

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**METASTATİK VE NON METASTATİK TÜMÖRLERDE
NEFRONEKTİN EKSPRESYONU**

Sayra DİLMAÇ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Metastazın Mekanizması	4
2.1.2. Anjiyogenez	5
2.1.3. İnvazyon ve Epitelial Mezenkimal Geçiş	8
2.2. Tümör Mikroçevresi	9
2.2.1. Tümör Mikroçevresindeki Hücre Tipleri	10
2.2.1.1. Tümör ile İlişkili Fibroblastlar (TİF)	10
2.2.1.2. İmmün Sistem Hücreleri	11
2.2.1.3. Tümör ile İlişkili Makrofajlar (TİM)	12
2.2.1.4. Miyeloid Kökenli Süpresör Hücreler (MDSC)	13
2.2.1.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	13
2.2.1.6. Doku İnhibitör Metalloproteinazlar (TIMP)	14

2.3.	Tümör ve Hücre Dışı Matriks	15
2.4.	Nefronektin	17
2.5.	Proliferasyon Belirteci Ki67	18
GEREÇ ve YÖNTEM		19
3.1.	Hayvan Deney Gruplarının Oluşturulması	19
3.1.1.	Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	19
3.1.2.	Western Blot İçin Doku Hazırlanması	19
3.2.	İmmünohistokimya Yöntemi	20
3.3.	Image J Analizi	22
3.4.	Bradford Yöntemi İle Protein Miktarı Tayini	22
3.5.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve İmmun Blot	23
BULGULAR		27
4.1.	İmmünohistokimya Bulguları	27
4.1.1.	Primer Tümör İmmün Boyanmaları	27
4.1.2.	Karaciğer İmmün Boyanmaları	32
4.1.3.	Akciğer İmmün Boyanmaları	37
4.2	Western Blot Bulguları	42
4.2.1.	Primer Tümörlerde Nefronektin Ekspresyonu	42
4.2.2.	Primer Tümörlerde Ki67 Ekspresyonu	43
TARTIŞMA		45
SONUÇLAR		48
ÖZGEÇMİŞ		49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC	:	Antijen sunan hücreler
ARG	:	Arjinin
ASP	:	Asparjin
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CAF	:	Karsinoma ilişkili Fibroblastlar
COOH	:	Karboksil grubu
CSF-1	:	Koloni Stimulan Faktör-1
DAB	:	Diaminobenzidin
EGF	:	Epitelial Büyüme Faktörü
EMG	:	Epitelial Mezenkimal Geçiş
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGF-1	:	Fibroblast Büyüme Faktörü-1
FGF-2	:	Fibroblast Büyüme Faktörü-2
GLY	:	Glisin
IgG	:	İmmünglobulin G
MAM	:	Meprin/A5protein/protein tirozin fosfataz
MDSC	:	Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler
MHC	:	Major Histokompatibilite Kompleksi
MHC-I	:	Major Histokompatibilite Kompleksi-I
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
MMP-2	:	Matriks Metalloproteinaz-2
MMP-7	:	Matriks Metalloproteinaz-7
MMP-9	:	Matriks Metalloproteinaz-9
MMP-12	:	Matriks Metalloproteinaz-12
NK	:	Doğal Öldürücü Hücreler
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz
PDGF	:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGF-B	:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü-B
PDGF-C	:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü-C
POEM	:	Preosteoblast EGF tekrarlı Protein ile MAM Domaini
RGD	:	Arjinin-Glisin-Asparjin
TAM/TİM	:	Tümör ilişkili Makrofajlar
TGF-β	:	Transforming Büyüme Faktörü-Beta

TIMP	:	Doku İnhibitör Metalloproteinazlar
TİF	:	Tümör İlişkili Fibroblastlar
VEGF	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
VEGF-A	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü-A
VEGF-C	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü-C
VEGF-D	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü-D
VEGFR-2	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör-2
VEGFR-3	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptör-3
4TLM	:	Karaciğer Metastatik Hücre Hattı
4THM	:	Kalp Metastatik Hücre Hattı
67NR	:	Metastatik Olmayan Hücre Hattı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
1	Malign tümörlerin temel özellikleri [11]. Bu 6 özellik sayesinde tümörler daha agresif ve yayılımcı bir potansiyele sahip olmaktadır	4
2	Primer tümörün büyümesi ve dolaşıma çıkması ile başlayan metastaz basamakları gösterilmektedir [13]	5
3	Metastaz sonrasında tümör hücreleri dormant hallerinden kurtulup proliferasyon olduktan sonra klinik olarak belirlenebilen metastazlar oluştururlar [15]	6
4	Anjiyogenik dönüşümde görevli moleküller	7
5	Anjiyogenez basamakları	8
6	Tümör gelişimi ve mikroçevre	10
7	M1 ve M2 makrofajlar	12
8	MMP'ler ve EMG düzenlenmesi	14
9	MMP, TIMP ve tümör oluşumu basamakları	15
10	Tümör Mikroçevresi	16
11	Nefronektinin kimyasal yapısı	17
12	12 günlük metastazdan sonra elde edilen primer tümörlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.	28
13	12 günlük metastaz sonucu elde edilen primer tümörlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	29
14	25 günlük metastazdan sonra elde edilen primer tümörlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.	30

15	25 günlük metastaz sonucu elde edilen primer tümörlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	31
16	4TLM hücre hattından elde edilen primer tümörlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	32
17	4THM hücre hattından elde edilen primer tümörlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	32
18	12 günlük metastazdan sonra elde edilen karaciğerlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.	33
19	12 günlük metastaz sonucu elde edilen karaciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	34
20	25 günlük metastazdan sonra elde edilen karaciğer dokusunda nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları. Ölçek 50µm.	35
21	25 günlük metastaz sonucu elde edilen karaciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	36
22	4TLM hücre hattından elde edilen karaciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	37
23	4THM hücre hattından elde edilen karaciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	37
24	12 günlük metastazdan sonra elde edilen akciğer dokusunda nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları. Ölçek 50µm.	38
25	12 günlük metastaz sonucu elde edilen akciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	39

26	25 günlük metastazdan sonra elde edilen akciğer dokusunda nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.	40
27	25 günlük metastaz sonucu elde edilen akciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	41
28	4TLM hücre hattından elde edilen akciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	41
29	4THM hücre hattından elde edilen akciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması	42
30	12 günlük 4TLM ve 4THM primer tümörlerde nefronektin ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM ve 4THM tümörlerde nefronektin ekspresyon düzeylerinin karşılaşmasını gösteren grafik (B)	42
31	25 günlük 4TLM, 4THM ve 67NR primer tümörlerinde nefronektin ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM, 4THM ve 67NR tümörlerinde nefronektin ekspresyon düzeylerinin karşılaşmasını gösteren grafik (B)	43
32	12 günlük 4TLM ve 4THM primer tümörlerde Ki67 ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM ve 4THM tümörlerde Ki67 ekspresyon düzeylerinin karşılaşmasını gösteren grafik (B)	43
33	25 günlük 4TLM, 4THM ve 67NR primer tümörlerinde Ki67 ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM, 4THM ve 67NR tümörlerinde Ki67 ekspresyon düzeylerinin karşılaşmasını gösteren grafik (B)	44

GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Hücreler bulundukları çevreye; hücre dışı sinyalleri hücre içi sinyallere çeviren ve bu sinyalleri düzenleyen etmenlerle bağlıdır. Hücre düzeyindeki bu sinyaller; gen ifadesi, büyüme, farklılaşma, hücre bölünmesi, hücre hareketi ve apoptozu içermektedir. Hücre ve çevresi arasındaki ilişkide, gen ifadesinde ya da sinyal adımlarında bozulma, hücrenin oluşturduğu dokuda beklenmedik değişimlerin gözlenmesine sebep olmaktadır. Bu da dolaylı olarak tümör oluşumuna yol açan bir ortamdır. Tümörler iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malign) karakterde olabilmektedirler. İyi huylu olan tümörler sadece bulundukları doku ile sınırlı kalırken; kötü huylu olanlar dokuyu terk edip yeni yerlere yerleşme eğiliminde; yani metastaz yapma yeteneğindedirler [1]. Malign tümör hücreleri metastaz yapma aşamasına geldiklerinde; tümör durağanlıktan kurtulup, ihtiyaçları doğrultusunda besin ve oksijen temini için yeni kan damarlarını oluşturur (anjiyogenez) ve bu damarları kullanarak vücudun başka bir bölgelerine yerleşirler[2, 3].

Meme kanseri kadınlarda akciğer kanserinden sonra en sık ölüme yol açan kanser türüdür. Bir kadında yaşamı boyunca meme kanseri geliştirme riski %10-12,2 olup, başka bir ifadeyle her 8-10 kadından birisinin meme kanserine yakalanma riski olduğu söylenebilir[4]. Meme kanserinin metastaz yaptığı organların başında kemik, akciğer, karaciğer, beyin ve adrenal bezler gelmektedir [5].

Nefronektin (POEM - preosteoblast EGF repeat protein with MAM domain) fare böbreğinde tanımlanmış, ligandı $\alpha 8\beta 1$ integrin olan bir hücre dışı matriks proteinidir [6]. Moleküler olarak 70-90 kDa ağırlığında, EGF(epiteliyal büyüme faktörü)-benzeri tekrarlar, RGD(arjinin, glisin, asparjin) sekansları ve COOH (karboksil) ucunda MAM (Meprin/A5-protein/ protein tirozin fosfataz) domaini içermektedir [7]. EGF-benzeri tekrarlar içermesi sebebiyle osteoblast farklılaşmasını arttırdığı gösterilen nefronektinin doku gelişimi ve hücre farklılaşmasında da rol oynayabileceği ileri sürülmektedir [6].

Literatürde nefronektinin kanserle ilişkisini gösteren çalışmalar oldukça azdır ve günümüzde nefronektinin kanser gelişimindeki rolü hala tam olarak açıklanamamıştır. Nefronektinin malign tümörlerle ilişkisi, Kuphal S. ve arkadaşlarının malign melanoma üzerinde yaptıkları çalışmada gösterilmiştir[8]. Bu çalışmanın ardından, Erin N. ve arkadaşları tarafından metastatik tümör hücre hattında nefronektinin varlığı gen düzeyinde

gösterilmiştir [5]. Ancak nefronektinin metastaz üzerinde etkili olup olmadığını açıklayan bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır.

Literatür bilgilerimiz çerçevesinde ortaya konan ekstraselüler ortamın hücresel dinamikler üzerine etkisi ve nefronektinin hücresel farklılaşmada ve hücre hareketliğindeki rolü göz önünde bulundurularak; nefronektinin maligniteye bağlı olarak tümörlerde farklı düzeylerde eksprese olacağı hipotezini kurduk. Hipotezimizi test etmek amacıyla ortotopik olarak malign ve benign hücre hatları verilerek oluşturulacak fare meme kanseri modelinde bağlı olarak; ortaya çıkan primer tümörlerde ve meme kanserinin sıklıkla metastaz yaptığı akciğer ve karaciğer dokularındaki sekonder metastatik tümörlerde, nefronektin ekspresyonunda zaman ve hücreye bağımlı değişimleri belirlemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Tümör, herhangi bir hücre ya da hücre grubunun, organizmanın sahip olduğu kontrol mekanizmalarının etkisinden çıkıp kontrolsüz çoğalmasıdır. Organizmada bu kontrol mekanizmalarının doğru çalışmaması durumunda normal hücreler yapı ve fonksiyon değiştirerek tümör karakteri kazanabilirler [2]. Bu nedenle kanser, hücrede meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [9].

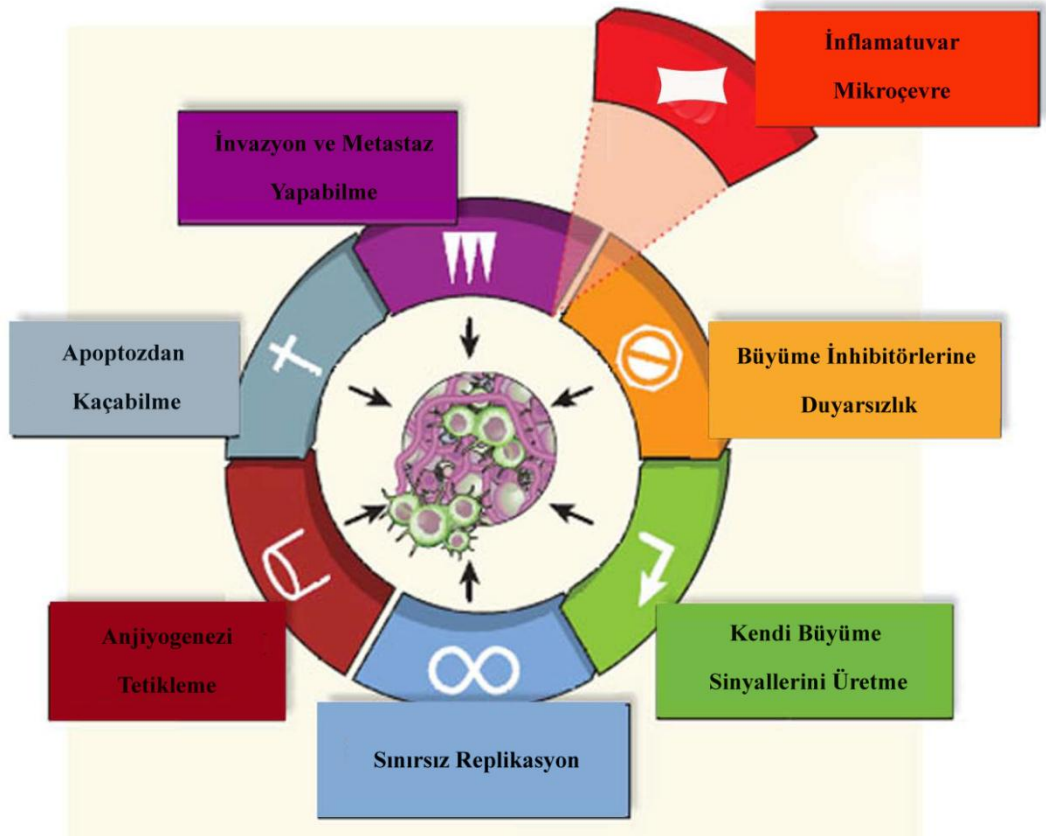
Normal hücreler komşu hücrelere veya hücre dışı matrikse adezyon molekülleri aracılığıyla tutunarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu adezyon

noktalarında elektron yoğun plaklar oluşur, hücrelerin ameboid uzantılarında yavaşlama ve sonuç olarak da durma gözlenir. Bu durum hücrelerin kontak inhibisyon etkisinden kaynaklanmaktadır. Ancak tüm hücrelerde kontak inhibisyon özelliği bulunmaz. Bu da tümör hücrelerinin durma potansiyeline sahip olmadığının bir göstergesidir. Bu nedenle; tümör hücreleri bulundukları organda proliferasyon olarak kitlesel gelişim gösterirler. Bu hücreler organ dışına çıkmadan sadece bu organda kitlesel artışa giderse bunlara “benign” yani iyi huylu tümör hücreleri denir. Ancak, bazı tip tümör hücreleri primer odaktan ayrılıp farklı odaklar oluşturmak üzere başka bölgelere hareket etme eğilimindedirler. İşte tümör hücrelerinin primer odaktan ayrılarak uzak mesafelere yayılması “metastaz” olarak, metastaz yapma yeteneğine sahip hücreler de “malign” yani kötü huylu tümör hücreleri olarak tanımlanmaktadır [10].

Malign tümörlerin gelişimleri sırasında gösterdikleri davranışlardan yola çıkılarak bunlarla ilgili altı temel özellik tanımlanmıştır:

1. Dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama,
2. Büyümeyi durdurucu sinyallere karşı dayanıklılık,
3. Programlı hücre ölümünden kaçabilme,
4. Yaşlanmaya direnç gösterme ve sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olma,
5. Yeni kan damarları oluşturabilme (anjiyogenez),
6. Farklı dokulara yayılabilme ve bir bölgeden diğerine taşınabilme (metastaz).

Bu altı özellik malign tümörlerin temel özellikleri olmakla birlikte aynı zamanda kanser tedavisindeki başlıca hedefleri de oluşturmaktadır [2]. (Şekil 1)

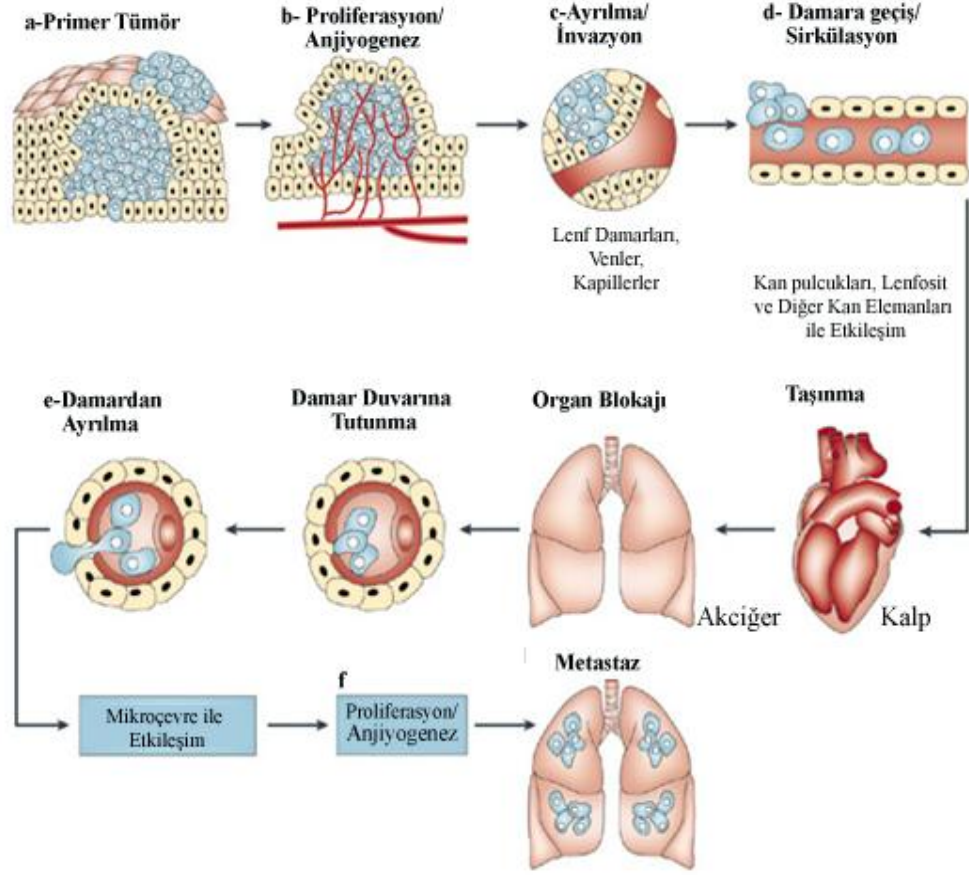


Şekil 1: Malign tümörlerin temel özellikleri [11]. Bu 6 özellik sayesinde tümörler daha agresif ve yayılımcı bir potansiyele sahip olmaktadır.

2.1.1. Metastazın Mekanizması

Tümör metastazı sıralı bir dizi olaylar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu adımlardan herhangi birinde oluşacak başarısızlık sürecin ilerlemesini de engelleyecektir [12]. Metastazın başlayabilmesi için hücrenin belirli bir kitlesel büyüklüğe ulaşması ve hücresel transformasyonunu tamamlaması gerekmektedir [13].

Tümör hücreleri, büyümekte olan tümör kitlesine ihtiyacı olan besin ve oksijen kaynağını sağlayabilmek için besin kaynaklarına doğru ilerlemek zorundadırlar. Bunun için, kitle 1-2 mm büyüklüğe ulaştığı zaman anjiyogenik farklanmayı başlatır. Bu farklanma, anjiyogenik faktörlerin sentezlenmesi ve salgılanmasıyla başlar ve tümör çevresinde kılcal damar ağı oluşumu gözlenir. Bu ağ giderek yoğunlaşır ve tümör hücre yığınının etrafını tamamen kaplar. Tümör hücrelerinin dolaşıma katılmasında ince duvarlı venüller ve lenf damarları daha az direnç gösterdikleri için; tümör hücreleri çoğunlukla bu yolu kullanmayı tercih etmektedirler. Tümör hücreleri dolaşıma geçtikten sonra kan yoluyla uzak organlara doğru yol alırlar. Dolaşıma çıkan tümör hücreleri, kanda yer alan immün hücrelerin saldırısına maruz kalmamak için, bir an önce dokuya gitmek eğilimindedirler. Dolaşımdan ayrılacakları zaman da, damarın endotel hücreleri ve bazal membranlarını aşarak endotel dışına ulaşmalıdırlar. Tümör hücreleri ulaştıkları yeni organlarda yeniden büyüme eğilimindedirler ve yine kapiller ağ oluşturmak üzere anjiyogenezi tetiklerler [13]. (Şekil 2)



Şekil 2: Primer tümörün büyümesi ve dolaşıma çıkması ile başlayan metastaz basamakları gösterilmektedir [13].

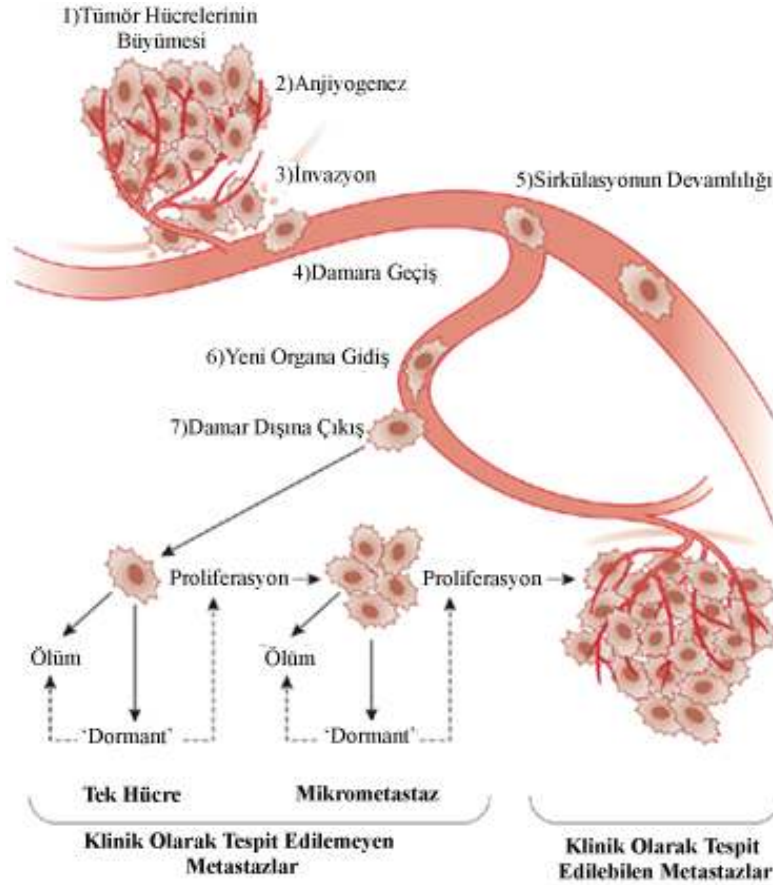
2.1.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez, gelişmekte olan kitleye vasküler destek sağlarken, ortama kazandırdığı besin ve oksijen ile tümörün büyümesine ve yayılmasına yardımcı olarak metastazı tetiklemektedir [14].

Tümör hücreleri, doku dışına çıkıp başka organlarda tek bir hücre ya da mikrometastazlar oluşturmaları ile hemen agresif bir potansiyele sahip olmazlar. Bu aşama “dormansi (uyku hali)” aşamasıdır ve bu aşamada uzunca bir süre hatta yıllarca kalabilirler. Tümör dormansisi; in vivo ortamda 1mm ya da daha küçük çaptaki tümörün büyümesini durdurması ve hareketsiz kalmasıdır. Ancak, tümör hücrelerinin dormansi durumundan kurtulmaları;

1. Tümörden salınan faktörler,
2. Mikroçevresinin değişimi etkisiyle gerçekleşmektedir.

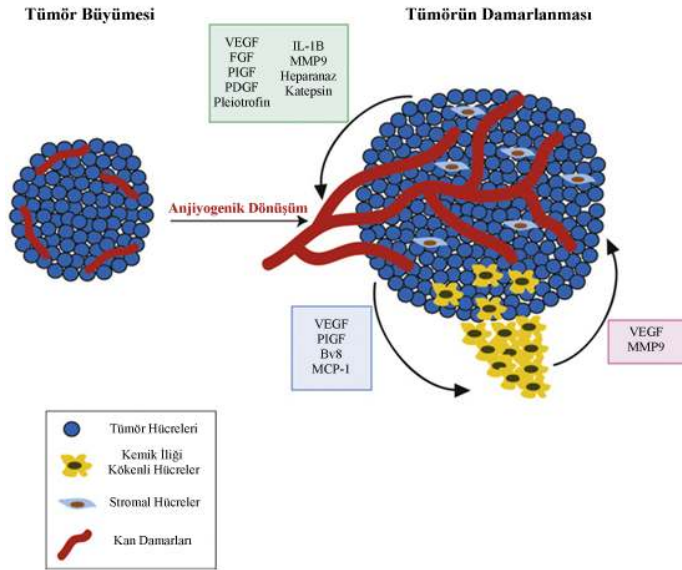
Bu mekanizmaların etkisiyle dormansiden kurtulan tümör hücreleri proliferasyon olarak, klinik olarak belirlenebilen kitleler haline gelir ve giderek büyüyen kitle yeni metastazlar yapma arayışına devam eder [15]. (Şekil 3)



Şekil 3: Metastaz sonrasında tümör hücreleri dormant hallerinden kurtulup proliferere olduktan sonra klinik olarak belirlenebilen metastazlar oluştururlar [15].

Anjiyogenik dönüşüm, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin bozulmasıyla başlayan bir süreçtir. Pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge, tümör büyümesini engellemekte ve tümörü dormant halde tutmaktadır. Bu dengenin pro-anjiyogenik faktörlerin salgılanması yönünde bozulması tümör anjiyogenezini ve büyümesini tetiklemektedir [16]. Anjiyogenik sürece girmiş tümör hücreleri; bazı büyüme faktörleri ve moleküllerini salgılamaya başlamaktadırlar [17]. Bu moleküller arasında VEGF-A (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A) fizyolojik ve patolojik anjiyogenezin önemli bir düzenleyicisi olup, pro-anjiyogenik bir faktördür [18]. VEGF-A, damar endotel hücreleri üzerinde VEGFR-2'ye bağlanarak damar anjiyogenezini stimüle ederken, VEGF-C ve VEGF-D lenfatik endotel hücrelerinde baskın olarak var olan VEGFR-3'e bağlanırlar ve lenfanjiyogenezini tetiklerler [19]. Fibroblast büyüme faktörü FGF-1 (fibroblast büyüme faktörü), FGF-2 ve PDGF-B (platelet kaynaklı büyüme faktörü) ve PDGF-C de anjiyogenezde rol alan önemli moleküllerdir [20-22].

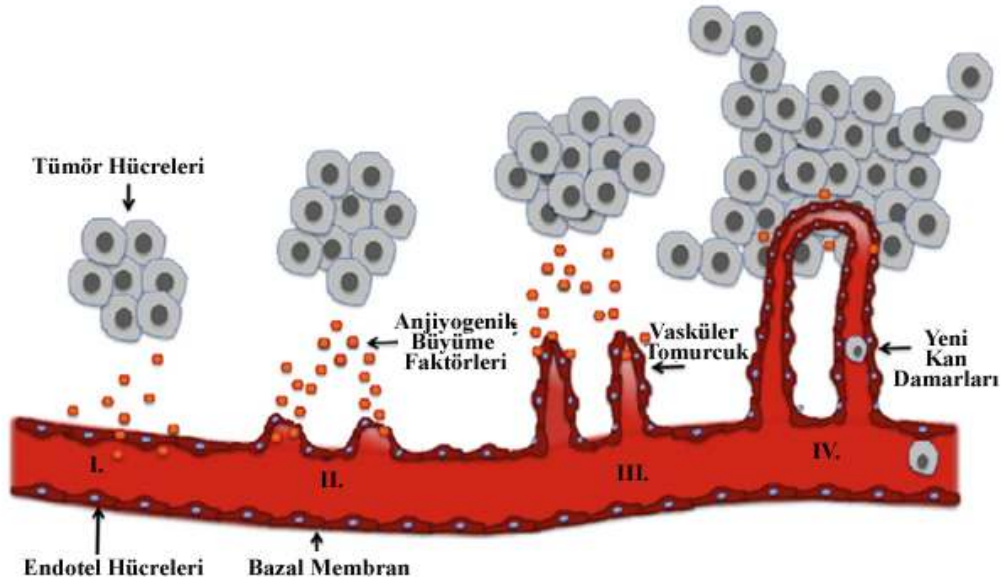
Tümör mikroçevresinde artan VEGF ekspresyonu; tümörün büyük damarlara ulaşmasını ve kan içerisinde rahat hareket etmesini sağlayarak tümörün metastazını da kolaylaştırmaktadır [14]. Bu işlemler basit gibi görünse de aslında, hem tümör hücreleri, hem endotelial hücreler, hem de diğer stromal hücrelerle tümör mikroçevresindeki sinyal yollarının birlikte çalıştığı çok karmaşık olaylar zincirinden oluşmaktadır [23]. (Şekil 4)



Şekil 4: Anjiyogenik dönüşümde görevli moleküller.

Pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin pro-anjiyogenik faktörlerin yönünde kayması ile anjiyogenik dönüşüm başlar ve tümörde vaskülarizasyon artar. Tümör hücrelerinin kendi salgıladığı proteazlar ve pro-anjiyogenik faktörler (yeşil kutu), tümör çevresindeki immün sistem hücrelerinin düzenlediği faktörler (pembe kutu), inflamatuvar hücrelere karşı tümör hücrelerinden salgılanan faktörler (mavi kutu) şeklinde gösterilmektedir[16].

Anjiyogeneze damar endotel hücreleri önceden var olan kan damarlarına doğru hareket ederek, büyüme faktörlerinin etkisiyle yeni damar oluşumunu tetiklerler. Başlangıçta tümör içindeki olgunlaşmamış kan damarları yeni bir bazal membrana sahip olarak, olgun kan damarları ile bağlanırlar ve yeni damarları oluştururlar [24] (Şekil 5). Bu durum, metastaz sürecinin tamamlanması için oldukça önemlidir.



Şekil 5: Anjiyogeneze basamakları.

I- Tümör büyümesi sonucu hipoksi gelişir ve anjiyogenik faktörler salınmaya başlar (VEGF, FGF gibi). II- Salınan anjiyogenik faktörler endotel hücrelerini harekete geçirir. III- Endotel hücreleri proliferasyon olur ve kan taşıyabilen damar filizlerini oluşturmaya başlar. IV- Sadece yeni bir hücre dışı

matriks ve bazal membran oluşumundan sonra, yeni kan damarı oksijen taşınması için kullanılabilir. Ayrıca tümör hücreleri damar aracılı uzak alanlara göç edebilirler [24].

Son yıllarda metastazın önlenmesine yönelik yapılan çalışmalar daha çok anjiyonegenезin inhibe edilmesi yönünde yoğunlaşmaktadır [24]. Anjiyogenezin inhibe edilmesi ile tümör hücrelerinin beslenmesi, oksijenlenmesi ve damar yoluyla hareket etme yetenekleri kısmen engellenebilmektedir [14].

2.1.3. İnvazyon ve Epitelial-Mezenkimal Geçiş

Metastaz, tümör hücrelerinin gelişmeye başladıkları dokudan çıkıp bölgeyi işgal etmeleriyle başlar. Tümör hücreleri öncelikle hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks bağlarını zayıflatıp kırmalıdır [25]. Bu aşamadaki en önemli düzenleme normal doku yapılanmasındaki epitelial-mezenkimal geçişin (EMG) düzenlenmesidir [26].

Tümör hücreleri dolaşıma katılırken önce endotel hücrelerini ve onların bazal laminasını aşmak zorundadırlar. Normal epitel hücrelerinin hareket kabiliyetleri, üzerlerine yerleştikleri bazal lamina sebebiyle sınırlıdır. Çoğunlukla yanal düzlem üzerinde hareket edebilmektedirler. Ancak, tümör hücreleri, epitel hücrelerinin karakterlerini değiştirerek çok yönlü harekete sahip olabilmelerini sağlamaktadır [27]. EMG'nin sağlanmasıyla epitel hücreleri karakter değiştirerek daha saldırgan, apoptoza engel olabilen, istilacı hücrelere dönüşebilmektedirler. Tümör hücreleri tarafından EMG; invazyon ve metastaz sırasında farklı aşamalarda geçici ya da kalıcı olarak aktive edilebilir [2].

Embriyogeneز sırasında da bazı transkripsiyon faktörleri EMG'de aktif role sahiptir. Bu transkripsiyon faktörlerinin birçok malign tümör tipinde metastaz ve invazyon sırasında aşırı ekspres oldukları gösterilmiştir [28, 29]. Bu transkripsiyon faktörleri tarafından üretilen matriks yıkıcı enzimler sayesinde epitel bütünlüğü ve hücreler arası bağlantıların zayıflatılmasıyla; hücreler daha rahat hareket edebilir hale gelmekte ve apoptoza karşı direnç kazanmaktadırlar [30].

Kanser hücreleri ve tümör-ilişkili stromal hücreler arasındaki etkileşim bir ya da daha fazla transkripsiyon faktörünün salgılanmasını arttırmakta ve bu da hücredeki agresif karakteri tetiklemektedir [31, 32].

2.2. Tümör Mikroçevresi

Solid malign tümörler, sadece malign karakterdeki tümör hücrelerinden oluşmamaktadır. Bu hücrelerin yanı sıra stromal doku içinde yer alan başka hücrelerde bulunur ve bu hücrelerin tümü tümör mikroçevresini oluşturmaktadır [33]. (Şekil 6) Mikroçevreyi oluşturan hücreler çoğunlukla tümör gelişiminde tümör hücrelerine desteklik sağlamaktadırlar [34].

Literatürde stromal dokunun tümör gelişimi ve ilerlemesinde pasif izleyici olarak rol aldığı gösterilmiştir. Ancak son yıllarda tümör hücreleri ve stromal hücreler arasında karmaşık çift yönlü ilişki olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu durum, tümör hücreleri ile hücre dışı matriks arasında karmaşık bir ağın var olduğu gerçeğini düşündürmektedir [34].

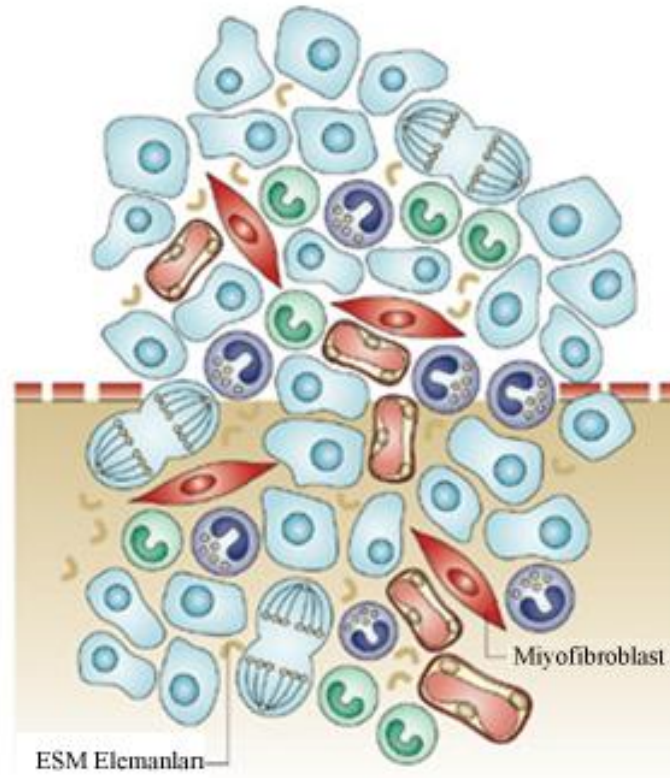
Tümörün gelişimi sırasında yakınlarında yer alan mikroçevre 2 şekilde tanımlanmaktadır;

1-Fiziksel Mikroçevre: Hücresel bileşenler, hücre-hücre ilişkileri, tümör parankimasını oluşturan matriks ve tümör hücreleri şeklinde tanımlanır.

Fiziksel mikroçevreyi; endotelyal hücreler ve prekürsörleri (pro-anjiyogenik faktörlerin salgılanması yoluyla), perisitler (pro-anjiyogenik faktörlerin salgılanması yoluyla), düz kas hücreleri, fibroblastlar, karsinoma ilişkili fibroblastlar (CAF) (pro-anjiyogenik faktörlerin salgılanması yoluyla), miyofibroblastlar, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM),doğal öldürücü hücreler (NK), antijen sunan hücreler (APC) oluşturmaktadırlar.

2-Fizyolojik Mikroçevre: Oksijen değişimleri, besinler, tümör damarlanması sırasında kullanılmayan ürünleri içermektedir [35].

Tümör Stroması



Şekil 6: Tümör gelişimi ve mikroçevre

Tümör gelişimi sırasında mikroçevreyle iletişimde olan hücreler tümörün gelişimi, invazyonu ve metastazına yardımcı olan bir mikroçevre oluşmasını sağlarlar[35].

2.2.1. Tümör Mikroçevresindeki Hücre Tipleri

2.2.1.1 Tümör İle İlişkili Fibroblastlar (TİF) (Cancer-Associated Fibroblast) (CAF)

Tümör stromasının esas hücre popülasyonunu TİF'ler oluşturur ve her karsinomada farklı oranlarda bulunurlar. TİF'ler sadece tümörögenезin başlaması ve malign karakter kazanmasında değil, proliferasyon, invazyon ve tümör hücrelerinin hareket yeteneklerinde de önemli role sahiptirler. Bu hücrelerin proliferasyon yetenekleri oldukça gelişmiştir. Kanser hücreleri ile

epitel hücreleri, endotel hücreleri ve perisitler arasında iletişim kurarak büyüme faktörleri ve kemokinlerin salgılanmasını sağlarlar [36].

Ayrıca; TİF'ler ve tümör hücreleri birlikte çalışarak, immün baskılayıcı hücreleri harekete geçirmek için birçok faktörün salgılanmasına aracılık ederler [34]. TİF'ler, hücre dışı matriks bozulması ve tümör ilerlemesinden sorumlu matriks metalloproteinaz (MMP) kaynağı olup; anjiyogenezin indüklenmesinden sorumlu, VEGF salgılanmasında rol oynamaktadırlar [36].

2.2.1.2. İmmün Sistem Hücreleri

İmmün sistem hücreleri tümörlü dokunun doğal bileşenleridirler. Bu hücreler tümöre antagonist etki edebilecekleri gibi, tümör gelişiminde olumlu etki de gösterebilmektedirler. Tümör gelişimini destekleyen inflamatuvar hücreler arasında mast hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, B ve T lenfositler yer almaktadır [37-39]. Bu hücreler çeşitli sinyal moleküllerinin (VEGF, sitokinler, kemokinler, FGF, MMP-9 vb.) salgılanmasını sağlayarak tümör gelişimine yardımcı olurlar [39, 40].

Tümör kendi mikroçevresini oluşturmaya başladığında ilk olarak hangi immün sistem hücre tipinin işin içine girdiği hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak immün baskılayıcı hücreler ve tümör hücreleri arasındaki ilişki, tümörün karakterini kazanmasında oldukça etkin role sahiptir. İmmünsüpresif mikroçevrenin oluşması; tümör hücrelerinin immün sistem hücrelerinden kaçışını ve tümörün metastatik karakter kazanmasını sağlamaktadır [34].

Tümör hücrelerinin immün sistem hücrelerinden kaçmalarını sağlayan iki farklı mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan ilki MHC (major histocompatibility complex) (majör histokompatibilite kompleksi) I kompleksindeki bozukluklardır. Bu bozukluk sonunda, tümör hücreleri bazı onkogenlerin aktivasyonunu sağlayarak fenotiplerini gizlemektedirler. Bu şekilde de sitotoksik T lenfositlerin hedefi olmaktan kurtulmuş olurlar [41]. İmmün sistemden kaçışın ikinci yolu, gelişmekte olan tümörün immün sisteme saldırı düzenlemesidir. Buna sebep olan tümörün kendisidir. İnflamasyon ve otoimmüniteyi ortadan kaldırırken tümör kaynaklı makrofajlar (TAM) ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücreleri (MDSC) kullanırlar. Bu yollarla tümör hücreleri, esas bağışıklık sistemini kendi kontrollerine alarak indüksiyon ve tümöre karşı immün yanıtı baskılamış olmaktadır [41].

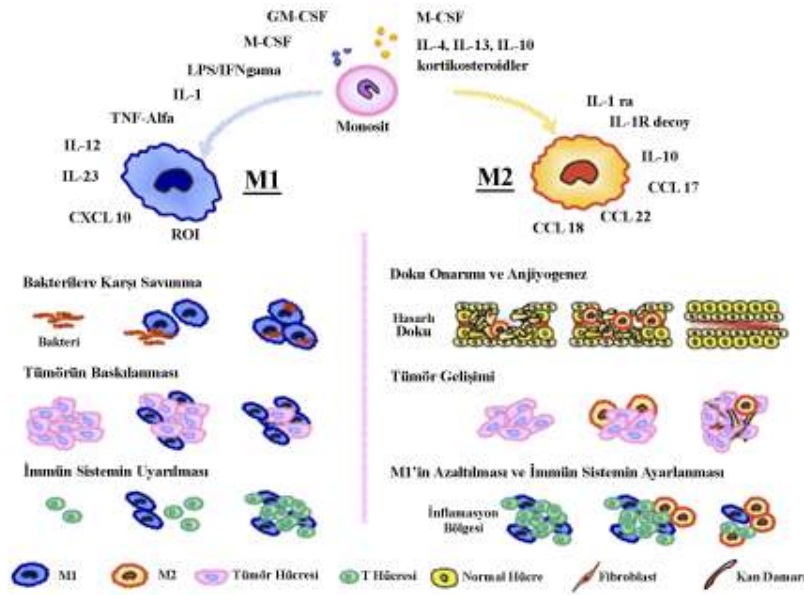
Tümör dokusu içinde, tam olarak farklılaşmış bağışıklık sistem hücrelerine ek olarak, çeşitli kısmen farklılaşmış miyeloid progenitörlerin varlığı da tespit edilmiştir. Bu hücreler tümör gelişimi indükleyici etki göstermektedirler [39].

İmmün sistem hücrelerinin etkileri değerlendirildiğinde; bunların olası yanıtları bozarak, tümör hücrelerinin büyümesi ve gelişimini indüklediği, buna bağlı olarak metastazı arttırdığı ileri sürülmektedir [34].

2.2.1.3. Tumorle İlişkili Makrofajlar (TİM) (Tumor Associated Macrophages) (TAM)

Tümörün metastaz yapma yeteneği ile makrofajlar arasında yakın ilişki bulunmaktadır [42]. TİM'lerin, tümör mikroçevresindeki varlığı, tümör gelişimi ve anjiyogenezi desteklemektedir. Tümör stroması ve tümör hücrelerinden salınan kemokinler ve büyüme faktörleri TİM'lerin bu alanda toplanmasını tetiklemektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda makrofajların 2 alt tipinin olduğu gösterilmiştir. M1 ve M2 olarak derecelendirilen bu alt tipler; yüzey belirteçleri, davranışları ve verdikleri yanıtlar bakımından farklıdırlar. Monositlerden köken alan klasik makrofajlar, M1 olarak tanımlanırken; pro-tümör fonksiyonuna sahip olan, alternatif olarak aktive olmuş makrofajlar M2 olarak tanımlanmaktadır. (Şekil 7) M1 makrofajlar; bakteri ve yabancı maddelere karşı savaşım için programlanmıştır ve tümör ile karşılaşınca bunu baskılama kapasitesine sahiptirler. Bunları; yüzeyinde bulundurdıkları özel belirteçler aracılığıyla yapmaktadırlar. Ancak, M2 makrofajların yüzey belirteçleri normal M1 makrofajlardan oldukça farklıdır ve bu durum, M2'lerin farklı rollerinin olduğunun bir göstergesidir. Bu makrofaj ailesi özellikle doku tamiri ve anjiyogenezi mekanizmalarında rol oynarken, anjiyogenezi ile olan ilişkisiyle de tümörün büyüme ve gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Gelişen tümör, inflamatuvar alanlarda M2 makrofajlar ile birlikte kendilerine kazanılmış bir bağışıklık edinirler [43].



Şekil 7: M1 ve M2 Makrofajlar

M1 ve M2 makrofajlar, bulundurdıkları yüzey reseptörleri ve görevlerindeki farklılıkları nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar[43].

Lin ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada; farelerde makrofaj büyüme faktörü olan CSF-1 (colony stimulation factor-1)'in ekspresyonunun azalmasıyla birlikte tümörde TİM yoğunluğu oldukça azalmış; buna bağlı olarak da tümör gelişimi ve metastaz sürecinin geciktiği gözlenmiştir.

Bu veriler TiM'lerin metastaz oluşumu için gerekli olduklarını ayrıca göstermektedir [44].

TiM'ler tarafından salgılanan VEGF, PDGF, TGF- β ve FGF gibi büyüme faktörleri pro-anjiyogenik süreçte vaskülarizasyonun artırılmasıyla anjiyogenez sürecinde rol almaktadırlar [43, 45]. Ayrıca, TiM'ler endotel hücre göçünü teşvik eden anjiyogenik faktör timidin fosforilazı da salgılamaktadırlar. MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 gibi proteaz enzimleri de TiM'ler tarafından üretilmektedir [46].

2.2.1.4. Miyeloid Kökenli Süpresör Hücreler (Myeloid Derived Suppressor Cells) (MDSC)

MDSC'ler farklılaşmanın birçok aşamasında olan henüz olgunlaşmamış oldukça heterojen hücrelerdir [47]. Tümör gelişiminde MDSC havuzunun genişlemesi ile tümörün ilerleme seviyesi ve metastaz arasında ilişki olduğu bilinmektedir [48]. MDSC'lerin en önemli işlevi; tümörün immün sistemden kaçışı sırasında immün baskılayıcı ve anti-inflamatuar yanıtı ortaya çıkarmak için immün sistemi düzenlenmeleridir [49].

2.2.1.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

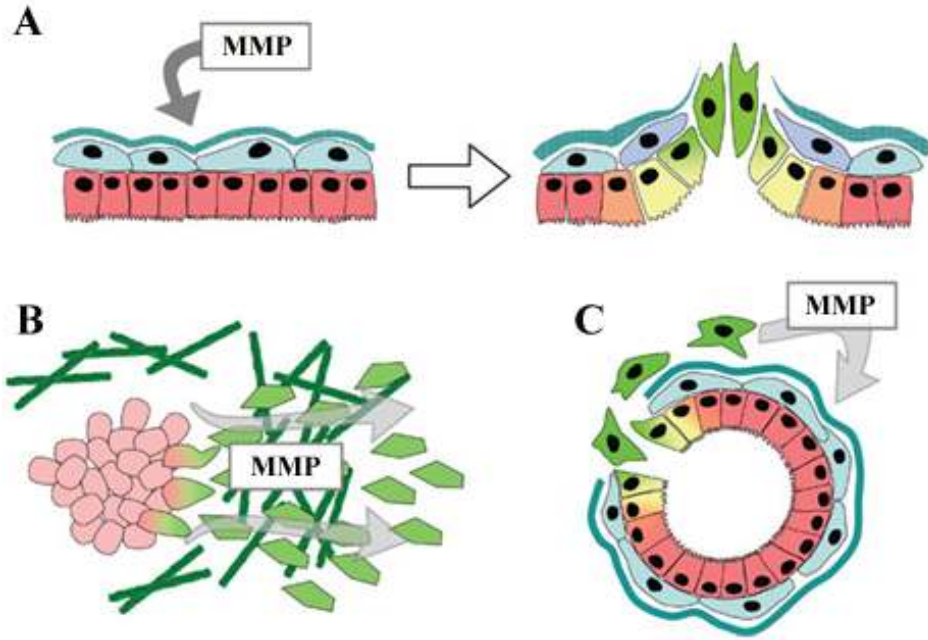
MMP'lerin, tümör gelişiminin karmaşık alt yapısını oluşturan; hücre tutunması, göç, epiteliyal-mezenkimal geçiş ve anjiyogenez aşamalarında, sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasında görevleri olduğu bilinmektedir[50].MMP'ler hücre dışı matriks yapısını bozarak hasara uğratmakta ve tümör yayılımı ve metastazında görev almaktadırlar [51]. Matriksin proteolizi ile matriks substratlarının bozulması farklı yollarla da düzenlenmektedir. Kollajen IV ve laminin V'in yarıklanması tümör hücre büyümesi, göçü ve anjiyogenez de dahil olmak üzere bir dizi işlemin başlamasına sebep olmaktadır [52, 53].İnvazif(yayılımcı) tümörlerde, MMP ve integrinlerin yüksek düzeyde bulunmaları bunlar arasında bir ilişki olduğuna işaret etmektedir [54].

Kaderinlerde MMP'lerin olası hedefleridirler. MMP aracılı iki hücre arasındaki E-kaderin (epiteliyal kaderin) bağlantılarının bozulmasıyla tümör hücrelerinin bu açıklıklardan kaçışı kolaylaşmaktadır [55].Ayrıca MMP'ler tarafından salgılanan proteolitik enzimler, hücre dışı matriks yapısını bozmakta ve tümörün çok daha kolay metastaza yönelmesini sağlamaktadır. Bu durum da, tümörün bulunduğu ortama göre agresivitesini değiştirmesini kolaylıkla açıklayabilmektedir [50].

MMP'ler EMG'de 3 şekilde ilişkilendirilebilirler:

1. Tümör mikroçevresinde MMP'lerin yüksek düzeyde bulunmaları, doğrudan epitel hücreleri üzerinde EMG'ye sebep olabilirler (Şekil 8-A).
2. Tümör hücreleri, metastaz ve invazyonun kolaylaştırılması için daha fazla MMP salgılanmasını sağlayarak EMG'ye sebep olabilirler (Şekil 8-B).
3. MMP düzeyinin artırılması yoluyla stromal hücrelerin aktivasyonunu sağlayarak tümör gelişimine yardımcı olabilirler (Şekil 8-C) [56].

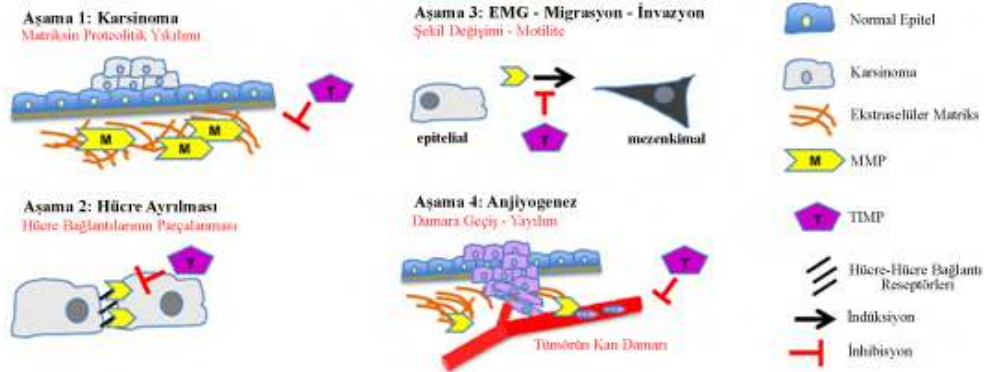
EMG'nin yeniden düzenlenmesiyle, tümör kitlesinden ayrılabilme yeteneği kazanan tümör hücrelerine, metastaz yapabilmek için bir kaçış yolu sağlanmış olmaktadır [56].



Şekil 8: MMP'ler ve EMG düzenlenmesi
MMP'ler EMG'yi düzenleyerek tümör ilerlemesinde görev almaktadırlar [56].

2.2.1.6. Doku İnhibitör Metalloproteinazlar (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) (TIMP)

TIMP'lerin genel görevleri, MMP bağlantılı aktiviteler ile proteolitik enzim aktivitelerinin düzenlenmesidir ve MMP inhibitörleri olarak da görülmektedirler. TIMP'ler, MMP aktivitesini inhibe ederek, hücre farklılaşması, büyüme, göç, istila, anjiyogenez ve apoptoz dahil olmak üzere tümör gelişimindeki birçok biyolojik süreçte görev almaktadırlar [57] (Şekil 9).



Şekil 9: MMP, TIMP ve tümör oluşumu basamakları
Tümör oluşumun farklı basamaklarında MMP ve TIMP'lerin hücre tutunmasındaki görevleri[50].

2.3. Tümör ve Hücre Dışı Matriks

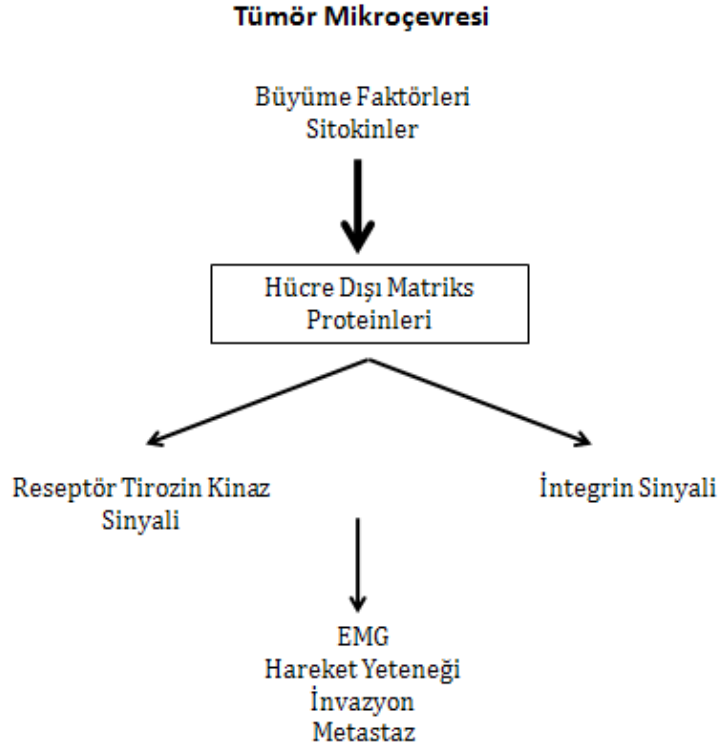
Mikroçevre, kanser ilerlemesinde önemli bir düzenleyicidir. Hücre dışı matriks, mikroçevrenin önemli bir bileşenidir ve tümör hücreleri ile yakın temas halindedir [58-60]. Hücre dışı matriks, tümör hücrelerinin; büyüme, hayatta kalma, hareketlilik ve anjiyogenik faktörlerin salınımı için kaynak oluşturmaktadır. Ayrıca, hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla, hücre döngüsünün ilerlemesi, göç ve farklılaşma için gerekli hücre içi sinyal iletim yollarını da tetiklemektedir [61, 62]. Tümör hücreleri ve hücre dışı matriksarasında integrin-aracılı etkileşimler, tümör hücrelerinin metastaz potansiyelinde önemli rol oynamaktadırlar [60]. Henüz pasif haldeki tümör hücreleri hücre dışı matriks ile geçici bağlantılar kurarken; proliferatif hale geçip metastatik özellik kazandıklarında bu bağ oldukça güçlenir [60, 63].

Hücre dışı matriksin anormal düzenlenmesi ve enzim yapısının değişmesini sağlayan hücre tipleri arasında CAF'lar ve immün sistem hücrelerine büyük görev düşmektedir [64, 65]. Ayrıca, epitel hücreleri ve mezenkimal kök hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipi de kanser gelişiminin geç safhalarında bu değişime dahil olmaktadır [66, 67].

Hücre dışı matriks içinde biriken kollajen I ve IV, fibronektin, laminin gibi hücre dışı matriks proteinleri, matriksin yeniden düzenlenmesine ve katepsin, MMP'ler gibi proteazların salınmasına neden olurlar [68]. Bu proteinler kendi çevreleriyle oldukça iyi iletişim halindedirler ve çevreden gelen sinyallere karşı oldukça duyarlı ve cevap vermeye hazır halde bulunmaktadırlar. Kendi hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak inflamatuvar sitokinleri ve büyüme faktörlerinin artışı tetikleyen sinyal yollarının aktivasyonunu sağlarlar [69]. Bu protein ailesinin üyeleri arasında osteopontin, periostin, tenascin C, nefronektin gibi proteinler bulunmaktadır [70]. Bu grup proteinler, embriyonik gelişim döneminde aktif olarak rol alırken, yetişkindeki normal dokularda aktiviteleri oldukça azalmıştır. Doku yaralanması, doku hasarı onarımı, inflamasyon, kanser ve diğer kronik hastalıklarda bu proteinlerin yeniden aktif hale geldikleri görülmektedir. Tümör gelişiminde fibroblast ve malign hücrelerin indüklemesiyle hücre dışı matriks proteinlerinin varlığında artış görülmektedir. Bu da tümörün metastaz yapması için uygun ortam hazırlamaktadır [69].

Matriselüler proteinlerin salınımının birçok tümör tipinde değiştiği gösterilmiştir. Örneğin; osteopontin, periostin, tenascin C'nin gen ekspresyonunun arttığı ortaya çıkarılmıştır [5, 71, 72].

Matriselüler proteinlerin, birçok reseptör-aracılı sinyal yollarını tetikleyerek epitelial-mezenkimal geçişin değişmesine neden olduğu ve tetiklediği de bilinmektedir. Bu proteinlerin, bu yolla tümör hücrelerinin göç ve invazyonunu desteklediğine dair önemli çalışmalar bulunmaktadır [69].(Şekil 10)



Şekil 10: Tümör Mikroçevresi

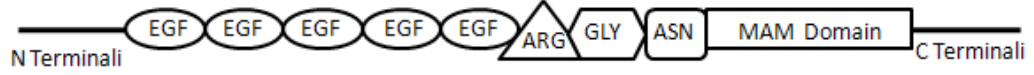
EGF ve TGF- β gibi sitokinlerin salgılanmasından sonra tümör mikroçevresi (kalın ok), matriselüler proteinlerin farklı sinyal yollarını aktive etmesi sonucu ortaya çıkan biyolojik süreçler gösterilmektedir[70].

Doku homeostazının geliştirilmesi ve devamlılığı sırasında hücre dışı matriks dinamiklerinin önemi göz önüne alındığında; hücre dışı matriksin nasıl değiştiği ve bunun tümör oluşumu ve ilerlemesi üzerindeki etkilerinin nasıl olduğu bugün tartışılması gereken önemli bir konudur. Hücre dışı matriks; değişen tümör hücre matriks mimarisini, tümör hücrelerinin birbirleriyle iletişimini kolaylaştıran fiziksel değişiklikleriyle bu sürecin en önemli parçasıdır [73]. Tümör mikroçevresindeki hücre dışı matriksin değişimi; sadece reseptör-ligand sinyallerinin oluşumunda değil, yoğun bir hücre dışı matriks ağının oluşumunda da önemlidir [70].

2.4. Nefronektin

Nefronektin diğer bir adıyla POEM (preosteoblast EGF repeat protein with MAM domain); özellikle gelişmekte olan böbrekler ve saç köklerinde görülen bir bazal membran proteindir [7]. Böbrek gelişimi başta olmak üzere; kurbağada ön ayaktaki erektör pili kasının ve zebra balığında da kalbin farklılaşmasında görevli olduğu gösterilmiştir [74-77]. Nefronektin; N-terminalinde 5 EGF (epitelial büyüme faktörü) benzeri tekrarlar, RGD (arjinin, glisin, asparjin) sekansları ve COOH ucunda MAM (Meprin/A5-protein/protein tirozin fosfataz) bölgeleri olan 3 domainden oluşmaktadır [7, 77]. RGD motifine ek olarak, bir hücre yüzey reseptörü $\alpha 8 \beta 1$ integrinin bağlanması için kritik olan, bir yardımcı bağlanma bölgesine sahiptir [78, 79]. (Şekil 11) Bu iki protein arasındaki

bağlantı böbrek gelişimindeki epiteliyal-mezenkimal geçişte oldukça önemli rol oynamaktadır [80].



Şekil 11: Nefronektinin kimyasal yapısı.

Nefronektinin kimyasal yapısı. EGF (epiteliyal büyüme faktörü) benzeri tekrarlar, RGD bölgesi (arjinin[ARG], glisin[GLY], asparjin[ASP]) ve MAM (Meprin/A5-protein/protein tirozin fosfataz) domaini .

Nefronektin, hücre dışı matriks proteinlerinden biridir. Tümör gelişimi sırasında tümöre komşu olan bu matrikste ekspresyonu bilinen bir protein olup kanser gelişiminde rolü olabileceği fikri ilk olarak Eckhardt ve arkadaşları tarafından (2005) ortaya atılmıştır. Bu çalışmada, nefronektin ekspresyonun metastatik tümörlerde arttığını göstermişlerdir [81]. Buna karşın, başka bir çalışmada, meme kanserinin metastazı sonrasında, organlardan elde edilen metastatik hücrelerde nefronektinin gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [5]. Literatürde, henüz nefronektinin özellikle tümör ve metastatik alanlardaki ekspresyonuyla ilgili net bir çalışma bulunmamaktadır.

2.5. Proliferasyon Belirteci Ki67

Hücre proliferasyonundaki artış ve hücre döngüsündeki değişiklikler tümör gelişiminde önemlidir [82]. Tümör hücreleri oldukça proliferatif hücreler olduklarından, proliferasyon belirteci olarak hücre döngüsündeki kilit noktalarda görevli proteinler kullanılmaktadır. Bunlar; PCNA, p53, Ki67 olarak belirlenmiştir [82]. Bunların arasında Ki67, tümör proliferasyonunda sıklıkla çalışılan bir belirteçtir [83].

Ki67; 80'lerin başında Gerdes ve arkadaşları tarafından farelerin Hodgkin lenfoma hücre hatlarının (L428) immünize edilmesiyle karakterize edilmiş bir proteindir[84]. 345 ve 395 kDa molekül ağırlığına sahip iki izoformu bulunmaktadır[85, 86]. Ki67, hücre döngüsü ile bağlantılı, histon olmayan bir proteindir. Proliferatif hücrelerde G1 fazının ortasında görülmeye başlar; S ve G2 fazlarında düzeyi artar ve bölünme sırasında en yüksek seviyeye gelir [87].

Ki67, sağlıklı meme dokusunda düşük seviyelerde gözlenmektedir[88]. Buna karşın tümör hücrelerinde Ki67 ekspresyonu oldukça yoğundur ve Ki67 pozitif hücrelerin oranındaki artış; metastaz için olumlu bir faktördür ve tümör hücrelerinin hayatta kalma oranlarının arttığını ifade etmektedir[89, 90].

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan 4TLM (karaciğer metastatik hücre hattı), 4THM (kalp metastatik hücre hattı) ve 67NR (metastatik olmayan hücre hattı) fare meme kanseri hücre hatları Doç. Dr. Nuray Erin'den (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi) temin edildi. Her bir meme kanseri hücre hattında çalışılmak üzere 20'şer adet Balb/c ırkından 8 haftalık dişi fare Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden sağlandı. Farelere; 4TLM meme kanseri hücre hattı hücrelerinden 1×10^5 ; 4THM meme kanseri hücre hattı hücrelerinden 1×10^5 ; 67NR meme kanseri hücre hattı hücrelerinden ise 1×10^6 hücre sayılarak sol meme dokularına ortotopik olarak enjekte edildi.

Hücrelerin enjeksiyonundan 15 gün sonra 4TLM, 4THM ve 67NR hücreleri enjekte edilen farelerin 10' ar tanesi sakrifiye edilerek meme tümörleri, akciğer ve karaciğer dokuları alındı. Kalan hayvanlar da enjeksiyondan 28 gün sonra sakrifiye edilerek meme tümörleri, akciğer ve karaciğer dokuları çıkarıldı.

Meme tümörlerinin bir kısmı, akciğer ve karaciğer dokularının tamamı immünohistokimyasal inceleme için rutin ışık mikroskopi takibinden sonra parafine gömüldü. Meme tümörlerinin bir kısmı Western-Blot protokolü için sıvı nitrojene (-196°C) alındı.

3.1.1. Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi

Farelerden alınan meme tümörü, akciğer ve karaciğer dokuları %10'luk formalin fiksasyonu içine alınarak 24 saat fiks edildi. Fiksasyondan sonra dokular 2 saat akar suda yıkandı. Ardından, dokular sırasıyla %70, %80, %90'lık etil alkollerde 24'er saat ve %100'lük etil alkolde ise 3 saat tutularak dokulardan suyun uzaklaşması sağlandı. Ksilol içinde üç defa üçer dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı. 56°C 'ye ayarlanmış etüvde sıvı parafin serilerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı.

3.1.2. Western Blot Tekniği İçin Doku Hazırlanması

Farelerden alınan meme tümör dokusu; kriyotüpler içerisinde sıvı nitrojende (-196°C) saklandı. Bu dokular mekanik parçalanmaya tabi tutuldu. Parçalanmış doku örnekleri ependorflara alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2gr doku başına 600µl lizis tamponu ve 10µl proteaz inhibitör kokteyl eklendi. Dokular vortekslendi ve sonikatör yardımıyla örneklerin homojen bir biçimde parçalanması sağlandı. 15.000g'de 10 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi.

Süpernatantlar alınıp pellet kısmı ayrıca saklanarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2. İmmünohistokimya Yöntemi

Fare meme tümörü, akciğer ve karaciğer dokularında nefronektin ve Ki67 proteinlerinin varlığını göstermek amacıyla uygulandı.

Kullanılan Solüsyonlar

- **1X PBS (Phosphate Buffer Saline):**
7,2 gr Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) (#1.06585.5000; Merck)
0,8 gr Potasyum Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (#1.05101.1000; Merck)
16 gr Sodyum Klorür (NaCl) (#1.06400.1000; Merck)
Yukarıdaki kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH=7,4 olacak şekilde ayarlandı.
- **Sitrik Asit Tamponu:**
2,1 gr Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (#1.0044.1000; Merck) 900ml distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH=6,0 olacak şekilde ayarlandı.
- **Borik Asit Tamponu:**
2,1 gr Borik asit (H_3BO_3) (#1.00162.5000; Merck) 900ml distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH=7-7,4 olacak şekilde ayarlandı.
- **%3'lük H_2O_2 Solüsyonu:**
92 ml metanol (CH_3OH) (#1.06009.2500; Merck) ve 8 ml %35'lik H_2O_2 (#1.07961.0100; Merck) karıştırılarak şale içerisinde hazırlandı.
- **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; Thermo Scientific/LabVision)
- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Antibody Diluent Solution (#ab64211; Abcam)
- **Primer Antikor:**
Rabbit Anti-Nefronektin Antikoru (#ab64419; Abcam)
Rabbit Anti-Ki67 Antikoru (#ab15580; Abcam)
- **Sekonder Antikor:** Biotinli Anti-Tavşan IgG (keçide üretilmiş) (#BA-1000; Vector Laboratories)
- **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi:** Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) (#85-9043; Invitrogen)
- **Kromojen:** Diaminobenzidine tabletleri (#D4168; Sigma)
- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer Hematoksilen (#1.09249.1000; Merck)
- **Kapatma Solüsyonu:** Entellan (#1.07961.0100; Merck)

İmmünohistokimya boyaması için kesitler 5µm kalınlığında; süperfrost (manyetik olarak statik olan) lamlar üzerine alındı. Bu kesitler 56°C'lik etüvde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitlerin 2 defa 10'ar dakika ksilol ve 5'er dakika azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) bekletilmesiyle deparafinize (parafinden kurtarma) olması sağlandı. Alkol

serilerinden sonra kesitler 5 dakika distile su içerisinde hidrate (suya indirme) edildi. Kesitlerden tümör ve karaciğer dokuları, taze hazırlanmış sitrik asit (pH=6,0) tamponunda 750W'da 5 dakika mikrodalga ışınlamaya maruz bırakıldı. Kesitler mikrodalga uygulaması sonrasında oda ısısında 20 dakika soğutulduktan sonra, PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.

Akciğer kesitleri ise taze hazırlanmış borik asit (pH=7-7,4) tamponunda 56°C'lik etüvde gece boyu bekletildi. Ertesi gün kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H₂O₂ solüsyonu ile oda ısısında 15 dakika bekletilerek yok edildi. Kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra, özgül olmayan bağlanımları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 7 dakika bloklandı. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan aynı örnek üzerine 1/300 oranında dilüe edilmiş nefronektin antikoru damlatıldı. Diğer örneklerden de negatif kontrol olanına antikor ile eşit oranda Ig (immünglobulin) içerecek şekilde hazırlanmış Ig kurumaması damlatıldı. Diğer kesitin üzerine de kurumaması ve gece boyu inkübasyonda sorun olmaması için PBS damlatıldı. Kesitler nemli muhafaza kutularına alınarak +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Inkübasyonun sonunda kesitlerdeki solüsyonlar uzaklaştırıldı. Daha sonra üzerine PBS eklenen örnek üzerine bloklama solüsyonu damlatılarak 7 dakika beklendi. Solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra örnek üzerine 1/500 oranında dilüe edilmiş Ki67 antikoru damlatıldı. Nefronektinin damlatıldığı örnek üzerine PBS damlatılarak kurumaması sağlandı. Oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Primer antikorlarla inkübasyon tamamlandıktan sonra kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında kesitler, 1/400 oranında dilüe edilmiş biotin ile işaretilenmiş anti-tavşan sekonder antikorları ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Inkübasyondan sonra kesitler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Inkübasyondan sonra kesitler yine 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından DAB (Diaminobenzidin) substratı damlatılarak enzim substrat ilişkisi sonucunda oluşacak olan kahverengi boyanmalar gözlemlendi. Mayer'in hematoksileninde zıt boyama yapıldı. Örnekler daha sonra artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirilerek dehidrate (sudan kurtarma) edildi, ksilolden geçirildi. Daha sonra kesitler entellan ile kapatıldı. Zeiss Axioplan ışık mikroskopunda tümör, akciğer ve karaciğer dokularında nefronektin ve Ki67 proteinlerinin dağılımları ve immunoreaktivite dereceleri Image J programı kullanılarak değerlendirildi.

3.3. Image J Analizi

Her bir doku için ayrı ayrı olarak, 5 farklı hayvandan alınan örneklerle immünohistokimya boyanması yapıldıktan sonra elde edilen preparatlardan rastgele olarak 10'ar alanın fotoğrafları çekilerek Image J programı yardımıyla boyanmış kısımların tüm alana oranı hesaplanarak boyanma yüzdesi çıkarılmıştır.

3.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Kullanılan Solüsyonlar:

- **1µg/µl BSA**
0,1 g stok BSA (10mg/ml) (#A9647; Sigma)
10ml Distile su

Bu solüsyondan 100µl alınarak 900µl distile su ile 1ml'ye tamamlanır.

- **Bradford Ayıracı (#1-800-4; BIORAD)**
3ml Bradford Reagent
12 ml Distile su

Western-Blot tekniği için hazırlanan lizatlar -80°C'den çıkartıldı ve buz üzerinde çözümleri beklendi. Çözünen lizatlar vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10000 rpm'de 1 dk süreyle santrifüj edildi ve lizatlar yeniden buz üzerine alındı. Pipet yardımıyla süpernatant kısımları yeni ependorflara aktarıldı.

96 kuyucuk içeren tablanın ilk sıraları okuyucunun daha anlaşılır ölçüm yapabilmesi için boş bırakıldı. Her bir lizat için ikinci sıranın ikinci kuyucuğundan başlanarak aşağı doğru her kuyucuğa 1µg/µl BSA'dan 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15µl koyuldu. Aynı kuyucuklara lizatlardan da 1µl örnek koyuldu. Her kuyucuğa 100µl bradford ayıracı eklenerek örnekler ölçüm için hazır hale getirildi.

Multiscan spectrum yardımıyla 595nm'de ölçüm yapıldı. Çıkan sonuçlar Microsoft Office Excel programına yazıldı. BSA'lardan alınan değerler X eksen; konsantrasyonlar ise Y eksen olacak şekilde veriler düzenledi ve grafik çizildi. Elde edilen grafiğin eğim formülüne göre lizatlardaki protein miktarları hesaplandı. Western-Blot protokolü için, her örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.

3.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi ve İmmun Blot

Farelerden elde edilen 67NR, TLM ve THM tümörlerinde; nefronektin ve Ki67 proteinlerinin ekspresyon miktarlarını belirlemek ve semikantitatif olarak protein seviyelerini karşılaştırmak için uygulandı.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Lizis Tampon Solüsyonu (Lysis Buffer):**
0,1 M Tris
0,6gr Tris (#1.08387.2500; Merck) 40 ml distile suda çözüldü. pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
Sodyum-ortovanadate
0,184 gr Na-orthovanadate (#L4390; Sigma), 10 ml Tris (pH:10) (0,1M tris:0,6gr/50ml) ile ateş üzerinde çözüldü.
- **Proteaz İnhibitör Kokteyli (#P8340; Sigma)**
- **%30 Akrilamid-Bisakrilamid:**
- 15,4 gr 37,5:1 oranındaki akrilamid-bisakrilamid(#161-01-25; Biorad) 40ml distile suda çözüldü.
- **4X Tris-HCl/SDS pH=8,8:**

6,05 gr Tris (#1.08387.2500; Merck) 40 ml distile su içerisinde çözöldü. pH 6,8'e ayarlandı. Ardından distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0,4 gr SDS (#161-0301; Biorad) eklendi.

- **4X Tris-HCl/SDS pH=6,8:**

18,15 gr Tris (#1.08387.2500; Merck) 40 ml distile su içerisinde çözöldü. pH 8,8'e ayarlandı. Ardından distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0,4 gr SDS eklendi.

- **%10'luk Amonyum Persölfat (APS):**

0,1 gr APS (#7727-54; Amresco) 1 ml distile su içerisinde çözöldü.

- **N,N,N'',N'''-Tetramethylethylenediamidine(TEMED)(#T-7024; Sigma)**

- **%10'luk Tris-HCl Jel**

Ayrıştırıcı (Seperating)Jel:

5,00 ml %30 akrilamid-bisakrilamid

3,75 ml 4X tris-HCl/SDS, pH:8,8

6,25 ml distile su

Yukarıdaki solösyonlar 15ml'lik falkon içerisinde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyonu sağlayacak olan;

0,05 ml %10'luk APS

0,01 ml TEMED

solösyonları eklendi. Seri bir şekilde pipetleme yapıldı ve jel karışımı cam plaka arasına dököldü. Yaklaşık 45 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

Toplayıcı (Stacking) Jel:

650 µl %30 akrilamid-bisakrilamid

1250 µl 4X tris-HCl/SDS, pH:6,8

3030 µl distile su

Yukarıdaki solösyonlar 15ml'lik falkon içerisinde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyonu sağlayacak olan;

25 µl %10'luk Amonyum-persölfat (APS)

5 µl TEMED

solösyonları eklendi. Seri bir şekilde pipetleme yapıldı ve jel karışımı cam plaka arasına dököldü. Yaklaşık 30 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

- **%5'lik Tris-HCl Jel**

Ayrıştırıcı (Seperating)Jel:

2,50 ml %30 akrilamid-bisakrilamid

3,75 ml 4X tris-HCl/SDS, pH:8,8

8,75 ml distile su

Yukarıdaki solüsyonlar 15ml'lik falkon içerisinde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyonu sağlayacak olan;

0,05 ml %10'luk APS

0,01 ml TEMED

solüsyonları eklendi. Seri bir şekilde pipetleme yapıldı ve jel karışımı cam plaka arasına döküldü. Yaklaşık 45 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

Toplayıcı (Stacking) Jel:

650 µl %30 akrilamid-bisakrilamid

1250 µl 4X tris-HCl/SDS, pH:6,8

3030 µl distile su

Yukarıdaki solüsyonlar 15ml'lik falkon içerisinde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyonu sağlayacak olan;

25 µl %10'luk Amonyum-persülfat (APS)

5 µl TEMED

solüsyonları eklendi. Seri bir şekilde pipetleme yapıldı ve jel karışımı cam plaka arasına döküldü. Yaklaşık 30 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

- **5X Elektroforez Yürütme Solüsyonu:**

9 gr Tris

43,2 gr Glisin (#5.00190.1000; Merck)

3 gr SDS

600 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 8,3-8,6 olmalıdır.

1X Elektroforez Yürütme Solüsyonu

5X stok solüsyondan 140 ml alındı ve 560 ml distile su ile 700 ml'ye tamamlandı.

- **Transfer Tampon Solüsyonu (Blotting Buffer):**

3 gr Tris

14,3 gr Glisin

800 ml distile su içerisinde çözüldü. pH7,8-8 arsında olmalıdır. Solüsyona daha sonra 200 ml metanol (#1.06009.2500; Merck) eklendi. +4°C'de soğutularak kullanıldı.

- **10X Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffer Saline-PBS) Solüsyonu**

36 gr Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) (#1.06585.5000; Merck)

4 gr Potasyum Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (#1.05101.1000; Merck)

80 gr Sodyum Klorür (NaCl) (#1.06400.1000; Merck)

1 litre distile su içerisinde çözüldü. pH 7,4'e ayarlandı.

1X Fosfat Tamponlu (Phosphate Buffer Saline-PBS)-Tween 20 Solüsyonu

100 ml 10X PBS solüsyonuna 900 ml distile su eklenerek 1X PBS hazırlandı. Daha sonra 1 litre 1X PBS'e 1 ml Tween-20 (#8.22184.0500; Merck) eklenerek PBS-T çalışma solüsyonu elde edildi.

- **Bloklama Solüsyonu: %1'lik Bovine Serum Albumin (BSA)**

1 gr BSA 100 ml PBS-T içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **Chemiluminescent Solüsyonu(#WBLUC0500; Millipore)**

Çalışılacak olan nefronektin ve internal kontrol olarak kullanılacak olan Beta aktin (β -actin) proteinlerinin kilo daltonuna uygun olarak %10'luk Tris-HCl jeli; Ki67 proteinin kilo daltonuna uygun olarak da %5'lik Tris-HCl jeli hazırlandı. Her bir örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde distile su, örnek ve laemli solüsyonu (Sample Buffer 2X, Laemli Electrophoresis Reagent, #S-3401; Sigma) oranlarıyla eşitlenerek 5 dakika 100°C'de kaynatıldı. Her kuyucuğa 20 mikrolitre örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklendi. Protean Tetra Cell, Mini Trans Blot Modül (#165-8033; Biorad) tankının içine yerleştirildi. Yürütme solüsyonu eklenerek tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 80 Voltta 2-2,5 saat elektroforez edildi.

Elektroforezin ardından jeldeki proteinlerin PVDF (polivinilidinden diflorür) (#ISEQ00010; Millipore) membrana geçmesi için immunoblotlama yapıldı. Öncelikle PVDF membran metanolde 10-15 saniye bekletildi. Daha sonra PVDF membran, üstte ve altta üçer adet filtre kağıdı ve birer sünger olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. Jelde yürütülen proteinler, hazırlanan sandviçde PVDF membranın üzerine alınarak tekrar mini protean III sistemindeki transfer tankı içerisine alındı. Transfer tankına, transfer solüsyonu eklenerek +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran oda ısısında PBS-T solüsyonu ile yıkandı. Ardından yine PBS-T ile hazırlanan bloklama solüsyonunda (%1'lik BSA) ile oda ısısında 2 saat bloklandı. Membranlar; 1/1000 oranında %1'lik BSA'da hazırlanmış nefronektin, 1/4000 oranında %1'lik BSA'da hazırlanmış Beta aktin ve 1/1000 oranında %1'lik BSA'da hazırlanmış Ki67 primer antikorları ile gece boyu, +4°C'de, karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, oda ısısında PBS-T ile 45 dakika boyunca 15'er dakikada bir PBS-T yenilenerek yıkama yapıldı. Membranlar; 1/4000 oranında %1'lik BSA'da hazırlanmış HRP-işaretli anti-tavşan IgG sekonder antikör ile oda ısısında, karıştırıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tekrar oda ısısında PBS-T ile 45 dakika boyunca onbeşer dakikada bir PBS-T yenilenerek yıkama yapıldı. Membranlar; chemiluminisans substrat sistemi ile 3 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde filme (#AI0241 032 2; Kodak) aktarıldı. Görüntüleme için, Konica Minolta SRX-101A cihazı kullanıldı. Film cihaz vasıtasıyla geliştirici (#175 7314; Liford) ve tespit (#198 4565; Liford) solüsyonlarından geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu.

BULGULAR

67NR, 4TLM ve 4THM hücre hatlarının ortotopik olarak farelere enjeksiyonu sonrasında; 12 ve 25. günlerde elde edilen primer tümör, akciğer ve karaciğer dokularında nefronektin ve Ki67 için immünohistokimya ve western blot teknikleri uygulandı.

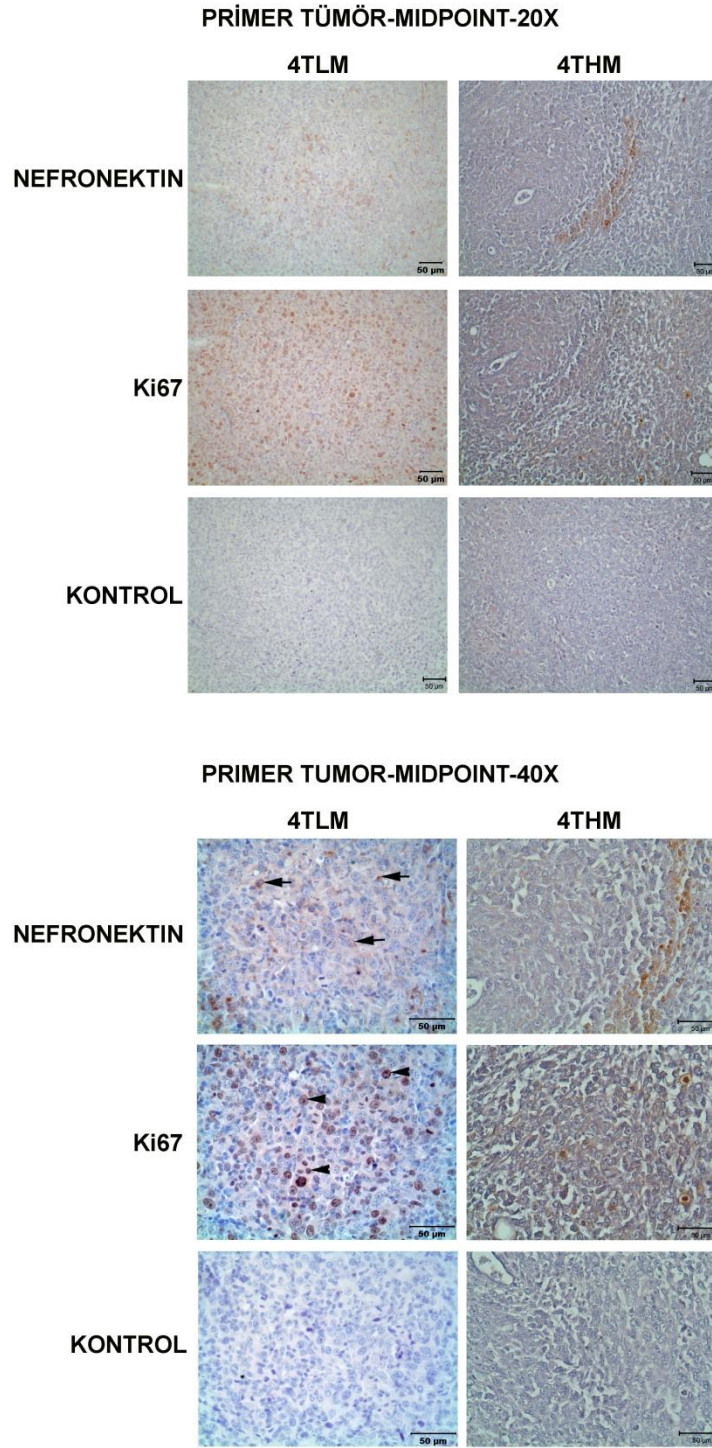
4.1. İmmünohistokimya Bulguları

3 hücre hattında (67NR, 4TLM ve 4THM) 12 ve 25. günlerde elde edilen primer tümör, karaciğer ve akciğer dokularında immün boyanmalar ayrı ayrı değerlendirildi.

4.1.1. Primer Tümör İmmün Boyanmaları

67NR, 4TLM ve 4THM primer tümörlerinde 12 ve 25. günlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları değerlendirildi.

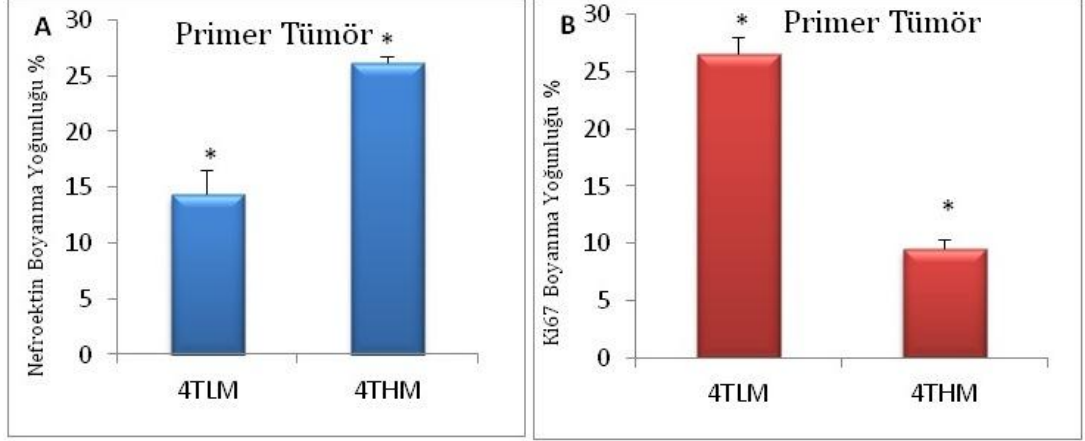
12. günde 67NR enjekte edilen farelerin tümörleri henüz çok küçük olduğundan bu tümörler değerlendirilemedi. 4TLM ve 4THM gruplarının immün boyanmalarında 4THM grubu primer tümörlerinde nefronektin boyanmasının daha yoğun olduğu gözlemlendi. Ki67 proteininin ise 4TLM grubunun tümörlerinde daha yoğun lokalize olduğu görüldü (Şekil 12).



Şekil 12: 12 günlük metastazdan sonra elde edilen primer tümörlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.

12 günlük metastaz sonucu elde edilen primer tümörlerde nefronektin ve Ki67 proteinlerinin immünohistokimya metodu sonucu elde edilen boyanma yoğunlukları Image J programı kullanılarak her hücre hattı için 5 farklı primer tümör örneğinden 10 alanın rastgele fotoğraflanmasıyla değerlendirildi. Nefronektin proteini için yoğun boyanmanın 4THM tümörlerinde olduğu ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Şekil 13-A).

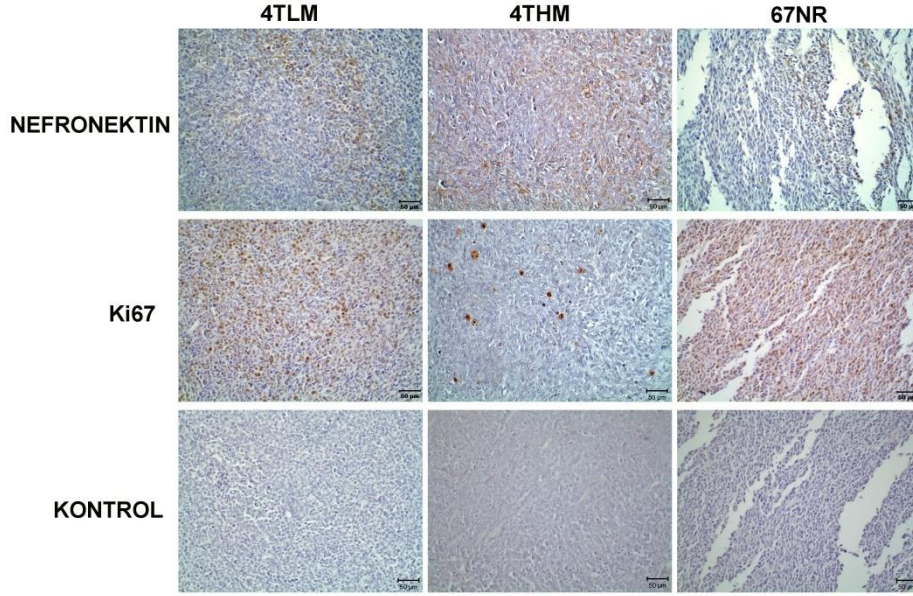
Ki67 proteini immün boyanmaları değerlendirildiğinde ise 4TLM grubunun primer tümörlerinde 4THM grubuna göre daha yoğun Ki67 boyanmasının istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 13-B).



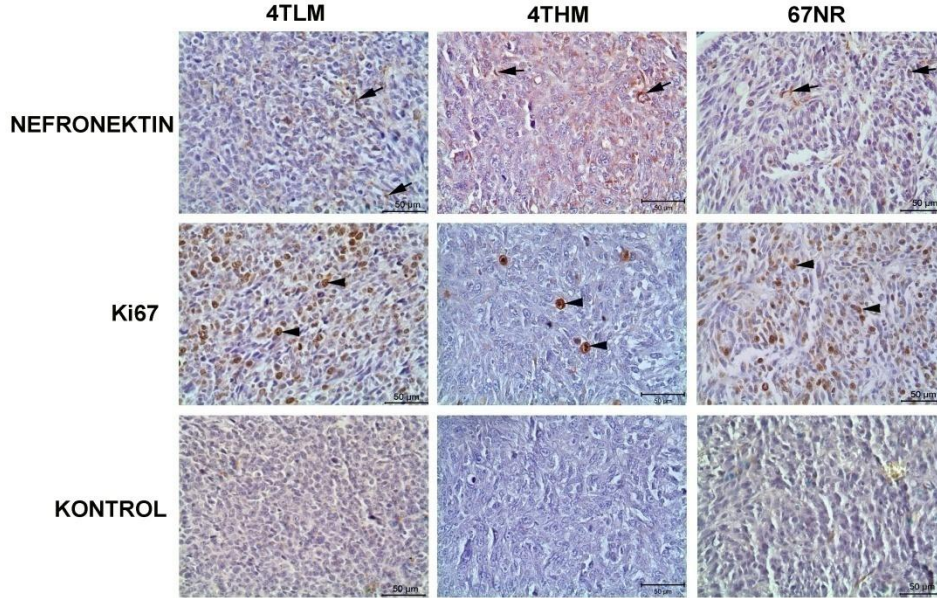
Şekil 13: 12 günlük metastaz sonucu elde edilen primer tümörlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

Tümör enjekte edildikten 25 gün sonra sakrifiye edilen farelerde de nefronektin immün reaksiyonunun, 4THM primer tümörlerinde, 67NR ve 4TLM primer tümörlerine oranla daha yoğun lokalize olduğu gözlemlendi. 4TLM ve 67NR primer tümörlerinde nefronektin immün reaksiyonları arasında bir fark görülmedi. Ki67 ise; 67NR ve 4TLM primer tümörlerinde yoğun olarak ekspres olmasına rağmen, 4THM primer tümörlerinde daha az ekspres olduğu gözlemlendi (Şekil14).

PRIMER TUMOR-ENDPOINT-20X



PRIMER TUMOR-ENDPOINT-40X

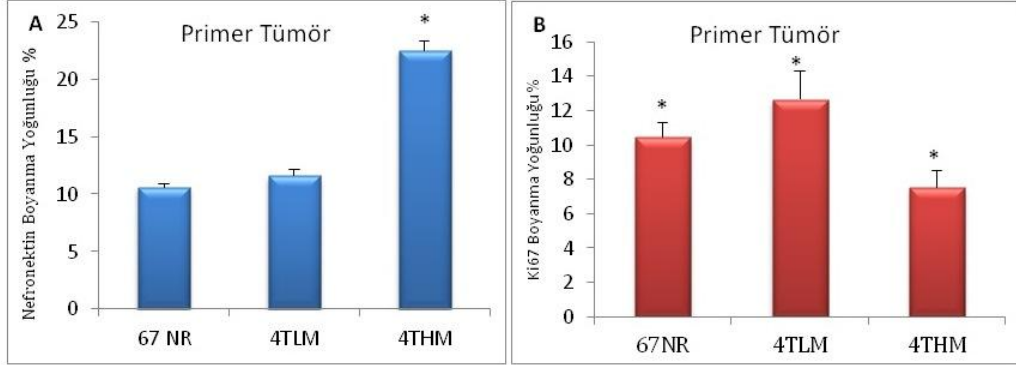


Şekil 14: 25 günlük metastazdan sonra elde edilen primer tümörlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.

25 günlük metastaz sonucu elde edilen primer tümörlerde nefronektin ve Ki67 proteinlerinin immünohistokimya metodu sonucu elde edilen boyanma yoğunlukları Image J programı kullanılarak her hücre hattı için 5 farklı primer tümör örneğinden 10 alanın rastgele fotoğraflanmasıyla değerlendirildi. Nefronektin proteini için 67NR, 4TLM ve 4THM primer tümörlerinde en yoğun boyanmanın 4THM tümörlerinde olduğu, 67NR ve 4TLM tümörlerinde boyanma şiddetinin ise birbirlerine yakın olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak 67NR ve

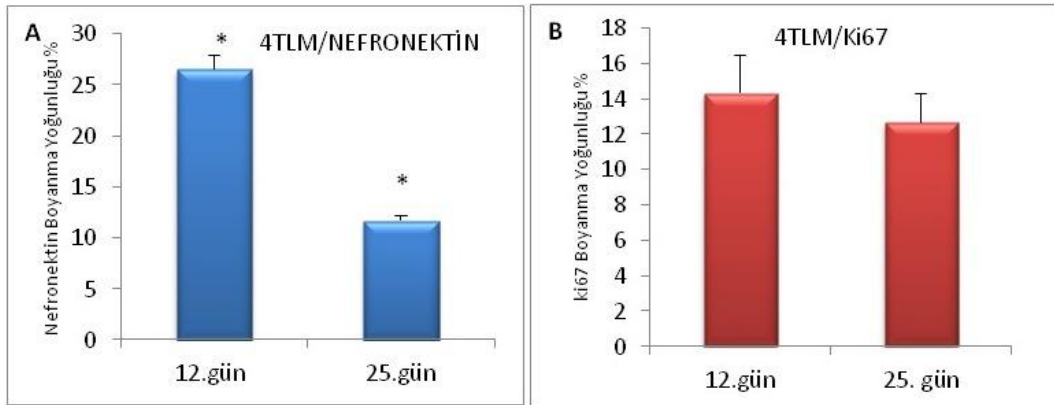
4THM primer tümörleri ile 4TLM ve 4THM primer tümörleri arasındaki farklılığın da ($p<0,05$) anlamlı olduğu gözlemlendi. Buna karşın 67NR ve 4TLM primer tümörleri arasındaki nefronektin düzeyi arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil15-A).

Ki67 proteinini immün boyanmaları değerlendirildiğinde, en yoğun boyanmanın 4TLM tümörlerinde olduğu, en az boyanma yoğunluğunun da 4THM tümörlerinde olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak 67NR, 4TLM ve 4THM primer tümörleri arasındaki Ki67 protein düzeyi farklılığının anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Şekil15-B).



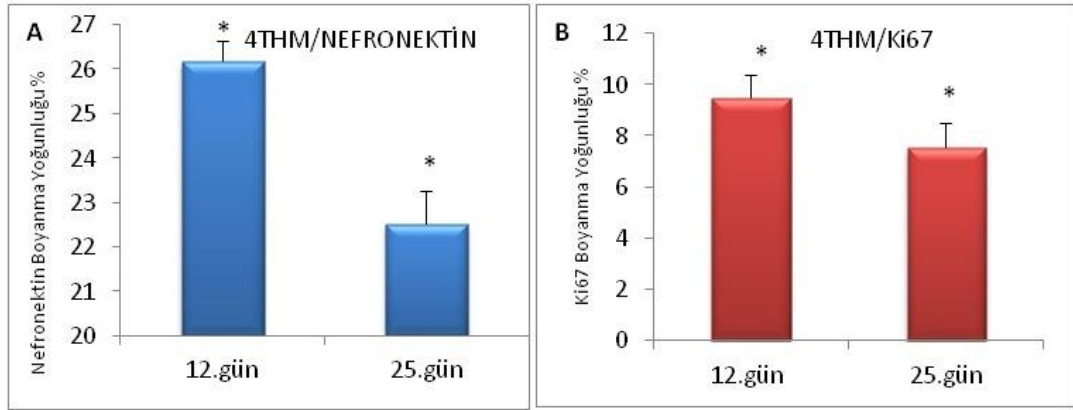
Şekil 15: 25 günlük metastaz sonucu elde edilen primer tümörlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4TLM hücre hattı enjekte edilen hayvanlardan alınan tümörlerde 12 ve 25 günlük metastaz süreçlerinde nefronektin proteininde 25. günde, 12. güne göre azalma olduğu bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 16-A) . Ancak Ki67 proteininin ekspresyonu değerlendirildiğinde 25. günde 12. güne göre azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) gözlemlendi (Şekil 16-B).



Şekil 16: 4TLM hücre hattından elde edilen primer tümörlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4THM hücre hattı enjekte edilen hayvanlardan alınan tümörlerde 12 ve 25 günlük metastaz süreçlerinde hem nefronektin, hem de Ki67 proteinlerinde 25. günde, 12. güne göre azalma olduğu bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil17 A-B).

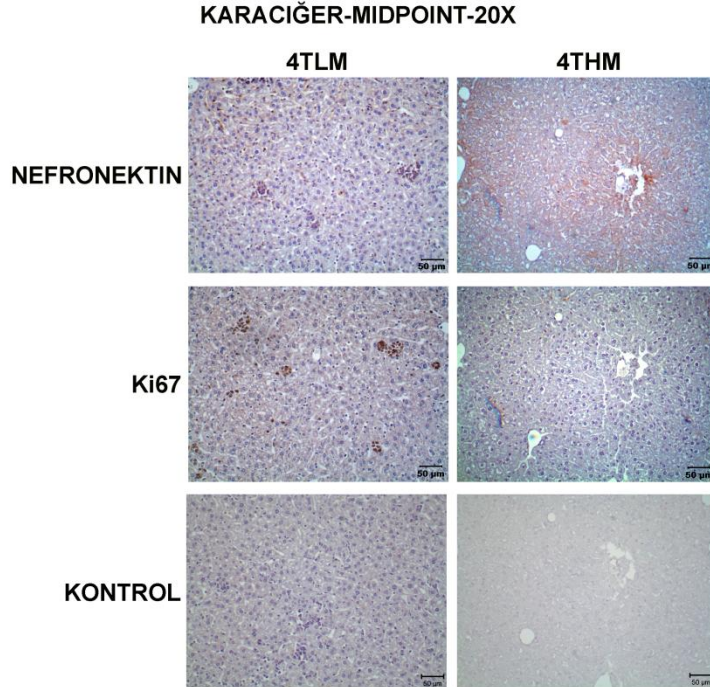


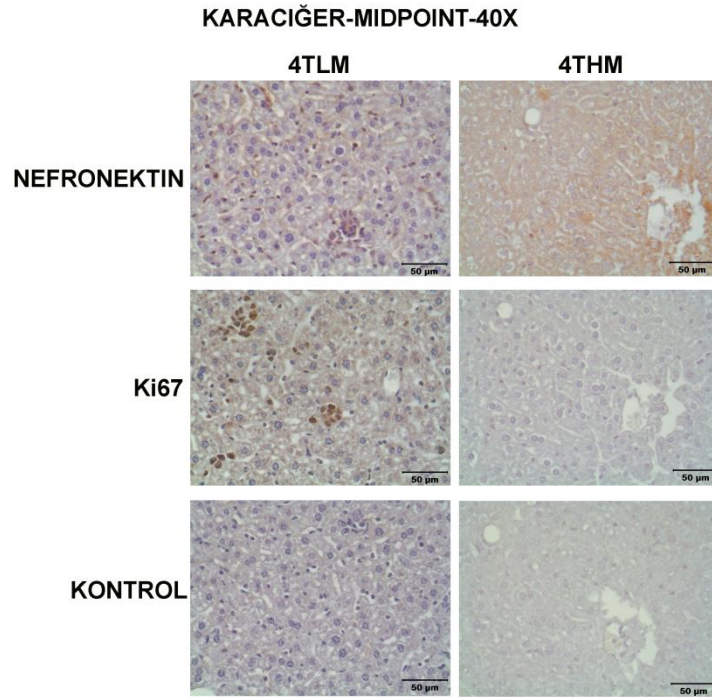
Şekil 17: 4THM hücre hattından elde edilen primer tümörlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4.1.2. Karaciğer İmmün Boyanmaları

4TLM ve 4THM gruplarından 12 gün ve 67NR, 4TLM ve 4THM gruplarından da 25. günün sonunda alınan karaciğerlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları değerlendirildi.

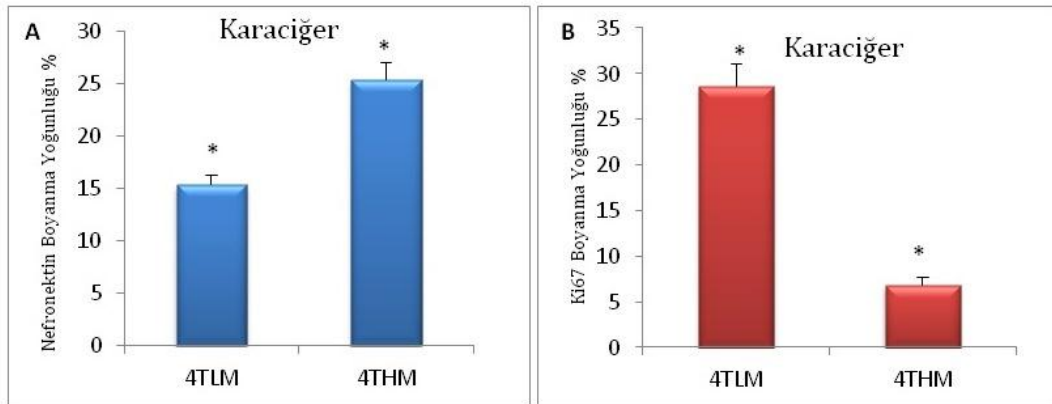
12. gün immün boyanmaları sonucunda 4THM grubunda nefronektin boyanmasının daha yoğun olduğu gözlemlendi. Ki67 boyanmasının ise 4TLM grubunda daha yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 18). Kontrol gruplarında ise herhangi bir immünoreaktiviteye rastlanmadı.





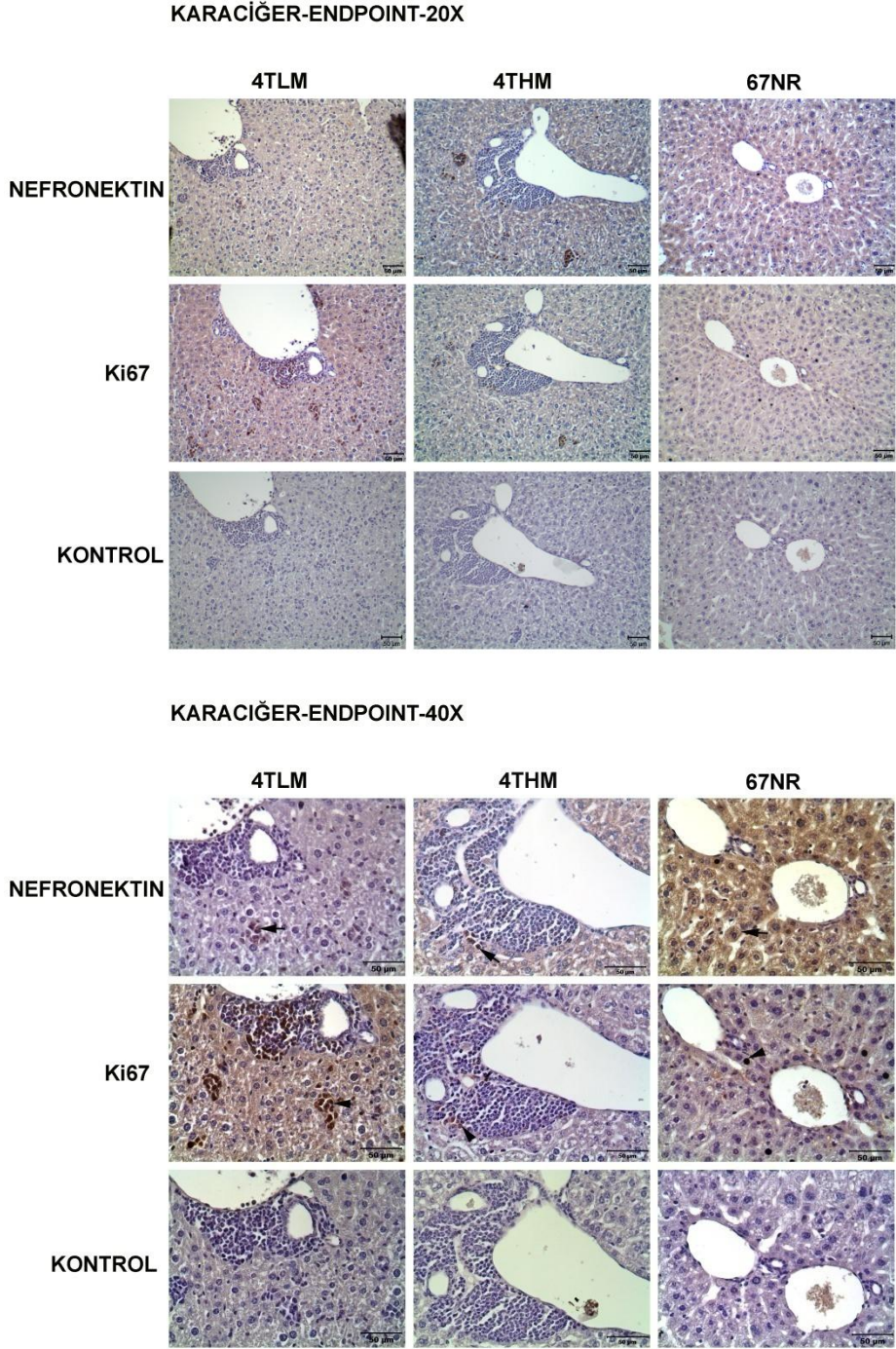
Şekil 18: 12 günlük metastazdan sonra elde edilen karaciğerlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.

12 günlük metastaz sonucu elde edilen karaciğerlerde nefronektin ve Ki67 proteinlerinin immünohistokimya metodu sonucu elde edilen boyanma yoğunlukları Image J programı kullanılarak her hücre hattı için 5 farklı karaciğer örneğinden 10 alanın fotoğraflanmasıyla değerlendirildi. Nefronektin proteini için 4TLM ve 4THM grupları arasında en yoğun boyanmanın 4THM karaciğerlerinde olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak 4TLM ve 4THM karaciğerleri arasındaki nefronektin düzeyi farklılığının anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 19-A). Aynı işlem Ki67 immünoreaktivitesi için de yapıldı ve immünoreaktivitenin ($p<0,05$) düzeyinde anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 19-B).



Şekil 19: 12 günlük metastaz sonucu elde edilen karaciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

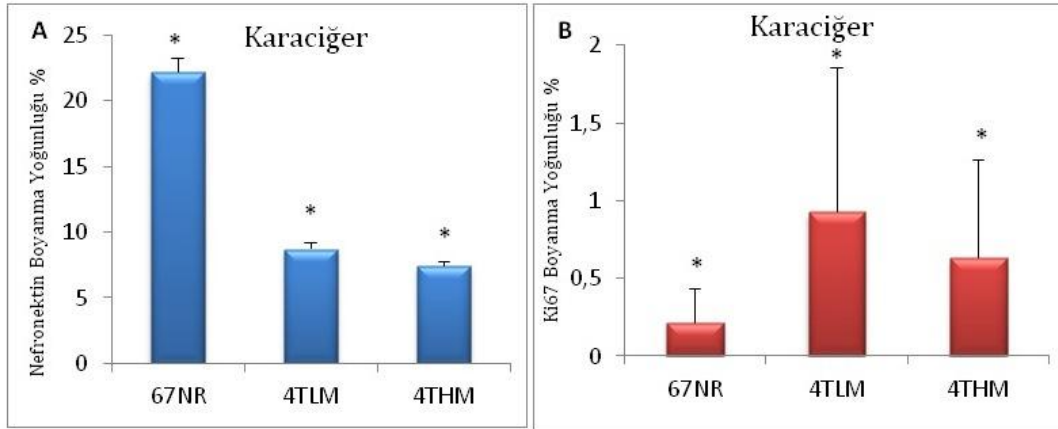
Tümör enjekte edildikten 25 gün sonra sakrifiye edilen farelerden alınan karaciğer dokularında nefronektin ekspresyonunun tümörün metastaz yaptığı alanlarda görülmediği tespit edildi. 67NR'de oldukça yoğun şekilde ekspresyon olurken 4TLM ve 4THM gruplarında daha az immünoreaksiyon gözlemlendi. Ki67 ekspresyonu metastatik alanlarda yoğun olarak gözlenmekteydi. Buna göre 4TLM'de daha yoğun gözlenen reaksiyon, 67NR'de ise eser miktardaydı (Şekil 20).



Şekil 20: 25 günlük metastazdan sonra elde edilen karaciğer dokusunda nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları. Ölçek 50µm.

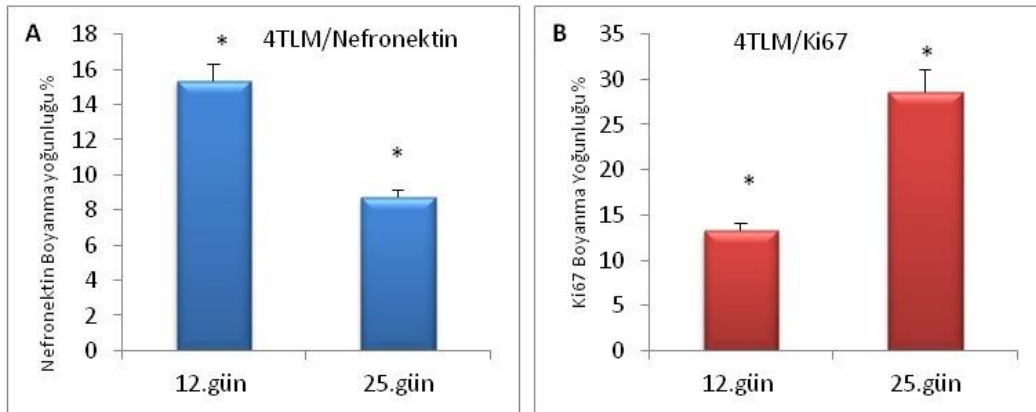
25 günlük metastaz sonucu elde edilen karaciğerlerde nefronektin ve Ki67 proteinlerinin immünohistokimya metodu sonucu elde edilen immün reaksiyonları Image J programı ile değerlendirildi. Nefronektin proteini için 67NR, 4TLM ve 4THM gruplarında en yoğun boyamanın 67NR karaciğerlerinde olduğu, 4THM grubunda ise 4TLM grubuna göre daha az boyanma şiddetinin olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak 67NR, 4TLM ve 4THM karaciğerleri arasındaki nefronektin düzeyindeki farklılığının anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 21-A).

67NR, 4TLM ve 4THM grupları arasındaki Ki67 yoğunluk farkının da istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Şekil 21-B).



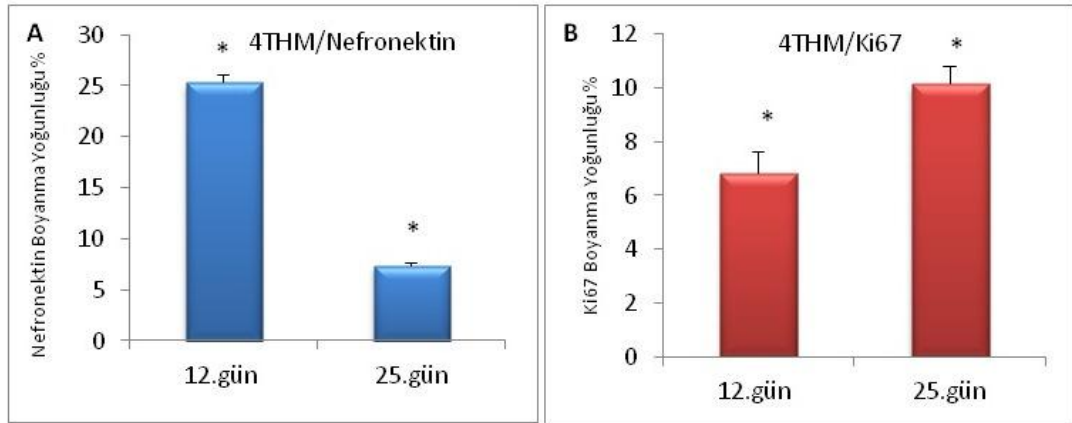
Şekil 21: 25 günlük metastaz sonucu elde edilen karaciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67(B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

4TLM hücre hattı enjekte edilen hayvanlardan alınan karaciğerlerde 12 ve 25 günlük metastaz süreçlerinde nefronektin proteininde 25. günde, 12. güne göre azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (şekil22-A). Ayrıca Ki67 proteinin ekspresyonu değerlendirildiğinde ise 12. günde 25. güne göre azaldığı gözlemlendi ve bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Şekil 22-B).



Şekil 22: 4TLM hücre hattından elde edilen karaciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4THM hücre hattı enjekte edilen hayvanlardan alınan karaciğerlerde 12 ve 25 günlük metastaz süreçlerinde nefronektin proteininde 4TLM'ye benzer şekilde; 25. günde, 12. güne göre azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 23-A). Ayrıca Ki67 proteininin ekspresyonu değerlendirildiğinde ise; 12. günde 25. güne göre azalma gözlemlendi ve bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Şekil 23-B).

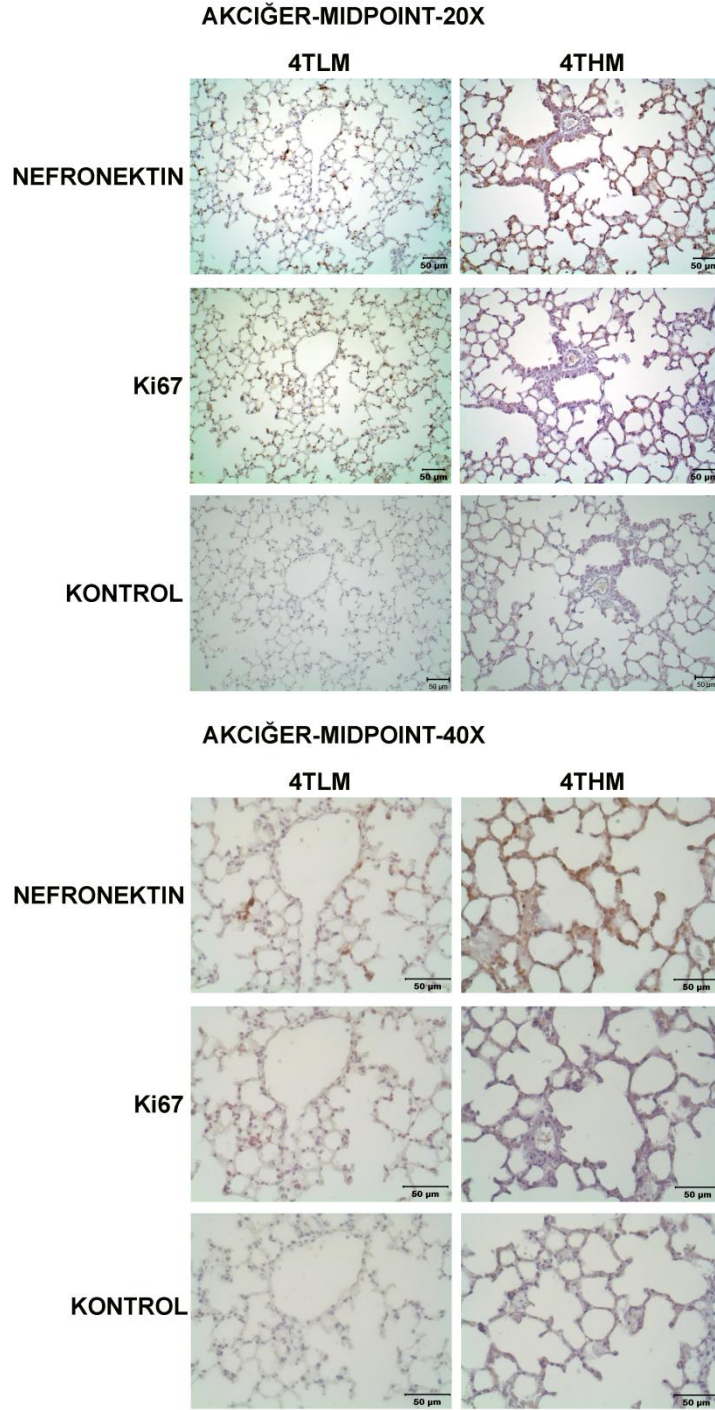


Şekil 23: 4THM hücre hattından elde edilen karaciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4.1.3. Akciğer İmmün Boyanmaları

67NR, 4TLM ve 4THM 12 ve 25. günlerin sonunda alınan gruplarından alınan akciğerlerde nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları değerlendirildi.

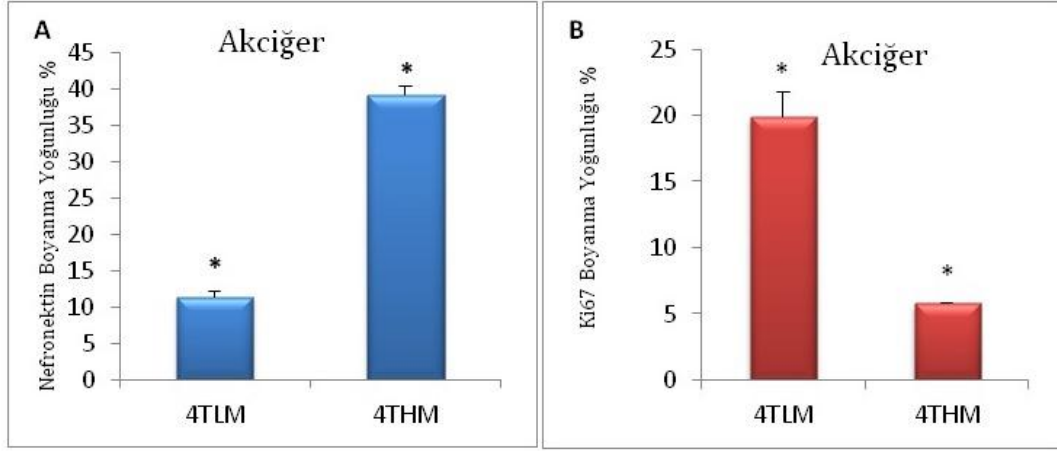
12. gün immün boyanmalarında 4THM grubunun akciğerlerinde nefronektin boyanması daha yoğun gözlemlendi. Bunun tersine, Ki67 immünoaktivitesi 4TLM grubunda daha yüksekti (Şekil 24).



Şekil 24: 12 günlük metastazdan sonra elde edilen akciğer dokusunda nefronektin ve Ki67 immün boyanmaları. Ölçek 50µm.

12 günlük metastaz sonucu elde edilen akciğerlerde nefronektin ve Ki67 proteinlerinin immünohistokimya metodu sonucu elde edilen boyanma yoğunlukları Image J programı kullanılarak her hücre hattı için 5 farklı akciğer örneğinden 10 alanın fotoğraflanmasıyla değerlendirildi. İstatistiksel olarak

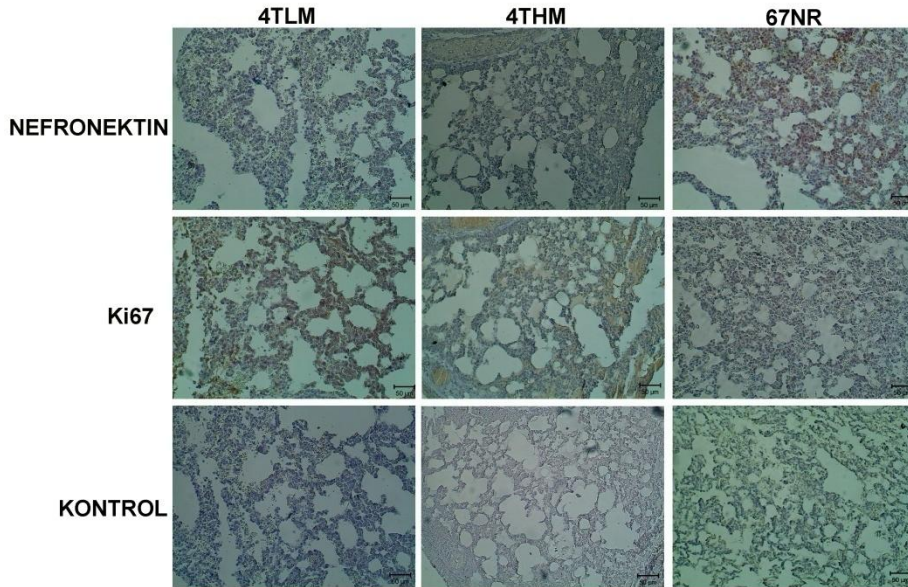
4TLM ve 4THM akciğerleri arasındaki nefronektin ve Ki67 düzeylerindeki farklılığının anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 25 A-B).

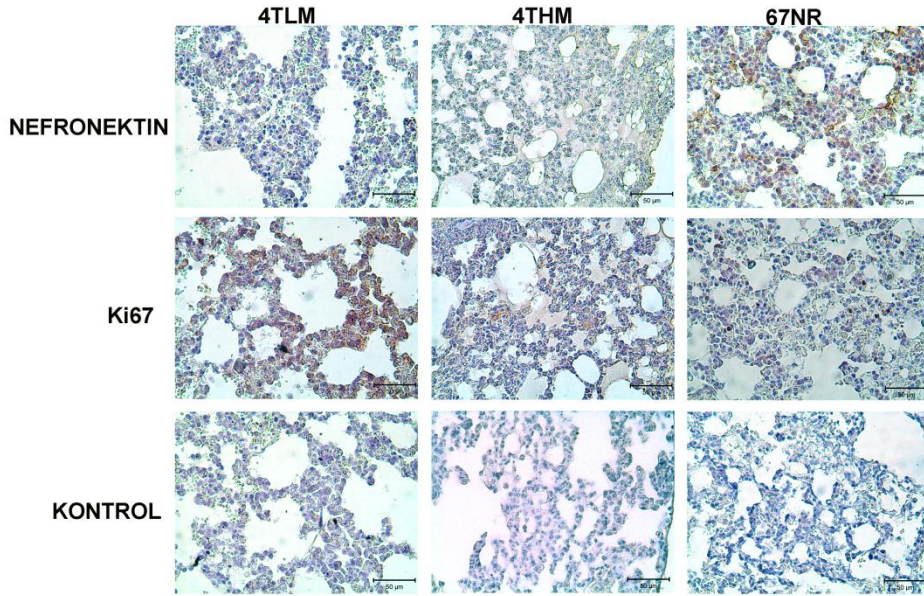


Şekil 25: 12 günlük metastaz sonucu elde edilen akciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

Tümör enjekte edildikten 25 gün sonra sakrifiye edilen farelerden alınan akciğer dokularında nefronektinin, 67NR grubunda oldukça yoğun ekspre olduğu gözlenirken, 4TLM ve 4THM gruplarında, özellikle metastazın yoğun gözlemlendiği alanlarda, az yoğunlukta bulunduğu gözlemlendi. Ki67'nin ise; 67NR grubunda 4THM ve 4TLM gruplarına oranla daha az ve zayıf ekspre olduğu gözlemlendi (Şekil 26).

AKCİĞER-ENDPOINT-20X

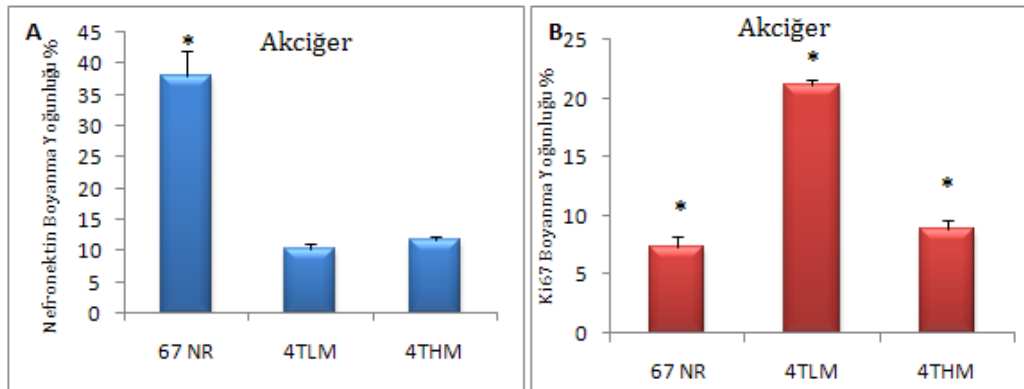




Şekil 26: 25 günlük metastazdan sonra elde edilen akciğer dokusunda nefronektin ve Ki67 immün boyanması. Ölçek 50µm.

25 günlük metastaz sonucu elde edilen akciğerlerde nefronektin ve Ki67 proteinlerinin immünohistokimya metodu sonucu elde edilen boyanma yoğunlukları Image J programı ile değerlendirildi. Nefronektin proteini için 67NR, 4TLM ve 4THM akciğerlerinde en yoğun boyanmanın 67NR akciğerlerinde olduğu, 4TLM ve 4THM akciğerlerindeki boyanma şiddetinin birbirlerine çok yakın olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak 67NR ile 4TLM ve 4THM akciğerleri arasındaki farklılığın anlamlı olduğu ($p<0,05$); 4TLM ve 4THM akciğerleri arasındaki farklılığın ise anlamlı olmadığı ($p>0,05$) gözlemlendi (Şekil 27-A).

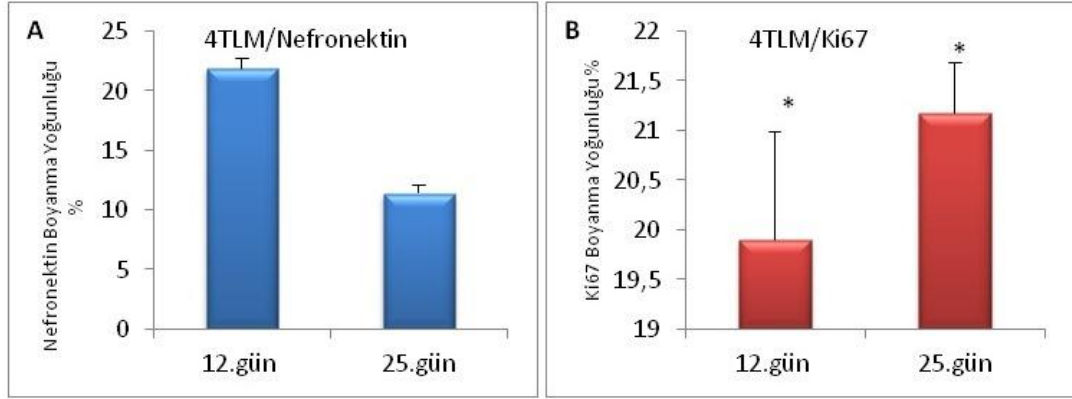
Ki67 proteininin için 67NR, 4TLM ve 4THM akciğerlerinde en yoğun boyanma şiddetinin 4TLM grubunda olduğu, en az boyanma şiddetinin de 67NR grubunda olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak 67NR, 4TLM ve 4THM primer tümörleri arasındaki farklılığın anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 27-B).



Şekil 27: 25 günlük metastaz sonucu elde edilen akciğerlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.

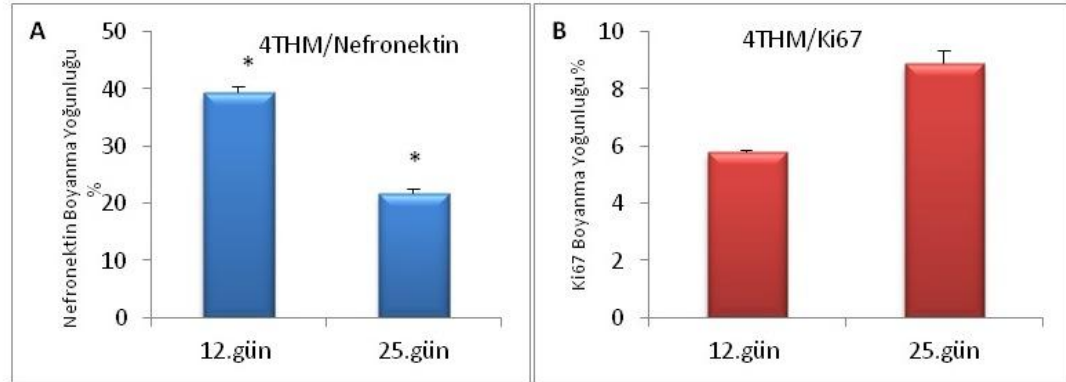
4TLM hücre hattı enjekte edilen hayvanlardan alınan akciğerlerde 12 ve 25 günlük metastaz süreçlerinde nefronektin proteininde 25. günde, 12. güne göre

azalma olduğu ama bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Şekil 28-A). Ki67 proteininin ekspresyonu değerlendirildiğinde ise; 12. günde 25. güne göre azalma gözlemlendi ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Şekil 28-B).



Şekil 28: 4TLM hücre hattından elde edilen akciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4THM hücre hattı enjekte edilen hayvanlardan alınan akciğerlerde 12 ve 25 günlük metastaz süreçlerinde nefronektin proteininde 25. günde, 12. güne göre azalma olduğu bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 29-A). Ki67 proteininin ekspresyonu değerlendirildiğinde ise; 12. günde, 25. güne göre azalma gözlemlendi ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) gözlemlendi (Şekil 29-B).



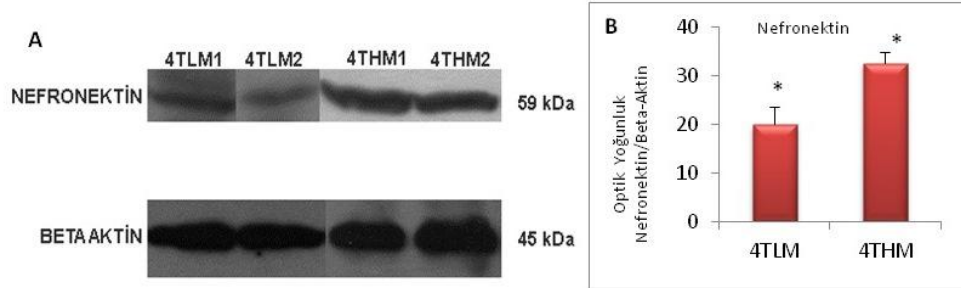
Şekil 29: 4THM hücre hattından elde edilen akciğerlerde 12 ve 25. günlerde nefronektin (A) ve Ki67 (B) proteinlerinin immün boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması.

4.2. Western Blot Bulguları

4.2.1. Primer Tümörlerde Nefronektin Ekspresyonu

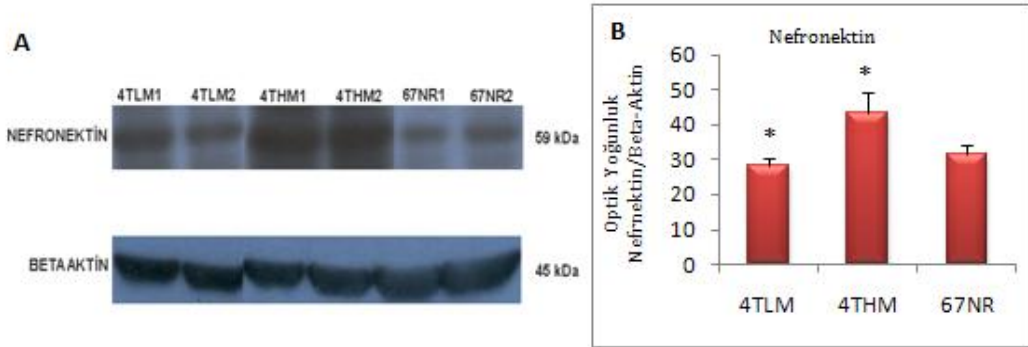
4TLM ve 4THM tümör hücre hatlarından elde edilen 12 ve 25 günlük tümörlerde ve 67NR hücre hattından elde edilen 25 günlük tümörlerde nefronektin ekspresyonları değerlendirildi.

12 günlük tümör gelişimi sonrasında 4TLM hücre hattında nefronektin ekspresyonunun 4THM grubuna göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 30-A). Bu azalmanın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 30-B).



Şekil 30: 12 günlük 4TLM ve 4THM primer tümörlerde nefronektin ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM ve 4THM tümörlerde nefronektin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (B).

25 günlük tümör gelişimi sonrasında ise 67NR ve 4TLM hücre hatlarında nefronektin ekspresyonunun; 4THM grubuna göre azaldığı görüldü (Şekil 31-A). Bu azalmanın 4THM ve 4TLM grupları arasında istatistiksel olarak da anlamlı olduğu; ancak 67NR grubundaki azalmanın diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği ($p>0,05$) bulundu (Şekil 31-B).

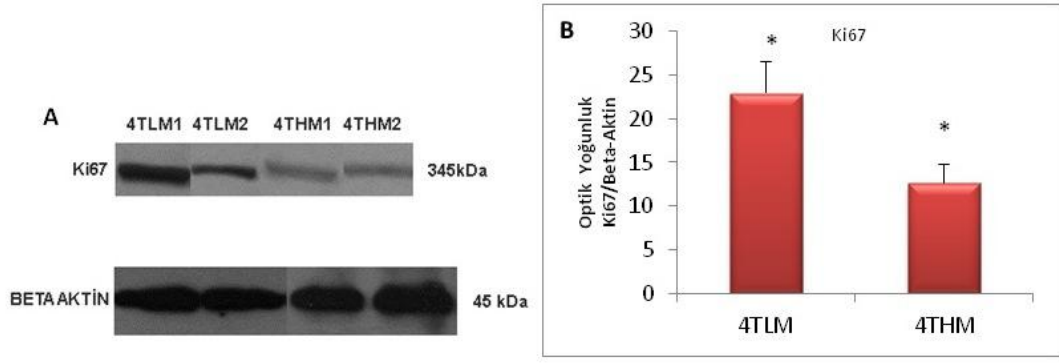


Şekil 31: 25 günlük 4TLM, 4THM ve 67NR primer tümörlerinde nefronektin ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM, 4THM ve 67NR tümörlerinde nefronektin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (B).

4.2.2. Primer Tümörlerde Ki67 Ekspresyonu

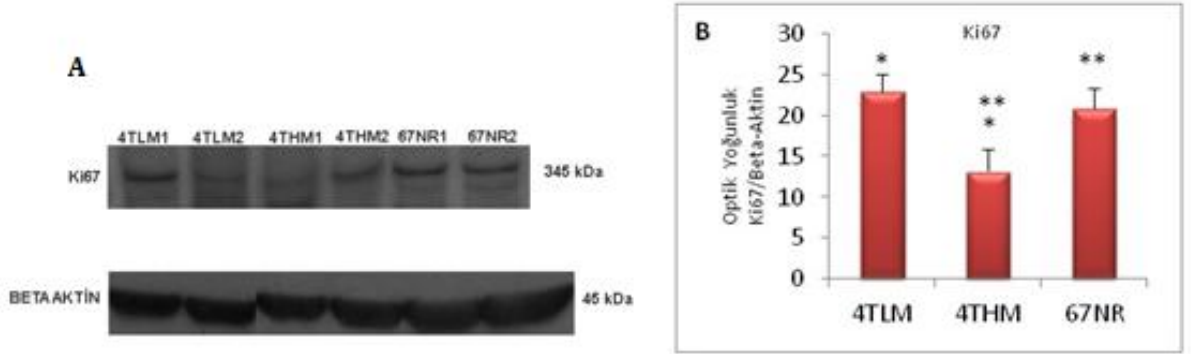
4TLM ve 4THM tümör hücre hatlarından elde edilen 12 ve 25 günlük tümörlerde ve 67NR hücre hattından elde edilen 25 günlük tümörlerde Ki67 ekspresyonları değerlendirildi.

12 günlük tümör gelişimi sonrasında 4THM hücre hattında Ki67 ekspresyonunun; 4TLM grubuna göre azaldığı görüldü (Şekil 32-A). Bu azalmanın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu ($p<0,05$) bulundu (Şekil 32-B).



Şekil 32: 12 günlük 4TLM ve 4THM primer tümörlerde Ki67 ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM ve 4THM tümörlerde Ki67 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (B).

25 günlük tümör gelişimi sonrasında ise 67NR ve 4THM hücre hatlarında Ki67 ekspresyonunun; 4TLM grubuna göre azaldığı görüldü (Şekil 33-A). Bu azalmanın 4THM ve 4TLM grupları arasında ve 4THM ve 67NR grupları arasında istatistiksel olarak da anlamlı olduğu; ancak 67NR ve 4TLM grubundaki azalmanın ise istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği ($p < 0,05$) bulundu (Şekil 33-B).



Şekil 33: 25 günlük 4TLM, 4THM ve 67NR primer tümörlerinde Ki67 ve beta aktin protein bantları (A) ve 4TLM, 4THM ve 67NR tümörlerinde Ki67 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmasını gösteren grafik (B).

TARTIŞMA

Meme kanseri; kadınlarda ölüme en çok sebebiyet veren kanser tipidir [91]. Meme kanseri hücrelerinin malignite özelliği kazanması ve metastaz yapma eğilimi de hastalığın ve tedavinin seyrini değiştiren önemli bir faktördür [92].

Tümör hücrelerinin metastaz sürecindeki ilk adımı bulundukları bölgedeki normal doku mimarisini bozup kendilerine yer edinmektir. Epitelial-mezenkimal geçişin yeniden düzenlenmesiyle metastaz için uygun ortam sağlanmış olur [92]. Bu düzenlenmede hücreler arası bağlantı molekülleri ve hücre dışı matriks elemanlarının formasyonunun değişmesi ya da kaybı söz konusudur [93]. Hücre dışı matriks elemanlarının kaybının metastazı teşvik ettiği önceki çalışmalarda belirtilmiştir [94, 95]. Çalışmamızda da bir hücre dışı matriks proteini olan nefronektinin rolü, Erin N. ve arkadaşlarının metastatik tümörlerde nefronektin gen ekspresyonunu düşük bulmaları fikrinden yola çıkılarak planlanmıştır [5]. Kullandığımız hücre hatlarından 4TLM'nin 4THM'ye göre daha metastatik olması nedeniyle hem bu 2 hücre hattının bulguları hem de metastatik yetenekte olmayan 67NR hücre hattının bulguları kıyaslanmaktadır [96].

Sonuçlarımıza göre, nefronektin, 67NR hücre hattından elde edilen dokularda 4TLM ve 4THM hücre hatlarından elde edilen dokulara göre da fazla yüksek düzeyde ekspre olmaktadır. Nefronektin bir adezyon molekülü olduğundan tümör agresif karakter kazanıp metastazı tetiklediğinde bu ve diğer bağlantı komplekslerini kopartıp daha kolay invaze olacaktır. Dolayısıyla en agresif hücre hattımız olan 4TLM'de nefronektin ekspresyonunun düşmesi tümörün kendine yer edinmesiyle açıklanabilir [96]. Sonuçlarımızda gördüğümüz 4TLM hücre hattının primer tümörlerindeki nefronektin proteininde azalma literatürle uyum göstermekte ve nefronektinin metastaz sürecinde etkin bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

Proliferasyon belirteci Ki67'nin; 4TLM hücre hattından elde edilen tümörlerde, metastatik olan 4THM ve metastatik olmayan 67NR hücre hatlarına göre daha yoğun lokalize olması yine literatürle örtüşen bir bulgudur [96].

Metastatik karakterde olmayan, ancak yüksek tümörojenik karakterde olduğu bilinen 67NR hücre hattında, 4THM hücre hattına göre daha yoğun görülen Ki67 ekspresyonu; bize tümörün metastatik yetenekte olmasa bile bulunduğu yerde tümör kitlesini genişletebilmek amacıyla proliferatif karaktere büründüğünü açıklamaktadır [97-99].

12. günde hayvanlardan alınan dokularda nefronektin ekspresyonu 25. güne göre daha fazla olarak bulundu. 12. günde tümör büyüklüğü 25. güne göre daha azdır ve 12. günde tümör hücreleri henüz metastatik olarak çok aktif değildirler. Ancak her iki zaman diliminde de nefronektin ekspresyonunun 4THM hücre hattı enjekte edilen primer tümörlerde daha yoğun gözlenmesinin sebebi bu hücre hattının 4TLM'ye nazaran daha az agresif olmasıyla açıklanabilir. Bu durum, 4TLM hücreleri enjekte edilen primer tümör alanında yer alan hücrelerin metastaz basamaklarına başlayıp EMG'yla hücre dışı dinamikleri etkileyip bozduğunun da bir işareti olabilir. Lu P. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hücre dışı matriksin tümör gelişim süresince yeniden düzenlendiğini ortaya çıkaran bulguları bizim bulgularımızla örtüşmektedir [73]. Ki67 ekspresyonunun da 25. günde daha yoğun gözlenmesi tümörün proliferasyona yönelik yeteneklerinin arttığına işaretir.

Meme kanserinin yoğun olarak akciğer ve karaciğere metastaz yapma özelliği olduğundan, tümörlü hayvanların akciğer ve karaciğerleri de çıkartılıp nefronektin ve Ki67 bakımından değerlendirilmiştir. Buna göre; metastazın yoğun olarak görüldüğü karaciğerde, 4TLM ve 4THM tümörü enjekte edilen hayvanların karaciğerlerinde metastazın şiddetine de bağlı olarak nefronektin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Bu ekspresyon şiddeti 25. günde daha da düşük bulunmuştur. Bu durum, dokunun kendini koruyamaması ve hücre dışı alanının malign hücrelerin istilasıyla bozulması şeklinde açıklanabilir. Bu durum metastatik alanların net olarak gözlemlendiği akciğer ve karaciğerde bu bölgelerde nefronektin ekspresyonunun kaybolmasıyla desteklenmektedir. Aslında tüm bunlar, malign bir tümörün metastaz yaptığı ortamda kendi mikroçevresini şekillendirmesiyle açıklanmaktadır [100, 101].

Karaciğerdeki Ki67 ekspresyonu ise literatürle uyumlu olarak proliferasyonu daha fazla olan 4TLM grubunda 4THM grubuna göre yoğun olarak bulunmuştur. 12. günde alınan örneklerde ise her iki grupta da metastazın oluştuğu 25. güne göre daha az Ki67 varlığının görülmesi tümör gelişiminin ilerleyen evrelerinde hücrelerin daha proliferatif olduklarının bir işaretidir.

67NR hücre hattı verilen gruplardan alınan akciğer ve karaciğer dokularında nefronektin ekspresyonu yoğun bulunmuştur. Bu durum metastaz yapma özelliği olmayan bu hücre hattında dokuların tümörle karşılaşmaması ve inflamatuvar yanıtın da hücre dışı alanı bozma yeteneğinde olmamasıyla açıklanabilir. Kısacası nefronektin, sadece metastaz sonrası malign hücrelerin mikroçevreyi şekillendirmelerinden etkilenmekte ve metastazla ilişkilendirilen bir protein olarak ortaya çıkmaktadır.

Eckhardt ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada nefronektinin metastatik tümör hücre hatları ve bu hatlardan elde edilen tümörlerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [81]. Bizde 67NR hücre hattından elde edilen primer tümörlerde nefronektinin hücre içinde de bir miktar lokalize

olduğunu gözlemledik. Bu durum bazı tümör hücrelerinin nefronektin ekspres edebileceğinin bir işareti olabilir. Tümör malign ise, metastaz sırasında bu proteinin hücre dışına salınarak; hücre dışı matriksde de etki gösterebileceğini düşündürmektedir. 67NR gibi birçok benign hücrenin metastatik karakter kazanamaması belki de nefronektin gibi bazı hücre dışı matriks proteinlerinin bu alanda bir bariyer oluşturması ve tümör hücresinin motiletilisini kısıtlamasıyla açıklanabilir.

Erin N. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada malignite kazanmış hücrelerde gen ekspresyon analizleri yapılmış ve nefronektin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [5]. Hücrelerde ve benzer şekilde hücre dışı matriksde olan bu azalma literatürde var olan çalışmalarla uyum göstermektedir.

Sonuç olarak; nefronektin proteini ekspresyonunda ileri metastatik hücre hatlarından elde edilen primer tümör ve metastazın sıklıkla görüldüğü akciğer ve karaciğer dokularında; metastatik alanlarda ve dokunun genelinde bir azalma görülmektedir. Bu durum, nefronektinin, hücre dışı matriks alanında doku dinamiğini korumaya yardımcı ve hücre dışı matriks düzenlenmesinde görevli bir matriks elemanı olduğu fikrini düşündürmektedir.

Çalışmamızda; nefronektin proteininin metastatik tümör hücre hatlarından elde edilen tümörlerde, metastazın yoğun olarak görüldüğü akciğer ve karaciğer organlarında, metastaz gerçekleşmeden önce ve metastazın ilerleyen aşamalarında dağılımı ve ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmeye çalışılmıştır. Metastatik tümörlerin metastazın sıklıkla görüldüğü organlarda nefronektin proteini ile ilgili daha önceden bir çalışma bulunmaması sebebiyle çalışmamız literatürdeki ilk çalışma olmaktadır.

Bir hücre dışı matriks protein olan nefronektinin; tümör gelişiminde hücre dışı matriks düzenlenmesinde görevli olabileceği bunun yanı sıra dokudaki kaybının metastazın gerçekleşmesini tetiklediği yönündeki bulgularımızla da tümör gelişimi, invazyonu ve metastazı süreçlerinde yeni bir bakış açısı yaratabileceği düşünülmektedir.

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, farelerden elde edilen 2 farklı metastatik meme kanseri hücre hattı ve ek olarak metastatik olmayan meme kanseri hücre hatlarında, bir hücre dışı matriks elemanı olan nefronektin ve proliferasyon belirteci Ki67'nin primer tümörlerde, metastazın sıklıkla görüldüğü akciğer ve karaciğer dokularındaki dağılımı araştırılmış ve olası görevleri hakkındaki düşüncelerimiz kaynak bilgiler yardımıyla tartışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde düzenlenmiştir.

1)Nefronektin proteini ekspresyonu metastatik hücre hatlarının primer tümörlerinde, metastazın yoğunluğuna bağlı olarak düşmektedir. Ayrıca metastazın görüldüğü 25. günde, metastazın henüz başlamadığı 12. güne kıyasla primer tümörlerde nefronektin ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir.

2)Karaciğer dokusunda nefronektin ekspresyonu; metastazın yoğun olduğu alanlarda gözlenmezken, tümörün metastatik karakteri arttıkça nefronektin proteininin azaldığı görülmüştür. Yine 12. günde alınan dokularda 25. güne göre daha fazla nefronektin ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir.

3)Akciğer dokusunda karaciğer ve primer tümörlere benzer şekilde, metastazın yoğunluğu arttıkça nefronektin ekspresyonunda azalma görülmüştür. 25. günde alınan dokularda 12. günle kıyaslandığında bir azalma tespit edilmiştir.

4)Ki67 proteini; metastatik hücre hatlarından elde edilen primer tümörlerde; metastazın yoğunluğu arttıkça artmaktadır. Metastatik olmayan hücre hatlarından elde edilen tümörlerde de ekspre edildiği görülmüştür. 12 günde alınan dokularda 25. güne kıyasla daha az yoğunlukta ekspre olduğu gözlenmiştir.

5)Karaciğer dokusunda metastazın gerçekleştiği alanlarda yoğun şekilde Ki67 ekspresyonu olduğu görülmüştür.

6)Akciğer dokusunda da daha yoğun metastaz yapan hücre hattından elde edilen dokularda Ki67 ekspresyonunun daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

7)Bu çalışma nefronektin proteininin, metastatik meme hücre hatlarından elde edilen doku ve organlarda metastaza bağlı olarak azaldığını gösteren ilk orijinal çalışmadır.

ÖZGEÇMİŞ

Sayra DİLMAÇ 1985 yılında Antalya’da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini 1999 yılında Fatmagül Özpınar İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini 2003 yılında Adem Tolunay Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda “Histoloji ve Embriyoloji” yüksek lisans programına başladı.

KAYNAKLAR

1. Kim, Y., M.A. Stolarska, and H.G. Othmer, *The role of the microenvironment in tumor growth and invasion*. Prog Biophys Mol Biol, 2011. **106**(2): p. 353-79.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2527-35.
4. Handan, O., *Tibbi Onkoloji*2005.
5. Erin, N., et al., *Altered gene expression in breast cancer liver metastases*. Int J Cancer, 2009. **124**(7): p. 1503-16.
6. Fang, L., et al., *Transforming growth factor-beta inhibits nephronectin-induced osteoblast differentiation*. FEBS Lett, 2010. **584**(13): p. 2877-82.
7. Brandenberger, R., et al., *Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin alpha8beta1 in the embryonic kidney*. J Cell Biol, 2001. **154**(2): p. 447-58.
8. Kuphal, S., S. Wallner, and A.K. Bosserhoff, *Loss of nephronectin promotes tumor progression in malignant melanoma*. Cancer Sci, 2008. **99**(2): p. 229-33.
9. Ponder, B.A., *Cancer genetics*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 336-41.
10. Chiang, A.C. and J. Massague, *Molecular basis of metastasis*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2814-23.
11. A, A.E., *4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücre hatlarında antianjiyogenik antitümoral ilaç olan endostatinin tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak anjiyogenik faktörlerden P maddesi ile P maddesini parçalayan neprilizin ve ADAM-10 enzimleri üzerine etkilerinin araştırılması*, in *Biology2010*, Akdeniz University.
12. Poste, G. and I.J. Fidler, *The pathogenesis of cancer metastasis*. Nature, 1980. **283**(5743): p. 139-46.
13. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
14. Moserle, L. and O. Casanovas, *Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance*. J Intern Med, 2013. **273**(2): p. 128-37.
15. McGee, S.F., et al., *Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression*. EMBO Rep, 2006. **7**(11): p. 1084-8.

16. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
17. Tammela, T., et al., *The biology of vascular endothelial growth factors*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 550-63.
18. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
19. Alitalo, K., T. Tammela, and T.V. Petrova, *Lymphangiogenesis in development and human disease*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 946-53.
20. Friesel, R.E. and T. Maciag, *Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 919-25.
21. Battegay, E.J., et al., *PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 917-28.
22. Cao, R., et al., *Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors*. FASEB J, 2002. **16**(12): p. 1575-83.
23. Gomes, F.G., et al., *Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms*. Life Sci, 2013. **92**(2): p. 101-7.
24. Weiss, A., et al., *Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1826**(1): p. 53-70.
25. Li, D.M. and Y.M. Feng, *Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **128**(1): p. 7-21.
26. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
27. Weinberg, R.A., *Mechanisms of malignant progression*. Carcinogenesis, 2008. **29**(6): p. 1092-5.
28. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-34.
29. Taube, J.H., et al., *Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15449-54.
30. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
31. Karnoub, A.E. and R.A. Weinberg, *Chemokine networks and breast cancer metastasis*. Breast Dis, 2006. **26**: p. 75-85.
32. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. Nature, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
33. Nguyen, D.X. and J. Massague, *Genetic determinants of cancer metastasis*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(5): p. 341-52.

34. Spano, D. and M. Zollo, *Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process*. Clin Exp Metastasis, 2012. **29**(4): p. 381-95.
35. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
36. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
37. Egeblad, M., E.S. Nakasone, and Z. Werb, *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism*. Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 884-901.
38. Coffelt, S.B., et al., *Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1564-76.
39. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
40. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
41. Poschke, I., D. Mougiakakos, and R. Kiessling, *Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(8): p. 1161-71.
42. Pollard, J.W., *Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 623-30.
43. Solinas, G., et al., *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1065-73.
44. Lin, E.Y., et al., *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 727-40.
45. Bingle, L., et al., *Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo*. Br J Cancer, 2006. **94**(1): p. 101-7.
46. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
47. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
48. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 49-59.
49. Yang, L. and H.L. Moses, *Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer?* Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9107-11.
50. Bourboulia, D. and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(3): p. 161-8.
51. Stetler-Stevenson, W.G., S. Aznavoorian, and L.A. Liotta, *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 541-73.

52. Koshikawa, N., et al., *Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5*. J Cell Biol, 2000. **148**(3): p. 615-24.
53. Xu, J., et al., *Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 1069-79.
54. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. **85**(5): p. 683-93.
55. Noe, V., et al., *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 1): p. 111-118.
56. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 201-12.
57. Brew, K. and H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 55-71.
58. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 834-46.
59. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
60. Barkan, D., J.E. Green, and A.F. Chambers, *Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth*. Eur J Cancer, 2010. **46**(7): p. 1181-8.
61. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 342-52.
62. White, D.E., J.H. Rayment, and W.J. Muller, *Addressing the role of cell adhesion in tumor cell dormancy*. Cell Cycle, 2006. **5**(16): p. 1756-9.
63. Barkan, D., et al., *Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6241-50.
64. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
65. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell, 2005. **121**(3): p. 335-48.
66. Quante, M., et al., *Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth*. Cancer Cell, 2011. **19**(2): p. 257-72.
67. Singer, N.G. and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 457-78.
68. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.

69. Chiodoni, C., M.P. Colombo, and S. Sangaletti, *Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 295-307.
70. Wong, G.S. and A.K. Rustgi, *Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis*. Br J Cancer, 2013. **108**(4): p. 755-61.
71. Wikman, H., et al., *Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array*. Oncogene, 2002. **21**(37): p. 5804-13.
72. Kwon, Y.J., et al., *Expression patterns of aurora kinase B, heat shock protein 47, and periostin in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncol Res, 2009. **18**(4): p. 141-51.
73. Lu, P., V.M. Weaver, and Z. Werb, *The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression*. J Cell Biol, 2012. **196**(4): p. 395-406.
74. Linton, J.M., G.R. Martin, and L.F. Reichardt, *The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin alpha8beta1-mediated stimulation of Gdnf expression*. Development, 2007. **134**(13): p. 2501-9.
75. Abu-Daya, A., et al., *The secreted integrin ligand nephronectin is necessary for forelimb formation in Xenopus tropicalis*. Dev Biol, 2011. **349**(2): p. 204-12.
76. Patra, C., et al., *Nephronectin regulates atrioventricular canal differentiation via Bmp4-Has2 signaling in zebrafish*. Development, 2011. **138**(20): p. 4499-509.
77. Sato, Y., et al., *Nephronectin binds to heparan sulfate proteoglycans via its MAM domain*. Matrix Biol, 2013. **32**(3-4): p. 188-95.
78. Sato, Y., et al., *Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1*. J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14524-36.
79. Sanchez-Cortes, J. and M. Mrksich, *Using self-assembled monolayers to understand alpha8beta1-mediated cell adhesion to RGD and FEI motifs in nephronectin*. ACS Chem Biol, 2011. **6**(10): p. 1078-86.
80. Muller, U., et al., *Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis*. Cell, 1997. **88**(5): p. 603-13.
81. Eckhardt, B.L., et al., *Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(1): p. 1-13.
82. Iatropoulos, M.J. and G.M. Williams, *Proliferation markers*. Exp Toxicol Pathol, 1996. **48**(2-3): p. 175-81.
83. Kontzoglou, K., et al., *Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis*. Oncology, 2013. **84**(4): p. 219-25.
84. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int J Cancer, 1983. **31**(1): p. 13-20.
85. Schluter, C., et al., *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 513-22.

86. Duchrow, M., et al., *Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67*. Cell Prolif, 1996. **29**(1): p. 1-12.
87. Nicolini, A., A. Carpi, and G. Tarro, *Biomolecular markers of breast cancer*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1818-43.
88. Harper-Wynne, C., et al., *Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: a pilot study for breast cancer prevention*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(7): p. 614-21.
89. Goodson, W.H., 3rd, et al., *The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **59**(2): p. 113-23.
90. Kushlinskii, N.E., et al., *Expression of biomolecular markers (Ki-67, PCNA, Bcl-2, BAX, BclX, VEGF) in breast tumors*. Bull Exp Biol Med, 2004. **137**(2): p. 182-5.
91. Castano, Z., K. Tracy, and S.S. McAllister, *The tumor macroenvironment and systemic regulation of breast cancer progression*. Int J Dev Biol, 2011. **55**(7-9): p. 889-97.
92. Fidler, I.J., *Critical determinants of metastasis*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(2): p. 89-96.
93. Yao, D., C. Dai, and S. Peng, *Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(12): p. 1608-20.
94. Ota, I., et al., *Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20318-23.
95. Bonnomet, A., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 261-73.
96. Erin, N., et al., *Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **139**(3): p. 677-89.
97. Dexter, D.L., et al., *Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor*. Cancer Res, 1978. **38**(10): p. 3174-81.
98. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. Cancer Res, 1992. **52**(6): p. 1399-405.
99. Nagler, C., et al., *Co-cultivation of murine BMDCs with 67NR mouse mammary carcinoma cells give rise to highly drug resistant cells*. Cancer Cell Int, 2011. **11**(1): p. 21.
100. Bussard, K.M., C.V. Gay, and A.M. Mastro, *The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone?* Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 41-55.
101. Marsden, C.G., et al., *Disseminated breast cancer cells acquire a highly malignant and aggressive metastatic phenotype during metastatic latency in the bone*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e47587.

