



T.C.  
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN  
FARKLI EVRELERDEKİ  
MEME KANSERLİ HASTALARDA  
TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bilgesu ERSAN**

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2016



T.C.  
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN  
FARKLI EVRELERDEKİ  
MEME KANSERLİ HASTALARDA  
TESPİTİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bilgesu ERSAN**

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 1676 nolu proje ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı (2014-3) ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2016

T.C.  
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin  
Farklı Evrelerdeki Meme Kanserli Hastalarda Tespiti

Bilgesu ERSAN

Yüksek Lisans Tezi

27/07/2016

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN

Doç. Dr. Nuriye ÖZDEMİR

Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Yrd. Doç. Dr. Mustafa Emre ERCİN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için  
gerekten tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

27/07/2016



Bilgesu ERSAN

*Her an sevgi ve desteklerini hissettiğim aileme, meme kanseri hastası  
anneanneme ve tüm kanser hastalarına ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim için beni ekibine kabul eden, bu süreçte her türlü bilgi birikimini, deneyimlerini esirgemeyen, yeni bakış açısı kazandıran, yetişmem için elinden gelen tüm desteği sağlayan, danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemi sağlayan Enstitü Müdürümüz ve Anabilim Dalı öğretim üyelerimizden değerli hocam Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e ve desteğini her aşamada hissettiğim, her türlü imkanı sağlamaya çalışan Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının her aşamasında bilgilerini, deneyimlerini ve imkanını esirgemeyen Uzm. Dr. Ferda ALPARSLAN PINARLI'ya, deneyler sırasında her türlü desteği veren Uzm. Bio. Meral TİRYAKİ, Akan Hücre Ölçer çalışmaları sırasında çok emeği geçen Bio. Emrullah ÇALIŞIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre boyunca, destek ve yardımlarını esirgemeyen, beraber çalışmaktan zevk duyduğum, birçok güzel anılar paylaştığım, her zaman özlemlerle hatırlayacağım sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Tuğba Kevser ARKAN, Arş. Gör. Beyza Ecem ÖZ, Arş. Gör. Elif ERCAN'a, öğrenimim boyunca desteklerini gördüğüm arkadaşlarım Mol. Bio. Yeter DİLEK, Arş. Gör. Emine TERZİ, Arş. Gör. Tuba ÖZDEMİR ve Arş. Gör. İlkay PİŞKİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülebilmesi için her türlü kolaylığı sağlayan Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Birimi ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Birimi doktorlarına, hemşirelerine ve çalışmama dahil olan tüm meme kanserli hastalara sonsuz teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana sonsuz destek veren, zor anlarımda yanımda olan ve bu süreçte anlayışlarını eksik etmeyen her zaman yanımda olduklarını bildiğim, dayanağım aileme, beni büyüten anneanneme ve babaanneme çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Program ile maddi olarak destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xviii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Kanser Nedir? .....	4
2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi .....	5
2.1.2. Kanser Histopatolojisi .....	6
2.1.3. Kanserın Moleküler Temeli .....	8
2.1.4. Kanserın Karakteristik Özellikleri .....	9
2.1.5. Kanserde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm ve Mezenkimal Epitelyal Dönüşüm .....	12
2.1.6. Kanser Kök Hücre (CSC) Modelleri .....	16
2.2. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (CTC).....	18
2.2.1. CTC Nedir? .....	18
2.2.2. CTC Tespiti .....	23
2.2.2.1. CTC Saptama Basamağı.....	25
2.2.3. CTC Eşik Değeri.....	29
2.3. Meme Kanseri .....	30
2.3.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	30
2.3.2. Meme Kanseri Etiyolojisi.....	30
2.3.3. Meme Anatomisi .....	31
2.3.4. Meme Kanseri Patolojisi .....	32



2.3.3.1.Meme Kanseri Alt Türlerinin Histolojik Sınıflandırılması .....	32
2.3.3.2.Meme Kanseri Alt Türlerinin Moleküler Sınıflandırması.....	36
2.3.5. Meme Kanseri Evrelendirmesi.....	38
2.3.6. Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörleri .....	39
2.4. Kanser Tanısında Kullanılan Yöntemler .....	40
2.4.1. Meme Kanseri Metastazını Belirleme Yöntemleri .....	40
2.4.2. Tümör Belirteçleri .....	41
2.4.3. CTC'nin Likit Biyopsi Olarak Kullanımı .....	42
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>44</b>
3.1. Materyal .....	44
3.1.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması .....	44
3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılacak Sarf Malzeme ve Cihazlar.....	44
3.1.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Tamponlar .....	48
3.2. Yöntem.....	48
3.2.1. Akan Hücre Ölçer Çalışma Prensibi .....	48
3.2.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması .....	52
3.2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan CTC Zenginleştirme Basamakları..	52
3.2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan CTC Saptama Basamağı .....	55
3.3. İstatistiksel Analiz.....	59
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>61</b>
4.1. Meme Kanserli Hastaların Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları.....	64
4.2. Sağlıklı Bireylerin Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları .....	83
4.3. Takip Edilen Hastaların Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları.....	104
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>111</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>116</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>118</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>133</b>

EK-1. CTC saptama metotlarının tahmini duyarlılığı, avantajları, dezavantajları .....	133
EK-2. Meme Kanseri TNM Evrelemesi ve Özellikleri. ....	134
EK-3. Meme Kanseri TNM Evrelemesi Kriterleri.....	135
EK-4. Meme Kanseri TNM Evrelemesi .....	136
EK-5. Çalışmaya dahil edilen meme kanserli hastaların ER, PR statüleri, c-erb- B2 değerleri ve saptanan CTC subpopulasyon sayıları .....	137
EK-6. Tezden Üretilen Yayın.....	138
EK-7 Uluslararası Platformda Sunulmuş Bildiri (Poster).....	139
EK-8. Ulusal Platformda Sunulmuş Bildiri (Poster).....	142
EK-9. Etik Kurul Formu.....	144
EK-10. Gönüllü Olur Formu.....	148
EK-11. Özgeçmiş.....	150

## ÖZET

### **Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Farklı Evrelerdeki Meme Kanserli Hastalarda Tespiti**

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen, ölüme sebep olabilen bir kanser türüdür. Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler), meme kanserli hastalar için tümör belirteci olarak prognostik bilgi sunabilecek nadir hücrelerdir. Meme kanserli hastalarda CTC varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu nedenle çalışmamızda, meme kanserli hastalardaki CTC sayısı ile ER, PR durumu, c-erb-B2 değeri, serum tümör belirteç (CEA ve CA15-3) seviyeleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya, 11 meme kanserli hasta ve 8 sağlıklı gönüllü kadın dahil edilmiştir. Periferik kan örneğinin, ficol yoğunluk farkına dayalı ayrımı ve CD45 kaplı mikroboncuklar kullanılarak negatif seçilimi gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirilmiş hücreler, Anti-CK(14,15,16,19), Anti-CK(7,8), Anti-EpCAM, Anti-CD45, Anti-CD44 ve Anti-CD24 antikolar ile işaretlenmiştir. Tüm hücreler BD FACS Aria™ III Cell Sorter (akan hücre ölçer) ile analiz edilmiştir. CTC'ler, CK<sup>+</sup> CTC, EpCAM<sup>+</sup>CTC, CK<sup>+</sup>CSC, EpCAM<sup>+</sup>CSC ve CSC olarak subpopulasyonlarına ayrılmıştır.

İstatistiksel analizler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda daha fazla sayıda CTC olduğunu göstermiştir. CTC sayısı ile ER ve PR durumu, c-erb-B2 değeri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ( $p<0.05$ ). Buna ek olarak, CTC sayısı ile serum tümör belirteç seviyeleri arasında da ilişki bulunamazken, sadece EpCAM<sup>+</sup>CTC ile CEA seviyesi arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akan hücre ölçer, Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC), Kanser kök hücresi (CSC), Meme kanseri, Meme kanseri evreleri

## ABSTRACT

### **The Detection of Circulating Tumor Cells in The Varying Stages of Breast Cancer Patients' Blood**

Breast cancer is the most common cancer among women cause of cancer death worldwide. Circulating tumor cells (CTCs) are rare cancer cells that might represent prognostic information as a tumor biomarker for breast cancer patients. The presence of CTCs in breast cancer has been associated with worse prognosis. For this reason, we aim to evaluate the association among the status of ER and PR, c-erb-B2 values and the levels of serum tumor markers (CEA and CA15-3), tumor stages and CTC count in breast cancer patients.

The study is conducted with 11 breast cancer patients and 8 healthy volunteer women. Peripheral blood samples are separated by ficoll gradient and negatively selected with CD45 magnetic microbeads. The enriched cells are labelled with antibodies such as Anti-CK(14,15,16,19), Anti-CK(7,8), Anti-EpCAM, Anti-CD45, Anti-CD44 and Anti-CD24 for detection step. All cells are analysed by BD FACS Aria™ III Cell Sorter. We classify CTCs as subpopulations such as CK<sup>+</sup>CTC, EpCAM<sup>+</sup>CTC, CK<sup>+</sup>CSC, EpCAM<sup>+</sup>CSC, and CSC by our gating strategies.

The results of our statistical analyses indicate that a large number of CTCs are counted in patients group compare to the control group. The results show that there is no a significant relationship among tumor stages, the status of ER and PR, c-erb-B2 values and CTC count in breast cancer patients ( $p < 0.05$ ). Furthermore, no correlation is found between CTC count and serum tumor markers in breast cancer patients, but a significant correlation is shown between the presence of EpCAM<sup>+</sup>CTC and CEA levels.

**Keywords:** Breast cancer, Breast cancer stages, Cancer stem cell (CSC), Circulating tumor cells (CTCs), Flow cytometry

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:	Yüzde
~	:	Yaklaşık
°C	:	Santrigrat Derece
g	:	Relatif Santrifüj Kuvveti (RCF)
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
Na	:	Sodyum
pH	:	Potansiyel Hidrojen
µL	:	Mikrolitre
AJCC	:	American Joint Committee on Cancer
ALDH	:	Aldehid Dehidrojenaz
ALDH1	:	Aldehid Dehidrojenaz-1
APC-H7	:	Allophycocyanin-Hilite-7
ASCO	:	American Society of Clinical Oncology
BCM	:	Meme Kanseri Musin Antijeni
BRCA1	:	Meme Kanseri Duyarlılık Genleri 1
BRCA2	:	Meme Kanseri Duyarlılık Genleri 2
BSA	:	Sığır Serum Albumini
CA 27.29	:	Meme Kanseri-İlişkili Antijen 27.29
CA15-3	:	Yüksek Molekül Ağırlıklı Glikoprotein Ailesi ve Ürünleri
CD	:	Cluster of Differentiation
CD133	:	Cluster of Differentiation 133
CD24	:	Cluster of Differentiation 24
CD44	:	Cluster of Differentiation 44
CD45	:	Cluster of Differentiation 45
CD47	:	Cluster of Differentiation 47
cDNA	:	Komplementer DNA
CEA	:	Karsinoembriyonik Antijen
CK	:	Sitokeratin
CK14	:	Sitokeratin 14
CK15	:	Sitokeratin 15

CK16	:	Sitokeratin 16
CK19	:	Sitokeratin 19
CK7	:	Sitokeratin 7
CK8	:	Sitokeratin 8
CSC	:	Kanser Kök Hücresi
CT	:	Bilgisayarlı Tomografi
CTC	:	Circulating Tumor Cell
DAPI	:	4,2-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroklorür
DKİS	:	Duktal Karisinom İn Situ
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	:	Dulbecco Fosfat-Tampon Tuzu
DTC	:	Disemine Tümör Hücresi
ECM	:	Ekstraselüler Matriks
EDTA	:	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGFR	:	Epitelyal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT	:	Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
EpCAM	:	Epitelyal Adezyon Molekülü
ER	:	Östrojen Reseptörü
FBS	:	Fetal Sığır Serumu
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FISH	:	Florans in Situ Hibridizasyon
FITC	:	Fluorescein Isothiocyanate
FL	:	Floresan
FoxC2	:	Forkhead Box Protein C2
FS	:	İleri Saçılım (Forward Scatter)
G <sub>0</sub> evresi	:	Hücre Dinlenme Evresi
G <sub>1</sub> evresi	:	Hücre Bölünme Evresi
GD	:	Gangliosit
GD1a	:	Gangliosit 1a
GD2	:	Gangliosit 2
GD3	:	Gangliosit 3
HER2	:	İnsan Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IGF	:	İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu

IGF1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu 1
IHC	:	İmmunohistokimya
LKİS	:	Lobüler Karsinom İn Situ
M	:	Uzak Organ Metastazı Varlığı
MACs	:	Manyetik Aktif Hücre Sıralama
MAPK	:	Mitojen-Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
MCA	:	Meme Karinoma Antijeni
MET	:	Mezenkimal Epitelyal Dönüşüm
MR	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
m-RNA	:	Mesajcı RNA
MUC1	:	Musin 1
N	:	Lenf Nodu Tutulumu
PBMC	:	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PCR	:	Real Time Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
PE	:	Phycoerythrin
PERCP	:	Peridinin-Chlorophyll Proteinleri
PET	:	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K	:	Fosfoinositid-3-Kinaz
PMT	:	Foto Çoğaltıcı Lamba
PR	:	Progesteron Reseptörü
qPCR	:	Real Time Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
RB	:	Retinoblastom Geni
RNA	:	Ribonükleik Asit
RTK	:	Reseptör Tirozin Kinazlar
RT-PCR	:	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon Tepkimesi
S fazı	:	Sentez Fazı
SPSS	:	Statistical Package For Social Sciences
SS	:	Yana Saçınım (Side Scatter)
T	:	Primer Tümör Boyutu
TNM	:	Tümör-Nod-Metastaz
TP53	:	Tümör Baskılayıcı Protein 53 Geni
TPA	:	Doku Polipeptit Antijeni
TrkB	:	Tropomiyozin İlişkili Kinaz B

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu  
UICC : Union Internationale Contre Le Cancer  
VEGF : Vasküler Endetelyal Büyüme Faktörü  
WHO : Dünya Sağlık Örgütü





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal ve kanser hücresinde büyüme.....	4
Şekil 2.2. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri.....	6
Şekil 2.3. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri.....	6
Şekil 2.4. Kanser gelişim basamakları.....	7
Şekil 2.5. Kansere özgü biyolojik karakterler.....	10
Şekil 2.6. İnvazyon ve metastaz .....	13
Şekil 2.7. EMT sürecinde hücre-hücre adezyon kaybı ve sitoiskeletin yeniden düzenlenmesi.....	15
Şekil 2.8. Klonal gelişim modeli.....	17
Şekil 2.9. CTC ve metastatik kasted.....	19
Şekil 2.10. Boyut farkına dayalı ayırım .....	24
Şekil 2.11. Fikol ile yoğunluk farkına dayalı ayırım .....	25
Şekil 2.12. İmmunomanyetik ayırım stratejisi.....	26
Şekil 2.13. CTC saptama yöntemleri CTC saptama yöntemleri.....	27
Şekil 2.14. Meme anatomisi ve histolojisi.....	32
Şekil 2.15. Normal meme dokusundan invasiv karsinom gelişimi.....	33
Şekil 2.16. Meme kanseri alt türlerinin histopatolojik sınıflandırılması .....	34
Şekil 2.17. Meme kanallarında duktal karsinoma in sitü gelişimi.....	35
Şekil 2.18. Meme loblarında lobular karsinoma in sitü gelişimi .....	35
Şekil 3.1. Akan hücre ölçer temel prensibi. ....	48
Şekil 3.2. BD FACS Aria III akan hücre ölçer.....	49
Şekil 3.3. FS ve SS dedektörleri ile hücrelerin kanaldan geçişi .....	50
Şekil 3.4. FS/SS histogramda periferik kan hücrelerinin dağılımı .....	51
Şekil 3.5. a) Kan örneği b) PBS ile sulandırılmış kan örneği c) Fikol ayırımı öncesi kan örneği d) Fikol ayırımı sonrasında oluşan tabakalar .....	53
Şekil 3.6. İmmunomanyetik ayırım.....	54
Şekil 3.7. Çalışma sırasında 1 hasta için oluşturulan tüpler ve özellikleri. ....	56

<b>Şekil 3.8.</b> CTC zenginleştirme ve saptama basamakları.....	60
<b>Şekil 4.1.</b> CK tabanlı CTC kapılaması.....	62
<b>Şekil 4.2.</b> EpCAM tabanlı CTC kapılaması.....	63
<b>Şekil 4.3.</b> CK tabanlı CSC kapılaması.....	63
<b>Şekil 4.4.</b> EpCAM tabanlı CSC kapılaması.....	63
<b>Şekil 4.5.</b> CSC tabanlı kapılaması.....	64
<b>Şekil 4.6.</b> E2H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı... ..	65
<b>Şekil 4.7.</b> E2H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	65
<b>Şekil 4.8.</b> E2H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı... ..	66
<b>Şekil 4.9.</b> E2H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı.....	66
<b>Şekil 4.10.</b> E2H1'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	67
<b>Şekil 4.11.</b> E2H2' nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	67
<b>Şekil 4.12.</b> E2H2' nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	68
<b>Şekil 4.13.</b> E2H2' nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	68
<b>Şekil 4.14.</b> E2H2' nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı.....	68
<b>Şekil 4.15.</b> E2H2' nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	68
<b>Şekil 4.16.</b> E2H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	69
<b>Şekil 4.17.</b> E2H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	69
<b>Şekil 4.18.</b> E2H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	69
<b>Şekil 4.19.</b> E2H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup>	

CSC sayısı.....	70
<b>Şekil 4.20.</b> E2H3'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	70
<b>Şekil 4.21.</b> E3H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	70
<b>Şekil 4.22.</b> E3H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	71
<b>Şekil 4.23.</b> E3H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	71
<b>Şekil 4.24.</b> E3H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı.....	71
<b>Şekil 4.25.</b> E3H1'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	71
<b>Şekil 4.26.</b> E3H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	72
<b>Şekil 4.27.</b> E3H2'nin tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	72
<b>Şekil 4.28.</b> E3H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	73
<b>Şekil 4.29.</b> E3H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	73
<b>Şekil 4.30.</b> E3H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	73
<b>Şekil 4.31.</b> E3H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı.....	73
<b>Şekil 4.32.</b> E3H3'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	74
<b>Şekil 4.33.</b> E3H4'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	74
<b>Şekil 4.34.</b> E3H4'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	74
<b>Şekil 4.35.</b> E3H4'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC	

sayısı.....	75
<b>Şekil 4.36.</b> E3H4'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı.....	75
<b>Şekil 4.37.</b> E3H4'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	75
<b>Şekil 4.38.</b> E3H5'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	76
<b>Şekil 4.39.</b> E3H5'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	76
<b>Şekil 4.40.</b> E3H5'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	76
<b>Şekil 4.41.</b> E3H5'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı.....	76
<b>Şekil 4.42.</b> E3H5'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	77
<b>Şekil 4.43.</b> E3H5'in izotip boyaması.....	77
<b>Şekil 4.44.</b> E3H5'in izotip boyaması.....	78
<b>Şekil 4.45.</b> E3H5'in izotip boyaması.....	78
<b>Şekil 4.46.</b> E3H5'in izotip boyaması.....	79
<b>Şekil 4.47.</b> E3H5'in izotip boyaması.....	79
<b>Şekil 4.48.</b> E4H1'in CK tabanlı tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	80
<b>Şekil 4.49.</b> E4H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	80
<b>Şekil 4.50.</b> E4H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	81
<b>Şekil 4.51.</b> E4H2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	81
<b>Şekil 4.52.</b> E4H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	81
<b>Şekil 4.53.</b> E4H2'nin EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen	

EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	82
<b>Şekil 4.54.</b> E4H2'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı. ....	82
<b>Şekil 4.55.</b> E4H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	82
<b>Şekil 4.56.</b> E4H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	83
<b>Şekil 4.57.</b> K1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	84
<b>Şekil 4.58.</b> K1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	85
<b>Şekil 4.59.</b> K1'in izotip kontrol boyaması. ....	85
<b>Şekil 4.60.</b> K1'in izotip kontrol boyaması. ....	86
<b>Şekil 4.61.</b> K2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı....	86
<b>Şekil 4.62.</b> K2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	87
<b>Şekil 4.63.</b> K2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı....	87
<b>Şekil 4.64.</b> K2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	87
<b>Şekil 4.65.</b> K2'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	87
<b>Şekil 4.66.</b> K3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	88
<b>Şekil 4.67.</b> K3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	88
<b>Şekil 4.68.</b> K3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	88
<b>Şekil 4.69.</b> K3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	89
<b>Şekil 4.70.</b> K3'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	89
<b>Şekil 4.71.</b> K4'ün CK tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	89
<b>Şekil 4.72.</b> K4'ün EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı. ....	90

<b>Şekil 4.73.</b> K4'ün CK tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	90
<b>Şekil 4.74.</b> K4'ün EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	90
<b>Şekil 4.75.</b> K4'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	90
<b>Şekil 4.76.</b> K5'in CK tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	91
<b>Şekil 4.77.</b> K5'in EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı. ....	91
<b>Şekil 4.78.</b> K6'nın CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	92
<b>Şekil 4.79.</b> K6'nın EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	92
<b>Şekil 4.80.</b> K6'nın CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	93
<b>Şekil 4.81.</b> K6'nın EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	93
<b>Şekil 4.82.</b> K6'nın CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	94
<b>Şekil 4.83.</b> K7'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	94
<b>Şekil 4.84.</b> K7'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	94
<b>Şekil 4.85.</b> K7'nin CK tabanlı tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	95
<b>Şekil 4.86.</b> K7'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	95
<b>Şekil 4.87.</b> K7'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	95
<b>Şekil 4.88.</b> K8'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	96
<b>Şekil 4.89.</b> K8'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı.....	96
<b>Şekil 4.90.</b> K8'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	96

<b>Şekil 4.91.</b> K8'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	96
<b>Şekil 4.92.</b> K8'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	97
<b>Şekil 4.93.</b> Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CK <sup>+</sup> CTC ve EpCAM <sup>+</sup> CTC sayıları. ....	99
<b>Şekil 4.94.</b> Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CK <sup>+</sup> CSC ve EpCAM <sup>+</sup> CSC sayıları. ....	100
<b>Şekil 4.95.</b> Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CSC sayıları.....	101
<b>Şekil 4.96.</b> Hasta grubunda tespit edilen CK <sup>+</sup> CTC ve CK <sup>+</sup> CSC hücre sayıları. ....	102
<b>Şekil 4.97.</b> Hasta grubunda tespit edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC ve EpCAM <sup>+</sup> CSC .....	103
<b>Şekil 4.98.</b> E2H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	104
<b>Şekil 4.99.</b> E2H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı. ....	105
<b>Şekil 4.100.</b> E2H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	105
<b>Şekil 4.101.</b> E2H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	105
<b>Şekil 4.102.</b> E2H2T'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CTC sayısı.....	105
<b>Şekil 4.103.</b> E2H2'nin tedavi ile değişen CK <sup>+</sup> CTC ve EpCAM <sup>+</sup> CTC sayıları.....	106
<b>Şekil 4.104.</b> E2H2'nin tedavi ile değişen CK <sup>+</sup> CSC ve EpCAM <sup>+</sup> CSC sayıları. ....	106
<b>Şekil 4.105.</b> E2H2'nin tedavi ile değişen CSC sayısı.....	107
<b>Şekil 4.106.</b> E4H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CTC sayısı.....	107
<b>Şekil 4.107.</b> E4H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CTC sayısı. ....	108
<b>Şekil 4.108.</b> E4H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK <sup>+</sup> CSC sayısı.....	108

<b>Şekil 4.109.</b> E4H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM <sup>+</sup> CSC sayısı. ....	108
<b>Şekil 4.110.</b> E4H2T'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.....	108
<b>Şekil 4.111.</b> E4H2T meme kanserli hastanın tedavi ile değişen CK <sup>+</sup> CTC ve EpCAM <sup>+</sup> CTC sayıları.....	109
<b>Şekil 4.112.</b> E4H2T meme kanserli hastanın tedavi ile değişen CK <sup>+</sup> CTC ve EpCAM <sup>+</sup> CTC sayıları.....	109
<b>Şekil 4.113.</b> E4H2T meme kanserli hastanın tedavi ile değişen CSC sayıları.....	110





## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Ülkemizde cinsiyete göre en sık görülen ilk beş kanser türü .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> Kanser hücrelerinin karakteristik belirteçleri .....	14
<b>Tablo 2.3.</b> Normal somatik kök hücresi ve kanser kök hücresinin özellikleri.....	16
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada yararlanılan sarf malzemeler .....	45
<b>Tablo 3.2.</b> CTC zenginleştirme basamaklarında kullanılan sarf malzemeler .....	45
<b>Tablo 3.3.</b> Hücre yüzey moleküllerini işaretlemeye kullanılan florokrom bağlı antikolar .....	46
<b>Tablo 3.4.</b> Hücre içi boyamada kullanılan florokrom bağlı antikolar .....	46
<b>Tablo 3.5.</b> Çalışmada yararlanılan alet ve cihazlar .....	47
<b>Tablo 3.6.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler .....	47
<b>Tablo 3.7.</b> CD45 deplesyonu için kullanılan malzemelerin miktarı .....	54
<b>Tablo 3.8.</b> Hücre yüzeyini işaretlemeye kullanılan antikor miktarları .....	57
<b>Tablo 3.9.</b> Hücre içini işaretlemeye kullanılan antikor miktarları .....	58
<b>Tablo 3.10.</b> Hücre yüzeyini işaretlemeye kullanılan izotip antikor miktarları .....	58
<b>Tablo 3.11.</b> Hücre içini işaretlemeye kullanılan izotip antikor miktarları .....	59
<b>Tablo 4.1.</b> Hastaların demografik, klinik özellikleri.....	61
<b>Tablo 4.2.</b> CTC gruplandırması .....	62
<b>Tablo 4.3.</b> Hasta ve takip gruplarının adlandırılması.....	64
<b>Tablo 4.4.</b> Çalışmaya dahil edilen meme kanserli hastalarda saptanan CTC sayıları .....	83

# 1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz biçimde büyümesi ve anormal yayılımı ile karakterize edilen hastalık grubudur (1). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verileri ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarında, kanserin tüm dünyada ve ülkemizde de morbitide ve mortalitesi hızla artan bir hastalık olduğu belirtilmektedir (2-4). WHO Türkiye istatistik verilerine göre ise, 2014 yılında gerçekleşen toplam 422 000 ölüm içerisinde kanser %22'lik oranla ikinci sırada yer almaktadır (2). TÜİK verilerine göre, Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türü, dünya ve diğer gelişmiş ülkeler ile benzerlik göstermektedir (4). Kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise akciğer, trakea ve bronş kanseri cinsiyete göre en sık görülen kanser türleridir (4).

Kanserden ölümlerin %90'ının uzak organ metastazından kaynaklandığı bilinmektedir (5). Metastaz sırasında, primer veya metastatik bölgeden ayrılarak kan ve/veya lenf sistemi aracılığı ile uzak bölgede yeni kanser oluşumuna sebep olan hücreler “dolaşımdaki tümör hücreleri” (circulating tumor cells, CTCs) olarak adlandırılırlar (6). CTC'ler, periferik dolaşımda uzun yıllar dormant halde kalabilir. Gün içerisinde dolaşıma geçen hücrelerin %85'i, 5 dakika içerisinde ortadan kaldırılırken, sadece %2.5'i mikrometastaza, %0.01'i ise makrometastaza neden olur (7).

CTC'ler heterojen karaktere sahiptir ve genel olarak epitelyal orjinli CTC'ler, mezankimal orjinli CTC'ler ve kök hücre benzeri CTC'ler olmak üzere 3 grupta kategorize edilebilirler (8). Epitelyal orjinli CTC'ler, genel olarak primer veya metastatik bölgeden kopan hücrelerden oluşurlar (8). Bu hücreler epitel karakterlerini kaybetmedikleri için “metastaz başlatıcı hücreler” olarak bilinirler (9).

Kanser gelişimi sırasında, metastatik yayılımın başlamasını ve ilerleyişini kolaylaştıran bir takım değişiklikler görülür. Bunlar; kanser hücrelerinin morfolojik, biyokimyasal özelliklerinde farklılıklara neden olan ve immun sistem hücrelerine karşı dirençli hale gelmesini sağlayan değişikliklerdir. Bunlardan bilinen en önemlisi

“Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm” (EMT)’dir (8). Kanser hücreleri, kan dolaşımına geçerken EMT geçirecek, spesifik epitelyal belirteçlerini kaybederler ve kök hücre benzeri (CSC) hücre yüzey belirteçleri ekspres etmeye başlarlar (9). EMT geçiren kanser hücreleri, hasta başarılı bir kanser tedavi süreci geçirse bile ilaç dirençliliği gelişmesi nedeniyle zamanla uzak bölgelerde nükse sebep olabileceği için önemlidir (10). EMT geçiren CTC’ler epitelyal adezyon molekülü (EpCAM) ve sitokeratin (CK) gibi geleneksel hücre yüzey belirteçleri bulundurmalarına ek olarak vimentin gibi EMT belirteçlerini de ekspres edebilirler (8). Kanser hücreleri, hedef bölgelerine ulaştıktan sonra “Mezenkimal Epitelyal Dönüşüm” (MET) geçirirler. Kanser hücrelerinin epitelyal karakterlerini bu dönüşüm ile geri kazanmaları sonrasında, hücre sayılarını arttırarak farklılaşmış doku oluşumunu sağlarlar (11).

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri, süt kanallarını veya süt bezlerini kaplayan epitelyal hücrelerden köken alan neoplastik bir hastalıktır (12). Genetik ve klinik olarak heterojen tümör popülasyonu içerdiğinde metastatik lezyonlar ölüme neden olabilir (13). Meme kanseri, ülkemizde ve dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (2-4). Meme kanseri evreleri incelendiğinde vakaların % 8.4’ünde uzak metastaz olduğu görülmektedir (4).

Meme kanserli hastaların periferik kanlarında CTC varlığı kanser metastazının ve ikincil tümör oluşumunun göstergesi olabilir (14). Çünkü kanda çok az miktarda bile CTC tespiti edilmesi (10 mL kan içerisinde 1 CTC) kötü prognoz göstergesidir (14, 15).

CTC’ler, tümör biyolojisi ve tümör hücrelerinin yayılımı hakkında bilgi sağlama potansiyeline sahiptirler. CTC analizinin temel avantajı minimal invaziv hastalığın gelişimi sırasında, çoklu zaman noktalarında kolaylıkla elde edilebilen “likit biyopsi” özelliğine sahip olmasıdır (16). Bu noktada CTC teşhis ve tedavi belirlenmesinde önemli rol üstlenebilir. Çünkü, primer doku biyopsisi sonucu tümörden elde edilen bilgi ile dolaşıma geçen hücrelerin histopatolojik özellikleri arasında farklılık olabilir (17). Bu durum tedavinin yönünü tamamiyle değiştirecek bir potansiyele sahiptir.

Birçok kanser türü tedavi başlangıcında farmasötiklere karşı duyarlıyken, zamanla kanser hücrelerinde biriken DNA mutasyonları ve metabolik değişiklikler

sonucunda tedaviye karşı dirençlilik kazanabilir (10). Başarılı bir tedavi ve iyileşme süreci geçirilmiş olsa bile, zaman içerisinde uzak bölgelerde nüks gelişebilir (10). Tedavi öncesinde ve sonrasında kan örneğindeki CTC sayısının belirlenmesi, tedavi etkinliğinin incelenmesine ve gelişen ilaç dirençliliğinin ön görülmesine olanak sağlayabilir (18).

Rutinde kanser tanı ve tedavi takibine yardımcı olarak kullanılan tümör belirteçleri, vücudun kanser hücrelerine karşı verdiği yanıtın sonucunda oluşurlar (19). Kanserli hastaların serumunda bulunan tümör belirteçleri sağlıklı insanlara kıyasla daha yüksektir (20). Fakat meme kanseri tanı ve takibinde kullanılan tümör belirteçleri, sadece meme kanserine spesifik değildir. Serumdaki bu belirteçlerin seviyesi, benign (iyi huylu) süreçte yada farklı kanser türlerinin gelişiminde de bu belirteçlerde artış görülebilir veya kanser gelişimi sürecinde seviyelerinde değişiklik olmayabilir (19). CTC'ler sadece kanserli bireylerde saptanırlar (21), bu nedenle rutinde uygulanan tümör belirteçlerinden daha etkin bir kanser belirteci olma potansiyeli taşımaktadırlar.

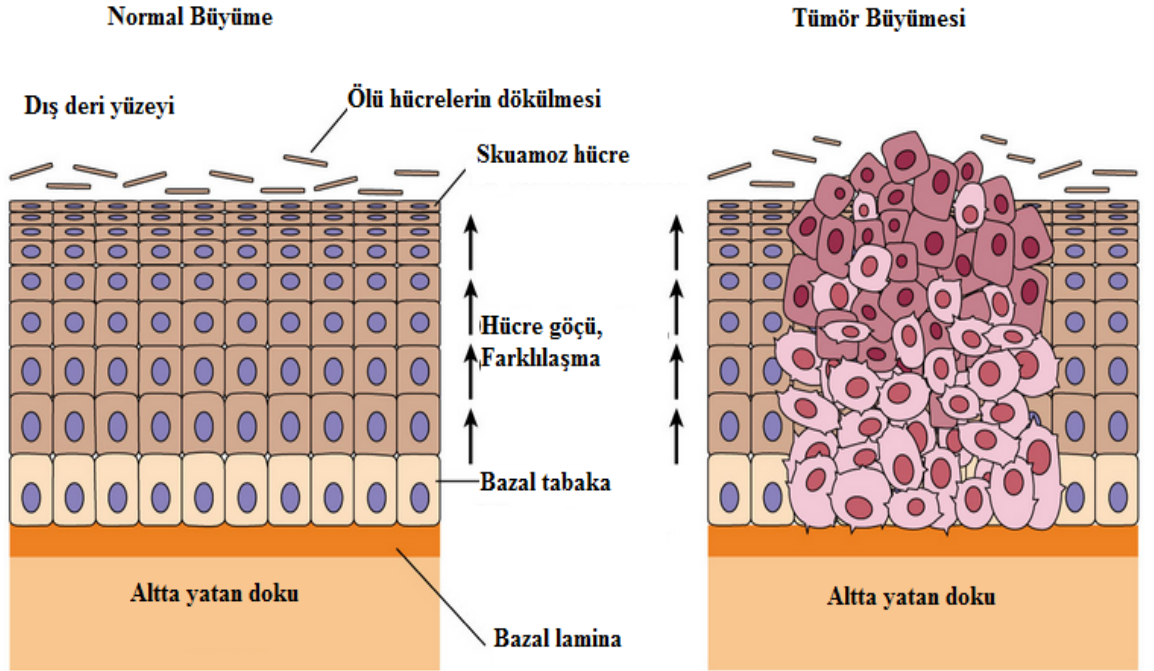
Tez çalışmasında öncelikli olarak, meme kanserli hastalar ile sağlıklı bireyler arasındaki CTC sayısındaki farklılık göz önüne alınarak meme kanserinde tümör belirteci olabilme etkinliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Buna ek olarak meme kanserli hastaların kanında bulunan CTC sayısı ile tümör evreleri, ER ve PR durumu, c-erb-B2 değeri ve rutinde kullanılan serum tümör antijen (CEA ve CA15-3) seviyeleri arasında ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser Nedir?

Kanser; hücrelerin aşırı çoğalmalarına sebep olan, aynı zamanda immün sistemin denetiminden kaçarak metastaz gerçekleştirebilen çok aşamalı bir hastalıktır (22) (Şekil 2.1).

Normal hücreler düzenli bir şekilde büyür, bölünür ve ölürlür. Bu belirli ömürlerinde büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz arasında belirli bir denge vardır. Nesillerden nesillere aktarılan genetik bir kusur, kimyasal karsinojenler, viral enfeksiyonlar ya da radyasyon gibi tümör gelişimini tetikleyen ajanlar aracılığı ile bu denge bozulur. Sonuçta, oluşan hücreler kontrolsüz büyümeye başlarlar ve sonrasında da kanser gelişimi gözlenir (23).



Şekil 2.1. Normal ve kanser hücrelerinde büyüme (24).

### 2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi

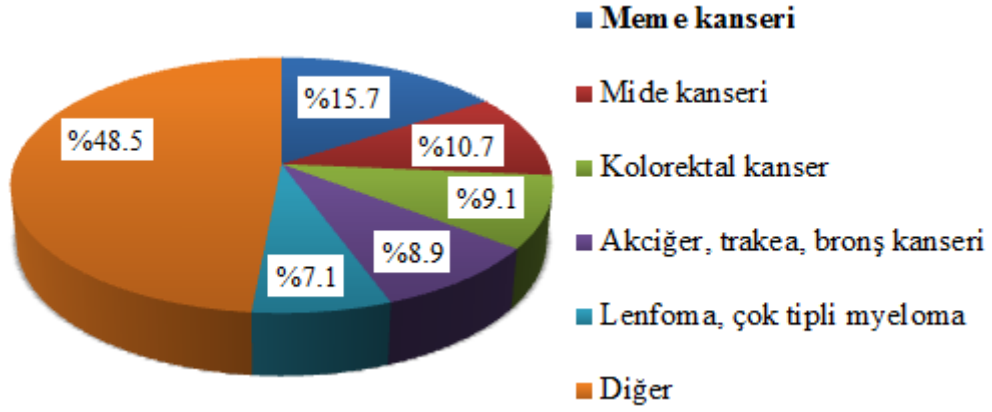
Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verileri ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarında, kanserin tüm dünyada ve ülkemizde de morbitide ve mortalitesi hızla artan bir hastalık olduğu belirtilmektedir (2-4).

Türkiye kanser insidansı, dünya insidansının üzerinde seyrederken, Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere oranla kanser açısından, hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir (4). TÜİK verilerine göre, Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türü, dünya ve diğer gelişmiş ülkeler ile benzerlik göstermektedir. Kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise akciğer, trakea ve bronş kanseri cinsiyete göre en sık görülen kanser türleridir (Tablo 2.1) (4).

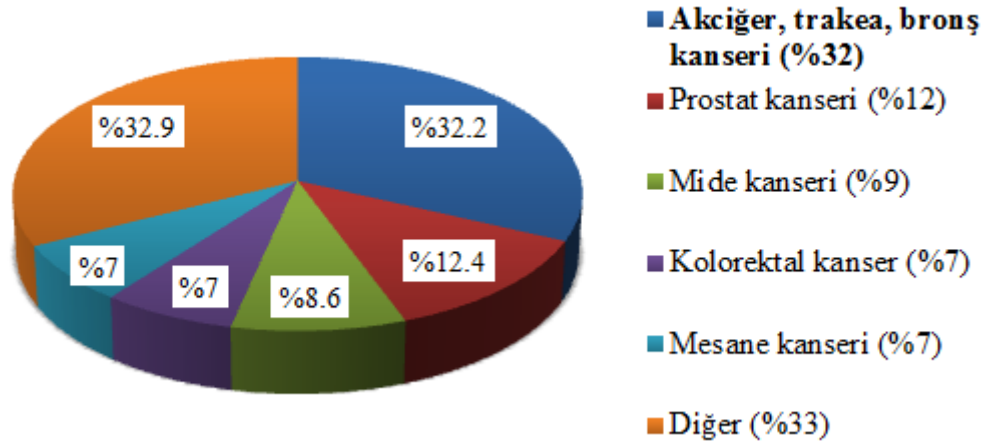
**Tablo 2.1.** Ülkemizde cinsiyete göre en sık görülen beş kanser türü (4)

En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türü		
Cinsiyet	Kadınlar	Erkekler
1.	Meme	Akciğer, Soluk Borusu, Bronş
2.	Tiroid	Prostat
3.	Kolorektal	Kolorektal
4.	Akciğer, Soluk Borusu, Bronş	Mesane
5.	Uterus Korpus	Mide

WHO Türkiye istatistik verilerine göre ise, 2014 yılında gerçekleşen toplam 422 000 ölüm içerisinde kanser %22'lik oranla ikinci sırada yer almaktadır. Bu verilere göre cinsiyete bağlı görülen kanser türleri kadınlarda (32 500 ölüm vakası/yıl) ise %16 ile meme kanseri (Şekil 2.2), erkeklerde (58 400 ölüm vakası/yıl) % 32 ile akciğer, trake ve bronş kanseri görülmektedir (Şekil 2.3) (2).



Şekil 2.2. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri (2).



Şekil 2.3. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri (2).

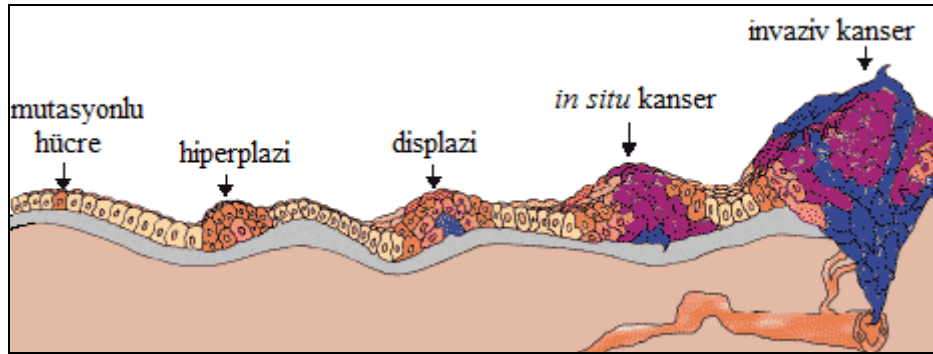
### 2.1.2. Kanser Histopatolojisi

Kanser, kademeli olarak gelişen bir hastalıktır. Çok hücreli organizmada hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, kanser gelişimine yol açabilir. Tümör kitlesi içinde bulunan, normal dokuya benzer hücresel görünüme sahip olan ve bir arada bulunma özelliğini koruyan hücreler, aşırı sayıdaki hücre bulundurmaları sebebiyle anormaldir. Bu durum *hiperplastik* olarak adlandırılır. Doku tabakası içinde bir hücre tipinin başka bir hücre tipine dönüşümü sonucunda *metaplazi* meydana gelir. Normal sitolojik görünümünü kaybetmiş dokular ise *displazi* olarak adlandırılırlar (Şekil 2.4). Bu hücrelerin nükleer

boyutunda ve şeklinde değişikliklere ek olarak mitotik aktivitesinde artış görülürken, normal farklılaşan dokularla kıyaslandıklarında ise sitoplazmik özelliklerinde azalış görülür. Sonuç olarak, hücrelerin mimari yapısında normal olmayan değişiklik görülür. Hücrelerin değişen mimarisi sonucunda, doku orijinleri hakkında çok az bilgi içeren ve histopatolojik kritere dahil edilemeyen hücreler oluşur ve bu yapı *anaplastik tümör* olarak adlandırılır (25).

Tümör hücreleri, hücresel bağlantıların yıkımına neden olan bir dizi mutasyon geçirirler ve bunun sonucunda *in situ* kanser gelişimi görülür. Bu kanser türünde tümör kitlesi hala epitelyal sınır içerisinde (Şekil 2.4). Bu durum kanser hücresinin çevre dokulara yayılma özelliği kazanmasıyla değişir ve invaziv kanser olarak adlandırılan bu kanser türü, zamanla yeni tümör oluşumuna neden olabilir (26).

Tümör histopatolojisi, tümör klinik davranışı ile mikroskopik özelliği arasındaki ilişkinin anlaşılmasında önemlidir. Tümör, agresif büyümesine göre 2 sınıfa ayrılır. Lokalize büyüyen ve yakındaki dokulara invaze olabilme özelliği bulunmayan tümörler *benign (iyi huylu)* olarak, diğer dokulara invaze olabilme özelliği bulunanlar ise *malign (kötü huylu)* olarak gruplandırılırlar (25).



Şekil 2.4. Kanser gelişim basamakları (27).

Malign tümörleri, benign tümörlerden ayırt etmeye olanak sağlayan 4 temel özellik vardır. Bunlar; diferansiyasyon ve anaplazi, büyüme hızı, lokal invazyon ve metastazdır.



*Diferansiyasyon ve anaplazi*, tümörün yalnızca değişikliğe uğramış bölümü olarak kabul edilen parankim hücrelerinin özellikleridir. Benign tümörler, türedikleri dokuya çok benzeyen, iyi diferansiye hücrelerden meydana gelirler. Malign neoplaziler de ise iyi diferansiye ya da indiferansiye olmak üzere iki tür hücre görülebilir (28).

*Büyüme hızı*, benign tümörlerde yavaşken, malign tümörlerde daha hızlıdır ve lokal veya uzak doku metastazı sonucunda hastanın ölümü ile sonuçlanabilir. Bu büyüme hızında etkili olan durum, kanser hücrelerinin kanlanma derecesi veya basınç farklılığıdır. Benign tümörlerde kanlanma derecesinin azalmasında nekroz görülür (28).

*Lokal invazyon*, benign tümörlerde görülmez. Bu tümörler, ilk ortaya çıktığı yerde sabittir ve metastaz gerçekleşmez. Fakat malign tümörlerde bu durum tam tersidir. Kanser hücreleri çevre dokulara infiltre olurlar ve bu dokuları tahrip ederek gelişmeye devam ederler (28).

*Metastaz*, kanser hücrelerinin lokal invazyon gerçekleştirmesinden sonra malign tümörler ile benign tümörleri ayıran en güvenilir özelliklerden biridir. Kanser hücreleri buldukları bölgeden ayrılarak, vücut boşluğuna geçerek, lenfatik yolla ve/veya hematojen yol olmak üzere 3 farklı şekilde metastaz gerçekleştirirler (28).

### **2.1.3. Kanserın Moleküler Temeli**

Kanser gelişiminin temelinde ölümcül olmayan genetik hasarlar yer alır. Bu genetik hasarlar ya da mutasyonlar çevresel faktörlerin etkisiyle kendiliğinden gelişir. Kanser genetiği hipotezine göre, mutasyona uğramış tek hücreden bir kitle oluşturacak şekilde monoklonal olarak çoğalma sonucunda kanserin meydana gelebileceğinden söz edilir. Bu genetik hasarın hedefinde; normal düzenleyici genler, hücre büyümesini teşvik eden proto-onkogenler, büyümei inhibe eden tümör baskılayıcı genler, programlı hücre ölümü genler ve DNA onarım genler bulunmaktadır (28).

*Onkogenler*, hücrelerde mevcut olduklarında transforme bir fenotip başlatan

genlerdir. Bütün hücrelerde bulunan ve mutasyon geçirmeleri sonucunda aşırı eksprese olan bu genler proto-onkogen olarak adlandırılırlar. Bilinen onkogenlerin büyük bölümü transkripsiyon faktörü, büyüme düzenleyici, hücre yaşamını ve diğer hücreler ile bağıntı kontrol eden proteinlerdir. Tek allelde mutasyonu ile dominant hale gelerek hücreyi proliferasyona teşvik ederler (28).

*Tümör baskılayıcı genler*, normal hücrelerde denetimsiz hücre bölünmesini engelleyen genlerdir ancak mutasyona uğradıkları veya kayboldukları durumlarda farklı fenotipte hücreler oluşumuna olanak sağlarlar. Kanserde aktif hale gelebilmesi için iki allelde de mutasyon olması gerekir (28).

*Apoptozu ve DNA onarımını düzenleyen genler*, proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genler gibi etki gösterebilirler (28).

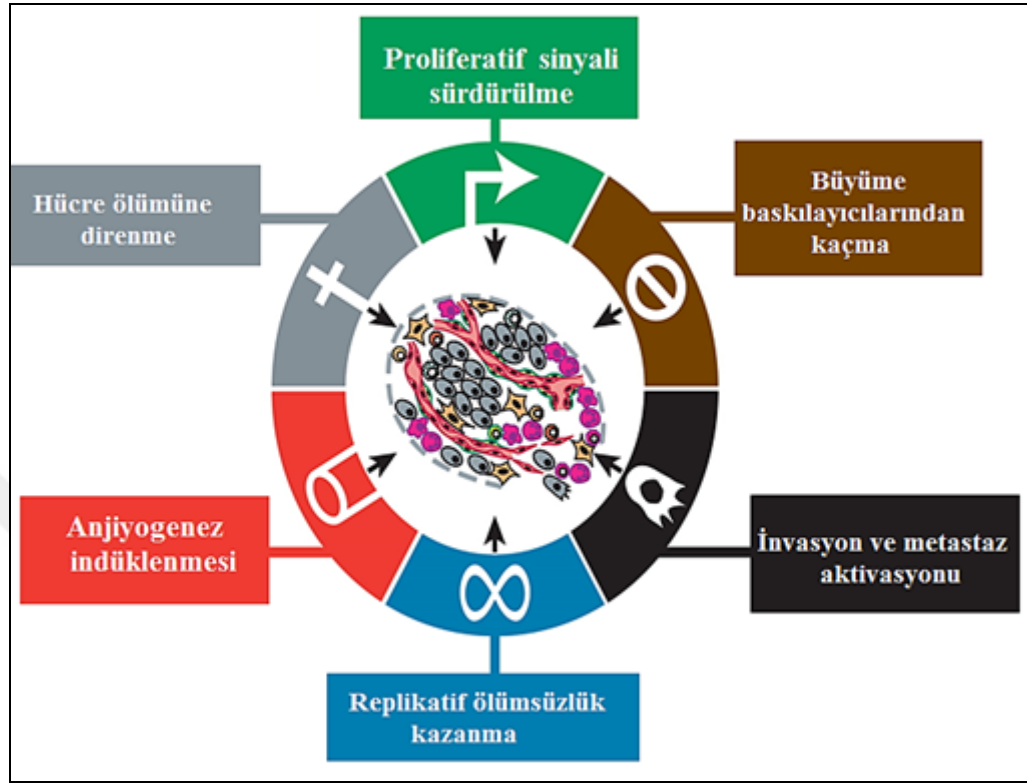
#### **2.1.4. Kanserin Karakteristik Özellikleri**

Tümörler çok aşamalı gelişim süreci boyunca kansere özgü altı biyolojik karakter kazanırlar. Kansere spesifik birden fazla özelliğin, tümör hücrelerinde toplanması sonucunda genomik istikrarsızlık meydana gelir ve malign tümörler, metastatik hale gelerek mortalite ve invazyona neden olurlar (29). Tümör hücresinin kazandığı özellikler, proliferatif sinyali sürdürme, büyüme baskılayıcılarından kaçma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlük kazanma, anjiyogenez indüklenmesi, invazyon ve metastaz aktivasyonudur (21) (Şekil 2.5).

#### **Proliferatif Sinyalizasyonun Sürdürülmesi:**

Kanser hücrelerinin tartışmasız en temel özelliğidir. Normal dokular, hücre büyüme-bölünme döngüsüne girişi ve ilerlemesini kontrol ederek, hücre sayısının homeostazını sağlarlar. Doku mimarisi ve fonksiyonunun korunmasını sağlayan büyüme destekleyici sinyallerin üretimi ile salınımı arasında bir denge vardır. Kanser hücreleri, bu dengeyi bozacak şekilde sinyalleri yeniden düzenleyerek yaşam döngülerini kontrol etme yeteneği kazanırlar. Bu sinyallerin en önemlileri, hücre zarı içinde sabitlenmiş reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar) ile aktive edilen fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ve mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) yolaklarıdır. Genellikle hücre büyümesi ve proliferasyonun sürdürülmesini, canlılığı, anjiyogenez

ve apoptozu kontrol ederler (29).



Şekil 2.5. Kansere özgü biyolojik karakterler (29).

### Büyüme Baskılayıcılarına Karşı Duyarsızlık

Kanser hücreleri büyümeyi uyarıcı sinyallerin sürdürülme özelliğini kazanırlarken, hücre çoğalmasını düzenleyen programları inhibe etmeleri gerekir. Bu programların çoğu *tümör baskılayıcı genlerin* aktivasyonuna bağlıdır (29).

İki prototip tümör baskılayıcı program vardır: Retinoblastom ilişkili protein (RB) ve tümör baskılayıcı protein 53 (TP53). RB proteini, çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyallere entegre olup, hücrenin büyüme-bölünme döngüsünün devam ettirilip ettirilmeyeceğine karar verir. RB yolunda fonksiyon bozukluğu olan kanser hücrelerinde, bölünme fazındaki (S fazı) hücreler için karar mekanizması engellendiğinden, hücre döngüsü kalıcı olarak kontrol dışı sürdürülür. Bu durumda hücreler Dinlenme evresine ( $G_0$  evresi) girmeden kontrolsüz bölünürler. TP53 ise hasarın onarılamaz olduğu durumlarda homeostaziyi sağlamak için devreye girer.

Eğer onarım gerçekleştirilemezse programlanmış hücre ölümü tetiklenir (29).

### Hücre Ölümüne Direnme

Hücre ölümü veya apoptoz, pro-apoptoz ve anti-apoptoz proteinler ile sıkı kontrol edilen bir mekanizmadır. Bu mekanizma, hasarlı hücreleri veya ihtiyaç duyulmayan ya da hatalı hücreleri ortadan kaldırmasında önem taşır. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu veya intrinsik sinyalizasyonla bağışıklık hücreleri ile kontrol edilebilir. Normal hücrelerde DNA hasarı olduğu zaman kaspaz enzimlerinin aktive olması ve TP53'ün hücre döngüsünü, bölünme evresinde (G<sub>1</sub> evresi) durdurması önemli bir süreçtir. Fakat kanser, apoptoz ve pro-apoptotik sinyal yollarını inaktive ederken hücrelerin sağkalımı için anti-apoptotik yolların aktivasyonu sağlar (29).

### Replikatif Ölümsüzlük Kazanma

Normal hücrelerde, hücre bölünmesi sırasında kromozomların telomer bölgeleri sınırlı onarılır ve her seferinde bir miktar kısalma meydana gelir (23). Kanser hücrelerinde bu kısaltmaların engellenmesi için telomeraz enzimi sürekli olarak kromozom sonlarına nükleotid ekler. Hücre bölünmesi, kanser hücrelerinde normal hücrelere göre çok hızlı olmasına rağmen, telomer bölgeleri kısalmaz ve sınırsız bölünme potansiyeli kazanır (29).

### Anjiyogenezin İndüklenmesi

Vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi; embriyogenez, menstrüel siklus gibi durumlarda görülen süreçtir. Patolojik durumda ise, başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit gibi), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda görülür (29, 30). Karsinogenezle birlikte, tümör kitlesi 1-2 mm<sup>3</sup>'lük hacme ulaştıktan sonra oksijen ve besine olan ihtiyaçları artar. Bu ihtiyacı gidermek için ilk aşama olan anjiyogenez uyarılır. Tümör ilişkili anjiyogenez; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna hizmet eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır (30).

## Anjiyogenik İnvazyon ve Metastaz Aktivasyonu

Metastazın önemli bir basamağıdır ve dinamik bir süreçtir (30). Epitel hücrelerinden köken alan kanserlerin oluşum sürecinde görülen metastaz, *metastatik kaskad* olarak tanımlanan (Şekil 2.6) karmaşık biyolojik olayların art arda meydana gelmesiyle gerçekleşir.

Metastatik kaskad basamakları aşağıdaki gibidir (31):

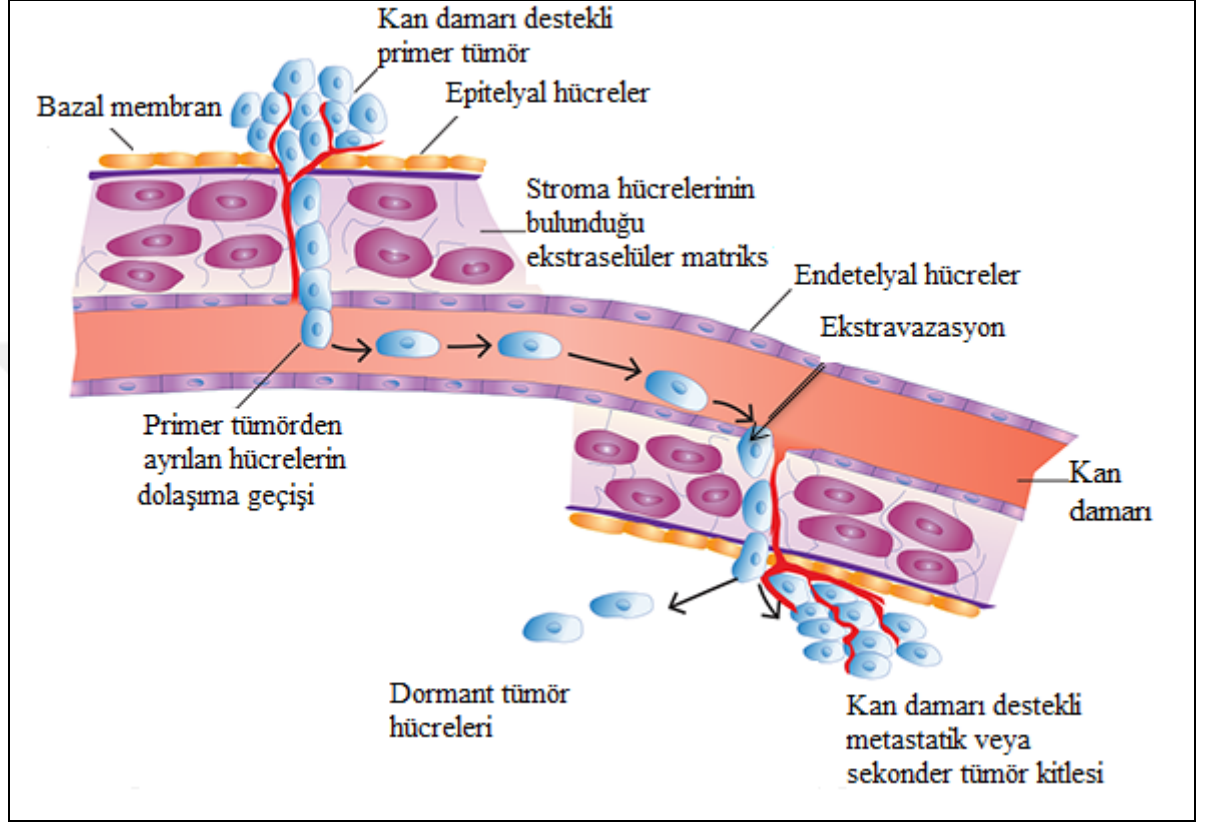
- ◆ Ekstraselüler matrikse ve stromal hücre duvarından çevre dokulara invazyon
- ◆ Kan damarı lümenine invazyon
- ◆ Damar yoluyla taşınım sırasında zorluklara direnme
- ◆ Uzak organlara göç etme
- ◆ Uzak dokuların parankimasına invazyon
- ◆ Yabancı çevrede mikrometastaz gerçekleştirmek için yaşamını sürdürmeyi başarma
- ◆ Metastatik bölgede kendi proliferasyon programını yeniden başlatma (31).

Metastatik süreç, malign hücrenin diğer hücelere ve ekstraselüler matrikse (ECM) tutunmayı sağlayan bölgelerinden serbest kalması ile başlar (33). Hücrelerin lateral bölgelerinde bulunan, birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve “kaderin” moleküllerinin geçişine aracılık eden sıkı birleşme bölgelerinde dağılma meydana gelir. Bu dağılmanın nedeni, bu bölgelerde E-kaderin regülasyonunda azalma ve N-kaderin, integrin vimentin ve matriks metaloproteinaz-9 gibi mezenkimal kaderinlerin regülasyonunda artış olmasından kaynaklanır. (33).

### **2.1.5. Kanserde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm ve Mezenkimal Epitelyal Dönüşüm**

Kanser gelişimi sırasında, buldukları bölgeden ayrılarak kan dolaşımına geçebilen epitelyal karakterdeki hücreler “metastaz başlatıcı hücreler” olarak bilinirler (9, 34). Bu hücrelerde, sentromer amplifikasyonu ile hücre içerisindeki mikrotübül organizasyonunu düzenler ve E-kaderin ekspresyonu korunduğu için

kanser hücrelerinin kümeler halinde dolaşıma geçmesini sağlar (35). Kümelenmiş bu hücrelerin, kontrollü hücre ölümüne (anoikis) maruz kalma ihtimalleri daha düşüktür. Damar içerisine kaldıkları için, uzak organ ekstrasvazasyonuna neden olabilir (34).



Şekil 2.6. İnvazyon ve metastaz (32).

Kanser gelişimi sırasında metastatik yayılımın başlamasını ve ilerleyişini kolaylaştıran bir takım değişiklikler görülür (36). Bunlar; kanser hücrelerinin morfolojik, biyokimyasal özelliklerinde farklılıklara neden olan ve immun sistem hücrelerine karşı dirençli hale gelmesini sağlayan değişikliklerdir. Bunlardan bilinen en önemlisi “Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm” (EMT)’dir (8).

EMT hipotezine göre; primer epitelyal tümör hücreleri EMT geçirerek, spesifik epitelyal karakterlerini kaybederler (9). Ayrıca, hücre-hücre adezyonunun azalması, hücre hareketliliğinin artması, invazyonunun artması, epitel belirteçlerin kaybı, mezenkimal fenotipin kazanılması gibi birçok fenotipik değişikliğe maruz kalırlar. Bu değişikliklerin sonucunda, fibroblast benzeri morfoloji kazanan hücreler,

diğer komşu hücrelerden ayrılırlar, kendilerini çevreleyen stromaya invazyon gerçekleştirirler ve apoptoza daha dirençli hale gelirler. (Tablo 2.2) (9). Bunlara ek olarak kanser hücreleri, *kök hücre benzeri* özellikler kazanabilir. Kök hücre benzeri özellik kazanan “kendini yenileme kapasitesine” sahip kanser hücreleri, metastatik tümör yayılma kaynağı olarak kabul edilmektedir. Çünkü EMT geçiren kanser hücreleri, terapötik ajanlardan etkilenmeden kan dolaşımına geçebilir (11) ve hasta başarılı bir kanser tedavi süreci geçirse bile ilaç dirençliliği gelişmesi nedeniyle zamanla uzak bölgelerde nüks görülebilir (10) (Şekil 2.7).

Kanser hücresi, hedef bölgesine ulaştıktan sonra çoğalarak farklılaştırılmış doku oluşturmak için “Mezenkimal Epitelyal Dönüşüm” (MET) geçirir ve epitelyal karakterlerini geri kazanırlar. Bu nedenle metastatik lezyonlar genellikle primer tümörün epitel özelliklerini gösterirler (örn. E-kaderin sentezleme) (Tablo 2.2) (11). Kemik iliği, akciğer, karaciğer gibi sekonder organlara yerleşmiş bu hücreler, bölgede dormant halde (dinlenme hali) kalabilirler veya metastaz başlatabilirler (34).

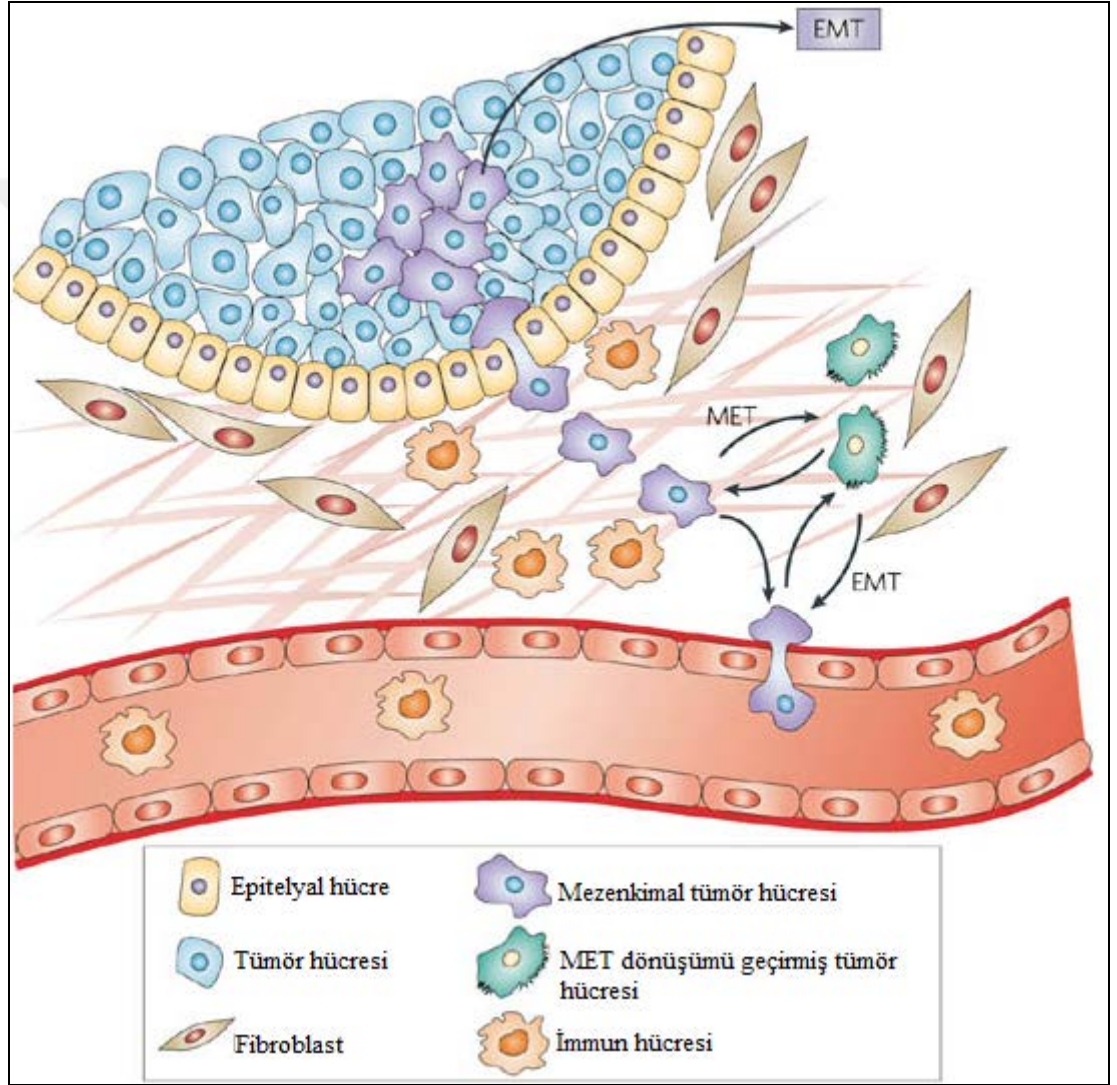
**Tablo 2.2.** Kanser hücrelerinin karakteristik belirteçleri (8).

<b>Epitelyal Belirteçler</b>	<b>Mezenkimal Belirteçler</b>	<b>Kök Hücre Belirteçleri</b>
Sitokeratin 8,18,19	Akt2	ALDH1
E-kaderin	Fibronektin1	CD44
EGFR	FoxC2	CD133
EpCAM	N-kaderin	CD24
HER2	PI3K	-
MUC1	Vimentin	-
pan-Sitokeratin	-	-

### EMT ve İlaç Dirençliliği

Hastalığın farmasötik tedavilere karşı toleranslı hale gelmesi sonucu oluşan durumdur. Birçok kanser türü tedavi başlangıcında farmasötiklere karşı duyarlıyken, zamanla kanser hücrelerinde biriken DNA mutasyonları ve metabolik değişiklikler sonucunda tedaviye karşı direnç geliştirme başlarlar (10).

Başarılı bir kanser tedavisinin ve iyileşmenin ardından uzak bölgelerde nüks, sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (10). Bu durumun nedenlerinden biri olarak EMT geçiren kanser hücrelerinin kök hücre benzeri karakter kazanımları gösterilebilir (11). Diğer bir neden ise kanser hücrelerinin genellikle heterojen olmalarıdır. Bu durum, hastalar arasında tedavi duyarlılığındaki farklılığın nedenlerinden de biridir (10).



Şekil 2.7. EMT sürecinde hücre-hücre adezyon kaybı ve sitoskeletin yeniden düzenlenmesi (37).



### 2.1.6. Kanser Kök Hücre (CSC) Modelleri

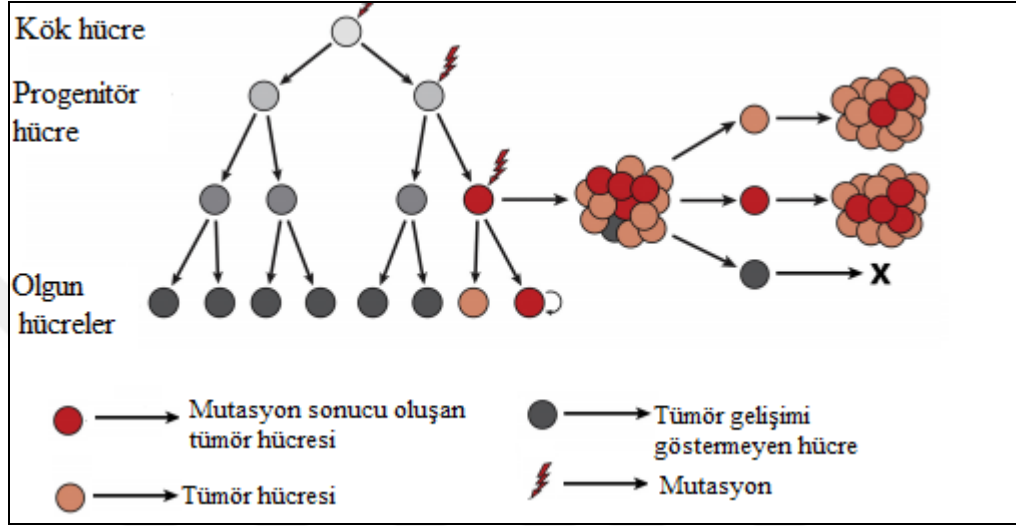
Normal kök hücreler, kendini yenileme özelliğine sahip olan ve bu özellik sayesinde farklılaşarak belirli bir dokunun olgun hücreleri üretebilen hücreler olarak tanımlanırlar (38). Bu hücreler, kendini yenileme süreçlerini kontrol etmek için birden fazla sinyal yolağı kullanırlar. Bu yolakların deregölasyonu bir neoplastik proliferasyon ile kanser kök hücre gelişimine yol açabilir (39). Buna ek olarak, patolojik süreçte kendini yenileme özelliğı kazanan hücre, malign karakterin gelişmesinden sorumlu olabilir (40). Kanser kök hücreleri ile normal somatik kök hücreler özellikleri Tablo 2.3’de gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.** Normal somatik kök hücresi ve kanser kök hücresinin özellikleri (8).

Normal Somatik Kök Hücre	Kanser Kök Hücre
Kapsamlı ama sınırlı kendini yenileme kapasitesi bulunur.	Kapsamlı ama sınırsız kendini yenileme kapasitesi bulunur.
Organojenetik kapasiteye sahiptir.	Tümörojenik kapasiteye sahiptir.
Nadir olarak anormal doku gelişimi gözlenir.	Tümör kitlesi içerisinde nadir veya az sayıdadır.
Yüzey belirteçlerine göre tanımlanabilir.	Genellikle aynı doku içerisinde, benzer hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu görülür.
Normal karyotip görünümündedir.	Anormal karyotip görünümündedir.
Çoğu zaman durağan haldedir.	Diğer kanser hücrelerine kıyasla daha az mitotik aktiviteye sahiptir.
Sıklıkla fenotipik çeşitlilik görülür.	Sıklıkla fenotipik çeşitlilik görülür.
Farklılaşmış hücre oluşturmak için sınırlı bölünme kapasitesine sahiptir.	Sınırlı proliferatif potansiyeli olan anormal döl oluşturma kapasitesine sahiptir.

Kanser heterojen bir hastalık olması nedeniyle kanser kök hücre (CSC) gelişimine dair iki temel model mevcuttur (41). Birinci model “klonal gelişim” olarak bilinir ve bu model kanser hücrelerinin fonksiyonel ve fenotipik farklılıklara

yol açarak zaman içerisinde geri dönüşümsüz genetik değişiklikler sonucunda heterojeniteye katkı sağlar (Şekil 2.8). Bu süreç sonunda en agresif olan hücreler, tümörün progresyonuna neden olur (41, 42). Oluşan CSC'ler, bir dizi mutasyon geçirerek dominant karakterde klon gelişimini sağlarlar. Bu klonlar, benzer karakterde tümör hücrelerini oluştururlar (43).



Şekil 2.8. Klonal gelişim modeli (43).

Diğer bir model ise bir tümör kitlesinin içerisindeki hücrelerin aynı olmadığı yönündeki *kanser kök hücre* modelidir. Bu modelde, CSC'lerin hiyerarşik olarak kanser başlatma veya çoğaltma yeteneğine sahip hücreler olduğunu düşünülmektedir (Şekil 2.9). CSC'ler, normal kök hücreye benzeri görünüme sahip olmasına rağmen proliferasyon ve farklılaşma açısından kök hücreden ayrılır. Kanser hücre popülasyonu içerisinde sadece belirli tümör kitlesinin büyümesinden sorumlu oldukları ileri sürülmektedir (41, 42) (Şekil 2.9). Bu modelde, projenitör hücrenin mutasyona uğradığı ve kök hücre benzeri karakter kazandığı düşünülmektedir. Oluşan hücreler, tümör içerisinde kendini yenileme yeteneğine sahip tümör hücrelerinin gelişimini sağlarlar (43).

Kanser kitleri içerisinde bulunan hücrelerin CSC olarak nitelendirilebilmesi için şu özellikleri taşımaları gerekir:

- ◆ Tümörü oluşturan hücrelerin çok farklı yüzey belirteçleri bulundurması ve normal somatik kök hücreler ile ortak yüzey belirteçleri taşımaları (44),
- ◆ Kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmaları (39),
- ◆ Az sayıdaki kanser kök hücre popülasyonunun tümör oluşturabilme kapasitesinin yüksek olmaları (39).

*Meme kanseri kök hücresi*; orjini tam olarak bilinmemekle birlikte CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> ve ALDH<sup>+</sup> yüzey antijenlerinin meme kanseri kök hücresinde eksprese olduğu ve artan tümörojenite ile ilişkisi bilinmektedir. Bu antijenler normal meme kök/progenitör hücrelerinde de eksprese olmaktadır. Meme kanseri kök hücrelerinin gelişiminde 2 teori bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, CSC'lerin, normal kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesinin ve diferansiyasyonunun deregulasyonundan kaynaklanabilir. Bu teori temelde CSC ile normal kök hücrelerin benzemesine ek olarak, normal kök hücrenin mutasyon ve onkojenik transformasyonun sürdürebilmesine dayanmaktadır (45). Diğer teori ise, meme kanseri kök hücrelerinin EMT sonucunda oluştuğu yönündedir. Normal ve kanser kök hücrelerinin benzer karakteristik özellik göstermesi bu teorinin temelini oluşturmaktadır (45).

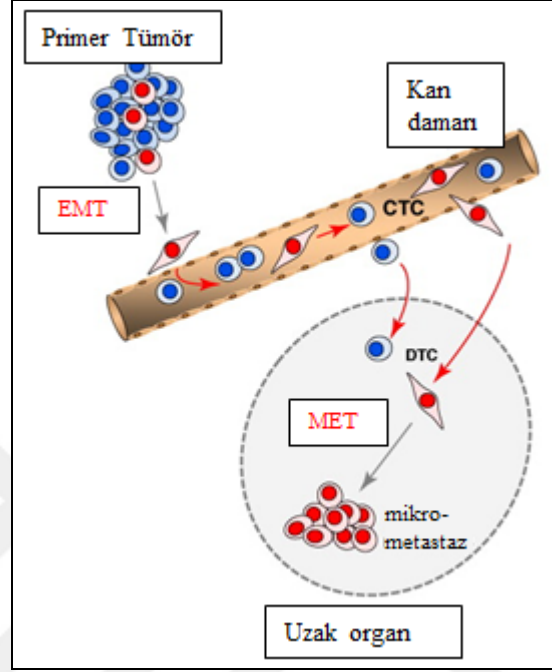
## **2.2. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (CTC)**

### **2.2.1. CTC Nedir?**

Metastaz sırasında, primer veya metastatik bölgeden ayrılarak kan ve/veya lenf sistemi aracılığı ile uzak bölgede yeni tümör oluşumuna sebep olan hücreler “dolaşımdaki tümör hücreleri” (circulating tumor cells, CTCs) olarak adlandırılırlar (6).

CTC'ler, periferik dolaşımda uzun yıllar dormant halde kalabilir. Buna rağmen, günde dolaşıma geçen hücrelerin %85'i 5 dakika içerisinde ortadan kaldırılırken, sadece %2.5 'i mikrometastaza, %0.01'i ise makrometastaza neden olur (7).

Meme kanserli hastaların periferik kanlarında CTC varlığı kanser metastazının ve ikincil tümör oluşumunun göstergesidir (14), çünkü çok az miktarda bile CTC varlığı (10 mL kanda 1 CTC) kötü prognoz göstergesidir (14, 15).



Şekil 2.9. CTC ve metastatik kasted (46).

### 2.2.2.1. CTC'lerin Kan Dolaşımına Geçerken Karşılaştıkları Engeller

Tümör hücreleri, EMT veya sentrozomal amplifikasyon gibi biyolojik olay ile pasif ya da aktif olarak kan dolaşımına girebilirler (47). Çok sayıda CTC'nin kan dolaşımına geçtiği tahmin edilse de çok az bir kısmı hayatta kalarak sekonder organa metastaz gerçekleştirebilir. CTC'ler, kan dolaşımına geçerken metastatik süreci engelleyen birçok doğal engelle karşılaşır (48).

Bunlar,

◆ Kan akışı tarafından oluşan gerilme kuvveti ve buna ek olarak kan hücreleri ile çarpışma etkisidir. EMT geçiren bu kanser hücreleri, epitel tümör hücrelerine kıyasla daha dayanıklıdır (48).

◆ CTC'lerin hücre-matriks etkileşimleri olmadan kan akışında hayatta

kalmaları gerekir. Normalde bu durumda anoikis devreye girer. Fakat CTC'ler tropomiyozin ilişkili kinaz B (TrkB) sayesinde kaspaz-ilişkili apoptozu baskılayarak anoikise karşı dayanıklılık kazanırlar (34). Ayrıca CTC kümeleri oluşturarak yada çok hücreli tümör hücre agregatları oluşturarak mekanik zorlamalara ve anoikis karşı korunurlar (49).

◆ Aktif immun sistem CTC'ler için engel oluşturur. Örneğin, kolorektal kanserde CD47 gibi belirteçlerin ekspresyonunu arttırarak makrofaj ve dentritik hücrelerin saldırılarını engellerler (50). Ayrıca MHC-I protein ekspresyonunu azaldığından trombosit agregasyonu ile NK hücre aracılı lizisten korunurlar (51).

◆ CTC'lerin kan akışını terk ederlerken, damar içi endoteline bağlanma sırasında zorlukla karşılaşılabılır. Trombosit inhibisyonu kanser hücrelerinin damar içi endoteline bağlanmasını arttırır. Fakat, aspirin gibi ilaçlar, aktif trombositlerin stabil tümör hücrelerine bağlanmasıyla anti-metastatik etki gösterir ve ektravazasyon engellenir (47).

#### **2.2.2.2. Hücre Yüzey Antijenlerine Göre CTC Subpopulasyonları**

Tümör heterojenitesi, belirli bir primer tümör içindeki genetik, fenotipik veya davranışsal özellikleri bakımından farklılık içeren kanser hücrelerinin subpopulasyonlarının birlikteliğini ifade eder (52). Bu populasyon içerisinden dolaşıma geçen tümör hücresi tek başına ya da farklı kombinasyonlar halinde bulunabilirler (5).

Genel olarak, epitelyal orjinli CTC'ler, mezenkimal orjinli CTC'ler ve kök hücre benzeri CTC'ler olmak üzere 3 grupta kategorize edilebilirler (8). Antijen özellikleri en iyi bilinen üç CTC alt populasyonu şunlardır (5, 8);

#### **Epitel Orjinli CTC'ler;**

Epitelyal orjinli CTC'ler, genel olarak primer veya metastatik bölgeden kopan hücrelerden oluşurlar (8) ve bu hücreler epitel karakterlerini kaybetmedikleri için "metastaz başlatıcı hücreler" olarak bilinirler (9).

### EpCAM (Epitelyal Hücre Adezyon Molekülü (CD326))

Birçok epitelyal dokunun bazolateral membranında bulunur ve kalsiyumdan bağımsız olan bu molekül, hücreler arası adezyonda görevlidir (53). Hücre adezyonu, komşu epitel hücreleri ile kontakt inhibisyon kurarken hücre göçü, çoğalması ve farklılaşması gibi çeşitli hücre sel fonksiyonlarda ve hücre polaritesinin korunmasında etkilidir (54).

Kanser hücrelerinde ise kontakt inhibisyon kaybı, hücre hareketi sonucunda kanser hücrelerinin komşu dokuları istila etmesine ve metastaza neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabilir (54). Hücre yüzeyinde bulunan EpCAM'ın kanda saptanması, bu hücrenin yabancı kökenli olduğu anlamına gelmektedir. Bu hücre histolojik özellik gösterdiğinden kanser hücresi olarak kabul edilir. Çünkü EpCAM, epitelyal kökenli kanserlerde aşırı eksprese olurken, normal epitelyal hücrelerde daha az eksprese olur (5). Bu nedenle, EpCAM çeşitli epitelyal kanserlerin tanı ve tedavisi için önemli bir moleküldür ve artan EpCAM ekspresyonunun genellikle kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (54).

### Sitokeratinler (CK'lar)

Hücre iskeleti bileşenlerinden ara filamentlerin büyük ve en çeşitli sınıfıdır. Tanımlanan 20 tip CK vardır. Bunlar düşük ve yüksek molekül ağırlıklarına veya izoelektrik noktalarına göre CK1 - CK8 "tip II keratin", CK9 - CK20 ise "tip I keratin" olarak adlandırılmıştır (55). EMT geçiren kanser hücrelerinde sitoiskelet yeniden düzenlendiği için CK ekspresyonu azalır (56).

Normal meme dokusunda CK5 ve CK14 miyoepitel hücrelerinde eksprese olurken; CK7, CK8, CK18 ve CK19 duktal epitelyumda eksprese olur. Kanser gelişimi sırasında meme CK karakteri genellikle korunur. Bu nedenle belirli meme kanseri alt tipleri arasında ayırt etmede ve prognoz belirlenmesinde sitokeratin ekspresyonu önem taşır. Bu özellik, metastatik bölgelerdeki metastazın veya lenf nodu metastazının saptanmasında prognostik bir belirteçtir. Meme kanseri vakalarının %90'dan fazlasında CK7, CK8, CK18 ve CK19 ekspresyonu görülür (55).

## **Mezenkimal Orjinli CTC'ler**

EMT geçiren CTC'ler, EpCAM ve CK gibi hücre yüzey belirteçleri dışında EMT belirteçlerini de eksprese ederler (8). Biyokimyasal yolların aktivasyonu ve değişmiş metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan bu belirteçler, N-kaderin, PI3K/Akt, Twist-1, Zeb-1 ve Plastin-3 gibi moleküllerdir. Bu belirteçler, özellikle transkripsiyon faktörleri, immünohistolojik boyama ve qRT-PCR ile daha kolay saptanabilirler (5).

## **Kök Hücre Benzeri CTC'ler**

Kanser gelişimini başlatan veya nükse neden olan progenitör hücreler, "kök hücre benzeri hücreler"dir ve metastazda önem taşırlar. Metastatik meme kanseri CTC'lerinin hem EMT hem de CSC fenotipi yönünden zengin olduğu gösterilmiştir (57).

### CD44 ve CD24

CD44 (cluster of differentiation 44), multifonksiyonel sınıf I transmembran glikoproteindir. Bu protein, hücre dışı değişiklerin incelenmesi, hücre-hücre yapışmanın düzenlenmesi, proliferasyon, büyüme, hayatta kalma, mortalite, migrasyon, anjiyojenez ve farklılaşma gibi rollerde öneme sahiptir. CD44, kanser hücrelerinde metastaz, tümörogenesizin teşvik edilmesi gibi rollerde görev alır (58). CD24 (cluster of differentiation 24), hücrelerinin çeşitli glikosil-fosfatidilinositol ile sabitlenmiş küçük hücre yüzey protein molekülüdür. Hücre-hücre fonksiyonları ve hücre-matris etkileşimlerinde öneme sahiptir. Kanser hücrelerinde invazyon ve metastazdan sorumludur (58).

Meme ve prostat kanseri ksenograft transplantasyon modellerinde yüksek CD44 ve düşük CD24 ekspresyonu gösteren kanser kök hücrelerinin (CSC) yüksek tümörjenik ve metastatik potansiyeli olabileceği ortaya konmuştur (59). Ayrıca bu hücreler kemoterapiye karşı direnç gösterebilirler (5).

Diğer belirteçlere örnekler ise gangliosit (GD3, GD2, GD1a), ALDH1, ABC proteinleridir. Gangliositler, hücre büyümesi ve hareketliliğinde yardımcı olarak

kanser gelişimine katkı sağlarlar Bu nedenle, CTC kök hücre belirteci olarak kullanılabilirler. ALDH1, normal meme epitellerinde %1-2 oranında eksprese olmalarına rağmen, meme kanseri kök hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiştir. Bu enzimatik protein, prognostik ve prediktif bir meme kanseri belirteci olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmektedir. ABC proteinleri ise, ABCG2 transporterlarının yüksek ekspresyonu ile CSC fenotipi ilişkilidir. CSC'nin dirençlilik kazanması, bu transporta ekspresyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle ABCG2 taşıyıcılarının kök hücre belirteci olmaya aday olduğu ileri sürülmektedir (5).

Primer lezyondaki hücelere benzeyen ve kanda bulunan tümör hücreleri, şekil, boyut ve görünüş olarak yaklaşık 150 yıl önce Thomas Ashworth tarafından tanımlanmışlardır (60). İlk CTC tespiti 1959 yılında kandan izole edilmiştir, fakat bu hücrelerin tanımlanması için mevcut metodun geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (61). Bu çalışmalar, hassas cihazların geliştirilmesi ile günümüzde CTC'ler tespit edilebilir hale gelmiştir.

### **2.2.2. CTC Tespiti**

CTC'ler, sağlıklı bireylerde nadir olarak bulunurlar; 1 mL periferik kan içerisinde yaklaşık  $10^7$  lökosit ve  $5 \times 10^8$  eritrosit arasında 1 tümör hücresi ile karşılaşılabilir (62).

CTC'ler homojen olarak kana dağılmazlar. Bu nedenle tek kan örneğinden izole edilen CTC'ler eksik yada yanıltıcı sonuç verebilir. CTC'lerin büyük boyutları nedeniyle kılcal damarlarda tıkanıklık görülebilir ve buna ek olarak, kılcal damara yapışmaları veya trombositlerle kaplanmış halde olmaları nedeniyle sayılarında azalma görülebilir (63). Ayrıca CTC tespiti sırasında da hücre kayıpları meydana gelebilir. Dolaşımda düşük konsantrasyonda bulunan bu hücrelerin tespiti ve karakterizasyonu için son derece hassas yöntemler gerekmektedir (64).

CTC tespitinde temelde iki basamak bulunur. Bu basamaklar zenginleştirme ve saptama basamaklarıdır (64).

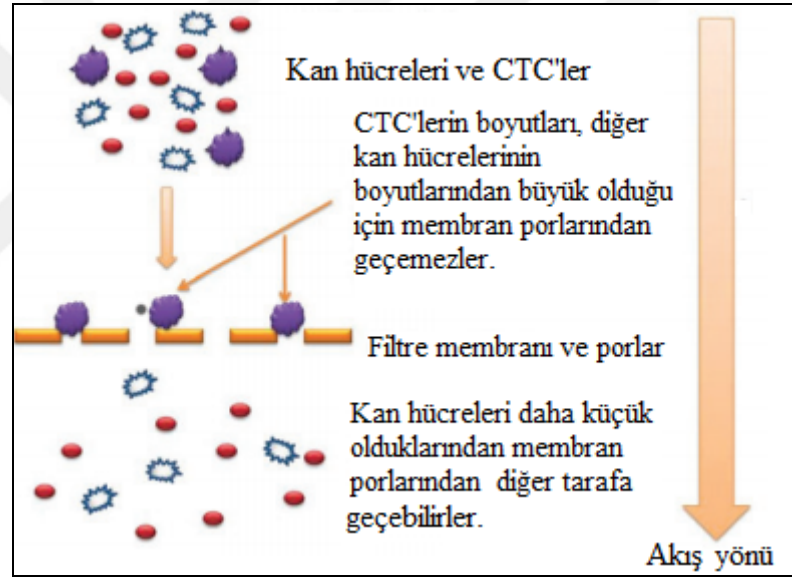


### 2.2.2.1. CTC Zenginleştirme Basamağı

CTC zenginleştirme basamağı, hematopoetik hücreler tarafından çevrenmiş CTC'lerin ayırt edilmesini sağlayan yöntemdir. Bu yöntemler;

#### Boyut Farkına Dayalı Ayrım

Seyreltilmiş tam kan örneğinin belirli büyüklükte gözeneklere sahip olan (standart olarak 8  $\mu\text{m}$ ) bir filtre cihazı içinden geçirilmesi temeline dayanır. CTC'lerin 8  $\mu\text{m}$ 'dan büyük olma özelliği ile diğer hücrelerin (lökositlerin 8  $\mu\text{m}$ 'den küçüktür) boyutları arasındaki farklılığına göre ayırım sağlanır (60, 65) (Şekil 2.11).

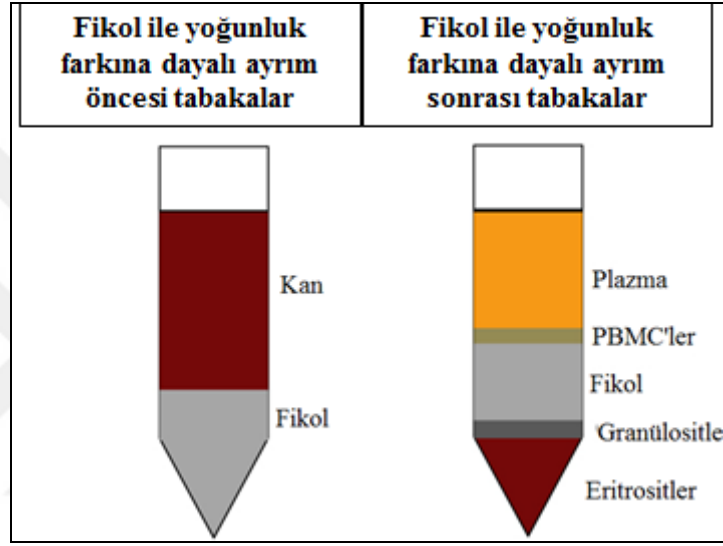


Şekil 2.10. Boyut farkına dayalı ayırım (63).

#### Yoğunluk Farkına Dayalı Ayrım

Hidrofilik polisakarit olan fikol (ya da benzer bir yoğunluk farkı ortam) aracılığı ile diğer kan bileşenleri içerisinde, mononükleer hücrelerin (PBMC'lerin) izolasyonuna dayanır (65). PBMC içerisinde CTC ile birlikte yüksek yoğunlukta lökosit bulunur (60).

Fikol yoğunluk farkına dayalı ayırım, santrifüj sırasında hücrelerin yoğunluklarına göre farklı alanlara göç etmeleri prensibine dayanır. Santrifüj sonrasında yoğunluk farkına göre hücre tabakaları oluşur. Üst kısım plazma tabakasıdır. Bu kısmın altında periferik kan mononükleer hücrelerin (PBMC'ler) oluşturduğu tabaka yer alır ve lökositler ve CTC'ler bu tabakada bulunur. PBMC tabakasının altındaki kısımlar sırasıyla fikol tabakası, eritrosit ve granülositlerin yer aldığı tabakadır (63) (Şekil 2.12).



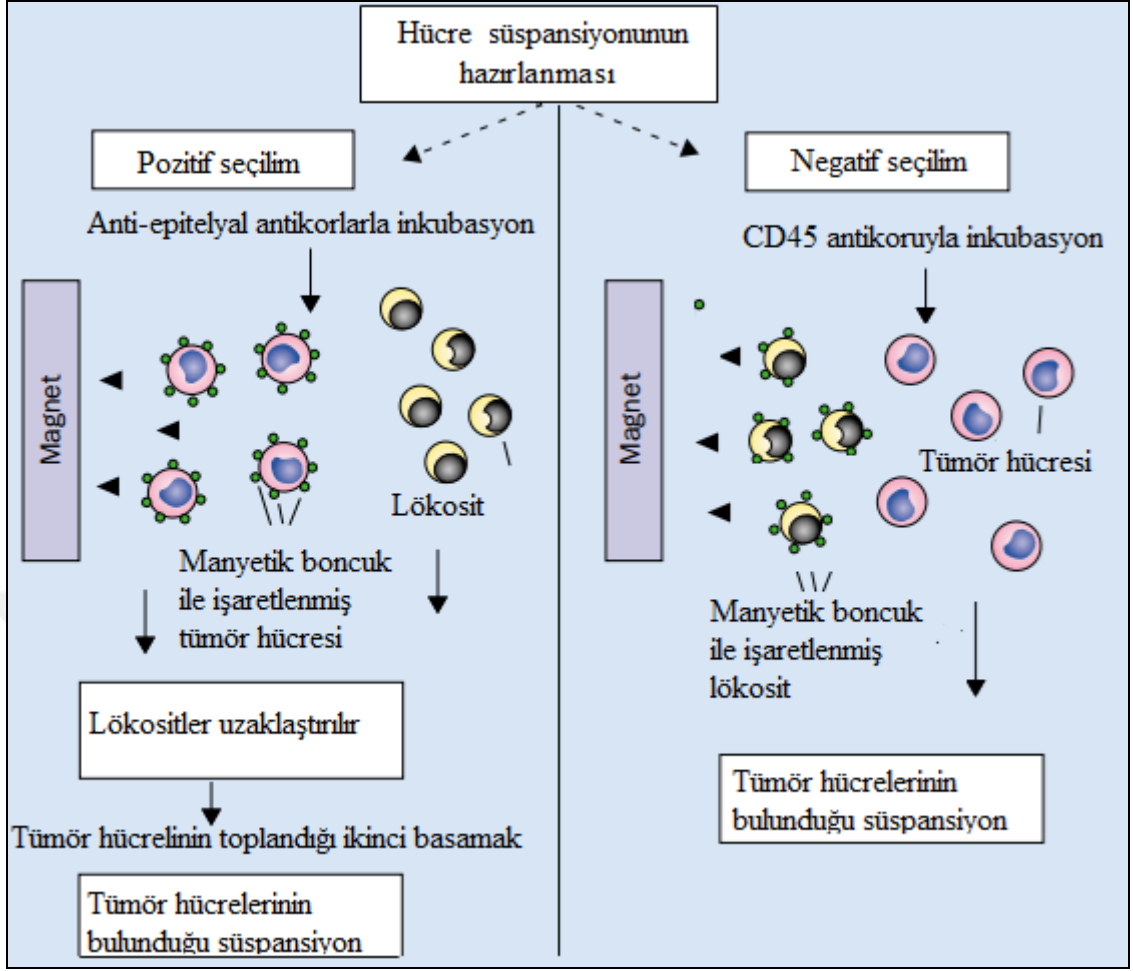
Şekil 2.11. Fikol ile yoğunluk farkına dayalı ayırım (66).

### Mikroakışkan Tabanlı Ayırım

Tam kan örneğinin yavaş yavaş çip tabanlı yüzeyden geçirilmesi prensibine dayanır. Hedef, antikor kaplı mikropost (örn. CTC Chip ve iChip), dielektroforez (örn. DEPArray) kullanılarak diğer kan hücrelerinden CTC'lerin ayırımı sağlanır (34, 65).

#### **2.2.2.1. CTC Saptama Basamağı**

Zenginleştirme basamağı sonrasında süspansiyon, lökositleri içerdiğinden CTC'lerin tek hücre düzeyinde tanımlanıp normal kan hücrelerinden ayrılması gerekmektedir.



Şekil 2.12. İmmunomanyetik ayırım stratejisi (68).

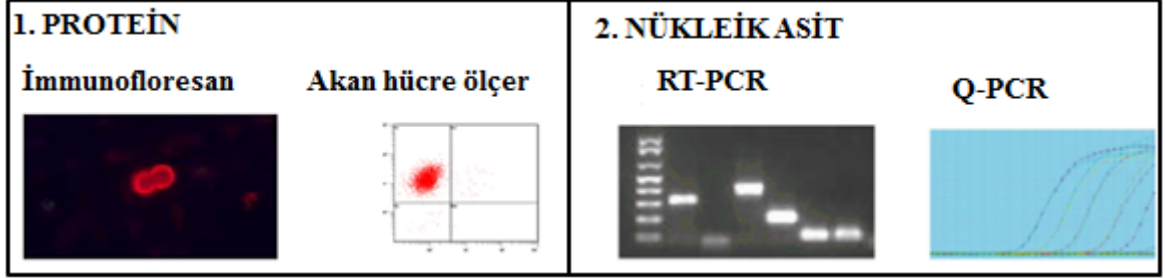
CTC saptanması, protein tabanlı stratejiler veya nükleik asit tabanlı teknikler ile yapılabilir (64) (Şekil 2.14). EK-1'de CTC saptama kullanılan metotların tahmini duyarlılığı, avantajları, dezavantajları yer almaktadır (69).

Bu teknikler;

#### Protein Tabanlı Yaklaşım

İmmüno Floresan ya da akan hücre ölçer kullanım temeline dayanır. Tümör hücrelerinin belirlenmesinde çeşitli özgül epitelyal antijenler için monoklonal antikorlardan yararlanılmaktadır. Monoklonal antikorlar, tümör hücrelerini işaretleyerek floresan ya da kolorimetrik olarak görülmelerini sağlarlar.

Bu amaçla epitelyal fenotipli kanserlerde CTC tespitine yönelik altın standartta sahip intraselüler sitokeratinler ile (örn. CK8, CK18, CK19) işaretlenmektedir (70). Sitokeratine karşı monoklonal antikorların kullanıldığı sitometrik yöntemde,  $10^6$  hücrede bir tümör hücresi yani CTC belirleme sınırı olarak kabul edilmektedir (65).



Şekil 2.13. CTC saptama yöntemleri CTC saptama yöntemleri (65).

#### Nükleik Asit Tabanlı Yaklaşım

Tek gen seviyesinde yada kompleks yaklaşımlar kullanım temeline dayanır. Bütün hücreler tarafından eksprese edilen ya da salgılanan proteinler reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon tepkimesi (RT-PCR) ya da real time polimeraz zincirleme tepkimesi (qPCR) kullanımına dayanır. CTC tespitinde moleküler testler için polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) aşırı analitik duyarlılık ve özgüllük avantajına sahiptir. Bu avantaj CTC'deki toplam tümör ve epitel-spesifik RNA'nın izolasyonundan kaynaklanır (65).

Bütün zenginleştirme ve saptama basamakları çeşitli kombinasyonları kullanarak çok sayıda CTC platformlarının geliştirilmesine rağmen, nadir doğaları ( $10^5$ - $10^8$  lökosit karşılık 1 CTC) nedeniyle bu hücrelerin tespiti zordur. Kontamine hücrelerin varlığı (ör. tümör olmayan epitel hücreler, dolaşımdaki endotel hücreler) ve dünya genelinde CTC yakalama için belirteç olarak kabul edilen moleküllerin eksikliği (ör. EMT geçirerek EpCAM /CK ekspresyonlarını kaybeden CTC'ler) yanlış pozitifliğe neden olabilir (65).

CTC saptama basamağında en sık kullanılan cihazların çalışma prensipleri

aşağıda belirtildiği gibidir;

### *CellSearch™ Sistem*

Günümüzde CTC saptamak için geliştirilen sistemlerin başında, prognozu belirlemek ve meme, kolon ve prostat kanserli hastaların kliniğini için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tek cihaz CellSearch™ sistemdir (71). CTC saptama sistemi, immünomanyetik işaretleme ve otomatik dijital mikroskop sistemine dayanır. Anti-sitokeratin antikolar epitel hücrelerinin tanımlanması için kullanılırken, CD45 antikoları lökositleri uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Nükleer boya DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), zenginleştirilmiş hücre popülasyonunun mikroskobik görünümünü sağlamak için floresan işaretli hücre çekirdeğine uygulanır. İnkübasyon, yıkama, manyetik ayırım ve tespit basamakları sonrasında, immünomanyetik ayrılan hücre popülasyonu otomatik dijital floresan mikroskobu sayesinde sayılabilir. Bu işlem 7.5 mL kanda gerçekleştirilir. Bu yöntem üç farklı antikorun (EpCAM, CK ve CD45) spesifitesinden yararlanarak CTC varlığı ve sayısı hakkında bilgi verir. Bu nedenle, testin başarısı CTC-spesifik belirteçler olarak kullanılan EpCAM ve CK hedef antijenlerinin ekspresyon düzeyine bağlıdır (71). CellSearch™ sistemide CTC pozitif olarak değerlendirilen hücreler, boyut olarak  $\geq 4\mu\text{m}$  ve DAPI+, pan-Sitokeratin<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> dir (34) .

### *Akan Hücre Ölçer*

Akan hücre ölçer, CTC'lerin klinik tespiti ve karakterizasyonu için kullanılan bir cihazdır. Bu cihaz, çeşitli hücre yüzey biyobelirteçlerinin eşzamanlı, çok renkli analizi ile birlikte hücre boyutu hakkında bilgi sağlayarak rutin hücresel ve partikül ölçümlerin hızlı şekilde yapılmasına olanak sağlar. Bir kaç bin hücrenin sayılmasının ve karakterizasyonunun aynı anda yapmasını kolaylaştırır. Tüm hücre popülasyonu içerisinde ilgilenilen hücrelerin ayrılması prensibine sahip olan akan hücre ölçer, karışık popülasyon arasından tek tip hücrenin ayrımı sağlayabilir. Bu özellik ile akan hücre ölçeri değerli hale gelmektedir. Bu sistemin avantajları, özel işaretleyicilerin varlığının ve yokluğunun incelenmesinin yanısıra ekspresyon seviyesinin de incelenmesine olanak sağlaması, kolayca tek bir numune üzerinde çoklu işaretleyici

analizi gerçekleştirebilmesi, kolaylıkla ayrılmış örneklerin elde edilmesi ve farklı yaklaşımlarla alt karakterizasyonlarının kolaylıkla yapılabilmesidir. Dezavantajları ise ön zenginleştirme basamaklarının hassas bir süreç olması (65, 72), sınırlı duyarlılığa sahip olması, örnek zenginleştirmede kullanılmak üzere büyük örnek hacminin gerekli olması, hücre spesifikliğinin görsel doğrulama olanağının olmaması ve teknik analitik zorluğudur (69).

### *RT-PCR*

RT-PCR, Hücreleri liziz edilmiş kan örneklerinde ideal olan bu yöntemdir. Hassas ve otomatik şekilde CTC'ye spesifik m-RNA'dan cDNA oluşumu sağlanır. PCR reaksiyonu sonrasında, örnek içindeki CTC sayısını ve gen ekspresyonunu tahmin etmek için kullanılabilir. Fakat CTC tespitinde tercih edilen mRNA belirteçleri, normal kan hücrelerinde de düşük seviyelerde ekspresyona edilebileceği için CTC sayısının belirlenmesinde sorun oluşturabilir. CTC ile normal kan hücrelerinin ayırt edilmesinde birden fazla m-RNA belirtecinin bir arada kullanılması sonucunda bu sorun ortadan kaldırılabilir. Zenginleştirme basamağı sonrasında liziz edilmiş hücre süspansiyonu AdnaTest™ ile analiz edilerek CTC pozitifliği araştırılabilir. Bu amaçla, meme kanserinde CTC teşhisinde HER2 (insan epitelyal büyüme faktör reseptörü 2), MUC1 (mucin 1), EpCAM m-RNA seviyeleri tercih edilmektedir. Bu testin avantajı, CTC'lerde aşırı miktarda ekspresyona olan çok sayıda genin analizine olanak sağlaması, EpCAM ekspresyonu az olan hücrelerde MUC1 ile zenginleştirme yapılabilmesidir (60).

### **2.2.3. CTC Eşik Değeri**

Metastatik meme kanserinde CTC'nin prognostik rolü olduğu düşünülmektedir. Bu alanda 2004 yılında yapılan ve dönüm noktası kabul edilen çalışma Cristofanilli ve arkadaşlarına aittir. Bu çalışmaya 177 metastatik meme kanseri hastası dahil edilmiştir ve CTC analizi CellSearch™ sistem ile gerçekleştirilmiştir (73). Bu çalışma sonucunda, meme kanserli hastalarda 7.5 mL kan numunesinde 5 ve 5' den fazla CTC tespit edilen hastalarda, 5' den az sayıda CTC tespit edilenler kıyasla, hastalısız sağkalım ve genel sağkalım sürelerinde önemli

derecede azalma saptanmıştır. Bu nedenle meme kanseri CTC eşik değeri 5 olarak kabul edilmektedir (73) .

Günümüzde metastatik meme kanserinde sağkalımı, hastalığın progresyonu ve uygulanan tedavi etkinliğini belirlemede CTC tespitinin önemli belirteç olabileceği düşünülmektedir (74).

### **2.3. Meme Kanseri**

Meme kanseri, meme kanalını veya meme bezlerini kaplayan epitel hücrelerinin transformasyonu ve malign karakterde çoğalması sonucunda oluşur (75). Genetik ve klinik olarak heterojen tümör popülasyonu içerdiğinde metastatik lezyonlar ölüme neden olabilir (13).

#### **2.3.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi**

Meme kanseri, ülkemizde ve dünyada kadınlarda arasında en sık görülen kanser türüdür (2-4). 2013 yılı içerisinde tanı konulan her 4 kadın kanserinden 1'i meme kanseridir. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45'i 50-69 yaş aralığında, %40'ının ise 25-49 yaş aralığında olduğu görülmektedir (4). Meme kanseri evreleri incelendiğinde invaziv vakaların %47.6'sı lokalize, %44'ü bölgesel metastaz ve %8.4'ü uzak metastazdır (4).

#### **2.3.2. Meme Kanseri Etiyolojisi**

Meme kanseri, etiyojisinde farklı değişkenlerin rol oynadığı bir hastalıktır. Bunların başında yaş, etnik köken, kalıtsal, hormonal sebepler, çevresel ve psikososyal faktörler gelmektedir (76).

Yaşa Göre Meme Kanseri Dağılımı: Artan yaş, meme kanserinde en önemli prognostik faktördür (76). 20 yaş öncesinde meme kanseri görülmesi çok yaygın olmakla birlikte 20 yaş sonrasında %2 oranında kadınlar bu hastalığa yakalanmaktadır (77).

Kalıtımsal Sebepler: Meme kanseri, genel popülasyona oranla aile hikayesinde bu hastalık görülmüş kadınlarda daha yaygındır. Kalıtımsal meme ovaryen kanser sendromu (BRCA1-BRCA2 mutasyonu), Li Fraumeni Sendromu, Peutz Jeghers Sendromu, Cowden hastalığı ve Muir Torre Sendromu meme kanserinin kalıtımsal sebeplerden sayılabilir (76).

BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, meme kanseri vakalarının %10'unu oluşturur ve tüm sendromlar arasında görülme sıklığı %80-90'dır. Hasarlı genlerin tamirinde rol oynayan bu tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyon otozomal dominanttır. BRCA1 mutasyonuna sahip bireylerin meme ve over kanserlerine yakalanma olasılığı %50-87 iken BRCA2 mutasyonuna sahip bireylerde bu oran %15-44'dür (78).

Hormonal Sebepler: Yumurtalık ve böbrek üstü bezleri tarafından üretilen üreme hormonlar, meme kanseri patogeneğinde rol oynamaktadır. Regli ve menopoz dönemindeki cinsiyet hormonlarına maruz kalma süresi karsinogenezde etkili olabileceği düşünülmektedir (77). Östrojen, androjen progesteron prolaktin, İnsülin benzeri büyüme hormonu 1 (IGF1), insülin ve melatonin meme kanseri hormonal sebepleri arasında yer almaktadır (76).

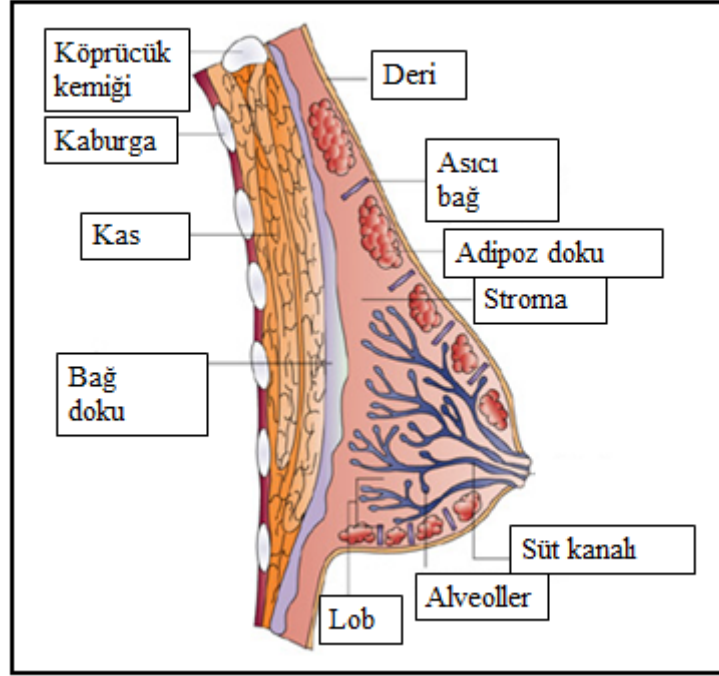
Çevresel Faktörler: İyonize radyasyon, sigara, alkol, obezite, virüsler, organokloridler, elektromanyetik alan çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Bu ajanlar fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle karsinogenez sürecini başlatabilirler (76).

Psikososyal Faktörler: Ansiyete/depresyon, çocukluk çağı, aile ortamı, inkar/baskılama, stresli yaşam, ayrılık ve kızgınlık gibi nedenler sayılabilir (76).

### **2.3.3. Meme Anatomisi**

Meme, göğüs duvarı ön yüzünde iki taraflı olarak pektoral kaslar üzerine yerleşmiştir. Memede her biri meme başına açılan 6-10 adet kanal sistemi bulunur ve bu terminal duktus tubül birimleri üzüm salkımı şeklinde bir grup hormona duyarlı asinüsten oluşmuştur (79). (Şekil 2.15).





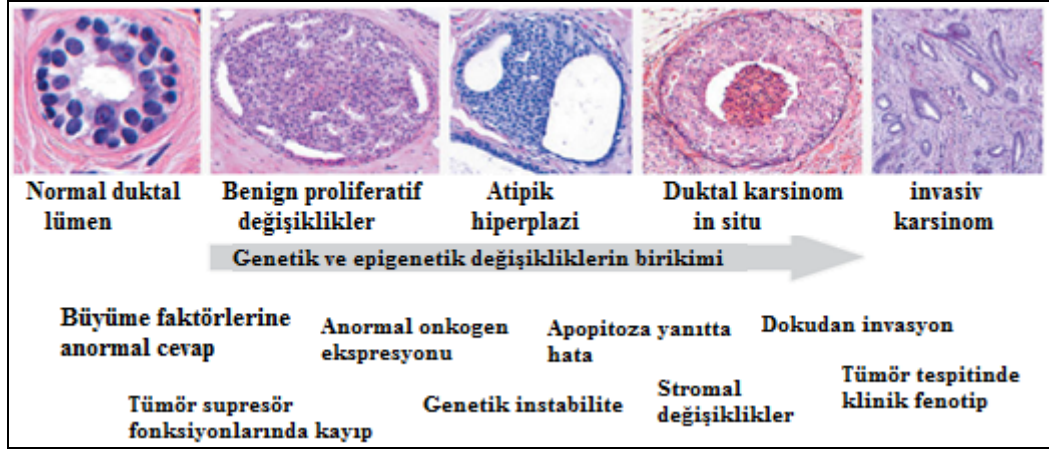
Şekil 2.14. Meme anatomisi ve histolojisi (80).

### 2.3.4. Meme Kanseri Patolojisi

Meme kanseri, biyolojik ve klinik açıdan heterojenite gösterir. Bu kanser türü, kontrolsüz hücre çoğalması, genomik instabilite ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması ile karakterizedir (81). Tümörögenез histolojik ve klinik evreler ile tanımlanır ve giderek biriken genetik, epigenetik ve mikroçevre değişiklikleri ile yönlendir (12) (Şekil 2.16).

#### 2.3.3.1. Meme Kanseri Alt Türlerinin Histolojik Sınıflandırılması

Meme kanseri, kanserin geliştiği bölgeye göre süt kanallarında ise duktal karsinom, süt bezlerinde ise lobular karsinom olarak adlandırılır (82). Bu iki bölgede gelişen kanser, invazyon ve metastaz özellikleri göz önüne alınarak “İn situ karsinom” ve “İnvaziv (infiltrate) karsinom” olarak kategorize edilir (81) (Şekil 2.17). EK-2’de meme kanseri sınıflandırması yer almaktadır. İn sitü karsinom, farklı bölgelere yayılma ve invaziv özelliği taşımazken invaziv karsinom yayılma eğilimindedir (81).



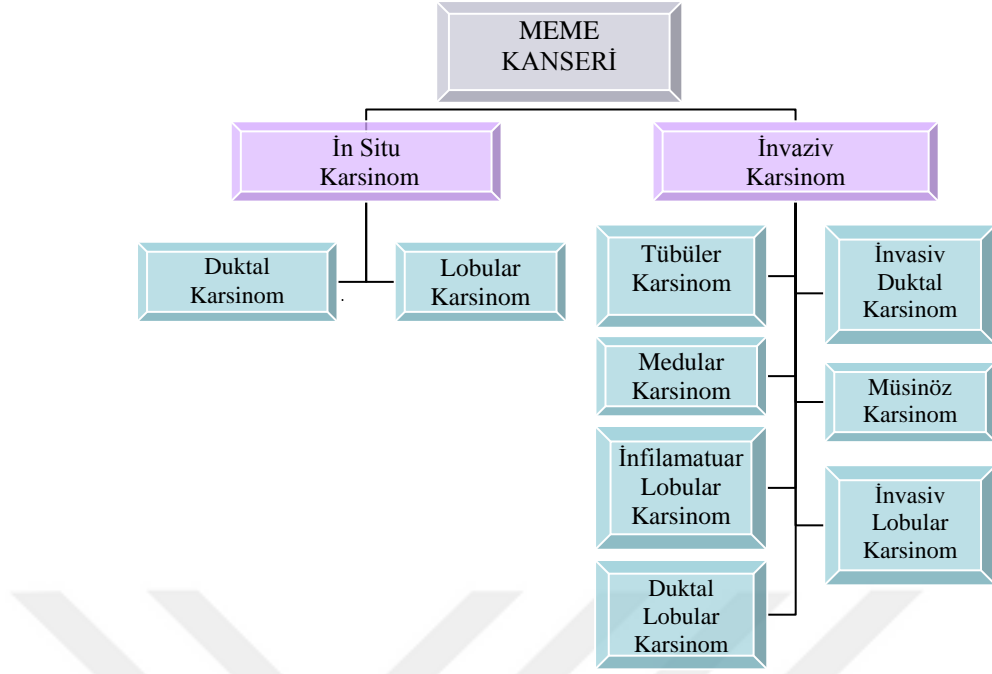
Şekil 2.15. Normal meme dokusundan invaziv karsinom gelişimi (83).

### İn Situ Meme Karsinomu

Kanserin köken aldığı bölgeye göre, duktal karsinom in situ (DKİS) ve lobular karsinom in situ (LKİS) olmak üzere iki tür in situ meme karsinomu bulunmaktadır. DCİS, duktus bezleri boşluklarını doldurur ve şeklini bozar. LKİS ise lobüler boşlukları genişletir ancak şeklini bozmaz. İki tür de bazal membran ile sınırlıdır (28).

Duktal Karsinom İn Situ (DKİS): Non-invaziv anormal hücrelerin meme süt kanallarını kapladığı durumdur (Şekil 2.18). Heterojen görünümleri olmasına rağmen ortak özellikleri, malign karakterli hücrelerin kanallar ve membran çevrili boşluklar içerisinde sınırlı proliferasyonu gerçekleşir (84). Başka bir deyişle, anormal hücreler kanaldan bazal membran epiteline yayılmazlar. Bu nedenle aksilla lenf nodül tutulumu veya uzak metastaz beklenmez. Tüm meme kanseri vakalarının %20-25'ini oluşturur (85).

Lobüler Karsinom İn Situ (LKİS): Anormal hücrelerin meme lobüllerinde bulunduğu durumdur. Bu durumda nadiren invaziv kanser gelişimi görülür. LKİS çok seyrek görülen ve meme kanseri riskinin arttığını gösteren bir durumdur (85). Genellikle raslantısal olarak saptanırlar ve kitle oluşumu gözlenmez. Bu nedenle de mamografide LKİS saptanma insidansı değişmez (28) (Şekil 2.19).



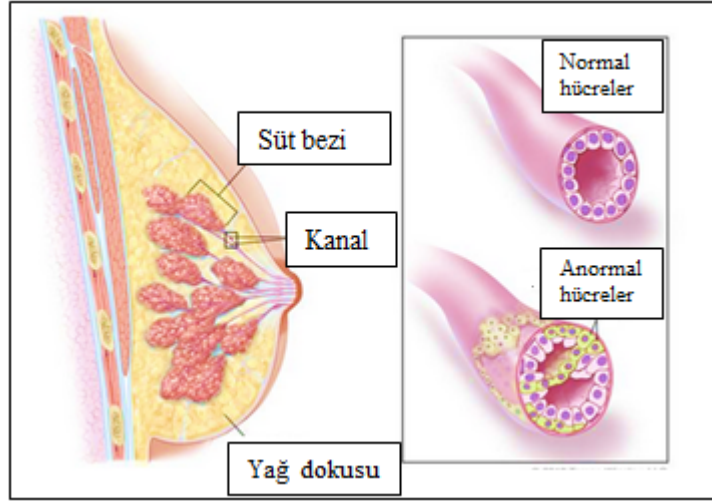
**Şekil 2.16.** Meme kanseri alt türlerinin histopatolojik sınıflandırılması (81).

### **İnvaziv Meme Kanseri**

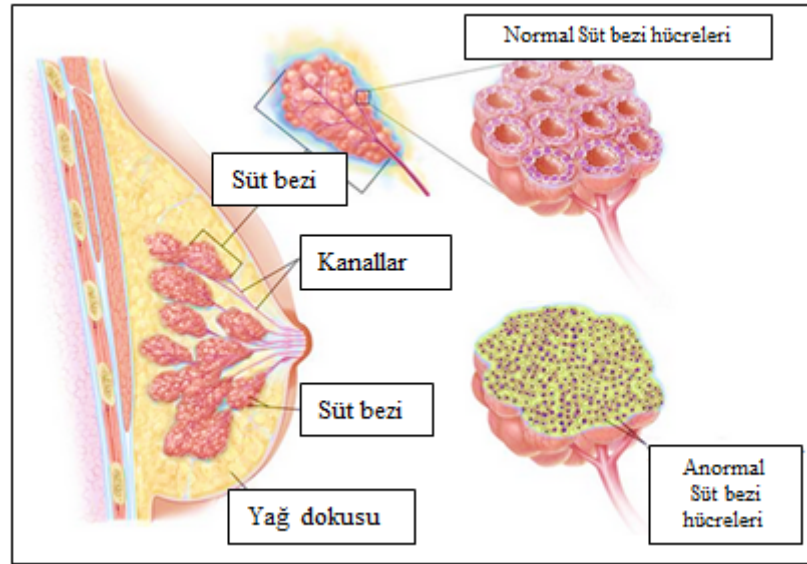
Malign meme tümörlerinin en önemlilerinden olan adenokarsinomlardır. İn situ karsinomlar, malign epitel hücreleri bazal membranla sınırlı iken, invaziv karsinomlarda neoplastik hücreler bazal laminayı aşarlar ve stromaya invaze olurlar.

Bu nedenle, kan ve lenf yolu ile lenf nodullarına tutunabilirler veya uzak metastaz yapabilirler (87). 2 cm'den küçük invaziv karsinomlarda 5 yıllık sağ kalım % 87dir ve prognozları, 5 yıllık sağkalım oranı %90 olan in situ karsinomlar gibi çok iyidir (28).

İnvaziv Duktal Karsinom: Kanserlerin %70-80'i bu grupta yer almaktadır. Bu kanser türüne genellikle DKİS ve nadiren LKİS eşlik eder. Makroskopik görünümleri heterojendir ve tümör kenarları düzensizdir. Lenfovasküler boşluklara invazyon saptanabilir (28).



Şekil 2.17. Meme kanallarında duktal karsinoma in sitü gelişimi (86).



Şekil 2.18. Meme loblarında lobular karsinoma in sitü gelişimi (86).

İnflamatuvar Karsinom: Ele gelen kitle olmaksızın ödemli ve eritematöz görülmesi ile karakterizedir. Karsinogeneze bağlı olarak dermal lenfatik boşlukların dolması ve lenfatik kanalların bloke olması sonucunda ödem oluşur. Uzak metastaz sıklıkla görülür bu nedenle 5 yıllık sağkalım %50'nin altındadır (28).

Medullar Karsinom: Meme kanserinin %1'inden daha az görülür. Çevre dokular ile sınırları belirgin ayrılır ve büyük anaplastik hücreler görülür. Lenfoplazmatik infiltrasyon ile fibroadenomlardan ayrılırlar (28).

Müsinöz Karsinom: Nadir bir alttürüdür. Tümör hücreleri stromayı parçalarken müsinöz oluştururlar. Makroskopik görüntüleri yumuşak ve jeletinöz görünümündedir. Sınırları belirgin olduğundan fibroadenom yanılıgısı oluşturabilir (28).

Tübüler Karsinom: Mamografide 1 cm altında saptanan ve invaziv tümörlerin %10'unu oluştururlar ve düzensiz yoğunluklar olarak saptanır. Lenf nodül metastazı seyrek, prognozu çok iyidir (28).

### **2.3.3.2. Meme Kanseri Alt Türlerinin Moleküler Sınıflandırması**

Benzer klinik ve patolojik özellikler göstermelerine rağmen tümörler farklı davranışlar sergileyebilir. Buna ek olarak, tümörlerin histolojik görünümünün altında yatan karmaşık genetik değişiklikler ile kanser gelişimi ve ilerlemesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde histolojik özellikler yeterli olmayabilir (88).

Meme kanseri moleküler sınıflandırması immunohistokimya/forans *in situ* hibridizasyon (IHC/FISH) profillerine göre ve ER, PR, HER2 varlığı temel alınarak yapılır (89). Moleküler seviyede Perou ve ark.'ı, meme kanseri gen ekspresyon seviyelerini analiz ederek cDNA, mikroarray teknolojilerini kullanarak moleküler alt tür ayrımı yapmışlardır. Bu genler ile hastalık seyri, hayatta kalım, nüks, metastaz bölgesi ve kemoterapiye cevap verme özellikleri arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (89, 90). Luminal (Luminal A ve Luminal B), HER2 pozitif, bazal benzeri, normal benzeri alt türleri meme kanseri moleküler alt türlerini oluşturmaktadır (90).

Luminal A: Meme kanseri vakalarının %50-60'ını oluşturur. Luminal epitelyal sitokeratinlerden CK8 ve CK18 ekspresyonu görülür. Luminal A yüksek seviyeli ER ve düşük proliferasyon seviyesi ile karakterize edilir. Bu tümörler sıklıkla histolojik olarak, nükleer pleomorfizmi düşük dereceli mitotik aktiviteye sahip olup ve iyi prognoz türleri içerir. Nüks oranı diğer alt tiplere göre oldukça

düşüktür ve kemiğe metastaz oldukça yaygındır. Fakat karaciğer, akciğer ve merkezi sinir sistemi metastazları ise hastaların % 10'unu geçmez (88).

Luminal B: Meme kanseri vakalarının %15-20'sini oluşturan meme kanseri türüdür. Daha agresif bir fenotip, yüksek histolojik derece ve proliferatif indeks, kötü prognoza sahiptir. Luminal-A alt tipine kıyasla daha yüksek bir nüks oranı ve nüks sonrası düşük sağkalım oranları görülür (88).

HER2 Pozitif: Meme kanseri vakalarının %15-20'sini oluşturan meme kanseri türüdür. HER2 pozitifliği daha agresif biyolojik ve klinik davranış gösterir. Tedavinin yokluğunda, HER2 pozitif tümör zayıf bir prognoza sahiptir (88).

Bazal-Benzer: Meme kanseri vakalarının %8 ile %35'ini oluştururlar. Bu tümörlerin çoğu beyin ve akciğer metastazı gösteren, agresif klinik davranışlı duktal infiltran tümörlerdir. Bazal-benzeri tümörler yüksek düzeyde CK5, CK14, CK17 ve laminin gibi bazal miyoepitelyal belirteçleri eksprese ederken ER, PR ve HER2 ekspresyonu yoktur, dolayısıyla triple negatif olarak adlandırılırlar ve yüksek riskli meme kanseri türüdür (88).

Normal Benzeri: Meme kanseri, vakalarının yaklaşık %5- 10'unu oluşturur. Genellikle ER, PR ve HER2 ekspresyonu olmadığından triple negatif olarak sınıflandırılırlar fakat CK5 ve EGFR ekspresyonu olmadığından bazal-benzeri meme kanserleri olarak kabul edilmezler (88). Bu tümörler de bazal epitel genlerinin güçlü ekspresyonu görülürken, luminal epitel genlerin ekspresyonu düşüktür. Bu kanser türünde CD36 antijeni kolajen tipi I, gliserol 3 fosfat dehidrojenaz, lipoprotein lipaz A, alkol dehidrojenaz 2 ekspresyonu görülür (82).

Düşük Claudin: Bu tümörlere sahip meme kanserli hastalar, triple-negatif tümörlere sahip hastalar gibi kötü klinik sonuç gösterirler. Kanser hücrelerinde EMT dönüşümü sonucunda epitelyal karakterinin kaybedilmesine ek olarak, sıkı bağlantı noktaları (tight junction), hücre-hücre adezyon molekülleri, claudin 3, 4 ve 7 ve E-kaderin gibi moleküllerinin ekspresyonunda da azalış görülür (88).

### 2.3.5. Meme Kanseri Evrelendirmesi

Tümör evresi (stage), klinik bir unsurdur ve tümörün progresyonu, yayılımı hakkında bilgi sunar (19). Meme kanseri tanısı konmuş hastaların, hastalığının yaygınlık derecesini tespit edilmesi için kullanılan sınıflandırmaya evrelendirme denir (87). Günümüzde en sık kullanılan kanser evreleme sistem UICC (Union Internationale Contre Le Cancer ) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer) tarafından belirlenmiş olan tümör-nod-metastaz (TNM) sınıflandırılmasıdır. EK-3'de TNM evrelemesinin kriterleri ve EK-4'de meme kanseri TNM evrelendirmesi yer almaktadır (91).

*Primer Tümör boyutu (T):* Klinik ve patolojik evrelendirme T evresi ile aynı kriterlere sahiptir. Klinik evrelemede palpasyon ve radyolojik bulgular, patolojik evreleme ise tümörün makroskopik ölçüleri kullanılır.

*Lenf nodu tutulumu (N):* Klinik evreleme için aksial ve mammaria interna bölgesindeki palpasyonbulguları kullanılırken, patoloji evrelemede disseke edilmiş gangliyonların mikroskopik görüntüleri sonucu elde edilen bulguları kullanılır.

*Uzak organ metastazı (M):* Uzak metastazın varlığı hakkında bilgi sunar.

Meme kanseri 5 yıllık sağkalım süresi tümör evresi ile ilişkilidir. Evre 0 için beş yıllık yaşam beklentisi %99-100, evre I için %95-100, evre II için %86, evre III için %57, evre IV için %20'dir (92).

Evrendirmenin avantajı (87);

◆ Tedavi seçeneği evrelemeye göre belirlendiğinden tedavi seçimi ve planlamasının kolay olmasıdır.

◆ Tedavi takip imkanı sağlamasıdır.

◆ Hasta prognozu hakkında bilgi vermesidir.

◆ Hastalık süresince tüm değerlerin ve sürecin kıyaslanmasıdır.

◆ Araştırmalara kolaylık sağlamasıdır.

### 2.3.6. Meme Kanseri Prognostik ve Prediktif Faktörleri

Meme kanseri hastalarının tanı anında tedaviden bağımsız olarak hastalığın seyri hakkında doğru bilgi veren, kolaylıkla klinik açıdan değerlendirilebilme imkanı sağlayan “prognostik faktörler”, hastanın gereksiz tedavi almasını engeller. Bu faktörler tümörün büyümesi, invazyonu, veya metastatik potansiyeli hakkındaki patolojik bilgilerdir. Tümör boyutu aksiller nod tutulumunda bağımsız olarak tümör nüks riskinin artışı tetikler. Prediktif faktörler ise tedaviye yanıt verecek hasta grubunun oluşturulmasıdır. Diğer bir deyişle uygulanacak tedaviye hedefin vereceği yanıtı önceden gösteren faktörlerdir (93). Başlıca prognostik faktörler;

Aksiller nod tutulumu, hem nüks hem de sağkalımla yakından ilişkilidir ve nod negatif meme kanseri hastalarında 5 yıllık sağkalım yaklaşık %70-80 iken, nüks %20 civarındadır. Tümör boyutu küçük olsa bile nod tutulum sayısı sağkalım üzerinde etkilidir (93).

Histolojik grade, meme kanserinde en önemli prognostik faktör olmasına rağmen sübjektif bir parametredir. Bu parametre Bloom Richardson gradlama sistemi olarak adlandırılır ve tübül formasyonu, mitoz ve nükleer polimorfizme göre verilen puanlamada üç tip ( grade I, grade II, grade III) kategorileme yapılır (93).

Lenfovasküler invazyon, meme kanserinden ölümlerin artışına neden olan önemli bir faktördür (93).

Steroid hormon reseptör durumu, bakımından negatif olan meme kanseri türlerinin daha kötü prognoza sahip olduğu bilinmektedir. Bu hastaların kemoterapiden ve adjuvan tedaviden aldıkları yanıtın fazla olduğu bilindiğinden dolayı hormon reseptörleri önemli bir prediktif faktördür. Bu reseptörler endokrin tedavinin belirlenmesinde önemlidir (93).

Bunlara ek olarak hücre siklusu, apoptoz, anjiyogenez, hücre proliferasyonu, DNA miktarı, S fazı, timidin indeksi, Ki67 siklin D, p27, p21, topoizomeraz II, p53, bcl-2, VEGF, IGF, EGFR, katapsin D meme kanserinde önemli prognostik ve prediktif faktörlerdir (93).



## 2.4. Kanser Tanısında Kullanılan Yöntemler

### 2.4.1. Meme Kanseri Metastazını Belirleme Yöntemleri

#### Görüntüleme Sistemleri

Kanser, erken evrede lokalize hastalık olarak kabul edilmesine rağmen zamanla semptomik hale gelebilir (94). Günümüzde meme kanseri taramasında kullanılmak üzere geliştirilmiş olan görüntüleme yöntemleri mamografi, ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi ve bilgisayarlı tomografi'dir (94). İntraoperatif cerrahi, rehberlik ve postoperatif numune değerlendirilmesi için umut vaat edici yöntemler olmalarına rağmen kesin tanı sağlayamazlar (95,96).

◆ *Mamografi*, erken teşhiste ve meme kanseri nüksünün tespitinde ASCO'nun önerdiği ve altın standartta sahip bir yöntem olarak kabul edilen görüntüleme sistemi mamografidir (97). Semptomik olgularda tanı amaçlı, tanı konmuş hastalarda tedavi belirlemek amacıyla ve tedavi sonrasında takip amaçlı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Tarama amaçlı kullanılan mamaografi 10 yıllık süreçte ölüm oranını %30'dan %20'ye düşürür (98). Mamografinin hasssiyeti ise %95.7 olmasına rağmen yoğun meme dokusunun incelenmesinde düşük hassasiyet gibi sınırlayıcı özelliği vardır (95).

◆ *Ultrasonografi*, ses dalgaları aracılığı ile görüntüleme sistemidir. Radyasyon içermez, eş zamanlı kitlesel görüntüleme yapması nedeniyle dinamik görüntüleme sunması açısından mamografiden üstündür. Ultrason görüntüleme, tespit karakterizasyonuna ve meme lezyonlarının biyopsisine rehberlik etmesi amacıyla kullanılmaktadır (99). Malign-benign tümör ayrımını net yapamadığı için mamografi ile birlikte kullanılır. Ultrasonografi hassasiyeti %60.9'dur (95).

◆ *Manyetik rezonans* görüntüleme, elektromanyetik radyo dalgalarının vücuda gönderilmesi ve geri dönen sinyallerin görüntüye dönüşmesi ile oluşan sistemdir. Radyasyon içermez (99). Yoğun meme dokusunun incelenmesinde ve gizli meme lezyonlarının saptanmasında etkin bir yöntemdir. MR'ın %94-100'e yakın kanser saptama duyarlılığı olmasına rağmen, duyarlılığı %37-97 arası olma açısından

düşüktür. Bu nedenle rutinde tarama amaçlı kullanılmamaktadır (95).

◆ *Pozitron emisyon tomografisi*, artan glukoz metabolizması baz alarak hem morfolojik hem de metabolik bilgi sunar (95). Duyarlılığı ve özgünlüğü yüksektir. Standart yöntemlerle bulunamayan primer lezyonların değerlendirilmesinde kullanılır (99).

◆ *Bilgisayarlı tomografi*, anatomik bilgi sağlamak için görüntüleme intravenöz olarak iyotlu kontrastı kullanılarak yapılır. PET ile birlikte kullanılarak malign hücreler değişen metabolik aktivitelerine göre saptanır ve lokalizasyonları belirlenir (95).

Hastalığın gelişimi, metastatik yayılmanın belirlenmesi, tümör boyutlarının ölçülmesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde görüntüleme sistemleri günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir.

#### **2.4.2. Tümör Belirteçleri**

Tümör belirteçleri, genellikle serumda, bazen de vücut sıvılarında ve dokularda bulunan çoğunlukla kanser hücreleri tarafından sentezlenen spesifik bir protein yada glikoprotein yapısındadırlar. Vücudun kanser hücrelerine karşı verdiği yanıtın sonucunda oluşurlar (19). Kanserli hastaların serumunda bulunan tümör belirteçleri sağlıklı insanlara kıyasla daha yüksektir. Tedavi hakkında yardımcı olmalarına ek olarak, bu belirteçler genel sağkalım, hastaliksız sağkalım ve hayat kalitesi açısından da önem taşımaktadır (20).

Meme kanserinde kullanılan tümör belirteçleri şunlardır (20);

- ◆ Karsinoembriyonik antijen (CEA),
- ◆ Doku polipeptit antijeni (TPA),
- ◆ Yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein ailesi ve ürünleri (CA15-3),
- ◆ Meme kanseri musin antijeni (BCM),
- ◆ Müsinoz karsinoma antijeni (MCA),
- ◆ Meme kanseri-ilişkili antijen 27.29 (CA 27.29) (20).

CEA ve CA 15-3 gibi serum tümör belirteçleri erken ve ilerlemiş evre kanserlerin değerlendirmesinde sıklıkla hastalarda sistemik tedaviye yanıt ya da direncin belirlenmesinde kullanılmaktadır. CEA, tüm epitelyal kanserlerde ortak olarak yükselen bir tümör belirteçidir. CA15-3 ise, ileri evre meme kanserinin izlenmesinde öneme sahiptir. Meme kanserine spesifik olmasına rağmen, meme dışında over, akciğer, prostat ve benign tümörlerde, over hastalıklarında, hepatit durumunda da yükselebilir (19).

Rutinde meme kanseri tanı ve takibinde kullanılan tümör belirteçleri sadece meme kanserine spesifik değildir. Serumdaki bu belirteçlerin seviyesi, benign süreçte yada farklı kanser türlerinin gelişiminde de bu belirteçlerde artış görülebilir veya kanser gelişimi sürecinde seviyelerinde değişiklik olmayabilir (19). Bu dezavantajları nedeniyle, tümör belirteçlerin kullanımı çoğu zaman yeterli olmayabilir ve ek tespit yöntemleri ile birlikte kullanılabilirler (100). Çünkü mamografiye kıyasla tümör belirteçleri daha az hassasiyete sahiptir ve yalancı pozitiflik oranı da göz ardı edilemeyecek kadar fazladır (20).

#### **2.4.3. CTC'nin Likit Biyopsi Olarak Kullanımı**

Girişimsel radyoloji ve görüntüleme sistemleri, metastatik bölgelerin büyük çoğunluğundan biyopsi almak amacı ile kullanılmaktadır. Doku biyopsileri, nispeten daha ucuz, doğruluğu onaylanmış ve kolay bir yöntem olsa da, hasta açısından az miktarda kanama ya da seyrek de olsa daha ciddi komplikasyonlara neden olabilirler (101). Bu nedenle CTC'lerin meme kanseri tanı ve tedavisinde gittikçe ilgi çekici bir yöntem haline gelmiştir (102).

CTC'ler, tümör biyolojisi ve tümör hücrelerinin yayılımı hakkında önemli bilgi sağlama potansiyeline sahiptir. CTC analizinin temel avantajı minimal invaziv hastalığın gelişimi sırasında, çoklu zaman noktalarında kolaylıkla elde edilebilmeleridir. Bu özelliklerinde dolayı "likit biyopsi" olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (16). Likit biyopsi,  $10^9$  normal hematopoietik hücreler arasında gizlenen tek bir tümör hücrelerini tespit eden analitik hassas bir kan testi olarak tanımlanabilir (103).

Tümörlerin heterojen doğası sebebiyle metastaz gerçekleştiren hücreler ile

birincil tümör kitlesi içinde bulunan hücrelerin farklı fenotipik ve genotipik özelliklere sahip olabileceği bilinmektedir (104). Yapılan bir çalışmada, primer doku biyopsisi ile hastadan elde edilen CTC'lerin karakterizasyonu karşılaştırıldığında, primer tümörün HER2 ekspresyon açısından pozitif olduğu fakat CTC'lerin bu ekspresyonu açısından negatif olduğu saptanmıştır (17). Doku kitlelerinin karakteristik özelliği ile metastatik hücreler farklı olabilmesi sebebiyle CTC'ler kanser teşhisi ve tedavi seçiminin belirlenmesinde önemli roller üstlenebilir (64). Doku biyopsisi ile CTC'lerin likit biyopsi özellikleri Tablo 2.4.'de gösterilmiştir (101).

**Tablo 2.4.** Metastatik meme kanserinde doku biyopsisi ile CTC Likit biyopsisinin karşılaştırılması (101).

<b>Doku Biyopsisi</b>	<b>CTC Likit Biyopsisi</b>
İnvazivdir, seyrek önemli morbiditeye neden olabilir.	Minimal invazivdir.
Tedaviye yanıt veya hastalık seyrinin gözlenmesinde birden fazla biyopsi yapılması uygun değildir.	Tedaviye yanıt veya hastalık seyrinin gözlenmesinde birden fazla kez yapılması daha kolaydır.
Analiz için yeterli doku eldesi gereklidir.	CTC izolasyonu zor olabilir ve belki CTC kaybedilebilir.
Oldukça ucuzdur.	Pahalıdır.
Hiçbir özel analitik ekipmanı gerektirmez.	Özel analitik ekipmanı gerektirir.
Tedavi merkezlerinin büyük çoğunluğu gerçekleştirilebilir.	Uygun ekipmana sahip laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir.
ER, PgR, HER2 için tümör dokusunun standardizasyonun İHK (+/- FISH) değerlerinin yorumlanması gereklidir.	CTC gerektiği takdirde üzerinde HER2 yorumlanması ve ER ifadesi için en iyi ileri doğrulama yöntemidir.
Tedavi kararlarının klinik etkisi belirsiz doku biyopsisi biyobelirteç değerlendirmesine bağlıdır.	Tedavi kararlarının klinik etkisi belirsiz CTC biyobelirteç değerlendirmesine bağlıdır.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması**

Çalışmaya, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Kliniği ile Ankara Numune Hastanesi Onkoloji Kliniğine başvuran 11 meme kanserli hasta ve 8 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Bu amaçla Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 02.02.2015 tarihli, 11 sayılı uygunluk belgesi alınmıştır.

Gönüllü bireyler, aşağıda belirtilen kriterler doğrultusunda belirlenmiştir ve çalışma ile ilgili detaylı bilgilendirme yapıldıktan sonra onayları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

##### *Hasta grubu kriterleri*

- ◆ Yeni teşhis konmuş,
- ◆ Hiç tedavi almamış
- ◆ Kanser evrelendirmesi yapılmış meme kanserli hastalar

##### *Kontrol grubu kriterleri*

- ◆ Hastalık geçmişinde herhangi bir kanser türü saptanmamış sağlıklı bireylerden oluşmaktadır.

##### **3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılacak Sarf Malzeme ve Cihazlar**

Tez çalışmasında kullanılmak üzere tercih edilen sarf malzemeler Tablo 3.1-Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmada yararlanılan sarf malzemeler

<b>MALZEMELER</b>	<b>MARKA</b>
Falkon tüpü 15'lik	Isolab, Wertheim, Almanya
Falkon tüpü 50'lik	Isolab, Wertheim, Almanya
BD Flow tüpü 5ML Polystyrol (Akan hücre ölçer tüpü)	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
EDTA'lı tüp (5mL)	Isolab, Wertheim, Almanya
Enjektör 10 cc	İsolab, Wertheim, Almanya
Lamel	Isolab, Wertheim, Almanya
Mikro pipet	Eppendorf Easypet 3, Hamburg, Almanya
Pastör pipet 3mL	Isolab, Wertheim, Almanya
Serolojik pipet 15 mL	Isolab, Wertheim, Almanya
Serolojik pipet 25 mL	Isolab, Wertheim, Almanya
Thoma Lamı	Isolab, Wertheim, Almanya

**Tablo 3.2.** CTC zenginleştirme basamaklarında kullanılan sarf malzemeler

<b>Sarf Malzemeler</b>	<b>Marka</b>
Biocoll Separation Solution (Fikol)	Merck Millipore, Darmstadt, Almanya
MACS CD45 Microbeads (Mikroboncuk)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya
MACS LD kolon	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya
MACS seperator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya
MACS magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Almanya

**Tablo 3.3.** Hücre yüzey moleküllerini işaretlemede kullanılan florokrom bağlı antikorlar

<b>Hücre Yüzey Antikorları</b>	<b>İşaretlenen Florokromlar</b>	<b>İzotip Kontrol Antikorları</b>	<b>Marka</b>
BD Anti-EpCAM (Monoklonal Antikor)	PE	BD IgG1 KPA ITCL NHP PE	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Anti-CD44 (Monoklonal Antikor)	V450	BD IgG2b Isotype Control Horizon V450	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Anti-CD24 (Monoklonal Antikor)	PERCP-CY5.5	BD IgG2a Itcl Percp- Cy5.5	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Anti-CD45 (Monoklonal Antikor)	APC-H7	BD IgG1 Kappa Isotype Control APC-H7	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD

**Tablo 3.4.** Hücre içi boyamada kullanılan florokrom bağlı antikorlar

<b>Hücre İçi Antikorlar</b>	<b>İşaretlenen Florokromlar</b>	<b>İzotip Kontrol Antikorları</b>	<b>Marka</b>
BD Anti-CK7,8 (Polikonal Antikor)	FITC	BD IgG2a Isotype Control FITC	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Anti-CK(14,15,16,19) (Polikonal Antikor)	ALEXA 647	BD IgG1 Isotype Control ALEXA 647	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD

**Tablo 3.5.** Çalışmada yararlanılan alet ve cihazlar

<b>Alet ve Cihazlar</b>	<b>Marka/Model</b>
+4 Buzdolabı (2-8 <sup>0</sup> C)	Klimasan-S 900 SC DD
Akan Hücre Ölçer	The BD FACSAria™ III Cell Sorter
Distile Su Cihazı	ELGA- LA621
Hassas terazi	MRC - ASB-220-C2
Işık Mikroskobu	Nikon- Eclipse E100
Kronometre	ISOLAB
Otomatik pipet pompası	Eppendorf Easypet 3
Santrifüj	Hettich Universal 320 R
Vorteks	MRC SI-100

**Tablo 3.6.** Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

<b>Kimyasal Malzemeler</b>	<b>Marka</b>
BD CellWASH Solüsyonu	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Cytotfix Tampon Çözeltilisi	BD Bioscience, San Jose, California ABD
BD FACS Flow Sheath Fluid (Koruyucu Kılıf Sıvısı )	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Perm/Wash Tampon Çözeltilisi	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD Phosflow Perm III Tampon Çözeltilisi	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD
BD PharMingenStain Tampon Çözeltilisi ( FBS'li)	BD Bioscience, San Jose, Kaliforniya, ABD



**Tablo 3.6.** Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler (devam)

BSA	Albumin Fraction V, Biowest, Nuaille, Fransa
Gibco DPBS (Kalsiyumsuz, Magnezyumsuz)	Gibco, Life Tech, ABD
EDTA disodyum	Genaxxon, Ulm, Almanya

### 3.1.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Tamponlar

MACS CD45 Tampon Çözeltisi: PBS içerisine (pH 7.2), %0,5'lik BSA ve 2mM EDTA eklendi. Hazırlanan solüsyon 2-8<sup>0</sup> C'de çalışmaya kadar saklandı.

Perm/Wash Tampon Çözeltisi: 10X olarak temin edilen solüsyon 1X olacak şekilde dilüe edildi. 9 mL distile su içerisine 1 mL Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek tampon hazırlandı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Akan Hücre Ölçer Çalışma Prensihi

Akan hücre ölçer, tek hücre süspansiyonu halindeki hücrelerin bir akış kanalı boyunca, tek hücre seviyesinde analizini sağlayan bir cihazdır. Hücreler, lazer önünden geçerken yansıyan foton enerjisinin ölçümüne bağlı olarak hücrelerin büyüklük (0,2-150µm), granülarite ve floresans özelliklerine göre hücre popülasyonlarını, organelleri veya benzer ölçüde partikülleri kantitatif olarak araştırma imkanı sağlar (105).



**Şekil 3.1.** Akan hücre ölçer temel prensibi.

Akan hücre ölçer sistemi 3 ana sistemden oluşmaktadır:

Hidrolik Sistem: Akış sistemidir. Partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev görev alır (105). Hücrelerin lazer önünden tek tek geçebilmesi için emilimini sağlayan sistemdir. Ana kısım akım kamarası (akım chamber)'dır. Düşük basınca doğru hareket eden numune, sıvı kılıfı sayesinde tam orta noktada ilerlerken, basınç sistemi de numune basıncının kılıf basıncından yüksek olmasını sağlar (105).

Optik Sistem: Lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan saçılımın çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün şekilde fotodedektöre aktarılmasında görev alır (105).

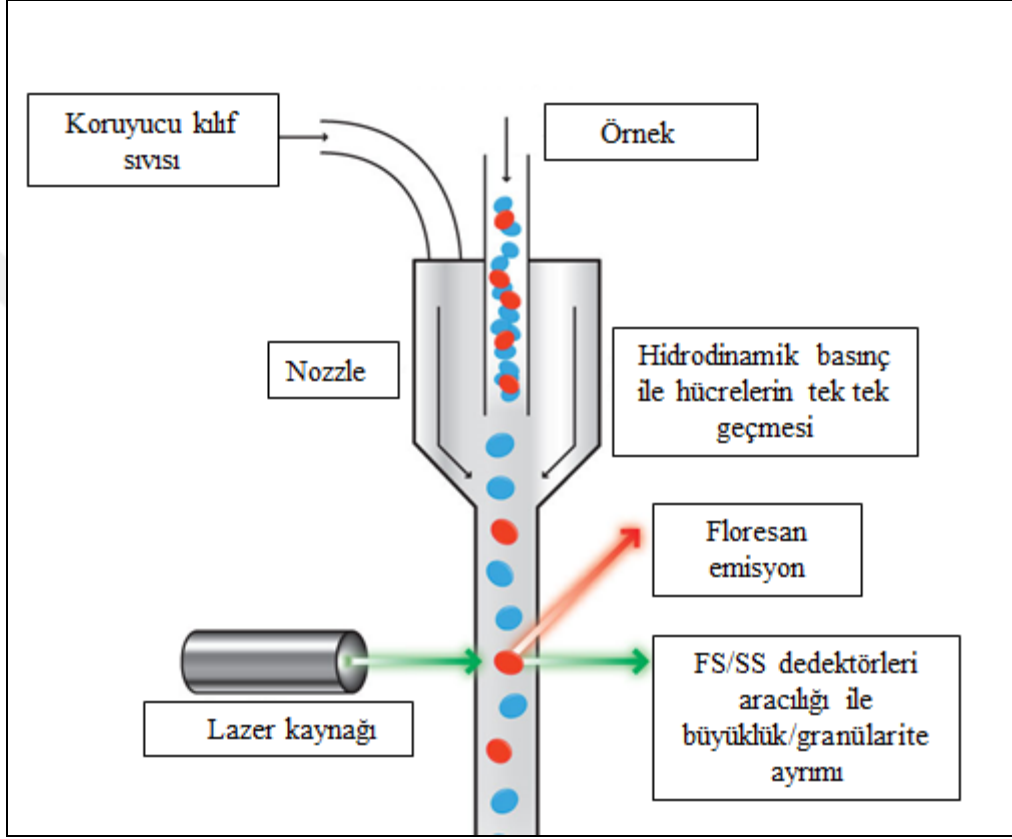
Elektronik Sistem: Elde edilen optik sinyalin Photo Multiple Tubes (PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur (Şekil 3.1) (105). Işık şiddetiyle orantılı olarak dedektörde elektron uyarımı olur ve elektrik akımı voltaj olarak kaydedilir. Voltaj uyarısının oluşması için hücrelerin lazer ışığı ile etkileşmesi gerekir (106)

Tez çalışmasında BD FACS Aria III cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. BD FACS Aria III akan hücre ölçer.

Akan hücre ölçerde çalışma gerçekleştirebilmek için taze ve fikse edilmiş solid dokuların çeşitli yöntemlerle süspansiyon haline getirilmesi gerekir. Hava basıncı ile sıvı içerisinde geçen hücreler, hidrostatik basınç ile cam veya kuartz yapıdaki akış kabineye gelirler. Buradan tek sıra halinde lazer kaynağının önünden geçerler (Şekil 3.3).



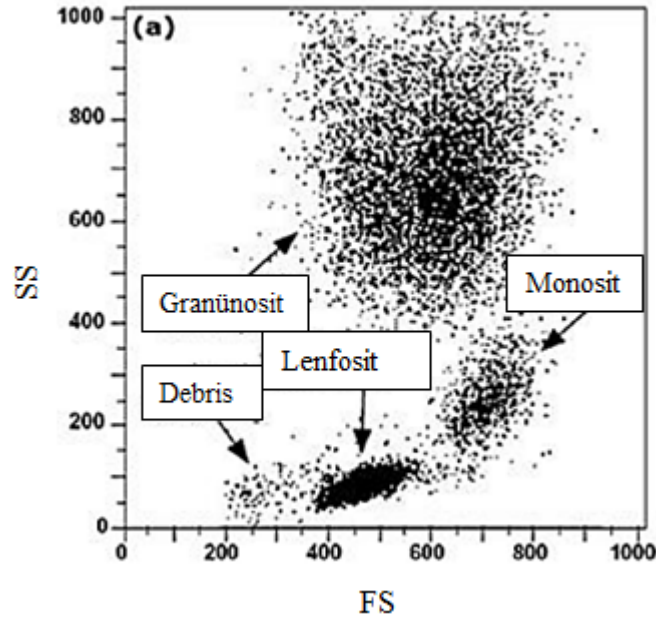
Şekil 3.3.FS ve SS dedektörleri ile hücrelerin kanaldan geçişi (105).

Sistem, floresan yoğunluğunun ölçümüne bağlı olarak çalıştığından güç kaynağı olarak “lazer” kullanılır. Bu kaynak helyum-neon, argon, kripton gibi yüksek enerjilidir (105).

Antikor aracılığı ile ilgilenilen antijeni göstermek için renk maddesi olarak florokrom kullanılır. Aynı dalga boyunda ışığı farklı absorbe eden florokromlar, farklı dalga boylarında ışık saçılımı gösterirler (105). Farklı florokrom boyalar kullanılarak istenilen antijenin belirlenmesinde direkt veya indirekt işaretleme tercih edilebilir. Direkt işaretleme, FITC, PE, PERTI, PERCY gibi işaretli antikorlar seçilerek

hücreler işaretlenir ve sonrasında akan hücre ölçerinde analiz edilir. İndirekt işaretlemede ise, primer ve sekonder olmak üzere iki antikor kullanılır. Primer antikor aranan epitopa karşıdır, sekonder antikor ise, primer antikordaki epitopa spesifiktir ve floresan ile konjuge haldedir. Bu işaretlemede ikinci işaretli antikor birçok birinci işaretli antikoru işaretlemede kullanılabilir (107).

Analiz için sistem belli dedektörler barındırır. Bunlar, Forward Scatter (FS), Side Scatter (SS), Floresan (FL)'dir. FS; hücre yüzey alanı veya yoğunluğu hakkında, SS; granülarite veya iç yapısı hakkında bilgi verir (Şekil 3.4) (105). FS/SS histogramı, hücre süspansiyonu içerisindeki hücre büyüklüğü ve hücre yoğunluğuna göre ayırımıdır. Örneğin, periferik kandan lenfosit, monosit ve granülosit farklı büyüklük ve yoğunluğa sahiptir. FS/SS histogramı farklı bölgelerde dağılım gösterir (Şekil 3.4). FS/SS ayırımından sonra belirli bir hücre grubu hakkında bilgi edinmek için hücre/hücre gruplarının bir çerçeve ile belirlenmesi olayına "gating" (kapılama) denir (107).



Şekil 3.4. FS/SS histogramda periferik kan hücrelerinin dağılımı (105).

### 3.2.2. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen 11 meme kanserli hasta ve 8 sağlıklı bireyden 7,5 mL periferik kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Bu kan örnekleri çalışma süresine kadar oda sıcaklığında bekletildi. Çalışma sırasında sırasıyla zenginleştirme basamaklarında ficol ile yoğunluk farkına dayalı ayırım ve immunomanyetik ayırım, saptama basamağında ise akan hücre ölçer kullanılmıştır (Şekil 3.8).

### 3.2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan CTC Zenginleştirme Basamakları

Zenginleştirme basamağının amacı, ilgilenilen hücre dışındaki kan hücrelerinin belirli teknikler kullanılarak uzaklaştırılması ve ilgilenilen hücre grubunun bulunma ihtimalinin artırılmasıdır.

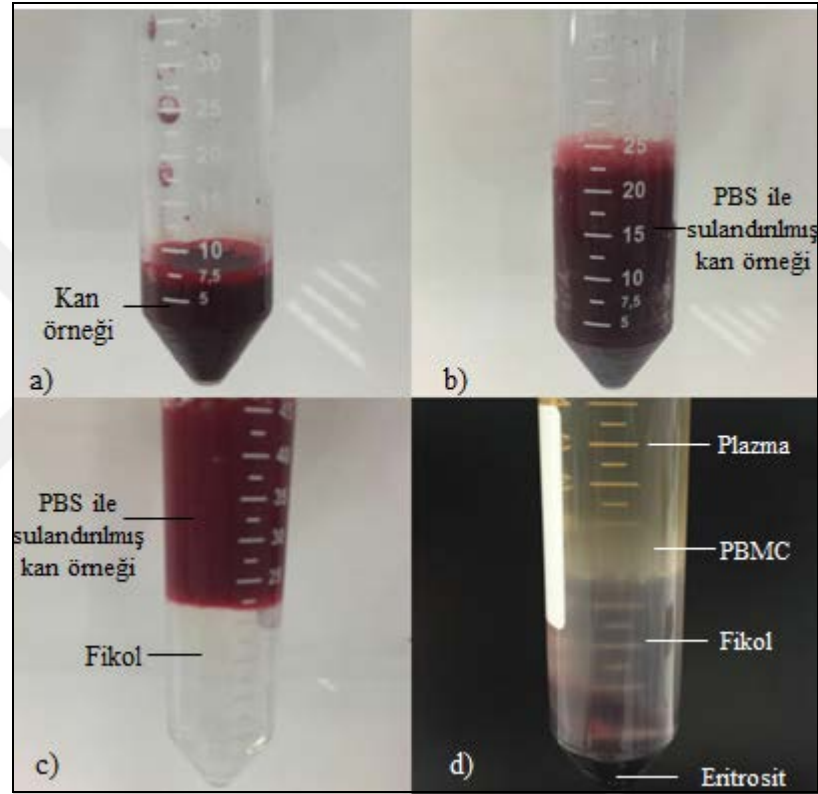
#### Ficol Yoğunluk Farkına Dayalı Zenginleştirme Basamağı

Tüm kan örneği ficol aracılığı ile yoğunluk farkına göre ayrıldı. Oluşan tabakalar içerisinde CTC'lerin ve lökositlerin bulunduğu PBMC tabakası izole edildi.

- ✓ 7,5 mL kan örneği 1:2 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra 1:1 oranında ficol üzerine yavaşça eklendi. 20<sup>0</sup> C'de, 300g'de 25 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Oluşan tabakalar Şekil 3.5'de gösterildiği gibi sırasıyla plazma hücrelerinin bulunduğu tabaka, ortada mononükleer hücrelerin (PBMCs) oluşturduğu bulutumsu tabaka, ficol tabakası ve en altta eritrositlerin bulunduğu tabakalardır. PBMC'lerin bulunduğu tabaka dikkatlice toplanarak ayrı bir falkon tüpüne alındı (Şekil 3.5).
- ✓ Toplanan PBMC'ler, PBS ile 20<sup>0</sup> C, 300g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra, 10 mL PBS hücre süspansiyonuna eklendi.
- ✓ Thoma lamında sayılmak üzere hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak

lama yüklendi ve hücreler mikroskopta sayıldı (108).

- ✓ Thoma lamında hücre sayısı hesaplamak için şu formül kullanıldı (109):  
Toplam hücre sayısı= 16 büyük kare içerisindeki hücre sayısı x 10 000 x dilüsyon faktörü x toplam hacim (109).
- ✓ Sayım işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra hücre sayılarının ortalaması alındı (108).



**Şekil 3.5.** a) Kan örneği b) PBS ile sulandırılmış kan örneği  
c) Ficol ayrımı öncesi kan örneği d) Ficol ayrımı sonrasında oluşan tabakalar (108).

### İmmunomanyetik ayırım (CD45 Depleksiyon) Basamağı

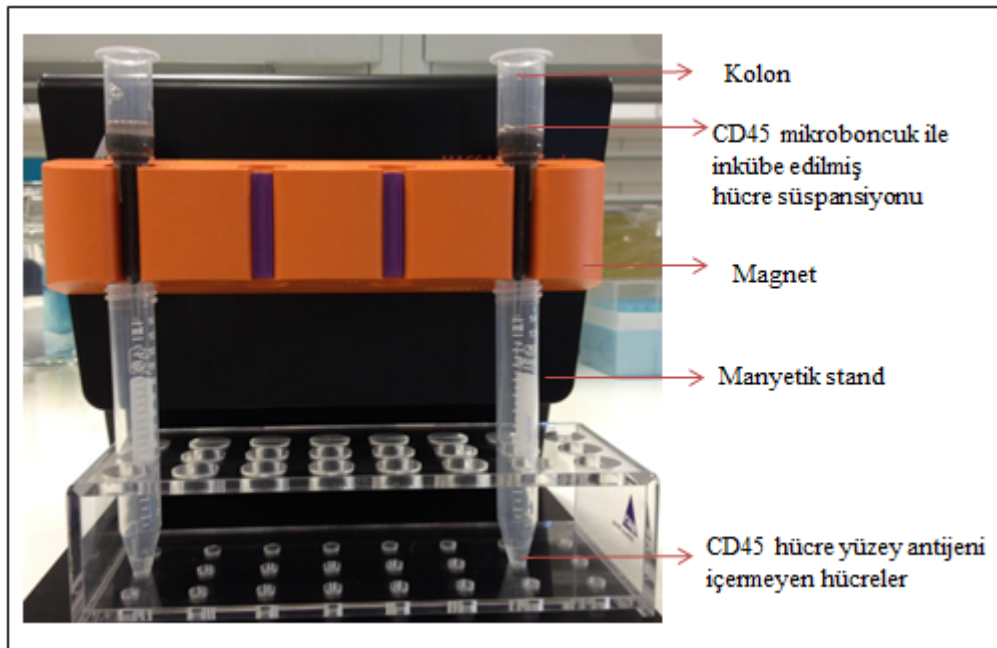
İmmunomanyetik ayırım, lökositlere spesifik CD45 hücre yüzey antijeni hedef alınarak gerçekleştirildi (Şekil 3.6). PBMC'lerin içerisinde yoğun şekilde bulunan lökositlerin hücre yüzey antijenlerine spesifik olan CD45 manyetik mikrobuncuklar

kullanılmıştır. Manyetik mikroboncukların diğer ucuna demir bağlıdır. Bu mikroboncuklar ile inkübe edilmiş hücre süspansiyonu, magnete yeleştirilen kolon içerisinde geçirilmiştir (Şekil 3.6). Manyetik alana maruz kalan mikroboncuk bağlanmış lökositler kolona yapışırken, CD45 yüzey antijeni içermeyen hücreler (ör. CTC'ler) kolondan direkt olarak akar.

- ✓ Hücre süspansiyonu 20<sup>0</sup> C, 300g' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra pellet üzerine 10<sup>7</sup> hücre sayısı ile orantılı olarak şekilde 80µL MACS buffer ve 20µL CD45 manyetikboncuk eklendi ve 15 dakika karanlıkta inkübe edildi (108) (Tablo 3.6).

**Tablo 3.7.** CD45 depleasyonu için kullanılan malzemelerin miktarı

CD45 Depleasyonu için gerekli olan malzemeler	10 <sup>7</sup> hücreye karşılık eklenen miktar
MACS buffer	80µL/10 <sup>7</sup> hücre
CD45 manyetikboncuk	20µL/10 <sup>7</sup> hücre
MACS buffer	1mL/10 <sup>7</sup> hücre



**Şekil 3.6.** İmmunomanyetik ayırım.

- ✓ İnkübasyon ardından  $10^7$  hücre sayısına karşılık 1 mL MACS buffer eklenerek  $4^0$  C 300g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Mikroboncuk içeren hücre süspansiyona,  $1.25 \times 10^8$  hücre sayısına karşılık 500 $\mu$ L MACS tamponu, eklendi.
- ✓ 2 mL MACS tamponu ile LD kolon yıkandı ve ardından hücre süspansiyonu kolona yüklendi.
- ✓ 2 kez, 1 mL MACS buffer ile yıkandı (Şekil 3.6) ve tekrar thoma lamında sayım yapıldı (108).

#### **3.2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan CTC Saptama Basamağı**

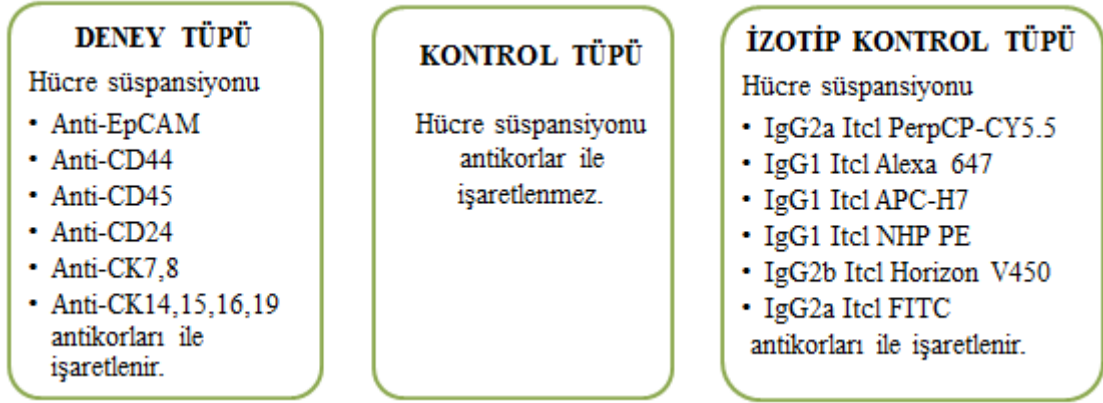
Saptama basamağının amacı, zenginleştirme basamakları sonrasında elde edilen hücre süspansiyonunun, uygun teknikler ile analiz edilmesidir. Hücre süspansiyonu, akan hücre ölçerde analiz edilmek üzere uygun florokrom bağlı spesifik antikorları ile işaretlendi.

CTC saptama basamağında 3 tüp oluşturuldu. Deney tüpünde, hücreler spesifik antikorlarla işaretlendi. Kontrol tüpündeki hücreler antikorlar ile işaretlenmezken, izotip kontrol tüpünde izotip antikorlar ile hücreler boyandı. Kontrol tüpü ve izotip kontrol tüpleri, CTC tespitinde önemli bir süreç olan kapılama işleminde, doğru kapılama yapılırken, yanlış pozitif ya da yanlış negatif değerleri elimine etmek için kullanıldı (Şekil 3.7)

##### Kontrol Tüpü

- ✓ Örnek kolondan geçirildikten sonra, yaklaşık 2,5 ml'lik hücre süspansiyonundan 100  $\mu$ L akan hücre ölçer tüpüne aktardı.
- ✓ Üzerine CellWASH solüsyonu eklendi ve  $4^0$  C 350g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 500  $\mu$ L Cellfix tampon çözeltisi eklenir (108).





Şekil 3.7. Çalışma sırasında 1 hasta için oluşturulan tüpler ve özellikleri.

- ✓ 4<sup>0</sup> C'de karanlıkta 16 saat inkübe edildi. Gerekliği takdirde, inkübe edilmeden çalışmaya devam edilebilir.
- ✓ İnkübasyonun sonrasında örnek 4<sup>0</sup> C 350g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 500µL Stain tampon çözeltisi eklenip vortekslendi.
- ✓ Akan hücre ölçerde analiz aşamasına kadar bu tüp 4<sup>0</sup> C'de karanlıkta bekletildi (108).

#### Deney Tüpü

- ✓ 100µL CellWASH solüsyonu içerisinde 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde hücre sayısına göre oranlanarak CellWASH solüsyonu eklendi. Sırasıyla hücre yüzey boyama ve hücre içi boyama yapıldı.
- ✓ Tablo 3.8'de belirtilen miktarlarda antikorlar eklenerek örnek vortekslendi, ardından 4<sup>0</sup> C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonrasında, örneğe 2 mL'ye Stain Tampon çözeltisi eklendi, 4<sup>0</sup> C 350g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ 500 µL Cellfix tampon çözeltisi eklendi ve örnek 4<sup>0</sup> C'de karanlıkta 16 saat inkübe edildi. Gerekliği takdirde beklenmeden çalışmaya devam edilebilir (108).

**Tablo 3.8.** Hücre yüzeyini işaretlemede kullanılan antikor miktarları

<b>Antikorlar</b>	<b>10<sup>6</sup> hücreye karşılık eklenen Antikor miktarı</b>
Anti-EpCAM-PE	20µL/10 <sup>6</sup> hücre
Anti-Human CD44-V450	20µL/10 <sup>6</sup> hücre
Anti-Human CD24-PERCP-CY5.5	20µL/10 <sup>6</sup> hücre
Anti-Human CD45-APC-H7	5µL/10 <sup>6</sup> hücre

- ✓ İnkübasyon sornası örnek 4<sup>0</sup> C 350g'de 5 dakika santrifüj edildi ve 2mL 1X Perm/Wash tampon çözeltisi eklendi.
- ✓ 100 µL Phosfow Perm III tampon çözeltisi vorteks üzerinde yavaşça eklendi, 4<sup>0</sup>C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
- ✓ Hücre süspansiyonu 4<sup>0</sup> C 350g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 2 mL 1X Perm/Wash tampon çözeltisi eklendi.
- ✓ 4<sup>0</sup> C 350g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 100 µL stain tampon çözeltisi eklendi.
- ✓ Hücre içi boyamada kullanılan antikorlar Tablo 3.9'daki miktarlarda eklendi ve vortekslendi.
- ✓ 4<sup>0</sup> C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edilir.
- ✓ 2 mL Perm/Wash tampon çözeltisi tampon çözeltisi eklendi, vortekslendi.
- ✓ 4<sup>0</sup> C 350g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 500µL Stain tampon çözeltisi eklendi, vortekslendi.
- ✓ Akan hücre ölçerde analiz aşamasına kadar bu tüp 4<sup>0</sup> C'de karanlıkta bekletildi (108).

**Tablo 3.9.** Hücre içini işaretlemede kullanılan antikor miktarları

<b>Antikorlar</b>	<b>10<sup>6</sup> hücreye karşılık eklenen Antikor miktarı</b>
Anti-CK 14,15,16,19- ALEXA 647	5µL/10 <sup>6</sup> hücre
Anti-CK7,8-FITC	20µL/10 <sup>6</sup> hücre

#### İzotip Kontrol Tüpü

- ✓ İmmunomanyetik ayırım ardından süspansiyonda 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde bir miktar hücre Akan hücre ölçer tüpüne alınır. Deney tüpünde anlatılan tüm basamaklar gerçekleştirilir. Hücre yüzeyini ve hücre içini boyamada kullanılan antikorlar Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterilmiştir.
- ✓ Hücre içi ve hücre yüzeyi işaretleme sonrası tüpte bulunan tüm hücreler akan hücre ölçerde analiz edildi.
- ✓ Analiz sırasında CTC’leri doğru belirlenmesi için, antikor eklemeyen oluşturulan kontrol tüpü ve yanlış ışımaları engellemek için oluşturulan izotip kontrol tüpü, deney tüpü ile birlikte değerlendirilmiştir (108).

**Tablo 3.10.** Hücre yüzeyini işaretlemede kullanılan izotip antikor miktarları

<b>Antikorlar</b>	<b>10<sup>6</sup> hücreye karşılık eklenen Antikor miktarı</b>
IgG1 Itcl NHP PE	20µL/10 <sup>6</sup> hücre
IgG2b Itcl Horizon V450	20µL/10 <sup>6</sup> hücre
IgG2a Itcl PerCP-CY5.5	20µL/10 <sup>6</sup> hücre
IgG1 Itcl APC-H7	5µL/10 <sup>6</sup> hücre

**Tablo 3.11.** Hücreini işaretlemeye kullanılan izotip antikor miktarları

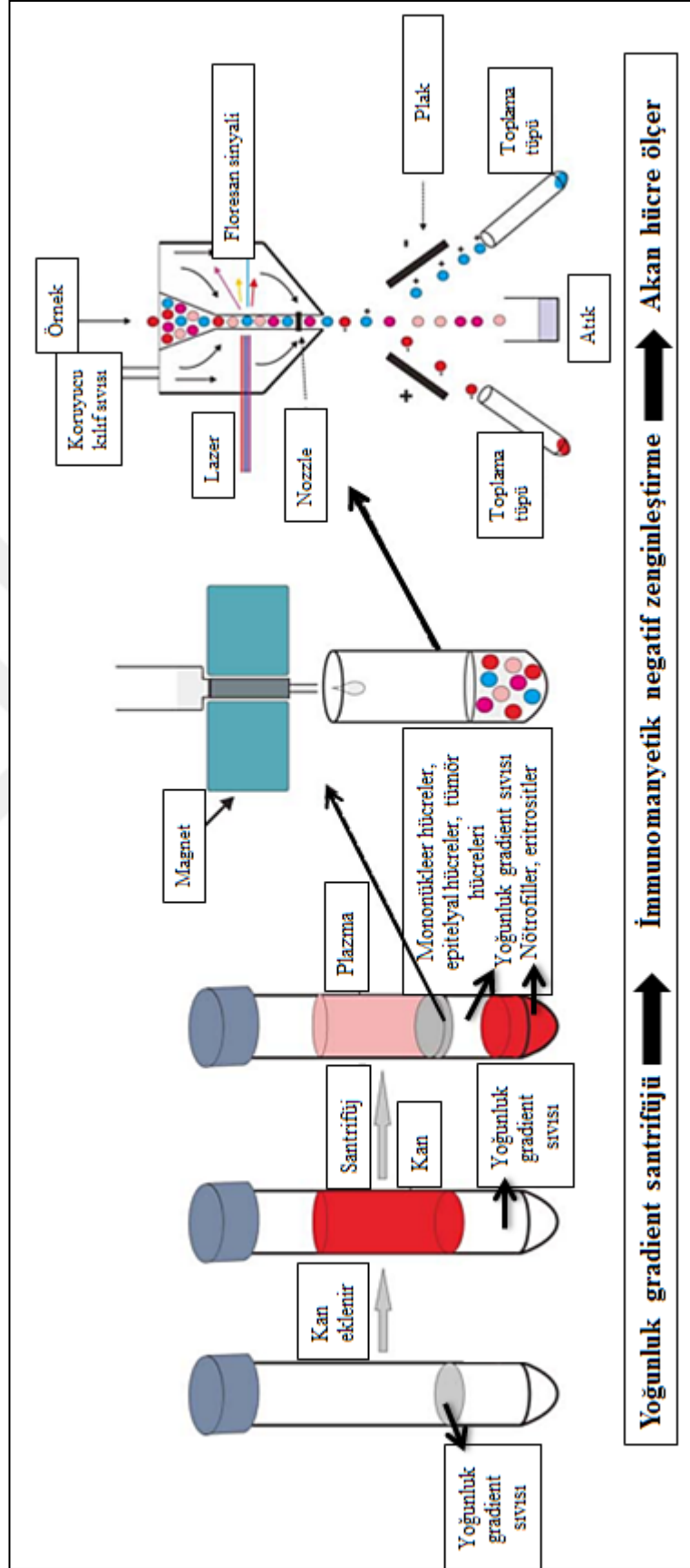
<b>Antikorlar</b>	<b>10<sup>6</sup> hücreye karşılık eklenen Antikor miktarı</b>
IgG1 Itcl ALEXA 647	5µL/10 <sup>6</sup> hücre
IgG2a Itcl FITC	20µL/10 <sup>6</sup> hücre

### 3.3. İstatistiksel Analiz

CTC tespiti sonrasında uygun kapılamalar stratejisi ile elde edilen hücre sayılarının normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. CTC sayıları ortanca (min-maks: minimum-maksimum) ile ifade edilmiştir.

Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CTC'ler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. CK tabanlı ve EpCAM tabanlı kapılama yöntemlerinden elde edilen CK+CTC, EpCAM+CTC, CK+CSC, EpCAM+CSC sayıları Wilcoxon testi ile karşılaştırılmıştır. Hasta grubundaki bireylerin tümör evresi, c-erb-B2 değerleri ile tespit edilen CTC sayıları arasındaki ilişkiler Poliserial korelasyon katsayısı; diğer kanser serum belirteçleri ile CTC sayıları arasındaki ilişki ise Spearman rho katsayısı ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı ve R paket programındaki “polycor” paketi kullanılmıştır.



Şekil 3.8. CTC zenginleştirme ve saptama basamakları (72).

## 4. BULGULAR

Çalışmaya, 35-85 yaş aralığındaki evre I-II' den 3 hasta (% 27.3), evre III'den 5 hasta (% 45.4) ve evre IV'den 3 hasta (% 27.3) olmak üzere 11 meme kanserli hasta ve 8 sağlıklı birey kontrol grubu olarak dahil edildi. Evre II ve evre IV meme kanserli hastalar içerisinde 1'er hastada, tedavileri süresince değişen CTC ve CSC değerlerini gözlemek için ilk kürden sonra bir kan örneği daha alındı (Tablo 4.2).

Hastaların demografik, klinik ve tümör özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Meme kanserli hastaların ER ve PR durumu, c-erb-B2 değerleri (EK-5) ile hastalarda tespit edilen CTC sayıları Tablo 4.4'de, sağlıklı bireylerde saptanan CTC sayıları ise Tablo 4.9'da belirtilmiştir. Tespit edilen CTC subpopulasyonları Tablo 4.2'de gösterildiği gibi katagorize edilerek analizleri gerçekleştirilmiştir.

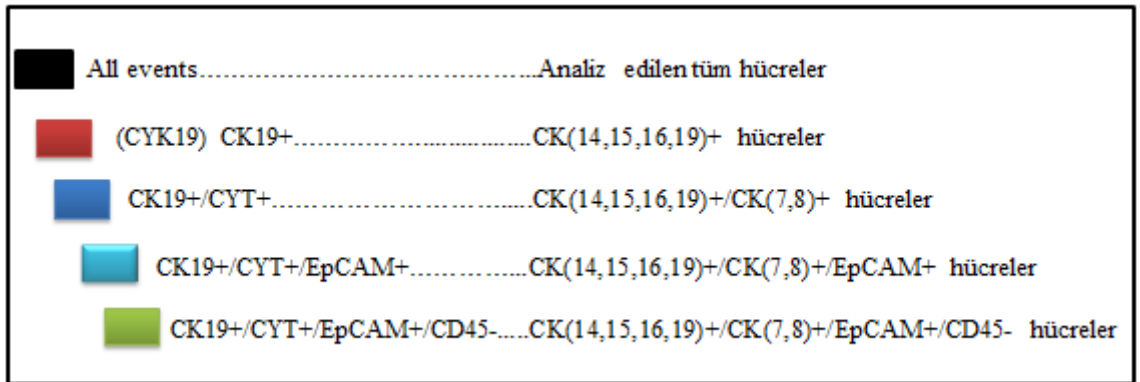
**Tablo 4.1.** Hastaların demografik, klinik özellikleri

Hastaların özellikleri	Parametreler	Sayı (%)
Yaş Grubu	≤50	5 (%45.5)
	>50	6 (%54.5)
Opere	Negatif	4 (%57.1)
	Pozitif	7 (%42.9)
Evre	I	-
	II	3 (%22.3)
	III	5 (%45.4)
	IV	3 (%22.3)
ER durumu	Negatif	2 (%18.2)
	Pozitif	9 (%81.8)
PR durumu	Negatif	2 (%18.2)
	Pozitif	9 (%81.8)
c-erb-B2 değeri	0	3 (%27.2)
	1+	4 (%36.4)
	2+	2 (18.2)
	3+	2 (18.2)

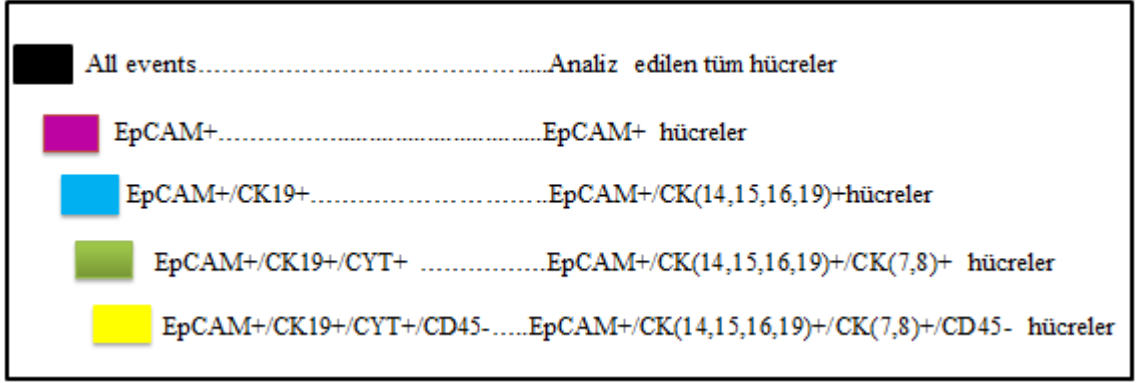
**Tablo 4.2.** CTC gruplandırması

CTC	CTC subpopulasyonları	Kapılama stratejisinde seçilen ilk hücre grubu	Kapılama stratejisinde sırasıyla seçilen hücre grupları
	CK <sup>+</sup> CTC	CK tabanlı CTC	CK(14,15,16,19) <sup>+</sup> /CK(7,8) <sup>+</sup> /EpCAM <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup>
	EpCAM <sup>+</sup> CTC	EpCAM-tabanlı CTC	EpCAM <sup>+</sup> /CK(14,15,16,19) <sup>+</sup> /CK(7,8) <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup>
	CK <sup>+</sup> CSC	CK(14,15,16,19) tabanlı CSC (CK tabanlı CSC)	CK(14,15,16,19) <sup>+</sup> /CK(7,8) <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>
	EpCAM <sup>+</sup> CSC	EpCAM tabanlı CSC	EpCAM <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>
	CSC	CSC tabanlı	CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>

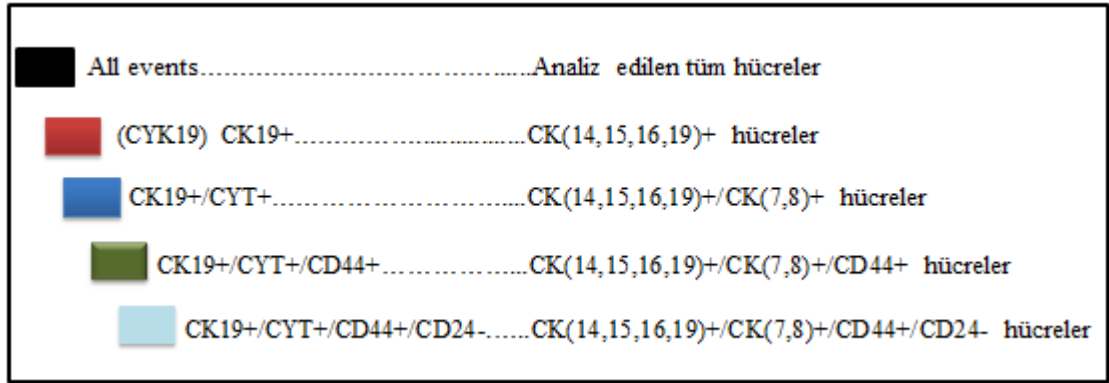
Akan hücre ölçerde analiz edilen örneklerin sonuçları Şekil 4.1- Şekil 4.5’de gösterildiği gibi elde edilmektedir. Analiz edilen tüm hücreler içerisinde uygun kapılama stratejisi ile kontrol ve izotip kontrol örneklerinin analiz sonuçları ile karşılaştırılarak hücre sayılarına ulaşılmıştır.



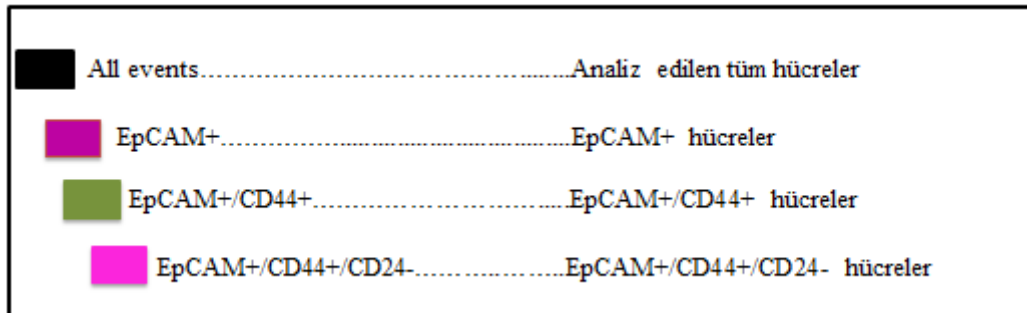
**Şekil 4.1.** CK tabanlı CTC kapılaması.



Şekil 4.2. EpCAM tabanlı CTC kapılması.

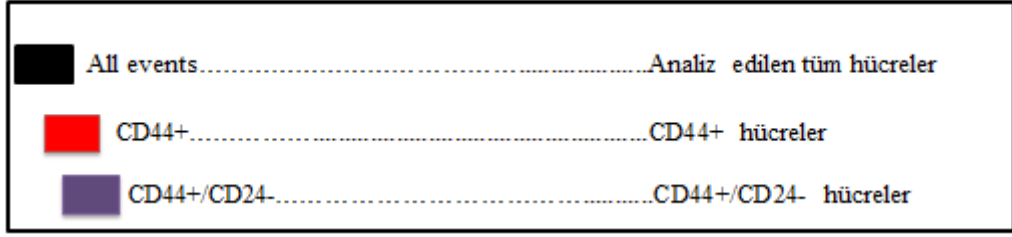


Şekil 4.3. CK tabanlı CSC kapılması.



Şekil 4.4. EpCAM tabanlı CSC kapılması.





Şekil 4.5. CSC tabanlı kapılaması.

#### 4.1. Meme Kanserli Hastaların Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları

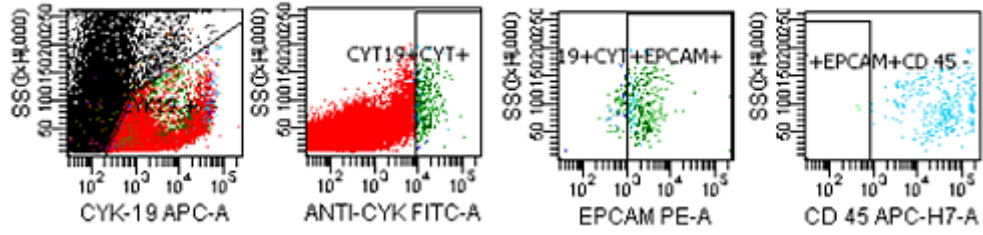
Çalışmaya dahil edilen teşhis konulmuş, evrelemesi yapılmış ve hiç tedavi almamış meme kanserli hastalar Tablo 4.3’de belirtildiği gibi adlandırılmıştır.

Tablo 4.3. Hasta ve takip gruplarının adlandırılması

Hasta Grubu		Hasta Takip
1.	Evre 2 Hasta1 (E2H1)	-
2.	Evre 2 Hasta 2 (E2H2)	E2H2T
3.	Evre 2 Hasta 3 (E2H3)	-
4.	Evre 3 Hasta1 (E3H1)	-
5.	Evre 3 Hasta 2 (E3H2)	-
6.	Evre 3 Hasta 3 (E3H3)	-
7.	Evre 3 Hasta 4 (E3H4)	-
8.	Evre 3 Hasta 5 (E3H5)	-
9.	Evre 4 Hasta 1 (E4H1)	-
10.	Evre 4 Hasta 2 (E4H2)	E4H2T
11.	Evre 4 Hasta 3 (E4H3)	-

E2H1’in akan hücre ölçer sonucuna göre, 7.5 mL kan örneğinde 413 472 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.6 - Şekil 4.10). Tablo 4.4’de uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

FACSDiva Version 6.1.3

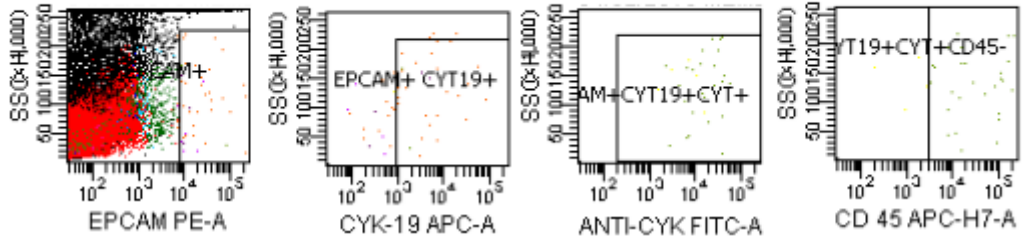


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	413,472	###	100.0
CYT19 +	346,785	83.9	83.9
CYT19+CYT+	401	0.1	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	336	83.8	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45-	3	0.9	0.0

Şekil 4.6. E2H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3

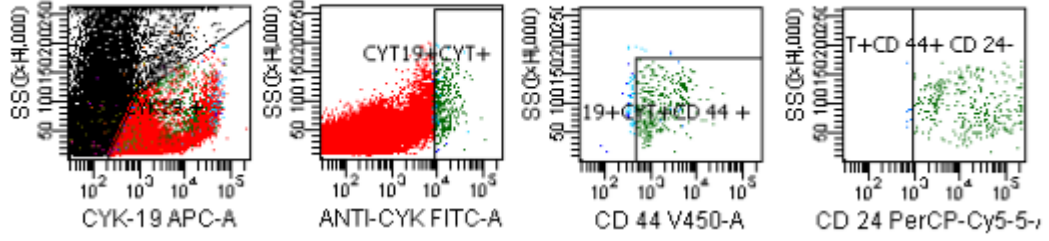


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	413,472	###	100.0
EPCAM+	53	0.0	0.0
EPCAM+CYT19+	32	60.4	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	32	100.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	5	15.6	0.0

Şekil 4.7. E2H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3

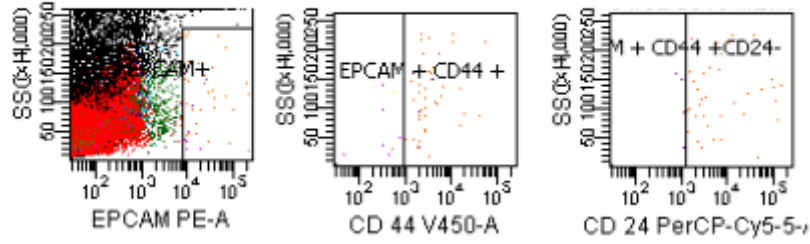


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	413,472	###	100.0
CYT19 +	346,785	83.9	83.9
CYT19+CYT+	401	0.1	0.1
CYT19+CYT+CD 44 +	333	83.0	0.1
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	7	2.1	0.0

Şekil 4.8. E2H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup> CSC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3

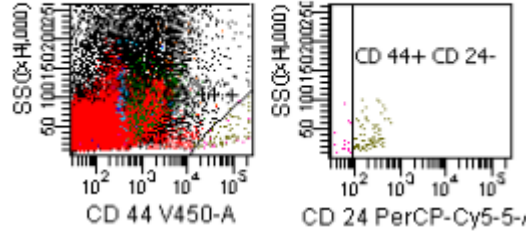


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	413,472	###	100.0
EPCAM+	53	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	44	83.0	0.0
EPCAM + CD44 + CD24-	4	9.1	0.0

Şekil 4.9. E2H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup> CSC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3



Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	413,472	###	100.0
CD 44 +	103	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	18	17.5	0.0

Şekil 4.10. E2H1'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E2H2'nin verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 748 213 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.11-Şekil 4.15). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	748,213	###	100.0
CYT19 +	7,757	1.0	1.0
CYT19+CYT+	5,121	66.0	0.7
CYT19+CYT+EPCAM+	3,506	68.5	0.5
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	0.2	0.0

Şekil 4.11. E2H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	748,213	###	100.0
EPCAM+	119	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	49	41.2	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	47	95.9	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	4	8.5	0.0

Şekil 4.12. E2H2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	748,213	###	100.0
CYT19 +	7,757	1.0	1.0
CYT19+CYT+	5,121	66.0	0.7
CYT19+CYT+CD 44 +	189	3.7	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +CD 24-	12	6.3	0.0

Şeki 4.13. E2H2' nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	748,213	###	100.0
EPCAM+	119	0.0	0.0
EPCAM+ CD 44 +	115	96.6	0.0
EPCAM + CD 44 + CD 24 -	5	4.3	0.0

Şekil 4.14. E2H2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	748,213	###	100.0
CD 44 +	1,622	0.2	0.2
CD 44+ CD 24 -	1,587	97.8	0.2

Şekil 4.15. E2H2'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E2H3' ün verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 3 925 000 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.16-Şekil 4.20). Tablo 4.4'de uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3,925,000	###	100.0
CYK19 +	2,668	0.1	0.1
CYT19+CYT+	121	4.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	56	46.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	10.7	0.0

Şekil 4.16. E2H3' ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup> CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3,925,000	###	100.0
EPCAM+	393	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	86	21.9	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	86	100.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	5	5.8	0.0

Şekil 4.17. E2H3' ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3,925,000	###	100.0
CYK19 +	2,668	0.1	0.1
CYT19+CYT+	121	4.5	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	109	90.1	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	9	8.3	0.0

Şekil 4.18. E2H3' ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3,925,000	###	100.0
EPCAM+	393	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	324	82.4	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	4	1.2	0.0

Şekil 4.19. E2H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	3,925,000	###	100.0
CD 44 +	2,208	0.1	0.1
CD 44+ CD 24-	1,106	50.1	0.0

Şekil 4.20. E2H3'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E3H1'in verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 850 770 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.21,-Şekil 4.25). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	850,770	###	100.0
CYT19 +	189,315	22.3	22.3
CYT19+CYT+	246	0.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	27	11.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	6	22.2	0.0

Şekil 4.21. E3H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	850,770	###	100.0
■ EPCAM+	100	0.0	0.0
■ EPCAM+ CYT19+	58	58.0	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+	49	84.5	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	7	14.3	0.0

Şekil 4.22. E3H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	850,770	###	100.0
■ CYK19 +	189,315	22.3	22.3
■ CYT19+CYT+	246	0.1	0.0
■ CYT19+CYT+CD 44 +	55	22.4	0.0
■ CYT19+CYT+CD 44 +CD 24-	10	18.2	0.0

Şekil 4.23. E3H1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	850,770	###	100.0
■ EPCAM+	100	0.0	0.0
■ EPCAM+ CD 44+	11	11.0	0.0
■ EPCAM+ CD 44+ CD 24-	5	45.5	0.0

Şekil 4.24. E3H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	850,770	###	100.0
■ CD 44 +	2,969	0.3	0.3
■ CD 44+ CD 24 -	2,709	91.2	0.3

Şekil 4.25. E3H1'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.



E3H2'nin verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 1 931 701 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı ve EpCAM tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.26- Şekil 4.27) Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,931,701	###	100.0
CYK19 +	9,383	0.5	0.5
CYT19+CYT+	149	1.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	82	55.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45-	7	8.5	0.0

Şekil 4.26. E3H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,931,701	###	100.0
EPCAM+	719	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	334	46.5	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	278	83.2	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	9	3.2	0.0

Şekil 4.27. E3H2'nin tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

E3H3'ün verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 507 836 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.28- Şekil 4.32). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	507,836	###	100.0
CYT19 +	152,686	30.1	30.1
CYT19+CYT+	395	0.3	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	363	91.9	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	3	0.8	0.0

Şekil 4.28. E3H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	507,836	###	100.0
EPCAM+	21	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	9	42.9	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	7	77.8	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	3	42.9	0.0

Şekil 4.29. E3H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	507,836	###	100.0
CYT19 +	152,686	30.1	30.1
CYT19+CYT+	395	0.3	0.1
CYT19+CYT+CD 44 +	336	85.1	0.1
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	11	3.3	0.0

Şekil 4.30. E3H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	507,836	###	100.0
EPCAM+	21	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	19	90.5	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	1	5.3	0.0

Şekil 4.31. E3H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	507,836	###	100.0
CD 44 +	138	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	31	22.5	0.0

**Şekil 4.32.** E3H3'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E3H4'ün verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 1 511 855 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.33- Şekil 4.37). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,511,855	###	100.0
CYK19 +	730	0.0	0.0
CYT19+CYT+	99	13.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	15	15.2	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	3	20.0	0.0

**Şekil 4.33.** E3H4'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,511,855	###	100.0
EPCAM+	72	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	34	47.2	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	25	73.5	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	0.0	0.0

**Şekil 4.34.** E3H4'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,511,855	###	100.0
CYK19 +	730	0.0	0.0
CYT19+CYT+	99	13.6	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	94	94.9	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	4	4.3	0.0

Şekil 4.35. E3H4'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,511,855	###	100.0
EPCAM+	72	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	63	87.5	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	5	7.9	0.0

Şekil 4.36. E3H4'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,511,855	###	100.0
CD 44 +	151	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	39	25.8	0.0

Şekil 4.37. E3H4'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E3H5'in verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 36 362 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.38- Şekil 4.42). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	36,362	###	100.0
■ CYK19 +	4,023	11.1	11.1
■ CYT19+CYT+	108	2.7	0.3
■ CYT19+CYT+EPCAM+	2	1.9	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	2	100.0	0.0

Şekil 4.38. E3H5'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	36,362	###	100.0
■ EPCAM+	65	0.2	0.2
■ EPCAM+ CYT19+	26	40.0	0.1
■ EPCAM+CYT19+CYT+	10	38.5	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	4	40.0	0.0

Şekil 4.39. E3H5'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	36,362	###	100.0
■ CYK19 +	4,023	11.1	11.1
■ CYT19+CYT+	108	2.7	0.3
■ CYT19+CYT+CD 44 +	104	96.3	0.3
■ CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	6	5.8	0.0

Şekil 4.40. E3H5'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

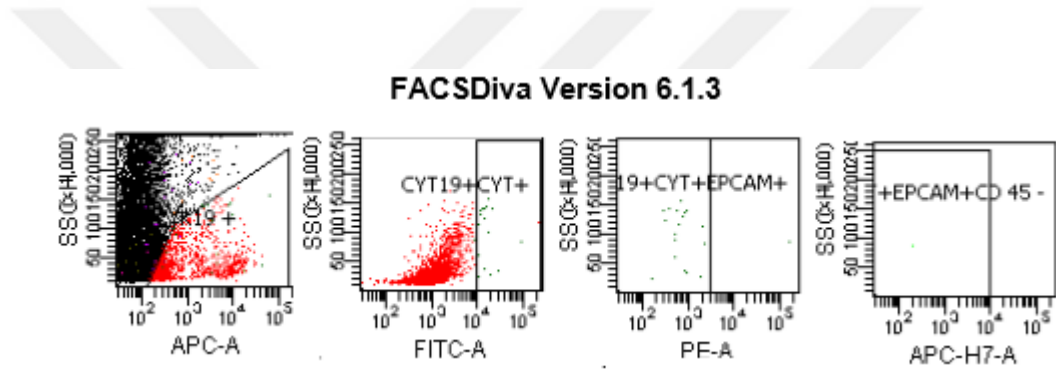
Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	36,362	###	100.0
■ EPCAM+	65	0.2	0.2
■ EPCAM + CD44 +	29	44.6	0.1
■ EPCAM + CD44 +CD24-	3	10.3	0.0

Şekil 4.41. E3H5'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	36,362	###	100.0
CD 44 +	19	0.1	0.1
CD 44+ CD 24-	5	26.3	0.0

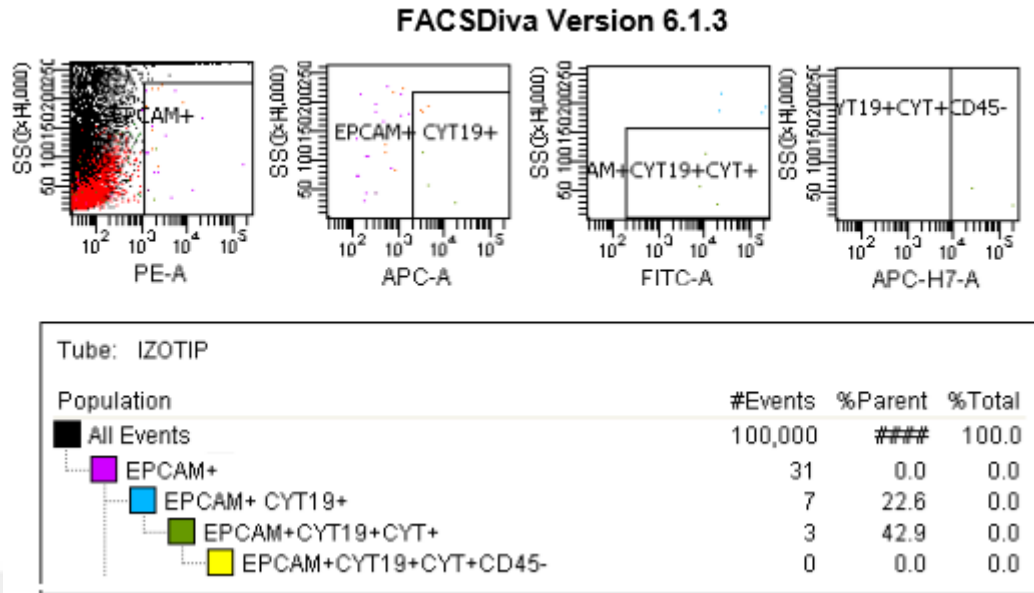
Şekil 4.42. E3H5'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

Şekil 4.43- Şekil 4.47'de E3H5'in izotip kontrol sonuçları yer almaktadır.

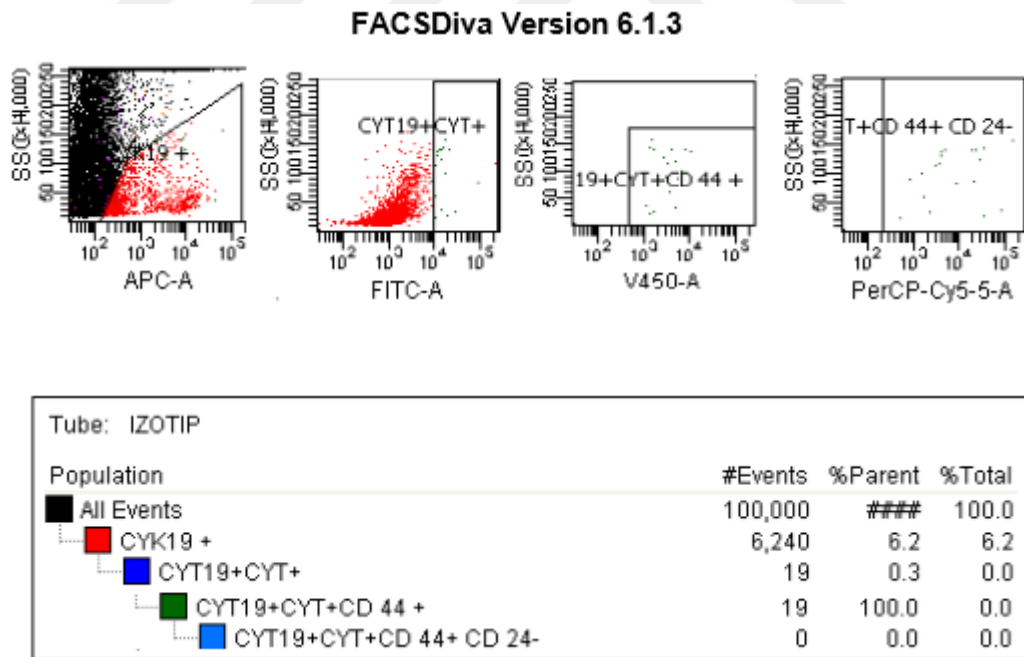


Tube: IZOTIP			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	###	100.0
CYT19 +	6,240	6.2	6.2
CYT19+CYT+	19	0.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	1	5.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	1	100.0	0.0

Şekil 4.43. E3H5'in izotip boyaması.

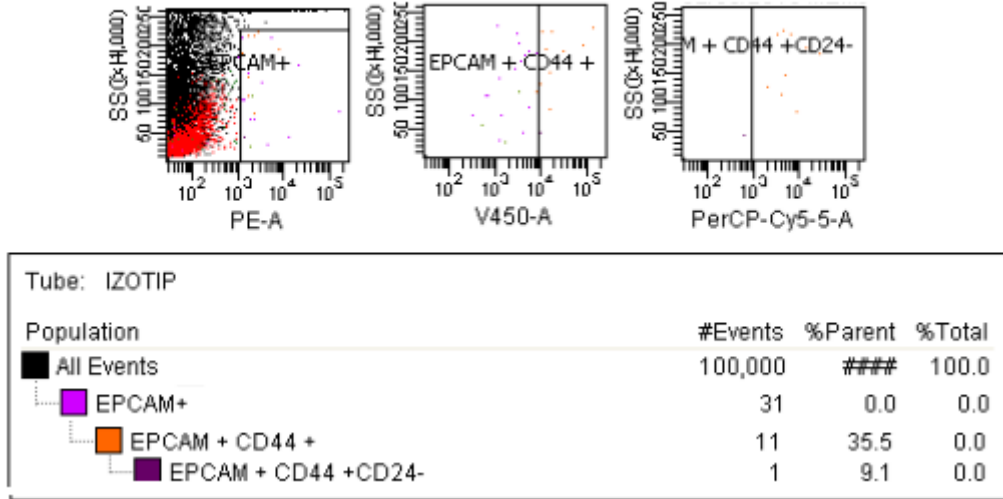


Şekil 4.44. E3H5'in izotip boyaması.

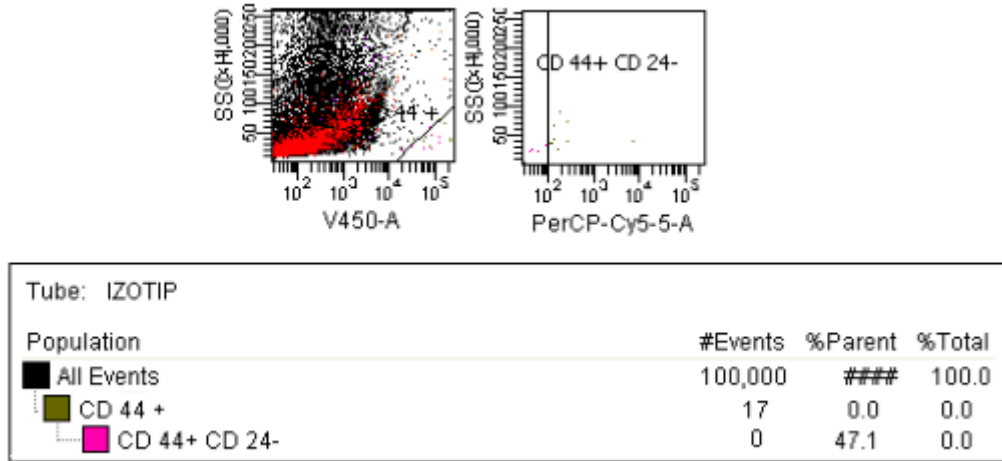


Şekil 4.45. E3H5'in izotip boyaması.

### FACSDiva Version 6.1.3



Şekil 4.46. E3H5'in izotip boyaması.

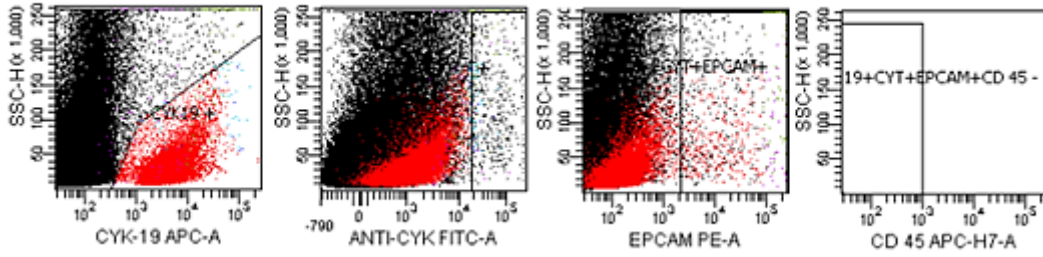


Şekil 4.47. E3H5'in izotip boyaması.

E4H1'in verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 1 332 010 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı ve EpCAM tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.48, Şekil 4.49). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.



FACSDiva Version 6.1.3

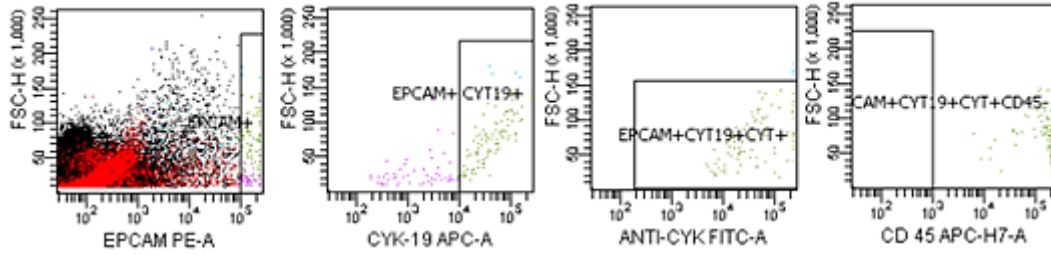


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,332,010	###	100.0
CYK19 +	13,110	1.0	1.0
CYT19+CYT+	66	0.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	55	83.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	1	1.8	0.0

Şekil 4.48. E4H1'in CK tabanlı tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3



Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,332,010	###	100.0
EPCAM+	155	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	105	67.7	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	101	96.2	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	1	1.0	0.0

Şekil 4.49. E4H1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

E4H2'nin verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 194 448 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.50-Şekil 4.54). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	194,448	###	100.0
CYT19 +	790	0.4	0.4
CYT19+CYT+	156	19.7	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	111	71.2	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	16	14.4	0.0

Şekil 4.50. E4H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	194,448	###	100.0
EPCAM+	58	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	45	77.6	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	43	95.6	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	10	23.3	0.0

Şekil 4.51. E4H2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	194,448	###	100.0
CYT19 +	790	0.4	0.4
CYT19+CYT+	156	19.7	0.1
CYT19+CYT+CD 44 +	71	45.5	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +CD 24-	13	18.3	0.0

Şekil 4.52. E4H2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	194,448	###	100.0
EPCAM+	58	0.0	0.0
EPCAM +CD 44 +	54	93.1	0.0
EPCAM +CD 44 + CD 24 -	7	13.0	0.0

Şekil 4.53. E4H2'nin EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	194,448	###	100.0
CD 44 +	1,046	0.5	0.5
CD 44+ CD 24 -	851	81.4	0.4

Şekil 4.54. E4H2'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E4H3'ün verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 4 975 000 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı ve EpCAM tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.55, Şekil 4.56). Tablo 4.4'de, uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	4,975,000	###	100.0
CYT19 +	4,638	0.1	0.1
CYT19+CYT+	70	1.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	66	94.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	5	7.6	0.0

Şekil 4.55. E4H3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	4,975,000	###	100.0
EPCAM+	278	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	229	82.4	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	46	20.1	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	7	15.2	0.0

**Şekil 4.56.** E4H3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

**Tablo 4.4.** Çalışmaya dahil edilen meme kanserli hastalarda saptanan CTC sayıları

Hasta Grubu	Hücre Sayısı (Events)	CTC subpopulasyonlarında tespit edilen hücre sayıları				
		CK <sup>+</sup> CTC	EpCAM <sup>+</sup> CTC	CK <sup>+</sup> CSC	EpCAM <sup>+</sup> CSC	CSC
E2H1	413 472	3	5	7	4	18
E2H2	3 925 000	6	5	9	4	1 106
E2H3	748 213	6	4	12	5	1 587
E3H1	850 770	6	7	10	5	2 709
E3H2	1 931 701	7	9	-	-	-
E3H3	507 836	3	3	11	1	31
E3H4	1 511 855	3	0	4	5	39
E3H5	36 362	2	4	6	3	5
E4H1	1 332 010	1	1	-	-	-
E4H2	194 448	16	10	13	17	851
E4H3	4 975 000	5	7	-	-	-
E2H2T	251 669	6	6	3	5	29
E4H2T	1 376 309	10	10	7	9	46

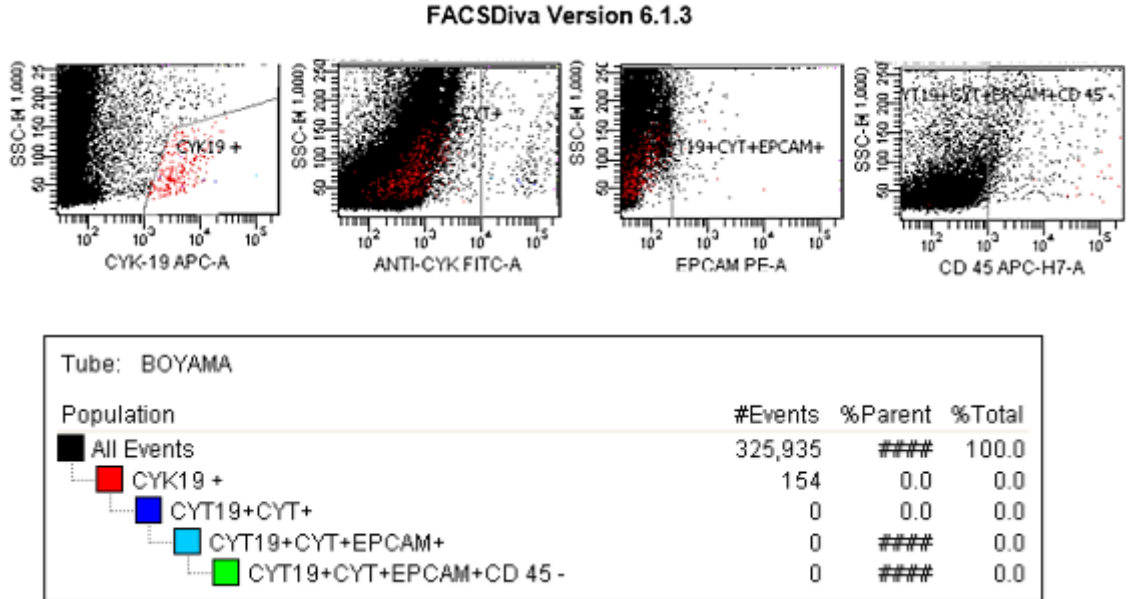
## 4.2. Sağlıklı Bireylerin Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 8 sağlıklı bireyin sonuçları Şekil 4.57 – Şekil 4.102 arasında ve Tablo 4.8'de yer almaktadır. Bu bireylerin kan örneklerinde EpCAM<sup>+</sup>CTC ve CK<sup>+</sup>CTC saptanmaz iken, bazı sağlıklı bireylerde CSC tespit edilmiştir. Tablo 4.5'de kontrol grubuna dahil edilen bireyler yer almaktadır.

**Tablo 4.5.** Kontrol grubuna dahil edilen sağlıklı bireylerin adlandırması

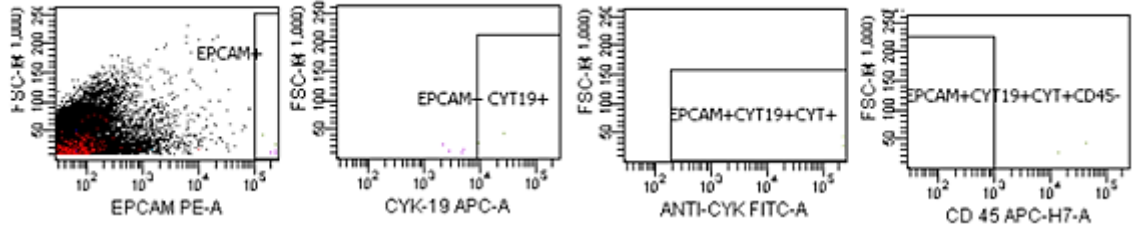
Kontrol Grubu		Adlandırma
1.	Kontrol 1	(K1)
2.	Kontrol 2	(K2)
3.	Kontrol 3	(K3)
4.	Kontrol 4	(K4)
5.	Kontrol 5	(K5)
6.	Kontrol 6	(K6)
7.	Kontrol 7	(K7)
8.	Kontrol 8	(K8)

K1'in verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 325 935 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı ve EpCAM tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.57, Şekil 4.58). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.



**Şekil 4.57.** K1'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3



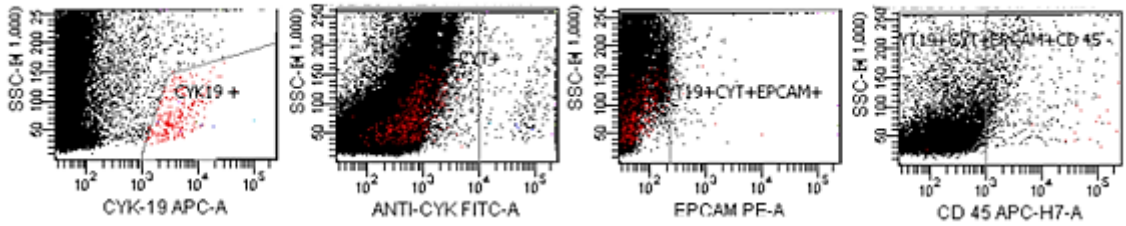
Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	325,935	###	100.0
EPCAM+	14	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	8	57.1	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	8	100.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	0.0	0.0

Şekil 4.58. K1'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Şekil 4.59 ve Şekil 4.60'da K1 izotip kontrol sonuçları yer almaktadır.

FACSDiva Version 6.1.3

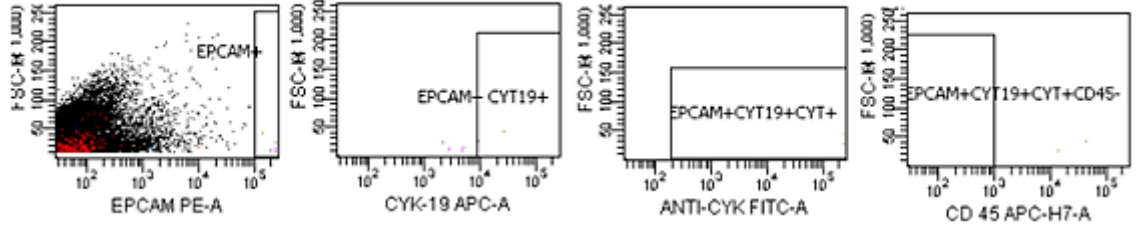


Tube: IZOTIP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	298,245	###	100.0
CYK19 +	282	0.1	0.1
CYT19+CYT+	7	2.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	4	57.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.59. K1'in izotip kontrol boyaması.

FACSDiva Version 6.1.3



Tube: IZOTIP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	298,245	####	100.0
EPCAM+	6	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	2	33.3	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	2	100.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	0.0	0.0

Şekil 4.60. K1'in izotip kontrol boyaması.

K2'nin verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 197 459 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.61- Şekil 4.65). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	197,459	####	100.0
CYK19 +	288	0.1	0.1
CYT19+CYT+	1	0.3	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	####	0.0

Şekil 4.61. K2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	197,459	###	100.0
EPCAM+	23	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	0	0.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	0	###	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	###	0.0

Şekil 4.62. K2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	197,459	###	100.0
CYT19 +	288	0.1	0.1
CYT19+CYT+	1	0.3	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	1	100.0	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	1	100.0	0.0

Şekil 4.63. K2'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	197,459	###	100.0
EPCAM+	23	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	4	17.4	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.64. K2'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	197,459	###	100.0
CD 44 +	7	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	7	100.0	0.0

Şekil 4.65. K2'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.



K3'ün verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 169 147 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.66- Şekil 4.70). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	169,147	###	100.0
■ CYK19 +	14	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	###	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	###	0.0

Şekil 4.66. K3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	169,147	###	100.0
■ EPCAM+	0	0.0	0.0
■ EPCAM+ CYT19+	0	###	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+	0	###	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	###	0.0

Şekil 4.67. K3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	169,147	###	100.0
■ CYK19 +	14	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+CD 44 +	0	###	0.0
■ CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	0	###	0.0

Şekil 4.68. K3'ün CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	169,147	###	100.0
EPCAM+	0	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	0	###	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	0	###	0.0

Şekil 4.69. K3'ün EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	169,147	###	100.0
CD 44 +	4	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	2	50.0	0.0

Şekil 4.70. K3'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

K4'ün verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 301 548 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.71- Şekil 4.75). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	301,546	###	100.0
CYT19 +	54	0.0	0.0
CYT19+CYT+	3	5.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45-	0	###	0.0

Şekil 4.71. K4'ün CK tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	301,546	###	100.0
EPCAM+	0	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	0	###	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	0	###	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	###	0.0

Şekil 4.72. K4'ün EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	301,546	###	100.0
CYT19 +	54	0.0	0.0
CYT19+CYT+	3	5.6	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	2	66.7	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.73. K4'ün CK tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	301,546	###	100.0
EPCAM+	0	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	0	###	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	0	###	0.0

Şekil 4.74. K4'ün EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	301,546	###	100.0
CD 44 +	6	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.75. K4'ün CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

K5'in verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 820 971 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı ve EpCAM tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.76- Şekil 4.77). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	820,971	###	100.0
■ CYK19 +	190	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+	6	3.2	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+	0	0.0	0.0
■ CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	###	0.0

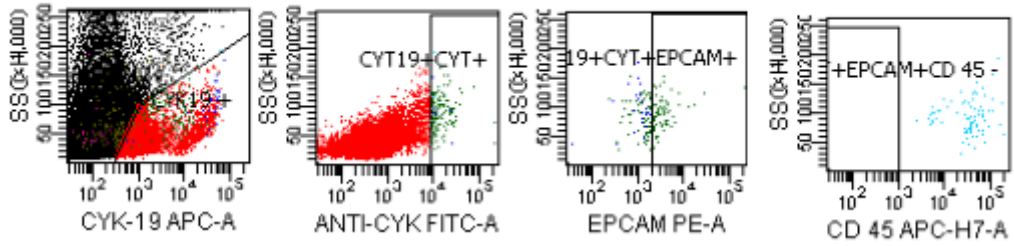
Şekil 4.76. K5'in CK tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	820,971	###	100.0
■ EPCAM+	18	0.0	0.0
■ EPCAM+ CYT19+	2	11.1	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+	2	100.0	0.0
■ EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	1	50.0	0.0

Şekil 4.77. K5'in EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

K6'nın verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 656 732 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.78- Şekil 4.82). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

FACSDiva Version 6.1.3

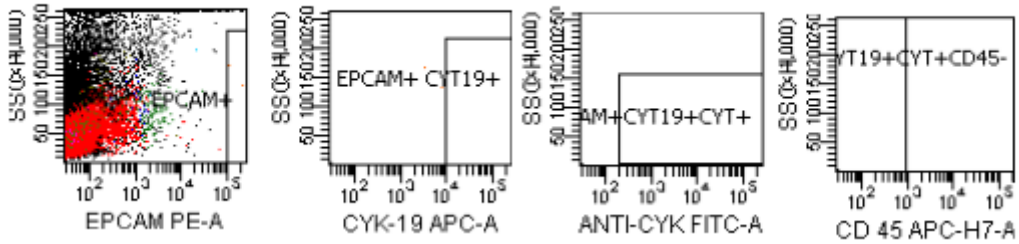


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	656,732	###	100.0
CYK19 +	30,123	4.6	4.6
CYT19+CYT+	170	0.6	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	79	46.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.78. K6'nın CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3

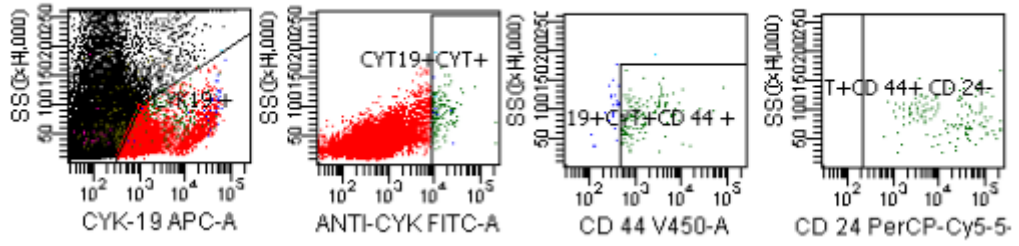


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	656,732	###	100.0
EPCAM+	2	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	0	0.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	0	###	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	###	0.0

Şekil 4.79. K6'nın EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3

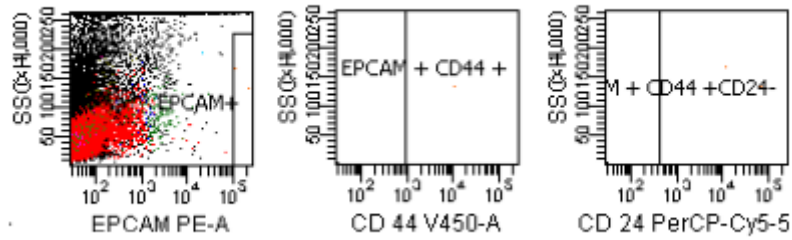


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	656,732	###	100.0
CYK19 +	30,123	4.6	4.6
CYT19+CYT+	170	0.6	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	138	81.2	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.80. K6'nın CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3

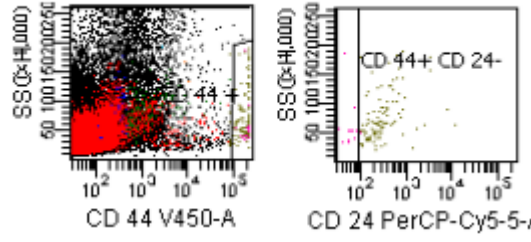


Tube: BOYAMA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	656,732	###	100.0
EPCAM+	2	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	2	100.0	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.81. K6'nın EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

FACSDiva Version 6.1.3



Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	656,732	###	100.0
CD 44 +	136	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	18	13.2	0.0

Şekil 4.82. K6'nın CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

K7'nin verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 606 663 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.83- Şekil 4.87). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	606,663	###	100.0
CYT19 +	84	0.0	0.0
CYT19+CYT+	11	13.1	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	0	0.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	###	0.0

Şekil 4.83. K7'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	606,663	###	100.0
EPCAM+	1	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	0	0.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	0	###	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	###	0.0

Şekil 4.84. K7'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	606,663	###	100.0
CYK19 +	84	0.0	0.0
CYT19+CYT+	11	13.1	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	11	100.0	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.85. K7'nin CK tabanlı tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	606,663	###	100.0
EPCAM+	1	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	1	100.0	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.86. K7'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	606,663	###	100.0
CD 44 +	5	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	1	20.0	0.0

Şekil 4.87. K7'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

K8'in verilerine göre 7.5 mL kan örneğinde 1 128 019 hücre sayıldı. Elde edilen hücreler içerisinde CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılamalar yapıldı (Şekil 4.88- Şekil 4.92). Tablo 4.6'da uygun kapılama stratejisine göre tespit edilen hücre sayıları yer almaktadır.



Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,128,019	###	100.0
CYK19 +	771	0.1	0.1
CYT19+CYT+	4	0.5	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+	3	75.0	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45 -	0	0.0	0.0

Şekil 4.88. K8'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,128,019	###	100.0
EPCAM+	2	0.0	0.0
EPCAM+ CYT19+	1	50.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	1	100.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	0	0.0	0.0

Şekil 4.89. K8'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,128,019	###	100.0
CYK19 +	771	0.1	0.1
CYT19+CYT+	4	0.5	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	3	75.0	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.90. K8'in CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,128,019	###	100.0
EPCAM+	2	0.0	0.0
EPCAM + CD44 +	1	50.0	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	0	0.0	0.0

Şekil 4.91. K8'in EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,128,019	###	100.0
CD 44 +	669	0.1	0.1
CD 44+ CD 24-	192	28.7	0.0

**Şekil 4.92.** K8'in CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

**Tablo 4.6.** Sağlıklı bireylerde tespit edilen CTC sayıları

Kontrol Grubu	Hücre sayısı (Events)	CTC subpopulasyonlarında tespit edilen hücre sayıları				
		CK <sup>+</sup> CTC	EPCAM <sup>+</sup> CTC	CK <sup>+</sup> CSC	EPCAM <sup>+</sup> CSC	CSC
K1	325 935	0	0	-	-	-
K2	197 459	0	0	1	0	7
K3	169 147	0	0	0	0	2
K4	301 548	0	0	0	0	0
K5	820 971	0	1	-	-	-
K6	656 732	0	0	2	0	18
K7	606 663	0	0	1	0	1
K8	1 128 019	0	0	0	0	192

Hasta ve kontrol gruplarında CTC'lerin tespitinden sonra yapılan CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı kapılama stratejileri sonucunda sırasıyla, CK<sup>+</sup>CTC, EpCAM<sup>+</sup>CTC, CK<sup>+</sup>CSC, EpCAM<sup>+</sup>CSC ve CSC'ler tespit edilmiştir.

Hasta grubuna dahil 6 bireyde, CK tabanlı kapılama ile eşik değeri üzerinde CK<sup>+</sup>CTC tespit edilmiştir (eşik değeri CTC  $\geq$ 5). Bu gruptan, EpCAM tabanlı yapılan kapılamada ise yine 6 hastada eşik değerinin üzerinde EpCAM<sup>+</sup>CTC tespit edilmiştir (Şekil 4.93).

CK kapılama stratejisi ile tespit edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısının ortancası, hasta grubunda 5 (min-maks: 1-16)'dır. Kontrol grubunda ise bu subpopulasyonda CTC

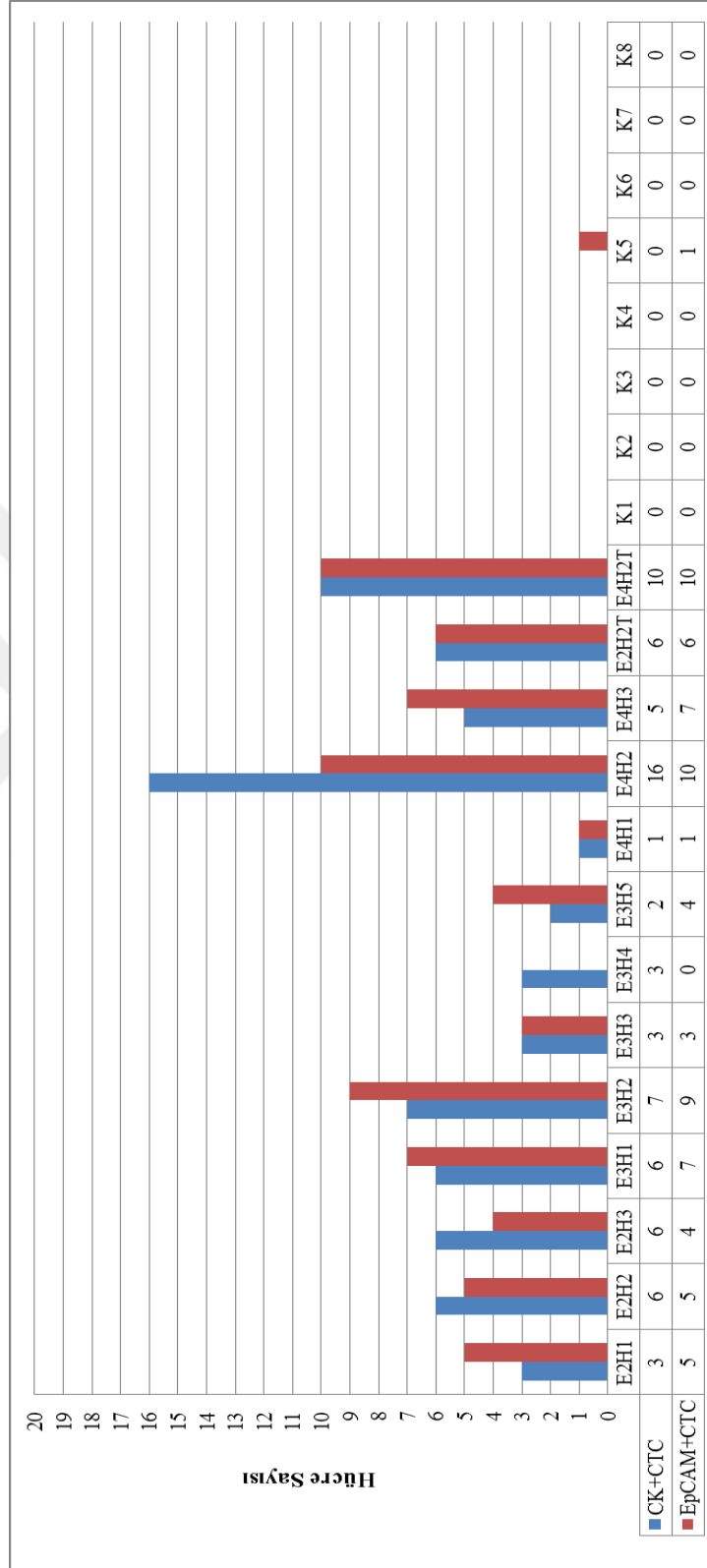
elde edilmemiştir (Şekil 4.93). Hasta grubu ile kontrol grubu CK<sup>+</sup>CTC değerleri kıyaslandığında, hasta grubunda CK<sup>+</sup>CTC sayısının anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir (Z=3.789; p<0,001; Tablo 4.7).

EpCAM kapılama stratejisi ile tespit edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı ortancası hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla 5 (min-maks: 0-10) ve 0 (min-maks: 0-1) olarak elde edilmiştir (Şekil 4.93). EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksektir (Z=3.352; p=0.001; Tablo 4.7).

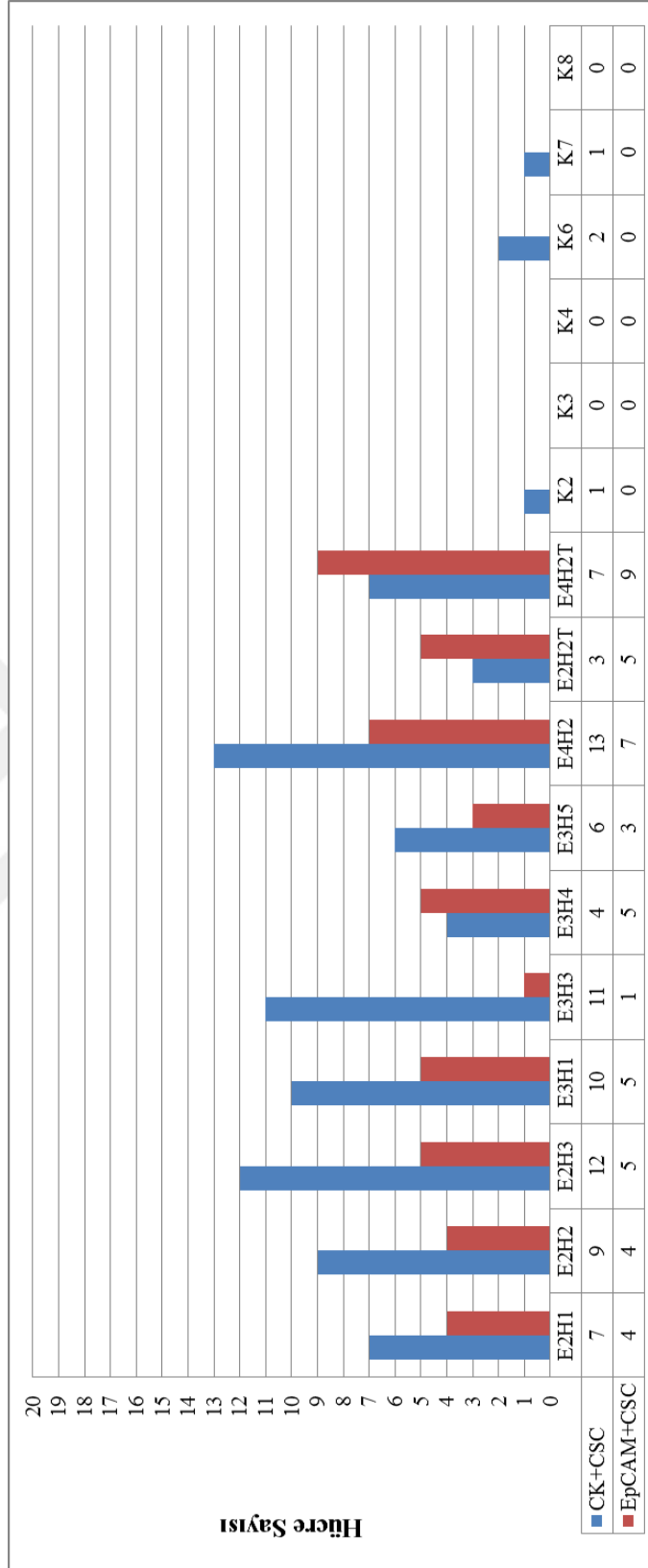
Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CK<sup>+</sup>CSC, EpCAM<sup>+</sup>CSC ve CSC sayıları kıyaslandığında, hasta grubunda daha fazla sayıda hücre tespit edildiği saptanmıştır (p<0,05; Şekil 4.94, Şekil 4.95, Tablo 4.7).

**Tablo 4.7.** Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen hücre sayılarının dağılımı

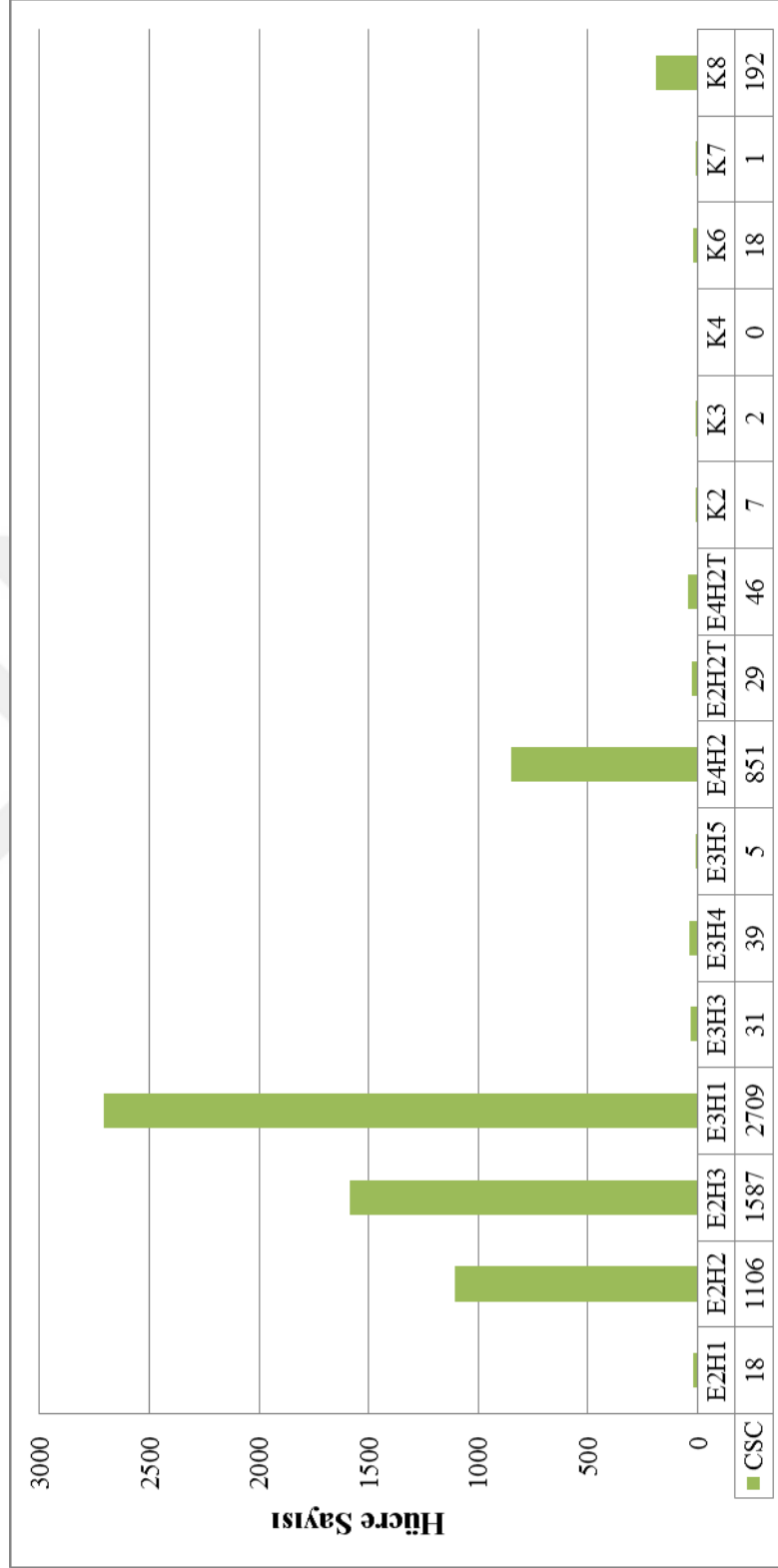
CTC subpopulasyonu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Z	p
CK <sup>+</sup> CTC	5 (1-16)	0 (0-0)	3.789	<0.001
EpCAM <sup>+</sup> CTC	5 (1-10)	0 (0-1)	3.352	0.001
CK <sup>+</sup> CSC	9.5 (4-13)	0.5 (0-2)	3.116	0.001
EpCAM <sup>+</sup> CSC	4.5 (1-7)	0 (0-0)	3.244	0.001
CSC	445 (5-2709)	4.5 (0-192)	2.262	0.020



**Şekil 4.93.** Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CK<sup>+</sup>CTC ve EpCAM<sup>+</sup>CTC sayıları.



**Şekil 4.94.** Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CK<sup>+</sup>CSC ve EpCAM<sup>+</sup>CSC sayıları.

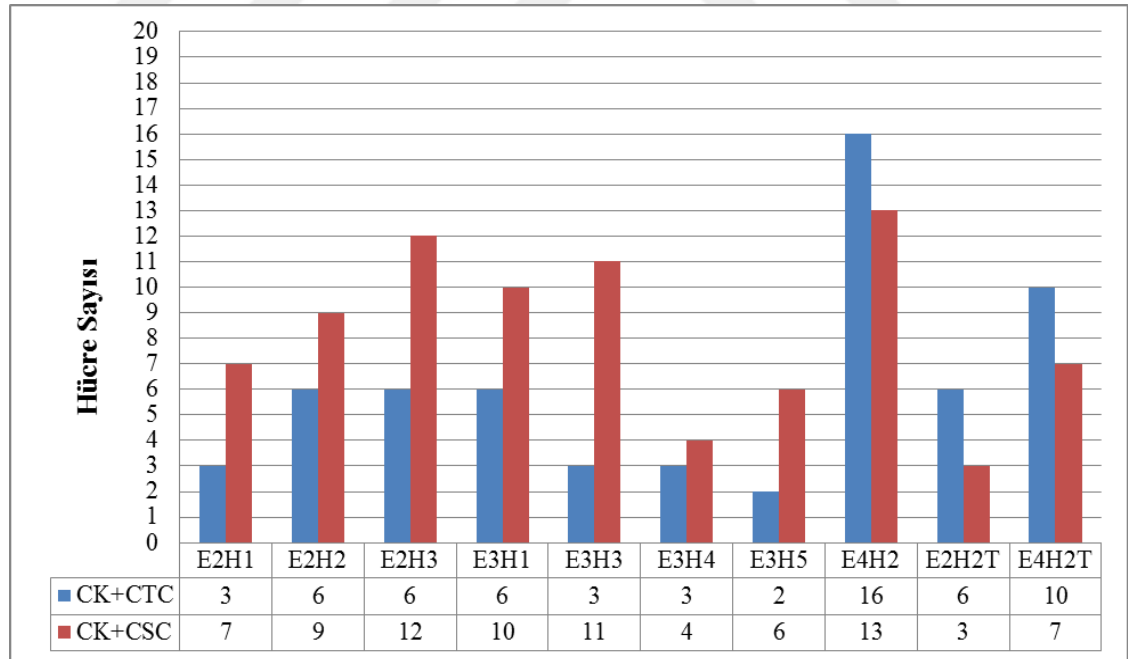


Şekil 4.95. Hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CSC sayıları.

Hasta grubunda tespit edilen CK<sup>+</sup>CTC ve CK<sup>+</sup>CSC sayılarının ortancası sırasıyla 2.5 (min-maks:0-16) ve 5.0 (min-maks:0-13) olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.8). İstatistiksel analizler doğrultusunda, CK<sup>+</sup>CSC sayısının, CK<sup>+</sup>CTC sayısından daha fazla olduğu belirlenmiştir (Z=2.456; p=0.014; Tablo 4.8). Şekil 4.96'da hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen CK tabanlı CTC ve CSC sayıları yer almaktadır.

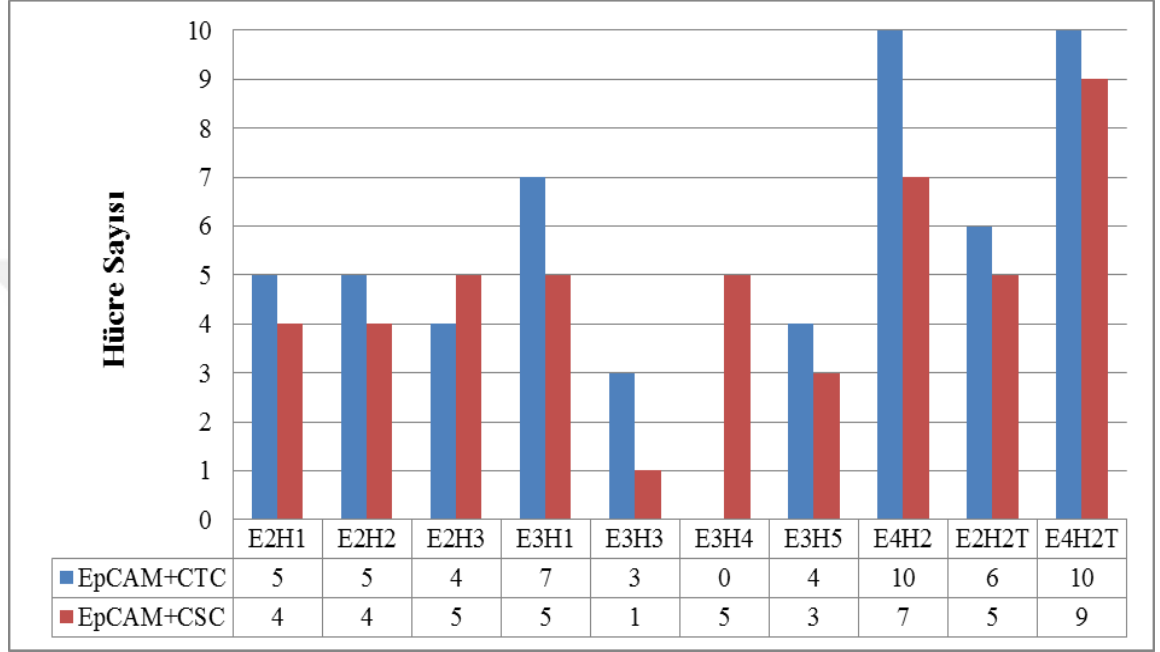
**Tablo 4.8.** CK<sup>+</sup>CTC ve EpCAM<sup>+</sup>CTC sayıları ile CK<sup>+</sup>CSC ve EpCAM<sup>+</sup>CSC karşılaştırması

Subpopulasyon	CTC	CSC	Z	p
CK <sup>+</sup>	2.5 (0-16)	5.0 (0-13)	2.456	<b>0.014</b>
EpCAM <sup>+</sup>	1.5 (0-10)	2.0 (0-7)	1.065	0.287



**Şekil 4.96.** Hasta grubunda tespit edilen CK<sup>+</sup>CTC ve CK<sup>+</sup>CSC hücre sayıları.

Hasta grubunda tespit edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC ve EpCAM<sup>+</sup>CSC sayılarının ortancası sırasıyla 1.5 (min-maks:0-10) ve 2.0 (min-maks:0-7)'dir. EpCAM tabanlı elde edilen CTC ve CSC'ler, sayıları bakımından benzer olduğu tespit edilmiştir (Z=1.065; p=0.287) (Tablo 4.8). Şekil 4.97'de hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen EpCAM tabanlı CTC ve CSC sayıları yer almaktadır.



**Şekil 4.97.** Hasta grubunda tespit edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC ve EpCAM<sup>+</sup>CSC hücre sayıları.

Meme kanserli hastaların TNM değerlerine göre belirlenen tümör evreleri, ER ve PR durumları, c-erb-B2 değerleri ve serum tümör belirteç (CEA, CA15-3) seviyeleri EK-5'de gösterilmiştir. Bu değerler ile CTC subpopulasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı (p<0.05; Tablo 4.9) görülmüş olmasına rağmen, CEA seviyesi ile EpCAM<sup>+</sup>CTC arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Ayrıca PR değeri ile CSC sayısı arasında negatif yönlü ve güçlü; c-erb-B2 değeri ile CK<sup>+</sup>CSC arasında negatif yönlü, orta dereceli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.9).



**Tablo 4.9.** Hasta grubundaki tümör ilişkili değerler ile CTC subpopulasyonları arasındaki ilişki

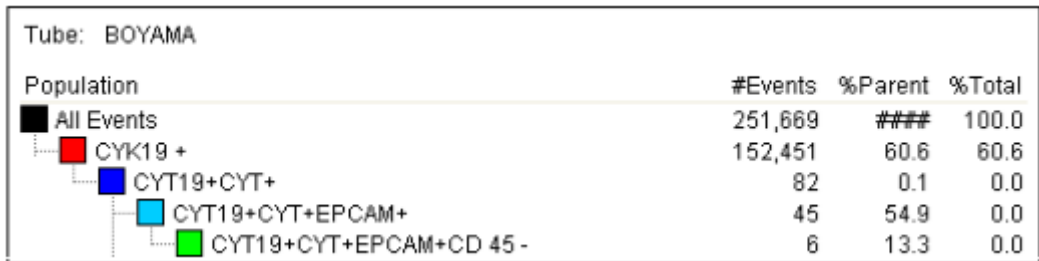
Patolojik değerler	CTC Subpopulasyonları				
	CK <sup>+</sup> CTC	EpCAM <sup>+</sup> CTC	CK <sup>+</sup> CSC	EpCAM <sup>+</sup> CSC	CSC
Tümör evresi <sup>1</sup>	0.283	0.191	0.220	0.325	-0.067
ER durumu	0.339	0.175	0.655	0.399	0.655
PR durumu	0.000	0.191	-0.267	-0.476	<b>-0.802*</b>
c-erb-B2 <sup>1</sup> değeri	-0.268	-0.350	<b>-0.584*</b>	0.122	-0.148
CA153 seviyesi	-0.074	0.348	0.429	-0.221	-0.405
CEA seviyesi	0.422	<b>0.78**</b>	0.381	0.196	0.071

<sup>1</sup> Poliseriyal ilişki katsayısı hesaplanmıştır. Diğerleri Spearman rho katsayısıdır.  
\* p<0.05; \*\* p<0.01

### 4.3. Takip Edilen Hastaların Akan Hücre Ölçer Analiz Sonuçları

Evre 2 ve evre 4 hastalarından 1'er hastadan ilk kür tedavi aldıktan sonra tekrar kan örneği alınarak CTC ve CSC sayılarındaki değişim incelenmiştir (Şekil 4.93- Şekil 4.102).

E2H2T meme kanseri hastasının tedavi öncesi ve tedavi sonrası CTC sayılarındaki değişimi Şekil 4.98-Şekil 4.102'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.98.** E2H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup> CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	251,669	###	100.0
EPCAM+	297	0.1	0.1
EPCAM+ CYT19+	113	38.0	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	45	39.8	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	6	13.3	0.0

Şekil 4.99. E2H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup> CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	251,669	###	100.0
CYT19 +	152,451	60.6	60.6
CYT19+CYT+	82	0.1	0.0
CYT19+CYT+CD 44 +	56	68.3	0.0
CYT19+CYT+CD 44+ CD 24-	3	5.4	0.0

Şekil 4.100. E2H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

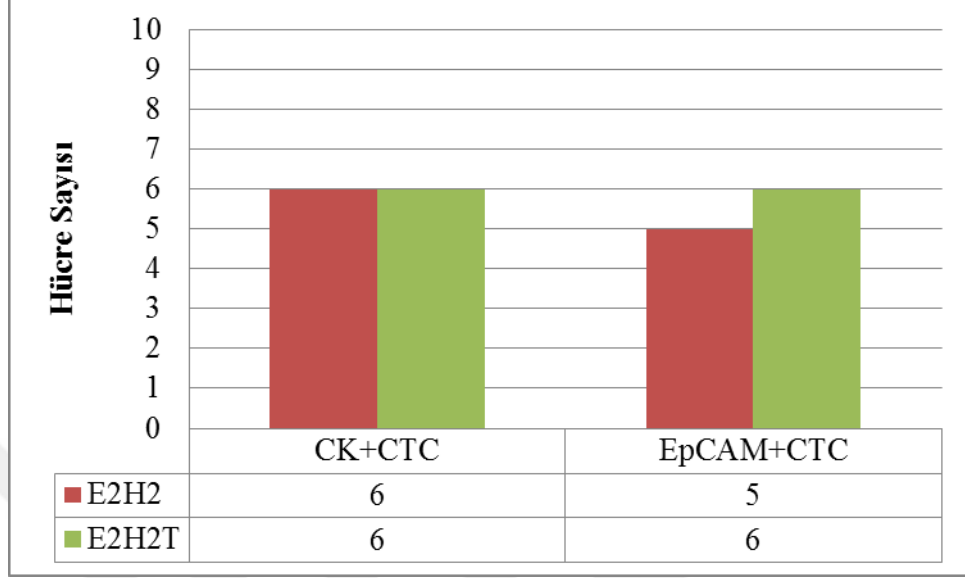
Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	251,669	###	100.0
EPCAM+	297	0.1	0.1
EPCAM + CD44 +	282	94.9	0.1
EPCAM + CD44 +CD24-	5	1.8	0.0

Şekil 4.101. E2H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	251,669	###	100.0
CD 44 +	97	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	29	29.9	0.0

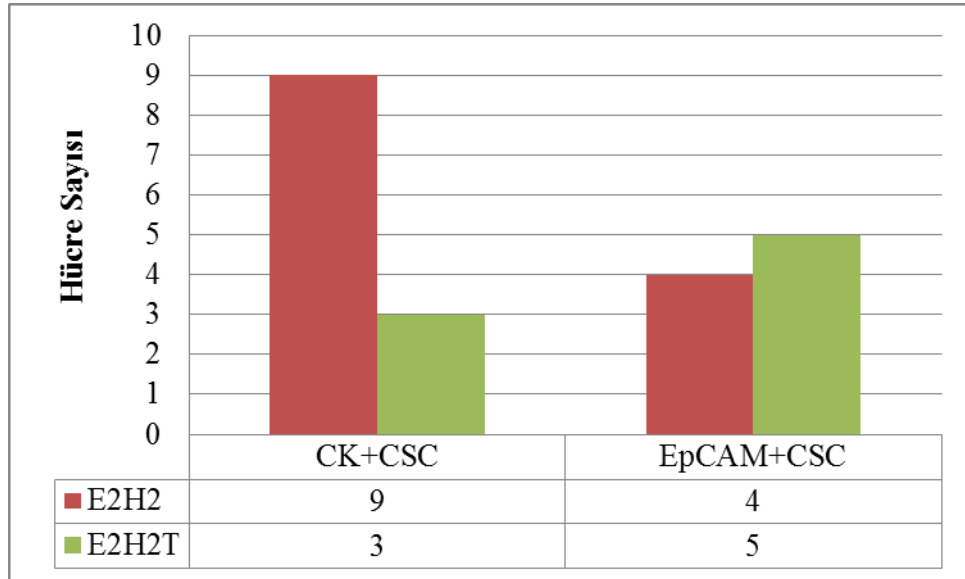
Şekil 4.102. E2H2T'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CTC sayısı.

E2H2'nin tedavi öncesi ve tedavi sonrası CK<sup>+</sup>CTC sayısında değişiklik saptanmazken, EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısında az miktarda artış görölmüştür (Şekil 4.103).



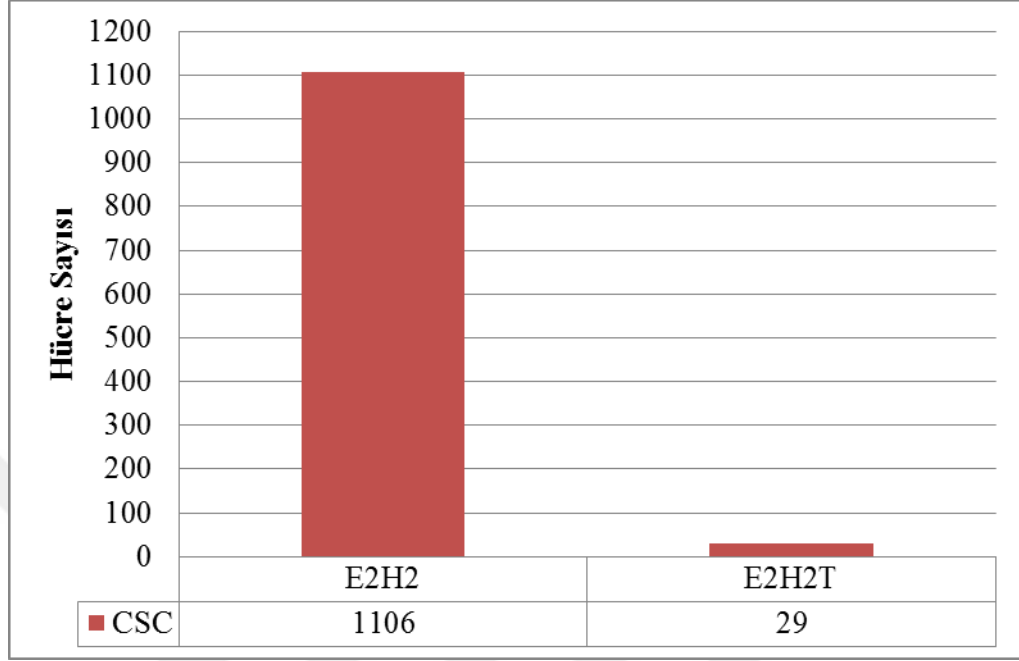
Şekil 4.103. E2H2'nin tedavi ile değişen CK<sup>+</sup>CTC ve EpCAM<sup>+</sup>CTC sayıları.

E2H2'nin tedavi öncesi ve tedavi sonrası CK<sup>+</sup>CSC sayısında azalırken, EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısında artış saptanmıştır (Şekil 4.104).



Şekil 4.104. E2H2'nin tedavi ile değişen CK<sup>+</sup>CSC ve EpCAM<sup>+</sup>CSC sayıları.

E2H2'nin tedavi ile değişen CSC sayıları belirgin bir azalış tespit edilmiştir (Şekil 4.105).



Şekil 4.105. E2H2'nin tedavi ile değişen CSC sayısı.

E4H2 meme kanserli hastanın tedavi öncesi ve sonrası verileri karşılaştırıldığında, uygulanan tedavi ile CTC sayılarındaki değişim Şekil 4.106-Şekil 4.110' de gösterilmiştir.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,376,309	###	100.0
CYT19 +	43,558	3.2	3.2
CYT19+CYT+	819	1.9	0.1
CYT19+CYT+EPCAM+	88	10.7	0.0
CYT19+CYT+EPCAM+CD 45-	10	11.4	0.0

Şekil 4.106. E4H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,376,309	###	100.0
EPCAM+	757	0.1	0.1
EPCAM+ CYT19+	142	18.8	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	118	83.1	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45	10	8.5	0.0

Şekil 4.107. E4H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,376,309	###	100.0
EPCAM+	757	0.1	0.1
EPCAM+ CYT19+	142	18.8	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+	118	83.1	0.0
EPCAM+CYT19+CYT+CD45-	10	8.5	0.0

Şekil 4.108. E4H2T'nin CK tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CK<sup>+</sup>CSC sayısı.

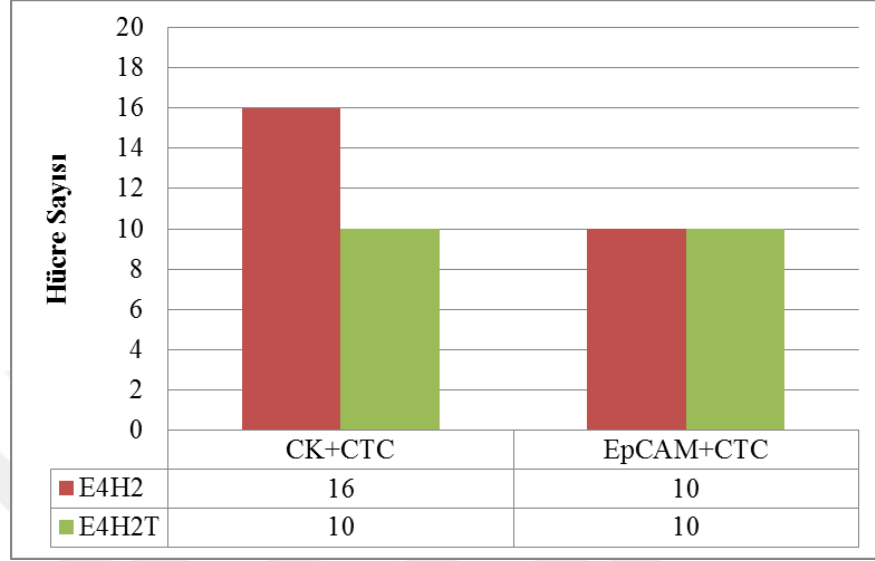
Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,376,309	###	100.0
EPCAM+	757	0.1	0.1
EPCAM + CD44 +	651	86.0	0.0
EPCAM + CD44 +CD24-	9	1.4	0.0

Şekil 4.109. E4H2T'nin EpCAM tabanlı kapılama sonucunda elde edilen EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı.

Tube: BOYAMA			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,376,309	###	100.0
CD 44 +	534	0.0	0.0
CD 44+ CD 24-	46	8.6	0.0

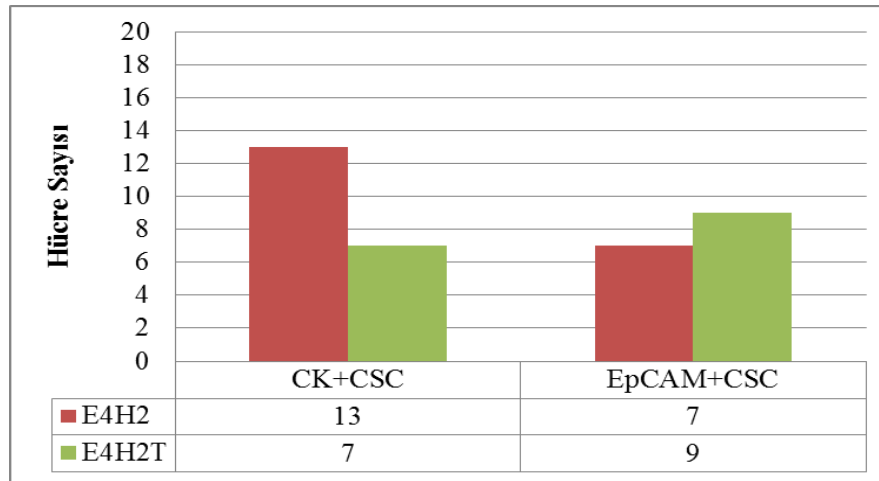
Şekil 4.110. E4H2T'nin CSC tabanlı kapılama sonucunda elde edilen CSC sayısı.

E4H2 meme kanserli hastada tedavi öncesi ve tedavi sonrası CK<sup>+</sup>CTC sayısında azalış saptanırken, EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısında değişiklik tespit edilememiştir (Şekil 4.111).



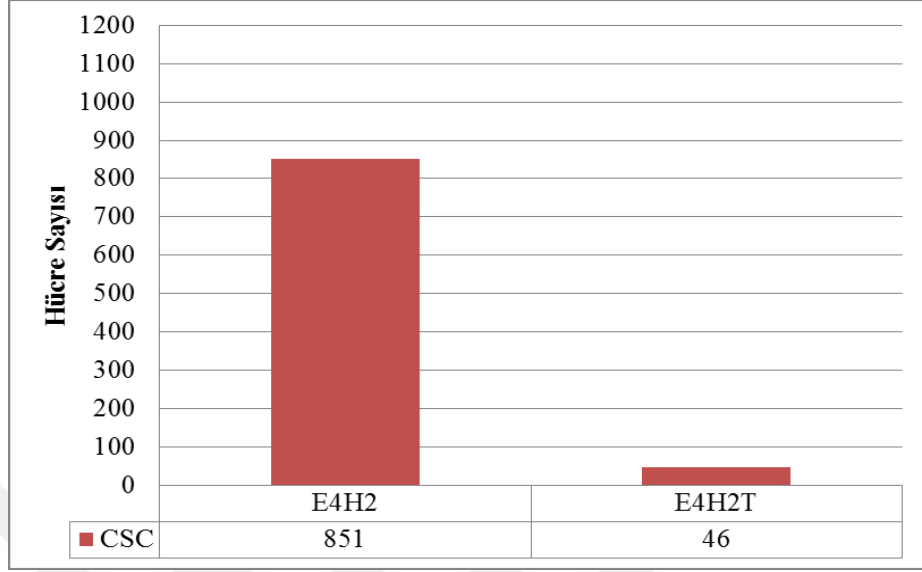
Şekil 4.111. E4H2T meme kanserli hastanın tedavi ile değişen CK<sup>+</sup>CTC ve EpCAM<sup>+</sup>CTC sayıları.

H4H2T meme kanserli hastada tedavi öncesi ve tedavi sonrası CK<sup>+</sup>CSC sayısında azalma, EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısında ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.112).



Şekil 4.112. E4H2T meme kanserli hastanın tedavi ile değişen CK<sup>+</sup>CSC ve EpCAM<sup>+</sup>CSC sayıları.

E4H2T meme kanserli hastada tedavi öncesi ve tedavi sonrası CSC sayısında belirgin azalış gözlenmiştir (Şekil 4.113).



Şekil 4.113. E4H2T meme kanserli hastanın tedavi ile değişen CSC sayıları.

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri, memenin duktal veya lobular kısımlarından köken alan bir hastalıktır (111). Genel olarak; çevresel, genetik ve hormonal etkiler sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir (28). Meme kanseri erken tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen, hala %25.2'lik insidans ile kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (62).

Meme kanserinde tümör ilişkili ölümlerin asıl nedeni uzak metastaz olarak görülmektedir (64). Başlangıçta tümör hücreleri proliferasyon geçirerek sayılarını arttırmaları, sonrasında bazal membrana penetre olurlar, kendilerini çevreleyen dokular arasından dolaşıma geçerler (112) ve sonuçta sekonder lezyonlar oluştururlar (9). Dolaşımda bulunan primer veya metastatik bölgeden köken alan bu nadir malign hücreler "*dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC)*" olarak adlandırılırlar (113).

Sağlıklı bireylerin kanında  $10^5-10^8$  lökosit karşılık yaklaşık 1 CTC bulunmaktadır (114). CTC'lerin metastatik sürecin ve kanser gelişiminin anlaşılabilmesinde bir belirteç olabilme özelliği temel alınarak, meme kanserinde tümör belirteci olarak kullanılabilme potansiyellerinin olabileceği araştırılmıştır (95,114). Bu amaçla yapılan bir çalışmada, 199 malign hastalığı olmayan, 964 malign karsinom teşhisi konmuş ve 145 sağlıklı bireyden 7.5mL kan örneğinde alınarak, CellSearch™ ile CTC taraması yapılmıştır. Çalışma sonucunda, prostat kanserli 188 hastanın 107'sinde (%57), meme kanserli 1316 hastanın 489'unda (%37), over kanserli 53 hastanın 20'sinde (%37), kolorektal kanserli 333 hastanın 99'unda (%30), akciğer kanserli 168 hastanın 34'ünde (%20) ve diğer kanserli 125 hastanın 32'sinde (%26) 2'den fazla CTC tespit edilmiştir. Sağlıklı bireylerde ise CTC saptanmamıştır, fakat malign hastalığı olmayan bireylerin sadece 1'inde 2'den fazla CTC tespit edilmiştir. Metastatik kansere sahip bireylerde 0 ile 23 168 arasında CTC sayılmış ve metastatik karsinomlarda farklı miktarlarda CTC olabileceğini vurgulanmıştır (96). Yagata ve ark.'nın çalışmasında, 57 sağlıklı ve benign lezyon saptanan bireylerde, 30 tane evre I-III meme kanserli hastada ve 38 metastatik meme kanserli hastada CellSearch™ ile CTC taraması yapılmış olup, benign ve sağlıklı bireylerin oluşturduğu grupta CTC tespit edilmemiştir ve diğer meme kanserli hastaların bulunduğu grupta CTC saptanmıştır (115). Tez çalışmasına dahil edilen



meme kanserli hastaların hepsinde CTC tespit edilmiştir. Sağlıklı bireylerin oluşturduğu kontrol grubunda ise CK tabanlı kapılama sonucunda CK<sup>+</sup>CTC saptanamamıştır fakat EpCAM tabanlı yapılan kapılama sonucunda bir hastada 1 tane EpCAM<sup>+</sup>CTC tespit edilmiştir (Tablo 4.4, Tablo 4.5). Literatur bilgisi doğrultusunda, sağlıklı bireylerde 1 CTC tespit edilebilir.

Hasta grubu ile kontrol grubu CK<sup>+</sup>CTC değerleri kıyaslandığında, hasta grubunda CK<sup>+</sup>CTC sayısının anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir (Z=3.789; p<0.001). EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir (Z=3.352; p=0.001; Tablo 4.6). Sonuç olarak; literatürde de belirtildiği gibi meme kanserli hastalarda CTC varlığı, metastaz başlangıcının ve kanser gelişiminin göstergesi olabilir.

CTC sayısı ile tümör histopatolojisi arasında da bir ilişki olabileceği düşünülmektedir (116-121) Bu amaçla Hu ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada, immunohistokimyasal olarak ve akan hücre ölçer ile 36 meme kanserli hasta kanında CTC sayısı ile meme kanseri evreleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmada, evre I'de %0 (0/4), evre II'de %33.3 (8/24), evre III'de %60 (3/5) ve evre IV'de %100 (3/3) CTC tespit edilmiştir. Bu durumda, meme kanseri klinik evreleri ile CTC sayısı arasında pozitif bir korelasyon olabileceği belirtilmiştir (116). Yapılan bir diğer çalışmada, opere olmuş meme kanserli hastalarda CTC sayısı ile tümör karakteristik özellikleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada, 92 hastada CellSearch<sup>TM</sup> ile CTC tespiti gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda CTC ile tümör evresi, ER ve PR durumu, tümör boyutu, histolojik türü, lenfovasküler invazyon arasında ilişki belirlenememiştir (117). Wang ve ark.'larının 2009 yılındaki çalışmalarında, meme kanserli hastalarda, hastalığın ilerleyişi ile CK19 ekspresyonu saptanan CTC'ler arasında ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu amaçla, akan hücre ölçer ile 25 sağlıklı bireyin, 7 benign tümörlü bireyin, 4 evre I, 23 evre II, 7 evre III ve 7 evre IV meme kanserli hastanın dahil edildiği çalışmada, sağlıklı bireylerde, benign tümörlü bireylerde ve evre I hastalarında CK19 ekspresyonu tespit edilmemiştir. Evre II hastalarının %9'unda, evre III hastalarını %70'inde ve evre IV hastalarının %86'sında CK19 ekspresyonu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, CK<sup>+</sup> CTC'ler ile tümör boyutu, hastalık evresi gibi klinikopatolojik faktörler arasında ilişki olabileceği belirtilmiştir (118). Liao ve ark.'nın çalışmasında ise, 2336 hastanın

periferik kan örneğinde saptanan CTC sayısı ile tümör evresi, ER ve PR durumları arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, CTC sayısı ile lenf nodül durumu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (119). Aynı amaçla gerçekleştirilmiş benzer bir çalışmada Zhou ve ark.'ları aksilla lenf nodül metastazı saptanmış 126 hastada CTC'ler CellSearch™ ile saptanmıştır. CTC sayısı ile yaş, menoposal durum, tümör T durumu, histolojik derecesi, HER-2 durumu ve KI-67 ekspresyon seviyesi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (120). Mikulová ve ark.'nın çalışmasında ise erken evre 54 meme kanserli hastanın periferik kanında bulunan CTC'lerin izolasyonu ve karakterizasyonu AdnaTest Breast Cancer™ ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, CTC sayısı ile tümör boyutu, histolojik derecesi ve reseptör durumu arasında korelasyon saptanamamıştır (121). Tez çalışmasında, meme kanserli 11 hastanın tümör evreleri, c-erb-B2 değeri, ER ve PR durumları ile CK<sup>+</sup>CTC, EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı bulunmuştur (p<0.05; Tablo 4.8).

Literatürde yapılan CSC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) çalışmaları incelendiğinde, meme kanserli hastalarda bu hücreler ile tümör boyutu, TNM evrelemesi, lenf nodül tutulumu, tümör boyutu, histolojik derecesi, ER ve PR durumları arasında ilişki bulunamamıştır (122, 123). Tez çalışmasında, meme kanserli hastaların tümör evreleri, ER durumu, c-erb-B2 değeri ile CSC sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmazken, CSC sayısı ile PR durumu arasında negatif yönlü güçlü bir ilişki olduğunu belirlenmiştir. (Tablo 4.8).

CTC subpopulasyon hücre sayısı ile TNM evresi, histolojik derece, ER ve PR durumları arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen bir çalışmaya 8 sağlıklı, 26 meme kanserli hasta dahil edilmiştir. CK<sup>+</sup>, CK<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücrelerin oluşturduğu 3 grup akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir. Bu gruplar kıyaslandığında, CK<sup>+</sup> ile CK<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücreleri arasında bir korelasyon saptanırken, CK<sup>+</sup> hücreleri ile TNM arasında ilişki saptanamamıştır (124). Bir diğer çalışmada ise meme kanserli hastaların CTC (CD45<sup>-</sup>/ EpCAM<sup>+</sup>)'ler ve CTC subpopulasyonu olan CSC (CD45<sup>-</sup>/ EpCAM<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>)'ler akan hücre ölçer ile incelenmiştir. Bu iki grup arasında, TNM evresi, histolojik derece, ER ve PR durumları arasında bir ilişki saptanamamıştır (125). Wang ve ark.'nın 2016 yılındaki çalışmalarında ise meme kanserli hastaların

CK19<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve CK19<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücre sayıları incelenmiştir. Çalışmada lenf nodu metastazı ve farklı klinik evrelemelere gruplandırılmış primer meme kanseri hastalarının PBMC'lerinde bulunan CK19<sup>+</sup> hücrelerinin, meme kanseri gelişiminin öngörülmesinde önemli bir görev üstlendikleri vurgulanmaktadır. CK19<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücre sayıları arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilirken, CK19<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücrelerinin hasta PBMC'lerinde yüksek miktarda bulunduğu vurgulanmıştır. CK19<sup>+</sup> hücreler içerisinde CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> subpopulasyona sahip hücreler, kontrol grubunda saptanamamıştır. CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücreleri meme kanserinde uzak metastazı desteklediği belirtilmiş ve bu hücrelerin CTC'lerin içerisinde yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir. Evre I hastalarının PMBC'lerinde CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/az</sup> hücreler saptanmıştır. Bu durum erken evrede, sistemik bir hastalık olabileceğini ve aynı anda oluşan mikrometastazların yüksek olasılığını da göstermektedir (75). Tez çalışmasında, CK<sup>+</sup>CSC, EpCAM<sup>+</sup>CSC ve CSC sayıları ile TNM evreleri, c-erb-B2 değeri, ER durumları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı, PR durumları ise CTC subpopulasyonlar içerisinde sadece CSC ile negatif yönlü güçlü bir ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (p<0,05; Tablo 4.8). Ayrıca, meme kanserli hastalarda CK<sup>+</sup>CSC sayısının CK<sup>+</sup>CTC sayısından daha fazla olduğu (Z=2,456; p=0,014) ve EpCAM<sup>+</sup>CTC ile EpCAM<sup>+</sup>CSC sayılarının benzer olduğu tespit edilmiştir (Z=1.065; p=0,287) (Tablo 4.7).

Kan aracılığı ile yayılan tümör hücreleri, primer bölgeden uzak bölgelere taşınırken standart görüntüleme teknikleri veya serum tümör belirteçleri ile saptanamayabilirler. Serum tümör belirteç seviyeleri, benign süreçte yada farklı kanser türlerinin gelişiminde de artış gösterebilir veya kanser gelişimi sürecinde seviyelerinde değişiklik olmayabilir (19). Bu dezavantajları ve sınırlı özgünlükleri nedeniyle tek başlarına kanser tanı ve tedavi sürecinin izlenmesinde yeterli olmayabilirler (19). Bu amaçla CTC'leri kanser tanı ve tedavi sürecinin izlenmesinde, rutinde kullanılan belirteçlere yardımcı olabilecek daha güvenilir bir belirteç olup olamayacakları araştırılmıştır. 2012 yılında Bidard ve ark.'nın çalışmasında, hastaların CEA, CA15-3 seviyeleri ile CTC sayıları kıyaslanmıştır ve CTC'nin diğer tümör belirteçlerinden üstünlüğünün olmadığı belirtilmiştir (126). Tarhan ve ark.'nın çalışmasında meme kanserli 30 hastada CA15-3 seviyesi, CTC sayısı ve histopatolojik tümör faktörleri arasındaki ilişki incelenmiştir. CTC sayımı CellSearch<sup>TM</sup> ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda CTC sayısı ile tümör

boyutu, hormon durumu, tümör derecesi arasında ilişki saptanmazken sadece HER2 durumu ile arasında ilişki saptanmıştır. Hastalık gelişiminde CA15-3 seviyesindeki değişim ile CTC sayısı arasında pozitif ilişki gösterilmiştir (127). Bir diğer çalışmada ise 98 metastatik meme kanserli hasta kanında CellSearch™ ile CTC tespit edilmiştir. CTC'lerin CEA ve CA15-3 seviyeleri, tümör belirteçlerinden daha güçlü bilgiler verme potansiyeline sahip olabileceği vurgulanmıştır (128). Tez çalışmasında, araştırmaya dahil edilen bireylerde CA15-3 seviyesi ile CTC subpopulasyonlarındaki hücrelerin sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmesine rağmen, sadece EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı ile CEA seviyesi arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir (p<0.05; Tablo 4.8).

CTC'ler, etkili prognostik ve prediktif belirteç olabilme, adjuvan tedavi etkinliği gözlemlene ve erken metastaz gelişimini saptayabilme avantajları ile çalışmaların odağı haline gelmiştir. Mueller ve ark.'nın çalışmalarında metastaz saptanmayan meme kanserli 245 hastanın 54'ünde (%22) tedavi öncesi CTC tespit edilmiştir. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası CTC değerleri kıyaslanan 43 hastanın 10 tanesinde tedavi sonrası CTC saptanmamıştır. Tedavi öncesi 6 hastada CTC saptanmazken, bu hastalarda tedavi sonrası CTC tespit edilmiştir (129). Metastaz saptanmayan primer meme kanserli 91 hastada adjuvan kemoterapi öncesi ve sonrası lazer taramalı sitometri ile CTC miktarı belirlenmiştir ve CTC sayısındaki değişimin tedavi etkinliğinin incelenmesi açısından değer taşıdığı ileri sürülmüştür (130). Hyu ve ark.'nın çalışmasında ise heterojen CTC populasyonlarında EpCAM ekspresyonu araştırılmıştır. EpCAM<sup>-</sup> meme kanserli hastalarda yüksek miktarda EMT ilişkili genlerin ekspresyonu ve yüksek sayıda CSC görülmüştür. Bu hastalar, kemoterapiye karşı yüksek dirençli oldukları çalışma sonucunda belirtilmiştir (131). Söz konusu tez çalışmasında, tedavi öncesi ve tedavi sonrası CTC sayıları kıyasladığımız iki hastada da tedavi sonrası hastalarda CK<sup>+</sup>CSC sayısında ve CSC sayılarında belirgin azalış olduğu göze çarparken, EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısında artış olduğu görülmüştür. EpCAM<sup>+</sup>CSC subpopulasyonundaki bu artış, kemoterapi dirençliliğinin göstergesi olabilir. Bu nedenle CTC'ler hastalık sürecinin izlenmesine ek olarak uygulanan tedavinin etkinliği konusunda da umut vaat eden bir belirteç olabilir (132).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

◆ Dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC) meme kanserli hastalarda tespiti ve meme kanseri tümör evreleri ile ilişkisinin, ER ve PR durumu, c-erb-B2 değeri, serum tümör belirteç (CEA ve CA15-3) seviyeleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

◆ Meme kanserli 11 hasta ile 8 sağlıklı bireyden 7,5 mL kan örneği alınarak hücrelerin ficol yoğunluk ayrımı ve immunomnyetik ayrımı gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirilmiş hücre süspansiyonu, akan hücre ölçerde analiz edilmek üzere florokrom içeren boyalar ile işaretlenmişlerdir. Hücre yüzeyi Anti-EpCAM, Anti-CD44, Anti-CD24, Anti-CD45 ile, hücre içi ise Anti-CK(7,8) ve Anti-CK(14,15,16,19) ile boyanmıştır. Altı farklı antikor ve bunların izotip boyları kullanılarak yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların elimine edilmesi amaçlanmıştır. CTC subpopulasyonlarındaki hücre sayılarının belirlenmesi için, CK tabanlı, EpCAM tabanlı ve CSC tabanlı olarak kapılama stratejileri gerçekleştirilmiştir. Farklı kapılama stratejilerinin tercih edilme nedeni, hücre yüzey antikoruna bağlı olarak değişen CTC sayısının olup olmadığının gösterilmesidir.

◆ Meme kanserli hasta grubunda bulunan 11 hastanın 8'inde ve kontrol grubunda bulunan 8 kişiden 7'sinde, CTC subpopulasyonlarının tespiti amacıyla Anti-CK(14,15,16,19), Anti-CK(7,8), Anti-EpCAM, Anti-CD45, Anti-CD44, Anti-CD24, ve kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

◆ Evre II ve evre IV meme kanserli birer hastadan, tedavi süreleri içerisinde kan örneği alınarak tedavi sürecinde iken CTC sayısı tekrar incelenmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası CTC sayılarındaki değişiklik, tedavi etkinliğinin incelenmesi, tedavi sürecince ilaç dirençlilik gelişimi hakkında ön bilgi saplama açısından önem taşımaktadır.

◆ Çalışmamıza dahil edilen tüm meme kanserli hastalarda CK<sup>+</sup>CTC tespit edilmiştir. Bu değer 1 ile 16 arasında değişmektedir. EpCAM<sup>+</sup>CTC sayısı ise 0 ile 10 arasında değişmektedir.

◆ Metastatik meme kanserli hastalarda genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım süreleri incelenmiş ve belirlenen CTC sayısı eşik değeri 5'dir. 5 ve 5'den fazla CTC saptanan bireylerde bu sürenin azaldığı ve metastaz gerçekleştiren bir tümör olduğu kabul edilmektedir. Çalışmamızda, evre IV metastatik meme kanserli 3 hastanın

2'sinde eşik değeri üzerinde CTC tespit edilirken, 1 hastada eşik değeri altında CTC tespit edilmiştir. Bu bireyde lenfatik yayılım ile metastaz gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Sağlıklı bireylerde ise, CK+ kapılamasına göre CK<sup>+</sup>CTC tespit edilmezken, EpCAM kapılamasında 1 tane EpCAM<sup>+</sup>CTC tespit edilmiştir. Literatur bilgisi doğrultusunda, sağlıklı bireylerde 1 CTC tespit edilebilir.

◆ Kök hücre antikoru kullanılan 11 hastanın 8'inde CK<sup>+</sup>CSC tespit edilmiştir, bu değer 3 ile 12 arasında değişmektedir. Bu grupta saptanan EpCAM<sup>+</sup>CSC sayısı ise 1 ile 9 arasında değişmektedir. Sağlıklı bireylerde CK<sup>+</sup>CSC sayısı incelendiğinde, 8 bireyin 3'ünde bu değer 0'dır, 2 bireyde 1 tane, 1 kişide ise 2 tane CK<sup>+</sup>CSC tespit edilmiştir. Sağlıklı bireylerde saptanan CK<sup>+</sup>CSC sistemik gelişen bir hastalıktan kaynaklanabilir. Bu grupta EpCAM<sup>+</sup>CSC hücre tespit edilememiştir.

◆ Çalışma sonucunda tümör TNM evrelemesi ile CTC subpopulasyonları arasında ilişki bulunmamıştır.

◆ Çalışma sonucunda tümör ER ve PR durumları ile CTC subpopulasyon hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı (p<0.05), sadece PR durumu ile CSC arasında negatif yönlü ve güçlü, c-erb-B2 değeri ile CK<sup>+</sup>CSC arasında negatif yönlü, orta dereceli bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

◆ Meme kanserli hastaların serumlarındaki CEA ve CA15-3 seviyeleri ile CK<sup>+</sup>CTC, CK<sup>+</sup>CSC, EpCAM<sup>+</sup>CSC sayıları arasında ilişki tespit edilemezken, CEA seviyesi ile EpCAM<sup>+</sup>CTC arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

◆ CTC'lerin etkili prognostik ve prediktif belirteç olabilme, adjuvan tedavi etkinliği gözlemlene ve erken metastaz gelişimini saptayabilme avantajları göz önüne alındığında, kanser tanısı ve kişiye özgü tedavi açısından büyük öneme sahip olabilir. Bu doğrultuda, FACS cihazı ile sort edilebilen bu hücrelerin tespiti ve karakterizasyonu yapılabilir, ilaç dirençliliği çalışmaları gerçekleştirilebilir.

◆ Bilgimiz doğrultusunda benzer bulgular elde etmemize rağmen, hasta sayımızın az olması önemli bir dezavantajdır. Daha fazla sayıda hasta dahil edilerek, farklı antikolar veya farklı moleküler teknikler kullanılarak çalışma gerçekleştirilebilir.

◆ Ülkemizde yapılan sınırlı sayıda CTC çalışması bulunması ve bilginiz doğrultuda bu çalışmanın ilk olması açısından tez çalışması özgün bir değer taşımaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges, *Metabolism*, 2015, 64: 16-21.
2. World Health Organization Cancer Country Profiles. [http://www.who.int/cancer/country-profiles/tur\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/cancer/country-profiles/tur_en.pdf?ua=1))2014.  
14 Haziran 2016
3. Murat G, Boztaş G. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2009kanseraporu.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf).  
14 Haziran 2016.
4. Gültekin M, Boztaş G, Utku EŞ, Ergün AK, Sevinç A, Tütüncü S, Dünder S, Seymen E. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/ANA\\_rapor\\_2013v01\\_2.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/ANA_rapor_2013v01_2.pdf).  
21 Mayıs 2016.
5. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations, *Ann Transl Med.*, 2014, 2: 109.
6. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells, *Oncogene*, 2015, 35: 1216-1224.
7. Broersen LHA, van Pelt GW, Tollenaar RA, Mesker WE. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer, *Cell Oncol.*, 2014, 37: 9-15.
8. Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance, *Oncotarget.*, 2015, 6: 10697-10711.
9. Friedlander TW, Premasekharan G, Paris PL. Looking back, to the future of circulating tumor cells, *Pharmacol and Ther.*, 2014, 142: 271-280.
10. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview, *Cancers*, 2014, 6: 1769-1792.

11. Krawczyk N, Meier-Stiegen F, Banys M, Neubauer H, Ruckhaeberle E, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients, *BioMed Research International.*, 2014, 2014. doi.org/10.1155/2014/415721.
12. Polyak K. Is breast tumor progression really linear?, *Clin Cancer Res.*, 2008, 14: 339-341.
13. Geng SQ, Alexandrou AT, Li JJ. Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis, *Cancer Lett.*, 2014, 349: 1-7.
14. Nalejska E, Mączyńska E, Lewandowska MA. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology, *Mol Diagn Ther.*, 2014, 18: 273-284.
15. Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications, *Pharmacol Ther.*, 2014, 141: 209-221.
16. Lianidou E S, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers, *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2014, 51: 160-171.
17. Lavrov AV, Zubtsova ZhI, Zubtsov DA, Frolova MA, Ignatova EO, Skrypnikova MA, Malysheva EV, Legchenko EV, Petrovskii AV, Utyashev IA, Tyulyandin SA, G d DV. Analysis of circulating tumor cells in patients with triple negative breast cancer during preoperative chemotherapy, *Bull Exp Biol Med.*, 2014, 157: 159-161.
18. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer, *Clin Chem Lab Med.*, 2011, 49: 1579-1590.
19. Arslan Ç. Kanserde Tanı: Patoloji ve Laboratuvar. İçinde: Mandel NM, Selçukbiricik F (editorler). *Onkoloji El Kitabı*. 1. Basım. Çukurova Nobel Kitapevi, 2015: 32-41.



20. Yasasever V. Tümör Belirteçleri. İçinde: Meme Kanserinin Biyolojik Özellikleri. İçinde: Topuz E, Aydın A, Dinçer M (editörler). *Meme Kanseri*, 1. Basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, 2003:160-181.
21. Cáceres G, Puskas JA, Magliocco AM. circulating tumor cells: a window into tumor development and therapeutic effectiveness, *Cancer Control*, 2015, 22: 167-176.
22. Connolly JL, Schnitt SJ, Wang HH, Longtine JA, Dvorak A, Dvorak HF. *Principles of Cancer Pathology*, 6th ed. London, Hamilton, 2003:487-502.
23. Sandallı C, Işık K. DNA Replikasyonu ve Telomerlerin Muhafazası. İçinde: *Temel Moleküler Biyoloji*, Beldüz AO (çeviri editörü). *Fundamental Moleküler Biology*, Allison LA. 2. Basım, Ankara, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti, 2014: 117-158.
24. <https://www.premedhq.com/loss-of-cell-cycle-control-in-cancer-cells>. 14 Haziran 2016.
25. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*, 1st ed. New York, Garland Science, 2007: 24-56.
26. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.*, 2004, 350: 1430-1441.
27. <http://science.education.nih.gov/supplements/nih1/cancer/guide/understanding1.html>. 14 Haziran 2016.
28. Zekioğlu O, Yıldız K. Neoplazi. İçinde: *Robbins Temel Patoloji*, Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U, (28). *Robbins Basic Pathology*, Kumar V, Abbas A, Aster JC. 9. Basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi Tic. Ltd. Şti, 2013: 681-714.
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, 144: 646-674.

30. Güllü İH. A İ. Metastaz biyolojisi, *Üroonkoloji Bülteni*, 2005, 4.
31. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, *Cell*, 2011, 147: 275-292.
32. Meadows GG, Zhang H. Effects of alcohol on tumor growth, metastasis, immune response, and host survival, *Alcohol Res.*, 2015, 37: 311.
33. Munguti J, Sammy M. Mechanisms of tumour metastasis: anatomical mimicry?, *Microscopic Anatomy*, 2013, 1: 23.
34. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells, *EMBO Mol Med.*, 7: 1-11.
35. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, Brannigan BW, Kapur R, Stott SL, Shioda T, Ramaswamy S, Ting DT, Lin CP, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis, *Cell*, 2014, 158: 1110-1122.
36. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S. EMT and tumor metastasis, *Clin Transl Med.*, 2015, 4:6.
37. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?, *Nat Rev Cancer.*, 2007, 7: 415-428.
38. Guo W, Lasky JL, Wu H. Cancer stem cells, *Pediatr Res.*, 2006, 59: 59R-64R.
39. Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: a review, *ANZ J Surg.*, 2007, 77: 464-468.
40. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells, *N Engl J Med.*, 2006, 355: 1253-1261.

41. Tinhofer I, Saki M, Niehr F, Keilholz U, Budach V. Cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells, *Int J Radiat Biol.*, 2014, 90: 622-627.
42. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges, *Pathobiology*, 2008, 75: 75-84.
43. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities, *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 717-728.
44. Karsten U, Goletz S. What makes cancer stem cell markers different?, *Springerplus*, 2013, 2: 301.
45. Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells, *Int J Biochem Cell Biol.*, 2012, 44: 573-577.
46. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives, *Trends Mol Med.*, 2010, 16: 398-406.
47. Uppal A, Wightman SC, Ganai S, Weichselbaum RR, An G. Investigation of the essential role of platelet-tumor cell interactions in metastasis progression using an agent-based model, *Theor Biol Med Model.*, 2014, 11:17.
48. Mitchell MJ, King MR. Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress, *Front Oncol.*, 2013, 3:44.
49. Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer, *Am J Pathol.*, 2011, 178: 989-996.
50. Steinert G, Schölch S, Niemiets T, Iwata N, García SA, Behrens B, Voigt A, Kloor M, Benner A, Bork U, Rahbari NN, Büchler MW, Stoecklein NH, Weitz J, Koch M. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer, *Cancer Res.*, 2014, 74: 1694-1704.
51. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, Salih HR. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells

- that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells, *Cancer Res.*, 2012, 72: 440-448.
52. Martelotto LG, NG CK, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity, *Breast Cancer Res.*, 2014, 16: 210.
  53. Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology, *Am J Pathol.*, 2003, 163: 2139-2148.
  54. Schnell U, Cirulli V, B Giepmans. EpCAM: structure and function in health and disease, *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828: 1989-2001.
  55. Shao MM, Chan SK, Yu AM, Lam CC, Tsang JY, Lui PC, Law BK, Tan PH, Tse GM. Keratin expression in breast cancers, *Virchows Arch.*, 2012, 146: 313-322.
  56. Joosse SA, Hannemann J, Spötter J, Bauche A, Andreas A, Müller V, Pantel K. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells, *Clin Cancer Res.*, 2012, 18: 993-1003.
  57. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients, *Breast Cancer Res.*, 2009, 11: 1-9.
  58. Jaggupilli A, E Elkord. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity, *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2012. doi.org/10.1155/2012/708036.
  59. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 3983-3988.

60. Castle J, Shaker H, Morris K, Tugwood JD, Kirwan CC. The significance of circulating tumour cells in breast cancer: a review, *Breast*, 2014, 23: 552-560.
61. Nabar BV. A study in isolating circulating cancer cells from blood, *J Clin Pathol.*, 1962, 15: 380-382.
62. Pukazhendhi G, Glück S. Circulating tumor cells in breast cancer, *J Carcinog.*, 2014, 13: 8.
63. Potdar PD, Lotey NK. Role of circulating tumor cells in future diagnosis and therapy of cancer, *J Cancer Metastasis Treat.*, 2015, 1: 44-56.
64. Toss A, Mu Z, Fernandez S, Cristofanilli M. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine, *Ann Transl Med.*, 2014, 2: 108.
65. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells, *Cancers*, 2014, 6: 595-624.
66. Lin Z, Chiang NY, Chai N, Seshasayee D, Lee WP, Balazs M, Nakamura G, Swem LR. In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells, *Nat Protocols.*, 2014, 9: 1563-1577.
67. Lim SZ, Ong KW, Tan BKT, Selvarajan S, Tan PH. Sarcoma of the breast: an update on a rare entity, *J Clin Pathol.*, 2016, 69: 373-381.
68. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer, *The lancet oncol.*, 2004, 5: 79-88.
69. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research, *Nat Rev Cancer.*, 2014, 14: 623-631.
70. Armakolas A, Panteleakou Z, Nezos A, Tsouma A, Skondra M, Lembessis P, Pissimissis N, Koutsilieris M. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients, *Future Oncol.*, 2010, 6: 1849-1856.

71. Lu Y, Liang H, Yu T, Xie J, Chen S, Dong H, Sinko PJ, Lian S, Xu J, Wang J. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry, *Cancer*, 2015, 121: 3036-3045.
72. Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic, *Journal of Oncology*, 2010, 2010. doi.org/10.1155/2010/426218.
73. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, *N Engl J Med.*, 2004, 351: 781-791.
74. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodríguez M, García-Puche JL, Macià M, Corominas JM, Delgado-Rodríguez M, Gonzalez L, Albanell J, Fernández M, Solé F, Lorente JA, Serrano MJ. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients, *Breast Cancer Res.*, 2012, 14: R71.
75. Wang F, Li YC, Liu LP, Zhang HM, Tong S. Circulating Tumor Cells and Tumor Stem Cells Detection in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Breast Cancer, *J Clin Lab Anal.*, 2016, doi: 10.1002/jcla.21911.
76. Belli AK, Ferahman M. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi. İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011: 27-32.
77. USAulkareem IH. Aetio-pathogenesis of breast cancer, *Niger Med J.*, 2013, 2013: 371-375.
78. Şahin N, Güler Hİ. DNA Hasarının Uzaklaştırılması ile Çift Zincir Kırıklarının Tamiri. İçinde: *Temel Moleküler Biyoloji*, Beldüz AO (çeviri editörü). *Fundamental Moleküler Biology*, Allison LA. 2. Basım, Ankara, Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., 2014: 159-184.

79. Tüccar M. Meme Kanseri Anatomisi. İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011: 19-24.
80. Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance, *Nat Rev Cancer.*, 2002, 2: 101-112.
81. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers, *Cancer Biol Ther.*, 2010, 10: 955-960.
82. Sarkar S, Mandal M. Breast Cancer: Classification Based on Molecular Etiology Influencing Prognosis and Prediction. In: Gunduz M (Ed). *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*, 1st ed. Rijeka, InTech, 2011: 69-84.
83. Burstein HJ, Polyak K, Wong J, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast, *N Engl J Med.*, 2004, 350: 1430-1441.
84. Tuzlalı S. Meme Kanseri Malign Tümörlerinin Patolojik Özellikleri. İçinde: Topuz E, Aydın A, Dinçer M (editörler). *Meme Kanseri*, 1. Basım. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, 2003: 242-261.
85. Aksu G. Meme Kanserinde Radyoterapi, İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011: 363-386.
86. [http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page2#figure\\_390\\_e](http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page2#figure_390_e). 14 Haziran 2016.
87. Soyder A. İnvaziv Meme Kanseri. İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011: 261-269.
88. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications, *World J Clin Oncol.*, 2014, 5: 412-424.

89. Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 2015, 17: 60.
90. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 2000, 406: 747-752.
91. Greene FL, Balch CM, Fleming ID, Fritz A, Haller DG, Morrow M, Page DL. *AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors*, 6th ed. New York, Springer, 2002:221-240.
92. Lippman ME. Breast Cancer. In: Kasper D, Braunwald E, Hauser SL (eds). *Harrisons's Principles of Internal Medicine*, 16th ed. USA. MC Graw-Hill , 2005: 516-523.
93. Başaran G. Oyder A. Meme Kanserinde Prognostik ve Prediktif Faktörler. İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011:233-240.
94. Hong b, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends, *Theranostics*, 2013, 3: 377-394.
95. De Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine., *Am J Pathol.*, 2013, 183: 1075-1083.
96. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10: 6897-6904.
97. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG, Halberg F, Somerfield MR, Davidson NE. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management



- guidelines in the adjuvant setting, *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24: 5091-5097.
98. Tenekeci N, Tunaci M. Mamaografi ve Diğer Radyolojik Tanı Yöntemleri. İçinde: Meme Kanserinin Biyolojik Özellikleri. İçinde: Topuz E, Aydın A, Dinçer M (editörler). Meme Kanseri, 1. Basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., 2003:136-146.
99. Binokay F, Soyupak S. Meme Kanserinde Radyolojik Görüntüleme. İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011:125-136.
100. Alunni-Fabroni M, V Mueller, T Fehm, W Janni, B Rack. Monitoring in metastatic breast cancer: Is imaging outdated in the era of circulating tumor cells?, *Breast Care*, 2014, 9: 16-21.
101. Turner N, Pestrin M, Galardi F, De Luca F, Malorni L, Di Leo A. Can biomarker assessment on circulating tumor cells help direct therapy in metastatic breast cancer?, *Cancers*, 2014, 6: 684-707.
102. McInnes LM, Jacobson N, Redfern A, Dowling A, Thompson EW, Saunders CM. Clinical implications of circulating tumor cells of breast cancer patients: role of epithelial–mesenchymal plasticity, *Front Oncol.*, 2015, 5: 42.
103. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer, *Clin Chem.*, 2013, 59: 110-118.
104. Pantel K, R H Brakenhoff. Dissecting the metastatic cascade, *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4: 448-456.
105. Gazioğlu SB. Genel Bilgiler. İçinde: Deniz G, Demirel GY (editörler). *Akan Hücre Ölçer*, 1. Basım. İstanbul, Yelken Ajans Yayıncılık, 2014: 10-13.
106. Givan A L. Flow cytometry, *Flow Cytometry Protocols*, 2004, 1-31.

107. Deniz G, Demirel GY. Florokrom Boyama Teknikleri. İçinde: Deniz G, Demirel GY (editörler). *Akan Hücre Ölçer*, 1. Basım. İstanbul, Yelken Ajans Yayıncılık, 2014: 16-21.
108. Şimşek E, Güler ÖÖ, Çarhan A, Ersan B, Arkan TK, Dilek Y, Ercan E, Öz BE, Terzi E, Çalışır E, Tiryaki M, Pınarlı FA, Korkmaz MH. Determination of circulating tumor cells in peripheral blood by flow cytometry, *Journal of Cellular Therapy and Regenerative Medicine*, 2014, doi:10.5152/niche.2015.246.
109. Halkman AK, Ayhan K. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 2. Basım. Ankara, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Sim Matbaası, 2000: 522.
110. Onat H, Başaran M. Meme Kanseri Risk Faktörleri ve Korunma. İçinde: Topuz E, Aydın A, Dinçer M (editörler). *Meme Kanseri*, 1. Basım. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, 2003: 90-107.
111. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2013, 63: 11-30.
112. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer—clinical applications, *Nat Rev Clin Oncol.*, 2010, 7: 693-701.
113. Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges, *The Oncologist*, 2009, 14: 1070-1082.
114. Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM, Kraan J, Martens JWM, Foekens JA. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation?, *Eur J Cancer.*, 2007, 43: 2645-2650.
115. Yagata H, Nakamura S, Toi M, Bando H, Ohno S, Kataoka A. Evaluation of circulating tumor cells in patients with breast cancer: multi-institutional clinical trial in Japan, *Int J Clin Oncol.*, 2008, 13: 252-256.

116. Hu XC, Wang Y, Shi DR, Loo TY, C LW. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells, *Oncology*, 2003, 64: 160-165.
117. Lang J, Mosalpuria K, Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Reube J, Singh B, Bedrosian I, Meric-Bernstam F, Lucci A. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer, *Breast cancer Res Treat.*, 2009, 113: 501-507.
118. Wang L, Wang Y, Liu Y, Cheng M, Wu X, Wei H. Flow cytometric analysis of CK19 expression in the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2009, 28: 1.
119. Liao Y, Wang SY, Meng XY, Y Jie, Shi MJ, Liu HL, Chen FF, Xiong B. Circulating tumor cells in breast cancer and its association with tumor clinicopathological characteristics: a meta-analysis, *Med Oncol.*, 2014, 31: 1-8.
120. Zhou Y, Ouyang T, Wang T, Xie Y, Fan Z, T Fan, Li J. The study of associations between circulating tumor cells and clinicopathologic characteristics in axillary lymph node positive primary breast cancer, *Zhonghua wai ke za zhi (Chinese journal of surgery)*, 2014, 52: 420-424.
121. Mikulová V, Cabiňáková M, Janatková I, Mestek O, Zima T, Tesařová P. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy, *Scand J Clin Lab Invest.*, 2014, 74: 132-142.
122. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis, *Clin Cancer Res.*, 2005, 11: 1154-1159.
123. Tanei T, K Morimoto, K Shimazu, S J Kim, Y Tanji, T Taguchi, Y Tamaki, S Noguchi. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and

- epirubicin-based chemotherapy for breast cancers, *Clin Cancer Res.*, 2009, 15: 4234-4241.
124. Wang J, Cao MG, You CZ, Wang CL, Liu SL, Kai C, D J. A preliminary investigation of the relationship between circulating tumor cells and cancer stem cells in patients with breast cancer, *Cellular and Molecular Biol.*, 2012, 16: 1641-1645.
125. Wang N, Shi L, Li H, Hu Y, Du W, Liu W, Huang S, Qu X. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry, *Tumor Biol.*, 2012, 33: 561-569.
126. Bidard FC, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Cottu P, Beuzeboc P, Rolland E, Mathiot C, Pierga JY. Assessment of circulating tumor cells and serum markers for progression-free survival prediction in metastatic breast cancer: a prospective observational study, *Breast Cancer Res.*, 2012, 13: R29.
127. Tarhan MO, Gonel A, Kucukzeybek Y, Erten Ç, Cuhadar S, Yigit SC, Atay A, Somali A, Dirican A, Demir L. Prognostic significance of circulating tumor cells and serum CA15-3 levels in metastatic breast cancer, single center experience, preliminary results, *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2013, 14: 1725-1729.
128. Shiomi-Mouri Y, KoUSAka J, Ando T, Tetsuka R, Nakano S, Yoshida M, Fujii K, Akizuki M, Imai T, Fukutomi T. Clinical significance of circulating tumor cells (CTCs) with respect to optimal cut-off value and tumor markers in advanced/metastatic breast cancer, *Breast Cancer*, 2016, 23: 120-127.
129. Mueller V R S, Loibl S, Komor M, Houber J, Schrader I, Conrad U, Untch M, Minckwitz G, Pantel K. Prospective monitoring of circulating tumor cells in breast cancer patients treated with primary systemic therapy- A translational project of the German Breast Group study GeparQuattro, *J Clin Oncol.*, 2007, 25: 21085.

130. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Höffken K. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse, *J Clin Oncol.*, 2008, 26: 1208-1215.
131. Hyu K, Goo KB, Han H, J Soh, W Cho, Kim SI, Jung HI, Kim YS. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer, *Oncotarget*, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8250.
132. Soyder A. Meme Kanserinde Evreleme. İçinde: Aydın S, Akça T (editörler). *Tüm Yönleriyle Meme Kanseri*, 1. Basım. Adana, Adana Nobel Kitapevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti, 2011: 227-232.
133. Tavasolli FA, Devilee P. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs*. 1st ed. Lyon, IARC Press, 2003,10.

## 8. EKLER

**EK-1.** CTC saptama amaçlı kullanılan metotların tahmini duyarlılığı, avantajları, dezavantajları (69).

Metot	Tahmini Duyarlılık	Avantajları	Dezavantajları
<b>PCR tabanlı yaklaşım</b>	$10^{-4}$ - $10^{-6}$	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hızlı, kantitatif</li><li>-Yüksek duyarlılık</li><li>-Küçük örnek hacmi gerekli</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hücre-hücre analizi için uygun değil</li><li>-Canlı ve cansız hücreler arasında ayırım yapmaz</li><li>-Düşük özgüllük</li></ul>
<b>Akan Hücre Ölçer</b>	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hızlı, kantitatif</li><li>-Hücre- hücre analizi</li><li>-Multiparametre</li><li>-Canlı-cansız hücre ayırımında yüksek özgüllük</li><li>-Ek karakterizasyon için CTC sorting potansiyeli</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sınırlı duyarlılık</li><li>-Örnek zenginleştirmede kullanmak üzere büyük örnek hacmi gerekli</li><li>-Hücre spesifikliğinin görsel doğrulaması yok</li><li>- Teknik ve analitik zorlayıcı</li></ul>
<b>CellSearch™ Sistem (Veridex)</b>	$10^{-7}$	<ul style="list-style-type: none"><li>- Yüksek duyarlılık ve özgüllük</li><li>- Otomatik, kantitatif</li><li>- Yüksek tekrarlanabilir</li><li>-Orta miktarda numune hacmi gerekli</li><li>- Canlı-cansız hücreler tanımlama</li><li>- Ticari olarak temin edilebilir</li><li>-FDA onayı ile sadece tahlil amaçlı</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sınırlı analiz parametrelerini</li><li>-CTC yakalama için EpCAM kullanılması bazı tümör hücrelerinin kaçışına neden olur</li><li>-Çoklu zenginleştirme ve işlem adımları CTC kaybına yol açabilir</li><li>-Parçalı öznel okuyucu</li></ul>
<b>CTC Mikrochip</b>	$10^{-7}$	<ul style="list-style-type: none"><li>-Yüksek hassasiyet ve özgüllük</li><li>- Niceldir</li><li>- En az işlem ile canlı-cansız ayırımı</li><li>- Tanımlama kullanılır</li><li>-Ek karakterizasyon için CTC kurtarma potansiyeline sahiptir</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Teknoloji, ticari olarak mevcut değildir</li><li>- CTC yakalamak için EpCAM kullanımı bazı tümör hücrelerini kaçırılmasına neden olur</li><li>- Kısmen öznel okuyucu</li></ul>
<b>EPISPOT</b>	$10^{-7}$	<ul style="list-style-type: none"><li>- Yüksek hassasiyet ve özgüllük</li><li>- Niceldir</li><li>- Multiparametre</li><li>-Sadece canlı tümör hücreleri tespit edilir</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Analizden önce izole CTC 48 saatlik kültürü gerektirir</li></ul>

**EK-2. Meme Kanseri Türleri (133).**

<b>İn situ karsinom</b>	İn situ duktal karsinom (DCIS)
	İn situ lobüler karsinom (LCIS)
<b>İnvaziv karsinom</b>	Duktal karsinom (% 70-80)
	Lobüler karsinom (% 5-10)
	Tübüler karsinom (% 2) (Prognozu iyi)
	Kribriform karsinom (%1) (Prognozu iyi)
	Medüller karsinom (% 1-5) (Prognozu kötü)
	Müsinöz (kolloid) karsinom (% 1-2) (Prognozu iyi)
	İnvaziv papiller karsinom (% 1)
	İnvaziv mikropapiller karsinom
	Apokrin karsinom
	Sekretuar (juvenil) karsinom (Prognozu iyi)
	Adenoid kistik karsinom
	Metaplastik karsinom (Prognozu kötü)
	Nöroendokrin tümör
İnflamatuar karsinom (Prognozu kötü)	

### EK-3. Meme Kanseri TNM Evrelemesi Kriterleri (133).

<b>EVRE I</b>	<b>Erken Evre</b> Tümör meme ile sınırlı (nod-negatif)	<b>Evre 1A:</b> Tümör 2 cm veya daha küçük. Kanser meme dışına yayılmış halde değil. <b>Evre 1B:</b> Küçük meme kanseri kümeleri (0.2 mm'den büyük, 2 mm'den küçük) lenf düğümlerinde bulunur, ya memede tümör bulunmaz yada tümör 2cm daha küçüktür
<b>EVRE II</b>	<b>Erken Evre</b> Tümör çapı>2 cm veya hareketli lenf nodlarında tutulum (nod-pozitif)	<b>Evre 2A:</b> Memede tümör bulunmaz yada tümör 2 cm yada daha küçüktür.Kanser (2 mm'den büyüktür)1-3 aksial lenf nodüllerinde yada göğüs kemiğinin yakınındaki lenf nodülerinde bulunur.tümör 2 cm'den büyük,5 cm'den küçüktür. Kanser lenf düğümlerine yayılmamıştır. <b>Evre 2B:</b> Tümör 2cm'den büyük 5cm'den küçüktür.meme kanseri hücrelerinin küçük kümeleri lenf nodüllerinde bulunur. (0.2 mm'den büyük 2mm'den küçüktür) nodülüne veya göğüs kemiğinin yakınındaki lenf düğümlerine yayılmıştır. sentinel lenf nodu biyopsisi sırasında bulundu). (5cm'den büyüktür). Kanser lenf düğümlerine yayılmamıştır
<b>EVRE III</b>	<b>Lokal İleri Evre</b> Tümör göğüs duvarına uzanmış, lenf nodlarında tutulum	<b>Evre 3A :</b> Memede tümör bulunmaz ya da tümör herhangi bir boyutta olabilir. Kanser 4-9 lenf düğümünde ya da göğüs kemiğine yakın lenf düğümlerinde bulunabilir. (testlerde veya bir fizik muayenede sırasında bulunur).Tümör 5 santimetreden daha büyüktür. Göğüs kanseri hücrelerinin küçük kümeler (0.2 mm'den büyük 2 mm'den küçüktür), lenf düğümleri içinde bulunur yada tümör 5 santimetreden daha büyüktür. Kanser 1-3 aksiller lenf nodüne veya göğüs kemiğinin yakınındaki lenf bezlerine yayılmıştır. (sentinel lenf nodu biyopsisi sırasında bulundu). <b>EVRE 3B:</b> Tümör herhangi bir büyüklükte olabilir ve kanser göğüs duvarına ve/veya meme derisine yayılır ve şişmeye ya da ülsere neden olur. Kanser 9'dan fazla lenf nodülüne ya da göğüs kemiği yakınındaki lenf nodülüne yayılmış olabilir. İnflamatuar meme kanserine neden olabilir <b>EVRE 3C:</b> Memede tümör bulunmaz ya da tümör herhangi bir boyutta olabilir. Kanser göğüs duvarına ve/veya meme derisine yayılır ve şişmeye ya da ülsere neden olur ve/veya göğüs duvarına yayılır. Genelde kanser 10 ya da daha çok koltuk altı lenf düğümlerine, da köprücük kemiğinin üzerindeki yada altındaki lenf düğümlerine, veya koltuk altı lenf düğümleri ve göğüs kemiğinin yakınındaki lenf düğümlerine yayılmıştır. Kanser meme derisine yayılmıştır Ayrıca enflamatuar meme kanseri olabilir.
<b>EVRE IV</b>	<b>Metastatik Evre</b> Kemik, karaciğer, akciğer ve beyin metastazları	Kanser vücudun diğer bölgelerine sıklıkla kemikler, akciğerler, karaciğer veya beyin yayıldı.



**EK-4. Meme Kanseri TNM Evrelemesi (91).**

<b>EVRE</b>	<b>TÜMÖR (T)</b>	<b>NOD (N)</b>	<b>METASTAZ (M)</b>
EVRE 0	T (in situ karsinom)	N0	M0
EVRE I	T1	N0	M0
EVRE II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
EVRE IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
EVRE IIIC	Herhangi T	N3	M0
EVRE IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

**EK-5.** Çalışmaya dahil edilen meme kanserli hastaların ER, PR statüleri, C-erb-B2 değerleri ve saptanan CTC subpopulasyon sayıları

Hasta Grubu	Tümör Evresi (TNM'ye göre)	Hücre Sayısı (Events)	ER	PR	c-erb-B2	CTC subpopulasyonlarında tespit edilen hücre sayıları				
						CK+CTC	EpCAM+ CTC	CK+ CSC	EpCAM+ CSC	CSC
E2H1	EvreII	413 472	%90+	%90+	1+	3	5	7	4	18
E2H2	EvreII	3 925 000	%90+	%90+	0	6	5	9	4	1106
E2H3	EvreII	748 213	%90+	%70+	0	6	4	12	5	1587
E3H1	EvreIII	850 770	-	%50+	2+	6	7	10	5	2709
E3H2	EvreIII	1 931 701	%50+	-	0	7	9	-	-	-
E3H3	EvreIII	507 836	%90+	%90+	1+	3	3	11	1	31
E3H4	EvreIII	1 511 855	-	-	3+	3	0	4	5	39
E3H5	EvreIII	36 362	%90+	%90+	1+	2	4	6	3	5
E4H1	EvreIV	1 332 010	%70+	%60+	2+	1	1	-	-	-
E4H2	EvreIV	194 448	%90+	%90+	1+	16	10	13	17	851
E4H3	EvreIV	4 975 000	%90+	%90+	3+	5	7	-	-	-
E2H2T	EvreII	251 669				6	6	3	5	29
E4H2T	EvreIV	1 376 309				10	10	7	9	46

## EK-6. Tezden Üretilen Yayın (108).

	Niche, 2014; 3: 0-0 · DOI: 10.5152/niche.2015.246
	<h1>Determination of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood By Flow Cytometry</h1>
	Ender Simsek <sup>1</sup> , Ozen Ozensoy Guler <sup>1</sup> , Ahmet Carhan <sup>1</sup> , Bilgesu Ersan <sup>1</sup> , Tugba Keyser Arkan <sup>1</sup> , Yeter Dilek <sup>1</sup> , Elif Ercan <sup>1</sup> , Beyza Ecem Oz <sup>1</sup> , Emine Terzi <sup>1</sup> , Emrullah Calisir <sup>2</sup> , Meral Tiryaki <sup>2</sup> , Ferda Alparslan Pinarli <sup>2</sup> , Mehmet Hakan Korkmaz <sup>3</sup>
<b>Niche</b>	
<b>Original Article</b>	<b>Abstract</b>
	<p><b>Objective:</b> Circulating tumor cells (CTCs) have been interest of subject in the past few decades in terms of prognosis and response to the therapy in several cancers and have potential as a "liquid biopsy" in the diagnosis and treatment of cancer. The aim of our study was to improve a convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection.</p> <p><b>Methods:</b> In this modified method, 7,5 mL peripheral blood samples were firstly collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the fresh blood samples by ficoll gradient separation. Next, the leukocytes in PBMCs were removed by magnetic microbeads conjugated with CD45 for a negative selection. Finally, the retained cells were labeled with anti-epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM), anti-cytokeratins (anti-CKs) and the leukocyte-specific marker as anti-CD45. All samples were analyzed by a flow cytometry.</p> <p><b>Results:</b> CTCs were detected in blood samples of cancer patients such as breast cancer, lung cancer, colorectal cancer, bladder cancer, and laryngeal cancer using with our modified convenient method for the strategies of CTC enrichment and detection. For instance, our results showed that CTCs were not detected in the volunteer sample while 9 CTCs were detected with the use of EpCAM-based gating strategy but the number of detected CTCs was 7 when gated on CK 14,15,16,19 in the breast cancer sample.</p> <p><b>Conclusion:</b> CTCs can be detected with our modified method including highly sensitive assays that provide us monitoring the process of cancer treatment and knowing some important information about cancer prognosis.</p> <p><b>Keywords:</b> Cancer, circulating tumor cells (CTCs), flow cytometry</p>

## EK-7. Uluslararası Platformda Sunulmuş Bildiri (Poster)



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

10th ISMRC International Symposium on Minimal Residual Cancer:  
Liquid Biopsy in Cancer Diagnostics and Treatment

March 19-21 2016 in Hamburg, Germany

P32 Gene expression profiling in circulating tumour cells (CTCs) from patients with metastatic breast cancer.....	24
P33 Single cell gene expression profiling of circulating tumor cells from ovarian cancer patients using multi-marker gene panel analysis .....	25
P34 EpCAM-independent enrichment of circulating tumor cells in metastatic breast cancer	26
P37 Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of Circulating Tumor Cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients .....	27
P38 Detection and molecular characterization of EpCAM positive and EpCAM negative circulating tumour cells isolated from SCLC patients using an epitope independent platform .....	29
P39 The importance of the circulating tumor cells in cancer .....	30
P40 Which cells are resistant to the cancer treatment? Circulating Tumor Cells (CTCs) or Cancer Stem Cells (CSCs) .....	31
P41 A novel strategy for determining circulating tumour cells in lung cancer .....	33
P42 Does circulating tumor cell used as a liquid biopsy detector? .....	34
P43 A noninvasive method for bladder cancer: CTC detection with flow cytometry .....	35
P44 Unbiased enrichment of circulating tumour cells directly from whole blood.....	37
P45 The combination of Parsortix© system and CellCelector™ micromanipulator enables the characterization of EpCAM <sup>neg</sup> circulating tumor cells in breast cancer .....	38
P46 A FISH-based method for assessment of HER-2 amplification status in breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation .....	39
P49 Adding more information to circulating tumor cells - in situ detection and visualisation of androgen receptor splice variants in prostate cancer cells .....	40
P50 CellCelector isolation of circulating tumor cells enables additional marker staining following panel sequencing.....	41

P40

## Which cells are resistant to the cancer treatment? Circulating Tumor Cells (CTCs) or Cancer Stem Cells (CSCs)

Ersan B.<sup>1</sup>, Arkan T.K.<sup>1</sup>, Oz B.E.<sup>1</sup>, Ercan E.<sup>1</sup>, Altundag M.K.<sup>2</sup>, Alparslan Pinarli F.<sup>3</sup>, Guler G.<sup>4</sup>, Ozensoy Guler O.<sup>1</sup>, Carhan A.<sup>1</sup>, Simsek E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yildirim Beyazit University, Department of Medical Biology, Ankara, Turkey, <sup>2</sup>Hacettepe University Institute of Oncology, Department of Medical Oncology, Ankara, Turkey, <sup>3</sup>Diskapi Yildirim Beyazit Training and Research Hospital, Department of Genetics, Ankara, Turkey, <sup>4</sup>Hacettepe University, Department of Pathology, Ankara, Turkey

Cancer is the second leading cause of death worldwide (1) and the majority of deaths associated with cancer are due to the metastasis of the original tumor cells (2). Breast cancer is the most common cancer among women worldwide (3) and circulating tumor cells (CTCs) play a critical role in the metastatic spread of breast cancer (4). Among CTC subpopulations, there are several phenotypes: epithelial, epithelial-mesenchymal, mesenchymal and mesenchymal stem cells (5). Cancer stem cells (CSCs) constitute a subpopulation of the CTCs (6). Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) can cause loss of EpCAM and CK expression, which can cause CTCs to change into CSCs (4). Thus, CTCs (7) and CSCs (8) can lead to an aggressive phenotype, metastasis, and resistance to current therapies. The aim of our study was to determine whether the amounts of CTCs and CSCs are different after the treatment. With this purpose, we classified breast cancer patients according to their tumor node metastasis (TNM) stages as well as cancer types and investigated to show which type of cancer cells is more resistant to cancer treatment. For this reason, the peripheral blood (7.5 ml) samples were collected from breast cancer patients and healthy volunteers. For the negative selection of our study, CD45 was used as a leukocyte marker to enrich CTCs. After the enrichment step, CTCs were labeled with EpCAM<sup>+</sup>, CK 7,8<sup>+</sup>, CK14,15,16,19<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> and CSCs were labeled with CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Both cell types were analyzed by BD FACS Aria III flow cytometry. According to the findings of our study; the results showed that after the cancer treatment, CTC enumeration was decreased and the CSCs were more resistant than the CTCs in patients with different stages of breast cancer. This may provide us monitoring of cancer treatment process and giving important information about cancer prognosis.

**Keywords:** BC, CTCs, CSCs, Flow cytometry

**References:** 1) Wang L Mining causal relationships among clinical variables for cancer diagnosis based on Bayesian analysis. *BioData Min.* 2015,16;8:13.

2) Pantel K et al. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2014,14;7(1):1-11.

3) Jemal A et al. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015, 24(10):1495-506.

4) Mesker WE et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2014,37(1):9-15.

5) Rigaud M et al. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Annals of Translational Medicine.* 2014,2 (11):109.

6) Martin S et al. Interplay of Stem Cell Characteristics, EMT, and Microtentacles in Circulating Breast Tumor Cells. *Cancers.* 2013,5, 1545-65.

7) Paris PL et al. Looking back, to the future of circulating tumor cells. *Pharmacol Ther.* 2014, 142(3):271-80

8) Kabanov AV et al. Can nanomedicines kill cancer stem cells? *Adv Drug Deliv Rev.* 2013,65(13-14):1763-83.



**EK-8.** Ulusal Platformda Sunulmuş Bildiri (Poster)



**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



8 MAYIS 2015

**Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi**  
**Sağlık Temel Bilimleri ve Laboratuvarları**  
**Binası/Bilkent/Ankara**

## **Meme Kanseri Hasta Kanlarında Dolayan Tumor Hucrcleri (CTC)**

Bilgesu ERSAN, Ender ŞİMŞEK

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji ABD.

Kanser Türkiye’de ve Dünya’da en sık görülen ve ölümle sonuçlanan hastalıklar sıralamasında 2. sırada yer almaktadır. Meme kanseri ise kadınlarda en sık görülen kanser tipleri arasında ilk sıradadır. Kanser hastalığında birçok kişinin hayatını yitirmesinden metastaz sorumludur. Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Metastaz sırasında periferel kanda bulunan ve yeni tümör oluşumuna neden olan bu metastatik tümör hücreleri, dolayan tümör hücreleri (CTC) olarak adlandırılmaktadır. CTC’ler sağlıklı bireylerde nadir bulunmaktadır. Bu hücrelerin tespitine yönelik kullanılabilcek cihazların başında akım sitometri cihazı yer almaktadır. Sadece kanser hastalarında sayılarının artışı CTC’leri biyobelirteç olma potansiyeline ek olarak erken tanı ve tedavi takibi ve görüntüleme öncesi ön bilgi sağlama potansiyeline sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, Meme Kanseri, CTC, Akım Sitometrisi





**EK-9. Etik Kurul Formu**

FORM-1

**YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ****ETİK KURULU****BAŞVURU FORMU**

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi öğrenci ve çalışanları tarafından yürütülen ve insan katılımcılardan klinik dışı bilgi toplamayı gerektiren araştırmalar için bu başvuru formunun yanı sıra diğer gerekli belgelerle "Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurul "una başvurulur. "Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Etik Kurul"u başvuruyu "Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı Etik Kurul Yönergesi" genel kapsamında değerlendirir.

**BAŞVURU KAYIT FORMU (Etik Kurul tarafından doldurulacak)**

Araştırma kodu (Yıl – Araştırma sıra no)	2014 - 31
Başvuru formunun Etik Kurula ulaştığı tarih	18.12.2014
Etik Kurul Karar toplantı tarihi ve karar no	02.02.2015 - 11

**ARAŞTIRMANIN BAŞLIĞI**

KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN FARKLI EVRELERDEKİ MEME KANSERLİ HASTALARDA TESPİTİ

**ARAŞTIRMACI/ARAŞTIRMACILAR\***

	Unvan	Adı Soyadı	Görev yeri	Telefon	e-posta
1	Prof. Dr.	Kadri ALTUNDAĞ	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi		
2	Prof. Dr.	Gülnur GÜLER	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi		
3	Prof. Dr.	Mehmet Hakan KORKMAZ	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		
4	Doç. Dr.	Özen ÖZENSOY GÜLER	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		
5	Yrd. Doç. Dr.	Ender ŞİMŞEK	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi		

6	Uzman Dr.	Ferda PINARLI	Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etlik Semt Polikliniği Genetik Tanı Merkezi		
7	Uzman Dr.	Ömer BAYIR	Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
8	Yüksek Lisans Öğrencisi	Bilgesu ERSAN	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		
9	Yüksek Lisans Öğrencisi	Tuğba Kevser ARKAN	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri		
10	Yüksek Lisans Öğrencisi	Yeter DİLEK	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü		

**ARAŞTIRMA DÖNEMİ**

Başlangıç 01/01/2015

Bitiş 30/06/2015

**ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ**
 Öğretim üyesi araştırması



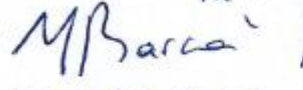

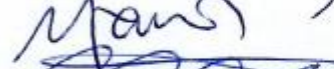

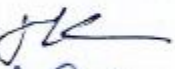

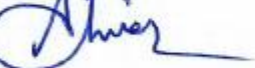


Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'in "KANDA DOLAŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN FARKLI EVRELERDEKİ MEME KANSERLİ HASTALARDA TESPİTİ" adlı araştırması değerlendirilmiştir.

Proje etik açısından uygun bulunmuştur.

Proje etik açısından geliştirilmesi gerekmektedir.

Proje etik açısından uygun bulunmamıştır.

**İmzalar:**

Prof. Dr. S. Yavuz SANISOĞLU	Koordinatör	
Prof. Dr. Arif ERSOY	Koordinatör Yardımcısı	
Prof. Dr. Mehmet BARCA	Üye	
Prof. Dr. Mehmet AKKUŞ	Üye	
Prof. Dr. M. Fatih UŞAN	Üye	
Prof. Dr. Fatih Vehbi ÇELEBİ	Üye	
Prof. Dr. Erdal Tanas KARAGÖL	Üye	
Prof. Dr. Mustafa Sıtkı BİLGİN	Üye	
Prof. Dr. Ahmet KANKAL	Üye	
Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER	Üye	
Yard. Doç. Dr. Arif DEMİR	Üye	
Gülcan SERTÇELİK	Raportör	

## EK-10. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Farklı Evrelerdeki Meme Kanserli Hastalarda Tespiti'dir.

Bu araştırmanın amacı, sağlıklı bireylerin ve meme kanserli hastaların kanlarında dolaşan tümör hücrelerinin olup olmadığını tespit etmektir. bu çalışmada sizden sadece **1 (bir) kez** bir tüp ( 7.5 ml) kan alınacaktır. Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 90'dır.

Bu araştırma ile ilgili olarak doktorunuzun önerilerine uymak sizin sorumluluklarıdır. Bu çalışmada kan alımı sırasında veya kan alındıktan sonra görülebilecek riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir. Bunlar, bu bölgede kanın dokulara sızması sonucu şişme (hematom oluşumu) sonrasında ağrı, bazı durumlarda enfeksiyon, uyuşma, seyirme, bulantı, kusma, bayılma gibi durumlardır; ancak bu sonuçlarla çok nadir olarak karşılaşılır. Sizin için beklenen yararları, meme kanseri erken tanısının konulabilecek olması ve kanserin sıçrama (metastaz) yapıp yapmadığının belirlenmesidir.

Bu araştırmanın olası yararları, sizden alınan kanlarda dolaşan tümör hücrelerinin varlığı araştırılacak ve meme kanserli hasta kanlarında bu hücreler sayılacaktır. Dolaşan tümör hücresi tespit edilen hastalarda metastaz görülüp görülmeyeceği hakkında yorum yapılabilecek olmasıdır. Riskleri ise meme kanserli hastalarda, bu tümör hücrelerinin tespit edilememesi (yanlış negatif sonuç) ya da sağlıklı bireylerde tümör hücresi tespiti (yanlış pozitif sonuç) olabilir. Ancak bu iki durumun gerçekleşme ihtimali çok düşüktür.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırmacı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar bireyin kendi sağlık güvencesi olan sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanacaktır. Araştırma

sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0312 305 50 00 no.lu telefonda Prof. Dr. Kadri ALTUNDAĞ'a başvurabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu Araştırma Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmektedir.

Bu araştırmada yer almak tamamen **sizin isteğinize bağlıdır**. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dâhilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan gerekleri yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız nedeni ile sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

**Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayımlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir**, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz (tedavinin gizli olması durumunda, gönüllüye kendine ait tıbbi bilgilere ancak verilerin analizinden sonra ulaşabileceği bildirilmelidir).

#### **Çalışmaya Katılma Onayı:**

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime

karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

**Gönüllünün,**

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

**Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,**

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

**Açıklamaları yapan araştırmacının,**

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

**Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,**

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:Tarih ve İmza:

**EK-11. Özgeçmiş**

<b>KİŞİSEL BİLGİLER</b>	
Adı Soyadı	: Bilgesu ERSAN
Doğum tarihi	:11/05/1989
Doğum yeri	:Ankara
Medeni hali	:Bekar
Uyruğu	:T.C.
Adres	:Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, Anabilim, Ankara
E-mail	:bilgesuersan@gmail.com
<b>EĞİTİM</b>	
Lise	: 75. Yıl Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
<b>YABANCI DİL BİLGİSİ</b>	
İngilizce	: 53,75
<b>ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR</b>	
Biochemichal Society Hep Yaşam Derneği Hücre Ölümü Araştırma Derneği The European Association for Cancer Research (EACR) Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği Türk Viral Hepatitle Savaşım Derneği (VHSD)	



