

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**FARKLI ORGANLARA METASTAZ YAPMIŞ MEME
KANSER HÜCRELERİNİN KEMOTERAPÖTİKLERE
DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Adem YAVAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**FARKLI ORGANLARA METASTAZ YAPMIŞ MEME
KANSER HÜCRELERİNİN KEMOTERAPÖTİKLERE
DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Adem YAVAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nuray ERİN

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2012.02.0122.003)

‘Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Programı'nda Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir 08/01/2013

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nuray ERİN

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

ye : Prof. Dr. Arda TAŐATARGİL

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

ye : Doç. Dr. Sadi KÖKSOY

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez Enstit¼ Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun gr¼lm¼ř ve Enstit¼ Yönetim Kurulu'nun/...../2013 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Meme kanseri tedavisinde kemoterapi önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada parental meme kanser hücresinin (4T1) ve bu hücrenin karaciğere (4TLM), beyine (4TBM) ve kalbe (4THM) metastazlarında metotreksatın, vinorelbinin ve sisplatinin etkisi ve ilaç duyarlılığını etkileyen mekanizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır. Kanser tedavisinde kemoterapötik ilaçlara olan direnç en yaygın klinik problemdir. Bu direnç primer tedavi sırasında ya da tedavi sonrası kazanılmış olabilmektedir. İlaç direncinin gelişmesi başarılı kanser tedavisinde önemli bir engel oluşturmaktadır.

Bu çalışmada spesifik olarak metastatik meme kanserinin tedavisinde kullanılan sisplatin, metatreksat ve vinorelbinin 4THM, 4TBM, 4TLM ve parental hücre olan 4T1 dizilerinin in-vitro ortamda proliferasyonu üzerine etkisi ve olası sitotoksik etkilerinin araştırılmıştır. Farklı dozlarda kemoterapiler kullanılarak her bir hücre hattı üzerinde herbir ilacın pD₂ değerleri hesaplanmıştır . Böylece metastatik meme kanserinde farklı organlara metastaz yapan hücreler üzerinde hangi kemoterapötik ilacın daha etkili olduğunun bulunması planlanmıştır.

Bu sebeple klinikte kullanılan sisplatin, metotreksat ve vinorelbin kemoterapötik ilaçları seçildi. Bütün kemoterapötikler tek ajan olarak kullanıldı. Literatüre bakıldığında bu ilaçlarla ve bu hücre hatlarıyla ilgili bir çalışma bulunmadığından dolayı ilaçlar tek ajan olarak farklı dozlarda 72 saat uygulandı. Ayrıca direnç gözlenen hücre hatlarında da direnç mekanizması ile ilgili olarak survivin düzeyine western blot yöntemi ile bakıldı.

Çalışmamızda, 4TBM ve 4TLM hücrelerinin en duyarlı olduğu ilaç metotreksat, 4THM hücrelerinin en duyarlı olduğu ilaç ise vinorelbin olmuştur. 4T1 hücrelerinin ise hem metotreksata hem de vinorelbine karşı olan duyarlılığı benzer bulunmuştur. Yüksek dozdaki (10 µM) metotreksat hem 4TBM hem de 4THM hücrelerini öldürmüştür. Sisplatinin 4TBM, vinorelbinin ise 4T1 hücrelerini yüksek dozlarda öldürdüğü bulunmuştur.

10 nM sisplatin ile 4TLM hücrelerinde survivin ekspresyonunu arttarken, 4THM ve 4TBM hücrelerinde survivin ekspresyonu azaltmıştır. 100 nM metotreksat 4TLM hücrelerinde survivin ekspresyonunu değiştirmezken 4T1, 4THM ve 4TBM hücrelerinde survivin ekspresyonunu azaltmıştır. Vinorelbin ise hücrelerdeki survivin ekspresyonunda herhangi bir değişmeye neden olmamıştır.

Anahtar kelimeler: Metotreksat, Sisplatin, Vinorelbin, Survivin, Metastatik Meme Kanseri

ABSTRACT

Chemotherapy has an important role in breast cancer treatment. Resistance to chemotherapeutics is the most commonly encountered problem in the clinical oncology. This resistance can develop during primary treatment or can be acquired after the treatment regimen.

In this study, we aimed to find out the most effective drug against breast cancer cells metastasized to different organs. As the candidate drugs, methotrexate, vinorelbine and cisplatin were selected as these drugs are currently under clinical use. All of the chemotherapeutics were used as single agent and the treatments were applied for 72 hours at different doses. By this way, the influence of different drug doses on the in vitro proliferation rates of metastatic breast cancer cell lines 4THM, 4TBM, 4TLM and the parental cell line 4T1, and the possible cytotoxic effects were investigated. In order to reveal the resistance mechanisms, survivin protein levels were determined using western blot was made for the resistant cell lines.

According to our results, methotrexate is the most effective drug against 4TBM and 4TLM cell lines, while vinorelbine is the most effective drug against 4THM cell line. There was no significant difference in the sensitivity of 4T1 cells to either methotrexate or vinorelbine. Methotrexate, when used at high doses (10 μ M) was cytotoxic against both 4TBM and 4THM cells and induced cell death. Similarly, high doses of cisplatin killed 4TBM cells while high dose vinorelbine was cytotoxic against 4T1 cells.

Treatment with 10 nM cisplatin increased surviving expression in 4TLM cells while the expression levels of the same protein was found to be decreased in 4THM and 4TBM cells. 100 nM methotrexate was sufficient to decrease survivin expression levels in 4T1, 4THM and 4TBM cell lines although survivin expression was not found to be changed in 4TLM cells. Vinorelbine, on the other hand, did not change the survivin expression levels in any of the cell lines investigated.

Key Words: Methotrexate, Vinorelbine, Cisplatin, Surviving, Metastatic Breast Cancer.

TEŞEKKÜR

Sayın Hocam Doç. Dr. Nuray ERİN' e yüksek lisans çalışmalarımnda olduğu gibi tezimin hazırlanmasında gösterdiği öncülük, titizlik, özveri ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet İSBİR olmak üzere Yard. Doç Dr. Cahit NACİTARHAN' a ve diğer öğretim üyelerimize, çalışma arkadaşlarıma ve desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Kanseri	2
2.1.1. Meme Kanseri Tarihçesi	2
2.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.1.3. Risk Faktörleri	4
2.1.4. Meme Kanserinin Oluşumu	5
2.2. Metastaz Biyolojisi	5
2.2.1. Metastaz patogenezi	5
2.2.2. Meme Kanserinin Yayılımı	8
2.2.3. Yeni Çevreye Adaptasyon	13
2.2.4. Metastaz Öncesi Dokudaki Değişiklikler	13
2.2.5. Metastazın Organ Seçimi (Organotropizm)	13
2.2.6. Organ-Spesifik Metastazı Düzenleyen Moleküller	14
2.2.7. Akciğer, Kemik Ve Beyin Metastazını Yöneten Genler	15
2.2.8. Meme Kanserinin Beyin Metastazı	16
2.2.9. Meme Kanserinin Karaciğer Metastazı	18
2.2.10. Meme Kanserinin Kardiyak Metastazı	18
2.2.11. Survivin	20
2.2.12. Metastatik Meme Kanserinde Tedavi	22
2.2.13. Kanser Tedavisinde Kemoterapi	22
2.2.14. Sisplatin	23
2.2.15. Metotreksat	25
2.2.16. Vinorelbin	28

GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Hücre Kültürü Yöntemi	31
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler	32
3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar	32
3.1.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	33
3.1.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları	33
3.1.6. Besiyerinin Hazırlanması	33
3.1.7. Hücrelerin Çoğaltılması	34
3.1.8. Hücrelerin Dondurulması	34
3.1.9. Hücrelerin Çözülmesi	34
3.2. Hücre Kültürü	34
3.2.1. Hücre Kültürü İçin Hücre Standartlarının Hazırlanması	35
3.2.2 Doz Belirleme Deneyi	35
3.2.3. Hücre Kültüründe Canlılık Testi	36
3.2.4. Survivin Tayini İçin Hücre Kültürü	36
3.3. Western Blot Yöntemi	37
3.3.1. Western Blot Yönteminde Kullanılan Kimyasallar	37
3.3.2. Stok Çözeltiler	37
3.3.3. Lizis Buffer Hazırlanması	39
3.3.4. Stripping Solüsyonu (Strip-Off solüsyonu)	39
3.3.5. Commasive Mavi İle Membranın Boyanması	39
3.3.6. Protein Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması	40
3.3.7. Jelin Hazırlanması	41
3.3.8. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	42
3.3.9. Görüntüleme	42
3.4. İstatistiksel Analiz	42
BULGULAR	43
4.1. Hücre Kültürü Sonuçları	43
4.1.1. Metotreksatın Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi	43
4.1.1.1. 4TLM Hücre Hattı	43
4.1.1.2. 4THM Hücre Hattı	45
4.1.1.3. 4TBM Hücre Hattı	47
4.1.1.4. 4T1 Hücre Hattı	49
4.1.2.2. 4THM Hücre Hattı	53
4.1.2.3. 4TBM Hücre Hattı	55
4.1.2.4. 4T1 Hücre Hattı	57
4.1.3.1. 4TLM Hücre Hattı	59

4.1.3.2. 4THM Hücre Hattı	61
4.1.3.3. 4TBM Hücre Hattı	63
4.1.3.4. 4T1 Hücre Hattı	65
4.2. Western Blot Sonuçları	68
4.2.1. 4TLM Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu	68
4.2.2. 4THM Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu	69
4.2.3. 4T1 Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu	70
4.2.4. 4TBM Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu	71
TARTIŞMA	72
SONUÇLAR	77
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	:	Deoksiribonükleik asit
RNA	:	Ribonükleik asit
ATP	:	Adenozin 3'-trifosfat
CGH	:	Komperatif genom hibridizasyonu
SNP	:	Tek nükleotid polimorfizm
ER	:	Östrojen reseptörü
PR	:	Progesteron reseptörü
HER2	:	İnsan epidermal büyüme reseptörü 2
KİTH	:	Kemik iliği türevi hücre
VEGF	:	Vasküler endotel büyüme faktörü
COX2	:	Siklooksijenaz2
SSS	:	Santral sinir sistemi
MRG	:	Manyetik rezonans görüntüleme
BT	:	Bilgisayarlı tomografi
DHFR	:	Dihidrofolat redüktaz
DHF	:	Dihidrofolat
THF	:	Tetrahidrofolat
RFC1	:	Azaltılmış folat taşıyıcı
MTXGlu	:	Metotreksat poliglutamatlar
AICAR	:	5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit
EORTC	:	European organisation for research and treatment of cancer
MTX	:	Metotreksat
Vin.	:	Vinorelbin
MDM2	:	Murine double minute 2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Terapötik müdahalenin mevcut ve potansiyel aşamaları gösteren metastaz süreci.	7
2.2. Primer tümör ve metastaz oluşumu.	9
2.3. Meme kanseri metastaz şeması	10
2.4. Meme kanserinin en sık metastaz yaptığı organlar	12
2.5. Meme kanserinin beyne, karaciğere, lenf nodlarına, akciğere ve kemiğe organ-spesifik metastaz oluşturmasında rol oynayan faktörler.	15
2.6. p53, survivinin antiapoptotik aktivitesini antagonize ederek apoptozu başlatabilir.	21
2.7. Sisplatinin kimyasal yapısı	24
2.8. Metotreksatın kimyasal yapısı	25
2.9. Folik asit moleküler yapısı	26
2.10. Metotreksat ve hücrel mekanizma.	27
2.11. Metotreksat ekstraselüler adezyon konsantrasyonunu artırır.	28
2.12. Vinorelbinin kimyasal yapısı	29
3.1 Western blot seti	41
4.1. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4TLM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	43
4.2. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi	44
4.3. MTX uygulanan 4TLM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,8 \pm 0,03$ olarak hesaplandı.	44
4.4. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4THM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	45

4.5. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi	46
4.6. MTX uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,6 \pm 0,19$ olarak hesaplandı.	46
4.7. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4TBM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	47
4.8. 4TBM hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi	48
4.9. MTX uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,1 \pm 0,16$ olarak hesaplandı.	48
4.10. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4T1 hücrelerine ait fotografik görüntüler.	49
4.11. 4T1 hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi	50
4.12. MTX uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,91 \pm 0,19$ olarak hesaplandı.	50
4.13. Farklı dozlarda Vinorelbin ile muamele edilen 4TLM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	51
4.14. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi	52
4.15. Vinorelbin uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $6,9 \pm 0,30$ olarak hesaplandı.	52
4.16. Farklı dozlarda vinorelbin ile muamele edilen 4THM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	53
4.17. 4THM hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi	54
4.18. Vinorelbin uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $9,3 \pm 0,30$ olarak hesaplandı.	54
4.19. Farklı dozlarda Vinorelbin ile muamele edilen 4TBM hücrelerine ait fotografik görüntüler	55
4.20. 4TBM hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi	56

4.21. Vinorelbin uygulanan 4TBM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $4,9 \pm 0,20$ olarak hesaplandı.	56
4.22. Farklı dozlarda Vinorelbin ile muamele edilen 4T1 hücrelerine ait fotografik görüntüler.	57
4.23. 4T1 hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi	58
4.24. Vinorelbin uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,9 \pm 0,50$ olarak hesaplandı.	58
4.25. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4TLM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	59
4.26. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi	60
4.27. Sisplatin uygulanan 4TLM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $5,61 \pm 0,21$ olarak hesaplandı.	60
4.28. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4THM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	61
4.29 4THM hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi	62
4.30 Sisplatin uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $6,38 \pm 0,19$ olarak hesaplandı.	62
4.31. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4TBM hücrelerine ait fotografik görüntüler.	63
4.32. 4TBM hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi	64
4.33. Sisplatin uygulanan 4TBM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $6,56 \pm 0,09$ olarak hesaplandı.	64
4.34. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4T1 hücrelerine ait fotografik görüntüler.	65
4.35. 4T1 hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi	66
4.36. Sisplatin uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $6,8 \pm 0,22$ olarak hesaplandı.	66

4.37. 4TLM hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.	68
4.38. 4THM hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.	69
4.39. 4T1 hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.	70
4.40. 4TBM hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.	71

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3. 1. Büyük jelin hazırlanması	41
4. 1. Metastatik meme kanseri hücrelerinin farklı kemoterapötiklere olan duyarlılığı	67

GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen kanserlerin %23' ünü teşkil etmektedir. Tahminlere göre, 2015 yılında, meme kanserinden kaybedilecek kadın sayısı 800.000 olacaktır. Dünya'daki meme kanseri sıklığı, 1990 yılından itibaren her yıl %0.5'lik artış göstermektedir [1].

Kanser, kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından karmaşık bir hastalıktır. Kanser, hücrelerinin aşırı çoğalması, immün sistemin gözetiminden kaçarak uzaktaki dokularda metastaz oluşturması ve davranışsal değişiklikler geçirmesiyle çok basamaklı bir süreçtir [2].

Metotreksat, vinorelbin ve sisplatin metastatik meme kanseri tedavisinde sık kullanılan kemoterapötiklerdendir.

Metotreksat, folik asit antimetabolitleri içindedir. Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu, timidilat ve pürin nükleotidlerinin biyosentezinin durmasına yol açar. Böylece DNA ve RNA'nın sentezi ve enerji için gerekli ATP yapımı durur. Metotreksatın hücrelerdeki toksik etkileri folik asit (N5-formiltetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir [3].

Vinorelbin (5'-nor-anhidrovinblastin) vinka alkaloidler ailesinden bir antineoplastik ilaçtır. Etkisini, moleküler olarak, hücrenin mikrotübülleri üzerinde gösterir. Tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek, mitotik mikrotübüllere tercihli olarak bağlanır ve aksonal mikrotübülleri yalnızca yüksek konsantrasyonlarda etkiler. Tübülün depolimerizasyonunun indüksiyonu, vinkristinin yaptığından daha azdır. Vinorelbin, mitozu G2-M evresinde bloke ederek, interfazda ya da sonraki evrelerde hücre ölümüne sebep olur [4].

Sisplatin metastatik meme kanserinde hem teşhis sonrasındaki ilk tedavide hem de kurtarma tedavisinde oldukça çok denenmiştir. Kurtarma tedavisinde fazla bir etkisi olamamasına rağmen bazı faz II çalışmalarında kompozit ile %50 oranında önemli etkinlik göstermiştir. Sisplatin DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yaparak sitotoksik etki göstermektedir [5].

Bu ilaçların meme kanserinde hangi organlara metastaz yapan hücreler üzerinde etkili, hangilerine karşı da etkisiz olduklarının belirlenmesi, etkili tedavi protokollerinin oluşturulmasında önemli olacaktır. Bu çalışmanın amacı da karaciğere (4TLM), beyine (4TBM) ve kalbe (4THM) metastaz yapmış meme kanseri hücrelerinin [6] [7] bu ilaçlara duyarlılığını ve duyarlılığı etkileyen mekanizmaların belirlenmesidir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Meme Kanseri Tarihçesi

Meme kanserinin tanı ve tedavisine tarihsel olarak bakıldığında, insanlığın 5000 yıldır bir mücadele içinde olduğu görülmektedir. Meme, eksternal bir organ olduğundan dolayı meydana gelen patolojik değişiklikler gözle görülebilmektedir. Bu durum kanserle ilgili çalışmaları üzerine çekmiştir.

Meme hastalıklarına ait en eski bilgiler Mısır papirüsünde bulunmuştur. Milattan önce 3000-2500 yılları arasında Eski Mısır'da İmhotep tarafından yazıldığı tahmin edilmektedir. Bu tarihi belgelerde cerrahi müdahalenin yapıldığı 48 hastadan bahsedilmektedir. Bu yapıtta elle dokunulduğunda hissedilebilen tümörlerin bulunduğu memenin tedavi edilemeceği anlatılmaktadır.

Klasik Yunan'da (MÖ 460-160), 300 yıl boyunca Hipokrat'ın bedeninin kan, sarı safra, kara safra ve flegmden (aşırı mukus) oluştuğu hipotezi geçerli olmuştur. Bu hipoteze göre meme kanseri bu dört maddenin arasında meydana gelen dengesizlik olarak oluşmaktadır. Ayrıca Hipokrat kanlı meme başı akıntısı ile gelen meme kanseri bir hastayı tanımlamıştır. Menopoz ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi saptamıştır [8].

Tarihte ilk kez meme kanserini mastektomi ve aksiller küraj ile tedavi eden hekim olan Leonides, koterizasyon ve damar bağlama tekniklerini kullanarak memeyi kesip çıkarmıştır [9].

İlk başarılı Lumpektomi ameliyatını yapan Paris'te yaşayan Hollanda'lı doktor Adrian Helvetius (1661-1741) olmuştur. John Hopkins Üniversitesi'nde William Halsted tarafından XIX. yüzyılın sonlarında geliştirilen radikal mastektomi, meme kanseri ameliyatlarının standart yöntemi olmuştur. Bu metot da rutin olarak tüm meme, lenf bezleri, pektoralis major ve minor kasları, interkostal kasların yüzeysel fasyaları ile birlikte blok halinde çıkarılmaktadır.

Bu yöntem daha sonraki altmış yıl Dr.Haagensen'in yaptığı modifikasyonlarla ağırlığını korumuştur. Yirminci yüzyılın ortalarından sonra radikal mastektomi, yerini daha ılımlı cerrahilere bırakmıştır [10].

W. Fabry ve J. Schultes 16. yüzyılın sonlarında meme ameliyatının teknik detaylarını anlatan bir kitap yazmışlardır. 17. ve 18. yüzyıllarda meme ameliyatının sadece deneyimli cerrahlar tarafından yapılması kararı alınmıştır. Bu dönemde memenin ve aksiller lenf nodüllerinin anatomisi ve ilişkisi anlaşılmış ve kanser ameliyatları sırasında çıkarılması kabul edilmiştir [11].

18. yüzyılda A. Leewenhoek tarafında mikroskobun icadıyla canlı hücre inceleme çalışmaları başlamıştır. 19. yüzyılda Berlin'den J.Müller, M.Schleiden ve T.Schwann insan vücudunun canlı hücrelerin kompozisyonundan oluştuğunu saptadılar. Müller kanserin de yaşayan hücrelerden oluştuğunu belirtmiş ancak bu hücrelerin normal hücrelerden farklı olduğunu bildirmiştir. C.Tiersch ve W.von Waldeyer metastazın, ana tümörden ayrılan hücreler tarafından oluşturulduğunu saptamışlardır. C. Moore meme ve aksilla lenf nodüllerinin “en bloc (bir bütün halinde)” çıkarılmasının hastalığın yaygınlaşmasını engelleyeceğini savunmuştur [12].

1939 yılında Gray meme kanserinin lenfatik yayılmasının yayılma yolu ile değil embolizasyon ile olduğunu, kan damarı ile yayılmanın uzak metastazlardan sorumlu olduğunu savunmuştur. B. Fisher'e göre bu durum daha farklıydı. B. Fisher, meme kanserinin sistemik bir hastalık olduğunu ve hastalığın nasıl seyredeceğinin beden ile kanser arasındaki biyolojik savaş sonucu belirleneceğini ileri sürmüştür. Dolayısıyla lokal tedavi yerine sistemik tedavilerin uygulanmasının daha doğru olacağını savunmuştur. Bu düşünce kemoterapinin önünü açmıştır. Birinci Dünya Savaşında kullanılan hardal gazının kemik iliği depresyonu yaptığının anlaşılması bugünkü modern kemoterapinin temelini atmıştır [8].

20. yüzyılın sonuna gelindiğinde meme kanserinin gerçek nedeni hala saptanmamıştır. Ancak tümörün oluşmasına yol açabilecek hücresel büyüme faktörleri, hücre içi haberleşme yolları ve hangi genlerin ne tür bozulmalar ile karşılaştığında meme kanseri oluşturduğuna dair geniş bilgilere ulaşılmıştır.

21. yüzyıl başında genetikte başlayan gelişmeleri gen ekspresyon taramalarını komperatif genom hibridizasyonu (CGH) veya tek nükleotid polimorfizm taraması (SNP) takip etmiştir. Bu tekniklerle yapılan araştırmalar meme kanserinin tek tip bir hastalık olmadığını göstermiştir. Meme tümörünün biyolojik davranışı ve çeşitli kemoterapilere nasıl cevap vereceği bu yeni moleküler sınıflama ile önceden saptanabilir hale gelmiştir. Ancak hala çok sayıda yapılması gereken çalışma bulunmaktadır. Özellikle genomik çalışmalar ilerledikçe meme kanserini anlamamız ve hedefe yönelik ilaçlar geliştirmemiz mümkün olacaktır [13].

2.1.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Gelişmiş ülkelerde en sık görülen kanser türlerinden biri meme kanseridir. 20-34 yaş arasındaki genç kadınların %12'sinde meme kanserine rastlanmaktadır [14]. Bilinen kanser türleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı alırken kadınlarda en sık görülen kanserdir. 1948-1985 yılları arasında kanser nedeniyle oluşan ölümlerin %80'i meme kanserine bağlı iken, 1985'den itibaren akciğer kanseri meme kanserini geçmiştir. 2009 yılı Amerika Birleşik Devletlerinin (A.B.D.)

verilerine bakıldığında meme kanserinin yıllık insidansının 190 000 olduğu görülmektedir. Yine aynı yıla ait veriler yıllık kanser insidansının 1,5 milyon olduğunu söylemektedir [15]. Ülkemizde 1991 yılında yapılan bir çalışmada 1985-1990 yılların arasında görülen kanser türlerinden %20'sinin meme kanseri olduğu gösterilmiştir [16]. 2005 yılı insidansı %35 olarak açıklanmıştır [17].

Meme kanseri ile ilişkili pek çok risk faktörü (yaş ve cinsiyet, ırk ve etnisite, iyi huylu meme hastalıkları, meme kanseri öyküsü, yaşam şekli ve beslenme alışkanlığı, reproduktif ve hormonal faktörler, iyonize radyasyona maruz kalmak, sigara içmek ve çevresel faktörler) tanımlanmıştır. Meme kanserinde en önemli risk faktörlerinden birisi yaştır. Hastalık gelişme riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalık görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu kanser türünün 30 yaşına kadar oldukça az görülmesine rağmen özellikle 65 yaşından sonra lineer bir artış gösterdiği belirtilmektedir. Bu riskin 65-80 yaş arasındaki kadınlarda, daha genç kadınlara göre yaklaşık olarak 5,8 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir [18]. Ülkemizde de bu durum genel tablodan farklı değildir. Meme kanseri vakalarının sadece %5' lik bir kısmının 35 yaş altında görüldüğü belirtilmiştir [19]. Meme kanserinin görülme sıklığındaki benzer farklılıklar aynı ülkede yaşayan farklı etnik gruplara arasında ve/veya beyaz-siyah ırk arasında da görülmektedir. Bu farkın nedeni olarak yaşam tarzı, sosyoekonomik durum ve çevresel etkenler gösterilmektedir. Ayrıca başka ülkelere göç eden bireylerde yapılan çalışmada, birkaç nesil sonra göç ettikleri ülkenin görülme sıklığına ulaştıkları gösterilmiştir. Bu sonuç hastalığın ortaya çıkışında çevresel etkenlerin ve yaşam tarzının önemini ortaya çıkarmaktadır [20].

Meme kanseri görülme sıklığında Dünya ülkeleri arasında özellikle menapoz sonrası kadınlarda ciddi farklılık görülmektedir. Japonyada yüz binde 12-15 arasındayken, Hawaii, Kaliforniya ve Kanada bu oran yüz binde 80-90' lara çıkmaktadır [21].

1980' li yıllarda mamografiyle tarama yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte meme kanseri görülme sıklığı artmıştır. Fakat bu artış erken evre hastalarda olmuştur. İleri evre hastalarda ise azalma görülmüştür [22].

Gelişmiş ülkelerde mamografinin kullanımındaki yaygınlaşma olguların %80' ninde erken evrede tanı konulmasını sağlamıştır. Mamografinin düzenli yapılması durumunda 50 yaş ve üzeri kadınlarda mortalitede %30 azalma görülmüştür. 2000 yılından bu yana mamografi 40 yaş ve üstü kadınlarda meme kanserinin taranmasında ve hastalığın saptanmasında en önemli yöntem olmuştur [23].

2.1.3. Risk Faktörleri

Meme kanserinin en önemli risk faktörlerinin başında yaş ve cinsiyet gelmektedir. Bayanlarda meme kanseri görülme oranı erkeklere göre oldukça yüksektir. Bunların yanında 20 yaş altı bayanlarda meme kanseri görülme sıklığı oldukça düşüktür. 35 yaş civarında büyük bir artış gösteren hastalık, 50' li yaşlara gelindiğinde en riskli dönemi oluşturur. Bundan sonra daha düşük hızla devam eder.

Meme kanseri meme dokusunun gelişimi ve hormonal etkiler nedeniyle kadınlarda oldukça sık görülmektedir. Erkeklerde görülme sıklığı %1' dir. Doğumda memenin epitelyal komponenti meme başının altında az sayıda rudimenter kanaldan oluşur ve prepubertal yıllarda bu kanallar yavaş yavaş büyümeye başlar. Kadınlarda cinsiyet hormonlarının etkisi ile meme gelişimi pubertede hızlanmaktadır. Ayrıca doğum kontrol ilaçları ve hormon replasman tedavisi kullanımı da kadınlarda meme kanserinin daha sık görülmesine neden olabilmektedir [24].

2.1.4. Meme Kanserinin Oluşumu

Normal hücreler belirli bir kontrol mekanizması içerisinde bölünür ancak söz konusu kanser hücreleri olduğunda bu mekanizma kontrolden çıkmıştır. Kanser hücrelerinde normal hücre döngüsü kontrolü kaybolur ve uygunsuz bir şekilde bölünürler. Hücre bölünmesinde genetik kontrol mekanizması çok önemlidir. Çünkü hücrenin davranışını kontrol etmek ve düzenlemek karmaşık bir sinyal alış verişiyle gerçekleşir. Hücrenin ne zaman bölüneceği, farklılaşacağı veya öleceği, hücrenin aldığı sinyaller doğrultusunda gerçekleşir. Mutasyon sonucu bu ağda meydana gelebilecek bir bozukluk hücrelerin daha hızlı bölünmesine neden olacaktır. Fakat hücrelerin daha hızlı bölünmesi kanserli hücre olduğu anlamına gelmez.

Klasik tümör gelişiminde, normal bir epitel hücre premalignant atipik hücreye dönüşür. Daha sonra bu tip lezyonlar invazif olur ve dağılırlar. Dağılan lezyonlar immün sistemden kurtuldukları takdirde metastaz oluştururlar.

Duktal hiperplazi meme kanseri başlangıcının ilk işaretidir. Bu esnada düzgün dağılım göstermeyen epitel hücrelerinde çoğalma görülmektedir. Bu hücreler başlangıçta iyi huyludur. Ancak kişide genetik olarak kanser riskinin yüksek olması hiperplaziden atipik hiperplaziye dönüşümün olmasına neden olur. Daha sonra duktal veya lobular olarak karsinom gelişir. Bu durumda atipikleşme sonrası kötü huylu özellikteki hücrelerin artışı başlar. Son olarak hücreler bazal membrandan ayrılarak komşu dokulara doğru yayılım gösterirler [25].

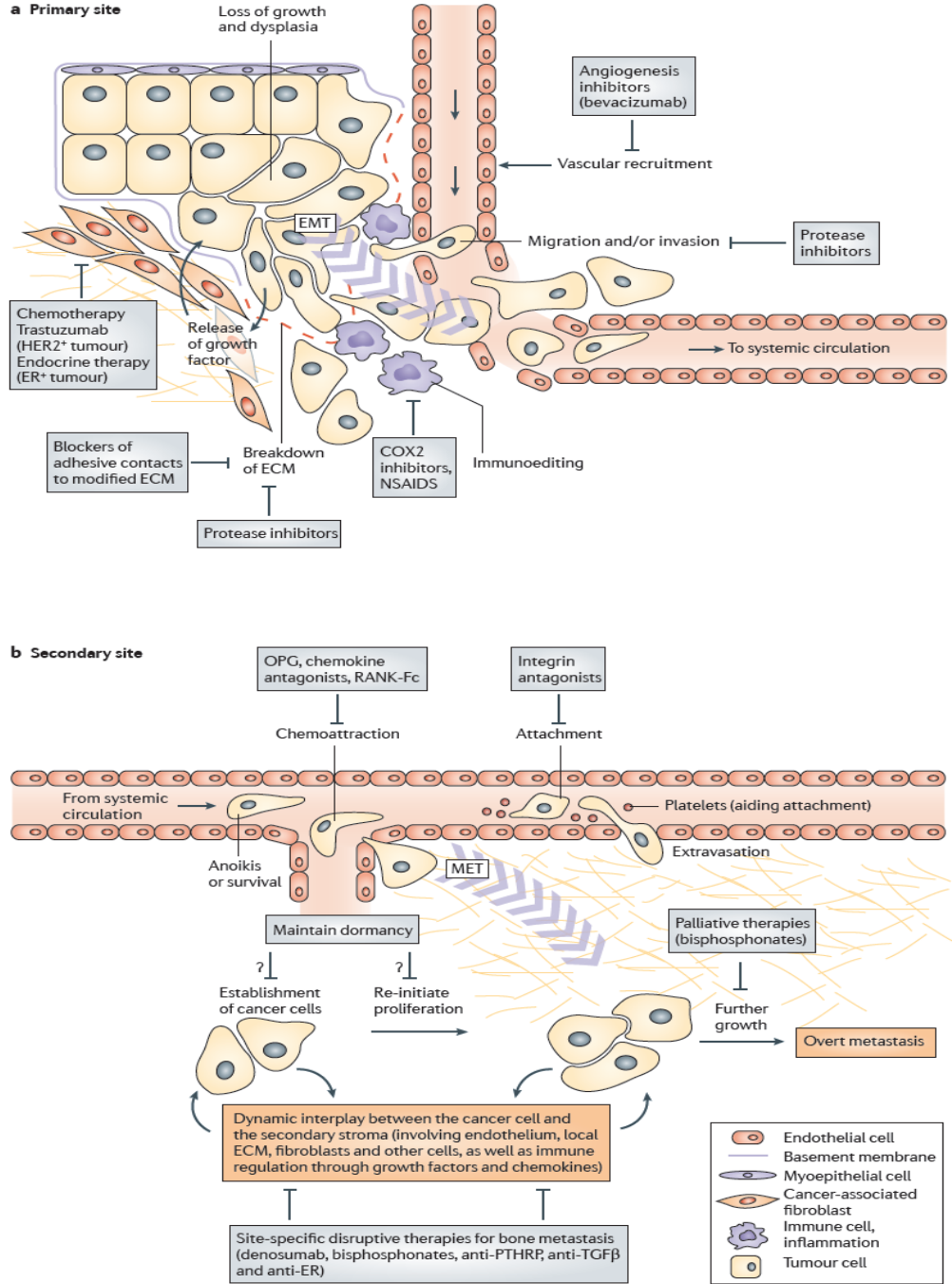
2.2. Metastaz Biyolojisi

2.2.1. Metastaz patogenezi

Metastaz, en basit ifadeyle primer tümör hücrelerinin uzak bölgelere dağılarak orada büyüme göstermeleri olarak tanımlanabilir. Metastaz oluşabilmesi için kanser hücrelerinin birbirini izleyen bir takım basamakları tamamlaması gerekmektedir. Metastaz oluşumu farklı organ çevreleri ile metastatik hücrelerin etkileşimine bağlıdır. Organa özgü metastazlar çeşitli deneysel modellerde gösterilmiştir. Isaiah J. Fidler 1990 senesinde yaptığı bir çalışmada bir organdaki tümör büyümesinin belirli bir yere spesifik olduğunu göstermiştir [26].

Metastaz kanserin en korkutucu yönlerinden biridir. Tıp alanında gelişen teknoloji, artan bilgi ve donanıma rağmen kanser ölümlerinin büyük bir kısmı tedaviye direnç gösteren metastazlardan dolayı olmaktadır. Öyle ki kanser tanısı alan bir çok hastada tanı esnasında metastaz mevcut olabilmektedir. Metastaz farklı viseral organlarda bulunabileceği gibi tek bir organda bir çok bölgede ve lenf nodunda görülebilir. Özellikle lenf nodu ve viseral organlarda aynı anda metastaz oluşması tedavi sürecini zorlaştırır.

Ayrıca metastazın oluştuğu organın spesifik ortamı sistematik tedaviye olan yanıtı değiştirmektedir. Tümör hücreleri tek başlarına fonksiyonel değildirler. Fonsiyonel hale gelebilmeleri (büyümeleri ve metastaz oluşturmaları) için stroma ile etkileşim halinde olmaları gerekir. Stroma çeşitli konakçı hücre tiplerinden oluşur. Bu hücreler tümör mikroçevresini oluştururlar. Stromal hücreler fibriler proteinler ve glikoproteinler kompleksine gömülüdür. Tümör hücreleri kronik inflamasyon oluşturarak stromal hücre bileşiklerini aktive ederler. Aktive edilmiş stromal hücrelerin salgıladığı sitokinler ve proteazlar, tümör büyümesini aktive ederler ve metastaz oluşumuna yardımcı olurlar. Tümör hücreleri metastaz oluşturdıklarında genellikle konvensiyonel kemoterapiye direnç geliştirirler. Bu durum anti-kanser ilaçların etkisini değiştirmektedir ve metastatik meme kanserli hastalarda kötü prognoza neden olmaktadır (Şekil 2.1.) [27].



Şekil 2. 1. Terapötik müdahalenin mevcut ve potansiyel aşamaları gösteren metastaz süreci [27].

Kanser hücrelerinin primer ve sekonder bölgelerdeki biyolojik çeşitliliği metastaz tedavisinde ciddi bir engel oluşturmaktadır. Bu çeşitlilik kendini biyolojik ve immünojenik özelliklerde gösterebildiği gibi genetik olarak da ortaya çıkmaktadır. Enzimler, hücre morfolojisi, salgılanan büyüme faktörleri, hücre yüzey reseptörleri, kemoterapötiklere yanıt, invazyon yeteneği ve metastaz yeteneği gibi çok geniş alanda heterojenite görülebilmektedir.

Primer ve sekonder tümörlerde meydana gelen bu çeşitliliğe neyin neden olduğunu bulmak ve bunun altında yatan mekanizmaların aydınlatılması kanser araştırmacılarının temel amacı olmuştur. Ancak bu şekilde kansere ve metastazlarına etkili tedavi yöntemleri geliştirmek mümkün olacaktır [27].

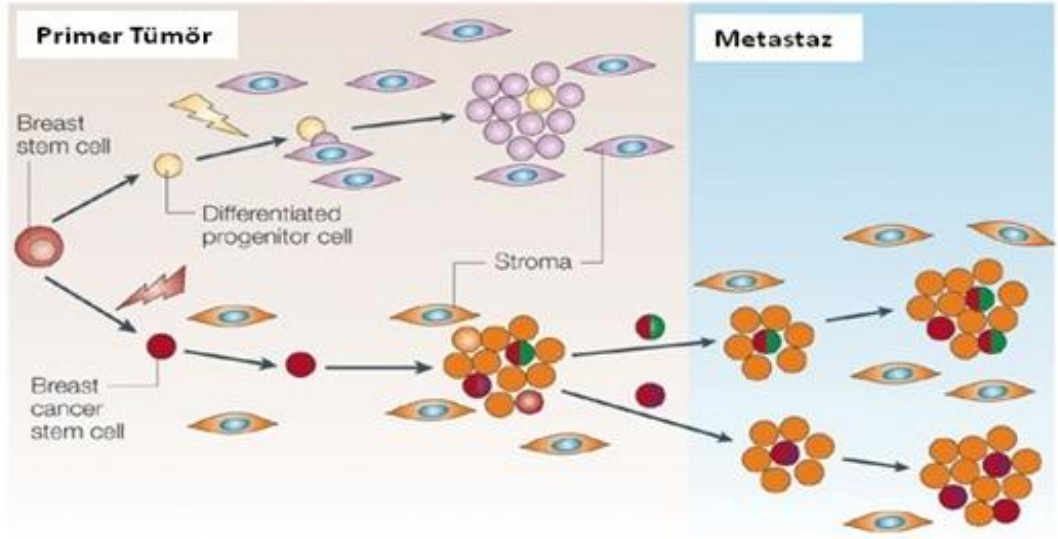
Metastatik süreç; kanser hücrelerinin ana tümörü terk ederek lenf ya da kan dolaşımına girdikleri, hayatta kalarak göç ettikleri ve uzak organlarda kolonize oldukları bir dizi karmaşık basamaktan oluşmaktadır. Bu karmaşık süreç metastatik hücrelerin genetik ve epigenetik değişimler yoluyla birçok özellik edindiğini göstermektedir [28]. Massagué ve Nguyen, metastatik süreci temel olarak üç genel metastaz sınıfına ayırmaktadır: metastaz başlangıcı, metastaz ilerlemesi ve metastaz virülansı [29]. Metastaz başlangıç genleri tümör hücrelerinin dolaşıma girmelerinin yolun açan genlerdir. Metastazın ilerlemesine neden olan genler primer tümörün büyümesinde bazı hız sınırlayıcı ve metastatik kolonizasyonda başka özel işlevleri yerine getiren genlerdir. Metastaz virülans genleri primer tümörde değil fakat metastatik kolonizasyona katkıda bulunan genlerdir. Ancak, kötü huylu hücreler metastaz oluşturmadan önce bazı tümörjenik koşulları yerine getirmelidirler. Bu hücreler hızlı çoğalabilmelidirler, köken dokularının çevresel kısıtlamalarından kaçabilmelidirler, anjiyogenez adı verilen, yeni kapiler ve kan damarları oluşturarak kan ihtiyacını sağlayabilmelidirler. Tümörler büyüdükçe, immün yanıt tümörler üzerinde, oksijen derişiminin azalması ve asidik çevrenin artışı gibi baskılar oluşturur. Tümör hücreleri bu baskıya uyum sağlamalı. Bu gibi özellikler tümör başlangıcı ve lokal gelişim sırasında edinilir. Fakat metastatik hastalığın gelişebilmesi için bu özellikler etkin kalmalıdır [30].

2.2.2. Meme Kanserinin Yayılımı

Bir çok tümörün mikroskobik olarak yayılabilmesi için 1 mm^3 lük bir hacime ulaşması gerekmektedir. Meme kanserinin mamografiyle tespit edilebilmesi için 3-5 mm, palpe edilebilmesi için 10 mm bir büyüklüğe ulaşması gerekmektedir [31].

Metastaz oluşumuna bakıldığında iki temel durumun söz konusu olduğu görülmektedir. Bunlardan bir tanesi tümör hücrelerinin sahip olduğu genotip ve fenotiplerin değişerek farklı hücre popülasyonları oluşturması bir diğeri ise tümör hücre özellikleriyle metastaz süreci arasındaki ilişki ve mikroçevredir (Şekil 2.2.). İntegrin reseptörler, büyüme faktörlerinin aşırı salgılanması, matriks metalloproteazlar, hücre adezyonu, hücre döngüsü kontrolü ve anjiyogenik faktörler metastaz biyolojisinde önemli role sahiptirler.

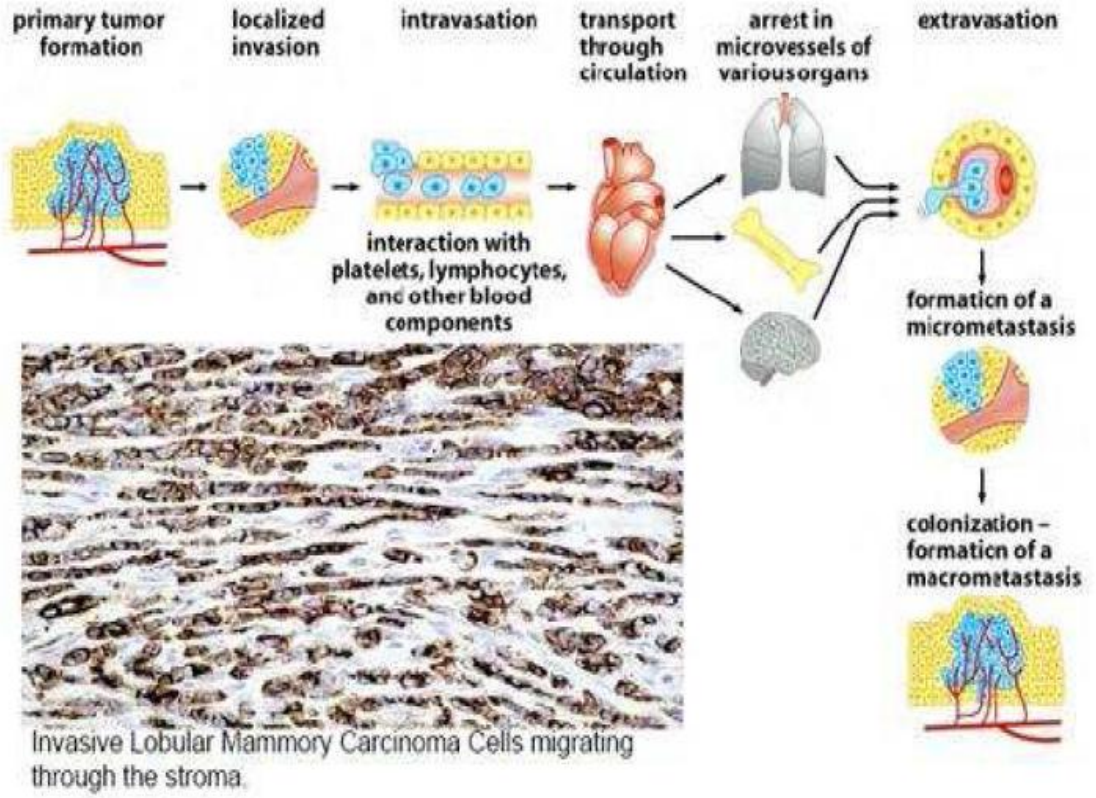
Kanser metastazının patogeneğinde hem tümör hemde konakçı hücrelerin intrinsik özellikleri önemlidir. İkisi arasındaki etkileşim hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Temel olarak kan akımıyla taşınan kanser hücrelerinin organlara spesifik olarak gitmesini ve orada büyümesini konakçı organ ile kanser hücresi arasındaki moleküler etkileşim belirlemektedir.



Şekil 2.2. Primer tümör ve metastaz oluşumu. Meme kök hüresinde (kırmızı) oluşan onkogenik mutasyonlar zayıf progresyonlu meme kanseri kök hüresinin (turuncu) oluşmasına neden olur. Farklılaşan progenitör hücrelerde oluşan mutasyonlar (sarı) metastatik olmayan iyi progresyona sahip meme kanser hücreleri (pembe) oluşturur. Metastatik zayıf progresyona sahip tümörlerde sadece meme kanseri kök hücre popülasyonu metastaz oluşturabilir. Metastaz oluşturan hücreler tekrar primer meme tümörü gibi benzer stromal yanıt oluşturur [32].

Neoplastik dönüşümden sonra kanser hücreleri hızla proliferasyona başlar. Oluşan tümör kitlesi ilk önce basit difüzyonla beslenirken daha sonra yöntem yerini yeni kan damarlarına bırakmaktadır. Yeni kan damarlarının oluşması angiogenezis ile gerçekleşir. Tümör 1-2 mm büyüklüğe ulaştığında yeni kan damarlarına ihtiyaç duyar. Kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılması ile metastaz süreci başlamış olur. Tümör hücreleri daha sonra dolaşıma girerler. Dolaşıma katılan tümör hücrelerinin en çok kullandığı yol lenfatiklerdir. Çünkü lenfatiklerde penetrasyon için direnç çok zayıftır. Dolaşımda bulunan tümör hücreleri yeni organın küçük kapillerlerinde sıkışır, açığa çıkmış olabilen subendoteyal bazal membrana yapışır. Dolaşımın kesilmesini ekstrasvazyon izler ve yeni organda kanser hücreleri çoğalarak metastatik süreci tamamlar. Mikrometastazlar konakçı tarafından parçalanır. Parçalanamadığı takdirde büyük metastazlar için zemin hazırlanmış olur. (Şekil 2.3.)

Yapılan araştırmalarda kanser hücrelerinin metastaz oluşturmada genetik faktörlerinde rol oynadığı belirtilmiştir. Tümör oluşumu sırasında hücrelerin, proliferasyon sinyalinin devamı, büyümeyi baskılayan ajanların etkilerinden kaçınma, replikatif immortaliteyi sağlama, angiogenezis indüklemeye, invazyonu aktive etme ve metastazı sağlama özelliklerinin olması gerekmektedir.



Şekil 2. 3. Meme kanseri metastaz şeması [32].

İnvazyon ve metastaz süresince hücrede birbirini izleyen değişik biyolojik olaylar meydana gelir. Metastaz lokal invazyonla başlar ve en yakın kan ve lenfatik damarına kanser hücrelerinin girmesi ve uzak doku parakimine ekstravaze olmasıyla devam eder. Metastaz oluşan dokuda öncelikle mikrometastazlar, daha sonra ise büyüyerek makroskopik tümör oluşur. Bu invazyon ve metastaz sürecinde hücrenin biyolojik özellikleri değişir. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, kontrol bağlantı bölgelerinin kaybına neden olur ve poligonal epitelya hücrelerinin bozulmasına yol açar, matriks enzimlerinin aktive olması ile kanser hücrelerinin motilitesi artarken hücreler apoptoza karşı direnç kazanırlar [32].

Kanserin erken evresinde bir çok kanser hücresi çoktan kana karışmıştır ancak bunların birçoğu kanda yok edilir. Zamanla tümörün büyümesi sonucu kana karışan hücre sayısında bir artış gözlenir. Bu durum metastaz yapma olasılığını artırır. Dolaşımdaki bu kanser hücrelerinin metastaz oluşturabilmesi için uygun ortam bulmaları gerekir. Uygun ortam her kanser türüne özgü belirli oksijen saturasyonu gerektirmektedir [33].

Yapılan çalışmalarda meme kanserinin bölgesel olarak en çok aksiller lenf bezleri, mamaria interna lenf bezleri ve supraklavikular lenf bezi gruplarına yayılım gösterdiği görülmüştür. Bu bölgelerdeki tutulumların iyi bilinmesi tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemlidir.

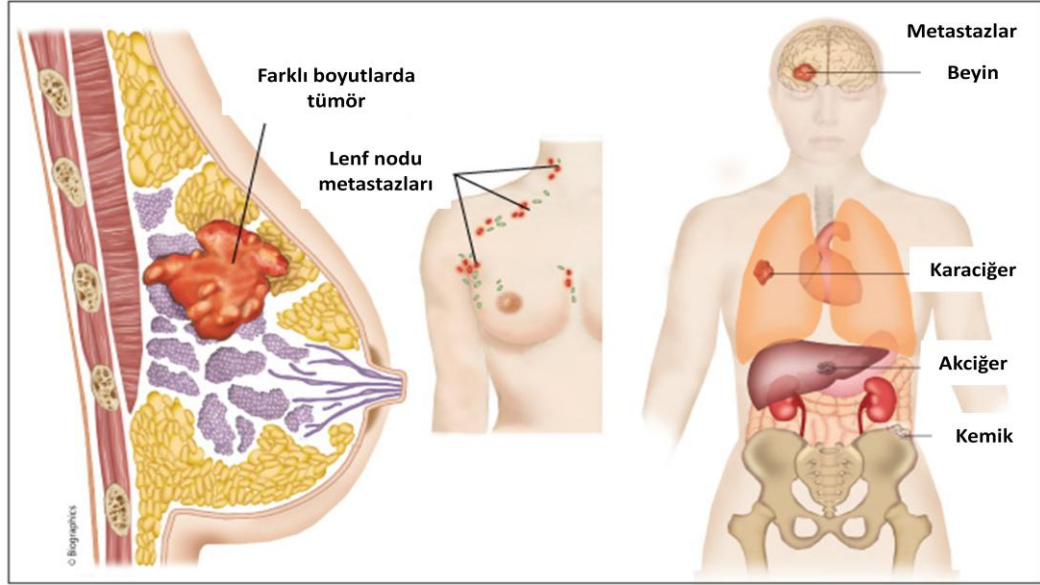
Fizik muayenede palpe edilebilecek boyutlara ulaşmış meme tümörü bulunan olguların yaklaşık %50' sinde lenf bezi tutulumunun bulunduğu görülmüştür. Primer tümör ne kadar büyükse aksilla metastaz riski o derece fazladır. Mamaria interna lenf bezleri meme kanserinin metastaz yaptığı ikinci lenf bezi grubudur. Supraklavikuler lenf bezi metastazları, yaygın aksilla tutulumu ile birlikte seyretmektedir. Supraklavikuler metastazların yaygın aksilla tutulumunu takiben ortaya çıktığı ve prognozu kötüleştirdiği bilinmektedir [34].

Kanserin meme içinde lokal gelişmesi ile lenfatik yayılım her zaman birlikte gerçekleşmez. Küçük tümörler yaygın aksilla lenf metastazları ya da uzak metastazlar yapabilmesinin yanında aksilla lenfatığının tutulumundan önce hızlı yerel ilerleme ile göğüs duvarına yapışıklık yapabilirler.

Bir diğer farklı lenfatik yayılım türü ise "permeasyon yayılması" dır. Permeasyon yayılım ile de kanser hücreleri lenf akımı ters yönünde lenfatik damarın duvarında tutunarak ilerlerler. Bu şekilde gelen kanser hücreleri burada metastatik nodüller oluşturur. Bunlara "satellit deri nodülleri" denir. Satellit deri nodülleri hastalığın çok ilerlediğinin bir işaretidir. Çünkü bu nodüller permeasyon yolu ile lenfatik yayılma hastalığının ileri evrelerinde görülmektedir.

Meme kanseri metastazı için ikinci bir yol ise vertebral venöz (Batson pleksusu) dallarıdır. Venöz kanallar bu pleksus ile toraks, abdomen ve pelvis organlarının venleri arasında uzanır. Bu pleksus vertebralardan geçerek, sakruma kadar ilerler. Bu durum pulmoner metastaz olmadan vertebra, kafatası, pelvis ve santral sinir sistemine olan metastazları açıklar.

Meme kanseri, progresyon mekanizmalarının anlaşılmasına ve yeni tedavi modellerinin geliştirilmesine rağmen bayanların ölümünde hala ikinci sırayı almaktadır. Meme kanseri metastatik olmasından dolayı ölümler devam etmektedir. Örneğin meme kanseri tanısı alan hastaların %25 ila %50 sinde ölümcül metastaz gelişmektedir. Meme kanserinin farklı altipleri ve moleküler belirteçlerin ekspresyon düzeyi (östrojen reseptörü, ÖR; progesteron reseptör, PR; insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, HER2) güçlü prognostik ve prediktif değerlere sahiptir. Örneğin üçlü negatif meme kanserlerinde (ÖR-, PR-, HER2-) moleküler belirteçlerin metastaz oluşumu ve progresyonu pozitif hastalara göre daha kötüdür. Preklinik ve klinik çalışmalara rağmen metastatik hastalığın tedavisinde çok yol alınamamıştır. Terapötik uygulamalar sitotoksik kemoterapi, radyoterapi ya da cerrahi müdahale ile sınırlıdır. Fakat bu uygulamalar da sağkalım üzerinde sınırlı etki göstermektedir. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları primer tümör büyümesini kontrol edebilmelerine rağmen relapsı engellemede çok etkili değildirler. Metastaz süreci primer tümör bölgesinde, lokal invazyonla başlayan olayların çeşitli basamakların ardarda gelişmesi olarak görülmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Meme kanserinin en sık metastaz yaptığı organlar [35].

Metastatik yayılımın diğer bir çarpıcı özelliği ise organa özgü olmasıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, incelenen birçok tümörün metastazının organotropizmini belirlemek için hem kanser hücrelerinin hem de hedef dokunun moleküler karakteristiklerinin birlikte hareket ettiğini göstermiştir. Mevcut kanser araştırmalarında öne çıkan konulardan birisi de farklı tümör tiplerinin dağıldığı organların spesifik mekanizmalarının, diseksiyonunun, moleküler yollarının tanımlanmasıdır. Bu moleküler yolların ortaya çıkarılması klinikte yeni tedavi seçeneklerinde ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

Tümör hücrelerinin dolaşımına uzak organlara ulaşmasındaki ilk engel damar duvarıdır, özellikle de endotel tabakasıdır. Karaciğer ve kemik iliği gibi bazı organlarda oldukça geçirgen olan sinüzoit mikro damarlar bulunmaktadır. Sinüzoitler kan hücrelerinin ekstrasvazasyonuna izin verirler. Bu nedenle dolaşımda bulunan kanser hücreleri için zayıf bir engel oluşturur. Bunun aksine bir çok organdaki endotel hücreleri kanser hücrelerinin kolayca geçişine engel olmak için bitişik durumdadır. Beynin sahip olduğu kan-beyin bariyeri oldukça sıkı endotel tabasına sahiptir. Kan hücreleri ve lökositler metastazı kolaylaştırır. Kan hücreleri ve lökositler tümör hücreleriyle L ve P selektinler ile kompleks oluştururlar [35]. Böylece damarda emboli oluşturmaya katkıda bulunurlar. Selektin ligantların (sLex/a, sialyl Lewis x/a glikanlar) oluşması hastalar için zayıf prognoz ile korele ve metastatik progresyon ile ilişkilidir. Ayrıca spesifik organ tropizmi hedef dokuda ekspres edilen kemokinlere ve sitokinlere bağlıdır. Tümör hücrelerinden ekspres edilen bu kemokin ve sitokin konjuge reseptörleri de organ tropizmi ile ilişkilidir. Örneğin CXCR4 ve CCR7 reseptörlerinin ligantları sırasıyla CXCL12 ve CCL21' dir. Bunların antagonistleri özellikle meme kanserini durdurmak ve ikinci bir organa göç etmesini engellemekte kullanılmaktadır [36].

2.2.3. Yeni Çevreye Adaptasyon

Dağılmış kanser hücrelerinin metastaz oluşturması için ikinci engel yabancı dokuya adapte olabilmek yetenekleridir. Fizyolojik olarak normal hücreler kendi spesifik orjinal dokularında hayatta kalabilir ve proliferasyon yapabilirler. Bu durum doğru dokuyu tanıma ve tropizmin devamlılığında kritik mekanizma olarak görülmektedir. Normal dokularda durum bu şekildeyken dolaşımdaki kanser hücreleri orjinal dokularından farklı başka organ ve dokularda büyüyebilmektedir. Bunun için kanser hücrelerinin yeni özellikler kazanması gerekmektedir. Özellikle yeni mikroçevrenin hücreleri ve ekstrasellüler matriks ile etkileşim içinde olabilmek yeteneğine sahip olmalıdırlar. Tümör hücreleri progresyon boyunca çok çabuk bir şekilde çevrelerindeki stroma ile iki yönlü bir ilişki kurabilirler. Böylece metastaz boyunca tümör progresyonu tümör-stroma etkileşimi ile aktif olarak desteklenir [29].

2.2.4. Metastaz Öncesi Dokudaki Değişiklikler

Doku değişiklikleri tümör hücrelerinin tutunmasından önce gözlemlendiği için ön metastatik niş kavramı kullanılmıştır. Yeteri kadar ön metastatik nişin olması tümör hücrelerinin ilk olarak bulunması ve yaşaması için gereklidir [37]. Kaplan ve arkadaşları akciğerin metastatik kolonizasyonu için uygun mikroçevrenin oluşmasında mobilize kemikiliği türevi hücrelerin (KİTH) önemine vurgu yapmışlardır. Bu hücreler primer tümörlerin salgıladığı faktörlerle hareket ederler. Bu faktörler dağılmış tümör hücrelerini olası bölgelere yönlendirirler. Bu hücreler VEGFR1, CD133, CD34 ve c-Kit ekspresyon ederler. Ön-metastatik niş oluşumunda ortaya çeşitli moleküler mekanizmalar da atılmıştır. VEGFR1+ KİTH tarafından ekspresyon edilen VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrin) bu hücrelerin ön-metastatik nişte depolanan fibronectin ile etkileşimi için önemlidir. KİTH' ler bir kere güçlendirildiğinde matriks metalloproteinazlar salgılamak için uyarılırlar ve VEGF gibi matriks bağlı proteinler ekspresyon ederler [38].

2.2.5. Metastazın Organ Seçimi (Organotropizm)

Metastazların organlara dağılımı tümörün türüne ve yerine göre değişmektedir. Yayılma genellikle tümör içinde ya da tümörün hemen yakınında karşılaşılan ilk kapiler dizisinde başlar. Metastatik hücreler lenfatik kanallar boyunca bir noddan diğerine zıplayabilir ve drenaj nodlarında birikebilirler. Tümör hücrelerinin lenfatik damarlarda ya da kapilerde yayılma eğilimi, drenaj nodlarının subkapsüler sinüsündeki retiküler lifler ya da kan damarlarının iç çeperlerindeki endotel hücreleri gibi özgün yapılara yapışabilme yeteneğine bağlıdır. Bu yapılarla etkileşimler tümör hücreleri tarafından ekspresyon edilen yapışma moleküllerinin türlerine, özellikle de integrinlere bağlıdır [39].

Metastazın diğer çarpıcı özelliği lokalizasyonudur. Lokalizasyon rastgele değildir. Kan dolaşımındaki patternler metastatik kanseri olan hastalarda organa özgü lokalizasyon için sadece kısmi bir açıklama sağlar. Örneğin meme kanseri sıklıkla akciğere, kemiğe, karaciğere ve beyne metastaz yapabilmektedir. Fakat bütün bu bölgeler meme bezi dokusuyla doğrudan vasküler bir bağlantıya sahip değildirler [40].

Metastatik oluşum uygun bir mikroçevre gerektirmektedir. Bu mikroçevrede kanser hücreleri hayatta kalabilmeleri, proliferere olabilmeleri ve yeni tümör kütleleri oluşturabilmeleri gerekmektedir. Bu fikir 1889 yılında “tohum ve toprak” (seed and soil) adıyla Stephen Paget tarafında öne sürülmüştür. Bu sebeple yeni bir hipotez değildir. Stephen Paget’ e göre ikincil organa başarılı bir kolonizasyon tümör hücresinin kendi iç özelliklerine (tohum) ve mikroçevrenin (toprak) destekleyici özelliğine bağlıdır. Bu karşılıklı işbirliği hayatta kalmayı ve proliferere olmayı sağlar [41].

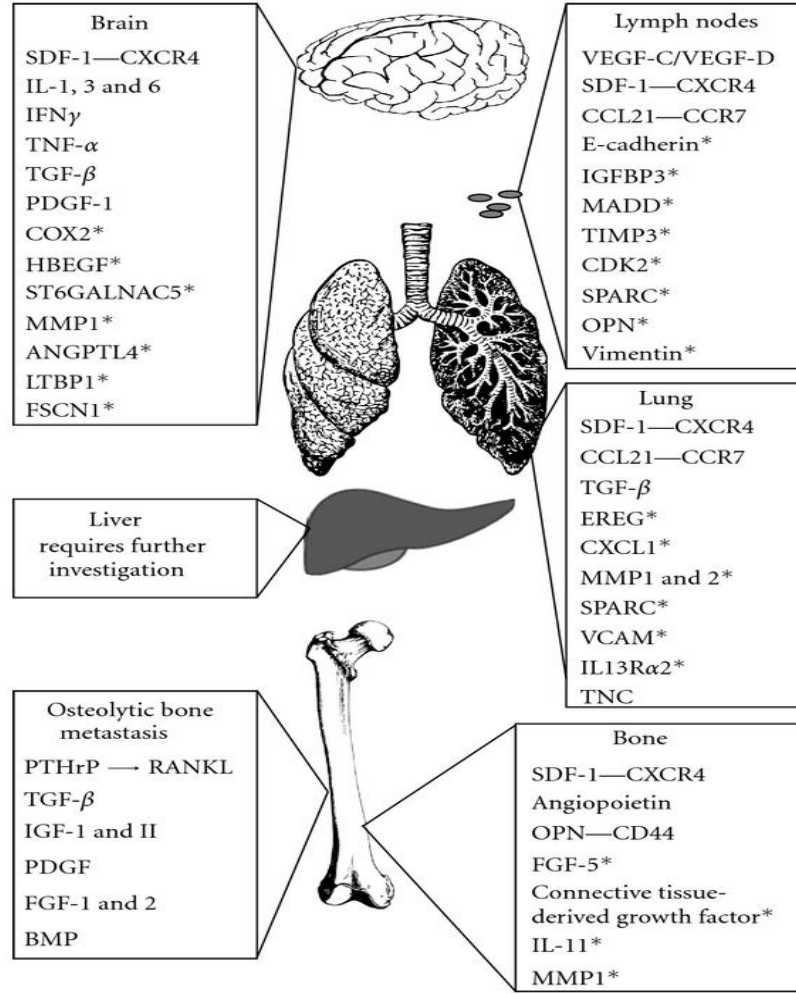
Daha sonrasında yapılan çalışmalarda metastatik tropizminde bölgeye özgü büyüme medyatörleri ortaya çıkmıştır. Özellikle meme kanserinin metastazını akciğere, kemiğe ve beyne yönlendiren genler tanımlanmıştır. Bu genler kanser hücresiyle mikroçevre arasındaki uyumsuzluğu gidererek metastatik dağılımın organ spesifik paternlerini düzenlemektedirler.

Metastatik kolonizasyonun pleiotropik mekanizmaları, kanser hücrelerinde birikmiş genetik modifikasyonların paternleri olarak yorumlanabilir. Bu durum yabancı mikroçevrede primer tümörün büyümesi, dağılması ve hayatta kalabilmesi için gereklidir. Metastazın farklı zamansal paterni de düşünüldüğünde olay daha da karmaşık bir hale gelmektedir. Örneğin akciğer veya pankreas gibi bazı karsinomalar kısa süre içinde metastaz oluşturabilirken, meme kanseri gibi diğer karsinomaların metastaz oluşturması genellikle yıllar sürebilmektedir. Bu durum pankreas gibi kanserlerin sahip olduğu hücrelerin yabancı mikroçevreye adaptasyonlarının hızlı olduğunu gösterirken, meme kanseri gibi kanser hücrelerinin adaptasyonunu daha fazla zaman aldığını göstermektedir. Kanser hücrelerinin genetik instabilitesi göz önüne alındığında, bu sürecin her adımında bazı önemli genlerin ya mutasyona (amplifikasyon, translokasyon veya heterozigotluğunun kaybı) ya da transkripsiyonel düzenlenmeyle değiştirilmiş olma olasılığı vardır [42].

Metastazların belirlenmesi oldukça güçtür. Çünkü bu metastazın olduğu organların tamamını ayrıntılı bir şekilde araştırmak mümkün değildir. Tıbbi görüntüleme tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde çok küçük lezyonların dahi belirlenmesi metastazların saptanmasında önemli hale gelmiştir. Güncel araştırmalar aynı zamanda lenfatik damarlardan ya da kan damarlarından yayılan tek hücrelerin saptanması ve primer tümörlerin metastaz oluşturma eğilimleri hakkında tahminde bulunmayı sağlayacak gen ifadesi görüntülerinin tanımlanması üzerine odaklanmaktadır [43].

2.2.6. Organ-Spesifik Metastazı Düzenleyen Moleküller

Bireysel genlerin organ-spesifik metastaz ile ilişkili olmasına rağmen küresel bağlamda ele alınmalıdır. Diğer bir komplikasyon ise farklı genler belirli bir özelliğin edinimine katkıda bulunurken, bir gen birden fazla etkiden sorumlu olabilir (Şekil 2.5.). Birden fazla genin karmaşık, dinamik ve interaktif ağının oluşturduğu bu pleiotropik etki metastatik hücrelerin doku-tropizmi altında yatan geniş ve karmaşık etkileri açıklayabilir. Bu karmaşıklık ve pleiotropizm meme kanserli hastalarda birden fazla, özdeş olmayan ve değişebilen prognostik işaretleri göstermektedir [44].



Şekil 2.5. Meme kanserinin beyne, karaciğere, lenf nodlarına, akciğere ve kemiğe organ-spesifik metastaz oluşturmasında rol oynayan faktörler [45].

2.2.7. Akciğer, Kemik Ve Beyin Metastazını Yöneten Genler

Meme kanseri heterojen yayılım ile kemiklerde ve yumuşak dokularda metastaz oluşturur. İskelet sisteminde özellikle lomber vertebralara, pelvis kemiklerine, femur proksimal uçlara, kaburgalara ve kafatası kemiklerine yerleşir.

BoM1 kemik metastazı hücre hattındaki 43 genin aşırı ekspresyonu ve 59 genin ekspresyonundaki azalma kemik metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde akciğer metastazının belirtileri de LM2 hücre hattında 43 genin aşırı ekspresyonu ile 47 genin ekspresyonunda azalma olarak belirtilmiştir. Bu genler arasından sadece altı tanesi her ikisi için de geçerlidir. Kemik uyaran genler kemik mikroçevresiyle ilişkiliyken, bazı akciğer metastaz genleri akciğer dokusu dışında tümör invazyonuyla ve agresifliğiyle ilişkilidir [46].

Yumuşak dokular içinde meme kanserinin en sık metastaz yaptığı yerler olarak akciğer, karaciğer ve plevra görülmektedir. İskelet sisteminde ise özellikle

lomber vertebralar, pelvis kemikleri, femur proksimal uçları, kaburgalar ve kafatası kemikleri sıklıkla yerleştiği bölgelerdir. Çok nadir olarak mesane ve mide de metastaz yapabilirler. Meme kanserinin en sık uzak organ metastazı yaptığı organlar kemik, akciğer ve karaciğerdir.

Bos PD. ve arkadaşları 2009 yılında yaptığı çalışmada beyin metastaz hattında tanımlanan 243 genin ekspresyon profilini belirlemiştir. Bu 243 gen bağımsız klinik meme kanseri veri setlerinde beyin relapsı ile olan ilişkisine bakmak için analiz edilmiştir. Klinik olarak beyin metastazına işaret eden 17 genin bazal ÖR negatif meme kanseri alt tipiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Beyin metastazına işaret eden genlerin üçte biri akciğer metastazını işaret eden genlerle örtüşmektedir. Bu ortak genler beyin metastazı tropizmini açıklamaya yetmemiştir. Ancak beyin metastazı belirtilerinin kemik metastazı belirtilerinden çok farklı olduğunu ortaya koymuştur. ST6GALNAC5 geninin beyin metastazı hücre hatında aşırı ekprese edildiği ve insan beyin metastaz örneklerinde up-regüle edildiği bulunmuştur [47]. Akciğer ve beyin metastazı arasında önemli benzerlikler bulunurken, kemik metastazında bulunmamıştır. Bu durumun akciğer ve beyinde benzer vasküler olayların olması kemikte ise bu benzerliğin olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kemikte ve karaciğerde mikrovaskülerite fenestreyken, akciğerde ve beyinde devam eden bir endotel tabakadan oluşmuştur. Bu nedenle akciğer ve beyin metastatik hücrelerinin hedef organlarda koloni oluşturabilmeleri için sıkı vasküler bariyeri geçmeleri gerekir. Bu fikir COX2, ANFPTL4, LTBP1 ve EGFR ligantları gibi bazı örtüşen genlerin gözlenmesiyle desteklenmiştir. COX2, ANFPTL4, LTBP1 ve EGFR ligantları fonksiyonel olarak endotel hücrelerin yapışmasına ve vasküler geçirgenliğin kontrolüne katılırlar [48].

2.2.8. Meme Kanserinin Beyin Metastazı

Metastatik beyin tümörü insidansı kesin bilinmemesine rağmen yetişkinler arasında en yaygın neoplazmdır. Sadece ABD’ de yılda 200 binden fazla vaka ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanserli yetişkinlerin %8-10’ unda beyin metastazı geliştiği gösterilmiştir. Sıklıkla üç primer kanser türü beyin metastazı oluşturmaktadır. Bunlar akciğer kanseri (%40-%50), meme kanseri (%15-%25) ve melanomadır (%5-%20) [49].

Yukarıda bahsedildiği gibi meme kanseri akciğer kanserinden sonra en sık beyin metastazı oluşturan kanserdir. Meme kanserli hastalarda beyin metastazı metastatik hastaların %10-16’ lık oranına sahiptir [50]. Birçok durumda meme kanserli hastalarda sistematik olarak akciğer, karaciğer ve/veya kemik metastazından sonra beyin metastazı gelişmektedir. Asistematik metastatik meme kanserli hastaların yaklaşık %15’ i gizli beyin metastazına sahiptir.

Metastazlar beyin dokusu (parankima) ya da leptomeninkslerde oluşurlar. Meme kanseri leptomeningealerde en sık metastazın görüldüğü solid tümördür. Retrospektif çalışmada sinir sistemine metastaz yapmış meme kanserli hastaların %78’ i multibl interserebral metastaza, %14’ ü soliter interserebral metastaza sahiptir ve kalan %8 metastaz leptomeningealdir [51].

Meme kanserinde beyin metastazının gelişmesinde yüksek riskli hastaların karakterizasyonu bir çok defa araştırılmıştır. En çok kabul gören risk faktörleri genç hastalar ve östrojen reseptör negatif (ÖR-) primer tümörlerdir. Hastalık, genç hastalarda genellikle agresif gelişmektedir. Çeşitli grupların yaptıkları çalışmalarda beyin metastazı olan hastaların, olmayanlara göre ortalama 5 yaş daha genç olduğu ayrıca hormon reseptör durumunda beyin metastazıyla alaklı olduğu bulunmuştur. ÖR+ hastalarda hormon tedavisiyle beyin metastazı olma riski, ÖR- hastalara göre daha azdır. Öte yandan meme kanserli vakaların %25-30' unda HER-2' nin aşırı eksprese edildiği görülmüştür. Bu durum HER-2 ekspresyonunun beyin metastazı arasında bir ilişkinin olup olamayacağı sorusunu akla getirmiştir. Bu durumda olan hastaların %1-4' nün ilk metastaz alanının beyin olduğu görülmüştür. Ayrıca tümör boyutu (2 cm' den büyük), tümör derecesi (derece 3) ve lenf nodu (3' den fazla) olması beyin metastazını indükleyen faktörler olarak görülmektedir [52].

Beyin metastazının en sık görülen klinik bulguları baş ağrısı, bulantı, bellek ve diğer kişilik değişiklikleri, halsizlik, konuşma bozukluğu, dengesizlik gibi bilişsel değişikliklerdir. Leptomeningeal hastalığı bulunanlarda kranial sinir tutulumu intrakraniyal (beynin içinde) lezyonları olanlardan daha fazladır.

Beyin metastazı bulunan meme kanserli hastalarda semptomatik rahatlama sağlamak ve tümör çevresindeki ödemi azalmak için kortikosteroidler kullanılır. Kortikosteroidlerin kapiler geçirgenliği azaltır. Böylece arteriel tonusu düzenlemiş ve tümör periferindeki ödem azalmış olur [53].

Kemoterapötik tedavinin beyin metastazı üzerindeki etkisi sınırlıdır. Bunun nedeni kan-beyin bariyerinden dolayı metastatik bölgeye ilaçların ulaştırılmasındaki güçlüktür. İlaçların kan-beyin bariyerini geçebilmeleri için yağda çözünebiliyor olmaları gerekmektedir. Ancak bu şekildeki ilaçlar santral sinir sistemine (SSS) ulaşabilir. Ayrıca endotel hücrelerinde bulunan P-glikoproteinler de ilaçların SSS' e ulaşmasını engellemektedirler. Bu sebepten dolayı meme kanser tedavisinden sıklıkla kullanılan vinorelbin, dozetaksel, 5-fluorourasil, paklitaksel ve doksorubisin gibi kemoteratiklerin SSS' e geçişleri oldukça zayıftır. Bu negatif durum beyine metastaz yapmış meme kanserli hastalarda anti-neoplastiklerin kullanımını sınırlamaktadır [50].

Beyin metastazı bulunan meme kanserli hastalarda kan-beyin bariyeri genellikle hasarlıdır. Bu nedenle normal fizyolojik koşullarda kan-beyin bariyerini geçemeyen etoposide, fulvestrant ve transtuzumab gibi kemoterapötikler beyin metastazında buranın hasarlanması sonrası geçebilmektedir [50].

Beynin çeşitli bölgelerine metastaz yapmış hastalara tüm beyin ışınlanması standart tedavi uygulamasını oluşturmuştur. Özellikle cerrahi uygulamanın ardından yapılan tüm beyin ışınlarından önemli sağkalım sonuçları elde edilmiştir. Ancak cerrahi işlem için beyinde metastatik lezyonun tek veya az sayıda olması, hastanın diğer minimal koşulları sağlıyor olması gerekmektedir. Beyinde çoklu metastatik lezyonu bulunan hastalarda bu uygulama hala tartışılmaktadır [53].

2.2.9. Meme Kanserinin Karaciğer Metastazı

Karaciğer, meme kanserli hastalarda en sık metastazın görüldüğü bölgelerden biridir. Karaciğer, meme kanserli hastaların %12-15 arasında ileri derece meme kanserli hastaların ise %50' sinden fazlasında görülen metastatik bölgedir. Meme kanseri hücrelerinin kan veya lenf yoluyla karaciğere yerleşmesi ile oluşur.

Karaciğerin en önemli görevi sindirim için gerekli maddeleri salgılamak ve kan pıhtılaşması için gerekli proteinleri yapmaktır. Karaciğer büyük bir organdır. Bu nedenle işlevine devam edebilir. Metastaz belirtileri geç fark edilebilir [54].

Meme kanser hücrelerinin karaciğere yerleşmesiyle oluşan karaciğer metastazıyla birlikte çok değişik belirtiler meydana çıkabilmektedir. Meme kanseri metastazları karaciğeri büyütebilir. Büyüyen karaciğer kendisini saran zara baskı yapar. Bu durum ciddi ağrıya neden olabilir. Bununla birlikte büyüyen karaciğer sağ omuza giden sinirlere de baskı yaparak omuz ağrısı oluşturabilir. Aynı şekilde karaciğerin büyümesi mide üzerine de baskı yapabilir bu durum iştahsızlığa neden olabilirken, karaciğer hücrelerinin yıkımıyla oluşan zehirli maddeler bulantı oluşturabilir. Karın boşluğunda serbest sıvı birikmesi, asit oluşturur. Oluşan asit karının şişmesine ve solunum zorluğuna neden olur. Oluşan sıvı zaman zaman alınarak hasta rahatlatılır.

Karaciğerde metastaz oluşumu zayıf prognozun göstergesidir. Sistematik hormon ve ilaç tedavisi uygulanan hastalarda, tedaviye rağmen ölüm oranı çok yüksektir. Tedavi edilmeyen hastalarda ortalama sağ kalım süresi 4-14 ayken, sistematik tedavi gören hastalarda bu süre 13-25 aya çıkmaktadır. Primer tümör tanısı alan hastaların solid tümörlerinin %60' ında klinik ya da mikroskopik düzeyde metastatik yayılım olduğu ortaya çıkmıştır [55].

Kanser hücrelerinin metastaz süreci oldukça karmaşıktır. Bu durumu açıklamak için hala çalışmalar sürmektedir. Metastaz süreci tümör hücresiyle konakçı doku arasındaki ilişkiyi içeren çok basamaklı bir durumdur. Bu durumu açıklamaya çalışan pek çok çalışma metastaz oluşumunun sadece kan akımıyla gerçekleşmeyeceğini ortaya koymuştur. Karaciğerde bulunan hücre büyümesini etkileyen humoral etkenlerin metastaz oluşum sürecinde önemi bulunmaktadır. Bunun yanında karaciğerin endotel ile kaplı özel yapısı metastaz oluşumu için uygun zemini hazırlamaktadır. Bazı organlarda (beyin, kalp gibi) metastaza karşı bulunan bariyer karaciğerde yetersiz ya da eksiktir [43].

2.2.10. Meme Kanserinin Kardiyak Metastazı

Kardiyak tümörler onkolojik vakalarda sık karşılaşılan bir durum değildir. Ancak yeni tedavi rejimleri sayesinde hastaların yaşam sürelerindeki artış ve tanı koyabilmedeki kolaylıklar sayesinde kalp metastazı görülme sıklığı artmıştır. Teknolojideki gelişmelerle birlikte yüksek rezolüsyonlu, ekokardiyografi cihazları, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), bilgisayarlı tomografi (BT) gibi kitlesel görüntüleme yöntemlerinin, kardiyak patolojilerin tanısında kullanımının artmaya başlamasıyla beraber kalbin özellikle de perikardın metastatik tutulumu daha sık görülmeye başlanmıştır. Ayrıca primer kardiyak tümörlerin yaygın olmamasına

rağmen, ikincil tümörler için aynı şey söylenemez. Uzak bölgelere metastaz yapabilen malignant neoplazmalar tarafından kalpte metastaz oluşturulabilir. Teoride her malignant tümör kalbe metastaz yapabilir. Günümüzde sadece merkezi sinir sistemi tümörlerinin kardiyak metastaz oluşturmadığı görülmüştür.

Kardiyak metastaz, bir tümörün kalbi oluşturan epikard, perikard, miyokard, endokard, büyük damarlar ve koroner arterler gibi yapılara metastatik olarak tutunması anlamına gelir.

Tümörler dört alternatif yolla kalbe yayılım gösterirler:

Doğrudan ekstansiyon

Lenfatik sistem yoluyla

İnferior vena kava yoluyla, pulmoner venler intrakaviter difüzyon yoluyla

Bunların arasından retrograd lenfatik uzanım en sık rastlanandır. Perikardiyak boşluğu drene eden lenfatik kanalların çoğunluğu viseral epikartda bulunur ve aort kökü düzeyinde inceler tek bir kanal haline dönüşür. Bu bölgede bulunan ve bası yapan tümörler bu nedenle perikard efüzyonuna neden olurlar. Karaciğerin ve akciğerin mikrosirkülasyonları kanser hücrelerini büyük oranda temizlediği için koroner arterlere çok az kanser hücresi geçebilir. Bu sebepten dolayı koroner arterler yoluyla hematojen kardiyak metastazı gelişen olgularda uzak organ metastazı da görülme ihtimali çok yüksektir [56].

Kalbe en sık metastaz yapan kanser türleri akciğer, yemek borusu, melanomlar, lenfoma ve meme kanserleri olarak belirtilmiştir [57]. Literatüre bakıldığında kardiyak metastaz insidansı oldukça değişkendir (%2,3 - %18,3) [58]. Hangi malignant tümörün tercihen kalbe metastaz yaptığı tam olarak bilinmemesine rağmen melanoma ve mediastinal primer tümörlerin kalbe daha fazla metastaz yaptığı görülmüştür. Ancak metastazın direkt invazyon yoluyla mı, yoksa lenfatik obstrüksiyonla mı geliştiği tam olarak anlaşılamamıştır.

Kardiyak metastazlarda lenfatik sistem büyük rol oynamaktadır. Kalbin lenfatik sisteminin bilinmesi, kalpte neden seyrek metastaz oluştuğunu açıklayabilir. Kalbin lenfatik sistemi temel olarak üç katmandan oluşur: subepikardiyal, miyokardiyal ve subendokardiyal ağlar.

Kardiyak metastazlar genellikle küçük ve çok odaklıdır. Ancak tek başına büyük tümör lezyonları da görülebilir. Karsinomlarda metastatik birikimler prekardiyum yoğunlaşma difüzyonuna neden olabilir. Hematolojik malignitelerde perikardiyumun ve / veya miyokardiyumun ve / veya endokardiyumun difüz tümör infiltrasyonunun yanı sıra odak gözlenmiştir. Kalbin sağ bölgesinde sol bölgesine göre daha fazla oluşum olduğu sanılmasına rağmen son zamanlardaki çalışmalarda sol bölgesinde de tutulum bulunan çok sayıda olguya rastlanmıştır. Bir çok vakada difüz bilateral yayılıma rastlanmıştır [59].

Metastaz lenfatik veya hematojen yolla, doğrudan veya transvenöz uzantısı tarafından kalbe ulaşabilir. Lenfatik yayılım perikard metastazları oluşturma

eğilimindedir, hematojen yayılım tercihen miyokardiyal metastazlar oluşturur. Endokardiyal tümör yatakları nadir bulunur. Bronşiyal veya özofagus gibi kalbe yakın bölgede gelişen kanserler kalbe doğrudan ekstansiyon ile yayılabilirler. Fakat bu tümörler ağırlıklı olarak lenfatikler ile kalbe ulaşırlar. Benzer durum meme kanserinde de gözlenmiştir. Tümör hücreleri mediastinal lenf nodu ile ilk önce epikardiyal daha sonra miyokardiyal lenfatik sistemi işgal ederler. Topografik özellikleri ve yaygınlığından dolayı akciğer ve meme kanseri en sık kalp metastazının karşılaştığı tümörlerdir. Her iki kanser türü de perikardiyumu etkilemektedir. Parsiyal veya total intrakaviter büyümesi olan ikincil kalp metastazları oldukça nadirdir. Bu tümörler oluştuğlarında genellikle trombotik madde ile kaplanırlar. Kalp kapakçığındaki tümör hücre kümeleri daha nadir görülmektedir. Bu tip tümör infiltrasyonu çok nadir de olsa kalp kapağı darlığına veya yetersizliğine neden olur [60].

2.2.11. Survivin

Survivin 142 amino asitten oluşan, 16,5 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. Apoptozis inhibitör proteinlerden olan survivin embriyolojik dönemde normal dokularda ve tümör dokularında sentezlendiği ancak erişkin dokularda bulunmadığı bilinmektedir. Birçok kanser türünde eksprese edilen survivin ayrıca organogenezde de önemli role sahiptir [61].

Mitozda eksprese olan survivin ayrıca sentrozomlar, metafaz mikrotubulleri, anafaz mekiği ve mitotik aparatın kalıntıları gibi mitoz komponentlerinde de lokalizedir [62].

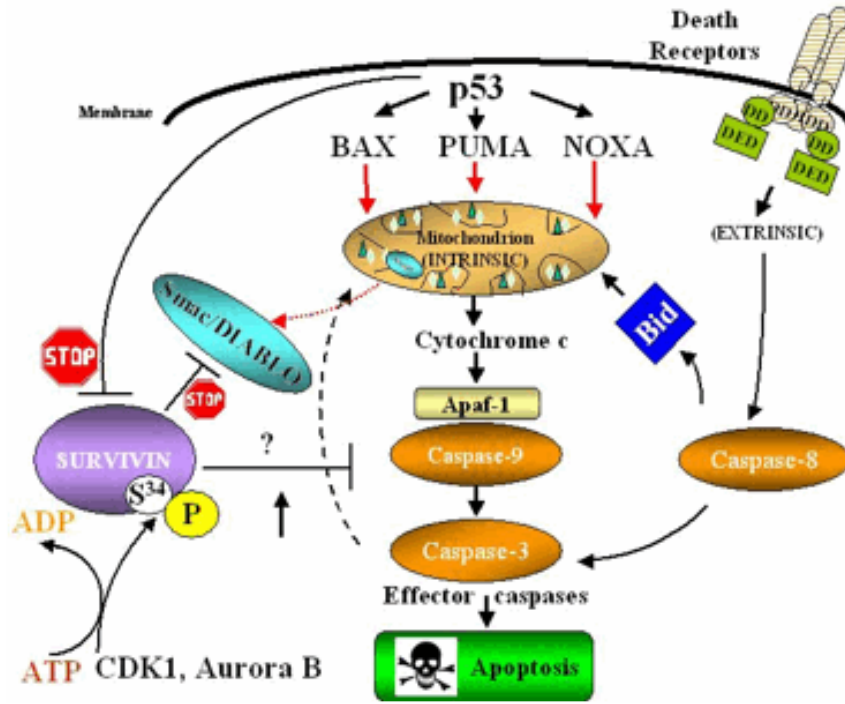
Survivinin prokaspaz 3 ve prokaspaz 7' yi inhibe edip her iki kaspaza in vitro bağlandığı gösterilmiştir. Kaspaz 3 apoptoz sinyalini başlatmada anahtar role sahiptir. Kaspaz 3 poly(ADPriboz)polimerazın, PAK2 (p21 aktive kinaz 2), lamin, gelsolin, ve α -fodrinin bölünmesinden sorumlu olup, DNA tamirinin inhibisyonuna, apoptotik oluşumuna, nükleer membran yıkımına, sitoplazmik büzüşmeye sebep olmaktadır [63].

Survivin, mitozun erken evrelerinde mikrotübül dinamiklerini düzenler. Survivin mikrotübül etkileşiminin bozulmasıyla survivinin antiapoptotik fonksiyonu kaybolur ve kaspaz 3 aktivitesi artar. Kaspaz 3, Fas bağımlı hücre ölümlerinde önemli bir yere sahiptir. Survivin nükleusa translokasyonu da Fas stimülasyonu ve hücre proliferasyonu ile gerçekleşir.

Survivin ekspresyonu normal dokulardan ziyade tümör dokularında eksprese edilir. Bu durum survivini oldukça önemli kılmaktadır. Neredeyse tüm insan kanserlerinde eksprese olduğu bilinmektedir.

Survivin kanserdeki aşırı ekspresyonunun mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Ancak survivinin kanserde yaygın ekspresyonuna çoklu yolların neden olduğu düşünülmektedir. P53 proteininin, apoptotik genleri düzenleyerek apoptozu indüklediği bilinmektedir. P53' ün down regülasyonunu engellemek için survivin hedef protein olabilir (Şekil 2.6.). P53, survivinin antiapoptotik aktivitesini antagonize ederek apoptozu başlatabilir. Ancak survivinin, p53 aktivitesini MDM2 (Murine double minute 2) ve proteozom regülasyonunu etkileyerek gerçekleştirdiği

bilinmektedir. Son zamanlarda, bazı kanser hücre dizilerinde p53 gibi transkripsiyonel faktörlerin survivin ekspresyonunun regülasyonundaki etkisi çokça araştırılmaktadır [64].



Şekil 2. 6. p53, survivinin antiapoptotik aktivitesini antagonize ederek apoptozu başlatabilir [64].

Kanserde survivinin aşırı ekspresyonu, mitozla transforme olmuş hücrelerin anormal progresyonunu kolaylaştırmak için hücre siklusu kontrol noktalarını aşabilir. Apoptoz çalışmaları yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Pek çok kanser ilacı apoptozu uyararak tümör hücrelerini öldürmektedir. Ancak bazı kanser türlerinde bu ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. Yapılan birçok araştırmada survivin ekspresyon eden tümörlerin apoptozu uyaran kanser ilaçlarına karşı direnç kazandığı gösterilmiştir.

Survivin insanlarda akciğer, karaciğer, meme, prostat, kolon gibi sık görülen kanserlerde ekspresyon edildiği gösterilmiştir. Survivin tümörlerdeki aşırı ekspresyonu kısa sağkalım, kemoterapiye ve radyoterapiye direnç tümör rekküransları ile ilişkilidir. Survivin, hem mitozdaki hem de apoptozdaki görevi, tümör hücrelerinde ekspresyon edildiğini ve tümör oluşması ve büyümesinde tümör hücrelerine avantaj sağladığını gösterir. Bu bulgular kanser hücrelerinin, hücrenin canlılığını arttırmak ve kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkilerini aşmak için fetal survivin ekspresyon paternine döndüklerini göstermektedir. Survivin artması kanser hastaları için negatif bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir [65].

Klinik çalışmalara göre survivinin kanserde aşırı ekspresyonu tümör hücrelerinin sağ kalımını arttırırken, baskılanması, eksikliği ya da fonksiyonunun bozulması hücre ölümüne neden olur. Büyümede hücre sağ kalımı için gerekli bir

protein olan survivin, erişkin dokularda downregüledir ve kanserlerdeki upregülasyonu sebebiyle spesifik bir hedef olabilir. Antikanser ilaçların çoğu farklı kanserlerde farklı regülatuar yolları düzenlemesine rağmen genellikle survivinin downregülasyonuna yol açarak apoptozis veya mitotik katastrof oluştururlar. Yeni moleküler genetik yaklaşımlar ve kemoterapötik ilaçlar veya radyoterapi ile potansiyel bir hedef olan survivinin inhibisyonu yoluyla mevcut tedavi geliştirilebilir ancak tedavide survivin hedeflenirken hematopoetik hücreler gibi bazı yetişkin hücrelerindeki fonksiyonları da korunabilmelidir. Survivin kanserde ve fizyolojik şartlarda kompleks hücresel dolaşımını anlamak için ileri araştırmalara gerek vardır [66].

2.2.12. Metastatik Meme Kanserinde Tedavi

Metastazın lokalizasyonu ve sayısı uygun terapötik yöntemlerin seçiminde son derece önemlidir. Birçok vakada tedavi lokal terapi ile mikro metastazların yok edilmesinin yanında yenilerinin oluşmasını engellenmeyi amaçlayan sistemik terapinin bir kombinasyonundan oluşur. Başlıca lokal tedaviler cerrahi ve radyocerrahidir. Sistemik tedaviler arasında kemoterapi ve radyasyon terapisi ve bunların yanı sıra biyolojik ve hormon terapisi bulunur. Biyolojik tedavilerde kanser hücrelerini hedefleyen monoklonal antikolar ya da metastazda rol alan anjiogenesis gibi süreçleri bloke eden faktörler kullanılabilir.

Metastatik kanserin tedavisinin seçimi bir çok faktöre bağlıdır. Bunların başında kanserin türü gelmektedir. Kanser türünden sonra metastazların büyüklüğü, sayısı ve lokalizasyonu, hastanın genel durumu yaşı, hastaya önceden uygulanan tedaviler tedavi seçiminde son derece önemlidir. Birçok vakada mevcut tedaviler metastatik kanser için tam bir iyileşme sağlayamamaktadır. Fakat uygulanan tedaviler hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilmekte, tanı sonrasında sağkalımı önemli ölçüde arttırmaktadır. Metastatik kanser için yeni, etkili ve daha iyi tolere edilebilen tedavilerin bulunması, şu andaki kanser araştırmalarının ve klinik denemelerin başlıca hedefidir [67].

2.2.13. Kanser Tedavisinde Kemoterapi

Kemoterapi kavramı tarihte ilk kez Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Bu tedavi yönteminde çok sayıda kemoterapi ilacı kullanılmıştır. I. ve II. Dünya Savaşı'nda İngiltere'nin kullandığı akilleyici ajanlar kemoterapötiklerin ilk sınıfını oluşturmuştur [68].

Kemoterapötik ilaçlar kanser hücresi üzerinde genellikle sitotoksik etki göstermektedir. Kemoterapötik ilaçların bu sitotoksik etkilerinin yanı sıra doza bağımlı olarak anjiogenezin baskılanması ve apoptozisin uyarılması gibi etkileri de vardır. Özellikle düşük dozlarda kullanıldığında bu etkilerin daha belirgin olduğu görülmektedir [69].

Günümüzde bireylerin yaşam kalitesini önemli derecede etkileyen ilaç tedavisi, kanser tedavisinin en az bir döneminde kullanılmaktadır. Bu konuda kanserli hastalara ilk uygulanan ilaçlar sitotoksik ajanlardır, yani kemoterapidir. Kemoterapinin yanında son dönemlerde kullanılmaya başlayan tirozin kinaz

inhibitörleri, antikorlar ve antianjiyogenik ajanlar, bunlardan daha eski olan hormon tedavileri, immunmodülatörler kanser tedavisinde kemoterapi ile birlikte veya ayrı olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi, özellikle hızlı proliferen olan hücrelere karşı seçici etkisi olan doğal veya sentetik kimyasal veya biyolojik ajanlarla yapılan tedavidir. Bu nedenle kullanılan ilaçların toksisite etkileri bilinmeli ve takip edilmelidir. Sitotoksik kemoterapi bazı yayılmış kanserleri iyileştirirken, diğerlerinde tümörleri küçültüp belirtileri azaltır ve hatta bazen yaşam süresini uzatır [70].

Kanserin ilaçla tedavisinde en önemli klinik uygulamalarından biri lokal tedavi sonrası adjuvan kemoterapi verilmesidir. Lokal tedaviden sonra kemoterapi uygulanması mikrometastazların ortadan kaldırılması ve sistemik nüksün azaltılması için önemlidir.

Kemoterapinin oldukça çeşitli toksik etkileri vardır. Bunların arasında en belirgin etkiler kemik iliği, gastrointestinal sistem epitel hücreleri, saç follikülleri ve gonadlar gibi hızlı proliferen olabilen hücreler üzerinde olmaktadır. Kemoterapötik ajanlar hedef tümörü oluşturan hücrelerin hızla çoğalmasını durdurmaktadır. Bunun yanında epitelide etkilediğinden dolayı inflamasyon ve iyileşme yanıtlarında etkilemektedir. Bu durum oral mukoza ve ülserasyon ve mukoziteye neden olabilmektedir [71].

Kemoterapi alan hastalara uygulanan tedavi protokolüne göre çeşitli yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bunların arasında en sık karşılaşılanları hematolojik yan etkiler, cilt, sinir sistemi, karaciğer, kardiyoloji, akciğer, üriner ve gastrointestinal sistemler üzerinde istenmeyen etkiler, toksisite gelmektedir. Bütün bu sorunların arasından bulantı, kusma ve öğürme kanser hastalarında en yaygın ve sıkıntılı olanıdır. Eğer bulantı ve kusma kontrol altına alınmazsa sıvı elektrolit dengesinde bozulmaya, dehidrasyona ve kilo kaybına neden olur. Bu durum hastanın psikolojik olarak etkilenmesine ve tedavi sürecine uyumunu etkilemektedir [72].

2.2.14 Sisplatin

Metaller hücre sel proste neredeyse her yerde bulunurlar ve bazıları hayati öneme sahip bileşiklerdir. Metaller redoks aktivitesi, değişken koordinasyon modelleri ve organik maddelerle reaksiyonu gibi spesifik karakterlere sahipken, hücre içi durumları da sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu sebepten dolayı anormal metal iyonu konsantrasyonu kanser gibi çeşitli patolojik hastalıklar ile ilişkilidir. Buna rağmen metal bileşikleri potansiyel anti-kanser ajan olarak görülmektedir [73].

Sisplatin kanser tedavisinde sıkca kullanılan kemoterapötiklerden bir tanesidir. Bu bileşiğin keşfi platin(II) ve diğer metal içerikli bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımının yolunu açmıştır. Sisplatinin klinik kullanımı farklı tip kanserli birçok hastalarda (baş-boyun, testis, akciğer, yemek borusu, over, meme ve serviks kanseri) başarılı sonuçlar vermiştir. Sisplatin ve türevlerinin klinik başarısı diğer metal tabanlı anti-kanser bileşiklerinin gelişimini sağlamıştır. Ancak normal dokulardaki yan etkilerinden dolayı kullanımları sınırlı kalmıştır [74].

Sisplatinin 1960' lı yıllarda anti-kanser ilaç olarak keşfi kanser tedavisinde yeni bir çağ açmıştır. İlk kez 1844 yılında sentezlenen sisplatinin yapı tayini 1892

yılında Alfred Werner tarafından yapılmıştır. 1960' lı yıllarda Rosenberg ve arkadaşları sisplatin oluşumunda platin elektrodunun elektrolizini keşfetmiştir. Daha sonra rat sarkoma üzerinde çeşitli platin komplekslerinin etkilerini test etmişlerdir.

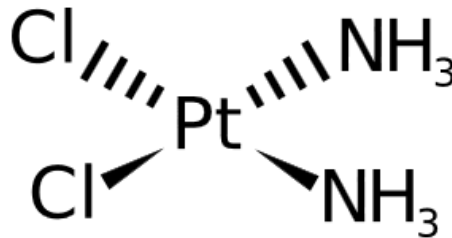
Sisplatin 1971 yılında ilk kez kanserli bir hastaya uygulanmıştır. Önemli antitümör etkisi 1974' de hem testis (3/7) hem de ovaryum kanserinde görülmüştür. 1978' de Platinol (Bristol-Myers Squibb) olarak klinik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Sisplatin yüksek seviyede ve geniş spektrumda anti-tümör etki göstermiştir ve bu yüzden araştırmacılar düşük yan etkiye sahip, üstün anti-tümör etkisi olan platin içermeyen yeni metal türleri bulmaya çalışmıştır. Sisplatinin çeşitli solid tümörler üzerinde klinik faydaları olmuştur. Ancak toksik yan etkileriyle beraber tümör direnci oluşması daha sonrasında sekonder tümörlerin oluşmasına neden olmaktadır [75].

Bu bağlamda araştırmacılar kaspaz direnci olmayan veya gelişmiş farmakolojik karakteristiklere sahip, az toksisitesi olan ve etkili platin kompleksleri üzerine yoğunlanmışlardır. Bunların yanında sisplatin kombine tedavilerde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Oluşturulan kombine tedavilerle ilaçların pozitif yönde sinerjistik veya en azından additif etki oluşturdıkları görülmektedir [74].

Etki Mekanizması ve Klinik Kullanımı;

Sisplatin (cis-dimmedichloroplatinum II) inorganik divalent, suda çözülebilen bir bileşiktir. Platin atomuna bağlı iki amonyum ve iki klor cis- konumda bağlıdır (Şekil 2.7.). Bileşiğin trans izomeride bulunmaktadır. Fakat sadece cis formu sitotoksik özelliğe sahiptir [76].

Sisplatin difüzyon yoluyla hücre içerisine alınır. Klor atomları tiyoller ile reaksiyona girerek yer değiştirebilir. Klorların yer değiştirmesi sonucu oluşan pozitif yüklü molekül DNA çift sarmalına kovalent bağlanarak DNA, RNA ve protein sentezi mekanizmalarını inhibe eder. En fazla aynı DNA zincirindeki komşu guaninler arasında çapraz bağlar yaparlar. DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu inhibe eden bu bağlardır. Bu durum yanlış kopyalamaya veya kopmaya neden olur. Böylece hasarlı DNA' ya sahip hücreler oluşur. Ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Ayrıca sisplatin hücre mitokondrisine zarar verir, ATPaz aktivitesini inhibe eder, hücreyi G2 fazında durdurur ve hücresel transport sistemini inhibe eder [76].



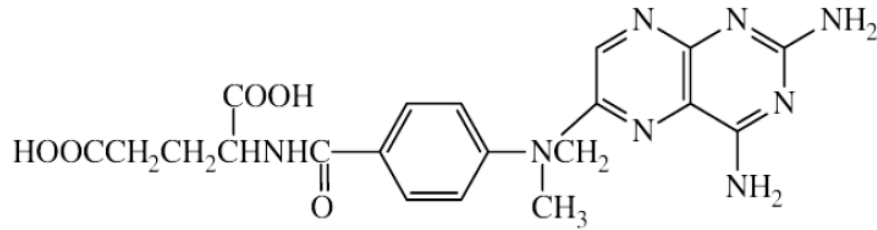
Şekil 2.7. Sisplatinin kimyasal yapısı

Sisplatinin oral formu absorbe olmadığından intravenöz (IV) veya intraperitoneal (IP) yolla uygulanır. Sisplatinin farmakokinetiğinde bireysel faktörler önemlidir. Bu nedenle çok farklı dozlarda uygulaması yapılmaktadır. Standart uygulamasında vücutta çok geniş bir alanda dağılım göstermektedir. Başlangıç yarı ömrü 25-50 dakika iken son yarı ömrü 58-70 saattir. Böbrek, karaciğer, bağırsak ve testis gibi organlara yüksek oranda geçmesine karşın kan-beyin bariyerinden geçişi çok azdır. Sisplatin karaciğerde metabolize edilir. Bir ya da iki aktif olmayan metabolite sahiptir. Bunlar plazma proteinlerine %90 oranında bağlanırlar. Başlıca atılım yolu böbreklerdir. Böbrek fonksiyon bozukluğunda verilmesi uygun değildir. Böbrekte meydana gelecek toksisiteyi azaltmak için bol mayi ile birlikte verilmelidir. Sisplatinin en sık görülen yan etkileri; bulantı, kusma, orta veya ileri periferik nöropati ve renal disfonksiyondur [77].

Sisplatin, 10, 50, 100 mg'lık flakonlar şeklinde bulunur. Kullanım dozu kemoterapi protokolüne göre değişir. İlaç verilmeden önce bol hidrasyon yapılır, %20 mannitol sonrasında ise furosemid ve KCl verilir [78].

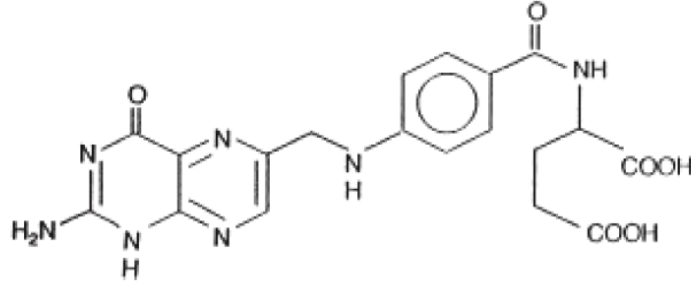
2.2.15. Metotreksat

Metotreksat çok çeşitli neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir antimetabolittir. Kimyasal olarak N-(4(((2,4-diamino-6-pteridinil)metil) metil-amino) benzoil)-L-glutamik asittir (Şekil 2.8.).



Şekil 2. 8. Metotreksatın kimyasal yapısı

Metotreksat folik asit antagonistidir (Şekil 2.9.). Kimyasal olarak folik asidin 4-amino-N10-metil analogudur [79].



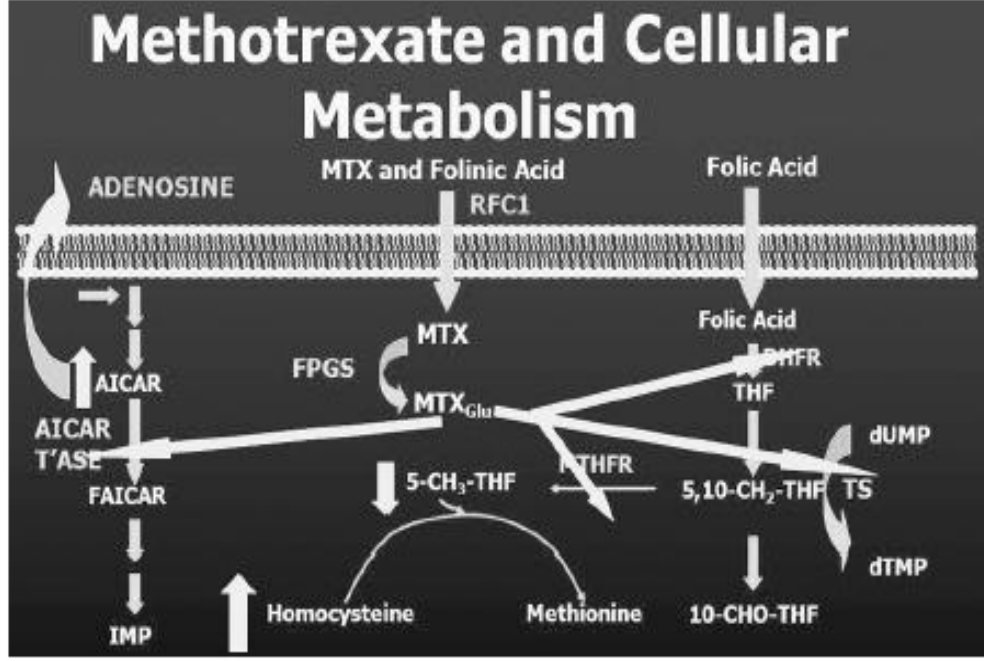
Şekil 2. 9. Folik asit moleküler yapısı

Metotreksat' ın primer hedefi dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimidir. Bu enzim folik asit sentezinde ara basamakta yer alan dihidrofolatı (DHF) tetrahidrofolata (THF) dönüştürmektedir [3]. Tetrahidrofolat, timidilatın üretiminde rol oynamaktadır. Timidilat ise DNA ve RNA sentezinde önemli role sahip pürin ve pirimidin sentezinde rol oynamaktadır. Bu nedenle metotreksat, THF eksikliğine neden olarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik yolu etkilemektedir.

Metotreksatın farmakokinetik özellikleri;

Metotreksat genellikle 7,5 – 25 mg doz aralığında haftalık uygulanır. Oral veya intramuskuler verildiğinde iyi bir şekilde absorbe edilir. İntramuskuler uygulama oral alımlarda daha sık görülen bulantı yan etkisinin azalmasına da yardımcı olmaktadır. Oral metotreksatın biyoyararlanımı bireyler arasında farklılık göstermekle birlikte genellikle %70 civarındadır. Gıdalarla birlikte alınması absorpsiyonu değiştirmemektedir. Oral alınan metotreksatın gastrointestinal sistem tarafından alınımı öncelikle doyurulmuş transport (azaltılmış folat taşıyıcı 1, RFC1) ile düzenlenir. Bu nedenle RFC1 doyurulduğunda biyoyararlanım için yüksek doza gerek duyulmaktadır. Parental uygulama gastrointestinal sisteme uğramadığı için biyoyararlanımı daha iyidir.

Absorpsiyondan sonra metotreksatın %10' u karaciğerde 7-hidroksimetotreksata dönüşür. Hem metotreksat hemde 7-hidroksimetotreksat temel olarak böbreklerden atılır. Metotreksat düşük-orta arası protein bağlayan ve yüksek doku dağılımı olan bir ilaçtır. Ekstravaskular boşluktaki birikimi ve dializ ilaç konsantrasyonunda azalmaya neden olur. Metotreksatın yarı ömrü uygulamadan sonra 6-8 saattir ve 24 saat içinde serumda tespit edilemez. Hücre içine alınan metotreksat ve 7-hidroksimetotreksatın bir kısmı poliglutamata türevlerine metabolize edilirler. Metotreksat poliglutamatlar (MTXGlu) karaciğer ve eritrositler de dahil olmak üzere diğer dokularda da uzun süre saklı tutulurlar. Eritrositlerdeki MTXGlu konsantrasyonu kabaca ilacın terapötik etkisi ile ilişkilidir (Şekil 2.10.) [80].



Şekil 2.10. Metotreksat ve hücrel mekanizma. 5-CH₃-THF, 5-metil-tetrahidrofolat; 5,10-CH₂-THF, 5-10-metilen tetrahidrofolat; 10-CHO-THF, 10-formil-tetrahidrofolat; AICAR, 5-aminoimidazole-4-karboksamid ribotüklotid; DHFR, dihidrofolat reduktaz; dTMP, deoksitimidin monofosfat; dUMP, deoksiutodin monofosfat; FAICAR, formil AICAR; FPGS, folipoliglutamat sentaz; IMP, inozin monofosfat; MTHFR, metilen tetrahidrofolat reduktaz; MTX, metotreksat; MTX_{Glu}, metotreksat poliglutamat; RFC1, azaltılmış folat taşıyıcı 1; T'ASE, transformilaz; THF, tetrahidrofolat; TS, timidilat sentaz [81].

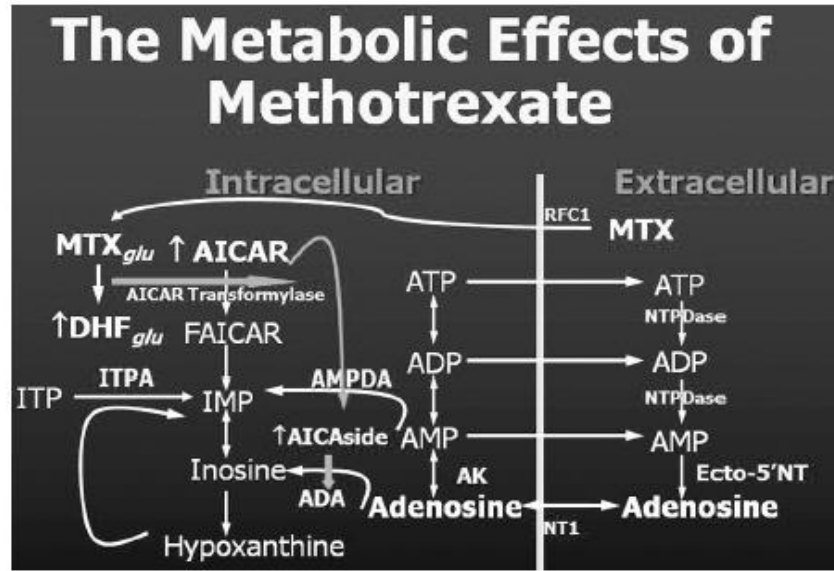
Folik asit antagonisti olan MTX bazı kilit enzimleri inhibe ederek pürinlerin ve piridinlerin sentezini engeller. Dihidrofolat reduktaz enziminin inhibisyonu tetrahidrofolat (THF) seviyesini azaltır. 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit (AICAR) transformilaz de novo purin sentezini engeller. Metotreksatın pürinin ve pirimidinin biyosentezi üzerindeki etkisi kemik iliği baskılanması, karaciğer toksisitesi ve ağız iltihabı gibi birçok toksisitesi ile ilişkilidir. Geçtiğimiz 20 yıl içinde folikasit (1 ila 5 mg/gün) metotreksatın neden olduğu toksisiteyi engellemede etkili olduğu gösterilmiştir. Folik asit veya folinik asit ile birlikte uygulanması metotreksatın terapötik etkisini etkilemediği birçok klinik çalışmada ve meta-analizde gösterilmiştir [82].

Metotreksatın etki mekanizması;

Metotreksat etkisi çeşitli farmakolojik mekanizmalarla, pürin ve pirimidin sentezinin inhibisyonu, poliamin birikimiyle transmetilasyon reaksiyonlarının baskılanması, antijen bağımlı T hücre proliferasyonunun azalması, inflamasyonun adezyon bağımlı süpresyonuyla adenozin salınımının artırılması şeklinde açıklanmıştır. Bu etki mekanizmaların kombinasyonunun metotreksatın antiinflamatuvar etkisini oluşturduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar in vitro, in vivo ve klinik veriler metotreksatın adezyon aracılı antiinflamatuvar etkisini desteklemiştir [81].

2.2.15.1 Metotreksat Ekstraselüler Adenozin Salınımını Arttırır

Metotreksatın ekstraselüler adenozin artışına neden olduğu yolak belirlenmiş ve hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla kanıtlanmıştır. Metotreksat ve metaboliti olan 7-hidroksimetotreksat alındığı hücrede poliglutamasyona uğrar. MTX_{Glu}' ın (metotreksat poliglutamat) folat bağımlı enzimlerin inhibisyonunda metotreksattan daha etkili olduğu gösterilmiştir. MTX_{Glu}' nun AICAR (5-aminoimidazo-4-karboksamid ribonükleotit) transformilaz inhibisyonu AICAR' nin intrasellüler birikimine neden olur. AICAP, AMP deaminazı (AMPDA) inhibe ettiği için artan AICAR seviyesi ekstraselüler boşluğa intrasellüler adenin nükleotidler ve adenozin salınımına neden olur. Ekstraselüler AMP, ADP ve ATP ecto-apyrase (CD39) ve ecto-5'-nükleotidaz (Ecto-5'NT veya CD37) ile adenozine defosforlanabilirler (Şekil 2.11) [81].



Şekil 2. 11. Metotreksat ekstraselüler adenozin konsantrasyonunu arttırır. MTX, metotreksat; MTX_{Glu}, metotreksat poliglutamat; DHF_{Glu}, dihidrofolat poliglutamat; AICAR, 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit; FAICAR, formil AICAR; AMPDA, AMP deminaz; ADA, adenozin deaminaz; AK, adenozin kinaz; RFC1, azaltılmış folat taşıyıcı; NTPDase, nükleozid trifosfat defosforilaz; Ecto-5'NT, ecto-5'- nükleotidaz; NT1, nükleozid taşıyıcı 1 [81].

2.2.16. Vinorelbin

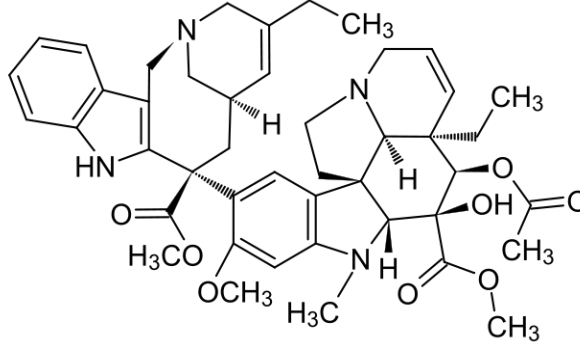
Metastatik meme kanserinde (MMK) optimal kemoterapinin amacı hastanın yaşam süresini ve yaşam kalitesini arttırmaktır [83]. Günümüzde MMK'li hastaların tedavisinde kesin tek bir standart yoktur. Çünkü tedaviler uygulanmadan önce bireysel yaklaşım önemlidir. Bu bireysel yaklaşımlar hastalısız interval, önceki tedaviler dahil olmak üzere tümör biyolojisi, tümör yükü, agrasif viseral metastaz varlığı ya da yokluğu ve hastanın tercihleri gibi durumları içermektedir [84]. Bu

koşullar onkolojistlerin tek ya da kombine ilaç veya ilaç dizisi kullanmalarını belirleyecektir.

Mevcut koşullarda antrasiklin tabanlı tedaviler standarttır. Bu ajanların kümülatif kardiyak toksisitelerinden dolayı antrasiklin içermeyen alternatiflerin geliştirilmesine gerek duyulmuştur. Bu nedenle erken evrelerde taksanların kullanımı daha çok artmıştır. Antrasiklin veya taksan ön tedavisi alan hastalara en sık kullanılan ajanlardan biri vinoralbindir. Vinoralbinin prospektif, randomize faz II denemesi European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) tarafından yapılmıştır [85].

Mikrotübüller, hücre iskeletinin hareketli bir parçasıdır. Hücre iskeletini oluşturmalarının yanında almaçları tutarlar veya serbest bırakırlar. Protein yapısındadırlar ve uzun, içi boş silindir şeklindedirler. Hücre şeklinin korunması, hücre sinyalleşmesi, mitoz gibi birçok hücrel fonksiyonda önemli rol oynarlar. Sinerjistik hücrelerinde ise madde iletiminde iş görürler. Bu nedenle mikrotübüller anti kanser ilaçların hedefi olmuştur [86].

Vinorelbin kantarantin halkası ile modifiye edilmiş üçüncü jenerasyon semisintetik vinka-alkaloiddir (Şekil 2.12). Vinorelbin moleküler seviyede hücrenin mikrotübül aparatında tübülün dinamik dengesini etkiler. Tübülün polimerizasyonunu inhibe eder ve tercihen mitotik mikrotübüllere bağlanırlar. Vinorelbin G2-M fazında mitozu bloklar. Bu durum interfazda hücre ölümüne neden olur [87].



Şekil 2. 12. Vinorelbinin kimyasal yapısı

İn vitro çalışmalarda vinka-alkalooidlerin tübülün ile etkileşimlerinde niteliksel ayrıma varabildikleri gösterilmiştir. Bu nedenle vinorelbin daha çok mitotik mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olur [88]. Klinik olarak aksonal mikrotübül aktivitesi nörotoksikite ile ilişkiliyken, mitotik mikrotübül aktivitesi antitümör aktivitesi ile ilişkilidir. Bu nedenle vinka-alkalooidler içerisinde vinorelbin önem kazanmıştır.

Oral uygulamadan sonra vinorelbin hemen emilir ve T_{max} ' a 1,5 ile 3 saatte ulaşır. Oral vinorelbinin biyo yararlanımı %40 civarındadır. İlacın az bir yiyecek alınması mide bulantısını veya kusmayı azaltacaktır. [89].

Oral vinorelbin miyelo hasassiyetini test etmek için ilk adımda 60 mg/m² uygulanmalıdır. 3. veya 4. derecede toksisite olmaması durumunda doz 80 mg/m²'ye çıkarılmalıdır. Tedavi sırasında 3. veya 4. dereceden nötropeni görülmesi durumunda doz 60 mg/m²'ye düşürülmelidir. Her vinorelbin uygulamasını güvenli ve optimize etmek için her alımdan önce 24 saat içerisinde tam olarak kan sayımı yapılmalıdır.

Vinorelbin diğer vinka alkaloidlere göre daha az nörotoksisiteye sahiptir. İlk dozundan sonra yaklaşık 30 dakika içerisinde tümör bölgesinde akut ağrı sendromu meydana gelebilir [90].

Vinorelbin, düşük toksisitesi ve artan değerlerdeki etkinliğiyle klinikte en çok kabul gören vinka alkaloididir. Bu bileşik, meme kanserini, lösemileri, lenfomaları, akciğer kanserlerini içeren çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca özofajiyal kanser, lenfoma ve prostat kanseri için de ümit vericidir [91].

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Yöntemi

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1. DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X) (Biochrom- F4815)**
- 2. Non-essential amino asid (Biochrom - K 0293)**
- 3. Tyrpsin-EDTA (%0.25) (Sigma-T4049)**
- 4. Gentamisine (Genta)**
- 5. Sodium pirüvat 100 mM (Santa Cruz)**
- 6. 2-Mercaptoethanol 1000X (Merck)**
- 7. Fetal Bovine Serum (Biochrom)**
- 8. Cell Proliferation Reagent (WST-1) (Roche- 11644807001)**
- 9. Methanol (Merck)**
- 10. Vinorelbine 25 mg (LC Laboratories-V8799)**
- 11. Methotreksat (Tocris-1230)**
- 12. Sisplatin (SantaCruz-sc-200896)**

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler

1. Hücre kültür pleyti (Falcon)
2. Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml) (BD)
3. Hücre dondurma tüpleri (TRP)
5. 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (BD)
- 6.6 kuyucuklu hücre kültür pleyti (BD)
- 7.12 kuyucuklu hücre kültür pleyti (BD)
8. Steril serological pipet (BD)
9. Steril mikropipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Gilson)
10. Otomatik mikropipetler
11. Enjektör (1 ml, 5 ml, 10 ml)
12. Thoma lam (Marienfeld- C964730)
13. Eppendorf tüp (LP)

3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar

1. Santrifüj (Eppendorf)
2. Mikro santrifüj (Eppendorf)
3. Class II LaminAir(Esco)
4. Işık mikroskobu (Olympos)
5. CO₂ inkübatörü (%5 CO₂) (Termo)
6. Sıvı azot tankı
7. Buzdolabı (+4) (Beko)
8. Laboratuar tipi derin dondurucu(-86) (Termo)
9. Vortex (Velp)
12. Su banyosu (Memmert)
13. Otoklav (Nüve)
14. Derin dondurucu (-20) (Beko)

3.1.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

- a) DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X) (Biochrom) sıvı besiyeri:** Fenol kırmızısı içerir, Son kullanma tarihine kadar +4 °C'de saklandı.
- b) Fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom):** 500 ml'lik şişelerde ve ısıyla inaktive edilmiş halde temin edildi. 25 ml' lik falkon tüplere bölündü. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklandı. Toplam besiyerinin %5' ini oluşturdu.
- c) Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck):** 1 litrelik şişede temin edildi. Oda sıcaklığında saklandı.
- d) Hücre dondurma solüsyonu:** 4 ml serumsuz medium besiyerine 400 µl DMSO ve 800 µl FBS eklenerek dondurma solüsyonu hazırlandı. Hücreleri sıvı azot tankında dondurmak için kullanıldı.
- e) Sodyum pirüvat çözeltisi:** 220 mg sodyum pirüvat 20 ml steril su içerisinde çözüldükten sonra enjeksiyon filtresinden geçirilerek steril hala getirildi. Medium içerisine %0,5 olacak şekilde eklendi.
- f) Versene çözeltisi:** 1 lt su içerisinde, 130 mg sodyum dihidrojenfosfat monohidrat, 6800 mg sodyum klorür, 400 mg potasyum klorür, 2100 mg sodyumbikarbonat, 200 mg EDTA disodyum tuzu çözüldü ve konsantre HCl kullanılarak pH: 7,8' e ayarlandı. Hazırlanan çözelti steril filtreden geçirilerek kullanıldı.

3.1.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları

4T1, 6-thioquanine dirençli hücre hattıdır. 4T1 hücreleri, BALB/c farelerine enjekte edildiğinde yaygın metastaz oluştururlar. Özellikle akciğer, karaciğer, lenf nodları ve beyin metastazı oluştururlar. BALB/c farelerinde 4T1 hücrelerinin primer tümör ve metastaz oluşturmaları insan meme kanserine oldukça çok benzerlik göstermektedir. Bu tümör modeli, IV. evre insan meme kanseri için iyi bir hayvan modelidir. 4T1 hücrelerinin 6-thioquanine dirençli olmasından dolayı uzak organlarda mikrometastazlar görülebilir [92]. Çalışmada kullanılan diğer hücre hatları 4T1 hücrelerinin metastazlarıdır. 4THM (kardiyak metastaz), 4TLM (karaciğer metastazı), 4TBM (beyin metastazı) [6-7] çalışmada kullanılan diğer hücre hatlarıdır.

3.1.6. Besiyerinin Hazırlanması

Besiyerinin hazırlanması için kullanılan tüm çözeltiler su banyosunda 37 °C'ye getirildi. DMEM-F12 içerisinde %5 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamin, 0,02 mM non-essential aminoasit, 1 mM sodyum pirüvat olacak şekilde besi ortamı hazırlandı. Kullanılmadığı sürece +4°C'de saklandı.

3.1.7. Hücrelerin Çoğaltılması

4T1, 4TBM, 4THM, 4TLM hücreleri 37 °C'de, %5 CO₂ ve nemli hava içeren inkübatörde DMEM-F12 içerisinde %5 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamin, 0,02 mM non-essential aminoasid, 1 mM sodyum pirüvat olacak şekilde, steril besiyeri kullanılarak çoğaltıldı. Hücrelerin pleyteki sayısı çok arttığı zaman, yapışıkları pleyttten kaldırılarak yeni pleytlere pasajlandı. Pasajlama işleminde versene çözeltisi kullanılarak hücreler kaldırıldı.

4T1, 4TBM, 4THM, 4TLM hücrelerinin çoğaltılması işleminde ilk olarak besi ortamı pleytlerden uzaklaştırıldı ve atıldı. Pleytte yapışmış halde bulunan hücrelerin üzerine 2 ml versene çözeltisinden koyuldu. Versene eklenmesinin ardından 5-6 dakika inkübatörde bekletildi ve hücrelerin yapışıkları pleyttten ayrıldıkları gözlenir gözlenmez 5 ml taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı ve hücreler içerisinde taze medyum bulunan pleyte istenilen yoğunlukta olacak şekilde aktarıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe, uygun medyum içinde inkübe edilerek çoğaltıldı.

3.1.8. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı uygun şekilde donduruldu. Hücreler pleyttten uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek 4 dk 4000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pelletin üzerine yoğunluğuna göre 1-3 ml dondurma solüsyonu eklendi ve tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonları cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 24 saat -80°C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen (-196 °C) tankına transfer edildi.

3.1.9. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirildi: Hücreleri içeren cryo tüp 37 °C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü, kontaminasyon olasılığını azaltmak için cryo tüpler suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde (yaklaşık 2 dakika) yapıldı. Cryo tüplerin içeriği çözülür çözülmez su banyosundan uzaklaştırıldı ve dış yüzeyi alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Pleyte aktarılan taze medyum üzerine hızlı bir şekilde cryo tüpteki hücre süspansiyonu eklendi ve hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe üretildi.

3.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü deneylerinde laboratuvarımızda bulunan parental 4T1 hücreleri ve 4T1 hücrelerinin kardiyak metastazından elde edilmiş 4THM (4T Heart Metastasis) ve karaciğer metastazından elde edilmiş 4TLM (4T Liver Metastasis) hücreleri kullanılmıştır

Hücreler besi ortamında (DMEM-F12 içerisinde %5 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamin, 0,02 mM non-essential aminoasid, 1 mM sodyum pirüvat) 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi ve hücre çoğalması gözlemlendi. .

Yeterli miktarda hücre elde edildikten sonra, hücreler çalışmada kullanılana kadar hücre dondurma solüsyonu içerisinde cryo tüplerde sıvı azotta donduruldu.

3.2.1. Hücre Kültürü İçin Hücre Standartlarının Hazırlanması

Hücre kültürü pleytinde bulunan süpernatantlar uzaklaştırıldı. Üzerine 2 ml Versene çözeltisinden eklendi ve hücrelerin pleyt yüzeyinden ayrılmaları için 5-10 dakika inkübe edildi.

Ayrılan hücrelerde Versene etkisini ortadan kaldırmak için 4 ml medyum eklendi. Thoma lamında sayıldı. 120 binden yarı yarıya olacak şekilde dilue edildi ve 96 kuyucuklu pleyte sırayla ekildi. Her bir hücre hattı için bu işlemler gerçekleştirildi. 24 saat inkübasyona bırakıldı.

24 saatin sonunda her bir kuyucuğa besiyeri ile hazırlanan %10' luk Cell Proliferation Reagent (WST-1) (ROCHE) 100 µl verildi. 3 saat inkübasyona bırakıldı.

3 saat sonra spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen değerler KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.2 Doz Belirleme Deneyi

Hücreleri toplama aşamasında petrideki süpernatantlar uzaklaştırıldı ve üzerine 2 ml Versene çözeltisi eklendi. İnkübatörde 5 dakika bekletilerek hücrelerin petri yüzeyinden ayrılması sağlandı.

Versene etkisini ortadan kaldırmak için 4 ml medyum eklendi ve hücreler kaldırılarak 15 ml' lik falkonlara alındı. Thoma lamı kullanılarak hücreler sayıldı.

Deneyde 96 kuyucuklu kültür pleytleri (96-well plate) kullanıldı. Pleytlerin her kuyucuğuna 750 hücre (kullanılan hücre hatlarından) 200 µl besi ortamı içerisinde ekildi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.

48 saat sonunda süpernatantlar uzaklaştırıldı. Çeşitli konsantrasyonlarda, besi ortamında hazırlanan Metotreksat, Vinorelbin ve Sisplatin çözümlerinden her bir kuyucuğa 120 µl eklendi. 72 saat boyunca 37 °C' de %5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi.

Kemoterapötik ajanlar uygulanmadan önce başlangıç anındaki hücre sayısını belirlemek için besi ortamında hazırlanan %10' luk Cell Proliferation Reagent (WST-1) (ROCHE) 100 µl eklendi. 3 saat inkübasyona bırakıldı.

3 saatin sonunda spektrofotometre kullanılarak 420 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

Elde edilen değerler KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı.

72 saat sonunda süpernatantlar uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa besi ortamında hazırlanan %10' luk Cell Proliferation Reagent (WST-1) (ROCHE) 100 µl verildi. 3 saat inkübasyona bırakıldı.

3 saatin sonunda spektrofotometre kullanılarak 420 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

Elde edilen değerler KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.3. Hücre Kültüründe Canlılık Testi

96 kuyucuklu hücre kültürü pleytine her bir kuyucukta 750 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonra tedaviye başlangıç anındaki hücre sayısını belirleyebilmek için 96 kuyucuklu pleytin bir sırasındaki kuyucuklara 100 µl WST-1 koyuldu. 3 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Her bir hücre dizisi çalışmadan kullanılan kemoterapötiklerle farklı konsantrasyonlarda muamele edildi. Bu işlemden sonra hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra deney sonundaki hücre sayılarını belirlemek için tekrar WST-1 kullanıldı. 3 saat inkübasyona bırakıldı ve spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Değerler KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı. Hücre sayılarındaki doza bağlı inhibisyonun kontrole göre yüzdeleri hesaplandı. Daha sonra her bir hücre hattı ve kullanılan kemoterapötik ajana göre "pD₂" değerleri hesaplandı. Bir ilacın maksimum etkisinin %50' sini oluşturan ilaç konsantrasyon EC₅₀ olarak belirtilir. EC₅₀ değerini -logaritması pD₂ değerini vermektedir (pD₂= -log EC₅₀). pD₂ değerlerinin hesaplanması için GraphPad Prism 5 programı kullanıldı.

3.2.4. Survivin Tayini İçin Hücre Kültürü

6 kuyucuklu hücre kültürü pleytine kuyucukta 1 milyon hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimden sonra hücreler 48 saat inkübe edildiler. 48 saat sonunda farklı dozlarda kemoterapötikler uygulandı. Tekrar 48 saat inkübe edildiler. 48 saatten sonra süpernatantlar uzaklaştırıldı. 6X SDS 1X olacak şekilde lizis buffer ile dilue edildi ve her bir kuyucuğa 500 µl koyuldu. Hüceler parçalandıktan sonra eppendorflara alınarak -80 °C' saklandı. Kaldırılan örnekler, western blot yöntemi ile survivin tayininde kullanıldı.

3.3. Western Blot Yöntemi

3.3.1. Western Blot Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

- Tris Base : Applichem Cat No: 77-86-1
- Glisin : Sigma Cat No: 85H07821
- Metanol : Merck: 106007
- Tween20 : Cayman Cat No : 400035
- Temed : Applichem Cat No : 110-18-9
- Akrilamid : Biorad Cat No : 161-0156
- Amonyum Persülfat: Applichem Cat No : 7727-54-0
- Sodyum Dodesilsülfat : Sigma Cat No : 114H0311
- Merkaptotanol (%98, 100 ml): Sigma Cat No: M3148
- Bromofenol Mavisi (25 gr): Sigma Cat No: B0126
- Bonvine Serum Albumin (100 gr): Sigma Cat No: A7906
- PVDF-Plus, Transfer Membranı, (0.45 µM, 30cmx3m): Cat No: PV4HY000GL
- ECL Pierce Western Blotting Substrate: Thermo Scientific Kit (250 ml) Lot: KFI33910
- Marker (Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder (2X250 µl): Fermenta Lot: 00037359
- Primer Antikor Rabbit Anti-Survivin : Bioss bs-0615R
- Sekonder Antikor Anti-Rabbit: Santacruz sc-2004
- Primer Antikor GAPDH: Santacruz sc-166574
- Sekonder Antikor Anti-Mouse: Santacruz sc-2031
- Marker: Fermantas sm1811

3.3.2. Stok Çözeltiler

	<u>100 ml için</u>	<u>250 ml için</u>
100 ml 4X lower buffer : TRİS BASE	18,7 gr	46.75gr
ddH ₂ O	80 ml	200 ml
%20 Sodiumdodecylsulfate (SDS)	2 ml	5 ml

Ph=8,8 e HCl ile ayarlandıktan sonra 100 ml ye kadar ddH₂O koyulur.manyetik karıştırıcıda iyice çözülür.

(önce tris base tartılır sonra ddH₂O, en son SDS eklenir.)

% 10 APS (Amonyum Persülfat): Taze hazırlanmalıdır ve +4 °C' de saklanmalıdır. 0,1 gr APS 1 ml dH₂O' da çözülür.

Satüre Bütanol Hazırlanması : 25 ml %99 luk bütanol falkona alınır üzerine 50 ml'ye dek dH₂O eklenir, çalkalanır. Üst faz kullanılır.

3.3.3. Lizis Buffer Hazırlanması

TRİS HCl pH 7,4 : 1 ml (1 M stok), final konsantrasyon: 50 mM

HCl : 600 µl (5 M stok); 0.15 M

Triton-X 100 : 200 µl ; % 1

Sodium deoxycholic asit : 0.02 gr ; %0.25

ddH₂O ile 20 ml'ye tamamlanır.

Hazırlanan solüsyondan 7ml alınır + 1 tablet protease inhibitör (PI) konulur. -80 °C' de saklanmalı.

3.3.4. Stripping Solüsyonu (Strip-Off solüsyonu)

20 ml % 10 SDS

12.5 ml stacking buffer

67,5 ml dH₂O

Manyetik karıştırıcıda 55 °C' ye ısıtıldı. Sonra 704 µl β-merkaptotanol eklendi.

1. Membran 60 °C' de 30 dk shakerda strip-off solüsyonu ile muamele edilir. (β-merkaptotanol olduğu için kapaklı bir kaptayılmalı)

2. 45 dk PBS-T ile shakerda yıkanır. (β-merkaptotanol uzaklaştırılmalı, 10 dk da bir PBS-T yi değiştirilmeli.)

3. % 5'lik süt tozu ile 1 saat blotlanır.

** Blotlanmış-işaretlenmiş membranı farklı bir antikorla işaretlemeden önce temizlemek için yapılır.

3.3.5. Commasive Mavi İle Membranın Boyanması

Jel running buffer'dan alındıktan sonra bir kaba konur üzerine örtecek kadar commasive-blue koyulur. 30 dk beklenir. Sonra boya tekrar kullanılmak üzere falkona alınır. Jel üzerine destain çözeltisi (Metanol 75 ml + Asetik asit 25 ml + ddH₂O 150 ml karışımından oluşur). eklenir. 10 dk' da bir destain yenilenir (2-3 kez). Sabaha kadar destainde bırakılır. Ertesi gün bantlara bakılır. Jelden proteinlerin düzgün yürüyüp yürmediğine ve PVDF membrana transfer olup olmadıklarına bakılır.

3.3.6. Protein Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması

BSA Protein Assay Bio-Rad Protein assay Dye Reagent Contrate

Cat.No.500-0006

1-) 1ml 5X DYE + 4ml ddH₂O (ile Stok DYE 1X e dilue edilir.)

2-) Stok Standart 2,66mg/ml

ST1- 50 µl + 50 µl ddH₂O 1,33 mg/ml

ST2- ST1 den 50 µl + 50 µl ddH₂O 0,66mg/ml

ST3- ST2 den 50 µl + 50 µl ddH₂O 0,33mg/ml

ST4- ST3 den 50 µl + 50 µl ddH₂O 0,166mg/ml

ST5- ST4 den 50 µl + 50 µl ddH₂O 0,083mg/ml

ST6- ST5 den 50 µl + 50 µl ddH₂O 0,041mg/ml

ST7- ST6 den 50 µl + 50 µl ddH₂O 0,020mg/ml

3-) 5µl örnek, 95µl ddH₂O ile dilue edilerek ependorf tüplere alınır. Hazırlanan örneklerden 10 µl ve 5µl alınarak 96 kuyucuklu pleyte konur ve 1X Dye ile 170 µl' ye tamamlanır.

4-) 96 kuyucuklu pleytin bir sırasına da 40 µl ST konur ve 170 µl' ye 1X Dye ile tamamlanır.

5-) Yarım saat karanlıkta oda ısısında bekletilir.

6-) Spektrofotometri cihazında 595 nm de okunur.

Örneklerdeki protein miktarları KCjunior (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) programı kullanılarak hesaplandı. Çıkan total protein sonuçlarına göre örneklerden kullanım miktarları hesaplandı.

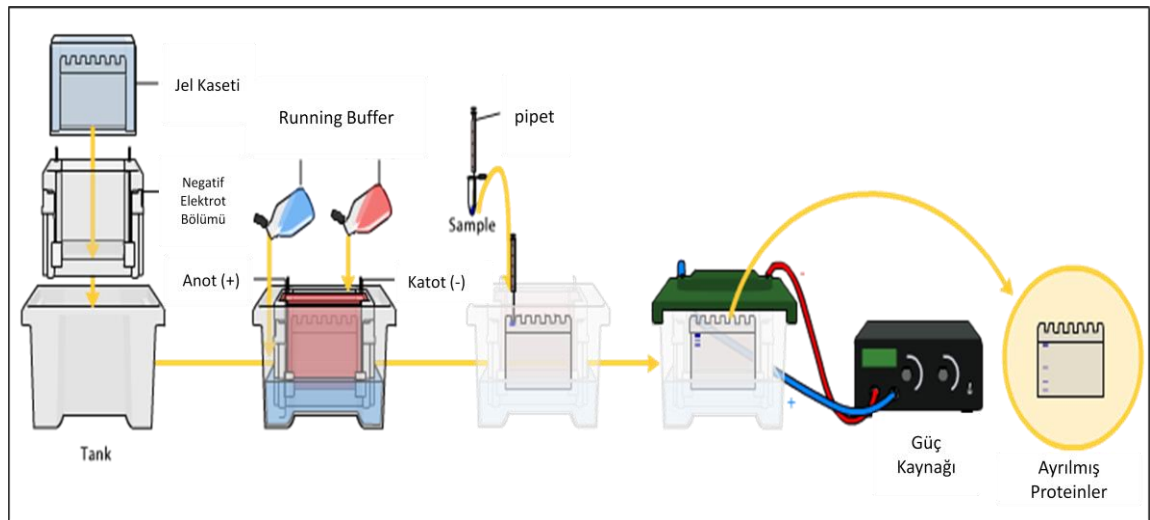
Hücre kültüründen elde edilen örnekler sonike edildi. Sonikasyon işlemi sırasında örnekler buz içerisinde bekletildi ve 10 dk aralarla 1 saat sonike edildi. Örnekler 95°C 5dk. ısıtıldı. 9000 rpm 4 dk. santrifüj edildi. Süpernatantlarda bulunan proteinler jele yüklendi.

3.3.7. Jelin Hazırlanması

Tablo 3. 1. Büyük jelin hazırlanması

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stracking	10 ml' lik
ddH ₂ O	15 ml	11,55 ml	10,5 ml	7,05 ml	ddH ₂ O	6 ml
Resolving Buffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	Stracking Buffer	2,5 ml
Acr (29:08)	7,05 ml	10,5 ml	12 ml	15 ml	Acr (29:08)	1,25 ml
%10 SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	%10 SDS	100 µl
%10 APS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	%10 APS	100 µl
Temed	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	Temed	10 µl

- 15 ml' lik falkon tüpte hazırlanan %12'lik resolving (alt jel) iki cam arasında western setinde belirtilen seviyeye kadar yüklendi. Kabarcık kalmaması için kalan bölüm satüre bütanol ile dolduruldu.
- Falkon tüpte kalan jel kapağı açık bir şekilde oda sıcaklığında donması beklendi.
- Donduktan sonra satüre bütanol uzaklaştırılır, Stracking (üst jel) eklendi ve tarak koyuldu. Jelin donması beklendi.
- Üst jel de donduktan sonra taraklar çıkarıldı ve camlar western tankı içerisine yerleştirildi ve belirtilen seviyelere kadar running buffer ile dolduruldu.
- Survivin tayini için hazırlanan örnekler ve belirteç (marker) jele yüklendi.
- Western tankı güç kaynağına bağlandı ve 120 V'da proteinler aynı hizaya gelip alt jele geçene kadar yürütüldü. Bütün örnekler alt jele geçtiğinde 150 V'da artırıldı ve proteinler jelin sonuna kadar yürütüldü.



Şekil 3. 1 Western blot seti

3.3.8. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

- Jeldeki yürüme tamamlandıktan sonra transfere geçildi. PVDF membranlar metanolde 30 sn kadar ıslatıldı.
- Süngerler, watman kağıtları transfer buffer ile ıslatıldı.
- Transfer kasetleriyle sandviç hazırlandı ; siyah üzerine sünger + watman kağıdı + jel + pvdf membran + watman kağıdı + sünger
- Sandviçler transfer tankına yerleştirildi ve tranfer buffer ile tank dolduruldu. Gece boyu buz içerisinde 40 V' da transfere bırakıldı.
- Transfer gerçekleştikten sonra membranlar kurutuldu ve metanolden geçirildi. Membran işaretlendi ve deney numarası yazıldı.

Membranlar %5' lik süt tozunda (100 ml 1X TBS-Tween'e - 5 gr süt tozu) poşetlenerek 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak blotlandı. Daha sonra membran % 5 lik süt tozu ile 1:300 konsantrasyonda hazırlanan primer anti-survivin antikorla 2 saat oda sıcaklığında çalkalanarak işaretleme yapıldı. Daha sonra 10 dk arayla 3 defa 1X TBS-T ile yıkandı. Membran anti-rabbit seconder antikorla 2 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Daha sonra 10 dk arayla 3 defa yıkandı. Görüntüleme aşamasına geçildi.

3.3.9. Görüntüleme

Son yıkama işleminden sonra membranlar eski bir film üzerine yerleştirildi. Üzerine 500 µl ECL (Electrochemiluminescence) damlatıldı. Membran film kasetine yerleştirildi. Karanlık odada ışık kontaminasyonundan kaçınarak membran üzerine yeni film yerleştirildi. 1 dk sonra film makineye koyuldu ve bantlar gözlendi. Duruma göre 10 ve 30. dk' larda da aynı işlem uygulandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Tüm değerler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. EC_{50} değerleri lineer regresyon analizi ile maksimum yanıtın (E_{max}) %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu olarak hesaplandı. Duyarlılık pD_2 (-Log EC_{50}) olarak verildi. Sonuçların istatistiksel analizi Tukey testi, tekrarlayan ölçümler için ANOVA testi kullanılarak yapıldı. p değerleri 0,05'in altında bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

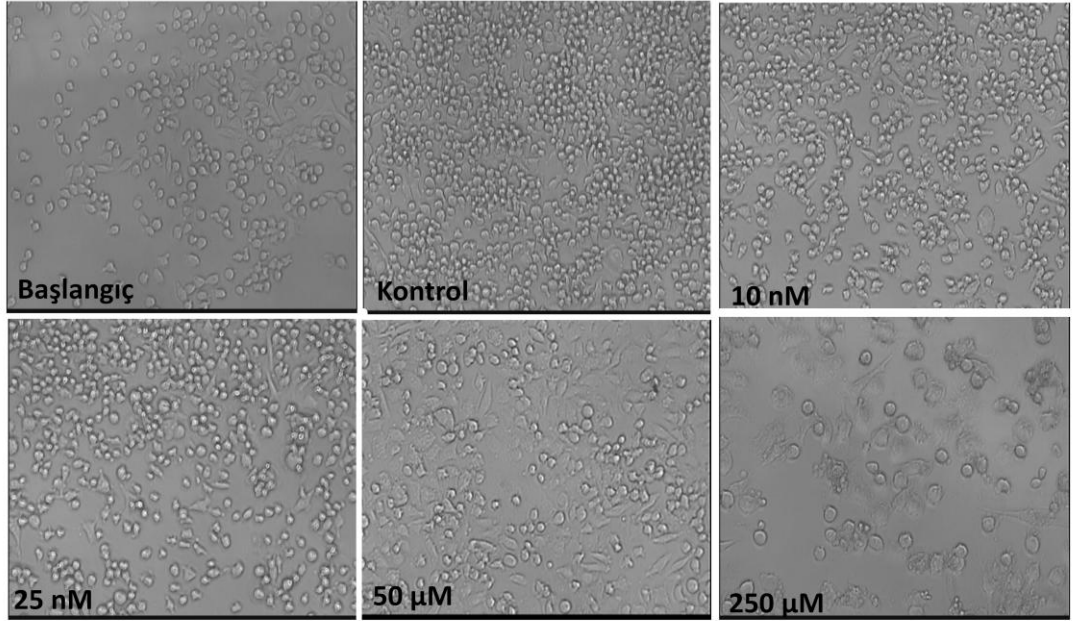
BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Sonuçları

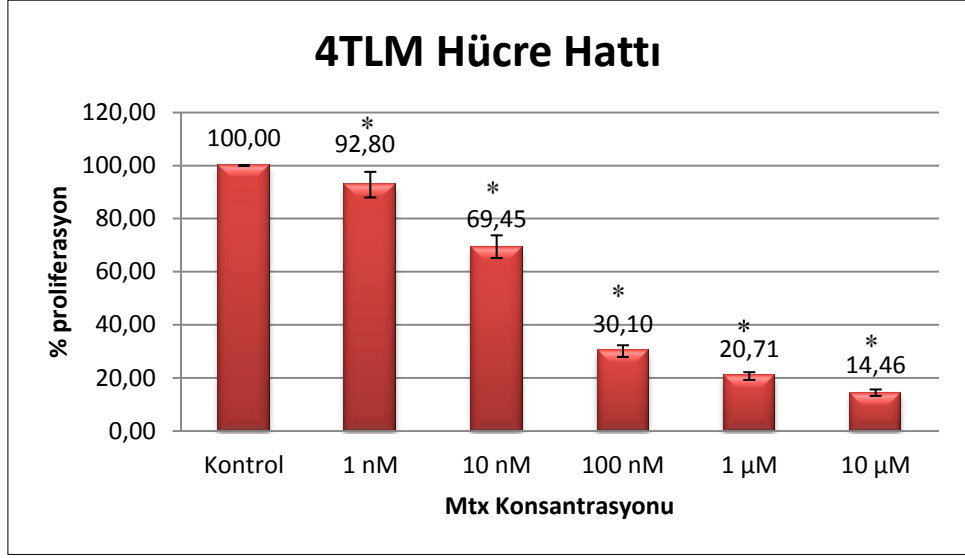
4.1.1. Metotreksatın Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

4.1.1.1. 4TLM Hücre Hattı

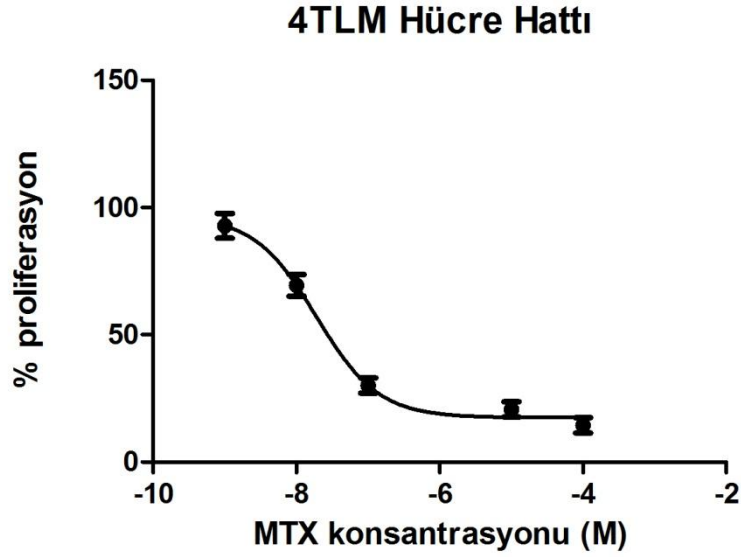
Metatreksatın hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM ve 250 nM konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4TLM hücrelerinin proliferasyonları metotreksatla tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3 de görüldüğü gibi Metatreksat doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. Hücre çoğalmasını baskılamasına rağmen metatreksat kullanılan en yüksek dozda bile 4TLM hücrelerinin ölümüne neden olmadı (hücre sayısı başlangıç hücre sayısından yüksekti).



Şekil 4. 1. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4TLM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



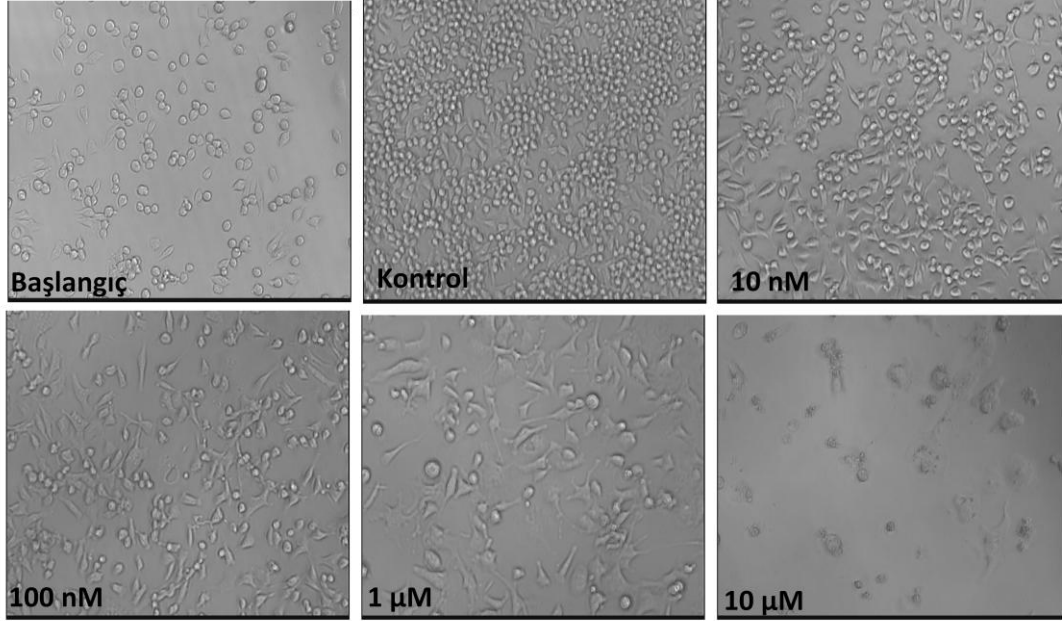
Şekil 4. 2. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM MTX, 10 nM MTX, 100 nM MTX, 1µM MTX ve 10 µM MTX gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM ve 250 nM metotreksat uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 5 kere tekrarlanmıştır).



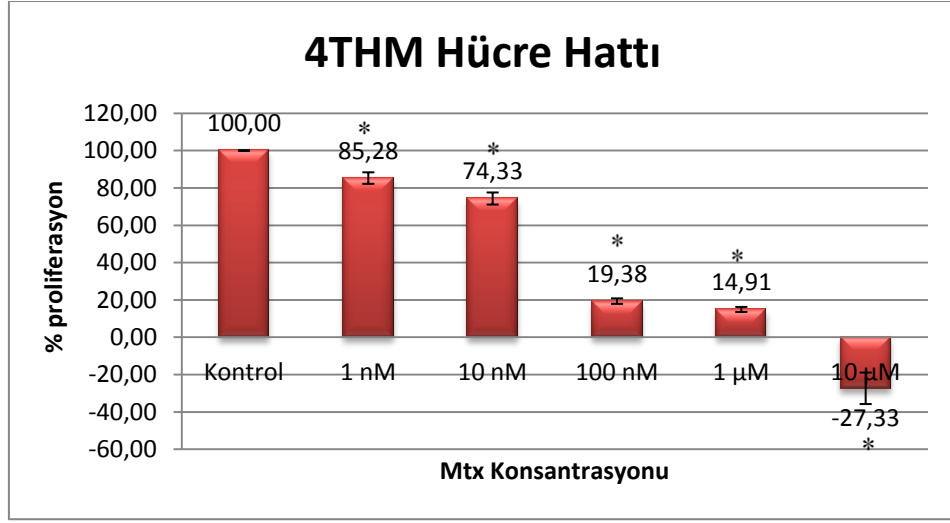
Şekil 4. 3. MTX uygulanan 4TLM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,7 \pm 0,09$ olarak hesaplandı.

4.1.1.2. 4THM Hücre Hattı

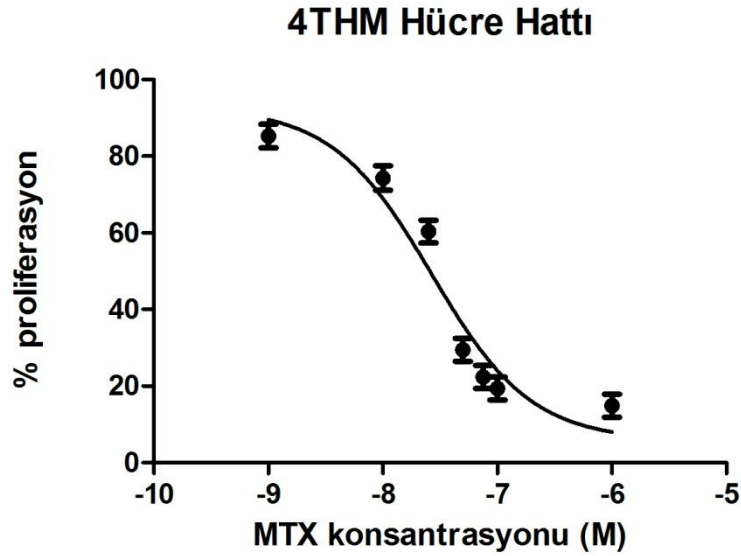
Metatroksatın hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM , 25 nM, 50 nM, 75 nM, 0,1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4THM hücrelerinin proliferasyonları metotreksatla tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6 da görüldüğü gibi Metatroksat doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 10 μ M konsantrasyonda hücrelerin ölmesine neden oldu.



Şekil 4. 4. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4THM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



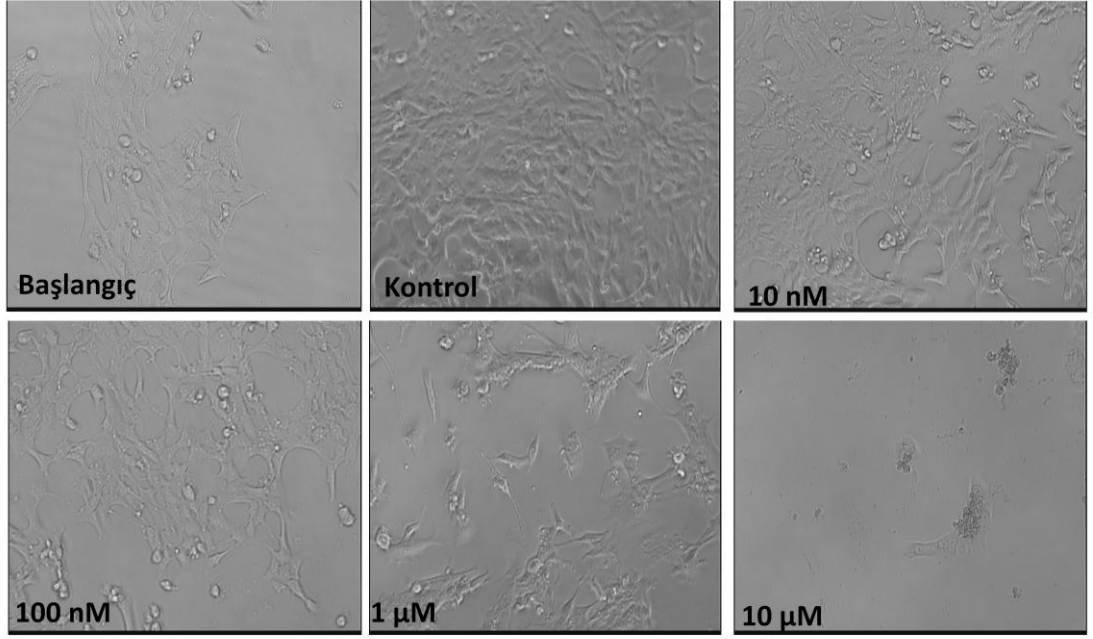
Şekil 4.5. 4THM hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM MTX, 10 nM MTX, 0,1 µM MTX, 1 µM MTX ve 10 µM MTX gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 1 nM, 10 nM, 0,1 µM, 1 µM ve 10 µM metotreksat uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 4 kere tekrarlanmıştır).



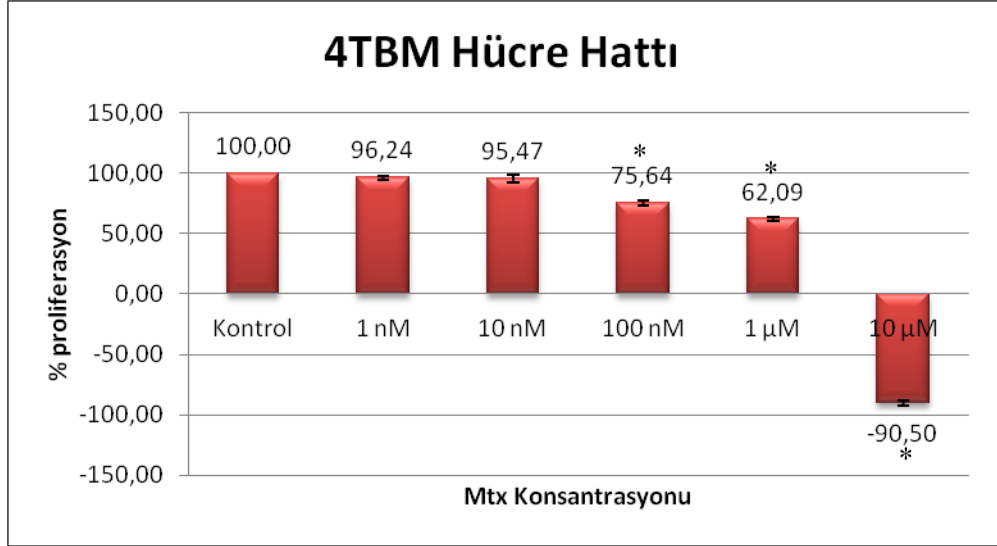
Şekil 4. 6. MTX uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,6 \pm 0,19$ olarak hesaplandı.

4.1.1.3. 4TBM Hücre Hattı

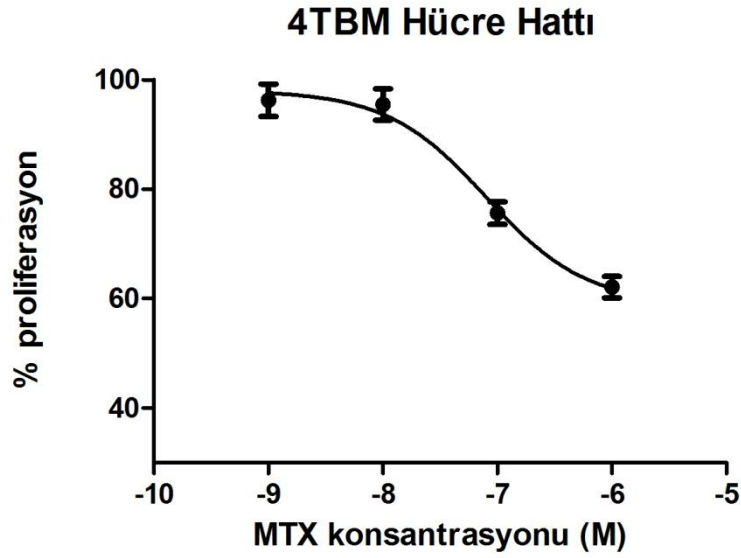
Metatroksatın hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4TBM hücrelerinin proliferasyonları metotreksatla tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9 da görüldüğü gibi Metatroksat doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 10 μ M konsantrasyonda hücrelerin ölmesine neden oldu.



Şekil 4. 7. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4TBM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



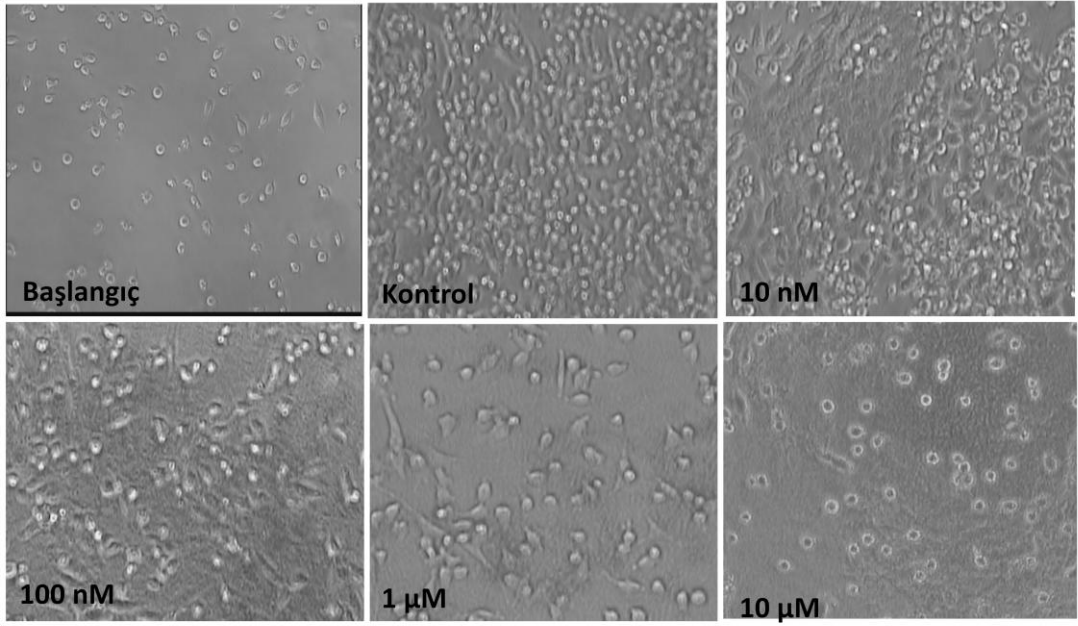
Şekil 4.8. 4TBM hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM MTX, 10 nM MTX, 100 nM MTX, 1 µM MTX ve 10 µM MTX gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM metotreksat uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 5 kere tekrarlanmıştır).



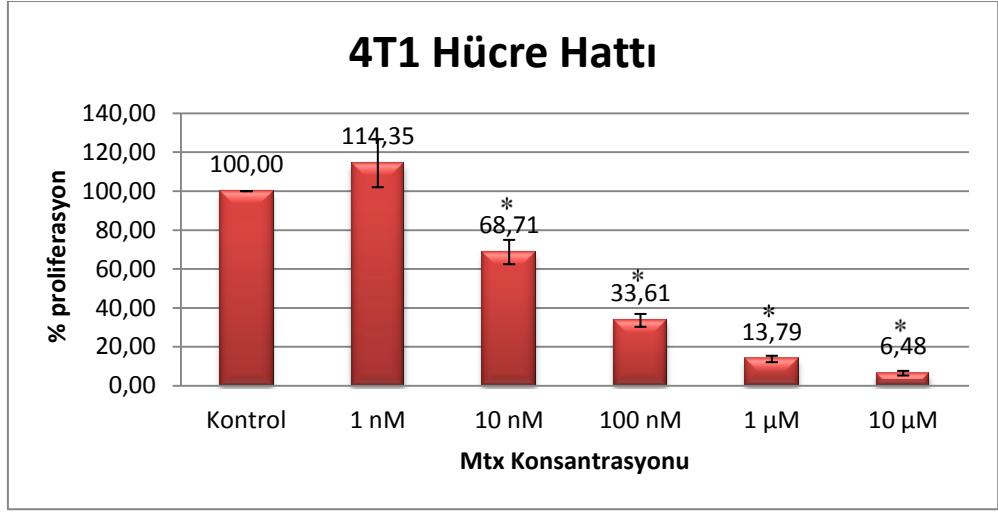
Şekil 4.9. MTX uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,1 \pm 0,16$ olarak hesaplandı.

4.1.1.4. 4T1 Hücre Hattı

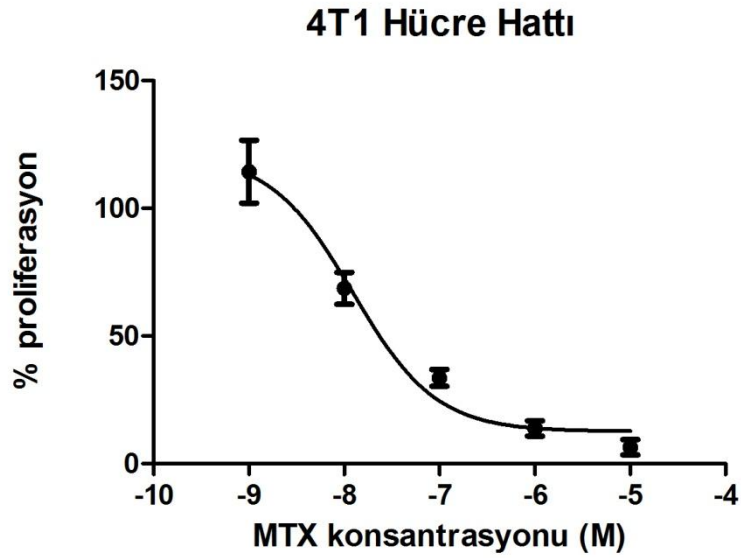
Metatroksatın hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, ve 10 µM, konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4T1 hücrelerinin proliferasyonları metotreksatla tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.10, 4.12 ve 4.13 de görüldüğü gibi Metatroksat doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. Hücre çoğalmasını baskılamasına rağmen metatreksat kullanılan en yüksek dozda bile 4T1 hücrelerinin ölümüne neden olmadı (hücre sayısı başlangıç hücre sayısından yüksekti).



Şekil 4. 10. Farklı dozlarda MTX ile muamele edilen 4T1 hücrelerine ait fotografik görüntüler.



Şekil 4.11. 4T1 hücrelerinde farklı dozlardaki metotreksatın (MTX) hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM MTX, 10 nM MTX, 100 nM MTX, 1 µM MTX ve 10 µM MTX gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, ve 10 µM, metotreksat uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 4 kere tekrarlanmıştır).

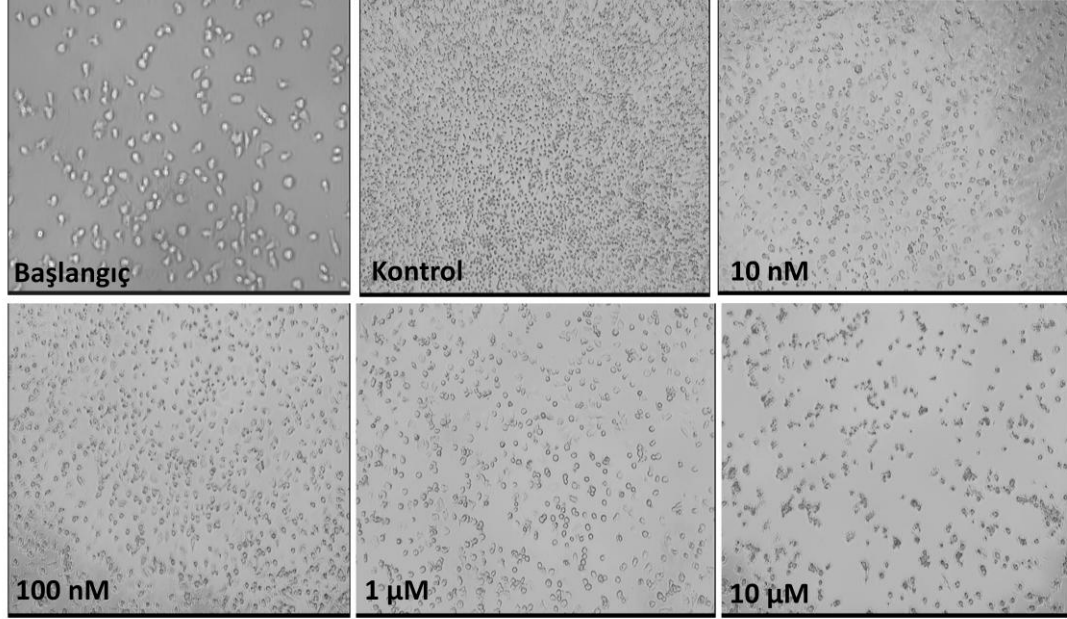


Şekil 4.12. MTX uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,91 \pm 0,19$ olarak hesaplandı.

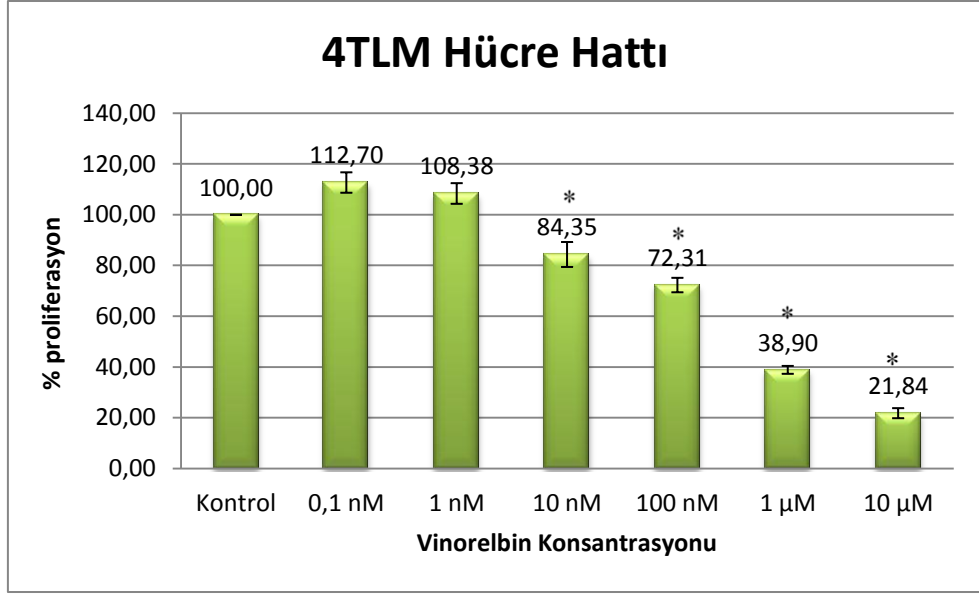
4.1.2. Vinorelbinin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

4.1.2.1. 4TLM Hücre Hattı

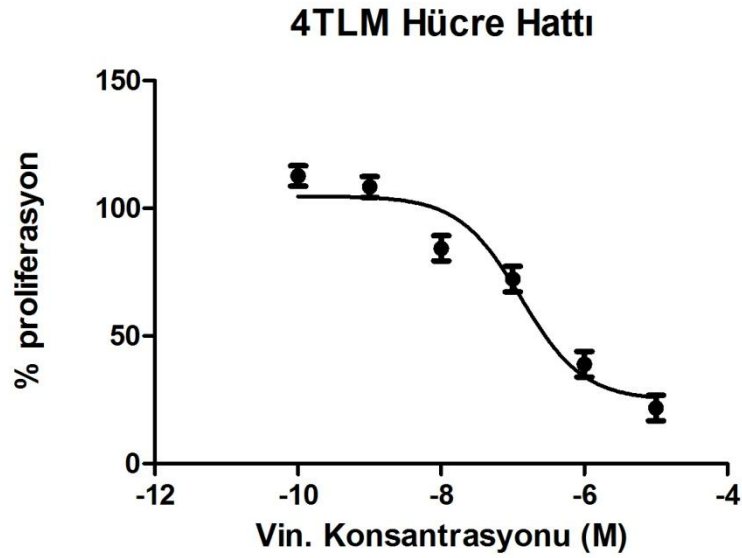
Vinorelbinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM., 10 nM, 100 nM, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4TLM hücrelerinin proliferasyonları vinorelbinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15 de görüldüğü gibi Vinorelbin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı.



Şekil 4.13. Farklı dozlarda Vinorelbin ile muamele edilen 4TLM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



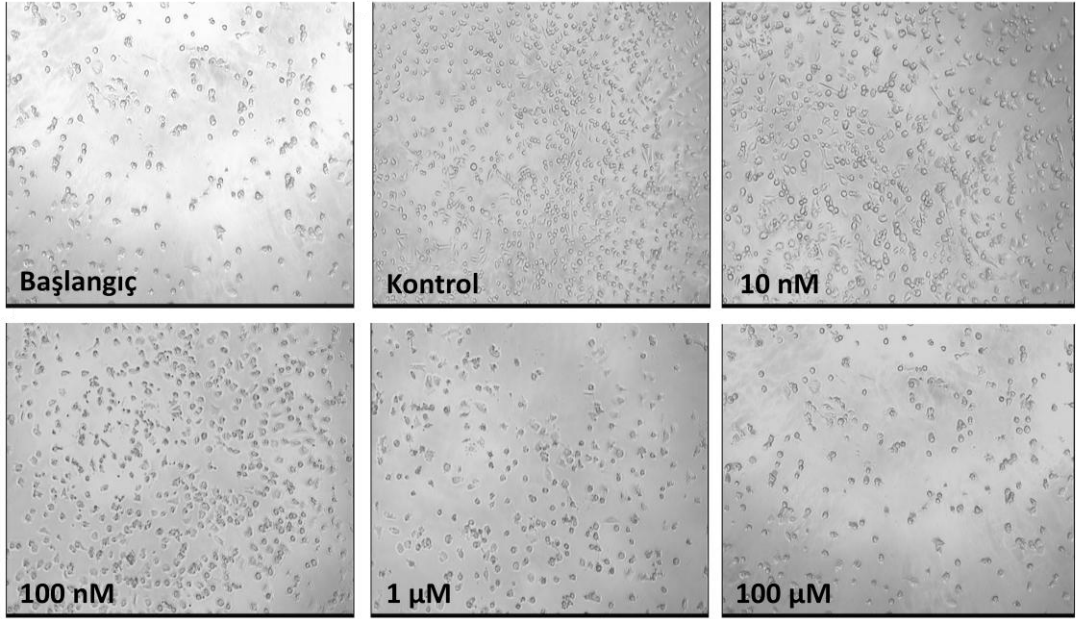
Şekil 4. 14. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM Vin., 10 nM Vin., 100 nM Vin., 1 µM Vin. ve 10 µM Vin. gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 1 nM., 10 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM vinorelbin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).



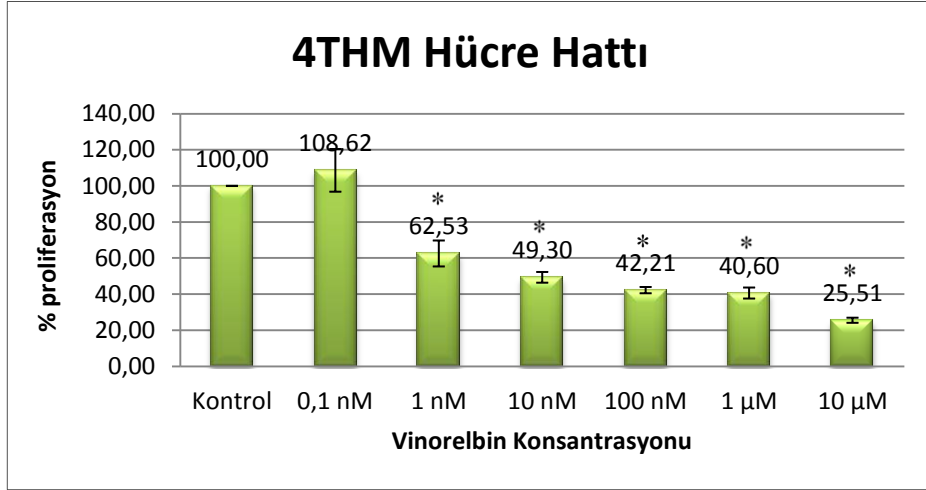
Şekil 4. 15. Vinorelbin uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $6,9 \pm 0,30$ olarak hesaplandı.

4.1.2.2. 4THM Hücre Hattı

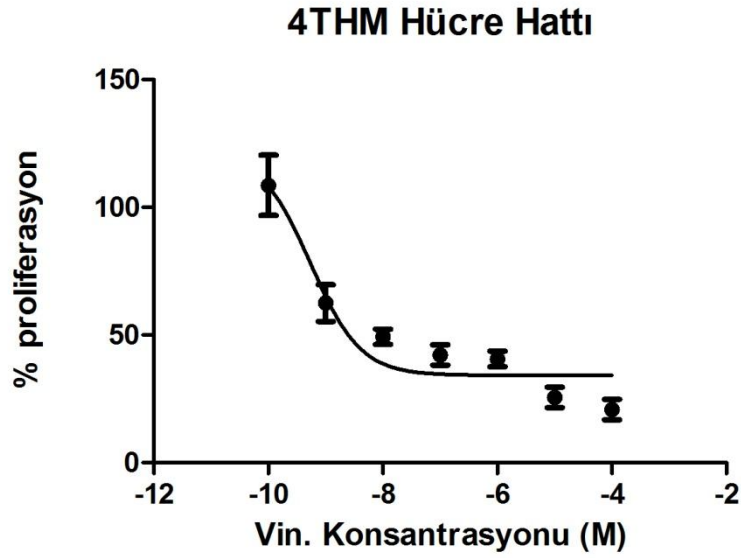
Vinorelbinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 0,1 nM, 1 nM., 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4THM hücrelerinin proliferasyonları vinorelbinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18 de görüldüğü gibi Vinorelbin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 4THM hücreleri 0,1 nM vinorelbine karşı direnç göstermişlerdir.



Şekil 4.16. Farklı dozlarda vinorelbin ile muamele edilen 4THM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



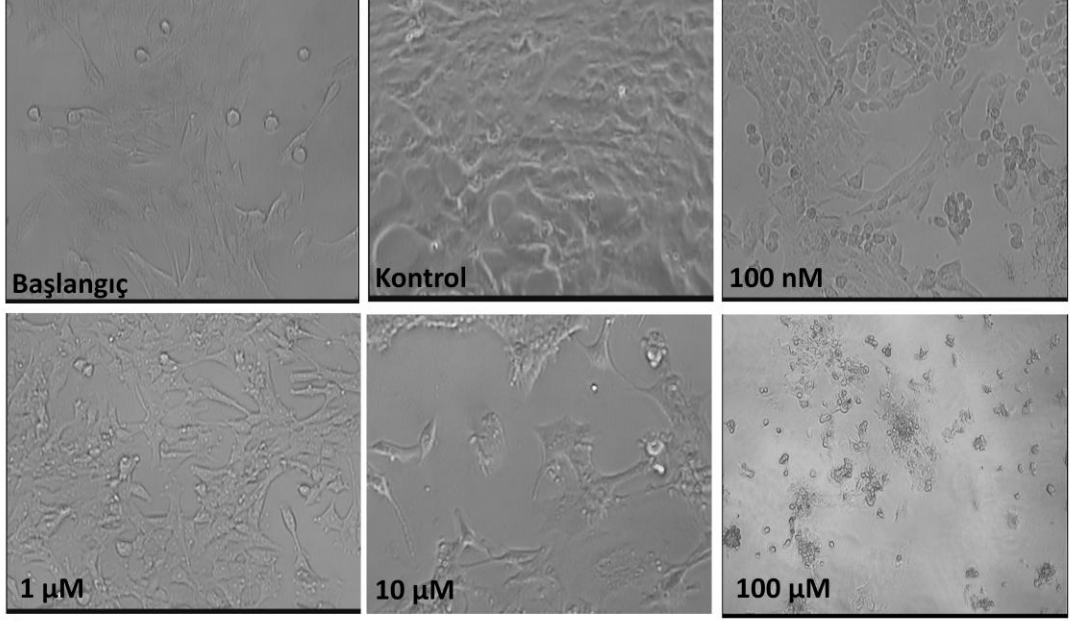
Şekil 4. 17. 4THM hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbine hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM Vin., 10 nM Vin., 100 nM Vin., 1 µM Vin. Ve 10 µM Vin gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 1 nM., 10 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM vinorelbine uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).



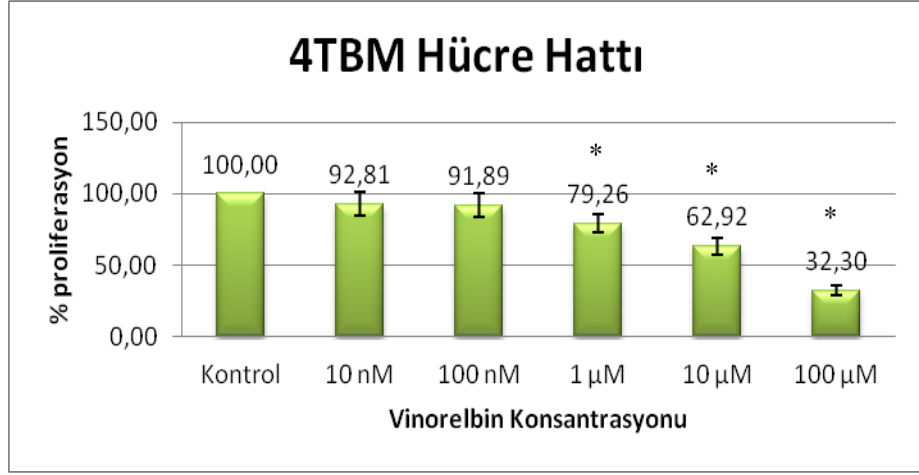
Şekil 4. 18. Vinorelbine uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $9,3 \pm 0,30$ olarak hesaplandı.

4.1.2.3. 4TBM Hücre Hattı

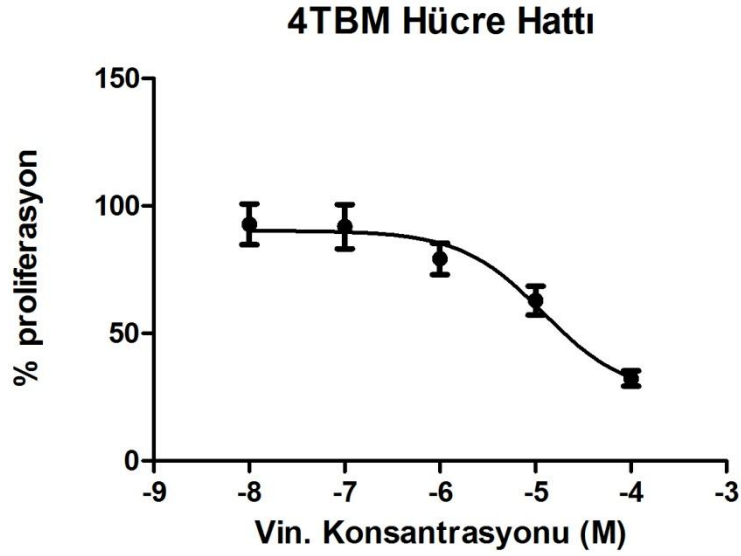
Vinorelbinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4TBM hücrelerinin proliferasyonları vinorelbinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21 de görüldüğü gibi Vinorelbin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 4TBM hücreleri 10 nM ve 100 nM vinorelbine karşı direnç göstermişlerdir.



Şekil 4. 19. Farklı dozlarda Vinorelbin ile muamele edilen 4TBM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



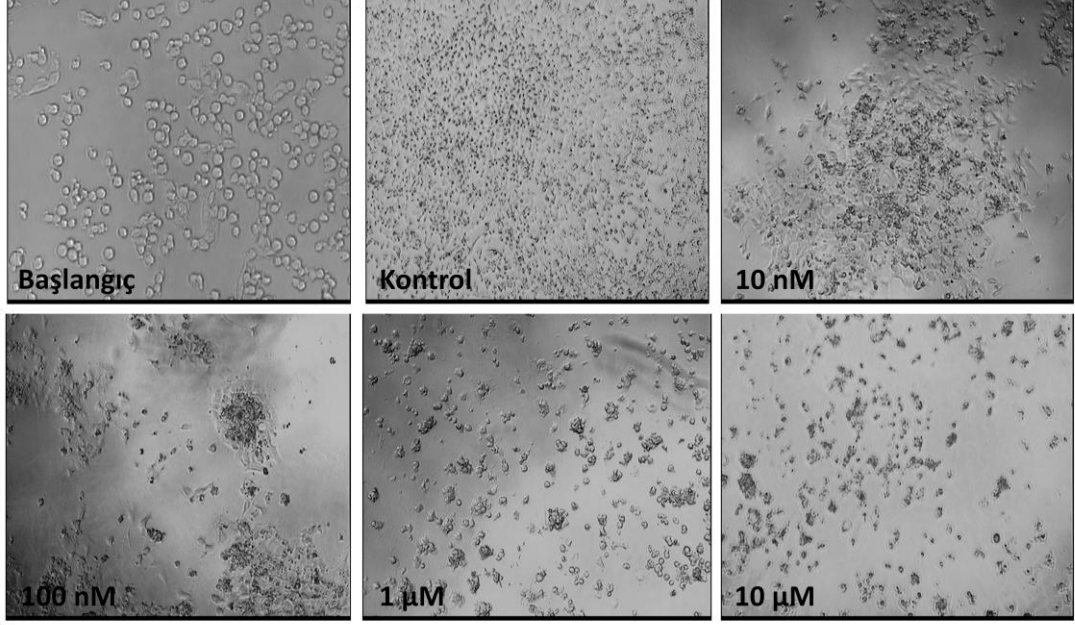
Şekil 4. 20. 4TBM hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi; 10 nM Vin., 100 nM Vin., 1 uM Vin., 10 µM Vin.ve 100 µM gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 1 nM., 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM vinorelbin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).



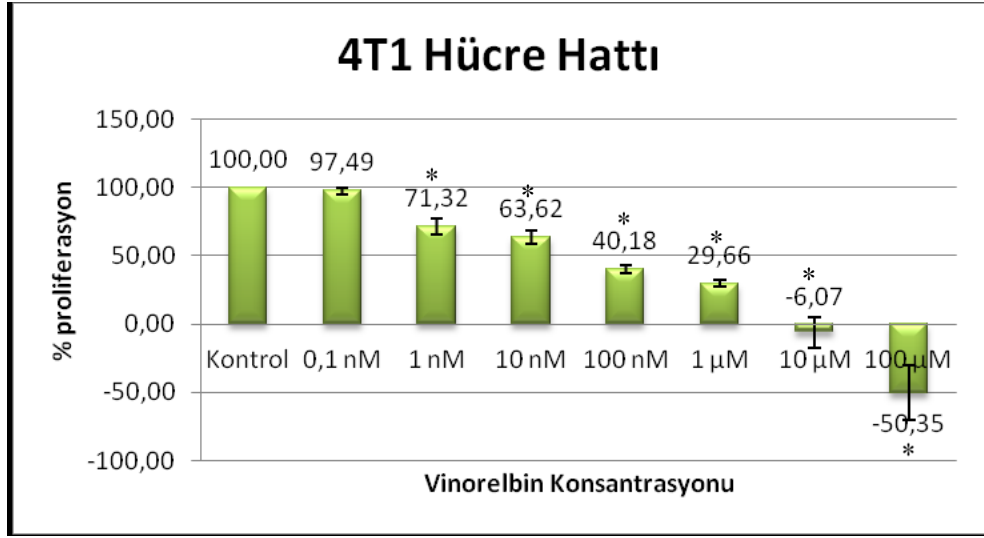
Şekil 4. 21. Vinorelbin uygulanan 4TBM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $4,9 \pm 0,20$ olarak hesaplandı.

4.1.2.4. 4T1 Hücre Hattı

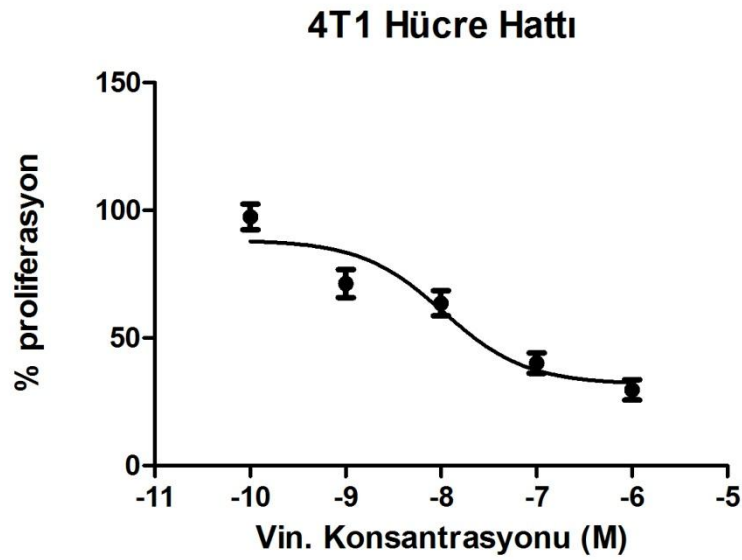
Vinorelbinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4T1 hücrelerinin proliferasyonları vinorelbinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24 de görüldüğü gibi Vinorelbin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 10 μ M ve 100 μ M vinorelbin 4T1 hücrelerini öldürmüştür.



Şekil 4. 22. Farklı dozlarda Vinorelbin ile muamele edilen 4T1 hücrelerine ait fotografik görüntüler.



Şekil 4. 23. 4T1 hücrelerinde farklı dozlardaki vinorelbinin hücre proliferasyonuna etkisi; 0,1 nM Vin., 1 nM Vin., 10 nM Vin., 100 nM Vin., 1 µM, 10 µM ve 100 µM Vin. gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM vinorelbin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).

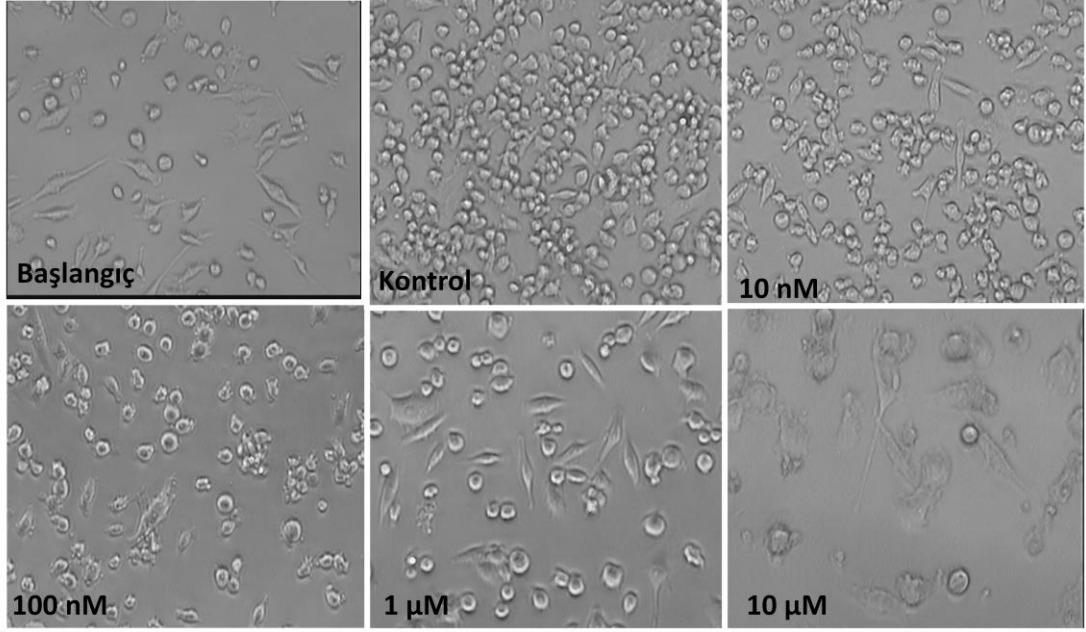


Şekil 4. 24. Vinorelbin uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $7,9 \pm 0,50$ olarak hesaplandı.

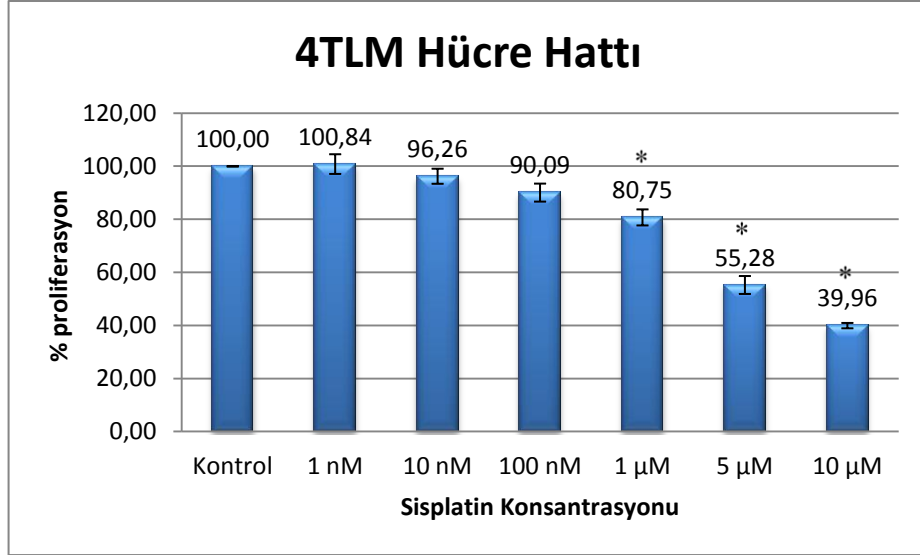
4.1.3. Sisplatinin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

4.1.3.1. 4TLM Hücre Hattı

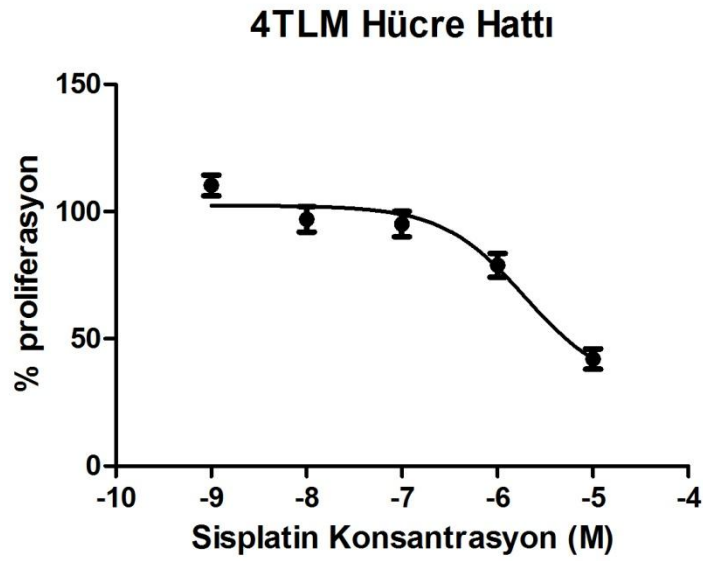
Sisplatinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4TLM hücrelerinin proliferasyonları sisplatinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.25, 4.26 ve 4.27 de görüldüğü gibi sisplatin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 4TLM hücreleri 1 nM, 10 nM ve 100 nM sisplatine karşı direnç göstermişlerdir.



Şekil 4. 25. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4TLM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



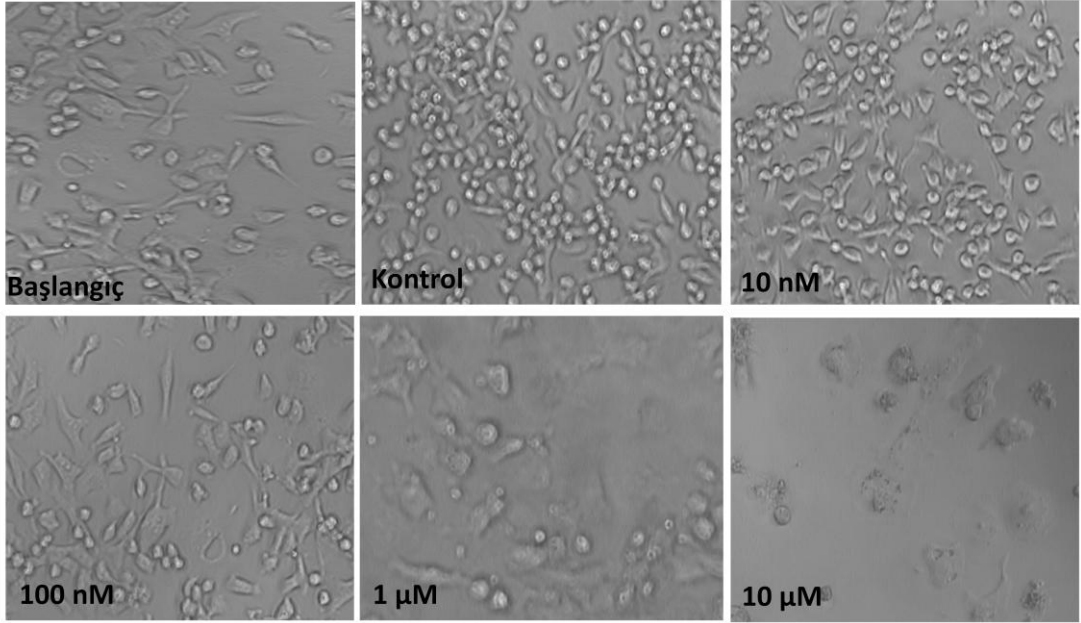
Şekil 4. 26. 4TLM hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM , 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM sisplatin gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1µM, 5 µM ve 100 µM sisplatin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (* $p < 0.05$) (Değerler \pm SEM olarak verilmiştir, $n=8$, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).



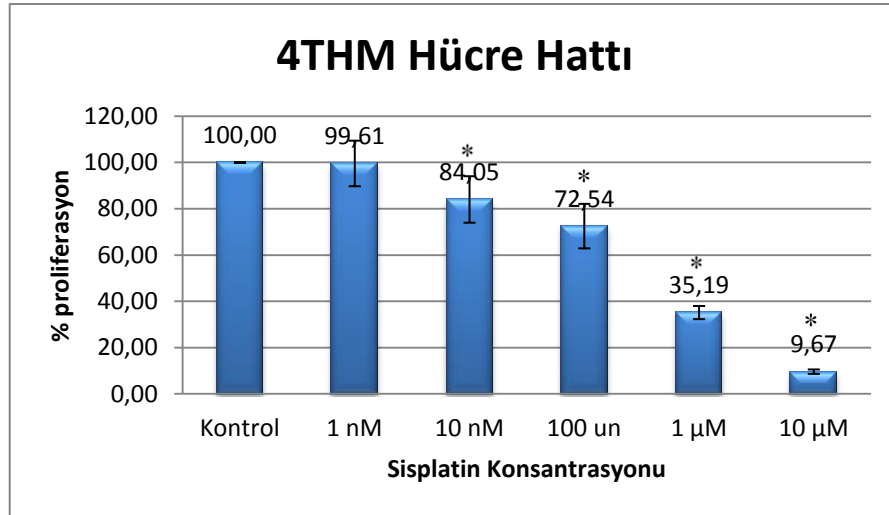
Şekil 4. 27. Sisplatin uygulanan 4TLM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD_2 değeri $5,61 \pm 0,21$ olarak hesaplandı.

4.1.3.2. 4THM Hücre Hattı

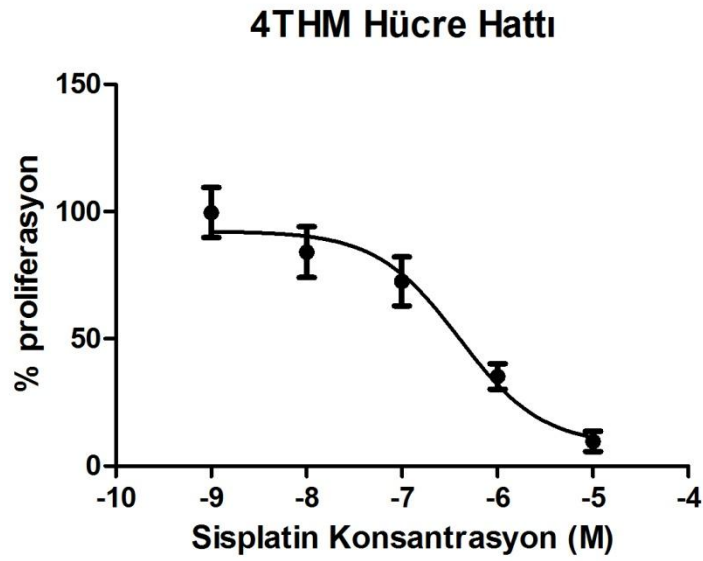
Sisplatinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4THM hücrelerinin proliferasyonları sisplatinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.28, 4.29 ve 4.30 de görüldüğü gibi sisplatin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 4THM hücreleri 1 nM sisplatinine karşı direnç göstermişlerdir.



Şekil 4. 28. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4THM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



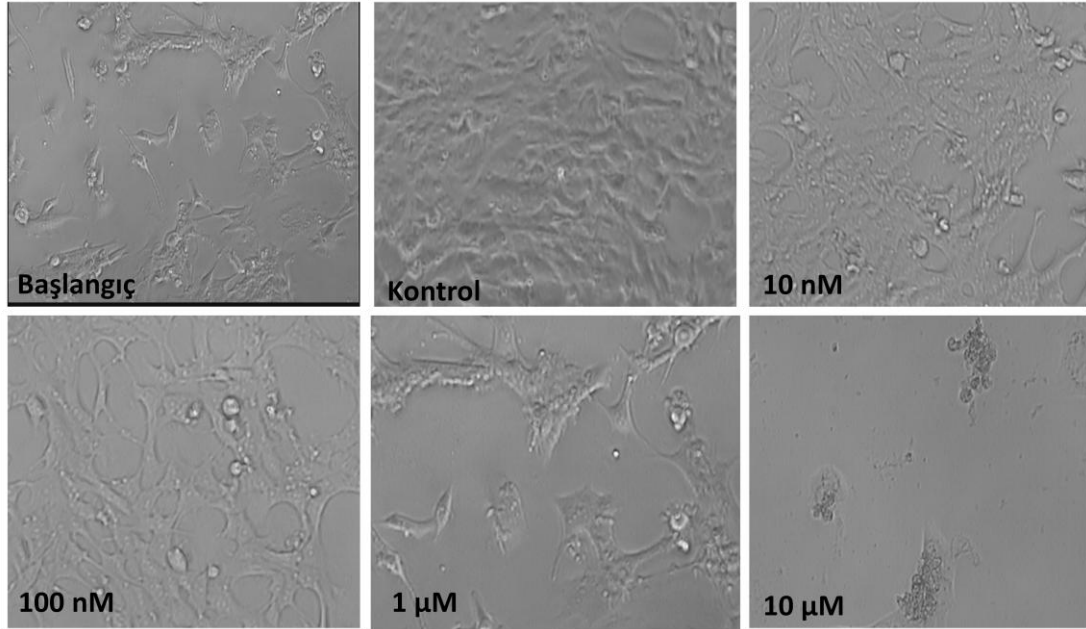
Şekil 4. 29 4THM hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM sisplatin, 10 nM, 100 nM, 1 µM ve 10 µM gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1µM ve 100 µM sisplatin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (*p<0.05) (Değerler ± SEM olarak verilmiştir, n=8, deneyler 4 kere tekrarlanmıştır).



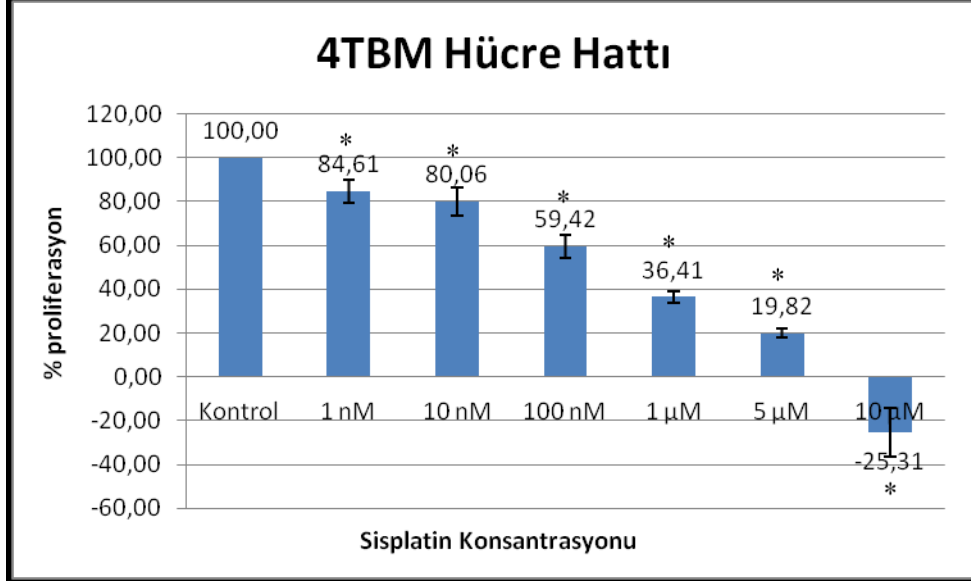
Şekil 4. 30 Sisplatin uygulanan 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD₂ değeri 6,38 ± 0,19 olarak hesaplandı.

4.1.3.3. 4TBM Hücre Hattı

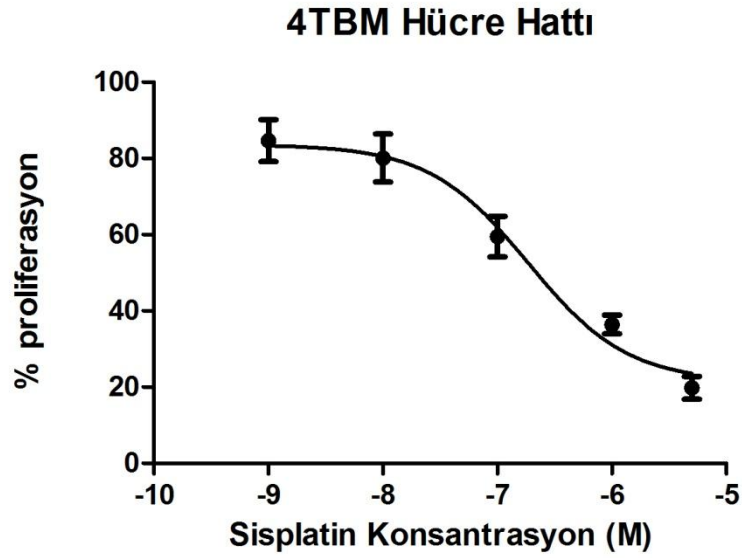
Sisplatinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4TBM hücrelerinin proliferasyonları sisplatinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33 de görüldüğü gibi sisplatin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı. 10 μ M sisplatin 4TBM hücrelerini öldürmüştür.



Şekil 4. 31. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4TBM hücrelerine ait fotografik görüntüler.



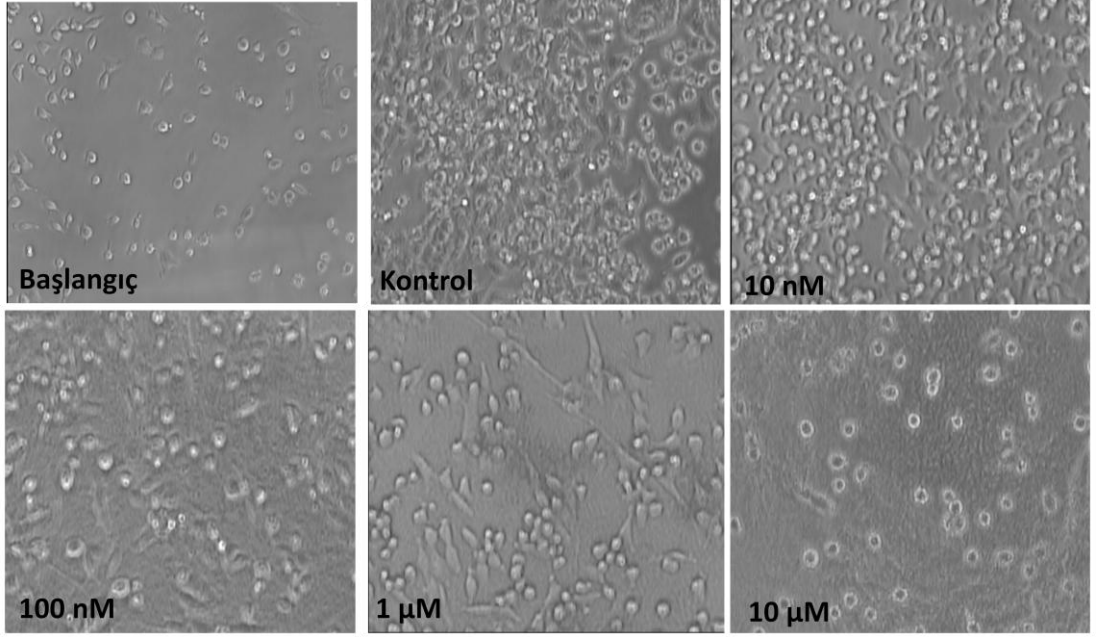
Şekil 4. 32. 4TBM hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM sisplatin, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 100 µM sisplatin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (*p<0.05) (Değerler ± SEM olarak verilmiştir, n=8, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).



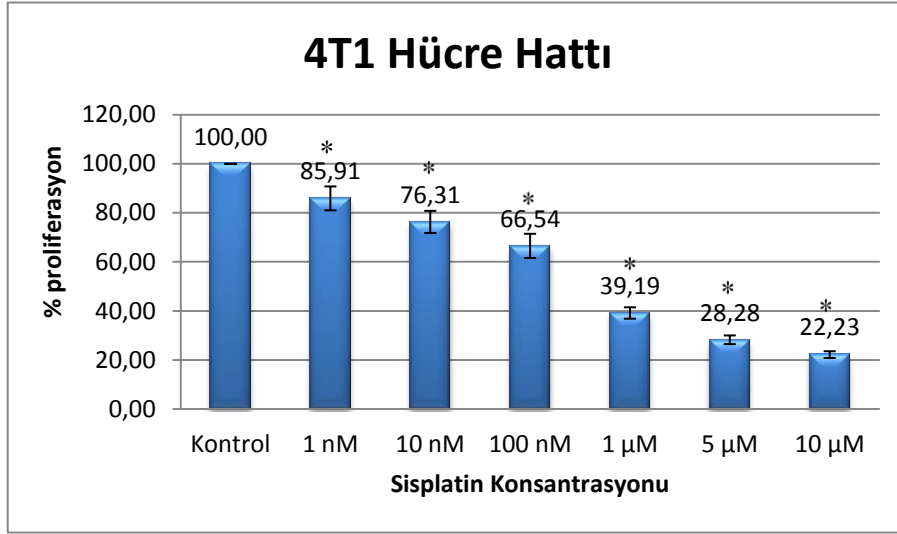
Şekil 4. 33. Sisplatin uygulanan 4TBM hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD₂ değeri 6,56 ± 0,09 olarak hesaplandı.

4.1.3.4. 4T1 Hücre Hattı

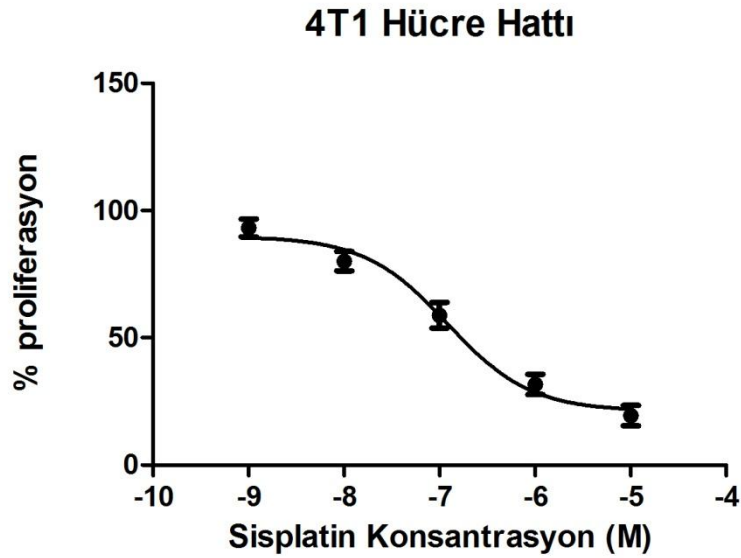
Sisplatinin hücre proliferasyonunu baskıladığı, ilacın 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonları kullanılarak belirlendi. Metotta anlatıldığı gibi 4T1 hücrelerinin proliferasyonları sisplatinle tedavi edildikten 72 saat sonra belirlendi. Şekil 4.34, 4.35 ve 4.36 de görüldüğü gibi sisplatin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladı.



Şekil 4. 34. Farklı dozlarda Sisplatinin ile muamele edilen 4T1 hücrelerine ait fotografik görüntüler.



Şekil 4. 35. 4T1 hücrelerinde farklı dozlardaki sisplatinin hücre proliferasyonuna etkisi; 1 nM sisplatin, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM gruplarının kontrole göre istatistiksel olarak karşılaştırılması. Bu değerler üzerinden proliferasyondaki inhibisyon yüzde olarak hesaplandı. 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1µM, 5 µM ve 100 µM sisplatin uygulanan hücre gruplarındaki canlı hücrelerin yüzdesi kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük olduğu saptandı. (*p<0.05) (Değerler ± SEM olarak verilmiştir, n=8, deneyler 3 kere tekrarlanmıştır).



Şekil 4. 36. Sisplatin uygulanan 4T1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden değer pD₂ değeri 6,8 ± 0,22 olarak hesaplandı.

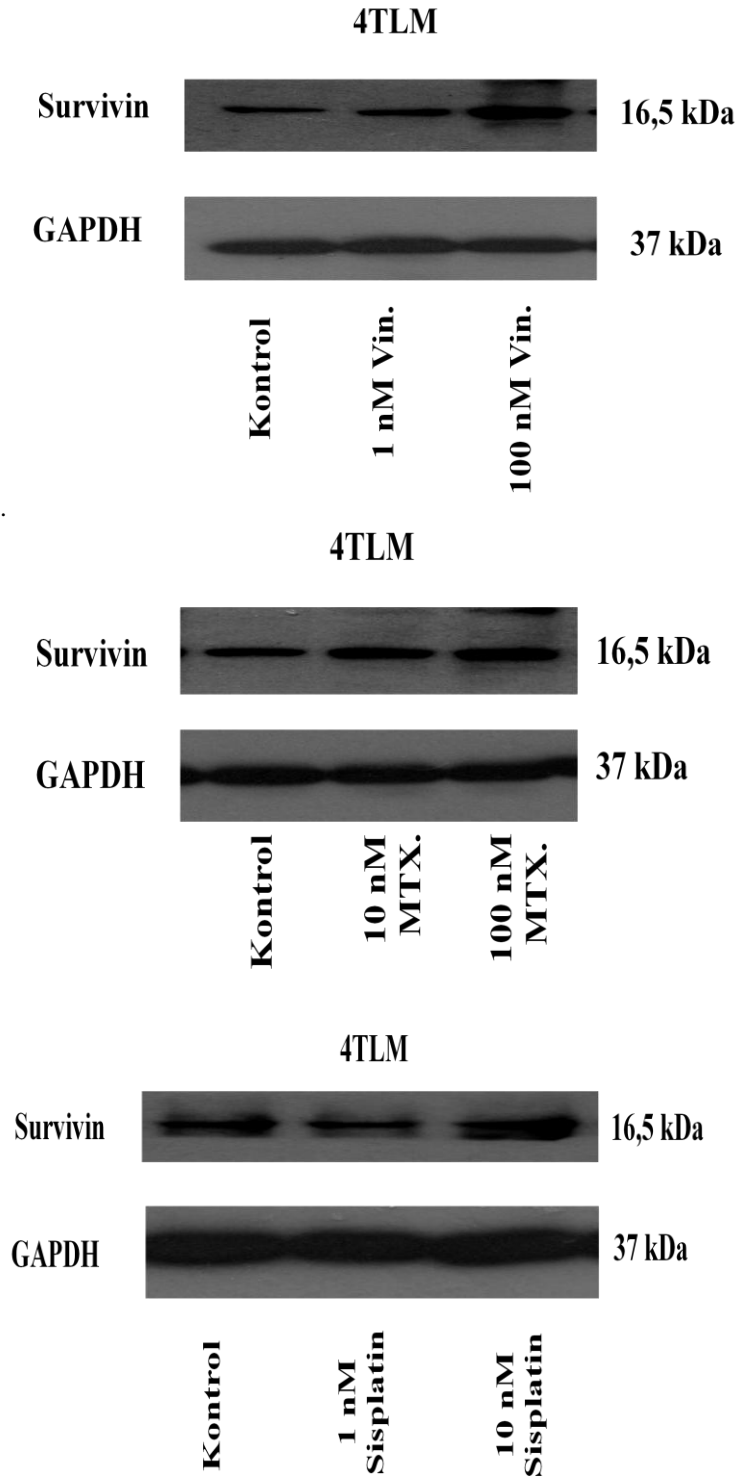
Tablo 4. 1. Metastatik meme kanseri hücrelerinin farklı kemoterapötiklere olan duyarlılığı

	4TBM	4TLM	4THM	4T1
Metotreksat	7,1 ± 0,16	7,7±0,09	7,6 ± 0,19	7,91 ± 0,19
Sisplatin	6,56 ± 0,09	5,61 ± 0,21	6,38 ± 0,19	6,8 ± 0,22
Vinorelbin	4,9 ± 0,20	6,9 ± 0,30	9,3 ± 0,30*	7,9 ± 0,50

Her bir hücre hattının kullanılan kemoterapötiklere olan duyarlılıkları (pD_2) belirlenmiştir. Belirlenen pD_2 değerlerine göre her bir ilaç için hücrelerin duyarlılıkları arasında karşılaştırma yapılmıştır. Hücrelerin MTX'e duyarlılıkları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Sisplatine en duyarlı hücre 4T1 gibi gözükse de diğer hücrelerle arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamaktadır. Vinorelbine en dirençli hücre hattı 4TBM olmuştur. Diğer hücre hatlarıyla arasında duyarlılık açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır (* $p<0,05$ aynı kemoterapötik ilacın farklı hücreler üzerindeki etkisi).

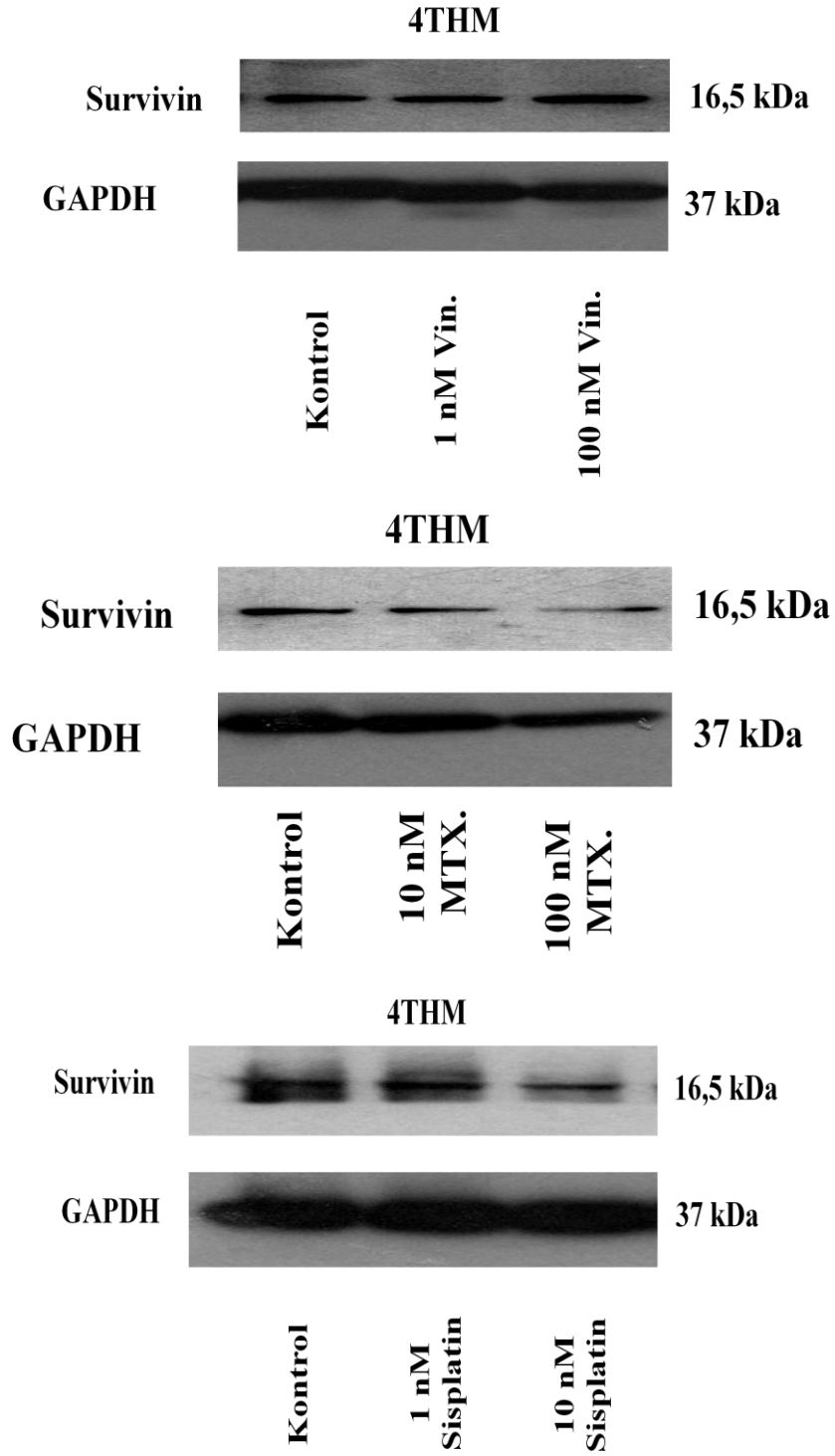
4.2. Western Blot Sonuçları

4.2.1. 4TLM Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu



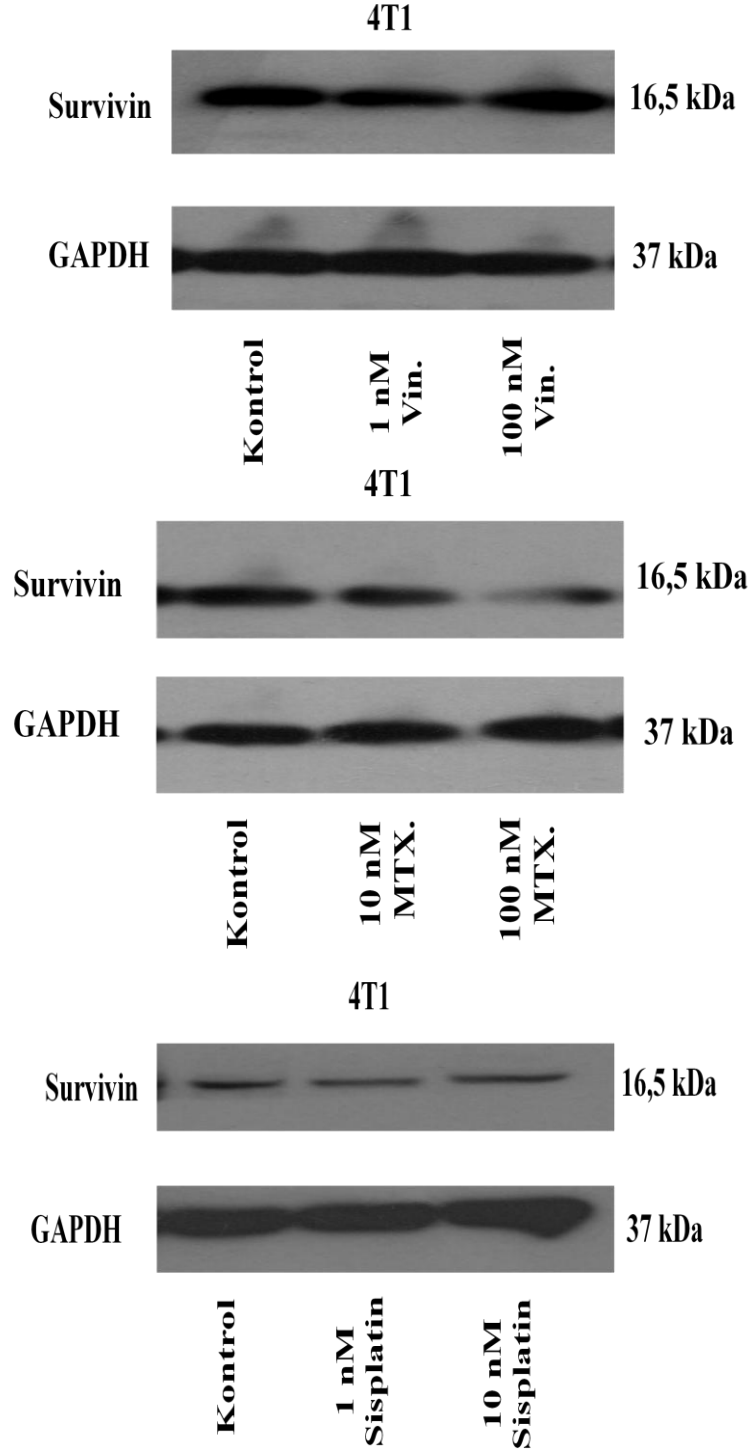
Şekil 4. 37. 4TLM hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.

4.2.2. 4THM Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu



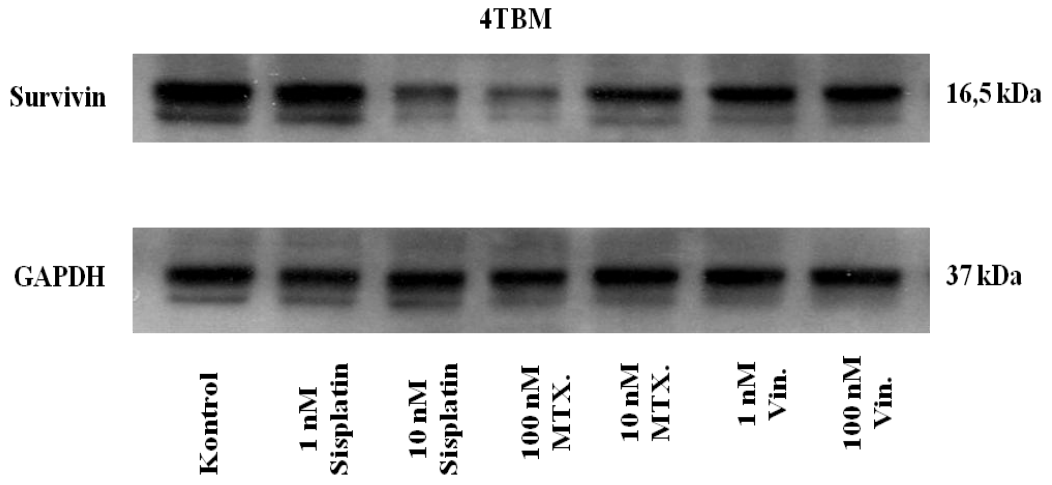
Şekil 4. 38. 4THM hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.

4.2.3. 4T1 Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu



Şekil 4. 39. 4T1 hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.

4.2.4. 4TBM Hücre Hattında Survivin Ekspresyonu



Şekil 4. 40. 4TBM hücre hattında survivin ekspresyonu üzerinde farklı dozlardaki Vin. MTX ve Sisplatinin etkisi.

TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser türüdür. Kanser kelimesi toplumda kötü psikolojik etki ve korku yaratmaktadır. Ancak her kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de erken tanı, tedavi ve tedavi sonrası düzenli takip başarılı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Meme kanserindeki tedavi ilk zamanlarda kemoterapi ve kanserli memenin tamamen rezeksiyonu şeklindeyken günümüzde bu görüş değişmiştir [93].

Primer sistemik tedavi olarak isimlendirilen neoadjuvan kemoterapi 1970' li yıllarda lokal ileri meme kanserinde klinik sonuçları iyileştirmek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise bu yaklaşım lokal ileri meme kanserinde standart bir tedavi olmuştur. Primer kemoterapide amaç, opere edilebilen meme kanserinde meme koruyucu cerrahi oranını arttırmak ya da opere edilemeyen ve inflamatuvar meme kanserini opere edilebilir kılmaktır [94].

Meme kanseri tedavisinde ilk zamanlardaki rejimler daha çok tümör belirlendiği esnada operasyon, operasyon sonrası kemoterapi ve radyoterapi şeklindeydi. Bu tedavi rejimi ile operasyon ve kemoterapi sonrası görüntülemelerde kitle olamamasına rağmen takiplerde uzak organ metastazı çıkması mikrometastaz kavramını ortaya çıkarmıştır. Meme kanseri sistematik bir hastalıktır uzak organlara mikrometastaz yapmaktadır [95].

Meme kanseri metastaz yapmamışsa tedavi edilebilirken, metastaz oluştuktan sonra hastanın sağ kalım oranı oldukça düşüktür. Dolayısıyla metastaz yapan hücrelerin karakterize edilmesi, duyarlı ve dirençli olduğu ilaçların bulunması etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için gereklidir. Bu çalışmada farklı organlara metastataz yapmış meme kanser hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan meme kanser hücre hatları parental 4T1 hücreleri, 4THM (kalbe metastaz yapan), 4TLM (karaciğere metastaz yapan), 4TBM (beyne metastaz yapan) hücreleridir [6-7]. Yapılan literatür araştırmalarında bu hücrelerin klasik kemoterapötik ilaçlara duyarlılık düzeyi ve olası dirençlerinin daha önce araştırılmadığı fark edilmiştir. Metastatik meme kanserinin tedavisinde kullanılan sisplatin, metotreksat ve vinorelbinin 4THM, 4TBM, 4TLM ve parental hücre olan 4T1 dizilerinin in-vitro ortamda proliferasyonu üzerine etkisi ve olası sitotoksik etkileri bu tezde araştırılmıştır.

Metastatik meme kanseri kemoterapilere hassasiyeti olan bir hastalıktır. Tek ajan veya kombine rejimler kullanılmaktadır. Ne yazık ki, ilk basamak tedavi seçiminde farklı stratejilerin beraber karşılaştırılması sınırlıdır. Çünkü hasta popülasyonundaki değişiklikler ve birbirini takip eden tedaviler bu karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır.

Kemoterapiye direnç önemli bir problem olup, apoptotik yollardaki bozulmayla kısmen ilişkilidir. Kanser oluşumu ve gelişiminde apoptoz mekanizması önemli bir yere sahiptir. Apoptozis, değişik aktive ve inhibe edici faktörler tarafından sıkı kontrol altında tutulan önemli bir olaydır. Kanser hücrelerinde bulunan antiapoptotik proteinler bu sürecin baskılanmasına neden olurlar. Survivin, diğer apoptozisi inhibe eden proteinlerin (IAP) aksine farklılaşmasını tamamlamış, normal yetişkin dokularda belirlenemeyen, fakat çeşitli kanser tiplerinde eksprese edilen bir proteindir [96]. Kanser hastalarında yapılan bir çok çalışmada kötü prognozun survivin ekspresyonu ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir [97-98].

Son zamanlarda klinikte kullanılan DNA hasarı veren ajanlar, mikrotübüllere bağlanan ilaçlar ve nükleosidler kötü huylu hücrelerin apoptozunu indüklemektedir. Apoptozisi inhibe eden proteinleri up-regülasyonu kemoterapi ve radyoterapiye dirençte hayati öneme sahiptir. Bu bağlamda survivinin kanser hücrelerindeki aşırı ekspresyonu, sağ kalım sürelerinin azalmasıyla ilişkilidir ve in vivo koşullarda neoplastik hücrelerin apoptotik indeksini azalttığı gösterilmiştir [99]. Kanser tedavisinde konvansiyonel ilaçlar önemli bir silah olmasına rağmen yeni tedavi yöntemleri apoptozisin altında yatan moleküler mekanizmaları daha derinlemesine incelemeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle survivinin aşırı ekspresyonu apoptotik uyarıya olan direncin artmasına neden olmasına rağmen, baskılanması hücrelerin kemoterapötiklere olan duyarlılığını arttırmaktadır [100].

Bu sebepten dolayı çalışmamızda farklı kemoterapötiklerin deneysel fare modellerinde farklı organlara metastaz yapan meme kanser hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir

Metastatik meme kanserinde ilk ajan olarak antrasiklinler ve taksanlar dışında vinorelbin de kullanılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar antrasiklinler ve taksanlar kadar geniş değildir. İleri meme kanseri tedavilerinde kullanılan antrasiklinlerin ve taksanların taksan ve antarsiklin olmayan alternatif tedavi seçeneklerini ortaya çıkarmıştır. Tek ajan olarak vinorelbinin kullanıldığında hastalarda iyi tolere ve daha az bulantı / kusma ve alopesi olduğu görülmüştür [101].

Vinorelbin özellikle yaşlı kadınlarda (65 yaş ve üzeri), ilk evre metastaz olaylarında oldukça çok çalışılmıştır. İlk basamak tedavi olarak vinorelbinin kullanıldığı üç adet farklı faz II çalışmasında sonuçlar şu şekildedir. Bu çalışmaların genel yanıt oranları (%38-%41) ve 6 ayın ortalama progresyon süreleri benzer çıkmıştır. İkinci çalışmada yaşlı, metastatik meme kanserli kadınlarda klinik olarak etkili görünen vinorelbinin yanıt oranı %38 olarak bulunmuştur. Üçüncü çalışmada 6 aydan fazla stabil hastalığı olan kadınlara bakılmıştır ve bu oran %54'lere çıkmaktadır [102] [103] [104]. Sorio ve ark. 20 kadına 3 hafta boyunca 7 gün arayla 30 mg/m² vinorelbin tedavisi uygulamış ve yanıt oranını %30 bulmuşlardır [105].

2009 yılında yayınlanan klinik rehberinde vinorelbinin metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde aktif ve güvenli ajan olduğu bildirilmiştir. Vinorelbin hem tek başına hem de diğer kemoterapötiklerle kombine edilebilmektedir. Bu uluslararası rehberde vinorelbin, metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde standart kemoterapiler arasında gösterilmiştir [106]. Ancak meme kanseri hangi organa metastaz yaptığında vinorelbinin kullanımının etkili olacağı hakkında bir bilgi mevcut değildir.

Yeni 3. kuşak ilaçlardan ilk randomize çalışma vinorelbin ile yapılmıştır. Fransa’ da yapılan bu çalışmada, sisplatin ve vindesin kombinasyonu, sisplatin ve vinorelbin kombinasyonu veya tek ajan olarak vinorelbin kemoterapisi ile karşılaştırılmıştır. Sisplatin ve vinorelbin kolunda ortalama yaşam süresi 40 hafta iken sisplatin ve vindesin kolunda 32 hafta olarak bulunmuş ve anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır. Tek ajan olarak vinorelbin verilen grupta ise anlamlı fark bulunmamış [107]. SWOG grubunun çalışmasında sisplatin ve vinorelbin kombinasyon tedavisi ile sisplatin tek ajan tedavisi karşılaştırılmış ve ortalama yaşam süresi sırası ile 8 ay ile 6 ay bulunmuştur [108].

Yaptığımız çalışmada vinorelbinin kalbe metastaz yapmış olan 4THM hücrelerinde daha etkili olduğu görülmektedir. Bunun yanında vinorelbinin beyne metastaz yapmış 4TBM hücrelerinde etki gösterebilmesi için yüksek bir konsantrasyona çıkmak gerekmektedir. Bu durum 4TBM hücrelerinin bu ilaca dirençli olduğunu göstermektedir. Vinorelbinin hücre proliferasyonunun baskılanmasında en etkili olduğu hücre hattı 4THM ($pD_2: 9,3 \pm 0,30$) olurken, azalan sırayla 4T1 ($pD_2: 7,9 \pm 0,50$), 4TLM ($pD_2: 6,9 \pm 0,30$) ve 4TBM ($pD_2: 4,9 \pm 0,20$) olarak belirlendi. 4TLM hücrelerinin 100 nM vinorelbin ile muamelesi hücre proliferasyonunu baskımlarken survivin ekspresyonunu arttırmıştır. 4T1 hücre hattında 100 nM vinorelbin survivin ekspresyonunu değiştirmemiştir. 100 nM vinorelbin 4THM hücrelerinde proliferasyonu baskımlarken survivin ekspresyonunu değiştirmemiştir. 4TBM hücreleri 100 nM vinorelbin tedavisine direnç göstermişlerdir. Hem hücre proliferasyonun da hem de survivin ekspresyonun da bir değişme olmamıştır. Vinorelbinin yüksek dozlarda klinik kullanımı toksisite nedeniyle her zaman mümkün olmayabilir. Vinorelbinin en önemli yan etkilerinden birinin nötropeni olması, bu yüksek konsantrasyonda vinorelbinin kullanılmasına olanak sağlamamaktadır. [109].

Meme kanseri için birçok yeni ajanın kullanıldığı klinik çalışmalar beyin metastazı olan hastalar üzerinde yapılmıştır. En geniş araştırmalardan bir tanesi Rosner ve ark. tarafından 100 kadın üzerinde yapılan araştırmadır. 100 kadın çeşitli kemoterapilerle tedavi edilmiştir. Bu çalışmada siklofosfamid, fluorourasil ve prednizon veya siklofosfamid, fluorourasil ve prednizon bunlara ilave olarak metotreksat ve vinkristin kullanılmıştır. Bu rejimlerden hiç biri kan-beyin bariyerini aşamamalarına rağmen her iki rejiminde yanıt oranı %50 olmuştur. Vinorelbinin beyin metastazı olan hastalardaki etkisini gösteren bir klinik çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımız beyin metastazı olan hastaların vinorelbine dirençli olabileceğini göstermektedir.

Metotreksat antimetabolit gurubunda bulunan bir ilaçtır. Folik asidin 4-amino-N10-metil analogudur. Metotreksat, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek DNA, RNA ve ATP sentezi için gerekli olan THF sentezini durdurur. Bu durum timidilat, pürin nükleotidlerin ve aminoasitlerin sentezinde azalmaya neden olur. Böylece nükleik asit ile protein metabolizmasını önlerler. Metotreksatın hücre bölünmesini inhibe etmesi kanser tedavisinde dikkatleri üzerine çekmiştir. Bu nedenle kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılan bir kemoterapötik ilaç olmuştur. [110].

Booger ve ark. 22 beyin metastazı olan meme kanserli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada siklofosfamid, metotreksat ve fluorourasil veya siklofosfamid, doksorubisin ve fluorourasil kombinasyon tedavilerinde %59' luk yanıt oranına ulaşmışlardır. Bu sonuçlar tümör kemosensitivitesinde ilacın normal kan-beyin bariyerine geçebilme yeteneğinin önemli olduğu desteklemektedir. Beyine metastaz yapmış 4TBM hücrelerinde bu sonuçlar, Booger ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metotreksatın etkili olması bizim çalışmamızda metotreksatın beyin metastazı hücrelerinde etkili ilaç sonucunu desteklemektedir. Bunların yanında elbette tek ajan tedavi ile kombine tedaviler arasında yanıt farklarının oluşabileceği ihtimalide göz ardı edilmemelidir.

Çalışmamızda metotreksatın 4T1 ve karaciğere metastaz yapmış 4TLM hücre hatlarında da etkili olduğu görülmüştür. Düşük dozlarda en az etkiyi beyne metastaz yapmış 4TBM hücreleri üzerinde göstermiş olmasına rağmen 10 µM konsantrasyonda hücreleri öldürmüş, 100 nM ve 1 µM konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu kontrole göre düşürmüştür. Metotreksatın hücre proliferasyonunu baskılanmasında en etkili olduğu hücre hattı parental hücre olan 4T1 olurken (pD2: 7,91 ± 0,19) azalan sırayla 4TLM (pD2: 7,8±0,03), 4THM (pD2: 7,6 ± 0,19) ve 4TBM (pD2: 7,1 ± 0,16) üzerinde etkili olmuştur. 4T1 hücreleri 100 nM metotreksat ile tedavi edildiğinde hem hücre sayısında kontrole göre %66' lık bir azalma hem de survivin ekspresyonunda kontrole göre düşüş gözlenmiştir. 100 nM metotreksat tedavisi 4TBM hücrelerinde survivin ekspresyonunu baskılamıştır. Çalışmamızda 4THM hücrelerinin metotreksata karşı duyarlı olduğu görülmüştür. 1 nM metotreksat konsantrasyonunda dahi hücre proliferasyonunda kontrole göre anlamlı bir düşüş olmuştur. 4THM hücrelerinin 100 nM metotreksat ile 48 saat muamelesi sonucu survivin ekspresyonunda da kontrole göre düşüş gözlenmiştir. 4TLM hücrelerinin metotreksat ile tedavisinde hücre proliferasyonu doza bağlı olarak baskılanmıştır. 4TLM hücrelerinin 100 nM metotoreksat ile tedavisi survivin ekspresyonunu değiştirmemiştir.

Sisplatin 1971 yılında ilk kez kanserli bir hastaya uygulanmıştır. 1978' de Platinol olarak klinik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Sisplatin yüksek seviyede ve geniş spektrumda anti-tümör etki göstermiştir ve araştırmacılar düşük yan etkiye sahip, üstün anti-tümör etkisi olan platin içermeyen yeni metal türleri bulmaya çalışmıştır. Sisplatinin çeşitli solid tümörler üzerinde klinik faydaları olmuştur. Ancak toksik yan etkileriyle beraber tümör direnci oluşması daha sonrasında sekonder malignitelerin oluşmasına neden olmaktadır [75].

Platin tuzları tek ajan olarak metastatik meme kanseri tedavisinde çok tercih edilmezler. Çünkü toksisite açısından diğer aktif tedavilerin durumu daha uygundur. Ancak üçlü negatif meme kanserlerinin tedavisinde platin ajanlarının araştırılmasına devam edilmektedir. Çünkü meme kanserinin bu alt tipi, DNA tamirindeki bozuklukları hedefleyen tedavilere karşı hassas olabilmektedir [111].

Tek tedavi ya da kombine tedavi olarak kullanılan platin bileşikleri metastatik meme kanseri tedavisinde önemli role sahiptir. Sisplatin ilk basamak tedavi olarak etkilidir ancak yüksek cevap oranına (%50 ile 80) antrasiklinlerle kombine edildiğinde ulaştığı literatürde belirtilmiştir [112]. Ön tedavi olarak sisplatin alan hastalarda sisplatinin cevap oranı çok (<%10) düşüktür. Bu yüzden bu durumda monoterapi olarak sisplatin önerilmemektedir. Ön tedavi alan hastalarda sisplatinin etkisinin az olması, ilaç direncinin oluşmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda metastatik meme kanserinin karaciğer metastazında (4TLM) sisplatin etkili değilken diğer hücrelerde (örneğin: 4TBM, 4THM) etkili olduğu görülmüştür. Sisplatin ile yapılan deneylerde çıkan sonuçlar şu şekildedir : Sisplatin en dirençli hücre hattı 4TLM (pD_2 : $5,61 \pm 0,21$) olmuştur. Diğer hücre hatlarına sisplatinin etkisi 4T1 (pD_2 : $6,8 \pm 0,22$), 4THM (pD_2 : $6,38 \pm 0,19$) ve 4TBM (pD_2 : $6,56 \pm 0,09$) şeklinde olmuştur. 4TLM hücrelerinin 10 nM sisplatin ile tedavisi survivin ekspresyonunda artışa neden olmuştur. 4TLM hücre hattının 10 nM sisplatin ile 48 saat muamele edilmesi bu hücre hattında survivin ekspresyonunu arttırmıştır. 10 nM sisplatin, 4T1 hücre hattında survivin ekspresyonunda kontrole göre bir değişmeye neden olmazken, 4THM ve 4TBM hücre hatlarında kontrole göre survivin düzeylerinde düşüşe neden olmuştur. Özellikle tek başına, yüksek dozda (10 μ M sisplatin) 4TBM hücrelerini öldürmüştür. Ancak 4TLM hücreleri üzerinde sadece yüksek dozlarda kontrole göre anlamlı bir inhibisyon görülmüştür. 4TLM hücrelerinde 1-5 ve 10 μ M sisplatin konsantrasyonlarında sırasıyla %19,25, %44,72, %60,04 oranlarında inhibisyon gözlenmiştir. Buradan anlaşılacağı gibi metastatik meme kanserinde sisplatinin tek tedavi olarak kullanılması farklı metastatik bölgelerde farklı etkiler gösterecektir.

Sonuç olarak farklı organlara metastaz yapan meme kanserinin tedavisinde ilaç direnci olmayan ve/veya en az ilaç direnci olan, gelişmiş farmakolojik özelliklere sahip, toksisitesi az etkili ilaçların tedavide kullanılması önemli sonuçları da beraberinde getirecektir. Klinikte kullanılan kombine tedaviler baz alınarak bu kemotrapötik ilaçların kombinasyonlarının nasıl bir etki oluşturacağı ileriki çalışmaların konusu olacaktır. Literatüre bakıldığında bu kemoterapötiklerin tek ajan olarak kullandığımız hücre hatlarına olan etkisi bakılmamıştır. Etkili kanser tedavisi için hücrelerin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu sebeple kemoterapötik ilaçlara olan dirençleri değerlendirilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak kombine tedavilerin hem proliferasyon hem de ilaç direnci üzerindeki etkilerinin araştırılması literatüre önemli katkıda bulunacaktır.

SONUÇLAR

Farklı organlara metastaz yapmış meme kanser hücreleri üzerinde vinorelbin, sisplatin ve metotreksatın etkisini ve bu hücrelerde survivin ekspresyonunu incelediğimiz bu çalışmada;

1. Metotreksata en duyarlı hücre hattı parental hücre hattı olan 4T1 ($pD_2: 7,9 \pm 0,19$) olarak belirlendi. Diğer hücre hatlarının metotreksata olan duyarlılıkları sırasıyla 4TLM ($pD_2: 7,8 \pm 0,03$), 4THM ($pD_2: 7,6 \pm 0,19$) ve 4TBM ($pD_2: 7,1 \pm 0,16$) olarak belirlendi. 4TLM hücre hattında 100 nM metotreksat survivin ekspresyonunu değiştirmemi. 100 nM metotreksat 4T1, 4THM ve 4TBM hücrelerinde survivin ekspresyonunu kontrole göre düşürmüştür.
2. Vinorelbine en duyarlı hücre hattı meme kanserinin kalp metastazı olan 4THM ($pD_2: 9,3 \pm 0,30$) hücre hattı olmuştur. Diğer hücre hatlarının vinorelbine olan duyarlılıkları sırasıyla 4T1 ($pD_2: 7,9 \pm 0,50$), 4TLM ($pD_2: 6,9 \pm 0,30$) ve 4TBM ($pD_2: 4,9 \pm 0,20$) olarak belirlendi. 4TLM hücre hattında 100 nM vinorelbin survivin ekspresyonunu kontrole göre arttırdı. 4T1, 4THM ve 4TBM hücre hattında 100 nM vinorelbin survivin ekspresyonunu değiştirmemi.
3. Sisplatine en duyarlı hücre hattı parental meme kanser hücresi olan 4T1 ($pD_2: 6,8 \pm 0,22$) olmuştur. Diğer hücre hatlarının sisplatine olan duyarlılıkları sırasıyla 4TBM ($pD_2: 6,56 \pm 0,09$), 4THM ($pD_2: 6,38 \pm 0,19$) ve 4TLM ($pD_2: 5,61 \pm 0,21$) olarak belirlendi. 4TLM hücre hattında 10 nM sisplatin survivin ekspresyonunu kontrole göre arttırmıştır. 4T1 hücre hattında 10 nM sisplatin survivin ekspresyonunu değiştirmemi. 10 nM sisplatin 4THM ve 4TBM hücrelerinde survivin ekspresyonunu kontrole göre düşürmüştür.

KAYNAKLAR

1. Parkin, D.M., et al., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(2): p. 74-108.
2. Merlo, L.M., et al., Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(12): p. 924-35.
3. Dutz, J.P. and V.C. Ho, Immunosuppressive agents in dermatology. An update. *Dermatol Clin*, 1998. 16(2): p. 235-51.
4. Gasparini, G., et al., Vinorelbine is an active antiproliferative agent in pretreated advanced breast cancer patients: a phase II study. *J Clin Oncol*, 1994. 12(10): p. 2094-101.
5. Sledge, G.W., Jr., et al., Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1988. 6(12): p. 1811-4.
6. Erin, N., et al., Capsaicin-induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 99(3): p. 351-64.
7. Erin, N., et al., Altered gene expression in breast cancer liver metastases. *Int J Cancer*, 2009. 124(7): p. 1503-16.
8. DJ Winchester, D.W., CA Hudis, L Norton, *Breast Cancer*. BC Decker 2006: p. 1-14.
9. Beenken SW, W.F., Bland K, *History of the therapy of breast cancer in The Breast*. KI Bland and EM Copeland III. Saunders – Elsevier, 2004: p. 3-18.
10. Kalaycı G, A.K., Demirkol K, Ertekin C, Kalaycı G, Acarlı K, Demirkol K, Ertekin C. *Meme hastalıkları ve tarihçe*. Nobel, 2002: p. 534-535.
11. S., S.G., *Crisis and Controversy: Historical Patterns in Breast Cancer Surgery*. CBMH/BCHM 1991: p. 77-99.
12. S, S.G., *Crisis and Controversy: Historical Patterns in Breast Cancer Surgery*. CBMH/BCHM 1991: p. 77-99.
13. Habel, L.A., et al., A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*, 2006. 8(3): p. R25.
14. Hickey, M., et al., Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Hum Reprod Update*, 2009. 15(3): p. 323-39.

15. Harold JB, J.R., Monica M et al, Malignant Tumors Of The Breast. Principles & Practice of Oncology, 2008. Two: p. 1606-1654.
16. Burgut R, T., Bozdemir N. , Türkiye’de 16 merkezin kanser verilerinin degerlendirilmesi. TUBİTAK ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, 1994.
17. TC Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı 2005 yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. 2005.
18. Singletary, S.E., Rating the risk factors for breast cancer. Ann Surg, 2003. 237(4): p. 474-82.
19. Ozmen, V., et al., Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. World J Surg Oncol, 2009. 7: p. 37.
20. Locke, F.B. and H. King, Cancer mortality risk among Japanese in the United States. J Natl Cancer Inst, 1980. 65(5): p. 1149-56.
21. Reynolds, T., "User-friendly" cancer statistics review features new format. J Natl Cancer Inst, 1992. 84(19): p. 1470-1.
22. Ravdin, P.M., et al., The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med, 2007. 356(16): p. 1670-4.
23. Bruce G.Haffty, T.A.B., Carlos A. Perez ed, Principles and Practice of Radiation Oncology. Early Stage Breast Cancer. Lippincott Williams and Wilkins 5. baskı: USA., 2008. Chapter 53.
24. Kopans, D.B., Breast İmaging Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
25. Kenemans, P., R.A. Verstraeten, and R.H. Verheijen, Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Maturitas, 2004. 49(1): p. 34-43.
26. Fidler, I.J., Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Res, 1990. 50(19): p. 6130-8.
27. Eckhardt, B.L., et al., Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. Nat Rev Drug Discov, 2012. 11(6): p. 479-97.
28. Bogenrieder, T. and M. Herlyn, Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. Oncogene, 2003. 22(42): p. 6524-36.
29. Nguyen, D.X. and J. Massague, Genetic determinants of cancer metastasis. Nat Rev Genet, 2007. 8(5): p. 341-52.

30. Fidler, I.J., et al., Critical determinants of neoplastic angiogenesis. *Cancer J*, 2000. 6 Suppl 3: p. S225-36.
31. Spratt, J.S. and S.W. Spratt, Medical and legal implications of screening and follow-up procedures for breast cancer. *Cancer*, 1990. 66(6 Suppl): p. 1351-62.
32. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
33. Iglehart, J., Kaelin, CM, Diseases of the Breast. *Sabiston Textbook of Surgery*. ed.C. Townsend W.B. Saunders Company : Philadelphia, USA, 2001.
34. Singletary, S.E., et al., Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*, 2002. 20(17): p. 3628-36.
35. Laubli, H. and L. Borsig, Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2010. 20(3): p. 169-77.
36. Muller, A., et al., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001. 410(6824): p. 50-6.
37. Wels, J., et al., Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev*, 2008. 22(5): p. 559-74.
38. Kaplan, R.N., et al., VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005. 438(7069): p. 820-7.
39. Jodele, S., et al., Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(1): p. 35-43.
40. Sethi, N. and Y. Kang, Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer*, 2011. 11(10): p. 735-48.
41. Shibue, T. and R.A. Weinberg, Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment. *Semin Cancer Biol*, 2011. 21(2): p. 99-106.
42. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(4): p. 274-84.
43. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*, 2008. 123(9): p. 1991-2006.

44. Yachida, S., et al., Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 2010. 467(7319): p. 1114-7.
45. Chu, J.E. and A.L. Allan, The Role of Cancer Stem Cells in the Organ Tropism of Breast Cancer Metastasis: A Mechanistic Balance between the "Seed" and the "Soil"? *Int J Breast Cancer*, 2012. 2012: p. 209748.
46. Lu X, K.Y., Efficient acquisition of dual metastasis organotropism to bone and lung through stable spontaneous fusion between MDA-MB-231 variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009: p. 106(23):9385–90.
47. Bos PD, Z.X., Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX,, Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 2009: p. 459(7249): 1005–9.
48. Lorusso, G. and C. Rugg, New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2012. 22(3): p. 226-33.
49. April F. Eichler, J.S.L., Multidisciplinary Management of Brain Metastases *The Oncologist*. July 2007. 12: p. No. 7, 884-898.
50. Lin, N.U., J.R. Bellon, and E.P. Winer, CNS metastases in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2004. 22(17): p. 3608-17.
51. Evans, A.J., et al., Brain metastases from breast cancer: identification of a high-risk group. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2004. 16(5): p. 345-9.
52. Cheng, X. and M.C. Hung, Breast cancer brain metastases. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. 26(3-4): p. 635-43.
53. Pestalozzi, B.C., Brain metastases and subtypes of breast cancer. *Ann Oncol*, 2009. 20(5): p. 803-5.
54. O'Reilly, S.M., M.A. Richards, and R.D. Rubens, Liver metastases from breast cancer: the relationship between clinical, biochemical and pathological features and survival. *Eur J Cancer*, 1990. 26(5): p. 574-7.
55. Eichbaum, M.H., et al., Prognostic factors for patients with liver metastases from breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 96(1): p. 53-62.
56. Reynen, K., U. Kockeritz, and R.H. Strasser, Metastases to the heart. *Ann Oncol*, 2004. 15(3): p. 375-81.
57. Klatt, E.C. and D.R. Heitz, Cardiac metastases. *Cancer*, 1990. 65(6): p. 1456-9.
58. Butany, J., et al., A 30-year analysis of cardiac neoplasms at autopsy. *Can J Cardiol*, 2005. 21(8): p. 675-80.

59. Lam, K.Y., P. Dickens, and A.C. Chan, Tumors of the heart. A 20-year experience with a review of 12,485 consecutive autopsies. *Arch Pathol Lab Med*, 1993. 117(10): p. 1027-31.
60. Bussani, R. and F. Silvestri, Neoplastic thrombotic endocarditis of the tricuspid valve in a patient with carcinoma of the thyroid. Report of a case. *Pathol Res Pract*, 1999. 195(2): p. 121-4.
61. Fukuda, S. and L.M. Pelus, Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(5): p. 1087-98.
62. Skoufias, D.A., et al., Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol*, 2000. 151(7): p. 1575-82.
63. Tamm, I., et al., IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 1998. 58(23): p. 5315-20.
64. Mirza, A., et al., Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 2002. 21(17): p. 2613-22.
65. Altieri, D.C., The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, 2001. 7(12): p. 542-7.
66. Yamamoto, H., C.Y. Ngan, and M. Monden, Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci*, 2008. 99(9): p. 1709-14.
67. Fidler, I.J., S.J. Kim, and R.R. Langley, The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *J Cell Biochem*, 2007. 101(4): p. 927-36.
68. Chu, E., Vincent T. DeVita, Jr, *Cancer Principles&Practice of Oncology* 6th edition. 2001: p. 289.
69. Salter, J.T. and K.D. Miller, Antiangiogenic agents in breast cancer. *Cancer Invest*, 2007. 25(7): p. 518-26.
70. DeVita, V.T., Jr., The evolution of therapeutic research in cancer. *N Engl J Med*, 1978. 298(16): p. 907-10.
71. Redding, S.W., Cancer therapy-related oral mucositis. *J Dent Educ*, 2005. 69(8): p. 919-29.
72. Wickham, R., Management of intractable nausea and vomiting. *Clin J Oncol Nurs*, 2004. 8(1): p. 91-4.
73. Frezza, M., et al., Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*, 2010. 16(16): p. 1813-25.

74. Desoize, B. and C. Madoulet, Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. 42(3): p. 317-25.
75. Lebwohl, D. and R. Canetta, Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer*, 1998. 34(10): p. 1522-34.
76. Boulikas, T. and M. Vougiouka, Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep*, 2003. 10(6): p. 1663-82.
77. Haskell CM; Selch MT, R.K., Stomach Cancers. In Haskell CM(ed):*CancerTreatment*. WB Saunders Company, 1990: p. 214.
78. Büsselberg, A.-M.F.a.D., Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 2011: p. 1351-1371.
79. Brunton LL, L.J., Parker KL, Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Mc Graw- Hill Companies, New-York, 2006.
80. Chan, E.S. and B.N. Cronstein, Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res*, 2002. 4(4): p. 266-73.
81. Tian, H. and B.N. Cronstein, Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2007. 65(3): p. 168-73.
82. Cronstein, B.N., Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev*, 2005. 57(2): p. 163-72.
83. Smith, I., Goals of treatment for patients with metastatic breast cancer. *Semin Oncol*, 2006. 33(1 Suppl 2): p. S2-5.
84. Cardoso, F., et al., Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2010. 21 Suppl 5: p. v15-9.
85. Pajk, B., et al., Anti-tumor activity of capecitabine and vinorelbine in patients with anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer: findings from the EORTC 10001 randomized phase II trial. *Breast*, 2008. 17(2): p. 180-5.
86. Carre, M., et al., Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem*, 2002. 277(37): p. 33664-9.

87. Goa, K.L. and D. Faulds, Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy. *Drugs Aging*, 1994. 5(3): p. 200-34.
88. Binet, S., et al., Immunofluorescence study of the action of navelbine, vincristine and vinblastine on mitotic and axonal microtubules. *Int J Cancer*, 1990. 46(2): p. 262-6.
89. Marty, M., et al., Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Ann Oncol*, 2001. 12(11): p. 1643-9.
90. Cragg GM, N.D., Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol.*, 2005: p. 100(1-2):72-9.
91. Bunn, P.A., Jr. and K. Kelly, New chemotherapeutic agents prolong survival and improve quality of life in non-small cell lung cancer: a review of the literature and future directions. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(5): p. 1087-100.
92. American Type Culture Collection Manassas. VA 20108 USA www.atcc.org.
93. Liu, K., et al., [Clinical comparison of GC regimen (gemcitabine and cisplatin) versus FEC regimen (fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide) as neoadjuvant chemotherapy for breast cancer]. *Ai Zheng*, 2007. 26(4): p. 427-30.
94. Briest S, S.V., Neoadjuvant Therapy. In *Early Diagnosis and treatment of Breast cancer*. Jacobs L, finlayson CA(eds) Saunders- Elsevier, 2011: p. 261-79.
95. Fisher, B., et al., Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol*, 1997. 15(7): p. 2483-93.
96. Cohen, J.J., Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 103(4): p. 548-54.
97. Kawasaki, H., et al., Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res*, 1998. 58(22): p. 5071-4.
98. Takai, N., et al., Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett*, 2002. 184(1): p. 105-16.
99. Altieri, D.C., Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(1): p. 46-54.

100. Olie, R.A., et al., A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*, 2000. 60(11): p. 2805-9.
101. Telli, M.L. and R.W. Carlson, First-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2009. 9 Suppl 2: p. S66-72.
102. Fumoleau, P., et al., Phase II trial of weekly intravenous vinorelbine in first-line advanced breast cancer chemotherapy. *J Clin Oncol*, 1993. 11(7): p. 1245-52.
103. Vogel, C., et al., Vinorelbine as first-line chemotherapy for advanced breast cancer in women 60 years of age or older. *Ann Oncol*, 1999. 10(4): p. 397-402.
104. Romero, A., et al., Vinorelbine as first-line chemotherapy for metastatic breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1994. 12(2): p. 336-41.
105. Sorio, R., et al., Pharmacokinetics and tolerance of vinorelbine in elderly patients with metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*, 1997. 33(2): p. 301-3.
106. Murray, N., et al., Advanced breast cancer: diagnosis and treatment. National Institute for Health and Clinical Excellence Guideline 2009 - a solid basis for good clinical practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2009. 21(5): p. 368-70.
107. Le Chevalier, T., et al., Randomized study of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: results of a European multicenter trial including 612 patients. *J Clin Oncol*, 1994. 12(2): p. 360-7.
108. Wozniak, A.J., et al., Randomized trial comparing cisplatin with cisplatin plus vinorelbine in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 1998. 16(7): p. 2459-65.
109. Burstein, H.J., et al., Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol*, 2003. 21(15): p. 2889-95.
110. Bertram G. Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, 9. Edition. Singapore: The McGraw-Hill Companies, 2004: p. 898-931.
111. Cleator, S., W. Heller, and R.C. Coombes, Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*, 2007. 8(3): p. 235-44.
112. Crown, J., et al., Chemotherapy for metastatic breast cancer-report of a European expert panel. *Lancet Oncol*, 2002. 3(12): p. 719-27.

ÖZGEÇMİŞ

Adem YAVAŞ, 15.01.1987'de Aydın' da doğdu. İlköğrenimini Aydın Gazipaşa İlköğretim Okulunda (1993-2001), lise öğrenimini burslu olarak Aydın Özel Yesevi Kolejinde (2001-2005) tamamladı. 2010 Ocak ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesinden Kimyager olarak mezun oldu. 2011 Ocak ayında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.