

**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MEME TÜMÖRLERİNDE TAKSOTER VE ADRIAMİSİNE İN**  
**VİTRO CEVAP FARKLILIKLARI İLE TWIST GEN**  
**EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**  
**SELMA ULUSAL**

**DANIŞMAN**  
**DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU**

**NİSAN 2011**



**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MEME TÜMÖRLERİNDE TAKSOTER VE ADRIAMİSİNE İN**  
**VİTRO CEVAP FARKLILIKLARI İLE TWIST GEN**  
**EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**  
**SELMA ULUSAL**

**DANIŞMAN**  
**DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU**

**NİSAN 2011**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Selma ULUSAL' ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "*Meme Tümörlerinde Taksoter ve Adriamisine In Vitro Cevap Farklılıkları İle Twist Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması*" başlıklı bu çalışma, jürimizce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

16.05.2011

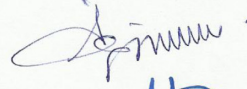
Üye : Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye : Prof.Dr. Seher BAŞARAN



Üye : Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCİ



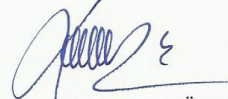
Üye : Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU(Danışman)



Üye : Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/05/2011 tarih ve 877./1.4049 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr. Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Meme kanseri, tüm dünyada, kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Meme kanserinde kemoterapi genellikle adjuvan ve neoadjuvan olarak uygulanmaktadır. Adriamisin ve taksoter, meme kanseri kemoterapisinde sıkça kullanılan ajanlardır.

Kemoterapi, yüksek maliyetli bir tedavi türüdür. Kemoterapide kullanılan ajanların toksik yan etkileri kullanımlarını kısıtlayan bir unsurdur. Uygulanan rejimlere bireysel cevap farklılıkları diğer bir problemdir. Bu nedenle, kemoterapiye yanıt hakkında bilgi verebilecek öngörüselle markırların belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmaktadır.

TWIST transkripsiyon faktörü, gelişimde mezoderm oluşumu ve farklılaşmasında görevli bir bazik heliks lup heliks proteinidir. İnsanlarda Twist proteinini kodlayan TWIST1 genindeki mutasyonlar Seathre-Chotzen Sendromu'na yol açmaktadır. Twistin anti-apoptotik, anjiyojenik ve metastatik süreçlerde rol oynadığı belirlenmiştir. Son dönemlerde, Twist transkripsiyon faktörünün, kemoterapötik ajanlara dirençte de rolü olduğu bildirilmektedir.

Çalışmamızda, daha önce kemoterapi almamış hastalardan alınan meme tümörlerinde Twist ekspresyonu ile adriamisin ve taksoter hassasiyeti arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Tümörlerin bu iki ajana hassasiyeti ATP-TCA ile belirlenmiştir.

Çalışma sonunda, meme tümörlerinde Twist ekspresyon artışı ile adriamisine hassasiyetin azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür. Tümörlerin taxotere hassasiyeti ile twist ekspresyon farklılıkları arasında ilişki görülmemiştir. Sonuç olarak, Twist, meme tümörlerinde adriamisin hassasiyetinin belirlenmesinde öngörüselle bir markır adayı olarak görünmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Twist, ATP-TCA, meme, tümör

## SUMMARY

Breast cancer is the most prevalent cancer among women worldwide. Chemotherapy is being applied in adjuvant and neoadjuvant settings in breast cancer therapy. Adriamycin and taxotere are chemotherapeutics that are commonly used in breast cancer chemotherapy.

Chemotherapy is an expensive therapy option. Besides, toxicity of the chemotherapeutics is one of the most important problem affecting their use. Another problem about chemotherapy is the different response rates of the individual patients to the chemotherapeutics used. So, there are many studies aiming to find predictive markers which give information about response to chemotherapeutics.

TWIST transcription factor is a basic-helix-loop-helix protein regulating the mesoderm formation and differentiation during development. Mutations of the TWIST1 gene, coding for the twist protein is the cause of Sheatre-Chatzen Syndrome in humans. It has been determined that twist is a part of anti-apoptotic, angiogenic and metastatic processes. Twist transcription factor has also been reported have role in resistance to chemotherapeutic agents.

We aimed to investigate the association between twist expression and response to adriamycin and taxotere in breast tumors of the patients, who did not receive any chemotherapy before. ATP-TCA has been used to determine the responsiveness of the tumors to these chemotherapeutics.

According to the results of the study, there was a statistically significant correlation between increased levels of twist gene expression and decreased response rates to adriamycin in breast tumors. There was no correlation between the twist expression levels and response to taxotere in the tumors. In conclusion, it seems that Twist is a candidate predictive marker for determining the responsiveness of breast tumors to adriamycin chemotherapy.

**Keywords:** Twist, ATP-TCA, breast, tumor

## İÇİNDEKİLER

### SAYFA

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vii
<b>ÖZET</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	x
<b>TABLO DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1. Kadınlarda Normal Meme Yapısı ve Gelişimi.....	5
2.1.1. Kadınlarda Normal Meme Yapısı .....	5
2.1.2. Kadınlarda Meme Bezinin Oluşumu ve Gelişimi .....	7
2.1.3. Meme Bezi Gelişiminde Hormonların Önemi .....	8
2.2. Meme Kanseri .....	8
2.2.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri.....	9
2.2.2. Meme Kanserlerinin Histolojik Tipleri.....	10
2.2.2.1. In Situ Meme Karsinomu .....	11
2.2.2.2. İnvaziv Meme Karsinomu .....	11
2.2.2.3. İnvaziv Duktal Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflaması.....	12
2.2.3. Meme Kanseri Hücrelerinde Fizyolojik Düzensizlik Örnekleri .....	12
2.2.3.1. Meme Kanserinde Büyüme/Bölünme Sinyallerinde Düzensizlik .....	14
2.2.3.1.1. Her2/neu (c-erbb-2) .....	15
2.2.3.1.2. Siklin D1 .....	16
2.2.3.1.3. c-Myc .....	16
2.2.3.2. Meme Kanserinde Büyüme/Bölünmeyi İnhibe Eden Sinyallere Duyarsızlık....	17
2.2.3.2.1. Retinoblastoma .....	17
2.2.3.2.2. TGF-Beta.....	18
2.2.3.3. Meme Kanserinde Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz) Mekanizmalarındaki Bozukluklar .....	19

2.2.3.3.1. p53.....	22
2.2.3.4. Meme Kanseri Hücrelerinde Sınırsız Replikatif Potansiyel .....	24
2.2.3.5. Meme Kanseri Anjiyogenez .....	24
2.2.3.6. Meme Kanseri İnvazyon ve Metastaz .....	25
2.2.4. Meme Kanseri Kalıtsal Yönü : BRCA1 ve BRCA2.....	26
2.2.5. Meme Kanseri Kemoterapi.....	27
2.2.5.1. Adriamisin (Adriamycin, Doxorubicin).....	28
2.2.5.1.1. Adriamisin etki mekanizması .....	30
2.2.5.2. Taksoter (Taxotere, Docetaxel) .....	35
2.2.5.2.1. Taksoterin etki mekanizması .....	35
2.2.5.3. Meme Kanseri Antrasiklin ve Taksan Kemoterapisine Direnç .....	39
2.2.5.3.1. Kemoterapi Direnci İle İlişkilendirilmiş Hücresel Elemanlar Ve Yolaklar....	42
2.3. TWIST (Twist1, Bhlha38) Transkripsiyon Faktörü.....	45
2.3.1. Twist Transkripsiyon Faktörünün Gelişimsel Rolü.....	46
2.3.2. Epitelyal Mezenkimal Değişim ve Twist.....	48
2.3.3. Twist Transkripsiyon Faktörü ve Kanser.....	49
2.4. İn Vitro Kemosensitivite Testleri .....	51
2.4.1. Adenozin Trifosfat Tümör Kemosensitivite Testi (ATP-TCA).....	52
2.5. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time RT-PCR) ile Gen Ekspresyon Analizi.....	54
2.5.1. Real Time PCR.....	54
2.5.1.1. SYBR Green.....	54
2.5.1.2. Floresan Problar.....	55
2.5.1.2.1. TaqMan ve Diğer Hidroliz Probları.....	55
2.5.1.2.2. Moleküler Beacon Probları .....	56
2.5.1.2.3. Akrep Problar .....	56
2.5.1.2.4. Hibridizasyon Probları .....	57
2.5.2. Real Time RT-PCR'da Kantifikasyon Yöntemleri .....	58
2.5.2.1. Mutlak (Absolüt) Kantifikasyon.....	58
2.5.2.2. Rölatif Kantifikasyon (Karşılaştırmalı Ct) Yöntemi .....	58
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>59</b>
3.1. Gereç.....	59



3.1.1. Kullanılan gereçler.....	59
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	60
3.1.3. Örneklem Grubu .....	61
3.2. Yöntemler.....	61
3.2.1. ATP-TCA.....	61
3.2.1.1. Tümörlerin Alınması.....	60
3.2.1.2. Tümörlerin Enzimatik Parçalanması .....	62
3.2.1.3. Kültür Aşaması.....	62
3.2.1.4. Luminometrik Sayım Aşaması .....	64
3.2.1.5. Değerlendirme Aşaması .....	65
3.2.2. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR İle Gen Ekspresyon Analizi .....	66
3.2.2.1. RNeasy Mini Kit İle RNA İzolasyonu .....	66
3.2.2.2. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit İle cDNA Sentezi.....	67
3.2.2.3. Roche Real Time Ready Catalog Assay İle Gen Ekspresyonu .....	69
3.2.2.4. Light Cycler 480 Cihazına Örneklerin Yüklenmesi .....	70
3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	70
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>71</b>
4.1. Hastaların Yaş Gruplarına Göre Dağılımları .....	71
4.2. Tümörlerin Histolojik Tiplere Göre Dağılımı.....	71
4.3. Tümörlerin Östrojen Reseptör, Progesteron Reseptör ve Her2/neu Düzeylerine İlişkin İmmünohistokimyasal Bulgular .....	72
4.4. Tümörlerde Metastaz ve Histolojik Grade Bulguları .....	73
4.5. TWIST Gen Ekspresyonu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Sonuçları .....	73
4.6. ATP –TCA (Adenosine Triphosphat Tumor Chemosensitivity Assay) ve Twist RT-PCR Sonuçlarının İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	75
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>79</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>85</b>
<b>7. KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>86</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Meme Bezi Anatomik Yapısı.....	5
Şekil 2.2. Meme bezi yapısındaki hücreler.....	6
Şekil 2.3. Meme adenokarsinomlarının farklı histolojik tipleri ve görülme sıklıkları .....	10
Şekil 2.4. Bcl-2 proteinleri.....	22
Şekil 2.5. Adriamisin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.6. Adriamisin proteazomlarca taşınması.....	31
Şekil 2.7. Topoizomeraz II etki mekanizması .....	33
Şekil 2.8. Taksol (a) ve taksoter (b) kimyasal yapıları.....	35
Şekil 2.9. Beta tübüline bağlı taksoter.....	38
Şekil 2.10. DNA'ya bağlı halde twist.....	45
Şekil 2.11. Twistin etkileştiği yollar.....	50
Şekil 2.12. Hidroliz problemlerinin çalışma prensibi .....	56
Şekil 2.13. Hibridizasyon problemlerinin çalışma prensibi .....	57
Şekil 3.1. ATP-TCA hücre kültür mikropalakası .....	63
Şekil 3.2. Neubauer lamında hücrelerin sayılacağı alanın görüntüsü .....	64
Şekil 3.3. Luminometrede elde edilen excell sonuçlarına bir örnek .....	64
Şekil 3.4. Centoaus Office ile veri girişi .....	65
Şekil 3.5. 1 no'lu yümörden izole edilen RNA ve tümörlerden elde edilen cDNA'lara ait agaroz jel görüntüsü.....	68
Şekil 3.6. Real Time Ready Catalog Assay PCR Şartları.....	69
Şekil 4.1. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı .....	71
Şekil 4.2. Tümörlerin histolojik tiplere göre dağılımı .....	72
Şekil 4.3. Tümörlerde ER, PR ve HER2 bulguları.....	72
Şekil 4.4. Bazı tümörlere ait RealTime PCR görüntüsü.....	73

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Antitümör Ajanların ATC klasifikasyonu .....	29
<b>Tablo 2.2.</b> Kemoterapi direnç faktörleri .....	40
<b>Tablo 2.3.</b> Metastatik meme kanserlerinde tek ajan terapisine cevap oranları .....	41
<b>Tablo 3.1.</b> cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve hacimleri .....	68
<b>Tablo 3.2.</b> Real Time Ready Bileşenleri ve Hacimleri .....	69
<b>Tablo 4.1.</b> Tümörlerin $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ sonuçları .....	74
<b>Tablo 4.2.</b> 1'no'lu tümörde ve lenf nodu metastazında Twist Ekspresyonu.....	74
<b>Tablo 4.3.</b> Taksoter Hassasiyetine Göre Tümörlerde Twist Ekspresyon Farkları .....	76
<b>Tablo 4.4.</b> Adriamisin Hassasiyetine Göre Tümörlerde Twist Ekspresyon Farkları .....	77
<b>Tablo 4.5.</b> Taksoter ve Adriamisin Hassasiyetine Göre Tümörlerde Twist Ekspresyon Farkları.....	78

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGE	AÇIKLAMA
bHLH :	basic helix-loop-helix
RT-PCR :	Real Time PCR
ATP-TCA:	Adenosine-Triphosphat Tumor Chemosensitivity Assay
kDa:	Kilo dalton
EGF:	Epidermal Growth Factor
IGF:	Insuline like growth factor
Rb:	Retinoblastoma
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor beta
EMT:	Epithelial Mesenchymal Transition
MDR:	Multi Drug Resistance
P-gp:	P-glikoprotein
NF- $\kappa$ B:	Nuclear Factor Kappa-B
STAT:	Signal Transducers and Activators
SF-ATPA:	Serum Free Adenosine Triphosphat Assay
ELA:	European Laboratory Association
$\mu$ l:	mikrolitre
ng:	nanogram
kb:	kilobaz
Ct:	Crossing Treshold
Cp:	Crossing point

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de, kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerin ikinci sıradaki nedenidir (48).

Meme kanseri etiyolojisini araştıran çalışmalar ile pek çok risk faktörlerinin katkısı olduğu ortaya koyulmuştur. Kadınlarda meme kanseri insidansı, erkeklere göre çok yüksektir. Cinsiyet dışında erken menarş, geç menapoz, BRCA1, BRCA2 ve TP53 genlerinde mutasyon taşıyıcılığı en bilinen risk faktörleridir (18).

Meme kanserlerinin neredeyse tamamı, meme epitelinden kaynaklanmakta ve bu nedenle adenokarsinom olarak adlandırılmaktadır. İnvaziv meme adenokarsinomlarının histolojik alt tipleri, invaziv duktal karsinom, invaziv lobüler karsinom, tübüler karsinom, müsinöz karsinom, medullar karsinom, papiller karsinom ve metaplastik karsinomlardır (66).

Meme kanseri kemoterapisi, adjuvan (postoperatif) ve neoadjuvan (preoperatif) olarak uygulanabilmektedir (17). Adriamisin ve taksoter, meme kanserinin adjuvan ve neoadjuvan kemoterapisinde sıklıkla kullanılan antitümör ajanlardır (17, 19, 107).

Antimikrobiyal antitümör ajanların antrasiklinler grubundan olan adriamisin (doksorubisin), DNA molekülünün arasına girmektedir. Adriamisinin antikanser etkilerine, DNA'ya interkalasyonu sonucunda, DNA Topoizomeraz II enzimi zehirlenmesi, makromolekül sentezinde görevli DNA ve RNA polimeraz gibi enzimlerin inhibisyonu, DNA eklentilerinin oluşumu ve adriamisin kimyasal yapısından kaynaklanan serbest radikal oluşumu gibi olayların aracılık ettiği düşünülmektedir. Adriamisin kaynaklı kardiyotoksisite, bu ajanın kullanımını kısıtlayan önemli bir faktördür (33,77, 86).

Taksoter (Taxotere, docetaxel), *Taxus baccata* (Avrupa porsuk ağacı) yaprağı özütünün işlenmesi ile elde edilen yarı sentetik bir antikanser ajandır (20, 74). Taksoterin hücrel hedefi mikrotübüllerin yapısındaki beta tübülün alt ünitesidir (2, 74).

Son yirmi beş yılda meme kanserinin adjuvan kemoterapisinde önemli gelişmeler olmuştur. Ancak bu gelişmeler, kemoterapinin yüksek maliyeti ve kemoterapi kaynaklı toksisite problemlerini de beraberinde getirmiştir (6).

Metastatik meme kanserinde antrasiklin ve taksandan oluşan kemoterapiye cevap oranı % 30-70 civarındadır. Taksan ve antrasiklinlere direnç görüldüğünde, tedavi seçenekleri oldukça azalmaktadır (95).

Meme kanserinde, tümörün moleküler karakteristikleri, kemoterapiye hassasiyeti etkileyebilmektedir. Tümörlerin kemoterapiye cevabının belirlenmesi ve böylece yüksek maliyet ve toksisite problemlerinin en aza indirilebilmesi için moleküler markır araştırma çalışmaları giderek artmaktadır (6).

Antrasiklin içeren kemoterapi rejimlerine hassasiyet ile ilişkilendirilen moleküler markırlar arasında Topoizomeraz II- $\alpha$  (TOP2A) ve Her-2/neu aşırı ekspresyonu üzerinde durulmuş, ancak çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (5, 113, 36). HER2 ve TOP2A genleri 17. kromozomda birbirlerine çok yakın konumlanmışlardır. Antrasiklin kemoterapisine cevap ile HER2 ve/veya TOP2A aşırı ekspresyonu arasındaki ilişkiyi bildiren çalışmalar, HER2, TOP2A ve 17. kromozom duplikasyonlarını kapsayan birbiri ile çelişkili sonuçları barındırmaktadır (57, 15, 82). Beta III ve beta I tübülün düzeyleri düşük olan meme kanserlerinin taksotere yanıtının daha iyi olduğu bildirilmiştir (80).

Adenozin Trifosfat Tümör Kemosensitivite Testi (ATP-TCA), tümörlerin kemoterapiye verdiği hücrel yanıtın in vitro olarak incelenmesinde faydalanılan ve

kemoterapötik ajanlara direnç markırlarının belirlenmesine aracılık eden yöntemlerden biridir (16, 64). Bu test ile tümör hücreleri enzimatik yolla ayrıştırılıp, kemoterapötik ajanlar ile kültür edilmektedir. Tüm canlıların evrensel enerji kaynağı olan ATP, yalnız canlı hücrelerde bulunur (64). Hücre öldükten sonra ATP miktarı derhal sıfıra inmektedir. Hücrelerdeki ATP miktarı, ateş böcekleri türleri gibi bazı canlılardan izole edilebilen lusiferin ve lusiferaz enzimleri ile ışığa dönüştürülerek ölçülebilmektedir (71). ATP-TCA'da, tümörün kemoterapötik ajana verdiği cevabın belirlenmesinde, kültür süresi sonunda canlı olarak kalan hücrelerin sayısı, luminometrede, lusiferin-lusiferaz enzim reaksiyonu ile ölçülür. Bu yolla tümörün hangi ajan ya da ajanlara daha hassas olduğu in vitro olarak belirlenebilmektedir (16,64) .

TWIST transkripsiyon faktörü (Twist1), bazik heliks-lup-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir (72). Twist transkripsiyon faktörü mutasyonları insanlarda, otozomal dominant kalımlı Saethre-Chatzen sendromuna neden olmaktadır (49, 50). Bu domaini içeren transkripsiyon faktörleri, gelişimle ilgili pek çok olayda önemli görevler üstlenirler (39,72). TWIST transkripsiyon faktörü, son dönemlerde, antiapoptotik, anjiyojenik ve metastatik rolleri nedeniyle onkoprotein olarak da değerlendirilmektedir (8). TWIST transkripsiyon faktörü ekspresyonu ile çeşitli kemoterapötik ajanlara direnç arasında ilişki bildiren bazı çalışmalar vardır. (27, 54, 87, 102, 115).

Çalışmamızda, meme kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinde TWIST transkripsiyon faktörü ekspresyon farklılıkları ile tümörlerin adriamisin (doksorubisin) ve taksotere (dositaksel) hassasiyetleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bildiğimiz kadarıyla primer meme tümörlerinde TWIST gen ekspresyon farklılıkları ile tümörlerin adriamisin ve taksotere primer hassasiyetinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, tümörlerde TWIST gen ekspresyonunun belirlenmesinde, Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR (Real Time RT-PCR) yönteminin kullanılması, adriamisin ve taksotere hassasiyetinin ise ATP-TCA ile belirlenmesi planlanmıştır. Çalışmamızda adriamisin ve taksotere primer hassasiyetin belirlenebilmesi için, tümörler, daha önce kemoterapi almamış hastalara ait tümör

örnekleri incelenmiştir. Çalışmada adriamisin ve taksoter ajanlarının tercih edilmesinin nedeni, hem bu ajanların meme kanseri kemoterapi rejimlerinde sıklıkla kullanılması (107), hem de iki ajanın kemoterapötik etki mekanizmalarının birbirinden farklı olmasıdır.

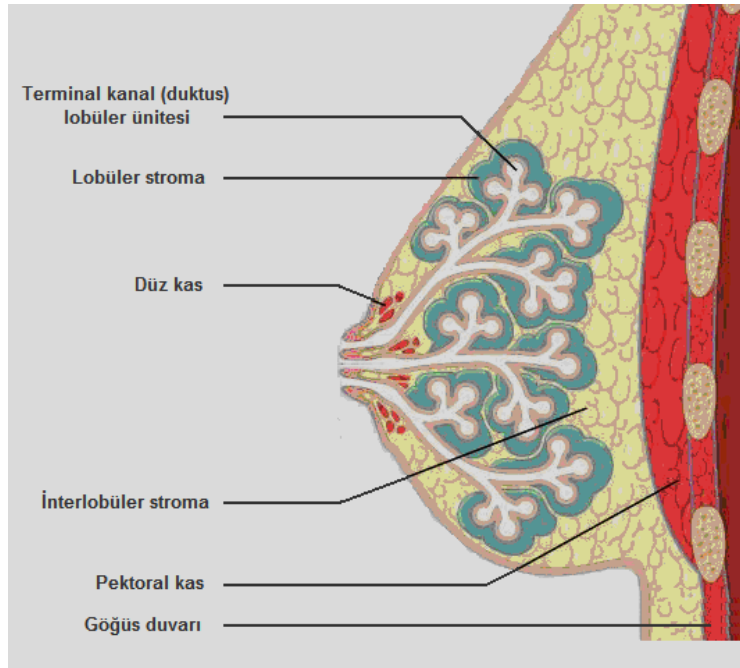


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kadınlarda Normal Meme Yapısı ve Gelişimi

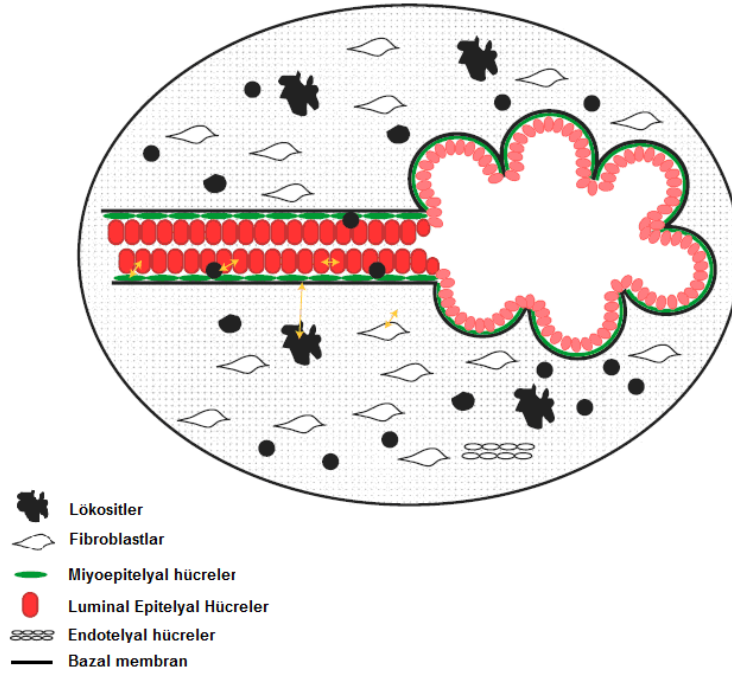
#### 2.1.1. Kadınlarda Normal Meme Yapısı

Kadınlarda meme bezleri, üst göğüs duvarının pektoral kası üzerinde bilateral olarak konumlanmıştır ve 6 ile 10 arasında değişen sayıda majör kanal (ductus) sisteminden oluşmuştur.



**Şekil 2.1.** Meme Bezi Anatomik Yapısı (Lester, S.C., 2010, The Breast, in Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J., eds., Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition, Saunders Elsevier Inc., Philadelphia, chapter 23, 1464 p.)

Yetişkin kadında terminal kanallar bir lobül oluşturmak üzere üzüm benzeri kümelenmeler meydana getirirler (Şekil 2.1. Meme Bezi Anatomik Yapısı). Her kanal sistemi (duktal sistem), tipik olarak memenin dörtte birinden fazlasını meydana getirir ve sistemler geniş çapta iç içe geçerler. Geniş kanalların dallanması ile terminal kanalın lobüler ünitesi meydana gelir (66).



**Şekil 2.2.** Meme bezi yapısındaki hücreler (Polyak, K. and Kalluri, R., 2010, The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer, Cold Spring Harb Perspect Biol., November 2010, 2:a003244.)

Meme histolojik yapısı, özelleşmiş bir epitel dokusu ve stromadan meydana gelir (Şekil 2.2.). Süt kanallarının sınırları bazal membranı oluşturan dış bir miyoeptilyal hücre katmanı ve süt üretimini gerçekleştiren iç lümenal epitel hücre katmanı ile çevrilmiştir. Kanalların etrafında ekstraselüler matriks ve çeşitli hücreler (endotel hücreleri, fibroblastlar, miyofibroblastlar, lökositler, yağ hücreleri) içeren stroma bulunmaktadır (88,116).

### 2.1.2. Kadınlarda Meme Bezinin Oluşumu ve Gelişimi

Meme bezi embriyonik dönemde ektoderm dokusundan köken alarak gelişir. İnsan embriyosunda meme tomurcukları mezenkimal hücrelerden salınan faktörler nedeniyle bazal epidermal hücrelerin proliferasyonu ile ortaya çıkmaktadır (5, 8). Meme bezi, embryo yaklaşık 4,5-6 mm büyüklüğe eriştiğinde oluşmaya başlar (5,53).

Prepubertal memede, geniş kanal sistemi, minimal lobül oluşumu ile terminal kanallarda sonlanır. Reprodüktif dönem, memedeki değişikliklerin en dinamik olduğu dönemdir. Her menstural döngüde endometriumun büyüüp gerilemesi gibi memede de değişiklikler olur. Menstural döngünün ilk yarısında lobüller daha durgundurlar. Ovülasyon sonrasında östrojen ve projesteron ile birlikte hücre proliferasyonu ve bunun sonucunda da lobül başına düşen asini miktarı artar. İntralobüler stroma, belirgin şekilde ödemli hale gelir. Mensturasyondan sonra, östrojen ve progesteron düzeylerindeki düşüş lobülleri geriletir ve stromal ödemin yok olmasını sağlar (66).

Memenin tam olarak olgun ve fonksiyonel hale gelmesi gebelik ile olur. Lobüller progresif olarak sayıca ve hacimce büyür. Gebeliğin sonunda meme neredeyse tamamen lobüllerden oluşmuş bir bez haline gelmektedir (66).

Bebeğin doğumundan hemen sonra, lobüllerin luminal hücreleri, progesteron düzeyi düşükçe süte dönüşecek olan kolostrum salgısını yapar (66).

Laktasyonun bitiminde, meme epiteli ve stroması büyük ölçüde yeniden düzenlenir. Epitel hücreler apoptoza uğrar, lobüller geriler ve atrofiye olur, toplam meme hacmi küçülür ancak tam bir gerileme meydana gelmez. Bu nedenle gebelik kalıcı bir büyüme ve lobül sayısı artışına neden olur (66).

### **2.1.3. Meme Bezi Gelişiminde Hormonların Önemi**

Memenin kanalsal (duktal) şekillenmesi, dolaşımdaki hormonlar tarafından kontrol edilir. Yetişkin kadın meme yapısında bazal ve luminal epitel hücreler, birlikte, stroma içerisine gömülü duktal ağı meydana getirirler.

Puberte ile birlikte, östrojen, progesteron, büyüme hormonu gibi ovaryum ve hipofiz bezi hormonları, duktal kanallanmayı başlatır ve devam ettirirler.

Postnatal meme bezi gelişiminde steroid hormon reseptörlerinin, hücrelerde doğru uzaysal konumlanması önemlidir. Duktal luminal hücrelerin yaklaşık % 25-30'u Östrojen reseptör alfa (ER $\alpha$ )/ progesteron reseptörü (PR) pozitifdir ve bu pozitif hücreler tekdüze dağılım göstermezler. Bu tekdüze olmama durumu prolaktin hormon reseptörü için de geçerlidir. Olgun meme bezinde çoğalan hücreler steroid reseptör negatiftir, çoğalmaları, ER/PR pozitif hücreler tarafından parakrin mekanizmalarla düzenlenirler (64)

## **2.2. Meme Kanseri**

Günümüzde, özellikle kadınlar arasında önemli bir sağlık problemi olan meme kanseri hakkındaki ilk yazılı bilgilerin tarihi antik döneme kadar uzanmaktadır. Mısır'da bulunan ve MÖ 1600 yılından kalma olduğu belirlenen bir papirüste, o dönemde henüz kanser terimi kullanılmadığından, ülseratif meme oluşumları olarak meme tümörlerinden bahsedilmektedir. Tarihte kanserle ilgili bilinen ilk yazılı belge olan ve Edwin Smith Papirüsü adı verilen bu papirüste, “ateş burgusu” adlı bir aletle koterizasyon yapılarak tedavi edilmeye çalışılan meme tümörlü, biri erkek, sekiz olguya ilişkin bilgiler olduğu belirlenmiştir. Papirüste, hastalık için, “tedavisi yoktur” ifadesi kullanılmaktadır (47).

Tüm dünyada, kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olan meme kanserinden ölenlerin sayısı 2008 yılı istatistiklerine göre yaklaşık dört yüz altmış bin civarındadır (51). Ülkemizde de, Sağlık Bakanlığı'nın yayımladığı, sekiz ile ait kanser görülme sıklıklarına ilişkin istatistiklerde, meme kanseri kadınlarda % 23,8'lik bir oranla birinci sırada yer almaktadır (48). Meme kanseri kaynaklı ölümler, kadınlarda, kanser ölümlerinin ikinci sıradaki nedenidir (18).

### **2.2.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri**

Bu güne kadar meme kanseri ile ilişkilendirilmiş faktörlerin hiçbirisi tek başına hastalığın etiyolojisini açıklayamamıştır. Ovaryan siklusların kümülatif sayısını etkileyen erken menarş ve geç menapoz meme kanser riskini arttırmaktadır. Menarş yaşının geciktiği her yıl için meme kanseri riskinde yaklaşık % 15'lik bir azalma, menapoz yaşının geciktiği her yıl için meme kanseri riskinde yaklaşık % 3'lük bir artış görülmektedir (18). İlk gebeliğin erken yaşta meydana gelmesinin riski azalttığı belirlenmiştir. Klinik randomize ve gözlemsel epidemiyolojik çalışmalarda, kombine hormon replasman tedavisinin meme kanseri riskini arttırdığı görülmüştür. Endojen hormonların meme kanseri riskine katkısını araştıran çalışmalarda, kandaki östradiol konsantrasyonunun, postmenopozal kadınlarda özellikle östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) pozitif tümör riski ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.

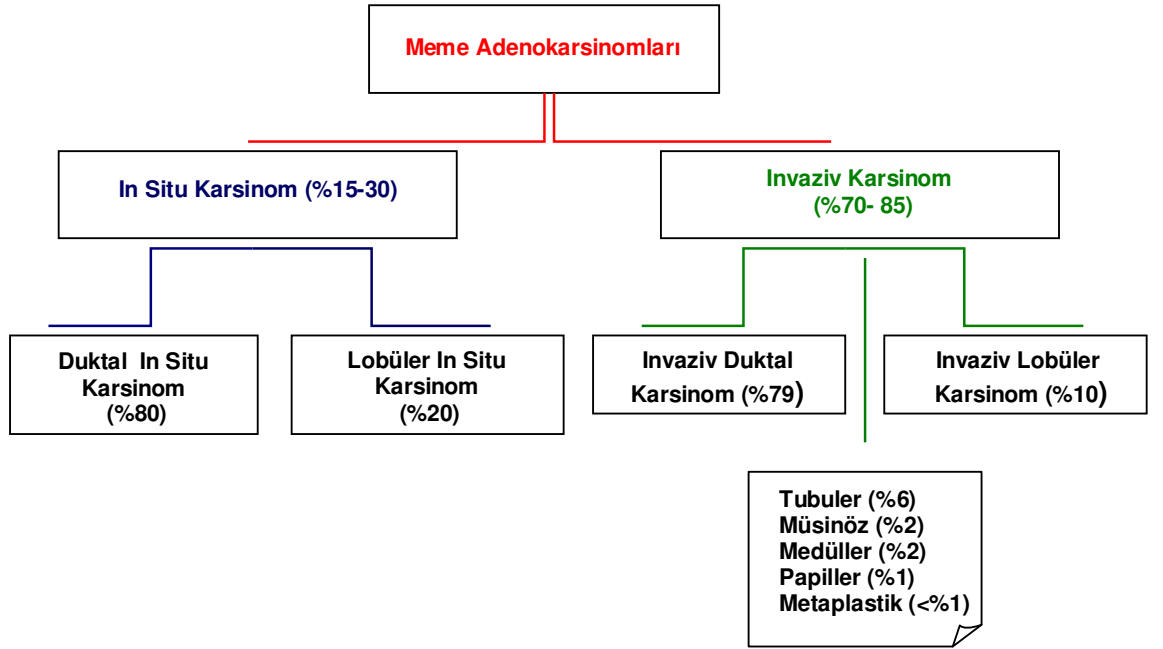
Memenin selim hastalıkları olan fibrokist ve fibroadenomların meme kanser riskini 2-3 kat arttırdığı bildirilmektedir (18).

Aile öyküsü meme kanseri riskinde 2-3 kat artış ile ilişkilendirilmiştir. Etkilenmiş birinci derece akraba sayısı ile orantılı olarak risk artmaktadır. Meme kanseri riski, BRCA1, BRCA2 ve TP53 genlerinde mutasyon taşıyanlarda büyük ölçüde artmaktadır. Bu genlerde mutasyon taşıyan bireylerde yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski

% 50'nin üzerinde ise de, pek çok popülasyonda bu genlerin mutasyonları nadir görülmektedirler ve olguların sadece % 2-5'lik bir kısmını açıklayabilmektedirler (18)

## 2.2.2. Meme Kanserlerinin Histolojik Tipleri

Meme malignitelerinin % 95'inden fazlası, meme epitelinden kaynaklanan adenokarsinomlardır. Adenokarsinomlar, in situ ve invaziv (infiltrate olan) karsinomlar olmak üzere iki grupta incelenmektedirler ( Şekil 2.3) (66).



**Şekil 2.3.** Meme adenokarsinomlarının farklı histolojik tipleri ve görülme sıklıkları (Lester, S.C., 2010, The Breast, in Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J., eds., Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition, Saunders Elsevier Inc., Philadelphia, chapter 23, 1464 p)

### **2.2.2.1. In Situ Meme Karsinomu**

In situ karsinom, maliğn hücrelerin çevredeki stromal dokuya geçmeksizin, duktus ya da lobül içerisinde proliferasyonla karakteristiktir (66).

Memede, duktal kanal epitelinin proliferasyonu ile karakterize olan in situ karsinomlar, duktal karsinoma in situ (DCIS) olarak adlandırılmaktadır. DCIS saptanan kadınlarda, invaziv kanser gelişme riski beş kat artmaktadır (10). Morfolojik olarak; komedo, nonkomedo, solid, kribriform, papiller, mikropapiller tip olmak üzere beş farklı tipi bulunmaktadır (66).

Terminal kanalın lobüler ünitesinden kaynaklanan in situ karsinom, Lobüler Karsinoma In Situ (LCIS) olarak adlandırılır. Genellikle mikroskopik incelemelerde tesadüfi olarak ortaya çıkar, çünkü mamografik dansite farklılıklarına ve kalsifikasyona sebep olmaz (10, 66). %25- % 35 oranında invaziv meme kanserine geçiş gösterir (10). LCIS, Olguların yaklaşık % 20- 40'ında bilateraldir ve yine olguların % 80-90'ında menopoza öncesi görülür (66).

### **2.2.2.2. Invaziv Meme Karsinomu**

İnvaziv meme karsinomlarının çok büyük bir kısmının terminal kanalın lobüler ünitesindeki epitel hücrelerden kaynaklandığı genel kabulüne rağmen, histolojik görünüş ve klinik tabloları çok büyük çeşitlilik gösterdiğinden, duktal ve lobüler infiltratör karsinom olarak farklı başlıklar altında incelenmelerine devam edilmektedir (118, 66). Az rastlanan invaziv karsinom tipleri; tubuler karsinom, müsinöz karsinom, medullar karsinom, papiller karsinom ve metaplastik karsinomdur (66).

İnvaziv Duktal Karsinom (IDC), ayırt edici bir özelliği olmayan (No Special Type, NST) olarak da adlandırılan meme karsinomlarını kapsamaktadır (10, 66, 118)

ve son dönemlerde ağırlık kazanan mikroerey ile gen ekspresyon analizi çalışmaları ile bu tümörlerin sınıflamasında büyük gelişmeler sağlanmıştır (66).

İnvaziv Lobüler Karsinom (ILC), invaziv duktal karsinomun aksine, fiziksel muayene ve mamografide daha az belirgin bir tümör yapısı gösterir. Çoğunlukla bilateral olarak görülür. Bu tip tümörlerde östrojen reseptör pozitifliği ve HER2/neu negatifliği yaygındır (66). İnvaziv lobüler karsinom ile lobüler karsinoma in sitünün öne çıkan histolojik özelliği her ikisinde de E-cadherin kaybının immünohistokimyasal olarak görülebilmesidir (103).

### **2.2.2.3. İnvaziv Duktal Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflaması**

Meme kanserini moleküler olarak sınıflandırmak amacıyla yapılan ilk çalışma 40 meme tümöründen 20'şer tekrar ve 3 normal meme dokusunun değişken ekspresyonlu 1753 gen bakımından incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda araştırmacılar meme kanserinin gen ekspresyon paternlerine göre; luminal benzeri meme tümörleri (luminal sitokeratin 8 ve 18 ekspresyonu), bazal benzeri meme tümörleri (sitokeratin 5 ve 17 ekspresyonu), HER-pozitif (genellikle Her2) meme tümörleri, normal benzeri meme tümörleri olarak dört farklı sınıfa ayrılabilceğini öne sürmüşlerdir. Seçilen 476 gen seti ile 78 tümörde yapılan ikinci değerlendirme sonucunda da, luminal meme tümörleri, Luminal A ve Luminal B olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 115 olgu ile 534 genden oluşan mikroerey çalışmasının sonucunda, meme tümörlerinin; bazal benzeri, HER2 pozitif, Luminal A ve Luminal B ile normal benzeri olmak üzere beş sınıfta toplandığı bildirilmiştir.

Meme tümörleri ile yapılan diğer çalışmalarda, ER pozitif ve ER negatif meme kanserlerinin, bu beş sınıf dışında başka alt gruplar da oluşturabileceği bildirilmiştir. Moleküler alt tiplerin prognoz ve kemoterapiye cevapları da birbirinden farklı görünmektedir. Örneğin luminal tip kanserler daha iyi yaşamkalım süreleri ile



ilişkiliyken, bazal benzeri ve HER2 pozitif tümörler kemoterapiye iyi cevap vermesine rağmen en kötü prognoz gösteren alt gruplar olarak bildirilmiştir (6).

### **2.2.3. Meme Kanseri Hücrelerinde Fizyolojik Düzensizlik Örnekleri**

Kanser, ister bir bireyde somatik mutasyon sonucu sporadik olarak, ister kalıtsal bir özellik sonucu bir ailenin birden fazla bireyinde ortaya çıksın, genetik bir hastalıktır. Kanserleşme sürecinde rol alan genler, etki mekanizmalarına göre iki grupta sınıflandırılır; onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ( 81,106).

Onkogenler, hücrenin büyümesi ve sağkalımı için gerekli hücre proteinleri kodlayan proto-onkogenlerin mutasyona uğramış formlarıdır. Proto-onkogenler, hücre çoğalmasında rol alan sinyal yollarında görevli proteinleri, büyümeyi sağlayan genlerin ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörlerini ve programlanmış hücre ölümü inhibitörlerini kodlayan genlerdir.

Tümör baskılayıcı genler, kayıpları ya da inaktivasyonları sonucunda kanserleşmeye sebep olan genlerdir. Bunlar, hücre büyümesi ve bölünmesini durduran ya da gerekli zamanlarda ara verilmesini sağlayan genlerdir. Son yıllarda, tümör baskılayıcı genler “Gatekeeper” ve “Caretaker” olarak iki farklı grup altında incelenebilmektedir.

Gatekeeper TBG’ler, hücre siklusu kontrol noktalarından hücrenin geçişini düzenleyerek, kontrolsüz büyümeyi ve tümör oluşumunu engeller, programlanmış hücre ölümünü sağlayarak, hücre bölünmesi ve sağkalımını kontrol altında tutarlar.

Caretaker tümör baskılayıcı genler, mutasyonların taranması ve onarımında rol alan proteinleri, mitoz sırasında normal kromozom dağılımında rol alan proteinleri ve programlanmış hücre ölümü mekanizmasının bileşenlerini kodlarlar. Caretaker tümör

baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, onkogen ve gatekeeper tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların birikmesine yol açarak, kanserleşmeye neden olurlar (81).

Bir hücrenin, kanser hücresine dönüşmesi için meydana gelmesi gereken genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin sayısı ve doğası, kanser tipleri arasında farklılıklar gösterir (58). Hanahan ve Weinberg, bu değişimlerin, hücre fizyolojisinde altı temel bozukluğa yol açtığını bildirmişlerdir (44). Bu bozukluklar:

- i. büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme (otonomi),
  - ii. büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık,
  - iii. programlanmış hücre ölümünden kaçış,
  - iv. sınırsız bölünme potansiyeli,
  - v. sürekli bir damarlanma yeteneği (anjiyogenez),
  - vi. dokuya invazyon ve metastaz gücü
- olarak sınıflandırılabilir (44).

Meme kanseri, tek bir hastalık olmayıp, hem moleküler hem klinik açıdan yüksek düzeyde heterojenite gösteren bir patolojidir (89). Bir gen veya hücresel yolaktaki bozukluk, kanser hücrelerindeki bu temel fizyolojik bozukluklardan birden fazlasına katkı sağlayabilmektedir.

### **2.2.3.1. Meme Kanserinde Büyüme/ Bölünme Sinyallerinde Düzensizlik**

Meme kanserinde HER2/neu reseptörünün aşırı ekspresyonu, c-myc amplifikasyonu, siklin D1 aşırı ekspresyonu gibi olaylar büyüme sinyallerinde düzensizleşmeye neden olmaktadır.

### 2.2.3.1.1. Her2/neu (c-erbB-2)

HER2/neu (HER2), 17q21’de lokalize bir gen tarafından kodlanan, 185 kDa’luk bir transmembran tirozin kinaz olup, meme kanserinde önemli rol oynayan bir onkogendir (93). HER2, epidermal büyüme faktör reseptörler (EGFR) ailesinin bir üyesidir. Bu reseptör ailesinin dört üyesi vardır: HER1 (EGFR ya da c-erbB-1), HER2 (neu ya da c-erbB-2), HER3 (c-erbB-3) ve HER4 (c-erbB-4).

HER ailesi üyelerinde, HER2 dışındaki reseptörlerde ligand bağlayan bir ekstraselüler domain bulunmaktadır. HER2’nin ekstraselüler domaini, ligand ile direkt etkileşim kurabilecek yapıda değildir, belli bir ligandı da yoktur. Bu nedenle normal şartlar altında monomer halindeyken hücre sinyalizasyonuna aracılık edemez, aktif hale gelebilmek için diğer reseptörler ile etkileşime girmelidir (11).

HER2’nin aşırı ekspresyonu mitojenik ve anti apoptotik sinyalleri indükleyebilir. HER2 aşırı ekspresyonunda hücre fizyolojisinde meydana gelebilecek anomaliler;

- i. RAS-MAPK yolağı aktivasyonu ile hücre proliferasyonunun indüklenmesi,
- ii. PI3K/Akt yolağı aracılığı ile apoptozun inhibe edilmesi,
- iii. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üretimi ile anjiyojenik yolların aktive edilmesidir.

Invaziv meme kanserlerinin yaklaşık % 20-30’unda, HER2, aşırı eksprese olmaktadır (93). Meme kanserlerinde HER2 nin aşırı ekspresyonunun öncelikli nedeni, HER2/neu geninin amplifikasyonudur. Bu olay diğer solid tümörlerde nadir görülmektedir (2).

Bazı meme kanserlerinde, HER2, aşırı eksprese olmadığı halde anormal sinyalizasyon aktivitesi göstermektedir. Bu tümörlerde, HER2’nin, reseptör ailesinin

diğer üyeleri ile dimer partneri olma önceliğinin arttığı ve bu nedenle sinyalizasyonda bozukluklar meydana geldiği saptanmıştır (2).

#### **2.2.3.1.2. Siklin D1**

Siklin D1, 11q13 bölgesindeki CCND1 geni tarafından kodlanır. Siklin D1, CDK4 ya da CDK6 ile kompleks oluşturarak, hücre siklus düzenlenmesinde çok kritik bir protein olan retinoblastoma fosforilasyonuna aracılık etmek suretiyle, G1 fazında hücre siklusunun ilerlemesine katkıda bulunur (100.). EGF (Epidermal Growth Factor) ve IGF (Insulin-Like-Growth-Factor) gibi büyüme faktörleri, östrojen, androjen ve retinoik asit gibi hormonlar, Ras, Src, ErbB2 ve Beta-catenin gibi onkogenik sinyal elemanları siklin D1 ekspresyonunu arttırarak, hücre siklusunun G1 fazından proliferasyona geçişine aracılık ederler (96).

Siklin D1, meme kanserlerinin yaklaşık % 15'inde amplifiye (84), primer meme tümörlerinin yaklaşık % 50'sinde ise mRNA ve protein düzeyinde aşırı eksprese olmaktadır (4).

Östrojenin mitojenik etkisine, G1-S geçişinde c-Myc ve siklin D1 aracılık etmektedir. Östrojen, siklin D1 ekspresyonunu hızla arttırmaktadır (96). Yapılan çalışmalarda lobüler karsinomların universal olarak siklin D'i aşırı eksprese ettiği, ancak duktal karsinomlarda siklin D1 aşırı ekspresyonunun ER pozitif olgularla sınırlı olduğu bildirilmiştir (100).

#### **2.2.3.1.3. c-Myc**

c-myc protoonkogeni, B-myc, L-myc, N-myc ve S-myc gibi üyeleri bulunan bir onkogen ailesine aittir. Max ile dimerize olduğunda, hücre çoğalması ve apoptozda

görevli hedef genlerin promotorlarına bağlanıp onları düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. c-myc amplifikasyonu, primer meme tümörlerinin yaklaşık % 20'sinde görülmektedir. ER ve/veya PR ekspresyonu olmayan tümörlerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir. c-myc, HER2/neu, cyclinD1 geni ve Ras gibi diğer elemanlarla etkileşime girer. Tümör baskılayıcı BRCA1 de c-myc ile etkileşime girebilir ve c-myc aracılı transkripsiyonu baskılayabilir. Pek çok çalışmada, c-myc gen amplifikasyonu ve kötü prognoz arasında bir ilişki olduğu bildirilmişse de, bu konudaki bulgular çelişkilidir (100).

### **2.2.3.2. Meme Kanserinde Büyüme/Bölünmeyi İnhibe Eden Sinyallere Duyarsızlık**

#### **2.2.3.2.1. Retinoblastoma**

Moleküler düzeyde, antiproliferatif sinyallerin çoğu, hatta belkide tamamı, retinoblastoma (Rb) proteini ve onunla yakından ilişkili p107 ve p130 proteinleri tarafından aktarılmaktadır (44). Rb, pek çok kanserde inaktivasyona hedef olan kritik bir hücre siklus düzenleyicisidir.

Rb1 geni tarafından kodalanan 110 kDa'luk retinoblastoma proteini, hücre hayat döngüsünün özellikle G1-S fazı geçişinde anahtar rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir. Rb, üst sinyalizasyon yollarının fosforilasyon durumlarına bağlı olarak, hiperfosforile veya hipofosforile durum arasında gidip gelir. Aktif Rb, hücre döngüsünün sentez (S) fazına girmek için gerekli proteinlerin sentezini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan E2F transkripsiyon faktörüne bağlanıp onu inaktive eder. Böylece hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişi bloke olur.

Hücre döngüsü sırasında Rb büyük oranda fosforile olur ve siklin bağımlı kinaz (CDK) kompleksleri tarafından inaktive edilir. Bunun sonucunda Rb, E2F transkripsiyon

faktörünü serbest bırakır. S fazı için gereken proteinlerin sentezi gerçekleşir ve hücre S fazına girer.

Rb1 geni içindeki mutasyonlar, kromozomal delesyonlar ve transkripsiyonel baskılama gibi etkenlerle Rb1'in etkisiz hale gelmesi, meme kanserlerinin % 20'sinde görülmektedir. Ancak Rb inaktivasyonunun frekansı ve prognostik değerine ilişkin çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Meme kanserlerinde, Rb ekspresyonu ve relaps olmadan sağkalım arasında herhangi bir ilişki gösterilmemiştir (83).

#### **2.2.3.2.2. TGF-Beta**

Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) süper ailesi, insanlarda yaklaşık 30-40 farklı üyesi bulunan dimerik proteinleri içeren bir protein ailesidir. Hormon olarak ya da daha sıklıkla, bir dizi biyolojik olayı yürütmek için lokal düzenleyiciler olarak görev yaparlar. Gelişim sırasında, desen (patern) oluşumunu düzenler ve çoğalma, özelleşme, farklılaşma, ekstraselüler matriks oluşumu, hücre ölümü gibi pek çok hücreysel olayda görev alırlar. Erişkinlerde de, doku onarımı ve immün düzenlenmede rol alırlar.

TGF-  $\beta$  proteinlerinin tümü, plazma zarının iç yüzünde bir serin/treonin kinaz domaini içeren transmembran proteinlerince aktarılmaktadır. Bu serin/treonin kinaz reseptörlerin Tip I ve Tip II olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır. TGF  $\beta$  ailesinin her üyesi, bu iki tipteki reseptörün karakteristik kombinasyonlarına bağlanırlar. Bağlanma sonucunda, kinaz domainleri bir araya gelir ve reseptör kompleksi aktive olur (3).

TGF-beta, hem meme bezinin gelişiminde, hem de meme kanserinin çeşitli aşamalarında rol almaktadır. Bir meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 hücre dizisinde

antiöstrojenler ile muamele, biyolojik olarak aktif TGF-beta1 ve TGF-beta2 salınmasına neden olmuştur (21).

Meme bezi gelişimi, farklılaşması ve neoplazisi önemli ölçüde, cinsiyet hormonları olan östrojen ve progesteron tarafından düzenlenmekte ise de, bu etkilere belli büyüme faktörlerinin aracılık ettiği uzun zamandır bilinmektedir. TGF-beta'nın meme bezi epitelinin gelişimindeki rolüne, ilk kez 1987'de Daniel ve Robinson tarafından, hormonlara cevap olarak sentezlenmesine ise Lippman ve ark. tarafından 1988 yılında yapılan çalışmalarda dikkat çekilmiştir. DNA sentezini inhibe edebildiği, apoptozu indüklediği ve ekstraselüler matriksi yeniden modüle edebildiği için TGF-beta'nın etkisi aynı zamanda hücre tipine, farklılaşmaya ve mikroçevreye de bağlıdır (79).

Östrojen ve progesteron, meme bezi gelişimi için vazgeçilmez ise de, meme epitel hücrelerinin bu ajanlara cevabında farklılıklar olduğu görülmektedir. Östrojen, puberte sırasında duktal morfogenez için gereken primer uyarıları sağlamakta, aynı zamanda, progesteron reseptörünü indükleyerek, bezi lobüler-alveolar farklılaşmaya yönlendirmektedir. Progesteron, gebelik sırasında, duktal ağacın yan dallanmaları ve alveolar genişleme için gereklidir. TGF-beta, meme bezi gelişiminin tüm safhalarında epitelde eksprese olmaktadır (79 ). TGF-beta yolağı, meme epitel hücrelerinin temel antiproliferatif yolaklarından biridir. TGF-beta'nın antiproliferatif uyarısına cevabın kaybı meme karsinogenezinin önemli aşamalarından biridir (9). Ancak pek çok çalışmada, TGF-beta'nın daha geç tümör basamaklarında, tümör gelişimi için bir indükleyiciye dönüşebileceği, anjiyogenezi, ekstraselüler matriks degradasyonunu indükleyebileceği ve antitümör immun cevapları baskılayabileceği bildirilmiştir (21).

### **2.2.3.3. Meme Kanserinde Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz) Mekanizmalarındaki Bozukluklar**

Apoptoz, enerji bağımlı, aktif ve son derece düzenli bir hücre ölümü sürecidir. Apoptotik süreçte, apoptoza giren hücre dışındaki diğer hücreler hasar görmezler.

Apoptotik hücre, bir takım morfolojik değişikliklere uğrar. Kromatini yoğunlaşır, nükleusu fragmanlara ayırır, plazma membranında kabarcıklar oluşur ve hücre büzülür. Nihayet hücre parçalanarak zarla çevrili küçük moleküllere dönüştürülür. Bu partiküller fagositozla sindirilir (100).

Apoptozun bilinen araçlarına dayanarak, memelilerde iki tür apoptotik sinyalizasyon yolağı olduğu görülmüştür: dış apoptoz yolağı ve iç apoptoz yolağı.

Dış apoptotik yolak (hücre ölüm reseptörlerine bağlı yolak), çözülebilir sitokinlerin (tümör nekroz faktörü alfa- tümör nekroz faktörü alfa ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) gibi) ya da hücreye bağlı ölüm ligandlarının (FAS.L gibi) hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanması ile meydana gelir. Bu yolak immün yanıtlar sonucu meydana gelen hücre ölümünün temel yolağıdır.

Dış apoptotik yolak ile hücre arasındaki haberleşmeyi sağlayan 20'den fazla ölüm reseptörü tanımlanmıştır. Bu reseptörler, kısa sitoplazmik bölgelerinde ölüm domaini adı verilen bir domaine sahip, ekstraselüler kısımda ise sistince zengin bir domain ile karakterizedirler. Bu grubun iyi bilinen üyeleri arasında TNF- $\alpha$  reseptör 1 (TNF-R1), Fas (Apo-1/CD95), TRAIL-R1 ve R2, DR3, DR6 ve p75-Sinir Büyüme Faktörü reseptörü yer almaktadır. Bu reseptörlerin ligandlarının neredeyse tamamı, metalloproteinazlar tarafından kesilip çözünebilir ligandlar haline de gelebilen tip II transmembran proteinlerdir. Ligand ile etkileşen reseptör trimerize olur ve alt yolakların etkileşimi ile kaspaz 8 ve kaspaz 10 aktive edilerek apoptoz süreci başlar (35).

İç apoptotik yolak (mitokondri aracılı yolak), intraselüler bir organel, DNA'ya ya da hücre iskeletine zarar gelmesi ya da büyüme faktörü aracılı sağ kalım sinyallerinin yokluğu sonucunda meydana gelen apoptoz şeklidir. Mekanistik olarak mitokondri, hücre içerisinde meydana gelen stresi algılayabilme özelliği taşır.

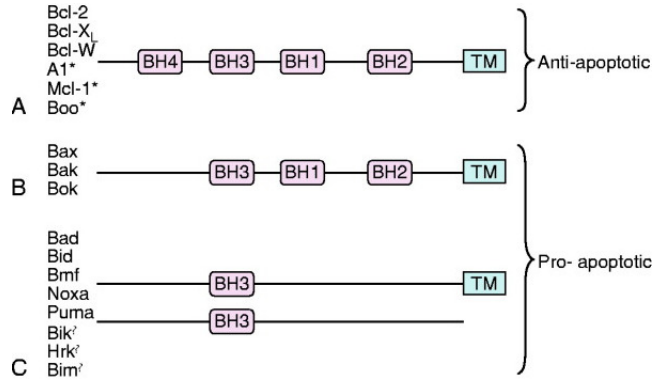


Hücrenin apoptoz sırasında geçirdiği morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler, kaspazlar (caspases; Cysteine Aspartyl Specific Proteases) adı verilen bir grup proteaz tarafından yürütülmektedir. Kaspazlar inaktif öncüller olarak sentezlenirler. Yine kaspazlar tarafından gerçekleştirilen aspartik asit rezidülerinin yarıklanması sonucu aktif hale gelirler ve apoptoz süreci tetiklenmiş olur (100). Başlatıcı kaspazlar olan 2, 8, 9 ve 10 aktif hale geldikten sonra efektör kaspazlar olan 3 ve 7'yi proteolitik olarak yarıklayıp, aktive ederler. Efektör kaspazlarda apoptoz ile sonuçlanacak olan protein yıkımı sürecini yürütürler (25)

İnsanlarda Apaf-1 adı verilen protein, kaspazlara bağlanıp onları aktive ederken, Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri kaspaz aktivatörü olarak, bazıları kaspaz aktivitesi inhibitörü olarak etki gösterir. Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondride görev yaparlar. Başlatıcı kaspazlardan biri aktive olduktan sonra Apaf-1 ile kompleks oluşturur. Bu kompleksin oluşumu için programlanmış hücre ölümü için bir takım sinyaller ve sitokrom c ye ihtiyaç duyulur. Hücre ölümünü gerektiren herhangi bir durum yokken, sitokrom c, mitokondri zarları arasındaki boşlukta, Apaf-1 ve kaspaz-9 ise sitozolde bulunur. Bu kaspaz-9'u inaktif tutar. Herhangi bir hücre ölüm sinyali ortaya çıktığında, mitokondri hasara uğrar ve sitokrom c sitozole çıkar. Sitozole sızan sitokrom -c, Apaf-1'e bağlanır ve apoptozom adı verilen yapının oluşumunu tetikler. Apoptozom içerisindeki kaspaz-9 artık aktiftir ve apoptoz için gereken reaksiyonlar dizisi başlamış olur. (32,100)

Mitokondriye bağlı apoptozun temel elemanları Bcl-2 ailesinin üyeleridir. Bu aileye adını veren Bcl-2 geni, foliküler B hücreli lenfomanın önemli bir bulgusu olan t(14;18)(q32;q21) translokasyonu sonucu ekspresyon artışı sayesinde bulunmuştur. Bcl-2, onkogen olarak sınıflandırılmıştır çünkü aşırı ekspresyonu tümör oluşumuna neden olmaktadır. Ancak diğer onkogenlerin aksine hücresel proliferasyona neden olmaktan çok hücre ölümüne direnç sağlayarak tümör gelişimine katkıda bulunmaktadırlar.

Bu güne dek 20 den fazla Bcl-2 üyesi tanımlanmış ve üç gruba ayrılmışlardır (Şekil 2.4). Bu grupların içerdikleri domainler ve apoptotik fonksiyon açısından dahil oldukları sınıflar şekilde gösterilmektedir (35).



**Şekil 2.4.** Bcl-2 proteinleri (Dorsey, F.C, Steeves, A.M., Cleveland, J.L., 2008, Apoptosis, Autophagy and Necrosis, in: Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., Thompson, C.B., eds., The Molecular Basis of Cancer, 3th Edition, Saunders Elsevier, 205-220 p. )

### 2.2.3.3.1. P53

Apoptoz, hücre dışından gelen sinyallerin yanı sıra, genetik materyaldeki anomaliler gibi hücre içi bozukluklara cevap olarak da başlatılır. Tümör baskılayıcı gen p53, genomun gardiyanı olarak adlandırılmakta ve bu yollarda anahtar rol oynamaktadır (25).

TP53 geni 17p13'de lokalizedir. Hücre döngüsünün kontrolü, apoptozis, DNA onarımı ve anjiyogenezde rol alan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan 53 kDa'luk P53 proteinini kodlar. P53 aktivitesinde artışa neden olan pek çok hücrel olay vardır:

- i. iyonize radyasyon ile indüklenen DNAhasarından sonra ATM ve CHK2 gibi protein kinazların aktivasyonu
- ii. UV radyasyonu, sitotoksik ilaçlar, protein kinaz inhibitörleri gibi ajanların neden olduğu hücrel stres
- iii. hücre döngüsü düzenleyicisi P14<sup>ARF</sup>'nin etkisi

p53 aktivitesini indükleyebilir.

P53'ün fonksiyonlarından biri, hücre döngüsünün G1/S fazı geçişinin kontrolüdür. P53, bir hücre döngüsü inhibitörü olan p21<sup>WAF/CIP</sup>'in transkripsiyonunu artırır. p21<sup>WAF/CIP</sup>'in transkripsiyonu, siklin bağımlı kinaz kompleksi (CDK)4/6 üzerinde negatif etki yapar. (CDK)4/6 inhibüsyonu, Rb tümör baskılayıcı genini aktive edip, meme kanserlerinde sıkça amplifiye olan siklin D1'in ekspresyonunu inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini engeller.

P53, G2/S geçişini de düzenleyebilmektedir. Bu noktadaki önemli hücre döngüsü inhibitörleri olan GADD45 ve 14-3-3 $\alpha$ 'nın transkripsiyonu p53 tarafından düzenlenmektedir.

P53, bir çok pro-apoptotik proteinin (BAX, APAF1, PUMA, P53AIP1, NOXA, PIDD gibi) ekspresyonunu aktive ederek apoptozu başlatır.

P53, meme tümör oluşumu ve gelişimi ile ilgili maspin proteinini kodlayan geni de düzenlemektedir. Maspin, antianjiyojenik, antimetastatik özelliktedir ve invaziv davranışı baskılayıcı etkilere sahip bir serin proteazdır (83).

P53'ün bu kadar çok fonksiyona sahip olması, onu hücre kaderi (cell fate) ve stres sinyallerini kontrol eden kritik düzenleyici olayların merkezine yerleştirmektedir. Bu kapsamda p53, hücre döngüsü işleyişini durdurur ve aynı zamanda onarılamaz bir hasar söz konusu ise, apoptozu indükler (83).

Sporadik meme kanserlerinin %15- %35'inde p53 mutasyonları görülmektedir (104). P53 mutasyonları, diğer epitelyal kanserlere göre, meme kanserinde daha nadirdir ve daha agresif hastalık ve genel sağkalımın kötü olması ile ilişkilendirilmiştir (83).

Meme kanseri histolojik alt tiplerine göre bakıldığında, p53 mutasyonlarının en sık medullar meme kanserlerinde, en nadir ise papiller ve müsinöz karsinomlarda görüldüğü bildirilmektedir (83). P53 mutasyonu olan medullar karsinomlarda daha iyi prognoz görülmektedir (104). Duktal karsinomlarda, lobüler karsinoma nazaran daha sık mutasyonu görülür. Yüksek dereceli in situ duktal karsinomların %40'ında, orta dereceli in situ duktal karsinomların %5'inde mutant iken, düşük dereceli in situ duktal karsinomlarda ve duktal hiperplazilerde mutasyonu bildirilmemiştir (83).

#### **2.2.3.4. Meme Kanseri Hücrelerinde Sınırsız Replikatif Potansiyel**

Kromozomların uçları, 6 baz çiftlik bir DNA dizisinin (5'-TTAGGG-3') çok sayıda tekrarından oluşan telomer adı verilen yapılar tarafından kapatılmıştır. Her hücre bölünmesi sonunda telomerik DNA yaklaşık 50-100 baz çiftlik bir kayıba uğrar. Telomerlerin bu şekilde kaybı, kromozomal DNA'nın uçlarını koruyamayacak kadar kısaltmalarına ve sonunda hücrenin krize girerek ölümüne yol açar. Telomerik DNA dizileri, telomeraz adlı bir enzim tarafından sentezlenmektedir (44). Sınırsız replikatif potansiyel, hücrelerdeki telomeraz enzimi ile ilişkilidir. Neredeyse tüm invaziv meme kanserlerinde telomeraz aktivitesi görülmektedir. Çoğu duktal karsinoma in situ lezyonlarında da invaziv formdakine benzer oranlarda telomeraz aktivitesi gözlemlenmiştir. Ancak bunun invaziv kansere dönüşüm riski ile ilişkisi olup olmadığı net değildir. Meme kanseri kök hücreleri de, telomeraz ekspresyonunun aracılık ettiği sınırsız çoğalma ve kendini yenileme potansiyeline sahip görünmektedir (9).

#### **2.2.3.5. Meme Kanseri Anjiyogenez**

Damarlar ile iletilen oksijen ve besin maddeleri hücre fonksiyonu ve sağ kalımında son derece önemli rol oynadıklarından, bir dokudaki tüm hücreler bir kılcal damara 100µm kadar yakın olmak zorundadırlar. Organ oluşumu sırasında bu mesafe damarların koordineli bir şekilde gelişimi ile sağlanır. Dokunun oluşumu

tamamlandıktan sonra yeni kan damarlarının oluşum süreci olan anjiyogenez kısa süreli ve son derece kontrollü olarak devam eder (44).

Damarlanma, tümörlerde, oksijenin alınması ve metabolitlerin uzaklaştırılması için büyük önem taşımaktadır. Meme kanserlerinde de kanser hücrelerinin damarlanabilmeleri söz konusudur. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), damarlanmanın önemli araçlarından biridir. Artmış VEGF ekspresyonu saptanan duktal karsinom in situ olgularında invaziv kansere dönüşme riskinde artış bildirilmiştir. VEGF düzeyleri, östradiol ve HER-2 ile ilgili sinyalizasyona cevap olarak artabilmekte ve matriks metalloproteinazların aktivasyonu ile stromadan sentezlenebilmektedir. Bu nedenle meme kanserinin tedavisinde VEGF ve matriks metalloproteinaz inhibitörlerinin kullanılabilmesi için araştırmalar devam etmektedir (9).

#### **2.2.3.6. Meme Kanserinde İnvazyon ve Metastaz**

Bir çok kanser hastasının, kanser nedeniyle değil, metastatik hastalık nedeniyle öldüğü sıkça kullanılan bir ifadedir. Doğrudan yaşamsal bir fonksiyonu olmayan ve kolay ulaşılabilen bir dokuda meydana gelen meme tümörleri, metastaz yapmadıklarında, çoğunlukla tedavisi mümkün olan sistemik bir hastalık olabilmektedir. Metastazın gerçekleşebilmesi için, hücrelerin, doğal bir bariyer olan bazal membranı geçerek dolaşım sistemine girmesi ve uzaktaki organlara ulaşabilmesi gerekmektedir (9).

Epitelyal Mezenkimal Değişim (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT), bazal yüzeyi ile bazal membrana tutunmuş haldeki polarize epitel hücrelerin, göç etme kapasitesinde artış, invazivlik, apoptoz direncinde artış, ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretiminde artış gibi mezenkimal hücre fenotipi olarak kabul edilen biyokimyasal özellikleri kazanmasına olanak sağlayan biyolojik bir süreçtir (55). Bazal membranın bütünlüğünün bozulması ve köken aldığı epitelyal tabakadan uzağa göç edebilecek mezenkimal hücrenin oluşumu EMT sürecinin tamamlanmasının işaretidir

(56). EMT sürecinde hücreler, primer tümörden uzaklaşmalarını sağlayabilecek daha hareketli ve invaziv bir fenotip kazanmaktadırlar. Bu nedenle epitelial mezenkimal dönüşümün meme kanser metastazında önemli rol oynayabileceği bildirilmektedir (58, 67).

#### **2.2.4. Meme Kanserinin Kalıtsal Yönü: BRCA1 ve BRCA2**

1990'larda, meme kanserine yakınlıkla ilişkili iki gen olan BRCA1 ve BRCA2 belirlenmiştir. Bu iki genin herhangi birinde, germline mutasyonların ardından somatik inaktivasyon, bazı kalıtsal meme kanseri olgularında kanser fenotipine neden olabilir. BRCA mutasyonları nadir olsa da, bu mutasyonları taşıyan kadınların yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski oldukça yüksektir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının klinik çalışmalarda, tümörlerin bilateral oluşu, erken yaşta ortaya çıkması ve yumurtalık kanseri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu iki gendeki mutasyonların neden özellikle meme ve yumurtalık kanserlerine yakınlığa yol açtığı tam olarak bilinmemekte, reproduktif faktörler ve hormonal etkenlerin de katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

BRCA1 geni 17q21, BRCA2 geni ise 13q12-q13 bölgesine lokalizedir. DNA hasarının onarılması ve kromozom bütünlüğünün devam ettirilmesinde görev alan tümör baskılayıcı genlerdir. DNA hasarı meydana geldiğinde, BRCA1 ataxia-telangiectasi mutated (ATM) protein kinaz tarafından fosforile olur. Fosforile BRCA1, mitotik rekombinasyon ve DNA kırık onarımında görevli proteinler olan BRCA2, BRCA1-associated RING domain, Rad51 ve/veya Rad50 protienlerinden oluşan bir kompleks ile DNA tamir mekanizmasını aktive eder. Meme kanseri hücrelerinde BRCA1 ya da BRCA2 fonksiyon kaybı kromozomal instabiliteye yol açar ve kontrol noktası aktivasyonunu tetikler. Eğer kontrol noktası işlevsel ise, p53 ve p21 gibi kritik kontrol noktası genleri aktive olabilir ve hücre siklus bloklanmasını uyarır. Ancak genelde BRCA genlerindeki bir mutasyon, sekonder genetik değişikliklerin birikimine

yol açar. Bu genetik değişiklikler p53 gibi kritik bir proteini etkilerse, kontrol noktası aktive edilemez ve kontrolsüz hücre bölünmesi meydana gelir (100).

### **2.2.5. Meme kanserinde Kemoterapi**

Kemoterapi, primer ya da distal tümörün büyüme/bölünmesini yavaşlatmak ya da aksatmak amacıyla, yüksek proliferasyon oranlarına sahip hücrelere karşı sitotoksik aktivite gösteren ilaçların sistemik kullanımına dayanan terapi türüdür (19). Bu ilaçlar genellikle, cerrahi ve radyoterapi gibi diğer yaklaşımları da içeren bir sistemin parçası olarak uygulanmaktadır (1). Tablo 2.1’de, kanser kemoterapisinde kullanılan ajanların ATC (The Anatomical Therapeutic Chemical Classification) sınıflaması özetlenmiştir (41).

Kanser kemoterapisinde bazı zorluklar mevcuttur. Kemoterapi tümör hücreleri kadar hızlı bölünen normal hücrelere de zarar veren konvansiyonel bir tedavi türüdür (19). Kemoterapi amacıyla verilen ajanların, tümör hücrelerinin bulunduğu bölgelere yüksek konsantrasyonlarda ulaşabilmeleri için yüksek dozlarda uygulanmaları gerekmekte ve sonuçta non-spesifik toksik etkiler ortaya çıkmaktadır. Diğer önemli problem ise, tümörün, uygulanan ilaca direnç gösterebilmesidir. Kemoterapiye direnç primer olarak, yani ilaç ilk uygulandığında ortaya çıkabileceği gibi, kemoterapi bir süre uygulandıktan sonra sekonder olarak da ortaya çıkabilir (17).

Pek çok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de kemoterapi, tedavinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Meme kanserinde kemoterapi, adjuvan (postoperatif) ve neoadjuvan (preoperatif) olarak iki farklı şekilde uygulanmaktadır: Adjuvan kemoterapi, meme kanseri hastalarına cerrahi müdahale ve/veya radyoterapiden sonra uygulanan kemoterapidir. Neoadjuvan kemoterapi ise, cerrahi operasyon öncesinde verilen kemoterapidir. Neoadjuvan kemoterapi, büyük tümörleri olup mastektomi gerektiren meme kanseri hastalarında, tümör boyutunun küçültülmesi ile meme koruyucu cerrahiye imkan sağlayabilmektedir (17).

Meme kanseri kemoterapisinde, tek ajandan oluşan kemoterapi, siklofosamid-metotreksat-florourasil (CMF) kombinasyonundan oluşan kemoterapi, antrasiklin temelli kombinasyonlar, antrasiklin ve taksan temelli kombinasyonlar ve son dönemlerde özellikle HER2 onkoprotein artışı gözlenen meme kanseri hastalarında antrasiklin-taksan kombinasyonuna ek olarak herseptin (trastuzumab, monoklonal HER2 antikoru uygulanması yaygın olarak kullanılmaktadır (92).

#### **2.2.5.1. Adriamisin (Adriamycin, Doxorubicin)**

Antitümör ajanların antrasiklinler alt gurubuna ait olan adriamisin (ATC klasifikasyonunda L01DB, 41), meme kanseri kemoterapi kombinasyonları içerisinde sıklıkla tercih edilen ajarlardandır (107). Bu antikanser ajan meme kanserinin yanı sıra Hodgkin ve Non-Hodgin Lenfoma, multiple myeloma, akciğer, ovaryum, gastrik, tiroid karsinomları, sarkom ve pediatrik kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (110).

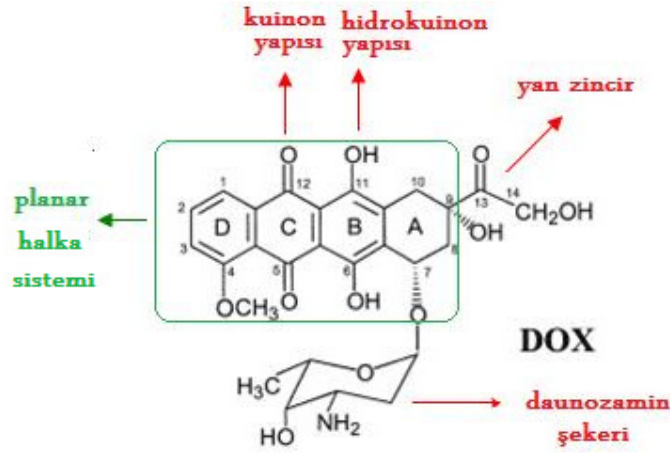
1958'de, Güney İtalya'dan alınan bazı toprak örneklerinde yeni *Streptomyces* bakteri türleri bulunmuştur. Bu organizmadan elde edilen parlak renkli bir antibiyotik olan daunomisin aynı zamanda tümörlerde de sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Daunomisin daha etkili formlarını bulmak amacıyla topraktan elde edilen örnekler N-nitrozo-N-metil üretan ile muamele edilerek daunomisin değişik bir formunu üretme yeteneğine sahip mutant bir suş (*Streptomyces peucetius* var. *Caesius*) elde edilmiştir. Elde edildiği toprak yapısı Adriatik Denizi'nin toprak yapısına benzediği için, bu mikroorganizmadan sağlanan antibiyotik, adriyamisin olarak adlandırılmıştır. Adriyamisinin antikanser ajan olarak klinikte kullanımı, 1974 yılında da FDA tarafından onaylanmıştır.



**Tablo 2.1.** Antitümör Ajanların ATC klasifikasyonu

<b>L01</b>	<b>ANTİNEOPLASTİK AJANLAR</b>	
<b>L01A</b>	<b>ALKİLLEYİCİ AJANLAR</b>	
	<b>L01AA</b>	Nitrojen Mustard Analogları
	<b>L01AB</b>	Alkil sülfonatlar
	<b>L01AC</b>	Etilen iminler
	<b>L01AD</b>	Nitrozüreler
	<b>L01AG</b>	Epoksidler
	<b>L01AX</b>	Diğer Alkilleyici Ajanlar
<b>L01B</b>	<b>ANTİMETABOLİTLER</b>	
	<b>L01BA</b>	Folik Asit Analogları
	<b>L01BB</b>	Pürin Analogları
	<b>L01BC</b>	Pirimidin Analogları
<b>L01C</b>	<b>BİTKİ ALKALOİDLERİ ve DİĞER DOĞAL ÜRÜNLER</b>	
	<b>L01CA</b>	Vinka Alkaloidler ve Analogları
	<b>L01CB</b>	Podofillotoksin Türevleri
	<b>L01CC</b>	Kolşisin Türevleri
	<b>L01CD</b>	Taksanlar
	<b>L01CX</b>	Diğer Bitki Analogları ve Doğal Ürünler
<b>L01D</b>	<b>SİTOTOKSİK ANTİBİYOTİKLER ve İLİŞKİLİ MADDELER</b>	
	<b>L01DA</b>	Aktinomisinler
	<b>L01DB</b>	Antrasiklinler ve İlişkili Maddeler
	<b>L01DC</b>	Diğer Sitotoksik Antibiyotikler
<b>L01X</b>	<b>DİĞER ANTİNEOPLASTİK AJANLAR</b>	
	<b>L01XA</b>	Platinli Bileşikler
	<b>L01XB</b>	Metilhidrazinler
	<b>L01XC</b>	Monoklonal Antibiyotikler
	<b>L01XD</b>	Fotodinamik/radyasyon Terapisi Duyarlılığını Arttırıcılar
	<b>L01XE</b>	Protein Kinaz İnhibitörleri
	<b>L01XX</b>	Diğer Antineoplastik Ajanlar
	<b>L01XY</b>	Antineoplastik Ajan Kombinasyonları

Adriamisinin kimyasal olarak, quinon ve hidroquinon yapısına sahip dört tetrasiklik halkadan oluşan bir planar halka sistemi ile buna bağlı bir daunozamin şekeri ve bir yan zincirden oluşmaktadır. Parlak kırmızı renktedir, ışıktan etkilenir ve floresan özellik gösterir. Suda, fizyolojik tuz çözeltisinde ve metanolde çözümlür. Adriyamisin demire yüksek afinite gösterir,  $Fe^{+3}$  ile etkileşime girerek  $Fe(Adriamycin)_3$  bileşiği oluşturur (Şekil 2.5). Planar halka ile daunozamin şekeri arasındaki glikozidik bağ, gastrointestinal kanalda hidrolize uğradığından oral olarak verilememektedir (33).



Şekil 2.5. Adriamisinin kimyasal yapısı (Minotti, G., Menna, P., Emanuela, S., Cairo, G., Gianni, L., 2004, Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, Pharmacol. Reviews, 56, 185-229 p.)

### 2.2.5.1.1. Adriamisin etki mekanizması

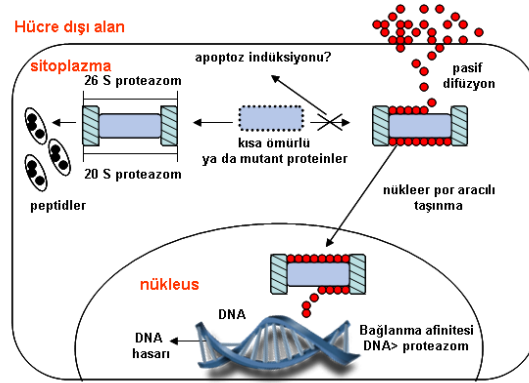
Adriamisinin sitotoksik etkilerine neden olan iki temel olay söz konusudur:

i. DNA'ya bağlanma ve bunun sonucunda DNA-eklentilerinin oluşumuna, makromolekül sentezinde aksaklıklara, Topoizomeraz II zehirlenmesine ve hücre sinyal yollarının aktivasyonuna sebep olma;

ii. DNA ve hücre zarı hasarına yol açan serbest radikal üretimi (110, 86).

## DNA'ya Bağlanma

Adriyaminin nükleusa taşınmasında proteozomlar görev alırlar (62). Proteozomlar, proteinlerin non-lizozomal yıkımında rol alan nükleer ve sitoplazmik proteinaz kompleksleridir (Şekil 2.6). Adriyamin hücre içerisine alındıktan sonra yüksek afinite ile proteozomlara bağlanmakta ve nükleusa ATP-bağımlı reaksiyonla porlardan geçerek taşınmaktadır. Nükleusta adriyaminin, DNA'ya olan afinitesi protezoma olan afinitesinden daha yüksek olduğundan, proteozomdan ayrılıp DNA'ya bağlanır. Bu bağlanma non-kovalent bir bağlanmadır (77).



Şekil 2.6. Adriyaminin proteozomlarca taşınması (Kiyomiya, K., Matsuo, S., Kurebe, M., 2001, Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex, Cancer Res., 61,6, 2467-2471 p. )

## Makromolekül Sentezinin Adriyamin İle Baskılanması

Adriyaminin etki mekanizması ilk çalışmalarda DNA interkalasyonu ve/veya DNA polimeraz aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda DNA/RNA biyosentezini baskılama etkisinin büyük ölçüde doza bağımlı olduğu belirlenmiştir. DNA sentezinin baskılanmasının, Adriyamin kaynaklı p53 aktivasyonunun etkisi ile meydana gelen hücre döngüsü durdurulmasının bir parçası olarak erken ve geçici bir olay olabileceği bildirilmiştir (38).

### ***Adriamisin Kaynaklı DNA Eklentisi Oluşumu***

Adriamisin DNA'ya bağlandıktan sonra DNA eklentileri meydana getirebilir. Bu eklentilerin oluşumu büyük oranda formaldehit varlığı ile ilişkilidir. Bu eklentiler daha çok 5'-GC dizilerinde meydana gelmekte ve çift iplikli DNA yapısını stabilize etmektedirler (29, 108). Bu DNA eklentilerinin, doksorubisinin topoizomeraz II enziminden bağımsız sitotoksitesine aracılık ettiği bildirilmiştir (34). Adriamisin kaynaklı DNA eklentilerinin adriamisinin klinik dozlarında oluşumu, 2008 yılında Coldwell ve arkadaşları tarafından meme kanseri MCF-7 hücre hattında gösterilmiştir (29).

### ***Adriamisine Bağlı Topoizomeraz II Zehirlenmesi***

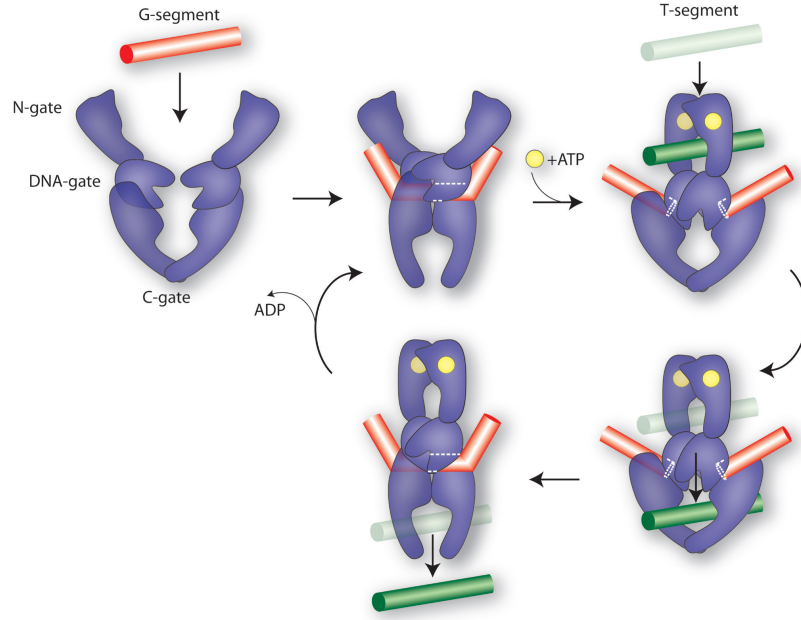
DNA replikasyonu sırasında meydana gelen replikasyon çatalı, çift iplikli DNA boyunca her 10 baz çiftin replikasyonunda bir parental zincirin kendi etrafında bir tam tur dönmesine yol açmaktadır. Bu nedenle, replikasyon çatalının tüm kromozom boyunca ilerleyebilmesi için anormal bir hızla dönmesini gerektirir. Ancak bunun gerçekleşebilmesi için çok büyük bir enerjiye ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, enerji sarfi yerine topoizomeraz adı verilen bir grup enzim devreye girerek DNA heliksinde replikasyon çatalının ilerleyebilmesi için bir "fırdöndü" meydana getirirler.

Ökaryotik topoizomeraz enzimlerinin bir alt grubu olan Topoizomeraz II enzimi, DNA sarmalının her iki dalı ile de aynı anda kovalent bağ kurar ve sarmalda geçici bir çift iplik kırığı oluşturur (Şekil 2.7)(3).

Bir topoizomeraz II enzimi DNA'ya bağlandığında ATP hidrolizinden elde ettiği enerji ile ;

- i. bir DNA boşluğu oluşturmak üzere DNA sarmalını (Şekil 2.7'de G segmenti olarak gösterilmiştir) kırar,

- ii. yakındaki çift iplik segmentini (Şekil 2.7’de T segmenti olarak gösterilmiştir) bu boşluğun içerisinden geçirir,
- iii. kırığı tekrar birleştirir ve DNA’dan ayrılır. (3)



**Şekil 2.7.** Topoizomeraz II etki mekanizması (Collins, T.R.L., Hammes, G.G., Hsieh, T., 2009, Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective, *Nucleic Acids Res.*, 37, 3, 712-20 p.

Omurgalılarda topoizomeraz II enziminin topoizomeraz-IIa (TOP2A) ve topoizomeraz-IIβ (TOP2B) olmak üzere iki farklı alt tipi bulunmaktadır. Aminoasit dizilimleri % 70’in üzerinde benzerlik gösteren bu iki enzim ayrı genler tarafından kodlanmaktadır. Yapısal benzerliklerinin aksine iki alt tipin gen ekspresyon profilleri birbirinden oldukça farklıdır ve farklı görevler yaptıkları düşünülmektedir (73). Topoizomeraz IIA ekspresyonu, G2/M fazında en yüksek seviyeye ulaşmakta ve mitoz sonunda en düşük seviyeye inmektedir (76).

Adriamisin (doksorubisin), Topoizomeraz II düzeylerini arttırarak normalde hücre için gerekli olan bir enzimin toksik etki oluşturmaya aracılık ederler. Bu tip etkiler

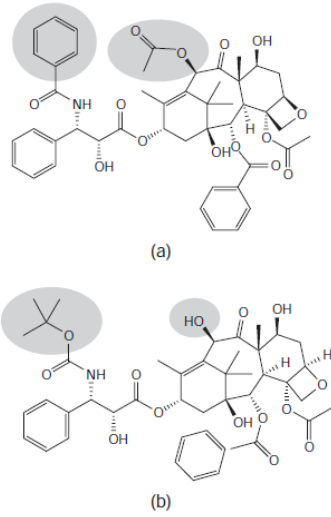
gösterten ajanlara Topoizomeraz II zehirleri de denilmektedir. Adriamycin DNA'ya nonkovalent olarak interkalasyon yapan bir ajandır. Bu interkalasyon sonucunda, adriamisin, topoizomeraz II tarafından DNA'nın kırıldığı ve topoizomeraz II'nin tirozin rezidülerine kovalent olarak bağlandığı reaksiyonu stabilize eder. Adriamisin yapısındaki planar halka sistemi DNA'ya interkalasyonda önemlidir. Daunozamin şekeri, DNA'nın minör oluğunda konumlanır ve antrasiklin-DNA-topoizomeraz II kompleksinin stabilizasyonunda son derece önemli görünmektedir (30, 77). Oluşan kompleks, DNA çift zincir kırıklarının oluşumunu da arttırarak hücre ölümüne neden olmaktadır (86).

### ***Adriamisine Bağlı Serbest Radikal Üretimi***

Adriamisine sitotoksitesinde hem antitümör hem de kardiyovasküler etkiler açısından serbest radikal üretiminin potansiyel rolü karmaşık bir konu olmakla birlikte, kimyasal yapısı itibariyle adriamisinin uygun koşullar altında serbest radikal oluşturduğundan şüphe duyulmamaktadır. Adriamisinin kuinon içeren yapısı, sitokrom P450 redüktaz, NADH dehidrogenaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerce katalizlenen reaksiyonlarda elektron alıcısı olarak davranmasını sağlar. Serbest elektron eklenmesi, kuinonları, semikuinon serbest radikallerine dönüştürür. Semikuinonlar ise, serbest oksijen varlığında süperoksitler, hidroksil radikalleri ve peroksitler gibi moleküllerin oluşumuna neden olurlar. Bu radikaller, hücre zarı ve DNA gibi yapılara zarar verir. Adriamisin ve demirin kompleks oluşturması ile de serbest radikallerin oluştuğu bildirilmiştir (38). Bir çok dokuda, oksidatif hasar, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından en aza indirilmektedir. Kalp ise, hidrojen peroksit detoksifikasyonunu sağlayan katalaz enziminden yoksundur. Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi de adriamisin tarafından inhibe edilebildiğinden, kalp oksidatif savunma mekanizması zayıflamaktadır (33). Adriamisinin pek çok hastada kardiyotoksik yan etkiler meydana getirmesinde bu olayın temel rol oynadığı düşünülmektedir.

### 2.2.5.2. Taksoter (Taxotere, Docetaxel)

Taksoter, Taxoidaceae familyası ağaçlarından elde edilen Taksan grubu (ATC klasifikasyonunda L01CD, 41) ilaçlardandır. Bu grubun ilk keşfedilen üyesi, *Taxus Brevifolia* (pasifik porsuk ağacı) özütlerinden elde edilen Taxol (paclitaxel) dur. Ancak bu ilacın geniş çapta izole edilmesinde yaşanan zorluklar yarı sentetik olarak bu ilacın türevlerini üretme fikrini gündeme getirmiştir. Taksoter (Taxotere, doxorubicin), *Taxus baccata* (Avrupa porsuk ağacı) yapraklarından elde edilen özütün işlenmesi ile elde edilen yarı sentetik bir taksan türevidir (Şekil 2.8) (20).



**Şekil 2.8. Taksol (a) ve taksoter (b) kimyasal yapıları.** (Paz, M.M., Missailidis, S., 2008, Antitumor Antibiotics, in: Missailidis, S., Anticancer Therapeutics, John Wiley and Sons Ltd., U.K., 111-124 p.)

#### 2.2.5.2.1. Taksoterin Etki Mekanizması

Taksoterin hücre içerisindeki hedefi, beta tübülin polimerleridir. Beta tübülinler mikrotübül proteinlerinin bileşenleridir. Mikrotübüller hücre şeklinin korunması, hücre hareketleri, hücre sinyalizasyonu ve hücre bölünmesi gibi olaylarda önemli roller üstlenen iplikçi protein polimerleridir (74).

Mikrotübüller, globüler tübülün proteinlerinden oluşurlar. Tübülün ise birbirine çok benzeyen alfa ve beta tübülün adı verilen polipeptidlerin dimerizasyonu ile meydana gelir. Tübülün dimerlerinin polimerleşmesi ile boru şeklinde bir kor etrafında yapılanmış genellikle 13 doğrusal önflaman içeren mikrotübüller oluşur. Tübülün dimerlerinin baş-kuyruk yönünde dizilmesi ile oluşan önfilamanlar, paralel şekilde bir araya gelmişlerdir. Bu yapılanmanın oluşturduğu mikrotübüllerde sonuçta iki farklı uç, farklı polariteye sahip olur. Hızlı büyüyen uca artı, yavaş büyüyen uca da eksi uç denir (32). Eksi uçlar alfa tubulin ile sonlanırken, artı uçlar beta tubulin ile sonlanmaktadır.

Tübülün dimerleri polimerleştikleri gibi ayrışabilirler ve mikrotübüller hızlı bir yapılanma ve ayrışma döngüsüne girebilirler. Hem alfa hem beta tübülün GTP'ye bağlanır. Alfa alt ünitesinde bağlı GTP değiştirilemez (nonexchangeable) iken, beta alt ünitesindeki GTP hidrolize olabilir. Beta tübülüne bağlı GTP, polimerleşme sırasında veya polimerleşmeden çok kısa süre sonra GDP'ye hidrolize olur. Bu GTP hidrolizi, tübülünün komşu moleküllere bağlanma eğilimini zayıflatır, ayrışmaya yardımcı olur ve mikrotübüllerin dinamik değişkenliğini sağlar. Aktin filamanları gibi, mikrotübüller de yürüme hareketi yapar. Bu hareket, GDP'ye bağlı tübülünlerin eksi uçtan sürekli kaybedilmesi ve aynı mikrotübülün, artı ucuna GTP bağlı tübülün monomerlerinin eklenmesi ile gerçekleşen dinamik bir davranıştır. Mikrotübüllerde GTP hidrolizi, dinamik kararsızlık olarak bilinen, her bir mikrotübülün uzama ve kılma döngüleri arasında gidip gelmesi olarak tanımlanan olay ile sonuçlanır. Bir mikrotübülün uzayacağı ya da kılacağı, kısmen tübülün eklenme oranına karşılık GTP hidroliz oranı ile belirlenir. Yeni GTP-bağlı tübülün molekülleri, GTP hidrolizinden daha hızlı eklendiklerinde mikrotübülün artı ucunda GTP başlığı kalır ve mikrotübül uzamaya devam eder. Bununla birlikte, polimerleşme oranı yavaşsa, mikrotübülün artı ucundaki GTP bağlı tübülün GDP'ye hidroliz olacaktır. Bunun sonucunda da GDP bağlı tübülün ayrışacak, hızla depolimerizasyon sonucu kılma meydana gelecektir (32).

Her alfa ve beta tübülün monomer yapısı, üç temel fonksiyonel domain içerir. Rossman katlantısı adı verilen bir yapıyı oluşturan N terminal domain (1 ve 206.



aminoasitler arası) altı paralel beta plakası (S1-S6) ve altı heliks (H1-H6) içermektedir. Bu bölge, GTP/GDP bağlanmasında görev alır.

Merkezi domain (207-384. aminoasitler arası) dört kompleks beta plakası (S7-S10) ve üç heliksten (H8-H10) oluşur. Bu domain, protofilamentlerin oluşturulmasında alfa ve beta tübülün monomerleri arasında yatay/boylamsal ilişkinin kurulmasını sağlar.

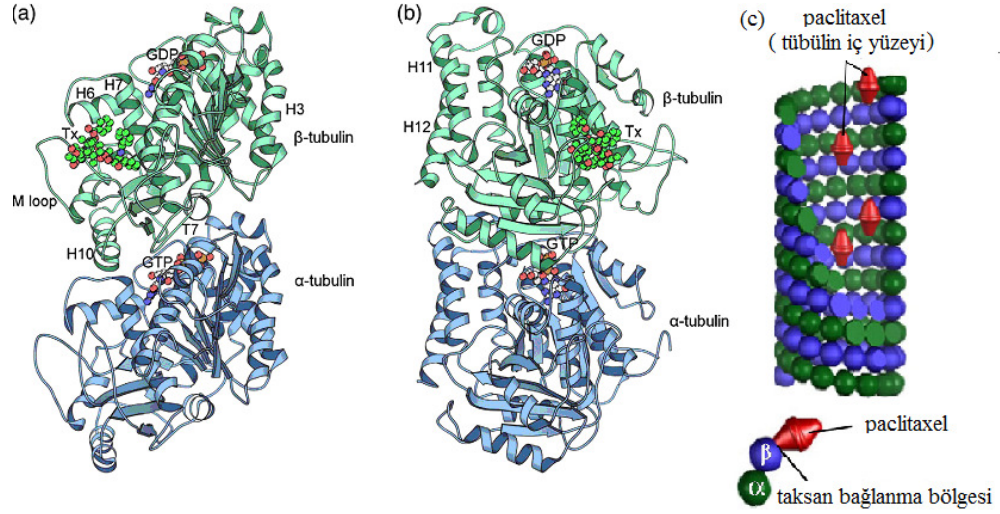
C-terminal bölgesi, 385. aminoasitle başlar ve iki antiparalel heliks (H8-H10) içerir. Bu bölge, mikrotübülle ilişkili proteinler için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır (74).

Çoğu hücredeki mikrotübüller, eksi uçlarından tutundukları sentrozom adı verilen bir mikrotübül organize edici merkez (MTOC) tarafından sıkı bir kontrol altında tutulmaktadır. Sentrozom, interfaz hücrelerinde nükleusa komşu merkezi bir konumda bulunur. Mitoz sırasında mikrotübüller, kromozomların ayrılmasından ve yavru hücrelere dağılımından sorumlu mitotik iğ yapısını oluşturmak üzere kopyalanmış sentrozomlardan dışarıya doğru uzanırlar.

Sentrozom, mikrotübüllerin eksi uçları ile tutundukları bir başlangıç noktası olarak görev yapar. Mikrotübül uzamasının sentrozomdan başlaması, hücre içindeki mikrotübüllerin polaritesi için önemlidir. Genelde, mikrotübüller, artı uçlarına tübülün eklenmesi ile sentrozomdan dışarıya hücre kenarına doğru uzarlar. Sentrozomdaki tübüllerin yapılanmasında gama tübülün adı verilen ve az bulunan diğer bir tübülün proteini tarafından organize edilir. Bölünmeyen hücrelerde mikrotübüller, başka işlevlerde görev almak üzere sentrozomdan ayrılırlar.

Mikrotübül polimerizasyonu iki temel basamakta meydana gelir; nükleasyon ve uzama. Nükleasyon aşamasında, 6-12 alfa-beta tubulin heterodimeri oluşur. Daha sonra GTP bağlı alfa-beta tubulin dimerleri, nükleus yapısına eklenerek uzama sağlanır. Ani bir uzama fazından sonra, herhangi bir polimerizasyonun olmadığı durgunluk fazına

girilir. Uzamadan ani olarak kısalmaya geçiş katastrof (catastrophe) kısalmadan uzamaya geçiş ise reskü (rescue) olarak adlandırılmaktadır (74).



**Şekil 2.9.** Beta tübüline bağlı taksoter (tx) (a ve b). Paclitaxel bağlanma bölgesi McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N., McCann, A., 2008, Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1785, 2, 96-132 p.

Mikrotübüllere taksan bağlanma bölgesi sadece yapılanmış tübülünde bulunur (Şekil 2.9). Taksol (paclitaxel) ve taksoterin bağlandıkları bölge aynıdır, ancak, taksoterin mikrotübüllere afinitesi taksolden daha fazladır. Bu ilaçların bağlanma bölgesi beta tubulinin arayüzündeki hidrofobik bir yarıktır. Taksanlar bu bölgede protein ile hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler kurarlar. Bu bağlanma, tubulinin stabilizasyonuna neden olur.

Moleküler çalışmalarda, taksan bağlanma bölgesinin, beta tubulin proteininin 217 ile 233. aminoasitleri arasında yer aldığı belirlenmiştir (74).

Taksanlar, mikrotübül dinamiklerini tübülünlerin ayrılmasını engelleyerek baskılamaktadırlar. Böylece, metafaz anafaz geçişini engelleyerek mitozu bloklamakta

ve apoptozu indüklemektedirler. Taksoter (dositaksel), sentrozom organizasyonunu bozmaktadır. Böylece hücreler G2-M fazında birikir ve hücre ölümü tetiklenir (74).

### **2.2.5.3. Meme Kanserinde Antrasiklin ve Taksan Kemoterapisine Direnç**

Kanser kemoterapisinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri, tümörün uygulanan ajan/ajan kombinasyonlarına cevap vermemesidir. Kemoterapi, maliyetli yüksek bir tedavidir ve toksik yan etkilere yol açabilmektedir (6). Bu nedenle, hastalığın seyri hakkında bilgi veren prognostik faktörler kadar, tedaviye cevap ile ilgili öngörülse faktörlerin bilinmesinin de önemi büyüktür.

Tümörün uygulanan kemoterapiye cevap vermemesinde rolü olan pek çok faktör belirlenmiştir. Kanserin sistemik kemoterapisinde tedaviye yanıtı etkileyebilecek genel faktörler tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.2).

Metastatik meme kanserinde antrasiklin ve taksandan oluşan kemoterapiye cevap oranı % 30-70 civarındadır (95). Taksan ve antrasiklinlere direnç görüldüğünde, tedavi seçenekleri ciddi ölçüde azalmaktadır. Dirençli ya da refraktör meme kanseri olgularının çoğu tek ajan ya da kombinasyonlar kapsamında kapesitabinle tedavi edilmektedir. Kapesitabinle tedavi edilen hastalarda bildirilen genel cevap oranları % 15-40 arasında olup, hastalığın stabilizasyonu ile ilişkili klinik fayda oranları % 20-45 civarındadır (95). Ancak kapesitabin kullanımında da hastaların bir süre sonra direnç gösterdikleri bildirilmektedir. Antrasiklin ve taksan refrakter meme kanserlerinde gemisitabin ve vinorelbin ile tedaviye yaklaşık % 16-25 oranında cevap alınabilmektedir (95). Tablo 2.3'de, metastatik meme kanserinde tek ajan kemoterapisine cevap oranları gösterilmektedir

**Tablo 2.2.** Kemoterapi direnç faktörleri (Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., Hortobagyi, G.N., 2007, Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patient with Breast Cancer, in; Yu, D., Hung, M., eds., Breast Cancer Chemosensitivity, Springer Science + Business Media, LLC, Landes Bioscience, 1-16 p.

<b>Hücresel ve biyokimyasal mekanizmalar</b>
<p>Azalmış ilaç birikimi</p> <ul style="list-style-type: none"><li>İlacın içeri alınımının (influx) azalması</li><li>İlacın dışarı verilmesinin (efflux) artışı</li><li>Hücre içi ilaç trafiğinde bozukluklar</li></ul> <p>İlacın toksik aracısının ya da ilacın kendisinin inaktivasyonunun artışı</p> <p>İlaç indüklü hasara toleransın ya da hasar onarımının artışı</p> <p>İlaç aktivasyonunun azalması</p> <p>Hedef moleküllerde nicel ve nitel bozukluk</p> <p>Ko-faktör ya da metabolit düzeylerinde bozulma</p> <p>Sitotoksisitenin alt yolak efektörlerinde bozulma</p> <p>İlacın hasarına apoptotik yanıt ve/veya sinyalizasyon yolağında bozukluk</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Gen ekspresyon bozuklukları</li><li>Transkripsiyon, posttranskripsiyon ya da translasyon bozuklukları</li><li>Makromolekül stabilite bozuklukları</li></ul>
<b>In vivo mekanizmalar</b>
<p>Farmakolojik ve anatomik ilaç bariyerleri</p> <p>Konakçı-ilaç etkileşimleri</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Normal dokular tarafından ilaç inaktivasyonunun artışı</li><li>Normal dokular tarafından ilacın aktivasyonunun azalması</li><li>Normal dokunun ilaç hassasiyetinin artması (toksikite)</li></ul>

**Tablo 2. 3.** Metastatik meme kanserlerinde tek ajan terapisine cevap oranları (Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., Hortobagyi, G.N., 2007, Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patient with Breast Cancer, in; Yu, D., Hung, M., eds., Breast Cancer Chemosensitivity, Springer Science + Business Media, LLC, Landes Bioscience, 1-16 p.

Ajan	Cevap oranı(%)
Capecitabine	20 - 36
Docetaxel	18 - 68
Doxorubicin	25 - 40
Gemcitabine	14 - 37
Paclitaxel	17 - 54
Vinorelbine	25 - 47
Tamoxifen	21 - 41
Aromatase inhibitors	10 - 20
Trastuzumab	12 - 34

Antrasiklin içeren kemoterapi rejimlerine hassasiyet ile ilişkilendirilen faktörler olarak Topoizomeraz II $\alpha$  (TOP2A) ve HER2 aşırı ekspresyonu üzerinde durulmuş, ancak çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (5, 36, 113). HER2 ve TOP2A genleri 17. kromozomda birbirlerine çok yakın konumlanmışlardır. Antrasiklin kemoterapisine cevap ile HER2 ve/veya TOP2A aşırı ekspresyonu arasındaki ilişkiyi bildiren çalışmalar, HER2, TOP2A ve 17. kromozom duplikasyonlarını kapsayan birbiri ile çelişkili sonuçları barındırmaktadır (15, 57, 82).

Hem primer (intrinsic) hem sekonder (kazanılmış) ilaç direnci taksanların kullanımında karşılaşılan problemlerdir. Beta tubulin mutasyonlarının taksan direnci ile ilgili olabileceğini bildiren çalışmalar olsa da, klinik olarak bu ilişkiyi doğrulayacak yeterli veri elde edilememiştir (74). Ayrıca beta tubulin mutasyonları klinikte nadir görülmektedir (91). Beta III ve beta I tübülün düzeyleri düşük olan meme kanserlerinin taksotere yanıtının daha iyi olduğu bildirilmiştir. Mikrotübülle ilişkili protein taunun düşük ekspresyonu ile paklitaksele daha iyi cevap arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (80). HER2 amplifikasyonu, dositaksele iyi yanıt ile ilişkilendirilmişse de, bu konuda yapılan çalışmalarda birbiri ile çelişkili sonuçlar bildirilmektedir (80).

Tümörün, etki mekanizmaları ve yapıları farklı birden fazla ajana direnç göstermesi çoklu ajan direnci (Multi Drug Resistance, MDR) olarak ifade edilmektedir. MDR1 geni tarafından kodlanan bir ilaç transport proteini olan P- glikoprotein, antrasiklinler, taksanlar, vinka alkaloidler, epipodofilotoksinler ve anti folatlar gibi bir çok kemoterapötik ajanı hücre dışarısına pompalamaktadır (95). Meme kanserinde P-glioprotein aşırı ekspresyonu ve antrasiklin/taksan direnci arasında ilişki bildiren çalışmalar yapılmışsa da sonuçlar çelişkilidir (80,95).

#### **2.2.5.3.1. Kemoterapi Direnci İle İlişkilendirilmiş Hücresel Elemanlar ve Yolaklar**

Kemoterapötik ajanların çoğu farklı moleküler hedefler ile etkileşime girerek sitotoksik etki gösterirler. Primer hedeflerdeki bu değişkenliğe rağmen, bu ajanların toksik etkilerine verilen hücresel yanıtlar büyük ölçüde ortak olup genellikle programlanmış hücre ölümü ile ilgili yolaklar üzerinden meydana gelmektedir. Hücre sağ kalımını kontrol eden yolaklar bir çok noktada apoptotik yolaklar iç içe geçerler ve bu yolaklarda rol alan moleküllerin pek çoğu kanserde kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmiştir (25,40).

#### ***P53 ve İlaç Etkinliği***

P53, hücresel strese yanıtın önemli modülatörlerinden biridir. DNA hasarı, hücre bağlantılarının kaybı, onkogen aktivasyonu gibi olaylar p53'ü aktive eder. P53 normalde ömrü kısa olan bir proteindir. Posttranslasyonel modifikasyonla aktive olan p53 stabilizasyonu ve dolayısı ile birlikte işlev gördüğü proteinlerle ve DNA ile etkileşimi artar. P21 ve benzeri pek çok genin aktivasyonu aracılığıyla hücre siklusunu durdurur ve hata onarımına zaman tanır. Ancak eğer hasar onarılamayacak boyutta ise, p53 bu defa Bax, Fas ve PUMA gibi apoptoz indükleyicilerinin ekspresyonunu uyarır. P53 tümör baskılayıcı geninin mutasyonlarına kanserde sık rastlanılmaktadır. P53 fonksiyon kaybı ile antikanser ajanlara direnç arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok

araştırma yapılmıştır. Örneğin, kolorektal kanserlerde 5-florourasil (5-FU) terapisine direnç ile p53 mutasyonları arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Ancak p53 mutasyonlarının ilaç direnci ile ilişkisini genelleyebilecek tutarlı sonuçlara ulaşamamıştır. Meme kanserlerinde de p53 statüsü ve kemoterapiye cevap arasındaki ilişki üzerinde tam bir görüş birliği yoktur (40, 104).

### ***Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) Ailesi***

Dimerik transkripsiyon faktörlerinin nükleer faktör kappa B ailesi, Rel domaini adı verilen N-terminal bir DNA bağlama/dimerizasyon domaini içeren transkripsiyon faktörlerinden oluşur. İnsan NF-κB ailesi, Rel proteinlerini (RelA(p65), RelB ve c-Rel), NF-κB proteinleri p50/p105 (NF-κB1), p52/100 (NF-κB2)'yi içermektedir. NF-κB ailesi üyeleri, normal şartlar altında, sitoplazmada, inhibitör proteinler olan IκBα veya IκBβ ile ilişkili olarak inaktif halde tutulurlar. İlgili sinyal alındığında inhibitör proteinler olan IκB'ler fosforile olur ve proteazomlar tarafından parçalanmaya açık hale gelirler. İnhibitörden kurtulan NF-κB serbest kalır ve nükleusa yönelip, aralarında apoptotik genlerin de olduğu hedeflerini aktive eder (35).

NF-κB transkripsiyon faktörleri, tümör anjiyogenezi, proliferasyon, inflamasyon, metastaz, farklılaşma ve sağkalım gibi olaylarda önemli roller oynarlar (35). Meme tümörleri ve meme kanseri hücre hatlarında, NF-κB konstitütif aktivasyonunun önemine ilişkin bildiriler artmaktadır. (31, 63). Nf-κB aktivasyonunun kanser kemoterapisine direnç ile ilişkili pek çok faktör ile etkileştiği bilinmektedir (63).

### ***AKT***

PKB olarak da bilinen protein kinaz AKT, büyüme faktör sinyalizasyonunda son derece önemli bir rol oynar ve konstitütif aktivasyonu halinde, büyüme faktörlerinden bağımsız olarak büyüme/bölünmeye yol açan bir onkogen haline gelebilir. Adımı ilk

defa keşfedildiği AKT8 virüsünden almıştır. İnsanlarda üç tip AKT bulunur ve üçünün de düzenlenmesinde fosfatidil-3,4,5-trifosfat (PIP3) ikincil habercisi görev yapmaktadır.

AKT, apoptozu indüklemek için bazı substratları fosforile eder. Bad ve Fas gibi bazı pro-apoptotik düzenleyicileri uyarma yeteneğine sahip forkhead (FOXO) ailesi transkripsiyon faktörlerini fosforilasyonla inaktive edebilir. Kaspaz 9'u fosforile edip fonksiyon yapmasını engelleyerek ya da inhibitör  $\kappa$ B'leri inaktive ederek, apoptozun NF- $\kappa$ B aracılığıyla baskılanmasına yol açabilir. Bir kaspaz inhibitörü olan XIAP AKT tarafından fosforile ve stabilize edilebilmektedir. Mitokondri aracılı hücre ölümü için gereken Bax'ın mitokondri dış zarına yerleşmesi süreci de, Akt tarafından Bax'ın fosforilasyonla inhibe edilmesi sonucu aksatılabilmektedir. AKT, MDM2'yi fosforilasyonla aktive etmektedir (35).

Pek çok kanserde Akt aktivasyonu bildirilmiştir. Akt aktivasyonuna neden olan Ser473 fosforilasyonunun da meme kanseri dahil bazı kanserlerde kötü prognostik belirteç olduğu belirlenmiştir. In vitro ve in vivo çalışmalarda Akt inhibüsyonunun hücreleri kemo ve radyoterapiye daha hassas hale getirdiği görülmüştür. Tüm bu bulgular Akt'yi ilaç araştırmalarında sıklıkla hedeflenen bir faktör haline getirmiştir (68).

### **STAT3**

STAT'lar (Signal Transducers and Activators of Transcription), sitoplazmada bulunan ve yalnızca aktive olduklarında nükleusa taşınan transkripsiyon faktörleridir.

Janus kinazlar (JAKlar) adı verilen sitoplazmik tirozin kinazlar (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2), sitokin reseptörleri ile stabil olarak ilişkilidirler. Sitokinlerin sitokin reseptörüne bağlanması, JAK-sitokin reseptörü bağlantısında değişikliğe neden olur ve iki JAK, birbirini transfosforile edecek kadar yakınlaşırlar. JAK'lar aktive olduktan



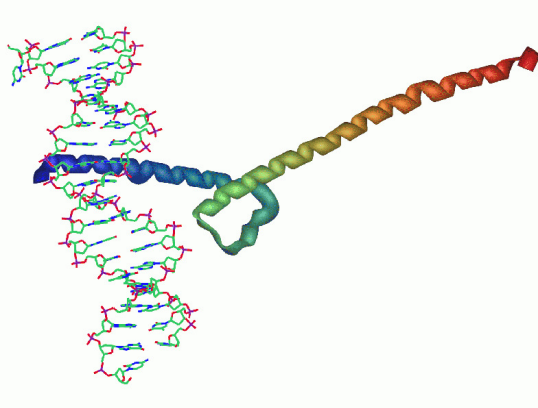
sonra sitokin reseptörünü fosforile eder ve sitokin reseptörü üzerinde STAT'lar için bir yerleşim bölgesi oluşur (3).

Tüm STAT'lar, yapılarında bulunan SH2 domaini sayesinde JAK'lar dışında, aktif reseptör tirozin kinazların fosfotirozin rezidüleri ile de etkileşime girebilirler (3).

Akciğer, meme ve beyin tümörleri ile myeloma ve lenfoma da STAT3 aşırı ekspresyonu gözlemlenmiştir. STAT3 konstitütif aktivasyonunun melanoma hücre hattı U266'da apoptoza, meme kanseri hücrelerinde kemoterapi direncine, küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde cisplatin direncine neden olduğu bildirilmiştir (63).

### 2.3. TWIST (Twist1, Bhlha38) Transkripsiyon Faktörü

Twist transkripsiyon faktörü, bazik heliks-lup-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. bHLH domaini, iki amfipatik alfa heliks ile bunları birbirine bağlayan uzunluğu değişken bir lup kısmından oluşmaktadır. Alfa heliks yapılarından birinin ucunda kısa bir dizi bazik aminoasit yer alır. Bu domaini içeren transkripsiyon faktörleri, gelişimle ilgili pek çok olayda önemli görevler üstlenirler (72,111).



Şekil 2.10. DNA'ya bağlı halde twist. (Vesuna, F., Raman V., 2010, <http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=1030> )

bHLH yapısındaki alfa heliksler, diğer bHLH proteinler ile etkileşimi sağlar. Bazik kısım E kutusu adı verilen DNA bölgelerine (CANNTG) bağlanmaya aracılık eder (111).

Bazik heliks lup heliks transkripsiyon faktörleri 3 temel grupta incelenmektedirler. Bunlardan ilki A sınıfı bHLH'lerdir. E proteinleri olarak da anılırlar ve bir çok dokuda geniş çapta eksprese edilirler. B sınıfı bHLH'ler doku spesifik transkripsiyon faktörlerini içerir. Twist transkripsiyon faktörü de bu alt grubun üyesidir. Üçüncü bir sınıf olan negatif regülatörler ise, bazik kısımdan yoksun proteinler olan Id proteinleridir. Bu proteinler bazik domainleri olmadığı için DNA'ya bağlanamaz, bu nedenle E proteinlerinin fonksiyonel transkripsiyonel kompleksler oluşturmalarına engel olurlar.

bHLH transkripsiyon faktörleri ailesinin dokuya spesifik transkribe olan alt sınıfının bir üyesi olan Twist (Twist1) proteini, etkisini, E kutusu elemanlarına bağlanmak üzere dimerler oluşturarak gerçekleştirir.

Twist proteinini kodlayan Twist1 geni, 7p21 de lokalizedir. 202 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır. İki ekzondan oluşan genin ikinci ekzonu tamamen UTR bölgesinden oluşmuştur. Twist gen promotor bölgesinde iki aday TATA kutusu bölgesi bulunmasına rağmen, sadece proksimal olanın aktif olduğu bildirilmiştir (50, 114).

### **2.3.1. Twist Transkripsiyon Faktörünün Gelişimsel Rolü**

Twist transkripsiyon faktörü, ilk defa Drosophila'da erken embryo gelişiminde gastrulasyon kusurları araştırılırken saptanmıştır (109). Mutant twist Drosophila'da dorso-ventral şekillenme kusurlarına neden olmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarda da, Twist'in bir mezodermal belirleyici faktör olarak pek çok gelişim basamağında önemli roller oynadığı belirlenmiştir (12, 13, 23).

Omurgalılarda Twist, genel olarak nöral krest göçü sırasında epitelyal mezenkimal dönüşümün düzenlenmesi mezoderm determinasyonunun, miyogenezin, morfogenezin düzenlenmesinde rol oynar (8, 43, 46).

İnsanlarda Twist transkripsiyon faktörü mutasyonları, Saethre-Chotzen Sendromu adı verilen otozomal dominant bir kraniyosinoztozis sendromuna yol açmaktadır (50). Sendrom, unilateral ya da bilateral olabilen koronal synostozis (koronal: vücudun dikey olarak baştan ayağa omuzlar ile paralel şekilde konumlanması, synostosis: kemiklerin bağlayıcı doku osifikasyonu ile kaynaşması), yüz asimetrisi, pitozis, kulaklarda karakteristik görünüm (büyük bir krus ve küçük kulak kepçesi) gibi özellikler ile karakterizedir. Sendromda elin iki ya da üç parmağının sindaktilisi de değişen oranlarda görülebilmektedir. Twist1 geni sendromla ilişkilendirilebilmiş tek genidir. Saethre-Chotzen Sendromlu hastaların %46-80'inde delesyon/duplikasyon ve sekans analizleri ile Twist1 mutasyonları saptanmıştır. Nadiren olgularda 7p21'i kapsayan translokasyonlar ya da kromozom 7 ringleri görülebilmektedir (49).

Twist transkripsiyonu aktive edebileceği gibi, histondeasetilazları yönlendirerek ya da asetiltransferazları inhibe ederek transkripsiyonu baskılayıcı roller oynayabilir (42).

Northern blot ile pek çok dokuda yapılan analizler sonucunda, TWIST1 ekspresyonunun, plasenta, kalp ve iskelet kasları gibi mezoderm-kökenli dokulara, özellikle de prekürsör hücrelere sınırlı olduğu saptanmıştır (114). Son dönemlerde proteinin kahverengi yağ dokusunda da eksprese olduğu ve adaptif termogenez (metabolize olan yağın ısı kaynağı olarak kullanıldığı işlem) sürecinde önemli rolü olduğu saptanmıştır (85).

Twist'e yapısal olarak çok benzeyen Dermo1 (Twist2)'in ise, kemik gelişimi sırasında osteoblast olgunlaşmasını inhibe ederek hücreleri preosteoblast fenotipinde tuttuğu düşünülmektedir (39).

### 2.3.2. Epitelyal Mezenkimal Değişim ve Twist

Epitelyal Mezenkimal Değişim (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT), bazal yüzeyi ile bazal membrana tutunmuş haldeki polarize epitel hücrenin göç etme kapasitesinde artış, invazivlik, apoptoz direncinde artış, ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretiminde artış gibi mezenkimal hücre fenotipi olarak kabul edilen biyokimyasal özellikleri kazanmasına olanak sağlayan biyolojik bir süreçtir (55). Bazal membranın degradasyonu ve köken aldığı epitelyal tabakadan uzağa göç edebilecek mezenkimal hücrenin oluşumu EMT sürecinin tamamlanmasının işaretidir (56).

EMT sırasında transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, spesifik hücre yüzey proteinlerinin ekspresyonu, iskelet proteinlerinin ekspresyonu ve yeniden düzenlenmesi, ekstraselüler matriksi degrade eden enzimlerin sentezi ve spesifik mikro RNA'ların sentezi gibi bir takım olaylar meydana gelir. Bir çok durumda, bu süreçte rol alan faktörler, hücrelerin EMT'ye geçişinin belirteci olarak değerlendirilmektedir (56).

Epitelyal mezenkimal değişim ilk kez keşfedildiğinde, süreci tanımlamak üzere “dönüşüm” (transformation) kelimesi kullanılmış (45), ancak daha sonra hücrelerde meydana gelen değişimlerin geri dönüşümlü olduğu anlaşılacak şekilde “dönüşüm” yerine “değişim” (transition) kelimesinin kullanılmasının daha uygun olduğuna karar verilmiştir (55). EMT değişikliklerine uğrayan hücreler daha sonra tekrar eski epitelyal fenotiplerine dönüşebilmektedirler ve bu sürece de Mezenkimal Epitelyal Değişim (MET) adı verilmektedir. MET hakkında henüz çok şey bilinmemektedir. En iyi bilinen örneği, böbrek oluşumu sırasında hücrelerin geçirdikleri değişikliklerdir.

EMT'in organizmadaki fizyolojik rolü hakkında yapılan araştırmalar, bu sürecin üç farklı fonksiyonel sonuçla ilişkisi olduğunu göstermiştir :

- i. tip 1 EMT; implantasyon, embryo oluşumu ve organ gelişiminde rol alan gelişimsel EMT

- ii. tip 2 EMT; yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve fibrözde rol alan EMT
- iii. tip 3 EMT; neoplastik hücrelerde meydana gelen EMT

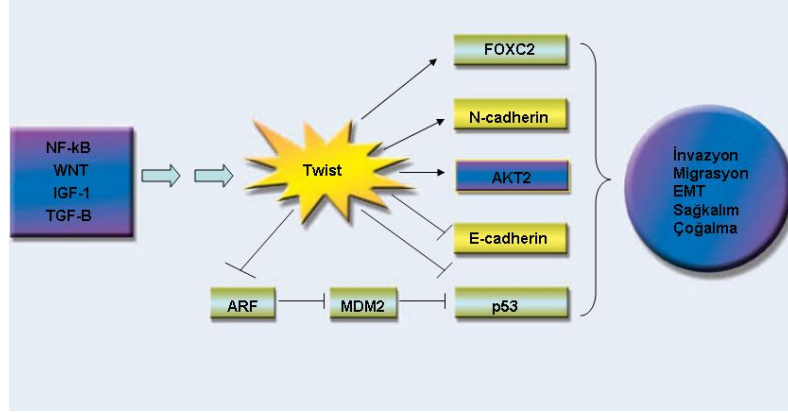
EMT sürecinin temel elemanları ve oluş şekline, bu üç temel olaya spesifik farklılıklar henüz bilinmemektedir. Bu üç farklı sınıftaki EMT, farklı biyolojik süreçler sergiliyorsa da, genetik ve biyokimyasal elemanlarda büyük oranda ortaklık söz konusudur (56).

Hücre-hücre asosiasyonlarında önemli role sahip protein ailelerinden biri olan E-kaderinler, epitelyal hücre adezyonunda görev yapar. CDH1 geni tarafından kodlanan e-kaderin ekspresyonu, epitelyal mezenkimal dönüşüm sırasında transkripsiyon faktörleri tarafından inhibe edilmektedir. Twist transkripsiyon faktörü, e-kaderin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür (3).

### **2.3.3. Twist Transkripsiyon Faktörü Ve Kanser**

Önceleri gelişimsel rolleri ile tanınan TWIST transkripsiyon faktörü, son dönemlerde kanserleşme mekanizmalarında da üzerinde durulan bir transkripsiyon faktörü haline gelmiştir (8).

Twistin potansiyel onkogenik özellikleri arasında; bir çok kanser tipinde aşırı eksprese olması, antiapoptotik rol oynaması, ilaç direncinde anjiyogenezde EMT'de ve invazyonda rol alması sayılabilir (28).



**Şekil. 2.11.** Twistin etkileştiği yollar (Cheng, G.Z., Zhang, W., Wang, L.H, 2008, Regulation of Cancer Cell Survival, Migration, and Invasion by Twist: Akt2 Comes to Interplay, Cancer Res., 68, 4, 957-960 p.)

Twist transkripsiyon faktörünün, c-myc indüklü apoptozu, ARF/MDM2/P53 yolağını baskılayarak düzenlediği bildirilmiştir. Twist, p53 aktivasyonunu, hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel olarak inhibe edebilmektedir (70, 101, 105, 112) (Şekil 2.11.).

Twistin EMT düzenlenmesindeki rolü ile ilişkili olarak, tümör hücrelerinin primer odaktan ayrılıp metastatik sürece katkı sağladığına ilişkin ilk bulgular, lobüler meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir (119). Araştırmalar, twist transkripsiyon faktörünün meme kanseri hücrelerinde kromozomal instabiliteyi arttırdığını gösteren bir çalışmada, Twist aşırı eksprese eden hücrelerde VEGF ekspresyonunun da arttığı bildirilmiştir (78). Twist transkripsiyon faktörünün meme kanseri hücre hatlarında micro RNA-10b aracılığıyla metastatik süreçlere katkı sağladığı bildirilmiştir (69).

Twist transkripsiyon faktörü ekspresyonu ile çeşitli kemoterapötik ajanlara direnç arasında ilişki bildiren bazı çalışmalar vardır (27, 54, 87, 115).

Tüm bu bulgular, twist transkripsiyon faktörününün hem kanserleşme hem de tedavi süreçlerinde araştırılmaya değer bir markır olduğunu göstermektedir.

#### 2.4. In Vitro Kemosensitivite Testleri

Kemosensitivite testleri, antikanser ajanların hücreler üzerinde sitotoksik ve/veya sitostatik ya da apoptozu indükleyici etkilerinin belirlenmesine olanak sağlayan ex vivo yöntemlerdir (16).

Doğal ürünlerden elde edilen özütlerin ya da bileşiklerin ve sentetik olarak üretilen potansiyel antikanser ilaçların etkilerinin belirlenmesi ve geliştirilerek klinik kullanıma hazır hale gelmesi çok basamaklı bir süreçtir. Bu maddelerin önce hücre kültürlerinde in vitro antikanser etkileri belirlenir, daha sonra uygun hayvan modelleri ile in vivo etkileri ortaya koyulur. Bu süreçler sonunda söz konusu madde etkili bulunursa, ilacın klinik denemelerine başlanabilmektedir. Bu, prospektif randomize çalışmalar aracılığıyla, belli bir kanser için ortalama sayıdaki hastaya uygulanabilecek en iyi tek tedavi stratejisinin belirlenmesini amaçlar Ancak, yapılan araştırmalarda, benzer histolojik tümörlere sahip bireylerde bile tedavi rejimlerine cevap farklılıkları olabildiği görülmüştür. Bireysel olarak hastaya en uygun tedavi rejiminin belirlenmesi bu nedenle önemli bir unsur haline gelmiştir (16).

Kemosensitivite testleri, tümör hücrelerinin hangi ilaç ya da ilaç kombinasyonlarına daha iyi cevap verdiği belirlenmesinde ve tedavinin bireyselleştirilmesinde kullanabilecek potansiyele sahip görünmektedir. Solid tümörler ve lösemilerde yapılan pek çok retrospektif ve prospektif çalışma ilaç direnç/hassasiyetinin in vitro yöntemlerle belirlenebileceğini göstermiştir (16).

In vitro kemosensitivitenin belirlenmesinde klonojenik ya da nonklonojenik yöntemler kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları olduğu gibi, bu yöntemlerin pratikte kullanılmasını zorlaştıran ortak bazı problemler de vardır. In vivo ilaç özelliklerini etkileyen farmakokinetik ve farmakodinamik değişkenler bu yöntemlerde devreye girmemektedir.

Klonojenik yöntemler bakterilerde kullanılan antibiyotik duyarlılık testlerine benzer testlerdir. Soft agar ile kaplanmış petri kapları üzerinde ilaçla muamele edilmiş ya da edilmemiş tümör hücreleri çoğaltılır ve yaklaşık 2-3 hafta sonunda oluşan koloniler sayılır. Agar, fibroblastların büyümesini engelleyip seçici olarak tümör hücrelerinin üremesini sağlar. Kullanılan ajanın sitotoksitesine bağlı olarak oluşan koloni sayısında azalma meydana gelmektedir. Klonojenik genellikle uzun zaman gerektirmekte, hücrelerin süspansiyonda tek tek ayrılmasında zorluklarla karşılaşılabilir (16).

Nonklonojenik yöntemler içerisinde, hücrelerde bulunan ATP'nin luminometrik (ışık şekline dönüştürülerek) olarak ölçüldüğü Adenozin Trifosfat Tümör Kemosenitivite Testi (ATP-TCA), canlı ve ölü hücrelerin farklı boyanmasına dayanan Diferansiyel Boyama Toksikite Testi (DiSC), tetrazolium tipi indikatör boyaların hücre zarlarından geçişi ve glikolitik aktiviteler sonucunda indirgenmesi sonrasında renk değişimine dayanan MTT gibi testler yer almaktadır.

#### **2.4.1. Adenozin Trifosfat Tümör Kemosenitivite Testi (ATP-TCA)**

Canlı hücrelerde evrensel enerji kaynağı ATP'dir. Hücreler ölümcül hasara maruz kaldıklarında, hücre içi adenozin trifosforaz enzimlerinin hidrolitik aktivitesi nedeniyle saniyeler içerisinde ATP sifıra düşer. Dolayısı ile ATP, hücre canlılığın önemli bir indikatörüdür (64).

ATP-TCA testinde hücrelerdeki ATP, luminometrik olarak ölçülür ve canlı hücre miktarı belirlenmeye çalışılır. ATP'nin luminometrik olarak ölçülmesinde lusiferin-lusiferaz reaksiyonlarından faydalanılır. Lusifer kelimesi, Latince de "ışık getiren" anlamına gelmektedir. Pek çok canlı türü ışık üretebilme yeteneğine sahiptir. Ateş böcekleri ışık üretebilen canlıların tipik örnekleridir (71). Lusiferin, enzimatik olarak oksilusiferin ve ışık şeklinde enerji üretebilen bir küçük molekül sınıfıdır. Lusiferin moleküllerinden ışık üretimini, lusiferaz adlı enzim katalizlemektedir. Lusiferin ve lusiferaz ateş böceği türlerinden izole edilebilmektedirler. Lusiferin-



lusiferaz reaksiyonları, yüksek hassasiyetleri dolayısıyla, hücrese ATP miktarını tam olarak belirleyebilmektedirler. Yapılan çalışmalarda hücrese ATP ve lusiferin-lusiferaz reaksiyonu ile oluşan ışık miktarının çok geniş bir konsantrasyon aralığında lineer ilişki gösterdiği belirlenmiştir.

1980'lerin başında biyoluminesans temelli yöntemler yardımıyla mikroorganizmaların test edilmesine ilişkin çalışmalar daha sonra preterapötik kemosenitivite testlerinde kullanılmak üzere onkolojiye uyarlanmıştır. Geliştirilen yöntemler, sırasıyla, ATP Bağımlı Hücre Viabilite Testi (ATP-CVA), Serumsuz ATP Testi (SF-ATPA) ve ATP Tümör Kemosenitivite testi (ATP-TCA) olmuştur. Tümör hücrelerinin selektif büyümesini, ATP-CVA yönteminde adherent olmayan kültür plakları, SF-ATPA yönteminde ise selektif kültür ortamı sağlamaktadır. ATP-TCA testi bu iki prensibi bir arada barındırmaktadır (64).

ATP-TCA testi, meme, ovaryum, kolorektal, pankreas ve cilt kanserleri gibi pek çok kanser türünde araştırılmıştır. Hastaların klinik sonuçları ve ATP-TCA test bulgularının karşılaştırıldığı çalışmalarda, tümörlerin çoğunda testin prediktif yeterliliğinin % 90'ın üzerinde olduğu saptanmıştır. Negatif prediktif değer % 100, pozitif prediktif değeri ise % 85-95 olarak bildirilmektedir (64).

ATP-TCA testi için tümörlerden alınan örnekler enzimatik yolla hücrelerine ayrılır. Elde edilen hücreler altı-yedi gün boyunca istenen ilaç/ilaç kombinasyonları ile kültür edilir. Kültür süresi sonunda canlı hücre miktarı, luminometre adı verilen cihazlar yardımıyla, lusiferin-lusiferaz reaksiyonuna tabi tutularak belirlenir. Hücre sayısı ne kadar çoksa, hücrelerin ilaca verdiği yanıt o kadar azdır.

## **2.5. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time- RT PCR) İle Gen Ekspresyon Analizi**

Hücre yapı ve işlevlerinin temel elemanları olan proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri incelemek için mesajcı RNA düzeylerinin gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time RT-PCR) ile kantifikasyonu ve profillenmesi moleküler biyoloji çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalara duyulan ihtiyaç, yöntemin kimyasal ve teknik araçlarının hızla gelişimine neden olmuştur (75). Real time RT-PCR'ın temel prensibi, konvansiyonel PCR'a çok benzer. İzole edilen RNA, ters transkriptaz enzimleri ile cDNA'ya çevrilir ve kantifiye edilir. Real time RT-PCR'da normal PCR'ın aksine, amplicon birikimi, floresan bir boya yardımıyla her siklusun sonunda belirlenir (PCR).. Bu yöntem için kullanılan thermal döngüleyici araçlar, kullanılan floresan boyayı ışık dalga boyuna göre algılayabilecek donanıma sahip sistemlerdir.

### **2.5.1. Real Time PCR**

Real Time PCR ile DNA ya da RNA'nın kantifikasyonunda her PCR döngüsü sonunda PCR ürününün miktarı arttıkça oransal olarak başlangıçta düşük olan floresan sinyal de artış gösterecektir.

#### **2.5.1.1. SYBR® Green**

SYBR® Green I, tıpkı konvansiyonel jel elektroforezinde kullanılan etidyum bromid gibi, çift dallı DNA iplikleri arasına giren bir boyadır. SYBR® Gren I solüsyonda serbest halde iken ışımaya miktarı çok düşüktür. Çift dallı DNA oluşmaya

başladıkça, SYBR<sup>®</sup> Green I, DNA'nın minör oluşuna bağlanır ve oluşan boya-DNA kompleksinde floresan ışımaya miktarı artar. Bu yöntemin boya dışında sadece bir çift primer gerektirmesi (herhangi bir prob kullanımı gerekmekte), ucuz olması ve primer dizisine bağlı olarak farklı gen bölgeleri için kullanılabilir olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak yöntemde kullanılan boyanın belli bir bölgeye spesifik olmaması beraberinde bazı problemler getirmektedir. Oluşan non spesifik çift dallı PCR ürünleri, primer dimerleri de boyayı bağladıklarından sonuçlar etkilenebilmektedir. Kullanılan primerlerin çok spesifik olarak dizayn edilmesi gerekir.

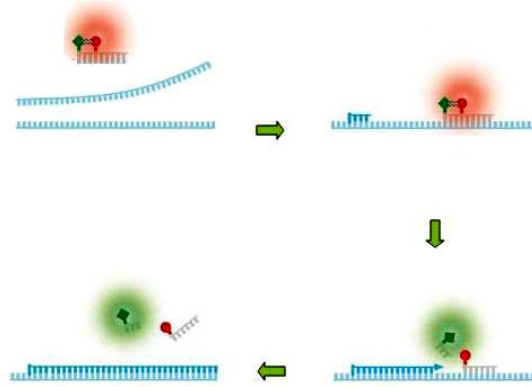
### **2.5.1.2. Floresan Problar**

DNA dizisine spesifik problarda iki temel boya bulunur; floresan boya ve keunçer (söndürücü) boya. Bir floresan boyada, ekzitasyon nedeniyle oluşacak olan ışık söndürücü boyaya yakın konumlandığında soğurur. Ancak PCR amplifikasyonu ile, floresan boya ve söndürücü birbirinden uzaklaşır ve floresan sinyal oluşur (PCR). Floresan işaretli bir boyanın enerjisinin, yakın konumlu diğer bir moleküle aktarılması prensibine floresan rezonans enerji transferi (FRET) adı verilir (75).

#### **2.5.1.2.1. TaqMan<sup>®</sup> ve Diğer Hidroliz Problemleri**

TaqMan ve diğer hidroliz problemlerinde Taq Polimeraz enziminin 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinden faydalanılır. 5' ucunda FAM gibi bir floresan raportör boya, 3' ucunda ise TAMRA gibi bir keunçer (söndürücü) içeren standart problemlerdir. TaqMan probu intakt haldeyken, gerek solüsyonda serbest gerekse hedef DNA'ya hibridize olmuş olsun, üzerindeki floresan boyanın verdiği ışımaya, keunçer tarafından söndürülür. Bu söndürmeyi sağlayan, söndürücü ile floresan boyanın yakın konumlu olmasıdır.

Reaksiyon ilerledikçe, Taq polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi, probdan 5'FAM boyasının probdan ayrılmasını ve söndürücüden uzaklaşmasını sağlayacak, bu da floresan sinyalde artış olarak sonuçlanacaktır (Şekil 2.12) (37, 75).



**Şekil 2. 12.** Hidroliz probleminin çalışma prensibi. (Roche, Light Cycler 480, Instrument Operator's Manual, V1.5.)

#### 2.5.1.2.2. Moleküler Beacon Problemleri

TaqMan problemlerine çok benzer. Ancak bu problemlerde iki farklı kısım vardır; hedef DNA'ya spesifik olarak bağlanan asıl prob kısmı ve prob solüsyonda serbest iken floresan boya ve söndürücüyü birbirine yakın tutmak için bulunan saç tokasına benzer yapıda kök kısmı. Prob, hedefe hibridize olduğunda saç tokası yapısı açılır ve floresan sinyal meydana gelir ( 37, 75).

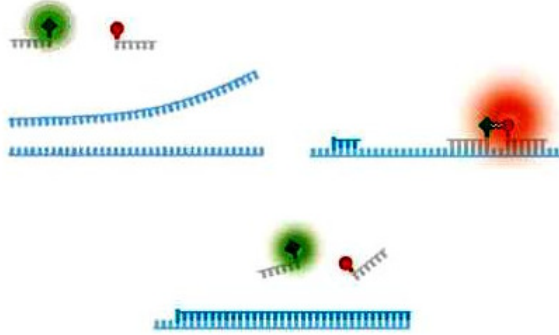
#### 2.5.1.2.3. Akrep Problemleri

Akrep problemler, moleküler Beacon problemlere benzer. Floresan sinyalin solüsyonda serbest haldeki probda söndürülmesini sağlayan bir saç tokası yapısı bardındırırlar.

Ancak ek olarak bu problemler, bi-fonksiyonel problemlerdir. Problem dizisine kovalent olarak eklenmiş primer dizisi, problemin aynı zamanda primer gibi işlev görmesini sağlar. PCR'ın primer hibridizasyonu ve uzama aşamalarında, akrep problemlerin primer kısmı, hedef bölgeye hibridize olur ve ikinci denatürasyonda saç tokası yapısı açılır, problem de hedef bölgeye hibridize olur, söndürücü etkisini kaybeder ve floresan ışımaya meydana gelir (75).

#### 2.5.1.2.4. Hibridizasyon Problemleri

Hibridizasyon problemleri, spesifik olarak dizayn edilmiş, alıcı ve verici floresan boya ile işaretlenmiş iki oligonükleotid problemden oluşan sistemlerdir. PCR sırasında iki oligonükleotid problem hedef dizisine yapışarak yakın şekilde konumlanır. Bir problemin floresan enerjisi diğerini uyarır ve ışımaya meydana gelir (Şekil 2.13) (99).



**Şekil 2. 13.** Hibridizasyon problemlerinin çalışma prensibi (Roche, Light Cycler 480, Instrument Operator's Manual, V1.5.)

## **2.5.2. Real Time RT-PCR'da Kantifikasyon Yöntemleri**

### **2.5.2.1. Mutlak (Absolut) Kantifikasyon**

Konsantrasyonu bilinen bir örnek serisini temel alarak oluşturulan standart eğriler yardımıyla, bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmaktadır. Bu nedenle standart eğri metodu olarak da adlandırılır. Standart olarak DNA, plazmidler ya da RNA kullanılabilir (37, 99).

### **2.5.2.2. Rölatif Kantifikasyon (Karşılaştırmalı C<sub>T</sub>) Yöntemi**

Real time PCR'da reaksiyon floresan ışımalarının eşik değeri aştığı ilk siklus, geçiş noktası (crossing point=C<sub>p</sub>) ya da geçiş eşiği (crossing treshold, C<sub>t</sub>) olarak adlandırılmaktadır. Karşılaştırmalı C<sub>T</sub> yönteminde, hedef genin C<sub>t</sub> değeri ile referans genin C<sub>T</sub> değerinin farkı örnekler arasında karşılaştırılmaktadır. Bu nedenle yöntem Delta-Delta C<sub>t</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ ) metodu da denilmektedir (37,75, 98).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Kullanılan Gereçler**

- Luminometre (Lumistar BMG)
- Invert Mikroskop (Olympus CKX31)
- Etüv (Heraeus)
- Vorteks (Stuart)
- Kuru blok ısıtıcı (Techne Dri-Block DB-2D)
- Spektrofotometre (Thermo NanoDrop 2000c)
- Mikrosantrifüj (Labnet)
- Santrifüj (Heraeus Labofuge 400)
- Real Time Thermal Cyclor (Roche Light Cyclor 480 II)
- Homojenizatör (Tissue- Lyser LT)
- Derin Dondurucu (Bosch)
- Buzdolabı (Bosch)
- Laminair Flow (Ratek)
- Jel elektroforez Güç Kaynağı (Thermo EC 300 XL)
- Jel Elektroforez Tankı (Thermo OWL Easy Cast B1A)
- Mikrodalga Fırın (Breyton)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Viber Lourmat)
- Neubauer Lamı
- 15 ml lik steril polipropilen santrifüj tüpleri (Orange Scientific)
- 1,5 ml lik Eppendorf SafeLock Clear Steril Santrifüj Tüpleri (Eppendorf)
- 10 ml'lik serolojik pipetler (Orange Scientific)
- Otomatik Pipet Seti (Thermo Scientific FinnTip)  
(1 ml, 300 µl (çok kanallı), 200 µl, 20 µl, 10 µl ve 2 µl)
- Steril filtreli pipet uçları (Finntip)
- Geniş ağızlı steril filtreli pipet uçları (Finntip Wide Bore)
- 50 ml lik falkon tüpleri (Orange Scientific)

- Steril petri kapları (orange Scientific)
- Penset ve bistüri setleri
- 96 kuyucuklu hücre kültür plakları (Costar 3790)
- Steril Kimyasal küveti (Costar 4870)
- 96 kuyucuklu hücre sayım plakları (Nunc)
- Kağıt havlu
- Kapaklı plastik kutu

### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- DMEM besiyeri (GIBCO DMEM + GlutaMAX™-I)
- Antibiyotik/Antimikotik solüsyon (Wisent)
- RNA later (Qiagen)
- Triphan Blue Solüsyonu
- RNA izolasyon kiti
- Beta Merkaptoetanol
- Agaroz (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Tris (Sigma)
- DNase I (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- Etidyum bromid (sigma)
- Molecular Weight Marker (Fermantas)
- 6X Jel Yükleme Tamponu (Sigma)
- Liberase (Roche)
- Luciferin (Roche)
- Luciferase (Roche)
- ATP resolution reagent (Sigma)
- Distile Su
- DNase RNase free distile su (Wisent)
- cDNA sentez kiti (Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit)



- Twist1 ve Beta actin prob-primer seti (Roche Real Time Ready Gen Expression Assay)

- Adriamisin (Doxorubicin)

- Taksoter (Docetaxel)

### **3.1.3. Örneklem Grubu**

Mart 2010- Şubat 2011 arasında, Prof. Dr. Mahmut Müslümanoğlu tarafından çeşitli merkezlerde gerçekleştirilen meme cerrahi girişimlerinde çıkarılan 29 tümörden ve Mart 2009- Mayıs 2009 tarihleri arasında European Laboratory Association'a (ELA) kemohassasiyet testi istemi ile gönderilmiş dört tümörden alınan örneklerden oluşan toplam 33 tümör çalışmaya dahil edilmiştir. Tümörlerden, yaklaşık 0,5 cm<sup>3</sup>'lük ikişer parça çıkarılarak, parçaların biri ATP-TCA testi için transport besiyerine alınmış, ikincisi ise RNA eldesi için korunmak üzere RNA stabilizasyon sıvısı içerisine aktarılmıştır. Örnekler tümörün merkezinden alınmış ve tümör hücre içerikleri alındıkları sırada imprint sitoloji ile doğrulanmıştır. Tümörlere ilişkin histopatolojik bilgiler ETA Patoloji/Sitoloji Laboratuvarı'nda değerlendirilmiştir. ATP-TCA ve gen ekspresyon çalışmaları, PREMEDI Prenatal Tanı ve Genetik Hastalıklar Uygulama Araştırma Merkezi, Moleküler Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. ATP-TCA testlerinde kullanılan luminometre, European Laboratory Association tarafından sağlanmıştır.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. ATP-TCA**

#### **3.2.1.1. Tümörlerin Alınması**

Ameliyat sırasında hastadan çıkarılan tümör dokusunda, tümör hücre içeriği imprint sitoloji ile incelendikten sonra tümörün odağından 0,3-0,5 cm<sup>3</sup>'lük iki parça kesit halinde çıkarılmış ve biri daha sonra RNA izole etmek üzere RNA stabilizasyon

sıvısı içerisinde alınmış, diğeri ise ATP-TCA için steril bir santrifüj tüpü içerisindeki yaklaşık 7 ml'lik transport besiyeri içerisinde alınmıştır.

### ***Transport besiyeri içeriği***

DMEM

% 0,2 antimikotik/antibiyotik solüsyon

### **3.2.1.2. Tümörlerin Enzimatik Parçalanması**

ATP-TCA için tümör doku örneğinin hücrelerine ayrıştırılması gerekmektedir. Bunun için;

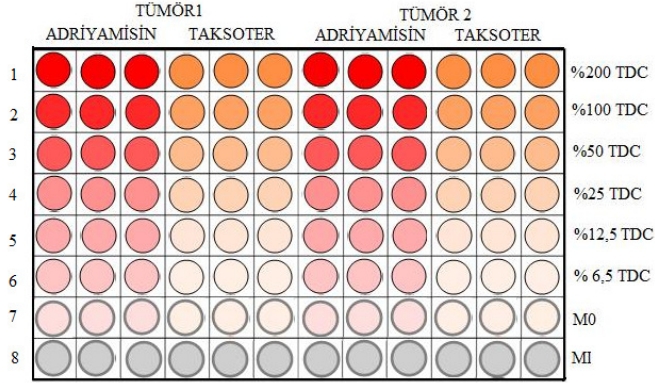
1. 10 ml transport besiyerine 250 µl Liberase enzimi ve 60 µl DNase I eklenir.
2. Doku önce steril petri kabı içerisinde mekanik olarak parçalanır. Mümkün olduğunca küçük parçalar elde edilir ve bu parçalar 15 ml'lik steril santrifüj tüpü içerisindeki enzim-transport medyum karışımı içerisinde konur.
3. 37<sup>0</sup>C'lik etüvde gece boyunca 15 dakikada bir dairesel hareketler ile tüpün karıştırıldığı bir düzeneğe yerleştirilen santrifüj tüpü içerisindeki doku parçalarının hücrelere ayrılması sağlanır. Hücrelerin ayrılması, kuyucuklarda kümelenmeler sonucu sayısal verileri etkilemelerini önlemek açısından önemlidir.

### **3.2.1.3. Kültür Aşaması**

1. Santrifüj tüpü (içerisinde herhangi bir doku parçası kalmadığına emin olunduktan sonra) 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir
2. Hücre kültüründe kullanılacak olan CAM besiyeri hazırlanır. CAM besiyeri için transport besiyerine %2 Ultraser G eklenir.
3. Denenmesi planlanan ilaç stokları endorff tüpleri içerisinde hazırlanır. Bizim çalışmamızda kullanılan adriyamisin 2 µl/1 ml, taksoter ise 30 µl/ 1 ml olacak

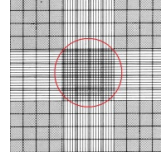
şekilde hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra direk ışık görmemesi gereken ilaçlar ile çalışıldığından steril kabinin ışığı kapalı olmalıdır.

4. Hücre kültür mikroplağının her bir kuyucuğuna çok kanallı pipet aracılığıyla 100 µl CAM besiyeri konur.
5. Kültürde her ilaç denemesi üç defa tekrarlanmakta böylece sayısal olarak daha güvenilir sonuçlara ulaşmak hedeflenmektedir. İlaç stok solüsyonundan 100 µl alınarak mikroplağın ilk sırasında ilgili 3 kuyucuğa konur ve pipetaj yapılarak karışım homojenize edilir. Bu kuyucuktan 100 µl ilaç-besiyeri karışımından çekilerek bir sonraki sıraya konur ve bu böylece 6. sıraya kadar devam eder. 6. sıradan çekilen 100 µl'lik ilaç-besiyeri karışımı atılır. 7. kuyucuğa (M0) ve 8. kuyucuğa (MI) ilaç koyulmaz (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. ATP-TCA hücre kültür mikroplakası

6. Santrifüjden çıkarılan tüpün dibindeki pellet kaldırılmadan üzerindeki fazla besiyeri atılır. Üzerine 3 ml CAM besiyeri eklenerek pipet ile çok iyi pipetaj yapılır. Tüp steril kabine yatık şekilde koyulur.
7. Bir endorrf tüpünün içerisine 50 µl tripan blue boyası koyulur. Üzerine 3 ml lik hücre süspansiyonundan 50 µl eklenir. Neubauer lamına bu karışımdan 10 µl koyularak invert mikroskop altında canlı ve ölü hücre sayıları belirlenir (Şekil 3.2).  $(480.000-1.500.000)/10\text{ml}$  arasındaki sayıya karşılık gelen konsantrasyonlarda sonuç alınabilmektedir. Hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplanır;



**Şekil 3. 2.** Neubauer lamında hücrelerin sayılacağı alanın görüntüsü

Neubauer lamının kırmızı ile belirtilen alanından sayılan hücre sayısı dikkate alınarak formülde hesap yapılır;

Mikroskopta sayılan hücre sayısı x 2 x 10.000 x 3

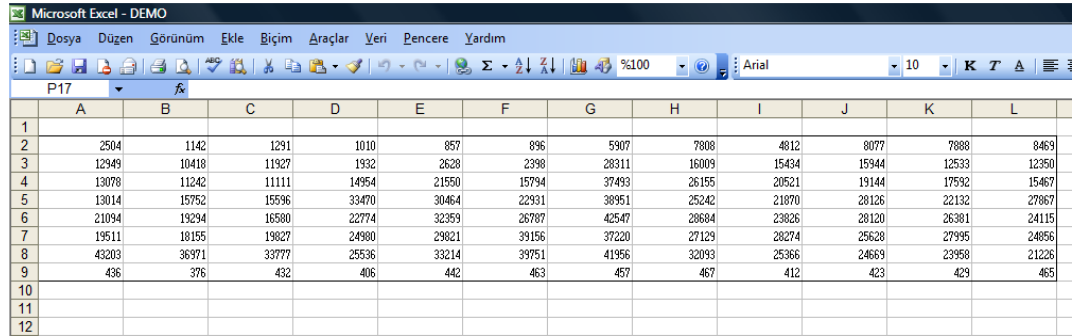
8. Hücre süspansiyonunun üzerine hücre sayısı yeterli ise 7 ml daha besiyeri eklenir ve homojenize edilir.
9. Hücre süspansiyonu steril küvet içerisine boşaltılır. Bu işlem için serolojik pipetler kullanılır.
10. Konteyner içerisindeki hücre süspansiyonundan çok kanallı pipet ile alınan 100'er µl'lik karışım 8. sıraya kadar her sıraya koyulur. 8. sıraya hücre süspansiyonu eklenmez (MI).
11. Mikroplaka kapağı hava alabilen bir kutu içerisinde etüve kaldırılır. Kutunun içerisinde, mikroplakanın altına nemli kağıt koyulur.
12. % 5 CO<sub>2</sub>'li 37<sup>0</sup>C'lik etüvde 5-7 gün arası inkübe edilir.

#### **3.2.1.4. Luminometrik Sayım Aşaması**

1. Sayım için kullanılacak mikroplakaya her bir hücre kuyucuğuna karşılık 100 µl somatik hücre ayırıcı solüsyon koyulur.
2. Kültür mikroplakasından çok kanallı mikropipet ile hücre süspansiyonundan 100 µl'lik karışım pipetaj yapılarak alınır ve sayım plağındaki somatik hücre ayırıcı solüsyon üzerine bırakılır. Hücre transfer işlemleri geniş ağızlı filtrelili steril uçlar ile gerçekleştirilir.
3. Lusiferin Lusiferaz enzimi hazırlamak üzere, 7 ml ATP tamponu steril bir tüpe konur. İçerisine, kullanılan lusiferin ve lusiferaz enziminin prospektüs bilgisi

doğrultusunda her iki enzimden eklenir. 7 ml ATP-Lusiferin-Lusiferaz (Lu-Lu)karışımı 96 kuyucuktaki örneğin okunması için yeterlidir.

4. Luminometrenin filtreli ucu Lu-Lu içerisine yerleştirilir. Örneklerin bulunduğu sayım plakası da örnek tepsinine yerleştirilir.
5. Sayım işlemi başlatılır.
6. Sayım sonucunda elde edilen veriler luminometre tarafından Excel dosyası haline getirilmektedir (Şekil 3.3) .



The screenshot shows a Microsoft Excel window titled "Microsoft Excel - DEMO". The menu bar includes "Dosya", "Düzen", "Görünüm", "Ekle", "Biçim", "Araçlar", "Veri", "Pencere", and "Yardım". The toolbar contains various icons for file operations and editing. The active cell is P17. The spreadsheet displays a table with 12 columns (A-L) and 12 rows (1-12). The data is as follows:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1												
2	2504	1142	1291	1010	857	896	5907	7808	4812	8077	7888	8469
3	12949	10418	11927	1932	2628	2398	28311	16009	15434	15944	12533	12350
4	13078	11242	11111	14954	21550	15794	37493	26155	20521	19144	17532	15467
5	13014	15752	15596	33470	30464	22331	38951	25242	21870	28126	22132	27867
6	21094	19294	16580	22774	32359	26787	42547	28684	23826	28120	26381	24115
7	19511	18155	19827	24980	29821	39156	37220	27129	28274	25628	27995	24856
8	43203	36971	33777	25536	33214	39751	41956	32093	25366	24669	23958	21226
9	436	376	432	406	442	463	457	467	412	423	429	465
10												
11												
12												

Şekil 3.3. Luminometrede elde edilen excell sonuçlarına bir örnek

7. Luminometre temizlenir ve kapatılır.

### 3.2.1.5. Değerlendirme Aşaması

Örneklerin AUC (Area Under Curve) değerleri bir Excel programı yardımıyla hesaplanır. Biz çalışmamızda ELA laboratuvarında kullanılan Centoaus Office Excel Programı'ndan yararlanarak örneklerin AUC değerlerini hesapladık.  $AUC < 12,500$  olan tümörler dirençli,  $AUC \geq 12,500$  olan tümörler ise hassas olarak kabul edilmektedir (64). Şekil 3.4'te Centoaus Office sonrası elde edilen görüntüler örneklenmiştir.

	B	C	D	E	F	G	H
1	TCA CALCULATIONS OF PERCENT INHIBITION						06.04.2011
2	TITRATION OF 800% TEST DRUG CONCENTRATION						
3							
4	NT	NT	MO	MO	PATIENT:	EI 4317	R.N. ÇIRMAN
5					SPECIMEN:		
6	329	329	652	652	CELLS/WELL:		
7	354	354	652	652	ASSAY DAYS:		
8	358	358	507	507	PERFORM BY:		
9	342	342	530	530	Remarking:		
10	348	348	509	509			
11	373	373	530	530			
12							
13	MEAN	351	563				
14	CV%	3,89%	11,24%				
15							
16		PERCENT TEST DRUG keine Auswertung					
17	DRUGS/CALCS	200	100	50	25	12,5	6,25
18							
19	ADRIAMYCIN	474	529	553	526	738	647
20	15,10	571	469	573	657	856	647
21	-34,01	505	479	628	467	536	647
22	MEAN	517	492	585	550	710	647
23	RANGE%	7,83%	5,33%	5,42%	14,44%	18,61%	0,00%
24	INHIBIT %	21,94	33,39	-10,03	6,27	-68,97	-39,34
25							
26	TAXOTERE	573	441	511	381	559	680
27	39,34	452	448	511	430	559	680

Şekil 3.4. Centoaus Office ile veri girişi

### 3.2.2. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz PCR Reaksiyonu İle Gen Ekspresyon Analizi

#### 3.2.2.1. RNeasy Mini Kit İle RNA İzolasyonu

1. RLT Buffer içerisine 10 µl/ml olacak şekilde Beta merkaptetanol eklenir.
2. RPE Buffer içerisine 1'e 4 hacimde absöüt etanol eklenir.
3. Parçalama ve homojenizasyon için Qiagen Tissue Lyser LT kullanılmıştır. Bunun için parçalamada kullanılacak boncuklar 2ml'lik tüpler içerisine konur ve kuru buz üzerinde en az 15 dakika beklenir.
4. RNA later içerisindeki doku örnekleri soğutulmuş boncuklu ependorf tüplerine koyulur ve 15 dakika buz üzerinde bekletilir.
5. Tüpler buzdan alınıp Tissue Lyser LT adaptörüne yerleştirilir.
6. Tüplerin üzerine 600 µl Buffer RLT eklenir.
7. 3-5 dakika RLT içerisindeki dokular homojenizatörde parçalanıp homojenize edilir.

8. Süpernatant yeni bir tüpe transfer edilir ve üzerine bire bir hacim % 70'lik etanol eklenir, pipetaj yapılır.
9. Sekizinci basamakta oluşan karışımdan 700 µl kadar alınıp RNeasy spin kolonuna aktarılır. 15 saniye 10 bin rpm de santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
10. RNeasy spin kolonuna 700 µl RW1 Buffer eklenir, 15 saniye 10 bin rpm de santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
11. Spin kolonuna 500 µl RPE eklenir. 15 saniye 10 bin rpm de santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
12. Spin kolonuna 500 µl RPE eklenir. 2 dakika 10 bin rpm de santrifüj edilir. Süzüntü atılır.
13. Spin kolonu 1,5 ml'lik temiz bir ependorf tüpüne yerleştirilir. 30-50 µl RNase free su eklenir ve 1 dakika 8 bin rpm de santrifüj edilir.
14. Elde edilen süzüntü RNA içermektedir. Bu basamakta verimi arttırmak için süzüntü spin kolonundan bir defa daha santrifüjle geçirilebilir.
15. Elde edilen süzüntünün 2 µl'si Nano Drop'ta örneğin miktar tayini için kullanılabilir. Örneklerimizde 150 ila 800 ng/ µl arasında RNA'lar elde edilmiştir.

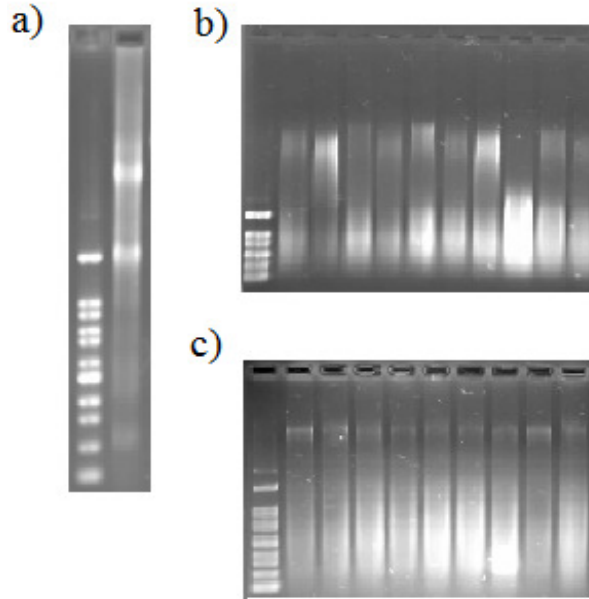
### **3.2.2.2. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit İle cDNA Sentezi**

1. 0,2 ml'lik PCR tüpleri içerisine, 2 µl Random Hexamer Primer (600 pmol/µl stok) RNA ve H<sub>2</sub>O eklenerek toplam 11.4 µl'lik bir karışım elde edilmiştir. Örneklerdeki RNA miktarlarını eşitlemek için, her bir örneğin konsantrasyonu reaksiyonda 500 ng olacak şekilde su ve RNA eklenmiştir. Karışım thermal cyclerda 65<sup>0</sup>C'de 10 dakika inkübe edilip süre bitiminde hemen buz üzerine alınmıştır.
2. Tabloda (Tablo 3.1) belirtilen bileşenlerden oluşan bir ana karışım her bir örnek başına 8,6 µl olacak şekilde hazırlanmış ve bu birinci basamaktaki 11.4 µl'lik karışıma eklenerek toplam 20 µl'lik karışım elde edilmiştir.

**Tablo 3.1.** cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve hacimleri

BİLEŞEN	HACİM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaksiyon Tamponu, 5X	4 µl
Protector Rnase Inhibitor, 40U/ul	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix, her biri 10 mM	2 µl
DTT	1 µl
Transcriptor High Fidelity Reverse Transriptase Enzimi	1.1 µl

4. 20 µl'lik karışım 45<sup>0</sup>C'de 30 dakika ve 85<sup>0</sup>C'de 5 dakika tutulmuş ve sonrasında buza alınmıştır.



**Şekil 3.6.** 1 no'lu tümörden izole edilen RNA (a) görüntüsü ve tümörlerden elde edilen cDNA'lara ait agaroz jel görüntüsü (b,c). Her jelde ilk sıra markır olup 1kb'dır.



### 3.2.2.2. Roche Real Time Ready Catalog Assay İle Gen Ekspresyonu

Çalışmamızda TWIST (Twist 1) geni ve housekeeping olarak kullanılan Beta Actin (Actb) geninin Light Cycler 480 ile kantifikasyonu için Roche Real Time Ready Single Assay primerleri kullanılmıştır. Bunun için, hem TWIST hem Beta Actin geni için ayrı ayrı, Tablo 3.2’de belirtilen bileşenlerden oluşan bir ana karışım hazırlanmış ve örnek başına 15 µl bu karışımdan, 50 ng RNA’ya karşılık gelen cDNA ve gerekirse su eklenerek, son hacim 20 µl’ye tamamlanmıştır.

**Tablo 3.2.** Real Time Ready Bileşenleri ve Hacimleri

TWIST1		BETA ACTIN	
BİLEŞEN	HACİM	BİLEŞEN	HACİM
PCR grade H <sub>2</sub> O	4 µl	PCR grade H <sub>2</sub> O	4 µl
Light Cycler 480 Prob Master, 2X	0,5 µl	Light Cycler 480 Prob Master, 2X	0,5 µl
Real Time Ready Twist1 Primeri	2 µl	Real Time Ready β aktin primeri	2 µl
<b>TOPLAM HACİM</b>	<b>20 µl</b>	<b>TOPLAM HACİM</b>	<b>20 µl</b>

Set-up			
Detection Format		Block Type	Reaction Volume
Monocolor Hydrolysis Probe / UPL Probe		96	20 µl
Filter combination: dynamic Mode FAM 483 – 533 or 465 – 510 respectively, for LightCycler® 480 Instrument Version I or II			
Programs			
Program Name		Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation		1	None
Amplification		45	Quantification
Cooling		1	None
Temperature Targets			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
Pre-Incubation			
95	None	00:10:00	4.4
Amplification			
95	None	00:00:10	4.4
60	None	00:00:30	2.2
72	Single	00:00:01	4.4
Cooling			
40	None	00:00:30	2.2

**Şekil 3.6.** Real Time Ready Catalog Assay PCR Şartları

### **3.2.2.3. Light Cycler 480 Cihazına Örneklerin Yüklenmesi**

1. Her bir örnek hem beta aktin hem de TWIST geni real time reaksiyonları en az iki ayrı reaksiyon olarak tekrarlanmıştır.
2. 96'lık Roche plaklarında örnekler Light Cycler 480'e yüklenmiş ve sonuçlar Light Cycler 480 II Basic Relative Quantification Programı ile analiz edilmiştir.

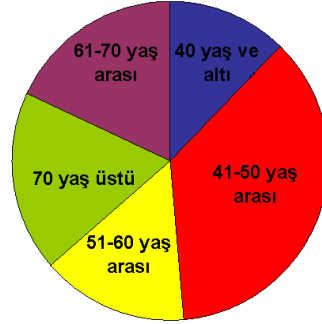
### **3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışmamızda, adriamisin ve taksoter ATP-TCA verileri ile twist gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek üzere SPSS.17.0 paket programından faydalanılarak Mann Whitney U testi kullanılmıştır.  $P < 0.05$  önemlilik düzeyine göre sonuçlar değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastaların Yaş Gruplarına Göre Dağılımları

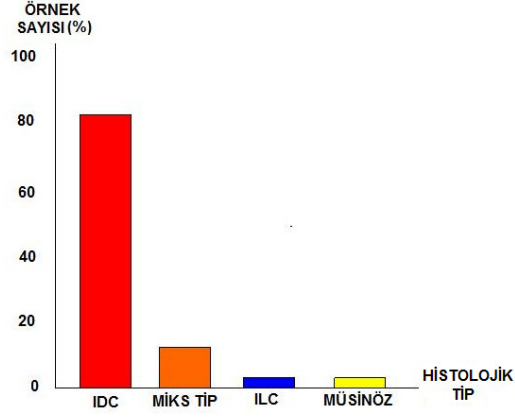
Çalışmamızda kullanılan tümör örneklerinin alındığı toplam 33 hastanın genel yaş ortalaması 54,8'dir. 41-50 yaş arası hastalar % 36.4'lük bir oranla en büyük grubu oluştururken, 40 yaş altı hastalar % 12 ile en küçük grubu oluşturmaktadır. 61-70 yaş arası ve 70 yaş üstü hastaların dağılımı eşit olup %18.2'lik gruplar oluşturmakta iken, 51-60 yaş arası hastalar % 15.2'lik bir grup oluşturmaktadır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

### 4.2. Tümörlerin Histolojik Tiplere Göre Dağılımı

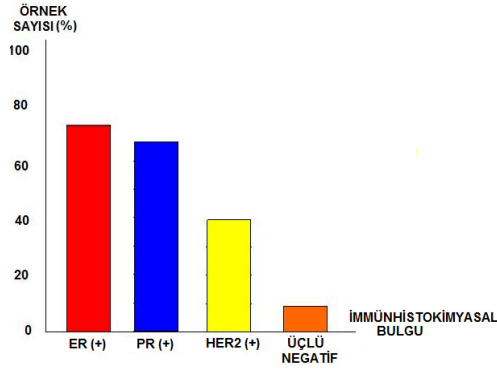
Çalışmamızda değerlendirmeye alınan tümörlerin %81.81'ini, tek veya çok odaklı invaziv duktal karsinomlar; % 12.12'si, miks tipte tümörler; (IDC+ILC vb); % 3.03'ünü invaziv lobüler karsinomlar (ILC) ve % 3.03'ünü, müsinöz karsinomlar oluşturmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Tümörlerin histolojik tiplere göre dağılımı

#### 4.3. Tümörlerin Östrojen Reseptör, Progesteron Reseptör ve HER2/neu Düzeylerine İlişkin İmmünohistokimyasal Bulgular

Tümörlerin östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2 düzeyleri patoloji laboratuvarında immünohistokimyasal yöntemler ile belirlenmiştir.



Şekil 4. 3. Tümörlerde ER, PR ve HER2 bulguları

Çalışmamızdaki tümörlerde östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) pozitifliğinin sırası ile % 72.72 ve % 66.66 olduğu görülmüştür. HER2 pozitif

tümörlerin oranı % 39,39'dur. Üçlü negatif ( ER, PR, HER2 açısından negatif ) tümörler ise % 12,12'lik oran ile en küçük grubu oluşturmaktadır (Şekil4.3).

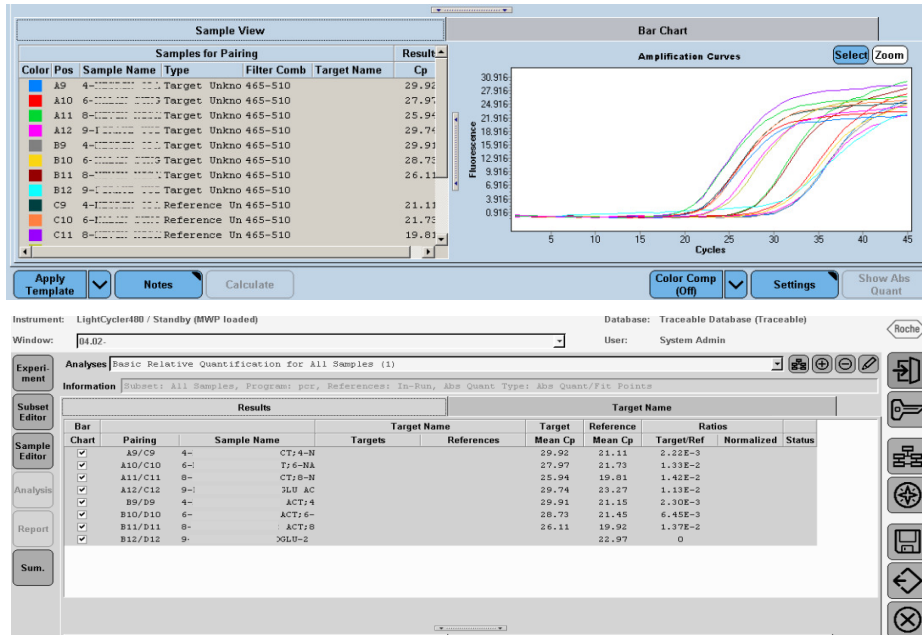
#### 4.4. Tümörlerde Metastaz Ve Histolojik Grade Bulguları

Çalışmamıza dahil edilen tümörlere sahip hastaların %39,39'unda metastaz (aksiller ve/veya sentinel lenf nodu pozitifliği) bulguları görülmüştür. Metastaz bulgusu olmayan tümörlerin oranı ise % 60,61'dir.

Çalışmamızdaki tümör örneklerinin % 75,8'i Grade 3; % 18,2'si Grade 2 tümörlerdir. Grade 1 tümörler % 3 ile en küçük grubu oluşturmaktadır. Tümörlerden birinin histolojik greydi bilinmemektedir (% 3).

#### 4.5. TWIST Gen Ekspresyonu $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ Sonuçları

Her bir örnek için TWIST transkript kopya sayısı değişiklikleri beta aktin referans geni kullanılarak  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  metodu ile belirlenmiştir (Şekil 4.4 ve Tablo 4.1)



Şekil 4.4. Bazı tümörlere ait RealTime PCR görüntüsü

**Tablo 4.1.** Tümörlerin Twist gen ekspresyonu ( $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ ) sonuçları

ÖRNEK NO	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$	ÖRNEK NO	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$	ÖRNEK NO	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
1	19,02731	12	21,70567	24	21,40684
2	230,7201	13	57,2816	25	42,81368
3	103,9683	14	22,7848	26	32,89964
4	28,05138	15	14,6213	27	6,147501
5	19,226176	17	29,446	28	150,1229
6	55,71524	18	47,17661	29	21,55574
7	41,06963	19	35,75318	34	159,7863
8	276,28	20	22,3159	54	15,67072
9	26,72281	21	38,85424	55	6,105037
10	12,72858	22	18,12614	87	1,00
11	66,71781	23	41,06963	88	14,12325

1 no'lu tümör örneğinin metastazından alınan doku örneğinde de TWIST gen ekspresyonuna bakılmıştır (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** 1'no'lu tümörde ve lenf nodu metastazında Twist Ekspresyonu

ÖRNEK NO	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
1 (Primer Tümör)	19,02731
1' (Metastaz)	159,7863

#### **4.6 ATP-TCA (Adenosine Triphosphat Tumor Chemosensitivity Assay) Ve Twist RT-PCR Sonuçlarının İlişkisinin Değerlendirilmesi**

27 tümör örneğinde ATP-TCA çalışması için yeterli hücre elde edilmiştir. ATP-TCA başarı oranı % 96,3'dür. Üç tümör (% 9,09) normal hücre kültür flasklarında fetal bovin serum ile manipüle edildiklerinden ATP-TCA sonuçları değerlendirilmeye alınmamıştır. Üç tümörden ise ATP-TCA için yeterli hücre elde edilememiştir ( $n_{\text{toplam}}=33$ ).

Adriyamin ve Taksoter ile ayrı ayrı ATP-TCA uygulanan tümörlerin bu ajanlara hassasiyet durumları Centoaus Office97 (ELA) programı ile hesaplanmıştır. Area Under Inhibition Curve (AUIC) < 12.500 olan tümörler kullanılan ajana cevap vermeyen, AUIC  $\geq$ 12.500 olan tümörler ise kullanılan ajana cevap veren tümörler olarak gruplandırılmıştır (Tablo 4.3; 4.4 ve 4.5).

**Tablo 4.3.** Taksoter Hassasiyetine Göre Tümörlerde Twist Ekspresyon Farkları

TAKSOTERE CEVAP VERMEYEN TÜMÖRLER			TOPLAM	ORTALAMA
ÖRNEK NO	AUC	2 <sup>^</sup> DDCT		
3	11797	103,9683067		
5	6257	19,22617679		
21	8176	38,8542363	<b>162,0487198</b>	<b>54,01623994</b>
TAKSOTERE CEVAP VEREN TÜMÖRLER				
1	16933	19,02731384		
2	16858	230,7201184		
6	17766	55,71523605		
7	16986	41,06962872		
9	18517	26,72281342		
10	17215	12,72858374		
11	17777	66,71780869		
12	15258	21,70566924		
13	15499	57,28160454		
14	16929	22,78480313		
15	18141	14,6213032		
17	15630	29,446005		
18	18009	47,17661495		
19	17540	35,75318842		
22	18858	18,12614216		
23	18845	41,06962872		
27	16548	6,147500725		
29	14864	21,55573723		
34	18703	159,7863103		
54	14287	15,67072476		
55	12518	6,105036836		
87	17552	1.00		
88	15068	14,12324794	<b>965,05502</b>	<b>51,72239369</b>
<i>p= 0,3 (p&gt;0,05)</i>				



**Tablo 4.4.** Adriamisin Hassasiyetine Göre Tümörlerde Twist Ekspresyon Farkları

ADRIAMİSİNE CEVAP VERMEYEN TÜMÖRLER			TOPLAM	ORTALAMA
ÖRNEK NO	AUC	2- <sup>Δ</sup> DDCT		
1	11260	19,02731384		
2	8279	230,7201184		
3	8278	103,9683067		
13	8543	57,28160454		
21	2573	38,8542363		
23	7626	41,06962872		
29	11590	21,55573723		
34	7859	159,7863103		
54	10266	15,67072476	<b>687,934</b>	<b>76,43710898</b>
ADRIAMİSİNE CEVAP VEREN TÜMÖRLER				
5	13341	19,22617679		
6	13122	55,71524		
7	14613	41,06962872		
9	17182	26,72281342		
10	15720	12,72858374		
11	16203	66,71780869		
12	15179	21,70566924		
14	16929	22,78480313		
15	14292	14,6213032		
17	16534	29,44600482		
18	18113	47,17661495		
19	15668	35,75318842		
22	12552	18,12614216		
27	13058	6,147500725		
55	13105	6,105036836		
87	17447	1.00		
88	14684	14,12324794	<b>439,1698</b>	<b>24,39832016</b>
<i>p= 0,041 (p&lt;0,05)</i>				

**Tablo 4.5.** Taksoter ve Adriamisine Hassasiyetine Göre Tümörlerde Twist Ekspresyon Farkları

<b>TAKSOTER VE ADRIAMISINE CEVAP VERMEYEN TÜMÖRLER</b>			
<b>ÖRNEK NO</b>	<b>2-<sup>^</sup>DDCT</b>	<b>TOPLAM</b>	<b>ORTALAMA</b>
3	103,9683067		
21	38,8542363	<b>142,82254</b>	<b>71,4112715</b>
<b>TAKSOTER VE ADRIAMISINE CEVAP VEREN TÜMÖRLER</b>			
6	55,71523605		
7	41,06962872		
9	26,72281342		
10	12,72858374		
11	66,71780869		
12	21,70566924		
14	22,78480313		
15	14,6213032		
17	29,446005		
18	47,17661495		
19	35,75318842		
22	18,12614216		
27	6,147500725		
55	6,105036836		
87	1,00		
88	14,12324794		
5	19,22617679	<b>439,16976</b>	<b>25,8335152</b>
<b><i>p= 0,084 (p&gt;0,05)</i></b>			

## 5. TARTIŞMA

Kanserin tedavisi için medikal karar aşamasında; tedavi uygulanmadığında olası klinik sonuç, tedaviden fayda sağlama olasılığı, müdahaleden kaynaklanabilecek muhtemel yan etkiler ve hastanın tercihleri gibi faktörler önemli olmaktadır (94, 95). Bu nedenle, kanserin tedavisinde hastalığın klinik seyri hakkında bilgi verecek prognostik markırlar ile uygulanması planlanan tedavinin etkinliği ile ilgili bilgiler verebilecek öngörüsül markırların belirlenmesi giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Son dönemlerde, gelişimsel olaylarda önemli rol oynayan epitelyal mezenkimal değişim sürecinde görevli transkripsiyon faktörlerinin kanserde metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (56, 58, 67). Epitelyal mezenkimal değişimde görev alan transkripsiyon faktörlerinden biri olan Twistin, kanserde anti apoptotoik rol oynadığı ve çeşitli kanser hücre hatlarında ilaç direncine aracılık ettiği gösterilmiştir (58, 67, 69, 70).

Çalışmamızda, bHLH transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olan Twist transkripsiyon faktörünün, meme tümörlerinde değişken ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Tümörlerin adriamisin ve taksotere hassasiyetleri de ATP-TCA ile belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler, Twist transkripsiyon faktörü düzeylerindeki artış ile tümörlerin adriamisine hassas olmaması arasında anlamlı bir ilişki ( $P < 0,05$ ) saptanırken (Tablo 4.4), tümörlerin taksotere hassasiyetleri ile twist gen ekspresyon farkları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür (Tablo 4.5).

Bildiğimiz kadarıyla, daha önce kemoterapi görmemiş meme kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinde adriamisin ve taksotere ATP-TCA ile belirlenen hassasiyet ve Twist ekspresyon farklılıkları arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Twistin apoptozu inhibe ettiğine dair ilk bulgular Maestro ve ark. tarafından rhabdomyosarkomlar üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (70). Çalışmada,

Myc onkogeninin pro apoptotik etkilerine karşı koyabilecek cDNA bölgelerinin fonksiyonel olarak taranması sırasında, bHLH domaini içeren proteinlerin varlığı ortaya çıkarılmış ve bu proteinlerin Twist ve Dermo 1 olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, twist ekspresyonunun p53 indüklü büyüme- durdurulmasını devre dışı bıraktığı görülmüştür ve bu olayda twistin, ARF geninin ekspresyonunu baskılama yeteneğinin rolü olabileceği bildirilmektedir (70). Guo Chang ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada, mutant p53'e sahip, adriamisine dirençli MCF7 hücre hatlarına (MCF7/Adr) p14 ARF cDNA'sının transferi ile adriamisine direncinin azaltılabildiği bildirilmiştir. (22). Bu iki çalışma birlikte göz önüne alındığında, çalışmamızda, adriamisine hassas olmayan tümörlerde artmış twist ekspresyonunun ARF inhibisyonu üzerinden anti apoptotik etki göstermesi olası görünmektedir.

Pham ve ark. tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, Twistin, NF- $\kappa$ B tarafından upregüle edilmesinin kemoterapötik ajanların indüklediği sitotoksiteyi engellediğine ilişkin bulgular elde edilmiştir (87). H $\beta$ TA, H $\beta$ TA-RelA, CCR3, PC3 hücre hatları kullanarak yapılan çalışmada, NF- $\kappa$ B'nin, twist ekspresyonunu doğrudan kontrol ettiği belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre Twist, kemoterapötik ajanların neden olduğu hem apoptotik hem nekrotik hücre ölümü yollarına karşı koruyucu roller üstlenmektedir. Bu çalışmada twistin hücre ölümünün ekstrinsik ve intrinsic yollarını bloklama özelliğini araştırmak üzere, doksorubisinle aynı anikanser ajanlar grubunda bulunan daunorubisin ajanından faydalanılmıştır. Twistin, hem TNFalfa indüklü ekstrinsik hücre ölümünü hem de daunorubisin indüklü intrinsic hücre ölümünü baskılama özelliğinin olduğu belirlenmiştir (87). Adriamisine, Pham ve ark.'nın çalışmalarında kullandıkları daunorubisin antibiyotiği ile aynı antikanser ajanlar grubunda sınıflanmaktadır ve sitotoksik etki mekanizmaları benzerlik göstermektedir (70,87). Ayrıca, NF- $\kappa$ B aktivasyonunun, adriamisine indüklü apoptozu inhibe edebildiği pek çok çalışmada bildirilmiştir (14, 24, 121). Daha önce, NF- $\kappa$ B yolağının bloklanmasının meme kanseri hücrelerinde kemorezistansı engelleyebildiği de bildirilmiştir (117). Tüm bu veriler göz önüne alındığında, çalışmamızdaki twistin meme tümörlerinde adriamisine dirençle ilişkisine aracılık edebilecek olası bir diğer faktör de Nf- $\kappa$ B aktivasyonu olabilir.

Cheng ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre (26), Twist, STAT3 tarafından transkripsiyonel olarak aktive olmakta ve STAT3 onkogenik fonksiyonlarına aracılık etmektedir. Çalışmada, 46 meme tümör örneğinde STAT3'ün, transkripsiyonel olarak Twist'i indüklediği belirlenmiştir. Kim ve ark., tarafından MDA-MB-231, MCF7, ve HepG2 hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise JNK yolağı üzerinden STAT3 aktivasyonunun doksorubisine direnç gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (60). Bu iki çalışma ile birlikte, doksorubisine hassas olmayan tümörlerde artmış twist ekspresyonu bulduğumuz bizim çalışmamız göz önüne alındığında, Twistin STAT3 indüklü aktivasyonunun meme kanserinde görülen adriamisin kemorezistansında etki gösterebileceği ihtimali güçlenmektedir.

Li ve ark.(67) tarafından MCF7 hücrehatlarında yapılan bir çalışmada, hücreler G1/s ve G2/M fazlarında senkronize edildikten sonra adriamisin ile muamele edilmiştir. Rutin olarak kültür edilen adriamisinle muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin morfolojilerini karşılaştıran araştırmacılar adriamisinle muamele edilen hücrelerin düzleşmiş ve aktif yayılım gösteren yapılanmalarına karşın, adriamisin verilmeyen hücrelerin epitel hücrelerine karakteristik sıkı paketlenmiş koloniler oluşturduğu gözlemlemiştir (67). Adriamisin muamelesi, hücre hücre bağlantılarının büyük oranda kaybedilmesine neden olmaktadır. Bu fenotipik değişiklikler, Twist transkripsiyon faktörü tarafından indüklenen epitelyal mezenkimal transisyon profili ile uyum göstermektedir. Ayrıca adriamisine 36 saat maruz bırakılan hücrelerde P-glikoprotein seviyesi, western blot ile taranabilir düzeye ulaşmaktadır. Adriamisine maruziyet, p- glikoprotein substratı olan ilaçların yanı sıra, p-gp ile ilişkisi bildirilmemiş ilaçlara da cevabı olumsuz etkilemiştir (67). Çalışmada adriamisin tarafından indüklenen apoptoz ve EMT fenotipinin büyük oranda hücre siklusuna bağımlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Twist ekspresyonunun adriamisin tarafından hem zaman hem de doza bağımlı olarak arttığı görülmüştür. Twist baskılanması hem adriamisin indüklü EMT fenotipini hem de p-gp ekspresyonunu baskılamıştır. Çalışmada Twist depleksiyonunun, p53-mdm2-Twist kompleksinin harabiyeti üzerinden adriamisin hassasiyetini arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak, Adriamisin tedavisi sonrasında meydana gelen p-glikoprotein indüklü direncin ve EMT kaynaklı daha invaziv hastalık

fenotipinin twist hedeflemeye yönelik terapötik uygulamalar ile azaltılabileceği bildirilmektedir (67). Bizim çalışmamızda ise tümörlerdeki twist gen ekspresyon düzeyleri, tümör örnekleri, adriamisine maruz kalmadan önce stabilize edilerek belirlenmiştir. Li ve ark.'nın adriamisine maruz bıraktıkları hücrelerde bildirdikleri Twist gen ekspresyon artışı ile tümörlerin direnci arasındaki ilişki, bizim çalışmamızda, primer tümörlerde adriamisine maruziyeti öncesinde de belirlenebilmiştir. Çalışmamızda, adriamisine hassas olmayan dokuz tümörden ikisinin aynı zamanda, bir mikrotübül stabilize edici ajan olan taksotere de hassas olmadığı görülmüştür (tablo) Bu iki tümörde, her iki ajana da cevap alınmaması, MDR fenotipini düşündürülebilir. Li ve ark.'nın çalışması ile bizim çalışmamız birlikte değerlendirildiğinde, Twistin, adriamisine maruz kalmadan da bazı tümörlerde p-glikoprotein artışı kaynaklı MDR fenotipine neden olup olmadığı sorusu akla gelmektedir. Yaptığımız literatür taramasında bu konuda yapılmış bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Meme tümörlerinde taksoter (dositaksel) direnci ile twist gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. Twist gen ekspresyonunun mikrotübül hedefleyen ajanlara hassasiyet ile ilişkisini araştıran çalışmalardan ilki, Wang ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada (115) nazofarengeal karsinom hücre hattı HNE1-T3 kullanılmıştır. Çalışmada HNE1 parental hücre hattına taksol muamelesi aracılığıyla direnç kazandırılmış ve dirençli hücre hattı HNE1-T3'ün genomik kopya değişimleri CGH ile incelenmiştir. Bu hücre hattında CGH ile 7p21-22 bölgesinde artış olduğu belirlenmiş ve bu bölgede bulunan TWIST gen ürünü artışı RT-PCR ve Western Blot ile gösterilmiştir.

Yu ve ark. (120) tarafından 2009 yılında, laringeal karsinoma Hep-2 hücre hattında, taksoter ile benzer etki mekanizmasına sahip bir ajan olan paklitaksel indüklü apoptozda twistin rolü olduğunu bildirilmiştir.

Kajiyama ve ark tarafından 2007 yılında (54) epitelyal ovaryan karsinom hücre hatlarında yapılan çalışmada, hücrelerin paklitaksel ile muamelesinin epitelyal

mezenkimal değişimi indüklediği ve bununla birlikte Twist ve Snail transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunda artış görüldüğü bildirilmiştir (54).

Yaptığımız literatür taramasında, taksotere primer direnç ile twist transkripsiyon faktörü ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer bir taksan olan paklitakselin tümörlerindeki etkisi ile twist ekspresyonunu araştıran bir çalışmaya da rastlanmadığından, çalışmamızın taksoter ile ilgili bölümünü literatürle karşılaştırmak güçleşmektedir.

Çalışmamızda ATP-TCA sonucu alınan 26 tümörden sadece 3 tanesi taksotere hassas değilken, aynı tümör popülasyonunda dokuz tümörün adriamisine hassas olmadığı görülmüştür. Bu beklenen bir sonuçtur, çünkü taksoter, kemoterapide kullanılan en etkili ajanlardan biridir (7, 61). Adriamisine ve taksotere hassas olmayan iki grup tümör arasındaki fark, twist transkripsiyon faktörü aracılı olası kemoterapi direnç yolları arasında fark olabileceğini düşündürmektedir.

Twist transkripsiyon faktörünün, kanserde metastatik süreçlere katkı sağladığını bildiren bazı çalışmalar bulunmaktadır (52, 67, 69, 119). Bizim çalışmamızda da, 1 no'lu tümörün metastatik lenf nodundan aldığımız tümör örneğinde twist ekspresyonunun, primer tümördekenden yaklaşık 8,4 kat fazla olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). Bu bulgu, twist transkripsiyon faktörünün anjiyojenik ve metastatik özelliklerini desteklemektedir.

Mironchik ve ark.'nın (78) 2005 yılında, MCF7 meme tümör hücreleri ile yaptıkları araştırmada, MCF7 hücre hattı stabil olarak Twist eksprese eden MC7/Twist hücre hattına dönüştürülmüş ve bu hücre hattının yüksek düzeyde kromozom instabilitesi gösterdiği ve VEGF eksprese ettikleri bildirilmiştir. VEGF'nin anjiyojenik özellikleri ile uyumlu olarak twist eksprese eden hücreler metastatik özellikler göstermişlerdir. Ma ve ark.'nın 2007 yılında yaptıkları çalışmada da, meme kanseri hücre hatlarında Twist aracılı miR-10b aktivasyonunun meme tümörlerinde invazyon ve metastazı başlattığı bildirilmiştir (69). Bizim çalışmamız da da metastatik meme

tümöründe twist ekspresyonunun artmış olması, Mironchik ve ark. İle Ma ve ark.'nın bu yöndeki bulgularını desteklemektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

In vitro kemohassasiyet testleri gibi, ATP-TCA'da, uygulanan ajana tümörün hassasiyetinin, hücre bazında değerlendirilmesini sağlamakta ve tümörlerin kemoterapötik ajanlara direncinin tahminine fayda sağlayacak öngörüsül markırların belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda;

1. ATP-TCA yapılabilecek büyüklükte olan 27 tümör örneğinden 26'sında ATP-TCA başarı ile (%96,3) uygulanmıştır. ATP-TCA, tümörlerde kemohassasiyetin in vitro olarak belirlenmesinde kullanılabilecek pratik bir yöntemdir.
2. İlk defa, meme tümörlerinin merkezinden alınan örneklerde ATP-TCA sonuçları ile değişken twist ekspresyonu ilişkisi gösterilmiştir.
3. Meme tümörlerinden alınan örneklerin in vitro primer taksoter hassasiyeti ile Twist ekspresyon farklılıkları arasında herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız, meme tümörlerinde Twist transkripsiyon faktörü ekspresyon farklılıklarının, adriamisin terapisi için öngörüsül markır adayı olabileceğini desteklemektedir. Elde ettiğimiz bulguların, klinik ve patolojik tam yanıt düzeyleri bilinen neoadjuvan meme kanseri hastalarında Twist transkripsiyon faktörünün restrospektif olarak araştırılmasına temel oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Airley, R., 2009, Cancer Chemotherapy: Basic science to the clinic, John Wiley and Sons Ltd., 342 p.
2. Albanell, J., Ross, J.S., Pronk, L., Gascon, P., 2005, Monoclonal antibody strategies for targeting HER2, in: LaRochelle, W.J. and Shimkets, R.A., eds., The Oncogenomics Handbook, Humana Pres Inc., 627-645 p.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008, Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition, Garland Science, USA, 1268 p.
4. Alle, K.M., Henshall, S.M., Field, A.S., Sutherland, R.L., 1998, Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast . Clin. Cancer Res., 4, 847 – 854 p.
5. Anbazhagan, R., Osin, P.P., Bartkova, J., Nathan, B., Lane, E.B., Gusterson, B.A., 1998, The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast, Journal of Pathology, 184, 197-206 p.
6. Andre, F., Pusztai, L., 2006, Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy, 3, 11, 621-632 p.
7. André, N. and Meille, C., 2006, Taxanes in paediatric oncology, and now?, Cancer Treat. Rev, 32, 2, 65- 73 p.
8. Ansieau, S., Morel, A.P., Hinkal, G., Bastid, J., Puisieux, A., 2010, TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein, Oncogene, 29, 3173–3184 p.
9. Arrick, B.A., 2008, Breast Cancer, in: Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., Thompson, C.B., eds., The Molecular Basis of Cancer, 3th Edition, Saunders Elsevier, 423-429 p.
10. Aydın, A. ve Topuz, E., 2006, Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip, İstanbul Konsensusu, Nobel Tıp Kitabevleri, 80 s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

11. Barros, F.F., Powe, D.G., Ellis, I.O., Green, A.R., 2010, Understanding HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerisation and treatment, *56*, 5, 560-572 p.
12. Bate, M., Rushton and E., Currie, D.A., 1991, Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*, *Development*, 113, 79–89 p.
13. Baylies, M.K, Bate, M., 1996, twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272, 1481–1484 p.
14. Bednarski, B.K., Baldwin, A.S.Jr., Kim, H.J., 2009, Addressing reported pro-apoptotic functions of NF-kappaB: targeted inhibition of canonical NF-kappaB enhances the apoptotic effects of doxorubicin, *Plos One*, 4, 9, e9882.
15. Beser, A.R., Tuzlali, S., Guzey, D., Dolek Guler, S., Hacihanefioglu, S., Dalay, N., 2007, HER-2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer, *13*, 3, 180-185 p.
16. Blumenthal, R.D., 2005, An overview of Chemosensitivity Testing, 3-18 p, in: Blumenthal, eds., R.D., Chemosensitivity, Volume 1, *In Vitro Assays*, 229 p.
17. Boshle, J., and Hall, G., 2006, Principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surgery (Oxford)*, 24, 2, 66-69 p.
18. Boyle, P. and Levin, B., 2008, World Cancer Report, Published by the International Agency for Research on Cancer,
19. Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., 2001, Harrison's Manual of Medicine, 15th Edition, 1000 p.
20. Brown, I., Sangrithi-Wallace, J.N., C Schofield, A.C., 2008, Antimicrotubule agents, in: in: Missailidis, S., *Anticancer Therapeutics*, John Wiley and Sons Ltd., U.K., 79-89 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

21. Buck, .B., Knabbe, C., 2006, Tgf-beta signalling in breast cancer, *Ann. Y. Acad. Sci.*, 1089, 119-126 p.
22. Chang, G. and Chu-Tse W., 2000, Transfer of p14ARF gene in drug-resistant human breast cancer MCF-7/Adr cells inhibits proliferation and reduces doxorubicin resistance, *Cancer Lett.*, 158, 2, 203-210 p.
23. Castanon, I., Von, S.S., Kass, J., Baylies, M.K., 2001, Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development, *Development*, 128, 3145–3159 p.
24. Chen, C., Shen, H.L., Yang, J., Chen, Q.Y., Xu, W.L., 2011, Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib, *J. Canc. Res. Clin. Onc.*, 137, 1, 9-17 p.
25. Chen, G.G. and Lai, P.B.S., eds, 2009, Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy, *Apoptosis in cancer*, Springer, 386 p.
26. Cheng, Zhang, W.Z., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., Wang, L.H., 2008, Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function, *J Biol Chem.* 283, 21, 14665-73 p.
27. Cheng, G.Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C.D., Wang, L.H., 2007, Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to Paclitaxel, *Cancer Res.* 67, 1979–1987 p.
28. Cheng, G.Z., Zhang, W., Wang, L.H, 2008, Regulation of Cancer Cell Survival, Migration, and Invasion by Twist: Akt2 Comes to Interplay, *Cancer Res.*, 68, 4, 957-960 p.
29. Coldwell, K.E., Cutts, S.M., Ognibene, T.J., Henderson, P.T., Phillips, D.R., 2008, Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations, *Nucleic Acids Res.*, 36,16, e100, (Epub 2008 Jul 16).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

30. Collins, T.R.L., Hammes, G.G., Hsieh, T., 2009, Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective, *Nucleic Acids Res.*, 37, 3, 712-20 p.
31. Connelly, L., Barham, W., Onishko, H.M., Sherrill, T., Chodosh, L. A., , Blackwell, T.S., Yull, F.E., 2011, Inhibition of NF-kappa B activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden, *oncogene*, 30, 1410-1412 p.
32. Cooper, G.M., Hausman, R.E., Hücre, Moleküler Yaklaşım, Üçüncü Baskı, 2006, (Çev.: Sakızlı, M., ve Atabey, N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 541- 590 s.
33. Creighton, T.E., 1999, *Encyclopedia of Molecular Biology*, John Wiley and Sons Inc., Canada, 4899 p.
34. Cutts, S.M., Swift, L.P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D.R., 2003, Sequence specificity of adriamycin-DNA adducts in human tumor cells, *Mol Cancer Ther.*, 2, 7, 661-70 p.
35. Dorsey, F.C, Steeves, A.M., Cleveland, J.L., 2008, Apoptosis, Autophagy and Necrosis, in: Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., Thompson, C.B., eds., *The Molecular Basis of Cancer*, 3th Edition, Saunders Elsevier, 205-220 p.
36. F. P. O ' Malley, F.P.O., Chia, S., Tu, D., Shepherd, L.E., Levine,M.N., Bramwell, V.H., I. L. Andrulis, I.L., Pritchard, K.I., 2009, Topoisomerase II Alpha and Responsiveness of Breast Cancer to Adjuvant Chemotherapy, *JNCI*, 101, 9, 644-650 p.
37. Farrell, Jr., R.E., 2010, *RNA Methodologies, A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 4th Edition, Elsevier Inc, USA, 717 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

38. Gewirtz, D.A., 1999, A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin, *Biochemical Pharmacology*, 57, 727–741 p.
39. Gong, X.Q. and Li, L., 2002, Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation, *J. Biol. Chem.* 277, 12310–12317 p.
40. Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., Hortobagyi, G.N., 2007, Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patient with Breast Cancer, in; Yu, D., Hung, M., eds., *Breast Cancer Chemosensitivity*, Springer Science + Business Media, LLC, Landes Bioscience, 1-16 p.
41. Guidelines for ATC classification and DDD assignment, 2010
42. Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., et al. 1999, Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A, *Cell*, 96, 405–413 p.
43. Hamamori, Y., Wu, H.Y., Sartorelli, V., Kedes, L., 1997, The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 6563–6573 p.
44. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000, Hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57-70 p.
45. Hay, E.D., 1995, An overview of epithelio-mesenchymal transformation, *Acta Anat. (Basel)*, 154, 1, 8-20 p.
46. Hebrok, M., Wertz, K., Fuchtbauer, E.M., 1994, M-twist is an inhibitor of muscle differentiation, *Dev. Biol.*, 165, 537–544 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

47. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>
48. <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8il-2006-SON.pdf>
49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1189>
50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/601622>
51. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
52. Hong, J., Zhou, J., Fu, J., He, T., Qin, J., Wang, L., Liao, L., Xu, J., 2011, Phosphorylation of Serine 68 of Twist1 by MAPKs Stabilizes Twist1 Protein and Promotes Breast Cancer Cell Invasiveness, *Cancer Res.* 2011 Apr 18. [Epub ahead of print]
53. Hughes, E.S., 1950, The Development of the Mammary Gland, *Ann R Coll Surg Engl.*, 6, 2, 99-119 p.
54. Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., et al., 2007, Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells, *Int. J. Oncol.* 31, 277–283 p.
55. Kalluri, N., and Neilson, E.G., 2003, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *J. Clin. Invest.*, 112, 12, 1776-1784 p.
56. Kalluri, R., and Weinberg, R.A., 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.*, 119, 6, 1420-1428 p.
57. Kaplan, H.G., Malmgren, J.A., Atwood, M., Goldstein, L.C., 2010, Positive response to neoadjuvant cyclophosphamide and doxorubicin in topoisomerase II nonamplified/HER2/neu negative/polysomy 17 absent breast cancer patients, *Cancer Manag. Res.*, 20, 2, 213-218 p.
58. Karreth, F. and Tuveson, D.A., 2004, Twist induces epithelial mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis, *Cancer Biol. Ther.*, 3, 11, 1058-1059 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

59. Kawachi, K., Sasaki T, Murakami, A., Ishikawa, T., Kito, A., Ota, I., Shimizu, D., Nozawa, A., Nagashima, Y., Machinami, R., Aoki, I., 2010, The topoisomerase II alpha gene status in primary breast cancer is a predictive marker of the response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy, *Pathol. Res. Pract.*, 206, 3, 156-162 p.
60. Kim, J.H, Lee,S.C., Roo, J., Kang, H.S., Kim, H.S., Yoon, S., 2010, Jnk signaling pathway-mediated regulation of Stat3 activation is linked to the development of doxorubicin resistance in cancer cell lines, *Biochem, Pharmacol.*, 79, 3, 373-380 p.
61. Kim, S.J., Noguchi, S., 2008, Prediction of response to docetaxel in breast cancer, *Gan To Kagaku Ryoho*, 35, 2, 190-193 p.
62. Kiyomiya, K., Matsuo,S., Kurebe, M., 2001, Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex, *Cancer Res.*, 61,6, 2467-2471 p.
63. Kunnumakkara, A.B., Anand, P., Aggarwal, B.B., Mehta, 2009, Nuclear Factor- $\kappa$ B and Chemoresistance: How Intertwined Are They?, in: K., Sidik, Z.H., eds., *Drug Resistance in Cancer Cells*, Springer, 177-208 p.
64. Kurbacher, C.M. and Cree, I.A., 2005, Chemosensitivity Testing Using Microplate Adenosine Triphosphate–Based Luminescence Measurements, 101-120 p, in: Blumenthal, eds., R.D., *Chemosensitivity, Volume 1, In Vitro Assays*, 229 p.
65. LaMarca, H.L. ve Rosen, J.M., 2008, Minireview: Hormones and Mammary Cell Fate-What Will I Become When I Grow Up?, *Endocrinology*, 149, 4317-4321 p.
66. Lester, S.C., 2010, The Breast, in Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J., eds., *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition, Saunders Elsevier Inc., Philadelphia, chapter 23, 1464 p.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

67. Li, Q.Q., Xu, J.D., Wang, W.J., Cao, X.X., Chen, Q., Thang, F., Chen, Z.Q., Liu, X.P., Xu, Z.D., 2009, Twist1 mediated, adriamycin induced epithelial mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells, *Clin. Canc. Res.*, 15, 8, 2657-2665, p.
68. LoPiccolo, J., Granville, CA., Gills, J.J., Dennis, P.A., 2007, Targetin Akt in cancer therapy, *Anticancer Drugs*, 18, 8, 861- 874 p.
69. Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Weinberg, R.A., 2007, Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer, *Nature*, 449, 682–688 p.
70. Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., et al., 1999, Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis, *Genes Dev.* 13, 2207–2217 p.
71. Marques, S.M. and Esteves da Silva, J.C., 2009, Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions, *IUBMB Life*, 61, 1, 6-17 p.
72. Massari, M.E., and Murre, C., 2000, Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms, *Molecular and Cellular Biology*, 20, 2, 429-440 p.
73. McClendon, A.K. and Neil Osheroff, N., 2007, DNA Topoisomerase II, Genotoxicity, and Cancer, *Mutat Res.*, 623,1-2, 83-97 p.
74. McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N., McCann, A., 2008, Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1785, 2, 96-132 p.
75. McPherson, M.J., Simon Geir Møller, 2006, PCR, Second Edition, Taylor and Francis Group, 305 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

76. Meyer, K.N., Kjeldsen, E., Straub, T., et al., 1997, Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities, *J. Cell Biol.*, 136, 775-788 p.
77. Minotti, G., Menna, P., Emanuela, S., Cairo, G., Gianni, L., 2004, Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol. Reviews*, 56, 185-229 p.
78. Mironchik, Y., Winnard, Jr. P.T., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., et al., 2005, Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer, *Cancer Res.* 65, 10801–10809 p.
79. Moses, H. and Barcellos-Hoff, M.H., 2011, TGF- $\beta$  Biology in Mammary Development and Breast Cancer, *Cold Spring Harb. Persp. Biol.*, 3, 1, doi: 10.1101/cshperspect.a003277.
80. Noguchi, S., 2006, Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers, *Cancer Sci.*, 97, 9, 813-820 p.
81. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., 2007, *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, Seventh Edition, Saunders Elsevier, 585 p.
82. Oakman, C., Moretti, E., Di Leo, A., 2010, Re-searching anthracycline therapy, *Breast Cancer Res. Treat.*, 123, 1, 171-175 p.
83. Oliveria, A.M., Ross, J.S., Fletcher, J.A., 2005, Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and caretakers, *Am. J. Clin. Pathol.*, 124 Suppl., 16-28 p.
84. Ormandy, C.J., Musgrove, E.A., Hui, R., Daly, R.J., Sutherland, R.L., 2003, Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer . *Breast Cancer Res. Treat.* 78, 323 – 335 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

85. Pan, D., Fujimoto, M., Lopes, A., Wang, Y.X., 2009, Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism, *Cell*, 137, 73–86 p.
86. Paz, M.M., Missailidis, S., 2008, Antitumor Antibiotics, in: Missailidis, S., *Anticancer Therapeutics*, John Wiley and Sons Ltd., U.K., 111-124 p.
87. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Knabb JR, Papa S, Kuntzen C et al, 2007, Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs, *Mol. Cell. Biol.* 27,3920–3935 p.
88. Polyak, K. and Kalluri, R., 2010, The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, November 2010, 2:a003244.
89. Polyak, K., 2007, Breast cancer: origins and evolution, 117,11, 3155-3163 p.
90. Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., Ansieau, S., 2006, A twist for survival and cancer progression, *Br. J. Cancer*, 94, 13–17 p.
91. Pusztai, L., 2007, Markers predicting clinical benefit in breast cancer from microtubule-targeting agents, *Ann. Oncol.*, 18 Suppl. 12, xii, 15-20 p.
92. Pusztai, L and Christos Sotiriou, C., Gene expression profiles, prognosis and prediction of response to endocrine therapy and chemotherapy, in; Walker, R.A. and Thompson, A.M., eds., *Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer*, Second Edition, Informa UK Ltd., 139- 147 p.
93. Rakha, E.A., Rampaul, R.S., Bartlett, J.M.S., Ellis, I.O., 2008, Assessment of human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer, in: Walker, R.A. and Thompson, A.M., eds., *Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer*, Second Edition, Informa UK Ltd., 169-182 p.
94. Ravdin, P.M., Siminoff, I.A., Harvey, J.A., 1998, Survey of breast cancer patients concerning their knowledge and expectations of adjuvant therapy, *J. Clin. Oncol.*, 16,2,515-521 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)**

95. Rivera, E., 2010, Implications of anthracycline-resistant and taxane-resistant metastatic breast cancer and new therapeutic options. *Breast J.*, 16, 3, 252-263 p.
96. Roberti, A., Macalusa, M., Giordano, A., 2009, Alterations in cell cycle regulatory genes in breast cancer, in: Giordano, A. and Normano, N., eds., 2009, *Breast Cancer in the Post-Genomic Era*, Humana Press, 55-77 p,
97. Roche Applied Science, Technical Note LC13/2001, Relative Quantification.
98. Roche Applied Science, Technical Note LC16/2005, Customising Light Cycler Relative Quantification Technics for Spesific Applications.
99. Roche, Light Cycler 480, Instrument Operator's Manual, V1.5.
100. Runge, M.S. and Patterson, C., 2006, *Principles of Molecular Medicine*, Humana Press, 1304 p.
101. Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., et al., 2008, Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction, *Oncogene*, 27, 5543–5553 p.
102. Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Uchiumi, T., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Yamamoto, K., Seki, N., Naito, S., 2010, P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci.* 101, 8, 1797-1806 p.
103. Snoj, N., Dinh, P., Bedard, P., Sotiriou, C., 2009, *Molecular Biology of Breast Cancer*, in: Coleman, W.B. and Tsongalis, G.J., eds., Academic Press Elsevier Inc, *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*, 501-517 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

104. Staples, O., Lain, S., Ziyaie, D., Thompson, A.M., 2008, p53 and breast cancer, in: Walker, R.A. and Thompson, A.M., eds., Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer, Second Edition, Informa UK Ltd., 148-167 p.
105. Stasinopoulos, I.A., Mironchik, Y., Raman, A., Wildes, F., Winnard, Jr. P., Raman, V., 2005, HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 280, 2294–2299 p.
106. Strachan, T. and Read, A.P., 2004, Human Molecular Genetics Third Edition, Garland Publishing, USA, 674 p.
107. Strom, E.A., Buzdar, A.U., Hunt, K.K., 2007, Multidisciplinary care of breast cancer patients: overview and implementation, in: Hunt, K.K., Robb, G.L., Strom, E.A., Ueno, N.T., eds., MD Anderson Cancer Series, Breast Cancer, 1-18 p.
108. Swift L.P., Rephaeli, A., Abraham Nudelman, A., et al., 2006, Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-mediated form of cell death, *Cancer Res.* 66, 9, 4863-71 p.
109. Thisse, B., El Messal, M., Perrin-Schmitt, F., 1987, The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern, *Nucleic Acids Res.*, 15, 8, 3439-53 p.
110. Thorn, C.F., Oshiro Connie, Marsh Sharon, Hernandez-Boussard Tina, McLeod Howard, Klein Teri E, Altman Russ B., 2010, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenetics and genomics*.
111. Vesuna, F., Raman V., 2010, review in; <http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=1030>.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

112. Vichalkovski, A., Gresko, E., Hess, D., Restuccia, D.F., Hemmings, B.A., 2010, PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage, *Oncogene*. 17, 29, 24, 3554- 3565 p.
113. Villman, K., Sjöström, J., Heikkilä, R., Hultborn, R., Malmström, P., Bengtsson, N.O., Söderberg, M., Saksela, E., Blomqvist, C., 2006, TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer, *Acta Oncol.*, 45, 5, 590-596 p.
114. Wang, S. M., Coljee, V. W., Pignolo, R. J., Rotenberg, M. O., Cristofalo, V. J., Sierra, F., 1997, Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187, 83-92 p.
115. Wang, X., Ling, M.T., Guan, X.Y., Tsao, S.W., Cheung, H.W., Lee, D.T., et al., 2004, Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells, *Oncogene*, 23, 474–482 p.
116. Watson, C.J. and Khaled, W.T., 2008, Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment, *Development*, 135, 6, 995-1003 p.
117. Weldon, C.B., Burow, M.E., Rolfe, K.W., Clayton, J.I., Jafee, B.M., Beckman, B.S., 2001, NF- $\kappa$ B-mediated chemoresistance in breast cancer cells, *Surgery*, 130, 2, 143- 150 p.
118. Winchester, D.J. and Winchester, D.P., eds., 2000, American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology, Breast Cancer, BC Decker Inc., Hamilton, London, 294 p.
119. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A., 2004, Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis., *Cell*, 25,117, 7, 927- 939 p.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)**

120. Yu, Li.H.Z., Lu, S.M., Liu, W.W., Li, J.F., Wang, H.B., Xu,W., 2009, Alteration in TWIST expression: possible role in paclitaxel-induced apoptosis in human laryngeal carcinoma Hep-2 cell line, *Croat. Med. J.*, 50, 6, 536-542 p.
121. Yu, L.L., Dai, N., Yu, H.G., Sun, L.M, Si, J.M., 2010, Akt associates with nuclear factor kappaB and plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells, *Oncol. Rep.*, 24, 1, 113-119 p.

## ÖZGEÇMİŞ

### **Bireysel Bilgiler**

Adı Soyadı : SELMA ULUSAL  
Doğum Tarihi ve Yeri : 10. 07. 1980 Eskişehir  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Evli  
İletişim Adresleri: Atakent Mh, Selçuklu Cad. Defne B1-51 D10 İSTANBUL  
0 533 250 41 16  
selmademir1980@gmail.com

### **Eğitim Durumu:**

İlköğretim : Ziya Gökalp İ.Ö.O-1994  
Ortaokul : Prof. Dr. Orhan Oğuz And. Lisesi-1998  
Üniversite: Fen-Edb. Fak Biyoloji Bölümü- 2003  
Yüksek Lisans: Osmangazi Ün. Sağlık Bil. Enst. Tıbbi Genetik AD-2005

### **Üye Olunan Kuruluşlar:**

:Tıbbi Genetik Derneği  
:Biyologlar Derneği