



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSER MODELİNDE REKOMBİNANT HEAT
SHOCK-90 PROTEİNİ İLE İMMUNİZASYONUN ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Veteriner Hekim Adem MİLLETSEVER

DOKTORA TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Burdur-2024

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSER MODELİNDE REKOMBİNANT HEAT
SHOCK-90 PROTEİNİ İLE İMMUNİZASYONUN ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Veteriner Hekim Adem MİLLETSEVER

DOKTORA TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma “Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından “0877-DR-23” proje numarası ile desteklenmiştir.

Burdur-2024

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Adem MİLLETSEVER tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan “*Meme Kanseri Modelinde Rekombinant Heat Shock-90 Proteini İle İmmünizasyonun Etkilerinin Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Patoloji Anabilim Dalında *Doktora Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 16/08/2024

Prof. Dr. Ahmet AYDOĞAN
Çukurova Üniversitesi Ceyhan
Veteriner Fakültesi

Başkan

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi

Jüri

Doç. Dr. İ. Taci CANGÜL
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Jüri

Doç. Dr. Volkan İPEK
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi

Jüri

Doç. Dr. Hidayet TUTUN
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi

Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve doktora eğitimim sürecinde bana yol gösteren, rehber olan, bilgilerini aktaran, her zaman destek olan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım, kendisini manevi annem olarak gördüğüm, akıl hocam değerli tez danışmanım Veteriner Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özlem ÖZMEN hocama teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim süresince akademik ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana öğrettikleri her bilgi ve deneyim için değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ, Doç. Dr. Volkan İPEK ve Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ'ye çok teşekkür ederim. Doktora eğitimim sürecinde her zaman bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini her zaman paylaşan, kendisini tanıdığım için hep mutlu olduğum canım arkadaşım ve kıymetli meslektaşım Öğr. Gör. Leyla Elif Özgü AYÖZGER'e çok teşekkür ederim. Deney süreci ve laboratuvar çalışmalarında tecrübe ve bilgilerini paylaşan, bu süreçte yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Uğur ŞAHİN, Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER ve değerli asistanlarına teşekkür ederim. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi sorumlu veteriner hekimi Simge GARLI'ya deney sürecinde yardımları için teşekkür ederim. 0877-DR-23 No'lu proje ile tezimin maddi desteğini sağlayan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Bugünlere ulaşmamı sağlayan, sevgisini kalbimde hep hissettiğim ve hissedeceğim, ömrümün her anında, her zaman desteğini ve emeğini hiç esirgemeyen, hakkını asla ödeyemeyeceğim canımdan çok sevdiğim annem Hatice CAN'a sonsuz teşekkür ederim.

ETİK BEYANI

“Meme Kanseri Modelinde Rekombinant Heat Shock-90 Proteinini İle İmmünizasyonun Etkilerinin Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özlem ÖZMEN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Adem MİLLETSEVER

Tarih: 16/08/2024

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
TÜRKÇE ÖZET	xii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme	3
2.1.1. Meme Bezi Anatomisi	3
2.1.2. Meme Bezi Histolojisi	4
2.2. Meme Kanseri	5
2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	5
2.2.2. Meme Kanserinde Genetik Predispozisyon	6
2.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	6
2.2.4. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırması	7
2.2.5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması	8
2.2.6. Meme Kanserinde Terapötik Yaklaşımlar	10
2.2.7. Meme Kanseri Mikro Çevresi	11
2.2.8. Tümörlerin Bağışıklıktan Kaçış Mekanizmaları	13
2.3. Rekombinant DNA Teknolojisi	14
2.4. Isı Şoku Proteinleri (Heat Shock Protein-HSP)	16
2.4.1. HSP90	18
2.4.2. Kanser Gelişiminde HSP90	21
2.5. Ki-67	23
2.6. PCNA	24
2.7. CD31 (Trombosit Endotel Hücre Adezyon Molekülü)	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. HSP90'ın Rekombinant Olarak Üretilmesi	25
3.1.1. Plazmid İzolasyonu	25
3.1.2. Kompetent Hücre Hazırlama	25
3.1.3. Plazmid Transformasyonu	26
3.1.4. IPTG ile Protein İndüksiyonu Deneyi	26
3.1.5. İndüksiyon Testi	26
3.1.6. Protein Saflaştırması (Purifikasyon)	27
3.2. Deney Modelinin Oluşturulması için Hücrelerin Hazırlanması	27
3.3. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerinin Farelere Enjeksiyonu ile Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması	28
3.4. DeneySEL Tasarım ve Deney Hayvanlarının Bakımı	29

3.5. Fare Ağırlıklarının Takibi	30
3.6. Tümör Boyutlarının Ölçümü	31
3.7. Primer Tümör Ağırlıklarının Ölçümü	32
3.8. Histopatolojik Değerlendirme	32
3.8.1. Dokuların İşlenmesi	32
3.8.2. Hematoksilen-Eozin Boyama	33
3.8.3. Tümörlerin Nekroz Yüzdesi	34
3.9. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	34
3.9.1. Boyama Protokolü	35
3.9.1.1. Isıtma ve Deparafinize Etme	35
3.9.1.2. Antijen Retrieval	35
3.9.1.3. İmmunohistokimyasal Boyama	36
3.9.2. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi	37
3.9.2.1. Ki-67 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	38
3.9.2.2. CD31 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	38
3.9.2.3. PCNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	39
3.9.2.4. HSP90 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	39
3.10. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile mRNA Ekspresyonu	39
3.10.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması	39
3.10.2. RNA İzolasyonu	40
3.10.3. cDNA Sentezi	40
3.10.4. Primer Dizaynı	41
3.10.5. Primerlerin Optimizasyonu	42
3.10.6. Primer Ara Stok Hazırlanışı	42
3.10.7. Real-time qPCR	42
3.10.8. Rölatif Kantitasyon Hesaplanması	43
3.11. İstatistiksel Değerlendirme	44
 4. BULGULAR	 45
4.1. Makroskobik Bulgular	45
4.2. Primer Tümör Ağırlıkları, Günlük Hacim Değişimleri ve Canlı Ağırlık Analizi	47
4.3. Histopatolojik Bulgular	51
4.4. Primer Tümörün Nekroz Yüzdesi	55
4.5. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi	56
4.5.1. Ki-67 Ekspresyonu	56
4.5.2. CD31 Ekspresyonu	61
4.5.3. PCNA Ekspresyonu	66
4.5.4. HSP90 Ekspresyonu	71
4.6. Real-Time PCR Reaksiyonu ile HSP90 mRNA Ekspresyonu	76
 5. TARTIŞMA	 78
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Meme kanserinin histolojik sınıflandırması	8
Şekil 3.1.	Meme kanseri modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi	31
Şekil 4.1.	Çalışma gruplarının tümör kitlelerinin makroskopik görünümü	46
Şekil 4.2.	Gruplar arasında primer tümör hacim ortalamalarının ilk (7. gün) ve son (29. gün) ölçüm oranları	48
Şekil 4.3.	Tümör hacmi ilk ve son ölçüm ortalamaları analizi sonuçları	48
Şekil 4.4.	Primer tümör ağırlıkları analiz sonuçları	49
Şekil 4.5.	Hayvanların canlı ağırlıkları	50
Şekil 4.6.	Hayvanların canlı ağırlık değişimleri	50
Şekil 4.7.	Korelasyon analizleri	51
Şekil 4.8.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	52
Şekil 4.9.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	52
Şekil 4.10.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	53
Şekil 4.11.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	53
Şekil 4.12.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	54
Şekil 4.13.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	54
Şekil 4.14.	Primer tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü	55
Şekil 4.15.	Primer tümör nekroz oranlarının gruplar arasındaki istatistik sonuçları	56
Şekil 4.16.	Tümör grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	57
Şekil 4.17.	0,5 µg HSP90 tedavi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	57
Şekil 4.18.	1 µg HSP90 tedavi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	58
Şekil 4.19.	0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	58
Şekil 4.20.	1 µg HSP90 profilaksi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	59
Şekil 4.21.	Çalışma gruplarının tümör dokularına ait Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü	60
Şekil 4.22.	Primer tümör hücrelerinin Ki-67 ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları	61
Şekil 4.23.	Tümör grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	62
Şekil 4.24.	0,5 µg HSP90 tedavi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	62
Şekil 4.25.	1 µg HSP90 tedavi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	63
Şekil 4.26.	0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	63
Şekil 4.27.	1 µg HSP90 profilaksi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	64

Şekil 4.28	Çalışma gruplarının tümör dokularına ait CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü	65
Şekil 4.29.	Primer tümör hücrelerinin CD31 ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları	66
Şekil 4.30.	Tümör grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	67
Şekil 4.31.	0,5 µg HSP90 tedavi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	67
Şekil 4.32.	1 µg HSP90 tedavi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	68
Şekil 4.33.	0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	68
Şekil 4.34.	1 µg HSP90 profilaksi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	69
Şekil 4.35.	Çalışma gruplarının tümör dokularına ait PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü	70
Şekil 4.36.	Primer tümör hücrelerinin PCNA ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları	71
Şekil 4.37.	Tümör grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	72
Şekil 4.38.	0,5 µg HSP90 tedavi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	72
Şekil 4.39.	1 µg HSP90 tedavi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	73
Şekil 4.40.	0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	73
Şekil 4.41.	1 µg HSP90 profilaksi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	74
Şekil 4.42.	Çalışma gruplarının tümör dokularına ait HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü	75
Şekil 4.43.	Primer tümör hücrelerinin HSP90 ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları	76
Şekil 4.44	Çalışma gruplarında HSP90 mRNA ekspresyon rölatif miktarları	77

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Meme kanseri moleküler sınıflandırması	9
Tablo 3.1.	Deney grupları ve detaylı olarak yapılan uygulamalar	28
Tablo 3.2.	Deney grupları ve yapılan uygulamalar	29
Tablo 3.3.	Tam otomatik doku takip cihazı solüsyonları ve uygulama süreleri	32
Tablo 3.4.	Tamponlu formalin solüsyonunun hazırlanışı	32
Tablo 3.5.	Tümör dokularının immunohistokimyasal boyamalarında kullanılan antikorlar hakkında bilgiler	34
Tablo 3.6.	Sitrat tamponu hazırlama	36
Tablo 3.7.	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (0.01 M, pH 7.2)	37
Tablo 3.8.	Master miks hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar	41
Tablo 3.9.	Thermal cycler protokolü	41
Tablo 3.10.	Real-Time qPCR analizi için yapılan primer dizaynlar	42
Tablo 3.11.	Real-Time qPCR analizi için master miks hazırlanması	43
Tablo 3.12.	PCR protokolü	43
Tablo 4.1.	Real-Time PCR HSP90 mRNA ekspresyon miktar tayini	77

SİMGELER ve KISALTMALAR

µg	Mikrogram
ADH	Atypical Ductal Hyperplasia (Atipik kanal hiperplazisi)
ALH	Atypical lobular hyperplasia (Atipik lobüler hiperplazi)
ALND	Aksiller Lenf Nodu Diseksiyonu
APC	Antigen-Presenting Cell (Antijen sunan hücre)
ATP	Adenozin Trifosfat
BCS	Breast-Conserving Surgery (Meme koruyucu cerrahi)
BRCA	Breast Cancer Gene (Meme kanseri geni)
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır serum albumin)
CaCl₂	Kalsiyum Klorür
CD	Cluster of Differentiation (Başkalaşım kümesi)
CD31	Cluster of Differentiation 31 (Trombosit endotel hücre adezyon molekülü)
cDNA	Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
CL	Claudin (Klaudin)
CO₂	Karbondioksit
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (Sitotoksik T lenfosit)
DAB	3,3'-Diaminobenzidine (3,3' Diaminobenzidin)
DC	Dendritic Cell (Dendritik hücre)
dH₂O	Deiyonize Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extracellular Matrix (Ekstrasellüler matriks)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Etilendiamintetraasetik asit)
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition (Epitel mezenkimal geçiş)
ER	Estrogen Receptor (Östrojen reseptörü)
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (Hanks'ın dengeli tuz çözeltisi)
HCl	Hydrochloric Acid (Hidroklorik asit)
HEPES	Hydroxyethyl Piperazine Ethanesulfonic Acid
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor (İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü)
HRP	Horseradish Peroxidase (Yabanturpu peroksidaz)
HSP	Heat Shock Protein (Isı şoku proteini)
IFN-γ	İnterferon-Gamma
IL	İnterlökin
IPTG	Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside (İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit)
KH₂PO₄	Potasyum Fosfat Monobazik
Ki-67	Proliferasyon Kiel 67 (Hücre proliferasyon düzenleyicisi)
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells (Myeloid-türevli baskılayıcı hücreler)
ml	Mililitre

mM	Milimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase (Matriks metalloproteinaz)
Na₂HPO₄	Sodyum Fosfat Dibazik
NAC	Neoadjuvant Chemotherapy (Neoadjuvan kemoterapi)
NaCl	Sodyum Klorür
NaH₂PO₄H₂O	Sodyum Fosfat Monobazik Monohidrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NF- κB	Nükleer Faktör Kappa B
NK	Natural Killer Cell (Doğal öldürücü hücre)
p53	Tumor Protein P53 (Tümör Protein 53)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponlu salin)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen (Prolifere olan hücre çekirdek antijeni)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Trombosit endotel hücre adezyon molekülü)
PR	Progesteron Reseptörü
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT	Radiation Therapy (Radyoterapi)
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez)
TDLU	Terminal Duct Lobular Unit (Terminal duktal lobuler ünite)
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocytes (Tümör infiltre eden lenfositler)
TME	Tumor Microenvironment (Tümör mikro çevresi)
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer (Üçlü negatif meme kanseri)
Tregs	Regulatory T Cells (Regülatör T hücreleri)
μl	Mikro Litre

ÖZET

Meme Kanseri Modelinde Rekombinant Heat Shock-90 Proteini ile İmmunizasyonun Etkilerinin Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerde önemli yer tutan bir hastalıktır. Hastalığın gelişimi ve progresyonu, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimleri sonucunda gerçekleşir. Bu süreçte, hücrel stres yanıtında kritik rol oynayan şaperon proteinleri, kanser hücrelerinin hayatta kalma ve proliferasyonunda önemli bir yer tutar. Heat Shock Protein 90 (HSP90), bu şaperon proteinlerinden biri olup, hücre içinde protein katlanması, stabilizasyonu ve degradasyonunda görev alır. HSP90, normal hücrel süreçlerde yer almasının yanı sıra, kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilerek tümör gelişimi ve çoğalmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, HSP90'ın inhibisyonu ve hedeflenmesi, kanser tedavisinde yeni ve umut verici bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada üçlü negatif fare meme kanseri hücre hattı kullanılarak oluşturulan fare meme kanseri modelinde rekombinant protein teknolojisi ile elde edilen HSP90 ile immunizasyonun meme kanserine karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlandı. Araştırmada toplam 80 adet BALB/c dişi fare kullanıldı. 0,5 µg HSP90 grubu, 1 µg HSP90 grubu, kontrol grubu, tümör grubu, 0,5 µg HSP90 proflaksi grubu, 1 µg HSP90 proflaksi grubu, 0,5 µg HSP90 tedavi grubu, 1 µg HSP90 tedavi grubu olmak üzere 8 grup (n: 10) oluşturuldu. Proflaksi gruplarına tümör inokülasyonundan 28 gün önce haftada 1 kez ve sonrasında 4 defa HSP90 uygulandı. Tedavi gruplarına tümör enjeksiyonu ile aynı anda ve haftada 1 kez olmak üzere 4 defa deri altı HSP90 uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı. Tümör grubuna tümör hücresi enjeksiyonu yapıldı ve HSP90 enjeksiyonları ile eş zamanlı olarak deri altı serum fizyolojik uygulandı. Deneysel aşama tümör inokülasyonundan sonraki 29. günde sonlandırıldı. Farelerin tümör dokuları toplandı. Tümöral kitleler makroskopik olarak incelendi, tümör ağırlıkları, tümör boyutları ve tümör hacmi belirlendi. Kitlelerden, histopatolojik, immunohistokimyasal ve real time-polimeraz zincir reaksiyonu incelemeleri için örnekler alındı. Makroskopik olarak primer tümörler, 0,5-2 cm çap aralığında, ovalden silindire değişen şekillerdeydi. 0,5 µg HSP90 proflaksi grubunda, primer tümör hacmi, primer tümör ağırlığı ve PCNA ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Terapötik ve proflaktik uygulama yapılan gruplarda Ki-67 ekspresyonlarının azaldığı dikkati çekti. Tedavi gruplarında CD31 ve HSP90 ekspresyonlarının azaldığı saptandı. Elde edilen bulgular, rekombinant HSP90 ile yapılan terapötik ve proflaktik immunizasyonun meme kanseri modelinde meme tümörü proliferasyonunu, anjiyogenezisi, metastazı azaltabileceği ve önemli antitümöral etkiler oluşturduğunu gösterdi. Bu sonuçlar, HSP90'ın meme kanseri tedavisinde potansiyel bir immunoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini prognozu iyileştirebileceğini ve hayatta kalma oranını artırabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: 4T1, Anjiyogenezis, HSP90, Meme kanseri, Proliferasyon

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Recombinant Heat Shock Protein-90 Immunization on a Breast Cancer Model Using Molecular Methods

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and a leading cause of cancer-related mortality among women. The development and progression of this disease result from complex interactions between genetic and environmental factors. During these processes, chaperone proteins, which play critical roles in cellular stress responses, are essential for the survival and proliferation of cancer cells. Heat Shock Protein 90 (HSP90) is one of these chaperone proteins, responsible for protein folding, stabilization, and degradation within the cell. In addition to its role in normal cellular processes, HSP90 is overexpressed in cancer cells, contributing significantly to tumor development and progression. Therefore, the inhibition and targeting of HSP90 is considered a promising new strategy in cancer therapy. This study aims to investigate the protective and therapeutic effects of immunization with recombinant HSP90 against breast cancer in a mouse model of triple-negative breast cancer. A total of 80 female BALB/c mice were used in this study. Eight groups (n=10) were established: 0.5 µg HSP90 group, 1 µg HSP90 group, control group, tumor group, 0.5 µg HSP90 prophylactic group, 1 µg HSP90 prophylactic group, 0.5 µg HSP90 therapeutic group, and 1 µg HSP90 therapeutic group. The prophylactic groups received HSP90 once a week for 4 weeks, starting 28 days before tumor inoculation. The therapeutic groups received subcutaneous HSP90 simultaneously with tumor injection, followed by once-weekly injections for 4 weeks. The control group received no treatment, while the tumor group received tumor cell injection and simultaneous subcutaneous saline injections along with HSP90 injections. The experimental phase concluded on the 29th day after tumor inoculation. Tumor tissues were collected from the mice. Tumor masses were examined macroscopically, and tumor weights, dimensions, and volumes were determined. Samples were taken for histopathological, immunohistochemical, and real-time polymerase chain reaction analyses. Macroscopically, primary tumors ranged from 0.5 to 2 cm in diameter, with shapes varying from oval to cylindrical. In the 0.5 µg HSP90 prophylactic group, primary tumor volume, primary tumor weight, and PCNA expression were reduced. Decreased Ki-67 expression was noted in both therapeutic and prophylactic groups. CD31 and HSP90 expressions were reduced in the therapeutic groups. The findings suggest that therapeutic and prophylactic immunization with recombinant HSP90 can reduce breast tumor proliferation, angiogenesis, and metastasis in a breast cancer model, demonstrating significant antitumor effects. These results indicate that HSP90 may be used as a potential immunotherapeutic agent in breast cancer treatment, potentially improving prognosis and increasing survival rates.

Keywords: 4T1, Angiogenesis, Breast cancer, HSP90, Proliferation

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde en sık teşhis edilen kanser tipidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün istatistiklerine göre 2020 yılında meme kanserleri, tüm kanser vakalarının %11,7'sini oluşturmuştur (Nardin ve ark., 2020). Bu kanserlerin yaklaşık %10'u kalıtsaldır ve aile öyküsü ile ilişkilidir (Shiovitz ve ark., 2015). Meme kanseriyle ilişkilendirilen en iyi bilinen genetik mutasyonlar, BRCA1 (Meme ve yumurtalık kanseri yatkınlık geni) ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardır (Kuchenbaecker ve ark., 2017). Meme kanserinin gelişimine katkıda bulunan çok sayıda risk faktörü bilinmektedir. Bunlar arasında cinsiyet, yaş ve ekonomik düzey, hormonal faktörler, genetik faktörler, diyet, çevresel etmenler ve obezite yer alır. Meme tümörlerinin histolojik sınıflandırması tümörün meme epiteliyal bileşeni ile sınırlı ya da stromaya invaze olma durumuna ve tümörün kanal veya bez epitellerinden kaynaklanmış olma durumuna göre yapılır (Henry ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2016). Meme tümörünün moleküler sınıflandırması ise Luminal A, Luminal B, HER2⁺ (*human epidermal growth factor receptor-2*), ve üçlü negatif meme kanseri (*triple-negative breast cancer-TNBC*) olarak yapılır (Harbeck ve ark., 2019). Meme kanseri tedavileri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi (RT), hormonal tedavi, hedefe yönelik ilaçlar ve immün tedavi bulunmaktadır (Cardoso ve ark., 2019). Meme kanseri, çeşitli benign hücre tiplerini ve hücre dışı matriksi içeren karmaşık bir mikro çevrede gelişir. En çok bulunan hücre türü kanserle ilişkili fibroblastlardır. Ancak meme kanseri mikro çevresi aynı zamanda lökositleri de içerir (Ruffell ve ark., 2012).

Tümör gelişimi ve sağkalımı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte bağışıklık sisteminin önemli etkileri bulunur. Bağışıklık sistemi, tümör büyümesine hem katkı sağlar hem de baskılar. Bu nedenle tümör gelişiminde dengeyi korumada kritik bir rol oynar (Dunn ve ark., 2002). Kanser hücreleri şans eseri veya bağışıklık sistemi kaynaklı yangıya yanıt olarak mutasyonel değişiklikleri sürdürerek bölünmeye devam eder. Böylece immün kontrol ile tümör büyümesi arasındaki denge korunur (Sawnn ve Smyth, 2007). Ancak tümörler, immün sistemi baskılayıcı etkilerle veya hedef antijen ekspresyonunun kaybıyla immün sisteminin tümörleri ortadan kaldırma kapasitesini bozar. Bu aşamada tümör kaçışı meydana gelir (Shay ve Roninson, 2004).

HSP'ler, strese veya yüksek sıcaklığa yanıt olarak hücresel proteinlerin denatürasyonunu, açılmasını tersine çevirme veya engelleme ile yapısal ve işlevsel bütünlüğünü koruma fonksiyonu gören bir protein grubudur. Hücreler aşırı sıcaklık, anoksi, hipoksi ve stres gibi homeostatik zorluklara maruz kaldıklarında, protein katlanmasını, diğer proteinlerin doğal yapılarının ve işlevlerinin korunmasını kolaylaştırırlar (Malyshev, 2013; Ritossa, 1962). HSP'ler genellikle moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılır ve çoğunluğu HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve büyük HSP'ler olarak gruplara ayrılır (Pirkkala ve Sistonen, 2006). Apoptozis, nekroptoz, otofaji, epitel-mezenkimal geçiş (*epithelial to mesenchymal transition-EMT*), lipid metabolizması ve tümör bağışıklığının düzenlenmesinde rol oynarlar. Ayrıca anjiyogenezis, hücre proliferasyonu, hücre göçü, invazyon ve metastaz gibi süreçleri etkileyerek tümör büyümesini ve gelişimini desteklerler (Albakova ve Mangasarova, 2021). HSP90 proteinleri, apoptozis, hücre döngüsü kontrolü, hücre canlılığı, protein katlanması ve bozulması, sinyal olayları gibi temel hücresel süreçlerde ve düzenleyici yollarda yer alır (Whitesell ve Lindquist, 2005). Önemli olarak, HSP90'ın aşırı ekspresyonu, çeşitli kanser türleri, viral enfeksiyonlar, yangı ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durumla bağlantılıdır ve birçok hastalığın patogenezisinde potansiyel bir rol oynar (Geller ve ark., 2012; Luo ve ark., 2010). Konağın bağışıklık sisteminin temel düzenleyicileri arasındadır (Doody ve ark., 2004). Ayrıca insan meme kanserinin proliferasyonuna katkıda bulunurlar (Yano ve ark., 1999). HSP90 inhibitörleri anjiyogenezisi azaltır, kanser hücrelerinde EMT, motilite ve invazyon inhibisyonuna yol açar (Nagaraju ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında, farelerde üçlü-negatif meme kanseri (TNBC) hücre hatları olan 4T1 hücreleri kullanılarak oluşturulan fare meme kanseri modelinde rekombinant olarak elde edilen HSP90 ile immunizasyonun proflaktik ve terapötik etkileri değerlendirilerek, bu uygulamanın tümör hücrelerinin proliferasyon aktivitelerine, metastaza ve anjiyogenezise etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme

2.1.1. Meme Bezi Anatomisi

Meme bezleri, tüm memeli yavrularının beslenmesi için süt üretimi amacıyla biyolojik ve yapısal olarak dizayn edilmiştir. Embriyonik dönemde boyun bölgesi ve kasık bölgesi boyunca bilateral olarak ektodermal kalınlaşmalar ve hücre göçleri sırasında farklılaşır. Bu hat boyunca süt tomurcukları belirgin kalınlaşmalar ve meme yağ yastığına uzanan dallanmış bir kanal sistemi oluşturur (Hurley ve Loo, 2011; Richert ve ark., 2000).

İnsanlarda iki adet çift taraflı simetrik meme bezi bulunur. Bu bezler pectoralis majorun üzerindeki anterior torasik duvarın yüzeysel fasyasında yer alır ve aksillaya kadar yukarı doğru uzanır. Tubüloalveolar yapıdaki ekzokrin bezler süt üretimi sağlar. Embriyonik gelişim sırasında oluşan kanallar, fibrokollajenöz stroma içine gömülmüş glandüler dokudan oluşan 15-20 ayrı lob oluşturacak şekilde meme başından segmental olarak dallanma düzeninde uzanır. Bu loblar yağ doku ile birbirinden ayrılır. Her lob, kendi süt kanalıyla meme ucuna drene olur. Cooper bağları adı verilen askı bağları derin fasiya ile dermisin birleşmesiyle oluşan bağ dokunun fibröz kalınlaşmalarıyla görülen bir destek dokudur. Ayrıca hareketlilik sağlar ve malignite durumlarında derideki çukurlaşma ve büzüşmeden sorumludur. Bu yapı kemirgenlerde mevcut değildir. Memenin asıl fonksiyonel birimi olan lobuluslara, terminal duktal lobuler ünite (TDLU) denir. Her bir insan meme bezi lobunda, ana toplayıcı kanal, ekstralobüler terminal kanalları oluşturur ve bu kanallar daha da dallanarak TDLU'ya kadar uzanır. TDLU'nun terminal kanalları, 10-100 arasında değişen sayıda asiniden oluşan bir lobül oluşturur. Oluşan yapı, bir üzüm salkımını andırır (Cardiff ve ark., 2017; Hurley ve Loo, 2011).

Farelerde, boyun ile perianal bölge arasındaki karın altı süt hattı boyunca beş çift meme bezi bulunur. Meme bezleri servikal-torakal bölgede 3 çift ve abdominal-inguinal bölgede 2 çift olarak ayrılır. Farelerde meme bezi tek sinüs içerir. Tek sinüs doğrusal olarak meme yağ yastığına doğru büyüyen 5-10 sekonder kanal oluşturur.

Kanalların meme yağ yastığına uzanması puberte döneminde oluşur. Kanal büyümesi ve olgunlaşması terminal uç tomurcukları sayesinde gerçekleşir. Gebelikte terminal uç tomurcukları kanallar boyunca asiner tomurcuklar olarak şekillenir ve lümen epiteli gelişerek süt üretimi sağlanır. Yetişkin dişi farede meme, lobüloalveoler gelişme olmaksızın, terminal kanal adında kör bir kanalla sonlanır. Farelerde lobüloalveoler gelişim sadece gebelik sırasında meydana gelir ve genellikle süttten kesme ve involüsyonu takiben devam etmez (Cardiff ve ark., 2017; Hurley ve Loo, 2011; Richert ve ark., 2000).

2.1.2. Meme Bezi Histolojisi

Meme bezi, dallanan tubuler kanallardan oluşan ve sekretuar bez asinileriyle (veya alveollerle) sonlanan bileşik bir tubüloalveolar morfolojiye sahiptir. Lobüller, asinilerin gruplarını içerir. Daha büyük lob içinde birden çok lobül bulunur. Meme bezinin temel süt üretim birimi TDLU'dur. Bir TDLU, bir lobül ile ilişkili intralobüler ve ekstralobüler terminal kanallardan oluşur. TDLU'lar, intralobüler ve ekstralobüler terminal kanallara, toplayıcı kanallara ve en sonunda meme başlarının ostialarından (çıkışlar) süt kanallarına drene olur. Etrafındaki yoğun, interlobüler bağ dokusundan farklı olan gevşek, intralobüler bağ dokusu matriksine gömülüdür (Cardiff ve ark., 2017; Richert ve ark., 2000; Scudamore, 2014).

Dişi kemirgenlerde ve insanlarda, meme bezi asinileri, laktasyon sırasında işlevsel sekretuar hücre olan bir veya iki katmanlı kuboidal epiteliyal hücrelerle kaplanmıştır. Mitokondri, ribozom, lipid damlacıkları ve sekretuar vakuollerin sayısındaki farklılıklara göre bu epiteliyal hücreler değişir. Farelerde gebelikte, epiteliyal hücrelerin hızlı ve küresel proliferasyonları, kanal dalları ve gelişmekte olan alveoller içinde meydana gelir. Bu, yeterli süt üretimi için gerekli epiteliyal hücre sayısını ve epiteliyal yüzey alanını arttırır. Gelişmekte olan alveoller ayrılır, alveolar hücreler polarize olur ve küçük bir kanal aracılığıyla kanal ağına bağlı olan dairesel bir lümeni saran küresel tek sıralı epiteliyal hücre tabakasını oluşturur. Her bir alveol, kontraktil mioepiteliyal hücrelerle çevrilidir. Sekretuar aktivasyonla birlikte epiteliyal genişleme gerçekleşir. Adipositler lipid içeriklerini kaybederler. Stroma içinde büyük bir damar genişlemesi meydana gelir. Süttten kesilme sonrasında

involüsyon evresine girilerek alveollerde programlı hücre ölümü gerçekleşir. Böylece gebelik öncesi döneme geri dönülür (Cardiff ve ark., 2017; Richert ve ark., 2000; Scudamore, 2014).

İnsanlarda histolojik olarak meme bezi, glandüler ve bağ dokusu bileşenlerinden oluşur. Glandüler bileşen, iki hücre tabakasıyla kaplı bir duktal-lobüler sistemden oluşur. TDLU memenin temel fonksiyonel ünitesidir. Meme bezi epitel tabakasını iki farklı hücre tipi oluşturur. Luminal küboidal hücreler iç kısmı meydana getirir ve süt kanallarını sıralar. Bu kanallar meme başından yayılır ve areolanın hemen altındaki sinüslere doğru genişler. Süt kanallarının daha fazla bölünmesi, loblara ve lobüllere yol açar. Çift tabakanın dış kısmı miyoepitelial hücrelerden oluşur. İğ şeklindeki bu hücreler düz kas hücresi özelliklerine sahiptir ve sütün dışarı atılmasını sağlar. Meme bezi yağ bileşeni, meme bezinin stromal yağ yastığının büyük bir bölümünü meydana getirir. Yağ dokusu, epitelial büyüme, hücresel iletişim, anjiyogenezis ve süt üretimine katılarak meme bezinin homeostazını aktif bir şekilde düzenler. Fibroblastlar ayrıca meme stromasının önemli bileşenleridir. Bu hücreler genellikle epitelial dallanmanın bazal kısmında yer alır. Büyüme faktörü sentezi, metalloproteinaz üretimi ve hücre dışı matriks birikimi de dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Meme dokusunun histolojisi yaşa, menstrual döngüye ve hormonal etkilere göre aktif olarak değişir ve bu nedenle çok çeşitli görünüm sergiler (Archana, 2023; Cardiff ve ark., 2017; Richert ve ark., 2000; Scudamore, 2014).

2.2. Meme Kanseri

2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünya genelinde en sık teşhis edilen kanserdir, bunun ardından ikinci sırayı akciğer kanseri alır. Dünya Sağlık Örgütü'nün istatistiklerine göre, 2020'de yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası tespit edilmiş ve bu rakam tüm kanser vakalarının %11,7'sini oluşturmuştur. Bu vakalardan 684.996'sında ölüm gerçekleşmiştir (Nardin ve ark., 2020). Meme kanseri insidansı, mamografi taramasının yaygınlaşmasıyla artış göstermektedir. Modern tedavi stratejileri ve erken

teşhis nedeniyle meme kanseri mortalite oranı son yıllarda azalmıştır (Bellanger ve ark., 2018; Elmore ve ark., 2005). Batı ülkelerinde, meme kanserlerinin yaklaşık dörtte biri 50 yaşından önce ve sadece %5'i 35 yaşından önce teşhis edilmektedir (Francies ve ark., 2020). Yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde meme kanseri genellikle erken evrede teşhis edilir ve bu nedenle iyi bir prognoza sahiptir. Ancak, düşük ve orta gelir düzeyine sahip ülkelerde, genellikle daha ileri evrelerde teşhis edilir ve buna bağlı olarak daha kötü prognoz ve sağkalım oranları gözlenir (Allemani ve ark., 2015).

2.2.2. Meme Kanseri Genetik Predispozisyon

Meme kanserlerinin yaklaşık %10'u kalıtsaldır ve aile öyküsü ile ilişkilidir (Shiovitz ve ark., 2015). Bu sıklık ülkeler arasında değişkenlik gösterir. Birinci dereceden bir akrabasında meme kanseri olan bireylerin, 35 yaşından önceki erken başlangıçlı meme kanseri için yüksek bir relatif risk derecesi vardır (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2001). Meme kanseri aile öyküsü, ailenin büyüklüğü ve çevresel faktörler gibi farklı değişkenleri içerir. Meme kanseriyle ilişkilendirilen en iyi bilinen genetik mutasyonlar, BRCA1 (Meme ve yumurtalık kanseri yatkınlık geni) ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardır. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, sırasıyla 80 yaşına kadar meme kanseri geliştirme riskinin %72 ve %69'u ile ilişkilidir (Kuchenbaecker ve ark., 2017); BRCA2 mutasyon taşıyan erkeklerde meme kanseri riski %6'dır (Balmana ve ark., 2011; Paluch-Shimon ve ark., 2016). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının yaygınlığı, etnik gruplar arasında değişkenlik göstermektedir (Daly ve ark., 2015).

2.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

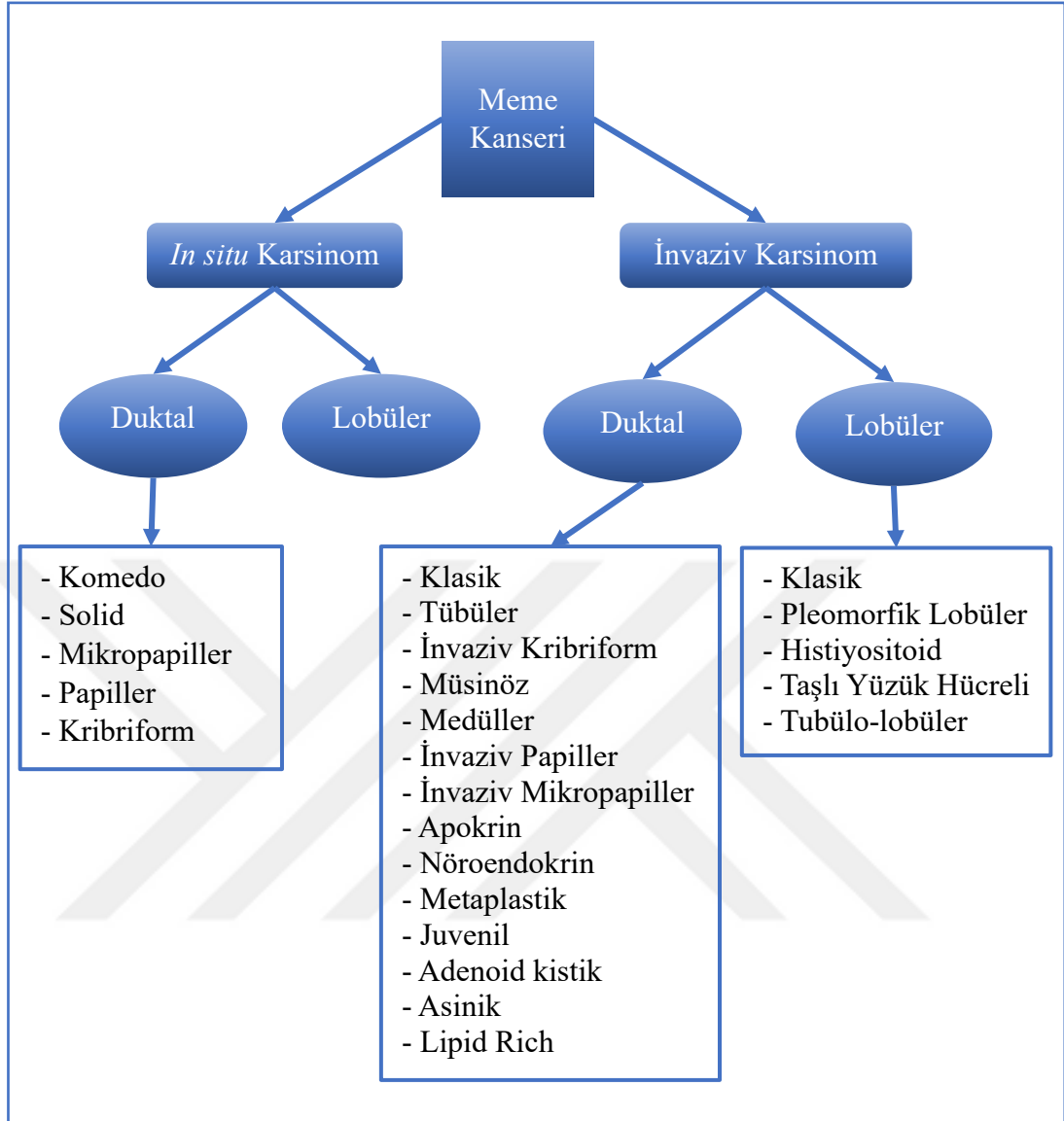
Meme kanserinin gelişimine katkıda bulunan birçok risk faktörü bilinmektedir. Yaşam tarzı, çevresel faktörler, cinsiyet, yaş, ekonomi, reproduksiyon ve memede hafif dereceli değişiklikler risk faktörleridir. Meme kanserinin neredeyse tamamı (%99) kadınlarda meydana gelmesi cinsiyetin önemli bir risk faktörü olmasını açıklar. Ancak, meme kanserinin erkeklerdeki insidansı, kadınlardaki gibi istikrarlı bir artış eğilimi göstermektedir (Lima ve ark., 2021). Yaş, meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Meme kanserinin insidansındaki artış tüm yaş gruplarında

görülür (Lima ve ark., 2021). Bir diğer risk faktörlerinden olan meme bezlerindeki benign değişikliklerin varlığı, meme kanseri geliştirme riskini arttırır. Bazı benign lezyonlar atipik kanal hiperplazisi (ADH) veya atipik lobüler hiperplazi (ALH), fibrotik adenom gibi proliferatif lezyonlar) riski iki kat arttırır. Yapılan çalışmalarda proliferasyon olmayan benign lezyonlara sahip kadınlar için meme kanseri geliştirme riski 1,27 iken proliferatif ancak atipik olmayan lezyonların varlığında, bu risk 1,88'e kadar yükselir. Meme kanseri geliştirme riski en yüksek grubu, atipik proliferatif lezyonlara (ADH, ALH veya her ikisi birlikte) sahip kadınlar oluşturmaktadır ve bu risk 4,24'e kadar yükselir (Abdel-Razeq ve ark., 2021; Hartmann ve ark., 2005).

Hormonal faktörler de en azından aynı derecede önemlidir. Hormonal faktörler içerisinde özellikle östrojenlere maruz kalma süresi ile meme kanseri gelişimi ilişkilidir. Meme kanserinin gelişiminde genetik faktörlere, hormon replasman tedavisi kullanımına, uygun olmayan diyet ve sonucunda obeziteye de büyük önem verilmektedir (Smolarz ve ark., 2022).

2.2.4. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırması

Meme kanseri histolojik olarak *in situ* karsinom ve invaziv karsinom olarak ikiye ayrılır. *In situ* karsinom potansiyel malign epiteliyal hücre proliferasyonudur. İnvaziv karsinom ise neoplastik hücrelerin stroma içine invazyonuyla karakterize olan malign anormal proliferasyondur. Kanser meme kanalından köken almışsa duktal karsinom; kanser lobülden köken almışsa lobüler karsinom olarak sınıflandırılır. Her iki tümör tipi de TDLU'dan köken alır (Henry ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2016). Meme kanserinin histolojik sınıflandırması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Meme kanserinin histolojik sınıflandırması (Henry ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2016).

2.2.5. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması

Meme kanserlerinin morfolojik sınıflandırması (mitotik indeks, histolojik derece ve yapısal özellikler) ve klinik patolojik parametreler (tümör boyutu, lenf düğümü tutulumu, metastaz) meme tümörü patofizyolojisi için yetersizdir (Masood ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda meme kanserinin gen ekspresyon paternlerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Böylece bireysel fenotip, hastalık prognozu ve sistemik tedavi planlama amacıyla meme kanseri alt tipleri ortaya konmuştur (Fragomeni ve ark., 2018; Perou ve ark., 2000). Kapsamlı gen ekspresyon çalışmalarına dayanarak,

dört moleküler alt tip ortaya çıkarılmıştır. Bunlar, Luminal A, Luminal B, HER2⁺ (*human epidermal growth factor receptor-2*), ve üçlü negatiftir (TN) (Harbeck ve ark., 2019). Meme kanseri moleküler alt tiplerinin ayırımında başlıca sorumlu gen grupları, östrojen reseptörleri (*estrogen receptor- ER*), progesteron reseptörleri (PR), HER2 ve hücre proliferasyon düzenleyicisi (*proliferation kiel 67-Ki-67*) ile ilgili genlerdir (Lukong, 2017). Meme kanserinin moleküler sınıflandırması Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Meme kanseri moleküler sınıflandırması

Moleküler Alt Tipler	Biyomarkırlar	Vakaların Sıklığı (%)	Histolojik Derece	Prognoz
Luminal A	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻ Düşük Ki67	40-50	İyi diferensiye (Derece I)	İyi
Luminal B (HER2⁻)	ER ⁺ PR ⁻ HER2 ⁻ Yüksek Ki67	20-30	Orta Diferensiye (Derece II)	Orta
Luminal B (HER2⁺)	ER ⁺ PR ^{-/+} HER2 ⁺ Düşük/Yüksek Ki67	20-30	Orta Diferensiye (Derece II)	Orta
HER2⁺	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺ Yüksek Ki67	15-20	Az Diferensiye (Derece III)	Zayıf
TN	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻ Yüksek Ki67	10-20	Az Diferensiye (Derece III)	Zayıf

ER: Östrojen reseptör; PR: Progesteron reseptör; HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2; TN: Üçlü negatif meme kanseri; Ki67: Hücre proliferasyon düzenleyicisi.

2.2.6. Meme Kanserinde Terapötik Yaklaşımlar

Meme kanseri tedavileri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi (RT), hormonal tedavi, hedefe yönelik ilaçlar ve immün tedavi bulunmaktadır. Ayrıca gen tedavisi, aşılar ve kimerik antijen reseptörü T hücre tedavisi gibi adaptif hücre terapileri gibi yenilikçi terapiler araştırılmaktadır (Cardoso ve ark., 2019; Senkus ve Lacko, 2017).

Cerrahi girişimler özellikle metastatik olmayan vakalarda standart bir yaklaşımdır ve kemoterapiye dayalı ameliyat öncesi sistemik tedavi memedeki tümör hacmini azaltır ve aksiller lenf nodu diseksiyonuna (ALND) olan ihtiyacı azaltır (Cardoso ve ark., 2019). Erken invaziv meme kanseri için meme koruyucu cerrahi (*Breast-conserving surgery-BCS*) ve mastektomi veya her ikisi de lokal tedavilerdir (van Maaren ve ark., 2019; Zumsteg ve ark., 2013). Bu nedenle çoğu meme kanseri için RT sonrası BCS, cerrahi standarttır. Klinik olarak lenf nodülü tutulumu olmayan hastalarda, aksiller lenf düğümlerin yönetimi hala tartışmalıdır. BCS alan hastalarda başlangıçta total mastektomi standarttır (Wilson ve ark., 1984; Zumsteg ve ark., 2013).

Meme kanserinde kemoterapi yöntemleri arasında neoadjuvan kemoterapi (NAC), adjuvan kemoterapi ve kurtarma kemoterapisi bulunmaktadır. Kemoterapinin uygulanması, erken meme kanserinde nüks riskini azaltır (Mano ve Awada, 2004). NAC, cerrahi uygulanabilir meme kanserinde meme ve aksiller lenf düğümünü küçülterek memenin korunmasını sağlar. Cerrahi uygulanamayan meme kanserini uzaklaştırılabilir hale getirir ve mikrometastazı ortadan kaldırır. NAC, birden fazla ALN tutulumu olan ve özellikle üçlü negatif ve HER2 pozitif meme kanseri için önerilir (Moo ve ark., 2018). Yüksek riskli hastalarda, lenf düğümü tutulumu, düşük hormon reseptörü ekspresyonu ve lenfovasküler invazyon gibi durumlarda NAC veya adjuvan kemoterapi (*adjuvant chemotherapy-AC*) uygulanmalıdır.

Adjuvan radyoterapi (RT), BCS alan hastalar için standart tedavidir. Total meme radyoterapisi, BCS sonrası adjuvan RT için kullanılan uygun bir seçenektir (Hughes ve ark., 2013; Kunkler ve ark., 2015). Kısmi meme RT'si düşük riskli hastalar için kabul edilebilir bir alternatiftir. Mastektomi uygulanan hastalarda, radyoterapi

uygulanıp uygulanmayacağı, etkilenen ALN sayısına göre belirlenir (Coles ve ark., 2017; Strnad ve ark., 2016).

Preoperatif endokrin terapi, HR-pozitif (ER veya PR) hastalar için adjuvan tedavi olarak standart kabul edilir (Du ve ark., 2021). Endokrin terapide seçici östrojen reseptör modülatörleri (Raloxifene, Tamoxifen) ve aromataz inhibitörleri (Anastrozole, Exemestane, Letrozole) uygulanır. Endokrin terapisinin duyarlılığı, hormon reseptörlerinin ekspresyonu ile doğrudan ilişkilidir. Neoadjuvan endokrin terapiden sonra AC uygulaması Ki67 ekspresyon seviyesine göre ayarlanır (Trayes ve Cokenakes, 2021).

2.2.7. Meme Kanseri Mikro Çevresi

Meme kanseri, çeşitli benign hücre tiplerini ve hücre dışı matriksi (tümör için mekanik destek sağlayan ve parakrin tarzda hücreler arası etkileşimi mümkün kılan) içeren karmaşık bir mikro çevrede gelişir. Stromal hücreler, kanserle ilişkili fibroblastlar, T lenfosit hücreleri, B lenfosit hücreleri, tümörle ilişkili makrofajlar (TIM), dentritik hücreler (DC), regülatör T hücreleri (Tregs), myeloid-türevli baskılayıcı hücreler (*myeloid-derived suppressor cells*-MDSC), endotel hücreleri ve ekstrasellüler matriks (extracellular matrix-ECM) tümör mikro çevresini oluştururlar. En çok bulunan hücre türü kanserle ilişkili fibroblastlardır. Bu hücreler, tümörün büyümesi, progresyonu ve metastazında etkilidirler (Liao ve ark., 2009). Tümörle ilişkili fibroblastlar hücre dışı matriksin değişimi, anjiyogenezis, immun modülasyonu, EMT indüksiyonu, tümör hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalmasını teşvik etmede rol oynarlar (Wright ve ark., 2023).

Meme kanseri mikro çevresi aynı zamanda lökosit kökenli hücreleri de (lenfositler, makrofajlar ve miyeloid türevli stromal hücreler) içerir (Ruffell ve ark., 2012). T lenfositleri, tümör mikro çevresindeki tümörögenesis sürecini etkiler. Sitotoksik T-lenfositleri (*cytotoxic T lymphocyte*-CTL) malign hücrelerde bulunan anormal tümör antijenlerini ayırt edebilir ve hedeflenen neoplastik hücreleri ortadan kaldıracaktır. Tümör mikro çevresindeki (*tumor microenvironment*-TME) CTL hücrelerinin varlığı, olumlu bir prognoz ile ilişkilidir. Bu hücreler, tümör

antijenlerinden türetilen ve sınıf I MHC (Majör histokompatibilite kompleksi) molekülleri ile birlikte sunulan peptitleri eksprese eden hücrelerdir (Abbas ve ark., 2021; Desai ve ark., 2023). TME genellikle daha az infiltre olan B-lenfositlerini içerir (Laumont ve ark., 2022). B-lenfositlerinin antitümöral işlevleri, T lenfositlerine antijen sunumu, tümörü hedefleyen antikorların üretimi ve sitokinlerin salınımını içeren çeşitli mekanizmaları kapsar (Esparcia-Pinedo ve ark., 2023).

Meme kanserinin immunojenitesi moleküler alt tipler arasında değişiklik gösterir; TNBC ve HER2 pozitif tümörlerde en yüksek, luminal A ve luminal B alt tiplerinde ise daha düşüktür (Nagarajan ve McArdle, 2018; Solinas ve ark., 2017). Ayrıca neoadjuvant tedaviye yanıt ve meme kanserinin prognozu, tümördeki bağışıklık tepkisinin yoğunluğunu yansıtan, tümöre infiltre olan lenfositlerin (TIL) miktarından olumlu yönde etkilenir (Dieci ve ark., 2018; Savas ve ark., 2016).

İmmün mikro çevresi, meme kanserinin gelişimini ve ilerlemesini etkiler. Karsinogenezisin erken evresinde, bağışıklık mikro çevresi, aktif CD8⁺ ve CD4⁺ T hücrelerinden salınan sitokinler yoluyla çoğunlukla anti-tümör etkisi uygular. Buna karşılık, bir tümör invaziv hale geldiğinde, kanserle ilişkili fibroblastlar ve sitokin içeriği de dahil olmak üzere mikro çevre hücre bileşimi, meme kanseri hücreleri tarafından teşvik edilerek tümörün gelişimine yardım eder (Boudreau ve ark., 2012; Schreiber ve ark., 2011).

Ekstrasellüler matriksin (ECM), tümör gelişimi açısından çeşitli rolleri vardır. ECM, tümör dokusuna yapısal destek sağlar. ECM, hücre adezyonunu ve göçünü artırır (Paradiso ve ark., 2021). Tümör hücreleri ECM'ye yapışır ve hareket ederek göç edebilirler. Böylece, çevreye infiltre olurlar. ECM metastaza katkı sağlar (Gkretsi ve Stylianopoulos, 2018). Tümör hücreleri ve TME'deki stromal hücreler, matriks metalloproteinazlar (*matrix metalloproteinase*-MMP) dahil çeşitli proteazları salgılayabilir. Bu proteazlar, ECM bileşenlerini parçalar ve tümör hücrelerinin invazyonuna ve metastazına yardımcı olur (Winkler ve ark., 2020). ECM bileşenleri, anjiyogenezisi teşvik eder (Flies ve ark., 2023; Lugano ve ark., 2020).

Endotel hücreleri anjiyogenezis sürecinde temel bir rol oynarlar. Tümörlerin kan damarlarının gelişimi, TME’de ve endotel hücreleri aracılığıyla gerçekleşir. Tümör büyümesini desteklemek için oksijen ve besin maddeleri sağlamak üzere kan damarları oluşturulur (Lugano ve ark., 2020). TME’de, endotel hücreleri daha geçirgen hale gelir. Bu geçirgenlik sayesinde bağışıklık hücrelerinin tümör dokusuna infiltre olması sağlanır (Stylianopoulos ve ark., 2018). Ayrıca kanser hücreleri, endotel hücreler aracılığıyla kan dolaşımına girer ve metastaz ile birlikte farklı bölgelerde tümör oluşumu gerçekleşir (Strilic ve Offermanns, 2017).

2.2.8. Tümörlerin Bağışıklıktan Kaçış Mekanizmaları

Kanser hücreleri, normal stromal hücreler ve konak savunma mekanizmaları arasındaki etkileşimi içeren tümör gelişimi ve sağkalımı karmaşık bir süreçtir. Yangı, hastalıklar ve stres faktörleri tümör büyümesine veya tümör baskılanmasına katkıda bulunur. CD8⁺ CTL ve CD4 yardımcı T (Th)1 hücreleri, kanser gelişimini engeller ancak kronik yangı gibi diğer faktörler bu etkileri geçersiz kılar (Blackwill ve Mantovani, 2002; Rakoff-Nahoum, 2007). Yararlı akut tepkiler tümörlere karşı başarısız olduğunda, kronik yangı, tümör büyümesine ve anjiyogenezise yardımcı olur (Grivennikov ve ark., 2010; de Martel ve Franceschi, 2009).

Bağışıklık sistemi tümör büyümesine hem katkı sağlar hem de baskılar. Bu nedenle tümör gelişiminde dengeyi korumada kritik bir rol oynar. Tümörler bazı hastalarda yeniden ortaya çıkmadan önce yıllarca uykuda kalabilir. Ayrıca birey tamamen işlevsel bir bağışıklık sistemine sahip olmasına rağmen tümörler büyüebilir (Dunn ve ark., 2002). Bu durum bağışıklık düzenlemesi ile ilgilidir (Dunn ve ark., 2004). Bununla birlikte, genetik dengesizlik nedeniyle, sürekli tümör hücresi çoğalması görülür. Ayrıca bu tümör hücreleri elimine edilir ve denge sağlanmış olur. Bu sırada kanser hücreleri bağışıklık kaynaklı yangıya yanıt olarak mutasyonel değişiklikleri sürdürerek bölünmeye devam eder. Böylece immun kontrol ile tümör büyümesi arasında bir denge korunarak tümör uyku hali görünümü sağlanır (Sawnn ve Smyth, 2007). Ancak tümörler, immun sistemi baskılayıcı etkilerle veya hedef antijen ekspresyonunun kaybıyla immun sistemin bunları ortadan kaldırma

kapasitesini bozar. Bu aşamada tümör kaçışı meydana gelir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinin gerçekten uykuda olduğu koşullar da olabilir (Shay ve Roninson, 2004).

Tümörler, MHC-I yolağını etkileyen antijen işleme mekanizmasını aşağı regüle ederek immun sistemden kaçabilmektedir. Tümör antijen ekspresyonu aşağı regüle edilir, bu da CTL'lerin tümör hücrelerindeki hedef antijenleri tanıyamamasına ve böylece tümör insidansı ve metastazının artmasına yol açar (Vinay ve ark., 2015). Ayrıca tümörler, TME'de mevcut hücreler tarafından çeşitli bağışıklık baskılayıcı sitokinlerin üretilmesi yoluyla CTL işlevini bozarak bağışıklık gözetiminden kaçarlar (Pasche, 2001).

2.3. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, canlı organizmalarda veya ürünlerinde geliştirilmiş ve istenen özellikler elde etmek amacıyla organizma dışında genetik materyalin değiştirilmesidir. Başka bir deyişle rekombinant DNA teknolojisi farklı orjinlerden büyük DNA moleküllerini izole etme, kesme, yapıştırma, çoğaltma, tanıma, yapısını değiştirme ve canlı organizmalara tekrar geri kazandırma imkanı sağlar. Bu teknoloji ile birlikte genotipten fenotipe ulaşılarak yeni genetik analiz yaklaşımı elde edilmiştir. Uygun bir vektör aracılığıyla çeşitli kaynaklardan elde edilen DNA parçalarının, istenen gen dizilimine sahip olacak şekilde eklenmesini içerir (Alberts ve ark.,2014; Bollon ve ark., 1984).

Organizmanın genomunda manipülasyon, ya yeni genlerin ve düzenleyici elemanların tanıtılması ya da genlerin yeniden kombinasyonu yoluyla endojen genlerin ekspresyonlarının azaltılması veya engellenmesi yoluyla gerçekleştirilir (Bazan-Peregrino ve ark.,2013). Spesifik hedef dizi DNA bölgeleri için restriksiyon endonükleazları kullanılarak farklı DNA parçaları elde etmek amacıyla enzimatik kesme uygulanır ve ardından DNA ligaz aktivitesi ile istenen gen vektöre sabitlenmek üzere parçalar birleştirilir. Vektör daha sonra bir konak organizmaya tanıtılır, kültürde eklenen DNA parçasının birden çok kopyasını üretmek üzere büyütülür ve sonunda ilgili DNA parçasını içeren klonlar seçilip toplanır (Alberts ve ark., 2014; Venter ve ark., 2007).

Rekombinant DNA vektör DNA'sı ve içine eklenen DNA parçasının oluşturduğu yeni DNA molekülüdür. Daha sonra bu molekül bakteri hücrelerine aktararak çok fazla miktarda üretimi sağlanır. Her bir bakteri hücresine bir rekombinant DNA molekülü kazandırılır. Sonuçta rekombinant DNA molekülünü taşıyan tek bakteri kolonisi oluşturulur. Kolonideki her bir bakteri aynı rekombinant DNA'yı taşıdığı için bu bakteri popülasyonuna DNA klonu denir. Bu koloniye ait bakterilerin çoğaltılması ile istenen DNA parçası sınırsız miktarda üretilir (Alberts ve ark., 2014; Bollon ve ark., 1984; Primrose ve Twyman, 2006).

Oluşturulan DNA parçaları doğrudan bakteri hücresine giremez ve bunun için vektörler kullanılır. Bir vektör, genellikle bir DNA parçası olan ve bir DNA dizisi veya diğer genetik materyali taşıyan ve bunu yeni bir hücreye tanıtan bir maddedir. Vektörler çoğaltma, ekspresyon veya izolasyon gibi farklı amaçlar için kullanılırlar. Vektörlerin genellikle rekombinant DNA taşıyan parça olarak bilinen bir ekleme parçası ve vektörün yapısından sorumlu olan omurga olarak adlandırılan daha büyük bir dizisi bulunur. Vektörler, farklı özelliklere bağlı olarak farklı türlere ayrılabilir. Bu nedenle, vektör seçimi işlemin amacına bağlıdır. Vektörler, işlemin sonunda geri kazanılabildikleri için birden fazla işlemde yeniden kullanılabilirler ve plazmidler, viral vektörler, kozmidler ve yapay kromozomlar olarak ayrılır (Alberts ve ark., 2014; Bollon ve ark., 1984; Primrose ve Twyman, 2006).

Plazmidler bakteri içerisinde kendi kendine çoğalabilen küçük ekstrakromozomal dairesel DNA molekülüdür. Küçük boyutları, rekombinant DNA'nın konak genomik DNA'sından ayrılmasını kolaylaştırır. Tüm bakterilerde doğal olarak bulunurlar. Bunlar bakterilere genom dışı özellikler kazandırır. En yaygın kullanılan plazmidlerden bazıları, konak olarak *E. coli*'yi kullanan pBR322, pUC ve pBluescript vektörleridir (Alberts ve ark., 2014; Bollon ve ark., 1984; Primrose ve Twyman, 2006).

Genel olarak, rekombinant DNA üç yöntemle üretilir. Bu yöntemler transformasyon, bakteriyel olmayan transformasyon ve faj tanıtımıdır. Transformasyon aşamasında ilk olarak, bir DNA parçası seçilir ve bir vektöre (taşıyıcı DNA) enjekte edilir. İkinci olarak, bu DNA parçası, restriksiyon endonükleaz

enzimleri kullanılarak daha küçük parçalara kesilir ve "DNA ligaz" isimindeki enzimle birleştirilir. Vektörler bir konak hücreye yerleştirilir ve bu işleme transformasyon denir. Konak hücre genellikle *Escherichia coli* bakterisidir. DNA parçası, transformasyon geçirmiş konakları transformasyon geçirmemiş konaklardan ayırt edebilmek için tanımlanabilir olmalıdır (Alberts ve ark., 2014; Bollon ve ark., 1984; Primrose ve Twyman, 2006).

Rekombinant DNA teknolojisi hayatın birçok alanında kullanılmaktadır. Bu teknoloji gıda işleme koşullarına uygun yeni enzimlerin üretilmesini mümkün kılar. Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak birçok ürün kuraklığa veya elverişsiz koşullara dayanacak şekilde genetik olarak modifiye edilmiştir. Ayrıca gen manipülasyonu ve terapisi, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak umut verici terapötik tekniklerle büyük ölçüde ilerlemiştir. En dikkat çekici örnek ise, insan insülininin üretilmesidir. Antikorlar ve türevleri, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yaygın olarak üretilmektedir. Bu teknolojinin ilaç metabolizması araştırmalarında da kullanımı vardır (Alberts ve ark., 2014; Bollon ve ark., 1984; Primrose ve Twyman, 2006).

2.4. Isı Şoku Proteinleri (*Heat Shock Protein*-HSP)

Ferruccio Ritossa, laboratuvarında istemeden yüksek sıcaklıkta bırakılan *Drosophila melanogaster* sineklerini incelemiştir ve kromozomlarında karakteristik bir şişme fark etmiştir. Bu "şişme" fenomeninin, ısı stresini takiben gen aktivasyonu nedeniyle spesifik proteinlerin artan ekspresyonundan kaynaklandığını düşünmüştür. Böylece "ısı şok proteinleri" (*heat shock protein*-HSP) kavramı ortaya çıkmıştır (Malyshev, 2013; Ritossa, 1962). HSP'lerin aşırı ekspresyonu, hücrenin hayatta kalmasını destekler ve hücrel proteinleri hasar veya agregasyon riskinden korur. Isı şokuna ek olarak, çevresel ve kimyasal faktörler, stres dışı fizyolojik nedenler ve hastalık koşulları dahil olmak üzere çeşitli faktörler HSP'lerin ekspresyonunu artırır (Pirkkala ve Sistonen, 2006).

HSP'ler, strese veya yüksek sıcaklığa yanıt olarak hücrel proteinlerin denatürasyonunu veya açılmasını tersine çevirme veya engelleme, yapısal ve işlevsel

bütünlüğünü koruma işlevi gören bir protein grubudur. HSP'ler, hücrelerdeki fizyolojik ve koruyucu rolleri nedeniyle moleküler şaperonlar olarak da bilinirler. Hücreler aşırı sıcaklık, anoksi, hipoksi, ağır metaller, ilaçlar, stres veya protein denatürasyonunu indükleyebilecek diğer kimyasal maddeler gibi homeostatik zorluklara maruz kaldıklarında, protein katlanmasını ve diğer proteinlerin doğal yapılarının ve işlevlerinin korunmasını kolaylaştırırlar (Malyshev, 2013; Ritossa, 1962). HSP'ler çeşitli sinyal yollarını inhibe veya aktive ederler, bu da büyümeyi, farklılaşmayı ve hücre bölünmesini etkiler (Tausif ve ark., 2024).

Sitozoldeki koruyucu rollerinin yanı sıra, HSP'ler hücre dışı boşlukta veya plazma zarı üzerinde yer aldıklarında bağışıklık sisteminin uyarılmasında anahtar roller oynarlar. İnsanlarda, bunların serumdaki varlığı, yangı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere stres koşullarıyla ilişkilidir (Barreto ve ark., 2003).

HSP'ler genellikle moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılır ve çoğunluğu HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve büyük HSP'ler olarak gruplara ayrılır. Küçük HSP'ler grubu hariç, HSP proteinleri ATPaz aktivitesine sahip ATP'ye bağımlı proteinlerdir (Pirkkala ve Sistonen, 2006). Küçük HSP ailesi, HSPB genleri tarafından kodlanır ve HSP27 dahil 11 üyeden oluşur. Tüm üyeler 43 kDa veya daha az boyuta sahiptir ve ATP'den bağımsızdır. HSP40 ailesi, DNAJ genleri tarafından kodlanan en az 49 üyeden oluşan en büyük HSP ailesidir. HSP10 ve HSP60'ı içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan insan şaperon ailesi üyeleri, HSPD, HSPE, CCT ve diğer bazı genler tarafından kodlanır. HSP70 ailesi, HSPA gen ailesi tarafından kodlanır ve 13 üyeye sahiptir. HSP90 ailesi, HSPC gen ailesi tarafından kodlanır ve beş üyeye sahiptir. Büyük HSP ailesi ise HSPH gen ailesi tarafından kodlanır ve iki ana üye HSP110 ve GRP170'i içerir (Kampinga ve ark., 2009).

HSP'lerin işlevleri yalnızca ekspresyonlarını tetikleyen uyaranlara değil, aynı zamanda bulundukları bölgeye de bağlıdır. HSP'ler apoptozis, nekroptoz, otofaji, epitel-mezenkimal geçiş, lipid metabolizması ve tümör bağışıklığının düzenlenmesinde rol oynarlar. Ayrıca anjiyogenezis, hücre proliferasyonu, hücre göçü, invazyon ve metastaz gibi süreçleri etkileyerek tümör büyümesini ve gelişimini desteklerler (Albakova ve Mangasarova, 2021).

Çeşitli çalışmalar, doğal öldürücü hücreler (*natural killer cell*-NK), T hücreleri, DC'ler, trombositler ve nötrofiller dahil olmak üzere farklı bağışıklık hücrelerinin HSP eksprese edebildiğini bildirmiştir (Albakova ve Mangasarova, 2021).

HSP'lerin, tümör kaynaklı, antijenik peptitlerin çapraz sunumu sürecinde önemli etkileri vardır. HSP-peptid komplekslerinin antijen sunan hücreler (*antigen presenting cell*-APC) tarafından alımı spesifik ve konsantrasyona bağlıdır ve bu nedenle HSP'ye özgü reseptörlerin bulunduğu varsayılır (Binder ve ark., 2004).

Isı şoku faktörleri (HSF'ler), HSP'lerin indüklenebilir transkripsiyonel düzenleyicileri olarak işlev görür. HSP'lerin indüksiyonları esas olarak ısı şoku faktörü 1'in (HSF-1) aktivasyonuna ve bunun tüm HSP genlerinin promotörlerinde bulunan ısı şoku düzenleyici elemanlar (HSE'ler) ile etkileşimine bağlıdır (Akerfelt ve ark., 2010).

HSF1 inaktivasyonu, geniş bir kanser çeşidinin progresyonunu engeller. Ek olarak, HER2/neu yolağının aktivasyonu HSF1 ve HSP ekspresyonunu indükler ve hücreleri spontan ve ilaca bağlı programlanmış hücre ölümüne dirençli hale getirir (Sangster ve ark., 2008).

HSF1, tümörjenik etkilere aracılık eder. Tümörjenik etki östrojen kaynaklı anti-metastatik genlerin ekspresyonunu inhibe eden MTA1'in alımını içeren alternatif bir yolak ile gerçekleşir (Khaleque ve ark., 2005). Böylece MTA1, HSF1 ile ortak etki ederek metastazı teşvik eder. HSF1 kanserlerde, ERK, PKA ve TOR yolakları aracılığıyla kötü huylu sinyalizasyonun arttırılması dahil olmak üzere ek özelliklere sahiptir (Dai ve ark., 2007).

2.4.1. HSP90

HSP90 ailesi üyeleri, kanser biyolojisindeki önemli rolleri ve kemoterapötik ajanlar için potansiyel hedefler olmaları nedeniyle çok dikkat çekmiştir. HSP90 ailesi, HSPC1 ile HSPC5 genleri tarafından kodlanan beş üyeden oluşur (Kampinga ve ark., 2009).

İki form, HSP90 alfa ve HSP90 beta, sitoplazmada bulunur, GRP94 (94-kDa glikoz regüle protein) endoplazmik retikulumda bulunur ve TRAP-1 (tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili protein 1) mitokondride bulunur (Whitesell ve Lindquist, 2005). HSP90'ın iki ana izoformu vardır, indüklenebilir form olan HSP90 α 'dır. Yapıcı form olan ise HSP90 β 'dır. Bu iki form sitoplazmada bulunur (Gupta, 1995; Sreedhar ve ark., 2004). Bu sitoplazmik HSP90 izoformları son zamanlarda ayırt edici işlevler göstermiş olsa da (Sreedhar ve ark., 2004), çoğu inceleme, dikkate değer yapısal ve işlevsel benzerlikleri nedeniyle bunları ayırt etmemektedir. Bu nedenle, belirtilmediği sürece HSP90 adı hem HSP90 α hem de β için kullanılmıştır (Ciocca ve ark., 2013; Csermely ve ark., 1998).

Sitoplazmik HSP90 izoformları arasındaki farklılaşma ile ilgili çalışmalar, her iki izoformun da sıklıkla dimer oluşturmaya rağmen, HSP90 α 'nın HSP90 β 'ya kıyasla daha sık dimerleşme eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak, α ve β izoformları, protein dizisi boyunca spesifik bölgelerde farklılık gösterir ve bu, iki izoformun farklı fonksiyonlar göstermesine yol açar (Sreedhar ve ark., 2004).

HSP90 esas olarak sitoplazmada bulunur. HSP90 esnek homodimerler oluşturur ve temel yapısı üç bölümden oluşur: N-terminal alanı (NTD) (25 kDa), orta alan (40 kDa) (MD) ve C-terminal alanı (CTD) (12 kDa). N-terminal alanı, yalnızca HSP90 ailesi üyeleri arasında değil, aynı zamanda DNA giraz, histidin kinaz ve MutL (GHKL) dahil olmak üzere ATPaz/kinaz üst ailesinin üyeleri için de homoloji gösterir (Prodromou ve Pearl, 2003).

HSP90 N-terminal bölgesi, ATP bağlama alanını içerir. Orta alan, üç bölgeden oluşan ve ATP ve HSP90 istemci proteinlerinin g-fosfatı için bağlanma yeri olarak görev yapan katalitik halkayı içerir. C-terminal alanı, HSP90 dimerizasyonuna ve yardımcı şaperon bağlanmasına neden olur. Bu alan alternatif bir ATP bağlanma bölgesine sahiptir ve ayrıca nükleotidler, novobiyosin ve sisplatin gibi küçük moleküller için bağlanma bölgesi de içerir (Whitesell ve Lindquist, 2005).

HSP90, konağın bağışıklık sisteminin temel düzenleyicileri arasındadır. HSP-şaperonlu peptitlerin MHC-I molekülleri üzerinde çapraz sunumundan sonra, in vitro

ve fare tümör modellerinde antijene özgü bir CD8⁺ T hücre yanıtı başlatılır (Doody ve ark., 2004). HSP90 inhibisyonu, NK ve T hücre proliferasyonunu, NK hücre sitotoksik aktivitesini ve T ile NK hücreleri tarafından üretilen interferon-gamma'yı (IFN- γ) azaltır. HSP90- α 'nın spesifik inaktivasyonu proteolitik ara ürünlerin kaybına neden olur. Ayrıca MHC I molekülünün hücre yüzeyinde son peptidin sunumunun azalmasına yol açar. MHC I antijen sunumuna ek olarak, HSP90 inhibisyonu APC tarafından endojen ve eksojen peptitlerin MHC II aracılı sunumunu da azaltır. HSP90- α inhibisyonu, tümör hücrelerini anti-PD-1 blokajına duyarlı hale getirir (Albakova ve Mangasarova, 2021).

HSP90 proteinleri, apoptozis, hücre döngüsü kontrolü, hücre canlılığı, protein katlanması ve bozulması, sinyal olayları gibi temel hücresel süreçlerde ve düzenleyici yollarda yer alır. Ek olarak, antijen sunan hücrelerin ve DC'lerin aktivasyonu ile adaptif bağışıklığı indükler. Proteostazis, hücre farklılaşması ve gelişimindeki belirgin rolleri iyi bilinmektedir (Whitesell ve Lindquist, 2005).

Önemli olarak, HSP90'ın aşırı ekspresyonu, çeşitli kanser türleri, viral enfeksiyon, yangı ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durumla bağlantılıdır ve birçok hastalığın patogenezisinde potansiyel bir rol oynar (Geller ve ark., 2012; Luo ve ark., 2010).

HSP90 aileleri östrojen reseptörlerinin (ER) düzenlenmesinde rol oynar ve bu nedenle, meme kanserinde tümör hücresi proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu, metastazı, hücre ölümü ve tümör immün tepkisinde rol oynarlar (Ciocca ve ark., 2013). HSP90- α seviyeleri, siklin D1 ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği için ayrıca insan meme kanserinin proliferasyonunda rol oynar (Yano ve ark., 1999).

HSP90 mutasyona uğramış veya aşırı eksprese edilmiş onkoproteinlerin birikimine neden olur. HSP'lerin yüksek ekspresyonu köpek meme kanserlerinde de dikkati çeker ve meme karsinogenezisinde yer alan moleküler mekanizmalarda rol oynar (Romanucci ve ark., 2006).

HSP90, RIP 1 kinaz ve AKT ile etkileşime girerek her iki durumda da nükleer faktör kapp β (NF- $\kappa\beta$) aracılı apoptozis inhibisyonunun desteklenmesine neden olur. Hem insan hem de köpek meme tümörlerinde HSP90 ve kaspaz 3 ve 8'de veya Bcl-2, Bcl-XL, Bax gibi diğer apoptozisle ilişkili proteinlerde benzer bir değişiklik yapısı görülür (Kumaraguruparan ve ark., 2006).

Son çalışmalar meme kanserinde HSF1'in önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. HSF1, HSP'leri indükleyerek meme kanseri ilerlemesinde işlev görür (Khaleque ve ark., 2005). Bununla birlikte, HSF1 anti-metastatik süreçlerin baskılanmasıyla metastazın aktivasyonu, malign pro-malign sinyal kaskadlarının aktivasyonu ve mitoz kontrol noktasının düzenlenmesi dahil olmak üzere ek roller oynar (Dai ve ark., 2007; Khaleque ve ark., 2005; Wang ve ark., 2004).

2.4.2. Kanser Gelişiminde HSP90

Normal memeli hücreleri, çoğalmalarını, büyümelerini, farklılaşmalarını ve ölümlerini düzenlemek için yeterli tanımlanmış moleküler mekanizmalarla donatılmıştır. Öte yandan kanser hücreleri, sürekli kontrolsüz çoğalma gösterirler ve normal hücre çoğalması ile homeostazisinden sorumlu doğal düzenleyici mekanizmaların etkisi altında bulunmaz (Miyata ve ark., 2013).

Birkaç kanser proteini, katlanmaları ve olgunlaşmaları için HSP90 mekanizmalarına ve şaperonlara bağımlıdır (Vartholomaiou ve ark., 2016). Örneğin; kanser gelişimi ve progresyonunda oldukça gerekli olan kinazlar, steroid hormon reseptörleri ve transkripsiyon faktörleri, bir grup HSP90 alıcı proteinini sunar. Bu nedenle, hemen hemen tüm kanser sınıflarında belirgin HSP90 ekspresyonu tespit edilmiştir (Gupta, 1995).

HSP90 tümör gelişimi, adezyon, invazyon, metastaz, anjiyogenezis ve apoptozisi düzenleyerek kanser gelişiminde önemli roller oynar (Aoyagi ve ark., 2005; Ochel ve ark., 1999). HSP90'ın, hareketsiz bir tümör hücresinin hareketli ve invaziv bir hücreye dönüşümünde önemli rolleri vardır. Özellikle, ekstrasellüler HSP90, invazyonu etkileyen önemli bir rol oynar çünkü matriks metalloproteinaz-2 (MMP2)

ile etkileşir ve onu aktive eder. Ekstrasellüler matriks parçalanır, kanser hücreleri göç eder ve başka alanlara invaze olup yapışır. HSP90, bu adımlardan her birinde rol oynar ve bu da malignitenin artmasını sağlar (Birbo ve ark., 2021).

HSP90, normal hücre koşullarında bol miktarda bulunur ve özellikle toplam hücresel proteinin yaklaşık %1-3'ünü oluşturur. Ancak, tümör hücrelerinde gözlenen strese yanıt olarak, HSF1 çekirdeğe yerleşir ve HSP90 ekspresyonunu indükler. Bu durum, HSP90'ın yukarı regülasyonu ve tümör hücrelerinin kötü mikroçevrelerde hayatta kalmasını sağlayarak maligniteyi teşvik eden mutasyonların kalıcılığına izin verir. Örneğin, hormon ve protein kinaz bağımlı meme kanserinde, HSP90 ekspresyon seviyesi prognozda belirleyici bir faktör olmuştur. Normal dokularla karşılaştırıldığında, kanser dokusu daha yüksek HSP90 ekspresyon düzeylerine sahiptir. Normal hücreler strese yanıt olarak HSP90 salgılar, ancak kanser hücreleri HSP90'u ardışık olarak salgılar. HSP90 ekspresyonuna etkili olan post-translasyonel modifikasyonlar HSP90'un lokalizasyonunu etkiler. Özellikle, asetilasyon ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar, HSP90'un ekspresyonunda etkilidir. (Albakova ve Mangasarova, 2021; Birbo ve ark., 2021; Tausif ve ark., 2024; Zagouri ve ark., 2012)

Meme kanserlerinde kilit rol oynayan çeşitli proteinlerle HSP90 etkileşime girer. Bunlar östrojen reseptörleri (ER), tümör baskılayıcı p53 proteini, anjiyogenez transkripsiyon faktörü, HIF-1alfa, antiapoptotik kinaz Akt, Raf-1, MAP kinaz ve ErbB2 gibi çeşitli reseptör tirozin kinazlardır (Beliakoff ve ark., 2004). HSP90 aşırı ekspresyonu invaziv duktal karsinomların bir özelliğidir (Conroy ve ark., 1996). Aşırı ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinin çeşitli stres uyaranlarına dirençli hale geldiği bir mekanizmada rol oynar (Yano ve ark., 1999).

Meme kanseri dokularında HSP90 ekspresyonu ve HSP90'a karşı oto-antikorların varlığı, meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilir (Conroy ve ark., 1996). Yüksek HSP90 ekspresyonu seviyeleri, bu proteinin köpek meme bezinde malign transformasyon ve tümör ilerlemesinde temel bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Romanucci ve ark., 2006). İnsanlarda HSP90 ekspresyonu ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma, yüksek HSP90 ekspresyon

seviyesinin tedaviye daha az yanıt veren daha malign kanserle ilişkilendirildiğini göstermiştir (Birbo ve ark., 2021).

Meme kanserinde yüksek HSP90 ekspresyonu, meme kanalı karsinomlarındaki proliferatif aktiviteye katkıda bulunurken, infiltratif lobüler karsinomlar ve lobüler neoplazi gibi diğer meme tümörlerinde önemli ölçüde azalmış HSP90 ekspresyonu vardır (Zagouri ve ark., 2012). TNBC'lerde ise önemli ölçüde azalmış HSP90 ekspresyonu gözlenir. HSP90 aşırı ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinin çeşitli stres uyarıcılarına dirençli hale gelme mekanizmasının bir bileşeni olarak önerilir. HSF1, HSP'leri indükleyerek meme karsinomunun ilerlemesinde rol oynar (Khaleque ve ark., 2005). HSF1, anti-metastatik süreçleri baskılayarak metastazı aktive eder, pro-malign sinyal yollarını etkinleştirir ve mitoz kontrol noktasını düzenler. Daha büyük tümörler, daha belirgin HSP90 artışı ile de karakterizedir (Pick ve ark., 2007; Zagouri ve ark., 2010). Bu durum hızla büyüyen tümörlerde hipoksik stresle ilişkili olayları yansıtır (Zagouri ve ark., 2012).

Kanser biyolojisindeki çok önemli rolü nedeniyle HSP90, tümör gelişimini ve progresyonunu engellemek için potansiyel bir terapötik hedeftir ve çeşitli HSP90 inhibitörleri klinik deneylerde test edilmiştir (Burrows ve ark., 2004). HSP90 inhibitörlerinin antikanser ilaçları olarak çeşitli avantajları vardır. Sinyal proteinlerinin çoğu HSP90 alıcı proteinleri olduğundan, HSP90 inhibitörleri aynı anda birden fazla sinyal yolağını hedefleyebilir. Bu nedenle, tek hedefli tedavi ile karşılaştırıldığında, tümör hücrelerinin anti-HSP90 tedavisinde hayatta kalma olasılığı daha düşüktür (Supko ve ark., 1995). HSP90 inhibitörleri, normal dokularda minimum toksisite ile tümör dokularında hedefe özgü hasarı maksimuma çıkarabilir. Ayrıca bunlar çözünmeyen ve kanser hücreleri için toksik olan katlanmamış proteinlerin birikmesine yol açar (Nomura ve ark., 2004).

2.5. Ki-67

Hücresel proliferasyon belirteci olan Ki-67'nin kanser dokusunda ekspresyonu artar. Ekspresyon artışı hücre bölünmesinin hızlı ve kanserin daha agresif olduğunu

gösterir. Ki-67 ile kötü prognoz ve meme kanseri proliferasyonu arasında pozitif ilişki vardır (Davey ve ark., 2021; Hashmi ve ark., 2019).

2.6. PCNA

Bir diğer hücre proliferasyon belirteci olan proliferen hücre çekirdek antijeninin (*proliferating cell nuclear antigen*-PCNA), DNA sentezi ve tamirinde önemli rolü vardır. PCNA'nın ekspresyon artışında metastaz riskinde de artış gözlenir. Meme kanserlerinde ise artan PCNA ekspresyonu ile kötü prognoz arasında paralellik vardır (Malkas ve ark., 2006; Moldovan ve ark., 2007; Qiu ve ark., 2017).

2.7. CD31 (Trombosit Endotel Hücre Adezyon Molekülü)

CD31 endotel hücreleri, lökositler ve trombositler tarafından eksprese edilen bir adezyon molekülüdür. Anjiyogenezisi sağlar ve neoplastik vaskülarizasyonun bir belirtecidir (DeLisser ve ark., 1997; Sapino ve ark., 2001). CD31, malign neoplazilerde metastaz kapasitesini, anjiyogenik aktiviteyi ve vaskülariteyi yansıtır (Charpin ve ark., 2004). Meme kanserlerinde CD31 invazyon, metastaz ve prognoz için kritik öneme sahiptir (DeLisser ve ark., 1997).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. HSP90'ın Rekombinant Olarak Üretilmesi

3.1.1. Plazmid İzolasyonu

HSP90, pET-22b(+) plazmid post-translasyonel modifikasyon yapabilen Rosetta *Escherichia coli* (*E. coli*) hücre hattında eksprese edilmek amacıyla cloning suşu olan DH5alfa transformasyonu sonucu ekim yapılan agarda üremiş koloniden alıp sıvı besiyerine konularak bir gece 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Falkona alınan besiyeri 4000 rpm (dakikadaki devir sayısı) 10 dk 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Plazmid mini kiti (innuPREP Plazmid Mini Kit 2.0; katalog no:845-KS-5041010) kullanılarak değerlendirildi ve izolasyon yaptıktan sonra elde edilen son ürün elüsyon buffer+plazmid uzun süreli depolama için -80°C'ye kaldırıldı.

3.1.2. Kompetent Hücre Hazırlama

Kompetent (ön işlemiden geçirilmiş plazmid alabilen bakteri) hücre olarak *E. coli* kullanıldı. Bu amaçla 37°C'de gece boyu sıvı besi yerinde büyütülmüş kültürden 5 ml alındı ve erlen içinde 50 ml sıvı besiyerine aktarıldı. Kültürdeki hücre yoğunluğunu kontrol etmek ve belirli bir hücre konsantrasyonuna ulaşılmasını sağlamak için 37°C'de optik dansite (OD) değeri olan 0,600'e gelene kadar çalkalayıcı inkübatörde bekletildi. Absorbans en az 0,4-0,5 OD olacak şekilde (270-280 nm) ölçüldü. Ardından 50'lik falkonlara 50 ml alınıp santrifüjde 4°C'de 5 dk 12.100 rpm'de santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 25 ml 0,1 M CaCl₂ eklenerek buzda 30 dk bekletildi. Daha sonra 12.100 rpm 10 dk 4°C'de santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Sonrasında üstüne 0,75 ml 0,1 M CaCl₂ eklenerek pelet çözdürüldü. Stok yapılacak her bir 0,05 ml'lik alikotlara %100'lük 0,13 ml gliserol eklenip bu stoklar -80°C'de saklandı.

3.1.3. Plazmid Transformasyonu

Hazır plazmidler ve kompetant hücreler yavaş bir şekilde buzda çözündürülerek kompetant hücre üzerine 1 mikrolitre plazmid eklendi ve 30 dk buzda bekletildi. Daha sonra 90 saniye boyunca 42°C'lik su banyosuna konulup ardından 1 dk buzda bekletildi. Üzerine 0,4 ml sıvı besiyeri eklendi ve 37°C'de 45 dk çalkalandı. Ardından 50 mikrogram/mililitre ampicilin içeren katı besiyerlerine ampiciline direnç geni taşıyan plazmidi alan bakterilerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlamak için ekim yapıldı.

3.1.4. IPTG ile Protein İndüksiyonu Deneyi

Bir gece antibiyotikli kültürde 37°C'de 225 rpm'de çoğaltılmış hücreler 1 litrelik ve aynı oranda antibiyotik içeren kültüre geçirildi ve 37°C 225 rpm'de çalkalandı. Her saat başı OD değeri ölçüldü ve OD'si 600'e gelen her 1 litrelik kültürler çift distile suda çözünmüş ve konsantrasyonu 50 mM olan 1 ml İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit (isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside-IPTG) eklendi. Proteinin 4 saat boyunca eksprese edilmesi beklendi. 4 saat sonunda 1 L'lik şişeler 500 ml plastik santrifüj tüplerine aktarıldı. Ardından hücreler 4°C'de 3900 rpm' de santrifüjlendi. Oluşan bakteri peleti 3 kolon (Poly-Prep® Chromatography Columns) hacmi olacak şekilde bağlanma tamponu olan 0,002 M imidazol içeren 0,1 M Tris-HCl (Hidroklorik asit) içinde çözündürüldü, ardından bakteri süspansiyonu glass beads eklenen ependorflara eklendi. Bu süspansiyon speed mill plus (beat-beater) cihazında parçalandı ve hücreleri parçalanmış lizat elde edildi. Ardından lizat 12.100 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek proteinleri içeren süpernatant protein izolasyonuna hazırlandı.

3.1.5. İndüksiyon Testi

Jelde yürütmek için örnekler (indüksiyondan sonra elde edilen hücreler) örnek yükleme tamponu (SDS-PAGE (SDS, gliserol, izleme boyası (bromophenol blue), Tris-HCl ve DTT (Dithiothreitol)) ile karıştırılarak 90-95°C'de 10-20 dk denatürasyona bırakıldı. Ardından 2 dk santrifüj edildi ve süpernatantı alınarak SDS PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez) jel de oda sıcaklığında

120 voltta yürütme yapıldı. Sığır serum albümin (*bovine serum albumin*-BSA) protein belirteci olarak kullanıldı.

3.1.6. Protein Saflaştırması (Purifikasyon)

Saflaştırma için Ni^{+2} bağlı resin kullanıldı. Kullanılacak miktara bir kolon hacmi denir (V). Kullanılacak miktarda Ni^{+2} içeren resin, önce 3 kolon hacmi (3V) su ile yıkanarak etanolden, ardından da 3 kolon hacmi bağlanma tamponu olan 0,002 M imidazol içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu ile yıkanarak protein bağlanmasına hazır hale getirildi. Resin+süpernatant bağlanma için 30 dk buz ortamında çalkalandı ve ardından kolona (Poly-Prep® Chromatography Columns) yüklendi. Bağlanma sonrası eklenen süpernatant kolona yüklendi resin+süpernetant karışımı kolondan akıtıldıktan sonra kolon 3 kolon hacmi kadar bağlanma tamponu olan 0,002 M imidazol içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Daha sonra sırasıyla artan imidazol konsantrasyonu içeren Tris HCl'ler 3'er kolon hacmi olacak şekilde kolondan akıtıldı. Kolondan her defasında 1 kolon hacmi ürün toplandı ve elde edilen fraksiyonlar ependorflarda buz içinde muhafaza edildi. Her bir fraksiyonun spektrofotometrede 280 nm'de OD'leri alındı ve SDS PAGE jel yürütüldü (her bir kuyucuğa ≤ 2 µg olacak şekilde örnek yüklendi). Saflık derecesi değerlendirildi. Saf fraksiyonlar diyalizden geçirilerek proteinler fosfat tamponuna alındı. Spektrofotometrede 280 nm'de her fraksiyonun OD'leri alındı ve SDS PAGE jel yürütülerek değerlendirildi.

Bu şekilde elde edilen HSP90 yeteri kadar üretilmedi ve standardizasyonu sağlamak amacıyla çalışmada ticari olarak saf şekilde üretilmiş Recombinant Human HSP90 alpha Protein (Cat: 11445-HNCE, Sino Biological, Çin) kullanıldı.

3.2. Deney Modelinin Oluşturulması için Hücrelerin Hazırlanması

4T1 fare meme kanseri hücreleri (ATCC; #CRL2539) ATCC'nin önerdiği medyum koşullarına uygun olarak %10 Fetal Sığır Serum (FBS) (Invitrogen; #10270106) ve %1 Penisilin/Streptomisin (PS) (Thermo Fisher; #15140122) ile desteklenmiş HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethanesulfonic Acid) içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Thermo Fisher; #A1049101) medyumunda 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ (Karbondioksit) ile sabitlenmiş inkübatörde çoğaltıldı. 4T1

fare meme kanseri hücreleri 1×10^5 hücre olacak şekilde BALB/c dişi farelerin meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edilmek için hazırlandı. Hücreler Tripsin-EDTA (Thermo Fisher; #25200056) ile kaldırıldı. 1600 rpm’de, $+4^\circ\text{C}$ ’de 5 dakika santrifüj edilip, takiben medyum uzaklaştırıldı ve hücreler Hanks’ Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma-Aldrich; #H9269) ile dilüe edildi. Hücreler, Countess II otomatik hücre sayım cihazı (Invitrogen; #AMQAX10006) yardımı ile sayıldı ve her bir hayvan için 100 μL HBSS içinde 1×10^5 hücre olacak şekilde hazırlandı.

3.3. 4T1 Meme Kanseri Hücrelerinin Farelere Enjeksiyonu ile Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması

Hücreler kültüre edildikten sonra üreyen hücreler (1×10^5 hücre/fare) BALB/c dişi farelerin meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edildi (Dilmac ve ark., 2018, Tanrioer ve ark., 2022). Daha önceki çalışmalarda enjeksiyondan 7 gün sonra tümör kitlelerinin elle palpe edilebilir büyüklüğe ulaştığı ve enjeksiyondan yaklaşık 27 gün sonra uzak organ metastazları şekillendiği bildirilmiştir (Tanrioer ve ark., 2022). Bu sebeple çalışmamızda tümör enjeksiyonundan sonraki 7. günden itibaren hayvanlar sürekli takibe alındı. Çalışmada hayvanlar her grupta 10’ar fare olacak şekilde 8 gruba ayrıldı (Tablo 3.1). Çalışma 29. günde sonlandırıldı. HSP 0,5 μg ve 1 μg dozunda deri altı olarak uygulandı. Çalışmada kullanılan HSP90’ın dozu daha önce böyle bir çalışma yapılmamış oluşu için önce anaflaksi gruplarında denendi ve yan etkisi olmadığı anlaşıncaya deney gruplarında uygulandı.

Tablo 3.1. Deney grupları ve detaylı olarak yapılan uygulamalar

Gruplar	Uygulamalar
Grup 1 (0,5 μg HSP90 grubu)	Haftada 1 kez olmak üzere 4 hafta 0,5 μg dozunda HSP90 deri altı verildi. Başka işlem uygulanmadı.
Grup 2 (1 μg HSP90 grubu)	Haftada 1 kez olmak üzere 4 hafta 1 μg dozunda HSP90 deri altı verildi. Başka işlem uygulanmadı.
Grup 3 (Kontrol grubu)	Herhangi bir işlem uygulanmadı.
Grup 4 (Tümör grubu):	Diğer gruplara tümör hücresi enjeksiyonu yapıldığı sırada tümör hücresi enjeksiyonu yapıldı ve HSP enjeksiyonları ile eş zamanlı olarak FTS (fizyolojik tuzlu su) uygulandı.

Tablo 3.1. (Devam) Deney grupları ve detaylı olarak yapılan uygulamalar

Grup 5 (0,5 µg HSP90 profilaksi grubu):	Tümör enjeksiyonundan 28 gün önce haftada 1 kez 0,5 µg dozda 4 defa HSP90 uygulandı. Tümör enjeksiyonundan sonra 4 defa daha uygulandı; enjeksiyondan 29 gün sonra ötenazi yapıldı.
Grup 6 (1 µg HSP90 profilaksi grubu):	Tümör enjeksiyonundan 28 gün önce haftada 1 kez 1 µg dozda 4 defa HSP90 uygulandı. Tümör enjeksiyonundan sonra 4 defa daha uygulandı. Enjeksiyondan 29 gün sonra ötenazi yapıldı.
Grup 7 (0,5 µg HSP90 tedavi grubu):	0,5 µg HSP90 tümör enjeksiyonu ile aynı anda yapıldı ve çalışma sonuna kadar 7 gün aralıklarla 4 defa HSP90 uygulandı. Enjeksiyondan 29 gün sonra ötenazi yapıldı.
Grup 8 (1 µg HSP90 tedavi grubu):	1 µg HSP90 tümör enjeksiyonu ile aynı anda yapıldı ve çalışma sonuna kadar 7 gün aralıklarla 4 defa HSP90 uygulandı. Enjeksiyondan 29 gün sonra ötenazi yapıldı.

Tablo 3.2. Deney grupları ve yapılan uygulamalar

Deney Grupları	İnokülasyon Öncesi HSP90 Uygulaması	Tümör Oluşturma	10 Gün Bekleme	İnokülasyon Sonrası HSP90 Uygulaması
Kontrol	-	-	-	-
Tümör grubu	-	+	+	-
Tedavi grupları	-	+	+	+ 0,5 µg
	-	+	+	+ 1 µg
Profilaksi grupları	+ 0,5 µg	+	+	+ 0,5 µg
	+1 µg	+	+	+1 µg
Anaflaksi grupları		+ 0,5 µg (haftada 1 toplam 4 doz)		
		+ 1 µg (haftada 1 toplam 4 doz)		

3.4. Deneysel Tasarım ve Deney Hayvanlarının Bakımı

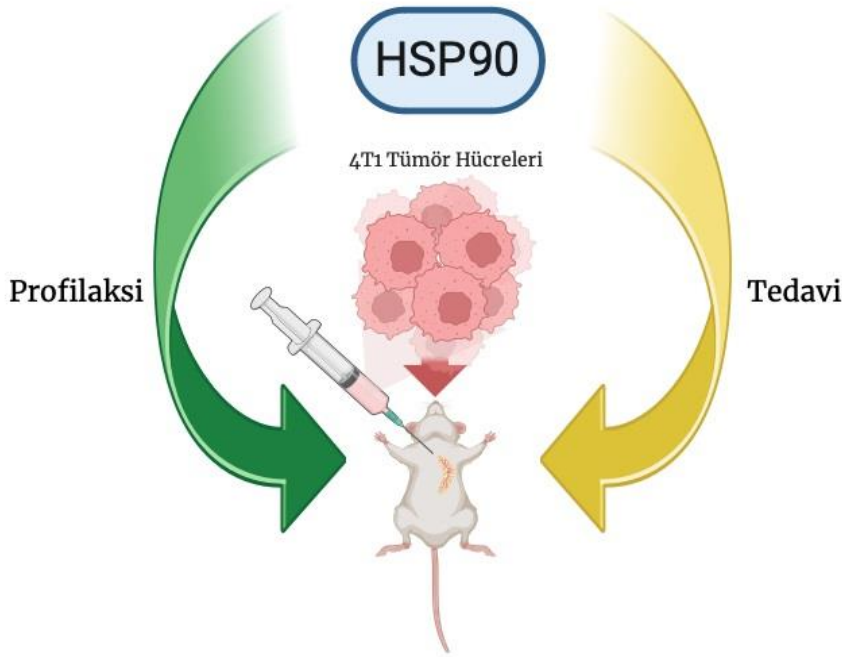
Çalışmanın deneysel aşaması için Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (MAKÜ-HADYEK) Etik Kurul onayı (17.08.2022 tarih ve 942 sayılı karar) alındı. Deney sırasında Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) 2.0 direktiflerine sıkı bir şekilde uyuldu. Fareler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde standart koşullarda 12 saatlik aydınlık-karanlık uygulamasına tabi tutuldu. Hayvanlar her grupta 10 adet hayvan olacak şekilde ve benzer büyüklüklerde 8 ayrı kafeste gruplara ayrıldı. Ortam, nem, ısı ve havalandırma

değerleri takip edildi, *ad libitum* yem ve suya erişimleri sağlandı. Tümör hücreleri enjeksiyonlarından sonra her gün günde iki kez (sabah-akşam) klinik bulgular ve sağlık parametreleri açısından (yem-su tüketimi ve hastalık bulguları) kontrol edildi ve anormallikler kaydedildi.

Deneyel düzenekte HSP90'ın hem koyurucu etkisi (profilaksi) hem de tedavi (terapötik) edici etkisi araştırıldı. Deneyel süreçte BALB/c ırkı, 8-10 haftalık, yaklaşık 20-30 gram ağırlığındaki 80 adet dişi fare kullanıldı. Çalışma her bir grupta 10 hayvanın bulunduğu toplamda 8 grup olacak şekilde dizayn edildi. Fareler ağırlık tartımının ardından gruplarına göre 8 ayrı kafese alındı. İki grup HSP proteinin herhangi bir anafaktik etkisi olup olmadığını belirlemek için kullanıldı. Bu gruplara tümör inokülasyonu yapılmadan 0,5 µg ve 1µg HSP90 deri altı olarak haftada 1 kez 4 hafta uygulandı ve bu gruptaki fareler ötenazi edilerek organları toplandı. Deneyel çalışma başlangıcında tümör grubuna 4T1 tümör hücre hattı inokülasyonu yapıldı, HSP enjeksiyonları ile eş zamanlı olarak FTS uygulandı ve tümör inokülasyonundan sonraki 29. (10 gün tümör gelişimi için beklendi) günde ötenazi edildi. İki grup tedavi grubu olarak ayrıldı ve tümör enjeksiyonu ile aynı anda bir gruba 0,5 µg ve diğer gruba 1µg HSP90 ile haftada 1 kez olmak üzere 4 hafta deri altı uygulama yapıldı. Profilaksi gruplarına ise ilk önce haftada 1 olmak üzere 4 hafta 0,5 µg ve 1µg HSP90 ile deri altı uygulama yapıldı. Ardından tümör inokülasyonu yapıldı. Tümör enjeksiyonundan sonra haftada 1 kez HSP90 uygulamalarına devam edildi ve inokülasyondan sonraki 29. günde fareler ötenazi edildi. Profilaksi gruplarına toplam 8 doz HSP90 uygulandı. Kontrol grubu ise herhangi bir işleme maruz kalmadan diğer gruplarla birlikte deney başlangıcından sonraki 29. günde ötenazi yapıldı.

3.5. Fare Ağırlıklarının Takibi

Denemeye başlamadan önce ve tümör enjeksiyonundan sonraki 7. günden itibaren üç günde bir olmak üzere farelerin ağırlıkları tartıldı ve not edildi. Böylece tümör gelişimi ile canlı ağırlık arasındaki bağlantı değerlendirilerek uygulamaların hayvanların sistemik durumlarını etkileyip etkilemedikleri ve besin alımının değişip değişmediğinin belirlenmesi planlandı.



Şekil 3.1. Meme kanseri modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi (Biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır)

3.6. Tümör Boyutlarının Ölçümü

Tümör hücresi enjeksiyonundan yaklaşık 1 hafta sonra tümörler elle palpe edilebilir büyüklüğe ulaştı. Aynı model ve hayvan ırkı kullanılan daha önceki çalışmalarda bildirildiği üzere (Tanrioer ve ark., 2022) 7. günden sonra tümör gelişimi şekillendiği için 7. günden itibaren 3 günde bir olmak üzere tedavi ve profilaksi gruplarındaki farelerin tümörleri elektronik kumpas yardımıyla tümörlerin uzunluk ve genişlikleri ölçülerek aşağıda belirtilen formüle göre tümör hacimleri hesaplandı.

$$\text{Tümör Hacmi} = (\text{Uzunluk} \times \text{Genişlik}^2) \times 0,5$$

Böylece zamana bağlı olarak gruplar arasında tümör büyüklüğü değişimlerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Tümör hücrelerinin hayvanlara verilmesinden sonra 29. gün hayvanların ötenazileri gerçekleştirildi ve çalışmanın deneysel bölümü tamamlandı.

3.7. Primer Tümör Ağırlıklarının Ölçümü

Farelerin nekropsileri sırasında ilk olarak tümör dokuları dikkatlice çıkarıldı ve kitlelerin ağırlıkları hassas terazi ile tartılarak not edildi. Böylece gruplar arasında tümör ağırlıklarının karşılaştırılması amaçlandı.

3.8. Histopatolojik Değerlendirme

3.8.1. Dokuların İşlenmesi

Deneyin sonlanması ile birlikte fareler sakrifiye edildi ve nekropsileri yapılarak tümör dokuları çıkarıldı. Tümör dokuları iki eşit parçaya ayrıldı ve bir parçası %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 2 gün boyunca tespit edildi. Dokular tespit edildikten sonra tam otomatik doku takip cihazında (Leica ASP300S, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) doku takibi sağlandı. Tam otomatik doku takip cihazı solüsyonları ve uygulama süreleri Tablo 3.3'te; tamponlu formalin'in hazırlanışı Tablo 3.4'te verildi.

Tablo 3.3. Tam otomatik doku takip cihazı solüsyonları ve uygulama süreleri

Solüsyon	Süre
%10 Formalin	1 saat
Distile su	1 saat
%50 etanol	1 saat
%80 etanol	1 saat
%96 etanol	1 saat
Absolü etanol	1 saat
Absolü etanol	1 saat
%50 ksilol etanol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	1 saat

Tablo 3.4. Tamponlu formalin solüsyonunun hazırlanışı

Solüsyon	Miktar
%37 Formaldehit	100 ml
Distile su	900 ml

Tablo 3.4. (Devam) Tamponlu formalin solüsyonunun hazırlanışı

Sodyum fosfat monobazik monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$)	4 gr
Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4)	6,5 gr

Hazırlanışı: $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ve Na_2HPO_4 900 ml distile su içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine 100 ml %37'lik formaldehit eklendi ve toplam çözelti distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Takip aşaması sonrasında dokular çelik doku gömme kalıpları içerisine alınarak üzerine parafin dipenser-tankından alınan sıvı parafin (60°C) doldurularak gömme işlemi yapıldı ve bloklandı. Blokların soğuması sağlandıktan sonra mikrotom cihazı (Leica RM2155, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin boyama için normal lamlara, immunohistokimyasal boyama için polilizinli lamlara çekildi. Doku kesitleri tümör hücrelerini değerlendirmek için tümör dokusunun merkezi esas alınarak elde edildi.

3.8.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

Normal lamlara alınan kesitler metal lam sepetinde bir gece boyunca etüv içerisinde (45°C) bekletildi. Ardından etüv 70°C'ye çıkarılarak 30 dakika bekletildikten sonra 10 dk ksilen I, 10 dk ksilen II, 10 dk ksilen III, 10 dk ksilen IV solüsyonlarında tutularak deparafinizasyon işlemi gerçekleşti. Ksilenin uzaklaştırılması ve rehidrasyon amacıyla 3'er dk sırasıyla absöü etanol, %80'lik etanol ve %50'lik etanol serilerinden geçirildi. Bu işlemden sonra 5 dk distile suda bekletilerek rehidrasyon işlemi tamamlandı. Kesitler 8 dk Hematoksilen solüsyonunda bekletildi. Akarsuda 5 dk yıkama yapıldı. Absöü alkol içerisinde 30 saniye bekletildi. Ardından kesitler Eozin solüsyonunda 2 dk bekletildikten sonra akarsuda yıkandı. Yıkama sonrasında sırasıyla %50'lik etanol, %80'lik etanol ve absöü etanolden geçirildi. Boyanan kesitlerin kuruması ile birlikte ksilene daldırılıp çıkarıldı ve lam-lamel arasına Entellan (HX31394161, Sigma-Aldrich, Almanya) damlatılarak kapatıldı. Tümör hücreleri ışık mikroskopunda ($\times 200$ büyütme, Carl Zeiss Axioscope 5, Carl Zeiss Suzhou Co., Ltd) görüntülenerek fotoğraflandı.

3.8.3. Tümörlerin Nekroz Yüzdesi

Tümörlerin histopatolojik değerlendirmesinde, QuPath-0.5.1 programı kullanılarak nekroz sahasını barındıran tüm alanlar belirlenmiştir ($\times 8$ büyütme, stereo mikroskop). Tümör alanı ve nekroz alanı (μm^2) belirlenerek yüzde değeri hesaplanmıştır.

3.9. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Primer meme tümörü dokularının immunohistokimyasal boyamasında mouse monoklonal CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule), HSP90 alpha/beta, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Polyclonal Ki-67 (proliferasyon Kiel 67) primer antikorları ve UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Horseradish Peroxidase) (Ready-To-Use) (TP-060-HL, Thermo Fisher Scientific, ABD) sekonder antikor ve 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kiti ((DAB Substrate System) (TA-060-HD, Thermo Fisher Scientific, ABD)) kullanıldı. Tüm immunohistokimyasal boyama işlemleri manuel olarak yapıldı. Deney süresince kullanılan primer antikor ve sekonder antikorlar hakkında bilgiler Tablo 3.5'te gösterildi.

Tablo 3.5. Tümör dokularının immunohistokimyasal boyamalarında kullanılan antikorlar hakkında bilgiler

Antikorlar	Katalog No.	Üretici Firma	Dilüsyon	İnkübasyonu Süresi	İnkübasyon Sıcaklığı
Mouse Monoklonal CD31/PECAM-1 (H-3) (Primer Antikor)	sc-376764	Santa Cruz Biotechnology, Inc. ABD	1/100	Overnight	4°C
Mouse Monoklonal HSP90 alpha/beta (Primer Antikor)	sc-13119	Santa Cruz Biotechnology, Inc. ABD	1/100	Overnight	4°C
Mouse Monoklonal PCNA (Primer Antikor)	307902	Biolegend, San Diego, CA, ABD	1/100	Overnight	4°C

Tablo 3.5. (Devam) Tümör dokularının immunohistokimyasal boyamalarında kullanılan antikorlar hakkında bilgiler

Rabbit Polyclonal Ki-67 (Primer Antikor)	28074-1-AP	Proteintech, San Diego, California	1/2000	Overnight	4°C
Ultra V Block (Sekonder Antikor)	TA-060-UB	Thermo Fisher Scientific, ABD	Stok	10 dakika	Oda sıcaklığı
Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Sekonder Antikor)	TP-060-BN	Thermo Fisher Scientific, ABD	Stok	10 dakika	Oda sıcaklığı
Streptavidin Peroxidase (Sekonder Antikor)	TS-060-HR	Thermo Fisher Scientific, ABD	Stok	10 dakika	Oda sıcaklığı
DAB Chromogen	TA-006-HDC	Thermo Fisher Scientific, ABD	Stok	-	Oda sıcaklığı
DAB Substrate	TA-006-HDS	Thermo Fisher Scientific, ABD	Stok	-	Oda sıcaklığı

3.9.1. Boyama Protokolü

3.9.1.1. Isıtma ve Deparafinize Etme

Kesitler bir gece boyunca etüv içerisinde (45°C) bekletildi. Ardından etüv 60°C'ye çıkarılarak 30 dakika bekletildikten sonra 10 dk ksilen I, 10 dk ksilen II, 10 dk ksilen III, 10 dk ksilen IV solüsyonlarında tutularak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından kesitler ksilenin uzaklaştırılması ve rehidrasyon amacıyla 3'er dk sırasıyla absolü etanol, %80'lik etanol ve %50'lik etanol serilerinden geçirildi. Bu işlemten sonra 10 dk distile suda bekletilerek rehidrasyon işlemi tamamlandı.

3.9.1.2. Antijen Retrieval

Primer antikorun üretici firma talimatına göre ısı kaynaklı antijen retrieval yöntemi yapıldı. Antijen retrieval işleminde ısı, otoklav kullanılarak sağlandı. Antijen retrieval için 10 mM (milimolar) sitrat tamponu (pH:6) kullanıldı. Sitrat tamponu yapımı Tablo 3.6'da açıklandı.

Tablo 3.6. Sitrat tamponu hazırlama

Çözelti A: 0,1 M Sitrik Asit Çözeltisi	
Sitrik asit monohidrat	21 gram
Distile su	100 mililitre

Hazırlanışı: Sitrik asit monohidrat, 100 mililitre distile su içerisinde çözülür.

Tablo 3.6. (Devam) Sitrat tamponu hazırlama

Çözelti B: 0,1 M Sodyum Sitrat Çözeltisi	
Trisodyum sitrat dihidrat	29,4 gram
Distile su	100 mililitre

Hazırlanışı: Trisodyum sitrat dihidrat, 100 mililitre distile su içerisinde çözülür.

Tablo 3.6. (Devam) Sitrat tamponu hazırlama

Çalışma Solüsyonu	
Solüsyon A	9 mililitre
Solüsyon B	41 mililitre
Distile su	450 mililitre

Hazırlanışı: Solüsyon A, Solüsyon B ve Distile Su karıştırıldı ve toplam 500 mililitreye distile su ile tamamlandı. pH 6 olacak şekilde HCl ya da NaOH (Sodyum hidroksit) ile ayarlandı.

Kesitler sitrat tamponu ile dolu plastik kaynatma kaplarına yerleştirildi. 120°C 15 dk basınçlı ısıya maruz bırakıldı. Isıtma işlemi ardından alınan kesitler oda ısısında 20 dk soğuması için bırakıldı. Soğumasının ardından immunohistokimyasal boyama aşamasına geçildi.

3.9.1.3. İmmunohistokimyasal Boyama

Antijen retrieval sonrası oda ısısında soğuması sağlanan kesitler fosfat tamponlu salin (*phosphate buffered saline*-PBS) içerisinde 5 dakika inkübe edildi. PBS yapımı Tablo 3.7’de açıklandı.

Tablo 3.7. Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (0.01 M, pH 7.2)

Solüsyon	Miktar
Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4)	1,48 gram
Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4)	0,43 gram
Sodyum klorür (NaCl)	7,20 gram
Distile su	1 litre

Hazırlanışı: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl 1 litre distile su ile çözdürüldü. Hazırlanan çözelti pH'sı HCl ya da NaOH ile 7.2 olarak ayarlandı.

İmmunohistokimyasal boyama, UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent HRP kit protokolüne göre yapıldı. Endojen peroksidaza bağlı spesifik olmayan arka plan boyamasını azaltmak için, kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika inkübe edildi. İki kez PBS içinde 5 dk yıkandı. Ultra V Block uygulanarak spesifik olmayan arka plan boyamasını engellemek amacıyla oda sıcaklığında 10 dakikayı aşmadan inkübe edildi. Ardından PBS uygulanmadan kesitler silkelendi. Kesitler üzerine primer antikorlar uygulandıktan sonra tüm kesitler bir gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Primer antikor uygulamasını takiben tüm kesitler dört kez, 5'er dk PBS içerisinde çalkalandı ve ardından kesitler üzerine sekonder antikor damlatıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Dört kez 5'er dk PBS içinde çalkalandı. Kesitler üzerine Streptavidin Peroksidaz uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Dört kez 5'er dk PBS içinde yıkama yapıldı. UltraVision Detection System Large Volume DAB Substrate System kitinde önerilen oranda DAB kromojen (40-100 μl) ve DAB substratı (1 ml) karıştırılarak kesitler üzerine uygulandı ve peroksidaz uyumlu kromojen ile 2-10 dk ışık mikroskopunda kontrollü şekilde inkübe edildi. DAB uygulaması sonrası kesitler distile su ile yıkandı. Arkaplan boyaması için kesitler üzerine Mayer's Hematoksilen (HX14931949, Sigma-Aldrich, Almanya) 12 saniye uygulandı ve akan suda yıkandı. Ardından kesitler sırasıyla %96 etanol ve absölü etanolden geçirildi ve lam lamel arasına Entellan damlatılarak kapatıldı.

3.9.2. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi

Tümör dokularının immunohistokimyasal ekspresyonları Carl Zeiss Axioscope 5 (07745 Jena, Almanya) ışık mikroskobu altında değerlendirildi. İmmun reaksiyon

skorlamaları her bir antikör için ilgili kontrol dokularının boyanma özelliğine ve literatürde belirlenen skorlama yöntemlerine göre belirlendi.

3.9.2.1. Ki-67 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Kantitatif olarak Ki-67 ekspresyonu değerlendirilmesinde ışık mikroskobu altında $\times 400$ büyütmede, her hayvanın tümör dokusundan pozitif boyanan beş farklı alandan fotoğraf çekildi. Fotoğraflar, QuPath 0.5.1'e (hücre görüntü analiz yazılım programı) yüklendi. Fotoğraf türü H-DAB olarak kaydedildi. Yüklenen görüntülerin piksel birimi μm 'ye dönüştürülerek piksel ayarı yapıldı. Üretici firmanın belirlemiş olduğu pozitif kontrol dokusundan alınan DAB OD değeri belirlendi ve tüm görüntülerde bu değer üzerinden QuPath 0.5.1'de analiz sekmesinden hücre görüntü analizleri içerisindeki pozitif hücre tespiti bölümü kullanılarak pozitif hücre tespiti otomatik olarak hesaplandı. Yapılan tespitlerde çekirdek boyanması dikkate alındı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-1500 arasında değişmekteydi. Elde edilen sonuçlar hücrelerin Ki-67 çekirdek boyanmasına göre negatif ve pozitif tümör hücresi ile yüzdesi olarak hesaplandı (Lea ve ark., 2021; Marwah ve ark., 2018; Zhong ve ark., 2016).

3.9.2.2. CD31 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

CD31 ekspresyonunun kantitatif olarak değerlendirilmesinde ışık mikroskobu altında $\times 400$ büyütmede, her hayvanın primer tümör dokusundan pozitif boyanan beş farklı alandan fotoğraf çekildi. Görüntüler, hücre görüntü analiz yazılım programı olan QuPath 0.5.1'e yüklendi. Fotoğraf türü H-DAB olarak kaydedildi. Yüklenen görüntülerin piksel birimi μm 'ye dönüştürülerek piksel ayarı yapıldı. QuPath 0.5.1'de analiz sekmesinden hücre görüntü analizleri içerisindeki pozitif hücre tespiti bölümü kullanılarak pozitif hücre tespiti otomatik olarak hesaplandı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-2000 arasında değişmekteydi. Elde edilen sonuçlar hücrelerin CD31 boyanmasına göre negatif ve pozitif tümör hücresi ile yüzdesi olarak hesaplandı.

3.9.2.3. PCNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Her hayvanın primer tümör doku kesitlerinin kantitatif olarak PCNA ekspresyon değerlendirmesinde ışık mikroskopunda $\times 400$ büyütmede 5 farklı alandan görüntüler alındı. Görüntüler QuPath 0.5.1'e yüklendi ve fotoğraf türü H-DAB seçildi. Yüklenen görüntülerin piksel birimi μm 'ye dönüştürülerek piksel ayarı yapıldı. Manuel olarak en güçlü PCNA boyamasının olduğu çekirdek dikkate alınarak DAB OD değeri ve eşik aralığı ayarlanarak optimizasyon yapıldı ve tüm görüntülere uygulandı. Analiz yapılacak alan dikdörtgen işaretleyici ile işaretlendi. Analiz sekmesinden hücre görüntü analizleri içerisindeki pozitif hücre tespiti bölümü kullanılarak pozitif hücre tespiti otomatik olarak hesaplandı. Yapılan tespitlerde çekirdek boyanması dikkate alındı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-2000 arasında değişmekteydi. Elde edilen sonuçlar hücrelerin PCNA çekirdek boyanmasına göre negatif ve pozitif tümör hücresi ile yüzdesi olarak hesaplandı.

3.9.2.4. HSP90 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

HSP90 ekspresyonunun kantitatif olarak değerlendirilmesinde ışık mikroskobu altında $\times 400$ büyütmede, her hayvanın primer tümör dokusundan pozitif boyanan beş farklı alandan fotoğraf çekildi. Görüntüler, hücre görüntü analiz yazılım programı olan QuPath 0.5.1'e yüklenerek değerlendirildi. Değerlendirme Ki-67 ekspresyonu ölçümünde yapılan işlemlerle aynı şekilde uygulandı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-2000 arasında değişmekteydi. Analiz sonuçları ekspresyon yüzdesi olarak belirlendi.

3.10. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile mRNA Ekspresyonu

3.10.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Tedavi uygulanan 5 grup farenin tümör dokuları fareler kurbanı edildikten sonra eşit iki parçaya ayrıldı. Tümör dokuları dondurulmadan steril homojenizatör ile homojenizasyonları yapıldı. Homojenizasyon sonrasında örnekler $-80^{\circ}C$ 'de muhafaza

edildi. Elde edilen örneklere spin kolon metoduna göre ribonükleik asit (RNA) ekstraksiyon prosedürü uygulandı.

3.10.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Hibrigen Dokudan Ribonükleik Asit (RNA) Ekstraksiyon (katalog no: MG-DRNA-01 (Hibrigen Biyoteknoloji, Gebze, Türkiye)) kiti kullanıldı. Total RNA izolasyonu için kitin prosedürüne uygun olarak aşağıdaki işlemler uygulandı. Her 50-100 mg doku için 1 ml Tissue Lysis Buffer kullanılarak dokular bu solüsyon içinde homojen hale getirilerek 10 dk buz üzerinde inkübe edildi. Örnekler 12.000 rpm'de, 4°C'de, 10 dk santrifüjlenerek süpernatant yeni bir RNaz (ribonükleaz) bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne alındı. Tüplere 200 µl kloroform eklenip, vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. Tüpler 4°C'de 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir RNaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Aktarılan süpernatantın hacmine göre ½ oranında etanol (%100) eklenerek vorteks ile iyice karıştırıldı, ardından karışım spin kolona alındı. 4°C'de 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı. 500 µl Wash Buffer TRP eklendi ve 4°C'de 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı. 500 µl Wash Buffer TRW eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı, ardından 4°C'de 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım atıldı. Kolon kuruması için 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra 1,5 ml'lik RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Daha sonra direkt olarak membran üzerine dokunun yoğunluğuna göre ortalama 75 µl RNase-free water kolona eklenerek 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Toplama işlemi için 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek mRNA örnekleri elde edildi. Elde edilen RNA'lar cDNA (tamamlayıcı DNA (*complementary DNA*)) sentezi basamağına kadar -80°C'de saklandı.

3.10.3. cDNA Sentezi

RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezi basamağı uygulandı. cDNA sentezi için Hibrigen cDNA sentez kiti (katalog no: MGCDNA01 (Hibrigen Biyoteknoloji, Gebze, Türkiye)) kullanıldı.

RNA örneği cDNA dönüşümü için 100 ng konsantrasyonunda kullanıldı. Her örnek için RNA + Random 6-mer primer (0,5 µL) + Oligo dTs (0,5 µL) + Nükleaz free su' dan 12 µL'e eklendi. Hazırlanan 20 µL RNA örneği karışımı 72°C'de 5 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından buz üzerinde soğutuldu. Son hacim 20 µL olacak şekilde Tablo 3.8'de belirtilen reaksiyon bileşenleri RNA örnekleri üzerine eklenerek 0,2 µL'lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve Thermal Cycler (Bio-Rad, CFX96™ Real-Time PCR, Amerika) cihazına yerleştirildikten sonra Tablo 3.9'da belirtilen cihaz protokolü ile reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, Real-Time PCR için hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

Tablo 3.8. Master miks hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar

Solüsyon	Miktar
Reaction Buffer	4 µl
Enzim mix	1 µl
Total RNA	1-6 µl
Nükleaz free dH ₂ O	20 µl'ye
Toplam hacim	20 µl

Master miks hazırlandıktan sonra aşağıda yer alan thermal cycler protokolü ile cDNA eldesi sağlandı.

Tablo 3.9. Thermal cycler protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman	Adım
42	60 dk	cDNA sentezi
80	10	Enzim inaktivasyonu

3.10.4. Primer Dizaynı

HSP90 target gen bölgesi ve GAPDH (Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz), referans gen bölgeleri için kullanılan primerler, NCBI ve ENSEMBLE gen bankaları kullanılarak elde edilen referans genom üzerinden NCBI Primer Blast Programı ile

fare türüne spesifik olarak dizayn edildi. Elde edilen primerlerin spesifitesi, yine NCBI BLAST programı ile kontrol edildi.

3.10.5. Primerlerin Optimizasyonu

Primerler, üretici firmanın kullanım kılavuzunda belirtilen talimatlara göre 100 µM (100 pmol/µL) için gerekli su miktarı eklenerek sulandırıldı. Sulandırılan primerler için aşağıda belirtilen ara stoklar oluşturularak Real-Time PCR analizi için hazır hale getirildi.

3.10.6. Primer Ara Stok Hazırlanışı

İleri (*forward*) ve ters (*reverse*) yöndeki primerlerden 10 µM ara stok oluşturuldu. Bunun için 100 µM'lık ana stoktan 10 µL alınarak üzerine 90 µL su eklendi. Ara stoklar hazırlanırken $M1 \times V1 = M2 \times V2$ klasik formülü kullanıldı.

3.10.7. Real-time qPCR

Real-Time qPCR analizi için Hibrigen marka SYBR Green qPCR MIX (katalog no: MG-SYBR-01 (Hibrigen Biyoteknoloji, Gebze, Türkiye)) master miks kiti kullanıldı. GAPDH geni yapılan literatür araştırması doğrultusunda çalışmaya Housekeeping gen olarak dahil edildi.

Real-Time qPCR analizi için yapılan primer dizaynı sonrası aşağıdaki primerler ile reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 3.10.).

Tablo 3.10. Real-Time qPCR analizi için yapılan primer dizaynlar

Primer Adı	Primer Sekansı	Sentezletilen Firma
HSP90-MOU-F	TTCCGGGCCCTTCTTTTGT	Oligomer, Çankaya/Ankara
HSP90-MOU-R	TCGGAGACGTTCCACAAAGG	Oligomer, Çankaya/Ankara
GAPDH-MOU-F	GGGTCCCAGCTTAGGTTCAT	Oligomer, Çankaya/Ankara
GAPDH-MOU-R	CTCGTGGTTCACCCCATCA	Oligomer, Çankaya/Ankara

Real-Time qPCR analizi için Tablo 3.11'deki gibi master miks hazırlandı.

Tablo 3.11. Real-Time qPCR analizi için master miks hazırlanması

Master Miks İçeriği	Master Miks İçeriği	Son Konsantrasyon
2× SYBR Green qPCR Mix	10 µl	1×
Forward Primer (10 µM)	0,4 µl	0,05-0,9 µM
Reverse Primer (10 µM)	0,4 µl	0,05-0,9 µM
cDNA	Değişken	Mak. 2 µl
RNase-Free Distile Su	20 µl'ye tamamlanacak şekilde	
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 µl	

Real-Time qPCR analizi BIO RAD marka CFX96™ Real Time System PCR cihazı ile aşağıdaki PCR protokolü uygulandı (Tablo 3.12).

Tablo 3.12. PCR protokolü

PCR Basamağı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Ön Denatürasyon	95	5 dakika	×1
Denatürasyon	95	15 saniye	×40
Annealing	57	60 saniye	
Melting Curve	60-95	2 dakika	×1

3.10.8. Rölatif Kantitasyon Hesaplanması

RNA ekspresyon miktar tayini, referans olarak GAPDH transkripti kullanılarak kontrol grubuna normalleştirilerek uygulandı. Göreceli niceleme hesaplamasında " $\Delta\Delta C_t$ Metodu" kullanıldı. $\Delta\Delta C_t$ hesaplaması aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

- Hem hedef grup hem de referans grubundaki her numunenin hem hedef RNA'sı hem de referans RNA'sı için Real-Time PCR sonucunda C_t değerleri elde edildi. Teknik tekrarlı çalışmalarda C_t değerlerinin ortalaması alınarak hesaplama devam edildi.
- Hedef grup ΔC_t değerleri, hedef gruptaki ilgili genin C_t değerinin referans (housekeeping gen) C_t değerine oranlanarak elde edildi.
- Referans grubun ΔC_t değerleri, referans grubundaki hedef gene ait C_t değerinin referans (housekeeping gen) C_t değerine oranlanarak elde edildi.
- C_t değerleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ olarak işlendi ve kat değişimi (fold change) hesaplandı.

- Kat Değişikliği değeri 1'i aşarsa, hedef grup RNA ifadesinin referans grubunun RNA ifadesine göre arttığı şeklinde yorumlandı. Kat Değişikliği değeri 1'in altında ise hedef grubun RNA ifadesinin referans grubunun RNA ifadesine göre azaldığı şeklinde yorumlandı.

3.11. İstatistiksel Değerlendirme

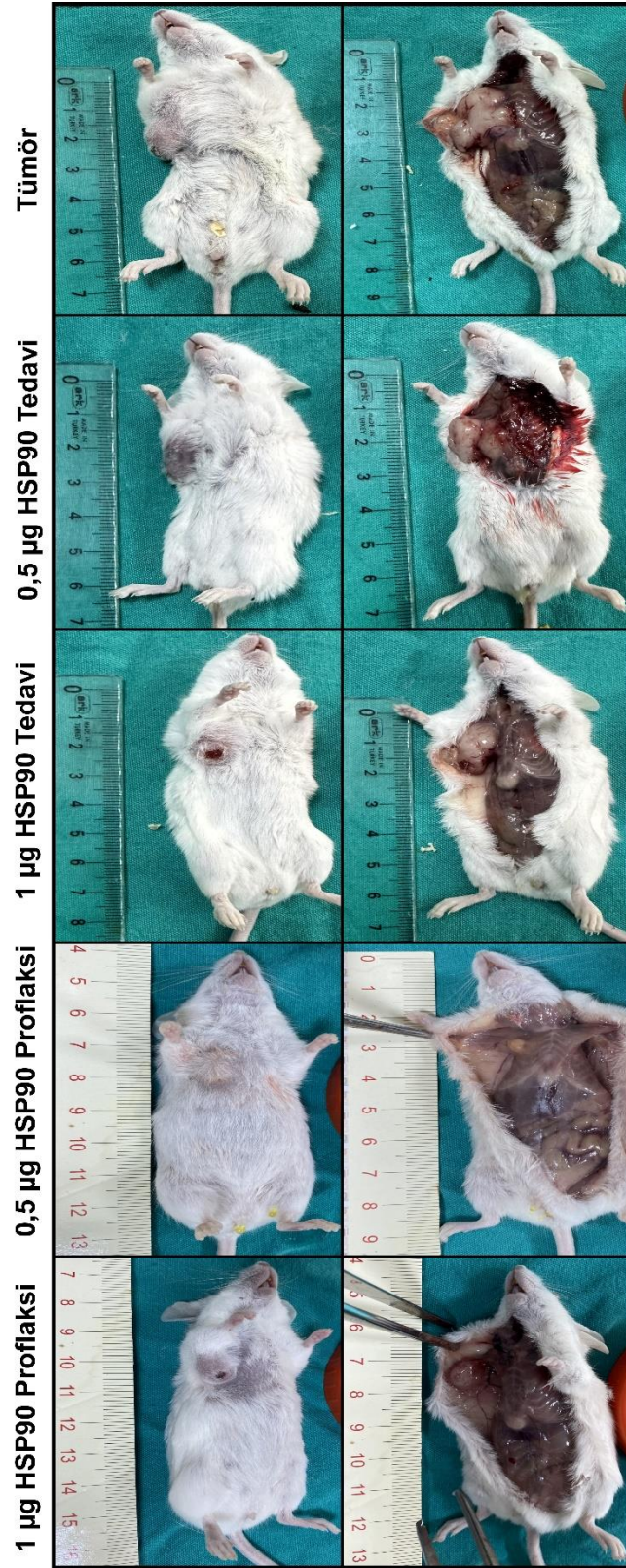
Gruplar GraphPad Prism 8.0.2 programı kullanılarak analiz edildi. Grafikler GraphPad Prism 8.0.2 programı kullanılarak çizildi. Gruplardaki veri setinin normal dağılıma uygun olup olmadığını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi yapıldı ve P değerinin 0,05'ten büyük çıkması halinde normal bir dağılım gösterdiği kabul edildi. Grupların varyansının homojen olup olmadığına Bartlett's testi ile bakıldı ve P değerinin 0,05'ten büyük çıkması halinde varyansların homojen olduğu kabul edildi. Normal dağılım ve homojenlik gösteren gruplar One-way Anova testi kullanılarak değerlendirildi. P değerinin 0,05'ten küçük ve eşit çıkması halinde gruplar arasında anlamlı bir farkın olduğu şeklinde yorumlandı. Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis testi uygulandı. P değerinin 0,05'ten küçük ve eşit çıkması halinde gruplar arasında anlamlı bir farkın olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Toplam 5 gruptan 10'ar olmak üzere 50 adet BALB/c ırkı, dişi farenin sağ torasik meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edilen 4T1 tümör hücrelerinin 29. günde oluşan makroskopik görünümleri şekil 4.1'de verilmiştir. Primer tümör kitleleri 0,5-2 cm çap aralđında, ovalden silindire değişen şekillerde, solid yapıda, beyaz-krem renginde bir görünüme sahiplerdi. Çalışma gruplarının tümör kitlelerinin makroskopik görünümü şekil 4.1'de gösterildi.





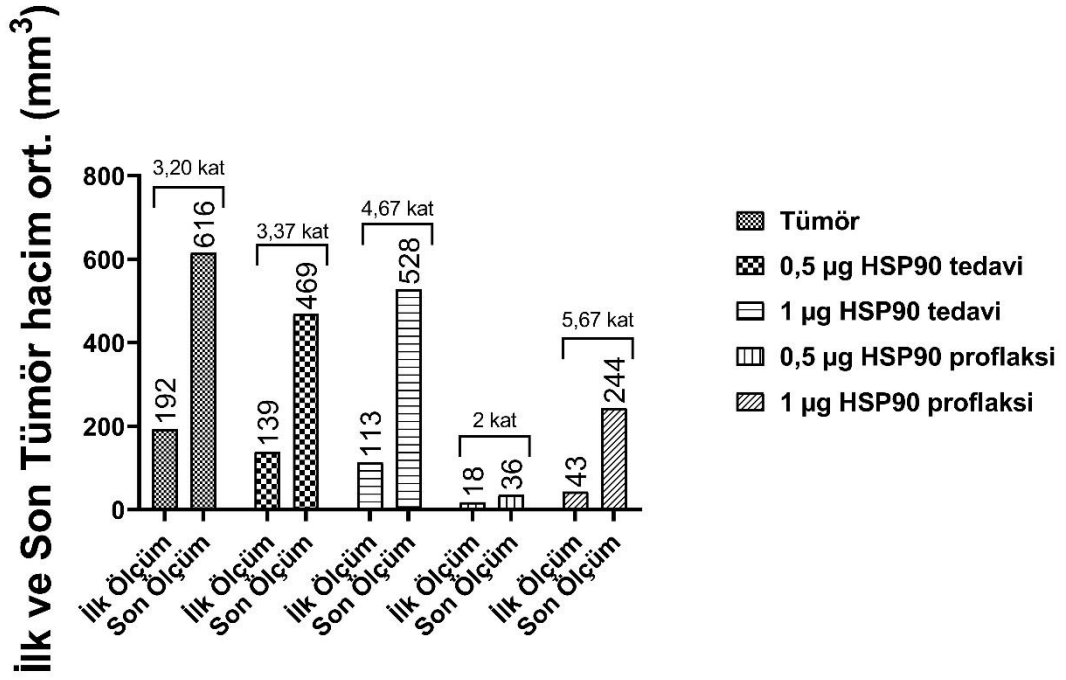
Şekil 4.1. Çalışma gruplarının tümör kitlelerinin makroskobik görünümü. Çalışma gruplarında BALB/c ırkı dişi farelerin sağ torasik meme dokusuna ortotopik olarak

enjekte edilen 4T1 tümör hücrelerinden 29. günde oluşan tümör kitlelerinin sakrifikasyon sırasındaki makroskopik görünüşleri

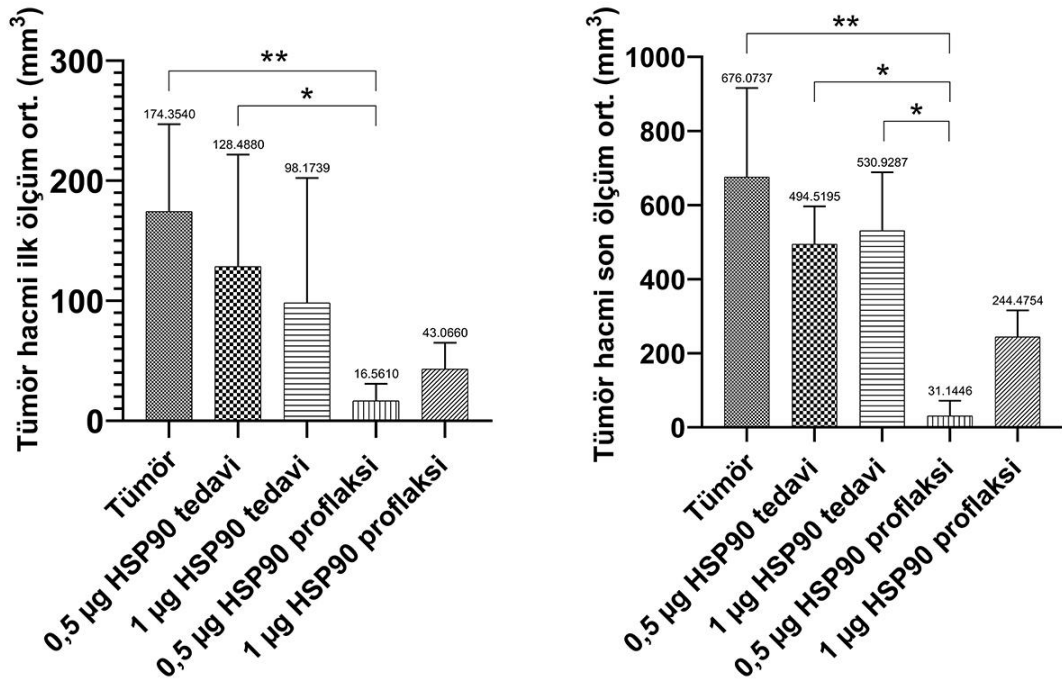
4.2. Primer Tümör Ağırlıkları, Günlük Hacim Değişimleri ve Canlı Ağırlık Analizi

Tümör implantasyonunun 7. günü (ilk ölçüm) ile 29. günü (son ölçüm) arasında tüm gruplardaki hayvanların primer tümör hacimleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. 1 µg HSP90 profilaksi grubu, ilk ölçümden son ölçüme kadar 5,67 kat büyüme göstererek en yüksek büyüme oranına sahip grup olarak kayıt edildi. Tümör hacminde büyüme oranları diğer gruplar arasında sırası ile 1 µg HSP90 tedavi grubunda 4,67 kat, 0,5 µg HSP90 tedavi grubunda 3,37 kat ve tümör grubunda 3,20 kat olarak gözlemlendi. En düşük büyüme oranı ise 0,5 µg HSP90 profilaksi grubunda (2 kat) görüldü. Primer tümörün hacmindeki oransal değişim analizi istatistik sonuçları Şekil 4.2’de gösterildi.

Gruplar arasında primer tümör hacmi ilk ölçüm ortalamaları kıyaslandığında tümör grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu arasında ($p=0,0035$) ve 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu arasında ($p=0,0421$) anlamlı bir fark vardı. Primer tümör hacmi ilk ölçüm ortalaması en düşüğe doğru sırasıyla 0,5 µg HSP90 profilaksi, 1 µg HSP90 profilaksi, 1 µg HSP90 tedavi, 0,5 µg HSP90 tedavi ve tümör grubu şeklindeydi. Gruplar arasında primer tümör hacmi son ölçüm ortalamaları kıyaslandığında ise tümör grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu ($p=0,0035$), 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu ($p=0,0484$) ve 1 µg HSP90 tedavi grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu ($p=0,0273$) arasında anlamlı bir fark görüldü. Primer tümör hacmi son ölçüm ortalaması en düşüğe doğru sırasıyla 0,5 µg HSP90 profilaksi, 1 µg HSP90 profilaksi, 0,5 µg HSP90 tedavi, 1 µg HSP90 tedavi ve tümör grubuydu. Gruplar arasındaki tümör hacmi ilk ve son ölçüm ortalamaları istatistik sonuçları Şekil 4.3’te gösterildi.

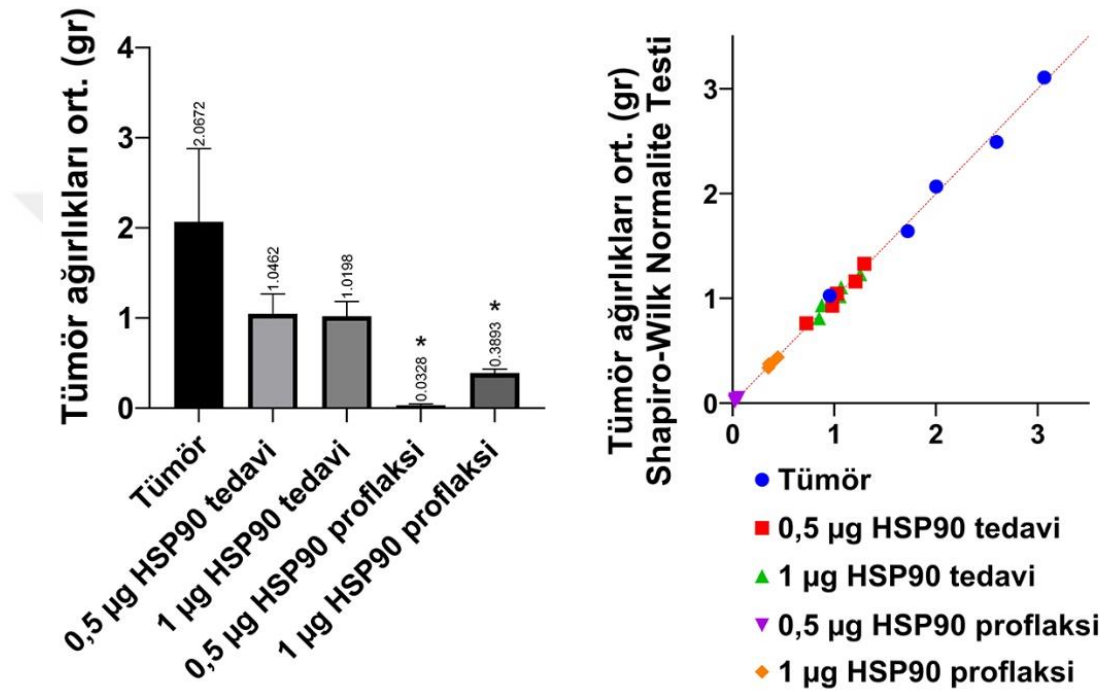


Şekil 4.2. Gruplar arasında primer tümör hacim ortalamalarının ilk (7. gün) ve son (29. gün) ölçüm oranları



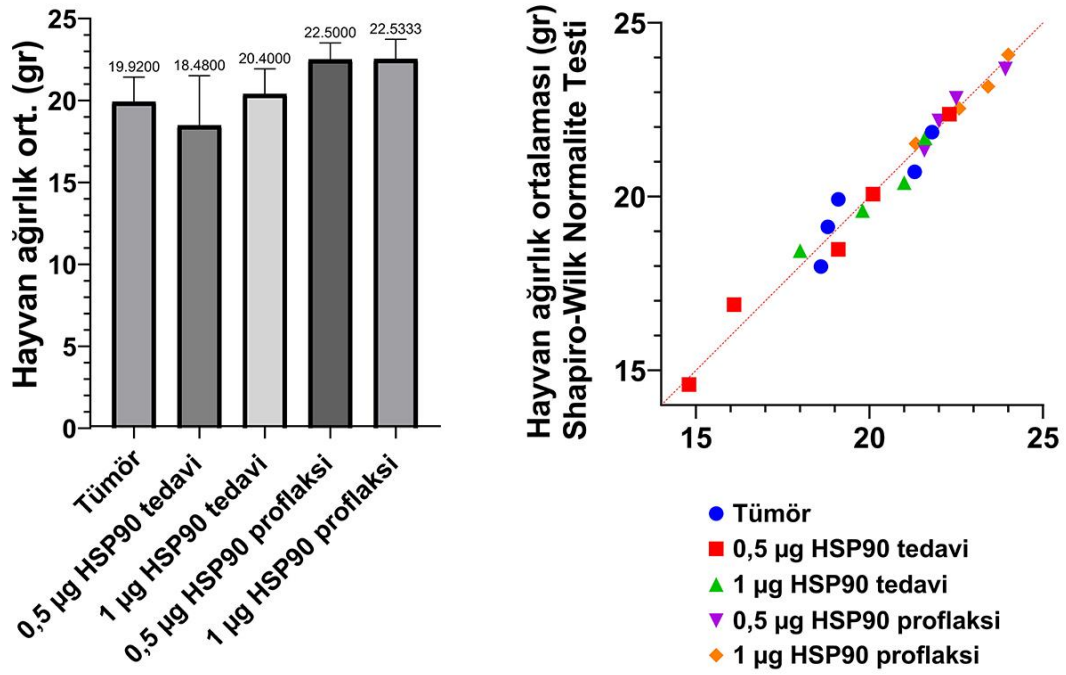
Şekil 4.3. Tümör hacmi ilk ve son ölçüm ortalamaları analizi sonuçları (*: P < 0,05; **: P < 0,01)

Tümör implantasyonunun 29. günü sakrifiye edilen farelerin primer tümör ağırlıkları arasında tüm gruplar kıyaslandığında tümör grubu ile 0,5 µg HSP90 proflaksi grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($P < 0,001$). Ayrıca tümör grubu ile 1 µg HSP90 proflaksi grubu arasında da anlamlı bir fark belirlendi ($P < 0,001$). 0,5 µg HSP90 proflaksi grubu ile 1 µg HSP90 proflaksi grubu arasında fark görülmedi ($p=0,7254$). Farelerin primer tümör ağırlıkları analizi Şekil 4.4'te gösterildi.



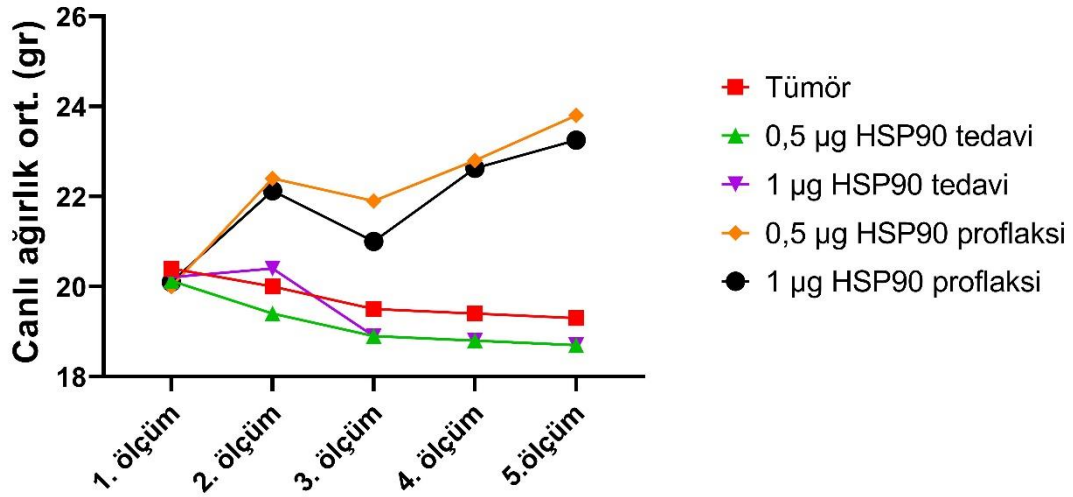
Şekil 4.4. Primer tümör ağırlıkları analiz sonuçları (*: $P < 0,001$).

Hayvanların canlı ağırlıkları arasında herhangi bir istatistiksel farka rastlanmamıştır ($p=0,3933$) (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. Hayvanların canlı ağırlıkları

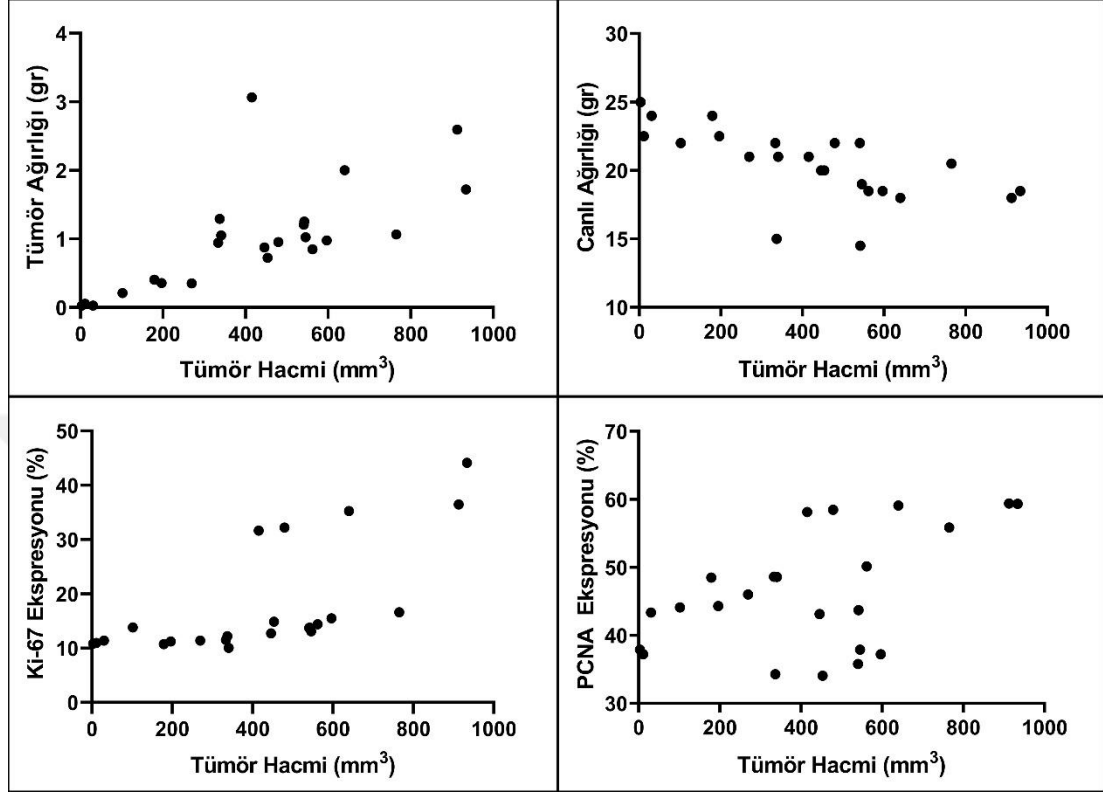
Hayvanların canlı ağırlıkları 7. günden itibaren üç günde bir olmak üzere beş kez tartıldı ve canlı ağırlık değişimleri Şekil 4.6’da gösterildi.



Şekil 4.6. Hayvanların canlı ağırlık değişimleri

Tümör ağırlığı (gr) ve tümör hacmi (mm³) arasında pozitif bir korelasyon belirlendi (r: 0,7111; P:0,0001). Tümör hacmi ile Ki-67 (r: 0,6718; p: 0.0004) ve PCNA (r: 0,5049; p: 0.0140) ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Tümör

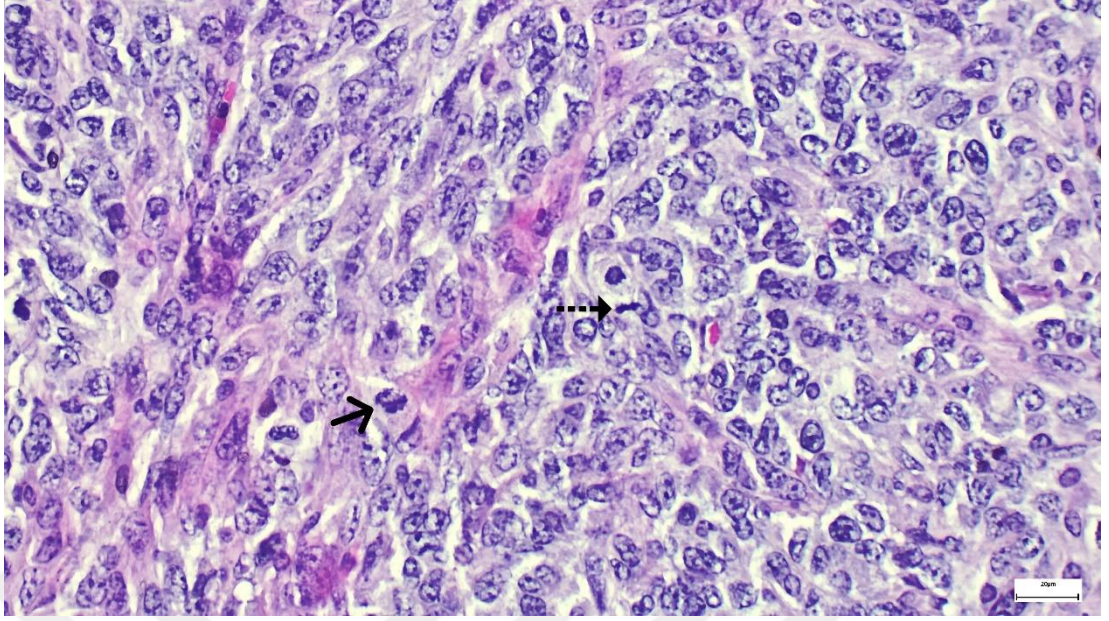
hacmi ve canlı ağırlığı arasında negatif bir korelasyon dikkati çekti ($r: -0,6329$; $p: 0.0012$). Korelasyon analizleri Şekil 4.7’de gösterildi.



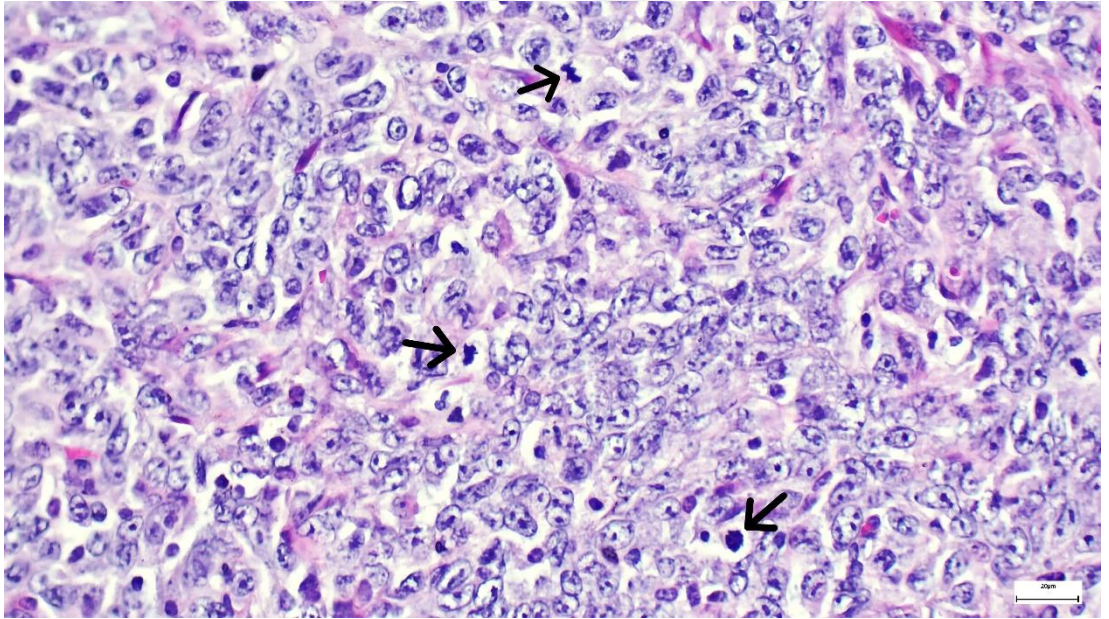
Şekil 4.7. Korelasyon analizleri

4.3. Histopatolojik Bulgular

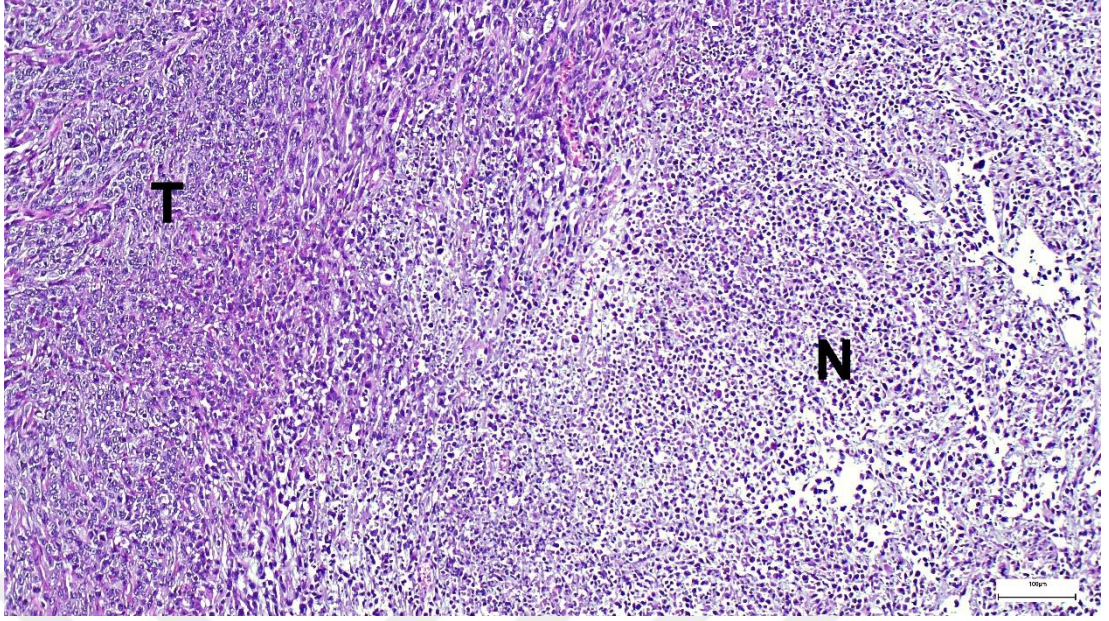
Tümör dokusunda hücreler incelendiğinde pleomorfik yapıda oldukları dikkati çekti. Çekirdekleri veziküler yapıdaydı, çekirdekçikler belirginleşmişti ve çekirdekçik sayısında artış göze çarptı. Sitoplazma ve çekirdek boyutlarının oranı incelendiğinde çekirdek boyutlarında büyüme görüldü ve çekirdek sitoplazma oranı artmıştı. Tümör hücreleri arasında yer yer mononükleer ve polimorfnükleer yangı hücrelerinin infiltrasyonu saptandı. Tümör dokusu kesitlerinden alınan $\times 400$ 'lük büyütmede ortalama 3-4 adet mitotik figüre rastlandı. Tüm tümör doku kesitlerinin merkezleri nekrotikti ve nekrotik alanlarda çoğunluğu nötrofil lökosit olan yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çekti. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14’de gösterildi.



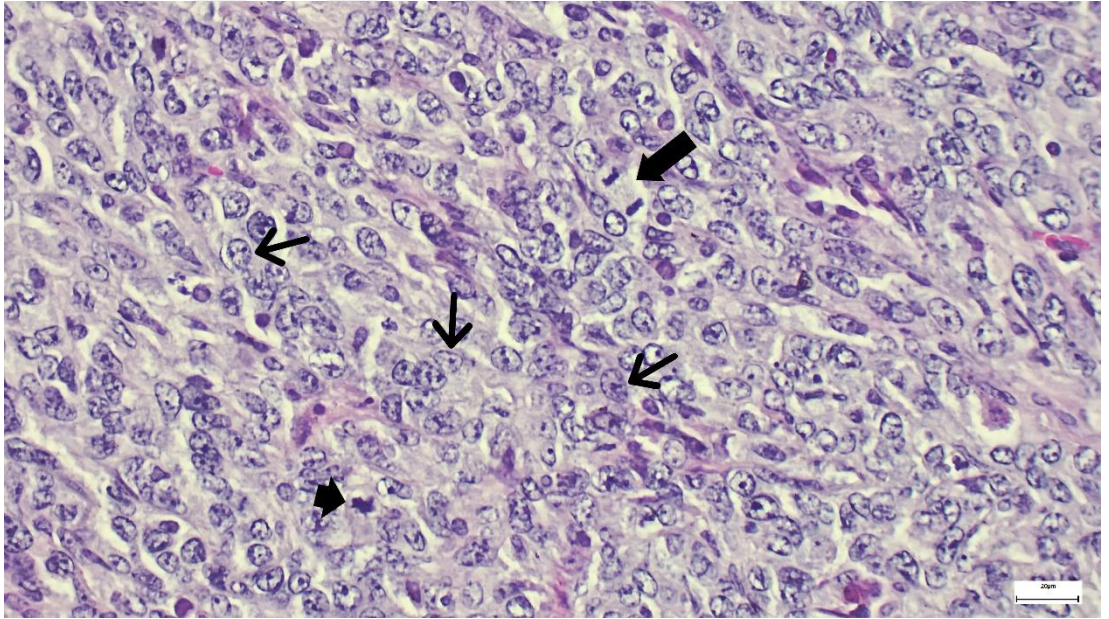
Şekil 4.8. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Veziküler çekirdeğe ve birden fazla çekirdekçiğe sahip tümör hücreleri, anafaz evresindeki mitotik figür (ok) ve atipik mitotik figür (kesikli ok); H&E boyama, Bar = 20 µm



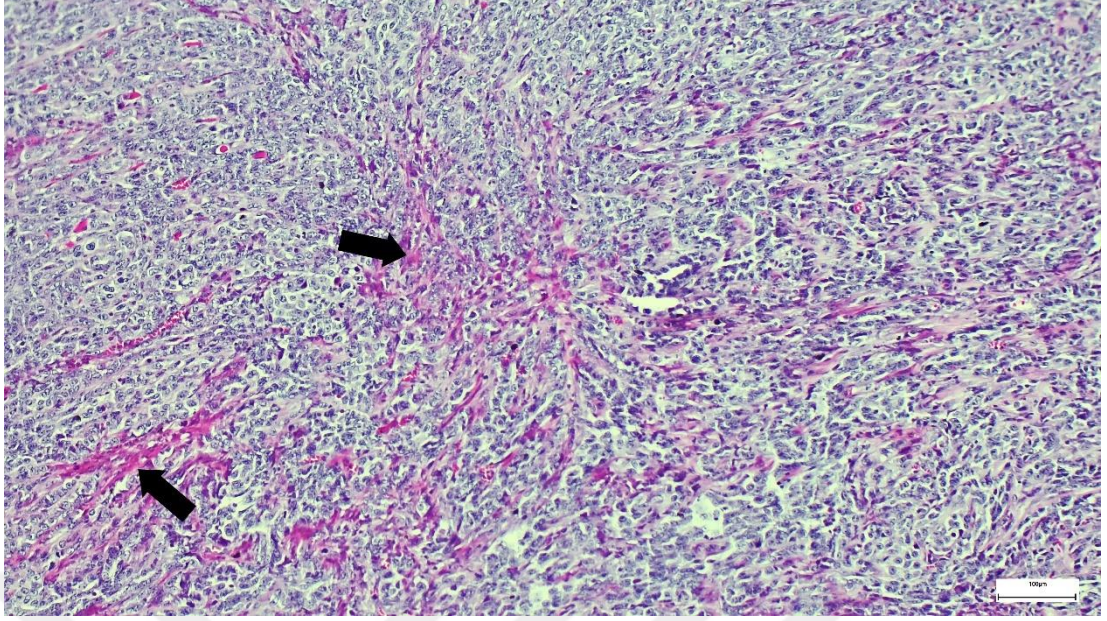
Şekil 4.9. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Atipik mitotik figürler (oklar); H&E boyama, Bar = 20 µm



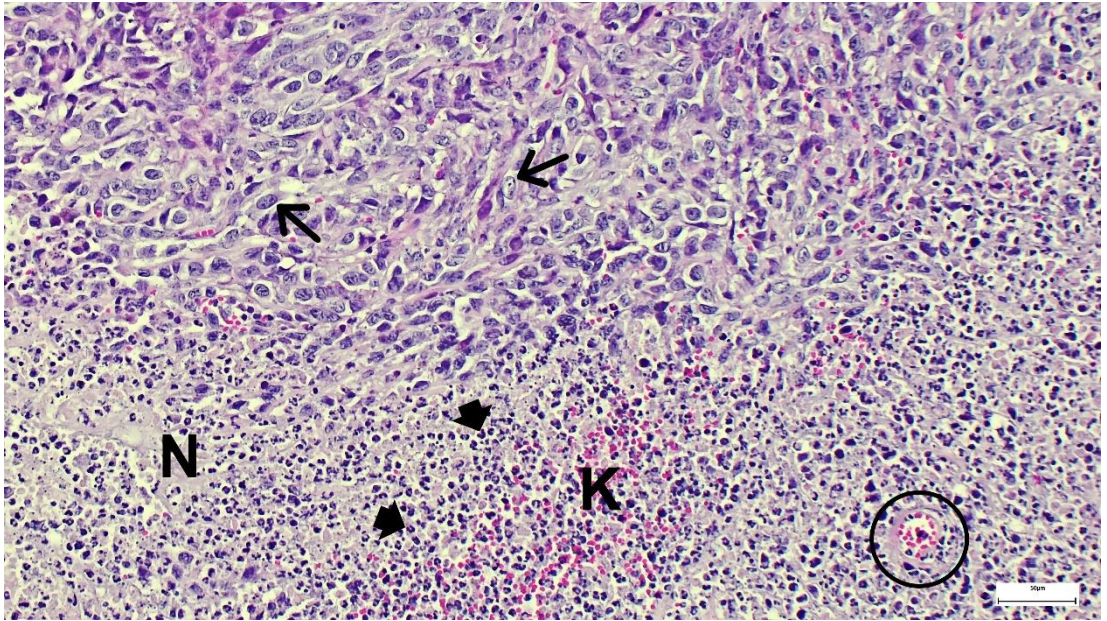
Şekil 4.10. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Tümör dokusundaki nekrotik alan (N), tümör hücrelerinin bulunduğu tümöral alan (T); H&E boyama, Bar = 100 µm



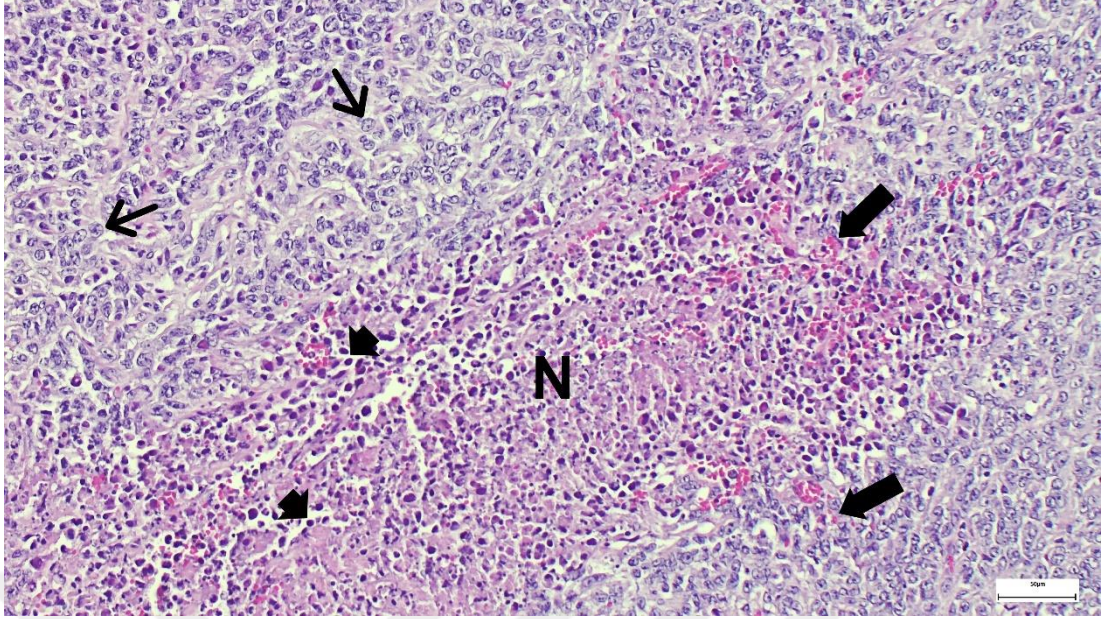
Şekil 4.11. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Veziküler çekirdeğe ve birden fazla çekirdekçiğe sahip tümör hücreleri (ince oklar), tipik mitotik figür (kalın ok), atipik mitotik figür (kısa ok); H&E boyama, Bar = 20 µm



Şekil 4.12. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Kas lifleri (kalın oklar); H&E boyama, Bar = 100 µm



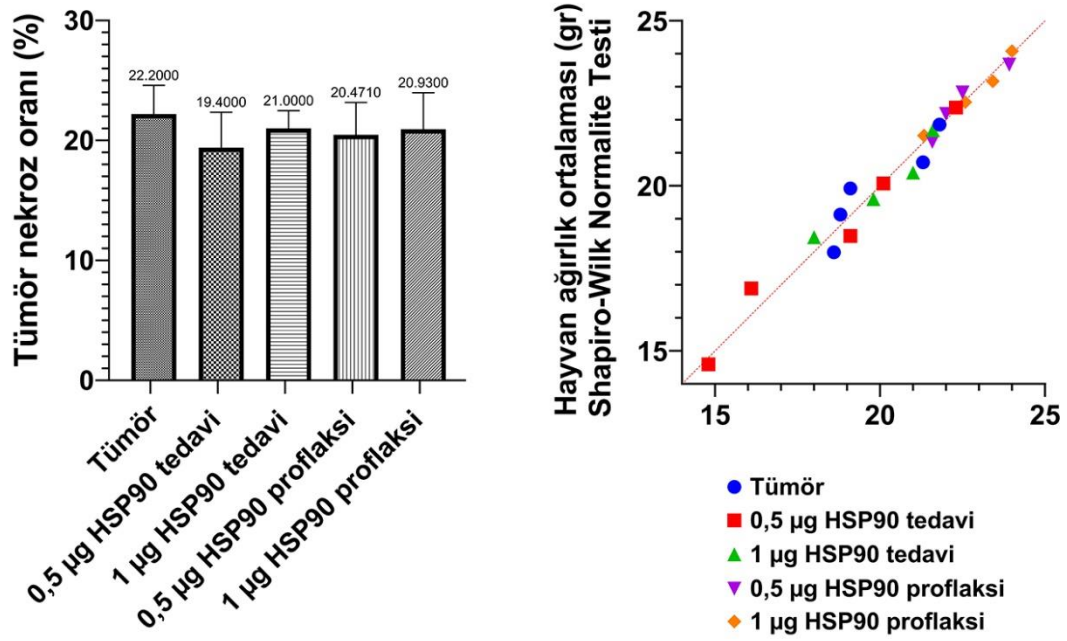
Şekil 4.13. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Nekroz alanı (N), kanama (K), damar (siyah halka), tümör hücreleri (ince oklar) ve nötrofil lökosit infiltrasyonları (kısa oklar); H&E boyama, Bar = 50 µm



Şekil 4.14. Primer tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Nekroz alanı (N), tümör hücreleri (ince oklar), kanama (kalın oklar), mononükleer lökosit infiltrasyonları (kısa oklar); H&E boyama, Bar = 50 µm

4.4. Primer Tümörün Nekroz Yüzdesi

Primer tümörün histopatolojik değerlendirmesinde en yüksek nekroz yüzdesi tümör grubunda görülürken (%22,20) 1 µg HSP90 tedavi grubunda %21,00, 1 µg HSP90 profilaksi grubunda %20,93, 0,5 µg HSP90 profilaksi grubunda %20,47 ve 0,5 µg HSP90 tedavi grubunda %19,40 olarak belirlendi (Şekil 4.15). Nekroz yüzdesi bakımından tüm gruplar arasında anlamlı bir fark dikkat çekmedi ($p=0,2081$) (Şekil 4.15).

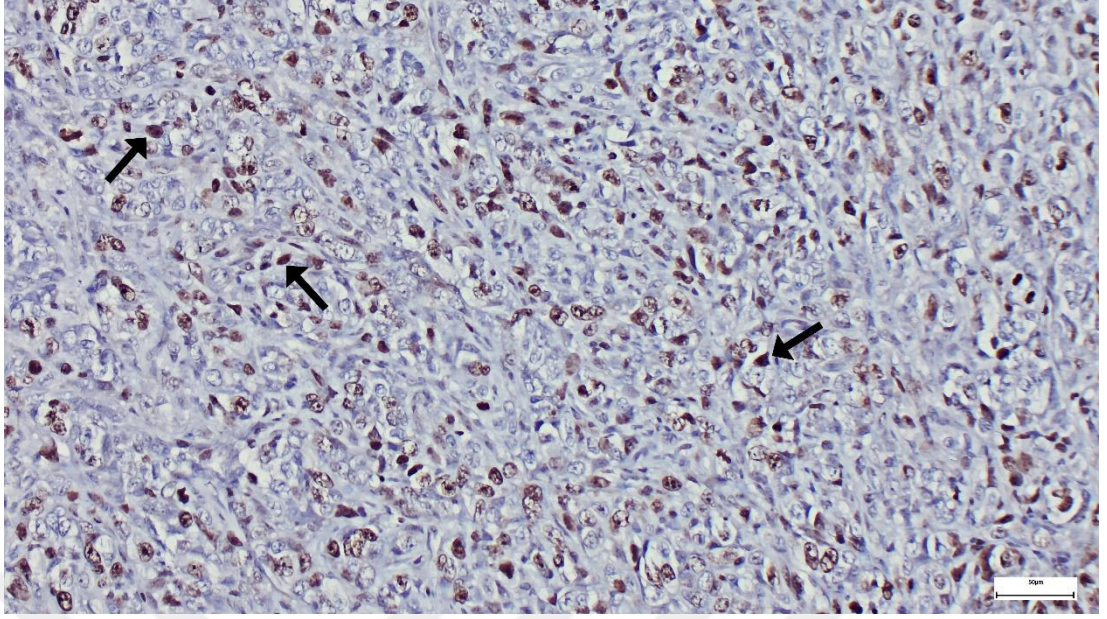


Şekil 4.15. Primer tümör nekroz oranlarının gruplar arasındaki istatistik sonuçları ($p>0,05$)

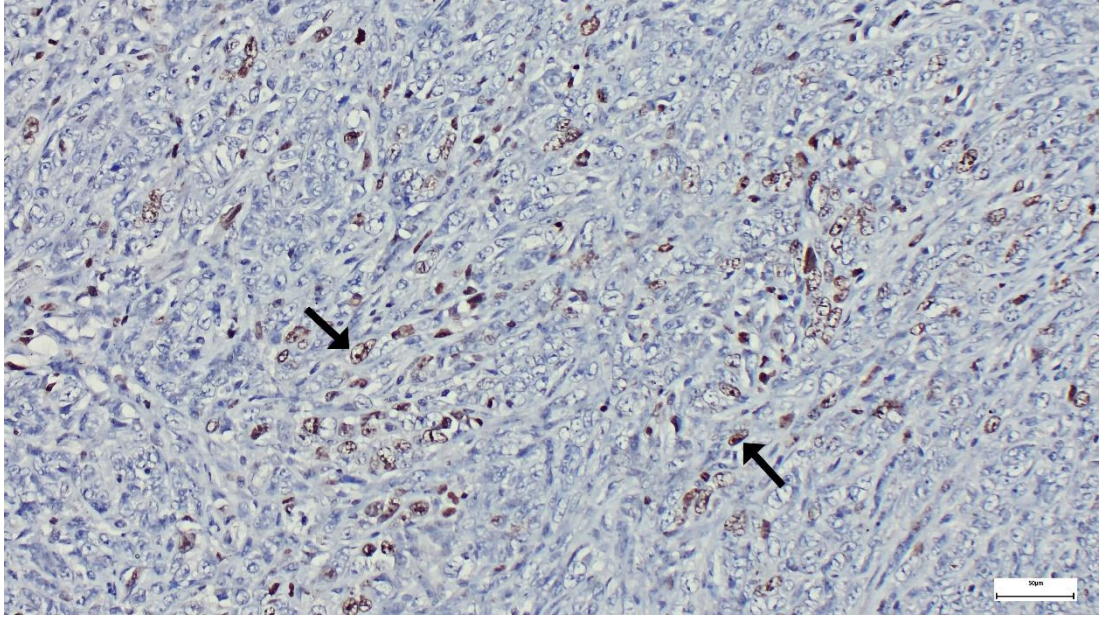
4.5. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi

4.5.1. Ki-67 Ekspresyonu

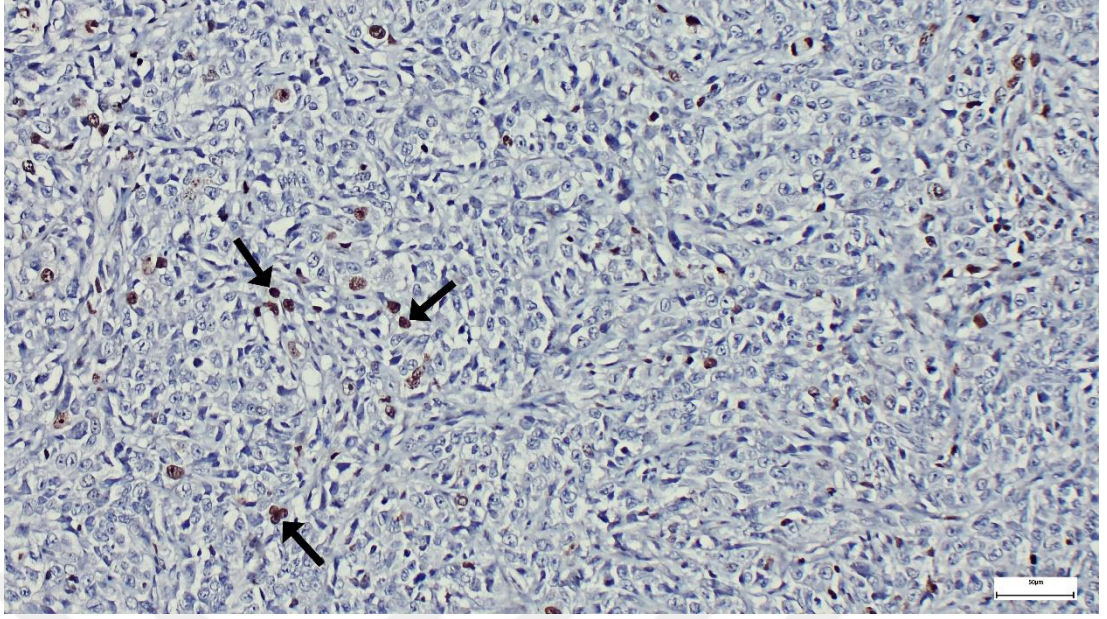
Tümör hücrelerinin nükleer immünohistokimyasal Ki-67 ekspresyonlarının değerlendirilmesinde tümör grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu, 1 µg HSP90 profilaksi grubu, 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ve 1 µg HSP90 tedavi grubu arasında anlamlı bir farkın olduğu görüldü ($P < 0,001$). 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu, 1 µg HSP90 profilaksi grubu, 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ve 1 µg HSP90 tedavi grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait Ki-67 ekspresyonlarının immünohistokimyasal görünimleri Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait Ki-67 ekspresyonlarının QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görüntüsü Şekil 4.21’de sunuldu. Şekil 4.22’de Ki-67 ekspresyonlarının analiz sonuçları verildi.



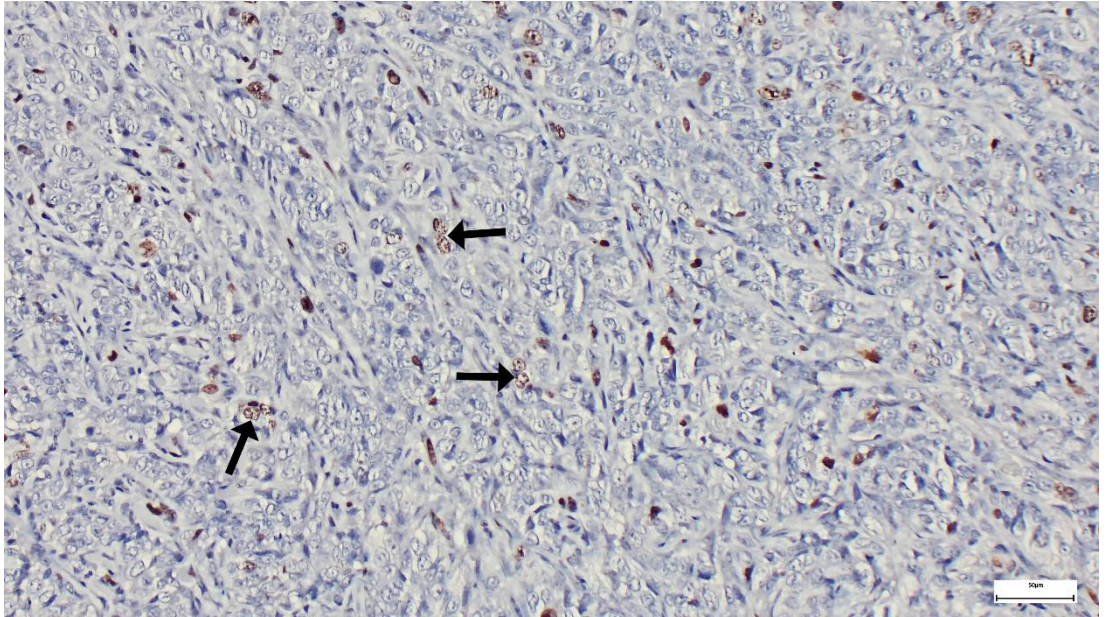
Şekil 4.16. Tümör grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli nükleer immün pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



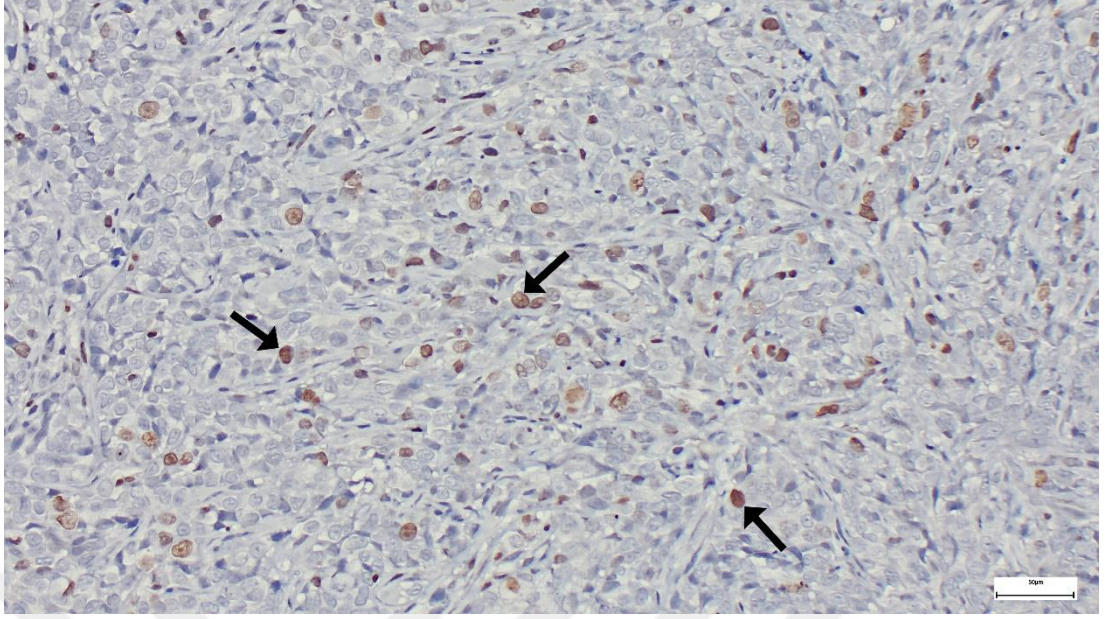
Şekil 4.17. 0,5 µg HSP90 tedavi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette nükleer immün pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



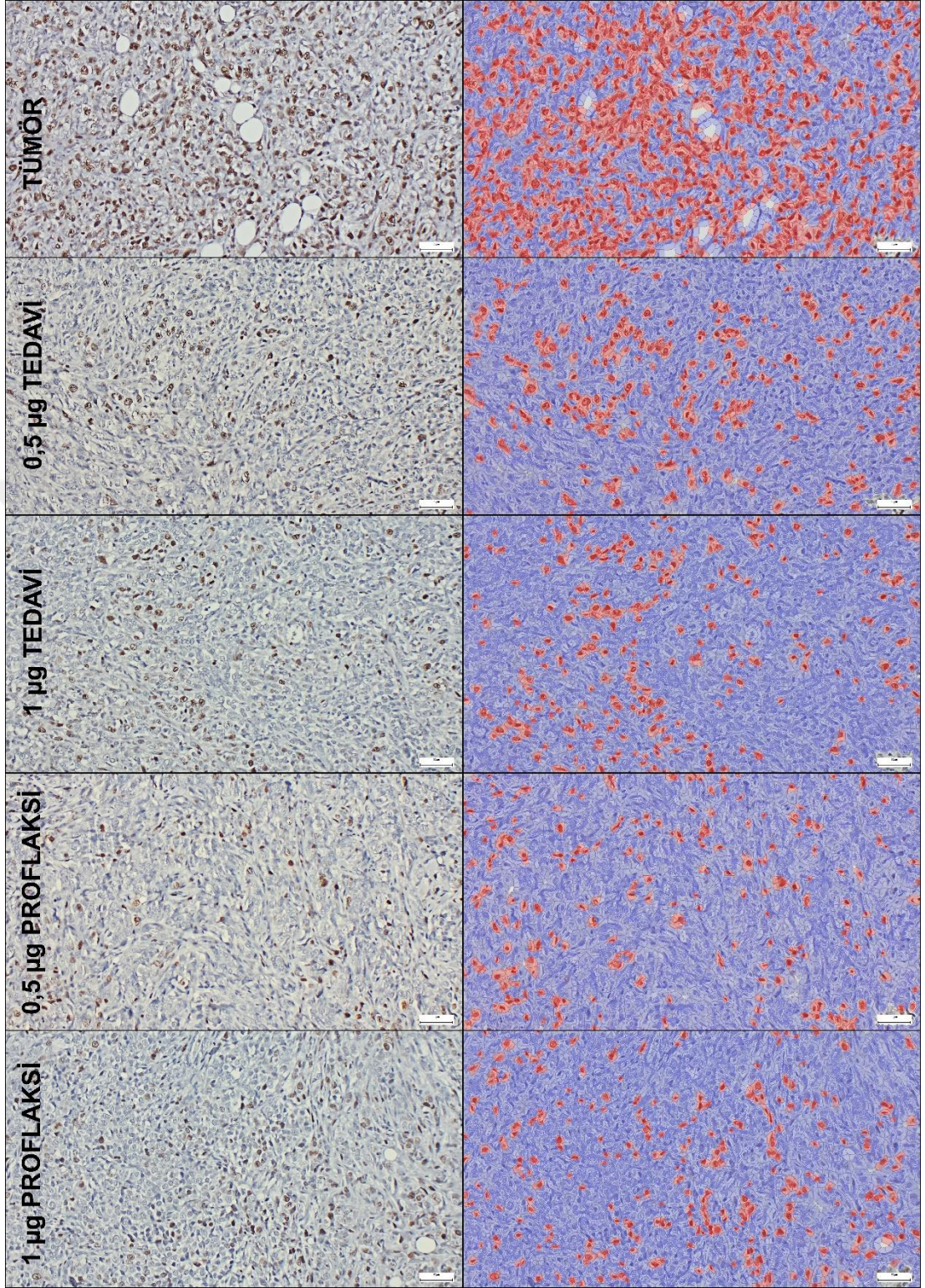
Şekil 4.18. 1 µg HSP90 tedavi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli nükleer immun pozitif reaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen; Bar = 50 µm



Şekil 4.19. 0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette nükleer immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm

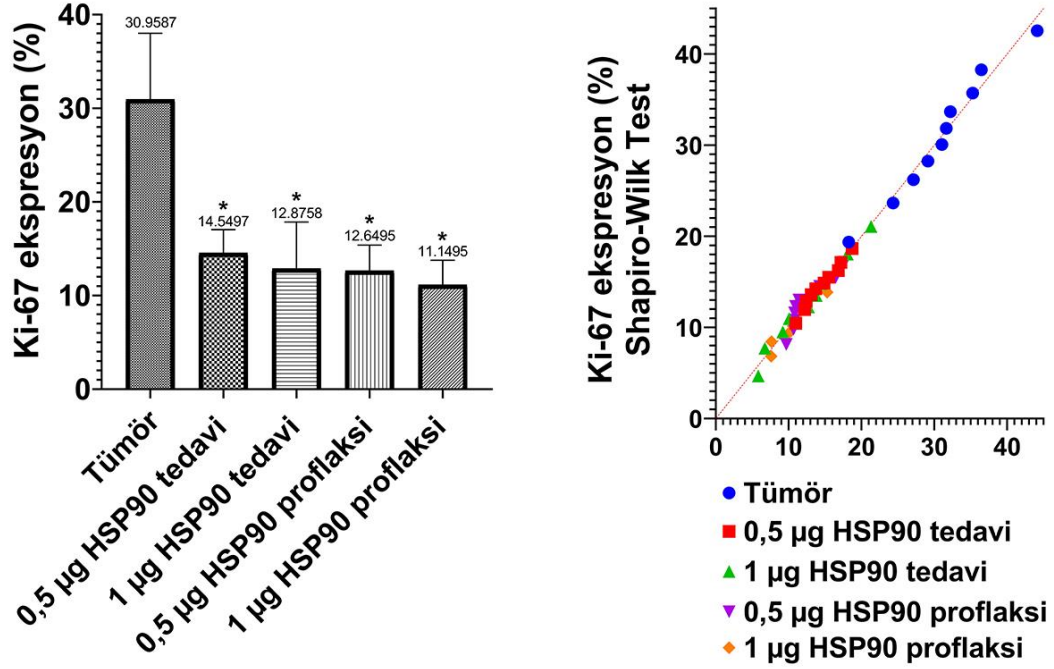


Şekil 4.20. 1 μ g HSP90 profilaksi grubunun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette nükleer immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 μ m



Şekil 4.21. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü. Soldaki resimde tümör hücrelerinin Ki-67 nükleer immün reaksiyonu (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise QuPath-0.5.1 programı ile

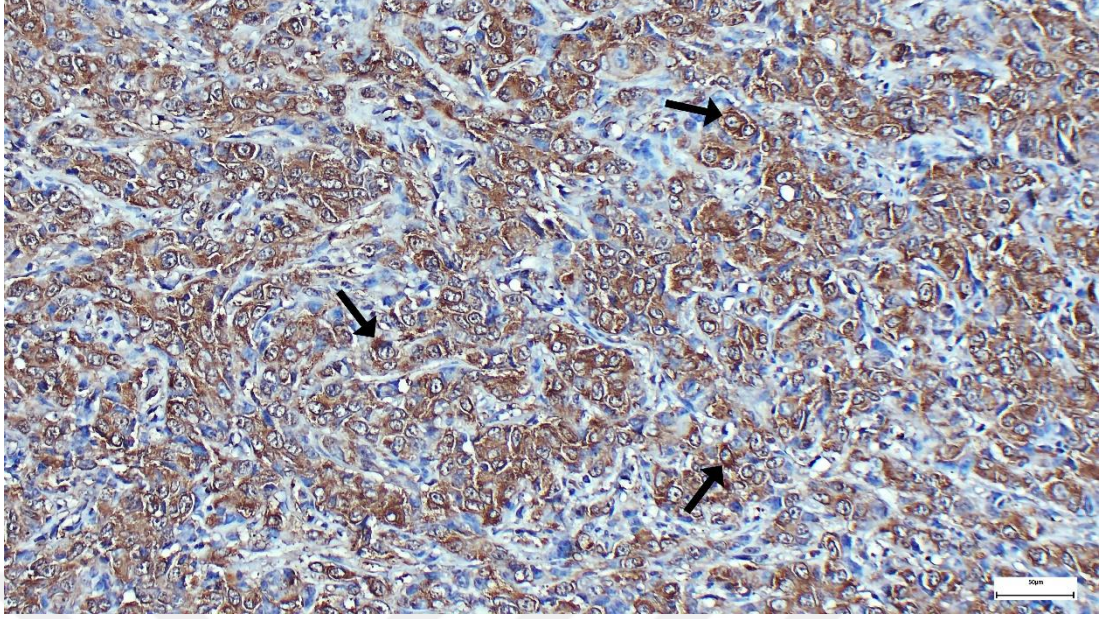
belirlenen immün pozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar = 50 µm



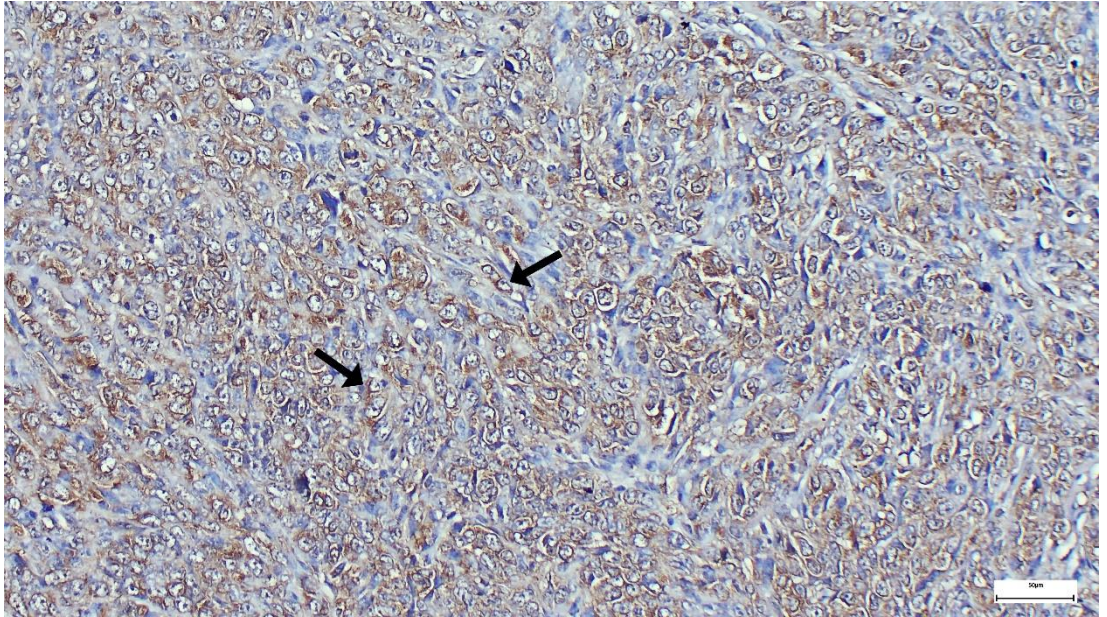
Şekil 4.22. Primer tümör hücrelerinin Ki-67 ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (Tümör grubu ile kıyaslandığında, *: $P < 0,001$)

4.5.2. CD31 Ekspresyonu

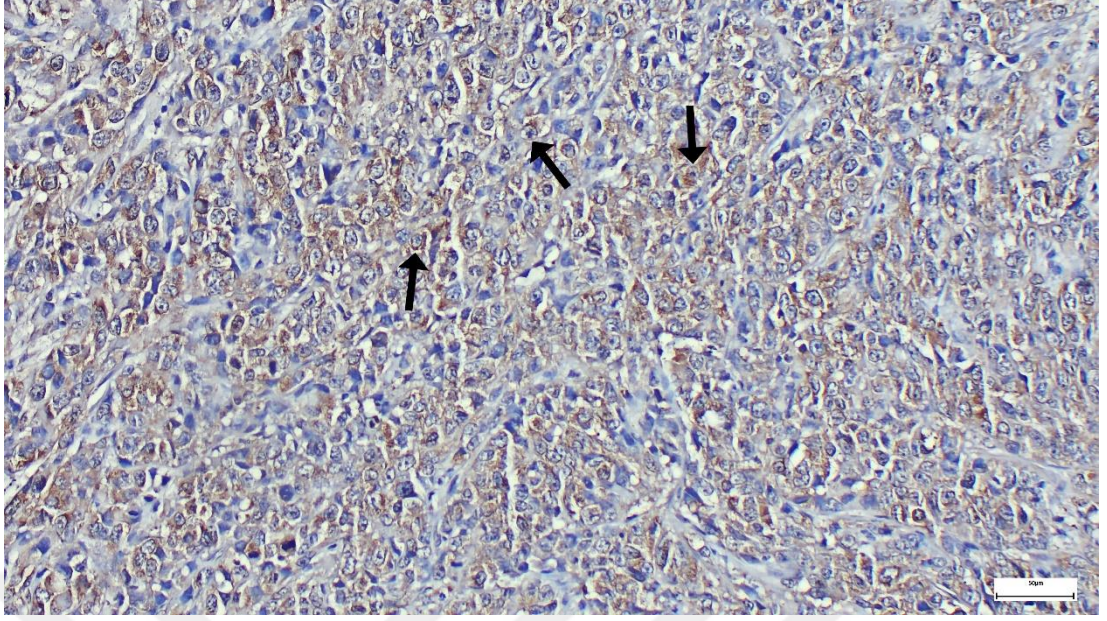
Tümör hücrelerinin CD31 membranöz ekspresyonu bağlamında tümör grubu hücrelerin diğer gruptaki hücelere göre daha yüksek ekspresyon sergilediği görüldü. Tümör grubu ile 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ($p=0,0006$) ve 1 µg HSP90 tedavi ($p=0,004$) grubu arasında anlamlı bir farkın olduğu belirlendi. 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ile 1 µg HSP90 tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.29). Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait CD31 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünimleri Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait CD31 ekspresyonlarının QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerinin görüntüsü Şekil 4.28’te sunuldu. Şekil 4.29’da CD31 ekspresyonlarının istatistiksel analizleri gösterilmiştir.



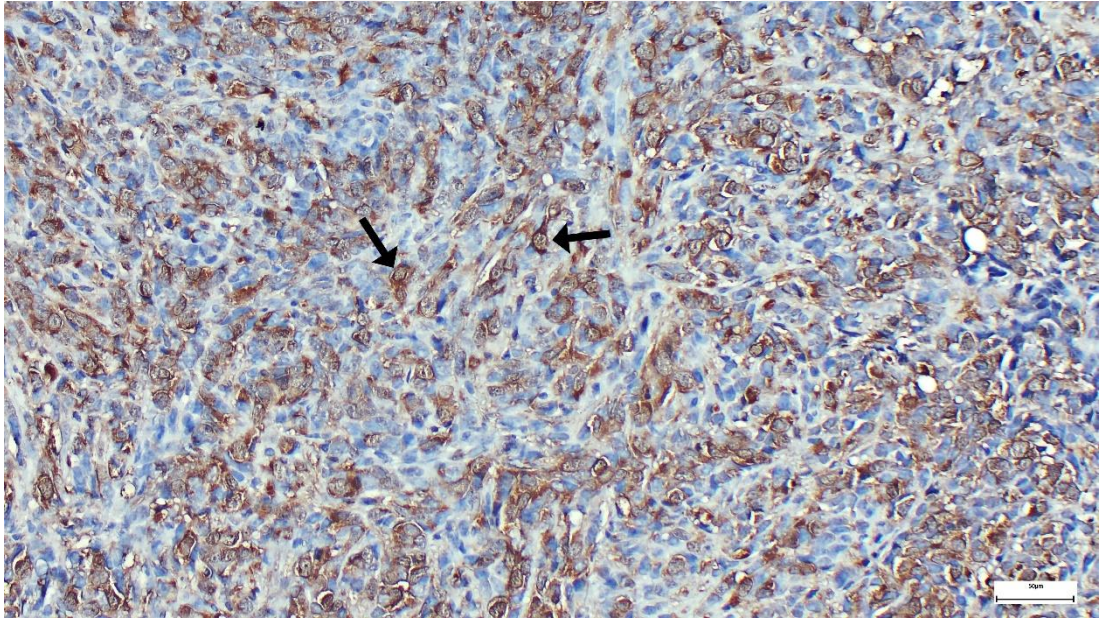
Şekil 4.23. Tümör grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli immun reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 μ m



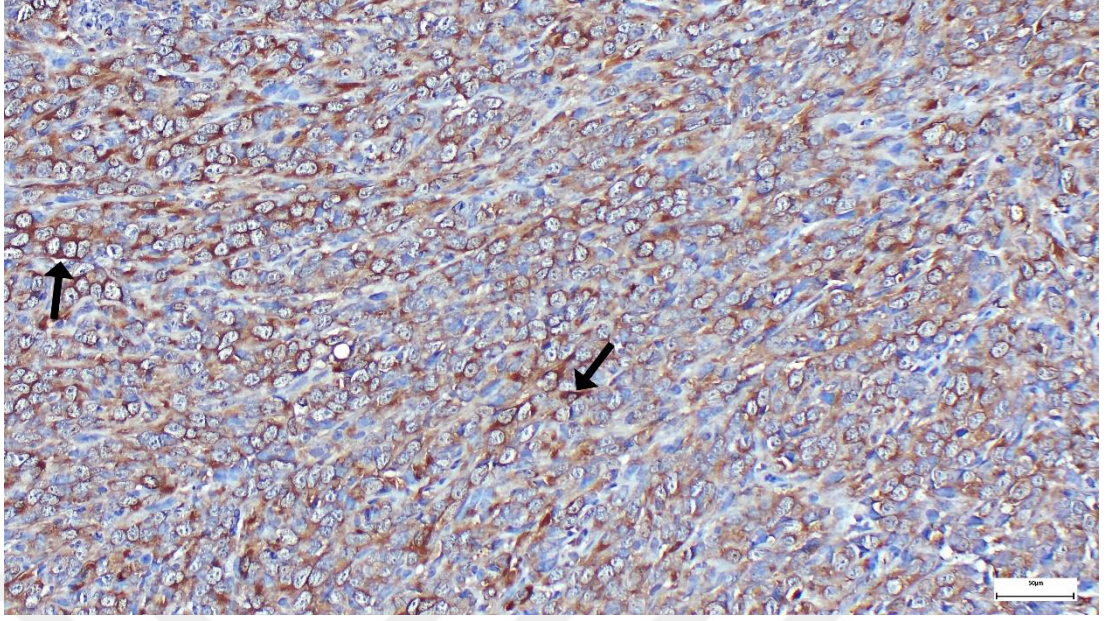
Şekil 4.24. 0,5 μ g HSP90 tedavi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette immun reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 μ m



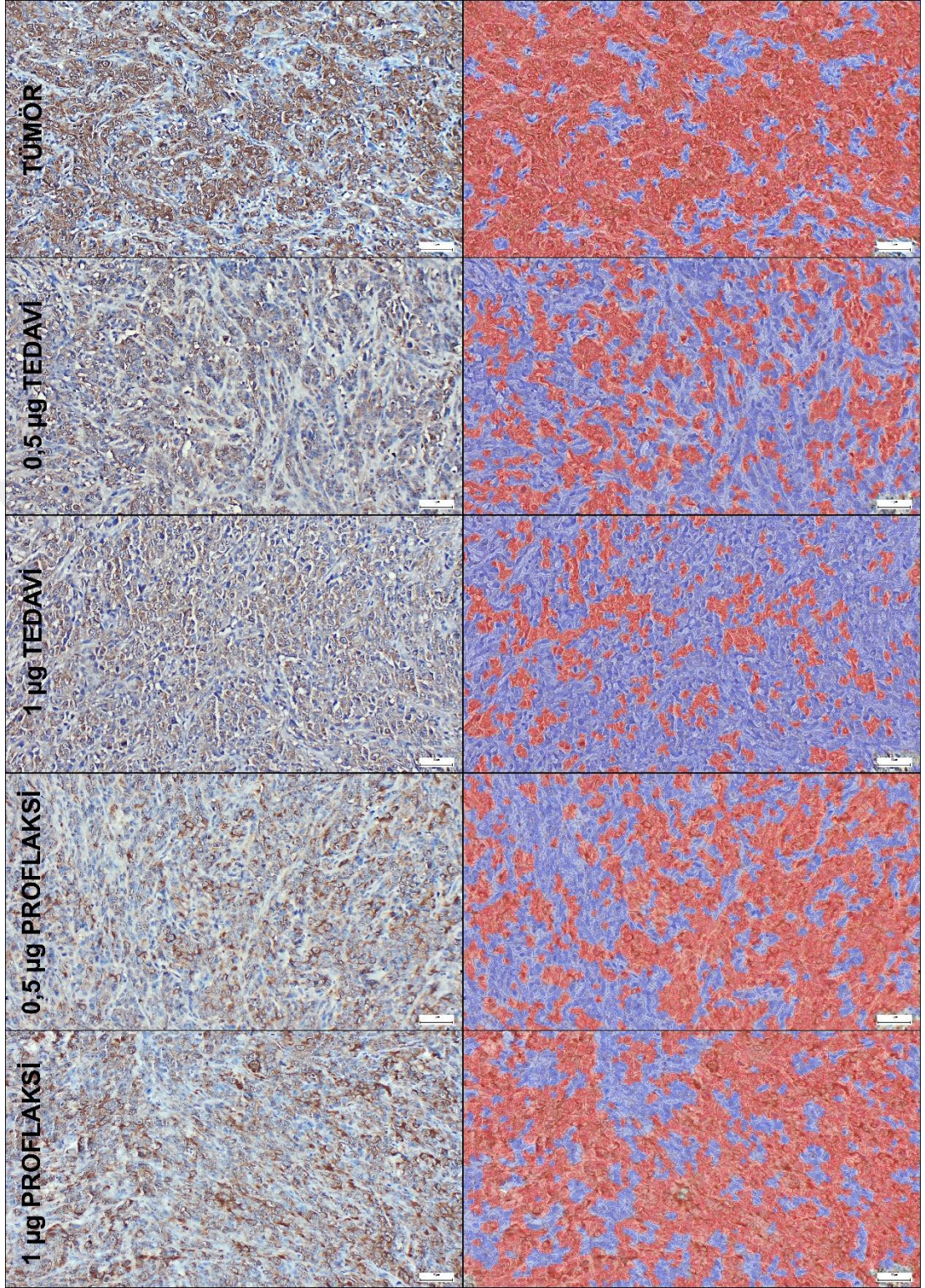
Şekil 4.25. 1 µg HSP90 tedavi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette immün reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



Şekil 4.26. 0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli immün reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm

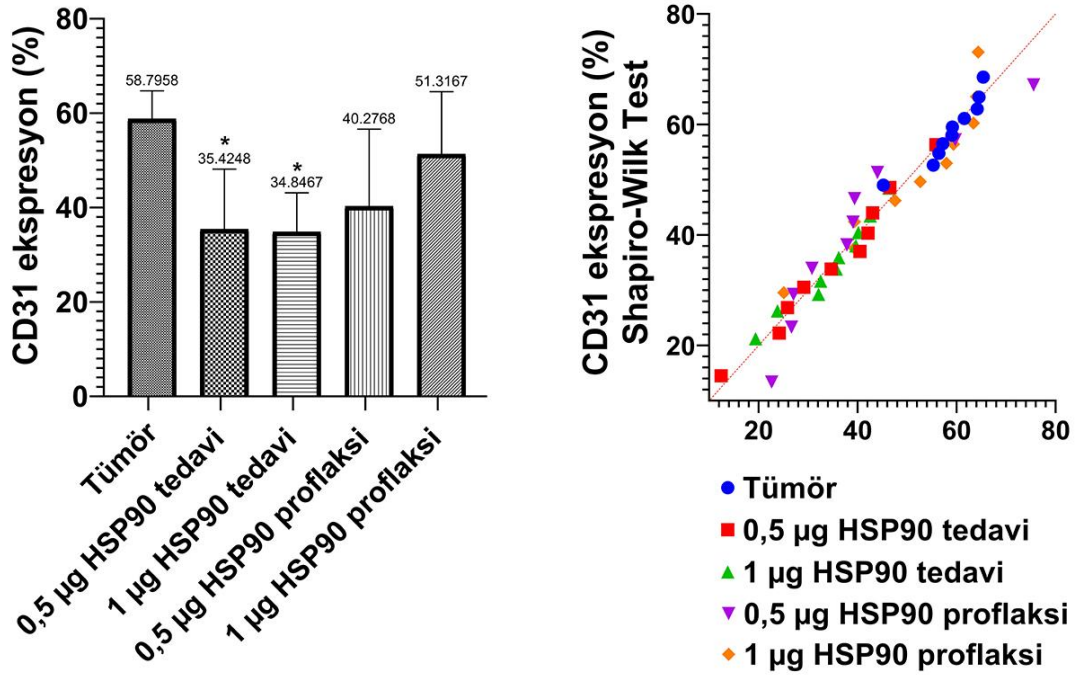


Şekil 4.27. 1 µg HSP90 profilaksi grubunun CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli immun reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



Şekil 4.28. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait CD31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü. Soldaki resimde tümör hücrelerinin CD31 immun reaksiyonu (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise QuPath-0.5.1 programı ile

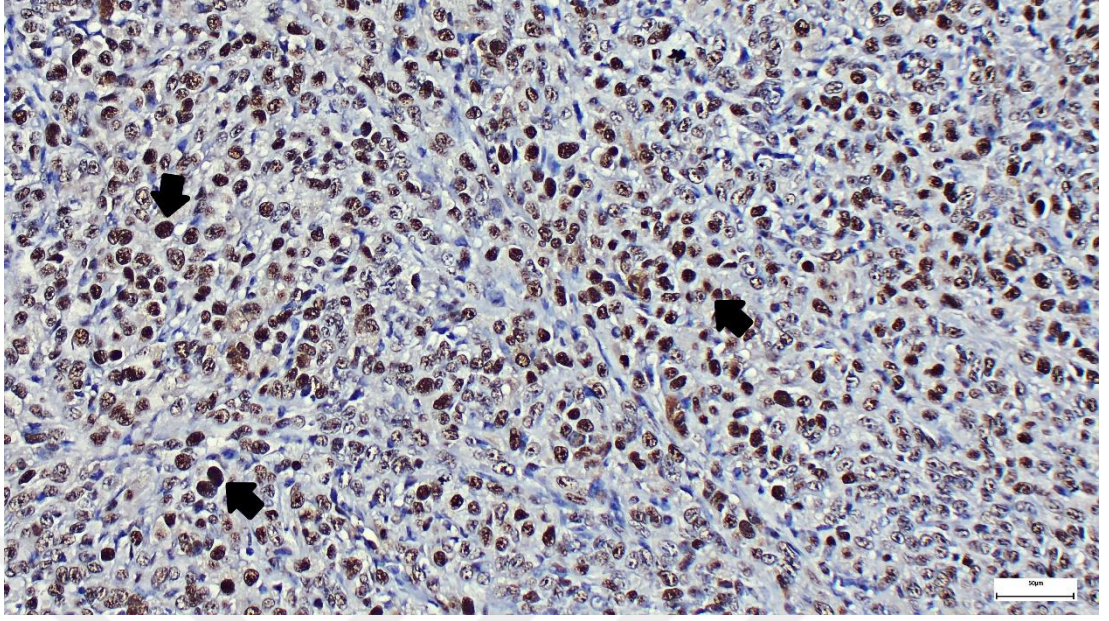
belirlenen immün pozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar = 50 µm



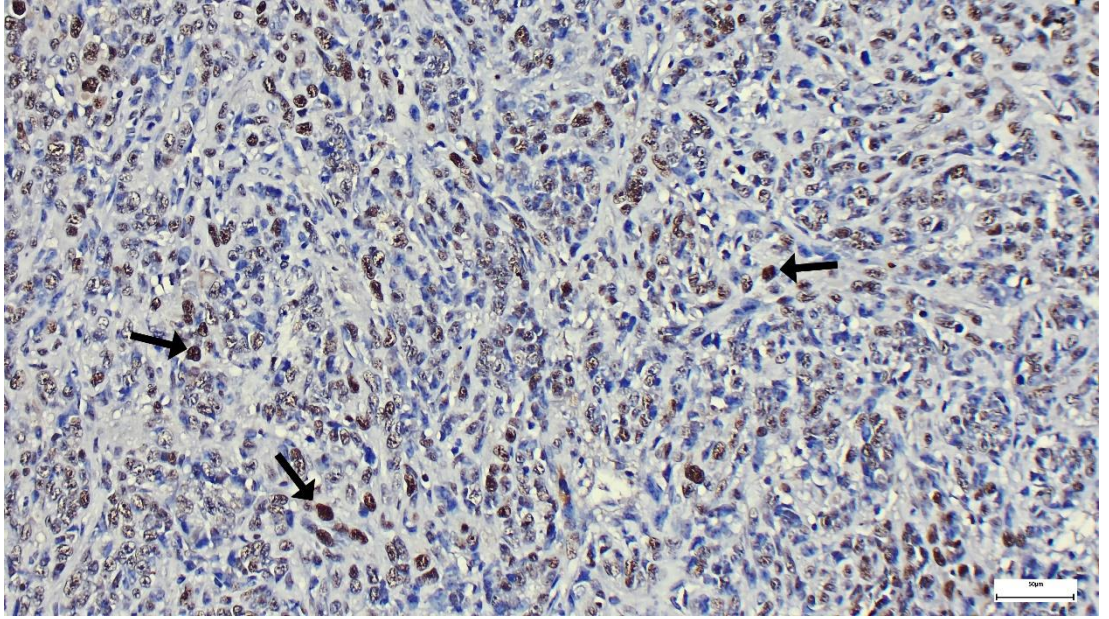
Şekil 4.29. Primer tümör hücrelerinin CD31 ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (Tümör grubu ile kıyaslandığında, *: $P < 0,001$)

4.5.3. PCNA Ekspresyonu

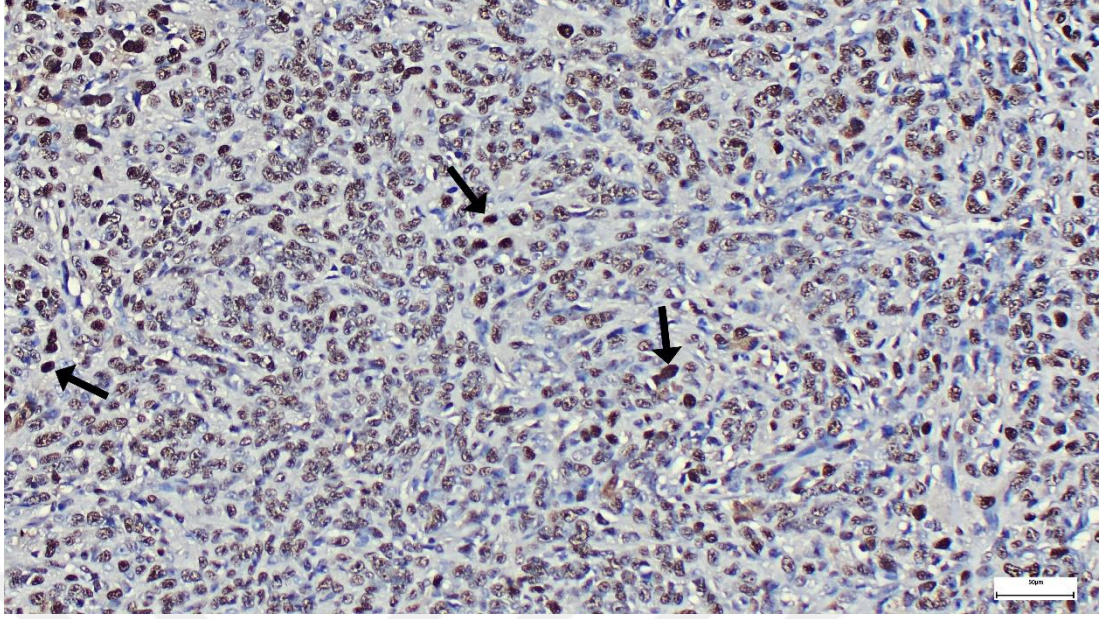
Tümör hücrelerinin nükleer PCNA ekspresyonlarının immunohistokimyasal değerlendirilmesinde tümör grubu ile 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ($P < 0,001$), 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu ($P < 0,001$) ve 1 µg HSP90 profilaksi grubu ($P < 0,01$) arasında anlamlı bir farkın olduğu görüldü. 0,5 µg HSP90 tedavi grubu ile 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu ($p=0,0266$) ve 1 µg HSP90 profilaksi grubu ($p=0,001$) arasında anlamlı bir farkın olduğu göze çarptı. 0,5 µg HSP90 profilaksi grubu ve 1 µg HSP90 profilaksi grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait PCNA ekspresyonlarının görünüşleri Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34’de gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait PCNA pozitif hücrelerin QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen görüntüsü Şekil 4.35’de gösterildi. Şekil 4.36’da PCNA ekspresyonlarının istatistiksel analizleri gösterilmiştir.



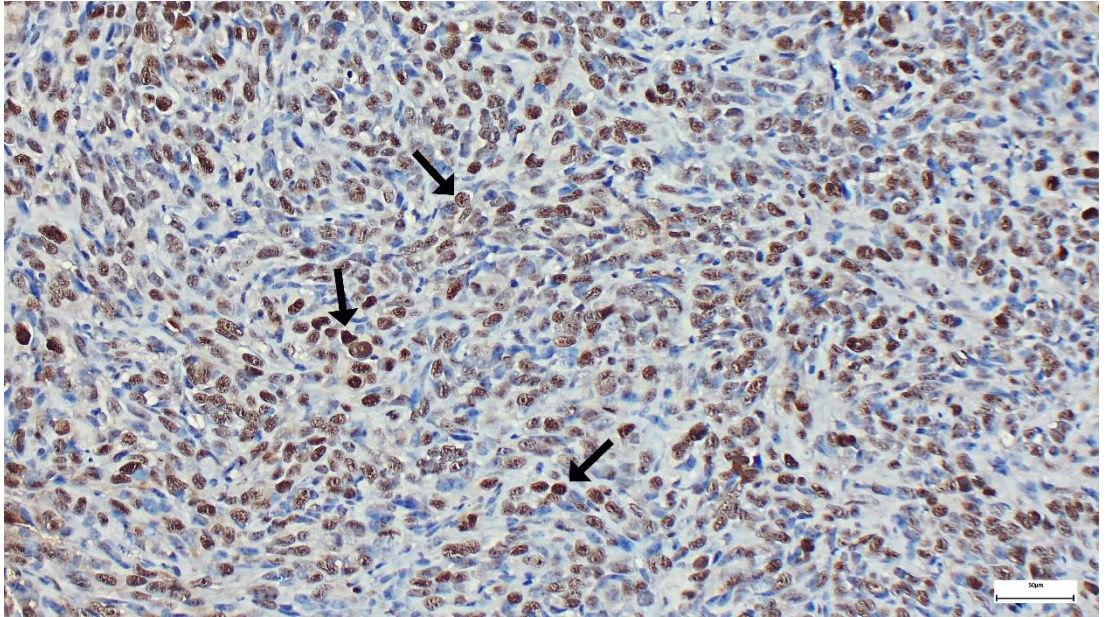
Şekil 4.30. Tümör grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer immün pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



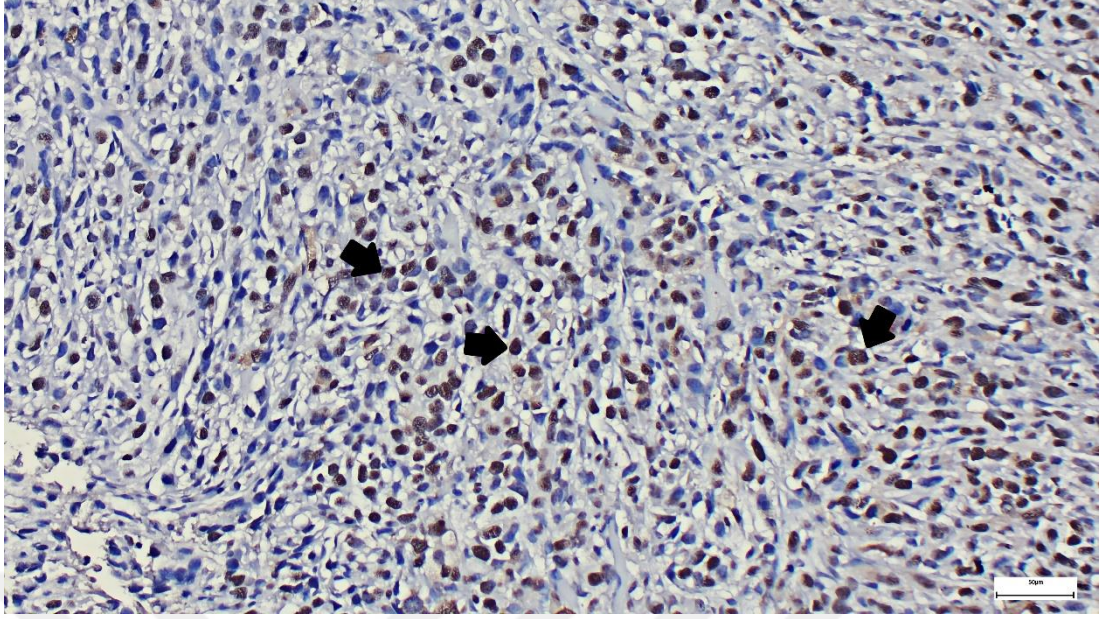
Şekil 4.31. 0,5 µg HSP90 tedavi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer immün pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



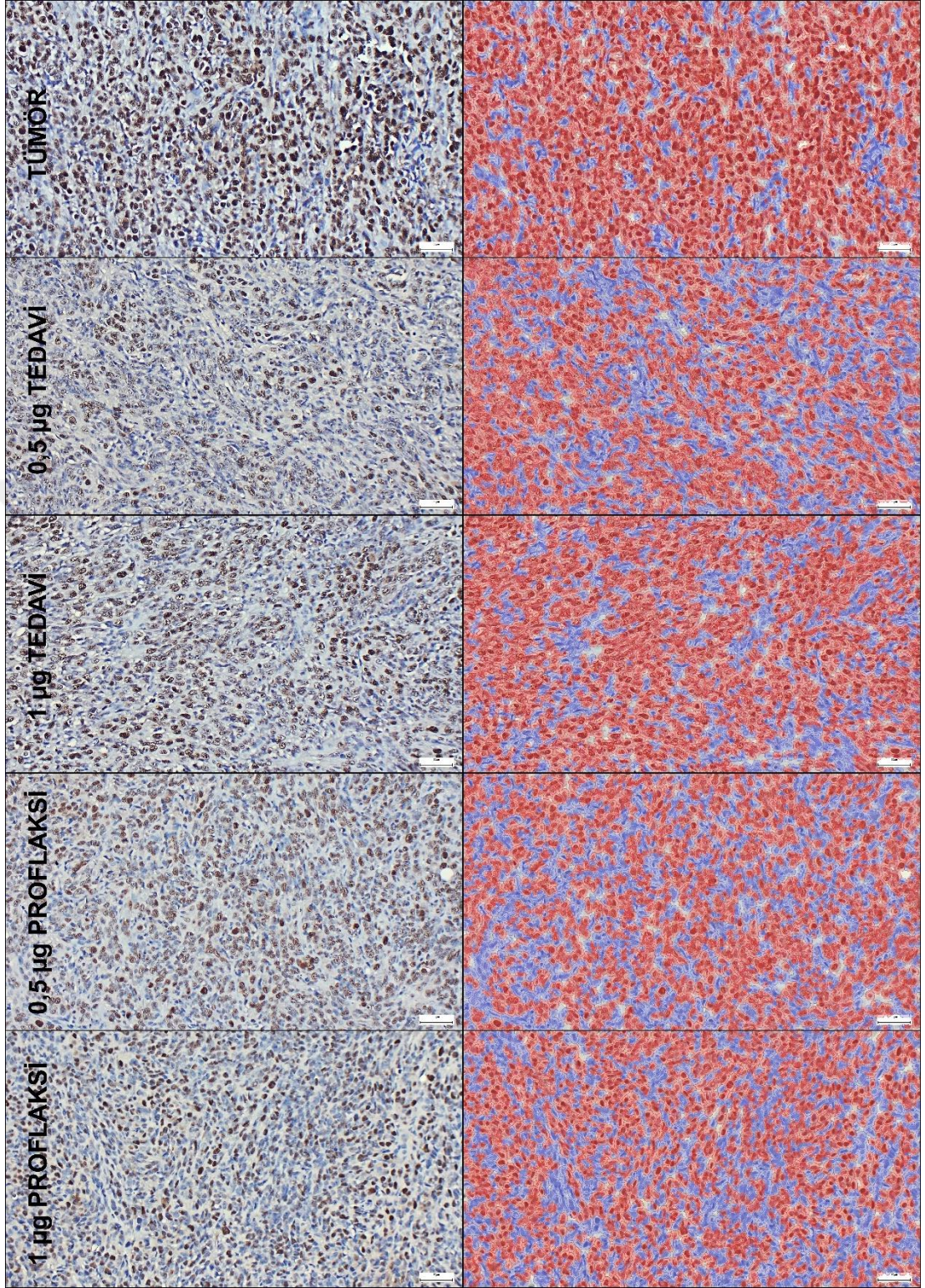
Şekil 4.32. 1 µg HSP90 tedavi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



Şekil 4.33. 0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm

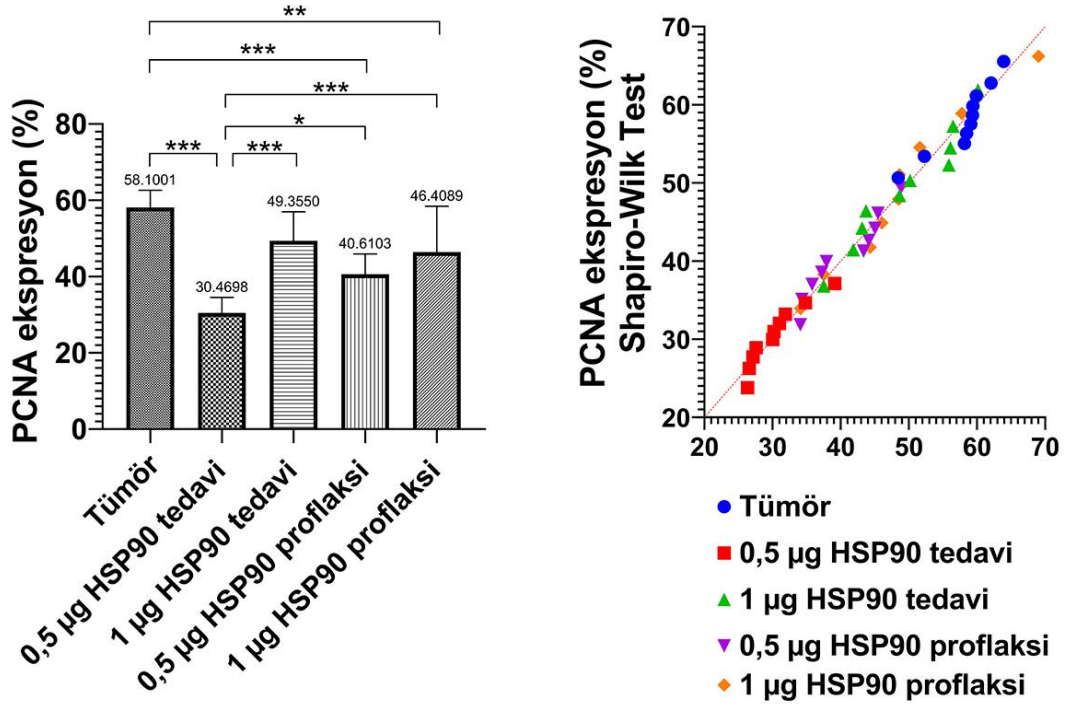


Şekil 4.34. 1 μg HSP90 proflaksi grubunun PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 μm



Şekil 4.35. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü. Soldaki resimde tümör hücrelerinin nükleer PCNA immun reaksiyonu (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise QuPath-0.5.1 programı

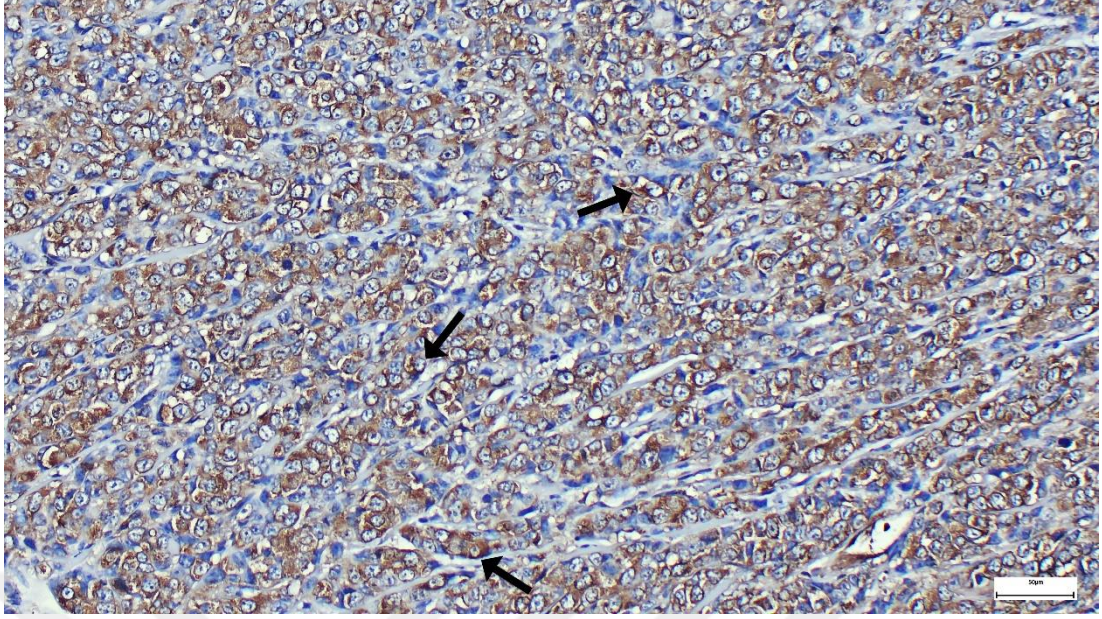
ile belirlenen immun pozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar = 50 μ m



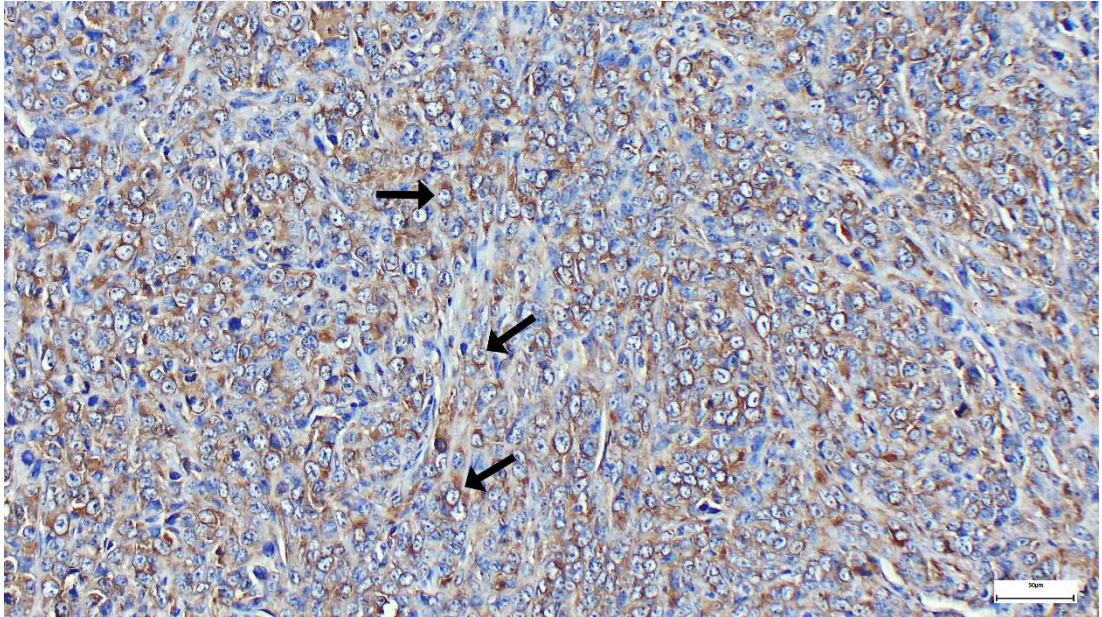
Şekil 4.36. Primer tümör hücrelerinin PCNA ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$)

4.5.4. HSP90 Ekspresyonu

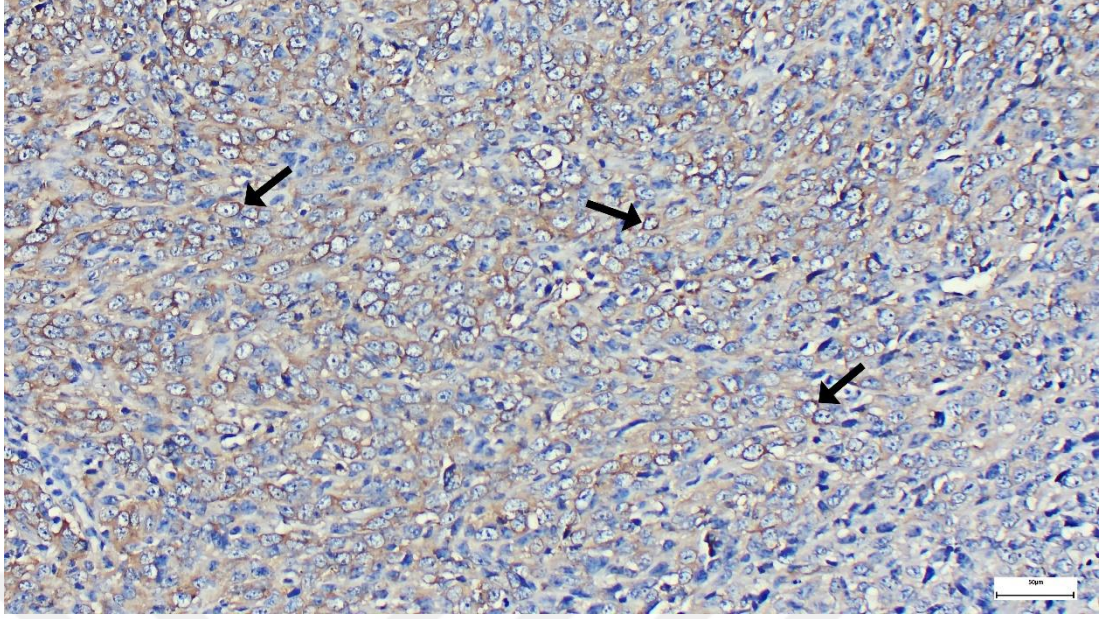
Tümör hücrelerinin HSP90 reaksiyonlarının immunohistokimyasal değerlendirilmesinde tümör grubu ile 0,5 μ g HSP90 tedavi grubu ($p=0,0376$) ve 1 μ g HSP90 tedavi grubu ($p=0,0016$) arasında anlamlı bir farkın olduğu görüldü. 1 μ g HSP90 profilaksi grubu ile 0,5 μ g HSP90 tedavi grubu ($p=0,0370$) ve 1 μ g HSP90 tedavi grubu ($p=0,0016$) arasında anlamlı bir farkın olduğu dikkati çekti. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait HSP90 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görüntüleri Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41’de gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait HSP90 ekspresyonlarının QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen görüntüsü Şekil 4.42’da gösterildi. Şekil 4.43’da HSP90 ekspresyonlarının istatistiksel analizleri gösterilmiştir.



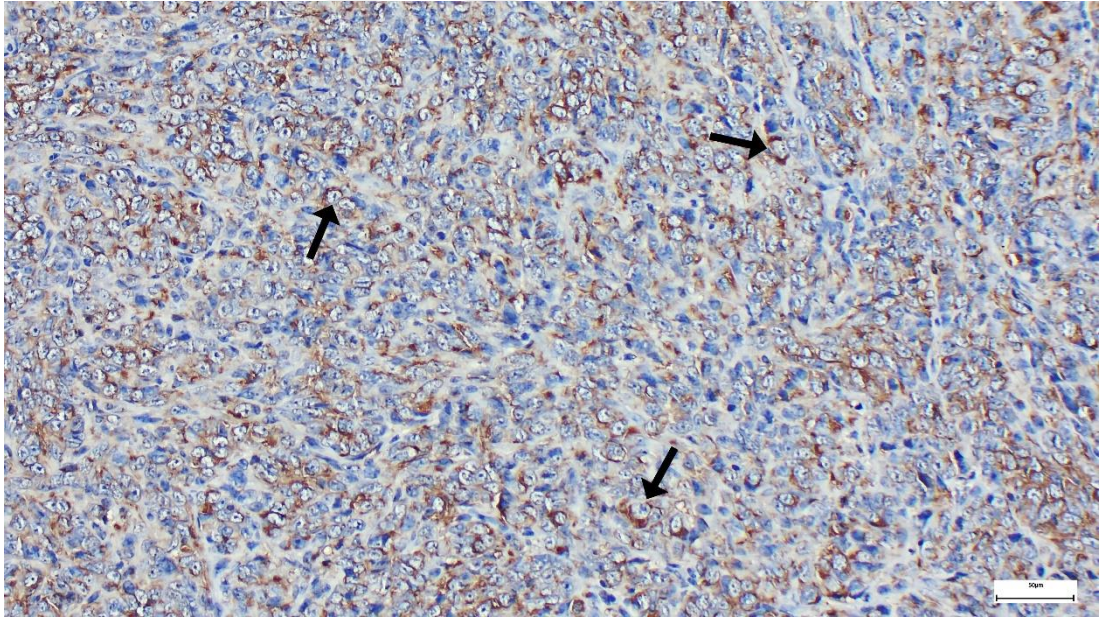
Şekil 4.37. Tümör grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



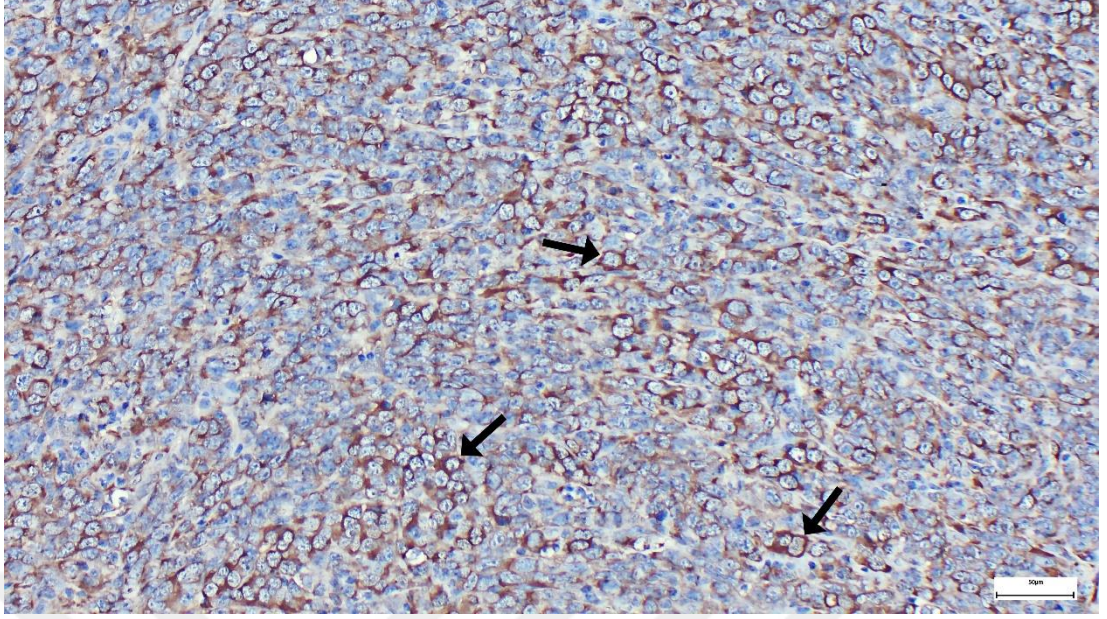
Şekil 4.38. 0,5 µg HSP90 tedavi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



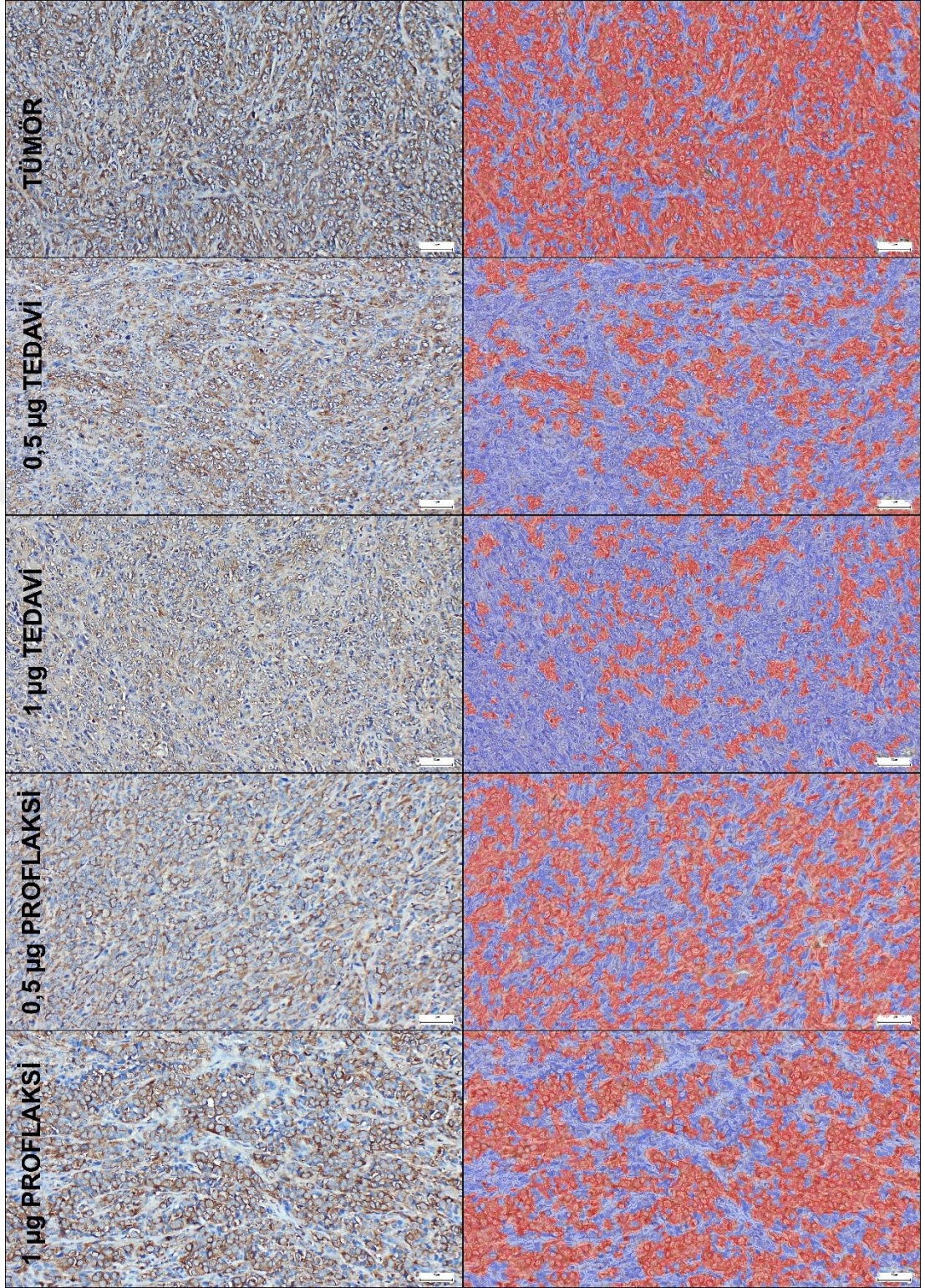
Şekil 4.39. 1 µg HSP90 tedavi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



Şekil 4.40. 0,5 µg HSP90 profilaksi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm

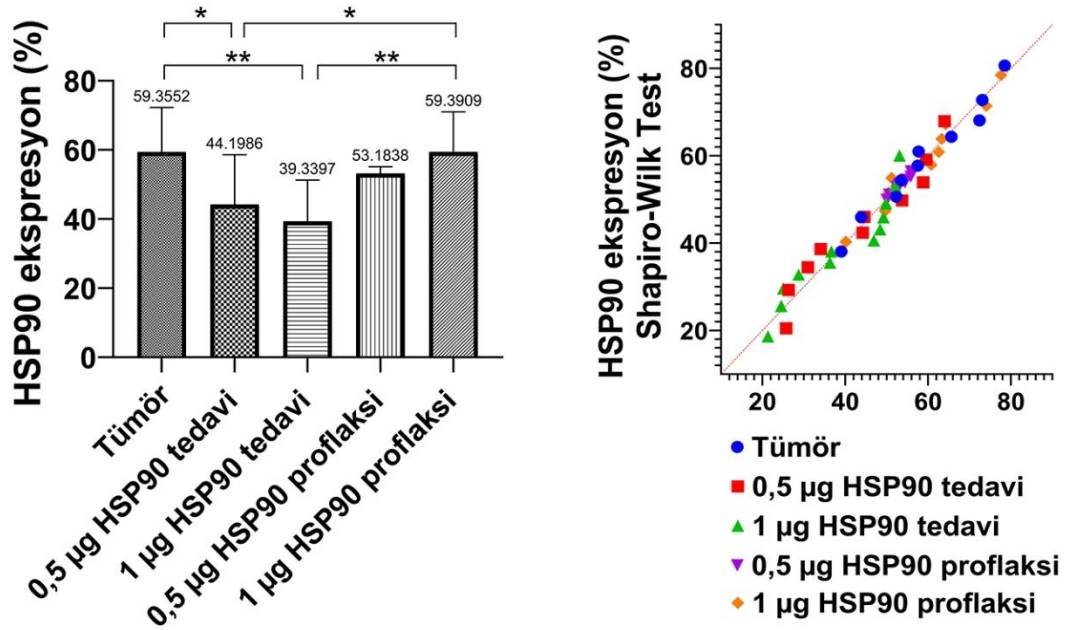


Şekil 4.41. 1 µg HSP90 proflaksi grubunun HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde immun pozitif reaksiyonlar (oklar); HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm



Şekil 4.42. Çalışma gruplarının tümör dokularına ait HSP90 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immun pozitif hücrelerin görüntüsü. Soldaki resimde tümör hücrelerinin HSP90 immün reaksiyonu (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise QuPath-0.5.1 programı ile

belirlenen immün pozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar = 50 μ m



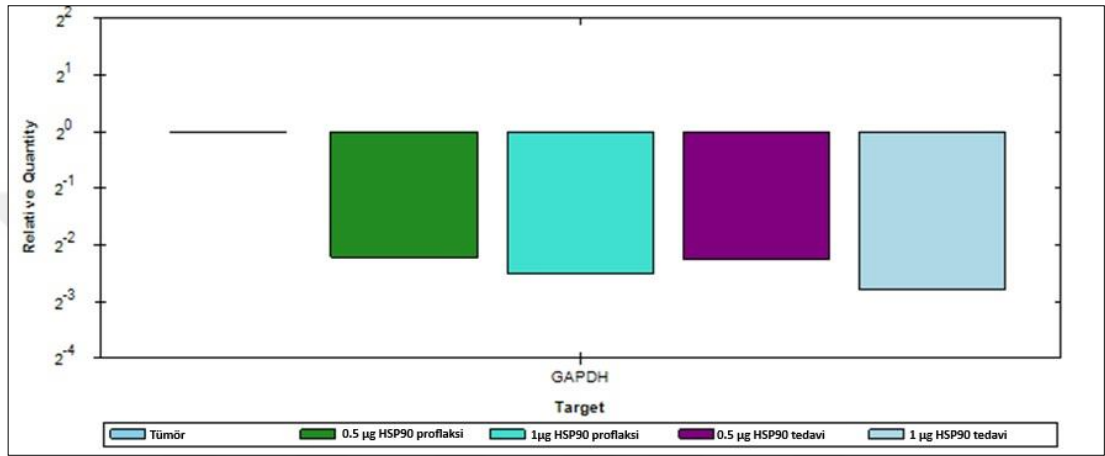
Şekil 4.43. Primer tümör hücrelerinin HSP90 ekspresyon değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$)

4.6. Real-Time PCR Reaksiyonu ile HSP90 mRNA Ekspresyonu

HSP90 mRNA ekspresyon miktar tayini, referans olarak GAPDH transkripti kullanılarak tümör grubuna normalleştirilerek yapıldı. Relative Quantification hesaplamasında " $\Delta\Delta C_t$ Metodu" kullanıldı. Tümör grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında HSP90 mRNA ekspresyon seviyesinin diğer gruplarda down regüle olduğu gözlemlendi. İmmünohistokimyasal HSP90 ekspresyonları ve Real-Time PCR bulguları incelendiğinde tümör grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda HSP90 ekspresyon seviyelerinde düşüş dikkati çekti. Çalışma gruplarının Real-Time PCR HSP90 mRNA ekspresyon miktarları Tablo 4.1'de ve HSP90 mRNA ekspresyon rölatif miktarları Şekil 4.44'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Real-Time PCR HSP90 mRNA ekspresyon miktar tayini

Hedef	Gruplar	Rölatif Miktar	Ortalama Cq
GAPDH	Tümör	1,00000	28,11
GAPDH	0,5 µg HSP90 profilaksi	0,21454	30,34
GAPDH	1 µg HSP90 profilaksi	0,17450	30,63
GAPDH	0,5 µg HSP90 tedavi grubu	0,20924	30,37
GAPDH	1 µg HSP90 tedavi grubu	0,14358	30,92



Şekil 4.44 Çalışma gruplarında HSP90 mRNA ekspresyon rölatif miktarları

5. TARTIŞMA

Stres proteinleri olarak da bilinen HSP'ler, tüm organizmalarda yaygın olarak bulunan moleküler şaperonlardır (Tausif ve ark., 2024). HSP'ler, proteinlerin yapısal ve işlevsel bütünlüğünü koruyarak ve proteinlerin uygun katlanmasına yardımcı olarak hücreleri çevresel stres faktörlerinin zararlı etkilerinden korur (Yun ve ark., 2020). Kanselerde, apoptozis, nekroptoz, otofaji, EMT, lipid metabolizması, anjiyogenezis ve tümör bağışıklığının düzenlenmesinde rol oynarlar ve tümör büyümesi ile gelişimini desteklerler (Albakova ve Mangasarova, 2021). HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar ve bunlardan birisi HSP90'dır. Tümör hücrelerinin yaygın olarak karşılaştığı ısı, besin ve oksijen eksikliği gibi stres koşullarında HSP90'ın ekspresyonu artar (Dubey ve ark., 2015). Böylece HSP90 tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar ve maligniteyi arttırarak mutasyonların devamlılığına izin verir, metastazı kolaylaştırır ve tedaviye direnç geliştirir (Whitesell ve Lindquist, 2005). Sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında, kanser dokusunda daha yüksek HSP90 ekspresyonu görülür (Cheng ve ark., 2012).

Aşılamalar veya immunizasyon temelde enfeksiyon hastalıklarını önlemeyi amaçlamıştır ve 20. yüzyılın en büyük tıbbi ilerlemelerinden biri olarak kabul edilir. Ancak immunizasyon hastalıkları önlemenin ötesine geçer ve bazı durumlarda tedavi edici olarak kullanılır. Enfeksiyonları tedavi etmek için tasarlanan terapötik aşılar, tümör içi uygulamalarla tümörlerde klinik denemelerde umut verici sonuçlar vermiştir. Maligniteleri aşilarla tedavi etme fikri, 1910'larda William Coley'nin öldürülmüş *Streptococcus* ve *Serratia* ile tümörlere enjeksiyon yapmasına ve 1950'lerde Lloyd Old'un *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG) ile benzer bir yaklaşım benimsemesine kadar uzanmaktadır. Büyük tümörlerin sistemik regresyonunu indükleyen ve uzun süreli hayatta kalım sağlayan bazı yeni aşı örneklerine rağmen, klinik denemelerin sınırlı olması sonuçların değerlendirilmesinde net veriler elde edilmesini önlemiştir. Ancak hastaya zararı olmayan veya çok az olan immunoterapiler ile ilgili çalışmalar rasyonel ve ikna edici preklinik veriler sunmaktadır (Lin ve ark., 2022). Bu çalışma HSP90'ın rekombinant olarak üretilmiş indüklenmiş formu ile immunizasyon oluşturularak tümör hücrelerinden salgılanan bu formun immun sistem tarafından tanınacağı ve tümöre karşı daha güçlü reaksiyon vereceği hipotezi üzerine kurgulanmıştır.

HSP'ler kanser gelişimi ile kemoterapiye, radyoterapiye ve immunoterapiye dirençte önemli roller oynarlar. Bu nedenle son yıllarda HSP'lerin inhibisyonu ile ilgili tedavilerin hedeflenmesi onkoloji alanında ilgi çeken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla antitümör tedaviler için HSP'lere karşı aşılama şeklinde, immun sistemin aktivasyonu veya HSP inhibisyonu oluşturan ilaçlarla tedaviler denenmektedir (Yun ve ark., 2020). Kemoterapi ve radyoterapi gibi mevcut anti-kanser tedavilerin birçok sınırlaması mevcuttur ve bunların üstesinden gelmek için adjuvan tedaviler ön plana çıkmaktadır. HSP'leri inhibe eden birkaç anti-kanser ilaç FDA tarafından da onaylanmıştır. Bunlar arasında bir HSP70 ekspresyon inhibitörü olan ve renal, hepatoselüler ve tiroid karsinomlarını tedavi etmek için onaylanan sorafenib sayılabilir. Sorafenib solid yapıdaki tümörlerde kullanılan antikanser bir ilaçtır. Bu ilaç hücrede tirozin kinazı inhibe eder ve hücrede apoptozisi tetikler. Sorafenibin HSP70 gen ekspresyonunu inhibe ettiği de saptanmıştır (Llovet ve ark., 2008). Bu çalışmada da immunizasyon için HSP90 seçilmiş ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre HSP90 ile immunizasyon hem profilaktik hem de terapötik amaçlı gruplarda tümör boyutu, histopatolojik özellikleri ile immunohistokimyasal ve PCR sonuçlarına göre olumlu etkiler saptanmıştır.

HSP'lerin işlevini modüle eden birçok aday antikanser ilacın klinik öncesi laboratuvar ortamında araştırmaları yapılmış ve klinik denemeleri tamamlanmış ancak bugüne kadar FDA onaylı genel bir HSP inhibitörü piyasaya sunulamamıştır. Dolayısıyla HSP ile ilişkili veya HSP'leri doğrudan hedefleyen ilaç veya tedavi seçenekleri araştırılmalıdır. Günümüzde HSP'ler ile ilgili olarak geliştirilen ilaçlar hücresel veya humoral bağışıklık sistemini uyarma üzerine kurulmuş bir mekanizmayla etkilerini gösterirler (Yun ve ark., 2020). Normal koşullar altında, HSP'ler toplam hücresel protein içeriğinin %5-10'unu oluşturur ve proteostazı sürdürmek için entegre bir ağ olarak çalışırlar. Ekstrem koşullar altında, strese yanıt olarak HSF'ler aktive edilir ve stresi tamponlamak için aşırı şekilde HSP oluştururlar. Substrat protein katlama işlevlerine ek olarak HSP'ler hücre sinyal iletimi, hücre döngüsü ve apoptozis düzenlemesinde de önemli roller oynarlar (Hu ve ark., 2020, 2022). Çalışmanın kurgulanması sırasında HSP90'nın seçilmesine tüm bu verilerin değerlendirilmesi sonucunda karar verilmiştir.

HSP'ler ve tümörlerdeki etkileri ile ilgili çelişkili sonuçların HSP'lerin formlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. HSP'ler, canlı organizmalar arasında korunmuş proteinlerdir. Birçok organizmada yapısal olarak ilişkili ancak işlevsel olarak farklı HSP'ler bulunur. Bir hücrenin farklı organel ve bölümlerinde bile farklı formlarda bulunabilirler. Bazı HSP'ler hücrede sürekli (*constitutive*) bulunan izoformlar şeklinde iken bazıları ise indüklenebilir (indüktif) izoformlar halindedir (Tutar ve ark., 2010). Canlı organizmalarda, hücreler sürekli değişen koşullar altındadırlar ve hücrenin hayatta kalması ya da bütünlüğü için hücresel protein homeostazının korunması çok önemlidir. Çünkü bu stres koşullarında protein yanlış katlanmaları ve agregasyonlarının hücrenin en önemli bileşenlerinden olan proteinlerin yapılarının bozulmasına neden olduğu ve bu sebeple çeşitli hasar ve hastalıklara yol açtığı dikkati çekmiştir. Hem prokaryot hem de ökaryot organizmalarda bulunan korunmuş HSP'ler proteostazdan sorumlu olan geniş bir protein ailesine aittir. Bunlar, yeni sentezlenmiş polipeptidin katlanması, yarı-kararlı proteinlerin yeniden katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması, protein agregatlarının çözülmesi, membran boyunca protein translokasyonu, hücre iskeletinin korunması, yeniden yapılandırılması ve immun sistem dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerde işlev görürler (Tutar ve ark., 2014). İlaçlar, ısı, enfeksiyonlar, ateş, yangı, maligniteler, iskemi, oksidatif stres, büyüme faktörleri ve hormonal stimülasyonlar HSP ekspresyonunu indükler ve bu hücrelerde indüklenmiş HSP'lerin ekspresyonları artar. Bu nedenle, birçok hastalık HSP'lerle ilişkilidir ve HSP'ler hem tedavi ve hem de immunizasyon için hedeftir (Tutar ve ark., 2022). Bu tez çalışmasında HSP90'ın indüktif formu immunizasyon için kullanılmış ve tümör hücrelerinde çoğalmayı önemli ölçüde azaltmıştır. Elde edilen bulgulara göre HSP90 meme kanseri hücrelerinin malignitesinin ve metastatik potansiyelinin azalmasına yol açmıştır. Bu durum ise HSP90 ile immunizasyonun aynı zamanda tümörlü hayvanın immun sisteminin uyarılmasına sebep olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

HSP proteinlerinin universal olarak türler arasında korunduğunu ve farklı HSP ve koşapronlar ile etkileşerek farklı fonksiyonlar oluşturduğu gösterilmiştir. Deneyler sırasında türlerin sürekli ve indüklenebilir formlar ile de ünite değişimi yapılmış ve bu kimerik yapılarda izoformların farklı proteinler ile etkileştiği dikkati çekmiştir (Tutar

ve ark., 2006). Bu çalışmada, üçlü negatif fare tümörü hücreleri olan 4T1 hücreleri ile farelerde deneysel olarak oluşturulan meme kanser modelinde hem profilaksi hem de tedavi için önemli sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar bu ve benzeri uygulamaların insanlarda da önemli iyileştirici etkileri olabileceği konusunda güçlü veriler elde etmemizi sağlamıştır. Çünkü 4T1 modeli insan üçlü negatif meme tümörleri için model olarak kullanılan ve benzer sonuçların elde edildiği bildirilen ve sık kullanılan bir modeldir.

HSP'ler ile bunların antikorlarının dolaşımdaki seviyeleri çeşitli karsinom tiplerinde yüksek oranlara ulaşır ve bu nedenle HSP'ler değişik kanser tiplerinin evre ve malignitelerinin değerlendirilmesi için mükemmel biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir. HSP'lerin, tümör hücresi proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu ve metastazına doğrudan katılabildikleri bilinmektedir (Calderwood ve ark., 2006; 2010). Çalışmamız sonuçlarına göre HSP90'nın hem tümör gelişiminin hem de tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi açısından önemli bir hedef olabileceği gösterilmiştir. HSP90'ın özellikle bizim çalışmamızda da kullandığımız indüklenmiş formları bu konuda son yıllarda çok dikkat çekmeye başlamış olup umut verici belirteçler olarak değerlendirilmektedir. Bizim sonuçlarımız da bu hipotezi desteklemiştir.

Hastanın kendi tümörlerinden proteinlerin eldesi ve bunun tekrar hastalara verilmesi ile immün sistemin bu proteini tanıyarak ona karşı reaksiyon vermesi ve tümör tedavisi ile ilgili yaklaşımlar geliştirilmiştir. HSP'ler bu proteinlerin en önemlisidir. HSP bazlı aşılardan çoğu, aşının uygulandığı hastaların rezeke edilen tümörlerinden saflaştırılmıştır. Bu kişiye özel aşılardan belirli avantajlara sahiptir, çünkü bunlar tanımlamaya gerek kalmadan kanser peptitlerinin birçoğunu taşırlar. Bu tip aşı hazırlama yaklaşımı, oldukça yararlı olmasına rağmen, bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Bu aşılardan en iyi bilineni vitespendir. Vitespen gibi otolog aşı uygulamaları için dört enjeksiyonun minimum doz olduğunu ve etkisini gösterdiğini bildirilmiştir (Testori ve ark., 2008). Sadece saflaştırılmış HSP'ye dayalı otolog aşılardan kullanma şeklindeki bir yaklaşım basit ve avantajlı olmasına rağmen aşı hazırlama işlemleri ve her hasta için aşı yapmaya yeterli doku bulunamaması gibi bazı önemli dezavantajları da bulunmaktadır (Colaco, 2013). HSP'ler tarafından indüklenen

savunma hücreleri, yalnızca türetildiği tümör hücrelerini değil, aynı zamanda farklı genotiplere sahip ancak benzer tümör antijenleri paylaşan diğer tümör hücrelerini de öldürme kapasitesine sahip olabilirler (Rodrigues ve ark., 2022). Bu nedenle, rekombinant HSP'lerin rezeke edilen tümör örneğinin özelleştirilmiş aşı hazırlanması için yetersiz olduğu klinik ortamlarda etkili olabileceği düşüncesi ile bu çalışma planlanmıştır. Buna ilaveten bu aşılardan profilaktik bir aşı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir, çünkü immunoterapi uygulamaları küçük ve az tümörü olan veya aşı için hiç tümör dokusu toplanamayan hastalarda etkili olabilmektedir. Özellikle kadınlarda son yıllarda meme kanseri bilinci artmakta ve sıklıkla yıllık kanser taramaları yaptırmaktadırlar. Projemizde özellikle profilaksi grubunda elde ettiğimiz sonuçlar bu gibi taramalar sonucu henüz kanserin çok yeni evrelerinde veya uyuyan kanser dediğimiz karsinoma *in situ* olgularında da bu proteinlerin etkili olabileceğini ve belki de hiç cerrahi uygulamaya gerek olmadan bu tümörlerin immun sistem aktivasyonu ile ortadan kaldırılabilceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada rekombinant HSP90 uygulamaları profilaksi ve terapötik amaçlarla 4'er doz şeklinde vitespenin dozu esas alınarak belirlenmiştir. Tümöre etkili olabilmesi için indüklenebilir HSP90 formu seçilmiştir.

Meme kanserleri arasında en agresif, invazif ve yüksek metastaza sahip, tedavi olanakları en sınırlı kanser alt tipi TNBC'dir. TNBC'de ER, PR ve HER2 ekspresyonları düşüktür ya da yoktur, dolayısıyla bu reseptörleri hedefleyen ilaçlara yanıt vermez. Günümüzde TNBC için etkili tedaviler geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır (Obidiro ve ark., 2023). TNBC'nin mekanizması ve tedavisine yönelik araştırmalar için tercih edilen 4T1 meme tümörü modeli, meme kanseri araştırmalarında kullanılan 4T1 fare meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan allogreft (singenik) bir modeldir. 4T1 hücreleri yüksek derecede invazif ve metastatiktir. İnsan meme kanseri araştırmalarında kullanılmasının nedeni ER, PR ve HER2 ekspresyonlarının eksikliğidir (Pulaski ve Suzanne, 2000). Meme kanseri tipleri içerisinde atipik kanal hiperplazisi ve duktal karsinoma *in situ*'da belirgin HSP90 ekspresyon artışı görülürken, invazif duktal karsinom'da ise yüksek HSP90 ekspresyonu görülür. Ancak TNBC'lerde önemli ölçüde azalmış HSP90 ekspresyonu dikkati çeker. Bir yandan yüksek HSP90 kötü bir prognostik faktör olarak önerilirken, kötü prognoza

sahip TNBC'lerde HSP90 ekspresyon azalması göze çarpar. Dikkat çeken bir başka nokta ise TNBC'lerin HSP90 inhibitörlerine duyarlı olmasıdır ve bu durum bir paradoksa neden olur (Mehta ve ark., 2011; Reis ve Tutt, 2008; Sun ve ark.,2008; Zagouri ve ark., 2010). Sunulan tez çalışmasında, 4T1 meme tümörü modeli kullanılarak oluşturulan primer meme tümörlerinde HSP90'ın etkisi araştırıldı. HSP90 proteinlerinin immunohistokimyasal yöntemler ile değerlendirilmesi sonucu tümör grubu ile tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu göze çarptı. Ancak tümör grubu ile profilaksi grupları arasında bir fark saptanmadı. 1 µg HSP90 profilaksi grubu ile tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu dikkati çekti. HSP90'ın terapötik olarak uygulanması HSP90 ekspresyon seviyelerinde dikkate değer azalmaya neden oldu. Bu bulgularla paralel olarak primer tümörün HSP90 mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde tedavi ve profilaksi gruplarında HSP90 ekspresyon seviyelerinde düşüş dikkati çekti. Ancak gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmedi. Bu bulgular, terapötik olarak uygulanan HSP90'ın primer tümör dokusunda tümör hücrelerinden HSP90 ekspresyonlarını azaltabileceği şeklinde yorumlandı. Ayrıca, HSP90 inhibitörlerinin tümör invazyonu ve metastaz riskini azalttığı bildirilmiştir (Tsutsumi ve Neckers, 2007). Bu çalışmada, HSP90 ile immunizasyonun metastaz üzerine etkili olabileceği kanısına varıldı. Çünkü hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal ve PCR analiz sonuçları tümör gelişiminin yavaşladığını ve hücrelerin agresifliklerinin azaldığını göstermiştir.

Kanser dokusunda hücresel proliferasyonun bir belirteci olan Ki-67, mitoz ile G1, S ve G2 dönemlerinde yoğun şekilde eksprese edilirken G0 döneminde eksprese edilmemektedir. Artan Ki-67 ekspresyon seviyeleri, hücrelerin daha hızlı bölündüğünü ve kanser dokusunun daha agresif olduğunu gösterir. Meme kanseri gelişiminde, Ki-67'nin ekspresyonu kanser proliferasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Davey ve ark., 2021). Yüksek Ki-67 ekspresyonu meme kanserinde kötü prognoza yorumlanır. TNBC en yüksek Ki-67 ekspresyonuna sahip meme kanseri tipidir (Hashmi ve ark., 2019). Sunulan çalışmada tümör hücrelerinin immunohistokimyasal olarak Ki-67 ekspresyonlarının değerlendirilmesinde tümör grubu en yüksek ekspresyona sahip gruptu. Tümör grubu ile tedavi ve profilaksi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu göze çarptı. Tedavi ve profilaksi grupları arasında ise anlamlı

bir fark bulunmadı. Terapötik ve proflaktik uygulanan HSP90'ın tümör hücrelerinde Ki-67 ekspresyonlarını azalttığı dikkati çekti ve böylece tümör hücrelerinin proliferasyon aktivitelerini azaltabileceği şeklinde yorumlandı.

Diğer bir hücre proliferasyon belirteci olan PCNA, Ki-67'den farklı olarak hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında eksprese edilir. PCNA hem DNA sentezi hem de DNA tamiri için oldukça önemlidir (Moldovan ve ark., 2007). PCNA, hücre proliferasyon aktivitesini ölçmek için kullanılır ve aktivite ne kadar yüksekse tümör hücrelerinin metastaz yapma riski o kadar yüksek olur (Qiu ve ark., 2017). Meme kanserlerinde artan PCNA ekspresyonu kötü bir prognozla ilişkilendirilir (Malkas ve ark., 2006; Aydoğan ve ark., 2018). Ancak Ki-67 çeşitli tümörlerde hücre proliferasyonunu değerlendirirken daha duyarlı ve spesifik olarak kabul edilir (Bologna-Molina ve ark., 2013). Ayrıca PCNA, HSP90 ile bir kompleks oluşturur. HSP90, hücre içi proteinlerin stabilizasyonu ve katlanmasını sağlayarak PCNA'nın etkin çalışmasına katkıda bulunur (Pennisi ve ark., 2015). Sunulan tez çalışmasında tümör hücrelerinin PCNA ekspresyonlarının değerlendirilmesinde, tümör grubu en yüksek PCNA ekspresyonuna sahipti. En düşük PCNA ekspresyonu 0,5 µg HSP90 tedavi grubunda görüldü. HSP90'ın 0,5 µg dozunda terapötik olarak uygulaması ve proflaktik olarak 0,5 µg ile 1 µg dozunda HSP90 uygulaması PCNA ekspresyonlarının azalmasına neden olduğu dikkati çekti. Terapötik ve proflaktik uygulanan HSP90'ın tümör hücrelerinde PCNA ekspresyonlarını azalttığı ve hücre proliferasyonuna negatif etki edebileceği düşünüldü.

HSP90'ın hücre stabilizasyonu sağladığı bilinmektedir. PCNA ise proliferasyon artışında ve DNA tamirinde ekspresyon artışı gösterir. HSP90, PCNA'nın etkin çalışmasına katkıda bulunur (Pennisi ve ark., 2015). Ki-67 hücrelerin daha hızlı bölündüğünü gösterir. Ayrıca hücrelerde Ki-67 ekspresyon artışı ile hücrelerdeki proliferasyon artışı arasında pozitif bir ilişki ortaya koyar (Davey ve ark., 2021). Tümör grupları ile terapötik ve proflaktik uygulama yapılan gruplar arasında PCNA, Ki-67 ve HSP90 ekspresyonları birlikte incelendiğinde PCNA ve Ki-67 ekspresyonları ile HSP90 ekspresyonlarının birbirine paralel bir şekilde terapötik ve proflaksi gruplarında azaldığı dikkati çekti. Gözlenen ekspresyon azalması, HSP90'ın sağladığı hücre stabilizasyon eksikliği sonucu PCNA'nın etkin çalışmaması ve DNA

tamirinde azalma ile açıklandı. Ayrıca Ki-67 ekspresyon azalması da bu duruma paralellik göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında tümör implantasyonunun 7. günü ile 29. günü arasında tüm gruplardaki hayvanların tümör hacimleri kıyaslandığında ilk ölçümde ve son ölçümde tümör boyutunda en çok büyümeye sahip grup tümör grubuydu. Tümör hacminin ilk ölçümü ve son ölçümünde en az büyüme profeksi gruplarında gözlemlendi. Tümör hacminin en yüksek büyüme oranı 1 µg HSP90 profeksi grubu iken en düşük büyüme oranı ise 0,5 µg HSP90 profeksi grubundaydı. Tümör ağırlıkları incelendiğinde profeksi gruplarının tümör ağırlıklarının diğer gruplara kıyasla oldukça düşük olduğu dikkati çekti. Hayvanların canlı ağırlıkları arasında herhangi bir farka rastlanmadı. González-Sistal ve ark.'larının (2014) yaptıkları bir çalışmada, tümör boyutu ile Ki-67 ve p53 ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada, HSP90'ın 0,5 µg profektik uygulamasının tümör hücrelerinde Ki-67 ve PCNA ekspresyonlarını azalttığı ve ayrıca tümör ağırlığı ile hacmindeki artışı önemli derecede azalttığı dikkati çekti. Böylece HSP90'ın 0,5 µg dozda profektik uygulamasının Ki-67 ve PCNA ekspresyonlarını azaltarak hücre proliferasyonunu azaltabileceği ve tümör ağırlığı ile tümör hacmindeki artışı yavaşlatabileceği ortaya kondu.

CD31, hücresel adezyon yoluyla yeni kan damarlarının oluşumunu yani anjiyogenezisi sağlar (DeLisser ve ark., 1997). Normal ve neoplastik vaskülarizasyonun bir belirteçidir (Sapino ve ark., 2001). Ayrıca vasküler endotelyal bariyer fonksiyonunun sürdürülmesi, yangı bölgelerine lökosit göçü ve T lenfosit hücre aktivasyonunda rol oynar. Birçok solid tümör hücre hattı tarafından eksprese edilir. CD31, malignitelerde anjiyogenezis ve tümörlerin kan yoluyla metastaz yapabilme kapasitesini yansıtır (Charpin ve ark., 2004). Meme kanserinde CD31, tümörlerin gelişimi, invazyonu ve metastaz yapabilmesi için yeni kan damarlarının oluşumu açısından kritik öneme sahiptir. Bu süreç, tümörlerin oksijen ve besin maddeleri almasını sağlar (DeLisser ve ark., 1997). Ayrıca, CD31'in meme tümörlerinde invazyona ve metastaza katkı sağladığı bildirilmiştir (Charpin ve ark., 2004). Bu çalışmada tümör hücrelerinin CD31 immun ekspresyonunda tümör grubunda diğer gruplara göre daha yüksek ekspresyon sergilediği gözlemlendi. HSP90'ın

terapötik olarak uygulanması tümör hücrelerinde CD31 ekspresyonunu azalttığı dikkati çekti. HSP90'ın terapötik uygulamasının CD31 ekspresyonunu azalttığı ve böylece invazyon ve metastaz riskini azaltabileceği düşünüldü. Tümör grubunda, hücre proliferasyonu belirteci olan PCNA ve Ki-67 ekspresyon artışlarıyla beraber HSP90 ve CD31 ekspresyon artışları da şekillendi. CD31 ekspresyon artışının sebebi, HSP90 ile ilişkili artan hücre proliferasyonu ile birlikte hücrelerin besin ve oksijen ihtiyaçlarındaki artışı sağlamak amacıyla yeni mikro damarlara ihtiyaç duyulması ile ilişkilendirildi.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, farelerde 4T1 meme kanseri hücre hattı ile deneysel olarak oluşturulan üçlü negatif meme tümörü modelinde HSP90'ın meme kanserine karşı koruyucu ve tedavi edici etkisi araştırıldı.

Primer meme tümör dokularında HSP90, Ki-67, PCNA ve CD31 immun ekspresyonu ve HSP90'ın mRNA ekspresyonu incelendi. HSP90'ın tümör hücrelerinin proliferasyon aktivitelerini azaltabileceği ve tümör ağırlığı ile tümör hacminde artışı yavaşlatabileceği düşünüldü. Ayrıca HSP90'ın invazyon, anjiyogenezis ve metastaz riskini azaltabileceği öngörüldü.

Sonuç olarak meme kanserlerinde HSP90'ın prognozu iyileştirebileceği ve hayatta kalım oranını arttırabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL (2021).** *Cellular and molecular immunology*. 10th Edition, Philadelphia: Elsevier, p: 1056-1051.
- Abdel-Razeq H, Tamimi F, Abujamous L, Edaily S, Abunasser M, Bater R, Salama O (2021).** Patterns and prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations among patients with triple-negative breast cancer: regional perspectives. *Cancer Manag Res.*, **9(13)**, 4597–4604.
- Akerfelt M, Morimoto R, Sistonen L (2010).** Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **11(8)**, 545-555.
- Albakova Z, Mangasarova Y (2021).** The HSP immune network in cancer. *Front Immunol.*, **30(12)**, 796493.
- Alberts B, Heald R, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K (2014).** *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, New York: Garland Science, p: 464-494.
- Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn JV, Johnson CJ, Bonaventure A, Marcos-Gragera R, Stiller C, Silva GA, Chen WQ, Ogunbiyi OJ, Rachet B, Soeberg MJ, You H, Matsuda T, Bielska-Lasota M, Storm H, Tucker TC, Coleman MP (2015).** Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet.*, **385(9972)**, 977-1010.
- Aoyagi Y, Fujita N, Tsuruo T (2005).** Stabilization of integrin-linked kinase by binding to Hsp90. *Biochem Biophys Res Commun.*, **331(4)**, 1061-1068.
- Archana B (2023).** *Breast Histology*. Singapore, Springer, p: 23–27.
- Aydogan A, Ozmen O, Haligur M, Sipahi C, Ileri D, Haligur A (2018).** Immunohistochemical evaluation of bcl-2, ER-alpha, caspase -3, -8, -9, PCNA and Ki-67 expressions in canine mammary carcinomas. *Biotech Histochem.*, **93(4)**, 286-292.
- Balmana J, Diez O, Rubio IT, Cardoso F, ESMO Guidelines Working Group (2011).** BRCA in breast cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol.*, **6**, 31-34.
- Barreto A, Gonzalez JM, Kabingu E, Asea A, Fiorentino S (2003).** Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cell Immunol.*, **222(2)**, 97–104.
- Bazan-Peregrino M, Sainson RC, Carlisle RC, Thoma C, Waters RA, Arvanitis C, Harris AL, Hernandez-Alcoceba R, Seymour LW (2013).** Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer. *Cancer Gene Ther.*, **20(8)**, 461-468.

Beliakoff J, Whitesell L (2004). Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs.*, **15(7)**, 651-662.

Bellanger M, Zeinomar N, Tehranifar P, Terry MB (2018). Are global breast cancer incidence and mortality patterns related to country-specific economic development and prevention strategies? *J Glob Oncol.*, **4**, 1–16.

Binder RJ, Vatner R, Srivastava P (2004). The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens.*, **64(4)**, 442– 451.

Birbo B, Madu EE, Madu CO, Jain A, Lu Y (2021). Role of HSP90 in cancer. *Int J Mol Sci.*, **22(19)**, 10317.

Blackwill F, Mantovani A (2002). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.*, **357(9255)**, 539–45.

Bollon AP, Barron EA, Berent SL, Bragg PW, Dixon D, Fuke M, Hendrix C, Mahmoudi M Sidhu RS, Torczynski RM (1984). *Recombinant DNA Products: Insulin, Interferon and Growth Hormone*. USA: CRC Press Taylor & Francis Group, p: 1-36.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, **18(2)**, 174-179.

Boudreau A, van't Veer LJ, Bissell MJ (2012). An 'elite hacker': breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity. *Cell Adhes Migr.*, **6(3)**, 236–248.

Burrows F, Zhang H, Kamal A (2004). Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell cycle*, **3(12)**, 1530-1536.

Calderwood SK (2010). Heat shock proteins in breast cancer progression-a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia.*, **26(7)**, 681-685.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.*, **31(3)**, 164-72.

Cardiff RD, Jindal S, Treuting PM, Going JJ, Gusterson B, Thompson HJ (2017). *Mammary gland*. In: Treuting PM, Dintzis SM, Kathleen SM (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology; A mouse, Rat, and Human Atlas*. 2nd edition, Academic Press, Washington. p: 487-509.

Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, Zackrisson S, Senkus E (2019). Early breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.*, **30(8)**, 1194–1220.

Charpin C, Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Djemli A, Andrac L, Bonnier P (2004). Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res.*, **10(17)**, 5815-5819.

Cheng Q, Chang JT, Geradts J, Neckers LM, Haystead T, Spector NL, Lyerly HK (2012). Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **14(2)**, R62.

Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK (2013). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol.*, **87(1)**, 19-48.

Colaco C (2013). Autologous heat-shock protein vaccines. *Hum Vaccin Immunother.*, **9(2)**, 275-276.

Coles CE, Griffin CL, Kirby AM, Titley J, Agrawal RK, Alhasso A, Bhattacharya IS, Brunt AM, Ciurlionis L, Chan C, Donovan EM, Emson MA, Harnett AN, Haviland JS, Hopwood P, Jefford ML, Kaggwa R, Sawyer EJ, Syndikus I, Tsang YM, Wheatley DA, Wilcox M, Yarnold JR, Bliss JM (2017). Partial-breast radiotherapy after breast conservation surgery for patients with early breast cancer (UK IMPORT LOW trial): 5-year results from a multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet.*, **390(10099)**, 1048–1060.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet.*, **358**, 1389–1399.

Conroy SE, Latchman DS (1996). Do heat shock proteins have a role in breast cancer? *Br J Cancer.*, **74(5)**, 717-721.

Csermely P, Schnaider T, So C, Prohászka Z, Nardai G (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.*, **79(2)**, 129-168.

Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell.*, **130**, 1005–1018.

Daly MB, Pilarski R, Axilbund JE, Berry M, Buys SS, Crawford B, Farmer M, Friedman S, Garber JE, Khan S, Klein C, Kohlmann W, Kurian A, Litton JK, Madlensky L, Marcom PK, Merajver SD, Offit K, Pal T, Rana H, Reiser G, Robson ME, Shannon KM, Swisher E, Voian NC, Weitzel JN, Whelan A, Wick MJ, Wiesner GL, Dwyer M, Kumar R, Darlow S (2015). Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 2. *J Natl Compr Cancer Netw.*, **14(2)**, 153–162 (2016).

Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ (2021). Ki-67 as a prognostic biomarker in invasive breast cancer. *Cancers (Basel).*, **13(17)**, 4455.

de Martel C, Franceschi S (2009). Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol.*, **70(3)**, 183–194.

DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Albelda SM (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.*, **151(3)**, 671-677.

Desai SA, Patel VP, Bhosle KP, Nagare SD, Thombare KC (2023). The tumor microenvironment: shaping cancer progression and treatment response. *J Chemother.*, **5**, 1-30.

Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, Pruneri G, D'Alfonso TM, Demaria S, Castaneda C, Sanchez J, Badve S, Michiels S, Bossuyt V, Rojo F, Singh B, Nielsen T, Viale G, Kim SR, Hewitt S, Wienert S, Loibl S, Rimm D, Symmans F, Denkert C, Adams S, Loi S, Salgado R (2018). Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma *in situ*: a report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol.*, **52(2)**, 16–25.

Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ (2004). Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8⁺ T cell effector function. *J Immunol.*, **172(10)**, 6087–6092.

Du L, Yau C, Brown-Swigart L, Gould R, Krings G, Hirst GL, Bedrosian I, Layman RM, Carter JM, Klein M, Venters S, Shad S, van der Noordaa M, Chien AJ, Haddad T, Isaacs C, Pusztai L, Albain K, Nanda R, Tripathy D, Liu MC, Boughhey J, Schwab R, Hylton N, DeMichele A, Perlmutter J, Yee D, Berry D, Van't Veer L, Valero V, Esserman LJ, Symmans WF (2021). Predicted sensitivity to endocrine therapy for stage II-III hormone receptor-positive and HER2-negative (HR⁺/HER2-) breast cancer before chemo-endocrine therapy. *Ann Oncol.*, **32(5)**, 642–651.

Dubey A, Prajapati KS, Swamy M, Pachauri V (2015). Heat shock proteins: A therapeutic target worth to consider. *Vet World.*, **8(1)**, 46–51.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.*, **3(11)**, 991–998.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.*, **22**, 329–360.

Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW (2005). Screening for breast cancer. *JAMA.*, **293(10)**, 1245–1256.

Esparcia-Pinedo L, Romero-Laorden N, Alfranca A (2023). Tertiary lymphoid structures and B lymphocytes: a promising therapeutic strategy to fight cancer. *Front Immunol.*, **9(14)**, 1231315.

Flies DB, Langermann S, Jensen C, Karsdal MA, Willumsen N (2023). Regulation of tumor immunity and immunotherapy by the tumor collagen extracellular matrix. *Front Immunol.*, **17(14)**, 1199513.

Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am.*, **27(1)**, 95-120.

Francies FZ, Hull R, Khanyile R, Dlamini Z (2020). Breast cancer in low-middle income countries: Abnormality in splicing and lack of targeted treatment options. *Am J Cancer Res.*, **10(5)**, 1568–1591.

Geller R, Taguwa S, Frydman J (2012). Broad action of HSP90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim Biophys Acta.*, **1823(3)**, 698–706.

Gkretsi V, Stylianopoulos T (2018). Cell adhesion and matrix stiffness: coordinating cancer cell invasion and metastasis. *Front Oncol.*, **8**, 145.

González-Sistal A, Sanchez AB, Del Rio MC, Arias JI, Herranz M, Ruibal A (2014). Association between tumor size and immunohistochemical expression of Ki-67, p53 and BCL2 in a node-negative breast cancer population selected from a breast cancer screening program. *Anticancer Res.*, **34(1)**, 269-273.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.*, **140(6)**, 883–899.

Gupta RS (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol.*, **12(6)**, 1063-1073.

Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim.*, **5(1)**, 66.

Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman J VJ, Johnson J, Blake B, Tlsty T, Vachon CM, Melton LJ, Visscher DW (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.*, **353(3)**, 229–237.

Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, Khan SM, Edhi MM, Ali JP, Khan A (2019). Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes.*, **12(1)**, 1-5.

Henry NL, Cannon-Albright L (2019). Breast cancer histologic subtypes show excess familial clustering. *Cancer.*, **125(18)**, 3131-3138.

Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, Mei H, Liu J, Wang W, Liu Q (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm (2020)*., **3(3)**, e161.

Hu L, Zhao R, Liu Q, Li Q (2020). New insights into heat shock protein 90 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Front Physiol.*, **11**, 1081.

Hughes KS, Schnaper LA, Bellon JR, Cirrincione CT, Berry DA, McCormick B, Muss HB, Smith BL, Hudis CA, Winer EP, Wood WC (2013). Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: long-term follow-up of CALGB 9343. *J Clin Oncol.*, **31(19)**, 2382–2387.

Hurley WL, Loor JJ (2011). *Growth, Development and Involution*. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences.*, 2nd edition, Academic Press, San Diego. p: 338–345.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Hightower LE (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.*, **14(1)**, 105–111.

Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ, Stevenson MA, Calderwood SK (2005). Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene.*, **24(43)**, 6564–6573.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Blom MJR, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, Goldgar DE, Terry MB, Rookus MA, Easton DF, Antoniou AC, BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium (2017). Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA.*, **317(23)**, 2402–2416.

Kumar P, Aggarwal R (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.*, **293(2)**, 247–269.

Kumaraguruparan R, Karunagaran D, Balachandran C, Manohar B M, Nagini S (2006). Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clin Chim Acta.*, **365(1-2)**, 168–176.

Kunkler IH, Williams LJ, Jack WJ, Cameron DA, Dixon JM (2015). Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.*, **16(3)**, 266–273.

Laumont CM, Banville AC, Gilardi M, Hollern DP, Nelson BH (2022). Tumor-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.*, **22(7)**, 414–430.

Lea D, Gudlaugsson EG, Skaland I, Lillesand M, Søreide K, Søreide JA (2021). Digital image analysis of the proliferation markers Ki67 and phosphohistone h3 in

gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: accuracy of grading compared with routine manual hot spot evaluation of the ki67 index. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, **29(7)**, 499-505.

Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One.*, **4(11)**, e7965.

Lima SM, Kehm RD, Terry MB (2021). Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. *EClinicalMedicine.*, **38**, 100985.

Lin MJ, Svensson-Arvelund J, Lubitz GS, Marabelle A, Melero I, Brown BD, Brody JD (2022). Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier. *Nat Cancer.*, **3(8)**, 911-926.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.*, **359(4)**, 378-390.

Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.*, **77(9)**, 1745– 1770.

Lukong KE (2017). Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clin.*, **7(1)**, 64-77.

Luo W, Sun W, Taldone T, Rodina A, Chiosis G (2010). Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.*, **5(1)**, 1-8.

Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, Dobrolecki LE, Liu Y, Agarwal B, Hickey R J (2006). A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103(51)**, 19472-19477.

Malyshev I (2013). In Immunity, Tumors and Aging: The Role of HSP70. 2013th Edition Dordrecht, The Netherlands: Springer, p: 1-13.

Mano MS, Awada A (2004). Primary chemotherapy for breast cancer: the evidence and the future. *Ann Oncol.*, **15(8)**, 1161–1171.

Marwah N, Batra A, Marwah S, Gupta V, Shakya S, Sen R (2018). Correlation of proliferative index with various clinicopathologic prognostic parameters in primary breast carcinoma: A study from North India. *J Cancer Res Ther.*, **14(3)**, 537-542.

Masood S (2016). Breast Cancer Subtypes: Morphologic and Biologic Characterization. *Womens Health (Lond).*, **12(1)**, 103-19.

Mehta PP, Whalen P, Baxi SM, Kung PP, Yamazaki S, Yin MJ (2011). Effective targeting of triple-negative breast cancer cells by PF-4942847, a novel oral inhibitor of Hsp 90. *Clin Cancer Res.*, **17(16)**, 5432–5442.

Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L (2013). The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr Pharm Des.*, **19(3)**, 347-365.

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.*, **129(4)**, 665-679.

Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M (2018). Overview of breast cancer therapy. *PET Clin.*, **13(3)**, 339–354.

Nagarajan D, McArdle S (2018). Immune landscape of breast cancers. *Biomedicines.*, **6(1)**, 20.

Nagaraju GP, Long TE, Park W, Landry JC, Taliaferro-Smith L, Farris AB, El-Rayes BF (2015). Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal transition, invasion, and migration in colorectal cancer. *Mol Carcinog.*, **54(10)**, 1147-1158.

Nardin S, Mora E, Varughese FM, D’Avanzo F, Vachanaram AR, Rossi V, Saggia C, Rubinelli S, Gennari A (2020). Breast cancer survivorship, quality of life, and late toxicities. *Front Oncol.*, **16(10)**, 864.

Nomura M, Nomura N, Newcomb EW, Lukyanov Y, Tamasda C, Zagzag D (2004). Geldanamycin induces mitotic catastrophe and subsequent apoptosis in human glioma cells. *J Cell Physiol.*, **201(3)**, 374-384.

Obidiro O, Battogtokh G, Akala EO (2023). Triple negative breast cancer treatment options and limitations: future outlook. *Pharmaceutics.*, **15(7)**, 1796.

Ochel H J, Schulte TW, Nguyen P, Trepel J, Neckers L (1999). The benzoquinone ansamycin geldanamycin stimulates proteolytic degradation of focal adhesion kinase. *Mol Genet Metab.*, **66(1)**, 24-30.

Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, Senkus E (2016). Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol.*, **27(5)**, 103-110.

Paradiso F, Serpelloni S, Francis LW, Taraballi F (2021). Mechanical studies of the third dimension in cancer: from 2D to 3D model. *Vol Int J Mol Sci.*, **22(18)**, 10098.

Pasche B (2001). Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol.*, **186(2)**, 153–68.

Pearl LH, Prodromou C, Workman P (2008). The Hsp90 molecular chaperone: An open and shut case for treatment. *Biochem J.*, **410(3)**, 439–453.

Pennisi R, Ascenzi P, Di Masi A (2015). Hsp90: a new player in DNA repair? *Biomolecules.*, **5(4)**, 2589-2618.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.*, **406(6797)**, 747-752.

Pick E, Kluger Y, Giltane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.*, **67(7)**, 2932–2937.

Pirkkala L, Sistonen L (2006). Heat shock proteins (HSPs): Structure, function and genetics. *Encycl Life Sci.*, 1–7.

Primrose SB, Twyman RM (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 7th Edition, Cornwall, UK: Graphcraft Limited, p: 508-545.

Prodromou C, Pearl LH (2003). Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr Cancer Drug Targets.*, **3(5)**, 301-323.

Pulaski Beth A, Suzanne Ostrand-Rosenberg (2000). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol.*, **39(1)**, 20-2.

Qiu X, Mei J, Yin J, Wang H, Wang J, Xie M (2017). Correlation analysis between expression of PCNA, Ki 67 and COX-2 and X-ray features in mammography in breast cancer. *Oncol Lett.*, **14(3)**, 2912-2918.

Rakoff-Nahoum S (2007). Why cancer and inflammation. *Yale J Biol Med.*, **79(3-4)**, 123–30.

Reis-Filho JS, Tutt AN (2008). Triple negative tumours: A critical review. *Histopathology.*, **52(1)**, 108–118.

Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*, **5(2)**, 227-241.

Ritossa F (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.*, **18**, 571–573.

Rodrigues MC, Morais JAV, Ganassin R, Oliveira GRT, Costa FC, Morais AAC, Silveira AP, Silva VCM, Longo JPF, Muehlmann LA (2022). An overview on immunogenic cell death in cancer biology and therapy. *Pharmaceutics.*, **14(8)**, 1564.

Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Della SL (2006). Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC cancer.*, **6(1)**, 1-12.

Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM (2012). Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **109(8)**, 2796–2801.

Sangster TA, Salathia N, Lee HN, Watanabe E, Schellenberg K, Morneau K, Wang H, Undurraga S, Queitsch C, Lindquist S (2008). HSP90-buffered genetic variation is common in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **105**, 2969–2974.

Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S, Malavasi F (2001). Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J Pathol.*, **194(2)**, 254-261.

Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, Loi S (2016). Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.*, **13(4)**, 228–241.

Sawnn JB, Smyth MJ (2007). Immune surveillance of tumors. *J Clin Investig.*, **117(5)**, 1137–46.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.*, **331(6024)**, 1565–1570.

Scudamore CL (2014). *Reproductive system*. In: Scudamore CL (Ed.), *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*, 1st edition. John Wiley and Sons, West Sussex. p: 88-97.

Senkus E, Lacko A (2017). Over-treatment in metastatic breast cancer. *Breast.*, **31**, 309–317.

Shay JW, Roninson IB (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.*, **23(16)**, 2919–2933.

Shiovitz, S, Korde LA (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann. Oncol.*, **26(7)**, 1291–1299.

Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H (2022). Breast cancer-epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers (Basel).*, **14(10)**, 2569.

Solinas C, Carbognin L, De Silva P, Criscitiello C, Lambertini M (2017). Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: current state of the art. *Breast.*, **35**, 142–150.

Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P, Shen YF (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters.*, **562(1-3)**, 11-15.

Strilic B, Offermanns S (2017). Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell.*, **32(3)**, 282–293.

Strnad V, Ott OJ, Hildebrandt G, Kauer-Dorner D, Knauerhase H, Major T, Lyczek J, Guinot JL, Dunst J, Miguelez CG, Slampa P, Allgäuer M, Lössl K, Polat B, Kovács G, Fischedick AR, Wendt TG, Fietkau R, Hindemith M, Resch A, Kulik

A, Arribas L, Niehoff P, Guedea F, Schlamann A, Pötter R, Gall C, Malzer M, Uter W, Polgár C (2016). 5-year results of accelerated partial breast irradiation using sole interstitial multicatheter brachytherapy versus whole-breast irradiation with boost after breast-conserving surgery for low-risk invasive and in-situ carcinoma of the female breast: a randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet.*, **387(10015)**, 229–238.

Stylianopoulos T, Munn LL, Jain RK (2018). Reengineering the physical microenvironment of tumors to improve drug delivery and efficacy: from mathematical modeling to bench to bedside. *Trends Cancer.*, **4(4)**, 292–319.

Sun B, Zhang S, Zhang D (2008). Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer. *Clin Cancer Res.*, **14(21)**, 7050–7059.

Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L (1995). Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **36(4)**, 305–315.

Şener LT, Güven C, Şener A, Çınar SA, Solakoğlu S, Albeniz I (2018). Nicotine reduces effectiveness of doxorubicin chemotherapy and promotes CD44⁺CD24⁻ cancer stem cells in MCF-7 cell populations. *Exp Ther Med.*, **16(1)**, 21–28.

Tanriover G, Dilmac S, Aytac G, Farooqi AA, Sindel M (2022). Effects of melatonin and doxorubicin on primary tumor and metastasis in breast cancer model. *Anticancer Agents Med Chem.*, **22(10)**, 1970–1983.

Tausif YM, Thekkekkara D, Sai TE, Jahagirdar V, Arjun HR, Meheronnisha SK, Banerjee A (2024). Heat shock protein paradigms in cancer progression: future therapeutic perspectives. *3 Biotech.*, **14(4)**, 96.

Testori A, Richards J, Whitman E, Mann GB, Lutzky J, Camacho L, Parmiani G, Tosti G, Kirkwood JM, Hoos A, Yuh L, Gupta R, Srivastava PK (2008). Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. *J Clin Oncol.*, **26(6)**, 955–962.

Trayes KP, Cokenakes SE (2021). Breast cancer treatment. *Am Fam Physician.*, **104(2)**, 171–178.

Tsutsumi S, Neckers L (2007). Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci.*, **98(10)**, 1536–1539.

Tutar L, Ozgur A, Tutar E, Coskun KA, Tutar Y (2014). Heat shock response agents and the diseases. Heat shock response agents and the diseases. *Front Protein Pept Sci.*, **1**, 139.

Tutar L, Tutar Y (2010). Heat shock proteins; an overview. *Curr Pharm Biotechnol.*, **11(2)**, 216-222.

Tutar Y, Naureen H, Farooqi AA (2022). Heat shock proteins in tumor progression and metastasis. In: Farooqi AA, Qureshi MZ, Sabitaliyevi UY(Eds), *Unraveling the Complexities of Metastasis*. USA: Academic Press, p: 187-201.

Tutar Y, Song Y, Masison DC (2006). Primate chaperones Hsc70 (constitutive) and Hsp70 (induced) differ functionally in supporting growth and prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **172(2)**, 851-861.

van Maaren MC, de Munck L, Strobbe LJA, Sonke GS, Westenend PJ, Smidt ML, Poortmans PMP, Siesling S (2019). Ten-year recurrence rates for breast cancer subtypes in the Netherlands: a large population-based study. *Int J Cancer.*, **144(2)**, 263–272.

Vartholomaïou E, Echeverria PC, Picard D (2016). Unusual suspects in the twilight zone between the Hsp90 interactome and carcinogenesis. *Adv Cancer Res.*, **129**, 1-30.

Venter M (2007). Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends Plant Sci.*, **12(3)**, 118-124.

Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Kwon BS (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.*, **35**, 185-198.

Wang Y, Theriault JR, He H, Gong J, Calderwood SK (2004). Expression of a dominant negative heat shock factor-1 construct inhibits aneuploidy in prostate carcinoma cells. *J Biol Chem.*, **279**, 32651–32659.

Whitesell L, Lindquist SL (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer.*, **5(10)**, 761–772.

Wilson RE (1984). Surgical management of locally advanced and recurrent breast cancer. *Cancer.*, **53(3)**, 752–757.

Winkler J, Abisoye-Ogunniyan A, Metcalf KJ, Werb Z (2020). Concepts of extracellular matrix remodeling in tumor progression and metastasis. *Nat Commun.*, **11(1)**, 5120.

Wright K, Ly T, Kriet M, Czirok A, Thomas SM (2023). Cancer-associated fibroblasts: master tumor microenvironment modifiers. *Cancers (Basel).*, **15(6)**, 1899.

Yano M, Naito Z, Yokoyama M, Shiraki Y, Ishiwata T, Inokuchi M, Asano G (1999). Expression of hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett.*, **137(1)**, 45-51.

Yun CW, Kim HJ, Lim JH, Lee SH (2020). Heat shock proteins: agents of cancer development and therapeutic targets in anticancer therapy. *Cells.*, **9(1)**, 60.

Zagouri F, Bournakis E, Koutsoukos K, Papadimitriou CA (2012). Heat shock protein 90 (hsp90) expression and breast cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*., **5(9)**, 1008-1020.

Zagouri F, Sergeantanis TN, Nonni A, Papadimitriou CA, Michalopoulos NV, Domeyer P, Theodoropoulos G, Lazaris A, Patsouris E, Zogafos E (2010). Hsp90 in the continuum of breast ductal carcinogenesis: Evaluation in precursors, preinvasive and ductal carcinoma lesions. *BMC Cancer*., **5(10)**, 353.

Zhong F, Bi R, Yu B, Yang F, Yang W, Shui R (2016). A comparison of visual assessment and automated digital image analysis of Ki67 labeling index in breast cancer. *PLoS One*., **11(2)**, e0150505.

Zumsteg ZS, Morrow M, Arnold B, Zheng J, Zhang Z, Robson M, Traina T, McCormick B, Powell S, Ho AY (2013). Breast-conserving therapy achieves locoregional outcomes comparable to mastectomy in women with T1-2N0 triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*., **20(11)**, 3469–3476.

