



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Meme kanseri hücre hatlarında propranolol ve paklitakselin anjiyogenez üzerine etkisi

Effects of propranolol and paclitaxel on angiogenesis in breast cancer cell lines

Fatma Şimşek¹, Sevinç İnan², Sevda Müftüoğlu⁴, Kemal Özbilgin³, Seda Vatansever³, İbrahim Tuğlu³

¹Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Turkey

²Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Turkey

³Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Turkey

⁴Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(1):144-153

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the effect of propranolol (PR), which is used in infantile hemangiomas, and paclitaxel (PX), which is widely used as a chemotherapeutic agent, on cancer cells.

Materials and Methods: That the cells counted with trypan blue the doubling time were determined. Also with MTT assay were analyzed the cytotoxic effect and IC₅₀ value of drugs. In the breast cancer cell lines which are differents with regard to invasion (MDA-MB-231 and MCF-7) anti-VEGF, anti-eNOS, anti-iNOS and anti-ERK1/2 primer antibodies investigated by using immunohistochemical methods. To evaluation of immunoreactivity was used the H-scoring system.

Results: With MTT test, IC₅₀ values are applied to the cells dosage for MDA-MB-231 cells; PX: 5 nmol, PR: 50 µm, and for MCF- 7 cells PX: 3,7 nmol, PR: 50 µm, were established. In immunohistochemical application, immunoreactivity of control group was increased with strong and/or stronger in the cancer cells, while those of in PX, PR and combine treatment was decreased either significant or very significant.

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

Keywords: MDA-MB-231, MCF-7, angiogenesis, propranolol.

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı infantil hemanjiyom vakalarında kullanılan propranolol (PR) ile kemoterapötik bir ajan olarak yaygın kullanılan Paklitakselin (PX) kanser hücreleri üzerine etkisini incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Tripan mavisi ile hücre sayımı yapılarak hücrelerin ikilenme zamanları belirlendi. MTT testi ile de ilaçların sitotoksik etkisi ve IC₅₀ değerleri analiz edildi. İnvazyon yönünden farklı iki meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231 ve MCF-7) anti-VEGF, anti-eNOS, anti-iNOS ve anti-ERK1/2 primer antikorları indirek immunohistokimyasal yöntemle incelendi. İmmunoreaktivitenin değerlendirilmesi için H skorum sistemi kullanıldı.

Bulgular: MTT testi ile hücrelere uygulanacak ilaç dozlarının IC₅₀ değerleri MDA için; PX: 5 nmol, PR: 50 µm ve MCF- 7 için; PX: 3,7 nmol, PR: 50 µm olarak bulundu. İmmunohistokimyasal uygulamada kanser hücrelerinde kontrol gruplarının immunoreaktivitesi şiddetli ve/veya çok şiddetli artmış iken PX, PR ve kombine uygulanan ilaç gruplarında boyanma şiddeti anlamlı veya çok anlamlı olarak azaldı.

Sonuç: Bu çalışma ile kemoterapötik olarak uygulanan paklitaksele ek olarak anti anjiyogenik ilaç uygulamalarının damarlarda vazodilatasyon, hücre çoğalması, göçü ve yaşam süresini etkilemesi sonucunda anjiyogenezi azaltması veya önlemesi açısından meme kanserinin tedavisinde önemli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: MDA-MB-231, MCF-7, anjiyogenez, propranolol.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Fatma Şimşek, Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Turkey E-mail: fatmaclasimsek@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 25.04.2018 Kabul tarihi/Accepted: 13.09.2018 Çevrimiçi yayın/Published online: 02.11.2018

GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda akciğer kanserinden sonra görülen ikinci en sık kanser tipidir ve kanser nedeni ölümünün içinde de ikinci sırayı almaktadır^{1,2}. Malign tümörlerin hem büyüme hızını ve hem de varlıklarını sürdürmelerini sağlayan damarların oluşumunun önlenmesi ve hatta ortadan kaldırılması, son zamanlarda kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak anjiyogenezi ve anti-anjiyogenik ilaçların geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda ilginç örneklerden biri propranololdür. Propranolol'ün özellikle VEGF üzerine etkili olduğu bildirilmiş ve infantil hemanjiyom vakalarında kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde meme kanserinin tedavi yöntemleri başta cerrahi olmak üzere, hormon tedavileri, kemoterapiler, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere beş grupta toplanır³. Henüz meme kanserini kesin önleyen bir yöntem mevcut değildir. Ancak kemoterapötik tedavilere ek olarak uygulanabilecek alternatif tedaviler hem kemoterapötik tedavinin zararlı etkisini en aza indirmek amacıyla hem de tedavi seçeneklerinin artması açısından önemli olacaktır. Anjiyogenez, meme kanserinde hem lokal tümör büyümesi hem de uzak metastaz açısından çok önemli bir rol oynamaktadır⁴. Preklinik modellerde yapılan çalışmalar meme hiperplazisinin tümöre dönüşmesinde anjiyogenezin öncülük ettiğini göstermiştir⁵. Diğer taraftan, anjiyogenez inhibitörlerinin tümör hücresine transfeksiyonu büyümeyi ve metastazı azaltmıştır⁶. Anjiyogenik moleküller içinde anjiyogenezin en potent uyarıcısı ve üzerinde en çok durulan VEGF⁷ dir. Tümör progresyonuna bağlı gelişen hipoksik durumlarda anjiyogeneze VEGF aracılık etmektedir⁷. Nitrik oksitte kan akımının düzenlenmesi ve damar geçirgenliğinde artma sağlayarak tümör hücrelerinin beslenmesini ve oksijen sağlanmasını kolaylaştırırken diğer yandan da lökosit endotel etkileşiminin azalması ile konakçı immün mekanizmasını bozmaya yardım eder⁸. Anjiyogenezle ilgili yollardan biri de MAPK-ERK sinyal yolağı olup kanserin belirleyicileri olan proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve inflamatuvar cevap gibi onkojenik fenotiplerin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bu nedenle, MAPK/ERK inhibitörleri belli kanser tiplerinde umut verici hedef tedaviler olarak ortaya çıkmıştır⁹. Sonuçta meme kanseri için kullanılacak yeni ilaçların antianjiyogenik

yollar üzerinden etki etmesi tedavinin etkinliği açısından önemli olacaktır.

Bu çalışmada kemoterapötik tedaviye ek olarak anti-anjiyogenik tedavi olarak henüz hemanjiyom olgularında hemanjiyomun küçülmesine neden olduğu bildirilen propranolol¹⁰ uygulamalarının meme kanseri tedavisindeki yeri ve etki mekanizmaları moleküler düzeyde araştırılmış olacaktır.

Propranololün infantil hemanjiyomda kullanılmasının yanı sıra son çalışmalarda bu ilacın nöroendokrin düzenlemeye, adrenerjik nörotransmitterler olan epinefrin ve norepinefrin salınımına ve sempatik sinir sistemi aktivasyonuna etkisi açısından meme kanseri ilerlemesini önleyici etkisine odaklanılmıştır. Bu çalışmalar adrenerjik sinyalin direkt tümör hücresine veya mikro çevreye etki ederek meme kanseri ilerlemesi ve metastazında gerekli olan birçok yolağı düzenlediğini göstermiştir^{11,12}. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda meme kanserinin etkin tedavisi için antineoplastik kemoterapötik ve anti-anjiyogenik ajanların moleküler mekanizmalarına ışık tutulacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Celal Bayar Üniversitesi Etik Kurulunun 01.11.2010 tarihinde onay verdiği 0023 sayılı çalışmadır.

Hücre Kültürü

MDA-MB-231 (ECACC-European Collection of Cell Cultures – Cat No: 92101203 LOT: 08A006 p.18) ve MCF-7 (ECACC Accession no 86012803 Lot No: 10K025 pass:9) meme kanser hücre hatları, RPMI-1640 (R8758 Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA), %10 Fetal bovine serum (FBS) (F9665, Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA), %1 L-Glutamin (G7513-Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) ve % 1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) (P4333-Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) içeren medyum ile dilüe edilerek 4 kültür kabına eşit olarak paylaştırıldı. Kültür kaplarında, %5 karbondioksit içeren, 37°C nemli inkübatörde çoğaltılmaya bırakıldı. İki günde bir medyumları değiştirilerek, konfluent olunca Tripsin-EDTA (T4049-Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) solusyonu ile 37°C ile 5 dakika bırakılarak hücreler alınıp, 1000 rp'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra pasajlandı. 4. pasaja kadar

yeterli miktarda çoğaltılan hücreler önce -80°C 'de ardından azot tankı içerisinde, dondurma medyumumu ile yedeklendi.

Aynı pasajdaki hücreler gruplar için ayrı kültür kaplarına bölünerek ilaç uygulamalarına geçildi. Deney 4 grup olarak planlandı. **1. Kontrol Grubu Meme kanseri;** K-A. MDA-MB-231 K-B. MCF-7, **2. Meme kanseri + Paklitaksel grubu;** A-Px. MDA-MB-231 ve Paklitaksel, B-Px. MCF-7 ve Paklitaksel eklenen grup, **3. Meme kanseri + Propranolol verilen grup;** A-Pr. MDA-MB-231 ve Propranolol, B-Pr. MCF-7 ve Propranolol eklenen grup, **4. Meme kanseri + Paklitaksel + Propranolol grubu;** A-Px+Pr. MDA-MB-231 ve Paklitaksel ile Propranolol, B-Px+Pr. MCF-7 ve Paklitaksel ile Propranololün kombine verildiği grup.

Hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi

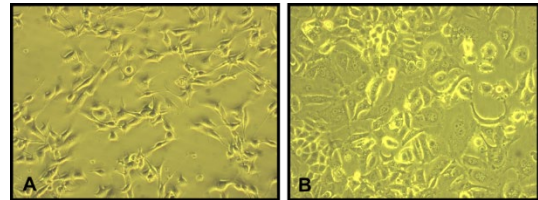
Gruplardan elde edilen 24 gözlü kültür kaplarındaki hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı ardından hücre üzerine 1 ml vasat eklendi. Her gözdeki hücre ile vasat karışımından 100 μl ve tripan mavisinden de 100 μl alınarak homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra thoma lamında hücre sayımları yapılarak ekildi. Hücreler ilk sayım yapıldığında her bir göze MDA-MB-231 hücresinden 15.10³ ve MCF-7 hücresinden, 15.10³ olacak şekilde ekildi. Ardında üç gün boyunca her gün kabın üzer tane gözü Tripsin-EDTA ile kaldırılarak hücre sayımı yapıldı.

İlaç dozlarının belirlenmesi - MTT Testi

Tedaviden sonra ilaç sitotoksitesini ölçmek için 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (M5655-Sigma, USA) ve distile su ile MTT solüsyonu hazırlandı. Hücreler 3 adet 96'lı kültür kabına her bir kuyucuğa 1x10⁵ hücre olacak şekilde pasajlandı ve inkübe edildi. Ardından MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 μL konuldu ve 37°C 'de 4 saat inkübe edildi. Kontrol gruplarına ilaç uygulaması yapılmadı ve PBS eklendi. Süre sonunda MTT solüsyonu atıldı ve her bir kuyucuğa 100 μL DMSO (A 3672, AppliChem, Darmstadt, Germany) eklenerek absorbans 570 nm' de spektrofotometrede ölçüldü. Ölçülen değerler ilaç eklenmeyen kuyucuklardaki değerler ile karşılaştırılarak ilaçların hücrelerin yarısını öldüren dozlar belirlendi böylece ilaç IC₅₀ dozları hesaplandı.

İndirekt immunohistokimyasal yöntem

24 kuyucuklu kültür kabında çoğaltılan hücreler 48. saatteki ilaç uygulamalarını takiben kültür vasatı atıldı, hücreler bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit ile 30 dk. fikse edildi. Fiksasyondan sonra 3 kez 5 dk. PBS ile yıkandı. %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulandı (5 dk) ve 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için %0,1'lik Triton-X 100 (T8787 -Sigma Chemical Co. St Louise, Missouri, USA) ile 15 dk. inkübe edildikten sonra 3 defa PBS ile yıkandı. 1 saat blocking uygulamasından sonra anti-VEGF (sc-7269, Santa Cruz, CA, USA), anti-iNOS (sc-649, Santa Cruz, CA, USA), anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz, CA, USA), anti-ERK1/2 (251140, Abbiotec, San Diego, USA) antikorları 1:100 oranında dilüe edilerek uygulandı ve 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra biotin (30 dk.) ve ardından streptavidin (30 dk.) uygulandı. Yine PBS ile yapılan yıkamalardan sonra DAB kromojeni uygulanarak immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrıldı ve primer antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirildi. Distile su ile yıkanan örnekler kapatma mediumu (Clear Mount, Mounting Medium Ref: 008110 Invitrogen, USA) ile kaplanarak kapatıldı ve fotoğrafları ışık mikroskobu ile çekildi.



Resim 1. MDA-MB-231(A) hücre hattının 24.saat ve MCF-7 (B) hücre hattının 72.saatteki görünüşleri. X400.

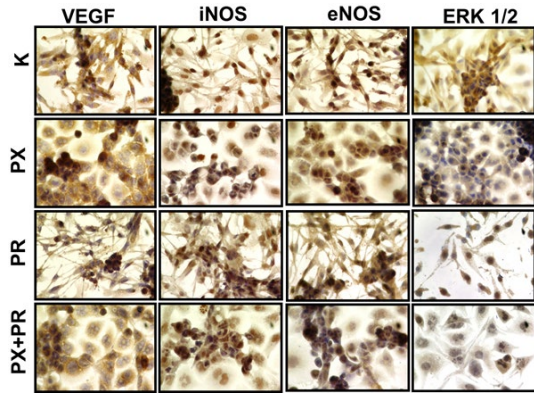
İstatistiksel analiz

İmmunoreaktivite şiddetleri hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++) olarak skorlandı. Boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma şiddetleri H-Skor ile hesaplanarak, gruplar arasında karşılaştırmalı olarak ANOVA istatistik testi ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

H-skor: Toplam alanda yüz hücre sayıldı. Hücreler boyanma şiddetlerine göre (1) hafif, (2) orta, (3) şiddetli ve (4) çok şiddetli olarak skorlandı. Boyanma üç kere tekrarlandı. Boyanma şiddetleri H-skor yapılarak istatistiksel olarak ANOVA istatistik testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Toplam boyanan hücre sayısı (%) X (Boyanma şiddeti + 1) formülü ile H-skor, 1 – 500 arasında olacak şekilde değerlendirildi.

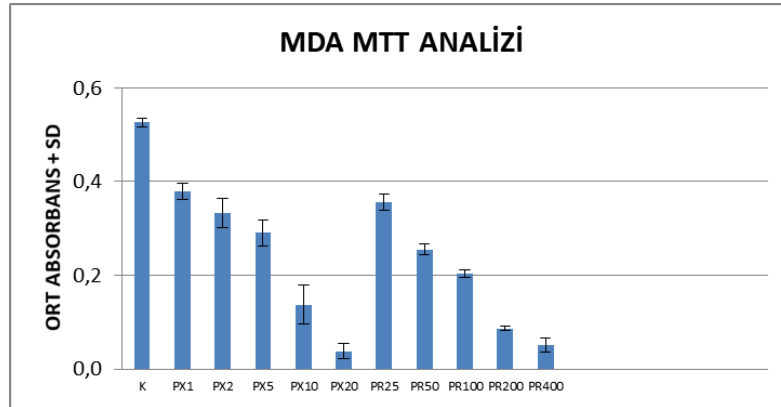
BULGULAR

MDA-MB-231 hücrelerin çoğalma hızının MCF-7 hücrelerine oranla daha hızlı olduğu, tripan mavisi ile hücre sayımı yapılarak ikilenme zamanlarının MDA-MB-231 için 24 saat, MCF-7 için ise 72 saat olduğu belirlendi (Resim 1).



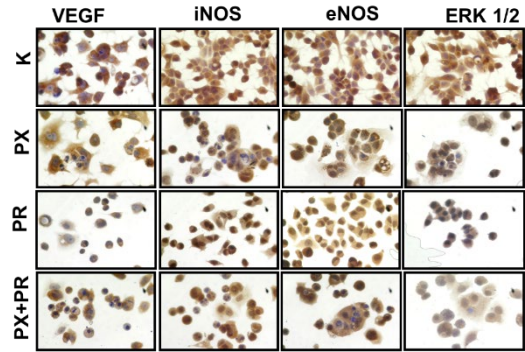
Resim 2. MDA-MB-231 hücre hattının VEGF, iNOS, eNOS ve ERK1/2 primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. X400.

Tablo1. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan Paklitaksel (PX) ve Propranolol (PR) ilaçlarının MTT sonucu elde edilen IC50 dozları.



MTT testi ile hücrelere uygulanacak ilaç dozlarının IC₅₀ değerleri MDA için; PX: 5 nmol, PR: 50 µm ve MCF- 7 için PX: 3,7 nmol, PR: 50 µm olarak bulundu.

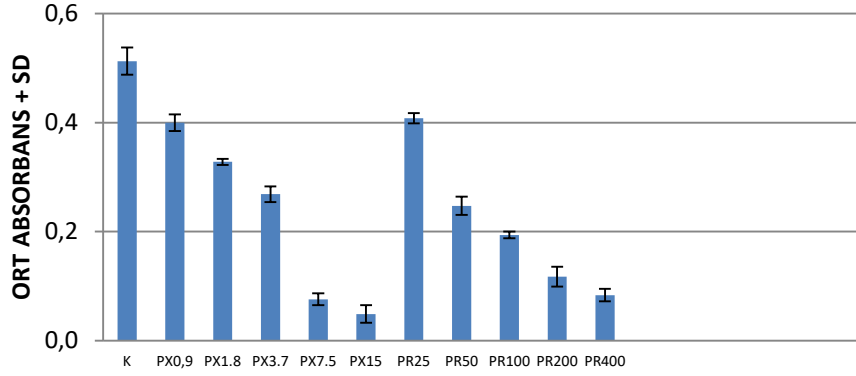
Kontrol grubu MDA-MB 231 meme kanser hücrelerinde VEGF immunoreaktivitesi şiddetli (+++) gözlenirken; PX grubunda orta (++); PR grubunda hafif/orta (+/++) ve PX+PR grubunda ise immunoreaktivite kontrol ve PX gruplarına göre azalmış (+/++) olarak izlendi. iNOS, eNOS ve ERK1/2 sinyal yollarının boyanma şiddeti de PX ve PR gruplarında tedavi edilmeyen gruplara göre azalmıştı (Resim 2). MCF-7 meme kanser hücrelerinde de VEGF, iNOS, eNOS ve ERK1/2 immunoreaktiviteleri şiddetli (+++) gözlenirken; PX ve PR gruplarında boyanma şiddeti azalmıştı. (Resim 3). Tüm immunoreaktivite şiddetleri tablolarda özetlenmiştir (Tablo 3 ve 4).



Resim 3. MCF-7 hücre hattının VEGF, iNOS, eNOS ve ERK1/2 primer antikoru kullanılarak indirekt immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. X400.

Tablo 2. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanan Paklitaksel ve Propranolol ilaçlarının MTT sonucu elde edilen IC₅₀ dozları.

MCF-7 MTT ANALİZİ



Tablo 3. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının H-Skor ve immunoreaktivite değerlendirmesi.

MDA-MB-231	VEGF	iNOS	eNOS	ERK 1/2
K				
İHC şiddeti	+++	++++	++++	+++
H-Skor	330, 362, 380	478, 396, 450	417, 434, 447	339, 326, 320
PX				
İHC şiddeti	++	++	++/+++	+ / ++
H-Skor	242, 238, 250	175, 213, 180	296, 271, 289	195, 178, 185
PR				
İHC şiddeti	+ / ++	++	++	++
H-Skor	195, 180, 176	254, 288, 275	234, 278, 287	235, 286, 275
PX+PR				
İHC şiddeti	+ / ++	++	+ / ++	+
H-Skor	200, 144, 153	277, 262, 241	187, 165, 173	190, 258, 239

Tablo 4. MCF-7 meme kanseri hücre hattının H-Skor ve immunore aktivite değerlendirmesi.

MCF-7	VEGF	iNOS	eNOS	ERK 1/2
K				
İHC şiddeti	+++	++++	++++	+++
H-Skor	350, 392, 330	458, 466, 450	477, 434, 447	309, 326, 320
PX				
İHC şiddeti	++	+ / ++	++	+ / ++
H-Skor	222, 218, 230	195, 173, 190	256, 221, 219	145, 218, 215
PR				
İHC şiddeti	+	++	++	+
H-Skor	135, 180, 126	224, 218, 295	204, 278, 275	105, 96, 175
PX+PR				
İHC şiddeti	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++
H-Skor	100, 214, 153	107, 202, 261	187, 225, 243	190, 178, 219

Tablo 5. MDA-MB-231 hücre hattının immunohistokimyasal değerlendirilmesinin istatistiksel analizi.

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

Tablo 6. MCF-7 hücre hattının immunohistokimyasal değerlendirilmesinin istatistiksel analizi.

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

TARTIŞMA

Çalışmamızda, invitro olarak metastaz ve invazyon açısından farklı olan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre hatlarında; antineoplastik kemoterapötik bir ilaç olan Paklitaksel ile antianjiyogenik olarak bilinen Propranolol uygulamasının anjiyogenez mekanizmalarında yer alan VEGF, NOS ve ERK yolakları ile ilişkisinin indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi yapıldı. Meme kanseri kadınlardaki dört kanserden biri olup kanserden ölümlerin de en sık nedenidir¹³. Meme kanseri tedavisinde seçenekler artmış; tedavide cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonal ve genetik yaklaşımlar uygulanmaktadır³. Hedefe yönelik tedavide, daha çok tümöre özgü olan ve yan etkisi de daha az olan tedaviler amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda meme kanserinin tedavisinde çeşitli kemoterapötik ilaç uygulamaları yapılmakta ancak ilaca karşı duyarsızlık ve çoklu ilaç dirençlerinin gelişmesi nedeniyle, invazyon ve metastazların önlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Kemoterapötik tedavide meme kanserinde kullanılan en önemli ajanlardan biri paklitakseldir¹⁴. Paklitakselin başlıca etki mekanizması, tübülün dimerlerinde mikrotübülleri etkileyerek mikrotübül depolimerizasyonunu durdurmak ve normal hücrel

dinamik reorganizasyonunu inhibe etmektedir. Malign tümörlerin hem büyüme hızını hem de varlıklarını sürdürmelerini sağlayan damarların oluşumunun önlenmesi ve hatta ortadan kaldırılması, son zamanlarda kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak anjiyogenezi ve antianjiyogenik ilaçların geliştirilmesini gündeme getirmiştir¹⁵. Bu açıdan anjiyogenez, tümörün akibeti ve tedavinin hedeflenmesi için anahtar bir süreçtir¹⁶.

Bir beta blokör olarak bilinen ve bu amaçla uygulanan propranolol onkolojide önemli bir aday olarak ortaya çıkmıştır¹⁷. Yapılan çalışmalarda propranololün anjiyogenik mekanizmaları etkileyerek anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir^{18,19,20}. Creed, Le^{21,22} ve arkadaşları Beta-adrenerjik sinyalizasyon, cerrahi stres, kanser proliferasyonu ve metastaz arasındaki bağlantıları kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır. Bu etki mekanizmaları propranololün farklı kanser tedavilerinde - neo-adjuvan, perioperatif ve adjuvan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu mekanizmalar dizisi propranololün birçok kanserde ve özellikle de meme kanserinde önemli bir anti-metastatik ajan olabileceğini desteklemiştir. Yapılan yeni çalışmalar göstermiştir ki kronik stres ve artmış beta-adrenerjik sinyaller akciğerlerde bir "metastatik" niş oluşturmada, böylece akciğer

kanser hücrelerinin kolonizasyonuna yol açmaktadır. Bu niş oluşumu propranolol tarafından inhibe edilmiştir²³. Nagaraja ve meslektaşları diğer yakın zamanlı çalışmalarında beta adrenerjik reseptör sinyali ile tümör stroması arasındaki ilişkiyi araştırmıştır²⁴. Buna göre; meme kanserinde stres sinyali pro-tümör ve prometastatik kanser ilişkili fibroblast ve kollajen birikimine neden olmuş ve bu etki propranolol tedavisi ile ortadan kalkmıştır. Ashrafi ve arkadaşları da fare meme kanseri modelinde propranololün kansere karşı adjuvan bir aşı olarak etkili olduğunu göstermişlerdir²⁵. Propranolol meme kanseri ve başka kanser vakalarında farklı açılardan denenilen yeni bir ajan olması sebebiyle bizim çalışmamızda yer almıştır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) güçlü ve selektif bir endotelial mitojen faktör olup endotel hücrelerin göçü ve çoğalmasında önemli rol oynamaktadır²⁶. Normal ve malign dokuda yeni kan damarı oluşumunu sağlayarak anjiyogenik cevabın tamamlanmasını sağlayan bir sinyal proteini²⁷. VEGF'in meme kanseri hücreleri ve meme stromal hücrelerinden salgılandığı gösterilmiş olup, bu da VEGF'in meme kanseri gelişimi ve anjiyogeneizde aktif rol oynadığını göstermektedir²⁸.

Nitrik oksid'in (NO) endotel hücre büyümesi, apoptoz, göç ve özellikle anjiyogeneiz üzerine önemli farklı biyolojik fonksiyonları olduğu gösterilmiştir²⁹. Bunun sebebi NO diğer serbest radikaller, metal, iyon ve proteinlerle etkileşime girer. Ayrıca fonksiyonu; konsantrasyon, hücre tipi ve genetik yapıya bağlı olduğu için, karsinogeneizdeki spesifik rolünü tespit etmek zordur. iNOS (NOS2) salgısının çeşitli insan kanserlerinde arttığı bulunmuştur³⁰. Kronik inflamasyonun tümör gelişimi ve kanserin ilerlemesine yol açtığı bilinmektedir. iNOS da kronik inflamasyona bağlı kanserin ilerlemesinde önemli bir proinflamatuvar medyatördür³¹. Birçok çalışmada iNOS potansiyel bir kanser belirteci olarak kullanılmış ve tümörde eksprese edilen yüksek iNOS'un melanom, prostat ve meme kanseri gibi birçok kanser tipinde hastanın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir^{32,33}. Ayrıca, proinflamatuvar mikroçevre ile de ilişkili olan iNOS direk olarak pAkt seviyesi, p-kaspaz-9 ve pBAD'ı içeren yolakları meme kanseri tümörlerinde aktive etmektedir^{34,35}.

eNOS (NOS3) NOS'un tümör vasküler endotel hücrelerinde etkili olan başlıca izoformudur. Brouet ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kaveolin-1

tarafından bazal eNOS'un inhibe edilmesi eNOS'u parçalayan bir proteininin, tümördeki NO-bağımlı kan akımını azalttığı ve tümörün büyümesini geciktirdiği gösterilmiştir³⁶. eNOS aktivasyonu proanjiyogenik VEGF tarafından endotel hücre fosforilasyonu ile olabilmektedir³⁷. VEGF'in uyarılmasına cevap olarak fosfoinositol 3-kinaz (PI3K) ve ardından Akt fosforilasyonu olmaktadır³⁸. Akt aktivasyonu direk olarak eNOS'u fosforile etmekte ve buda geçici olarak NO artışına yol açmaktadır³⁹. Bizim çalışmada da iNOS ve eNOS sentezinin kanserli hücrelerde artmış olmasına rağmen ilaç verilen gruplarda azalmasının VEGF'e yanıt olarak Akt ve ERK fosforilasyonu sonucu olduğu düşünüldü.

VEGF endotel hücrelerinde MEK-ERK yolğunun güçlü bir aktivatörüdür⁴⁰. Bresslin ve arkadaşları yaptıkları in vitro bir çalışmada VEGF'in ERK1/2 ve NO tarafından da etkinliğinin arttığını yani bu yolların etkileşim içinde olduklarını ve sonuçta anjiyogeneizde önemli olduklarını vurgulamışlardır⁴¹. ERK1/2'nin anjiyogeneiz ile ilişkisine bakılan farklı bir çalışmada VEGF'in Ras yolagını aktive ettiği bu aşamanın VEGF tarafından uyarılmasının anjiyogeneiz, migrasyon gibi hücrel değişiklikler için gerekli olduğu gösterilmiştir⁴². Endotel hücreleri anjiyogeneizde, dokuda oluşan iskemiye yanıt olarak meydana gelen fizyolojik ve patolojik yeni damar oluşumunda ve tümör büyümesi ve metastazda kritik rol oynamaktadırlar⁴³. In vitro olarak planlanan çalışmamızda kullandığımız anjiyogenik yolların meme kanseri hücre hatlarında artmış olmasına rağmen ilaç gruplarında azalmış olması uygulanan ilaçların bu yollar üzerinden etki ederek anjiyogenezi azaltabileceğini düşündürdü.

Propranolol ile ilgili yapılan bir kaç çalışmada β -adrenergik blokajın ERK/AKT yolagını etkileyerek güçlü bir antiproliferatif etki gösterdiği vurgulanmıştır^{44,45}. Ayrıca Seya ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada umblikal ven endotel hücrelerine Propranolol uygulamasının VEGF, NOS, ERK yollarına etkisine bakılmış olup ilacın bu yolları baskıladığı gösterilmiştir⁴⁶. Çalışmada; Propranolol uygulanan kanser hücre hatlarında VEGF, NOS ve ERK1/2 olan anjiyogenik yollarındaki boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu görüldü. Bunun da özellikle hemanjiyom tedavisinde kullanılan Propranololün β -blokör etkisinden dolayı meydana gelen

vazokonstriksiyon ve antianjiyogenik olaylar sonucunda oluştuğu düşünüldü. Propranololün Paklitakselle kombine uygulandığı gruplarda da yine kontrol grubuna göre immunoreaktivite şiddetinde azalma oldu ancak bu azalmanın Propranololün tek uygulandığı gruplara göre anlamlı bir farklılık göstermedi. Pasquier ve arkadaşlarının Propranolol ve kematerapatik olarak 5-fluorouracil (5-FU) veya Paklitaksel uyguladıkları meme kanseri hücre hatları dahil farklı hücre hatlarında Propranololün antianjiyogenik etkisinin kombine uygulanan gruplarda daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu çalışmada uygulanan paklitaksel dozları yüksek doz olarak uygulanmış olup düşük doz uygulandığında kombinasyonun anlamlı bir fark göstermediği görülmüştür⁴⁷.

Çalışmada; meme kanseri hücre hatlarında VEGF, ERK1/2 ve NOS yolakları incelenmiştir. Tüm bu yolakların immunohistokimyasal incelenmesi sonucunda kontrol grubu olarak seçtiğimiz MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarında artmış immunoreaktivite göstermişlerdir. Ancak iki hücre hattı arasında bu yolaklarda immunoreaktivitenin şiddeti açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. In vitro şartlarda kanser hücrelerinin çoğalma ve anjiyogenik faktörleri salgılamak için aktive olabildikleri ancak in vivo şartlarda, farklı mikroçevrede invazyon yönünden farklı davranış özellikleri sergileyebilecekleri düşünülmüştür.

Çalışmamızın kısıtlılıkları; immunohistokimyasal olarak bakılan yollaklara Western blot ile de bakılarak bulgularımız desteklenememiştir. Ayrıca MTT cihaz ile değil manuel olarak yapılmıştır. Bunun sebebi iki cihazın da bu deney sırasında laboratuvarımızda bulunmamasıdır.

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

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: FŞ, Sİ; Veri toplama: FŞ; Veri analizi ve yorumlama: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Yazı taslağı: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; İçeriğin eleştirilme incelenmesi: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Son onay ve sorumluluk: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Teknik ve malzeme desteği: S; Süpervizyon: FŞ, Sİ; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design: FŞ, Sİ; Data acquisition: FŞ; Data analysis and interpretation: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Drafting manuscript: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Critical revision of manuscript: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Final approval and accountability: FŞ, Sİ, SM, SV, KÖ, İT; Technical or material support:; Supervision: FŞ, Sİ; Securing funding (if available): n/a.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

1. Aslan FE, Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *J Breast Health*. 2007;3:63-8.
2. Aydınтуğ S. Meme kanserinde erken tanı. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. 2004;226-8.
3. Sayek I. *Temel Cerrahi*: Ankara, Güneş Kitabevi, 2004.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-6.
5. Jensen HM, Chen I, DeVault MR, Lewis AE. Angiogenesis induced by "normal" human breast tissue: A probable marker for precancer. *Science*. 1982;218:293-5.
6. Miller K, Sledge GW. Dimming the blood tide. Angiogenesis, antiangiogenic therapy and breast cancer, in *Breast Cancer Management Application of Clinical and Translational Evidence to Patient Care*, 2nd ed. (Ed JM Nabholz):287-308. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
7. Yazır Y. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF): reseptörleri ve fonksiyonları. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2007;29:128-36.
8. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riverosmoreno V, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res*. 1994;54:1352-4.
9. Daouti S, Wang H, Li WH, Higgins B, Kolinsky K, Packman K et al. Characterization of a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor with a Unique Mechanism of Action for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2009;69:1924-32.
10. Zhu L, Xie J, Liu Z, Huang Z, Huang M, Yin H et al. PEDF/VEGF ratio plays a crucial role in the spontaneous regression of infant hemangioma and the therapeutic effect of propranolol. *Cancer Sci*. 2018; doi: 10.1111/cas.13611.
11. Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun*. 2009;23:10-5.
12. Liu Y, Yu X, Zhuang J. Epinephrine Stimulates cell proliferation and induces chemoresistance in myeloma cells through the β -Adrenoreceptor in vitro. *Acta Haematol*. 2017;138:103-10.
13. Özmen V. Dünya'da ve türkiye'de meme kanseri. *The Journal of Breast Health*. 2008;7-9.
14. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and

- structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971;93:2325–7.
15. Bouck N, Stellmach V, Hsu S.C. How Tumors Become Angiogenic. *Adv Cancer Res.* 1996;69:135-74.
 16. Luengo-Gil G, Gonzalez-Billalabeitia E, Perez-Henarejos SA, Navarro Manzano E, Chaves-Benito A, Garcia-Martinez E et al. Angiogenic role of miR-20a in breast cancer. *PLoS One.* 2018; doi: 10.1371/journal.pone.0194638.
 17. Pantziarka P, Bryan BA, Crispino S, Dickerson EB. Propranolol and breast cancer—a work in progress. *Ecancermedicalscience.* 2018;12:ed82.
 18. Storch C H, Hoeger P H. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br J Dermatol.* 2010;163:269-74.
 19. Rico M, Baglioni M, Bondarenko M, Laluce NC, Rozados V, André N et al. Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. *Oncotarget.* 2017;8:2874-89.
 20. Rivero EM, Piñero CP, Gargiulo L, Entschladen F, Zänker K, Bruzzone A et al. The β 2-Adrenergic agonist salbutamol inhibits migration, invasion and metastasis of the human breast cancer MDA-MB-231 cell line. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;17:756-66.
 21. Creed SJ, Le CP, Hassan M, Pon CK, Albold S, Chan KT et al. β 2-adrenoceptor signaling regulates invadopodia formation to enhance tumor cell invasion. *Breast Cancer Res.* 2015;17:145.
 22. Le CP, Nowell CJ, Kim-Fuchs C, Botteri E, Hiller JG, Ismail H et al. Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat Commun.* 2016;7:10634.
 23. Chen H, Liu D, Guo L, Cheng X, Guo N, Shi M. Chronic psychological stress promotes lung metastatic colonization of circulating breast cancer cells by decorating a pre-metastatic niche through activating β -adrenergic signaling. *J Pathol.* 2018;244:49–60.
 24. Nagaraja AS, Dood RL, Armaiz-Pena G, Kang Y, Wu SY, Allen JK et al. Adrenergic-mediated increases in INHBA drive CAF phenotype and collagens. *JCI Insight.* 2018;7:11-14.
 25. Ashrafi S, Shapouri R, Shirkhani A, Mahdavi M. Anti-tumor effects of propranolol: Adjuvant activity on a transplanted murine breast cancer model. *Biomed Pharmacother.* 2018;104:45-51.
 26. Ferrara, N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36:127-37.
 27. Wang B, Shen J, Wang Z, Liu J, Ning Z, Hu M. Isomangiferin, a novel potent vascular endothelial growth factor receptor 2 kinase inhibitor, suppresses breast cancer growth, metastasis and angiogenesis. *J Breast Cancer.* 2018;21:11-20.
 28. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1041-56.
 29. Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Müller-Esterl W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J.* 2006;396:401-9.
 30. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:587-96.
 31. Wink DA, Ridnour LA, Hussain PS, Harris CC. The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric oxide.* 2008;19:65–7.
 32. Brennan PA, Dennis S, Poller D, Quintero M, Puxeddu R, Thomas GJ. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008;30:208–14.
 33. Somasundaram V, Basudhar D, Bharadwaj G, No JH, Ridnour LA, Cheng R et al. Molecular mechanisms of nitric oxide in cancer progression, signal transduction and metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2018; doi: 10.1089/ars.2018.7527.
 34. Prueitt RL, Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Thomas DD, Ying L et al. Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;120:796-805.
 35. Villegas SN, Gombos R, García-López L, Gutiérrez-Pérez I, García-Castillo J, Vallejo DM et al. PI3K/Akt cooperates with oncogenic notch by inducing nitric oxide-dependent inflammation. *Cell Rep.* 2018;22:2541-49.
 36. Brouet A, DeWever J, Martinive P, Havaux X, Bouzin C, Sonveaux P et al. Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *FASEB J.* 2005;19:602-4.
 37. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299:818-24.
 38. Lai H, Fu X, Sang C, Hou L, Feng P, Li X et al. Selenadiazole derivatives inhibit angiogenesis-mediated human breast tumor growth through suppressing VEGFR2-mediated ERK and AKT signaling pathway. *Chem Asian J.* 2018, doi:10.1002/asia.201800110.
 39. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399:597-601.
 40. Strowski M, Z, Cramer T, Schafer G, Juttner S, Walduck A, Schipani E et al. *Helicobacter pylori*

- stimulates host vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) gene expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB J.* 2004;18:218-20.
41. Breslin J. W, Pappas P. J, Cerveira J. J, Hobson R. W, Duran W. N. VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK- 1/2 and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:92-100.
 42. Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem.* 2001;49:289-98.
 43. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389-95.
 44. Annabi B, Vaillancourt-Jean E, Weil AG, Béliveau R. Pharmacological targeting of β -adrenergic receptor functions abrogates NF- κ B signaling and MMP-9 secretion in medulloblastoma cells. *Onco Targets Ther.* 2010;3:219-26.
 45. Montoya A, Amaya CN, Belmont A, Diab N, Trevino R, Villanueva G et al. Use of non-selective β -blockers is associated with decreased tumor proliferative indices in early stage breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8:6446-60.
 46. Seya Y, Fukuda T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2006;553:54-60.
 47. Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino FR, Pouchy C et.al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and antitumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget.* 2011;2:797-809.