak koloni olşumunu artırdığı, metergolinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak koloni oluşumunu inhibe ettiği ilk kez gösterilmiş olup, tüm bu sonuçlar, 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin farklı meme kanser alt tiplerinde serotoninin mitojenik etkisine katkıda bulunduğunu ve hücre proliferasyonunu, büyümesini stimüle ederek meme kanser hücrelerinin agresiflik kazanmasında etkili olduğunu ortaya koydu.

Pankreas kanser hücrelerinde (PaCa), 5-HT1B ve 5-HT1D reseptörlerinin fazla eksprese olduğu ve bu reseptörlere spesifik siRNA aracılığı ile reseptörler baskılandığında, PaCa hücrelerinin proliferasyonunun ve klonojenitesinin önemli oranda inhibe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada, serotonin reseptörlerinin baskılandığı PaCa hücrelerinde, invazyon, migrasyon, adhezyon ve proliferasyon ile ilişkili tümör hücre yolakları olarak bilinen uPAR / MMP-2 ve Integrin / Src / Fak aracılı sinyal yolağının aktivitesinin azaldığı da ortaya konmuştur (Gurbuz ve ark., 2014). Başka bir çalışmada serotonin reseptörlerinin prostat kanser hücrelerinde proliferasyon, göç ve farklılaşmayı başlatmak için birbiriyle ilişkili MAP kinaz ve PI3K / Akt sinyal yolaklarını uyardığı bildirilmiştir ((Dizeyi ve ark., 2011). Uterin lemiyom hücrelerinde yapılan çalışmada, 5-HT1B reseptörünün hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve apoptoz üzerindeki etkisine bakılmış olup, 5-HT1B reseptörü inhibe edildiğinde (SB216641 antagonisti kullanılarak), insan uterin lemiyom (huLM) hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşumununu önemli oranda baskılandığı bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, 5-HT1B reseptörü baskılandığında, MAPK/ERK yolağının aktivitesinde, EF2K ve siklin-D1 ekspresyonunda önemli bir azalmanın olduğu rapor edilmiştir (Gurbuz ve ark.,2016). Meme kanser hücrelerinde serotoninin 5-HT reseptör

aracılığıyla Gα/adenil siklaz ve Gβγ/adenil siklazı aktifleştirken hücre proliferasyon ve büyümesinden sorumlu PI3K/Akt yolağını kullandığı öne sürülmüştür (Gautam ve ark., 2016). Serotonin (5-HT) farklı malignitelerde büyüme faktörleri olarak salındığı bildirilmiştir ve 5-HT, mitojenik etkisini diğer hormonlar veya büyüme faktörleri ile etkileşim halinde gösterebileceği belirtilmiştir. Daha önce, farklı 5-HT reseptörlerinin 5-HT'nin proliferatif özelliklerini tetikleyebildiği ve mitojenik sinyal yollarının kaskadlarına aracılık edebildiği gösterilmiştir. 5-HT reseptörlerinin uyarılması, memeli hücrelerindeki büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterler dahil olmak üzere birçok hücre dışı uyarana karşı ortak bir reaksiyon olan transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve böylece hücre bölünmesinin aktivasyonuna yol açabileceği ileri sürülmektedir. Ancak meme kanser hücresi dahil olmak üzere birçok kanser hücresinde serotonin hücre proliferasyonunu stimüle etmek için kullandığı sinyal yolakları hala belirsizliğini korumaktadır. Bu yüzden sunulan çalışmada, önceki çalışmalarımızdan hareketle serotonin agresif meme kanser hücrelerinin proliferasyonunda görev alan FOXM1 sinyal yolağı ile ilişkisi literatürde ilk kez araştırılarak serotoninle başlatılan uyarının hangi sinyal yolağı aracılığı ile hücre proliferasyonunu tetiklediğinin ortaya çıkartılması amaçlandı.

FOXM1, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre çoğalmasında görev alan genlerin transkripsiyonundan sorumlu olan transkripsiyon faktörüdür. Son yıllarda ise FOXM1 kanser hücrelerinde aşırı derecede ifade olan onkogenik bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Hamurcu ve ark., 2016). Görevinden dolayı FOXM1'in, kanser hücrelerinin tümorojenik özellik kazanmasında ve onkojenik fenotipinin ilerlemesinde kritik bir rolü üstlendiği gösterilmiştir. Daha önce yaptığımız çalışmalarda, FOXM1'in, agresif meme kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunda ve hücrelerin proliferasyonuna aracılık eden translasyon uzama faktör-2-kinazın (eEF2K) (hücrelerin büyümesi ve metastazında rol oynayan onkogenik protein kinaz) hücrelerin çoğalmasında medyatör olarak görev yapan İntegrin-β1 genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonlarının düzenlemesinden sorumlu olduğu bulunmuştur. (Hamurcu ve ark., 2016; 2017). Hem FOXM1'in agresif meme kanserlerindeki görevlerinden dolayı hem de daha önce literatürde serotonin reseptörlerinin prostat kanserleri ve uterin lemiyom hücrelerinde eEF2K sinyal yolağı ile işkili olduğunun gösterilmesinden dolayı serotoninin ve 5-HT7 ve 5-HT1D reseptörlerinin FOXM1 sinyal yolağı üzerinde etkili olabileceği hipotezlenmişitir. Bu hipotezimizi doğrulamak

için öncelikle serotonin ve metragolin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 5-HT7 ve 5-HT1D reseptörlerinin ekspresyonu analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre, serotonin uygulanan hücrelerde artan konsantrasyona bağlı olarak hem 5-HT1D hem de 5-HT7 reseptörlerinin ekspresyonun arttığı ancak uyguladığımız en yüksek konsantrasyon olan 8µM serotoinin konsantrasyonunda sonucu açıklayamadığımız bir şekilde 5-HT reseptörünün ekspresyonlarının azaldığı bulundu. Bu sonuç eksojenik uygulanan serotoninin reseptörlerin ekspresyonunu artırdığını gösterdi. Metergolin ile muamele edilen hücrelerde, artan konsantrasyona bağlı olarak 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin eskpresyonunu azaltığı bulundu. Bu sonuç, antagonist-metergolinin hedefimiz olan 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerine spesifik olarak bağlanıp blokladığını gösterdi. Bu sonuçlardan sonra serotonin uygulanan hücrelerde aktifleşen 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin FOXM1 ekspresyonuna etkisi analiz edildi ve artan serotonin konsantrasyonuna bağlı olarak FOXM1 ekspresyonun arttığı ve 8µM serotonin uygulanan hücrelerde FOXM1 ekpresyonunda bir değişiklik olmadığı bulundu. Üstelik, FOXM1'in aşağı yönde hedefi olan EF2K ve p-EF2 ekspresyonununda benzer artışların bulunması, serotoninle ile uyarılan 5-HT7 reseptörü ile transkripsiyon faktör FOXM1 proteininin ekspresyonu arasında doğrusal bir ilişkinin olabileceğine işaret etmektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinde 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerinin metergolin ile baskılandığında, FOXM1 ekspresyonunu ve FOXM1 aşağı yönde hedefi olan proteinlerin ekspresyonlarını baskılanması, serotoninle aktifleştiğinde FOXM1 ekspresyonunu ve FOXM1 aşağı yönde hedefi olan proteinlerin ekspresyonlarının artması özellikle 5-HT7 reseptörünün FOXM1 sinyal yolağı ile bir bağlantısının olduğunu düşündürtmektedir. Tüm bu sonuçlarımız ilk kez serotonin 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörlerini aktifleştirdiğini, aktifleşen bu reseptörlerin hücre proliferasyonun anahtar protein olan FOXM1 ekspresyonunu uyarak hücre proliferasyonuna yol açtığını ortaya koymaktadır. Ancak bu verileri desteklemek için reseptörlerin doğrudan mı FOXM1'i uyardığı yoksa bir aracı kullanarak mı FOXM1 sinyal yolağını tetiklediğini ortaya çıkartmak, dolayısıyla serotoninin kanser hücrelerinde mitojenik etkisini hangi sinyal yolağını kullanarak gösterdiğini aydınlatmak için ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Ayrıca, sunulan çalışmada, hem serotonin uygulanan hücrelerde hem de metergolin uygulan hücrelerde, apoptozun göstergesi olan total kaspaz-3 protein ekspresyonunda bir değişikliği olmadığı bulundu. Bu sonuç, serotonin reseptörlerinin kaspaz bağımlı apoptoz sinyal yolağı ile bağlantılı olmadığını göstermiştir. Ancak metergolin uygulanan hücrelerde, 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörleri bloklandığında hücre proliferasyonunun azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçla, 5-HTR1D ve 5-HTR7 reseptörlerinin baskılanmasıyla birlikte hücre döngüsünde görev alan genlerin ekspresyonunun regülasyonundan sorumlu FOXM1'in ekspresyonun azalması ve buna bağlı olarak hücrelerin çoğalmasının baskılandığı düşünülebilir.

Sonuç olarak, 5-HT1D ve 5-HT7 reseptörleri serotoninin mitojenik aktivitesine aracılık ederek hücre çoğalmasına yol açmaktadır. Bu yüzden, bu reseptörler için spesifik antagonistlerin üretimi/keşfi agresif tümörlerin büyümesini kontrol altında tutmak için faydalı olabilir. Bu nedenle, serotonin reseptörünün bir antagonisti olarak metergolinin kullanımı, meme kanseri hücrelerinin tedavisi için yeni yaklaşım olarak önerilebilir.

6.KAYNAKLAR

Abdul M, Anezinis PE, Logothetis CJ, Hoosein NM. Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. Anticancer Res,1994a; 14: 1215-20.

Abdul M, Logothetis CJ, Hoosein NM. Growth-inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines. J Urol, 1995; 154: 247-50.

Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci, 2001; 26: 61-6.

Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem Sci, 2001; 26: 390-7.

Akdeniz D, Tunçer ŞB, Yazıcı H. PTEN Gen Yolağı ve Meme Kanseri Arasındaki İlişki. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2018; 71(2): 105-110.

Alpini G, Invernizzi P, Gaudio E, Venter J, Kopriva S, Bernuzzi F, Onori P, Franchitto A, Coufal M, Frampton G, Alvaro D, Lee SP, Marzioni M, Benedetti A, DeMorrow S. Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth. Cancer Res, 2008; 68: 9184- 93.

Ataee R, Ajdary S, Rezayat M, Shokrgozar MA, Shahriari S, Zarrindast MR. Study of 5HT3 and 5HT4 receptors expression in HT29 cell line and human colon adenocarcinoma tissues. Arch Iran Med, 2010b; 13: 120-5.

Ataee R, Ajdary S, Zarrindast M, Rezayat M, Hayatbakhsh MR. Anti-mitogenic and apoptotic effects of 5-HT1B receptor antagonist on HT29 colorectal cancer cell line. J Cancer Res Clin Oncol, 2010c; 136: 1461-9.

Ataee R, Ajdary S, Zarrindast M, Rezayat M, Shokrgozar MA, Ataee A. Y25130 hydrochloride, a selective 5HT3 receptor antagonist has potent antimitogenic and apoptotic effect on HT29 colorectal cancer cell line. Eur J Cancer Prev, 2010a; 19: 138-43.

Bach DH, Long NP, Luu TTT, Anh NH, Kwon SW, Lee SK. The Dominant Role of Forkhead Box Proteins in Cancer. Int. J. Mol. Sci, 2018; 19: 3279.

Badve S, Dabbs DJ , Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS. Basal-like and triple-negative breast cancers:a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. Mod Pathol, 2011; 24 (2): 157-167.

Ballou Y, Rıvas A, Belmont A, Patel L, Amaya Cn, Lıpson S, Khayou T, Dıckerson Eb, Nahleh Z, Bryan Ba. 5‐HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability. Molecular And Clınıcal Oncology, 2018; 9: 243-254.

Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar.Balıkesir Sağlık Bil Derg, 2016; 5(3).

Blask DE, Hill SM.Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. J Neural Transm Suppl, 1986; 21: 433-49.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? J Clin Oncol, 2005; 23(73): 50–60.

Brodie B. Shore P. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. Annals of the New York Academy of Sciences, 1957; 66: 631–642.

Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology,1999; 15:269-90.

Burz C, Berından-Neagoe I, Balacescu O, Irımıe A. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets,Acta Oncologica, 2009; 48: 811-821.

Cantley LC.The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science,2002; 296(5573): 1655-7.

Cattaneo MG, Codignola A, Vicentini LM, Clementi F, Sher E. Nicotine stimulates a serotoninergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. Cancer Res, 1993; 53: 5566-8.

Cattaneo MG, Fesce R, Vicentini LM. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. Eur J Pharmacol,1995; 291:209-11.

Cattaneo MG, Palazzi E, Bondiolotti G, Vicentini LM. 5-HT1D receptor type is involved in stimulation of cell proliferation by serotonin in human small cell lung carcinoma. Eur J Pharmacol, 1994; 268: 425-30.

Chew HK. Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what? West J Med, 2001; 174(4): 284-287.

Clark C, Weissbach H, Udenfriend S. 5-hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. Journal of Biological Chemistry,1954; 210: 139–148.

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture. Cancer Commun, 1991; 3(7): 207-12.

Craig DW, O'Shaughnessy JA, Kiefer JA, Aldrich J, Sinari S, Moses TM, Wong S, Dinh J, Christoforides A, Blum JL, Aitelli CL, Osborne CR, Izatt T, Kurdoglu A, Baker A, Koeman J, Barbacioru C, Sakarya O, De La Vega FM, Siddiqui A, Hoang L, Billings PR, Salhia B, Tolcher AW, Trent JM, Mousses S, Von Hoff D, Carpten JD. Genome and transcriptome sequencing in prospective metastatic triple-negative breast cancer uncovers therapeutic vulnerabilities. Molecular Cancer Therapeutics, 2013; 12(1): 104-116.

Cruchten SV, Broeck WVD. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. Anat Histol Embryol, 2002; 31: 214-223.

Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley J.A, Norton L. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. JAMA : Journal of the American Medical Association, 1999; 281(23): 2189-97.

Dahlstrom A. Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. Acta Physiologica Scandinavica, 1964; 62: 1–55.

Delitala G. Stimulating action of sulpiride and pimozide on prolactin release. Effect on bromocriptine, L-dopa and metergoline administration. Acta Endocrinol, 1977; 86(2): 251-6.

Derkach V, Surprenant A, North R. 5-HT3 receptors are membrane ion channels. Nature, 1989; 339: 706–709.

DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A.Breast cancer statistics.CA Cancer J Clin, 2013; 64(1): 52-62.

Dizeyi N, Bjartell A, Hedlund P, Tasken KA, Gadaleanu V, Abrahamsson PA. Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell line. Eur Urol, 2005; 47: 895-900.

Dizeyi N, Bjartell A, Nilsson E, Hansson J, Gadaleanu V, Cross N, Abrahamsson PA. Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. Prostate,2004; 59: 328-36.

Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzl M, Tasken KA, Abrahamsson PA. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines, Urol. Oncol, 2011; 29.

Dohr O, Vogel C, Abel J. Different response of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin [TCDD]-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells.Archives of biochemistry and biophysics, 1995; 321: 405–412.

Dowsett, M. Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. Endocrine-related Cancer, 2001; 8(3): 191-5.

Eison AS, Mullins UL. Regulation of central 5-HT2A receptors: a review of in vivo studies. Behavioural Brain Research, 1996; 73(1–2): 177–81.

Erdem SS, Yılmaz M, Yıldırım H, Mayda AS, Bolu F, Durak AA, Şener Ö. Düzce'de Yaşayanların Kanser ve Kanser Risk Faktörleri Hakkında Bilgi Düzeyi. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2017; 7 (1): 01-10.

Erspamer V. Asero B. Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffin cells, as 5-hydroxytryptamine. Nature, 1952; 169: 800–801. (Note: the original 1937 paper describing enteramine is written in Italian).

Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, Veer LJ, Perou CM. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. N Engl J Med, 2006; 355(6): 560-9.

Fisher B, Anderson S, Bryant J, Morgolose RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N Engl J Med, 2002; 347(16): 1233-1241.

Foukakis T, Bergh J, Hayes DF, Vora SR. Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer. Dizon Ed UpToDate, 2013.

Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Third edition, Wiley-Liss, New York, 2000: 486.

Gautam J, Banskota S, Regmi S, Subi Ahn S, Yong Hyun Jeon YH, Hyunyoung Jeong H, Kim SJ, Nam TG, Jeong BS, Kim JA.Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT7 receptor preferentially expressed in triple negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling Mol. Canc, 2016; 15: 75.

Giltnane JM, Balko JM. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. Discovery Medicine,2014; 17(95): 275-283.

Glück, S. Adjuvant chemotherapy for early breast cancer : optimal use of epirubicin, The Oncologist, 2005; 10: 780-791.

Golson ML, Kaestner KH. Fox transcription factors: from development to disease. Development, 2016; 143(24): 4558-4570.

Graeff FG, Zuardi AW, Giglio JS, Lima Filho EC, Karniol IG. Effect of metergoline on human anxiety. Psychopharmacology (Berl), 1985; 86(3): 334-8.

Greenamyre JT, Penney JB, D'Amato DJ, Young AB. Dementia of the Alzheimer's Type: Changes in Hippocampal L-[3H]Glutamate Binding. Journal of Neurochemistry; 1987; 48(2): 543-551.

Gurbuz N, Ashour AA, Alpay SN, Ozpolat B.Down-Regulation of 5-HT1B and 5-HT1D Receptors Inhibits Proliferation, Clonogenicity and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells.PLOS ONE, 2014; 9(8).

Gurbuz N, Asoglua MR, Ashoura AA, Salamab S, Kilic GS, Ozpolat B.A selective serotonin 5-HT1B receptor inhibition suppresses cells proliferation and induces apoptosis in human uterine leiomyoma cells.European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2016; 206: 114–119.

Hagena H. Manahan-Vaughan D. The serotonergic 5-HT4 receptor: A unique modulator of hippocampal synaptic information processing and cognition. Neurobiol Learn Mem, 2017; 138: 145-153.

Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, Ozpolat B. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorgenesis of human triple negative breast cancer cells. Oncotarget,2016; 7(13): 16619–16635.

Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF, Dönmez-Altuntaş H, Ozkul Y, Canatan H, Ozpolat B. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2018; 144: 415–430.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 2011; 144 (5); 646-674.

Hedlund PB, Sutcliffe JG. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. Trends in Pharmacological Sciences, 2004; 25(9): 481–6.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res., 2011; 13(4): 215.

Hormones E, Group BCC. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. Journal of the National Cancer Institute, 2002; 94(8): 606-16.

Howlader A, Altekruse SF, Li CI , Chen VW, Clarke CA, Ries LAG , Cronin KA. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. J Natl Cancer Inst, 2014; 106 (5).

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin).Pharmacol. Rev, 1994; 46(2): 157-203.

http://www.cancernews.com.au/breast-cancer/ Erişim Tarihi: 27.09.2019

https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC6A4#resources Erişim Tarihi: 08.01.2020

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/28693#section=Molecular-Formula Erişim Tarihi: Erişim Tarihi:13.01.2020

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5202#section=2D-Structure Erişim Tarihi: 25.12.2019

https://www.avivasysbio.com/wordpress/blog/slc6a4-serotonin-transport-gene Erişim Tarihi: 10.01.2020

https://www.breastcancer.org/treatment/radiation Erişim Tarihi: 21.09.2019

https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy. Erişim Tarihi: 21.09.2019.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3356. Erişim Tarihi: 27.12.2020

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3360. Erişim Tarihi: 27.12.2020

https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018 Erişim Tarihi: 25.09.2019

https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Erişim tarihi: 10.09.2019

Hwang ES, Lichtensztajn DY, Gomez SL, Fowble B, Clarke CA. Survival after lumpectomy andmastectomy for early stage invasive breast cancer: the effect of age and hormone receptorstatus. Cancer, 2013; 119: 1402-1411.

Ito H, Halldin C, Farde L. Localization of 5-HT1A receptors in the living human brain using [carbonyl-11C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique". J. Nucl. Med., 1999; 40 (1): 102–9.

Jaiswal N, Chakraborty S, Nag A. Biology of FOXM1 and its emerging role in cancer therapy. Journal of Proteins & Proteomics, 2014; 5(1): 1-24.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 2011; 61(2): 69-90.

Kan R, Wang B, Zhang C, Yang Z, Ji S, Lu Z, Zheng C, Jin F, Wang L. Association of the HTR6 polymorphism C267T with late-onset Alzheimer's disease in Chinese. Neuroscience Letters, 2004; 372 (1–2): 27–9.

Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the Cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Cancer Res, 1997; 57: 5441-5445.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer,1972; 4: 239-257.

Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. The lancet oncology, 2001; 2(3): 133-40.

Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2012; 490(7418): 61-70. (2012 for the Cancer Genome Atlas Network)

Koo CY, Muir KW, Lam EWF. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2012; 1819(1): 28-37.

Lasfargues EY, Coutinho WG. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. Es. Natl Cancer Inst, 1978; 61(4). (Lasfargues ve Coutinho, 1978)

Lee CI, Chen LE, Elmore JG. Risk-based breast cancer screening: implications of breast density. Medical Clinics, 2017; 101(4): 725-741.

Lee JH, Liu J, Shin M, Hong M, Nah SY, Bae H. Metergoline inhibits the neuronal Nav1.2 voltage-dependent Na(+) channels expressed in Xenopus oocytes. Acta Pharmacol Sin, 2014; 35(7):862-8.

Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. Cancer Res,1997; 57(15): 3071-8.

Liao DJ, Dickson RB. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2002; 80(2): 175-189.

Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans DB, Gallagher JA.The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. Cancer Res. 1997;57: 5386-5390.

Massagué J. TGFβ in cancer. Cell,2008; 134(2): 215-230.

McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. J Nucl Med, 2016; 57(1): 9-16.

McKinley A, Russell S, Spence R, Odling-Smee W, Nevin N. Hereditary breast cancer and linkage analysis to BRCA1. British journal of surgery, 1995; 82 (8): 1086-1088.

Meltzer H, Serotonergic Dysfunction in Depression. Br J Psychiatry Suppl, 1989; 8: 25-31.

Merzak A, Koochekpour S, Fillion MP, Fillion G, Pilkington GJ. Expression of serotonin receptors in human fetal astrocytes and glioma cell lines: a possible role in glioma cell proliferation and migration. Mol Brain Res, 1996; 41: 1-7.

Messina D, Annesi G, Serra P, Nicoletti G, Pasqua A, Annesi F, Tomaino C, Cirò-Candiano IC, Carrideo S, Caracciolo M, Spadafora P, Zappia M, Savettieri G, Quattrone A. Association of the 5-HT6 receptor gene polymorphism C267T with Parkinson's disease. Neurology,2002; 58 (5): 828–9.

Michor F, Iwasa Y, Nowak M.A. Dynamics of cancer progression. Nat Rev Cancer, 2004; 4: 197-205.

Micog JS, Hage JA, Velde CJ. Preoperative chemoteraphy for woman with operable breast cancer. Cochrane Database Syst Rev, 2007; 2.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ, Alatrash G. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. Cancer Immunology Research, 2014; 2(4): 361-370.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. J. vet. Pharmacol. Therap, 2008; 31: 187–199.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. J. vet. Pharmacol. Therap, 2008; 31: 187–199.

Nikiforuk A. Targeting the Serotonin 5-HT7 Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders: Rationale and Progress to Date. CNS Drugs, 2015; 29(4): 265-275.

O'Shaughnessy J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. The Oncologist, 2005; 10(3): 20-9.

Oakman C, Moretti E, Pacini G, Santarpia L, Leo AD. Triple negative breast cancer: a heterogeneous subgroup defined by what it is not. European J Cancer, 2011; 47(3): 370-372.

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

Oufkir T, Arseneault M, Sanderson JT, Vaillancourt C. The 5- HT2A serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2- STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. Placenta, 2010; 31: 439-47.

Pai VP, Hernandez LL, Stull MA, Horseman ND. The Type 7 Serotonin Receptor, 5-HT7, Is Essential in the Mammary Gland for Regulation of Mammary Epithelial Structure and Function. BioMed Research International, 2015; 831.

Pai VP, Marshall AM, Hernandez L, Buckley AR, Horseman ND. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. Breast Cancer Research, 2009; 11:81.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer, 2001; 94: 153-156.

Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev, 2001; 22(2): 153-83.

Perou, CM, Sørlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2000; 406:747-52.

Peroutka S, Howell, T. The molecular evolution of G proteincoupled receptors. Neuropharmacology,1994; 33: 319–324.

Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta- analysis. International journal of cancer, 1997; 71(5): 800-9.

Phipps AI, Li CI. Breast cancer biology and clinical characteristics. In: Li CI, Breast Cancer Epidemiology, Springer, New York, 2010: 21-46.

Pirozhok I, Meye A, Hakenberg OW, Fuessel S, Wirth MP. Serotonin and melatonin do not play a prominent role in the growth of prostate cancer cell lines. Urol Int, 2010; 84: 452-60.

Ponder B. Searches begin and end. Nature: International weekly. Journal of science, 1994; 371 (6495), 279.

Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase- dependent and -independent cell death. Cell Mol Life Sci, 2010; 67: 1589-1597.

Pritchard KI, Shepherd ILE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramvvell VH, Levine MN. HER2 and responsiveness of Breast cancer to adjuvant chemotherapy. N Engl J Med, 2006; 354(20): 2103-2111.

Quadros IM, Klaus AT, Miczek A. Serotonin and Aggression. In: Müller CP, Jacobs BL. Handbook of Behavioral Neuroscience, 2010; 21;687-713.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. Int J Low Extrem Wounds, 2005; 4: 138–44.

Rapport M, Green A, Page I. Crystalline serotonin. Science, 1948a; 108: 329–330

Rapport M, Green A, Page I. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. Journal of Biological Chemistry; 1948b; 174: 735–741.

Rapport M, Green A, Page I. Serum vasoconstrictor IV. Isolation and characterization. Journal of Biological Chemistry, 1948c; 176: 1243–1251.

Reid G. Rand M. Pharmacological actions of synthetic 5 hydroxytryptamine. Nature,1952; 169,: 801–802.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Norman Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. New England Journal of Medicine, 2005; 353(16): 1673-84.

Sarrouilhe D, Mesnil M. Serotonin and human cancer: A critical view. Biochimie, 2018; 1-5.

Sarrouilhe D. Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? Current Molecular Medicine, 2015; 15: 62-77.

Shamsi MJ, Islamian P. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. Nucl Med Rev Cent East Eur, 2017; 20(1): 45-48.

Siddiqui EJ, Shabbir M, Mikhailidis DP, Thompson CS, Mumtaz FH. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine 1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. J Urol, 2006b; 176: 1648-53.

Siddiqui EJ, Shabbir MA, Mikhailidis DP, Mumtaz FH, Thompson CS. The effect of serotonin and serotonin antagonists on bladder cancer cell proliferation. BJU International, 2006a; 97: 634-9.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J, Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. New England J, 2011; 365(14): 1273-83.

Soll C, Jang JH, Riener MO, Moritz W, Wild PJ, Graf R, Clavien PA.Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. Hepatology 2010; 51: 1244-54.

Soll C, Riener MO, Oberkofler CE, Hellerbrand C, Wild PJ, DeOliveira ML, Clavien PA. Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. Clin Cancer Res, 2012; 18: 5902-10.

Sonier B, Arseneault M, Lavigne C, Ouellette RJ, Vaillancourt C. The 5-HT2A serotoninergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. Biochem Biophys Res Commun, 2006; 343(4): 1053-1059.

Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triplenegative breast cancer. Cancer Research,2013; 73(7): 2025-2030.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci, 2017; 13(11): 1387-1397.

Tanis JE, Moresco JJ, Lindquist RA, Koelle M.R. Regulation of serotonin biosynthesis by the G proteins Gαo and Gαq controls serotonin signaling in Caenorhabditis elegans. Genetics, 2008; 178: 157–169.

Thompson CB. Fundemental immunology. Apoptozis. In: Paul WE, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999: 107-138.

Tomatır AG.Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü Apoptosıs: Programmed Cell Death. Tıp Klin Tıp Bilimleri 2003; 23: 499-508.

Uhlenhaut NH, Treier M.Forkhead transcription factors in ovarian function.Reproduction,2011; 142(4): 489-95.

Valentin MD, da Silva SD, Privat M, Alaoui-Jamali M, Bignon YJ.Molecular insights on basal-like breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2012. 134(1): 21-30.

Vicentini LM, Cattaneo MG, Fesce R. Evidence for receptor subtype cross-talk in the mitogenic action of serotonin on human small-cell lung carcinoma cells. Eur J Pharmacol,1996; 318: 497-504.

Vincent Shen. "2010 Molecule of the Year". BioTechniques. Archived from the original on 24 July 2011. Retrieved 18 February 2011.

Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. J Clin Oncol, 2010; 28(10): 1684-91.

Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Wade JL, Robidoux A, Margolese RG,

James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP). Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. JAMA, 2006; 295(23), 2727-41.

Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. Cell, 1989; 57(4): 645-658.

Welford RDW, Vercauteren M, Trebaul A, Cattaneo C, Eckert D, Garzotti M, Sieber P, Segrestaa J, Studer R, Groenen PM, Nayler O. Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and diseaseinduced dysregulation. Sci Rep, 2016; 6: 30059.

Wesolowska A. In the search for selective ligands of 5-HT5, 5-HT6 and 5-HT7 serotonin receptors." Pol J Pharmacol, 2002; 54(4): 327-341.

Wu N, Zhang J, Zhao J, Mu K, Zhang J, Jin Z, Yu J, LiJ. Precision medicine based on tumorigenic signaling pathways for triple-negative breast cancer. Oncology Letters, 2018; 16(4), 4984-4996.

Yakel JL. The 5-HT3 receptor channel: function, activation and regulation in Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors, In: Endo M, Kurachi Y, Mishina M. Handbook of Experimental Pharmacology, ISBN 3-540-66127-1, Springer-Verlag, 2000, Berlin, 541–560.

Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, Sasaki K. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. BMC Research Notes, 2012; 5(1): 376.

Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt MK, Broeks A, Cox A, Fasching PA, Hein R, Spurdle AB, Blows F, Driver K, Flesch-Janys D, Heinz J, Sinn P, Vrieling A, Heikkinen T, Aittomäki K, Heikkilä P, Blomqvist C, Lissowska J, Peplonska B, Chanock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Czene K, Humphreys K, Darabi H, Liu J, Veer LJV, Leeuwen FEV, Andrulis IL, Glendon G, Knight JA, Mulligan AM, O'Malley FP, Weerasooriya N, John EM, Beckmann MW, Hartmann A, Weihbrecht SB,

Wachter DL, Jud SM, Loehberg CR, Baglietto L, English DR, Giles GG, McLean CA, Severi G, Lambrechts D, Vandorpe T, Weltens C, Paridaens R, Smeets A, Neven P, Wildiers H, Wang X, Olson JE, Cafourek V, Fredericksen Z, Kosel M, Vachon C, Cramp HE, Connley D, Cross SS, Balasubramanian SP, Reed MWR, Dörk T, Bremer M, Meyer A, Karstens JH, Ay A, Park-Simon TW, Hillemanns P, Pérez JIA, Rodríguez PM, Zamora P, Benítez J, Ko YD, Fischer HP, Hamann U, Pesch B, Brüning T, Justenhoven C, Brauch H, Eccles DM, Tapper WJ, Gerty SM, Sawyer EJ, Tomlinson IP, Jones A, Kerin M, Miller N, McInerney N, Anton-Culver H, Ziogas A, Shen CY, Hsiung CN, Wu PE, Yang SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC,Haiman CA, Henderson BE, Marchand LL, Kolonel LN, Lindblom A, Margolin S, Jakubowska A, Lubiński J, Huzarski T, Byrski T, Górski B, Gronwald J, Hooning MJ, Hollestelle A, Ouweland AMW, Jager A, Kriege M, Tilanus-Linthorst MMA, Collée M, Wang-Gohrke S, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Mononen K, Grip M, Hirvikoski P, Winqvist R, Mannermaa A, Kosma VM, Kauppinen J, Kataja V, Auvinen P, Soini Y, Sironen R, Bojesen SE, Ørsted DD, Kaur-Knudsen D, Flyger H, Nordestgaard BG, Holland H, Chenevix-Trench G, Manoukian S, Barile M, Radice P, Hankinson SE, Hunter DJ, Tamimi R, Sangrajrang S, Brennan P, McKay J, Odefrey F, Gaborieau V, Devilee P, Huijts P, Tollenaar R, Seynaeve C, Dite GS, Apicella C, Hopper JL, Hammet F, Tsimiklis H, Smith LD, Southey MC, Humphreys MK, Easton D, Pharoah P, Sherman ME, Garcia-Closas M. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. Journal of the National Cancer Institute, 2010; 103(3): 250-63.

Yao H, He G, Yan S, Chen C, Song L, Rosol TJ, Deng X. Triplenegative breast cancer: is there a treatment on the horizon? Oncotarget,2017; 8 (1): 1913.

Ye H, Kelly TF, Samadani U, Lim L, Rubio S, Overdier DG, Roebuck KA, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. Molecular and Cellular Biology, 1997; 17(3): 1626-41.

Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. Breast J, 2007; 13:172-9.

Zhu, H. Forkhead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease. Life Sci, 2016; 144: 194-201.

SEROTONİN RESEPTÖRLERİNİN MEME KANSER HÜCRELERİNDE APOPTOZ SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%3	%2	%2	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	D. Sarrouilhe, J. Clarhaut, N. Defamie, M. Mesnil. "Serotonin and Cancer: What Is the Link?", Current Molecular Medicine, 2015 Yayın	%1
2	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
3	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	www.omicsonline.org İnternet Kaynağı	<%1
5	www.advancedbreastcancercommunity.com İnternet Kaynağı	<%1
6	paperity.org İnternet Kaynağı	<%1
7	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Venhar ÇINAR
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 27 Ocak 1994, Kayseri
Medeni Durumu: Bekâr
Tel: 05532894809
email: venhar_busra@hotmail.com

EĞİTİM

Derece/ Kurum/ Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans: Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimileri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD (Kayseri,2016-Halen)

Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (Sivas, 2016)

Lise: Melikgazi Mustafa Eminoğlu Anadolu Lisesi (Kayseri, 2012)

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1.Nesrin Delibaşı, Zuhal Hamurcu, Venhar Çınar, Nursultan Nurdinov, Ahsen Güler, Bülent Özpolat. Yumurtalık kanser hücrelerinde otofajik aktivitenin rolü. 7.Moleküler Kanser Araştırma ve 1.Temel Onkoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) 11-14 Ekim 2018, İzmir, TÜRKİYE (POSTER)

2.Ünal TD., Hamurcu Z., Delibaşı N., Çınar V., Güler G., Gökçe S., Nurdinov N. ve Ozpolat B. "Thymoquinone Inhibits Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Cells by Suppressing Autophagy and Beclin-1 and LC3" Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. (2020)

3.TARGETING AUTOPHAGY IN BREAST CANCER. Erciyes Medical of journal dergisi, review. (Yayın aşamasında).