



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ KÖK HÜCRE (BENZERİ) KÜLTÜRLERDE KANSER İLAÇLARININ ETKİNLİĞİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

GÖZDE KOYGUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Da

ARALIK/2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır
YÜKSEK LİSANS

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

GÖZDE KOYGUN

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ KÖK HÜCRE (BENZERİ) KÜLTÜRLERDE KANSER İLAÇLARININ ETKİNLİĞİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Gözde KOYGUN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Meltem DEMİREL KARS
2015, 90 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Meltem DEMİREL KARS
Prof. Dr. Mehmet ARTAÇ
Yrd. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Tez araştırmasının amacı meme kanseri hastalarının tümör dokularından elde edilmiş olan meme kanseri primer kök hücre (benzeri) kültürlerde trastuzumab ile karboplatin ve paklitaksel kombinasyonlarının etkinliğini ayrıca HER2, sitokin ve matriks metalloproteinaz ifadelerini değerlendirmektir. Histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde HER2 pozitif olarak sınıflandırılan hastalardan üretilen primer kültür popülasyonunda HER2 negatif hücre oranın belirlenmesi trastuzumab tedavisi sırasında görülen dirençliliği açıklamayabilmeyi sağlayacaktır. Primer kültürden saflaştırılmış olan $CD44^+/CD24^-/ALDH^+$ hücreler kanser kök hücresi (benzeri) hücreler olarak adlandırılmıştır. Kültüre edilen hücrelerde ($CD44^+/CD24^-/ALDH^+$ tip kültür meme kanseri hücreleri) antikanser ilaçlarının etkinliği, HER2 reseptörü ifadesi, sitokinlerinin ifadeleri ve metastatik hücre belirteçleri olan matriks metalloproteazların ifadeleri moleküler yöntemlerle (akım sitometri ve protein array) belirlenmiştir. Meme kanseri primer kültür popülasyonu % 34,6 HER2 pozitif, % 6,4 HER2 negatif meme kanseri kök hücresi benzeri popülasyon içermektedir. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 proteinleri $HER2^+$ KKH'lerde primer kültüre göre 1.30 – 2.42 kat daha fazla ifade edilmektedir ($p< 0.05$). Sitokin ifadelerini incelediğimizde ise HER2 pozitif meme kanseri kök hücre benzeri kültürlerde primer kültüre göre önemli bir fark gözlenmemiştir. HER2 pozitif ve HER2 negatif kanser kök hücre (benzeri) kültürlerine ilaçların tek tek ve kombinasyonları uygulanarak, her kültür tipi için

uygulanan ilacın IC_{50} konsantrasyonları ve ilaç etkileşimleri belirlenmiştir. Herseptin (Trastuzumab) HER2 pozitif kanser kök hücre (benzeri) hücrelere HER2 negatif alt kültüre olduğundan daha etkili olmuştur. Paklitaksel ve karboplatinde ise bu durum söz konusu değildir. Paklitaksel ve karboplatin kombinasyonu tüm alt kültürlerde sinerjik etki gösterirken, trastuzumab ise karboplatinle kombinasyonlarda alt kültürlerde sinerjik veya aditif etkileşim göstermiştir.

Sonuçlar değerlendrildiğinde meme kanserinde HER2 hedefli tedavilerde tümörde bulunan HER2 negatif kanser kök hücrelerinin tedavinin ve tadaviye yanıtın seyrini değiştirebilecek önemli bir faktör olduğu anlaşılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: HER2, hücre saflaştırma, karboplatin, meme kanseri, paklitaksel, primer kök hücreler, trastuzumab

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISMS OF ANTICANCER DRUG EFFICIENCY ON BREAST CANCER STEM CELL LIKE CULTURES

Gözde KOYGUN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN NANOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERIALS
Advisor: Assoc. Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS
2015, 90 Pages

Jury
Assoc. Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS
Prof. Dr. Mehmet ARTAÇ
Yrd. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

The aim of this study was to isolate breast cancer stem-like cells from HER2 negative and HER2 positive patients, by establishing their primary breast cancer stem cell cultures, The other main objective was to determine the effects of Trastuzumab, Paclitaxel and Carboplatin on sub cultures. Additionally investigaiton of HER2, cytokine and matrix metalloproteinase status of these cells was intended. The source of primary culture was histopathologically classified as HER2 positive. Determination of HER2-negative cell population ratio in primary culture will provide a description of trastuzumab resistance occurs during treatment. $CD44^{+}/CD24^{-}/ALDH^{+}$ cells were isolated from primary breast cancer cultures which are called breast cancer stem cells. The cultured cells (CD44 + / CD24- / ALDH-type culture of breast cancer cells) were identified by using molecular methods (flow cytometry and protein arrays) to determine the effects of anticancer

drugs, HER2 receptor expression, expression of cytokines and expression of matrix metalloprotease with metastatic cell markers. Breast cancer primary culture include 34.6% HER2 positive and 6.4% of HER2-negative cancer stem cell-like population. The $HER2^{+}$ cancer stem cells were expressed 1.30 - 2.42 fold higher than primary cell cultures in MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 proteins ($p < 0.05$). When we examined the expression of cytokines, HER2 positive breast cancer stem cells did not significantly overexpress the cytokines when compared to primary cancer cells population. HER2 negative and HER2 positive breast cancer stem cells were treated with trastuzumab, paclitaxel, carboplatin and combination of these anticancer agents. The IC_{50} levels of the drugs were determined for all of these breast cancer stem cell subgroups. Trastuzumab (Herseptin) was more effective on HER2 positive cancer stem (like) cells than HER2 negative sub-culture. This situation was not same for paclitaxel and carboplatin. As Paclitaxel and carboplatin exhibited synergistic effects in all sub-cultures, Paclitaxel- Herceptin binary application showed antagonistic effects. Herceptin combinations with carboplatin demonstrated synergistic-additive interaction in the sub-culture.

When the results were analyzed, it can be deduced that the HER2-negative breast cancer stem cells in tumor can change the response to the treatment in HER2-targeted therapies.

Keywords: Breast cancer, carboplatin, cell sorting, Herceptin, HER2, paclitaxel, primary stem cells

ÖNSÖZ

Bu çalışma TÜBİTAK 113S559 nolu proje ve Selçuk Üniversitesi 15201017 nolu BAP projesi ile desteklenmiştir. Tez çalışması Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinin altyapısı kullanılarak yürütülmüştür.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her ne koşulda olursa olsun desteğini esirgemeyen, bilimsel, teknik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitimime değerli katkılar sağlayan ve destekleri için kendilerine minnet duyacağım saygı değer tez danışmanı hocam **Doç. Dr. Meltem DEMİREL KARS'a**,

Tez çalışmalarım boyunca primer kanser kök hücre hattının temini ve üstün bilgilerini benimle paylasan sayın hocam **Prof.Dr. Mehmet ARTAÇ'a**

Ayrıca flowsitometri analizlerinde bana yardımcı olarak tezime farklı bir boyut kazandıran Selçuk Üniversitesi immünoloji ABD'ından saygıdeğer hocam **Doç. Dr. Hasibe ARTAÇ** ve **Uzman Ayça CEYLAN' a**,

Teknik bilgi ve malzeme yardımlarıyla destek veren **İLTEK** ve **çalışanlarına**,

Pozitif enerjileri ile bana ilham veren ve çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan yüksek lisans arkadaşlarıma,

Maddi manevi tüm güçlüklere karşı her zaman yanımda olan, beni özveri ile yetiştiren, haklarını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim sevgili ailem'e özellikle babam **Cemil KAYADİBİ** ve annem **Gülhan KAYADİBİ'ye**,

Gerek çalışmalarımda gerekse sosyal hayatımda tüm olumlu ve olumsuz olaylarda eksikliğini hiç hissetmediğim, her konuda desteğini aldığım sevgili eşim **Mustafa KOYGUN'a**.

Sonsuz teşekkürler…

GÖZDE KOYGUN
KONYA - 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vii**

İÇİNDEKİLER ..... **viii**

1.GİRİŞ **1**

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi 1
1.2. Araştırmanın Hipotezi 1
2.1.Kanser 3
2.2. Meme Kanseri 4
2.2.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması 5
2.3. Kök Hücreler 6
2.4. Kanser kök hücreleri 8
2.4.1. Meme Kanseri kök hücre belirteçleri 10
2.4.2.CD24 10
2.4.3.CD44 11
2.4.4. HER2/neu Proteini 12
2.5. Kanser tedavi yöntemleri 15
2.5.1. Radyoterapi 15
2.5.2. Kemoterapi 16
2.5.3.Kemoterapotiklerin Etki Mekanizmaları 16
2.6. İlaç dirençliliği 20
2.7. Matriks Metaproteazlar 22
2.7.1. MMP'lerin yapısı 23
2.7.2. MMP Türleri 24
2.7.3. Metaloproteinazların Sınıflandırılması 25
2.7.4.TIMP'ler (matriks metalloproteinaz doku inhibitorleri) 30
2.7.5. Matriks Metalloproteinazlar Ve Kanser İlişkisi 31
2.8. Sitokinler 32
2.8. 1.Sitokinlerin Sınıllandırması 32
2.8.2.Sitokin Etkilerinin Moleküler Fizyolojisi 33
2.8. 3.Sitokin Reseptörleri 34
3.2. Yöntem 37
3.2.1. Hücre Kültürü 37
3.1.2. Kanser Kök Hücre (benzeri) Hücrelerinde Moleküler Analizler 41

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **47**

4.1.Primer Kültürlerin Üretilmesi 47
4.2. Primer kültürlerden kanser kök hücrelerinin seçilmesi 48
4.3. Kanser kök hücrelerinde moleküler analizler 54
4.3.3. Protein Array Çalışmaları (MMP Ve Sitokinlerin Hücrelerdeki İfade Miktarlarının Belirlenmesi) 62

5.1 Sonuçlar..... 69
5.2 Öneriler..... 69

KAYNAKLAR..... 70

TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo2.4.1 Kanser kök hücrelerin normal kök hücreler ile benzer özellikleri (Matsui W, Wang Q, Wicha MS, Liu S 2008-2011)

Tablo 2.4.1. 1. Dokuya özgü kanser kök hücre belirteçleri

Şekil 2.4.4.1 HER2 reseptörü sinyal iletim sistemi ve transtuzumab etki mekanizması (Colombo, 2010).

Tablo 2.5.3.1. Kanser İlaçlarının Sınıflandırılması

Şekil 2.5.3.1. Paklitaksel'in yapısı. (Andersen, A.,2006)

Şekil.2.5.3.2.1. Karboplatin'in yapısı. Rose, David (October 6, 2008).

Şekil 5.3.3.1. Trastuzumab (Herceptine) moleküler yapısı (Alain Beck, 2010, http://www.discoverymedicine.com/)

Tablo 2.7.3.1 MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması (Reel, B.,2006).

Tablo 2.7.3.2.1. Jelatinazların salıverilmesini etkileyen faktörler (Johansson N, Ahonen M,2000).

Tablo 3.1.2.2.1. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan gereçler

Tablo 3.1.1.3.1. H3, H3-1, H3-2, ve H3-3 hücrelerinin üretileceği kültür ortamını içeriği.

Tablo 3.1.2.1.1 7AAD, CD44, CD24 VE HER2 için boyama miktarı

Tablo3.1.2.1.2 Akım sitometri ile saflaştırılan hücre grupları

Şekil 3.1.2.3.1. Abcam MMP ve sitokin protein array protokolü

Tablo 4.1.1. Meme Kanserli Hastanın demografik özellikleri

Şekil 4.1.1 Primer hücre-H3 mikroskopik görünümü (Leica, 10X objektif)

Şekil. 4.2.1 Farklı hastalardaki meme kanserinin birbirlerinden farklı olduğu gibi, aynı hastanın meme kanseri de genetik, morfolojik ve biyolojik davranış özellikleri açısından birbirlerinden farklılık gösterebilir (Meric-Bernstam F,2012).

Şekil 4.2.2. Meme kanseri primer kültür hücrelerinde flow sitometri analizi, kanser kök hücrelerinde HER2 ifadesinin analizi.

Şekil 4.2.3. Meme kanseri primer kültür hücrelerinde flow sitometri analizi, kanser kök hücrelerinde ALDH pozitif popülasyonun analizi.

Şekil 4.2.4 Primer hücrelerin mikroskopik görünümleri (Leica, 10X objektif)

Tablo 4.2.1. Akım sitometri ile izole edilen hücre grupları

Tablo. 4.2.2 Flow sitometri analizi, kanser kök hücrelerinde HER2 ifadesinin analizi

Şekil 4.3.1.1 H3, H3-1, H3-2, ve H3-3 için tekli kemoterapi tedavi çalışmaları IC50 değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1.1. Hücrelere tekli kemoterapötik ilaçların etkileri, ilaçların IC_{50} değerleri (μM) (a, b, c, d, e, f, g grupları arasında $p<0,05$'tir).

Şekil 4.3.1.2. A.H3 – Medium kontrol, , B. H3 – 100 uM Paklitaksel, C. 50 uM paklitaksel, D. 25 uM paklitaksel, E.12.5 uM paklitaksel, F.0.390625 uM paklitaksel, G. 0.19631 uM paklitaksel yüksek dozdan düşük doza yatay olarak seyreltilmiştir (10X objektif).

Tablo 4.3.1.2. Hücrelerde çoklu ilaç kombinasyonlarının etkileşimleri.

Şekil 4.3.2.1 Bradford analizinde kullanılan protein (BSA) Standard eğrisi

Tablo 4.3.2.1 BSA standart eğrisine göre hesaplanan hücre protein konsantrasyonları

Tablo 4.3.3.1 Proteinlerin membranlarda lokalizasyonu a) MMP protein array membran haritası, b) Sitokin array membran haritası.

Şekil 4.3.3.1. Protein array membranları ve protein spotları a) Human MMP protein array- H3 primer kültürü b) Human MMP protein array- H3-1 kök hücre kültürü (CD44+24-HER2+) c) Human cytokine protein array- H3 primer kültürü d) Human cytokine protein array H3-1 kök hücre kültürü (CD44+24-HER2+).

Şekil 4.3.3.2. H3-1 /H3 MMP ifadelerinin oranları.

Şekil 4.3.3.3. H3-1 /H3 Sitokinlerin ifadelerinin oranları.

Tablo 4.3.3.2 MMP ve sitokinlerin densitometrik analiz sonuçları tablosu.

GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Meme kanseri mortalitesinde son 10 yılda belirgin bir azalma kaydedilmiştir (Berry ve ark., 2005). Mortalitede bu azalma erken teşhis ve etkili adjuvan tedavilerin kullanımıyla ilişkilidir. Özellikle HER2 pozitif meme kanserlerinde trastuzumabın kullanılması sağkalım sürelerinin uzamasında belirgin rol oynamıştır (Paik ve ark., 2008). Fakat bütün bu gelişmelere rağmen tedavilere direnç gelişmekte ve hastalarda bir süre sonra relaps ortaya çıkmaktadır. Relaps sonrası gelişen metastatik meme kanseri hala kür sağlanamayan ölümcül bir hastalıktır. Bu nedenle, meme kanserinde yeni tedavilerin veya tedavi stratejilerinin geliştirilmesine gerek vardır.

Bu araştırmada amaç, meme kanseri CD44 pozitif ve CD24 negatif fenotipi taşıyan, kök hücre benzeri hücrelerde trastuzumab ve kombinasyon tedavilerinin etkinliğini belirleyen hücresel faktörleri ortaya koymaktır. Çalışma sonunda meme kanseri kök hücrelerinde hangi kemoterapötik kombinasyonun daha etkili olduğunu gösteren sonuçlar ortaya koyulmuştur. Ayrıca kanser kök hücrelerin protein ifade profilleriyle tedaviye verdikleri yanıt ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle tezden elde edilen olan bulguların hem literatür için hem de klinisyenleri yönlendirme açısından önemli olabilir.

1.2. Araştırmanın Hipotezi

Bu araştırmanın hedefi HER2 pozitif veya negatif meme kanseri kök hücrelerinde trastuzumab ve/veya kombinasyon tedavilerinin etkinliğini belirleyen hücresel faktörleri ortaya koymaktır. HER2 hedefli tedavilerin meme kanseri kök hücrelerini de hedefleyebileceği konusu literatürde oldukça yeni bir konudur. Araştırmanın hipotezi '**Histopatolojik olarak HER2 pozitif tanısı koyulan hastadan oluşturulan meme kanseri kök hücre benzeri hücre popülasyonunda tedavinin kısıtlanmasına neden olabilcek HER2 negatif kök hücre benzeri hücreler vardır**' dır. Çalışmada histopatolojik olarak HER2 pozitif hasta dokusundan saflaştırılmış olan kök hücre grubunun ifade ettiği proteinler ile trastuzumab tedavisi ve kombine tedaviye hücrelerin verdiği yanıt ilişkilendirilmiştir. Meme kanseri primer kök hücrelerinin elde edilmesi ülkemiz açısından yeni ve özgün bir teknolojidir. Çalışma sonunda popülasyonda var olan HER2 pozitif ve negatif meme kanseri grubunda hangi kemoterapötik kombinasyonun daha etkili olduğunu gösteren ipuçlarını

verilmiştir. Ayrıca HER2 pozitif meme kanseri hastalardan elde edilen kök hücrelerin protein ifade profilleriyle tedaviye verdikleri yanıt ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle kurulan hipotez hem literatür için hem de klinisyenleri yönlendirmek açısından değerli ve özgündür.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Kanser

Kanser dünya çapında en çok ölüm oranına sahip hastalıklarından biridir. 2007 de dünya çapında 7.021.000'nin üzerinde ölüme neden olmuştur ve ölümlerin %12,5'ine neden olan ikinci ölümcül hastalıktır (Garcia, M., Jemal, A.,2007).

Kanser yaşamının herhangi bir döneminde, vücudun herhangi bir organında başlayabilmekte ve herkesi etkileyebilmektedir. Vücudumuzdaki tüm organlar, gerektiği zaman yenilerini oluşturmak üzere bölünen hücrelerden meydana gelmektedirler. Bütün kanser türleri hücrede başlar. Kanseri anlamak için normal hücreler, kanser hücresine dönüşürken meydana gelen mekanizmayı anlamak önemlidir. Vücut çok farklı tiplerde hücrelerden bir araya gelmiştir. Bu hücreler büyür ve canlılığın devamını sağlamak için kontrollü olarak bölünürler. Hücreler zarar gördüğünde veya yaşlandığında, ölürler ve yerlerini yeni hücreler alır. Bununla birlikte, bazen bu düzenli döngü yanlış gidebilir ve hücrenin genetik materyali (DNA) zarar görebilir veya değişime uğrayabilir, mutasyona uğramak normal hücrelerin büyümesi ve bölünmesini etkiler. Kontrolsüz şekilde bölünen hücrelerin oluşturduğu bu doku kitlesine tümör denir. Tümörler benign veya malign olabilir.

- Benign tümörler uzaklaştırılabilir ve çoğu vakada nüksetmezler. Benign tümör hücreleri vücudun başka bölgelerine yayılmazlar.
- Malign tümör hücreleri yakın dokulara ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Kanserin, vücudun bir bölgesinden başka bir bölgeye yayılmasına metastaz adı verilir.

Hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengenin kontrolsüz olduğu noktada kanser karşımıza çıktığı için, ya hücre proliferasyonunun artmış hızı ya da hücre ölümünün (apoptoz) azalmış hızı kansere yol açabilmektedir(Ulutin T,2014). Hücrelerimizin yaşam süreleri boyunca DNA'sında meydana gelen dinamik değişiklikler sonucu beliren, genomun bir hastalığı olarak da kanseri tanımlamak da mümkündür (Li X., L. M. T., Huang J., 2003).

Kanserin nedenleri, hala tam olarak bilinememektedir. Genellikle, kanser oluşumu birtek sebeple birlikte düşünülmemelidir. Karsinojenler, kimyasal, fiziksel veya viral kaynaklı olabilirler. Kimyasal karsinogenez, boya, kimyasal, deri ve petrol ürünlerinin üretimi sırasında DNA'nın hasarlanması sonucu oluşmaktadır. Tütün, alkol, kimyasal katkı maddeleri, atmosferik ve su kirleticilerinin de kanserle bağlantılı olduğu gösterilmiştir.

Fiziksel karsinogenez ise, radyasyon ve UV ışık aracılığıyla DNA'da meydana gelen hasar sonucu oluşmaktadır. Radyasyonun, DNA'nın kimyasal bağlarında kırıklara yol açarak mutasyona neden olursa direkt etki, hücredeki diğer moleküllere zarar vererek serbest radikal oluştururursa indirekt etki göstermiş olduğu belirtilmiştir(Osman B, Kara A,2012).

DNA'nın genetik istikrarsızlığı, DNA metilasyonu gibi epigenetik faktörler ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar da kanser gelişiminde rol oynamaktadır (Sinici G.2003). Kanser hücreleri benzer morfoloji gösterseler de genetik yapı ve özellikleri birbirinden farklı olabilmektedir. Bu nedenle benzer morfolojik yapıda tümör dokuları olmasına rağmen uygulanan aynı ilaç terapisi bireyden bireye farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu durumda bireye ve o tümör dokusuna özgü ilaç tedavisinin planlanması gündemde tutulmaktadır (Çolakoğulları M., 2004).

Toplumda her beş kişiden biri, yaşantısının bir döneminde kanser ile karşılaşmaktadır (Güran K, 2005). Tüm yeni tedavi yaklaşımlarına karşın, halen kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır (Güran K., 2005). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre, dünyada kanserden ölenlerin sayısı 2004 yılında 7,4 milyondur. Bu rakamın 2030 yılında 11,8 milyona yükselmesi beklenmektedir (World Health Statistics, 2008).
Günümüzde kanser düşüncesi birçok insanda korkuya sebep olmasının yanı sıra tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle, erken tanı konulduğunda çoğu kişinin yaşam süresini uzatma imkânı vardır. Bu nedenle, yapılacak en önemli hamlelerden birisi, toplumların kendi içinde kanser riski taşıyan faktörleri ortaya çıkarması, risk gruplarını değerlendirmesi, tarama programlarını yaygınlaştırması, ilaç ve ilaç salınımı yolaklarının geliştirmesini daha çok aktifleştirmek olacaktır. (Kılıç, Sağlam ve Kara, 2009). Tüm dünyada erkekler arasında en sık rastlanan kanser çeşidi akciğer kanseri iken, kadınlar arasında en sık karşılaşılan kanser türü meme kanseridir (Hakan D. ve İlker A., 2003). Meme kanseri tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır.

2.2. Meme Kanseri

Meme, süt bezleri ve burada üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan meydana gelir. Bu süt bezleri ve kanalları kaplayan hücrelerin, kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun farklı bölgelerine giderek çoğalmalarına **meme kanseri** adı verilir. Meme kanseri klinik davranışı, klinik sonucu ve kanserin biyolojik doğası gereği heterojen bir hastalık olarak ifade edilir. Hastalığın kısa ya da uzun seyri ile ilişkili olan faktörler ve bununla ilişkili sistemik

tedavi göz önünde bulundurularak meme kanseri hastasının tedavisi hassas bir şekilde planlanmalıdır.

Sık görülmesi, prevalansın artması, hastalığın ilk safhalarında tedavi edilebilir olması, günümüz de tanınmasının mümkün olması, meme kanserinin önemini oldukca arttırmaktadır. Meme kanseri tedavisi olan bir hastalıktır. Son yıllarda meme kanseri tedavisinde bir hayli önemli gelişmeler meydana gelmiştir. Pek çok tedavi fırsatları ortaya çıkmıştır. Bu fırsatlar önemli ölçüde hastalığın belirlendiği safhaya göre değişikik göstermektedir. Hastalık ne kadar erken evrede saptanırsa tedavi şanşı ve seçeneği o kadar artmaktadır.

Meme kanserinin dünyada ortalama insidansı yüz binde 38-40 iken, Avrupa'da bu oran yüz binde 66-67, ülkemizde ise ortalama yüz binde 40 civarındadır (Sağlık Bakanlığı, 2012). Kadınlarda en çok görülen ilk on kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları araştırıldığında meme kanseri 40,6 ile ilk sırada görülmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2012). Türkiye İstatistik Kurumundan alınan bilgiye göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün içerisinde meme kanserinin en yüksek insidansa (insidansı yüzbinde 34.73) sahip olduğu belirlenmiştir (TÜİK, 2009). Uluslararası Kanser Ajansı özellikle meme kanseri sayısındaki artışa dikkat çekmektedir. Kadınlarda meme kanser insidansının bir önceki tahmin verilerine göre %20, meme kanserinden ölümlerin ise %14 arttığını gösterilmiştir. Meme kanseri kadınlarda görülen kanser çeşitleri içinde en sık görülen ve en fazla ölüme neden olan kanser olarak tanımlanmıştır. Güncel Globocan verileri doğrultusunda dünyada kansere yakalanan her 4 kadından biri meme kanseridir (Globocan, 2012).

Günümüzde meme kanseri tedavileri; ilk başta cerrahi olmak üzere, hormon tedavileri, kemoterapiler, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere beş grupta toplanır.

2.2.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Günümüzde, bireysel tedavi modaliteleri daha fazla ön plana çıktığı için genetik temel üzerinde gelişen kanserin sınıflandırmasının moleküler düzeyde yapılması daha fazla kabul görmektedir. Hasta tümör örneklerinin genetik ve epigenetik durumlarının ELISA ve microarray gibi moleküler tekniklerle yapılan gen ekspresyon profilleri ile özellikle meme kanserinin heterojenitesini ortaya çıkarma çabaları; tümörün incelenmesi, hastalık hakkında tanı, tedavi ve prognoz ile ilişkili detayların bilinmesini sağlamaktadır.

Meme kanserleri içerisinde gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen, ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi ve meme tümörleri 4 ana gruba ayrıldı (Denoix PF.,1952).

1) Luminal hücre benzeri,
2) Bazal hücre benzeri,
3) Normal epitel benzeri
4) HER2 pozitif grup

Sonraki çalışmalarda luminal hücre benzeri grup içerisinde luminal A ve B olmak üzere 2 alt grup daha tanımlandı (Sorlie T.,2003), meme kanserinin bu alt moleküler gruplarının ekspresyonları arasındaki farklılıkları doğrulandı (Sorlie T.,2003).

Luminal hücre benzeri grubunun tamamı ER (östrojen reseptörü) pozitiftir. Luminal A grubu en fazla ER ekspresyonu gösteren gruptur (Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, 2001). Luminal B grubunda bulunan tümörler luminal gruba özgü genleri orta düzeyde eksprese eder ve bazıları HER2 pozitiftir. p53 gen mutasyon sıklığı luminal A grubunda luminal B grubundan daha fazladır (Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R,2001). Luminal hücre benzeri grubun yaklaşık üçte ikisi düşük ya da orta düzey histolojik grade'e sahiptir, endokrin tedaviye duyarlıdır. Bazal hücre benzeri grubun %95'i ER negatiftir ve %91'i yüksek derecededir (Rouzier R, Perou CM,2005). Bazal hücre benzeri grup aynı zamanda "triple" negatif meme kanser fenotipindedir (ER negatif, PgR-Progesteron reseptörü negatif ve HER2 negatif). Ancak bazal hücre benzeri grubun heterojen bir yapıda olduğu ve alt grupları içerdiği düşünülmektedir (Kreike B,2007). Farklı moleküler alt gruplarda prognozun ve kemoterapi duyarlılığının farklı olduğu görülmüştür. Luminal hücre benzeri kanserlerin daha fazla sağ kalım oranları, bazal hücre benzeri ve HER2 pozitif tümörlerin ise birden daha çok ajanla yapılan neoadjuvan tedaviye daha yüksek düzeyde patolojik tam yanıt verdikleri gösterilmiştir (Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R,2001). Meme kanserinin moleküler alt gruplarını küçük gruplarıyla birlikte tanımlayacak standardize yöntemlerin geliştirilmesi, prognostik ve öngörüsel göstergelerin çok daha fazla hasta grubunu içeren klinik çalışmalarla birlikte çalışılması, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkmasını sağlaması, bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişmelerdir.

2.3. Kök Hücreler

Kök hücre; ilk olarak kemik iliğindeki bir grup hücrenin kan hücrelerini oluşturmasının keşfiyle ortaya çıkmıştır. Kemik iliğinin bu özelliği ile kan kanseri gibi bir çok

hastalıkta sağlıklı bireyden hasta bireye kemik iliği nakilleri ile tedavi imkanı sunulmuştur. Daha sonraki dönemlerde periferik kandaki kök hücrelerin de aynı amaca yönelik hizmet edebildiği anlaşılmış ve periferik kök hücre nakli ile tedavide kullanılmıştır (Görkey Ş. Kutlay N. 2007). 1980'li yıllarda kordon kanında kök hücrelerin bol bulunduğu düşüncesi gündeme gelirken, kordon kanı ilk olarak 1992 yılında Dr. David Harris tarafından kendi çocuğundan alınarak dondurulmuştur. 1994 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde Dünya‟ daki ilk kordon kanı bankası kurulmuştur (Karagöz E.2007). 1998 yılında ilk kez James Thomson tarafından IVF (in vitro fertilizasyon) tedavisi gören hastalardan alınan spermlerle yumurtaların yapay döllenmesi ile elde edilen embriyolardan "insan embriyonik kök hücreleri" ayrıştırılmıştır. Proliferasyon ve farklılaşma yönünden daha önceden keşfedilmiş olan kemik iliği kök hücrelerine kıyasla kapasitelerinin daha fazla olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Görkey Ş. Kutlay N. 2007). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, herhangi bir dokudan izole edilen kök hücrelerin, gerekli ortam sağlanıp uygun uyaranlarla muamele edildiği takdirde farklı doku hücrelerine dönüşebildikleri (plastisite özelliği) gösterilmiştir (Vescovi A, Gritti A,2002). Sınırsız çoğalabilme, kendini yenileyebilme (self-renewal) özelliklerinin yanında tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yetenekleri (multi-lineage differentiation) kendilerine özgü 3 önemli özelliğe sahip olan kök hücrelerin her organda bulunduğu düşündürmektedir (Spillane JB,2007).

Kök hücreler vücuttaki diğer hücrelerden farklı olarak aşağıdaki temel özellikleri taşımaktadır;

- Farklılaşmamış ve özelleşmemiş hücrelerdir.
- Özel bir dokunun spesifik hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler.
- Farklılaşmadan kalarak uzun bir süre boyunca çoğalmayı başarabilmektedirler.
- Özelliklerini kaybetmeden transplante edilebilirler.
- Telomeraz enzim aktivitesine sahiptirler.
- Asimetrik olarak bölünebilirler.

Bu özelliklerin birleşimi, genel olarak **'stemness'** olarak adlandırılmaktadır. Kanser kök hücrelerin de ''stemness'' özellikte olduğu ve tüm bu özelliklerin sağlıklı kök hücrelerle aynı yolaklar üzerinden düzenlendiği bildirilmiştir (Mikkers H,2005).

2.4. Kanser Kök Hücreleri

Kanserin, kök hücre özelliği gösteren az bir hücre grubundan meydana gelebileceği görüşü yaklaşık 150 yıl öncesine dayanmaktadır. 1961'de Till JE ve Mc CE, kanserin kökeninin dokuya özgü kök hücreler olabileceğini ileri sürmüşlerdir. 1967'de ise Pierce GB, kanserin kök hücrelerin olgunlaşmalarının durmasıyla ilgili olduğunu belirtmiştir (Wicha MS, Liu S,2006). Kanser kök hücresi (KKH) hakkındaki ilk doğrudan kanıt, 1997'de Dick J. ve arkadaşlarının yayımladıkları makale ile gelmiştir.

Karsinogenez ile ilgili ortaya atılan kanser kök hücre teorisinde, dış ya da iç etkenlerin kök hücrelerde kalıtımsal ve/veya kazanımsal olarak genetik hasar meydana getirmesi sonucu kök hücrelerin ilerleyen zamanlarında tümör gelişimi ile metastazından sorumlu olduklarını bildirmektedir (Wicha MS, Liu S 1983-1990). Ayrıca kanser kök hücreerinin tümör hücrelerini günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerine karşı dirençli hale getirme potansiyeline de sahip oldukları söylenmişitir (Matsui W, Wang Q,2008).

Geçtiğimiz yıllarda bilim insanları kök hücre tabanlı hiyerarşik modelleri kullanarak kanser biyolojisini tekrar gözden geçirmişlerdir. Konu hakkındaki esas tartışmalar doku kök hücrelerinin transformasyon için primer hedef olabileceğini göstermektedir. Bunu da aşağıda belirtildiği şekilde özetleyebiliriz:

(i) Kök hücreler uzun ömürlüdür, yavaş olarak bölünen hücreler dokularda sessizce bekleyip neoplastik transformasyon için birden fazla genetik farklılığa neden olmaktadır bu da kısa ömürlü olanlara göre daha fazla genotoksik sonuçlara yol açmaktadır (Dario Ponti,2006);

(ii) Moleküler yolaklar kök hücrelerin kendini yenilemesinde kritik bir rol oynamaktadır (Reya T, Morrison SJ,2001);

(iii) Normal kök hücreler ve tümör hücreleri bir dizi fenotipik özellik paylaşırlar: farklılaşmamış faz, kendini yenileme özelliği, migrasyon mekanizmalarının aktivasyonu.

Kök hücre fonksiyonlarının anlaşılmasının yanı sıra, bu hücrelerin tanımlanması ve ayrıştırılması da gerekmektedir. Kanser kök hücreler Tablo 2.4.1 de gösterildiği üzere normal kök hücreler ile benzer özellikler taşırlar.

Tablo2.4.1 Kanser kök hücrelerin normal kök hücreler ile benzer özellikleri (Matsui W, Wang Q, Wicha MS, Liu S 2008-2011)

	Normal kök hücreler	Kanser kök hücreler
Kendini yenileme	+	+
Farklı hücre tiplerine farklılaşabilme	+	+
Oct4, Nanog, Klf4, Sox-2 gibi transkripsiyon faktörlerini içerme	+	+
Belli sinyal yolaklarından etkilenme (Wnt, Notch ve TGF-β vb.)	+	+
Telomeraz enzim aktivitesi	+	+
ABC taşıyıcı proteinleri sayesinde kemoterapötiklere direnç	+	+
Aktif DNA onarım mekanizması	+	+
Apoptoza direnç	+	+

Kanser kök hücrelerin tümör kitlesi içerisinde ki hücrelerin yaklaşık %0,3-2' sini oluşturduğu görüşü yaygındır (Avital I, Stojadinovic A,2014). Kanser kök hücre popülasyonunda ki az sayıda bulunan hücrelerin bile kanseri başlatarak kanser hücrelerini çoğaltmada yeterli olduğu belirtilmektedir (Visvader JE, Lindeman GJ,2008). Kanser kök hücreleri kendini yenileyebilme yetenekleri, yavaş hücre bölünmesine sahip olmaları, birçok farklı hücreye farklılaşabilmeleri, herhangi bir tümörü başlatabilme yetenekleri, kendilerine has detoksifikasyon enzim sistemlerine sahip olmaları, moleküler hücre yüzey işaretçileri ve embriyonik sinyal yolaklarına sahip olmaları sayesinde oldukça özel hücre gruplarıdır (Visvader JE, Lindeman GJ 2008). KKH varlığı ilk olarak akut lenfoblastik lösemide gösterilmiştir (Lapidot T, Sirard C,1994). Ardından beyin (Singh SK, Hawkins C,2004), meme (Al-Hajj M, Wicha MS,2003), kolon (Dalerba P, Dylla SJ,2007), pankreas (Li C, Heidt DG,2007), prostat (Collins AT, Berry PA,2005), akciğer (Kim CF, Jackson EL,2005) ve baş-boyun (Prince ME, Sivanandan R,2007) kanseri gibi çeşitli tümörlerde de KKH varlığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kanser tedavisinin temel amacı, kaç adet ve hangi tip kanser hücresinin elimine edileceğini anlamaktır. Bundan dolayı sınırlı üreme potansiyelindeki kanser hücrelerinin eliminasyonu sınırsız üreme özelliğine sahip kök hücre yayılımı düşünüldüğünde klinik rölaps ya da rekürrens ile sonuçlanmakadır (Christophe G. ve Daniel B.2009).

Yıllar içerisinde meme kanseri tedavisindeki gelişmelere rağmen, bir süre sonra hastalığın yeniden ortaya çıkması (rölaps) hastalığın tam tedavisinin önünde bir engel olarak durmaktadır. Bunun nedeni de kanser kök hücreleri olarak bilinen kök benzeri hücrelerin varlığından kaynaklanmaktadır (Wicha MS, Liu S, Dontu G.2006).

2.4.1. Meme kanseri kök hücre belirteçleri

Kanser kök hücrelerinin sınırsız çoğalma ve organlara yayılma yetenekleri mevcuttur. Bundan dolayı kanser tedavisi için kanser kök hücrelerini belirlemek ve bu hücreleri hedefleyerek öldürmek gerekmektedir. Yeni çalışmalarla teşhiste kullanılacak hücre yüzey belirteçleri ve tedavi hedeflerini bulabilmek kanseri ortadan kaldırmada oldukça büyük bir adım olarak ön görülmektedir. Dokuya özgü hücre yüzey belirteçlerinden yararlanılarak kanser tipine özgü kanser kök hücrelerini belirlemek flow sitometrik yöntem ile mümkün hale gelmiştir (Mimeault M,2011). Dokuya ait kök hücre belirteçlerinin tanımı Tablo 2.4.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.4.1. 1. Dokuya özgü kanser kök hücre belirteçleri

Tümör tipi	**Tümör tipine özgü hücre yüzey belirteçleri**
Akut Myelositer Lösemi	CD34, CD38, CD96, CD90
Multiple Myeloma	CD138
Akciğer	CD45,CD31,CD34
Hepatosellüler	CD133
Meme	**CD44, CD24**
Prostat	CD44/CD133, β İntegrin
Pankreas	CD44,CD24,ESA

2.4.2.CD24

CD24 (ısıya dayanıklı antijen, HSA) 30 aminoasitten oluşan polipeptiti ve yüksek karbonhidrat içeriği olan fosfatidil-inositol ile bağlı bir hücre yüzey glikoproteinidir. CD24 B hücrelerinin gelişiminin tüm evrelerinde ve timüsten oluşan çoğu T hücre prekürsörlerinde

(timosit) eksprese olmaktadır. T hücrelerinin matürasyonu ile CD24 ekspresyonu kaybolurken CD4 veya CD8 eksprese edilmeye başlanmaktadır. CD24, B hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Meme kanserinde immünositokimyasal yöntemlerle CD24 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu ortaya çıkarıkmıştır (Marija Balic, Henry Lin,2006). CD24 meme kanseri için negatif bir markerdir. Pankreas kanseri için ise pozitif bir markerdir. Tümör hücrelerinde CD24 ekspresyonu metastaz potansiyelini artırmaktadır ve karsinomlar dahil birçok kanserde oldukça fazla eksprese edilmektedir. Bundan dolayı potansiyel olarak erken tümör markeri gibi düşünülebilir (Pirruccello SJ, LeBien TW. ,2007). Son araştırmalar meme tümörlerinde karsinogenez sırasında CD24 ekspresyonunun azaldığı veya kaybolduğu göstermiştir. Bu da kanser kök hücrelerinin karakteristik bir özelliğidir (Pirruccello SJ, LeBien TW.,2007). CD24 stromal hücrelerden salınan faktör-1 ile ilişkili olarak migrasyon ve sinyal iletimini sağlamaktadır. Bu nedenle mikrometastatik hücrelerde CD24 ekspresyon kaybı, bu hücrelerin metastatik potansiyelini baskılamaktadır. Meme kanserinde kemik iliğinde bulunan mikrometastatik hücrelerin, mezenkimal kök hücre ile benzer özellikler de olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler meme kanseri kök hücresi olarak değerlendirilmiştir. Mezenkimal kök hücresi gibi bu hücrelerde de CD44+/CD24zayıf+/- olarak bulunmuştur. Bu nedenle bizim de çalışmamızda mikrometastatik hücrelerde CD24 ve CD44 ekspresyonunun değerlendirilmesi önemlidir.

2.4.3.CD44

CD44 hücreler arası ve hücrelerle ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimde rol oynayan çok-fonksiyonlu bir transmembran reseptörü ve hücre yüzey adezyon molekülüdür. Hücre trafiği, hücrelere kemokin ve büyüme faktörü sunumu, büyümefaktörlerinin aktarımı, apoptoza ve hematopoeze aracılık eden sinyallerin geçişi gibi birçok proçesde yer aldığı gösterilmiştir (Naor D, Sionov RV,1997). CD44, fagositik glikoprotein-1 (pgp-1) veya HCAM olarak bilinen tip 1 transmembran glikoproteinidir. CD44, hyaluronik asit için reseptördür ve birçok izoformu vardır. Başlıca izoformu olan tip 1 glikolize transmembran proteini, lenfosit, myeloid hücreler ve eritrositlerde eksprese edilmektedir. Diğer izoformları glikozaminoglikan içermektedir ve hematopoietik veya hematopoietik olmayan hücrelerde eksprese edilmektedir. İşlevleri ile ilgili olarak hücre yapışması, sinyalizasyon, göç ve reaktif oksijen türlerine karşı savunma gibi durumlarda rol oynadığı bilinmektedir. CD44 lökositlerin endotelyal hücrelere, stromal hücrelere ve ekstrasellüler matrikse adezyonu ile

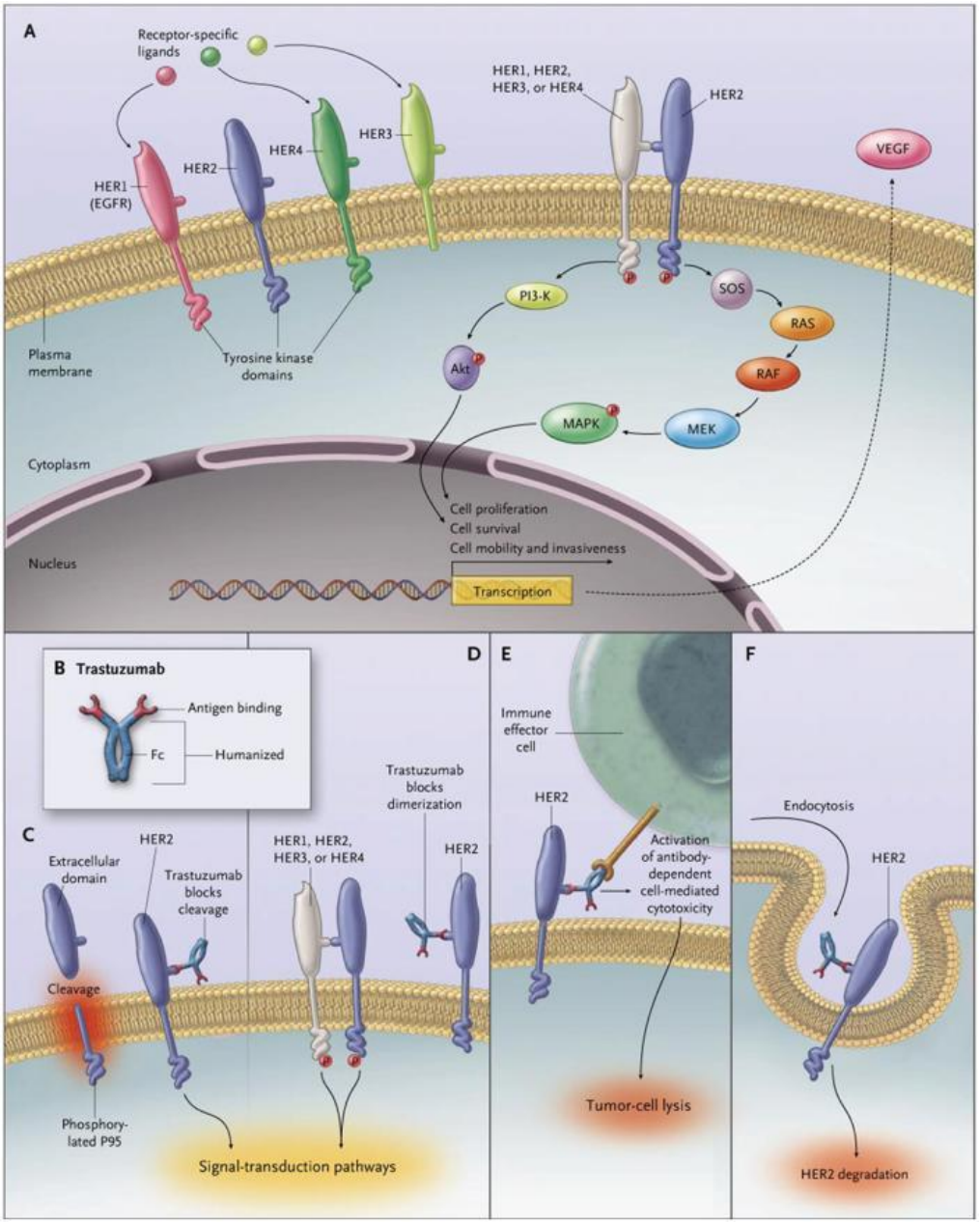
ilişkilidir(Goodison S, Urquidi V,Tarin D.1999). Normal meme dokusundaki kök hücreler ile ilişkilidir ve CD44 ekspresyonu, meme epitelinin büyüme ve farklılaşmasını sağlamaktadır. CD44 ekspresyonu kısmen hormonlar, IGF-1 ve EGF gibi büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Meme karsinomlarında CD44 ekspresyonu, tümörün kök hücre ilişkili olduğunu göstermektedir. CD44, CD24 ile birlikte mikrometastatik hücrelerin CD44(+/-) /CD24zayıf(+/-) ekspresyon paternini değerlendirmek için kullanılmıştır (Pirruccello SJ, LeBien TW. ,2007).

2.4.4. HER2/neu proteini

Organizmada tümör gelişimiyle birlikte immün sistem hücreleri de uyarılır ve her tümöre özgü olan tümör yüzey antijenlerini tanıyarak bunlara bağlanır. Monoklonal antikorlar tarafından tanınan hücre yüzeyi proteinleri antijen olarak sınıflandırılır. Bunlara aynı zamanda "marker" da denilebilir, çünkü bu proteinler farklı hücre topluluklarını birbirlerinden ayırt etmek amacıyla kullanılır. Meme kanserinde en çok incelenen ve meme kanseri patogenezinde hormon reseptörleri ile birlikte en etkin olan EGFR (HER) ailesi olarak bilinen reseptörlerdir. EGFR ailesi 4 adet reseptörden oluşur. Hücre membranında monomer olarak bulunan bu reseptörler HER–1 (EGFR–1), HER–2 (EGFR–2), HER–3 (EGFR–3) ve HER–4 (EGFR–4) olarak isimlendirilir.

Bu reseptörlerin ligandları heregulinler olarak adlandırılır. Heregulinler bir büyüme faktörü ailesidir ve ErbB3 ve ErbB4' e bağlanarak ErbB2 ile heterodimerizasyonu ve bunun sonucunda aşağı akış sinyal iletimini başlatırlar. HER2 direkt olarak ligand bağlayamaz; aktivitesi için ligand bağlayan diğer büyüme faktörü reseptörleriyle heterodimerizasyona gereksinim duyar. Bunlar içerisinde HER3 en önemli heterodimerizasyon partneri gibi görünmektedir (Mosesson Y, Yarden Y.,2004). HER2 geni hücre büyümesi, bölünmesi ve onarımının kontrolünde rol oynar. Hücre membranına bağlı bulunan HER2 proteini sinyal kaskadını başlatır, böylece normal hücresel büyüme süreci başlamış olur. Normal hücrelerde HER2 geni 2 kopya halindedir ve hücre yüzeyinde 50.000 protein kopyası bulunur. Normal koşullarda her 17. kromozomda bir HER2 geni mevcuttur; bununla beraber meme kanseri geliştiğinde HER2 geni ek kopyalar üretmeye başlayabilir ve "amplifiye" olur. Çok sayıda HER2 gen kopyası, tümör hücrelerinin yüzeyinde HER2 proteini aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır (Hicks DG, Tubbs RR.,2005). HER2 amplifikasyonu ve/veya protein aşırı ekspresyonu yeni tanı konmuş meme kanserli hastaların %20' sinde bulunur ve HER2 düzeyi

normal olan hastalarla karşılaştırıldığında daha agresif klinik seyir ve daha kısa genel sağkalım süresiyle beraberdir (Wolff AC, Hammond ME,2007). Meme kanserinde HER2' nin bir onkojen olarak tanımlanması, bu hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini sağlamıştır. Trastuzumab, HER2' nin ekstrasellüler domainine bağlanarak etki gösteren bir humanize monoklonal antikordur. HER2 aşırı ekspresyonu olan hastalarda tek başına kullanıldığında klinik yanıt sağladığı görülmüştür, kemoterapiyle kombine edildiğinde sağkalımı uzatmaktadır, adjuvan tedavide kullanıldığında ise nüks oranlarını %50 azaltmaktadır (Spector NL, Blackwell KL,2009).



Şekil 2.4.4.1 HER2 reseptörü sinyal iletim sistemi ve transtuzumab etki mekanizması (Colombo, 2010).

Meme kanseri hastalarının yaklaşık % 20 kadarında HER2 aşırı ifade edilir (Slamon, 1989). Fonsiyonunda en önemli gereksinim reseptör dimerizasyonudur (Graus-Porta, 1997). HER2 reseptörü kendisi veya diğer HER1, HER3 veya HER4 reseptörleri ile dimerize olur (Colombo, 2010) Şekil 2.4.4.1. Reseptör dimerizasyonu HER2 reseptörünün tirozin kinaz bölgesini aktifleştirir ve sinyal transdüksiyonu başlar. HER2 aktivasyonu çeşitli sinyal yolaklarını ve sinyal proteinlerini (MAPK, PI3K/Akt, mTOR, Src kinaz, STAT transkripsiyon faktör) aktive eder (Artaaga, 2012). Bu sinyal iletim sistemleri hücre üremesini, migrasyonu, angiogenezi tetikler.

Son zamanlarda geliştirilen herceptin'nin metastatik, HER2 pozitif meme kanserli hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (Geyer CE, Forster J, Lindquist D,2006). Ancak HER2 pozitif meme kanserli hastaların tümü trastuzumab'a yanıt vermemektedir. AntiHER2 tedaviye direncin mekanizmalarını açıklığa kavuşturmaya yönelik çalışmalar sürmektedir. Örneğin artmış insülin-benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R) düzeyleri trastuzumabın yaptığı HER2 blokajını bypass edebilir ve Akt' ı aktive edebilir (Lu Y, Zi X, Zhao Y,2001). Benzer durum bir tümör supresör gen olan PTEN eksikliğinde de söz konusudur (Nagata Y, Lan KH, Zhou X,2004). Ayrıca HER2' nin ekstrasellüler domaini eksik, ancak kinaz aktivitesi devam eden bir formu son zamanlarda tanımlanmıştır ve Trastuzumabdirenciyle ilişkili bulunmuştur (Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J,2007). HER2'yi içeren amplikon sıklıkla terapötik etkinliği etkileyen ek genler bulundurmaktadır. Başlangıçta HER2 pozitif hastalığın antrasiklinlere daha hassas olduğu düşünülmesine karşın, son zamanlarda edinilen bilgiler bu hassasiyetin amplikonda bulunabilen topoizomeraz II geni ile belirlendiğini düşündürmektedir (Tanner M, Isola J, Wiklund T,2007). AntiHER2 tedaviye direncin daha iyi anlaşılabilmesi için hem hücre seri panellerine hem de antiHER2 tedavi alan hastalardan elde edilen dokulara modern genom analiz yöntemleri uygulanmaktadır. Bugün için küçük moleküllü insülin-benzeri büyüme faktörü IGF inhibitörleri, fosfatidilinozitol 3'-kinaz (PI3K) ve Akt kinaz inhibitörlerinin meme kanserinde klinik gelişimi ilerlemektedir ve bunların in vitro olarak anti-HER2 tedavi ile sinerjistik etkileri gösterilmiştir (Tseng PH, Wang YC, Weng SC,2006).

HER2'yi test etmek için birçok model geliştirilmiştir. Amerika Klinik Onkoloji Cemiyeti ve Amerika Patolog Cemiyeti HER2 testlerinde uyumluluğu sağlamak için bir kılavuz önermiştir. Buna göre meme kanseri dokusu, başlangıçta immmunhistokimyasal boyama ile HER2 protein ekspresyonu için değerlendirilmelidir (Tseng PH, Wang YC, Weng

SC,2006). HER2 ekspresyon skor metodu hücre membran boyanma şekline göre belirlenir. Skorlama aşağıda belirtilmiştir;

+3: pozitif HER2 overekspresyonu; invaziv tümörün %30'undan fazlasında yoğun membran boyanmasının olması

+2: Şüpheli HER2 protein ekspresyonu; tek tip olmayan ya da zayıf yoğunlukta membran boyanması (hücrelerin en az %10 boyanma olacak)

0 yada +1: negatif HER2 protein ekspresyonu

Şüpheli boyanan meme kanseri dokuları HER2 geni amplifikasyon yöntemlerinden biri kullanılarak yeniden değerlendirilmelidir. HER2 geni amplifikasyonu, HER2 geninin hücre nükleusunda bulunan kopya sayısının artmasıdır. Genelde fluorescence in situ hybridization (FISH) kullanılmaktadır.

2.5. Kanser tedavi yöntemleri

Geçtiğimiz yıllarda kanser tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen günümüz teşhis ve tedavi yaklaşımları ağırlıklı olarak invasif (yani rastgele biyopsiler ve cerrahi müdahaleler), ışın tedavisi ve kemoterapötik ajanlar gibi basit, spesifik olmayan tekniklere dayanmaktadır (Garcia, M., Jemal, A.,2007). Kanser ölümcül bir hastalık olmaya devem etmektedir ve günümüz terapötik yaklaşımları bu hastalığın kötü giden seyrini iyileştirmede henüz yeterli değildir. Mevcut durumda uygulanan kanser tedavileri cerrahi yöntem, radyasyon tedavisi ve kemoterapi ile sınırlıdır.

2.5.1. Radyoterapi

Radyoterapi cerrahi müdahaleye ek olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Tümör içeren belirli bir alan üzerinde uygulanan özel bir tür iyonize enerji kullanır.

İyonlaştırma enerjisi kanser hücresinin nükleer genetik materyaline zarar verir böylece düzgün bir şekilde çoğalmalarını önler. Buna rağmen radyoterapi sadece hedeflendirildiği bölgede çalışır, eğer hedeflendirildiği alan dışında mutasyona uğramış hücreler bulunuyorsa tedavi ile yok edilemeyecektir. Bu da genellikle çoklu tedavi gerektirmektedir ve bunun sonucunda radyoterapiye ek olarak birçok yan etki eşlik eder (Wong, H.L.,2007).

2.5.2. Kemoterapi

En yaygın olarak bilinen kanser tedavisi ise kemoterapidir. Kemoterapi kanser hücreleri ve kemik iliği, sindirim sistemi ve kıl foliküllerinden bazı sağlıklı hücreleri de içeren hücresel bölünme hızının yüksek olduğu tüm hücreleri öldürerek mücadele eder. Kemoterapinin radyoterapiye göre üstünlüğü tüm vücutta etkili olmasıdır, böylece birincil ve ikincil tümör bölgelerini ortadan kaldırır. Kemoterapi intravenöz, oral, topikal ve intratumoral olmak üzere dört farklı yolla verilir. Ancak, kanser hücrelerinin tamamen yok edilebilmesi için kemoterapi kullanmak sıklıkla yetersiz kalmaktadır. Radyoterapi gibi kemoterapi hastaları kanser hücrelerinin ortadan kaldırılabilmesi için çoklu tedaviye ihtiyaç duyar.

Antikanser terapötikler çoğunlukla suda çözünmez ve enjekte edilebilen çözücüler olarak uygulanmaları için bir organik çözücüde çözülmeleri gerekir. Organik çözücüler toksiktir ve yan etkileri vardır. Antikanser ilaçların düşük molekül ağırlığında olması hızlı atılımı ve zayıf terapötik indeks ile sonuçlanır, bu durum bu ilaçların kanser hastalarına artan dozlarla uygulanmasını gerektirir, bu nedenle sitotoksisite ve diğer yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. Ek olarak, kemoterapötik ilaçlar yalnız uygulandıklarında spesifiklikten yoksundur ve bu nedenle kanser olmayan dokularda önemli derecede hasara neden olurlar, bu durum kemik iliği baskılanması, saç kaybı (alopesi) ve bağırsak epitel hücrelerinin dökülmesi de dahil olmak üzere birçok istenmeyen yan etki ile sonuçlanır (Wong, H.L., 2007).

2.5.3.Kemoterapotiklerin etki mekanizmaları

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

Sadece çoğalmakta olan hücrelere etkili olan kemoterapötik ilaçlara; döngüye spesifik İlaçlar denir. Döngüye spesifik olmayan ilaçlar, çoğalmakta olan hücrelere daha etkili olmalarına karşın büyüme hızı düşük olan tümörlerin tedavisinde etkilidirler. Kanser tedavisinde yararlanılan ilaçlar daha farklı mekanizmalarla da etki göstermektedirler. Bu ilaçların başlıcaları (Wong, H.L.,2007) şöyle sıralanabilir; (Tablo 2.5.3.1)

a-) Pürin ve pirimidin nükleotid prekürsörlerinin sentezini engelleyerek ya da DNA ve RNA sentezinde bunların yerlerini alarak etki gösteren ilaçlar,

b-) DNA fonksiyonlarını bozarak etki gösteren ilaçlar,

c-) Hücre yapısındaki nükleofilik gruplara kovalent bağlarla bağlanarak etki gösteren ilaçlar,

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

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

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

Tablo 2.5.3.1. Kanser İlaçlarının Sınıflandırılması

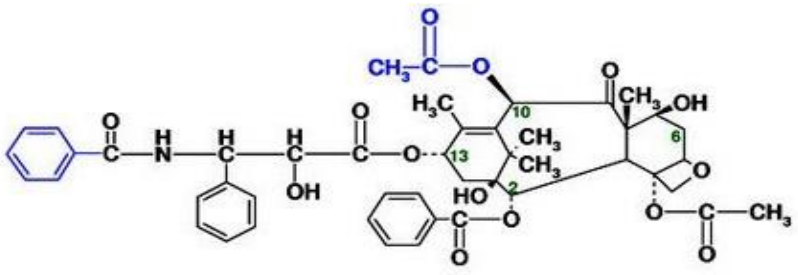
Antimetabolitler	**Antibiyotikler**	**Alkilleyici ilaçlar**
Sitarabin	Bleomisin	Korbustin ve Lomustin
Fludarabin	Daktinomisin	Siklofosfamid ve
5-florourasil	Daunorobisin	Mekloretamin
6-merkaptopürin	Doksorubisin	Streptozotosin
Metotraksat	İdaurubisin	
6-Tiyoguanin	Plikamisin	
Mikrotübül İnhibitörleri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

Genel olarak bütün bu ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak pratikte ilaçlar kanser hücrelerine seçici etki göstermemekte ve prolifere olan tüm normal veanormal hücreleri ise etkilemektedir (Hitchings G.H.,2001).

2.5.3.1. Paklitaksel

1970 yılında Paklitaksel ABD'de keşfedilen, Taxus brevifolia adlı ağaçtan izole edilen, ovaryum, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin iyileştirilmesini sağlayan, ayrıca çeşitli solid tümörlere karşı aktif kemoterapötik bir ajan şeklinde ve belli kanser türlerine karşı da radyoterapinin duyarlılığını arttırmak üzere kullanılan doğal bir alkoloiddir (Özcan AG,2005).

Taksan diterpenoid ailesine bağlı bu ilacın adı Taksol® olarak da bilinmektedir (Fitz Patrick F.A,2003). Yapılan yoğun çalışmalar sonucunda taksol, 1983 yılında faz I, 1985 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır. Taksol, FDA (Food and Drug Administration) tarafından 1992 yılı içinde ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır. Ancak bu ilacın kalp ve beyin gibi farklı organlarda ters etki yaptığı bilinmektedir. Preparatı Taxol® (Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) olarak isimlendirilirken etken maddesine paklitaksel (Şekil 2.5.3.1) adı verilmiştir (Arbuck, S.G. and B.A. Blaylock, 1995).



Şekil 2.5.3.1. Paklitaksel'in yapısı. (Andersen, A.,2006)

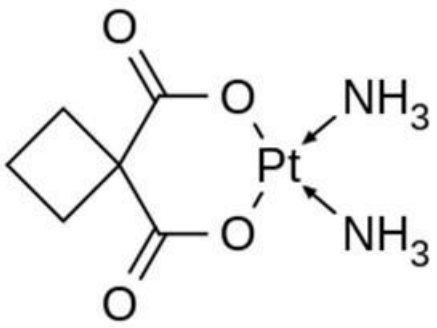
Paklitaksel (Taxol) meme kanserinin tedavisinde umut verici olmuştur. Paklitaksel mikrotübül ayrılmasını önlemekte ve apoptoz ile hücre ölümünü indüklemektedir. Paklitaksel ile tedavi edilmiş tümör hücreleri hücre döngüsünün G2-M fazında arrest olmakta bu da apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (Georgiadis MS.,1998). Paklitaksel meme kanseri, akciğer kanseri ve diğer birkaç solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Georgiadis MS.,1998).

Ayrıca paklitaksel, metastatik meme kanserinde tek başına kullanılan aktif maddelerdir. Paklitaksel'in meme kanserine karşı antitümör etkisinin belirlenmesi için çeşitli tedavi şekilleri denenmiştir. İlk olarak 1991 yılında tek başına paklitaksel kullanılmasıyla metastatik meme kanserinde % 56 oranında bir cevap elde edilmiştir. Paklitaksel alan hastalarda yapılan çalışmalarda genel olarak cevap oranları ilk basamak metastatik tedavide % 32-62, ikinci veya daha sonraki basamaklarda ise % 21-48 olarak bulunmuştur. Paklitaksel'in optimum dozu ve tedavinin uygulanış şekli halen tartışmalıdır (Crown, J.,1998).

2.5.3.2. Karboplatin

Karboplatin hücresel bölünmeyi ve gelişmeyi engelleyen (antineoplastik) bir ilaçtır(Şekil.2.5.3.2.1). Karboplatin kanser hücrelerinin çoğalmasına engel olur, dna-protein

çapraz-bağlanmadan ziyade belirgin olarak zincirler-arası dna çapraz-bağlanma oluşturarak DNA'nın fonksiyonunu bozar. Bu hücre siklusuna spesifik olmayan bir etkidir. Böylece, vücuttaki gelişimlerini ve yayılımlarını yavaşlatır.

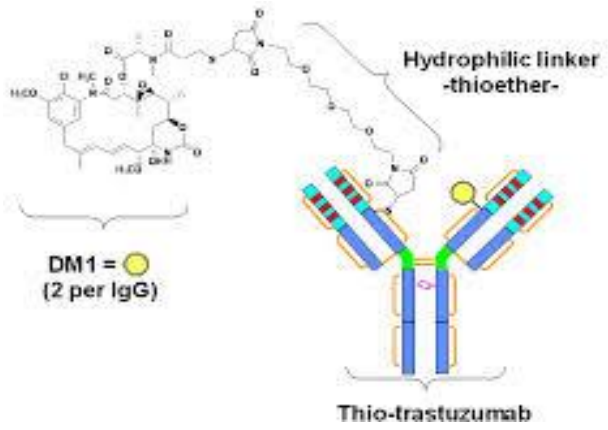


Şekil.2.5.3.2.1. Karboplatin'in yapısı. Rose, David (October 6, 2008).

2.5.3.3. Trastuzumab (Herceptin)

Herceptin, kansere neden olma potansiyeli taşıyan bir genin ürettiği HER2 proteinini hedefleyerek fonksiyonunu bloke etmek üzere tasarlanmış monoklonal bir antikordur. Herceptin'in etki şekli, vücudun bağışıklık sistemini aktive etmesi ve HER2/neu reseptörüne bağlanarak tümör hücrelerinin büyümesini engeller (Pietras RJ, Pegram MD,1998). Trastuzumab anti-tümör etkisini HER-2/neu reseptörünün hücre içine alınıp yıkılmasıyla, hücre döngüsünün G1 fazında tutulmasını sağlayıp proliferasyonu azaltarak, apoptozisi artırarak, ve vasküler endotelyal büyüme faktörünün ekspresyonunu azaltıp anjiogenezi baskılayarak yapar (Nahta R, Esteva FJ,2006). Herceptin, hem erken hem de ileri evre (metastatik) HER2-pozitif meme kanseri tedavisinde benzeri görülmemiş şekilde etkili olmuştur. Kendi başına monoterapi olarak uygulanmasının yanı sıra, standart kemoterapi ile birlikte veya standart kemoterapiyi takiben uygulanan Herceptin'in HER2-pozitif meme kanseri olan kadınlarda cevap oranlarını, hastalıksız sağkalımı ve genel sağkalımı artırdığı ve yaşam kalitesini de koruduğu görülmüştür (Ferlay J, Shin HR,2010). Herceptin, ABD'de Genentech, Japonya'da Chugai ve uluslararası alanda Roche tarafından pazarlanmaktadır. Herceptin 1998 yılından bu yana, dünya genelinde HER2-pozitif meme kanserli 740.000'i aşkın hastayı tedavi etmek için kullanılmıştır (Ferlay J, Shin HR,2010). HER-2 pozitif tümörü olan hastalarda tek ilaç olarak veya kombine olarak kullanılmaktadır. HER2 reseptörlerinin

meme kanseri olgularının %25-30' unda aşırı eksprese edildiğinin ve bu aşırı ekspresyonun hastalıksız sağkalım ve genel sağkalımda azalmayla ilişkili olduğunun gösterilmesi bu onkoproteine yönelik hedefli tedavilerle ilgili araştırmalara hız kazandırmıştır (Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA,1989). HER2' nin 621 aminoasitten oluşan ekstrasellüler bölgesi 4 farklı domaini ile immunoterapi için ideal bir hedef olarak düşünülmüştür (Şekil 5.3.3.1).



Şekil 5.3.3.1. Trastuzumab (Herceptine) moleküler yapısı (Alain Beck, 2010, http://www.discoverymedicine.com/)

Bu amaçla HER2' nin ekstrasellüler bölgesine karşı geliştirilmiş humanize, rekombinant bir monoklonal antikor olan Trastuzumab(rhumAb 4D5), HER2 aşırı ekspresyonu olan metastatik meme kanserinin tedavisinde FDA tarafından ilk onayı alan hedefe yönelik ajandır. Yapısında HER2' nin ekstrasellüler domaininin juxtamembran kısmına bağlanan 2 antijen spesifik bölge içermektedir. Antikorun kalan kısmı ise bir Fc kısmı bulunan insan murin IgG' sidir (4D5). Preklinik çalışmalarda trastuzumabın çeşitli antineoplastik ajanlarla beraber kulanıldığında additif sitotoksik aktivite ve sinerjistik antitümöral etki gösterdiği saptanmıştır (Nahta R, Esteva FJ,2006).

2.6. İlaç dirençliliği

Günümüzde kanser tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır. İlkinde amaç tümörlü doku veya organın uzaklaştırılması, son ikisinde ise kanser hücrelerinin öldürülmesidir (Türker, F.A., 2002). Antikanser ilaçların çoğu sitotoksik etkileri ile malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önlerler ve onların ölümüne

yol açarlar. Radikal bir tedavi vücutta tek bir malign hücre kalmaksızın tüm hücrelerin yok edilmesi ile mümkündür. Ancak böyle bir durum az sayıdaki istisnalar dışında halen varolan ilaçlarla sağlanamamaktadır. Antineoplastik ilacın terapötik etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör, tümör hücrelerinin ilaca azalmış hassasiyeti, bir başka deyişle ilaca karşı direnç gelişimidir. Bu durum bazı kanser türünde kendiliğinden olabildiği gibi (doğal veya primer rezistans), kemoterapiden sonra da gelişebilir (kazanılmış veya sekonder rezistans) (Gate, L., Tew, K.D.2001).

Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antikanser ilacı uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide varolan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Bu duruma "çoklu ilaç dirençliliği" (ÇİD, multiple drug resistance; MDR) denilmektedir (Krishan A, Fitz CM,1997). Kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaca direnç gelişimi, azalmış ilaç birikimi, artmış ilaç metabolizması ve ilaç etkinliğindeki değişiklikler gibi pek çok faktörle ilişkili olabilir (Tablo 3.1.)(Gate, L., Tew, K.D, 2001).

Antikanser ilaçlara direnç gelişiminin olası mekanizmaları:

- Azalmış İlaç Birikimi
- Membran lipitlerinde değişiklik
- Hücre yüzeyinde ilacın spesifik olduğu reseptörlerin veya taşıyıcılarının kaybı
- İlacın hücre dışına atılmasını sağlayan taşıyıcıların etkisinde artış (170 kDa P-glikoprotein, P-gp) ve çoklu ilaç direnci proteininin (multidrug resistance protein, MRP) aşırı ekspresyonu).
- İlaç Metabolizmasındaki Değişiklikler;
- İlacın biyoaktivasyonunda azalma,
- Metabolik enzimlerin fazla salgılanması sonucu ilacın inaktivasyonunda artma,
- Yükselmiş hücre içi γ-L-glutamil-L-sisteinilglisin (glutatyon, GSH) konsantrasyonu
- İlacın Etkinliğinde Değişiklikler
- Hücresel hedeflerdeki değişiklikler
- İlaçla oluşan hasarın iyileşmesinde artış veya tolerans gelişmesi olarak sıralanabilir.

Yukarıda belirtilen ve kanser hücresinin biyokimyası ile ilgili direnç mekanizmalarından başka hücrenin çoğalma (proliferasyon) kinetiği, ilacın tümör içerisindeki kapillerlerden kapiller çevresindeki hücreler içerisine yayılmasının kısıtlılığı ve ayrıca tümörün vaskülarizasyon durumu ile ilgili direnç mekanizmaları da vardır (Türker, F.A., 2002).

İlk olarak hücresel olmayan ilaç direnç mekanizmasında zayıf vaskülarize tümör bölgeleri ile tümöre ilaç girişi etkili bir şekilde azaltılabilir, böylece kanserli hücreler sitotoksisiteden korunur. Ayrıca tümörlerde asidik ortam basit ilaçlara karşı direnç mekanizması sağlar. Hücresel membranlardan düfüzyonunu engellemek için bu bileşenler iyonize edilebilir. Yüksek interstisyal basınç ve düşük mikrovasküler basınç moleküllerin ekstravazasyonunu geciktirir veya engeller (Krishna, R. and L.D. Mayer,2000). Ayrıca, tümörlerin terapötik müdahaleye karşı direnci hücresel mekanizmalardan dolayı da olabilir, malign hücrelerin biyokimyasındaki uzun süreli değişiklikler olarak kategorize edilebilir. Bunlar, değiştirilmiş spesifik enzim sistemleri (ör; topoizomeraz aktivitesi), değiştirilmiş apoptoz düzeni veya çoklu ilaç direncinden sorumlu protein veya çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerden P-glikoproteinin dışa akış sistemi gibi taşıma esaslı mekanizmaları içerir (Links, M. and R. Brown,1999). Son olarak, antikanser ilaçlar çok geniş hacimlerde olacak şekilde dağılırlar. Kanserle mücadele için kullanılan ilaçlar hem tümör hücreleri hem de normal hücreler için toksiktir, bu sebeple genellikle kemoterapinin etkinliği önemli yan etkiler nedeniyle sınırlıdır.

2.7. Matriks Metaproteazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP'lar) elastin, kollajen ve proteoglikanlar gibi ekstraselüler matriks proteinlerini yıkıma uğratan, merkezinde Zn^{+2} atomu barındıran ve aktiviteleri için Ca^{+2}'a bağımlı olan, 24 farklı endopeptidazdan oluşan bir enzim ailesidir (Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix, 1999). MMP'lar; proteinazların 5 alt sınıfından biri olan metalloproteinazlar enzim ailesindendir. Büyük çoğunluğu bağ dokusu hücreleri ve inflamatuvar fagositler tarafından salınmaktadır. MMP' lar doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar(Folgueras AR, Pendás AM, 2004).

MMP enzim ailesi, kollojenazlar (MMP-1, -8, -13, -18), stromelizinler (MMP-3, -7, -10, -11, 12), Jelatinazlar (MMP-2, -9) ve membran tip MMP'lar (MT-MMP-14, -15, -16, -17) olmak üzere 4 farklı gruptan oluşmaktadır. Ayrıca yeni tanımlanan MMP-4, -5, -6, -19 ve -20 bu grupların içerisinde değerlendirilememektedir. Kollojenazlar, kollojen tip I, II, III, VII, ve X gibi fibriler kollojenlerin yıkımından sorumludurlar. Jelatinazlar, 72 kDa ve 92 kDa tip IV kollojenazlar (MMP-2, 9) olarak ta bilinirler. Denatüre kollojenin ve bazal membranın yıkımından sorumludurlar. Endotelial, epitelial, yağ, kas, periferal sinir hücrelerinin

ekstrasellüler matriksinin yıkımından sorumludur. Stromelizinler, kartilaj proteoglikanları dahil bütün ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkıma uğratabilmektedirler. Ayrıca stromelizin-1 diğer birçok kollojenazı proteolitik olarak aktive edebilmektedir. MT-MMP'lar, hücre yüzeyinde bulunurlar, diğer matriks proteinleri gibi sekrete edilmezler. Karboksi terminal uçlarında transmembran bölge içerirler. Ekstrasellüler matriksi yıkıma uğratırlar. Ayrıca MMP-2 gibi diğer bazı MMP'ları proteolitik olarak aktive ederler (Kuzuya M, Iguchi A., Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S 1999, Vihinen P, Kahari VM, 2002).

2.7.1. MMP'lerin yapısı

MMP'ler farklı ortak yapısal özelliklere sahiptirler. Yapılarında predomain, prodomain, katalitik bölge, menteşe bölgesi, hemopeksin/vitronektin benzeri bölge olmak üzere 5 farklı gen bölgesiyle kodlanmaktadır(Kuzuya M, Iguchi A., Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S 1999, Vihinen P, Kahari VM, 2002).

2.7.1.1. Predomain

Predomain; 80 ila 90 adet aminoasit içeren, aminoterminal propeptididir. N terminalinde yer almaktadır, predomain olarak bilinen, enzimi salgılanma için etiketleyen ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir. (Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH.,2000).

2.7.1.2. Prodomain

Bu bölgede yer alan sistein rezidüleri, enzimin latent formunun korunmasından sorumludur. Prodomainin ayrılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlamaktadır (Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, Newby AC., 2011).

2.7.1.3. Katalitik Bölge

Yapısında 170 aminoasit bulundurur. Çinko bağlayan bölgedir. Ek olarak yapısal çinko ve kalsiyum iyonu içerir. (Murphy G, Nagase H.,2008). Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşmasını sağlar (Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, Newby AC., 2011). Jelatinaz enzimleri (MMP-2 ve MMP-9) bu bölümde 3 tane fibronektin tip II benzeri ek domain bulundururlar. Burada jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayıp,

proteolitik aktiviteyi arttırır, ayrıca elastolitik aktivite için esansiyeldir (Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, Newby AC. , 2011).

2.7.1.4. Menteşe Bölgesi

Katalitik bölge ile hemopeksin benzeri bölgeleri birbirine bağlayan, menteşe görevi sağlayan, 5 ila 10 aminoasitlik bölgedir. Pirolince zengindir. MMP-7 ve MMP-26'da bulunmaz (Sternlicht MD, Werb Z. , 2001).

2.7.1.5. Hemopeksin benzeri bölge

Bu bölge, N ve C terminallerini bağlayan disülfit bağı içerir ve 200 kadar aminoasit bulundurur (Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, 1994). Matrilisin 1 (MMP-7) ve MMP-26 dışında hemen hemen bütün MMP'larda bulunur. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinememekle beraber substrat özgünlüğünü sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliğiyle, hücre yüzey reseptör bölgelerinde tanınma fonksiyonu gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca endojen doku inhibitörleri olan TIMP'lerin, jelatinaz grubu MMP'lere (MMP-2 ve MMP-9'a) ve MMP-13'e bağlanmasıyla da ilişkilendirilmiştir (Zucker S, Cao J, Chen WT,2000). Bu genel yapının dışında Jelatinaz A ve B; katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan ve başka matriks metalloproteinaz enzimlerinde bulunmayan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain (3 adet fibronektin tip-2 benzeri domain) bulundurmaktadır(Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S.,1998,).

2.7.2. MMP türleri

Bugüne kadar klonlanmış ve sekanslanmış 66'dan fazla üyesi tesbit edilmiştir. İnsanlardan sentez edilen 24 adet MMP türü olduğu saptanmıştır (Tablo 2.7.1). Son yıllarda MMP'ların tanımlanması hızlı olmuştur. MMP ailesinin eskiden tanımlanmış yedi üyesi varken, yeni keşfedilen metaloproteinazların bunlara eklenmesi ile sayıları giderek artmıştır.

MMP substrat özgünlüğüne göre altı ana grupta sınıflandırılmaktadır (Rielly DD, Rahman P.2011). En çok bilinen ve kullanılan sınıflandırma şekli "substrat özgüllüğüne göre" yapılan sınıflandırmadır. Bununla birlikte "molekül ağırlıklarına göre" veya "yapılarına göre" yapılan sınıflandırmalar da kullanılmaktadır (Rayet B, Gelinas C. Aberrant,1999).

2.7.3. Metaloproteinazların Sınıflandırılması

Kollajenazlar: MMP-1, MMP-8, MMP-13

Gelatinazlar: MMP-2, MMP-9

Stromelysinler:MMP-3, MMP-10, MMP-11

Membran tip metaloproteinaz 1-5 (MT-MMPs)

Stromelysin-3

Metalloelastase

Tablo 2.7.3.1 MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması (Reel, B.,2006).

Grup adı	Tanımlayıcı isim	Numara	Temel substrat
Kollajenazlar	Interstisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen Tip I, II, III, VII ve X, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen Tip I, II, III, PG
	Kollajenaz-3	MMP-13	Kollajen Tip I, II, III
	Kollajenaz-4	MMP-18	Kollajen I
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, kollajen IV, V, VII, X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, kollajen IV, V, XIV, elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kollajen III, IV, IX, X
Membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)	MT1-MMP	MMP-14	Kollajen I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT3-MMP	MMP-16	Kollajen III, FN, jelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Jelatin
	MT5-MMP	MMP-24	PG
	MT6-MMP	MMP-25	Kollajen IV, fibrin, FN, jelatin
Diğerleri	**Matrilisin1**	MMP-7	Serin proteaz inhibitörleri
	Metaloelastaz	MMP-12	Kollajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	RASI-1	MMP-19	Kollajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	Enamelisin	MMP-20	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	MMP-21	Tanımlanmamıştır.
	CA-MMP	MMP-23	Tanımlanmamıştır.
	Matrilisin 2	MMP-26	Kollajen IV, FN, jelatin, VN
	CMMP (Horoz)	MMP-27	Tanımlanmamıştır.
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır.

PG: Proteoglikan, FN: Fibronektin, VN: Vitronektin.

2.7.3.1. Jelatinaz (MMP-2)

Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa molekül ağırlığındadır (Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH.,2000). Keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar, monositler gibi birçok hücreden olduğu gibi ve transforme olmuş hücrelerden de salıverilirler. Akciğerlerde bronş epitel hücreleri, bronş düz kas hücreleri ve fibroblastlar MMP-2 üretir (Yilmaz HH, Yazihan N, Tunca D.,2011). Jelatini, kollajeni (Tip I, IV, V, VII, X, XI, XIV), elastini, fibronektini, laminini (Yilmaz HH, Yazihan N, Tunca D.,2011), agrekanı, versikanı, proteoglikana bağlı proteini, α1-antitripsin/α1-proteinaz inhibitörü (α1-AT), miyelin bazlı protein (MBP) ve TNF prekürsörünü, MMP-1 ve MMP-9'u yıkıma uğratır (Chandler S, Miller KM, Clements JM,1997). MMP-2 aynı zamanda tip 1 kollajeni yıkarak ESM'in yeniden modellenme olayında önemli rol üstlenir (Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B,2001). MMP-2 çözünür halde iken MMP-1 ve diğer kollajenazlara göre daha zayıf kollajenolitik aktivite gösterir. Çünkü proMMP-2 hücre yüzeyine yerleşmiştir ve MT-MMP'ler tarafından aktive edilir. ProMMP-2 perisellüler alanda birikebilir ve lokal kollajenolitik aktiviteye neden olabilir. Dolayısı ile MMP-2'ler kollajenazların parçalamış olduğu küçük kollajen fragmanlarını yıkıma uğratarak birlikte aktivite göstermiş olurlar. Çünkü bu fragmanlar vücut ısısında denatüre olurlar (Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B,2001). MMP-2'ler TIMP-2, -3, -4 ve α2 makroglobulin tarafından inhibe edilirler (Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP,1997). MMP-2 ekspresyonunun kolon (Sundov Z, Tomic S, Vilovic K, Kunac N, Kalebic M, Bezic J.,2008), pankreas (Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP.,1997), meme (Talvensaari-Mattila A,1998), prostat (Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, 2008) ve akciğer (Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, 2008) tümör dokusunda arttığı saptanmış ve söz konusu MMP kötü prognoz faktörü olarak değerlendirilmiştir.

2.7.3.2. Jelatinaz B (MMP-9)

Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa molekül ağırlığındadır (Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, 2008). MMP-9, jelatin ve tip IV bazal membran kollajeni için substrat özgüllüğü gösterir. Ayrıca MMP-9 kollajenleri (Tip III, V, VII, X, XIV) (Chandler S, Miller KM,1997), elastini (Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, 2008), fibronektini (Chandler S, Miller KM,,1997), agrekanı, versikanı, proteoglikan bağlı

proteini, entaktini, α1-AT, MBP ve TNF prekürsörünü (Chandler S, Miller KM,1997) de yıkıma uğratır. Organizmada gelişim, doku yenilenmesi ve inflamasyondan sorumludur (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001). MMP-9 geninin promotor bölgesinin varsayılan AP-1 (-533, -79), NF-kB (-600), Sp1 (-558), ve PEA3 (-540) olmak üzere 4 adet bağlanma bölgesi vardır (Sato H, Seiki M,1993). Bu bağlanma bölgelerinden biri veya bir kaçı aracılığıyla (Ras gibi) onkojenler, (FGF-2, EGF, HGF gibi) büyüme faktörleri ve (TNF-α gibi) sitokinler tarafından MMP-9 ekspresyonu düzenlenir (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001). Buna karşın MMP-9 ekspresyon ve/veya aktivitesi TIMP-1,-3,-4 ve α2-makroglobulin tarafından inhibe edilir (Chakrabarti S, Patel KD, 2005). Makrofaj, mast hücresi, lenfosit, eozinofil ve nötrofil gibi pek çok inflamatuvar hücre, LPS aracılığıyla MMP-9'un ve TNF-α, IL-8, granülosit koloni sitümüle edici faktör gibi diğer inflamatuvar medyatörlerin üretimi ve/veya salıverilmesinden sorumludur (Lu Y, Hong TG, Jin M,2010). Bahsedilen faktörlerin yanında jelatinaz salıverilmesini etkileyen başka faktörler de mevcuttur (Tablo 2.7.3.2.1).

Tablo 2.7.3.2.1. Jelatinazların salıverilmesini etkileyen faktörler (Johansson N, Ahonen M,2000).

Aktive Edici Faktörler			İnhibe Edici Faktörler
Hücre Yüzeyinde Etkili Faktörler	Kimyasal Ajanlar	Diğerleri	
Kalsiyum iyonoforu A23187	Lipopolisakkarid	Onkogenler	Retinoik asit
Konkanavalin A	Kolsişin	TNF	Glukokortikoidler
Kristaller	C-AMP	Otokrin ajanlar	Östrojen
Ürat	Mitomisin-C	Fibroblastların yaşlanması	Projesteron
Hidroksiapatit	Pentoksifilin	İnterlökin 1	Adenovirüs-5EIA geni
Kalsiyum pirofosfat	Forbol diesterleri	Epidermal büyüme faktörü	
İntegrin reseptör antikoru	Prostaglandin E	Trombosit büyüme faktörü	
Polihidroksietilmetakrilat	Trifluoprazin	Virüs aracılı farklılaşma	
Fagositoz	UV ışını		

MMP-9 anjiogenezle en fazla ilişkili olan MMP'lerden biridir ve anjiogenezin pek çok basamağında rolü olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, tumstatin ve angiostatin gibi bazı

anti-anjiojenik peptidler oluşturarak anti-anjiojenik ve koruyucu etkiler de meydana getirmektedir (Martin MD, Matrisian LM,2007).

2.7.3.3.Nötrofil kollajenaz (MMP-8)

Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, 75 kDa molekül ağırlığında proenzimdir ve aktif formu 58 kDa molekül ağırlığındadır (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001). Tip I, II, III, (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001), VII, VIII, X (I > III) kollajeni, jelatini, agrekanı, α1-AT'yi, fibronektini yıkar (Chandler S, Miller KM,1997). Nötrofillerce üretilir ve diğer kollajenazlardan farklı bir gen tarafından türetilir. Nötrofil kollajenazda, interstisyel kollajenazda (MMP-1) bulunmayan altı glikozilasyon sahası vardır ve bu nedenle nötrofil kollajenaz artmış glikozilasyondan sorumlu tutulur (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001).

Hanemaaijer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, romatoid sinovial fibroblast ve epitel hücrelerinde TNF-α ve PMA'ın (forbol miristat aseatat) MMP-8 mRNA ve protein düzeylerinde artış oluşturduğu ve bu artışın doksisiklin ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir. (Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT,1997). İnsan tam kanında *ex vivo* olarak yapılmış bir çalışmada Porphyromonas gingivalis kaynaklı LPS ile indüklenen MMP'ler (MMP-8, -9) ve pro-inflamatuvar mediyatörlerin (IL-1β, IL-6, IL-8) ekspresyonlarında tetrasiklin**,** doksisiklin ve kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasikilin-3 (CMT-3) ile sitokin sekresyonunda farklı derecede azalma yaptığı bulunmuştur. Bununla birlikte aynı çalışmada LPS'le muamele edilmiş tam kan örneklerinin MMP-9 ve MMP-8 sekresyonunda herhangi bir değişiklik oluşturmadığı da savunulmuştur (Cazalis J, Tanabe S,2009). Nötrofil hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada, LPS stimülasyonu ile MMP-7, MMP-9'a ek olarak MMP-8 ekspresyonunda da belirigin artış meydana geldiği görülmüştür (Shimizu T, Kanai K, 2006). İnsan jinjival fibroblastlarında yapılan bir çalışmada da LPS ile MMP-1, MMP-2 ve MMP-8 aktivasyonlarının arttığı belirtilmiştir (Ko SY.,2012).

2.7.3.4. Stromelisin 2 (MMP-10)

Stromelisin 2 (MMP-10), doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, aktif formu 46 kDa molekül ağırlığındadır (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001). Substratları fibronektin, jelatin, kollajenler (tip III, IV, V), kazein, agrekan, elastin, proteoglikan bağlı protein, MMP-1, MMP-8' dir (Chandler S, Miller KM,1997). "Transin 2" olarak da isimlendirilmiş olan ve insan tümörlerinden kopyalanabilen bu molekülün, aminoasid

dizilimi, büyüklüğü ve substrat spesifitesi stromelisin 1 ile benzer özellikler taşımakla birlikte, farklı genlerden de türetildikleri bilinmektedir (Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O.,2001). Son zamanlarda farklı hücre hatlarında MMP-10 ekspresyon düzeyinin LPS ile nasıl değiştiğini belirten çok az sayıda çalışma vardır. Bunlardan Reel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan monosit hücrelerinde LPS uyarımıyla mRNA düzeyinde MMP-1, MMP-10 ve MMP-14 üzerinde güçlü, MMP-9 ve TIMP-1'de ise daha zayıf şekilde stimülasyon gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Cazalis J, Tanabe S,2009). Ancak prostat kanseri hücre hattı PC-3'lerdeki MMP-10 ekspresyon düzeyine LPS indüksiyonunun etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

2.7.3.5. Matriks metalloproteinaz-7 (MMP-7)

Matriks metalloproteinaz MMP -7 matrilizin olarak da bilinir ESM‟in proteolitik aktivite sergiler (Van LP, Wielockx B, Puimege L,2005). Anjiogenez, metastaz, invazyon, hücre büyümesi tümör oluşumunun birçok basamağında yer alır ve kanser dokusunda sıklıkla eksprese olur.

MMP-7(Matrilizin) 28 kDa ağırlığında proenzim olarak salgılanır; N terminalinden 9 kDa' luk prodomain parçası kaldırılarak aktive olur. MMP-7 polarize glanduler epitelyumdan eksprese edilen MMP ailesinin bir üyesidir (Nelson, A.R.,2000). Bundan dolayı MMP-7 fonksiyonu, basolateral ya da apikal (her ikiside) kompartmana salınarak birçok substratla etkileşime girebilir. MMP-7 normal meme ve parotid bezlerin duktal ve glandüler epitelinden, karaciğer, pankreas, prostat, peribronşial bezlerden temel olarak eksprese edimektedir (Harrell, P.C,2005). İmmünohistokimyasal analizlerde hücre yüzeyi ya da hücre içinde glandüler epitelde primer olarak apikal ve lümende çok az da basolateral boyama gözlenmiştir (Harrell, P.C,2005). MMP-7 doğuştan bağışıklıkta, akciğer ve bağırsak gibi organlarda prodefinsinler gibi antibakteriyel peptitleri aktive ederek koruyucu rol oynar (Wilson, C.L.,1999). Tümör progresyonu sırasında benign ve malign tümörlerin epitelinden eksprese edilebilmektedir. MMP-7 proteoglikanlar, agrekan, vitronektin, tip IV kollajeni gibi geniş bir ESM substrat spesifikliğine sahiptir (Wilson, C.L.,1999). Matrilizin diğer MMP‟ler gibi hücre yüzey moleküllerinin ektodomainini kesmede önemli rol oynar. Tümör nekroz faktör-α (TNF-α) Fas ligand (FasL), heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), E-kadherin ve β4-integrin moleküllerin ektodomainini keser. TNF-α, FasL, ve HB-EGF apikal bölgede lokalize; E-kadherin, β4-integrin ve çeşitli ECM kompanentleri bazolateralde lokalizedir(Nelson, A.R.,2000). Matrilizin sekresyon mekanizması henüz net değildir

(Wilson, C.L.,1999). Latent MMP-7 öncelikle basolateral kompartmana salınır. MMP-7 apikal kompartmanda daha aktiftir (Nelson, A.R.,2000).

Mmp-7'nin kanser büyümesindeki rolü çok büyüktür. MMP-7 tümörleşmenin erken evresinde etkilidir (Lecce G, Meduri G,2001). MMP-7 HB-EGF"ün ektodomainini keserek olgun hale getirir, bu da ErbB4 reseptörünü aktive ederek hücre çoğalmasını arttırır ve apopitozu inhibe eder (Mote PA,2000).

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) tümör oluşumunda mitojenik ve antiapoptotik etkileri ile önemli rol oynar. IGF"nin biyoaktifliği IGF bağlayan proteinlerle etkileşerek düzenlenir. Son yıllarda matrilizinin tüm IGFBP (1-6)"i parçaladığı böylece kanser hücrelerinin büyümesini ve yaşamasını sağladığı bildirilmiştir (Giangrande PH, Pollio G,1997).

2.7.4.TIMP'ler (matriks metalloproteinaz doku inhibitorleri)

TIMP'ler, bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdendir. Pek çok dokuda ve vücut sıvısında bulunurlar. MMP'lere irreversible ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece, organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri olan TIMP'ler arasında sürekli bir denge söz konusu olur (Reel, B., 2006). İnsanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 adet TIMP türü bulunmaktadır. TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler. TIMP'ler kendi aralarında kıyaslandığında, MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber, matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden farklıklar içerirler. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile, Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilir (Reel, B.,2006).

MMP'ler ve TIMP'ler, normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve kemiğin yeniden modellenmesi, anjiyojenez, inflamasyon, apoptoz, immün cevap gelişimi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. MMP ekspresyonu, gen transkripsiyonunu etkileyen faktörlerin etkisi altındaki çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda gelişen doku yeniden modellenmesi sırasında artar. Bu sırada MMP'lerin üretimi TIMP'lerin üretimini aşabilir. Böylece MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge bozulur (Reel, B.2006). Dengenin MMP yönünde bozulması bu

enzimlerin, esansiyel olarak, aşırı matriks yıkımına neden olarak doku hasarı, inflamasyon, tümör invazyonu, metastaz, anjiyojenez ve malign hücre proliferasyonu gibi önemli patolojik süreçlere katılmasına neden olur (Dong Z, Nemeth JA, 2001).

2.7.5. Matriks metalloproteinazlar ve kanser ilişkisi

MMP' ların kanser gelişimindeki rolü, ekstrasellüler matriks komponentleri üzerindeki yıkıcı etkisinden daha karmaşıktır. MMP' lar tümör progresyonunun, hücre büyümesi, anjiogenez, invazyon, apoptozis ve metastaz olmak üzere her basamağında rol almaktadırlar. Kanserin erken evrelerinde, insulin-benzeri büyüme faktörleri gibi biyoaktif moleküllerin MMP' lar tarafından proteolitik olarak salınması sonucunda malign transformasyon gerçekleşmektedir (Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM,2004). MMP' lar tümör hücrelerinin konak immün cevabından kaçmasında da görev almaktadır. Örneğin: MMP-9, IL-2R alfa sinyalizasyonunu bozarak T lenfosit proliferasyonunu baskılar(Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC,2001). MMP ekspresyonunun, bazı kanser tiplerinde diagnostik ve prognostik değeri olduğunu gösteren çalışmalar bildirilmiştir. Tümör çevresindeki stromadan salınan MMP'lar, ile tümör hücre yüzeyindeki MT-MMP'lar tümör grade'i ile korelasyon göstermektedir(Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM,2004). Malign tümörlerde farklı MMP ekspresyonu, benign tümörlere oranla daha fazladır. Ayrıca MMP' lar primer tümörün büyümesi için gerekli mitojenik faktörlerin salınımına yol açmaktadır. Hücre ölümünü regüle eden substratların açığa çıkmasını sağlamaktadır. Metastatik kanser hücreleri dokulara giriş çıkış ve doku kanlanmasını sağlamak için MMP'ları kullanmaktadırlar. Jelatinaz A ve B'nin neovaskülarizasyonda rol aldığı düşünülmektedir. Kanser hücreleri, kemokin reseptörleri kullanarak metastatik hücrelerin farklı organlara hedeflenmesini sağlamaktadır. MMP'ların kemokin gradientlere bağlanmasının, metastatik hücrelerin hedeflenmesinde önem taşıdığı düşünülmektedir. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda MMP' ların kemokin aktivitesinin düzenlenmesi ve bu sayede inflamasyonun modulasyonu gibi rolleri de olduğu bildirilmiştir4. MMP' ların endotelial hücreler üzerine pek çok etkisi olduğu bilinmektedir. MMP' lar endotelial hücre migrasyonunda ve tüp formasyonunda oldukça önemlidir (Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ.,2001). Endotelial hücre migrasyonunu, fibrin bariyerlerine invazyonu sağlayan ve fibrinolitik aktiviteyi en çok gösteren MMP' lar, MT-MMP' lardır1. MMP-7 (Matrilizin) endotelial hücre proliferasyonuna ve MMP-1, ve MMP-2' nin endotelial ekspresyonunda up-regulasyonuna yol açar ve in-vivo ortamda anjiogenezisi

indükler(Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawaa T,2001). Ayrıca invitro koşullarda ekzojen MMP-9 un hücre büyümesini arttırdığı bilinmektedir (Rundhaug JE,2005). Anjiogenez de ise VEGF, FGF, TGF beta gibi bazı proanjiogenik faktörler, MMP'lar tarafından aktive edilmektedirler1. Ayrıca MMP-9 tümör makrofajlarında ve endotel hücrelerinde indüklenerek, neovaskülarizasyonu arttırdığı ve akciğer metastazlarına yol açtığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise farklı bazı MMP' ların anjiogenezisin endojen inhibitörleri olan anjiostatin ve endostatinin prekürsörlerinin salınımına yol açarak anjiogenezisi engellediği bildirilmiştir(Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawaa T,2001).

2.8. Sitokinler

İmmünolojik olay ve inflamasyon sırasında bazı hücrelerce hormon benzeri bir takım polipeptid moleküller sentezlenmektedir. Bu mdyatörlere "**sitokin**" denir. Sitokinler immün sistem hücrelerinin aktivitelerini yönlendiren peptidlerdir. Monosit/makrofajlarca salınan sitokinlere **monokin**, lenfositler tarafından salınan sitokinlere ise **lenfokin**, lökositlere etki eden monokin ve lenfokinlere de **interlökin** (IL) adı verilmektedir. İnterlökin (**IL**), koloni-sitümüle edici faktör (**CSF**), interferon(**IFN**), tümör nekroz faktör (**TNF**) ve tümör büyüme faktörü (**TGF**) gibi sitokinler; konağın yabancı antijenlere karşı reaksiyonlarını, lökosit ve bazı hücrelerin gelişmesini, hareketini, farklılaşmasını sağlayan immünomodülatörlerdir.
Sitokinler iki tiptir;

Tip-I; Th1 yardımcı T-hücreleri tarafından sentezlenir. (IL2, IFN-γ, IL12 ve TNF-β)

Tip-II; Th2 yardımcı T-hücreleri tarafından sentezlenir. (IL4, IL5, IL6, IL10 ve IL13)

2.8. 1.Sitokinlerin sınıflandırması

Sitokinler temel etkilerine göre dört gruba ayrılabilir. **Birinci grup;** doğal immüniteye aracılık eden ve anti-viral **tip-I interferonlar** ile **pro-inflamatuar sitokinleri**-TNF, IL-1, IL-6 ve düşük moleküler ağırlıklı inflamatuar sitokinlerin yeni tanımlanmış ailesinden oluşmaktadır.

Sitokinlerin ikinci grubu; antijen ile uyarılmış-CD4+ T-lenfositlerinden türevlenmiş sitokinler olup B ve T hücrelerinin; aktivasyonunun, büyümesinin ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynarlar. Bu grup; **IL-2**, başlıca T-hücre büyüme faktörü; **IL-4**, IgE sentezinin temel regülatörü; **TGF-β** (tümör büyüme faktörü-beta), lenfosit

yanıtlarını inhibe eder. **Sitokinlerin üçüncü grubu;** antijen ile aktive olmuş CD4+ ve CD8+ T-lenfositlerince üretilmektedir. İnflamatuar, lökositleri aktive etmeye yardımcı olmakta ve T-hücre regülasyonunda bu efektör hücreleri tanımaktadır. Bu grup, mononükleal fagositlerin temel aktivatörü **γ-interferonu**; nötrofillerin bir aktivatörü **lenfotoksini**; ve eosinofillerin bir aktivatörü **interlökin-5** i içerisine almaktadır.

Dördüncü grup; koloni-sitümüle eden faktörler (**CSF**) olarak adlandırılır ve kemik ilik hücrelerinin büyümesini sitümüle eder. Non-spesifik efektör hücrelerden ve T-hücrelerden türevlenen sitokinlerdir ve inflamatuar lökositlerin bir kaynağını meydana getirirler. Böylece sitokinler, patojenlere karşı konak savunmasında kritik olarak pek çok fonksiyona yardımcı olmakta ve spesifik ve doğal immünite arasında bağlantılar kurmaktadır. Ayrıca sitokinler, lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasına da tesir ederek immün cevapların önemini ve doğallığını düzenleyebilmektedir. Son olarak sitokinler, antijen eleminasyonunu sağlayan efektör mekanizmaların bir türünü aktive eden herhangi bir antijen için spesifik lenfositlerin az miktarlarını mümkün kılan önemli amplifikasyon mekanizmalarının gerçekleşmesini sağlamaktadırlar. Sitokinlerin aşırı üretimi veya faaliyeti; doku hasarına hatta kaybına neden olabilmektedir. Sitokinler veya inhibitörleri, hastalıkla ilişkili biyolojik cevapların modifiye edilmesinde veya uygulanmasında potansiyel olarak uygulanmaktadır.

2.8.2. Sitokin Etkilerinin moleküler fizyolojisi

İmmün ve inflamatuar reaksiyonların oluşmasında rol oynayan ve düzenleyen çözülebilir (soluble) proteinlerdir. Pleiotropizm (=Ambiguity, belirsizlik); bir sitokin multiple hedef hücreler üzerinde multiple etkilere sahiptir. Redundansi (fazlalık); farklı sitokinler aynı etkilere sahip olabilmektedirler. Sinergizm/ Antogonizm; aynı anda hücrelerin bir veya daha fazla sitokine maruz kalması nitelik olarak farklı yanıtların oluşmasına neden olabilir. Sitokin Kaskatı; bir sitokin diğer bir sitokinin üretimini arttırabilir (veya indirgiyebilir). Reseptör transmodülasyonu; bir sitokin, diğer bir sitokin için reseptörlerin ekspresyonunu arttırabilir (veya indirgiyebilir). Stokin etki şekilleri genellikle otokrin veya parakrin, sadece nadir olarak endokrin etki şeklindedir. Özelleşmiş hücrelerin bir tipi tarafından salgılanmaktadırlar. Her hormon etkisi yönünden tektir. Etkilerini endokrin tarzda gösterirler. Hedef hücrelerin özgünlüğü sınırlıdır ve sınırlandırılmış bir spektrum söz konusudur.

2.8. 3.Sitokin Reseptörleri

Sitokinlerin bağlandıkları reseptörler, sekans homolojilerine göre gruplandırılmaktadır. Bunlar;

1. İmmünoglobulin üstailesi,
2. Sitokin reseptör ailesi-class-ı
3. Sitokin reseptör ailesi-class-ıı
4. TNF reseptör ailesi
5. Yedi transmembran heliks ailesi

2.8. 3.1. İmmünoglobulin üst ailesi

İmmünoglobulin Üstailesi; Ig V veya C domainlerine 70-110 aa rezidüleri homolog olan, bir veya daha fazla Ig domain bölgeleri ile karakterize edilirler. IL1 ve M-CSF için söz konusu reseptörleri kapsar.

2.8. 3.2. Sitokin Reseptör Ailesi- Class I

(Hematopoeitin Reseptör Ailesi) İmmün ve hematopoeitik sistemlerde fonksiyon gören sitokin-bağlayan-reseptörlerin çoğu bu reseptör ailesine aittir. Bununla birlikte bu aile, büyüme hormonu ve prolaktin için reseptörleri de kapsar. Ekstracellular domainde, korunmuş aa sekans motifleri vardır. Bunlar; (i) pozisyonel olarak korunmuş 4 sistein rezidüsü (CCCC) ve (ii) Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) korunmuş sekansıdır.(X; korunmamış bir aa i temsil etmektedir). Reseptör 2 polipeptit zincirden oluşur; bir sitokin-spesifik altünite ve genellikle sitokin için spesifik olmayan bir sinyal transducing altüniteye sahiptir. Birkaç durum için bu reseptörler trimer yapıdadır. Sinyal-transducing altünite, sitokinin yüksek affinite ile bağlanması için gereklidir. Class-I sitokin reseptörleri, altailelere ayrılmaktadır. Bunlar;

a) **GM-CSF Altailesi**: bu alt aile IL3, IL5 ve GM-CSF için reseptörleri kapsar. Düşük affinite gösteren sitokin-spesifik reseptör α-altünitesidir.bu üç düşük affiniteli α-altünitelerinin hepsi, ortak bir sinyal-transducing β-alt ünitesi ile non-kovalent olarak ilişki kurabilmektedir. Dimerik reseptörün oluşması, sitokin için affinitenin artmasını sağlamakta aynı zamanda sitokin bağlanmasını takiben membranın diğer tarafına bir sinyalde geçmiş olur. İlginç olarak, IL3, IL5 ve GM-CSF aktivitelerinde önemli derecede redundansi göstermektedir. IL3 ve GM-CSF; hemapoietik kök hücreleri ve progenitör hücreler üzerine

etki etmekte, monositleri aktive etmekte ve megakaryosit farklılaşmasını teşvik etmektedir. Bu sitokinlerin üçünün tamamı, histamin salınımı ile eusinofil proliferasyonunu ve bazofil degranülasyonunu teşvik etmektedir.

b) **IL6 Altailesi:** bu alt aile; IL6, IL11 ve IL12 için reseptörleri kapsar. Bu olayda, ortak bir sinyal-transducing altünite (gp130), bir veya iki sitokin-spesifik altüniteler ile ilişki kurmaktadır. Şöyle bir durum tahmin edilmektedir; bu altünitelerdeki reseptörlere bağlanan sitokinler biyolojik aktiviteler yönünden örtüşme gösterir.

c) **IL2 Altailesi:** bu alt aile, IL2, IL4, IL7, IL9 ve IL15 için reseptörleri kapsar. IL2 ve IL15 reseptörleri, trimer olup; sitokin-spesifik bir zincir ve sinyal-tranduksiyonundan sorumlu iki zincirden-β ve γ- oluşur. IL2 reseptör γ-zinciri, dimer yapıdaki bu altaile üyelerindesinyal-transduksiyon altünitesidir. Genellikle α-altünite, sitokine özgüdür. β veya γ altüniteler; sitokin bağlamada yüksek affiniteye ve/veya sinyal trasdüksiyonu için gereklidir. Eritropoietin (EPO) reseptörü de (EPOR) bu altaileye aittir.

2.8. 3.3. Sitokin reseptör ailesi- class II

Sitokin Reseptör Ailesi- Class II (İnterferon Reseptör Ailesi) bu reseptörler için ligandlar; interferon α, β ve γ dır. Bu reseptörler korunmuş sistein motifine sahiptir fakat class-I sitokin reseptörlerindeki WSXWS motifi bulunmaz.

Class I ve Class II reseptörlerinin çoğunda sinyal trandüksiyonu reseptör alt ünitelerinin sitokin teşvik edilmiş dimerizasyonu ile başlmaktadır. Bu dimerizasyon reseptörün sistolik kısımlarını birbirine daha yakın bir konuma getirir ve hücre içi sinyal mekanizmasının başlangıç noktasını oluşturur. Bu sitokinler Jak / STAT patwayini kullanır. Jaklar, Statlar olarak bilinen proteinler üzerindeki tirozin rezüdülerini fosforlar. Genlerin aktivasyonunu sağlayan statların dimerizasyonu söz konusudur. Multiple Jakların ve statların özgünlüklerini yardımcı olan diğer elementler de izole edilmiştir. Jak / Stat patway i aslında sitokin spesifik bir padway olarak arzetmekte fakat diğer büyüme faktörleri ve hormonlarda bu padway i aktive edebilmektedir. Sitokin sinyal iletinin moleküler mekanizması için sadece stoplazmada lokalize olduğu düşünülmüş son kanıtlara baktığımızda ise sitokinler hücre nükleosunu hedef alaraktan fonksiyon görebilmektedir.

2.8. 3.4. TNF Reseptör Ailesi

Transmembran glikoproteinlerin TNF reseptör ailesi 55 kDa TNF reseptör (TNFR-I) ve 75 kDa luk TNF reseptör (TNFR-II) lerini, CD 40 ve Fas şeklinde kapsamaktadır.

Ekstracellular amino terminalinde yaklaşık 40 aa lık sisteince zengin tekrarlar sahiptirler. Ailenin bazı üyeleri stoplazmik bölgelerinde sekans benzerlikleri gösterir. Lenfotoksin ve TNF – α birlikte, p 55 reseptörü ve p 75 reseptörüne bağlanmaktadır. TNF – α 'nın öldürme etkileri p 55 reseptörü aracılığıyla gerçekleşir. p 55 reseptörü "death domain (ölüm domaini,DD)" olarak isimlendirilen korunmuş bir dizi motifi içerir. TRADD olarak adlandırılmakta ve apoptosis ile ilgilidir. p 75 reseptörü , TNF reseptör ilişkili faktörler (TRAFs) olarak isimlendirilen moleküllerin bir protein ailesinin tanımlayan bir domaini içerir. Bunların aşırı ekspresyonu transkripsiyon faktörü NFkB yi aktive eder ve böylece transkripsiyon faktör AP – 1 (aktivatör protein 1) regüle eden stres – aktive olmuş protein kinaz patway de aktive olur. TNFR I ve TNFR II 'nin soluble formları kanserli hastaların idrar ve serumlarında bulunmuştur.

2.8. 3. 5. Kemokin reseptör ailesi

Kemokin reseptörleri, 7 transmembran loopların bir üst ailesinin üyesidir ve sinyallerini heterotrimerik G proteinleri vasıtası ile iletirler. Kemokin reseptörleri yapısal olarak birbiriyle akrabadır. Kemokin reseptörlerin N-terminal kısmı ligand bağlanma özgünlüğünü belirlemede anahtardır. Sitokinlerin tümörün oluşumu ve gelişmesinde önemli rol aldıkları için potansiyel tümör belirteci olabilecekleri düşünülmektedir (Chechlinska M.,2003).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyaller

Meme kanseri kök hücre (benzeri) hücreler: 113S559 nolu TÜBİTAK projesinde elde edilen meme kanseri primer kültürü kullanılmıştır. 150mg Herceptine (trastuzumab) 5ml destile su ile çözdürülüp, ilk doz 10 uM olacak şekilde konsantrasyonu ayarlanmıştır. 0,007M Paklitaksel, ana stoktan ilk doz için konsatrasyonu 100 uM olacak şekilde hazırlanmıştır. Karboplatin (50mg/5ml) ana stoğundan ilk doz 4 uM olacak şekilde ilaç konsantrasyonu ayarlanmıştır. Hücre kültürü besiyesi (DMEM F-12) , %10 FBS (Biochrom), %1 penicillin-steptromycin (Biochrom), Tripsin-EDTA (biochrom -%0.05 / % 0.02 (w/v), without Ca^{2+}, Mg^{2+}). Protein izolasyonu için, RIPA cell lysis buffer (Amresco) kullanılmıştır. Sitotoksisite analizlerinde 3-[4,5- Dimethylthiazol-2-yl] 1-2,5-diphenyltetrazolium bromide (XTT) kiti kullanılmıştır. Matrix metalloproteinazlar ve sitokinlerin tespiti için MMP-10 hedef ve Cytokine-23 hedef human antibody array (Abcam) kullanılmıştır. Array membranları kemilüminisan olarak görüntülenmiş (Vilber Lourmat Gel Documentation System), ve Image J programıyla densitometrik analizler yapılmıştır. 7-AAD (Peridinin Chlorophyll Protein-PerCP, Becton Dickinson-BD), CD44 (Phycoerythrin-PE, BD), CD24 (Cy7 bağlı Phycoerythrin-PE-Cy7, BD), HER-2 (FITC Mouse Anti-Human HER-2/neu, BD) monoklonal antikorları kullanılarak akım sitometrik (FACS Aria III, BD) analiz cihazı kullanılarak meme kanseri hücreleri analizleri yapılmıştır. FACS Aria III akım sitometri cihazı (BD) ile saflaştırılarak kültüre alınmış ve hücreler üretildikten sonra ALDEFLUOR kiti (Aldehit Dehidrojenaz [ALDH] Merkezli Hücre Belirleme Kiti, STEMCELL) kullanılarak bu hücre gruplarındaki ALDH aktivitesi analiz edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Hücre kültürü protokolü

Meme kanseri kök hücre (benzeri) hücreler 113S559 nolu TÜBİTAK projesinde elde edilen meme kanseri primer kültürü kullanılmıştır. Tez çalışmaları süreci boyunca, TÜBİTAK projesinde elde edilen Hasta 3 (H3)'ün primer kültürü üretilmiştir. H3, flow sitometri analizi sonrası litaratürde bilinen kanser kök hücre belirteçleri kullanılarak kök hücre benzeri

hücreler seçilmiştir (Tirino V., Desiderio V., Paino F.,2012). Bu alt kültürler üretilip moleküler analizlere tabi tutulmuştur. H3-1: $CD44^{+}CD24^{-}HER2^{+}$; H3-2:$CD44^{+}CD24^{-}HER2^{-+}$ fenotipi taşıyan hücrelerdir. Bu tez çalışmasında kültürler kısa kodlarıyla anılacaktır. Hücrelerden analizlerin yapılabilmesi için belirli sayılara ulaşmaları gerekmektedir. Bu sayılara ulaşmak için kültürün üretildiği kültür kaplarının (25 cm^2, 75 cm^2, 24 kuyulu plaka gibi) konfluent yani %75-%80 dolu olması gerekmektedir. Hücreler tripsin (kaç mL, kaç dakika) ile kaldırılıp deneyden önce thoma lamında (Bright-Line, ABD) sayım yapılmıştır (100 µL trifan mavisi, 900 µL hücre süspansiyonu).

3.1.1.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücre kültürü çalışmalarında hücre hatlarının korunabilmesi, pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişimlerin önlenmesi; ayrıca bu çalışmalar sırasında güvenli olarak geriye dönebilme şeçeneğinin sağlanabilmesi amacıyla hücre hatlarının kısa veya uzun süreli stoklanması gerekmektedir. Hücrelerin saklanabilmesi için en uygun yöntem -80˚C veya -130˚C'nin altında dondurması işlemidir. Dondurma işlemi sırasında hücrenin organellerinin korunması için dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır (Tablo3.1.2.2.1). Bu amaçla kullanılan ajanlar suda eriyebilen maddelerdir; donma sürecinde oluşan buz kristali miktarını ve elektrolit konsantrasyonundaki artışı kontrol ederek optimal değerlerin üzerine çıkmasını engellemektedirler.

Dondurma işlemi için ilk olarak hücreleri yüzeyden kaldırabilmek amacıyla; 25cm^2'lik kültür kapları (Tablo1) için 2 ml %0,05/%0.02(w/v) Tripsin-EDTA (Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid - Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit) (Bio-Chrom, 25200-056, Germany) yıkamasının ardından 2 ml %0,05 / %0.02(w/v) Tripsin-EDTA uygulanmışyıt ve hücreler 37˚C'de 5-6 dakika süreyle inkübatöre bırakılmıştır. Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra mikroskop altında kültür kabından ayrıldıkları gözlenip, 3- 4ml tam besiyeri (serum içaren) ilave edilmiş ve sonrasında pipetaj işlemi ile homojen hale getirilmiştir. 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 ml; %90FBS , %10 DMSO içeren solüsyonun ilavesinin ardından kriyo tüplere aktarılarak –bir gece -20˚C ve daha sonra da -80˚C'deki derin dondurucuya, daha sonra da sıvı azot tankına kaldırılmıştır. Donmuş olarak saklanan hücreler daha sonra çözündürülerek yeni kültürler hazırlanabilmektedir. Bu işlem esnasında ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce çözülmekte ve ani olarak serbest sıvı salınmakta ve sonuçta

hipotonik hücreler şişerek patlamaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için çözdürme işlemi olabildiğince hızlı yapılmalıdır. Çözdürülecek olan hücreler -80˚C derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37˚C'lik su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dakika) bekletilmiştir. Ardından hücre kültür kabındaki 37˚C'ye ısıtılmış 9 mL besiyeri üzerine dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra ilave edilmiştir.

Tablo 3.1.2.2.1. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan gereçler

Kullanılan Gereç	**Firma - Ülke**
Steril Hücre Kültür Kabı (25 cm^2)	Cellstar - Almanya
Steril Hücre Kültür Kabı (75 cm^2)	Cellstar - Almanya
2, 5, 10, 25 ml hacimli otomatik pipetler	Thermo Scientific- ABD
Thoma-lamı	Bright-line ABD
İnvert mikroskop	Leica - Almanya
%99,9 Dimetilsülfoksit (DMSO)	AppliChem-Almanya
%0.05 / % 0.02 (w/v) Tripsin-EDTA (03-052-1B)	Biological Industries – Israil
0,2 µm porlu şırınga filtresi (16534K)	Falcon- ABD

3.1.1.3. Hücrelerin Üretilmesi ve Pasajlanması

Farklı hücre hatları ihtiyaçlarına uygun şekilde farklı ortamlarda yetiştirilmektedirler. H3, H3-1, H3-2, H3-3 hücre hatları, %10 FBS ve % 1 penicillin- steptromycin (10.000U/ml/ 10.000ug/ml) içeren DMEM-F12 ortamında üretilmektedir. (Tablo 3.1.1.3.1).

Tablo 3.1.1.3.1. H3, H3-1, H3-2, ve H3-3 hücrelerinin üretileceği kültür ortamını içeriği.

Madde	**Miktar**	**Firma - Ülke**
Penicillin- Steptromycin (10.000U/ml/ 10.000ug/ml)	5 ml (%1)	Bio-Chrom – Almanya
Fötal Dana Serum (FBS) (041271a)	50 ml (%10)	Biological Industries - İsrail
DMEM-F12 Hücre Ortamı (FG-4815)	500 ml	BioChrom - Almanya

Kültürlerde çoğalan hücreler, içinde bulundukları besi ortamındaki besleyici ajanları büyük ölçüde tükettikten ya da üreme yüzeyinin tamamını kullandıktan sonra çoğalma hızlarını düşürmekte ve zamanla tamamen durdurmaktadırlar. Bu dönemde kültürün bölünmesi yapılması gereken en doğru işlemdir ve bu işleme "Pasajlama" adı verilmektedir. Hücreler deneye alınacağı zaman Thoma lamında sayım işlemi uygulanıp istenilen hücre

miktarı hesaplandıktan sonra pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Deneye alınmayacak hücreler ise rutin olarak 48 saatte bir beslenir ve bulundukları hücre kültür kabının zeminini kapladıkları zaman (%80) seyreltmek üzere pasajlama yapılarak rutin beslemeleri devam ettirilir. Yüzeye bağımlı hücreler ile yapılan kültür çalışmalarında öncelikle hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları gerekir. Bu işlem mekanik, enzimatik ya da kimyasal yöntemlerle mümkün olmaktadır. Hücrelerin yüzeyden ayrılmasından sonra ise en kısa sürede kullanılan enzim ve kimyasallar ortamdan uzaklaştırılmalı veya taze tam besiyeri ile seyreltme yapılmalıdır.

Gerçekleştirilen pasajlama işlemi için tek kullanımlık steril cam pastör pipetleri kullanılarak hücrelerin üzerlerindeki ortam vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. 25cm^2'lik steril kaplara yapışmış olan hücrelerin yüzeyi uygulanacak Tripsin-EDTA'nın etkisini arttırmak için 1ml Tripsin-EDTA solüsyonu kültür kabının ortasına damla damla ilave edildikten sonra, 10-15 saniye süresince nazikçe sallama işlemi yapılarak Tripsin-EDTA'nın kültür kabının her bölgesine yayılması sağlanmıştır. Ardından Tripsin-EDTA vakum ile uzaklaştırılıp, 3mL Tripsin-EDTA solüsyonu kültür kabının ortasına damla damla ilave edilmiştir. 37˚C ve %5 CO_2'li inkübatörde hücreler yüzeyden kalkana kadar yaklaşık 5-6 dakika kadar beklemeye alınmıştır. Daha sonra 10 mL besiyeri hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve pipet yardımıyla hücreler süspande edilmiştir. Süspansiyon iki kültür kabına bölünmüştür. Hücrelerin kültür kabına homojen şekilde dağılmaları için nazikçe sallama işlemi uygulandıktan sonra, kaplar hücrelerin üremesi için inkübatöre yerleştirilmiştir.

3.1.1.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi için yapılan bir işlemdir. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre veya deneye istenilen miktarda hücre alabilmek amacıyla Thoma lamında sayım işlemi uygulanmıştır. Sayım işlemleri için her uygulama öncesinde homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp üzerine 900 µl trifan mavisi eklenip Thoma lamı ile üzerine yerleştirilmiş olan lamelin arasındaki oluğa pipet ile kenardan sızdırılarak süspansiyonun yayılması sağlanmıştır ve mililitredeki hücre sayısını belirlemek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hücre sayısı / mL= Hücre sayısı (tüm lam üzerinde sayılan)} \; x \; 10^4$$

3.1.2. Kanser Kök Hücre (benzeri) Hücrelerinde Moleküler Analizler

Tez çalışmamızda, Hasta 3 (H3) primer kültürü, ve alt grupları olan H3-1: $CD44^{+}CD24^{-}HER2^{+}$, H3-2:$CD44^{+}CD24^{-}HER2^{-}$benzeri (stem cell like) hücreler kullanılmıştır (Şekil 1.) İlaçsız kültüre edilen meme kanseri kök hücrelerinde ($CD44^{+}$/$CD24^{-}$ meme kanseri kök hücreleri) ve H3 primer meme kanseri hücrelerinde HER2 reseptörü ifadesi, sitokinlerinin ifadeleri ve metastatik hücre belirteçleri metalloproteazların ifadeleri moleküler yöntemlerle (Flow sitometri ve protein array) belirlenmiştir.

3.1.2.1. Kök hücre CD işaretleri kullanılarak hücrelerin izolasyonu vekKök hücrelerde HER2 ifadesi ile ALDH enzim aktivitesinin belirlenmesi

Hücreler 25 cm^2 kültür kabında %10 serum ve antibiyotik içeren DMEMF12 besiyerinde üretildikten sonra, hücreler 25 cm^2 kültür kabından kaldırılarak, trifan mavisi ile sayılıp $1x10^6$ hücre alınarak aynı çözelti ile yıkanmıştır. Kanser kök hücre zarı üzerinde bulunan (Tirino V., Desiderio V., Paino F., 2012) CD işaretlerine bağlanan floresan monoklonal antikorlar 1 μg/mL olacak şekilde hücreye eklenerek karanlıkta 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile yıkadıktan sonra FACS Aria III hücre saflaştırma sisteminde analiz edilerek hücreler saflaştırılmıştır. Hücre CD işaretlerine bağlanması için mouse anti-human CD44 FITC, mouse anti-human CD24 PE antikorları (BD Biosciences) kullanılmıştır. $CD44^{+}$, $CD24^{-}$ hücreler 2 mL DMEM/F12 besiyerine seçilerek kültür kabına alınmıştır. Bu hücreler meme kanseri kök hücresi olarak adlandırılmıştır. Seçme işlemi sonucunda kontrol amaçlı bir miktar örnek tekrar hücre saflaştırmalı akım sitometri sistemine verilmiş, popülasyondaki $CD44^{+}$, $CD24^{-}$ hücrelerin saflığı kontrol edilmiştir. Negatif kontrol olarak antikor ile muamele edilmemiş, 10 μg/mL 7AAD ile boyanmış hücreler kullanılmıştır (Ferraros, 2010; Pham, 2012). 7AAD popülasyondaki ölü hücrelerin parçalanmış DNA'sını boyadığı için 7AAD açısından pozitif olan hücreler değil negatif olan canlı hücreler deneye dahil edilmiştir.

Kanser kök hücrelerinin belirlenmesi ve izolasyonunda kullanılan bir diğer işaret de yüksek ALDH aktivitesidir. Bu amaçla ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ALDH inhibitörü (50 mmol/L DEAB) ile muamele edilmiş olan hücreler kullanılmıştır. Bu boyama işlemi için 10^7 hücre gerekmektedir. 2 mL tripssin/EDTA (Biochrom) ile 5-6 dakika 37° C de bekletilerek kaldirilan hücreler (H3), üzerine 5 ml DMEM-F12 (Biochrom) eklenmiştir. Daha sonra, 1500rpm'de 4 °C de 5 dakika santrifüj edilip, supernatant kısmı uzaklaştırılır. 1 mL PBS Dulbecco

(Biochrom) eklenerek hücreler süspande edildikten sonra, 1500 rpm'de 4 °C de 5 dakika santrifüj edilip, supernatant uzaklaştırılır. Tüplere Tablo 3.'deki belirtilen boyalar eklenip, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15-30 dakika inkübe edilir. 2 mL PBS Dulbeccoeklenerek hücreler iyice süspande edildikten sonra, 1500 rpm'de 4 °C de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatan uzaklaştırılır. Son olarak 500 µL PBS Dulbecco (Biochrom) eklenerek hücreler iyice süspande edildikten sonra, akım sitometrisinde analiz edilir.

Tablo 3.1.2.1.1 7AAD, CD44, CD24 VE HER2 için boyama miktarı

Analiz edilen belirteç	**Floresan boya**	**Eklenen miktar**
Hücre canlılığı (7AAD)	PerCP	5 µL
CD44	PE	5 µL
CD24	PE Cy7	2,5 µL
HER2	APC	2,5 µL

Kanser kök hücreleri ve kök hücre olmayan diğer kanser hücrelerinin karşılaştırılabilmesi için 4 farklı hücre grubuna 1 ml DMEM-F12 eklenir. Öncelikle meme kanseri hücrelerinin canlılığı 7-AAD$^{(-)}$ hücre populasyonu kapılanarak belirlenmiştir. Daha sonra meme kanseri kök hücre (benzeri) miktarı bu kapıdan alınan kadranla $CD44^{+}CD24^{-}$ hücre popülasyonu olarak saptanmıştır. Analizler hücre saflaştırma özelliği olan 8 renkli akım sitometri (FACS Aria III, BD) ile saflaştırılarak kültüre alınmış ve hücreler üretildikten sonra ALDEFLUOR kiti (Aldehit Dehidrojenaz [ALDH] Merkezli Hücre Belirleme Kiti, STEMCELL) kullanılarak bu hücre gruplarındaki ALDH aktivitesi analiz edilmiştir (Tablo3.1.2.1.2).

Saflaştırılmış kök hücrelerde HER2 reseptör ifadesi HER2 reseptör antikor kiti kullanılarak akım sitometri ile değerlendirilmiştir. Kök hücreler HER2 pozitif ve negatif olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır (Tablo 4). Popülasyonda yüksek oranda bulunan hücreler saflaştırılıp kültür ortamında öncelikle 24 kuyulu plakalarda üretilmiştir. Kuyuların dolması (% 75- % 80 doluluk/konfluent) ardından hücreler tripsinize edilip 25 cm^2 flasklarda üretilmiştir.

Tablo3.1.2.1.2 Akım sitometri ile saflaştırılan hücre grupları

$CD44^{+}CD24^{-}$ (Kanser Kök Hücre (benzeri) hücreler)	$HER2^{(+)}$
	$HER2^{(-)}$
$CD44^{+}CD24^{+}$ (Kök Hücre Olmayan Kanser Hücreleri)	$HER2^{(+)}$
	$HER2^{(-)}$

3.1.2.2. Kök Hücre Benzeri Hücrelere Kemoterapi Uygulanması Ve Toksisite Analizleri

Trastuzumab ve kombine tedavinin hücrelere sitotoksik etkisi 96 gözlü kültür kaplarında test edilmiştir. İlaçlar yüksek dozdan sırasıyla (trastuzumab: 6,67 µM; paklitaksel: 66,7 µM, karboplatin: 6,67 µM) düşük doza (trastuzumab: 0,013 µM; paklitaksel: 0,13 µM, karboplatin: 0,013 µM) yatay olarak seyreltilmiştir. Vasat kontrolü gözleri hariç her göze $1x10^4$ hücre ektikten sonra 96 saat 37ºC de inkübe edilmiştir. Her göze XTT solüsyonu eklenerek canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini oluşturmak için 4 saat bekletilmiştir. Hücre üremesindeki inhibisyon, kromojenik ürünün 490 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Biotek) ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve IC_{50} (hücrelerin %50'sinin yaşadığı ilaç konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanması ile belirlenmiştir (Kars M.D., 2008).

Primer meme kanseri kök hücre hatlarında paklitaksel, karboplatin ve Trastuzumab(Herceptin) kemoterapötiklerin kombinasyonlarının etkilerinin "checkerboard combination assay" yöntemi ile incelenmesidir (Kars,M.D.2006). Antikanser ilacının konstantrasyonu (A) horizontal (yatay) olarak seyreltilirken, ikinci antikanser ilacın konsantrasyonu (B) vertical (dikey) düzlemde seyreltilmiştir. Medium kontrolü gözleri hariç her göze $1x10^4$ hücre ektikten sonra 96 saat 37ºC de inkübe edilmiştir. Her göze XTT solüsyonu eklenerek canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerinin oluşması için 4-10 saat bekletilmiştir. Hücre üremesindeki inhibisyon, kromojenik ürünün 490 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Biotek) ile optik yoğunluğunun Belirlenmesiyle hesaplanmıştır. Primer hücrelere Trastuzumab(herseptin) paklitaksel, karboplatin kombine uygulanmış ve ilaç etkileşimleri belirlenmiştir. İlaç etkileşimleri aşağıdaki ifadelere göre belirlenmiştir:

$FIC_A = IC_{50}$ kombine tedavi / IC_{50A} tek başına

$FIC_B = IC_{50B}$ kombine tedavi / IC_{50B} tek başına

FIC: fraksiyonel inhibe edici ilaç konsantrasyonu, A: 1. ilaç, B: 2. ilaç, FIX ise fraksiyonel inhibe edici indeks'i ifade etmektedir. FIX = FICA + FICB formülü ile hesaplanır.

FIX <0.5 ise
sinerjik etki
FIX 0.5 ve 1 arası ise aditif etki
FIX > 1 ise
bağımsız etki
FIX > 2 ise antagonistik etkiyi göstermektedir.

3.1.2.3. Sitokin ve metalloproteazların protein array kullanılarak tayin edilmesi

Protein array tekniği çok sayıda proteinin aynı anda tayin edilebilmesine ve miktarlarının belirlenmesine olanak sağlayan bir sistemdir.

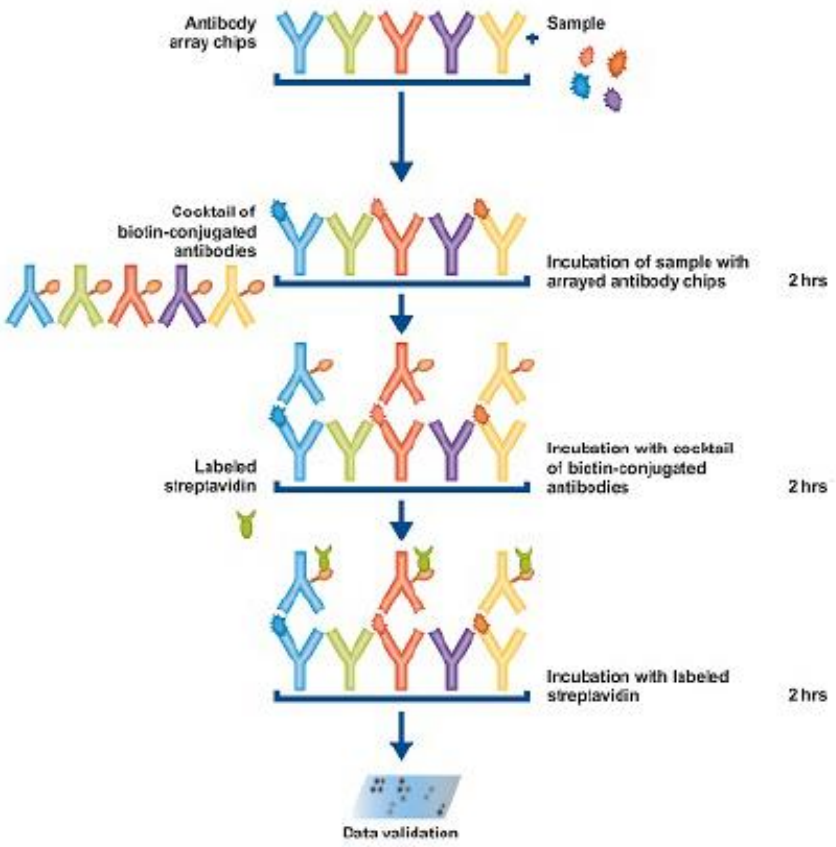
Meme kanseri primer hücrelerinden (H3 ve H3-1/$CD44^{+}CD24^{-}HER2^{+}$) protein izolasyonu yapılmış, protein miktarları BRADFORD yöntemine göre belirlenmiştir.

Protein izolasyonu için 75 cm^2 flasklarda %75-80 konfluent (kültürün kaptaki % doluluğu) üretilen $5x10^6$ hücre sayılıp, 1 mL RIPA cell lysis buffer (Amresco) eklendikten sonra 15 dakika buz banyosunda inkübe edilir. Daha sonra 1,5mL'lik santrifüj tüplerine alınıp 14.000g de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısım, protein içermektedir ve 1,5mL'lik santrifüj tüpüne aktarılıp, (-20 ºC de dondurulup saklanabilmektedir) proteinlerin miktar tayini için BRADFORD yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemde, saflaştırma işleminden sonra hücre lizat örneğinden 10 µL 96 gözlü plakalara üç tekrarlı eklenir. 250 µL commasie reagent eklenip, 30 saniye pipetleme ile karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 595nm' de mikplaka okuyucuda absorbansı ölçülür. Protein konsantrasyonları BSA standart eğrisine göre hesaplanmıştır.

H3 ve H3-1 (HER2 pozitif kanser kök hücreleri) kültürlerde metalloproteaz ve sitokin ifade miktarları protein array kit ve membranları kullanılmıştır(Abcam).

Metalloproteinazlar ve sitokinlerin tespiti için MMP-10 hedef ve Cytokine-23 hedef human antibody array (Abcam) kullanılmıştır. Membranlar eşit miktarda (0,9 mg) total lizat ile hibridize edilmiştir.

Bu analiz sırasında Şekil 3.1.2.3.1.'deki yöntem kullanılmıştır. Markerların işaretli kısmı üst sol köşede olacak şekilde yerleştirilir. Oda sıcaklığında 2ml 1X Bloking buffer solüsyonu konulup, 30-45 dakika inkübe edilir. 1X Bloking buffer solüsyonu aspire edilir. H3 ve H3-1 protein lizatları yüklenir ve 1.5-2 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 4 ºC ye alınıp bir gece beklenir ve ertesi gün solüsyon aspire edilir. 25 ml 1X wash buffer I ile her bir örnek 30 dakika beklenerek yıkama işlemi yapılır. 2 ml 1X wash buffer I koyup 5 dakika oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyona bırakılır. Daha sonra solüsyon aspire edilir. Bu işlemler 3 kez tekrar edilir. 2ml 1X wash buffer II ile 5 dakika beklemeli 2 kez yıkama yapılır. Daha sonra h3 ve h3-1'in üzerine Biotin-Conjugated Anti-Cytokines eklenip oda sıcaklığında 2 saat beklenir ve 4 ºC alınıp bir gece beklenir. Ertesi gün 2 ml 1X wash buffer I koyup 5 dakika oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatör yardımıyla yıkama işlemleri yapılır. 1X HRP-conjugated streptavidin hazırlandıktan sonra, inkübe edilir ve solüsyon aspir edilir. Tekrar wash buffer I ile 3 kez yıkama yapılır. Konsantrasyon ayarını kendimiz hazırladığımız 500ul detection buffer karışımından ekleyip, 2dk oda sıcaklığında inkübe edilir (çalkalama yok). Yıkama işlemi 3 kez wash buffer I ile yıkama yapılır ve array membranlarının birkaç saniye aralıklarla 2 dakika boyunca görüntüleme işlemi kemilüminisan olarak (Vilber Lourmat Gel Documentation System) alınır.



Şekil 3.1.2.3.1. Abcam MMP ve sitokin protein array protokolü

Array membranları kemilüminisan olarak görüntülenmiş (Vilber Lourmat Gel Documentation System) ve spotlardan Image J programıyla densitometrik analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. MMP panelindeki hedef proteinler MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, ve TIMP-4; sitokin panelindedkihedef proteinler ise G-CSF, GM-CSF, GRO, GRO-alpha, IL-1alpha, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IFN-gamma, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIG, RANTES, TGF-beta1, TNF-alpha, ve TNF-beta proteinleridir.

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

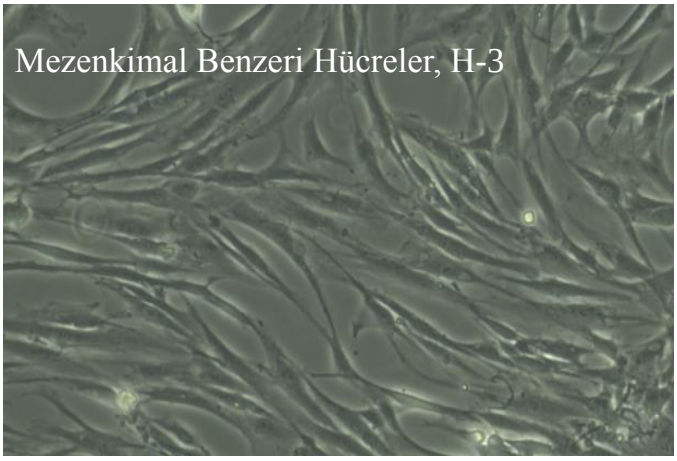
Bu projede öncelikli amaç HER2 negatif ve HER2 pozitif meme kanserli hastalardan cerrahi müdahale sırasında elde edilen dokulardan elde edilen primer kültür üretilmiştir ve kök hücreleri akım sitometrisi ile seçerek; kültür ortamında yaşatabilmek olmuştur. Hastamızın H3 (1), H3 (2) ve H3 (3) olarak adlandırdığımız alt grupları üretebildik fakat H3 (4) kanser kök hücresi olmayan alt grubu üretilemedi. Üretilebilen alt gruplarımız ve primer kanser hücresinde Trastuzumab'ın etkinliği değerlendirildi ve kombinasyon kemoterapinin kök hücrelerde meydana getirdiği moleküler etkileri araştırıldı. Bu etkiler kök hücrelerde HER2 reseptörü, sitokinler ve metastaz açısından önemli olan metalloproteinaz ifadeleri ve proliferatif etki yönünden değerlendirildirildi. Böylelikle HER2 negatif hasta grubundaki tedavi cevabını belirleyebilerek belirteçlerin neler olduğu konusunda literatüre önemli bir katkı sağlamak hedeflendi.

4.1.Primer Kültürlerin Üretilmesi

TÜBİTAK projesinde elde edilen immüno-histokimyasal (Tablo 4.1.1) olarak HER2 pozitif olduğu gösterilmiş meme kanserli hastadan alınan (H3)'ün primer kültürü üretilmiştir (Şekil 4.1.1).

Tablo 4.1.1. Meme Kanserli Hastanın demografik özellikleri

Hasta #	**ER** (Östrojen Reseptörü)	**PR** (Progesteron Reseptörü)	**HER 2** (İnsan epidermal büyüme faktörü 2)	**Moleküler alt grup**
H3	Negatif	Negatif	Pozitif (+++)	HER 2 Pozitif

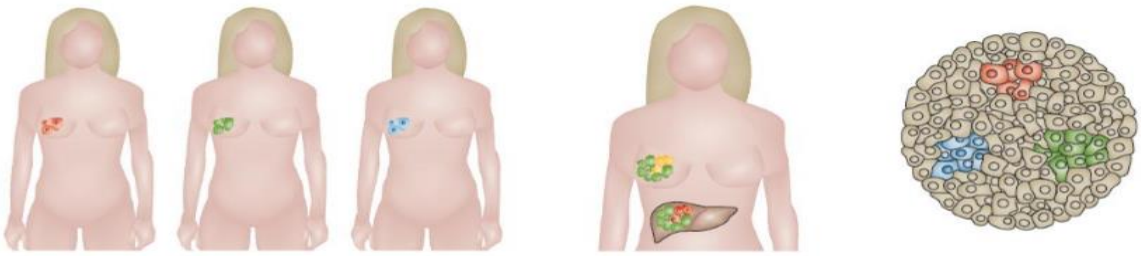


Şekil 4.1.1 Primer hücre-H3 mikroskopik görünümü (Leica, 10X objektif)

Epitel Benzeri Hücreler, bir fasulye şeklindedir ve büyük çekirdeğe sahipken; Mezenkimal Benzeri Hücreler İse; küçük bir çekirdek ve uzun şekli ile vardır (Phuc Van Pham, Binh Thanh Vu,2007). Tez çalışmamızda da H3'ün yapı itibariyle mezenkimal benzeri hücre olduğu görülmektedir (Şekil 4.1.1).

4.2. Primer Kültürlerden Kanser Kök Hücrelerinin Seçilmesi

Son yıllarda yapılan araştırmalarda kanserin biyolojik eylemleri incelendiğinde; intra-tümöral heterojenite kavramı daha fazla yer almaktadır. Hastaların tümörleri histopatolojik olarak birbirlerinden farksız gibi görünse de, moleküler alt tip ve malignite potansiyeli açısından farklılıklar göstermektedirler (Meric-Bernstam F,2012). Aynı tümörün içindeki farklı kanser hücrelerinin fonksiyonel olarak, migrasyon ve invazyon yeteneği açısından, dolaşımdaki hücrelerin dormant halde kalması veya karşılaştıkları mikro çevreye göre metastaz yapma potansiyelleri açısından ve sahip oldukları somatik mutasyonlar/kromozom anormallikleri açısından farklılıklar gösterebildikleri anlaşılmıştır (Şekil 4.2.1).



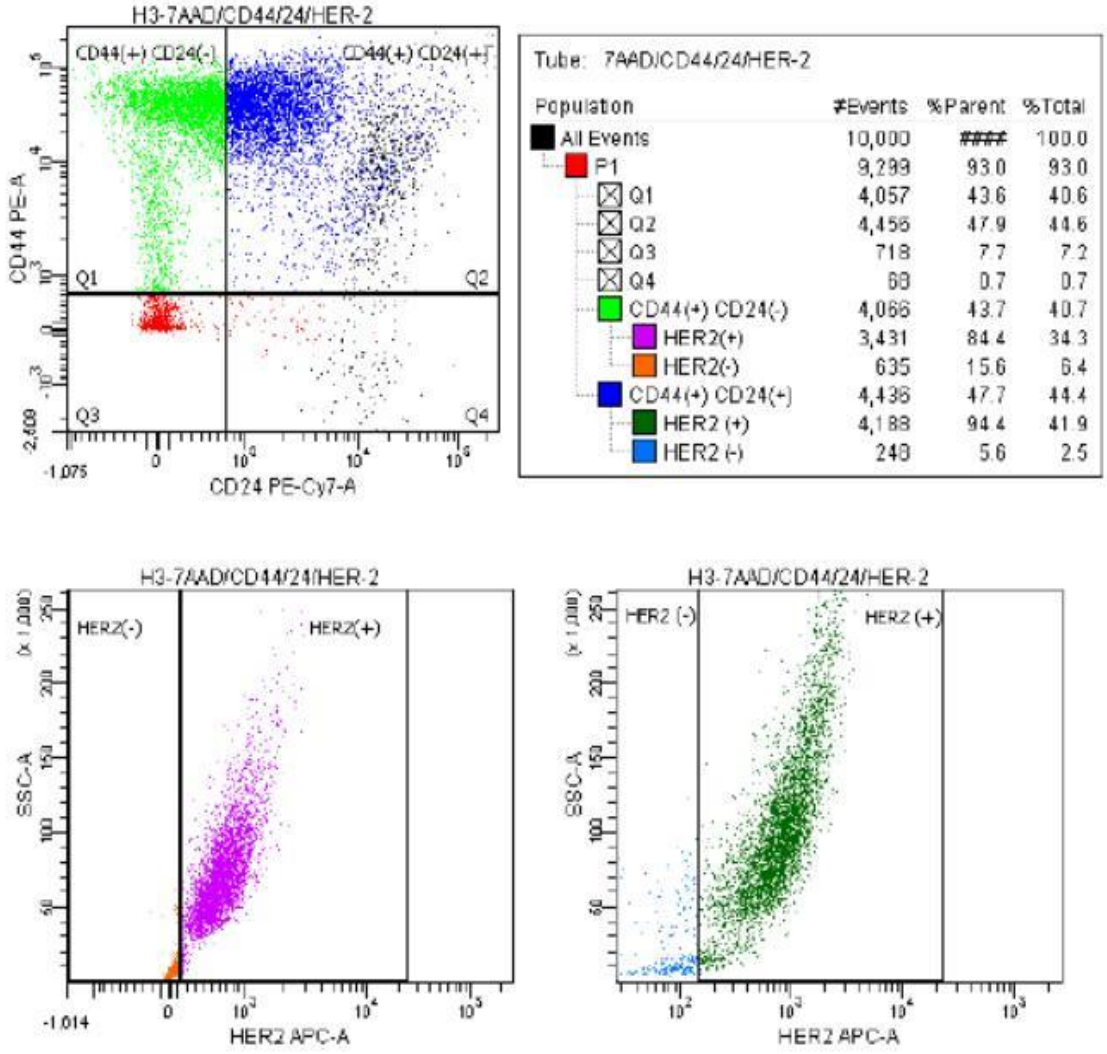
Şekil. 4.2.1 Farklı hastalardaki meme kanserinin birbirlerinden farklı olduğu gibi, aynı hastanın meme kanseri de genetik, morfolojik ve biyolojik davranış özellikleri açısından birbirlerinden farklılık gösterebilir (Meric-Bernstam F,2012).

Meme kanserine spesifik terapötik hedefler olan östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (ErbB2 veya HER2/neu) keşfi ise bu hedefleri taşıyan meme kanserli hastaların tedavisindeki en önemli gelişme olmuştur (Abeloff MD, Antonio CW,2008). Erken evre meme kanserlerinin %20'sinde HER2 geninin, mRNA'sının veya proteininin amplifikasyonu/aşırı ekspresyonu mevcuttur. Rutin kullanımda, HER2 hedefli tedavilerin; sadece HER2 gen ifadesini (FISH/CISH veya SISH yöntemi ile) veya HER2 aşırı ekspresyonu (İmmunohistokimyasal yöntem ile +3 ekspresyon) olduğu belirlenen meme kanserli hastalarda etkili olduğu kabul edilmektedir ve bu hastalar HER2 pozitiftir. İmmunohistokimyasal yöntem ile HER2; hafif şiddette (+2 ve +1 ekspresyon) eksprese oluyor ya da HER2 gen ifadesi yoksa bu hastalar HER2 negatif hastalık grubunda değerlendiriliyor ve bu hastalarda HER2 hedefli tedavilerin etkili olmayacağı kabul edilmektedir.

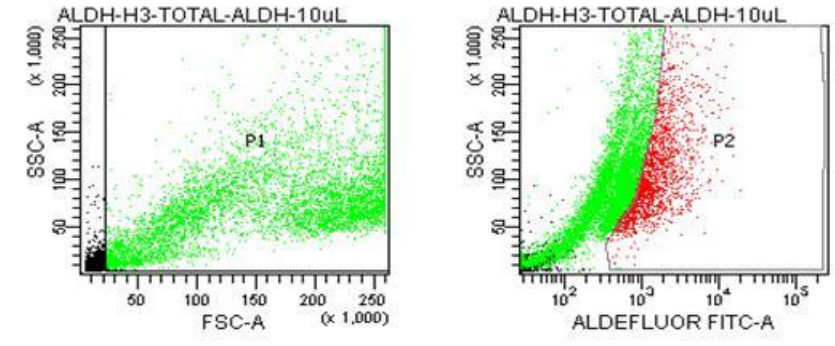
Akım sitometri, hücre veya diğer biyolojik materyallerin ayrıntılı olarak analizini sağlayan hem klinik hem de araştırma laboratuvarlarında kullanılan önemli bir cihazdır (Özdemir ve Artaç, 2013). Klinikte özellikle immün yetmezlik hastalıkları, lösemi ve lenfomaların tanı ve takibinde önemli rol oynarken; araştırma laboratuvarlarında mikrobiyoloji, apoptoz, hücre döngüsü, kanser araştırmaları vb. birçok alanda kullanım alanı mevcuttur. Özellikle son dönemlerde kanser araştırmalarında kanser yüzey belirteçleri ile kanser çeşidinin belirlenmesi ve kanser kök hücre çalışmalarında akım sitometrik yöntem ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada da hücre yüzey belirteçleri kullanılarak akım sitometrik yöntem ile meme kanseri hücreleri ve meme kanseri kök hücreleri ayrı ayrı gruplandırılmış ve bu hücre tiplerinde HER2 reseptörü ifadesi değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında amacımız, kanser oluşumunda HER2 pozitif fenotipe sahip hücrelerin primer meme tümöründeki dağılımını belirlemek, tekli ve çoklu ilaç etkinliğini gözlemlemektir. İlk olarak, flow sitometri ile H3 meme kanseri hücrelerinin canlılığı 7-AAD$^-$

hücre popülasyonu kapılanarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.2). Daha sonra meme kanseri kök hücre (benzeri) miktarı bu kapıdan alınan kadranla $CD44^{+}CD24^{-}$ hücre popülasyonu saptanmıştır (Tablo 4.2.1). İzole edilen meme kanseri kök hücreleri flow sitometri (FACS ARIA III) ile HER2 ekspresyonlarına göre HER2+ ve HER2- meme kanseri kök hücreleri olarak ayrıldı. Flow sitometri analizleri Şekil 4.2.2 ve Şekil 4.2.3'te verilmektedir. Kanser kök hücrelerinin belirlenmesi ve izolasyonunda kullanılan bir diğer işaret de yüksek ALDH aktivitesidir.



Şekil 4.2.2. Meme kanseri primer kültür hücrelerinde flow sitometri analizi, kanser kök hücrelerinde HER2 ifadesinin analizi.

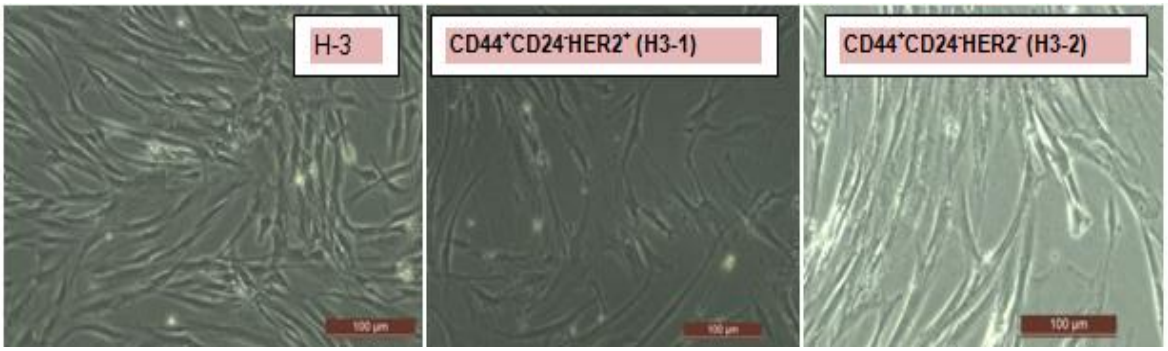


Tube: ALDH-10uL

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,588	85.9	85.9
P2	1,920	22.4	19.2

Şekil 4.2.3. Meme kanseri primer kültür hücrelerinde flow sitometri analizi, kanser kök hücrelerinde ALDH pozitif popülasyonun analizi.

Flow sitometri analiz sonuçlarına göre kültürler farklı popülasyonları barındırmaktadırlar. Flow sitometri analizi sonrası 4 farklı alt grupta saflaştırılmıştır. Bunlardan 3 grubu üretilebilmiş (Şekil 4.2.4) ve moleküler analizlere tabi tutulmuştur.



Şekil 4.2.4 Primer hücrelerin mikroskopik görünümleri (Leica, 10X objektif)

Tez çalışması boyunca kullanılan ve üretilen kültürler ise aşağıda verilen H3, H3 (1), H3(2) ve H3(3) kısa kodlarıyla anılacaktır.

1. H3: PRİMER MEME KANSERİ HÜCRESİ
2. $CD44^+CD24^-$, $HER2^+$ (H3-1) : MEME KANSERİ KÖK HÜCRESİ
3. $CD44^+CD24^-$, $HER2^-$ (H3-2) : MEME KANSERİ KÖK HÜCRESİ
4. $CD44^+CD24^+$, $HER2^+$ (H3-3) MEME KANSERİ KÖK HÜCRESİ OLMAYAN
5. $CD44^+CD24^+$, $HER2^-$ (saflaştırılan hücre sayısı az olduğu için üretilemedi)

$ALDH^+$ (H3-ALDH): MEME KANSERİ KÖK HÜCRESİ BENZERİ

Tablo 4.2.1. Akım sitometri ile izole edilen hücre grupları

	$CD44^+CD24^-$,$HER2^+$ (H3-1)	$CD44^+CD24^-$, $HER2^-$ (H3-2)	$CD44^+CD24^+$, $HER2^+$ (H3-3)	$CD44^+CD24^+$, $HER2^-$	ALDH+
Popülasyonda yüzdesi	% 34.3	% 6.8	% 42.9	% 2.6	% 19.2

Hücre saflaştırma işleminde primer meme kanseri hücre kültür popülasyonunun % 34,3'ü $CD44^+CD24^-$ ve %19,2'si $ALDH^+$ meme kanseri kök hücrelerinden oluşmaktadır.

Al-Hajj ve ark'ları, Michael Clarke laboratuarında akımsitometri kullanarak hücre süspansiyonu haline getirilmiş primer meme tümörü ve metastatik plevral efüzyonlardan kanser kök hücrelerini CD44, CD24 gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonuna göre ayrıştırmışlardır.

Çalışmamızda bu yüzey belirteçlere ek olarak diğer normal meme epitel hücre belirteci olan HER pozitif ve HER2 negatif hücreler değerlendirildi. akım sitometresi ile izole edile bu kök hücre alt grupları kültür ortamında başarıyla üretildi.

Tablo. 4.2.2 Flow sitometri analizi, kanser kök hücrelerinde HER2 ifadesinin analizi

%	**Hasta 3 (HER2 pozitif)**		
	TOTAL	**$HER2^+$**	**$HER2^-$**
MEME KANSERİ HÜCRESİ ($CD44^+CD24^+$)	**47,7**	**94,4**	**5,6**
MEME KANSERİ KÖK HÜCRE HÜCRESİ($CD44^+CD24^-$)	**43,7**	**84,4**	**15,6**

İmmüno-histokimyasal (Tablo 4.1.1) olarak HER2 pozitif olduğu gösterilmiş meme kanserli hastadan alınan (H3) primer kültürünün $CD44^{+}CD24^{-}$ meme kanseri kök hücrelerinin %84,4'ü HER2+ ve %15,6 'sı HER2- hücrelerden oluşmaktadır (Tablo.4.2.2).

Yılmaz A. ve Uygun K.' nın yaptığı bir çalışmada CD44+/CD24- hücre topluluğu içinde bir grup hücrenin tümörojenik olabileceği ifadesinin de cevabı olmuştur. Meme kanseri gibi solid tümörlerde kök hücre dağılımı, yani yüzdesi tümörün %1-2'si olarak kabul edilmektedir (Al Hajj M, Wicha MS,2003). Honeth ve ark'larının yaptığı çalışmada, tümör örneklerinin %31'inde CD44+/CD24- hücreler saptanmıştır. Honeth ve ark'larının yaptığı çalışmaya benzeyen başka bir çalışmada da tümör örneklerinin %56'sında CD44+/CD24- hücreler saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise örneklerinin %43.7'sinde CD44+/CD24- hücreler saptanmıştır. Tümör içerisinde aranan tümör başlatıcı grup, kök hücre özelliği gösteriyorsa dağılımın da kök hücreye benzer olacağı düşünüldüğü için bizim çalışma sonuçlarımızdaki dağılımlar anlamlı kabul edilebilir. Bu çalışmaların sonuçlarının farklı olmasının sebebi kullanılan teknik ve doku farklılığına bağlı olabilir.

NSABP-B31 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) çalışmasında Trastuzumab ile tedavi edilen ve tedaviye cevap veren meme kanserli hastaların bir kısmında sonradan tümör dokuları yeniden incelendiğinde HER2 gen amplifikasyonu gösterdikleri görülmüştür. Bu durum laboratuar hatası olarak açıklanmaya çalışılsa da sebebi kesin olarak ortaya konamamıştır. In-vitro çalışmalar meme kanseri kök hücrelerine trastuzumabın etkili olabileceğini göstermiştir.

Klinikte HER2'ye karşı geliştirilmiş olan bir monoklonal antikor olan Trastuzumab tedavisi öngörülmektedir. Fakat bütün bu gelişmelere rağmen her2 meme kanseri hastalarında belli bir süre sonra tedaviye direnç gelişmekte ve hastalarda tekrar nüks etmektedir (Paik, 2008). Bu değişim, tedavi kararlarını ve dolayısıyla onkolojik sonlanımlara ait beklentiyi etkileyebilmektedir. Relaps sonrası gelişen metastatik meme kanseri ise hala tedavisi sağlanamayan ölümcül bir hastalıktır. Tez çalışmamızın bu kısmından çıkarılabilecek en anlamlı sonuç; bu in vitro çalışma ile HER2 pozitif hastalardan izole edilen primer meme kanseri kök hücrelerinde HER2- ve HER2+ meme kanseri kök hücre alt grupları olduğunu göstermiştir. Ayrıca, histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde HER2 pozitif olarak değerlendirilen hastalardan üretilen primer kültürlerde popülasyonda HER2 negatif hücre oranın belirlenmesi Trastuzumab Tedavisi sırasında görülen dirençliliği açıklamayabilmeyi sağlamaktadır. HER2 negatif kanser kök hücreleri tekrar üreyip tedaviye cevap vermeyecektir

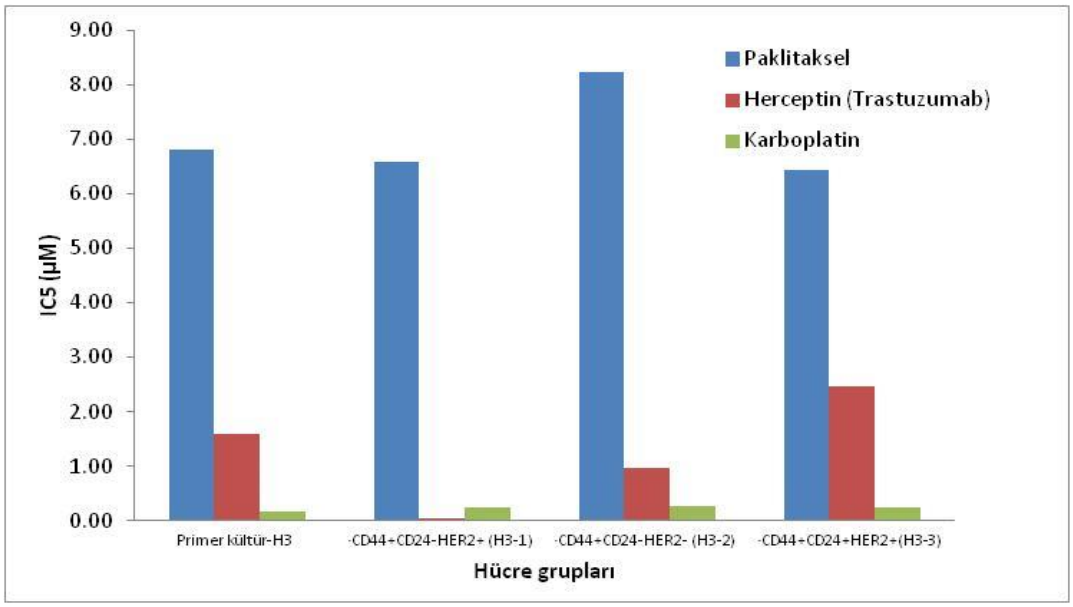
ve tümör tekrar nüks edecektir. Bu durumda, Bu hasta sadece trastuzumabla tedavi edilemez. Kombine tedavi uygulanmalıdır.

4.3. Kanser Kök Hücrelerinde Moleküler Analizler

4.3.1.Kök hücre benzeri hücrelere kemoterapi uygulanması ve toksisite analizleri

Tez çalışmasında daha önce laboratuarımızda ürettiğimiz meme kanseri kök hücre benzeri (stem cell like) hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler CD44 belirteci pozitif, CD24 belirteci negatif/düşük fenotiptedirler, bu özellikleriyle literatürde de önerildiği gibi meme kanseri kök hücre özelliği taşımaktadırlar. Kanser kök hücrelerinin belirlenmesi ve izolasyonunda kullanılan bir diğer işaret de yüksek ALDH aktivitesidir. Bu amaçla ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) kullanılmıştır. Aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzim ailesi hücre içi aldehitlerin oksidasyonundan sorumlu olan ve erken kök hücre farklılaşmasında retinol' ün retinoik asit'e oksidasyonuna katkı sağlayan enzimlerdir. Ayrıca gelişim sırasında kök hücrelerin kendini korumasında rol oynayarak hücresel farklılaşmayla bağlantılı bulunmuştur (Croker AK, Goodale D,2009). Artmış ilaç dışlama kapasitelerine ek olarak kanser kök hücreler Aldehit dehidrogenaz (ALDH) gibi aracı moleküller eksprese ederek bazı kemoterapötik ajanları inaktif hale getirebilmektedir. Bu sayede ALDH'ın, meme ve kolon kanseri gibi çeşitli dokulara ait hücre hatlarında kemoterapötik ajanlara direnç sağladığı gözlenmiştir.

Kanser kök hücresi özelliği taşıyan (HER2+) ve taşımayan (HER2-) hücre gruplarına Trastuzumab, paklitaksel ve karboplatin tek tek (Tablo 4.3.1) ve kombine uygulanarak (Tablo 4.3.1.2), her kültür tipi için uygulanan ilacın IC_{50} dozu (hücrelerin % 50'sini öldüren doz) bulunmuştur. Bu durum hücrelerin in-vitro tedaviye verdikleri yanıtların farklı olmasına neden olmaktadır. Paklitaksel, trastuzumab ve karboplatin ilaçlarının hücre grupları üzerindeki etki Şekil 4.3.1.1 de gösterilmiştir.



Şekil 4.3.1.1 H3, H3-1, H3-2, ve H3-3 için tekli kemoterapi tedavi çalışmaları IC50 değerleri gösterilmiştir.

İstatistiksel analizler için "SPSS for Windows 13.0 versiyonu (SPSS Inc., Illinois, USA) kullanıldı. Karşılaştırmalarda two-tailed t-testi kullanıldı. p = 0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 4.3.1.1. Hücrelere tekli kemoterapötik ilaçların etkileri, ilaçların IC_{50} değerleri (µM) (a, b, c, d, e, f, g grupları arasında p<0,05'tir).

Uygulanan ilaçlar	Primer kültür-H3	$CD44^+CD24^-HER2^+$ (H3-1)	$CD44^+CD24^-HER2^-$ (H3-2)	$CD44^+CD24^+HER2^+$(H3-3)
Paklitaksel	6.80^{a}	6.59^{c}	8.23^{d}	6.43^{e}
Herseptin (Trastuzumab)	$0.16^{a,b}$	$0.004^{c,b}$	$0.25^{d,b}$	$2.47^{b,e}$
Karboplatin	0.18^{a}	0.25^{c}	0.27^{d}	0.24^{e}

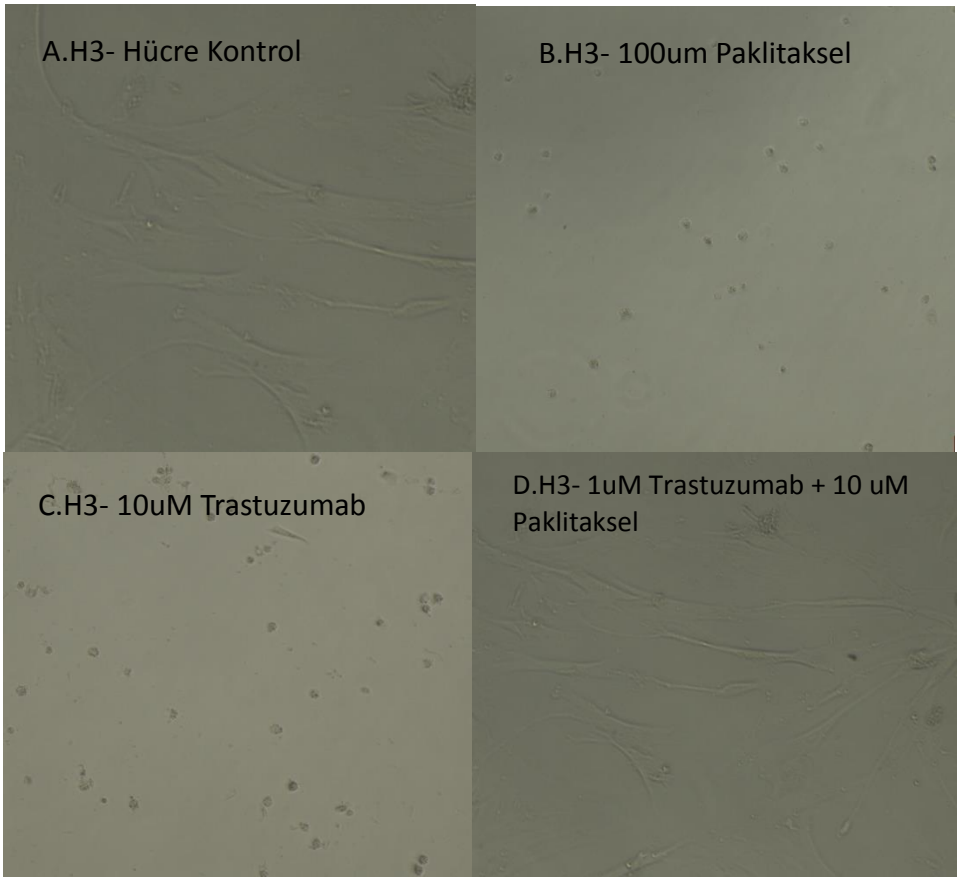
Tablo 4.3.1.1'de sunulan sonuçlara göre Paklitaksel H3(Şekil 4.3.1.2. B.) ve alt kültürler olan H3-1 (Şekil 4.3.1.3 B.), H3-2 ve H3-3(Şekil 4.3.1.4 B.)'e tekli uygulandığında hepsine eşit düzeyde etki gösterirmiştir. Kanser kök hücrelerinde karboplatinin uygulanan üç

ilaç içinde en fazla hücrelerin çoğalmasını önleyici etki (IC50) gösteren ilaç olduğu görülmüştür. Trastuzumab, H3 primer kanser hücrelerinde diğer alt kültürlere göre daha etkili olmuştur. Bu durum beklenilen bir sonuç çünkü biz biliyoruz ki Trastuzumab HER2' ye yönelik bir ilaç ve istenilen sonucu vermiştir. Ayrıca paklitaksel, karboplatin ve trastuzumab'ın genel etkilerini değerlendirdiğimizde HER2 pozitif (H3-1) hücrelere en etkili ilaç trastuzumab olmuştur. ($p<0.05$). Meme kanserli hastalar ile yapılan çalışmalar göstermektedir ki HER2 negatif hasta grubunda trastuzumab etkili olabilmektedir (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project). Bu etkinin özellikle luminal (hormon reseptörü pozitif) meme kanseri kök hücreleri üzerinden olabileceği de gösterilmiştir.

Checker Board Microplate Metodu kullanılarak meme kanseri hücrelerine trastuzumab, paklitaksel ve karboplatin kombinasyonları uygulanmıştır (Tablo 4.3.1.2).

Tablo 4.3.1.2. Hücrelerde çoklu ilaç kombinasyonlarının etkileşimleri.

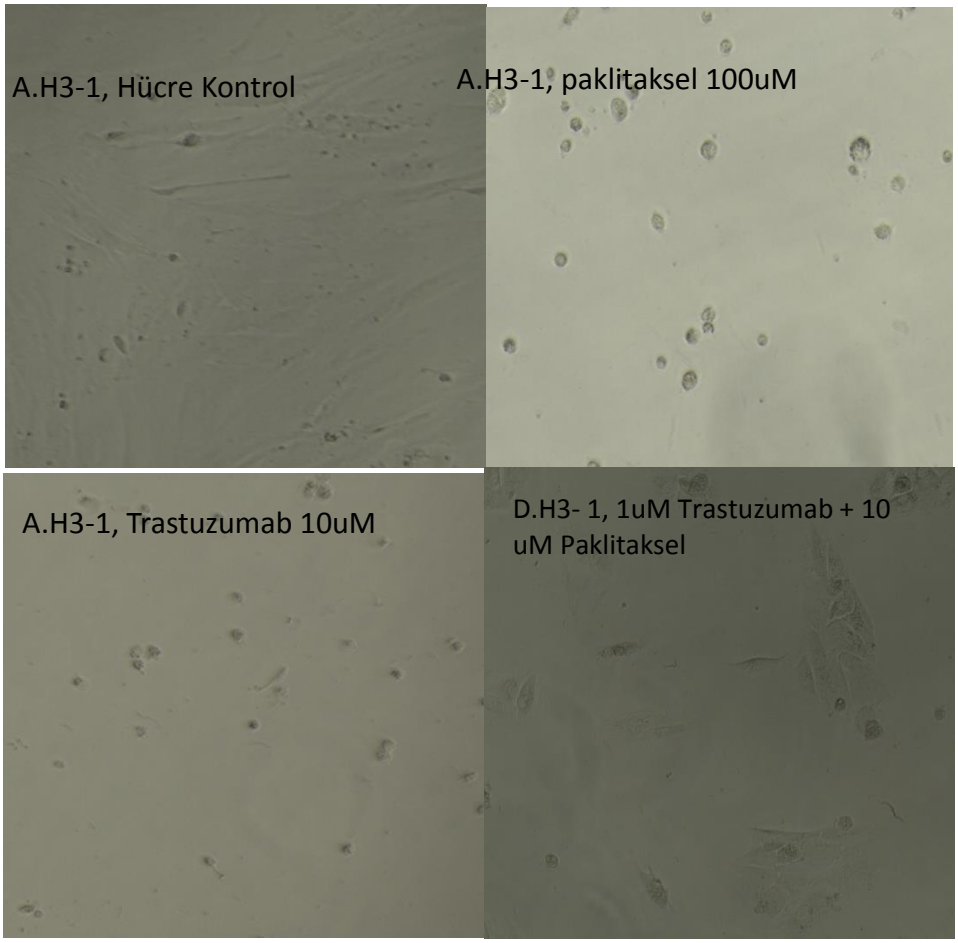
Uygulanan kombinasyon	**Primer kültür-H3**	**$CD44^+CD24^-$ $HER2^+$ (H3-1)**	**$CD44^+CD24^-$ $HER2^-$ (H3-2)**	**$CD44^+CD24^+$ $HER2^+$(H3-3)**
Paklitaksel-Karboplatin	FIX<0.5 Sinerjik	FIX<0.5 Sinerjik	FIX<0.5 Sinerjik	FIX<0.5 Sinerjik
Herseptin-Paklitaksel	FIX>2.0 Antagonist	FIX>2.0 Antagonist	FIX>2.0 Antagonist	FIX>2.0 Antagonist
Herseptin-Karboplatin	1.0 <FIX <2.0 Bağımsız	0.5 <FIX <1.0 Additif	FIX<0.5 Sinerjik	FIX<0.5 Sinerjik



Şekil 4.3.1.2. A.H3 (primer hücre) – Hücre kontrol, , B. H3 – 100 uM Paklitaksel (en yüksek doz) - tekli ilaç kombinasyonu, C. H3 – 10 uM Trastuzumab (en yüksek doz)- tekli ilaç kombinasyonu, D. H3 – 1 uM Trastuzumab +10uM Paklitaksel (en yüksek doz) -ikili ilaç kombinasyonundan alınan mikroskop görüntüleri. (10X objektif).

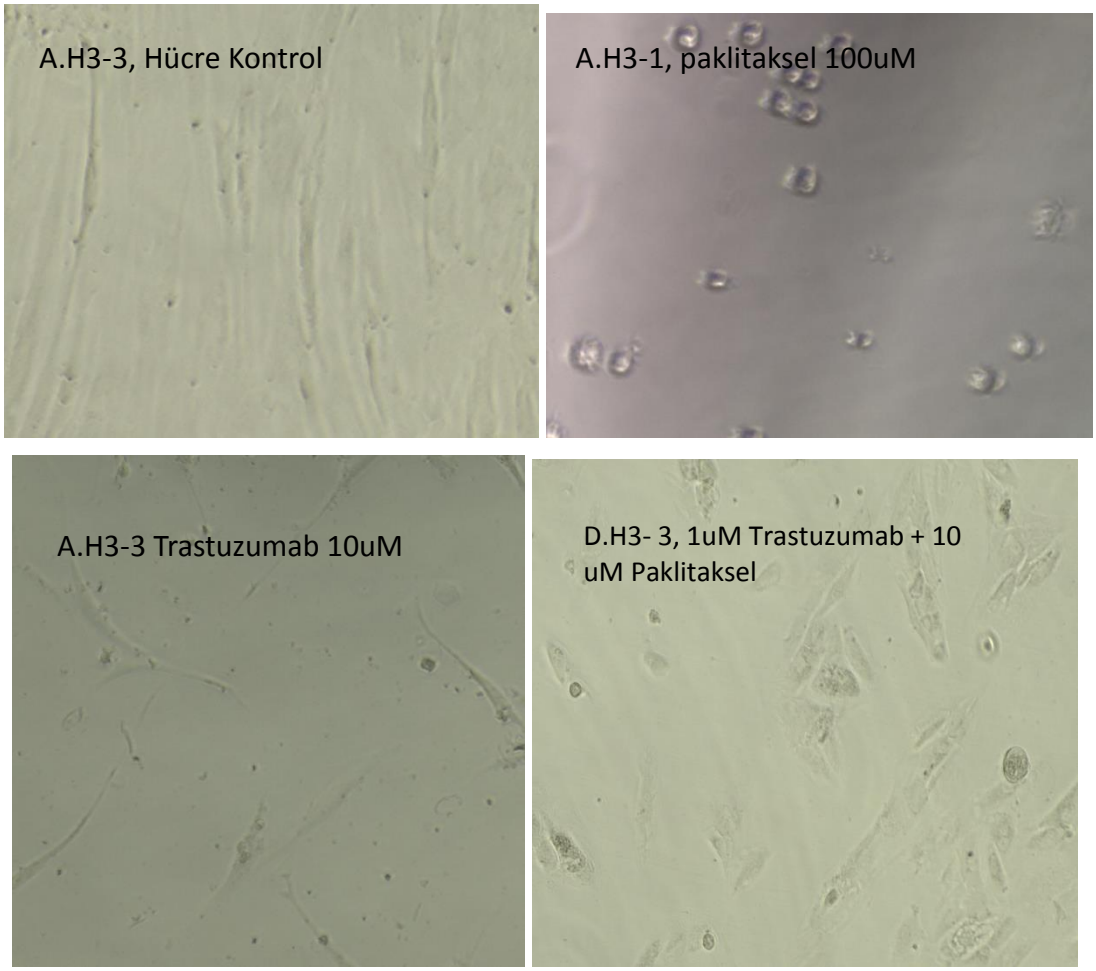
Primer hücre(H3) gruplarına; 100uM Paklitaksel ve 10uM Trastuzumab tekli olarak verildiğinde hücreleri tamamen öldürdüğü gözlemlenmiştir. Tekli ilaç kemoterapisinde dokuya en iyi gelen, hücrenin %50'sini öldüren iki dozu kombinledik. Bu dozlar; trastuzumab da 1uM iken paklitaksel de 10uM ile sağlandığı görülmüştür. İkili kombinasyondan sonraki aldığımız görüntü Şekil4.3.1.2.D' deki gibidir. Buda paklitaksel ve trastuzumab ikili uygulamanın hücreler üzerindeki etkisinin antagonistik olduğunu göstermektedir.

Mark D. ve Gottfried E.'nin yaptığı bir başka çalışmada hücre hattı kullanılmış ve bu ilaçlar hücre hatlarında daha etkili çıkmıştır. Yani mikromolar düzeyinde dozlara baktığımızda tek tek uygulanan ilaç dozlarının daha düşük konsantrasyonları hücrelerin üremesini engellediği görülmektedir. Fakat bizim yaptığımız çalışma, primer kültür ve kök hücrelerimizde tek tek uygulamada IC50 değerleri daha yüksek uygulanmıştır. Yani primer kültürde ilaçların etkisi daha düşüktür. Biz kombinasyonda her iki ilaç için IC50 değerine yakın bir konsantrasyon uygularız ki her iki ilaç birleştiğinde yaklaşık IC100 yakalayabilsin.



Şekil 4.3.1.3. A.H3-1 (kanser kök hücre (benzeri)) – Hücre kontrol, , B. H3-1 – 100 uM Paklitaksel (en yüksek doz) - tekli ilaç kombinasyonu, C. H3-1 – 10 uM Trastuzumab (en yüksek doz)- tekli ilaç kombinasyonu, D. H3-1 – 1 uM Trastuzumab +10uM Paklitaksel (en yüksek doz) -ikili ilaç kombinasyonundan alınan mikroskop görüntüleri. (10X objektif).

Meme kanseri kök hücre(benzeri) (h3-1) alt grubu incelendiğinde ise; durum yine aynıdır. Paklitaksel ve trastuzumab ikili kombinasyonu antagonist etki etmiştir.



Şekil 4.3.1.4. A.H3-3 (kanser kök (benzeri) olmayan hücre) – Hücre kontrol, , B. H3-3 – 100 uM Paklitaksel (en yüksek doz) - tekli ilaç kombinasyonu, C. H3-3 – 10 uM Trastuzumab (en yüksek doz)- tekli ilaç kombinasyonu, D. H3-3 – 1 uM Trastuzumab +10uM Paklitaksel (en yüksek doz) -ikili ilaç kombinasyonundan alınan mikroskop görüntüleri. (10X objektif).

Paklitaksel tek başına etkili, trastuzumab tek başına yine etkili fakat ikisinin birlikte olduğu aynı konsantrasyonlarda hücrede üreme var. Ürettiğimiz H3-3 içinde durum tıpkı diğer gruplarda olduğu gibidir. Sadece HER2 negatif olan kök hücrede (H3-2) HER2 pozitife göre trastuzumab tekli uygulama sonucu biraz daha fazla hücre var. Bu da yine tekli uygulamada XTT analizi ile gördüğümüz bir sonuçtur.

Tablo 4.3.1.1'de sunulan sonuçlarda ve yukarıda verilen hücrelerin mikroskop görüntüleri incelendiğinde; Paklitaksel tekli kombinasyon uygulamalarında H3 ve alt gruplarını öldürmüştür ve hepsine aynı etkiyi göstermiştir. Trastuzumab, Her2 hedefli bir ilaç ve sonuçlar incelendiğinde Trastuzumabın primer kök hücrelere etkisinin yanı sıra aslında kök hücreleri de hedef alan bir ilaç olduğu gözlemlenmiştir. H3-1; Her2 pozitif kanser kök hücresinde gözle görülebilen bir azalma vardır. Fakat biz tablo 4.3.1.1'e bakacak olursak burada Trastuzumabın HER 2 negatif olan H3-2 de primer kültüre oranla daha etkin olduğunu görmekteyiz. Bu durumda trastuzumab'ın kök hücre hedefli bir ilaç olarak olduğunu düşündürmektedir.

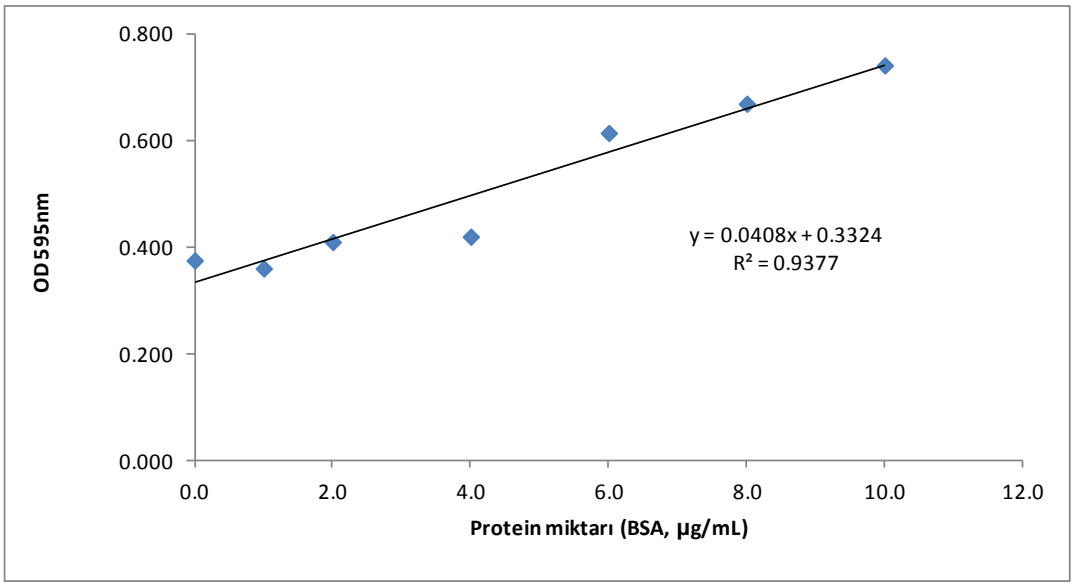
Tekli ilaç kemoterapisinde dokuya en iyi gelen, hücrenin %50'sini öldüren iki dozu kombinledik. Bu dozlar; karboplatinde 0.3uM, trastuzumab da 1uM iken paklitaksel de 10uM ile sağlandığı görülmüştür. H3 (Şekil 4.3.1.2) ve alt kültürler olan H3-1 (Şekil 4.3.1.3), H3-2 ve H3-3(Şekil (4.3.1.4))'e uygulanan paklitaksel ve trastuzumab ikili kombinasyonun sonuçları incelendiğinde ise tekli uygulamalardaki durumun tam tersine hücrelerin canlılığı yani antagonist bir etki ettiği gözlemlenmiştir. Klinikte ise paklitaksel ve trastuzumab'ın ikili kombinasyon sonuçları bu durumun tam tersini göstermektedir. Klinikteki doz ile doku kültürlerine uygulanan dozlar kıyaslandığında klinikteki dozların daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; hasta paklitaksel' e dirençli bir hasta da olabilir yada trastuzumab yapısı itibarile büyükte bir molekül olduğu için paklitaksel kemoterapi esnasında bloke olmuş olabilir. Yâda trastuzumab'a bağlanıp, onunda etkinliğini kısıtlayıp hücrelerin üremesine devam etmesini sağlamış olabilir.

H3 ve alt kültürlerinde Paklitaksel Ve Karboplatin kombine etkilerin **SİNERJİK** ve **ADİTİF** olduğu, Trastuzumab-karboplatin ikili kombinasyonlarda H3'ten elde ettiğimiz alt kültürlerde tedavinin daha etkili olduğu bulunmuştur.

Çalışmanın en önemli özelliği Trastuzumab'ın meme dokusu orijinli HER2 Negatif Kanser Kök Hücre (benzeri) kültürler üzerinde etkinliğinin tek başına ve/veya kombine kemoterapötik ilaçlarla birlikte değerlendirilmesidir. $HER2^-$ kök hücrelerin $HER2^+$ kök hücrelere göre ilaçlara daha dirençli olduğu gözlendi. Ayrıca tedavinin sonucunun primer ve alt grup kültürlerinde farklı olmasından da anlaşılacağı gibi (IC_{50} değerleri arasındaki farklar), kişiye özgü tedavi stratejilerinin belirlenmesi tedavinin başarısını arttırmasını hedeflenmektedir.

4.3.2.Protein izolasyonu (toplam lizat) ve miktar tayini

H3 ve alt grubu hücrelerden RIPA hücre liziz tamponu ile protein izolasyonu yapılmıştır. Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapılmıştır. Bradford reaktifi içindeki "Coomassie mavisi''nin, proteine bağlanmasıyla boyanın abzorbansı 465 nm'den 595 nm'ye kayar. Abzorbans değeri protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. BSA (bovine serum albumine) standart protein olarak kullanıldığında lineer konsantrasyon aralığı 100-1400 µg/mL'dir. Aşağıdaki grafikte BSA standart eğrisi protein miktar tayinleri için kullanılmıştır (Şekil 4.3.2.1). Tablo 4.3.2.1'de hücrelerden elde edilen lizatlarda proteinlerin miktarları verilmektedir.



Şekil 4.3.2.1 Bradford analizinde kullanılan protein (BSA) Standard eğrisi

Tablo 4.3.2.1 BSA standart eğrisine göre hesaplanan hücre protein konsantrasyonları

Hücre adı	Protein konsantrasyonu (µg/mL)
H3	1092
H3-1	939
H3-2	1088
H3-3	996

4.3.3. Protein array çalışmaları (MMP ve sitokinlerin hücrelerdeki ifade miktarlarının belirlenmesi)

Meme kanseri tedavisinde seçeneklerin artması hastaların sağkalımlarına önemli katkılarda bulunmuştur. Tedavi seçeneklerinin artması, hangi hastalara ne tür tedavi uygulanacağı sorusunu da beraberinde getirmektedir. Meme kanseri cerrahisi geçiren hastalarda 5 yıl içinde metastaz ve relaps görülme oranı yüksektir. Aynı tedaviyi almış hastalarda tümör davranışının değişken olması, survey durumunun öngörülmesi, relapsları önleme ve tedavi rejimlerini daha etkin kullanabilmek için yeni prognostik markerlara gereksinim artmaktadır. Bu yeni markerlar arasında invazyon ve metastazın kilit noktası stromal bağ doku ve bazal membran komponentlerinin yıkılmasında rol alan Matriks metalloproteinazların prognoz tayininde ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemli role sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Literatürde meme kanserinde metalloproteinazların prognostik önemi ile ilgili birçok çalışma bulunmasına karşın ülkemizde meme kanserinde matriks metalloproteinazlarla ilgili bildirilmiş çok sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Tez çalışmamızda kemoterapinin kök hücrelerde meydana getirdiği moleküler etkileri görmek için; Meme kanseri kök hücrelerinde sitokin (interlökin ve interferon) düzeyleri ve metalloproteaz miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen protein miktarları bu analizleri yapmak için yeterlidir. Primer kültürü H3 ve H3-1 (HER2 pozitif kanser kök hücreleri) hücre lizatları kullanılarak protein array deneyleri yapılmıştır.

Membranlar üzerindeki yüzey belirleyici proteinleri hücre tiplerini tanımlar (Wicha MS, Liu S, Dontu G.2006). MMP ler ve sitokinlerin tespiti için MMP-10 hedef ve Cytokine-23 hedef human antibody array (Abcam) kitleri kullanılmıştır. Array membranlarından densitometrik analizler yapılmıştır (Şekil 4.3.3.1) .

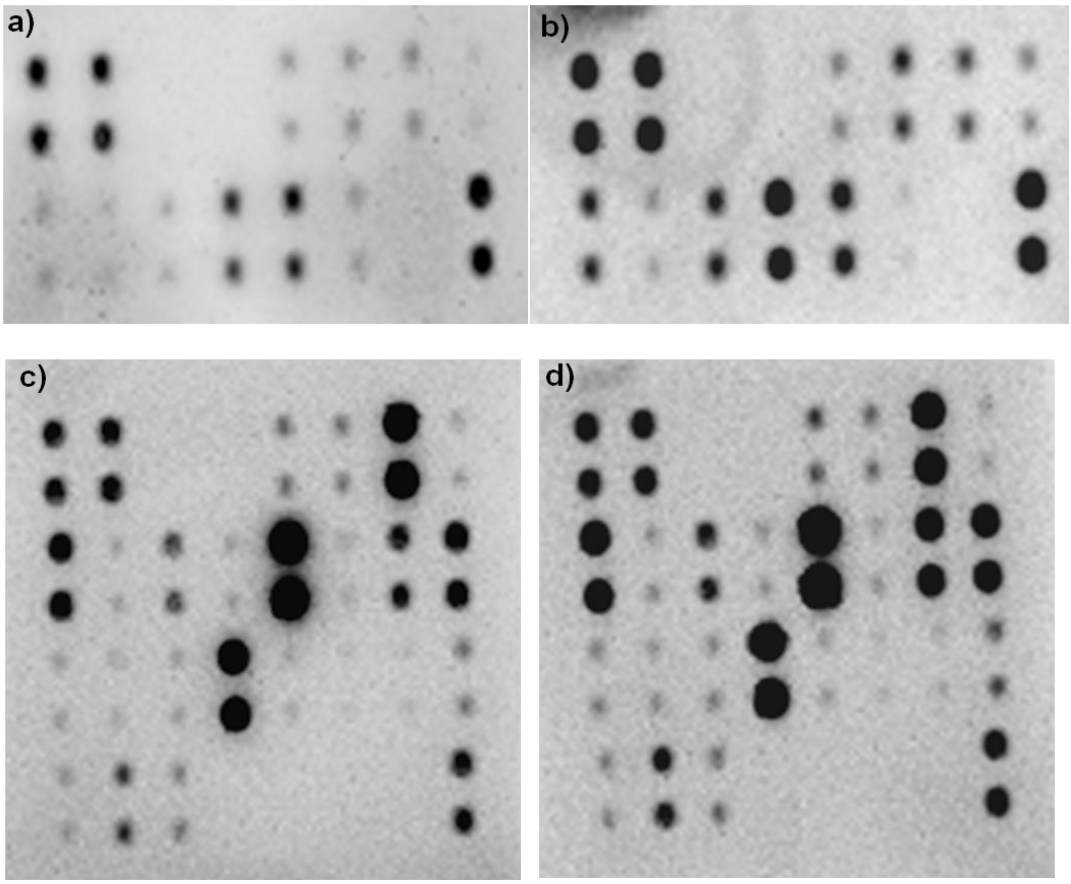
MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 proteinleri $HER2^{+}$ KKH'lerde primer kültüre göre 1.30 – 2.42 kat daha fazla ifade edilmektedir ($p< 0.05$).

Tablo 4.3.3.1 Proteinlerin membranlarda lokalizasyonu a) MMP protein array membran haritası, b) Sitokin array membran haritası.

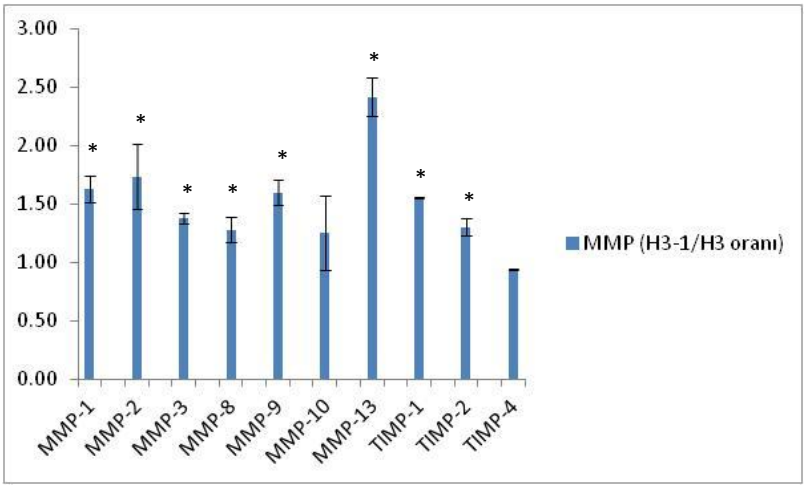
A)	A	B	C	D	E	F	G	H

1	Pos	Pos	Neg	Neg	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8
2	Pos	Pos	Neg	Neg	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8
3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-4	Neg	Pos
4	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-4	Neg	Pos

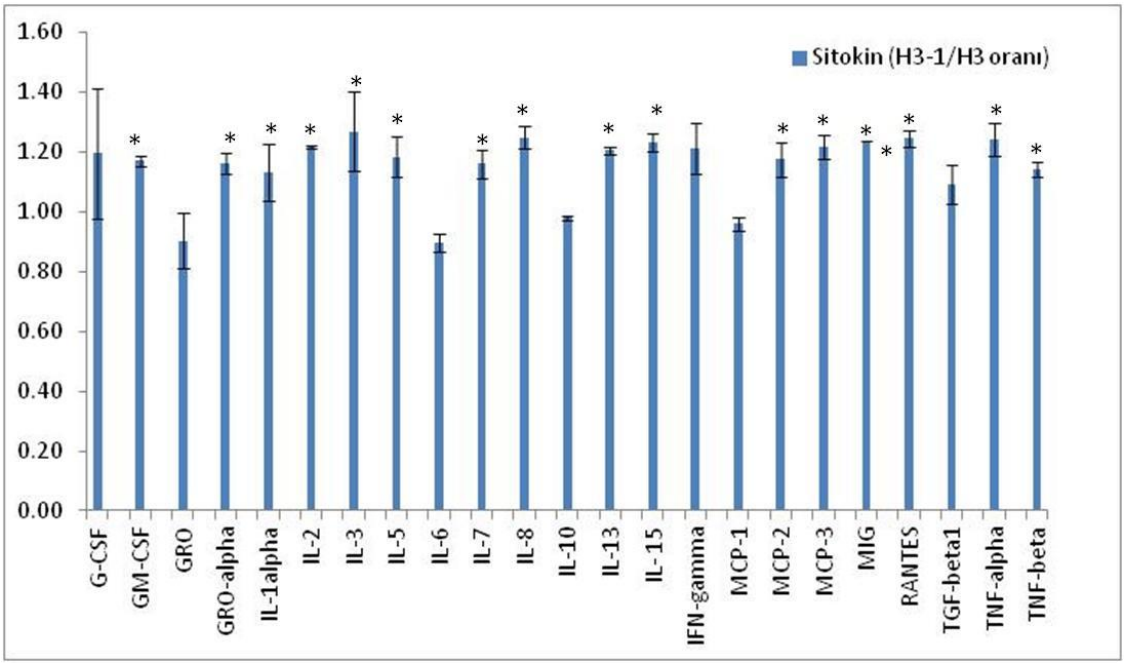
B)	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
2	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
3	IL-1α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
4	IL-1α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
5	IL-13	IL-15	IFN-γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
6	IL-13	IL-15	IFN-γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTES
7	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos
8	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos



Şekil 4.3.3.1. Protein array membranları ve protein spotları a) Human MMP protein array- H3 primer kültürü b) Human MMP protein array- H3-1 kök hücre kültürü (CD44+24-HER2+) c) Human cytokine protein array- H3 primer kültürü d) Human cytokine protein array H3-1 kök hücre kültürü (CD44+24-HER2+).



Şekil 4.3.3.2. H3-1 /H3 MMP ifadelerinin oranları.



Şekil 4.3.3.3. H3-1 /H3 Sitokinlerin ifadelerinin oranları.

G-CSF, GRO, IL-6, IL-10, MCP-1 ve TGF beta-1 hariç analiz edilen diğer sitokinler de yine HER2 pozitif KKH'lerde orijinal primer kültüre göre daha fazla ifade edilmiştir ($p<0.05$). HER2 pozitif KKH alt popülasyonundaki protein ifade profilinin ilk primer kültürden farklı olduğu görülmektedir.

MMP-1 ve özellikle MMP-3'ün artmış ekspresyonları meme kanserinde önemli prognostik değere sahiptir. Bu özellikleriyle özellikle MMP inhibitörleri terapötik bir hedef olarak bazı hasta gruplarında değerli olabilir. Memelilerde bulunan üç kollajenaz (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13), büyüme faktörlerini de içeren diğer matriks ve non-matriks proteinler gibi, esas substratları olan tip I, II, III, V, ve IX fibriler kollajenleri parçalar. MMP-13 ise psoriatik veya sağlıklı deride tespit edilmemiştir.MMP-2 (jelatinaz A), tip I, IV, V ve XI kollajenleri, fibronektini, laminini, geniş tenascin-C'yi, agrekanları ve elastini parçalayabilir. MMP-9 (jelatinaz B),tip III, IV, V ve XIV kollajenleri, agrekanları, elastini ve entaktini bulunur. MMP-9 indüksiyonu cilt hasar aldığında hemen yaraların iyileşmesiyle başlar ve hızla azalır (Giannelli G, Erriquez R,2004). MMP-2 aktivitesinin tümör gelişimi ve progresyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. MMP-2, insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor, IGF) bağlayıcı proteinleri yıkarak IGF' lerin salınımına yol açmaktadır (Pavlaki M, Zucker S,2003). Bu da hücre proliferasyonu ve apoptozisini modulasyonunu sağlamaktadır. Price ve arkadaşları MMP-2'nin promotor bölgesinde 1306CT

polimorfizmini göstermişlerdir. CC genotip MMP-2 transkripsiyonunda ve enzim aktivasyonunda artışa yol açarak, neoplazmaya yatkınlığı olan bireyleri etkilemektedir. Yu ve arkadaşları akciğer kanserli hastalarda CC genotipinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artış saptamışlardır (Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W,2001). Miao ve arkadaşları ise gastrik adenokarsinomalı hastalarda CC genotipini yüksek düzeyde saptamışlardır(Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P,2003).

Tablo 4.3.3.2 MMP ve sitokinlerin densitometrik analiz sonuçları tablosu.

Proteinler	**Ekspresyon oranı (H3-1/ H3)**	**Proteinler**	**Ekspresyon oranı (H3-1/ H3)**
MMP-1	1.63*	IL-5	1.18*
MMP-2	1.73*	IL-6	0.90
MMP-3	1.38*	IL-7	1.16*
MMP-8	1.28*	IL-8	1.25*
MMP-9	1.60*	IL-10	0.98
MMP-10	1.25	IL-13	1.21*
MMP-13	2.42*	IL- 15	1.23*
TIMP-1	1.55*	IFN-gamma	1.21*
TIMP-2	1.30*	MCP-1	0.96
TIMP-4	0.94	MCP-2	1.18*
G-CSF	1.19	MCP-3	1.22*
GM-CSF	1.17*	MIG	1.24
GRO	0.90	RANTES	1.25*
GRO-alpha	1.16*	TGF-beta1	1.09
IL-1alpha	1.13*	TNF-alpha	1.24*
IL-2	1.22*	TNF-beta	1.14*
IL-3	1.27*		

* $p < 0.05$ (HER2 pozitif kök hücrelerde (H3-1) protein ifadeleri primer kültür (H3) protein ifadelerinden anlamlı derece fazladır).

Bu gözlemler sonucunda MMP inhibisyonu ile geliştirilecek anti-kanser tedavi çalışmalarının önemi ortaya çıkmaktadır(Pavlaki M, Zucker S,2003). Farklı doku ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarda MMP-8 düzeyinin LPS (lipopolisakkarit) ile nasıl değiştiği gösterilmiş olsa da meme kanseri hücre hattında MMP-8 üzerindeki etkisi henüz incelenmemiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, MMP-8 geni silinmiş farelerde TNF-α ile akut hepatit oluşumuna karşı normal farelere kıyasla belirgin düzeyde koruma geliştirdiği gözlenmiştir. MMP-8 geni silinen farelerde, hepatosit nekroz ve apoptoz düzeyinde azalmaya bağlı olarak ölüm oranı azalmıştır (Van LP, Wielockx B, Puimege L,2005).

Bizim çalışmamızda, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 proteinleri $HER2^+$ KKH'lerde primer kültüre göre 1.30 – 2.42 kat daha fazla ifade edilmektedir ($p< 0.05$). Yapılan meme kanseri araştırmalarında meme kanserinde artmış MMP-3 ekspresyonunun tümör prognozunu teşvik edici olduğu ve bununla beraber invaziv meme kanseri hücrelerinde MMP-3 ekspresyonunun invaziv olmayan hücrelere göre arttığını gözlemlemişlerdir. Meme kanserinde tümör oluşumu, kanseri hücresi invazyonu ve metastazında, adezyon molekülleri ve matriks metalloproteinaz ailesinin önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Matriks metalloproteinazların, ECM degredasyonunda önemli rol oynaması, tümör invazyonunda ve metastazında etkilidir (Kohrmann A, Kammerer U). MMP-3 son zamanlarda meme kanserinde tümör etkileyici, tümörü hızlandırıcı olarak ortaya çıkmış ve risk üzerinde ilginç bir aday olduğu bildirilmiştir (Radisky ES, Radisky DC,2010). Artmış MMP3 ekspresyonu primer meme kanserli hücrelerde ve bu hücrelere ait protein ifadeleri oldukça iyi gözlenmiştir. İnsanda ve deney hayvanında yapılan çalışmalar bazı sitokinlerin antitümöral immün yanıtı güçlendirdiğini göstermiştir (Brandacher ve ark.2006). Bununla birlikte, meme kanserinde tümör nekroz faktör-α (TNF-α) gibi inflamatuvar sitokinlerin karsinogenetik olduğu, östrojen sentezini ve hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Honma ve ark. 2002, Purohit ve ark. 2002). TNF-α'nın tümör hücrelerindeki sitotoksik etkisi de bilinmektedir (Weitsman ve ark. 2003). Sitokinler, günümüzde immün sistemi baskılanmış olan kanser hastalarında tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Diğer taraftan sitokin reseptörlerine karşı geliştirilen antikorların da potansiyel antikanser ilaç olarak kabul edilmesi ilginçtir (Mendelsohn 1993). İnterlökin-2 (IL-2), T hücre proliferasyonunu sağlaması (Morgan ve ark. 1976) ve tümör lizisini uyarmasıyla (Grimm ve ark. 1982, Carson ve ark. 2001); interferon gama (INF-γ) neu antijenine spesifik yanıt oluşmasındaki rolü (Nanni ve ark. 2004) nedeniyle meme kanserli kişilerdeki T hücre aktivasyonunda özellikle araştırılması gereken sitokinler olarak görünmektedir.

Tablo 4.3.3.2 incelendiğinde, IL-2'nin Her2/neu+ kanserlerde arttığı görülmüştür. Bazı sitokinlerin kanserli doku tarafından sentezlendiğini gösteren çalışmalara dayanarak bu sitokinin, tümörün yüksek yayılma potansiyeline katkısının olduğu düşünülebilir. Ancak TNF-α düzeyleriyle IL-2 arasındaki pozitif bağıntı, her iki sitokinin başlıca kaynağının aktiflenen immün sistem hücreleri olma olasılığını kuvvetlendirmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışma ile HER2 pozitif hastalardan izole edilen primer meme kanseri kök hücrelerinde HER2- ve HER2+ meme kanseri kök hücre alt grupları olduğu literatürde ilk defa gösterildi. HER2 negatif hasta dokusundan saflaştırılmış olan kök hücre grubunun ifade ettiği protein / enzimler ile Trastuzumabtedavisi ve kombine tedaviye hücrelerin verdiği yanıt ilişkilendirilmiştir. HER2 pozitif meme kanserli hastalarda $HER2^-$ kanser kök hücrelerinin primer Trastuzumab direncinden sorumlu olabileceği ortaya konmuştur. $HER2^-$ kök hücrelerin $HER2^+$ kök hücrelere göre ilaçlara daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Çalışmada bazı MMP ve Sitokin düzeylerinin meme kanseri kök hücrelerinde daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu deneysel çalışmanın sonuçlarının HER2 pozitif meme kanserli hastalarda; gelecekte MMP'lere veya sitokinlere yönelik tedaviler ile metastaz gelişimi inhibe edilebilir. Sonuçların literatür ve bilime katkı açısından ümit vaat edici olduğu görülmektedir.

5.2 Öneriler

Meme kanseri kök hücrelerinin elde edilmesi ülkemiz açısından yeni ve özgün bir teknolojidir. Çalışma sonunda HER2 negatif meme kanseri grubunda hangi kemoterapötik kombinasyonun daha etkili olduğunu gösteren ipuçlarını verilmiştir. Ayrıca HER2 pozitif meme kanseri hastalardan elde edilen kök hücrelerin protein ifade profilleriyle tedaviye verdikleri yanıt ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle araştırma sonucunda hem HER2 pozitif hastalar için yeni terapötik stratejiler geliştirilebilir. Sonuçlar yeni ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalara ışık tutacaktır. Yapılan çalışma sonuçları, hem literatür için hem de klinisyenleri yönlendirmek açısından değerli ve özgündür.

KAYNAKLAR

Aksun SA, Özmen D, Bayındır O, 2001.Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 21, 332-42.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF, 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 7, 3983-88.

Altundağ K, Esteva FJ, Arun B, 2005. Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer. Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 5, 99- 106.

Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne C.K. ve ark., 2012. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol, 9, 16-32.

Avital I, Stojadinovic A, Wang H, Mannion C, Cho WC, Wang J ve ark., 2014. Isolation of stem cells using spheroids from fresh surgical specimen: an analytic minireview. Cancer Genomics Proteomics, 11, 2, 57-65.

Bailey TA, Luan H, Clubb RJ, ve ark., 2012. Mechanisms of trastuzumab resistance in ErbB2-driven breast cancer and newer opportunities to overcome therapy resistance. J Carcinog, 10, 28.

Baydın PÖ, Akbulut H, 2013. Kanserde damar endoteline yönelik gen tedavisi ajanları geliştirilmesi. Türk Onkolojisi Dergisi.

Berry, DA, K. A., Cronin SK, Plevritis DG, Fryback L, Clarke M, Zelen J, Mandelblatt S, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ, 2005. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. I. Cancer and C. Surveillance Modeling Network. N Engl J Med 353(17), 1784-92.

Bethune GC, Veldhuijzen van Zanten D, MacIntosh RF, Rayson D, Younis T, Thompson K, Barnes PJ, 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol, 25, 118-45.

Brook FA, Gardner RL, 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 11, 5709-12.

Cazalis J, Tanabe S, Gagnon G, Sorsa T, Grenier D, 2009. Tetracyclines and chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) modulate cytokine secretion by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. Inflammation, 32, 130-37.

Chakrabarti S, Patel KD, 2005. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. Exp.Lung Res., 31, 599-621.

Chandler S, Miller KM, Clements JM, ve ark., 1997. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. J.Neuroimmunol, 72, 155-61.

Chang JC , Tsimelzon A, ve ark., 2005. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. J Clin Oncol, 23, 1169-77.

Chechlinska M, 2003. The role of cytokines in carcinogenesis. Nowotwory J Oncol ,6,648–59.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ, 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res, 65, 23, 10946-51.

Colombo M, Corsib F, Foschib D, ve ark., 2010. HER2 targeting as a two-sided strategy for breast cancer diagnosis and treatment: Outlook and recent implications in nanomedical approaches. Pharmacological Research, 62, 150–65.

Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, ve ark., 2009. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. J Cell Mol Med, 13, 8B, 2236-52.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW ve ark., 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 24, 10158-63.

Daniele L, Sapino A, 2009. Anti-HER2 treatment and breast cancer: state of the art, recent patents, and new strategies. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 4, 918.

Early Breast Cancer Trialist Group, 1998. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet, 352, 930-42.

Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP, 1997. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. Digestion, 58, 520-28.

Ferraros CO, Martin AV, Castillo BM, ve ark., 2010. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44posCD24neg/low phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). Biochemical and Biophysical Research Communications, 397, 27–33.

Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C, 2004. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int J Dev Biol, 48, 411-24.

Gasparian AV, Burkhart CA, Purmal AA, ve ark., 2011. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT. Sci. Transl. Med., 3, 95-74.

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, ve ark., 2006. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med, 355, 2733-43.

Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP, 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. J Biol Chem, 272, 32889-900.

Giannelli G, Erriquez R, Iannone F, ve ark., 2004. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. Clin Experimental Rheumatol, 22(3), 335-38.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP, 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur. J. Cell Biol., 74, 111-22.

Goodison S, Urquidi V,Tarin D, 1999. CD44 cell adhesion molecules. Mol Pathol, 52, 189-96.

Görkey Ş, Kutlay N, 2009. Türkiye Biyoetik Derneği Kök Hücre Araşırmaları ve Uygulamaları Kurulu Kök Hücre Araştırmalarının Etik ve Hukuki Boyutu. 1. Basım.

Graus-porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE, 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. EMBO J, 16, 1647-55.

Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, ve ark., 1997. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. J. Biol. Chem., 272, 31504-09

Harrell, PC, ve ark., 2005. Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells. Exp Cell Res, 303(2), 308-20.

Hicks DG, Tubbs RR, 2005. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. Hum Pathol, 36, 250-61.

Houssami N, Macaskill P, Balleine RL, ve ark., 2011. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact, Insights through meta-analysis. Breast Cancer Res Treat, 129, 659-74.

Ithimakin S, Day KC, Malik F, ve ark., 2013. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. Cancer Res, 73, 1-11.

Johansson N, Ahonen M, Kahari VM, 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. Cell Mol. Life Sci., 57, 5-15.

Karagöz E, 2007. Kordon kanı kök hücreleri ve kordon kanı bankacılığı tarihçesi. Güneş Tıp Kitabevi, 20, 325-46.

Kars MD, İşeri OD, Gündüz U, Molnar J, 2008. Reversal of MDR by Synthetic and Natural Compounds in Drug Resistant MCF-7 Cell Lines. Chemotherapy, 54, 194-200.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S ve ark., 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell, 121, 6, 823-35.

Ko SY, 2012. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 in RANKL-induced RAW 264.7 cells. Arch. Oral Biol., 57, 1623-32.

Korkaya H, Paulson A, Iovino F, ve ark., 2008. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. Oncogene, 27, 6120-30.

Kuzuya M, Iguchi A, 2003. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. J. Atheroscler. Thromb., 10, 275-82.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J ve ark., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature, 367, 6464, 645-48.

Lecce G, Meduri G, Ancelin M, Bergeron C, Perrot-Applanat M, 2001. Presence of estrogen receptor b in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal and vascular cells. J Clin Endocrinol Metab, 86, 1379-86.

Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, Johansson R, Kosma VM, 2008. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. Histol. Histopathol., 23, 693-700.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V ve ark., 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res, 67, 3, 1030-37.

Li X, Lewis MT, Huang J, ve ark., 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J Natl Cancer Inst, 100, 672-79.

Lotem J, Sachs L, 2006. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. Oncogene, 25, 59, 7663-72.

Lu Y, Hong TG, Jin M, Saucerneol G, ve ark., 2010. A new lignan, from Saururus chinensis inhibits matrix metalloproteinase-9 induction via a nuclear factor kappaB and mitogen activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. Biol. Pharm. Bull., 33, 1944-48.

Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M, 2001. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). J Natl Cancer Inst, 93, 1852-57.

Marija B, Henry L, 2006. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. Clin Cancer Res, 5615.

Martin MD, Matrisian LM, 2007. The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. Cancer Metastasis Rev, 26, 717-24.

Mass RD, Press MF, Anderson S, ve ark., 2005. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. Clin Breast Cancer, 6, 240-46.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S, 1998. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. FASEB J., 12, 1075-95.

Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I ve ark., 2008. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. Cancer Res, 68, 1, 190-97.

Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, ve ark., 2003. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. Cancer Res., 63, 3987–90.

Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK, 2007. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. J Cell Mol Med, 11(5), 981- 1011.

Mosesson Y, Yarden Y, 2004. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. Semin Cancer Biol, 14, 262-70.

Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL, 2000. Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. Hum Reprod, 3, 48-56.

Murphy G, Nagase H, 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. Mol. Aspects Med., 29, 290-308.

Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, ve ark., 1994. Regulation of matrix metalloproteinase activity. Ann. NY Acad Sci., 732, 31-41.

Nagase H, Woessner JF, Jr, 1999. Matrix metalloproteinases. J.Biol.Chem., 274, 21491-94.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, ve ark., 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell, 6, 117-27.

Nahta R, Esteva FJ, 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. Breast Cancer Res, 8, 215.

Nelson, AR, ve ark., 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol, 18(5), 1135-49.

Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ, 2001. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol., 33, 960-70

Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawaa T, Kamiyama M, Hasegawa S, Momiyama N, ve ark., 2001. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. Cancer Lett., 173, 175–82.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, ve ark., 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. J.Leukoc.Biol., 69, 851-59.

Osman B, Kara A, Demirbel E, Kök S, Besirli N, 2012. Applied Biochemistry and Biotechnology PartA: Enzyme Engineering and Biotechnology, 223, 5, 2387-403.

Paik S, Wolmark N, ve ark., 2008. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. N Engl J Med, 1409-11.

Pavlaki M, Zucker S, 2003. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. Cancer Metastasis Rev., 22, 177-203.

Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, ve ark., 2010. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. J Clin Oncol, 28, 4307-15.

Pham PV, Vu BT, Phan NLC, Duong TT, ve ark., 2012. Isolation of breast cancer stem cells by single-cell sorting. Biomedical Tissue Culture, 59-72.

Pirruccello SJ, LeBien TW, 1986. The human B-cell associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. J Immunol, 136, 3779-84.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, ve ark., 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer Res, 65, 5506-11.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P ve ark., 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 3, 973-78.

Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y, 2006. Matrix Metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. J Clin Immunol, 26, 299-307.

Rayet B, Gelinas C, 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. Oncogene, 18, 6938-47.

Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, Newby AC, 2011. Diverse patterns of cyclooxygenase-independent metalloproteinase gene regulation in human monocytes. Br. J. Pharmacol., 163, 1679-90.

Reel, B, 2006. Matriks Metalloproteinaz enzimleri ve Ateroskleroz. Türkiye Klinikleri J Med, 26, 527-37.

Rielly DD, Rahman P, 2011. Genetics of susceptibility and treatment response in psoriatic arthritis. Nature Reviews Rheumatology, 7,12, 718–32.

Rundhaug JE, 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med., 9, 267-85.

Sato H, Seiki M, 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. Oncogene, 8, 395-405.

Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, ve ark., Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. J Natl Cancer Inst, 99, 28-38.

Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH, 2000. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. Br. J. Ophthalmol., 84, 654-66.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH, 2001. A novel role of metalloproteinase in cancermediated immunosuppression1. Cancer Res., 61, 237–40

Shimizu T, Kanai K, Kyo Y, Asano K, Hisamitsu T, Suzaki H, 2006. Effect of tranilast on matrix metalloproteinase production from neutrophils in-vitro. J. Pharm. Pharmacol., 58, 91-99.

Slamon DJ, Jones LA, ve ark., 1989. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science, 244, 707-12.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T ve ark., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature, 432, 7015, 396-401.

Spector NL, Blackwell KL, 2009. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancerv. J Clin Oncol, 27, 5838-47.

Sternlicht MD, Werb Z, 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 17, 463-516.

Saatkaya S, 2009. Malign meme kütlelerinin boyutunun değerlendirilmesinde ultrasonografi, dijital mamografi, manyetik rezonans görüntüleme ve postoperatif patoloji sonuçlarının karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyoloji Kliniği, 36-41.

Sundov Z, Tomic S, Vilovic K, Kunac N, Kalebic M, Bezic J, 2008. Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Duke's B colon cancer. Croat. Med. J., 49, 636-42.

Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T, 1998. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. Cancer, 83, 1153-62.

Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, ve ark., 2001. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial. J Clin Oncol 1, 24, 2428-36.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS ve ark., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282, 5391, 1145-47.

Tirino V, Desiderio V, Paino F, Papaccio G, de Rosa M, 2012. Methods for cancer stem cell detection and isolation, Shree Ram Singh (ed.), Somatic Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 879, 3-32.

Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tetu B, 2008. Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. Hum. Pathol., 39, 731-39.

Tuna M, 2009. Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücresi. Türk Onkoloji Dergisi, 24,1, 42-47.

Ulutin ANT, 2014. Hücre yaşlanması, ölümü ve kanser. Tıbbi Biyoloji, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 257-90, İstanbul.

Van LP, Wielockx B, Puimege L, Noel A, Lopez-Otin C, Libert C, 2005. Resistance of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice to TNF-induced lethal hepatitis. J. Immunol., 175, 7642-49.

Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R, 2002. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. Cells Tissues Organs, 171,1, 64-76.

Vihinen P, Kahari VM, 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int. J. Cancer, 99, 157-66.

Vincenti MP, Brinckerhoff CE, 2002. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. Arthritis Res., 4, 157-64.

Visvader JE, Lindeman GJ, 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer, 8, 10, 755-68.

Wicha MS, Liu S, Dontu G, 2006. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. Cancer Res, 66, 4, 1883-96.

Wilson, CL, ve ark., 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Science, 286,5437, 113-17.

Woessner JF, Jr, 2002. MMPs and TIMPs, an historical perspective. Mol. Biotechnol., 22, 33-49.

Wollf AC, Hammond ME, Schwartz JN, ve ark., 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol, 25, 118-45.

Yılmaz HH, Yazıhan N, Tunca D, 2011. Cancer trends and ıncidence and mortality patterns in Turkey. Japanese Journal of Clinical Oncology, 41, 10-16.

Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, ve ark., 2002. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. Cancer Res., 62, 6430–33.

Zucker S, Cao J, Chen WT, 2000. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. Oncogene, 19, 6642-50.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	GÖZDE KOYGUN
Uyruğu	**:**	TÜRKİYE
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	16.06.1989
Telefon	**:**	05301178677
Faks	**:**	
e-mail	**:**	gozdekayadibi@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Yahya Kemal BeyatlıAnadolu Lisesi-YENİMAHALLE, ANKARA**	**2006**
Üniversite	:	**Selçuk –Montana Eyalet Üniversitesi – KONYA,AMERİKA**	**2013**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi ,KONYA**	**2015**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

UZMANLIK ALANI

- KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU
- HASTA DOKULARINDAN PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ
- KONFOKAL MİKROSKOP
- MİCROARRAY YÖNTEMLERİ
- FLOW SİTOMETRİ
- X-CELLIGENCE
- HPLC
- GC-MS
- TGA
- ICP-MS
- ELISA OKUYUCU- NANO DROP

YABANCI DİLLER

İngilizce: **(çok iyi seviyede)**
Almanca: **(iyi seviyede)**

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

PROJE VE STAJLAR

Mart 2014 – Halen:

Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK)'te 'Meme kanseri kök hücre (benzeri) kültürlerde kanser ilaçlarının etkinliğinin moleküler mekanizmalarının araştırılması' konu başlıklı TUBİTAK VE BAP projesi.

Ocak 2013 – Mayıs 2013 :

Montana Eyalet Universitesi'nin Kimya bölümünde Peters research grubu 'Biomimetic Systems for Light Driven Hydrogen Production' projesinde araştırma asistanlığı.

Kasım 2012 – Ocak2013 :

Montana Eyalet Universitesi'nin BiyoKimya bölümünde Douglas Research Grubu 'P22 kapsülü kullanılarak polimer sentezi yapımı' projesinde araştırma asistanlığı.

Temmuz 2012 – Ağustos 2012 :

Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK)'nde Hücre Kültüründe Mikro ve Nano-biyoteknolojik yöntemler.

YAYINLAR

Uluslar arası bildiriler

1- Kars MD, Önecek G, Aykül F, **Kayadibi G,** Paclitaxel resistant breast cancer cell population includes considerable amount of ALDH+, CD44+, CD24-,cancer stem cell-like cells, EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, p108, May 18- 19, 2015. (Tez dışı)
2- Kayadibi G, Aykül F, Önecek G, Ceylan A**,** Kars MD, Çakır M, Börüban C, Artaç H, Artaç M, Identification of response to chemotherapy and investigation of matrix metallo protease related protein expression profiles in primary breast cancer, stem cell-like cells. EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, p103, May 18- 19, 2015. (**Y.L. Tezinden, poster bildirisi**).

3- Artaç M, **Kayadibi G,** Ceylan A, Kars MD, Artaç H, Çakır M, Börüban C, Tekin A, Tavlı L, Kartal A, The effects of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin on HER2-positive

cancer stem cells that are isolated from primary breast cancer cultures: A preliminary report, AACR Annual Meeting, April 18 - 22, 2015. . (**Y.L. Tezinden, poster bildirisi**).

Ulusal bildiriler

1- Koygun G., Kars MD, Ceyalan A, Artaç H, Çakır M, Börüban C, Tekin A, Tavlı L., Kartal A, Artaç M. Meme Kanseri Kök Hücre (Benzeri) Kültürlerde Kanser İlaçlarının Etkinliğinin ve Sitokinlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi **(Y.L. Tezinden, Sözlü Bildiri)**