



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HASTALARINDAN ELDE EDİLEN EKSOZOMLARDAKİ
SURVİVİN GEN EKSPRESYONLARININ ANALİZİ**

Mustafa YILDIRIM
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK

Gaziantep

2019

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
MEME KANSERİ HASTALARINDAN ELDE EDİLEN EKSOZOMLARDAKİ
SURVİVİN GEN EKSPRESYONLARININ ANALİZİ

Mustafa YILDIRIM

Tez Savunma Tarihi: 29.04.2019
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir "Doktora" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Doktora" tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Doktora" tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Prof. Dr. Lütfi ÇAKAR

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK

Dr. Öğr. Üyesi Necla BENLİER

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olup tezin planlanması ve yazım aşamasında etik dışı davranışım olmayıp, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettim. Bu tez çalışmasında elde edilen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edecek herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

imza

Mustafa YILDIRIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve biyokimya doktora eğitimim sırasında her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK başta olmak üzere, eğitim sürecim boyunca ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU'na ve eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI, Prof. Dr. Seyithan TAYSI ve Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENCI 'ye teşekkür ederim.

Hekimliği ve örnek bilim insanı kişiliği ile yolumu aydınlatan Prof. Dr. Semra PAYDAŞ'a, bilim yolculuğumda yoldaşım olan Doç.Dr. Vildan KAYA başta olmak üzere Temel ve Klinik Bilimler Çalışma Grubuna teşekkür ederim.

Yoğun çalışmalarım sırasında bana sabır gösteren fedakârlıkta bulunan eşim Evrim YILDIRIM'a yürek dolusu teşekkürlerimi sunarım. Varlıkları ile bana ümit ve yaşama sevinci veren oğullarım Emek Can ve Barış'a ve kızım Su'ya teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.DT.17.43 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 Meme Kanseri.....	5
2.1.1 Epidemiyoloji.....	5
2.1.2 Risk Faktörleri.....	5
2.1.3 Meme kanserinde tarama.....	12
2.1.4 Tanı.....	14
2.1.5 Histopatoloji.....	15
2.1.6 Prediktif ve prognostik faktörler	15
2.1.7.Tedavi	16
2.2 Eksozomlar	17
2.2.1 Eksozom içeriği.....	18
2.2.3 Eksozomal RNA'lar	19
2.2.4 Eksozomal DNA	19
2.2.6 Eksozomal içeriğin değişimi.....	20
2.2.7 RNA ve protein sekresyonunun mekanizması.....	21

2.2.7.1 miRNA sekresyon mekanizması	21
2.2.7.2 mRNA Sekresyon Mekanizmaları.....	23
2.2.7.3 Protein Sekresyon Mekanizması.....	23
2.2.8 Eksozomların Normal Fizyolojideki Rolü.....	25
2.2.9 Eksozomlar ve kanser	29
2.3 Survivin	32
2.3.1 Survivin ve kanser	32
2.3.2. Survivin ve meme kanseri.....	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1 Giriş.....	35
3.2 Hasta seçimi ve örneklerin elde edilmesi	35
3.3 Eksozomların İzolasyonu	36
3.4 Eksozomların membran bütünlüğünün bozulması ve Eksozomal survivin ölçümü	36
4.BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
6.KAYNAKLAR	61
7.EKLER	68
7.1 EK-1: GAÜN Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izin formu.....	68
EK-2: Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu	69
EK-3: Özgeçmiş.....	76

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APC	Antijen Sunan Hücreler
AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotranferaz
BMDM	Kemik İliği Kökenli Makrofajlar
BUN	Kan üre azotu
CRE	Kreatinin
DCs	Dendritik Hücreler
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DCIS	Duktal Karsinoma In Situ
ECM	Hücre dışı matrisi
EV	Ekstrasellüler vezikül
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Östrojen reseptör
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required For Transport
GPLs	Glikopeptidolipitler
Hb	Hemoglobin
HSP	Heat Shock Proteins
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2
IAP	Apoptoz inhibitör
İİAB	İnce iğne aspirasyon biyopsisi
IS	İmmun Sinaps
LDH	Laktat dehidrogenaz
LKİS	Lobular karsinoma insitu
LVI	Lenfovasküler invazyon
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA	Mesajcı RNA
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi
miRNA	mikroRNA
MS	Multiple Skleroz
MVBs	Multiveziküler cisimcikler
nSMase2	neutral Sphingomyelinase 2
NTAs	Nucleotide Terminal Additions
NK	Doğal öldürücü (Natural Killer)
PNI	Perinöral invazyon
PR	Progesteron Reseptör
RNA	Ribo Nükleik Asit
RR	Risk Oranı
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide- sensitive fusion attachment protein receptors
TME	Tümör mikro çevresi
TEX	Tümör Hücresi Kaynaklı Eksozomlar
USG	Ultrasonografi
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
WBC	Total lökosit

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Meme kanseri riskini arttıran ailesel geçişli genetik değişiklikler.....	6
Tablo 2.2. Rölatif risk arttırımına göre meme kanseri risk gelişimi ile ilgili faktör- ler.....	12
Tablo 3.1 Hastaların genel özellikleri.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Eksozom biyogenez ve sekresyonu.....	25
Şekil 4.1. Hasta kontrol grupları arasındaki eksozomal Survivin düzeyleri.....	40
Şekil 4.2. Ortalama sağ kalım eğrisi.....	44

ÖZET

MEME KANSERİ TANISINDA EKSOZOMAL SURVİVİNİN ROLÜ

Mustafa YILDIRIM

Doktora Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK

Mayıs 2019, 76 sayfa

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar için önemli bir halk sağlığı problemidir. Hastalara erken dönemde tanı koymak, hangi hastaların neoadjuvan veya adjuvan tedaviden fayda göreceğini belirlemek ve hasta bazında rekürrens riskinin belirlenmesi bu hastaların sağ kalımını arttıracak önemli faktörlerdir. Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda önde gelen ölüm nedenidir. Bu çalışmanın amacı karsinogeneizde rolü giderek daha fazla anlaşılan eksozomların ve eksozomal survivinin meme kanseri ile ilişkisinin belirlenmesidir.

Medicalpark Gaziantep Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniğinde 2014-2017 yılları arasında tanısı histopatolojik olarak doğrulanmış meme kanseri ile takip edilen hastalar ve sağlıklı gönüllüler çalışmaya alındı. Hastalar ve sağlıklı gönüllülerden alınan serum örnekleri -80°C de saklandı. Bu serum örneklerinden eksozomlar izole edildi. Elde edilen eksozomların bütünlüğü bozuldu. Elde edilen örneklerden Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile survivin düzeyleri ölçüldü.

Çalışmaya 55' si meme kanserli, 20'si sağlıklı gönüllü olmak üzere toplam 75 katılımcı alındı. İki grup arasındaki fark Mann Whitney U testi ile araştırıldı. Hasta kontrol grubu arasında eksozomal survivin düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0.047$). Hasta grubunda eksozomal survivin düzeyi 2.48 ± 6.38 ng/mL (Range 0-40.452) iken kontrol grubunda 0.23 ± 0.52 ng/mL (Range 0-2.4) idi. Eksozomal survivin ile diğer prognostik klinikopatolojik göstergeler arasında ilişki saptanmadı.

Meme kanseri hastalarında daha önce literatürde kötü prognostik bir belirteç olarak gösterilen Survivin eksozomal yol ile eksprese olduğu gösterildi. Eksozomal survivin ekspresyonu meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre yüksektir. Bu yolak hem bir tedavi hedefi hemde hastalığın erken tanısı için yeni bir belirteç olabilir.

Anahtar Sözcükler: Eksozom, Survivin, Tanı, Meme kanseri

ABSTRACT

THE ROLE OF EXOSOMAL SURVIVIN IN DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

Mustafa YILDIRIM

Doctoral Thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Professor Dr. Hülya ÇİÇEK

May 2019, 76 pages

Breast cancer is an important public health problem for women in the world. Diagnosing patients at an early stage, determining which patients will benefit from neoadjuvant or adjuvant treatment, and determining the risk of recurrence on a patient basis are important factors to improve the survival of these patients. Breast cancer is the leading cause of death in women across the globe. The aim of this study is to determine the role of exosomes and exosomal survivin in breast carcinogenesis.

Patients who were diagnosed with histopathologically confirmed breast cancer between 2014-2017 at Medicalpark Gaziantep Hospital Medical Oncology Clinic and healthy volunteers were included in the study. Serum samples from patients and healthy volunteers were stored at -80. Exosomes were isolated from these serum samples. The integrity of the exosomes was disrupted. survivin levels were measured by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

A total of 75 participants, 55 of whom were breast cancer and 20 healthy volunteers, were included in the study. The difference between the two groups was investigated by Mann Whitney U test. A significant relationship was found exosomal survivin levels between patient and healthy control group ($p = 0.047$). The exosomal survivin level in the patient group was 2.48 ± 6.38 ng / mL (Range 0-40.452) and in the control group 0.23 ± 0.52 ng / mL (Range 0-2.4). No relation was found between exosomal survivin and other prognostic clinicopathological indicators.

It was shown that survivin, which was previously shown as a poor prognostic marker in breast cancer patients, was expressed by exosomal route. Exosomal survivin expression is higher in breast cancer patients than in control group. This pathway can be both a therapeutic target and a new marker for early diagnosis of the disease.

Key Words: Exosome, Survivin, Diagnosis, Breast Cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar için önemli bir halk sağlığı problemidir. Meme kanseri erkeklerde nadiren görülmektedir (1). Sağlık bakanlığının 2015 verilerine göre de kadınlarda en sık görülen kanser meme kanseridir. Kadınlarda kanser nedenli ölümlerin ikinci sıklıkta nedenidir (2).

Meme kanseri nedenli ölüm oranlarının 1950-2014 yılları arasında azaldığı gözlemlenmiştir (3-4). Gelişen tanı ve tedavi yöntemleri, toplumsal farkındalığın artması erken tanı konan hasta sayısının artmasına neden olmaktadır. Erken tanı ile ileri evrede oldukça zor tedavi süreçleri yerine hasta için daha az morbidite ve mortalite oluşturacak tedaviler uygulanabilmektedir.

Meme kanseri erken tanısında mamografi, meme ultrasonografisi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Hastaların kendi kendisinin meme muayenesi ve klinik meme muayenesinde taramalarda kullanılan klinik yöntemlerdir. Bununla birlikte hala hastaların önemli bir kısmı ileri evrede tanı almaktadır. Konvansiyonel erken tanı yöntemlerinde yetersizlikler daha sofistike yöntemlerin araştırılmasına neden olmaktadır.

Meme kanseri klinik, patolojik ve tedaviye verilen yanıt açısından heterojen bir hastalıktır. Meme kanserinin klasik histolojik sınıflaması hastalığın klinik seyri konusunda yeterli bir fikir vermemektedir. Histolojik tip, tümör gradı, östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR), İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (HER 2) reseptör statusu, tümörün çapı, lenf nodu tutulumu ve metastaz varlığı bilinen önemli prognostik faktörlerdir. Hastanın yaşı ise bilinen diğer önemli bir prognostik faktördür.

Meme kanseri için yapılan yeni biyolojik belirteç araştırmaları kişisel tedaviler için oldukça önem kazanmaktadır. Biyolojik belirteçler hastalığa tanı konulmasında

veya tedavi yanıtlarının objektif bir şekilde karakterize edilmesini sağlayan araçlardır. Eksozomlar plazma, serum, idrar gözyaşı gibi birçok vücut sıvısında bulunan genetik materyal ve protein taşıyan ekstraselüler veziküllerdir. Eksozomlar, kanser tanısı, evrelemesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve tedavi için potansiyel hedef olarak ilgi çekmekte ve bu konuda araştırmalar gittikçe artmaktadır (5,6).

Çalışmamızda meme kanseri tanısında eksozomal survivin ekspresyonunun rolü ve diğer prognostik göstergelerle ilişkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Kanseri

2.1.1 Epidemiyoloji

Meme kanseri kadınlarda kanser görülen kanserlerin yaklaşık %25'inin nedenidir. Kanser nedenli ölümlerin ise %15'inin nedenidir. Bununla birlikte mortalite açısından 4 kat, insidens açısından ise 10 kata kadar kuzey amerika ve avrupa gibi insidensin yüksek olduğu bölgelerle asya afrika ülkeleri gibi insidensin düşük olduğu bölgeler arasında fark bulunur (3). Gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde insidensin düşük olmasına rağmen giderek artması batı tarzı beslenme ve yaşam tarzının bu ülkelerde yaygınlaşmasına bağlanabilir (4).

2.1.2 Risk Faktörleri

Meme kanseri için birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bununla birlikte bu risk faktörleri birçok kadın için küçük veya orta derecede meme kanseri için risk artışı oluşturmaktadır. Hastaların en az yarısında yaş ve kadın olmak dışında belirlenebilir risk faktörü bulunmamaktadır.

Meme kanseri insidensi yaşla birlikte artar ve hastaların yaklaşık %85'i 50 yaşından sonra tanı alır (7). Çok genç meme kanserli (≤ 35 yaş) hastalar batı ülkelerinde tüm hastaların %2,7'sini oluşturur (8). Asya ülkelerinde ise bu oran %10-25 arasında bildirilmektedir (9). Ülkemizde bu oran %17 olarak bildirilmektedir (10).

Aile öyküsü uzun süredir bilinen bir risk faktörüdür. Hastaların yalnızca %5-10'unda gerçek bir ailesel yatkınlık olduğu gösterilmiştir. Anne veya kız kardeşinde meme kanseri bulunmasının meme kanseri olma riskini 1,5-3 kat arttırdığı göstermiştir. Bununla birlikte meme kanseri olan yakın sayısı arttıkça bu risk artmaktadır. Belirlenen kalıtsal geçen bir genetik değişiklik bulunmasa bile risk artmaktadır. Aynı çevresel et-

kenlere maruz kalma, benzer yaşam tarzları ve belirlenemeyen genetik değişikliklerin bu duruma yol açabileceği düşünülmektedir.

Meme kanserine eğilim yapan en önemli mutasyonlar BRCA1 ve BRCA2’de görülen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar tüm meme kanserlerinin %5-10’una neden olmaktadır. Otozomal dominant geçiş gösteren bu mutasyonlar değişik derecelerde penetransa sahiptir. Bu mutasyonları taşıyanların yaşam boyu meme kanseri gelişim riski %26-85 arasında değişmektedir. Over kanseri gelişim riskleri ise BRCA1 için %16-63, BRCA2 için %10-27 arasında değişmektedir (11). Chen ve ark. yaptıkları meta-analizde 70 yaşına kadar meme kanseri kümülatif riski BRCA1 taşıyıcıları için %57, BRCA2 taşıyıcıları için %40 olarak tespit etmişlerdir (12).

Meme kanseri riskini arttıran diğer ailesel geçişli genetik değişiklikler tablo 1 de özetlenmiştir.

Tablo 2. 1. Meme kanseri riskini arttıran ailesel geçişli genetik değişiklikler

Gen/Bölge	İlişkili Sendrom ve klinik durumlar	Meme kanseri riski	Mutasyon/alel Frekansı
Yüksek Geçişli Genler			
BRCA1 (17q21)	Herdeiter meme/over kanseri sendromu: bilateral/multifokal meme tümörü, prostat, kolon, karaciğer, kemik tümörleri	%60-85 (yaşam boyu) %15-40 over kanseri	1/400

Gen/Bölge	İlişkili Sendrom ve klinik durumlar	Meme kanseri riski	Mutasyon/alel Frekansı
BRCA2 (13q12.3)	Hereditör meme/over kanseri sendromu: Erkek meme kanseri, safra kesesi, farengial kanser, mide, melanom, prostat kanseri	%60-85 8 (yaşam boyu) %15-40 over kanseri	1/400
TP53 (10q23.3)	Li-Fraumeni Sendromu: Meme kanseri, yumuşak doku sarkomu, santral sinir sistemi tümörleri, adrenokortikal kanser, lösemi, prostat kanseri	%50-89(50 yaşına kadar), %90 yaşam boyu	<1/10.000

Gen/Bölge	İlişkili Sendrom ve klinik durumlar	Meme kanseri riski	Mutasyon/alel Frekansı
PTEN (10q23.3)	Cowden Sendromu: Meme kanseri, hamartom, tiroid kanseri,oral mukoza, endometriyal kanser, beyin tümörü	%25-50 (yaşam boyu)	<1/10.000
CDH1 (16q22.1)	Familiyal diffüz mide kanseri: Lobüler meme kanseri, mide kanseri	RR 6.6	<1/10.000
STK11/LKB1 (19p13.3)	Peutz-Jeghers Sendromu: meme, over, testis, pankreas, serviks, endometriyum, kolon kanseri	%30-50 (yaşam boyu)	<1/10.000
Orta Geçişli Genler			

Gen/Bölge	İlişkili Sendrom ve klinik durumlar	Meme kanseri riski	Mutasyon/alel Frekansı
CHEK2 (22q12.1)	Li-Fraumeni sendromu 2: meme, prostat, kolorektal, beyin tümörleri, sarkomlar	OR 2.6	1/100–200 (Bazı popülasyonlarda)
BRIP1 (17q22)	Meme kanseri aynı zamanda bialelik mutasyonlarında Fanconi anemisine neden olur	RR 2.0	<1/10.000
ATM (11q22.3)	Ataksi Telenjektazi: mem. over, lösemi, lenfoma, mide, pankreas, mesane kanseri	RR 2.37	1/33–333
PALB2 (16p12)	Meme, pankreas, prostat kanseri: aynı zamanda bialelik mutasyonlarında Fanconi anemisine neden olur	RR 2.3	<1/1.000

Gen/Bölge	İlişkili Sendrom ve klinik durumlar	Meme kanseri riski	Mutasyon/alel Frekansı
Düşük Geçişli Genler			
FGFR2 (10q26)	Meme kanseri	OR 1.26	0.38
TOX3 (16q12.1)	Meme kanseri	OR 1.14	0.46
LSP1 (11p15.5)	Meme kanseri	OR 1.06	0.3
TGFB1 (19q13.1)	Meme kanseri	OR 1.07	0.68
MAP3K1 (5q11.2)	Meme kanseri	OR 1.13	0.28

Bazı hastalarda meme kanseri gelişimi ile endojen östrojenler gibi kadın üreme hormonlarıyla ilişki gösterilmiştir (13). Erken menarş, ilk doğumun geç yaşta olması veya hiç doğum yapmamak geç menapoz ile meme kanseri gelişim riskini arttırdığı gösterilmiştir. Postmenapoze kadınlarda plazma östrojen seviyesi ile korele olan obezite ve hormon deplasman tedavisinde meme kanseri gelişim riski ile ilişkilidir (14). Hormonal risk faktörleri meme kanseri gelişiminde rölatif risk oranı 2 ve altındadır.

Gözlemsel çalışmalar yüksek yağ içerikli diyetlerin düşük yağ içerikli diyetlere göre artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Buna karşın 8 prospektif çalışmanın değerlendirildiği Alexander ve ark. meta-analizinde bu ilişki gösterilememiştir (15). Diyet değişikliklerinin değerlendirildiği Women's Health Initiative

alışmasında 48.835 kadın çalışmaya alınmış ve diyet değişikliklerine göre randomize edilmişlerdir. Bu çalışmanın 8 yıllık takibinde diyet değişikliği ile meme kanseri riskinde bir değişiklik gösterilmemiştir (16).

Benign meme hastalıkları proliferatif ve nonproliferatif olarak sınıflandırılmaktadır. Non-proliferatif meme hastalıklarında meme kanseri riski artmaz. Atipisiz proliferatif benign meme meme hastalıklarında ise küçük bir risk artışı (Risk Oranı (RR) 1.5-2) vardır. Atipili proliferatif benign meme meme hastalıklarında risk daha fazladır (RR 4-5) (17). Proliferatif meme hastalıkları kontrol grubuna göre ailesinde meme kanseri öyküsü olanlarda daha fazla görülmektedir (18). Lobular karsinoma insitu (LKİS) benin hastalıklar arasında en yüksek riske sahip lezyondur (RR (-10). Bu risk sadece lezyonun olduğu meme için değil her iki meme içinde artmıştır (19).

Mamografik meme dansitesi de meme kanseri riskini tahmin etmede bir faktördür. Aslında mamografik dansiteyi oluşturan doku komponenti genetik olarak belirlenmektedir. Mamografide>%75 meme dansitesi olanlar>%10 olanlara göre 4,7 kat risk artışı vardır (20).

Çevresel faktörlerde meme kanseri riskini arttırmaktadır. İyonize radyasyona çeşitli nedenlerle (atom bombası sonrası yaşayanlar, sık X-ray filmi çektirenler, meme bölgesine tedavi amaçlı radyoterapi uygulananlar) maruz kalanlarda risk artmaktadır (21). Meme kanseri risk gelişimi ile ilgili faktörler rölatif risk arttırımına göre tablo 2 de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Rölatif risk arttırımına göre meme kanseri risk gelişimi ile ilgili faktörler

Rölatif risk artışı <2	Rölatif risk artışı 2-4	Rölatif risk artışı >4
Erken menarş Geç menapoz	Birinci derece akrabasında meme ca	BRCA1 veya BRCA2 mu- tasyonu
Hiç doğurmamak	CHECK2 mutasyonu	LKİS
Hormon deplasman tedavisi	İlk doğumunu 35 yaş sonrası yapmak	Atipik hiperplazi
Alkol kullanımı	Proliferatif benign meme hastalığı	30 yaşında önce radyasyona maruz kalmak
Postmenapozal obezite	Mamografide artmış meme dansitesi	

2.1.3 Meme kanserinde tarama

Her sekiz kadından biri yaşamlarının bir döneminde meme kanseriyle karşılaşmaktadır (22). Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda önde gelen ölüm nedenidir. Meme kanserinde geçen yıllara göre sağ kalımın daha iyi olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinde daha iyi kemoterapi ve hedefe yönelik tedavileri içeren yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi sağ kalımın iyileştirilmesinde etkilidir. Bununla birlikte nod negatif daha erken dönem hastaların pronozunun nod pozitiflere göre hala daha iyi olduğu gös-

terilmiştir. Meme kanseri taramaları ile daha erken evrede meme kanseri tanı alabilmektedir.

Meme kanseri erken tanısında görüntüleme yöntemleri, meme muayenesi ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Mamografi meme kanseri tarama programlarında en çok kullanılan tarama yöntemidir. Mamografi meme kanseri tarama programlarında 1970'lerden itibaren kullanılmaya başlamıştır. Bu tarihten sonra yapılan çalışmalarda mamografinin meme kanseri ilişkili mortaliteyi %30 azalttığı gösterilmiştir (23). Günümüzde mamografi rutin tarama için birçok sağlık organizasyonu tarafından önerilmektedir. Ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğüne bağlı Kanser Daire Başkanlığı ulusal toplum tabanlı tarama stratejileri çerçevesinde 40-69 yaş arası kadınlara 2 yılda bir mamografi çekimi önermektedir.

Mamografinin taramada sağladığı bu faydalara rağmen bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Mamografinin sensitivitesi %70-80 iken tarama amaçlı kullanılan Mamografinin sensitivitesi yaklaşık %50'dir (24,25). Mamografi ile tespit edilen meme kanserleri daha az saldırgan ve iyi prognozludur. Bu da Mamografi ile tespit edilen hastalar için klinik çalışma sonuçlarında hataya sebep olur. Daha saldırgan tümörler tarama aralıkları dışında tespit edilebilirler (26). Hastalarda yanlış pozitif sonuçlar nedeni ile yapılan tanısal işlemler ve taramanın kendisi anksiyeteye neden olabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda %1-10 oranında önemsiz ve aşırı teşhise neden olduğu gösterilmiştir (27,28).

Meme kanseri taramasında diğer bir görüntüleme yöntemi MRG'dir. Meme MRG bazı durumlarda kullanımı uygundur. Birinci derece yakınında veya kendisinde BRCA mutasyonu taşıyanlar, meme kanseri risk modellerine göre riski %25-30 üzerinde olanlar. Ayrıca 10-30 yaşlar arasında göğüs duvarına radyoterapi uygulanan hastalar içinde kullanılabilir. Düşük orta riskli kadınlarda MRG ile rutin tarama önerilmemek-

tedir (29). Bununla birlikte meme dansitesinin yüksek olduğu durumlarda meme MRG tercih edilebilir.

Meme USG özellikle dens memesi olanlarda tercih edilen bir tarama yöntemidir. USG iyi tolere edilen, diğler yöntemlere göre ucuz ve hastaların radyasyona maruz kalmadıkları bir yöntemdir. Meme USG ile Mamografide negatif tespit edilen 1000 kadından 1,9 ile 4,2 arasında pozitif sonuç elde edilebilmektedir (30). Bununla birlikte çok sayıda yanlış pozitif sonuçta gereksiz biyopsilere yol açabilmektedir (31).

2.1.4 Tanı

Meme kanseri tanısında ince iğne aspirasyon biyopsisi, tru-cut biyopsi, insizyonel biyopsi ve eksizyonel biyopsi kullanılan yöntemlerdir. Klinik muayene ile şüpheli kitle tespit edildiğinde veya Mamografide anormal bulgular tespit edildiğinde hastaya mutlaka biyopsi yapılmalıdır. Perkütan biyopsi cerrahi biyopsilere göre tercih edilmesi gereken bir yöntemdir. Cerrahi biyopsi elle muayene veya görüntüleme yöntemleri kılavuzluğunda peruktan biyopsilerin yapılamadığı durumlarda kullanılmalıdır.

Cilt punch biyopsi meme kanserinin cilt tutulumunda, paget hastalığında veya cilt nükslerine tanı koymada kullanılan bir yöntemdir. İİAB 10 veya 20 mililitrelik enjektör ve 23-27 gauge iğnelerle yapılır. Özellikle lezyon muayene ile ele geliyorsa tanı koymak için hızlı bir yöntemdir. İİAB ultrason eşliğinde de yapılabilmektedir. Özellikle kistlik yapıdaki kitlelerin kist içeriğinin aspire edilerek tanı konulmasına katkıda bulunur. Bununla birlikte in situ kanserle invaziv kanser ayrımının yapılamaması ve yanlış negatif oranının yüksek olması en önemli dezavantajlarıdır (32).

Kalın iğne biyopsisi lokal anestezi ile yapılan işlemlerdir. Vakum yardımcı biyopsi ile daha çok doku volümü elde edilebilir. Daha yüksek doku volümünün daha çok sayıda örnek almadan daha önemli olduğu gösterilmiştir (33). Hem kor biyopsi hem de kalın iğne biyopsisi görüntüleme tetkikleri yardımı ile yapılabilmektedir.

21.5 Histopatoloji

Memenin benign hastalıklarında proliferasyonda artış ile karakterize olanlarda meme kanseri gelişim riski artar. Bu durumlar duktal hiperplazi, papilloma, radyal skar, sklerozan adenozisdir. Atipi ile seyreden atipik duktal veya lobüler hiperplazide de riskde artış olur. Meme kisti, fibroadenomu, kolumnar değişikliklerde ise meme kanseri riskinde artış olmaz.

Meme kanserinin çeşitli tipleri bulunmaktadır. İnvaziv duktal adenokarsinom, invaziv meme kanserlerinin %70-80'ini oluşturur. İnvaziv lobüler karsinom ise invaziv meme kanserlerinin %8'ini oluşturur. Duktal ve lobuler kanserlerin birlikte görüldüğü mikst tip ise yaklaşık %7'sini oluşturur. Diğer nadir görülen tipler müsinöz, metaplastik, tübüler, medüller ve papiller karsinomdur. Meme kanseri moleküler profillemeye göre luminal A, luminal B, HER2-zengin ve basal like alt tiplerinden oluşmaktadır.

2.1.6 Prediktif ve prognostik faktörler

Prediktif faktörler verilen tedaviye alınacak cevabın öngörülmesini, prognostik faktörler ise tanı anında klinik sonuçlar hakkında tahmin yürütülmesini sağlar.

Prognoz bu alandaki moleküler çalışmaların yoğunluğuna rağmen halen temel patoloji sonuçlarına göre belirlenmektedir. Birçok çalışmada aksiller lenf nodu tutulumu, metastaz durumu ve tümör boyutunun en önemli prognostik faktörler olduğu gösterilmiştir. Diğer önemli patolojik prognostik faktörler hormon reseptör durumu, histolojik greyd, tümör tipi, lenfovasküler ve nörovasküler invazyondur.

Ki-67 pozitif hücrelerin yüzdesi hastaların prognozları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Abubakar ve ark. çalışmasında 8088 hasta değerlendirilmiş Ki-67 yüzdesi >%12 olan hastalarda prognoz daha kötü olduğu gösterilmiştir (34).

Diğer bir prognostik belirteç Her-2 ekspresyonudur. C-erb B-2 (Her-2) onkogeni 185 kDa'luk bir transmembran glikoproteini kodlar. Bu glikoproteinin intraselüler tarafında tirozin kinaz aktivitesi vardır. Her-2 epidermal büyüme faktörü ailesindedir. Bu reseptör grubu epidermal ileti yollarının aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. Epidermal yollar epitel hücrelerinin büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar. Her-2 invaziv meme kanserli hastaların yaklaşık %20'sinde over ekspresyonu vardır (35).

2.1.7.Tedavi

Meme kanserinin tedavisini lokal ve sistemik tedaviler olarak iki kısımda incelenebilir. Lokal tedaviler cerrahi ve radyoterapidir. Meme kanserinde cerrahi tedavi primer kitleye yönelik basit mastektomi, modifiye radikal mastektomi ve lumpektomidir. Basit mastektomi primer definitif tedavi olarak nadiren kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda lumpektomi ve RT ile modifiye radikal mastektomi karşılaştırıldığında sağ kalım açısından fark olmadığı gösterilmiştir (36).

Bekçi nodülü biyopsisi klinik olarak lenf nodu tutulumu tespit edilmediğinde veya şüpheli nodlardan yapılan biyopsi negatif geldiğinde uygulanmaktadır. Aksiller lenf nodu diseksiyonu ikiden fazla bekçi nodülü pozitifliğinde, klinik palpabl lenf nodu varlığında veya lenf nodu biyopsi pozitifliğinde önerilmektedir. Bekçi nodülü örneklemesinde 1-2 lenf nodu pozitifliğinde aksiller lenf nodu diseksiyonunun sağkalıma etkisi gösterilmemiştir (37).

Lokal tedavi olarak radyoterapi meme koruyucu cerrahi dışında 4 veya daha fazla aksiller lenf nodu tutulumunda, tümör çapı 5 cm üzerinde ve cerrahi sınır pozitifliğinde önerilmektedir. Hormon reseptör pozitif lenf nodu negatif 70 yaş üzeri hastalarda meme koruyucu cerrahi sonrası sağ kalıma etkisi gösterilmemiştir (38).

Definitif tedavilerden sonra adjuvan sistemik tedavi planı çok önemlidir. Sistemik tedavinin yararını değerlendiren pek çok çalışma yapılmıştır. Hormonal tedavi, kemoterapi ve Her-2'yi hedefleyen tedaviler ve bunların kombinasyonu meme kanseri sağ kalımında anlamlı bir etki yaratmaktadır (39).

Hormonal tedavi östrojen veya progesteron reseptörü pozitif olan tüm hastalara verilmelidir. Verilme sırası kemoterapi veya radyoterapilerden sonradır. Her-2'yi hedefleyen tedavilerle kombine kullanılabilir.

Her-2'yi hedefleyen tedaviler neoadjuvan (lokal tedavi öncesi) veya adjuvan kullanılabilir. Tümör çapı 0,5 cm üzeri tümörlerde kullanılır. kemoterapi, radyoterapi veya hormonal tedavilerle kombine kullanılabilir. Triple negatif hastalık ER, PR ve Her-2 negatif durumu ifade etmektedir. Bu hastalarda rekürrens oranı yüksektir (40).

2.2 Eksozomlar

Hücre dışı veziküllerin varlığını gösteren ilk çalışma 1946'da yapılmasına rağmen, 1977'de De Broe, bu “membran fragmanlarının” yayılabilir hücrelerin her yerde bulunan bir özelliği olduğunu açıkladı (41). 1980'lere kadar, bu “fragmanlar”, genellikle, doğrudan plazma zarından tomurcuklanan, trombosit “toz” veya hücrel enkaz olarak kabul edildi (42). Daha sonra iki bağımsız grup, hücre içi bir kökene sahip veziküllerin bir alt tipinin varlığını gösterdi. Endozom kaynaklı vezikülleri izole eden ilk araştırmacı Rose Johnstone, bunlara eksozom demeyi önerdi (43).

Ekstrasellüler veziküller (EV) ekstrasellüler aralığa salgılanan bütün membran veziküllerini ifade eden bir terminolojidir (44). Ektozom, dökülen veziküller, mikroveziküller ve mikropartikül terimleri direkt olarak plazma membranından köken alan genellikle 150-1000 nm boyutundaki vezikülleri kapsarken, eksozom terimi daha küçük veziküllere karşılık gelir ki bunlar intrasellüler olarak oluşmuş, plazma membranı

ile füzyon yaparak ekstrasellüler aralığa boşalan 30-100 nm boyutundaki multiveziküler cisimciklerdir (MVBs) (45).

EV'lerin salınımı ökaryotlar ve bakteriler dahil pek çok canlıda gerçekleşen bir süreçtir. EV'ler konak patojen ilişkilerinde, virulans faktörleri ve toksinlerin çevre dokuya salınımında önemli rol oynar (46).

Hayvanlarda ise protein salınımı, immünite, infeksiyonlar, sinyal yolları, kanser gibi pek çok süreçte rol oynar. Kan, idrar, tükürük, amniyon sıvısı, malign asit, bronkoalveoler lavaj sıvısı, sinovyum ve süt gibi pek çok vücut sıvısında saptanırlar. EV'lerin başta Parkinson, Alzheimer, Multiple Skleroz (MS), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), inme, prion hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere pek çok patolojik durumla ilişkisi araştırılmıştır. Vücut sıvılarında kolay saptanmaları nedeniyle hastalık biyobelirteç olarak da potansiyel kullanımları ilgi çekmiştir (47).

2.2.1 Eksozom içeriği

Eksozom içeriği ilgili veri bankası oluşturmak amacıyla EVpedia ve Vesiclepedia gibi veri depoları oluşturulmuştur. Vesiclepedia'da 41 farklı türde 538 çalışmadan oluşan 92,897 protein, 27,642 Mesajcı RNA (mRNA) , 4934 mikroRNA (miRNA) ve 584 lipid kaydı bulunmaktadır (21 Eylül 2015, <http://www.microvesicles.org/>). Bu içerikle ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Ocak 2019'da bu sayı 341 farklı türde 51,254 çalışmadan oluşan 349,988 protein, 27,646 mRNA, 10,520 miRNA ve 639 lipid çeşidine ulaşmıştır (48). Buradan EV'lerin ne kadar geniş ve heterojen molekül grupları olduğu ve bu konuda yapılan çalışmaların yoğunluğu anlaşılabılır (49).

Eksozoların içeriğine bakıldığında Tetraspaninlerden oldukça zengin olduğu görülmüştür. Bunun yanında sifingomyelin, kolesterol, seramid gibi lipidlerden de zengindir (50).

2.2.3 Eksozomal RNA'lar

Eksozomlar ve EV'lerin hem kısa hem uzun Ribo Nükleik Asit (RNA) zincirleri içerdği saptanmıştır. Embriyonik kök hücrelerden sekrete edilen eksozomlar pluripotent transkripsiyon faktörlerinden oluşan mRNA'lardan [Örneğin: octamer-binding transcription factor 4 (Oct-4), Zinc finger protein 42 homolog (Zfp-42), Homeobox protein NANOG (Nanog), Endothelial transcription factor GATA-2 (GATA2), Homeobox protein Hox-B4 (HoxB4)], sitokinlerden ve reseptörlerden zengindir (51). İlaveten, eksozomal mRNA'lar fonksiyoneldir ve hedef hücrede protein translasyonunu gerçekleştirirler (52). Böylece immün yanıt, pluripotensite, kanser, viral enfeksiyonlar, angiogenez ve diğer süreçlerde rol oynarlar (53).

Eksozomal mRNA'lar yanında miRNA'lar da fonksiyoneldir ve hedef hücre genlerini sessizleştirebilirler. Bu miRNA'ların da immün yanıt, viral enfeksiyonlar ve endotel hücre göçü, prometastatik immün yanıt ve T hücre supresyonundaki rolleri gösterilmiştir (54). mRNA ve miRNA'lara ilaveten viral RNA, tRNA, Y-RNA, small nuclear RNA, small nucleolar RNA, piwi-interacting RNA ve long non-coding RNA gibi diğer RNA türleri de eksozomlarda gözlenmiştir (55,56).

2.2.4 Eksozomal DNA

Genomik Deoksiribo Nükleik asit (DNA) da eksozomlarda saptanmıştır. Genomik DNA'nın eksozomal salını mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır (57). Mitoz esnasında salındığı yönünde bir görüş vardır. Glioblastom, kolon ve mide kanseri gibi tümör hücre kültürlerinden elde edilen eksozomlarda genomik DNA saptanmıştır. Bu hücrelerden salınan eksozomlardaki DNA çift iplikli olup mutasyonlu ya da amplifiye onkogenler gibi genellikle spesifik bir fraksiyonu temsil eder. Bu nedenle eksozomal DNA'ları mutasyonların dolaşımında saptanacağı biyo belirteç olarak kullanabilme olasılığı araştırılmaktadır (58).

2.2.5 Eksozomal proteinler

Kütle spektrometri ile eksozom ve EV'lerin içeriği ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmalar EV/eksozom proteomunun iki önemli özelliğini göstermiştir. İlk olarak bazı proteinler hücre tipinden bağımsız olarak neredeyse tüm eksozomlarda bulunurken bazı proteinler hücre tipine özgüdür. İkinci olarak eksozomların protein içeriği parental hücrenin proteomunu tam olarak yansıtmaz, bunun yerine normalde plazma membranında, endozomal kompartmanda ya da sitozolde bulunan spesifik proteinlerin zenginleştirilmiş, nükleer proteinler gibi diğerlerinin de azalmış hali gibidir (59).

Eksozomlarda sıklıkla bulunan proteinler tetraspaninlerlerdir (örneğin; CD9, CD63, CD81 heat shock proteins (Hsp90), ve TSG101 ve ALIX gibi endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) komponentleri) (60). Ancak pek çok çalışma eksozomal proteinlerin uniform olarak dağılmadıklarına işaret etmiştir. Örneğin insan kolon kanserinde apikal ve bazolateral membranlardan salınan eksozomlar farklı protein profillerine sahiptir (61). Bu morfolojik olarak homojen görünümdeki eksozomların bile içeriklerinin ne kadar heterojen olduğunun bir göstergesidir.

2.2.6 Eksozomal içeriğin değişimi

Hücrelerin ekstrasellüler değişikliklere karşı eksozomların içeriklerini düzenlediğine yönelik kanıtlar vardır. Isı değişimleri, hipoksi, oksidatif stres gibi durumlar eksozomların protein ve genetik materyal içeriğinde önemli değişikliklere yol açar (62). Benzer durum viral enfeksiyonlar ve prion hastalıklarında da geçerlidir (63). Bu görüş doğrultusunda, intrasellüler sinyal yollarının aktivasyonu ile eksozom profilinin değiştiği düşünülmektedir (64). Nöral kök hücrelerin IFN- γ maruziyeti sonrası EV ve eksozom içerisindeki Stat1 yolağı komponentlerini mRNA ve protein seviyesinde

upregule etmektedir. Böylece hedef hücrelerdeki Stat1 yolları EV'lerdeki IFN- γ /Ifngr1 kompleksi mediatörlüğünde aktive olmaktadır (65).

EV/eksozomal içeriğin eksternal stimulasyona duyarlı olduğunun anlaşılması sonrası bu moleküler mekanizmaları aydınlatmak aktif çalışma alanlarından biri haline gelmiştir.

2.2.7 RNA ve protein sekresyonunun mekanizması

2.2.7.1 miRNA sekresyon mekanizması

Kosaka ve arkadaşları eksozomlara miRNA sekresyonunu regüle eden ilk yolları tanımladı (66). Seramid sfingolipidinin eksozomal miRNA sekresyonunda rol oynadığı ve bu miRNA'ların hedef hücrede fonksiyonel oldukları gösterildi. Aynı zamanda seramid seviyelerindeki değişimin eksozomal miRNA miktarını etkilediğini de gösterdiler. Daha detaylandırmak gerekirse seramid biyosentezinde anahtar bir enzim olan neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)'nin kimyasal inhibisyonu ile eksozomal miRNA seviyelerinin düştüğünü, over ekspresyonu ile arttığını gösterdiler. Bununla birlikte miRNA sekresyonunu kontrol eden ana moleküler faktörler halen belirsizdir.

Sonraki çalışmalar eksozomlardaki miRNA profilinin parental hücrenin transkripsiyonel manzarasını yansıtmayan sıkıca denetlenen bir sürecin sonucu olduğunu gösterdi.

Beltri ve ark. hareketli bir nükleotid motifinin miRNA'larda mevcut olduğunu ve T lenfoblast kökenli eksozomlardaki lokalizasyonlarını kontrol ettiğini gösterdi (67). Sekrete edilen miRNA'lar 4 nükleotidlik GGAG motifinden zengindi. Bu motifin miRNA'ların eksozomlara geçişini modüle ettiğini kanıtladılar.

Squadrito ve arkadaşları BMDM mekanizmanın araştırılması için hücre modeli olarak kullandılar (68). BMDM'nin IL-4 ile stimulasyonu bir grup miRNA'nın eksozomlarda artışına yol açtı. IL-4 ile stimule edilen BMDM'lerde hedef mRNA'sı

azalan miRNA'lar eksozomlarda arttı, total sellüler miRNA seviyesi ise değişmedi. İlginç olarak bu bulgular eksozomal miRNA sekresyonunun hücrelerin miRNA: mRNA homeostazını korudukları bir temizleme mekanizması olduğu iddiasını desteklemektedir.

Koppers-Lalic ve arkadaşları insan B hücrelerinde bir başka muhtemel sekresyon mekanizmasını tanımlamışlardır (69). Çalışmalarına göre ekstrasellüler miRNA dağılımı kısmen nontemplated/sonlandırmayan nucleotide terminal additions (NTAs) olarak bilinen nucleotidyl transferase-aracılı posttranskripsiyonel modifikasyonlar ile regüle edilmektedir. Eksozomal miRNA'lar üridile 3' uçlarından zengindir. Hücre içindeki miRNA'lar ise adenile 3' uçlarına sahiptir. Adenin eklendikçe miRNA'lar daha çok muhafaza edilmektedir. Bu çalışma taşıyıcı proteinler, RNA düzenleyen enzimler gibi hücre içi pek çok yolağın miRNA'ların sekresyonuna nasıl etki ettikleri yönünde yeni soruların ortaya çıkmasına yol açmıştır.

Melo ve arkadaşları, meme kanser hücreleri kökenli eksozomlarda miRNA'ların hücre bağımsız maturasyonları hakkında miRNA eksozomal sekresyonu fenomeninin kompleksitesini daha da artıran tamamen yeni bir mekanizma tanımlamışlardır (70). İlk olarak kanser hücrelerinde eksozomlardaki miRNA'ların normal hücreler kıyasla arttığını gösterdiler. Ardından zamanla pre-miRNA seviyelerinin matür sekanslardaki artışa paralel olarak azalmasıyla miRNA biyogenezinin eksozomlarda aktif olduğunu kanıtladılar. Önemli olarak miRNA biyogenezindeki bir kısım komponentler (örneğin Dicer, TAR RNA-binding protein 2 ve Argonaute 2) normal hücrelerdekinin aksine kanser eksozomlarında aktiftir. Dicer kanser eksozomlarının onkogenik potansiyelinde anahtar role sahiptir. Aynı zamanda bu çalışmada bulgularını kanser hastalarının serum eksozomlarında veziküllerin Dicer endoribonüklezının aktif formunu içerdikleri ve Dicer'in tümör formasyonu için gerekli olduğunu göstererek desteklediler. İlginç olarak Dicer ile transmembran çapa proteinlerinden sialoforin (CD43) arasında CD43'ün Di-

cer'in transportunda ve böylece miRNA'ların eksozomlara salınımında rolü olabileceğini düşündüren bir ilişki de gösterdiler.

2.2.7.2 mRNA Sekresyon Mekanizmaları

Eksozomlar donör hücrelere kıyasla, miRNA'lara ek olarak, aynı zamanda mRNA ve proteinlerin de selektif olarak zenginleşmiş olduğu bulunmuştur. Batagov ve arkadaşları, eksozomca zenginleştirilmiş RNAların, hücrel RNA'dan daha kısa bir yarılanma ömrüne sahip olma eğilimi olduğunu bulmuşlardır (71). Ayrıca, 1458 bp'lik lineer motiflerin RNA sekresyon fraksiyonu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (eksozomal vs selüler RNA oranı). Bu motiflerin hiçbirisi ayrı ayrı eksozomal RNA'ların %24'ünden fazla bulunmamasına rağmen, sonuç multiple motiflerin kombinasyonun veya bu motifler tarafından paylaşılan korunmuş ikincil yapıların kombinasyonu RNA'ların ekzomlara hareketini düşündürüyor.

Bölükbaşı ve arkadaşları EV'ce-zengin RNA'nın 3'-UTR'sinde 25 nt stem-loop sap-ilmik) formu tanımlamışlardır (72). Ayrıca bu stem-loop'un miR-1289 için bir bağlama bölgesi içerdiğini ve stem-loop'unda 3'-UTR taşıyan RNA'ların, miRNA overekspresyonuyla EV'ce zenginleştiğini göstermişlerdir.

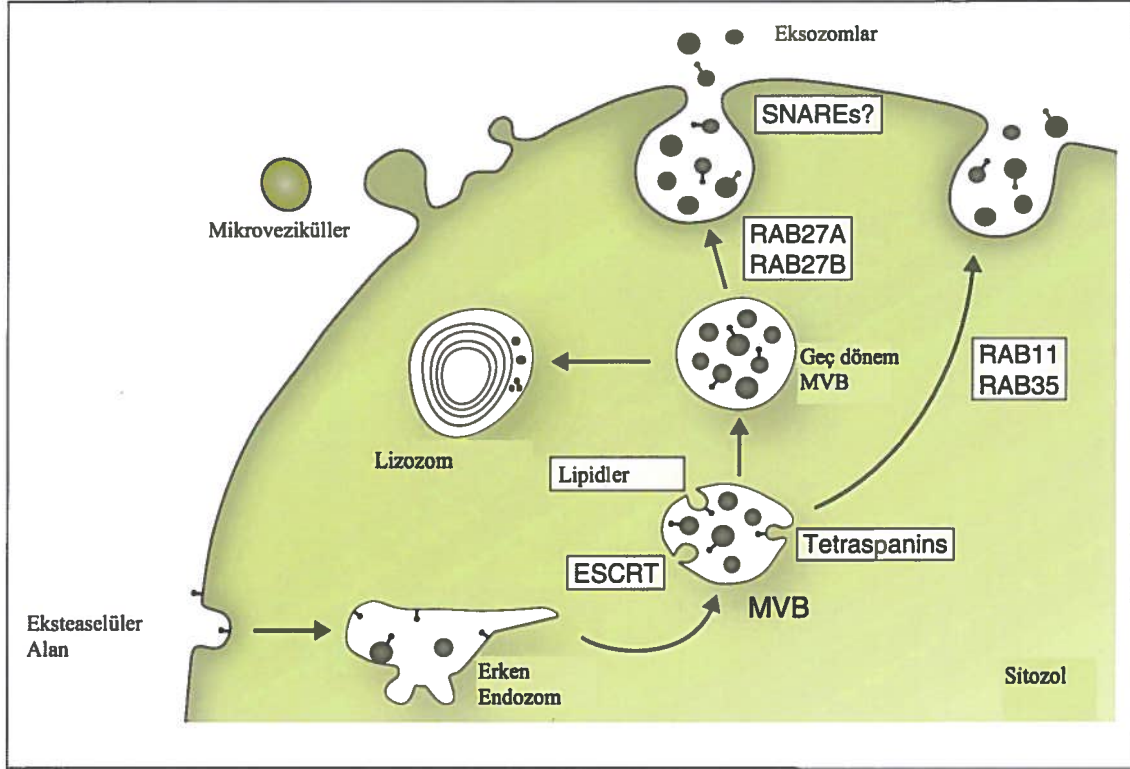
Tüm bu çalışmalar kısa RNA motiflerini tanıyıp EV/ekzomal RNA transportunu yöneten bir mekanizma olduğunu işaret etmektedir.

2.2.7.3 Protein Sekresyon Mekanizması

mRNA ve miRNA'lara ek olarak proteinlerin de EV'larda selektif olarak bulunduğu yine de bu sürecin arkasındaki mekanizmanın karakteri hala bilinmemektedir. Ortak görüş en az üç bağımsız mekanizma eksozomal proteinlerin oluşumundan sorumludur: lipid-aracılı, tetraspanins-aracılı ve ESCRT- aracılı (şekil 2.1) (73). Bu mekanizmaların birlikte çalıştığı ve farklı proteinlerin sentezi ve/veya farklı vezikül alt tiplerine yüklenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. ESCRT kompleksinin

multiple komponenti ubiquitin bağlama aktivitesine sahip olması protein ubiquinasyonun eksozomal protein sıralanmasında posttranslasyonel modifikasyon olabileceğini düşündürmektedir (74). Bu hipotezi destekler nitelikte, ubiquitin protein ligaz NEDD4 HTLV-1 gag proteini ubiquitinler yönetir. Benzer şekilde yakın zamanda bulunan, post translational modifikasyon olan hnRPA2B1 'in sumoylasyonu miRNAya başlı proteini hedeflemektedir (75). Bu da sumoylasyonun daha protein sıralamasında genel bir rol oynayabileceğini düşündürür. ESCRT'ye ek olarak tetraspaninler eksozom formasyonu ve eksozomal proteinlerin sıralaması süreçlerinin ikisinde de yer alırlar. Tetraspaninler integral membran protein ailesinin üyesi olup, 4 adet, eksozomlardan zengin, transmembran domaini vardır.

ESCRT ve membran proteinlerine ilave olarak, aynı zamanda lipidler eksozom salgılama ve yük proteinlerinin sıralamasında rol alırlar (76). Örneğin sfingolipitleri metabolize eden enzimlerin eksozom sekresyonu nöronlar tarafından, amyloid-B-peptid temizlenmesi mikroglialar tarafından modüle edilir.



Şekil 2.1 Eksozom biyogenez ve sekresyonu (50 nolu kaynaktan alınmıştır)

Bu ve tüm diğer veriler lipid-regüle protein trafiği hipotezini destekler ama spesifik veziküler sınıfların yapım ve sekresyonu ile veziküler içeriği modifiye edip etmedikleri veya eksozomlardaki spesifik proteinlerin birleşmelerine doğrudan aracılık edip etmedikleri tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır.

2.2.8 Eksozomların Normal Fizyolojideki Rolü

EV'lerin fonksiyonlarına yönelik ilk çalışmalar, 5'nükleotidaz aktivitesine sahip normal ve neoplastik hücre dizelerindeki eksfoliyat veziküllerin tanınmasıyla 1980'lerin başlarında yapılmıştır (77). Daha sonra Stegmayr ve Ronquist prostat ve sperm hücreleri arasında fonksiyonel etkileşimi sağlayan prostazom adını verdikleri ve sperm motilitesine etkili bir eksozom tanımlamışlardır (78). Son yıllardaki çalışmalar pek çok hücre tipinin hem in vivo hem de in vitro ortamda ekstraselüler eksozom salma kapasitesinde olduğunu göstermiştir (79).

B-hücre kökenli eksozomların özellikle insan tonsilinden elde edilen folliküler dendritik hücrelerin (DCs) membranlarıyla etkileşmekte olması in vivo aktif sekresyonlarını desteklemektedir (80). DCs kaynaklı eksozomların peptid MHC-I, MHC-II ve T-hücre kostimültatör molekülleri (CD80/B7.1 ve CD86/B7.2 gibi) taşıdığı gösterilmiştir (81). B hücrelerinde olduğu gibi bu eksozomlar diğer DCs, CD4 T lenfosit, CD8 T lenfositlere MHC-antijen kompleksi yayılımıyla immün yanıtı uyarabilmekte yani aktivasyonlarını yönetebilmektedirler (82).

Transmembran proteinlere ek olarak diğer fonksiyonel moleküller de immün hücre kaynaklı eksozomlarda tespit edilmiştir. Montecalvo ve ark. DCs maturasyon aşamasına bağlı olarak DCs arasında farklı miRNA alt gruplarının değiş tokuş edebileceğini göstermişlerdir (83). Önemli olarak, yazarlar eksozomal miRNAların duyarlı hücrelerdeki hedef sekansları baskılayabilme kabiliyetlerini koruduğunu ve bu tahmin edilen hedeflerin farklılaşma, sitokin sentezi ve TGF sinyalini kapsayan DCs biyolojisi için çok kritik mRNAlar olduğunu göstermişlerdir.

Mittelbrunn ve ark. immün sinaps (IS) mikroçevresinde eksozomal miRNAların T hücrelerden antijen sunan hücrelere (APC) tek yönlü taşıma yaptığını göstermişlerdir (84). IS'lar antijen sunumu ve T hücre aktivasyonun regülasyonunda kritik öneme sahip oldukça özelleşmiş hücre-hücre kontakt alanlarıdır. Bu bağlamda, antijen bağlanması IS formasyonunu uyarır ve T hücre MVB'in APC'lere doğru polarizasyonu ile sonuçlanır. Bunun sonucunda, eksozom sekresyonunun artması sonunda antijen yönetimindeki IS formasyonu eksozomal miRNA'nın APCs'e taşınmasını destekler. Dahası, sadece IS yapısındaki transfer edilen eksozomlar hedef APCs'de fonksiyonel olabilmektedir. Bu konseptin kanıtı olarak T hücre kökenli eksozomal miR-335 duyarlı APCs'de Sox4 mRNA hedefi olduğu gösterildi bu da eksozomal miRNA'nın immün cevap regülasyonunda rolü olduğunu düşündürmektedir.

BMDMs Mycobacterium tuberculosis (Mtb) veya diğer mycobacterilerle enfekte olduğunda MTB-kökenli glikopeptidolipitleri (GPLs) içeren eksozom salgırlarlar (85). Eksozomla ilişkili GPLs, enfekte olmamış duyarlı makrofajlarda TNF-a ve CCL5/RANTES (doğal inflamatuvar aktivasyonun iki anahtar yönlendiricisi) sekresyonunu teşvik ederler. Bu pro-inflamatuvar yanıt, hedef makrofajlardaki TLR2 VE TLR4 ile bunların ilişki olduğu adaptör molekül myeloid diferansiasyon primer yanıt geni (MyD88) etkileşimine bağlıdır. MAPK ve NF-κB bu fenomende yer alan anahtar yollardır.

Farelere intranazal enjeksiyon ile bu enfekte BMDM kökenli eksozomlar, in vivo TNF-a ve IL-12 üretimini indükleyebilirler (86). Bu sitokinlerin sekresyonu farelerin akciğerlerindeki hem nötrofilleri hem de makrofajları aktive hale getirebilirler. Farelerde BMDM kökenli eksozomlar aynı zamanda doğal proinflamatuvar yanıtın diğer bir anahtar yöneticisi olan IL-1β iletimini de sağlayabilir. Qu ve ark. ekstrasellüler ATP'nin IL-1β ilişkili eksozomal sekresyonu için tetikleyici olduğunu ve P2X7R'in ATPnin bu etkisindeki rolünü ortaya çıkarmışlardır (86).

Ramachandra ve ark. enfekte BMDM'den salınan eksozomların immun yanıt aktivasyonunda farklı bir mekanizmasını tanımlamışlardır (87). ATP bağımlı bir sürecin sonunda, B hücrelerinde ve APCs'de tariflendiği gibi Mtb enfekte BMDM eksozomlarının da Majör doku uygunluk kompleksi (MHC) II kompleksi transferiyle hedef T hücreleri aktive edebilmektedir. Bu çalışmalar birlikte ele alındığında makrofaj kökenli eksozomların antimikrobiyal immun korumada aktif bir rolü olduğu sonucuna varılabilir.

EVs aynı zamanda şunların da mediatörlüğünü yapmaktadır: T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer- NK) hücrelerde immunsuppresif etki ve immun yanıtı inhibe etmek için Treg ve myeloid hücrelerin indüksiyonu (88,89).

Fetusa immüntolerans gelişiminde immunsupresif moleküller taşıyan hamilelerde plasenta kaynaklı eksozomların rolü gösterilmiştir. Eksozomlar, term doğum yapan gebelerde erken doğum yapanlara kıyasla daha fazla bu immunsupresif molekül taşımaktadır. FasL, T cell yüzey glikoproteini DC3 zeta zinciri ve JAK3 inhibisyonundan sorumlu temel ajandır ve sonuç olarak maternal sitotoksik T lenfositleri ve NK hücrelerinin aktivasyonunu baskılamaktadır. Hedlund ve ark. ULBPs ve NKG2D(NK RESEP.AKT. ligandı) ilişkili eksozomların da aynı etkiyi yarattığı göstermişlerdir (90). Plasental eksozomlar ULBP1-5 taşıyarak ve NK CD8+ and $\gamma\delta$ T lenfositlerde NKG2D reseptör down regülasyonunu indükleyerek in vitro olarak sitotoksik aktivitelerini inhibe ederler.

Eksosomlar aynı zamanda immun sistem için stimülandır. Bu özellik donör ve hedef hücrelerin karakteri gibi pek çok şeye bağlıdır. Bu ikilem aynı zamanda epitelde de görülür. Van Niel ve ark. insan intestinal epitelini kullanarak, bu hücrelerin antijen sunumuna katılan MHC-I ve MHC-II gibi aksesuar molekülleri içeren eksozom salınımı yaptığını; INF-g tedavisi sonrası eksozom sekresyonun daha arttığını göstermişlerdir (91). Bu da bu fenomenin inflamatuvar süreçlerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Prado ve ark. alerjen tolerize farelerin bronkoalveolar sıvısı kaynaklı eksozomların alıcı farelere intranazal enjekte edildiğinde sırayla tolerizasyonu uyarma yeteneğine sahip olduğunu gösterdi (92). Eksozom yönetiminden sonra, yazarlar tedavi edilen farelerde paralel TGF beta artışı ile Th2 benzeri sitokinlerinin azalması ile birlikte spesifik IgE ve IgG1 antikorunun inhibisyonu göstermişlerdir. Bu deneylerin nihai sonucu tolerojenik içerik kaynaklı eksozomların allerjen indüklemiş hava yolu inflamasyonunu azaltma yeteneğine sahip olduğunu ve aynı zamanda alerjik duyarlılığa karşı stabil korumayı indüklediğini kanıtlamıştır.

Eksozomların ek fonksiyonu, viral enfeksiyon bağlamında rolü ile ilişkisi tanımlanmıştır. De Carvalho ve ark, CD4+ T hücreleri kaynaklı eksozomların in vitro HIV-1'i inhibe ettiğini göstermiştir (93). Bu da eksozomların yüzey proteinlerine bağlanarak ve hedef hücrelerle bağlantısını önleyerek virüs için yem reseptör olarak davranabileceğini düşündürmektedir.

2.2.9 Eksozomlar ve kanser

Ekstraselüler veziküllerin sadece sitozol ve membran kalıntısı proteinleri taşımadığı immün sistem modülasyonu, immün sistem ve kanser hücrelerinin etkileşiminde rolü olduğu gösterilmiştir (94,95). Eksozomlar hücre proteinleri de dahil olmak üzere sinyal molekülleri taşıyan hücre proteinleri olmayan iletişim servisleri olarak çalışırlar (96).

Eksozomlar üretildiği hücrelerden salındıktan sonra bitişik dokuların ekstraselüler ortamı vasıtasıyla uzaysal ve zamansal gradyanlar oluşturarak, morfogenez, büyüme, farklılaşma ve yetişkin doku homeostazını düzenlemek üzere çeşitli kargo proteinleri ve genetik bilgi taşırlar. Son on yılda, eksozomlar bu eşsiz rolleri nedeni ile dünya genelinde büyük ilgi çekmiştir. Özellikle kanser progresyonu sürecindeki rolleri ilgi çekicidir.

Eksozomlar hücre kültürü ortamı ve kan, plazma, serum, idrar, bronş sıvısı, plevral efüzyon, eklem sıvısı, göz sıvısı, beyin omurilik sıvısı, anne sütü gibi saf ve tükürük gibi birçok vücut sıvısında izole edilmiştir (97,98). Bu nedenle elde edilmeleri kolaydır. Bu özellik eksozomların kanserin erken tanısında kullanılabilecek bir biyobelirteç olmasını gündeme getirmiştir.

Günümüzde eksozomların karakterizasyonu ağırlıklı olarak üç yöntemle yapılmaktadır: doğrudan görüntüleme, boyut dağılımı analizi ve eksozomal marker analizi.

Eksozomlar -80 °C'de muhafaza edilmelidir. Ancak, çözülme ve donma bu eksozom bütünlüğü için kötü olduğu bundan kaçınılmalıdır (99).

Eksozomlar ve virüsler benzer boyut, yoğunluk, kompozisyonları nedeni ile yakın akraba olarak kabul edilir. Günümüzde, eksozom montajı ve salgısını kontrol eden en iyi sinyal yolları daha önce virüslerde benzer bir rol oynadığı kanıtlanmış yollarıdır (100).

İntraluminal vezikülleri oluşumda rolü olan ESCRT dört kompleks halinde bulunmaktadır. İntraluminal veziküller sonrasında MVB'yi oluşturular bu nedenle erken dönem eksozom olarak kabul edilirler. Rab Gtpaz ailesi eksozomların transporu ve plazma membranı ile birleşmesinde primer regülatör olarak görev yapmaktadır (101). SNAREs iki membran arasındaki birleşmeye aracılık etmektedirler bu nedenle eksozomların hücreden salınımında rollerinin olabileceği öne sürülmüştür (102).

Tümörler stroma ve malignant hücrelerden oluşur (103). Stroma içinde, tümör hücrelerinin büyüme amacıyla kullandığı besin sağlayıcı kan damarları bulunur. Bu damarlanma, bağışıklık veya enflamatuvar hücrelerin tümör içine girmesine ve tümörün karmaşıklığının artmasını sağlar (104). Aynı zamanda stroma, protein ve lif tellerinin oluşturduğu ekstraselüler matriksi oluşturan yapısal elementleri içerir. Tümör mikro çevresi (TME), aynı zamanda kemokin, sitokin, oksijen ve diğer kimyasallar gibi dokunun asitliğini veya alkaliliğini değiştiren maddeler içerir. Bu TME maddelerine ek olarak, tümör hücreleri ve çevredeki hücreler arasındaki çapraz iletişim, tümör ilerlemesine katkıda bulunur (105).

Normalden iyi huyluya, iyi huyludan kötü huyluya, kötü huyludan metastatiğe olan değişim hem hücre içi hem de hücre dışı değişimler sayesinde gerçekleşir (106). Hücre içi, hücreler arası ve uzak hücre etkileşimleri; çekirdek zarı ve hücre zarından biyolojik materyallerinin sürekli trafiğiyle sağlanır. Fakat, TME içindeki tümör hücresi

iletişimlerinin ne çıkan mekanizmalarından biri de eksozomlardır. Eksozomlar, çeşitli hücre dışı sinyallerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Eksozomlar hem normal hem de patolojik hücresel süreçlerin gerçekleştiği hücre dışı hücre zarı veziklleridir (107).

Eksozom içinde veya membranında olan bazı proteinlerin varlığı, eksozomun hücrelerarası iletişimdeki rolüne işaret edebilir. Aynı zamanda, tümör hücrelerinin klinik olarak saptamadığı, erken bir zamanda yakalanıp yakalanmayacağını, daha etkili bir tedavinin başlanıp başlanamayacağıyla ilgili bir mekanizma da sağlayabilirler.

TME'deki değişimlerin eksozom salınımında bir etkisi olabilir. Artan kanıtlar eksozomların biyo aktivitesinin kanser tedavisinde klinik olarak uygulanabilirliğini göstermektedir. İçinden çıktıkları hücre tipinden bağımsız olarak, bu zara bağlı veziküller hücre dışında korunmuş ve kontrollü bir mikro evre oluşturmaktadır. Bu sayede, alıcı hücreden uzakta, üreten hücrenin dışında metabolik süreçler gerçekleşebilmektedir (108).

Hendrix ve ark. matrix metalloproteinazlarının ve heat shock proteini 90'nın metastatik kanser hücrelerinden eksozomal salınımının hücre dışı matrisi (ECM)'de değişiklikler oluşturarak ve growth factor tepkilerini değiştirerek istilacı hücre davranışını kontrol ettiği göstermişlerdir (109). Benzer olarak sağlıklı hücrelerdeki prokoagülan eksozomlar tümör başlangıcını, istilasını ve dağılımını; hücre dışından pıhtılaşma kaskadını ve hücre içinden coagulation-dependent growth signaling olayını başlatarak sağlar (110).

B ve T lenfositleri, dendritik hücreler, nöronlar, bağırsak epitel hücreleri ve tümör hücrelerinin hepsi eksozom salgılar (111). İnsandaki tümör hücrelerinin TEX (Tümör Hücresi Kaynaklı Eksozomlar)'i salgıladığı gösterilmiştir. Buna ek olarak TEX'in üstünde ve içinde bulunan protein içeriği hem TEX'in yapısal ve biyolojik

rolünün hem de kaynak hücrelerinin belirteçidir; bu da TEX ve içeriğini muhteşem biyobelirteçler veya kötü huylu durumları anlamak için araçlar haline getirir (112).

Kanser hastalarından alınan serum örneklerinde yüksek miktarda TEX'e rastlanmıştır ve bu içeriğin tümör ilerlemesiyle olumlu bir bağlantısı olduğu gözlemlenmiştir. Farklı kanser hücrelerinden salgılanan TEX'ler farklı tümör antijenleri üretirler. In vitro çalışmalara göre, meme kanseri hücrelerinden salgılanan TEX HER2'yi, bağırsak kanseri hücrelerinden salgılanan TEX CEA'yı ve melanoma hücrelerinden salgılanan TEX'ler MelanA/Mart-1 ve gp100'ü içermektedir (113). Kanser hastalarından alınan plasma örneklerinden elde edilen eksozomlar, tümör türüne göre tümör antijenleri salgılamada benzer özellikler göstermişlerdir (114).

Al-Nedawi ve ark. Glioma hücrelerinde epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin onkojenik varyantı olan EGFRvIII'in glioma hücrelerinden eksozomlar yolu ile diğer glial hücreler taşındığı göstermişlerdir (115). Taşınan bu genetik bilgi ile EGFRvIII'ün regüle ettiği Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), Bcl-x(L), p27 protein düzeylerinin değiştiğini saptamışlardır.

2.3 Survivin

Survivin bir apoptoz inhibitör (IAP) protein ailesi üyesidir. Hücre ölümünün baskılanmasında, mitoz düzenlemelerinde, hücre bölünmesinde kontrol noktalarında ve uygun olmayan ortamlara uyum sağlamada görev alır (116,117).

2.3.1 Survivin ve kanser

Survivin'in kanser hücrelerindeki anormal yüksek protein ekspresyonu ve aynı anda pek çok normal dokudaki düşük ekspresyonu, Survivin'i önemli bir anti-kanser hedefi haline getirir. Diğer IAP proteinlerinin aksine, Survivin'in apoptotik kaskattaki pozisyon ve rolü henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır. Pek çok IAP proteininin ağırlıklı olarak sitozolik olmasına ve kaspaz bağlanma ve engellenmesinde rolleri

olmasına karşın, Survivin çekirdekte, sitozolde, mitokondride ve en güncel olarak hücre dışında bulunmuştur (118,119). Bağışıklık sistemi devre dışı bırakılmış hayvanlardaki mitokondriyal rolleri arasında tümör büyümesi ve in vivoda tümör hücresi apoptozunu ortadan kaldırmak bulunurken, hücre dışı formunun kanser hücrelerine tekrar girerek çoğalmayı, apoptoz direncini ve istilayı artırıcı rolü olduğu gösterilmiştir (120).

Aynı zamanda Survivin'in hücre içi Hsp60 ve Hsp90 proteinleri ile doğrudan etkileşime girdiği saptanmıştır (121,122). Survivin'in HSP'lerle olan hem hücre içi hem de hücre dışı etkileşimi; tümör mikro çevresinde gerçekleşen hücresel stres tepkileriyle, apoptozla ve hücre çoğalmasıyla olan bağlantısının altını çizmektedir.

Survivin mRNA'sı, fetal dokularda ve insan tümörlerinin çoğunda selektif olarak ve fazla miktarda eksprese edilir, ancak nadiren normal diferansiye dokularda bulunur [5]. Birçok çalışmada artmış survivin ekspresyonunun ilerlemiş hastalık, sık tekrarlama, kısa süreli sağ kalım ve tedaviye karşı direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [5,6], bu nedenle meme kanseri dahil birçok tümörün tanısında ve prognozunda ideal bir tümör belirteci olabilir [7,8].

2.3.2. Survivin ve meme kanseri

Li ve ark. evre 1-3 meme kanserli hastalarda immünohistokimyasal yöntemle survivin ekspresyonunu araştırmışlardır (123). Bu çalışmada nükleer survivin ekspresyonunun sitoplazmik ekspresyona göre prognozla daha fazla ilişkisi olduğunu göstermişler ve survivinin iyi bir prognostik belirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Hamy ve ark. neoadjuvan tedaviye yanıt vermeyen hastalarda Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak survivin ekspresyonunu araştırmışlardır (124). Survivin ekspresyonunun bu hastalarda neoadjuvan tedaviye yanıtızsızlık ile korele olduğunu saptamışlar ve survivinin prognostik bir belirteç ve bir tedavi hedefi olarak önermişlerdir. Küçük interferans

RNA'sı (siRNA) yüklü kitosan manyetik nanopartiküller ile survivin ekspresyonunun susturulduğu hücrelerin sitotoksik tedaviye duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (125). Buda survivini bir tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir.

Meme kanseri hala kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınlarda kanser nedeni ölümlerinin% 14'ini oluşturmaktadır. Son yıllarda, meme kanseri mortaliteleri azalmasına rağmen, insidansı hala artmaktadır (126). Meme kanseri insidensindeki bu artışa karşın tedavideki gelişmeler nedeni ile meme kanserine bağlı ölüm oranı düşmektedir (127). Bu nedenle erken tanı kapsamlı bir kanser kontrol programının önemli bir bileşeni olmalıdır.

Meme kanseri erken tanısında sağlık farkındalığının geliştirilmesi ve düzenli kendi kendine muayene, periyodik mamografi muayeneleri, ultrasonografi ve doku biyopsisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bunların hala birçok dezavantajları vardır. Örneğin, küçük tümörler gözden kaçabilir. Bu nedenle, tümör aktivitesini izlemek için kolay, hassas, doğru ve non-invaziv bir yol bulmak acilen gerekmektedir. Meme kanseri erken tanısında kullanılan araçların yetersizliği yeni tanısal metod arayışını gündeme getirmiştir (128). Bu çalışmada meme kanserli hastaların tanısında eksozomal survivinin tanısal rolü araştırılmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Giriş

Son yıllarda eksozomlar ve diğer ekstrasellüler moleküller tarafından taşınan RNA ve diğer moleküllerin önemi ilgi çekmektedir. Bu moleküller, dolaşan biyolojik moleküllerin saptanmasında anahtar rol oynayabilirler. Bugüne kadar, RNA izolasyonu için eksozomların saflaştırılmasına yönelik yöntemler ultrasantrifüjün kullanılması nedeniyle zaman alıcı olmuştur ve tutarsız sonuçlar meydana gelmiştir. System Biosciences firmasının ExoQuick kiti ile ultrasantrifüj kullanılmadan eksozom izolasyonu serum, plazma veya asit sıvısından yapılabilmektedir. Elektron mikroskopi çalışmalarında, ExoQuick ile izole edilen eksozomların ultrasantrifüjleme kullanılarak izole edilen eksozomlara benzer olduğu gösterilmiştir. Bu eksozomların ayrıca birçok çalışmada fonksiyonel olarak aktif olduğu saptanmıştır (129-131).

3.2 Hasta seçimi ve örneklerin elde edilmesi

Bu araştırma için, Gaziantep Üniversitesi Tıp fakültesi Etik kurulu'ndan, 11.01.2016 tarih ve 2016/16 nolu kararıyla onay alınmış ve Helsinki Deklarasyon Kuralları'na uygun olarak çalışılmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalar, çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve yazılı onayları alınmıştır.

Medicalpark Gaziantep Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniğinde 2014-2017 yılları arasında tanısı histopatolojik olarak tanısı doğrulanmış invaziv duktal meme kanseri tanısı ile takip edilen hastalar ve sağlıklı gönüllüler çalışmaya alındı. Hasta dosyaları taranarak yaş, cinsiyet, rutin laboratuvar testleri gibi bilgiler retrospektif olarak elde edildi. Yaşı 18 ve altında olan meme kanserli hastalar ve yeterli karaciğer ve böbrek rezervi olmayan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastalardan birinci basamak sistemik kemoterapinin başlamasından hemen önce rutin kontroller için alınan kan örneklerinden kalan kan numuneleri, prospektif olarak

toplandı. Örneklerin elde edilmesinden sonraki 1 saat içinde 1.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen serumlar mikrotüplere bölündü ve hemen -80 °C'de donduruldu.

3.3 Eksozomların İzolasyonu

İlk olarak -80°C'de saklanan serumlar ilk olarak buzda çözülür. Hücre ve parçacıklarının çöktürülmesi için 3000xg'de 15 dakika santrifüj yapılır. Santrifüjden sonra, uygun hacimde supernatant steril bir tüpe aktarılır. 250 µl seruma 63 µl ExoQuick eksozom çöktürme solüsyonu eklendi. Solüsyonun seruma karışımı için invert yapılır ve 30 dakika +4°C'de inkubasyona bırakılır. Bu aşamada tüpler, solüsyonun tüpün dibine yönelmesi için hareket ettirilmedi. Inkubasyon bitiminde 1500xg'de 30 dakika santrifüj yapılır. Bu süreç oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Santrifüj sonunda görünen pellet yapısı eksozom içermektedir. Supernatant atılır ve 1500xg'de 5 dakika santrifüj ile çeperde kalan kısımlarda çöktürülür. Bütün sıvı tabaka pellete zarar vermeden atılır. Bir sonraki aşama için 300 µl 1X PBS içinde çözülür.

3.4 Eksozomların membran bütünlüğünün bozulması ve Eksozomal survivin ölçümü

Eksozom membran bütünlüğü 300 µl mix üzerine 100 µl ELISA inhibitörü içermeyen Liziz buffer (GF-1, Vivantis, Malaysia) ilave edilerek bozuldu. Standart, 2.000 pg/mL - 1.000 pg/mL - 500 pg/mL - 250 pg/mL - 125 pg/mL - 62,5 pg/mL - 31,2 pg/mL olmak üzere stok standardın seyreltilmesi ile hazırlandı.

Bütün standartlar 100 µl olarak ve bir blank uygun kuyucuklara yerleştirildi. (1-8 kuyucuklar). Ve diğer kuyucuklara 100 µl örnekler eklendi. Plate üstü kapatılıp (Plate sealer ile) 37°C'de 1 saat inkubasyona bırakılır. Inkubasyondan sonra plate yıkanmadan içindeki sıvı boşaltılır. Her bir kuyucuğa 100 µl Detection Reagent A eklendi. (Hazırlanışı: Konsantre solüsyon olarak gelen Detection Reagent A 1:100 seyreltilir). 37°C'de 1 saat inkubasyona bırakılır.

İnkubasyondan sonra, solüsyon aspire (uzaklaştırılma) edildi ve 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkama yapıp iki dakika beklendi ve bütün sıvı boşaltıldı. Yıkama işlemi toplamda 3 defa gerçekleştirildi. Son yıkamadan sonra kuyucuklardaki yıkama solüsyonu aspire(uzaklaştırılma) edildi. (Yıkama solüsyon hazırlanışı: 20 mL Konsantre olarak gelen solüsyon 580 mL ddH₂O ile seyreltildi) Yıkamadan sonra, 100 µl Detection Reagent B her bir kuyucuğa eklendi. (Detection Reagent B, Detection Reagent A ile aynı şekilde hazırlandı.) ve 37°C’de 30 dakika inkubasyona bırakıldı. Yıkama işlemi daha önce yapıldığı gibi toplamda 5 defa olacak şekilde gerçekleştirildi.

Yıkamadan sonra 90 µl Substrate solüsyonu her bir kuyucuğa eklenir. Plate yeni bir sealer ile kapatıldı ve 37°C’de 15 dakika inkubasyona bırakıldı. Sıvı içerik bu aşamada mavi rengini alır. Bu aşamada plate’in ışık görmemesi sağlandı. İnkubasyondan sonra, 50 µl Stop solüsyonu eklendi. Bu aşamada içerik sarı rengini alır. Sarı renk olmayan kuyucuklar için plate kenarına sarsılması için hafifçe vurulur. Plate altında herhangi bir parmak izi, kabarcık veya su damlası olmadığına dikkat edilerek 450 nm’de microplate reader ile ölçüm yapıldı.

Total lökosit (WBC), lenfosit sayısı, nötrofil sayısı, hemoglobin (Hb), trombosit sayısı (PLT) gibi hematolojik parametreler Sysmex marka XT-1800i model cihaz ile ölçülmüştür. Hastaların alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), kan üre azotu (BUN) ve kreatin (CRE) gibi parametrelerin konsantrasyonlarının ölçümleri Roche marka Cobas C501 model otoanalizörde ticari kitler kullanılarak yapılmıştır.

CA 15-3, serum düzeyleri elektrokemilüminesan yöntemi ile değerlendirilmiştir (Hitachi E170 otomatik analizörü, Roche, Basel, İsviçre). CA 15-3’ün 30 U/mL altındaki serum düzeyleri normal değerler olarak kabul edilmiştir.

3.5 İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler SPSS for Windows 15.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histiyogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Kolmogorov-Smirnov testinde p değerinin 0.05'in üzerinde olduğu durumlar normal dağılım olarak kabul edildi.

Hasta ve kontrol grubunda ölçülen eksozomal Survivin değerlerini normal dağılım göstermediğinden, hasta ve kontrol grubu Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Veriler normal dağılmadığında ikiden fazla grup karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı.

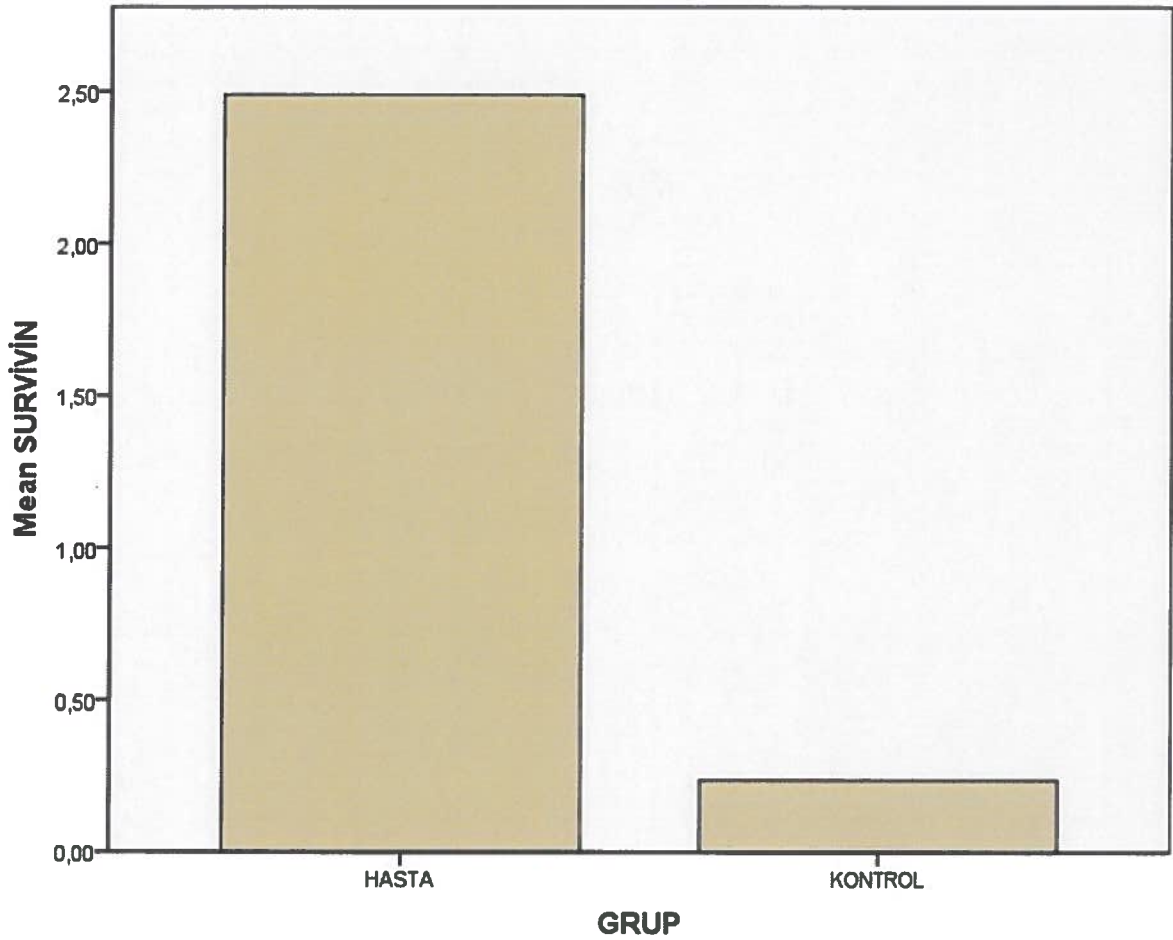
4.BULGULAR

Çalışmaya 55'i hasta 20'si sağlıklı gönüllü olmak üzere toplam 75 katılımcı alındı. Hasta ve kontrol grubunun tümü kadın idi. Hastaların ortalama yaşı 53.1 ± 10.6 (Range 28-76) idi. Hastaların laboratuvar değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak Tablo 3.1' de gösterilmektedir.

Tablo 3.1 Hastaların genel özellikleri.

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Medyan
YAŞ (yıl)	53.1 ± 10.6	52
BUN (mg/dL)	11.8 ± 5.5	11
CRE (mg/dL)	0.67 ± 0.15	0.64
AST (U/L)	19.8 ± 10.7	18
ALT (U/L)	20.2 ± 10.2	18
LDH (U/L)	171.8 ± 47.8	161
ALBUMİN (gr/dL)	3.8 ± 0.4	4
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	8.47 ± 2.58	8.65
NÖTROFİL ($10^3/\text{mm}^3$)	5.34 ± 2.0	5.18
LENFOSİT ($10^3/\text{mm}^3$)	2.35 ± 0.87	2.4
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	291.3 ± 85.7	490
Hb (g/dL)	12.5 ± 1.4	13
CA 15.3 (U/mL)	21.9 ± 8.7	21

Hasta kontrol grubu arasında eksozomal survivin düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0.047$). Hasta grubunda eksozomal survivin düzeyi 2.48 ± 6.38 ng/mL (Range 0-40.452) iken kontrol grubunda 0.23 ± 0.52 ng/mL (Range 0-2.4) idi (Şekil 1).



Şekil 4.1. Hasta kontrol grupları arasındaki eksozomal Survivin düzeyleri

Hastaların 11'inde (%20) komorbid hastalık öyküsü vardı. En sık görülen hastalıklar Tip 2 Diyabetes Mellitus 2 hastada, esansiyel hipertansiyon 3 hastada, 3 hastada bu iki hastalık beraber idi. Bütün hastaların ECOG performans skoru 0 olarak saptandı.

Hastalarda en sık kullanılan tanısal yöntem olarak 39 (%70) tru-cut biyopsi idi. İnsizyonel biyopsi 6 (%10.9), eksizyonel biyopsi 9, ince iğne aspirasyon biyopsisi ise 1

hastada tanısal yöntem olarak kullanıldığı saptandı. Hastaların 50'sine (% 90,9) cerrahi uygulandı. En sık kullanılan cerrahi yöntem 39 (%78) hastaya uygulanan modifiye radikal mastektomi ve aksiller lenf nodu diseksiyonu idi. Lumpektomi 11 (22) ve aksiller direksiyon ise bu hastaların 10'una uygulandı. Bekçi nodülü örnekleme yapılan sadece bir hasta vardı.

İnvaziv duktal adenokanser 52 (%94,5) hastada müsinöz mikst adenokanser 3 (%5,5) hastada görülen alt tipler idi.

Tümör hücrelerinin değerlendirmesinde 3 (%5,5) Grad I, 17 (%60) Grad II, 33 (%60) Grad III histoloji grade tespit edildi. Histolojik grade ile exoSurvuvun arasında istatistiksel ilişki saptanmadı ($p=0.969$).

Lenfovasküler invazyon (LVI) bilgisine 50 hastada ulaşılabilirdi. Değerlendirilen hastaların 26'sında (%52) LVI saptanırken 24'ünde (%48) saptanmadı. LVI ile exoSurvuvun arasında istatistiksel ilişki saptanmadı ($p=0.969$).

Perinöral invazyon (PNI) bilgisine 50 hastada ulaşılabilirdi. Değerlendirilen hastaların 21'inde (%42) PNI saptanırken 29'unda (%58) saptanmadı. PNI ile exoSurvuvun arasında istatistiksel ilişki saptanmadı ($p=0.806$).

Cilt tutulumu hastaların 5'inde (%9,1), kas tutulumu ise 2 (%3,6) hastada saptandı. İnvaziv adenokanser yanında 9 (%164) hastada insitd kanser komponentide tespit edildi.

Hastalar T evresine göre değerlendirildiğinde hastaların 7'si (%12,7) T1, 28'i (%50,9) T2, 15'i (%27,3) T3, 3'ü (%5,5) T4 idi. T evresi bilgisi 2 (%3.6) hastada elde edilemedi. T evresi ile eksozomal survivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.969$)

Lenf nodu tutulumuna göre hastalar değerlendirildiğinde hastaların 13'ünde (%23,6) N1, 9'unda (%16,4) N2, 6'sında (%10,9) N3 lenf nodu tutulumu saptanırken 25'inde (%12,7) lenf nodu tutulumu saptanmadı. Lenf nodu tutulumu bilgisi 2 (%3,6) hastada elde edilemedi. Lenf nodu tutulumu ile eksozomal survivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.788$)

Hastaların 7'sinde (%12,7) metastaz saptanırken 48'inde (%87,3) metastaz saptanmadı. Hastaların 3'ünde yalnızca kemik metastazı, 2'sinde akciğer ve kemik metastazı, birinde karaciğer ve kemik metastazı, bir hastada yalnızca karaciğer metastazı saptandı. Hastalığın metastaz yapması ile eksozomal survivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.242$).

Hastalar hastalık evresine göre değerlendirildiğinde hastaların 5'i (%9,1) evre 1, 26'sı (%47,3) evre 2, 17'si (%30,9) evre 3, 7'si (%9,1) evre 4 idi. Hastalığın evresi ile exoSurvivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.175$).

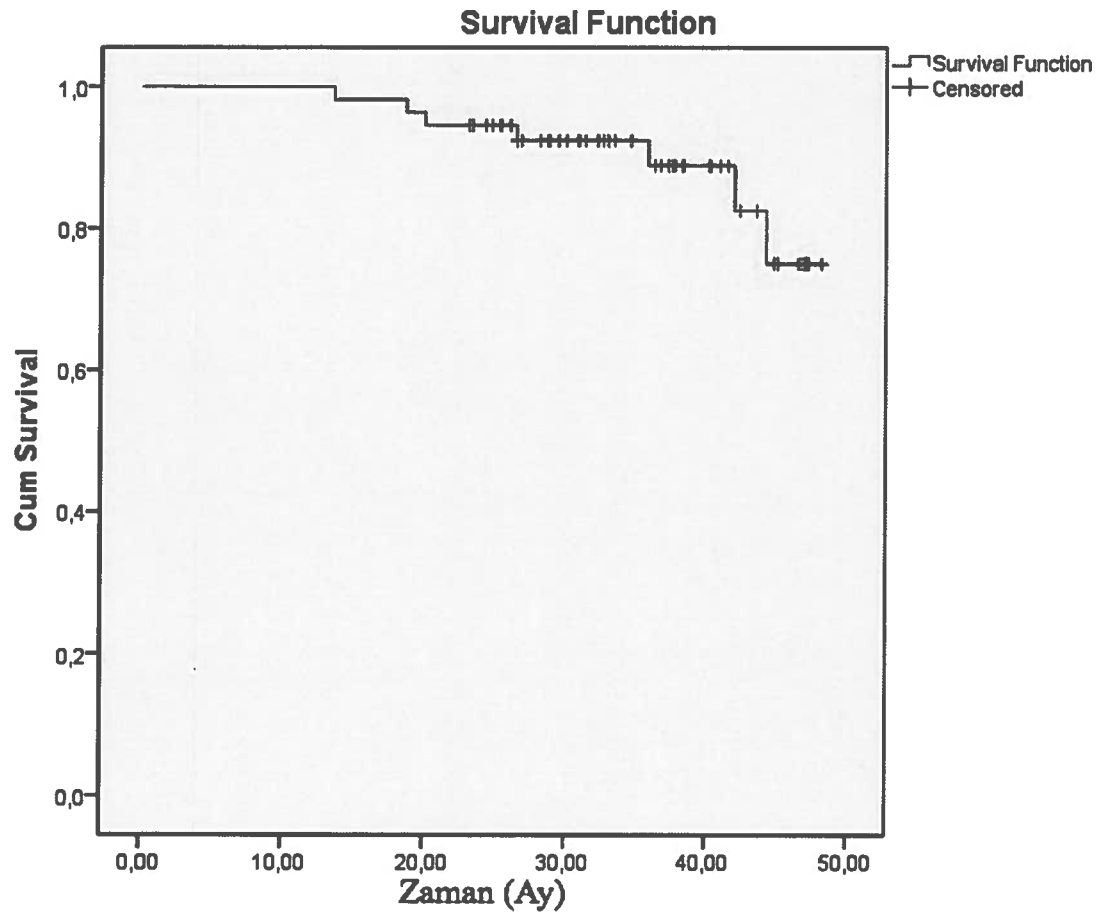
Hastaların 40'ında (%72,7) östrojen reseptörü pozitif, 15'inde (%27,3) negatif idi. Östrojen reseptör durumu ile exoSurvivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.546$). Hastaların 37'sinde (%72,7) progesteron reseptörü pozitif, 18'inde (%27,3) negatif idi. Progesteron reseptör durumu ile exoSurvivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.246$).

Hastaların 26'sı premenapozal, 28'i postmenopozal dönemde idi. Menopoz durumu ile eksozomal survivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.727$).

Her-2 reseptörü Floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve immünohistokimyal birlikte değerlendirildiğinde 18 (%32,7) hastada pozitif, 37 (%67,3) hastada negatif olarak değerlendirildi. Her-2 ile eksozomal survivin arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı ($p=0.695$).

Hastaların aldığı kemoterapi bilgisine 54 hastada ulaşılabildi. Bu hastaların 52'sine kemoterapi uygulandı. Hastaların 43'ü (%82,7) adjuvan, 2'si (%3,8) neoadjuvan, 7'si (%13,5) palyatif amaçlı kemoterapi aldı. En sık kullanılan tedavi rejimi 39 (%75) hastada kullanılan 4 kür doksorubisin siklofosfamid kombinasyonu sonrası haftalık paklitaksel kombinasyon kemoterapisi idi.

Hastaların ortalama takip süreleri 34.4 ± 8.7 (Range 13.6-48.2) ay idi. Sağkalım analizinde medyan sağkalıma ulaşamadı. Hastaların ortalama sağkalımları 44.9 ± 1.16 (%95 Güvenirlik Aralığı 42.6-47.2) ay olarak tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 4.2. Ortalama sağ kalım eğrisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda meme kanserinin çeşitli evrelerindeki hastalarda eksozomal survivin düzeyinin sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubundan daha yüksek olduğunu saptadık. Survivin'in kanserli dokulardaki yüksek protein ekspresyonu ve pek çok normal dokudaki düşük eksprese olması Survivin'i önemli bir antikanser hedefi haline getirir. Diğer IAP proteinlerinin aksine, Survivin'in apoptotik kaskattaki pozisyon ve rolü henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır. Pek çok IAP proteininin ağırlıklı olarak sitozolik olmasına ve kaspaz bağlanma ve engellenmesinde rolleri olmasına karşın, Survivin çekirdekte, sitozolde, mitokondride ve hücre dışında bulunmuştur (132,133).

Survivinin hücre içi formun mitokondri ile ilişkili rolü olduğu aynı zamanda Hsp60 ve Hsp90 ile iletişimi olduğu gösterilmiştir (134-136). HSP'ler protein katlanmasının kararlılığı için gereklidir. Çoklu protein kompleksi oluşumu, organel içi protein gelgiti ve protein yıkımında rolleri vardır. HSP'lerin kanser gelişimi ve sitoproteksiyonda rolü olduğuna dair kanıt bulunmuştur (137). Bunlara ek olarak yeni yapılan araştırmalar tümör hücrelerinin HSP'leri yüzeylerinde bulundurduğunu ve hatta salgıladıklarını göstermiştir (138).

Survivinin hücre dışı formunun kanser hücrelerine tekrar girerek çoğalmayı, apoptoza karşı direnci ve invazyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir (139). Hem hücre içi hem de hücre dışı Survivin'in HSP'lerle olan hem etkileşimi; tümör mikroçevresinde gerçekleşen hücresel stres yanıtı, apoptozla ve hücre çoğalmasıyla olan bağlantısının önemini gösterir. Son yıllarda giderek artan eksozom çalışmaları, bağışıklık yanıtını ve/veya apoptozu başlatmada önem taşıyan moleküllerin de dahil olduğu, eksozomlarla bağlantılı pek çok protein olduğunu ortaya çıkarmıştır (140,141).

Collin ve ark. Evre 1-3 me kanserli hastalarda survivin ekspresyonunu immühistokimyasal yöntemle araştırmışlardır (142). ER pozitif ve tamoksifen kullanan grupta %43 nükleer survvin pozitifliği, %52 sitoplazmik survivin pozitifliği saptamışlardır. ER negatif ve tamoksifen kullanmayan grupta %40 nükleer survvin pozitifliği, %52 sitoplazmik survivin pozitifliği tespit etmişlerdir. Survivin ekspresyonu ile prognoz arasında ilişki gösterememişlerdir.

Günaldı ve ark. meme kanserli hastaların %49,3'ünü oluşturan bir kanser hastası popülasyonunda hastaların serum örneklerinden ELISA yöntemi ile ölçülen survivin düzeylerini sağlıklı kontrol ile karşılaştırmışlardır (143). Çalışmalarında 120.8 pg/ml üzerindeki değerlerin 4.198 kat artmış kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Survivin ekspresyonu prekanseröz lezyonlarda da araştırılmıştır. Chade ve ark. yüksek gradlı Duktal Karsinoma In Situ (DCIS) lezyonlarında düşük gradlı DCIS lezyolarına göre daha çok survvin ekspresyonunu göstermişlerdir (144). Bu çalışmada immühistokimyasal yöntem kullanılmıştır.

Adamkov ve ark. meme fibroadenom ve invaziv adenokarsinom hastalarında immünhistokimyasal yöntemle survivin ekspresyonunu araştırmışlardır (145). Bu çalışmada karsinom hastalarında %69,9 ve fibroadenom hastalarında %60,5 survivin ekspresyonu saptamışlardır. Grad arttıkça survivinin nükleer birikiminin arttığını göstermişlerdir. Burdan yola çıkarak survivinin nükleer birikiminin proliferatif fenotiple ilişkili olduğu ve kötü prognostik bir belirteç olduğunu öne sürmüşlerdir.

Khan ve ark. HeLa servikal kanser hücre kültürü kullanarak kanser hücrelerinde survivinin hangi yolla salındığını araştırmışlardır (146). Survivinin Hsp70 gibi hem eksozomların içinde hemde eksozomların üstünde taşındıklarını göstermişlerdir. Çalışmalarında Survivin eksozomların içinde üretildiğini saptamışlardır. HeLa hücrelerinde hem bazal hem de proton ışınımının neden olduğu stresli ortamda Survivin salgılanma-

sına katkıda bulunduğunu göstermişlerdir. Proton ışınımının eksozom salgılanma oranında hiçbir etkisi olmamasına rağmen, ışınım maruz kalmış hücrelerde eksozomal Survivin içeriği artmış. Bununla birlikte, elde ettikleri verilerin Survivin'in hücre dışı ortama salgılanmasının nedeninde ortak hücre salı yolağının bir rolü olmadığını öne sürmüşlerdir.

Kanser hücrelerinin uzak metastazına eksozomların katkısı olabilir. Metastaz primer bölgeden tümör hücrelerinin ayrılmasını ve uzak organlara göç ederek sekonder lezyonlar geliştirdikleri çok aşamalı bir süreçtir. Birçok basamağı içeren bu olayda ön metastatik nişlerin oluşumu ve bunun için kemik iliği kaynaklı kök hücre alt grubunun indüklenmesi önemli bir basamaktır (147-150).

Modern tedavilerin gelişimi, cerrahi, kemoterapi ve radyasyon terapisi kanser yönetiminin temel taşları olmaya devam etmesine rağmen maalesef etkinlikleri çoğunlukla lokal kontrol ile sınırlıdır. Tümör metastaz yapması durumunda, hayatta kalma oranları dramatik olarak düşmektedir. Metastatik hastalık kanser hastalarında tüm morbidite ve mortalitelerin %95'inden sorumludur (151-153).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, tümör hücrelerinin tümör mikro-ortamını oluşturan birkaç yolak vasıtası ile normal hücreler ile ECM fonksiyonlarını değiştirdikleri gösterilmiştir (154,155). Bu süreçte, büyüme faktörleri, sitokinler, proteinler ve birlikte bir "tümör nişi" oluşturan, tümörün çoğalmasını ve difüzyonunu kolaylaştıran metabolitler gibi mediatörlerin salınımını görev alır. Bu arabulucular arasında, hücre dışı veziküllerin, özellikle de eksozomlar olarak adlandırılan nanoveziküllerin salınması, yakın zamanda tümörün nişi ve tümör yayılması içinde alternatif bir çerçeve olarak tanımlanmıştır (156).

Özellikle, tümör hücreleri, metastatik bir niş oluşumuna elverişli bir ortam oluşturmak üzere uzaktaki hücreleri şartlandırarak metastatik süreci hızlandırmak için

eksozom aracılı iletişimi saptama kapasitesini göstermiştir (157,158). Bu nedenlerden dolayı, EV'ler ve özellikle eksozomlar, kanser teşhisi, evrelemesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve tedavi için potansiyel araçlar olarak ideal bir aracı temsil eder (159). EV'lerin en yenilikçi uygulaması, evreleme amaçları için kullanılması ve kanser hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla en yüksek EV seviyelerini dikkate alarak tedaviye yanıtı izlemektir (160,161). Son olarak, eksozomlar ilk metastatik odakları vurmak için antikanser ajanlarla yüklenebilir, bu nedenle mevcut kemoterapi ve biyolojik terapi protokolleri ile elde edilenden daha yüksek bir özgüllük ve etkinlik elde edilebilir (162-164).

Wang ve ark. meme kanseri hastalarının periferik kanlarındaki survivin ve VEGF mRNA'larının qRT-PCR ölçülmesinin klinik önemini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, meme kanseri tanısı için survivin'in duyarlılığı ve özgüllüğü % 83.72 ve % 64'ü, VEGF'nin duyarlılığı ve özgüllüğü % 93.02 ve % 88 olarak saptamışlardır. Ayrıca, survivin ve VEGF mRNA seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (165). Bu çalışmada meme kanserinde prognostik faktör olduğu bilinen klinikopatolojik faktörlerle Survivin mRNA düzeyleri arasında ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde eksozomal survivin düzeyi ile prognostik faktör olduğu bilinen klinikopatolojik faktörler arasında ilişki saptanmadı.

Xu ve ark. formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş tümör dokularında survivin mRNA'sı düzeylerinin bilinen klinikopatolojik faktörlerle ilişkisini incelemişler (166). Çalışmalarında yüksek Survivin mRNA düzeyinin kötü prognostik bir faktör olduğunu göstermişlerdir. Yie ve ark. meme kanserli hastaların periferik kanlarında Survivin mRNA'sını ölçtükleri çalışmalarında kötü prognostik bir faktör olduğunu saptamışlardır (167).

Survivin düzeylerinin prognostik bir faktörlerle ilişkisi olmadığını gösteren çalışmalarda vardır. Güney ve ark. nodal tutulum haricinde analiz edilen klinik parametrelerin hiçbirinin, serum survivin konsantrasyonları ile anlamlı korelasyonu olmadığını bildirmiştir (168). Shen ChangXin ve ark. survivin mRNA ile tümör boyutu ve histolojik grade arasında korelasyon bulunmadığını ortaya koymuştur (169).

Göksel ve ark. adjuvan kemoterapi öncesi erken evre meme kanseri hastalarından ELISA yöntemi ile Survivin düzeyini değerlendirmişler (170). Çalışmalarında sağlıklı kontrollerle meme kanseri hastaları arasında fark bulamamışlar. Survivin düzeyinin yaş ve diğer histopatolojik parametrelerle ilişkisini saptamamışlardır.

Wang ve ark. tam kandaki survivin mRNA düzeylerinin meme kanserinin erken teşhisi için bir potansiyele sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Wang ve ark. çalışmasında 15 hastaya ELISA yöntemi ile survivin bakılmış ve sadece 2 örnekte pozitif bulunmuştur. Kullandıkları yöntemin yani survivin mRNA'sı ölçmenin daha duyarlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda ise eksozomal survivin hastaların sadece ikisinde ölçülemeyecek düzeyde idi. Bu da bizim kullandığımız yöntemin daha doğru olduğunu göstermektedir.

Kreger ve ark. paklitaksel uygulanan meme kanseri hücre serisinin survivinden zengin eksozom salgıladığını göstermişlerdir (171). Salgılanan survivinin paklitaksele dirence neden olduğunu saptamışlar. Meme kanseri tedavisinde kullanılan paklitaksele karşı gelişen dirençte eksozomal survivinin katkısının olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Siddharth ve ark. meme kanseri hücre kültürü çalışmalarında meme kanseri metastatik sürecin farklı aşamalarında survivinin rolü olduğunu göstermişlerdir (172). Survivin delesyonu ile invazyonun inhibe olduğunu saptamışlardır.

Survivin üretimi embriyonik ve fetal gelişimde görülür fakat tam olarak farklılaşmış dokuda görülmez (173). Neredeyse bütün insan kanserlerinde ekspresyonu

gösterilmiştir, bu da Survivini karsinogenez çalışmalarında çekici bir protein yapar (174). Çalışmamızdaki hasta ve kontrol sayısının az olmasından tek merkezden yapılmış olması nedeni ile eksozomal survivin için bir cut-of değeri belirleyemedik. Daha çok hasta ve çok merkezli yapılacak çalışmalarla eksozomal survivin için bir cut-of değeri belirlenebilir. Çalışmamızda tam kandan elde edilen serum örneklerindeki eksozomlardaki survivin ölçüldü. Oysaki eksozomların tükürük, ter, idrar gibi vücut sıvılarında da bulunduğu bilinmektedir. Bu sıvılar kan örneklerine göre daha az invaziv yolla elde edilebilecek örnekleridir. Bunlarla yapılacak çalışmalar meme kanserinin erken tanısı için hızlı yöntemler olabilir.

SONUÇ

Survivinin uygun olmayan klinikopatolojik parametrelerle olan ilgisiyle uyumlu olarak, tümör mikroçevresi içerisinde Survivin trafiği tümörün agresif yapıya gelmesini tetiklemeden potansiyel olarak sorumlu olabilir; bu da tedavileri engeller veya etkilerini minimuma indirir. Bu yüzden, Survivin karşıtı bir antibody kullanılarak yapılan tümör tedavisi, bağışıklık kompleksleri oluşturarak Survivini hücre dışı olarak nötrleyebilir.

Meme kanseri moleküler patogenezi ile ilgili bilgilerimiz gün geçtikçe artmaktadır. Bu yeni bilgilerin hastaların tanı ve tedavisinde kullanılabilmesi için yeni metotlar geliştirilmelidir. Hastalara erken dönemde tanı koymak, hangi hastaların neoadjuvan veya adjuvan tedaviden fayda göreceğini belirlemek ve hasta bazında rekürrens riskinin belirlenmesi bu hastaların sağ kalımını arttıracak önemli faktörlerdir. Bu konuda eksozomal survivin ile ilgili yeni çalışmaların faydalı olabileceğini düşünüyoruz.

6.KAYNAKLAR

- 1.Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin. 2018;68(1):7-30.
- 2.American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2017.
- 3.Srivastava, A. Moxley, K. Ruskin, R. Dhanasekaran, DN, Zhao, YD, Ramesh, RA. Non-invasive Liquid Biopsy Screening of Urine-Derived Exosomes for miRNAs as Biomarkers in Endometrial Cancer Patients. AAPS J 2018;20(5):82.
- 4.Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. Clin Lung Cancer 2009;10(1):42-6.
- 5.Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2015;65(2):87-108.
- 6.Torre LA, Siegel RL, Ward EM, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2016;25(1):16–27.
- 7.Hankey BF, Ries LA, Edwards BK. The surveillance, epidemiology, and results program: a national resource. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8(12):1117-121.
- 8.Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast cancer before age 40 years. Semin Oncol 2009;36(3):237-49.
- 9.Garwal G, Pradeep PV, Aggarwal V, Yip CH, Cheung PS. Spectrum of breast cancer in Asian women. World J Surg 2007;31(5):1031-40.
- 10.Yılmaz HH, Yazıhan N, Tunca D, Sevinç A, Olcayto EÖ, Özgül N, et al. Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey. Jpn J Clin Oncol 2011;41(1):10-6.
- 11.Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. Oncogene 2006;25(43):5832–5836.
- 12.Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol 2007;25(11):1329–1133.

13. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;15(1):48–65.
14. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: The Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003;289(24):3243-3253.
15. Alexander DD, Morimoto LM, Mink PJ, et al. Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer. *Nutr Res Rev* 2010;23(1):169-179.
16. Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, et al. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: The Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 2006;295(6):629–642.
17. Willett WC, Tamini RM, Hankinson SE, et al. Non-genetic factors in the causation of breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, et al., eds. *Diseases of the Breast*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2010:248.
18. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312(3):146–151.
19. King TA, Pilewskie M, Muhsen S, et al. Lobular carcinoma in situ: a 29-year longitudinal experience evaluating clinicopathologic features and breast cancer risk. *J Clin Oncol* 2015;33(33):3945-3952.
20. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med* 2007;356(3):227-236.
21. Elkin EB, Klem ML, Gonzales AM, et al. Characteristics and outcomes of breast cancer in women with and without a history of radiation for Hodgkin's lymphoma: a multi-institutional, matched cohort study. *J Clin Oncol* 2011;29(18):2466–2473.
22. Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev* 2012;38(7):890–903.

- 23.Tabar L, Fagerberg CJ, Gad A, et al. Reduction in mortality from breast cancer after mass screening with mammography. Randomised trial from the breast cancer screening working group of the Swedish National board of Health and Welfare. *Lancet* 1985;1(8433):829-32.
- 24.Buist DS, Porter PL, Lehman C, et al. Factors contributing to mammography failure in women aged 40-49 years. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(19):1432-40.
- 25.Carney PA, Miglioretti DL, Yankaskas BC, et al. Individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography. *Ann Intern Med* 2003;138(3):168-75.
- 26.Wishart GC, Greenberg DC, Britton PD, et al. Screen-detected vs symptomatic breast cancer: is improved survival due to stage migration alone? *Br J Cancer* 2008;98(11):1741-4.
- 27.Etzioni R, Xia J, Hubbard R, et al. A reality check for overdiagnosis estimates associated with breast cancer screening. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(12)
- 28.Puliti D, Duffy SW, Miccinesi G, et al. Overdiagnosis in mammographic screening for breast cancer in Europe: a literature review. *J Med Screen* 2012; 19(Suppl 1):42-56.
- 29.King TA, Muhsen S, Patil S, et al. Is there a role for routine screening MRI in women with LCIS? *Breast Cancer Res Treat* 2013;142(2):445-53.
- 30.Houssami N, Ciatto S. The evolving role of new imaging methods in breast screening. *Prev Med* 2011;53(3):123-6.
- 31.Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Occult cancer in women with dense breasts: detection with screening US—diagnostic yield and tumor characteristics. *Radiology* 1998;207(1):191-9.
- 32.Pisano ED, Fajardo LL, Caudry DJ, Sneige N, Frable WJ, Berg WA, Tocino I, Schnitt SJ, Connolly JL, Gatsonis CA, McNeil BJ. Fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable breast lesions in a multicenter clinical trial: results from the radiologic diagnostic oncology group V. *Radiology* 2001;219(3):785-92.
- 33.Berg WA, Krebs TL, Campassi C, Magder LS, Sun CC. Evaluation of 14- and 11-gauge, vacuum-assisted biopsy probes and 14-gauge biopsy guns in a breast parenchymal model. *Radiology*. 1997;205(1):203-8.

34. Abubakar M, Orr N, Daley F, Coulson P, Ali HR, Blows F, Benitez J, Milne R, Brenner H, Stegmaier C, Mannermaa A, Chang-Claude J, Rudolph A, Sinn P, Couch FJ, Devilee P, Tollenaar RA, Seynaeve C, Figueroa J, Sherman ME, Lissowska J, Hewitt S, Eccles D, Hooning MJ, Hollestelle A, Martens JW, van Deurzen CH, Investigators K, Bolla MK, Wang Q, Jones M, Schoemaker M, Wesseling J, van Leeuwen FE, Van 't Veer L, Easton D, Swerdlow AJ, Dowsett M, Pharoah PD, Schmidt MK, Garcia-Closas M. Prognostic value of automated KI67 scoring in breast cancer: a centralised evaluation of 8088 patients from 10 study groups. *Breast Cancer Res* 2016;18(1):104.
35. Yao M, Fu P. Advances in anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer. *Chin Clin Oncol* 2018;7(3):27.
36. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(16):1227-32.
37. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305(6):569-75.
38. Hughes KS, Schnaper LA, Bellon JR, Cirincione CT, Berry DA, McCormick B, Muss HB, Smith BL, Hudis CA, Winer EP, Wood WC. 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* 2013;31(19):2382-7.
39. Goldvaser H, Ribnikar D, Majeed H, Ocaña A, Amir E. Absolute benefit from adjuvant chemotherapy in contemporary clinical trials: A systemic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2018;71:68-75.
40. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363(20):1938-48.
41. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood, *J Biol Chem* 1946;166(1):189–197.
42. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma, *Br J Haematol* 1967;13(3):269-88.

43. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987;262(19):9412-20.
44. Gould SJ, Raposo G. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2013;2.
45. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
46. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 2012;80(6):1948-57
47. Smith JA, Leonardi T, Huang B, Iraci N, Vega B, Pluchino S. Extracellular vesicles and their synthetic analogues in aging and age-associated brain diseases. *Biogerontology*. 2015 Apr;16(2):147-85. *Biogerontology* 2015;16(2):147-85.
48. <http://microvesicles.org/> erişim tarihi 01.01.2019
49. Kim DK, Lee J, Simpson RJ, Lötvall J, Gho YS. A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research. *Semin Cell Dev Biol* 2015;40:4-7.
50. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:116-25.
51. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20(5):847-56.
52. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470-6.

- 53.Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA Blood. 2007;110(7):2440-8.
- 54.Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007;9(6):654-9.
- 55.Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP, Strobl J, Westerberg K, Gottardo R, Tewari M, Hladik F. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. Nucleic Acids Res 2014;42(11):7290-304.
- 56.Takahashi K, Yan IK, Kogure T, Haga H, Patel T. Extracellular vesicle-mediated transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer. FEBS Open Bio 2014;4:458-67.
- 57.Brandimarte C, Valesini G, De Berardinis PG, Palange P, Serra P, Balsano F. Relapsing polychondritis: A case with anticartilage, anticardiolipin and antacentromere antibodies. Recenti Prog Med. 1988 Feb;79(2):67-9. [Article in Italian]
- 58.Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. Cell Res 2014;24(6):766-9.
- 59.Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. J Cell Biol 1999;147(3):599-610.
- 60.Rana S, Zöller M. Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: A hypothesis. Biochem Soc Trans. 2011;39(2):559-62.
- 61.Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids Mol Cell Proteomics 2013;12(3):587-98.
- 62.Beninson LA, Fleshner M. Exosomes: An emerging factor in stress-induced immunomodulation. Semin Immunol 2014;26(5):394-401.

- 63.Février B, Vilette D, Laude H, Raposo G. Exosomes: A bubble ride for prions? *Traffic* 2005;6(1):10-7.
- 64.Kore RA, Abraham EC. Inflammatory cytokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor-, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;453(3):326-31.
- 65.Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, et al. Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Mol Cell* 2014;56(2):193-204.
- 66.Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285(23):17442-52.
- 67.Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* 2013; 4:2980.
- 68.Squadrito ML, Baer C, Burdet F, Maderna C, Gilfillan GD, Lyle R, Ibberson M, De Palma M. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep* 2014;8(5):1432-46.
- 69.Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep* 2014;8(6):1649-1658.
- 70.Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A., et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;26(5):707-21.
- 71.Batagov AO, Kuznetsov VA, Kurochkin IV. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* 2011;12 Suppl 3:S18.
- 72.Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Ströbel T, Erkan EP, Fan JB, Breakefield XO, Saydam O. miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012;1:e10.

- 73.Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014;28:3-13.
- 74.Moreno-Gonzalo O, Villarroya-Beltri C, Sánchez-Madrid F. Post-translational modifications of exosomal proteins. *Front Immunol* 2014;5:383.
- 75.Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* 2013;4:2980.
- 76.Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res.* 2019 Jan;60(1):9-18.
- 77.Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981;645(1):63-70.
- 78.Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 1982;10(5):253-7.
- 79.Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signaling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):171.
- 80.Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):195-208.
- 81.Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4(5):594-600.
- 82.Nolte-t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MH. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 2009;113(9):1977-81.
- 83.Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012;119(3):756-66.

- 84.Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011; 2:282.
- 85.Bhatnagar S, Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem* 2007;282(35):25779-89.
- 86.Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. Nonclassical IL-1 secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 2007;179(3):1913-25.
- 87.Ramachandra L, Qu Y, Wang Y, Lewis CJ, Cobb BA, Takatsu K, Boom WH, Dubyak GR, Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. *Infect Immun* 2010;78(12):5116-25.
- 88.Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* 2008;15(1):80-8.
- 89.Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):959-64.
- 90.Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: Evidence for immunosuppressive function. *J Immunol* 2009;183(1):340-51.
- 91.van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001;121(2):337-49.
- 92.Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernández-García H, Villalba M, Théry C, Rodríguez R, Batanero E. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* 2008;181(2):1519-25.
- 93.de Carvalho JV, de Castro RO, da Silva EZ, Silveira PP, da Silva-Januário ME, Arruda E, et al. Nef neutralizes the ability of exosomes from CD4⁺ T cells to act as decoys during HIV-1 infection. *PLoS One* 2014;9(11):e113691.

94. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183(3):1161-72.
95. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200(4):373-83.
96. Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* 2013;44(1):11-9.
97. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
98. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30:255-89.
99. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med* 2015;36(1):11-7.
100. Nolte-'t Hoen E, Cremer T, Gallo RC, Margolis LB. Extracellular vesicles and viruses: are they close relatives? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(33):9155-61
101. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):19-30.
102. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 29:116-25.
103. Zalatnai A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* 2006; :685-693.
104. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM, DeClerck YA. Tumor microenvironment complexity: Emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* 2012; 72:2473-2480.
105. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002; 70:486-497.

106. Gould CM, Courtneidge SA. Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment. *Cell Adhesion Migration* 2014; 8:24-23.
107. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014; 286:3-13.
108. Anderson HC, Mulhall D, Garimella R. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab Invest* 2010; 90:1549-1557.
109. Hendrix A, Westbroek W, Bracke M, De Wever O. An ex(o) citing machinery for invasive tumor growth. *Cancer Res* 2010; 70:9533-9537.
110. Milsom C, Yu J, May L, Meehan B, Magnus N, Al-Nedawi K, Luyendyk J, Weitz J, Klement P, Broze G, Mackman N, Rak J. The role of tumor-and host-related tissue factor pools in oncogene-driven tumor progression. *Thromb Res* 2007; 120(Suppl. 2): S82–S91.
111. Simpson RJ, Lim JWE, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomic* 2009; 6:267-283.
112. Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. *Immunol Res* 2006; 36:247-254.
113. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002;360:295-305.
114. Hegmans JP, Bard MPL, Hemmes A, Luider TM, Kleijmeer MJ, Prins J, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol* 2004;164:1807-1815.
115. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008;10(5):619-24.

- 116.Oto OA, Paydas S, Tanriverdi K, Seydaoglu G, Yavuz S, Disel U. Survivin and EPR-1 expression in acute leukemias: prognostic significance and review of the literature. *Leuk Res* 2007;31(11):1495-501.
- 117.Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18:609-615.
- 118.Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002; 115:575-585.
- 119.Khan S, Aspe JR, Asumen MG, Almaguel F, Odumosu O, Acevedo-Martinez S, et al. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer* 2009;100(7):1073-1086.
- 120.Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;114:1117-1127.
- 121.Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283:5188-5194.
- 122.Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(24):13791-6.
- 123.Li S, Wang L, Meng Y, Chang Y, Xu J, Zhang Q. Increased levels of LAPTM4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget* 2017. doi: 10.18632/oncotarget.17176.
- 124.Hamy AS, Bieche I, Lehmann-Che J, Scott V, Bertheau P, Guinebretière JM, Mathieu MC, Sigal-Zafrani B, Tembo O, Marty M, Asselain B, Spyrtos F, de Cremoux P. BIRC5 (survivin): a pejorative prognostic marker in stage II/III breast cancer with no response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2016;159(3):499-511.
- 125.Unsoy G, Gunduz U. Targeted silencing of Survivin in cancer cells by siRNA loaded chitosan magnetic nanoparticles. *Expert Rev Anticancer Ther* 2016;16(7):789-97.
- 126.Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67(1):7-30.

127. Mouffouk F, Aouabdi S, Al-Hetlani E, Serrai H, Alrefae T, Leo Chen L. New generation of electrochemical immunoassay based on polymeric nanoparticles for early detection of breast cancer. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:3037-3047.
128. Morton R, Sayma M, Sura MS. Economic analysis of the breast cancer screening program used by the UK NHS: should the program be maintained? *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2017; 9:217-225.
129. Chugh PE, Sin SH, Ozgur S, Henry DH, Menezes P, Griffith J, et al. Systemically Circulating Viral and Tumor-Derived MicroRNAs in KSHV-Associated Malignancies. *PLoS Pathog* 2013;9(7): e1003484.
130. Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* 2013;2(22):2747-55.
131. Sohail MM, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS One* 2013;8(11): e78505.
132. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002; 115:575-85.
133. Khan S, Aspe JR, Asumen MG, Almaguel F, Odumosu O, Acevedo-Martinez S, et al. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer* 2009;100(7):1073-86.
134. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004; 114:1117-27.
135. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283:5188-5194.
136. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:13791-13796.
137. Graner MW, Cumming RI, Bigner DD. The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences. *J Neurosci* 2007;27:11214-11227.

- 138.Radons J, Multhoff G. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc Immunol Rev* 2005;11:17-33.
- 139.Khan S, Aspe JR, Asumen MG, Almaguel F, Odumosu O, Acevedo-Martinez S, et al. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer* 2009;100(7):1073-1086.
- 140.Farsad K. Exosomes: novel organelles implicated in immunomodulation and apoptosis. *Yale J Biol Med* 2002;75(2):95-101.
- 141.Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006;66(9):4795-4801.
- 142.Collin LJ, Cronin-Fenton DP, Ahern TP, Christensen KB, Damkier P, Hamilton-Dutoit S, et al. Expression of survivin does not appear to influence breast cancer recurrence risk. *Acta Oncol* 2018; 23:1-8.
- 143.Gunaldi M, Isiksacan N, Kocoglu H, Okuturlar Y, Gunaldi O, Topcu TO, Karabulut M. The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer. *J Can Res Ther* 2018;14(3):570-3.
- 144.Chade MC, Piato S, Galvão MAL, Aldrighi JM, Negrini R, Mateus EF, Medeiros EM. Evaluation of survivin immunoexpression in the differentiation of high- and low-grade breast ductal carcinoma in situ. *Einstein (Sao Paulo)* 2018;16(1):eAO4065.
- 145.Adamkov M, Drahošová S, Chylíková J, Výbohová D. Survivin in breast lesions: immunohistochemical analysis of 196 cases. *Pol J Pathol* 2017;68(4):297-305.
- 146.Khan S, Jutzy JM, Aspe JR, McGregor DW, Neidigh JW, Wall NR. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis* 2011;16(1):1-12.
- 147.Liu W, Vivian CJ, Brinker AE, Hampton KR, Lianidou E, Welch DR. Microenvironmental Influences on Metastasis Suppressor Expression and Function during a Metastatic Cell's Journey. *Cancer Microenviron* 2014;7(3):117-31.
- 148.Nogués L, Benito-Martin A, Hergueta-Redondo M, Peinado H. The influence of tumour-derived extracellular vesicles on local and distal metastatic dissemination. *Mol Aspects Me.* 2018;60:15-26.

149. Zhao H, Achreja A, Iessi E, Logozzi M, Mizzoni D, Di Raimo R, et al. The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2018;1869(1):64-77
150. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883-91.
151. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):563-72.
152. Hayes DF, Allen J, Compton C, Gustavsen G, Leonard DG, McCormack R, et al. Breaking a vicious cycle. *Sci Transl Med* 2013;5(196):196cm6.
153. Ren B, Cui M, Yang G, Wang H, Feng M, You L, Zhao Y. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2018;17(1):108.
154. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer* 2017;17(5):302-317.
155. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* 2016;30(6):836-848.
156. Nogués L, Benito-Martin A, Hergueta-Redondo M, Peinado H. The influence of tumour-derived extracellular vesicles on local and distal metastatic dissemination. *Mol Aspects Med* 2018; 60:15-26.
157. Whiteside TL. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin Immunol* 2018; 35:69-79.
158. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015;527(7578):329-35.
159. Spugnini EP, Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, Fais S. A Role of Tumor-Released Exosomes in Paracrine Dissemination and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2018;19(12).

160.Caruso Bavisotto C, Cappello F, Macario AJL, Conway de Macario E, Logozzi M, Fais S, Campanella C. Exosomal HSP60: A potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17(9):815-822.

161.Logozzi M, Angelini DF, Iessi E, Mizzoni D, Di Raimo R, Federici C, et al. Increased PSA expression on prostate cancer exosomes in in vitro condition and in cancer patients. *Cancer Lett* 2017; 403:318-329.

162.Fu H, Yang H, Zhang X, Wang B, Mao J, Li X, et al. Exosomal TRIM3 is a novel marker and therapy target for gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37(1):162.

165.Srivastava A, Amreddy N, Razaq M, Towner R, Zhao YD, Ahmed RA, Munshi A, Ramesh R. Exosomes as Theranostics for Lung Cancer. *Adv Cancer Res* 2018;139:1-33.

164.Jiang S, Hu C, Liu P, Lu M. Tumor-derived exosomes in cancer metastasis risk diagnosis and metastasis therapy. *Clin Transl Oncol* 2018. doi: 10.1007/s12094-018-1918-0.

165.Wang S, Xu J, Zhang Q. Clinical significance of survivin and vascular endothelial growth factor mRNA detection in the peripheral whole blood of breast cancer patients. *Neoplasma* 2016;63(1):133-40.

166.Xu C, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Fujiwara S, Murakami K et al. High survivin mRNA expression is a predictor of poor prognosis in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Breast Cancer* 2014;21(4):482-90.

167.Yie SM, Luo B, Ye NY, Xie K, Ye SR. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin Exp Metastasis* 2006;23(5-6):279-89.

168.Guney N, Soyidine HO, Derin D, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, Yasasever V, Topuz E. Serum and urine survivin levels in breast cancer. *Med Oncol* 2006;23(3):335-9.

169.Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem* 2009;42(3):194-200.

170.Goksel G, Taneli F, Uslu R, Ulman C, Dinc G, Coskun T, Kandiloglu AR. Serum her-2/neu and survivin levels and their relationship to histological parameters in early-stage breast cancer. *J Int Med Res* 2007;35(2):165-72.

171.Kreger BT, Johansen ER, Cerione RA, Antonyak MA. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers (Basel)* 2016;8(12).

172.Siddharth S, Das S, Nayak A, Kundu CN. SURVIVIN as a marker for quiescent-breast cancer stem cells-An intermediate, adherent, pre-requisite phase of breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2016;33(7):661-75.

173.Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396:580-584.

174.Andersen MH, Svane IM, Becker JC, Straten PT. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* 2007; 13:5991-5994.

7.EKLER

7.1 EK-1: GAÜN Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izin formu

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme kanseri hastalarından elde edilen ekzosomlardaki survivin gen ekspresyonlarının analizi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	204		
FORMU	İLAN	☒	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017 /204	Tarih: 19.06. 2017	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tamamının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☐ E ☒ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Belgin</i>
Prof. Dr. Mehmet KILISKIN	PEDİYATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Mehmet</i>
Prof. Dr. Feridun IŞIK	GÖĞÜS CERRAHİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Feridun</i>
Prof. Dr. İlker SEÇKİNER	ÖROLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>İlker</i>
Prof. Dr. Ramazan BAL	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Ramazan</i>
Prof. Dr. Yusemin ZER	MIKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☐ E ☒ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Yusemin</i>
Doç. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK	İÇ HASTALIKLARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Zeynel</i>
Doç. Dr. Seval KUL	BIYOİSTATİSTİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☐ E ☒ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Seval</i>
Yrd. Doç. Dr. Betül TAŞ	AĞIZ DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	☐ E ☒ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Betül</i>
Uzm. Dr. Cahide Elif ÖRHAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep İl Sağlık Müdürlüğü	☐ E ☒ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Cahide</i>
Eyüp ÇELİK	AVUKAT	Gaziantep Barosu	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Eyüp</i>
Recep TÜRK	BANKACI	Ziraat Bankası Gaziantep Bölge Yöneticisi	☒ E ☐ K	☐ İ ☒ H	☐ E ☒ H	<i>Recep</i>

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

7.2 EK-2: Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ÇALIŞMALAR İÇİN

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Meme kanseri hastalarından elde edilen ekzosomlardaki survivin gen ekspresyonlarının analizi

Sorumlu Araştırmacının Adı: Doç.Dr. Hülya Çiçek

Diğer Araştırmacıların Adı: Doç.Dr. Mustafa Yıldırım, Uzm. Dr. Gülper Nacarkahya, Uzm. Biyo. Füsun Tuşgöl, Uzm. Biyo. İsmail Kaşoğlu

Destekleyici (varsa): BAP

“Meme kanseri hastalarından elde edilen ekzosomlardaki survivin gen ekspresyonlarının analizi ” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu bölümde aşağıdaki sorular cevaplanmalıdır.

Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir? Meme kanseri hastası olmanız

(Örnek: Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde/çocuğunuzda/ailenizin bir üyesinde. hastalığı tanısı konması / yakınmanızın olmasıdır. Katılımınız ile bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.)

a. Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?

Bu projemizde kanserin tanısına yönelik yeni bir noninvazif yöntem geliştirilecek, ayrıca mevcut konvansiyonel testlere önemli ölçüde üstünlük sağlayabilecek, kanserin moleküler tanısını da destekleyecek ve bunların tedavi ile ilişkilerini inceleyecek bir kit geliştirilecektir.

b. Çalışmaya toplam kaç kişinin katılması planlanmaktadır?

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

(Bu bölüm aynen korunacaktır)

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

(Bu bölümde katılımcının anlayacağı sade bir dille çalışma protokolü açıklanmalı ve aşağıdaki sorular mutlaka cevaplanmalıdır*)

a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ?

(Örnek: Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz kolunuzdan 1 tüp (2 ml) kan alınacaktır.. Genellikle bir tek örnekleme yeterlidir ancak bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.)

b. Örnekte neler araştırılacaktır ? mRNA gen ekspresyon analizleri yapılacaktır.

c. Örnekler nerede çalışılacaktır? Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Biyokimya Lab.

(Örnek: Toplanan kanlar yurt içinde/ yurtdışında bir laboratuvarında tetkik edilecektir.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor ?

4.Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilecek mi?

(Bu bölümde katılımcıdan “Tabakalandırılmış olur” olarak isimlendirilen bir onay alınmalıdır. Aşağıda yazılı olan bölüm aynen korunarak katılımcının aşağıdaki 4 seçenekten birini işaretlemesi istenmelidir.)

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

- 1- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- 2- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- 3- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- 4- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir?

Örnek:

- a. Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir. Düşük bir olasılık da olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, veya enfeksiyon riski vardır.
- b. Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferdinin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

6. Çalışmanın yararları nelerdir?

kanserin moleküler tanısını da destekleyecek ve bunların tedavi ile ilişkilerini inceleyecek bir kit geliştirilecektir. Sizin hastalığınızın takibi açısından önemlidir.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak ?

(Bu bölüm aynen korunacaktır)

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar ve destekleyici (varsa, firma adını belirtiniz) kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum

☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

(Çalışma için eğer gerekiyorsa aşağıdaki standart durumlar açıklanmalıdır)

- Örnek: Kanınız genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.)

8. Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir ?

Aşağıdaki seçeneklerden uygun olan kullanılmalıdır:

- a. Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?

(Bu bölüm aynen korunacaktır)

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak ?

- Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını; bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceğini belirtiniz.
- Varsa sigortalanma durumundan haberdar ediniz.

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI :

GÖREVİ :

TELEFON :

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜTF Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında ve Tıbbi Biyokimya, Dr. Hülya Çiçek tarafından bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.Hülya Çiçek’i, GÜTF Tıbbi Biyokimya BD’den arayabileceğimi biliyorum

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN
DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER
ALMAYACAKTIR.**

7.3 EK-3 Özgeçmiş

Mustafa Yıldırım 1977 yılında Gaziantep’de doğdu. İlkokulu 25 Aralık İlkokulunda, ortaokulu Ertuğrul Gazi İlköğretim okulunda, liseyi Vehbi Dinçerler Fen Lisesinde tamamladı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesine 1994 yılında başladı ve 2000 yılında mezun oldu. İç hastalıkları uzmanlık eğitimine 2002’de Çukurova Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D’da başladı. “Akut Lösemilerde Gravin Ekspresyonunun Prognostik Önemi” isimli tezi ile 2006 yılında iç hastalıkları uzmanlık eğitimini tamamladı. Malatya-Arapgir Devlet Hastanesinde 2006-2008 yılları arasında zorunlu devlet hizmeti yükümlülüğünü tamamladı. Antalya’da 2008 yılında askerlik yükümlülüğünü yerine getirdi. Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniğinde 2009 yılında Tıbbi Onkoloji yan dal eğitimine başladı. “Mide Kanserinde p53 ve Bcl-2 Ekspresyonunun Prognostik Önemi” isimli tezi ile 2012 yılında Tıbbi Onkoloji yan dal eğitimini tamamladı. Batman Bölge Devlet Hastanesinde Tıbbi Onkoloji zorunlu devlet hizmeti yükümlülüğünü tamamladı. Medicalpark Gaziantep hastanesinde 2014 yılında Tıbbi Onkoloji uzmanı olarak göreve başladı. Doçentlik sınavını 2014 yılında vererek İç Hastalıkları (Tıbbi Onkoloji) alanında Doçent ünvanını aldı. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya A.B.D.’da Biyokimya doktora eğitimine başladı. Evli ve üç çocuk babasıdır.