



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

**REKOMBİNANT HEAT SHOCK-70 İLE İMMUNİZASYONUN
MEME KANSER MODELİNDE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Şerife TAŞAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR-2024

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

**REKOMBİNANT HEAT SHOCK-70 İLE İMMUNİZASYONUN
MEME KANSER MODELİNDE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
METOTLARLA ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Şerife TAŞAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0876-DR-23 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2024

KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Şerife TAŞAN tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan “*Rekombinant Heat Shock-70 ile İmmünizasyonun Meme Kanseri Modelinde Etkilerinin Moleküler Metotlarla Araştırılması*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Patoloji Anabilim Dalında *Doktora Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.08.2024

Prof. Dr. Ahmet AYDOĞAN
Çukurova Üniversitesi
Ceyhan Veteriner Fakültesi
Patoloji AD
Başkan

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Patoloji AD
Jüri

Doç. Dr. Volkan İPEK
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Patoloji AD
Jüri

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

Jüri

Doç. Dr. Hidayet TUTUN
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD
Jüri

ONAY

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

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi sırasında, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, beni yüreklendiren, güler yüzünü, samimiyetini benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşarak yön veren hocalarım sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a, sayın Doç. Dr. Volkan İPEK'e ve Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ'ye, ayrıca Patoloji Anabilim Dalı bünyesinde birlikte çalıştığım tüm yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim. Tez çalışmamın deneysel sürecine katkılarından dolayı kıymetli hocam Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e ve sayın Öğr. Gör. Dr. Uğur ŞAHİN'e teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamın hem deneysel sürecinde hem de tez yazım aşamasında benden yardım ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Adem MİLLETSEVER'e teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca her daim yanımda ve en büyük desteğim olan ailem Ayşe AĞIRCA, Hüseyin AĞIRCA, Muhammet AĞIRCA ve sevgili eşim Osman TAŞAN'a çok teşekkür ederim.

ETİK BEYAN

“Rekombinant Heat Shock-70 ile İmmünizasyonun Meme Kanseri Modelinde Etkilerinin Moleküler Metotlarla Araştırılması” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özlem ÖZMEN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Şerife TAŞAN

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	<i>i</i>
KABUL VE ONAY SAYFASI	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
ETİK BEYAN SAYFASI	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER	<i>viii</i>
TABLolar	<i>xi</i>
SİMGELER ve KISALTMALAR	<i>xii</i>
ÖZET	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tümörlerin Özellikleri	2
2.1.1. Tümör-Stromal Etkileşimler	3
2.2. Meme Bezi	3
2.2.1. Meme Bezinin İlkel Yapısı ve Gelişimi	4
2.2.2. Meme Bezinin Anatomisi ve Histolojisi	5
2.3. Meme Tümörleri	6
2.3.1. Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması	8
2.3.2. Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflandırılması	9
2.3.2.1. Luminal A Alt Tip	10
2.3.2.2. Luminal B Alt Tip	10
2.3.2.3. HER2+ Alt Tip	11
2.3.2.4. Bazal Benzeri Meme Kanseri (BLBC)-Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC)	11
2.3.3. Meme Tümör Mikro Çevresi	12
2.3.4. Meme Tümör İmmunolojisi	14
2.3.4.1. Tümör İmmunolojisinin Düzenlenmesi	14
2.3.4.2. İmmün Gözetim	15
2.3.4.3. Miyeloid Hücreler	15
2.3.4.4. Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAM'lar)	15
2.3.4.5. Tümöre İnfiltrat Olan Lenfositler (TIL'ler)	17
2.3.4.6. Nötrofiller	18
2.3.4.7. Doğal Öldürücü Hücreler (NK)	18
2.3.4.8. Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler (MDSC'ler)	19
2.3.5. Anti-tümör Etkör Mekanizmaları	19
2.3.6. Tümör Kaçış Mekanizmaları	20
2.4. Meme Tümörü Hayvan Modelleri	21
2.4.1. Spontan Modelleri	22
2.4.2. İndüklenmiş Modelleri	23
2.4.2.1. Kimyasal İndüksiyon Yöntemi	23
2.4.2.2. Fiziksel İndüksiyon Yöntemi	23
2.4.2.3. Biyolojik İndüksiyon Yöntemi	24
2.4.3. Transplantasyon Hayvan Tümör Modelleri	24

2.4.3.1. Allogreft Tümör Modeli	25
2.4.3.2. Ksenogreft Tümör Modeli	26
2.4.4. Genetik Olarak Tasarlanan Hayvan Modelleri (GEMM'ler)	27
2.5. Meme Tümörlerinde Tanı ve Prognostik Biyobelirteçler	28
2.5.1. Ki-67	29
2.5.2. PCNA	31
2.5.3. CD-31	31
2.5.4. HSP-70	31
2.6. Heat Shock Proteinler (HSP'ler)	32
2.6.1. HSP-70'nin Kanserdeki Rolü	35
2.6.1.1. HSP-70 ve Tümör Bağışıklığı	35
2.6.1.2. HSP-70 ve Apoptozis	36
2.7. Rekombinant DNA Teknolojisi (RDT)	37
2.7.1. Tanımlamalar	38
2.7.2. Rekombinant DNA'nın Üretimi	38
2.7.3. DNA İzolasyonu	39
2.7.4. Rekombinant DNA'nın Çoğaltılması	40
2.7.5. Rekombinant DNA Teknolojisinin Kullanım Alanları	41
3. GEREÇ ve YÖNTEM	42
3.1. HSP-70'in Rekombinant Olarak Üretilmesi	42
3.1.1. Plazmid İzolasyonu	42
3.1.2. Kompetent Hücre Hazırlama	42
3.1.3. Plazmid Transformasyonu	43
3.1.4. İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) ile Protein İndüksiyonu Deneyi	44
3.1.5. İndüksiyon Testi	45
3.1.6. Protein Saflaştırılması (Purifikasyon)	45
3.1.7. SDS-PAGE Jelde Yürütme	45
3.2. <i>In vivo</i> Çalışmalar	48
3.2.1. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattının Hazırlanması	48
3.2.2. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması	49
3.2.3. DeneySEL Tasarım ve Deney Hayvanlarının Bakımı	50
3.2.4. Hayvan Ağırlıklarının Takibi ve Tümör Boyutlarının Ölçümü	53
3.3. <i>In vitro</i> Çalışmalar	54
3.3.1. Primer Tümör Dokularının Toplanması ve Ağırlıklarının Ölçümü	54
3.4. Histopatoloji Yöntemi ile Değerlendirme	55
3.4.1. Hematoksilen- Eozin Boyama	57
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirme	57
3.5.1. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü	59
3.5.1.1. Isıtma ve Deparafinize Etme	59
3.5.1.2. Antijen Açığa Çıkarma (Antijen Retrieval-AR)	59
3.5.1.3. İmmunohistokimyasal Boyama	60
3.5.2. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi	61
3.5.2.1. Ki-67 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	61
3.5.2.2. CD-31 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	62
3.5.2.3. PCNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	62

3.5.2.4. HSP70 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	63
3.6. Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	63
3.6.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması	63
3.6.2. RNA İzolasyonu	64
3.6.3. c-DNA Sentezi	65
3.6.4. Primer Dizaynı	67
3.6.4.1. Primerlerin Optimizasyonu	68
3.6.6. Real-Time qPCR	68
3.6.7. Rölatif Kantitasyon Hesaplanması	69
3.7. İstatistiksel Hesaplamalar	70
4. BULGULAR	71
4.1. Makroskobik Bulgular	71
4.1.1. Hayvanların Canlı Ağırlıklarında Zamana Bağlı Değişimler	72
4.1.2. Primer Tümörün Ağırlığı, Primer Tümörün Günlük Hacim Değişimi	73
4.2. Mikroskobik Bulgular	76
4.2.1. Histopatolojik Bulgular	76
4.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	83
4.2.2.1. Ki-67 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	83
4.2.2.2. CD-31 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	88
4.2.2.3. PCNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	93
4.2.2.4. HSP-70 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	98
4.3. Gen Ekspresyonu Bulguları	103
4.3.1. Real-Time PCR Bulguları	103
5. TARTIŞMA	105
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	126
KAYNAKLAR	128
ÖZGEÇMİŞ	145

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	Kompetent hücre hazırlama aşamaları	43
Şekil 3.2.	Plazmid transformasyonu aşamaları	44
Şekil 3.3.	Protein saflaştırma işleminin yapılışı	46
Şekil 3.4.	SDS-PAGE jelde yürütme deneyi	48
Şekil 3.5.	4T1 meme kanseri hücre hattı inokulasyonu ile meme kanseri modelinin oluşturulması	49
Şekil 3.6.	Meme kanseri modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi	50
Şekil 3.7.	Deney gruplarının dizaynının şematik gösterimi	52
Şekil 3.8.	Hayvanların ağırlık takibi ve tümör boyut ölçümünün şematik gösterimi	54
Şekil 3.9.	Tümör boyutlarının dijital kumpas kullanılarak ölçümü	54
Şekil 3.10.	Homojenize edilen tümör dokuları	64
Şekil 3.11.	mRNA izolasyonu aşamaları	65
Şekil 3.12.	mRNA miktar tayini testi	65
Şekil 3.13.	c-DNA sentez kiti	66
Şekil 3.14.	Real-Time qPCR analizi BIO RAD marka CFX96™ Real Time System PCR cihazı	69
Şekil 4.1.	Çalışma gruplarına ait makroskobik görünüm	71
Şekil 4.2.	Hayvanların canlı ağırlık analizi sonuçları	72
Şekil 4.3.	Hayvanların zamana bağlı canlı ağırlık değişim grafiği	72
Şekil 4.4.	Grupların primer tümör ağırlık analizi sonuçları	73
Şekil 4.5.	Primer tümörün zamana bağlı hacim değişim analizi sonuçları	74
Şekil 4.6.	Primer tümörün zamana bağlı hacim değişim analizi sonuçları	74
Şekil 4.7.	Primer tümörün zamana bağlı hacim değişim analizi sonuçları	75
Şekil 4.8.	Primer tümör ağırlığı ve hacmi arasındaki korelasyon grafiği	75
Şekil 4.9.	4T1-Tümör grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü	76
Şekil 4.10.	4T1-Tümör grubundakitümör dokusunun büyük büyütmedeki histopatolojik görünümü	77
Şekil 4.11.	0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü	77
Şekil 4.12.	0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunda bağ doku artışının yakından görünümü	78
Şekil 4.13.	1 µg HSP70 Proflaksi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü	78
Şekil 4.14.	1 µg HSP70 Proflaksi grubunda bir farenin tümör dokusunun büyütülmüş histopatolojik görünümü	79
Şekil 4.15.	0,5 µg HSP70 Tedavi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü	79
Şekil 4.16.	0,5 µg HSP70 Tedavi grubunda tümör dokusunun büyük büyütmedeki histopatolojik görünümü	80
Şekil 4.17.	1 µg HSP70 Tedavi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü	80
Şekil 4.18.	1 µg HSP70 Tedavi grubunda bir farenin tümör dokusunun büyük büyütmedeki histopatolojik görünümü	81

Şekil 4.19.	Gruplara göre tümör dokusunun histopatolojik görünümü	81
Şekil 4.20.	Gruplara göre tümör dokusunun histopatolojik görünümü	82
Şekil 4.21.	Gruplara göre tümör dokusunun karşılaştırmalı histopatolojik görünümü	82
Şekil 4.22.	4T1-Tümör grubunun tümör dokusuna ait yoğun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	84
Şekil 4.23.	0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	84
Şekil 4.24.	1 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	85
Şekil 4.25.	0,5 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait belirgin şekilde azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	85
Şekil 4.26.	1 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait belirgin şekilde azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	86
Şekil 4.27.	Çalışma gruplarında tümör dokularına ait Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü	87
Şekil 4.28.	Primer tümör hücrelerinde Ki-67 ekspresyonunun değerlendirilmesi	88
Şekil 4.29.	4T1-Tümör grubunun tümör dokusuna ait belirgin CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	89
Şekil 4.30.	0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	89
Şekil 4.31.	1 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalış CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	90
Şekil 4.32.	0,5 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	90
Şekil 4.33.	1 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	91
Şekil 4.34.	Çalışma gruplarında tümör dokularına ait CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü	92
Şekil 4.35.	Primer tümör hücrelerinin CD-31 ekspresyon değerlendirilmesi	93
Şekil 4.36.	4T1-Tümör grubunun tümör dokusuna ait şiddetli PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	94
Şekil 4.37.	0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait belirgin şekilde azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	95
Şekil 4.38.	1 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	95
Şekil 4.39.	0,5 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	96
Şekil 4.40.	1 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	96

Şekil 4.41.	Çalışma gruplarında tümör dokularına ait PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü	97
Şekil 4.42.	Primer tümör hücrelerinin PCNA ekspresyonunun değerlendirilmesi	98
Şekil 4.43.	4T1-Tümör grubunun tümör dokusuna ait belirgin HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	99
Şekil 4.44.	0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	99
Şekil 4.45.	1 µg HSP70 Proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	100
Şekil 4.46.	0,5 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	100
Şekil 4.47.	1 µg HSP70 Tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü	101
Şekil 4.48.	Çalışma gruplarında tümör dokularına ait HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü	102
Şekil 4.49.	Primer tümör hücrelerinin HSP90 ekspresyonunun değerlendirilmesi	103
Şekil 4.50.	Çalışma gruplarının HSP70 mRNA ekspresyon rölatif miktarları	104

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	ER, PR, HER-2 ve Ki-67'nin IHC analizinin meme tümörünün farklı alt tiplerin tanımlanması için kullanımı	10
Tablo 2.2.	Deneyisel meme tümörü hayvan modelleri	27
Tablo 3.1.	Kompetent hücre hazırlamada kullanılan maddeler	42
Tablo 3.2.	Plazmid transformasyonu için kullanılan gereçler	44
Tablo 3.3.	Separation jel hazırlamak için kullanılan maddeler	46
Tablo 3.4.	Stacking jel (4%) hazırlamak için kullanılan malzemeler	47
Tablo 3.5.	Deney gruplarına yapılan uygulamalar	52
Tablo 3.6.	Tamponlu formalin solüsyonunun hazırlanışı	56
Tablo 3.7.	Tam otomatik doku takip cihazı solüsyonları ve uygulama süreleri	56
Tablo 3.8.	İmmunohistokimyasal boyama yönteminde kullanılan malzemelere ait bilgiler	58
Tablo 3.9.	Sitrat tamponu hazırlamak için kullanılan malzemeler ve hazırlanışı	59
Tablo 3.10.	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (0,01 M, pH 7,2) hazırlamak için kullanılan malzemeler	60
Tablo 3.11.	Master miks hazırlanması için kullanılan kit içeriği	66
Tablo 3.12.	c-DNA sentezi için kullanılan Thermal Cycler protokolü	67
Tablo 3.13.	Real-Time qPCR analizi için yapılan primer dizaynı	67
Tablo 3.14.	Real-Time qPCR analizi için master miksin hazırlanma koşulları	68
Tablo 3.15.	Real-Time qPCR analizi BIO RAD marka CFX96™ Real Time System PCR cihazı ile PCR protokolü	69
Tablo 4.1.	Real-Time PCR HSP70 mRNA ekspresyon miktar tayini	104

SİMGELER ve KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µM	Mikro molar
AhR	Aril hidrokarbon reseptörü
AIF	Apoptoz indükleyici faktörü
ALND	Aksiller lenf nodu diseksiyonu
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
APC	Antijen sunan hücreler
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
BLBC	Bazal benzeri meme kanseri
BRCA	Meme ve yumurtalık kanseri yatkınlık geni
BRIP	BRCA etkileşimli protein
BSA	Bovine serum albumin
CaCl₂	Kalsiyum klorür
CAF	Kanser ilişkili fibroblast
CAR-T	Kimerik antijen reseptörü T
CD	Cluster of differentiation
CD-31	Platelet endothelial cell adhesion molecule
CD4+T	Yardımcı T hücreleri
CD8+T	T hücreleri
c-DNA	complementary DNA
CHEK	Checkpoint kinase
CL	Klaudin
cN0	Lenf nodülü tutulumu olmayan
CO₂	Karbondioksit
CTL	Sitotoksik T-lenfositleri
DAB	3,3' diaminobenzidin
DC	Dendritik hücreler
DCIS	Duktal karsinoma in situ
DISC	Ölüme neden olan sinyal kompleksi
dH₂O	Deiyonize su
Dk	Dakika
DMBA	7,12-dimetilbenz-α-antrasen
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E10.5	Embriyonik gün 10.5
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
e-HSP	Hücre dışı heat shock protein
EMT	Epitel-mezenkimal geçiş
ER	Östrojen reseptörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hibridizasyon
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GEMM	Genetik olarak tasarlanan hayvan modelleri

G-MDSC	Granülositik myeloid türevli baskılayıcı hücreler
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Hidroklorik asit
HE	Hematoksileneozin
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic asit
HER	Human epidermal growth factor receptor
HKMR	Hızlandırılmış kısmi meme radyasyonu
HR	Hormon reseptörü
HRP	Horseradish peroxidase
HSF-1	Heat shock transkripsiyon faktörü-1
HSP	Isı şoku proteinleri (Heat shock protein)
IDC	İnvaziv duktal karsinom
IDC-NST	İnvaziv duktal karsinom- spesifik olmayan tip
IFN-γ	İnterferon-gamma
IHC	İmmunohistokimya
IL	İnterlökin
ILC	İnvaziv Lobüler Karsinom
IM	İmmünomodülatör
IP	İntraperitoneal
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KH²PO₄	Potasyum fosfat monobazik
Ki-67	Hücre proliferasyon düzenleyicisi (Proliferasyon Kiel 67)
KMR	Kısmi meme radyasyonu
LAR	Lüminal androjen reseptör
LCIS	Lobüler karsinoma <i>in situ</i>
M	Mezankimal tip
M	Molar
M1	Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar
M2	Alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar
MC	Mast hücresi
MDSC	Myeloid-türevli baskılayıcı hücreler
MET	Mezenkimal-epitelyal geçiş
MHC	Majör doku uyumluluk kompleksi
m-HSP	Membran pozitif heat shock protein
MI	Mitotik indeks
MI	Mililitre
M-MDSC	Monositik- myeloid türevli baskılayıcı hücreler
MMP	Matriks metalloproteinaz
MNU	N-metil-N-nitrosourea
MSC	Mezenkimal stromal hücre
MSL	Kök hücre benzeri
Na₂HPO₄	Sodyum fosfat dibazik
NAC	Neoadjuvan kemoterapi
NaCl	Sodyum klorür
NaH₂PO₄H₂O	Sodyum fosfat monobazik monohidrat

NaOH	Sodyum hidroksit
NF- κB	Nükleer faktör kappa B
NF1	Nörofibromatozis tip 1
NHP	İnsan olmayan primat
NK	Doğal öldürücü hücreler
NLR	NOD benzeri reseptörler
NLR	Nötrofil: lenfosit oranı
NST	Spesifik tipi olmayan
OD	Optik dansite
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PALB	Partner and localizer
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PDX	Hastadan türetilen ksenograft
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PMRT	Postmastektomi radyasyon terapisi
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
RDT	Rekombinant DNA teknolojisi
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RR	Relatif risk
RT	Işın tedavisi
SCID	Şiddetli kombine immün yetmezlikli
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
SLN	Koruyucu lenf düğümü
STK11	
TAM	Tümör ilişkili makrofajlar
TCR	T hücresi reseptörü
TDLU	Dallanan terminal duktal lobüler ünite
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletelen-diamin
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TGF-β	Transforming growth factor-beta
Th	Yardımcı T lenfosit
TIL	Tümör ilişkili lenfosit
TKD	Tümörlerden türetilen antijenik peptitleri
TLR	Toll benzeri reseptörler
TME	Tümör mikro çevresi
TMR	Total meme radyoterapisi
TNBC	Üçlü negatif meme tümörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRAIL-R1	TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü 1
TRAIL-R2	TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü 2
TP53	Tümör protein 53

T-reg
VEGF

Regulator (dzenleyici) T hcreleri
Vaskuler endotel buyume faktoru



ÖZET

Rekombinant Heat Shock-70 ile İmmunizasyonun Meme Kanseri Modelinde Etkilerinin Moleküler Metotlarla Araştırılması

Meme kanseri kadınlar ve dişi hayvanlarda sık gözlenen ve önemli oranda mortaliteye sebep olan tümörler arasında sayılmaktadır. Meme kanseri insidansı gitgide artmakta ve bu nedenle erken teşhis ve tedavi ile ilgili çalışmalar hızlanmaktadır. Bu çalışmalar hızlı teşhis ile yan etkisi azaltılmış tedavilere odaklanmaktadır. Meme kanseri çalışmalarında en çok kullanılan yöntem deneysel tümör modelleridir. Heat shock proteinler hücrelerin stres koşullarına yanıt verme yeteneklerini artırarak hayatta kalmalarını sağlar; tümör hücreleri de bu proteinleri üreterek kendilerini konakçı immun yanıtından korumaya çalışır. Araştırmalarda bu proteinlerden en sık kullanılanlar arasında Heat Shock Protein 70 (HSP70) bulunmaktadır. HSP70, stres koşullarında hücrelerde sentezlenen ve proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan bir şaperon proteindir. Son yıllarda, HSP70'in meme kanserinde oynadığı roller üzerine yapılan araştırmalar artmıştır. Bu protein kanser hücrelerinin strese karşı direnç kazanmasında ve hayatta kalmasında kritik bir rol oynamaktadır. HSP70'in yüksek seviyelerde eksprese edilmesi, kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere karşı direnç göstermesine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, HSP70'in meme kanseri üzerindeki etkilerini anlamak yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, rekombinant HSP70 proteini ile immunizasyonun meme kanseri modelinde moleküler yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında, rekombinant HSP70 ile immunize edilen farelerde tümör büyümesi, malignite özellikleri ve metastaz potansiyeli değerlendirildi. Sonuçlar, HSP70 immunizasyonunun kanser hücrelerinin büyümesini, malignite özelliklerini ve metastazını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Proflaktik veya terapötik olarak uygulanan HSP70'in tümör malignitesinde önemli olan HSP70, Ki-67, PCNA ve CD-31 gibi belirteçlerin immunohistokimyasal ekspresyonlarında azalmalara sebep olduğu görüldü. PCR verileri de bu bulguları destekledi. Elde edilen bulgular, rekombinant HSP70'in, meme kanseri tedavisinde etkili bir immunoterapötik ajan olarak kullanılabileceğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır. Bu alanda yapılacak yeni ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fare, HSP70, Meme Kanseri, Rekombinant Protein

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Immunization with Recombinant Heat Shock -70 in a Breast Cancer Model by Molecular Methods

Breast cancer is one of the most frequently observed tumors in women and female animals, contributing significantly to mortality rates. The incidence of breast cancer continues to rise, prompting intensified research on early diagnosis and treatment. These studies aim to achieve rapid diagnosis and focus on therapies with reduced side effects. Experimental tumor models are the most commonly used methods in breast cancer research. Heat shock proteins (HSPs) enhance the ability of cells to respond to stressful conditions, thereby promoting their survival. Tumor cells also produce these proteins to shield themselves from the host's immune response, with Heat Shock Protein 70 (HSP70) being among the most extensively studied. HSP70 is a chaperone protein synthesized under stress conditions that ensures proper protein folding. Recent research has increasingly focused on the roles of HSP70 in breast cancer. This protein plays a critical role in enhancing the resistance and survival of cancer cells under stress. Elevated expression levels of HSP70 can contribute to cancer cells' resistance to therapies such as chemotherapy and radiotherapy. Thus, understanding the effects of HSP70 on breast cancer is vital for identifying new therapeutic targets and developing treatment strategies. In this study, the immunization with recombinant heat shock-70 (HSP70) protein in a breast cancer model was examined using molecular methods. The study evaluated tumor growth, malignancy criteria, and metastasis potential in mice immunized with recombinant HSP70. The results indicated that HSP70 immunization significantly reduced cancer cell growth, malignancy criteria, and metastasis. Prophylactic or therapeutic application of HSP70 led to notable decreases in the immunohistochemical expression of markers important for tumor malignancy, such as HSP70, Ki-67, PCNA, and CD-31. PCR data supported these findings. The findings provide strong evidence that recombinant HSP70 can be used as an effective immunotherapeutic agent in breast cancer treatment. Further comprehensive studies in this area are needed.

Keywords: Breast Cancer, HSP70, Mouse, Recombinant Protein

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türlerinden biridir ve kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen sebeplerinden biri olmaya devam etmektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi belirli durumlarda etkili olsalar da çoğu zaman yan etkilere ve hastalığın nüks etmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle, daha hedefe yönelik ve etkili tedavi stratejileri geliştirmek, meme kanseri yönetiminde büyük bir öneme sahiptir (Yang ve ark., 2022).

Heat Shock Proteinler (HSP) hücreleri stres koşullarına karşı korumak için sentezlenen moleküllerdir. HSP70 ailesi, özellikle protein katlanması ve hücrel stres yanıtlarında önemli roller oynamaktadır. Son yıllarda, HSP70'in immun sistem üzerindeki düzenleyici etkileri ve kanser immunoterapisinde potansiyel bir hedef olarak kullanılabileceği yönündeki bulgular, bu proteine olan ilgiyi artırmıştır (Hu ve ark., 2022; Vostakolaei ve ark., 2021).

Rekombinant HSP70 ile immunizasyonun immun sistemi tümör hücrelerine karşı aktive ederek bu hücreleri kısa sürede tanınmasını sağlayacağı, tümöre karşı daha etkili bir reaksiyon geliştireceği ve tümör büyümesini inhibe edebileceği fikri ile bu çalışma planlanmıştır. HSP70 ile immunizasyonun meme kanseri modelinde tümör büyümesi ve metastaz üzerindeki etkilerinin araştırılmasının, kanser tedavisinde yeni ve etkili yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada, rekombinant HSP70 ile immunizasyonun meme kanseri modeli üzerindeki etkileri patolojik, immunohistokimyasal ve PCR metotlarıyla değerlendirilmiştir. Çalışmamızın temel amacı, rekombinant HSP70'in 4T1 meme kanseri hücreleri ile deneysel olarak farelerde oluşturulan tümörlerdeki etkilerini değerlendirmek ve bu etkinin moleküler mekanizmalarını ortaya koymaktır. Bu bağlamda, HSP70 ile immunizasyonun potansiyel bir tedavi ajanı olarak kullanımına yönelik bilimsel verilerin elde edilmesi ve gelecekteki klinik çalışmalara zemin hazırlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tümörlerin Özellikleri

Tümör dokusu, tümörü oluşturan hücrelerden zengin olan parankim ve bu hücreleri destekleyen stroma adı verilen bağ dokusu olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Canlı organizmadaki herhangi bir hücre köken aldığı hücre özelliklerini az ya da çok kaybeder ve bazı yeni özellikler kazanarak tümör hücresine dönüşebilir. Yeni bir hücre tipine dönüşen bu tümör hücresi tekrar eski haline dönemez. Ayrıca tümöral özellikler bölünme sonucu oluşan yeni hücrelere de aktarılmaktadır. Tümör hücrelerinin önemli bir özelliği de organizmadaki diğer hücreler ile organize bir şekilde hareket edememeleridir (Sharma ve ark., 2022; Tarin, 2023).

Tümör hücreleri proliferasyon için devamlı bir uyarana ihtiyaç duymadan, hatta tümöre neden olan etken ortadan kalksa bile hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Normal dokuların gelişimini kontrol altında tutan kontrol mekanizmalarından tümör hücreleri etkilenmezler ve böylece tümörlerde büyüme sınırsız olarak devam eder. Tümör dokularının kontrol mekanizmalarından etkilenmeksizin ve canlının yeteri kadar besin alıp almadığına veya zayıfladığına bakmaksızın tümör gelişimine devam etmesi, tümörün otonom özellik kazanması sonucu şekillenmektedir (Ebbesen ve ark., 2009; Infanger ve ark., 2013; Szasz ve Szigeti, 2024).

Tümör stroması, neoplastik olmayan destekleyici bir bağ dokudan oluşmaktadır. Stroma, büyük ölçüde hücre dışı bağ dokusundan ve karmaşık bir proteoglikan matrisine gömülü proteinler ve kollajen gibi glikoproteinlerden meydana gelmektedir. Ekstraselüler matriks (ECM) olarak adlandırılan bu yapı aynı zamanda tümöre besin sağlayan kan damarlarını, kollajeni, fibroblastları ve bağışıklık hücreleri gibi çeşitli bileşen ve dokuları kapsamaktadır (He ve ark., 2022; Sutherland ve ark., 2023).

Stromal doku, tümör büyümesini desteklemesinin yanı sıra tümörlerin etrafında bir bağ doku kapsülü oluşturarak neoplastik yayılımın sınırlandırılmasına yardımcı olmaktadır (He ve ark., 2022).

2.1.1. Tümör-Stroma Etkileşimleri

Tümör hücreleri stromalarıyla, büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar ve inflamatuvar araçlar dahil olmak üzere çok çeşitli sinyal moleküllerini değiş tokuş ettikleri karmaşık bir etkileşime girmektedir. Bu etkileşim sonucunda hem stromal hücrelerin hem de tümör hücrelerinin büyüme hızı, farklılaşma durumu ve davranışı düzenlenmektedir (Bożyk ve ark., 2022; Pereira ve ark., 2021).

Tümör hücreleri, çevrede bulunan stromal hücreleri tümör hücresi çoğalmasını ve hareketliliğini arttıran veya yangı hücrelerini çeken bazı sitokinleri üretmeye teşvik edebilir. Ayrıca tümör hücreleri, stromal fibroblastlar veya yangı hücreleri tarafından salgılanan proteazlar ve büyüme faktörlerini ECM'den serbest bırakarak tümör hücresi çoğalmasını ve göçünü uyarabilir (Galland ve Stamenkovic, 2020; Rogers ve ark., 2022).

2.2. Meme Bezi

Memelilerin belirleyici bir özelliği olan meme bezi, ergenlik döneminde gelişmeye başlayarak tam anlamıyla yetişkinlikte gelişen, her östrus, hamilelik, emzirme dönemlerinde büyüme ve gerileme döngüleri görülen dinamik bir organdır. Yavrular için beslenme kaynağı olan memelerde anormal gelişimler ile meme tümörleri gibi çeşitli hastalıklar da ortaya çıkmaktadır (Solodneva ve ark., 2022).

Farklı canlı türlerinde meme bezinin konumu ve sayısında büyük farklılıklar vardır. Örneğin, primatlarda tek bir meme bezi çifti bulunurken, sıçan ve farelerde vücutlarının her iki yanında iki sıra şeklinde yer almaktadır (Biswas ve ark., 2022; Solodneva ve ark., 2022).

2.2.1. Meme Bezinin İlkel Yapısı ve Gelişimi

Meme bezi, embriyogenez sırasında ventral bölgede derinin altında şekillenen gelişmemiş bir yapıdır. Embriyonik yaşamdan itibaren ergenlik döneminde büyümeye başlayarak, hamilelik sırasında, laktogenezden önce alveolar yapıların şekillenmesini destekleyen hormonlarla ve büyüme faktörlerindeki değişikliklerle yönlendirilen morfolojik ve işlevsel değişikliklere uğradığı duktal bir gelişim sürecinden geçer (Spina ve Cowin, 2021). Meme bezleri embriyonik dönemde ektodermin kalınlaşması sonucu ortaya çıkar ve doğumda büyük bir meme yastığının küçük bir bölümüne gömülü ilkel, dallı bir kanal ağına dönüşür. Bu dallanmış kanal ağının büyük çoğunluğu fetal gelişimden ziyade ergenlik döneminde şekillenir. Meme bezinin embriyonik gelişimi birçok memeli türünde gebeliğin orta döneminde başlamasına rağmen, çeşitli memeli türlerinde bu gelişim farklılık göstermektedir (Biswas ve ark., 2022).

Farelerde bezin gelişimi; gebeliğin ortasında, embriyonik gün 10.5 (E10.5)'de iki taraflı epidermal çıkıntılar veya süt hatları oluştuğunda başlar ve bu oluşumdan sonraki 24-36 saat içerisinde meme hatları boyunca ektoderm hücre katmanının kalınlaşması ile beş çift mercimek büyüklüğünde plakodlar oluşur. Her bir plakod meme ucuna karşılık gelen, bazal membran ile çevrelenmiş bir meme tomurcuğu oluşturmak için altta yatan meme mezenkimine doğru genişler. Böylece dermis içinde yer alan gelişmekte olan meme yağ yastığına ulaşana kadar mezenkime doğru uzanırken tomurcuk büyümesi şekillenir (Slepicka ve ark., 2021). Gevşek bir preadiposit kümesinden oluşan yağ yastığını istila ettikten sonra mezenkimal tabakaya gömülü duktal dallanma şekillenmeye başlar ve bir lümen oluşturarak doğumdan önce içi boş ilkel bir kanal ağı oluşturacak şekilde gelişir. E15.5-E16.5'ten embriyonik gelişimin sonuna kadar meme tomurcukları uzamaya devam eder. Böylece doğumda meme başına giden tek bir kanala sahip basit dallanmış gelişmemiş bir yapı mevcuttur (Slepicka ve ark., 2021; Solodneva ve ark., 2022; Spina ve Cowin, 2021).

İnsan meme bezi gelişimi, farelerden farklı olarak embriyonik gelişim sırasında tek bir ektodermal tomurcuk olarak başlar ve ilk gözle görülür hali beşinci haftada fark

edilir. Meme tomurcuklarının geliştiği iki temel meme hattı torasik bölgede yer alır. Embriyonik gelişimin tamamlanmasının ardından hem kemirgenler hem de insanlar henüz gelişmemiş benzer meme parankim yapılarına, meme tomurcuklarına ve epitel yapısına sahiptir (Biswas ve ark., 2022).

2.2.2. Meme Bezinin Anatomisi ve Histolojisi

Meme bezleri, vücudun ventral yüzeyinde iki taraflı olarak yer alan apokrin bezlerden köken alabilen epidermal eklentilerdir. Bileşik, dallanmış bir tubüloalveolar yapıda olan meme bezleri memelilerin önemli bir özelliğidir. Dişi farede yağ yastıkları içinde hayvanın her iki yanında simetrik bir biçimde ön bacakların önünde bir çift, arkasında iki çift, arka bacaklarının önünde bir çift ve kasık bölgesinin hemen önünde bir çift yer alacak şekilde beş çift meme bezi bulunur. İnsanlarda ise meme bezleri, toraks bölgesinde deri altında bulunan çift dış salgı bezleri olarak yerleşmiştir. Her bez, bağ dokusu ve yağ dokusuyla diğerlerinden ayrılmış 15-25 adet *lobi glandulae* isimli tubüloalveoler bezden oluşur. Her lob, bir laktiferöz kanala açılır. Salgı bezleri süt üretir ve intralobüler kanallara boşaltır, ardından interlobüler kanallara gider. İnterlobüler kanallar, sütün boşaldığı laktiferöz sinüslerle birleşir. Meme başı keratinleşmiş yassı hücrelerle kaplıdır. Gebe olmayan farede meme dokusu, yağ dokusu içine gömülü dallanan bir kanal sisteminden oluşur. Kanallar, bazal laminaya bağlı bir miyoepitelyal hücre tabakası ile çevrili ve küboidal epitel ile kaplıdır (Al-Khaldi ve ark., 2022; Honvo-Houéto ve ark., 2015). Gebelik sırasında epitelyal bileşen çoğalarak lobüler alveollerini oluşturur. Alveoller, sitokeratinleri ve düz kas aktinini eksprese eden aralıklı miyoepitel hücre tabakasıyla çevrili tek bir epitel hücre tabakasına sahiptir (Oakes ve ark., 2006). Süt salgılanması doğumdan bir gün önce başlar ve üç haftalık laktasyon boyunca ya da yavrular süttten kesilene kadar devam eder. Meme bezi süttten kesildiğinde apoptozis ile involüsyona uğrar ve yaklaşık iki hafta içinde gebelik öncesi eski durumuna döner (Spina ve Cowin, 2021).

Morfolojik olarak meme bezleri epitel ve stromal hücreler olmak üzere farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır. Epitel hücreleri bezin duktal ağını şekillendirip yüzey alanını genişletirken, hücre dışı matriks proteini içeren çeşitli stromal dokular meme

bezlerini destekler. Epitel katman bazal membran ile stromadan ayrılır. Meme bezinde luminal ve bazal olmak üzere iki ana epitel türü vardır. Luminal epitel, süt üreten salgı alveollerine veya lobüllere farklılaşan içi boş lümeni çevreler ve kanalların iç katmanını oluşturur. Buna karşılık bazal epitel, olgun meme kanallarının dış katmanını oluşturan miyoepitelyal hücrelerden oluşur (Al-Khaldi ve ark., 2022; Honvo-Houéto ve ark., 2015). Stromal bağ dokunun ana bileşenlerini, meme yağ yastığını oluşturan ve gömülü duktal ağı koruyan adipositler, fibroblastlar, vasküler endotel hücreleri ve çeşitli doğuştan bağışıklık hücreleri oluşturur. Meme epiteli ile kendisini çevreleyen stroma arasındaki karşılıklı sinyalleşme, meme bezi morfogenezinin temel bir bileşenidir (Spina ve Cowin, 2021). Meme bezinin sahip olduğu iki adet epitel hücresi (luminal epitel ve miyoepitel) ve stromasının (interlobüler ve intralobüler stroma) her biri hem benign hem de malign tümörlerin kaynağıdır (Kumar ve ark., 2015).

2.3. Meme Tümörleri

Meme tümörleri hem insanlarda hem de evcil hayvanlarda dünya çapında en çok tanı alan tümörlerden olup kansere bağlı ölümlerin en sık karşılaşılan nedenlerinden biridir. Meme tümörlerinin görülme sıklığı evcil hayvanlar arasında köpeklerde çok yaygın olup köpeklerle karşılaştırıldığında kedilerde daha düşüktür; diğer hayvan türlerinin çoğunda ise nadir olarak görülmektedir (Meuten, 2020).

Dişi köpeklerde en yaygın görülen tümörler arasında deri tümörlerinden sonra meme tümörleri yer almaktadır. Köpek ve kedilerde bu tümörlerin görülme oranı coğrafi bölgelere göre değişmekle beraber ovaryumların alınması ve bu işlemin yapıldığı yaş ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte ırk duyarlılığı, yaş, ekzojen hormon maruziyeti, diyet ve beslenme ile sosyoekonomik faktörler de dahil olmak üzere görülme sıklığını etkileyen birçok faktörün varlığından söz edilmektedir (Alabbody, 2019). Köpeklerde malign ve benign tümörlerin oranını belirlemek, cerrahi olarak uzaklaştırılan her tümör için histopatolojik inceleme ile tiplendirme yapılmadığı ve incelemeyi yapan patoloğun deneyimiyle doğrudan bağlantılı olduğu için zordur. Patoloji değerlendirilmesi için gönderilen kitlelerin %41-53'nün malign

olduğu ve bu tür tümörlerin ortalama görülme sıklığının 10 yaş civarında olduğu rapor edilmiştir (Alabbody, 2019; Goldschmidt ve ark., 2016; Varallo ve ark., 2019).

Kadınlarda köpeklere benzer şekilde meme tümörleri en yaygın görülen malign tümörlerdir ve çoğu kadında akciğer metastazı sonucu ölüm şekillenmektedir. İnsanlarda 2020 kanser istatistik raporlarına göre meme kanseri, mortalite oranı olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır (Yang ve ark., 2022). Dünya Sağlık Örgütü'nün istatistiklerine göre, 2020'de yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası tespit edilmiştir ve tüm kanser vakalarının %11,7'sini oluşturmuştur (Yang ve ark., 2022). Kadınlarda ve köpeklerde meme bezi tümörleri, epidemiyolojik özellik, görülme yaşı, morfolojik görünüm, metastaz durumu ve tümörün seyri bakımından birçok benzerlik sergilemektedir. Tümör hücrelerinde östrojen reseptörlerinin varlığı da kadın ve köpeklerde birbirine benzemektedir. Meme tümörlerinin tamamına yakını kadınlarda ve dişi köpeklerde, daha az oranda ise erkeklerde görülmektedir. Yaş, meme tümörü için önemli faktörlerden biridir. Kadınlarda meme kanseri insidansındaki artış tüm yaş gruplarında gözlenirken, bu artış 50 yaş altındaki kadınlarda daha yüksektir (Lima ve ark., 2021).

Meme tümörlerinin yaklaşık %10'u kalıtsaldır ve bazı genlerde şekillenen mutasyonları içermektedir. Özellikle BRCA1 (meme ve yumurtalık kanseri yatkınlık geni) ve BRCA2 adı verilen iki genin mutasyonlarının meme kanseri ile ilişkili olduğu keşfedilmiştir (Cui ve ark., 2011; Saladin ve Porth, 2010). Ayrıca tümör baskılayıcı genlerden TP53 (tümör protein 53), NF1 (nörofibromatozis tip 1), STK11 ve PTEN (protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu) dahil olmak üzere birkaç genin yüksek penetrasyonlu mutasyonu kalıtsal meme kanseri riskine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, meme kanserlerinin %90'dan fazlası, rastgele somatik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Angeli ve ark., 2020; Chamseddine ve ark., 2022; Sokolova ve ark., 2023).

İnsanlarda ve hayvanlarda meme tümörü gelişiminde kalıtsal olmayan risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, genetik yatkınlık, uzun üreme süresi, hiç doğum yapmama, iyonlaştırıcı radyasyona ve kanserojen kimyasallara maruz kalma, aşırı

alkol ve yağ alımı, sigara gibi faktörler ile birlikte proliferatif meme lezyonlarının bulunması yer almaktadır (Goldschmidt ve ark., 2016; Kumar ve Parasar, 2020; Varallo ve ark., 2019).

2.3.1. Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırması

Meme tümörlerinin histolojik sınıflandırması, tümörün patolojik büyüme paternine dayanmaktadır. Tümörün sadece meme epitelial bileşeni ile sınırlı olma (*in situ* karsinom) ya da stromaya invaze olarak invaziv karsinom haline gelme, kanaldan (duktal karsinoma) ya da lobülden (lobüler karsinoma) kaynaklanmış olma durumu göz önüne alınarak histolojik sınıflandırma yapılmaktadır. Meme kanseri, duktal karsinoma *in situ* (DCIS) ve invaziv duktal karsinom (IDC) olmak üzere sınıflandırılır. DCIS, sadece kanal ve lobüllerle sınırlı potansiyel malign intraduktal epitelial hücre proliferasyonu olarak tanımlanırken IDC ise, meme dokusundaki neoplastik hücrelerin kanal duvarı boyunca stroma içine penetrasyonu ile karakterize olan malign anormal proliferasyonu şeklinde tanımlanır (Henry ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2015). Hem karsinoma *in situ* hem de invaziv karsinom, tümörün köken aldığı yer temel alınarak duktal ve lobüler olarak sınıflandırılır. Meme kanallarından kaynaklanan kanserlere duktal karsinomlar, lobüllerden kaynaklanana ise lobüler karsinomlar adı verilmektedir.

İnvaziv meme karsinomlarının 20'den fazla farklı histolojik alt tipi vardır. Histolojik alt tipler, hücre tipi (örn. apokrin özellikli karsinom), hücre dışı sekresyon miktarı, türü ve konumu (örn. müsinöz karsinom), yapısal özellikler (örn. papiller, tubuler ve mikropapiller karsinom) ve immunohistokimyasal profil (örn. nöroendokrin farklılaşması olan karsinom) gibi geniş bir kriter yelpazesine göre sınıflandırılır (Masood ve ark., 2016). Bunlardan en yaygın olanı, tüm meme invaziv karsinomların yaklaşık %40-75'ini oluşturan IDC-NST (invaziv duktal karsinom- spesifik olmayan tip)'tir. Bunu tüm invazif kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan invaziv lobüler karsinomlar (ILC) takip etmektedir. Geri kalanlar ise müsinöz, kribriform, mikropapiller, papiller, tubüler, medüller, metaplastik ve apokrin karsinomlar gibi daha az yaygın olan histolojik tiplerdir (Tsang ve ark., 2020).

Özel tip olarak tanımlanan tümörler belirgin özellikler ve özel hücresel ve moleküler davranış gösterirler. Bu tip tümörler arasında en sık medüller karsinom, metaplazik karsinom, apokrin karsinom, müsinöz karsinom, kribriform karsinom, tubuler karsinom, nöroendokrin karsinom, klasik lobüler karsinom ve pleomorfik lobüler karsinom yer almaktadır (Masood ve ark., 2016).

2.3.2. Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflandırması

Meme tümörünün farklılaşma tipine ve derecesine (tümör tipi ve histolojik derece) dayalı sınıflandırılması, mevcut olan tümör boyutu, lenf düğümü tutulumu, metastaz gibi klinik morfolojik parametreler meme tümörünün oldukça karmaşık olan biyolojik heterojenliğini tam olarak yansıtmak için yetersizdir. Benzer morfoloji ve evreye sahip tümörlerin klinik davranış ve tedaviye yanıt açısından farklılık gösterdiğini öne süren çeşitli kanıtlar vardır. Ayrıca, meme kanserinin doğası ve biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve sistemik tedavi seçeneklerinin (hormon, kemoterapi, anti-HER-2 ve diğer hedefe yönelik tedavi ve immunoterapi) artması, moleküler prognostik ve prediktif belirteçlerin kullanılmasının gerekliliğini daha da vurgulamaktadır (Rakha ve ark., 2023; Richard ve ark., 2021).

Meme kanseri moleküler alt tiplerinin ayırımında başlıca sorumlu gen grupları, östrojen reseptörleri (ER), progesteron reseptörleri (PR), human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) ve hücre proliferasyon düzenleyicisi (Ki-67) ile ilgili genlerdir. Meme kanseri, gen ekspresyon profili kullanılarak tanımlanan moleküler sınıflandırma ile Luminal A, Luminal B, HER-2'yi aşırı eksprese eden, bazal benzeri meme kanserleri (BLBC) ve normal benzeri meme tümörleri olmak üzere 5 temel alt tipe ayrılmıştır (Beňačka ve ark., 2022; do Nascimento ve Otoni, 2020).

Meme kanseri, gen ekspresyon profili kullanılarak tanımlanan moleküler sınıfları tanımlamak için bir dizi immunohistokimyasal biyobelirteçler de kullanılmaktadır. Bu belirteçler arasında Ki-67, ER, PR ve HER-2 yer almaktadır. ER ekspresyonuna göre meme kanserleri ER+ ve ER- olmak üzere iki farklı kümeye ayrılır. ER pozitifliği luminal sınıf için belirleyicidir, Luminal A ve B moleküler alt

tipleri ER pozitif iken, HER-2'yi aşırı eksprese eden, BLBC ve normal benzeri tümörler ER– tir (Tsang ve ark., 2020).

Tablo 2.1. ER, PR, HER-2 ve Ki-67'nin IHC analizi, farklı alt tiplerin tanımlanması için kullanımı (Tsang ve ark., 2020).

Moleküler alt tipler	ER	PR	HER-2	Ki-67
Luminal A alt Tip	+	PR $\geq$ %20	-	Ki-67<%20
Luminal B Alt Tip	+	PR<%20		Ki-67 $\geq$ %20
HER-2-aşırı	-	-	+	Ki-67 $\geq$ %20
Bazal Benzeri Meme Kanseri (üçlü negatif) (TNBC)	-	-	-	
Normal benzeri tümörler	-		+	

2.3.2.1. Luminal A alt tip

Luminal A, invaziv meme kanserlerinin %40-50'sini temsil eden en yaygın moleküler alt tiptir. Tipik olarak luminal A kanserleri düşük derecelidir ve tüm içsel alt tipler arasında en iyi prognoza sahiptir. IHC profili Tablo 2.1'de verilmektedir. Bu tümörler sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu gibi meme bezinin luminal epiteliyal hücrelerinin karakteristiklerini içerir (Gao ve Swain, 2018). Tubuler karsinom, kribriform karsinom, düşük dereceli IDC-NST (invaziv duktal karsinom spesifik olmayan tip), müsinöz ve ILC gibi geniş bir düşük histolojik dereceli varyant grubunu içerir (Vuong ve ark., 2014; Gao ve Swain, 2018). Daha sakin bir klinik seyir gösterir ve genellikle daha az lenf düğümü tutulumu sergiler. Ayrıca, hormon reseptörlerinin pozitif olmasından dolayı, hastalar endokrin terapilerden fayda sağlar (Tsang ve ark., 2020).

2.3.2.2. Luminal B Alt Tip

Luminal B kanserleri, luminal A'ya göre daha yüksek dereceli olma eğilimindedir ve daha kötü prognoza sahiptir. ER ile ilişkili genlerin daha düşük ekspresyonunu gösterirler, ancak proliferasyonla ilişkili genlerde (Ki-67) daha yüksek

ekspresyon ve HER-2 ile ilişkili genlerin değişken ekspresyonu, luminal A kanserlerine göre daha yüksektir. Luminal B, meme kanseri vakalarının yaklaşık olarak %20-30'unu oluşturur. İmmunohistokimyasal profili Tablo 2.1'de gösterildiği şekildedir. Luminal epitelial hücrelerde sitokeratin ekspresyonu gözlenir (Feng ve ark., 2018; Tsang ve ark., 2020). BRCA2 germ hattı mutasyonları ile ilişkilendirilen en yaygın malign meme tümörüdür. Luminal A ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir lokal nüks olasılığı vardır. Luminal B alt tipi, hormona bağımlı meme kanseri vakalarının en agresif formudur. Klinik olarak luminal A tek başına hormonal tedaviden fayda görürken, luminal B tümörleri ek kemoterapiye ihtiyaç duyulur.

2.3.2.3. HER-2+ Alt Tip

Tüm invazif meme kanserleri vakalarının yaklaşık %15'ini oluşturan HER-2'yi aşırı eksprese eden alt tip, HER-2 aşırı ekspresyonu ile karakterize edilir. HER-2'yi aşırı eksprese eden tümörlerin yüksek dereceli, ER- ve PR- olması muhtemeldir ve agresif bir klinik seyir izler. Bununla birlikte, anti-HER-2 hedefli tedaviye oldukça duyarlıdır ve bu da büyük ölçüde iyileştirilmiş bir sonuç sağlar.

Bu alt tip, HER-2'nin yüksek ekspresyonu (>10%), ER- ve PR- ve Ki-67'nin yüksek ekspresyonu (>20%) ile karakterizedir (Goldhirsch ve ark., 2013). HER-2 aşırı ekspresyonu ILC'de gözlenir. TP53 germ hattı mutasyonlarına sahip hastalarda (Li-Fraumeni sendromu) ailesel meme kanserlerinin yarısından fazlası hem ER, hem de HER-2 (+) olan karsinomlarıdır. HER-2 proteininin yüksek ekspresyonu, yüksek histolojik malignite, yüksek proliferatif indeks ve metastaz eğilimiyle ilişkilendirilir. Bu da kötü bir prognoza yol açar (Fragomeni ve ark., 2018; Feng ve ark., 2018).

2.3.2.4. Bazal Benzeri Meme Kanseri (BLBC) Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC)

Bazal Benzeri Meme Kanseri, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-20'sini oluşturur. Agresif meme kanserlerinden biri olan BLBC, bazal sitokeratinler de dahil olmak üzere normal meme bazal/miyoepitelyal hücrelerindeki genlerin

ekspresyonuyla karakterizedir. Ayrıca proliferasyonla ilişkili genlerin aşırı ekspresyonunu gösterirler ancak ER, PR ve HER-2 ile ilişkili gen ekspresyonundan yoksundurlar. Histolojik olarak BLBC'ler genellikle yüksek derecelidir, yüksek proliferasyon indeksine sahiptir ve üçlü negatif fenotip gösterir. BLBC hastalarının prognozu kötüdür ve tanıdan sonraki 5 yıl içinde nüksler meydana gelebilir. (Chen ve ark., 2018; Tsang ve ark., 2020).

2.3.3. Meme Tümörü Mikro Çevresi

Tümörler devamlı olarak evrimsel değişim halinde olan heterojen ve dinamik bir sistemle varlıklarını sürdürmektedir. Tümör mikroçevresi (TME), tümör hücrelerinin hayatta kalma, büyüme, çoğalma ve metastaz için ihtiyaç duyduğu ortam olarak ifade edilen bir kavramdır. Başka bir ifade ile TME, tümörlerin veya kendini yenileme ve tümör oluşumunu tetikleme yetenekleri olan kanser kök hücrelerinin bulunduğu, tümörün ilerlemesi sırasında şekillenen ağdır. Tümör progresyonu, TME olarak tanımlanan ortamdaki moleküler ve hücresel bileşenler ile kanserli hücreler arasındaki etkileşimlerin sonucu olarak şekillenmektedir (Fico ve Santamaria-Martinez, 2020). Tümör gelişimini düzenleyen ve tümör tedavisine yanıtı etkileyen TME'nin oluşumunda, stroma, hücre dışı matriks ile kan ve lenf damarları önemli rol oynamaktadır. Ayrıca endotel hücreleri, lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücre, monosit, makrofaj ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinin yanı sıra düzenleyici T hücreleri ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler gibi çeşitli protümör ve bağışıklık bastırıcı hücre tipleri de TME'de yer almaktadır. Bu bileşenler kanser hücreleri ile karmaşık bir iletişim ağı oluşturup TME'de kronik yangıyı düzenleyerek tümörleri bağışıklık tepkilerine karşı koruyabilmekte, dolayısıyla tümörün başlamasını, ilerlemesini ve metastazını desteklemektedir. Tümör geliştikçe TME'nin her bir bileşeninin rolü, kanser hücrelerinin büyümek için TME'nin belirli unsurlarından yararlandığı ve onu ele geçirdiği adaptif bir sürecin sonucu olarak değişmektedir (Rauner ve Kuperwasser, 2021; Wang ve ark., 2023).

Tümör gelişiminde ve tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden korunmasında endotel hücreleri anahtar rol oynar. Tümör anjiyojenik damarları önceden var olan

damarlardan dışarı doğru dallanır veya endotel progenitör hücrelerden türetilir. Böylelikle tümör büyümesi ve gelişimi için beslenme desteği sağlar (Fang ve ark., 2023). TME'nin ana bileşenlerinden biri olan bağışıklık hücreleri hayatta kalmayı desteklemek için tümör tarafından düzenlenen yangısal reaksiyonlar gibi çeşitli bağışıklık tepkilerinde ve aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır. TME'de en belirgin immun hücre tipi olan makrofajlar, tümör hücrelerinin dolaşım sistemine geçerek kaçışını teşvik ederler ve antitümör immun mekanizmalarını ve yanıtlarını baskılayarak kanser gelişimi ve ilerlemesiyle ilgili görevleri üstlenirler (Pan ve ark., 2020; Vitale ve ark., 2019). Yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar, makrofajların dolaşımdaki kanser hücrelerinin akciğerler gibi uzak bölgelere sızmasına yardımcı olabileceğini ve bunun da metastatik kolonilerin kalıcı büyümesine yol açabileceğini ortaya çıkarmıştır. Fibroblastlar ise, kanser hücrelerinin sistemik metastaz için primer tümörden kan dolaşımına geçmesine izin vermekte ve tümörde anjiyogenez geçiren endotel hücreleri için güvenilir bir geçiş sağlamaktadır. Doğuştan gelen bağışıklığa aracılık eden ve perforin veya granzim içeren granüller bakımından zengin olan NK hücreleri, çoğu tümör infiltrasyonunda ve hatta kanser öncesi lezyonlarda belirgin bir şekilde bulunmaz. Bu özellikler, tümörü NK hücre aracılı sitotoksositeye duyarlı hale getirir. NK hücrelerinin tümör infiltrasyonlarında az bulunmaları, bu hücrelerin tümör bölgesine geçişini engelleyen kaçınma mekanizmalarından biri olabilir (Dias ve ark., 2019).

TME'nin oksijen ve glikoz gibi besinler açısından yetersiz olduğu ve düşük pH sergilediği bilinmektedir. Bazı kanser hücreleri bu koşullara uyum sağlamakta ve bazı durumlarda bu zorlu koşulları kendi çıkarları için kullanmaktadır (Al-Akra ve ark., 2019). TME'yi çevreleyen farklı faktörler kanser gelişiminin, primer tümörlerin oluşumundan metastazların gelişmesine ve ilerlemesine kadar çeşitli aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, tümör hücreleri, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) gibi immun baskılayıcı hücrelerin katılımı ile immun gözetimden kaçınmak için TME'yi değiştirebilmektedir. Böylece, TME ve tümörü çevreleyen stroma, geleneksel kanser tedavilerinin etkinliğinde sınırlamalara yol açan tümör heterojenliğine katkıda bulunmaktadır (Januškevičienė ve Petrikaitė, 2019).

Ayrıca TME, temel olarak epitelyal hücrelerin polaritesini ve hücre adezyon yeteneklerini kaybederek göç ve istila özelliklerine sahip mezenkimal hücrelere dönüştüğü epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) ve tersi olan mezenkimal-epitelyal geçişin (MET) düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar (Erin ve ark., 2020).

2.3.4. Meme Tümör İmmunolojisi

2.3.4.1. Tümör İmmunolojisinin Düzenlenmesi

Bağışıklık sistemi, konakçıdaki tümör hücreleriyle yakın etkileşime girerek tümör gelişimini ve ilerlemesini ya inhibe eder ya da teşvik eder. Bu süreç, kanserin bağışıklığını düzenleme olarak bilinir (Mittal ve ark., 2014). İmmun düzenleme, eliminasyon, denge ve kaçış olmak üzere üç adımda gerçekleşen dinamik bir süreçtir. Eliminasyon, bağışıklık gözetimi olarak da adlandırılan ilk adımdır; burada dönüştürülmüş hücreler kansere karşı güçlü bağışıklık tepkisini etkinleştirebilen yetkin bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Denge aşamasında, immün gözetimden kaçan tümör hücreleri ve bağışıklık hücreleri karşılıklı olarak birbirini şekillendirir. Genetik olarak kararsız olan, hızla mutasyona uğrayan tümör hücreleri üzerinde seçim baskısı ile tümör ve bağışıklık sistemi arasında bir denge kurulur. Eliminasyona karşı direnç kazanan tümör hücresi varyantları, tümörün büyüdüğü ve klinik olarak belirgin hale geldiği sürecin son adımı olan kaçış aşamasına girer. Kaçış aşaması, immunosüpresif bir TME'nin kurulmasıyla karakterize edilir (Gil Del Alcazar ve ark., 2020; Kallinger ve ark., 2023).

İmmun düzenleme sürecinde yer alan doğal/adaptif immün hücre popülasyonlarının aktivitesine dayanarak, immün hücrelerin immün baskılayıcı ve immün sistemi uyarıcı hücreler olmak üzere iki ana alt sınıfı tanımlanabilir (Mittal ve ark., 2014). Özellikle bazı makrofajlar, lenfositler, NK hücreler, doğuştan gelen lenfoid hücreler (ILC'ler), dendritik hücreler (DC'ler) ve eozinofil gibi immün sistemi uyarıcı bağışıklık hücreleri tarafından tümörlerin infiltrasyonu, tümör kontrolü için çok önemlidir. Bununla birlikte, bu hücreler tarafından oluşturulan anti-kanser bağışıklık tepkisi, MDSC'ler, mast hücreleri (MC'ler), düzenleyici T hücreleri (T-

reg'ler) gibi immun baskılayıcı hücrelerin etkisiyle inhibe edilir (Gil Del Alcazar ve ark., 2020; Kallıngal ve ark., 2023).

2.3.4.2. İmmun Gözetim

Canlıların bağışıklık sistemi, bulaşıcı organizmaları ve bunların enfekte ettiği konakçı hücrelerini tanıyarak yok etmek üzerine gelişmiştir. Enfekte olmuş yabancı hücreleri tanımak ve öldürmek için kullanılan bağışıklık mekanizmaları aynı zamanda tümör hücreleri üzerindeki bazı antijenlere karşı da etki göstermektedir. Bu olaya immun gözetim adı verilmektedir. Etkili immun gözetimin tümör gelişimini baskıladığı, immun gözetimin başarısız olmasının ise tümörlerin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünölmektedir (Gil Del Alcazar ve ark., 2020; Kallıngal ve ark., 2023; Mittal ve ark., 2014).

Birçok türde değişik tipteki tümörlerin içinde ve çevresinde lenfosit ve makrofaj infiltrasyonlarının varlığı, tümörlerin bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarabildiğini göstermektedir (Gil Del Alcazar ve ark., 2020).

2.3.4.3. Miyeloid Hücreler

Ortak bir hematopoietik progenitörden köken alan monositler, makrofajlar, miyeloid dendritik hücreler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, mast hücreleri, eritrositler ve megakaryositlerin tümü miyeloid hücreleri oluşturmaktadır. Miyeloid hücreler, meme kanserinin fenotipinin düzenlenmesinde oldukça önemli bir role sahiptir. İmmun inhibitör etkisi olan bir dizi miyeloid hücre meme kanserinin gelişimini sürdürmesini desteklemektedir (Yang ve ark., 2022).

2.3.4.4. Tümörle İlişkili Makrofajlar

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesini, neoanjiyogenezi ve neoplastik hücre büyümesini etkileyen tümör mikro çevresinin anahtar hücre grubudur. TAM'lar meme tümörlerinde en fazla bulunan bağışıklık hücre popölasyonlarından birini oluşturur. Aktive edilmemiş,

klasik olarak aktive edilmiş (M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş (M2) makrofajlar olarak sınıflandırılırlar. M1 makrofajları proinflamatuvar özelliğe sahipken, aktivasyon mekanizmasına bağlı olarak çeşitli alt sınıflara ayrılan ve meme tümörlerinde en sık görülen tip olan M2 makrofajları, immunosupresif özelliğe sahiptir. Bunlar anjiyogenezi ve tümörün ilerlemesini desteklemektedir. Karsinogenez sırasında TME’de M1, M2’ye dönüşmektedir. Makrofajların bir grup kemokin tarafından uyarılarak tümörde toplandığı ve meme kanserinin ilerlemesi, stroma istilasası, hücre dışı matriksin yeniden yapılanması, anjiyogenezi ve metastazı düzenleme gibi farklı yollarla teşvik ettiği bilinmektedir (Annaratone ve ark., 2020). Makrofajlar kemokinlerin salgılanması, meme kanseri kök hücresi ile makrofaj etkileşimleri ve stroma hücreleri dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla meme tümörlerinde primer öneme sahiptir. Ek olarak proanjiyogenik makrofajlar anormal tümör damar yapısına katkıda bulunmaktadır. Meme kanserinde yüksek makrofaj oranının kötü prognoz, yüksek mortalite ve daha sık metastaz ile ilişkili olduğu gösterildiğinden TAM’lar, prognoz ve tedavinin değerlendirilmesinde önem teşkil eder (Fico ve Santamaria-Martinez, 2020; Yang ve ark., 2022).

Anti-tümör aktiviteleri hem T lenfositleri hem de NK hücreleri tarafından üretilen interferon- γ (IFN- γ) aracılığıyla uyarılır. Makrofaj aracılı tümör hücresi öldürülmesi, majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) antijenlerinden, tümöre özgü antijenlerden ve hedeflenen dönüştürülmüş hücrenin türünden bağımsızdır, ancak makrofaj ile tümör hücresi arasında doğrudan temas gereklidir (Kumari ve Choi, 2022).

Her ne kadar makrofajların uzun süredir tümör öldürücü olduğu düşünülse de son çalışmalar bazı makrofajların aslında tümör oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (Kumari ve Choi, 2022; Reis-Sobreiro ve ark., 2021). Tümörle ilişkili makrofajların anjiyogenezi teşvik edebildiği ve tümör hücresi istilasası ile metastazı arttırabildiği deneysel olarak gösterilmiştir. Ek olarak makrofajlar immunosüpresif olabilir, NK hücrelerinin ve lenfositlerin anti-tümör aktivitesini bloke edebilir (Annaratone ve ark., 2020)

2.3.4.5. Tümöre İnfiltrate Olan Lenfositler

Tümöre infiltre olan lenfositler (TIL'ler), TNBC ve HER-2 pozitif meme karsinomlarında daha sık görülür. TIL'lerin temel bileşimini T-lenfositler (CD3+) oluşturmaktadır. T-lenfositler, edinsel bağışıklık sisteminin ana bileşeni olarak sıklıkla sitotoksik (CD8+) T hücreler, yardımcı (CD4+) T hücreler ve düzenleyici T hücreler (T-reg) şeklinde sınıflandırılırlar (Annaratone ve ark., 2020). Birbirinden farklı fenotipe sahip olan her bir alt tip ise yangısal süreçte farklı bir rol oynamaktadır. CD4+T ve CD8+T hücreleri en önemli anti-tümör hücrelerdir ve birçok kanser türünde olumlu prognozla ilişkilendirilmesine karşın meme karsinomlarında yüksek düzeydeki T-reg hücreleri olumsuz prognozla ilişkilendirilmektedir. T-reg hücreleri anti-tümör immun tepkisini baskılamasına ek olarak dolaşımdaki sayılarının artması meme kanseri metastazını teşvik etmektedir. (Fico ve Santamaria-Martinez, 2020; Yang ve ark., 2022).

TIL'lerin küçük bir bileşenini oluşturan adaptif bağışıklık sistemi hücreleri olan B lenfositler de meme kanseri TME'de yer almaktadır (Annaratone ve ark., 2020; Fico ve Santamaria-Martinez, 2020).

Sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler), adaptif antitümör immun tepkinin primer efektör hücreleridir. CTL'lerin çoğu, dendritik hücreler tarafından tümör hücrelerinin yüzeyindeki tümör antijenlerini tanımak ve bunlara bağlanmak üzere hazırlanmış CD8+T lenfositlerdir. Tümör hücreleri daha sonra sitoliz yoluyla öldürülür. CD4+ Th (yardımcı T hücreleri) lenfositleri, CD8+T lenfosit çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran interlökin-2 (IL-2) ve IFN- γ gibi sitokinleri salgılayarak CD8+ CTL'lerin ve B lenfositlerin işlevini artırır (Annaratone ve ark., 2020; Fico ve Santamaria-Martinez, 2020).

Bununla birlikte, aslında tümörleri diğer bağışıklık hücrelerinin saldırılarına karşı koruyan ve T-reg'lerden oluşan bir T hücre popülasyonu vardır. T-reg hücreleri tümörlerde birikerek tümör dokusuna toleransı indüklerler. Tolerans, diğer lenfosit tipleri, makrofajlar ve dendritik hücreler ile karmaşık bir dizi etkileşim yoluyla

oluşturulur. Bu etkileşimlere hem çözünebilir faktörler hem de hücre-hücre teması aracılık eder (Rauner ve Kuperwasser, 2021).

2.3.4.6. Nötrofiller

Granülositlerin çoğunluğunu oluşturan nötrofiller meme kanserindeki kanser kök hücreleri ile de ilişkilendirilmektedir. Makrofajlarda olduğu gibi nötrofillerde zıt işlevlere sahip iki alt gruba bölünebilir. N1 nötrofiller, proinflamatuvar aktivite sergilerken, N2'ler ise T lenfositleri inaktive ederek kanser gelişimini destekler (Annaratone ve ark., 2020). Prognostik değerleri kan örneklerinde nötrofil:lenfosit oranı (NLR) kullanılarak belirlenir ve yüksek NLR değeri, daha kötü sağkalım ile ilişkilidir. TAM'larda olduğu gibi tümörle ilişkili nötrofiller de bazı sitokinler ve lökotrienleri salgılayarak EMT ve metastazı teşvik eder (Fico ve Santamaria-Martinez, 2020; Rauner ve Kuperwasser, 2021).

2.3.4.7. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler

Doğal Öldürücü (NK) hücreler, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla tümör hücrelerini tanıyarak öldüren ve hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık özellikleri gösteren sitotoksik lenfositlerdir. NK hücrelerinin işlevi, aktive veya inhibe edici reseptörlere yönelik ligandları arasındaki etkileşime bağlıdır (Peipp ve ark., 2022). NK hücreleri, aktive edici bir sinyalin varlığında granül ekzositozu ve apoptoz olmak üzere iki farklı yol izleyerek hedefi öldürür. Ayrıca sitotoksik etkileri nedeniyle NK hücrelerinin tümör dokusu içerisine yoğun infiltrasyonu özellikle meme tümörlerinde iyi prognoz ile ilişkilidir. NK hücreleri tümör hücrelerinin üzerindeki MHC moleküllerini ve stresin indüklediği ligandları tanıyan hem inhibitör hem de aktive edici çeşitli reseptörler bulundurur (Tarazona ve ark.,2020). NK hücreleri çok çeşitli neoplastik ve virüs ile enfekte olmuş hücreleri öldürebilir. MHC sınıf I moleküllerini eksprese eden hücreler tercihen NK hücreleri tarafından korunurken, MHC moleküllerini içermeyen hücreler spesifik olarak hedeflenir. Bir NK hücresi hedef hücreyi tanıdığı ve ona bağlandığında, immunolojik sinaps adı verilen ve iyi organize edilmiş bir yapı, hücre-hücre temas bölgesinde hızla oluşur. Bu arayüzde

NK hücresi, gözenek oluşturuvcu bir protein olan perforin ve serin proteaz olan granzimleri içeren litik granülleri salgılar. Perforin granzimlerin hedef hücreye girişine aracılık eder. Granzimler hedef hücreye girdikten sonra hem kaspaza bağımlı hem de kaspazdan bağımsız apoptozu başlatır (Fico ve Santamaria-Martinez, 2020; Rauner ve Kuperwasser, 2021).

2.3.4.8. Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler (MDSC'ler)

Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), kanser hastalarının kemik iliğinde, lenfoid dokularında, kanında ve tümörlerinde biriken ve doğuştan gelen T hücresi aracılı anti-tümör immun yanıtları baskılayan olgunlaşmamış miyeloid öncüleridir (Arroyo-Crespo ve ark., 2019; Goedegebuure ve ark., 2013). MDSC'ler, monositlere, nötrofillere veya DC'lere benzeyen hücreler de dahil olmak üzere farklı miyeloid hücre tiplerinin heterojen bir koleksiyonudur. MDSC'ler morfolojisi ve fenotipi nötrofillere benzeyen ve tüm MDSC popülasyonunun %80'ini oluşturan; granülositik MDSC (G-MDSC) ve morfolojisi ile fenotipi monositlere benzeyen, tüm MDSC popülasyonunun yaklaşık %20'sini temsil eden; monositik MDSC (M-MDSC) olmak üzere iki kategoriye ayrılır (Birbrair, 2020; Fridman ve ark., 2012). MDSC'ler tümörlü hastalardan başka kronik yangısal hastalıkları olanların dokularında da birikir. MDSC'lerin, IL-10 ve transforming growth factor-beta (TGF- β) gibi immunsupresif sitokinlerin salgılanması, T-reg farklılaşmasının teşvik edilmesi ve CTL ile Th1 farklılaşmasının inhibisyonu dahil olmak üzere birçok farklı mekanizma ile bağışıklık yanıtlarını baskıladığı bilinmektedir (Abbas ve ark., 2021; Birbrair, 2020; Chen ve ark., 2018; Fico ve Santamaria-Martinez, 2020).

2.3.5. Anti-tümör Efektör Mekanizmaları

Canlı organizmalar, tümör antijenlerine karşı çeşitli bağışıklık yanıtları geliştirebilirler. İmmun yanıtın türü ve bunun tümör hücrelerine karşı etkinliği, genellikle organizmanın doğal bağışıklık tepkisine ve saldırı altındaki tümör antijeninin özelliklerine göre şekillenir (Diamond ve Kanneganti, 2022). Tümör hücrelerine karşı en az spesifik bağışıklık tepkisi, kanser hücrelerine karşı şekillenen

ilk savunma hattı olduğu bilinen doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir. NK hücreleri ve makrofajlar da dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri kalıcı bir anti-tümör bağışıklığı oluşturmaz (Rameshbabu ve ark., 2021; Pastò ve ark., 2020).

Hücre aracılı ve humoral bileşenlerden oluşan adaptif bağışıklık sistemi tarafından daha spesifik bir immun yanıt oluşturulmaktadır (Sá-Nunes, 2022). En etkili antitümör savunmasını hücre aracılı bağışıklık yanıtının oluşturduğu bilinmektedir. Adaptif immun yanıtın oluşabilmesi için tümör antijenlerinin bazı immun efektör hücrelere dendritik hücreler tarafından sunulması gerekir (Marcucci ve Rumio, 2021). Dendritik hücreler, canlı tümör hücrelerini veya ölmekte olan tümör hücrelerinden salınan antijenleri yakalayıp bu antijenleri uygun bir boyuta parçalar, bunları sınıf I/II MHC antijenlerine bağlayarak hücre yüzeyinde sunar (Diamond ve Kanneganti, 2022). Dendritik hücreler daha sonra farklı lenfositlerle etkileşime girerek sunulan spesifik tümör antijenine karşı yanıtın oluşmasına katkıda bulunur. Antijenle aktive olan CD8⁺ ve CD4⁺ T lenfositleri sırasıyla tümöre spesifik sitotoksik ve Th lenfositlere dönüşürken, B lenfositleri immunoglobulin salgılayan plazma hücrelerine dönüşmektedir. CD8⁺ lenfositler, MHC sınıf I antijenleri bağlamında tümör antijenlerini tanıırken, CD4⁺ hücreleri bu antijenleri yalnızca MHC sınıf II molekülleri ile birlikte tanımaktadır (Pastò ve ark., 2020; Rameshbabu ve ark., 2022).

2.3.6. Tümör Kaçış Mekanizmaları

Bağışıklık sistemi ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimin sonucu olarak TME, iki ucu keskin bir bıçak gibidir. Bağışıklık sistemi tümör hücrelerini tanıyıp yok edebilmektedir ya da yüksek adaptasyon yetenekleri sayesinde tümör hücreleri, bağışıklık gözetiminden kaçmak veya bağışıklık efektör hücrelerini inhibe etmek için farklı stratejiler geliştirmektedir (Mortezaei, 2020). Bu durum tümör hücrelerinin büyümesinin sınırlanmadığı ve tümörün klinik olarak belirgin hale geldiği immun kaçışla sonuçlanmaktadır (Leone ve ark., 2018). İmmun kaçış mekanizmaları arasında, kanserin farklı aşamalarında rol oynayan immun dirençli tümör hücrelerinin seçimi, DC'ler ve T hücreleri gibi anti-tümöral immun hücrelerdeki anormallikler, T hücresi

trafiğindeki engeller ve immunsupresif TME'nin oluşumu yer almaktadır (Poggi ve ark., 2014; Seliger ve Massa, 2021).

TME içerisinde, tümör hücresi büyümesini desteklemek ve immun aracılı kontrolden kaçmak için çeşitli moleküler mekanizmalar devreye sokulabilir. Bu düzenlemede tümör hücresi, endotel, mezenkimal stromal hücre (MSC), T-reg, DC'leri içeren antijen sunan hücre (APC) ve MDSC'ler rol oynar. Bu hücre popülasyonları birbirleriyle pozitif/negatif sinyaller vererek etkileşime girer, böylece hayatta kalmayı, tümör hücrelerinin genişlemesini ve anti-tümör efektör lenfosit aktivitelerini etkiler (Leone ve ark., 2018; Poggi ve ark., 2014; Seliger ve Massa, 2021).

Tümör ilerlemesinin erken aşamalarından itibaren anti-tümöral bağışıklık ve tümörden kaçış mekanizmaları arasında hassas bir denge ortaya çıkmaktadır. Daha az immunojenik tümör hücresi klonlarının seçimi (kanser immun düzenlemesi) ve immun yanıtları sınırlayarak tümöral ilerlemeyi destekleyebilen immun baskılayıcı mikro ortamın teşvik edilmesi bu süreçte çok önemlidir (Seliger ve Massa, 2021).

Tümör hücrelerinin çoğalması, bağışıklık tepkisini saptırabilir. MDSC ve T-reg hücrelerinin oluşumunu indükleyerek efektör anti-tümör lenfositlerin neoplastik hücrelerin ortadan kaldırılmasındaki etkinliğini sınırlayabilir (Leone ve ark., 2018; Poggi ve ark., 2014; Seliger ve Massa, 2021).

2.4. Meme Tümörü Hayvan Modelleri

Meme tümörü hayvan modelleri, temel meme kanseri araştırmalarının tarihçesi ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Kemirgenler, köpekler, kediler, domuzlar ve insan olmayan primatlar (NHP'ler) gibi birçok hayvan türü meme kanseri araştırmalarında yer almaktadır (Mondal ve ark., 2022). Spontan meme tümörleri dişi köpeklerde çok yaygındır ve teşhis edilen tüm tümörlerin %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (Vilhena ve ark., 2020). Köpeklerin meme tümörleri progresyonu, tanı ve tedavisi bakımından insan meme kanserine benzerlik göstermektedir. Memeli

hayvanlar arasında kemirgenler, özellikle fareler ve sıçanlar, küçük boyutları, düşük maliyetleri ile anatomi, fizyoloji ve genetik bakımından da insanlara benzerlik göstermeleri nedeniyle meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Vilhena ve ark., 2020; Zeng ve ark., 2020).

Meme kanseri için fare modellerinin oluşturulması, tümör kök hücrelerinin büyümesi, dolaşıma katılması, TME’de meydana gelen değişimleri, kanser gelişimi ve biyolojisini anlayabilmek için oldukça önemlidir. Ayrıca terapötik ilaç geliştirme, etkili veya toksik ilaç dozlarının değerlendirilmesi için prelinik çalışmalarda hayvan modellerinin kullanılması yeni tedavi stratejileri geliştirme açısından önem arz etmektedir. Bununla birlikte hayvan modelleri, meme tümörlerinin seyri, metastaz mekanizmalarının anlaşılması ve prognoz hakkında ön bilgi edinmek üzerine yapılan çalışmalarda büyük ölçüde yardımcı olmaktadır (Zhou ve ark., 2023).

2.4.1. Spontan Modeller

Spontan meme kanserinin en önemli özelliği deney hayvanlarına dışarıdan yapay olarak hiçbir uygulamanın yapılmaması, doğal olarak meydana gelmesi ve dolayısıyla etiyojoloji açısından insanlara benzemesidir.

Kemirgenlerin yanı sıra köpek, kedi ve maymun gibi büyük hayvan türlerinde de spontan meme kanseri olguları rapor edilmiştir (Vilhena ve ark., 2020). Dişi köpekler, boyutlarının büyük olması, yüksek oranda spontan meme kanseri vakası sergilemeleri, insanlarla benzer ortamlarda yaşamaları ve sağlam bir bağışıklık sistemine sahip olmaları nedeniyle çalışmalarda büyük değer taşımaktadır. Köpekler ve insanlarda %80’den fazla genetik benzerlik görülmektedir. Ayrıca köpek meme kanserleri olguları evcil hayvan hastanelerinde sıklıkla teşhis edilmekte ve sıklıkla klinik uygulamalarla tedavi edilmektedir. Yapılan çalışmalarda köpekte spontan inflamatuvar meme kanserinin histopatolojik morfolojisi ve klinik özellikleri analiz edilmiş ve bu kanser tipinin insan inflamatuvar meme kanserinin spontan bir modeli olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır (Zeng ve ark., 2020).

Spontan meme tümörleri insan tümörlerine benzer çünkü genetik olarak heterojen popülasyonlarda doğal olarak meydana gelirler. Spontan meme kanseri hayvan modelleri genellikle kanser etiyolojisini incelemek için kullanılır (Vilhena ve ark.,2020).

2.4.2. İndüklenmiş Modeller

2.4.2.1. Kimyasal İndüksiyon Yöntemi

Meme tümörü insidansını arttırmak ve tümör oluşumunu hızlandırmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların kullanılması şeklinde sınıflandırılabilir. Bu ajanlar hayvanlara oral uygulama, enjeksiyon veya tüm vücudu maruz bırakma yoluyla uygulanabilir. En yaygın kullanılan kimyasal ajanlar 7,12-dimetilbenz-[α]-antrasen (DMBA) ve N-metil-N-nitrosourea'nın (MNU) uygulamasıdır (Rojas-Armas ve ark., 2020). DMBA en iyi bilinen polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) olup genotoksik ve kanserojenik bir kimyasaldır. DMBA DNA onarımına katılan pek çok enzimde hasar meydana getir ve hücrel sitozolik reseptör aril hidrokarbon reseptörünü (AhR) aktive ederek tümör gelişimine neden olmaktadır. Güçlü kanserojen ve bağışıklık baskılayıcı aktivitelerinden dolayı klinik öncesi modellerde meme kanserini indüklemek için yaygın olarak kullanılan ticari bir kimyasal maddedir (Zeng ve ark., 2020; Zingue ve ark., 2021).

Farelerde DMBA, 3,4-benzopiren, 3-metilkolan-thren (MCA), 1,2,5,6 dibenzantrasen ve üretan gibi kimyasal maddeler kullanılarak meme tümörü indüklenebilir. Bu indüklenen meme tümörlerinin çoğunluğunu adenomlar ve tip B adenokarsinomlar oluşturmaktadır (Rojas-Armas ve ark., 2020; Zingue ve ark., 2021).

2.4.2.2. Fiziksel İndüksiyon Yöntemi

Meme tümörleri, orta veya yüksek dozda iyonlaştırıcı ve nötron radyasyonu gibi fiziksel ajanlarla tüm vücut veya segmental ışınlama yoluyla tetiklenebilir. X-

ışınları, α -ışınları, β -ışınları ve γ -ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti ile DNA kırılma hasarı ve gen mutasyonları oluşumu sonrası meme tümörü oluşabilir. Sıçanlarda fiziksel ajanlarla elde edilen meme tümörleri genellikle hormona bağımlı adenokarsinomlar veya fibroadenomlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bazı çalışmalar, tek yüksek doz radyasyonun, dereceli radyasyonla karşılaştırıldığında tümör görülme sıklığını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir (Zeng ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2023).

2.4.2.2. Biyolojik İndüksiyon Yöntemi

Deney hayvanlarında meme tümörünün biyolojik yolla indüksiyonu onkogenleri aşırı eksprese etmek veya tümör baskılayıcı genleri susturmak için lentivirüslere dayanır (Zingue ve ark., 2021).

Kanserojenlerin neden olduğu meme tümörleri genellikle hormona bağımlı adenokarsinomlardır. Ek olarak, hayvanlardaki tümör sayısı, latentlik süresi ve histolojik tip, kanserojenlere maruz kaldığında yaştan, üreme geçmişinden ve konakçının endokrin ortamından etkilenebilir. Genel olarak, indüklenmiş meme kanseri hayvan modelleri, etiyoloji ve önleme çalışmaları için kullanılmaktadır (Zhou ve ark., 2023).

2.4.3. Transplantasyon Hayvan Tümör Modelleri

Transplantasyon hayvan tümör modelleri, spontan veya indüklenmiş meme kanseri dokularının/hücrelerinin deney hayvanlarına transplantasyonunu içeren modellerdir (DeRose ve ark., 2011). Bu yol ile meme tümörlerinin oluşturulmasında, tümör hücreleri tümör gelişimi için farelere doğrudan implante edilebilir. Transplantasyon bölgeleri primer tümör ve buna ek olarak farklı organ/dokularda metastaz oluşturmak amacıyla ortotopik (meme yağ yastığı) ve heterotopik (deri altı, periton içi, kas içi) olarak seçilebilir (Zeng ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2023).

Kanser hücrelerinin kökenine bağlı olarak, bu modeller ksenograft veya singenik (allograft) olarak sınıflandırılır. Ksenograft model için bağışıklık sistemi yetersiz olan farelere ihtiyaç vardır. Allograft modelde ise deney hayvanları, normal bağışıklık fonksiyonuna ve aynı genetik yapıya sahip farelerden oluşur (Zeng ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2023).

2.4.3.1 Allograft Tümör Modelleri

Singenik modellerde, tümör hücrelerinin kökeni, tümör hücrelerinin implante edileceği hayvanlara genetik olarak benzer laboratuvar hayvanlarından kaynaklanmaktadır ve bu model için implantasyondan önce uygulanacak olan hayvanın bağışıklığını baskılamaya gerek yoktur. Bu yüzden bu model, bağışıklık sistemi ile kanser gelişimi arasındaki etkileşimi incelemek için en ideal yöntemlerden biridir (DuPre ve Hunter, 2007). Spontan veya indüklenmiş olarak farelerden üretilen meme kanseri hücre hatları, normal bağışıklık fonksiyonuna ve aynı genetik suşa sahip konakçıya nakledilir. Bu amaçla, BALB/c farelerden üretilen 4T1, EMT6, TM40 ve D2A1; C57BL/6 farelerden üretilen E077; ve FVB farelerden üretilen MVT1, 6DT1 ve M6 yaygın olarak kullanılan meme kanseri hücre hatları arasında yer almaktadır. Bunlar arasında, üçlü-negatif meme tümörü (TNBC) olan BALB/c fareden üretilmiş 4T1 hücre hattı modeli, anti-kanser ilaçlarının taranması ve akciğer, karaciğer, dalak, beyin ve kemik gibi diğer organlarda görülen metastazların, tümör ve konakçı kaynaklı faktörlerin incelenmesi için önemli bir modeldir (DuPre ve Hunter, 2007). 4T1 hücre hattı modeli insan meme kanserine benzer özellikler sergilemesiyle de sıklıkla başvurulan fare meme kanseri modelidir. Fare meme yağ yastığına aynı genetik benzerliğe sahip olan kanser hücrelerinin implantasyonu ile oluşturulur (Park ve ark., 2018; Yang ve ark., 2021).

Singenik meme kanseri modellerinin hücre hatlarının hızlı büyümesi, metastazı ve immun bileşenli mikro çevre varlığı gibi çeşitli avantajları olmasına rağmen, nakledilen kanser hücreleri insanlara ait olmadığı için bu model ile ilgili de sınırlı bilgi söz konusudur (Yang ve ark., 2021; Zeng ve ark., 2020).

2.4.3.2. Ksenogreft Tümör Modelleri

Ksenogreft modelinde, tümör hücreleri insan meme tümörlerinden türetilir ve bağışıklığı baskılanmış hayvanlara implante edilir (Invrea ve ark., 2020; Souto ve ark., 2022). Bu model için en çok kullanılan sıçan modeli RNU/RNU nude sıçanlardır (Yang ve ark., 2014). Bu modellemede, hücre hattı veya hasta kökenli ksenogreftler bağışıklık yetmezliği olan farelere implante edilir. Sonuçta tümörler, orijinal tümörlerin histolojik, immunolojik ve biyolojik özelliklerini korur. Hücre hattı kökenli ksenogreftler, nude (timus ve T lenfositlerden yoksun), SCID (şiddetli kombine immun yetmezlikli hem B hem de T lenfositlerinden yoksun) ve NOD/SCID (NK hücrelerinin düşük aktivitesi ile T ve B hücresi fonksiyonunun kaybının şekillendiği) fare suşlarının bulunduğu bağışıklığı baskılanmış fare ırklarını içermektedir. Hastadan türetilen ksenogreft (PDX) modelinde, hastanın tümöründen kanserli dokuları doğrudan bağışıklık yetersizliği olan farelere implante edilir, böylece hem hücre-hücre etkileşimi hem de tümör mikro ortamı korunabilir. PDX modeli, gen ekspresyon profili ve ilaç yanıtı dahil olmak üzere primer hasta tümörünün özelliklerini korur. Ayrıca ilaç taraması, biyobelirteç geliştirme ve terapötik etkilerin değerlendirilmesi için büyük avantajlar sunar (Kita ve ark., 2020; Kleinmanns ve ark., 2022; Liu ve ark., 2023; Zanella ve ark., 2022).

Uzun süreli *in vitro* kültür nedeniyle insan meme kanseri hücre hatları genetik anormallikler, gen ekspresyon modelleri, patolojik özellikler, ilaç tepkileri ve tümör mikro ortamları açısından primer tümörlerden farklılık gösterir. PDX modelleri doğrudan insan tümör örneklerinden elde edildikleri ve hiçbir zaman *in vitro* kültüre alınmadıkları için giderek daha popüler hale gelmektedir. Bu ksenograftlar genetik anormallikler, gen ekspresyon profilleri, patolojik parametreler, metastatik potansiyel ve ilaç yanıtı açısından hastalara çok yakındır (DeRose ve ark., 2011). PDX modelleri, kişiselleştirilmiş ilaç seçimi için biyobelirteçleri tanımlamak ve klinik tedavide CDX transplantasyonunun sınırlamalarının üstesinden gelmek için kullanılır (DeRose ve ark., 2011; Liu ve ark., 2023).

2.4.4. Genetik Olarak Tasarlanan Hayvan Modelleri (GEMM'ler)

Genetik olarak tasarlanan hayvan modelleri (GEMM'ler) ile meme kanseri oluşturmak için farklı metotlar kullanılmaktadır. Bunlardan ilki transgenik teknoloji kullanılarak, dokuya özgü promotörler yoluyla transgenlerin dokuya özgü ekspresyonu sonucu transgenik farelerin üretilmesine dayanan transgenik meme kanseri hayvan modelleridir. Bu modelde onkogenlerin çok sayıdaki kopyası rastgele bir şekilde fare genomuna nakledilir. GEMM'lerin ikincisi, deney hayvanlarının genomunda bulunan p53, BRCA1/2 ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerinin çıkarılması sonucu oluşturulan meme kanseri modelidir. p53 nakavt (p53^{-/-}) fareler kendiliğinden meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kötü huylu tümörler geliştirebilir (Liu ve ark., 2023). Memeye özgü p53 nakavt farelerde, yaklaşık 10 hafta sonra spontan tümörler meydana gelir ve 15-20 hafta sonra hızlı tümör gelişimi şekillenir (Liu ve ark., 2023). PTEN, insan kanserlerinde yaygın olarak mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı genidir. PTEN +/- fareler altı aylıktan büyük yaşa geldiklerinde, %50'si meme kanseri olan bir dizi tümör geliştirirler (Liu ve ark., 2023).

Ayrıca spesifik onkogenler eksprese eden transgenik fareler ve spesifik tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğradığı veya genomdan çıkarıldığı gen knock out fareler ile kombinasyon halinde karmaşık transgenik meme kanseri fare modelleri oluşturulabilir (Zeng ve ark., 2020).

Tablo 2.2. Meme tümörü hayvan modelleri (Zeng ve ark., 2020).

Meme Tümörü Hayvan Modelleri		
Spontan Modeller		
İndüklenmiş Modeller	Kimyasal Yöntem	DMBA MNU MCA
	Fiziksel Yöntem	İyonlaştırıcı radyasyon
	Biyolojik Yöntem	Nötron radyasyon

Tablo 2.2. (Devam) Meme tümörü hayvan modelleri (Zeng ve ark., 2020).

Transplantasyon Modeller	Allogreft Yöntem	BALB/c farelerden üretilen 4T1, EMT6, TM40 ve D2A1	C57BL/6 farelerden üretilen E0771
		FVB farelerden üretilen MVT1, 6DT1 ve M6	
	Ksenogreft Yöntem	Hastadan türetilen ksenogreft (PDX)	
		Hücre hattından türetilen ksenogreft modeller	
Genetik Tasarlanan Modeller	Olarak Transgenik Yöntem		
	Gen Nakavt Yöntem		
	Bileşik Yöntem	Transgenik	

2.5. Meme Tümörlerinde Tanı ve Prognostik Biyobelirteçler

Günümüzde ince iğne aspirasyon biyopsisi, eksizyonel biyopsi, radyografi ve bilgisayarlı tomografi gibi teknikler meme tümörlerinin teşhisinde kullanılmaktadır. Köpek meme tümörlerinde yaş, tümörün büyüklüğü ve evresi, tümörün histopatolojik tipi, tümörün yayılım derecesi, östrojen reseptör durumu, mikrodamar yoğunluğu ve moleküler genetik değişimler gibi birçok faktör prognostik açıdan önemlidir. İnsanlarda ve köpeklerde meme tümörü olguları çok benzerlik göstermektedir. Bu sebeple, meme kanseri olgularında insanlara özgü biyobelirteçler, köpek meme tümörü olgularının da teşhisinde ve patofizyolojisinin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır (Hambly ve ark., 2023).

Köpeklerde meme bezi tümörlerinin duktusları ve asinusları döşeyen epitel hücrelerinden, miyoepitel hücrelerden ya da bunları çevreleyen bağ dokudan köken aldıkları belirtilmiştir (Aydoğan, A 2010). Veteriner hekimliğinde meme bezi tümörlerinin tanısında zaman zaman güçlüklerle karşılaşmakta ve bu güçlüklerin en

başında tümörün köken aldığı dokunun histopatolojik yöntemle ortaya konulamaması gelmektedir. Bu nedenle, güvenilir bir tanı için immunohistokimyasal (IHC) tekniklerin de kullanılmasının gerektiği vurgulanmıştır (Brunetti ve ark., 2003b; Karelina ve Golubeva 1983; Milli ve ark., 2000; Monteros ve ark., 2002; Sassi ve ark., 2008).

IHC teknikler, tümörün köken aldığı dokuyu belirleyerek objektif tanıya olanak sağlarlar. Bu tekniklerde kullanılan monoklonal ve poliklonal belirteçler insan kökenlidir. Deneysel çalışmalarda, insan ve köpek dokularında eşdeğer immunreaksiyonların meydana geldiği gösterilmiş ve insanlarda kullanılan bu markırların köpeklerde de güvenilir bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiştir (Hellmén ve Lindgren 1989).

IHC tekniği, tümörler için prognostik ve prediktif faktörleri belirlemede değerli bir araç olarak kullanılmaktadır (Ramos-Vara ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar arasında literatür verilerine ve tartışmalara dayanarak, köpek ve kedi meme karsinomları için immunohistokimyasal panelin, ER, PR, Ki-67 ve COX-2 ekspresyonlarından oluşması gerektiği savunulmuştur (Fawzy ve ark., 2022; Hambly ve ark., 2023; Yang ve ark., 2023).

Ayrıca meme tümörlerinde tanı amacıyla kullanılan belirteçler, tümör hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozunun belirlenmesinde kullanılan Ki-67 ve p53, metastatik potansiyelinin belirlenmesinde E-cadherin, CEA, CA 15-3, anjiogenezisin belirlenmesinde VEGF, EGFR ve HER-2 yangının belirlenmesinde COX-2, hormon reseptörlerinin belirlenmesinde ER ve PR, gen mutasyonlarının belirlenmesinde BRCA1 ve BRCA2 şeklinde sıralanabilir (Fawzy ve ark., 2022; Yang ve ark., 2023).

2.5.1. Ki-67

Bir tümörün proliferasyon potansiyelinin tahmini tümör malignitesini belirlemek için yararlıdır. Yüksek proliferasyon oranı, hızlı tümör büyümesi ile ilişkilidir ve yeteneği lokal ve uzak metastazlara neden olur. Tümörün proliferasyon

potansiyelini belirleyen biyobelirteçler arasında Ki-67 yer almaktadır. (Fawzy ve ark., 2022; Hambly ve ark., 2023; Yang ve ark., 2023).

Ki-67 hücre döngüsünü düzenleyerek tümör gelişimini etkilemektedir. Ki-67 sadece interfaz ve mitoz sırasında hücre çekirdeğinde saptanabilen nükleer, histon olmayan bir proteindir. Esas olarak çoğalan çekirdekte eksprese edilir ve sağlıklı hücreler ile iyi huylu tümörlerde neredeyse hiç tespit edilmez (Kaszak ve ark.,2022). Hücre döngüsünün G1 ve S fazları sırasında orta düzeydedir ve erken mitoz döneminde yükselmektedir. M evresinde en yüksek ekspresyona sahiptir ve ifadesi mitozdan sonra hızla kaybolur G0 aşamasında tespit edilemez. Mitozun ilerleyen dönemlerinde ise Ki-67 seviyesinde düşüş meydana gelir. Tümörlerde apoptoz ve hücre proliferasyonunun tanımlanmasında önemli bir role sahiptir. Yüksek Ki-67 ekspresyon seviyeleri agresif proliferasyonu, bu da kötü prognozu gösterir (Fawzy ve ark.,2022; Hambly ve ark.,2023; Yang ve ark.,2023).

Birçok tümör tipinde saptanan Ki-67 meme neoplazisinde en sık kullanılan prognostik biyobelirteçtir. Ayrıca meme kanserinde patolojik derece ve aksiller lenf yumrusuna metastaz yapan tümörlerde daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (Kaszak ve ark., 2022).

Histolojide rutin olarak kullanılan hematoksilin-eozin boyamasında mitotik indeksin (MI) belirlenmesi, tümör proliferasyonunu belirlemede IHC yöntemle Ki-67 boyaması kadar net değildir. Çünkü MI sadece mitoz geçiren hücre sayısını gösterir ve IHC yöntemle Ki-67 boyanması hücre döngüsünün farklı fazlarında ekspre edilir. Ayrıca Ki-67 köpek meme bezinin ince iğne biyopsisinden alınan sitolojik örneklerde bile değerlendirilebilir, bu da erken tümör teşhisi için bir seçenek oluşturur (Kaszak ve ark.,2022; Yang ve ark.,2023).

Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal değerlendirmesi, ER, PR ve HER-2 düzeylerinin değerlendirilmesi ile birlikte, meme kanserinin farklı alt tiplerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Kaszak ve ark.,2022; Yang ve ark.,2023).

2.5.2. PCNA

PCNA, hücre döngüsünün DNA sentez fazı sırasında hücre çekirdeklerinde ifade edilen yardımcı bir DNA polimeraz δ proteinidir ve proliferasyon indeksinin (PI) bir belirteci olarak işlev görmektedir. DNA onarım sürecinde, hücre döngüsü kontrolünde, kromatin düzeneğinde ve RNA transkripsiyonunda görev almaktadır. Hücre döngüsü sürekliliğini korumaktan sorumludur. Geç G1 fazında artar, S fazında zirveye ulaşır ve uzun yarılanma ömrü nedeniyle G2 ve M fazlarında yüksek kalır. Bu nedenle PCNA ekspresyon yoğunluğu kanser hücrelerinin çoğalma aktivitesinin ve malignitenin bir göstergesidir. Ayrıca tümör hacmi, histolojik değerlendirme, malignite derecesi ve lenfatik metastaz ile yakından ilişkilidir. Malign ve benign tümörlerin ayırıcı tanısında önemli bir biyobelirteçtir (Kaszak ve ark.,2022; Yang ve ark.,2023).

2.5.3. CD-31

Her neoplastik süreç, halihazırda var olan damarların temelinde yeni kan damarlarının oluşumunu içerir. Bu, tümör için besin ihtiyacını sağlamak ve doku homeostazını sürdürmek için gereklidir. Tümör büyümesi sırasında anjiyojenik süreç ilerler. Bu nedenle, anjiyogenez biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi, tümör ilerlemesinin veya metastaz varlığının belirlenmesi için oldukça kritiktir. Trombosit-endothel hücre adezyon molekülü olarak da adlandırılan CD-31, yangısal süreçlerde rol oynayan ve arterlerin, damarların ve kılcal kan damarlarının vasküler endotelinde eksprese edilen bir proteindir ve anjiyogenezin yaygın biyobelirteçleri arasında yer almaktadır (Kaszak ve ark.,2022; Malekian ve ark.,2020; Yang ve ark.,2023).

2.5.4. HSP70

HSP70 ve antikorlarının dolaşımdaki seviyeleri çeşitli karsinom tiplerinde yüksek oranlara ulaşır ve bu nedenle bunlar kanser türlerinin devre ve malignitelerinin değerlendirilmesi için mükemmel biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir (Vostakolaei ve ark., 2021). HSP70'in, tümör hücresi proliferasyonu, farklılaşması,

invazyonu ve metastazına doğrudan katılabildiği bilinmektedir. Yeni yapılan çalışma sonuçlarına göre HSP70'in meme kanseri prognozunu önemli ölçüde etkilediği de düşünülmektedir. HSP27 ve HSP70 yoğun ekspresyonlarının tümörlerinin tedavisinde antikanser yanıtları etkiledikleri de bildirilmiştir (Hu ve ark., 2020; Werner ve ark., 2021; Xanthopoulos ve ark., 2023; Yang ve ark., 2021).

2.6. Heat Shock Protein-HSP'ler

1962 yılında Ritossa tarafından *Drosophila*'nın kromozom şişmesi üzerinde ısıнын etkisinin keşfedilmesiyle 'ısı şok proteinleri' tanımı ortaya çıkmıştır. Isı şok proteinleri (*Heat Shock Protein*-HSP'ler), çeşitli proteotoksik stresler sırasında özellikle yüksek sıcaklığa yanıt olarak sentezlenen, protein katlanması ve olgunlaşmasını sağlayan ve dolayısıyla hücre canlılığını destekleyen bir grup protein olan moleküler şaperon ailesinin bir üyesidir. Hem prokaryot hem de ökaryot organizmalarda bulunan korunmuş HSP'ler proteostazdan sorumlu şaperonlardır. Molekül ağırlıklarına göre HSP'ler, HSP10 (HSPE), HSP20 (HSPB), HSP40 (DNAJA, DNAJB ve DNAJC), HSP60 (HSPD), HSP70 (HSPA), HSP90 (HSPC) ve büyük HSP'ler olmak üzere sınıflandırılır. Yüksek moleküler ağırlıklı HSP'ler (HSP110, HSP90, HSP70 ve HSP60 gibi) ATP'ye bağımlı bir şekilde hareket ederken, düşük moleküler ağırlıklı (10-40 kDa) HSP'ler (HSP40, HSP21 ve HSP10 gibi) ATP'den bağımsızdır (Junprung ve ark., 2021). Aynı ailede yer alan HSP'ler benzer dizi ve fonksiyonlara sahiptir. HSP'ler protein katlanması ve olgunlaşması sürecini sağlamada genellikle iş birliği içinde çalışırlar ve bu iş birliği içinde yer alan HSP'ler birlikte ifade edilirler. HSP'ler ya yapısal olarak sentezlenir ya da hücreler strese maruz kaldığında uyarılabilir. İndüklenebilen HSP'lerin her biri, strese maruz kalmayı neredeyse anında algılayan ve HSP'leri güçlü bir şekilde indükleyen bir protein olan ısı şoku transkripsiyon faktörü-1 (HSF-1) için bağlanma bölgeleri içerir. Moleküler şaperon rollerinin yanı sıra, bu proteinlerin enfeksiyona karşı karmaşık bağışıklık tepkilerine dahil olduğu ve çeşitli yangısal yolların düzenlenmesine katıldığı belirlenmiştir (Pockley ve Henderson, 2018).

HSP'lerin, hücreleri yüksek strese karşı koruma yetenekleri yanlış katlanmayı önlemeleri ile proteinlerin yeniden katlanmasını ve renatürasyonunu hızlandırmaları ile ilişkilendirilir. Bununla birlikte, stres toleransının sınırına ulaşıldığında hücreler, organizmada geri dönüşü olmayan sistemik hasarı önlemek için programlanmış hücre ölümünü (apoptoz veya otofaji) başlatır. HSP'ler ayrıca JNK, AKT ve NF- κ B gibi çeşitli sinyalleşme basamaklarının düzenlenmesi yoluyla proapoptojenik moleküllerin inhibe edilmesinde kritik roller oynarlar. Tüm bu özellikleriyle HSP'ler, hücre ölümü ile hayatta kalma arasındaki ince dengeyi korumada önemli roller üstlenmektedir (Das ve ark., 2019).

Canlı organizmalar arasında korunmuş proteinler olan HSP'ler, birçok organizmada yapısal olarak ilişkili olsalar da işlevsel olarak farklılıklar sergiler. Bir hücrenin endoplazmik retikulum, sitozol, mitokondri gibi farklı organellerinde bile farklı formlarda bulunabilirler. Bazı HSP'ler hücrede sürekli (*constitutive*) bazı izoformlar indüklenebilir (indüktif) formlarda ifade edilir (Tutar ve ark., 2010). Canlı organizmalarda, hücreler sürekli değişen koşullar altındadır ve hücrel protein homeostazının korunması hücrenin hayatta kalması ve bütünlüğü için çok önemlidir. Çünkü protein yanlış katlanması ve agregasyonunun proteinlerin yapılarının bozulmasına neden olduğu ve bu sebeple çeşitli hastalıklara yol açtığı bulunmuştur. HSP'ler, yeni sentezlenmiş polipeptidin katlanması, yarı-kararlı proteinlerin yeniden katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması, protein agregatlarının çözülmesi, membran boyunca protein translokasyonu, hücre iskeletinin korunması-yeniden yapılandırılması ve immun sistem baskılanması ya da aktive edilmesi dahil olmak üzere çok çeşitli hücrel süreçlerde görev alırlar (Tutar ve ark., 2010).

Hücrelerde bulunan intrasellüler HSP'lerin yanı sıra, ekstrasellüler HSP (e-HSP), membran yüzey HSP (m-HSP), HSP açısından zengin hücre dışı kesecikler olan eksozomlar (EV-HSP) da kanserde, bağışıklık mekanizmalarında ve çeşitli patolojik durumlarda hücreler arası iletişimde önemli roller oynar (Taha ve Eguchi, 2019). e-HSP, EV-HSP ve m-HSP hücre içi sinyal yollarını uyarak, endositoz tarafından alınarak veya çeşitli bağışıklık hücreleri, kanser hücreleri, epitelial hücreler, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), MSC ve tümör endotel hücreleri gibi alıcı hücrelere

moleküler olarak aktararak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilir. HSP'lerin hücrelerden salınması ise, hasarlı, stresli ya da ölü hücrelerden pasif salınım yoluyla olurken HSP içeren eksozomlardan salınması aktif salınım yoluyla gerçekleşmektedir (Taha ve Eguchi, 2019).

e-HSP'ler ayrıca hücrelerin ve eksozomların membran yüzeyinde de bulunabilir. Hücrelerin ve eksozomların yüzeyindeki HSP'ler, CD91+ tümör hücreleri, CD91+ fibroblastlar, CD91+ SREC1+ TLR+ profesyonel APC'leri ve CD94+ sitolitik bağışıklık hücreleri tarafından tanınabilir. Bu nedenle, mHSP de dahil olmak üzere e-HSP, tümör hücrelerinde malignite olaylarını aktive edebilir ya da bunun tersine, APC'ler tarafından antijen çapraz sunumunu, NK hücrelerini, CD8+ sitotoksik T lenfositler gibi sitolitik bağışıklık hücrelerini uyarabilir (Taha ve Eguchi, 2019).

HSP70 protein katlanmasını, translokasyonunu ve bozulmasını kontrol ederek hücrel homeostazın düzenlenmesinde, ayrıca stres oluşturan faktörler sonrasında hücrenin hayatta kalmasının sağlanmasında görev alan yüksek molekül ağırlıklı bir şaperon proteindir (Das ve ark., 2019). HSP70 yapısı ATPaz, substrat protein bağlanma ve C-terminal bölgeleri olmak üzere üç farklı protein ünitesinden oluşmaktadır. Deneyler sırasında türlerin sürekli (*constitutive*) ve indüktif formları ile de ünite değişimi yapılmış ve bu kimerik yapılarda ise konstitutif ve indüktif izoformların farklı proteinler ile etkileştiği görülmüştür (Tutar ve ark., 2006). HSP70, ATPaz aktivitesine sahip 44kDa'lık bir amino-terminal nükleotid bağlanma alanı, 18 kD'lık substrat bağlanma alanı ve 10 kD'lık bir C-terminal alanına sahiptir (Das ve ark., 2019). HSP70'in 13 izoformu olup (Taha ve ark., 2019), her izoform organel ve ifade bazında farklılık göstermektedir. Literatürde sunulan çalışmalarda HSP70 kullanıldığında bu yapının hangi izoform olduğu, dolayısı ile organel ve fonksiyonu belirsiz olduğu için genel bir adlandırmaya gidilmiştir. Böylelikle literatürde oluşan kaotik fonksiyonel belirsizlikleri giderip adlandırma ile kullanılan organel spesifik HSP belirlenmesi hedeflenmiştir. HSP70 izoformları HSPA olarak sınıflandırılmışlardır. Örneğin HSPA8 (HSC70) sitozolik konstitutif form iken HSPA5, ER (endoplazmik retikulum) HSP70 proteindir. HSP yapıları ailenin diğer HSP üyeleri ve koşaperonlarla farklı kompleksler kurarak oldukça farklı fonksiyonlara

sahip olabilirler. Bu kompleksler substrat proteinleri katlayabildikleri gibi proteazomda yıkımlanmaya sebep olabilirler. Oluşan farklı kompleks kombinasyonları ve bunların her birinin fonksiyonları henüz tam olarak tespit edilmemiştir. Buna rağmen HSP70 antiapoptotik olup hücrelerde sağ kalımı sağlar (Junprung ve ark., 2021).

2.6.1. HSP70'nin Kanserdeki Rolü

Kanserde bol miktarda bulunan HSP70 karsinogenezde geniş bir aktivite yelpazesine sahiptir. HSP70'in hem onkogenik hem de immunojenik olmak üzere iki yönlü davrandığı literatürde rapor edilmektedir (Chen ve ark., 2020; Van Eden ve ark., 2017).

Tümör hücreleri, e-HSP70'ler için doğal bir kaynaktır. IFN- γ ile canlı tümör hücrelerinin tedavisinden sonra tümör hücrelerinden aktif bir HSC70 salınımı vardır (Bausero ve ark., 2005). HSP70 ayrıca APC'lere bağlanma için CD40 ligandı ile rekabet eder. Ayrıca, DC'lerin lenf düğümlerine göçünün uyarılmasında ve olgunlaşmasında HSP70'lerin etkisi vardır.

HSP70 dışında, tümör hücre hatlarının plazma membranında başka şaperonlarda mevcuttur (Linder ve Pogg 2021). Bununla birlikte, ağırlıklı olarak, HSP70 ve HSP90 grubunun üyeleri hücre yüzeyinde ekspre edildiklerinde doğal bağışıklık sistemini uyarma kapasitesine sahiptir (Albakova ve ark., 2020).

2.6.1.1. Hsp70 ve Tümör Bağışıklığı

HSP70'in hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık tepkilerini uyardığı bilinmektedir. HSP70, tümör hücrelerinin membran yüzeyinde yüksek düzeyde eksprese edilir. Bu HSP70 membran pozitif tümör hücreleri aktif salınım yoluyla HSP70 yüklü eksozomları serbest bırakarak NK hücrelerinin uyarılmasına yol açar. Böylece yüzeye bağlı HSP70'leri, HSP70 proteini ile önceden uyarılmış NK hücreleri tarafından tanınır hale gelir.

Molekül ağırlığı yaklaşık 70kDa olan HSP'ler antijenik peptit taşıyıcıları olarak, MHC hücreleri tarafından sunulabilir veya doğal immunojenler olarak antitümör immun yanıtları uyarma kapasitesine sahiptir (Albakova ve ark., 2020). ATP ve ADP'nin varlığına bağlı olarak, HSP70 tümöre özgü antijenleri salma ve bağlama kapasitesine sahiptir. MHC'lerden antijenlerin sunumun ardından, bir CD8+ sitotoksik T lenfosit yanıtı başlatılır (Kumar ve ark., 2024; Somu ve ark., 2024). Ayrıca, rekombinant HSP70'in tümör içi infüzyonunun, NK hücrelerinin ve CD8+ sitotoksik T lenfositlerinin tümörlere infiltrasyonunu ve interferon gama (IFN- γ) salgılanmasını arttırdığı gösterilmiştir (Albakova ve ark., 2020).

2.6.1.2. HSP70 ve Apoptoz

Kanserli hücrelerde bulunan HSP70'in hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolları etkileyerek apoptozu baskılaması sonucu kanserin büyümesini desteklediği belirlenmiştir. DNA hasarı bulunduğu aktive olarak hücre büyümesini durduran ve apoptozu indükleyen genleri aktive eden p53 proteini, tümör supresör (baskılayıcı) olarak görev yapmaktadır (Chen ve ark., 2020; Van Eden ve ark., 2017). p53 pro-apoptotik BAX'ı aktive ederek mitokondriden sitokrom c salınmasına ve sitoplazmaya geçmesine neden olur. Sitoplazmaya geçen sitokrom c'in (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) APAF-1'e bağlanmasıyla da apoptozomlar oluşur ve kaspazlar aktif hale geçerek apoptozu başlatmaktadır. Ayrıca p53'ün hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollarda yer aldığı bilinmektedir. HSP70 intrinsik apoptotik yolun indüksiyonu için mitokondriden sitokrom c salınımı açısından önemli olan c-Jun N-terminal kinazın (JNK) ve p38'in inhibisyonuna yol açmaktadır. Böylece de sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını ve APAF-1 ve kaspaz-9 ile apoptozom kompleksi oluşumunu engelleyerek apoptozu baskılamaktadır. Ayrıca APAF-1'e doğrudan bağlanarak apoptozom kompleksinin oluşumunu bozduğu ve apoptozu bloke ettiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte HSP70, DNA fragmentasyonu için gerekli olan apoptoz indükleyici faktörü (AIF) inhibe ederek kaspazlardan bağımsız olarak apoptozu bloke etmektedir. Ekstrinsik yolda HSP70'in, TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörü 1 (TRAIL-R1) ve TRAIL-R2 ile etkileşimi yoluyla ölüme

neden olan sinyal kompleksinin (DISC) oluşumunu bloke ettiği tespit edilmiştir (Albakova ve ark., 2020).

2.7. Rekombinant DNA Teknolojisi (RDT)

Moleküler klonlama teknolojilerinde muazzam ilerlemeler, rekombinant DNA teknolojisinin sağlık sektörü, sürdürülebilir çevre ve tarım gibi çeşitli alanlara girmesine yardımcı olmuştur. Sağlık sektöründe, RDT biyofarmasötiklerin, aşılardan, gen terapilerinin, moleküler teşhislerin, vb. geliştirilmesinde çok önemli bir rol oynar (Vipra ve ark., 2022). Son yıllarda, kanser tedavisi, genetik hastalıklar, diyabet ve özellikle viral ve fungal direnç olmak üzere çeşitli bitki rahatsızlıkları gibi biyomedikal uygulamalar için gelişmiş stratejilere sahiptir. Sağlık sorunları göz önüne alındığında, rekombinant teknoloji, normal koşullarda tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığın tedavisine yardımcı olur (Khan ve ark., 2016; Vipra ve ark., 2022).

Rekombinant DNA teknolojisi canlı organizma veya ürünlerine geliştirilmiş ve istenen özellikler kazandırmak amacıyla bir canlıdan herhangi bir yolla yalıtılan bir genin, uygun bir konağın içerisine eklenerek orada çoğaltılmasını ve ifade edilmesini amaçlayan genetik materyalin değiştirilmesi çalışmalarına ait tekniklerin toplamıdır. Genel bir rekombinant DNA tanımı şöyle yapılabilir: Rekombinant DNA doğal olarak genellikle birlikte bulunmayan DNA dizilerinin bir araya getirilmesiyle yapay olarak oluşturulmuş herhangi bir DNA molekülüdür. Rekombinant DNA elde etmek üzere uygulanan tekniklerin tamamına da rekombinant DNA teknolojisi denilmektedir (Khan ve ark., 2016).

Yeni bir teknoloji olan rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı 1970'li yıllarda restriksiyon enzimleri ve ligaz enziminin keşfi ile mümkün olmuştur. Bu teknoloji doğal olarak bir arada bulunmayan genlerin farklı organizmalardan elde edilerek yine farklı mikroorganizmalara aktarma olanağı sunmaktadır. Aktarılabilecek olan genler enzimler kullanılarak kesilip saflaştırıldıktan sonra uygun taşıyıcılar aracılığıyla başka organizmalara aktarılabilmektedir (Jackwood ve ark., 2008). Ökaryotik genlerin yapı ve fonksiyonlarını anlamaya yönelik ayrıntılı moleküler

alışmaları mümkün kılan bu teknoloji, araştırmacıya farklı orijinlerden büyük DNA moleküllerini izole etme, kesme, yapıştırma, çoğaltma, tanıma, yapısını değiştirme ve canlı organizmalara tekrar geri kazandırma olanağı tanımaktadır. Yine bu teknoloji ile doğada normalde görülmeyen rekombinant varyasyonlar elde edilebilmekte, genlerin organizmalarda etki düzeyleri değiştirilebilmekte, organizmalara çok uzak kaynaklardan yeni genler aktarılabilmekte ve genomların tüm nükleik asit dizilişlerinin analizi gerçekleştirilebilmektedir (Tihanyi ve Nyitray, 2020).

2.7.1. Tanımlamalar

Rekombinant DNA: Vektör DNA'sı ve içine eklenen DNA parçasının oluşturduğu yeni DNA molekülüdür.

Restriksiyon enzimleri: Bakterilerden izole edilirler ve görevleri hücre içine giren viral kaynaklı DNA'ları parçalamaktır. Sayıları 1200'den fazladır.

DNA Ligaz: İki DNA parçasının kalıcı şekilde birleştirilmesi bu enzim tarafından gerçekleştirilir.

Plazmid: Bakteri içerisinde kromozom DNA'sından bağımsız olarak kendi kendine çoğalabilen çift zincirli halkasal DNA molekülüdür.

Vektör: Taşıyıcı DNA (Jackwood ve ark., 2008; Tihanyi ve Nyitray, 2020).

2.7.2. Rekombinant DNA'nın retimi

Rekombinant DNA transformasyon, bakteriyel olmayan transformasyon ve faj tanıtımı olmak üzere üç yöntemle üretilir. Transformasyon aşamasında ilk olarak, bir DNA parçası seçilir ve bir vektöre (taşıyıcı DNA) enjekte edilir. İkinici olarak, bu DNA parçası restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak daha küçük parçalara kesilir ve "DNA ligaz" isimindeki enzimle birleştirilir. Vektörler bir konak hücreye yerleştirilir ve bu işleme transformasyon denir. Konak hücre genellikle *Escherichia coli* bakterisidir. DNA parçası, transformasyon geçirmiş konakları transformasyon

geçirmemiş konaklardan ayırt edebilmek için tanımlanabilir olmalıdır (Singh ve ark., 2022).

Bakteriyel olmayan transformasyon yöntemi, yukarıdaki transformasyona oldukça benzerdir, ancak vektör olarak bakteri kullanılmaz. DNA parçası, hücre çekirdeğine doğrudan mikroenjeksiyon teknikleri kullanılarak enjekte edilir. Bu, yukarıda açıklanan transformasyona çok benzer bir süreçtir. İkisi arasındaki tek fark, bakteriyel olmayan transformasyonda konak olarak *E. coli* gibi bakterilerin kullanılmamasıdır (Singh ve ark., 2022).

Faj girişi ise, transformasyona çok benzer olan transfeksiyondur, ancak bakteri yerine faj kullanılır. Bu yöntemde en yaygın kullanılan fajlar, rekombinant DNA'yı taşımak için lambda veya M13 fajlarıdır (Singh ve ark., 2022).

Rekombinant DNA teknolojisinin esas çalışılan organizmadan izole edilen DNA'nın ilgili parçasının restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra bakteri plazmidleri gibi kendisi çoğalabilen bir taşıyıcı DNA (vektör) içine entegre edilmesidir. Vektör DNA'sı ve içine eklenen DNA parçasının oluşturduğu bu yeni DNA molekülüne 'rekombinant DNA' adı verilmektedir. Daha sonra bu molekül bakteri hücrelerine aktararak çok fazla miktarda üretimi sağlanır. Bu işlemde her bir bakteri hücresine bir rekombinant DNA molekülü kazandırılır (Jackwood ve ark., 2008). Bakteri hücrelerinin bir yetiştirme ortamı üzerinde ayrı koloniler oluşturacak şekilde yayılması ile sonuçta rekombinant DNA molekülünü taşıyan tek bakteri kolonisi oluşturulur. Kolonideki her bir bakteri aynı rekombinant DNA'yı taşıdığından bu bakteri popülasyonuna "DNA kolonu" adı verilir. Bu koloniye ait bakterilerin çoğaltılması ile istenen DNA parçasının sınırsız miktarda üretimi sağlanır (Singh ve ark., 2022; Tihanyi ve Nyitray, 2020).

2.7.3. DNA izolasyonu

Rekombinant DNA üretiminin ilk aşaması çalışılan organizma DNA'sı ve vektör DNA'sının izolasyonudur. Bu DNA, organel DNA'sı, RNA ve daha sonraki

alışmaları aksatacak, özellikle restriksiyon enzimlerinin çalışmasını durduracak, protein ve polisakkarit gibi kirleticileri de içermemelidir (Singh ve ark., 2022).

Temelde DNA izolasyonu hücre duvarı veya hücre zarının SDS (sodyum dedosil sülfat) gibi deterjanlarla zayıflatılıp parçalanarak DNA'nın açığa çıkarılması, protein ve polisakkarit gibi kirleticilerin fenol-kloroform gibi organik clerle, RNA'nın da RNAaz enzimi ile ortamdan uzaklaştırılması ve sonrasında DNA'nın tuz ortamında alkol ile çöktürülmesi basamaklarından oluşmaktadır. Fakat çalışılan organizmaya bazı küçük değişiklikler söz konusu olabilir (Singh ve ark., 2022; Tihanyi ve Nyitray, 2020).

DNA izolasyonu için kullanılan stratejide plazmidleri içeren bakteriler besi ortamında büyütülür, santrifüjle toplanır, bakteri duvarı parçalanır, açığa çıkan DNA'dan proteinler ve RNA uzaklaştırıldıktan sonra DNA etanolle ktrlr (Tihanyi ve Nyitray, 2020). Fakat, burada dikkat edilmesi gereken konu plazmid DNA'sının bakteri kromozom DNA'sından ayrılması gerekliliğidir. Çünkü, plazmit DNA'sına çok küçük miktarda bakteriyel DNA karışması dahi gen klonlama çalışmalarında istenmeyen sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle, plazmid izolasyonu sırasında bakteri DNA'sını ortamdan uzaklaştıran çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bu metodlar plazmid DNA'sı ve bakteriyel DNA arasındaki yapı ve büyüklük farklılığına dayanmaktadır (Jackwood ve ark., 2008; Singh ve ark., 2022).

2.7.4. Rekombinant DNA'nın oğaltılması

Gen klonlama; rekombinant DNA oluşturulduktan sonra bu molekülün çok sayıda kopyasının elde edilmesini gerektirir. Buda rekombinant vektörün konakçı bir hücre içine aktarılmasıyla sağlanır. Bu işlem hücre içine aktarılan vektör plazmid ise transformasyon, virus ise transfeksiyon adını alır. Konakçı genellikle *E. coli*'dir.

Bakteri plazma membranları normalde DNA gibi büyük moleküllerin geçişine izin vermez. Fakat yüksek iyonik tuz konsantrasyonlarına maruz bırakıldıklarında membran geçirgenliği değiştirilebilmekte ve bazı bakterilere ortamdan yabancı DNA

girişini sağlayabilmektedir. Bu tür hücrelere ‘kompetent hücre’ denir (Singh ve ark., 2022; Tihanyi ve Nyitray, 2020).

2.7.5. Rekombinant DNA Teknolojisinin Kullanım Alanları

Rekombinant DNA teknolojisi, mühendislik, temel ve tıp bilimleri, zirai bilimler gibi hayatın birçok alanında kullanılmaktadır. Ayrıca gen manipülasyonu ve terapisi, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak umut verici terapötik tekniklerle büyük ölçüde ilerlemiştir. Bunlara en dikkat çekici örnek, insan insülininin üretilmesidir (Singh ve ark., 2022; Tihanyi ve Nyitray, 2020). Antikorlar ve türevleri de rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yaygın olarak üretilmektedir. Günümüzde bu teknoloji kullanılarak aşı, tanı ve tedavi amaçlı birçok kit üretilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi, tıpta birçok genetik bozukluğun ve hastalığın teşhis ve tedavisinde önemli rol oynamasının yanı sıra, ilaçların insan vücudundaki etkinliğini ve kalma süresini değerlendirmek için ilaç metabolizmalarının incelenmesine de olanak tanımaktadır. Bu teknoloji aşağıda bazıları verilmiş olan farklı alanlardaki çok sayıda çalışmada hem ekomonik açıdan hem de verim açısından avantaj sağlamaktadır (Sivamani ve ark., 2024).

1. İnsülin üretimi
2. Hayvanlarda farmosötik ürünlerin üretimi
3. Herbisitlere dayanıklı kültür bitkileri
4. Rekombinant aşılar
5. Adli tıpta kullanımı
6. Antisens teknolojisi
7. Genetik hastalıkların gen tabanlı çözüm yolu: Gen tedavisi gibi alanlar bu tekniğin en sık kullanıldığı alanlardır (Jackwood ve ark., 2008; Singh ve ark., 2022; Tihanyi ve Nyitray, 2020).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. HSP70'in Rekombinat Olarak Üretilmesi

3.1.1. Plazmid İzolasyonu

HSP70, pET-22b (+) plazmidleri post-translasyonel modifikasyon yapabilen Rosetta *Escherichia coli* (*E. coli*) hücre hattında eksprese edildi. Bunun için cloning suşu olan DH5alfa transformasyonu sonucu ekim yapılan agarda üremiş koloniden alınıp sıvı besiyerine konularak bir gece 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Falkona alınan besiyeri 4000 rpm 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. InnuPREP Plazmid Mini Kit 2.0 (cat no:845-KS-5041010) kullanılarak bakteri kültüründen plazmid DNA'sının hızlı ve kolay bir şekilde izole edilmesi sağlandı. İzolasyon yaptıktan sonra elde edilen son ürün elüsyon buffer+plazmid kısa süreli bekleme için -20 °C'ye, uzun süreli depolama için -80 °C'ye kaldırıldı.

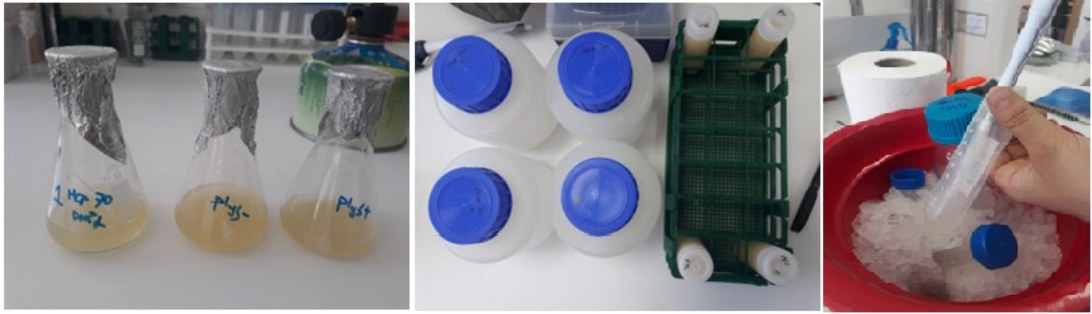
3.1.2. Kompetent Hücre Hazırlama

Tablo 3.1. Kompetent hücre hazırlamada kullanılan maddeler

Kullanılan maddeler	Kullanılan miktar
Gliserol	130 µl
0,1 M CaCl ₂	25 ml
LB Medya	60 ml

Kompetent hücre olarak *E. coli* kullanıldı. Bu amaçla 37 °C'de gece boyu sıvı besi yerinde büyütülmüş kültürden 5 ml alınarak erlenmayer içinde 50 ml sıvı besiyerine aktarıldı. Kültürdeki hücre yoğunluğunu kontrol etmek ve belirli bir hücre konsantrasyonuna ulaşılmasını sağlamak için 37 °C'de optik dansite (OD) değeri 0,6'a gelene kadar çalkalayıcı inkübatörde bekletildi. Absorbans en az 0,4-0,5 OD olacak

şekilde (270-280 nm) ölçüldü. Ardından 50'lik falkonlara 50 ml alınıp santrifüjde 4 °C de 5 dk 12100 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırılıp üzerine 25 ml 0,1M CaCl₂ eklendi ve yavaş bir şekilde pipetasyon yapıldıktan sonra buzda 30 dk bekletildi. Daha sonra 12100 rpm'de 10dk 4 °C'de santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Ardından 0,75 ml 0,1M CaCl₂ eklendi ve yavaş bir şekilde pipetasyon yapılarak pelet çözüldü. Stok hazırlanarak her biri 0,05 ml'lik alikotlara 0,13 ml gliserol (safılık: %100) eklenip bu stoklar -80 °C'de saklandı.



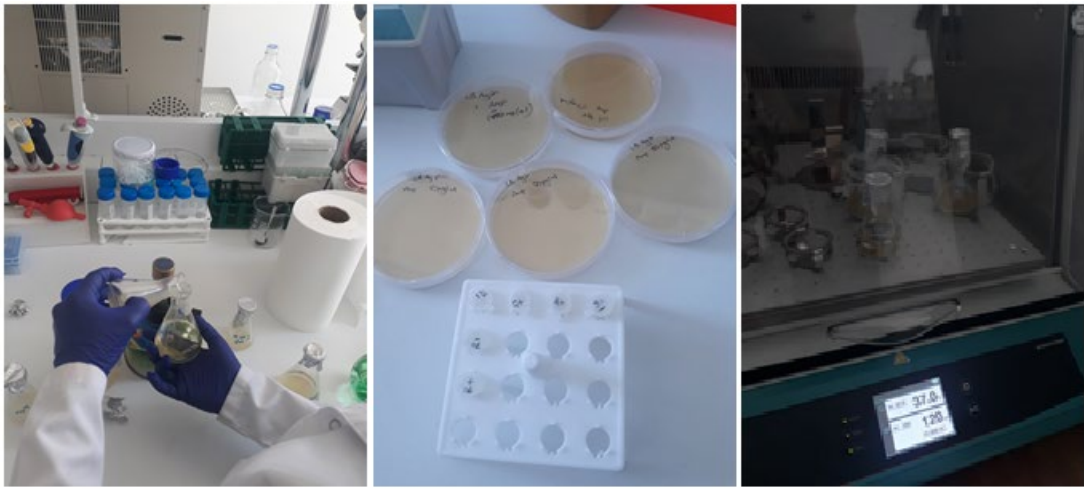
Şekil 3.1. Kompetent hücre hazırlama aşamaları

3.1.3. Plazmid Transformasyonu

Hazır plazmidler ve kompetent hücreler yavaş bir şekilde buzda çözdürülerek, 100 mikrolitre kompetent hücre üzerine 3 µl plazmid eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından 30 dk buzda bekletildi. Daha sonra 90 saniye boyunca 42 °C'lik su banyosunda ve ardından 1 dk süresince buzda bekletildi. Üzerine 0,4 ml sıvı besiyeri (LB, Luria Bertani Agar, cat no: L3147) eklendi 37 °C'de 45 dk boyunca çalkalandı. Ardından 50 mg/ml ampisilin içeren katı besiyerlerine ekim yapıldı. Çünkü plazmid ampisiline dirençlidir. Ampisilin bir marker görevi görür; eğer transformasyon aşamasında kompetent hücre plazmidi aldıysa, bakteride antibiyotiğe (ampisiline) direnç gelişir ve antibiyotikli medyalarda bakteri üremesi gözlenir. Aksine kompetent hücre plazmidi almadıysa bakteri antibiyotikli medyada üreyemez ve ölür.

Tablo 3.2. Plazmid transformasyonu için kullanılan gereçler

Kullanılan Malzemeler
Kompetent Hücre
1 µl Plazmid
Buz Banyosu
Su Banyosu
1 ml LB
Antibiyotikli Agar Petri



Şekil 3.2. Plazmid transformasyonu aşamaları.

3.1.4. İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) ile Protein İndüksiyonu Deneyi

Bir gece antibiyotikli kültürde, 37 °C’de 225 rpm’de çoğaltılan hücreler 1 litrelik ve aynı oranda antibiyotik içeren kültüre geçilerek OD’si 0,6’a gelene kadar 37 °C 225 rpm’de çalkalandı. Her saat başı OD değeri ölçülerek OD’si 0,6’a gelen her 1 litrelik kültürle bidistile suda çözünmüş ve konsantrasyonu 50 mM olan 1 ml IPTG eklenerek proteinin 4 saat boyunca eksprese edilmesi sağlandı. Dört saat sonunda 1 L’lik şişeler 500 ml plastik santrifüj tüplerine aktararak hücreler 4 °C’de 3900 rpm’de santrifüj edildi. Oluşan bakteri peleti 3 kolon (Poly-Prep® Chromatography Columns) hacmi olacak şekilde bağlanma tamponu olan 30 mM imidazol içeren 0,1 M Tris-HCl içinde çözündürüldü, ardından bakteri süspansiyonu glass beads eklenen ependorflara aktarıldı ve speed mill plus (bead-beater) cihazında parçalanarak hücreleri parçalanmış

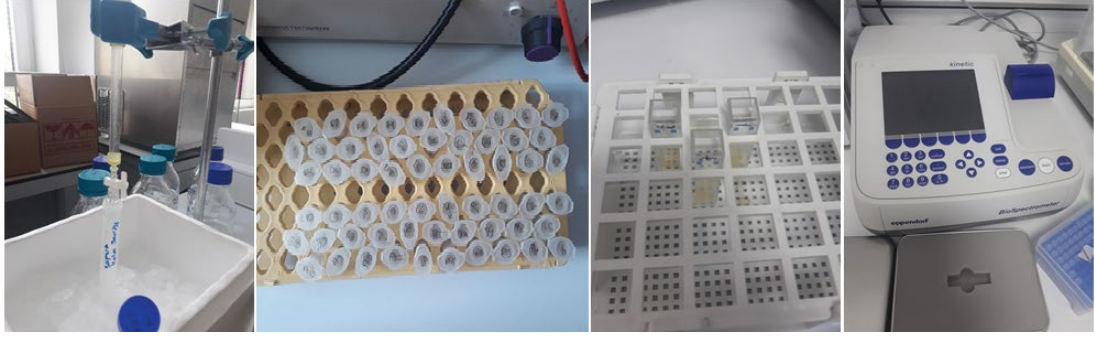
lizat elde edildi. Bead-beater ile parçalan ve ardından 12100 rpm’de 15 dk santrifüjlenen lizat proteinleri içeren süpernatant protein izolasyonuna hazırlandı.

3.1.5. İndüksiyon Testi

Saflaştırma işlemlerine geçmeden proteinin ifade edildiği, indüksiyon testi ile teyit edildi. Protein konsantrasyonları Bradford analizi ile gerçekleştirildi (He, 2011; Kruger, 2009). Toplam özüt ise ≤ 20 μg olacak şekilde elektroforeze yüklendi. Jelde yürütmek için örnekler örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak 90-95 °C de 10-20 dk denatürasyona bırakıldı. İki dk santrifüj edilip, süpernatantı alınan örnekler daha sonra sodyum dodesil sülfat -poliakrilamit jel elektroforezi (SDS PAGE)’de yürütme yapıldı.

3.1.6. Protein Saflaştırması (Purifikasyon)

Saflaştırma işlemleri FPLC-AKTA GO ve ticari kolonlar ile gerçekleştirildi (Coşkun ve ark., 2021). Bu projede üretilecek olan proteinler 6 x His-tag’li olduğu için saflaştırma basamağında Ni^{+2} bağlı resin kullanıldı. Kullanılacak miktardaki (bir kolon hacmi denir: CV) Ni^{+2} içeren resin önce 3 CV su ile yıkanarak etanolden, ardından da 3 CV bağlanma tamponu olan 30 mM imidazol içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu ile yıkanarak protein bağlanmasına hazır hale getirildi. Bağlanma için 30 dk buz ortamında çalkalanan resin+süpernatant daha sonra kolona yüklendi. Bağlanma sonrası eklenen süpernatant kolona yüklenerek resin+süpernatant karışımından kolondan akıtıldı. Ardından kolon 3 CV kadar bağlanma tamponu olan 50 mM imidazol içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu ile yıkandı ve sonrasında sırasıyla artan imidazol konsantrasyonu içeren Tris-HCl’ler 3CV olacak şekilde kolondan akıtıldı. Kolondan her defasında 1 mL fraksiyon toplanarak elde edilen fraksiyonlar buz içerisindeki ependorflarda muhafaza edildi. Gradyan 500 mM imidazol konsantrasyonuna kadar fraksiyonlar toplandı. Her bir fraksiyonun spektrofotometrede 280 nm’de OD’leri alındı ve SDS PAGE jel yürütüldü (her bir kuyucuğa ≤ 2 μg olacak şekilde örnek yüklendi) ve saflık derecesi değerlendirildi. Saf fraksiyonlar diyalizden geçirilerek proteinler fosfat tamponuna alındı.



Şekil 3.3. Protein saflaştırma işleminin yapılışı.

3.1.7. SDS-PAGE Jelde Yürütme Deneyi

Jelde yürütmek için örneklerimiz 90-95 °C de 10-20 dk denatürasyona maruz bırakıldı. Ardından 11000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatantı alındı. Daha sonra Tablo 3.3’te verilen maddeler sırasıyla karıştırılarak hazırlanan ve hem stacking hem de seperasyon jelinden oluşan SDS PAGE jelde, 120 voltta yürütme yapıldı.

Tablo 3.3. Separation jel hazırlamak için kullanılan maddeler

Kullanılan Kimyasallar	Miktar
H ₂ O	4,1 ml
Acrylamide/bis (30% 37.5:1; Bio-Rad)	3,3 ml
Tris-HCl (1,5 M, pH 8.8)	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
N,N,N,N-tetramethylethelene-diamine (TEMED) (Bio-Rad)	10 µl
Ammonium persulfate (APS), 10%	32 µl

- SDS-PAGE separation jeli çözeltisine TEMED ve APS eklendikten sonra jel hızla polimerize olacağı için dökmeye hazır olduğunda bu iki reaktif eklendi.
- Jel, stacking jeli için tarağın altından ~2 cm aşağıda bırakarak döküldü.
- Jelin üstü izopropanol ile kaplandı. Böylece jelin üstündeki kabarcıkların giderilmesi ve polimerize jelin kurumasını önlendi. ~30 dakika içinde jel tamamen polimerize edildi.
- İzopropanol uzaklaştırıldı ve kalan izopropanol kalıntılarını damıtılmış suyla yıkandı.
- Daha sonra stacking jel (4%) hazırlamak için Tablo 3.4'deki malzemeler sırayla karıştırıldı.

Tablo 3.4. Stacking jel (4%) hazırlamak için kullanılan malzemeler

Kullanılan Kimyasallar	Marka ve Kodu
H ₂ O	6,1 ml
Acrylamide/bis (30% 37.5:1)	1,3 ml
Tris-HCL (0.5 M Ph 6.8)	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
TEMED	10 µl
Ammonium persulfate (APS), 10%	100 µl

- Separation jel üzerine stacking jel döküldü.
- Kuyu oluşturmak için tarak eklendi ve ~30 dakika içinde stacking jel tamamen polimerize hale ulaştı.
- Jel aparata kelepçelendi. Running buffer eklenmiş olan bölmeye yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

Jelde yürütmek için örneklerimiz 90-95 °C de 10-20 dk denatürasyona bırakıldı. Ardından 11000 rpm’de 2 dk’da santrifüj yapıldı. Süpernatantı alındı ve SDS PAGE jelde oda sıcaklığında, 120 voltta yürütme yapıldı.



Şekil 3.4. SDS-PAGE jelde yürütme deneyi

Çalışmamızda bu şekilde elde edilen HSP70’i kullanmak yerine standardizasyonu sağlamak için çalışmada saf olarak üretilmiş ticari Recombinant Human HSP70 Protein (His Tag, Cat: 11660-H07H HSPA1A, Sino Biological, Çin) kullanıldı.

3.2. *In vivo* Çalışmalar

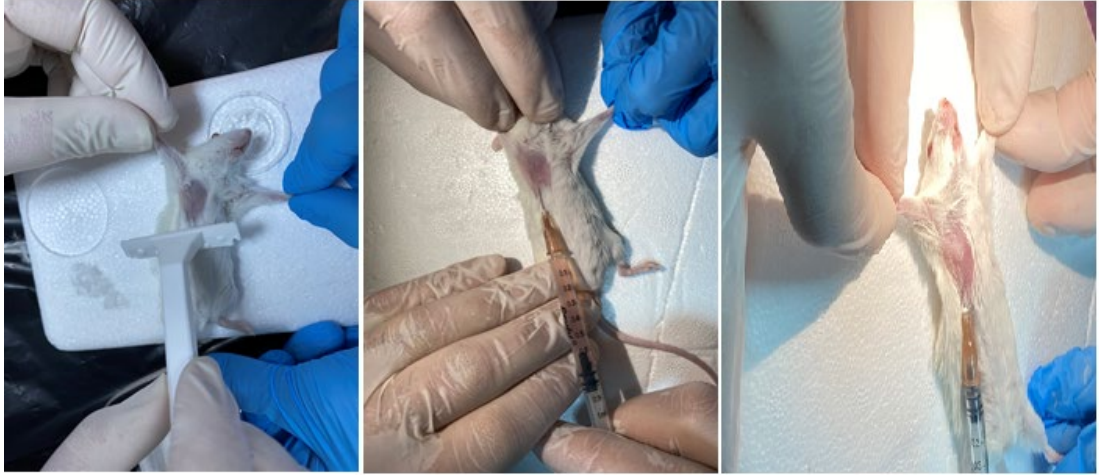
3.2.1. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattının Hazırlanması

4T1 fare meme kanseri hücreleri (ATCC; #CRL2539) ATCC’nin önerdiği medyum koşullarına uygun olarak %10 Fetal Sığır Serum (FBS) (Invitrogen; #10270106) ve %1 penisilin/streptomisin (PS) (Thermo Fisher; #15140122) ile desteklenmiş HEPES içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Thermo Fisher; #A1049101) medyumunda 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ ile sabitlenmiş steril inkübatörde çoğaltıldı. 4T1 fare meme kanseri hücreleri 1x10⁵ hücre olacak şekilde BALB/c dişi farelerin meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edilmek için hazırlandıktan sonra; hücreler Tripsin-EDTA (Thermo Fisher; #25200056) ile kaldırıldı. 1600rpm’de, +4 °C’de 5 dakika santrifüj edilip, takiben medyum uzaklaştırılarak hücreler Hanks’ Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma-Aldrich; #H9269) ile dilüe edildi. Hücreler,

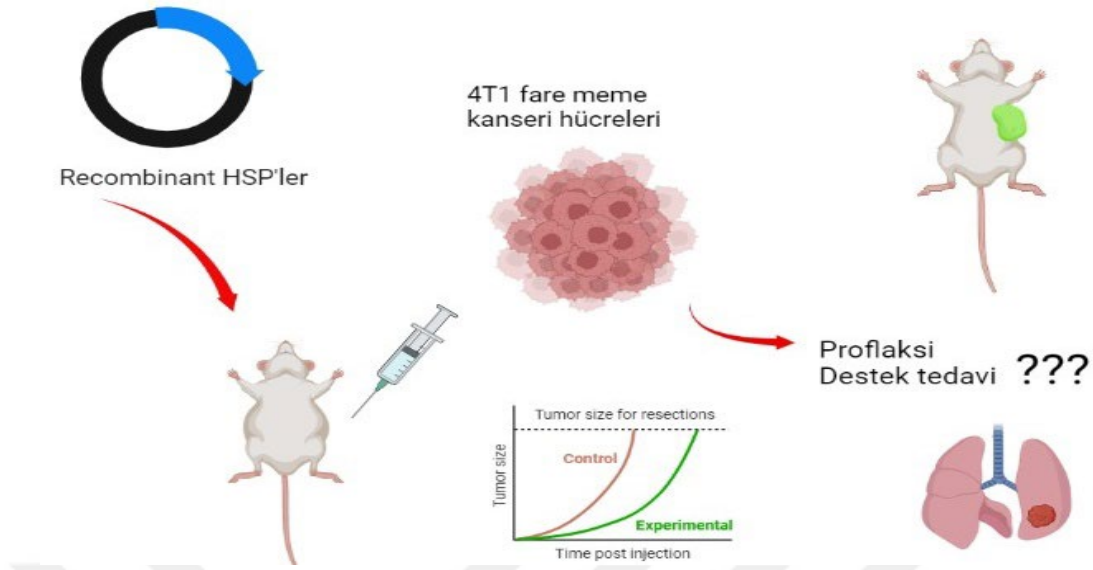
Countess II otomatik hücre sayım cihazı (Invitrogen; #AMQAX10006) yardımı ile sayılarak her bir hayvan için 100 μ L HBSS içinde 1×10^5 hücre olacak şekilde hazırlandı.

3.2.2. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması

Hücreler kültüre edildikten sonra üreyen hücreler (1×10^5 hücre/fare) BALB/c dişi farelerin meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edildi (Tanrioer ve ark., 2022). Bu inokülasyondan 7-10 gün sonra tümörler elle palpe edilebilir büyüklüğe ulaştığından dolayı deneysel süreçte tümör enjeksiyonundan sonraki 7. günden itibaren hayvanlar sürekli takibe alındı ve ortalama 10. günde tedavi uygulamaları başlatıldı.



Şekil 3.5. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattı İnokülasyonu ile Meme Kanseri Modelinin Oluşturulması.



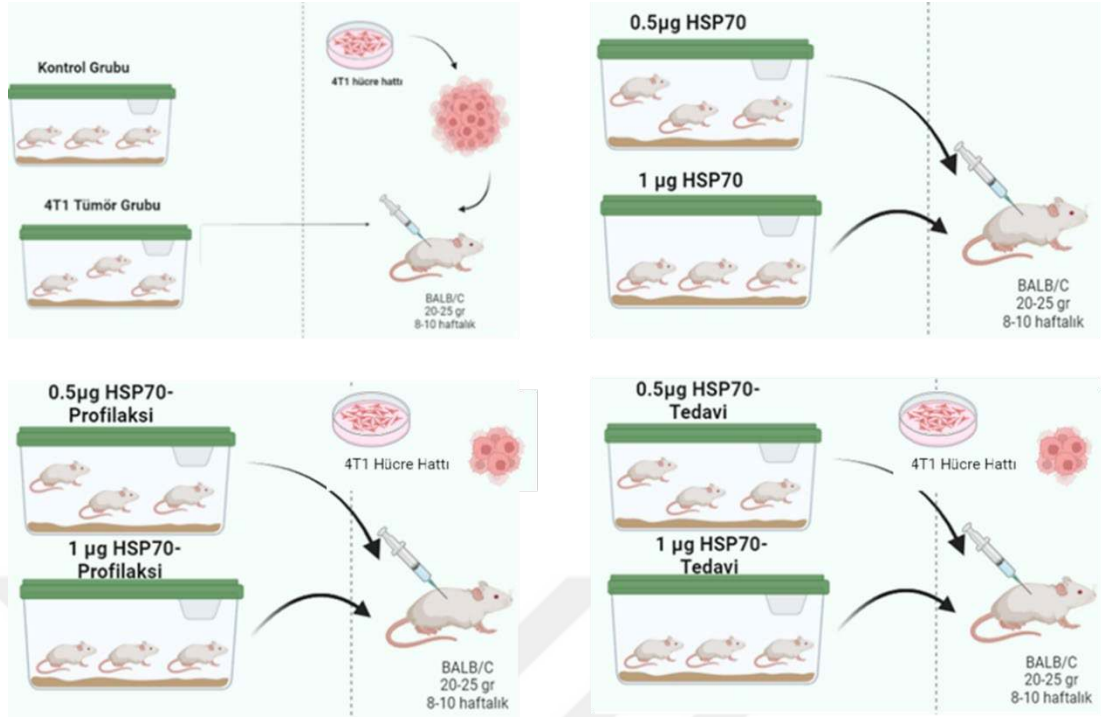
Şekil 3.6. Meme kanseri modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi

3.2.3. Deneysel Tasarım ve Deney Hayvanlarının Bakımı

Çalışmanın deneysel aşaması için Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (MAKÜ-HADYEK) Etik Kurul onayı (17.08.2022 tarihli ve 941sayılı karar) alındı. Deney sırasında Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) 2.0 direktiflerine sıkı bir şekilde uyuldu. Fareler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve burada standart koşullarda 12 saatlik aydınlık-karanlık uygulamasına tabi tutuldu. Ortam, nem, ısı ve havalandırma değerleri takip edildi, hayvanların yem ve suya *ad libitum* erişimleri sağlandı. Fareler tümör hücresi enjeksiyonlarından sonra her gün günde iki kez (sabah-akşam) klinik bulgular ve sağlık parametreleri açısından (yem-su tüketimi ve hastalık bulguları) kontrol edildi ve anormallikler kaydedildi.

Deneysel düzenekte HSP70'in hem koyurucu etkisi (profilaksi) hem de tedavi edici etkisi araştırıldı. Deneysel süreçte BALB/c ırkı, 8-10 haftalık, yaklaşık 20-30 gram ağırlığındaki 80 adet dişi fare kullanıldı. Çalışma her bir grupta 10 hayvanın bulunduğu toplamda 8 grup olacak şekilde Şekil 3.7'de gösterildiği gibi dizayn edildi. Fareler ağırlık tartımının ardından gruplarına göre 8 ayrı kafese alındı. İki grup HSP

proteinin herhangi bir anaflaktik etkisi olup olmadığını belirlemek için kullanıldı. Bu gruplara tümör inokülasyonu yapılmadan 0,5 µg ve 1 µg HSP70 subkutan olarak haftada 1 kez olmak üzere 4 hafta uygulandı ve bu gruptaki fareler çalışma sonunda diğer farelerle birlikte ötenazi edilerek organları toplandı. Deneysel çalışma başlangıcında tümör grubuna 4T1 tümör hücre hattı inokülasyonu yapıldı, başka hiçbir işlem yapılmadı ve tümör inokülasyonundan sonraki 39. (10 gün tümör gelişimi için beklendi) günde ötenazi edildi. İki grup tedavi grubu olarak ayrıldı ve tümör inokülasyonundan sonra tümörler palpe edilebilir hale gelene kadar beklendi (10. gün). Tümörler palpe edilebilir büyüklüğü ulaştıktan sonra bir gruba 0,5 µg ve diğer gruba 1 µg HSP70 ile haftada 1 kez olmak üzere 4 hafta boyunca subkutan uygulama yapıldı. Tümör inokülasyonundan sonraki 39. günde fareler ötenazi edildi. Profilaksi gruplarına ise ilk önce haftada 1 kez olmak üzere 4 hafta süresince 0,5 µg ve 1 µg HSP70 subkutan olarak uygulandı. Ardından tümör inokülasyonu yapıldı tümör kitleleri palpe edilebilir büyüklüğe gelene kadar beklendi (10 gün) daha sonra tedavi gruplarında uygulandığı gibi haftada 1 kez 0,5 µg ve 1 µg HSP70 uygulamalarına devam edildi. Tümör inokülasyonundan sonraki 39. günde fareler ötenazi edildi. Profilaksi gruplarına toplam 8 doz (tümör inokülasyonundan önce 4 doz, tümör palpe edilebilir büyüklüğe ulaştıktan sonra 4 doz) HSP70 uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir işleme maruz kalmadan diğer gruplarla birlikte deney başlangıcından sonraki 39. günde ötenazi yapıldı.



Şekil 3.7. Deney gruplarının dizaynının şematik gösterimi

Tablo 3.5. Deney gruplarına yapılan uygulamalar

	İnokülasyon Öncesi HSP70 Uygulama	Tümör İnokülasyonu	10 Gün Bekleme	İnokülasyon Sonrası HSP70 Uygulama
Kontrol Grubu	-	-	-	-
Tümör Grubu	-	+	+	-
Tedavi Grupları	-	+	+	+ 0,5 µg
	-	+	+	+ 1 µg
Profilaksi Grupları	+ 0,5 µg	+	+	+ 0,5 µg
	+1 µg	+	+	+1 µg

Anaflaksi
Grupları

+ 0,5 µg (haftada 1 toplam 4 doz)

+ 1 µg (haftada 1 toplam 4 doz)

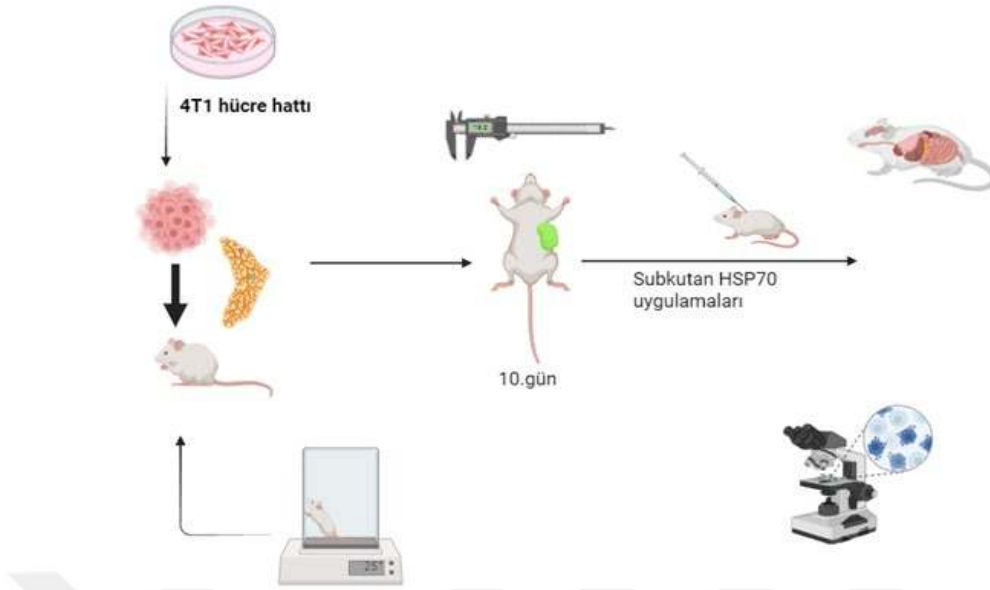
3.2.4. Hayvan Ağırlıklarının Takibi ve Tümör Boyutlarının Ölçümü

Deneysel süreç başlamadan önce ve tümör enjeksiyonundan sonraki 7. günden itibaren haftada bir kez olmak üzere hayvanların ağırlıkları tartılarak not edildi. Böylece tümör gelişimi ile canlı ağırlık arasındaki bağlantı değerlendirilerek uygulamaların hayvanların sistemik durumlarını etkileyip etkilemedikleri ve besin alımının değişip değişmediği hakkında bilgi sağlandı.

Tümör hücresi enjeksiyonundan yaklaşık 10 gün sonra tümörler elle palpe edilebilir büyüklüğe ulaştı. Bunu saptamak için 7. günden itibaren her gün tümör gelişip gelişmediği kontrol edildi. Tümör gelişimi saptandıktan sonra dijital kumpas yardımıyla tümörlerin uzunluk ve genişlikleri ölçülerek aşağıda belirtilen formüle göre tümör hacimleri hesaplandı.

$$\text{Tümör Hacmi} = (\text{Uzunluk} \times \text{Genişlik}^2) \times 0.5$$

Bundan sonra her 3 günde bir kumpas yardımıyla tümör büyüklükleri ve fare ağırlıkları tartıldı, böylelikle zamana bağlı olarak gruplar arasında tümör büyüklüğü ve hayvanların canlı ağırlık değişimleri değerlendirildi. Elde edilen veriler gruplar arasında istatistiksel olarak yorumlanarak gruplar arasındaki farklar değerlendirildi.



Şekil 3.8. Hayvanların ağırlık takibi ve tümör boyut ölçümü (BioRender ile hazırlanmıştır).



Şekil 3.9. Tümör boyutlarının dijital kumpas kullanılarak ölçümü.

Tümör hücrelerinin hayvanlara verilmesinden sonra 39. günde hayvanların ötenazileri gerçekleştirildi ve çalışmanın deneysel bölümü tamamlandı.

3.3. *In vitro* Çalışmalar

3.3.1. Primer Tümör Dokularının Toplanması ve Ağırlıklarının Ölçümü

Son HSP-70 uygulamasından 1 gün sonra hayvanların canlı ağırlıkları tartıldı ve ardından intraperitoneal (İP) olarak uygulanan 90 mg/kg ketamin (Ketasol) ve 10

mg/kg ksilazin (Basilazin) anestezisi ile ötenazileri gerçekleştirilerek çalışmanın deneysel bölümü tamamlandı.

Ötenazileri gerçekleştirilen farelerin nekropsisi yapılarak meme tümörü dokuları dikkatlice çıkarıldı. Her bir tümör kitlesinin ağırlığı hassas terazi ile tartılarak kaydedildi ve böylece gruplar arasında tümör ağırlıkları bakımından farklılıklar değerlendirildi. Daha sonra tümör dokuları tam merkezinden iki eşit parçaya bölünerek bir kısmı %10'luk formaldehit solüsyonu içinde tespit edilip histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için, bir kısmı da distile suya alınarak real-time PCR analizleri için kullanıldı.

3.4. Histopatoloji Yöntemi ile Değerlendirme

Nekropsi sırasında alınan primer tümör doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içine alındı. Tamponlu formalin solüsyonu hazırlanışı Tablo 3.5'de verildi. Bir gün formalinde bekletilerek tespit edilen dokular trimlenerek takip kasetlerine yerleştirildi. İki günlük beklemenin ardından kasetler tam otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) alındı. Tam otomatik doku takip cihazının solüsyonları ve uygulama süreleri Tablo 3.6'de verildi. Dokular gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek organlardaki yağın alınması ve sıcak parafine geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Takip aşaması sonrasında dokular çelik doku gömme kalıpları içerisine alınarak üzerine parafin dipenser-tankından alınan sıvı parafin (60 °C) doldurularak gömü işlemi yapıldı ve bloklandı. Blokların soğuması sağlandıktan sonra mikrotom cihazı (Leica RM2155, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin boyama için normal lamlara alındı ve immunohistokimyasal boyama için polilizinli lamlara çekildi. Doku kesitleri tümör hücrelerini değerlendirmek için primer tümör dokusunun merkezi esas alınarak elde edildi.

Tablo 3.6. Tamponlu formalin solüsyonunun hazırlanışı

Tamponlu Formaldehit	
%37 Formaldehit	100 ml
Distile su	900 ml
Sodyum fosfa monobazik monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$)	4 gr
Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4)	6,5 gr
Hazırlanışı: $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ve Na_2HPO_4 900 ml distile su içerisinde çözünür. Çözelti üzerine 100 ml %37'lik formaldehit eklenir ve toplam çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanır.	

Tablo 3.7. Tam otomatik doku takip cihazı solüsyonları ve uygulama süreleri

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

3.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Normal lamlara alınan kesitler metal lam sepetinde bir gece boyunca etüv içerisinde (45 °C) bekletildi. Ardından etüv 70 °C'ye çıkarılarak 30 dakika bekletildikten sonra 10 dk ksilen I, 10 dk ksilen II, 10 dk ksilen III, 10 dk ksilen IV solüsyonlarında tutularak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ksilenin uzaklaştırılması ve rehidrasyon amacıyla 3'er dk sırasıyla absöü etanol, %80'lik etanol ve %50'lik etanol serilerinden geçirildi. Bu işlemden sonra 5 dk distile suda bekletilerek rehidrasyon işlemi tamamlandı. Kesitler 8 dk hematoksilen solüsyonunda bekletildi. Beş dk akar suda yıkama yapıldı ve 30 saniye absöü alkol içerisinde bekletildi. Ardından kesitler eozin solüsyonunda 2 dk bekletildikten sonra akar suda yıkandı. Yıkama sonrasında sırasıyla %50'lik etanol, %80'lik etanol ve absöü etanolden geçirildi. Boyanan kesitler kurumalarının ardında ksilene daldırılıp çıkarıldı ve lam lamel arasına entellan (Sigma-Aldrich, Germany) damlatılarak kapatıldı. Kesitler ışık mikroskopunda (x200 büyütme, Carl Zeiss Axioscope 5, Carl Zeiss Suzhou) incelendi.

3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirme

IHC boyamalar için hazırlanan kesitler immunoperoksidaz yöntem için streptoavidin-biotin peroksidad kompleks yöntemine göre boyandı.

Primer meme tümör dokularının IHC boyamasında mouse monoklonal CD-31 (platelet endothelial cell adhesion molecule), HSP70, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ki-67 (proliferasyon Kiel 67) primer antikorları ve UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Horseradish Peroxidase) (Ready-To-Use) (TP-060-HL, Thermo Fisher Scientific, ABD) sekonder antikor ve 3,3' Diaminobenzidine (DAB) kiti ((DAB Substrate System) (TA-060-HD, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Tüm IHC boyama işlemleri manuel olarak yapıldı. IHC boyamada kullanılan primer antikor ve sekonder antikorlar hakkında bilgiler Tablo 3.7'te gösterildi.

Tablo 3.8. IHC analizlerde kullanılan malzemelere ait bilgiler

Antikorlar	Katalog No.	Üretici Firma	Dilüsyon	İnkübasyonu Süresi	İnkübasyon Sıcaklığı
Rabbit Polyclonal Ki-67 (Primer Antikor)	28074-1-AP	Proteintech, San Diego, California, ABD	1/2000	Bir gece	+4 °C
Mouse Monoclonal CD31/PECAM-1 (H-3) (Primer Antikor)	sc-376764	Santa Cruz Biotechnology, Inc. ABD	1/100	Bir gece	+4 °C
Mouse Monoclonal PCNA (Primer Antikor)	307902	Biolegend, San Diego, CA, ABD	1/100	Bir gece	+4 °C
Mouse Monoclonal HSP70 (Primer Antikor)	sc-59571	Santa Cruz Biotechnology, Inc. ABD	1/100	Bir gece	+4 °C
Ultra V Block (Sekonder Antikor)	TA-060-UB	Thermo Fisher Scientific,	Stok	10 dakika	Oda sıcaklığı
Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Sekonder Antikor)	TP-060-BN	Thermo Fisher Scientific,	Stok	10 dakika	Oda sıcaklığı
Streptavidin Peroxidase (Sekonder Antikor)	TS-060-HR	Thermo Fisher Scientific,	Stok	10 dakika	Oda sıcaklığı
DAB Chromogen	TA-006-HDC	Thermo Fisher Scientific,	Stok	-	Oda sıcaklığı
DAB Substrate	TA-006-HDS	Thermo Fisher Scientific,	Stok	-	Oda sıcaklığı

3.5.1. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü

3.5.1.1. Isıtma ve Deparafinize Etme

Polilizinli lamlara alınan kesitler bir gece boyunca 45 °C ısıdaki etüv içerisinde bekletildi. Ardından etüv 60 °C'ye çıkarılarak 30-45 dakika bekletildikten sonra 15'er dakikalık süre ile 4 ksilen serisinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından kesitlerdeki ksilenin uzaklaştırılması ve rehidrasyon amacıyla 3'er dk yüksek dereceli alkolden düşük dereceliye doğru (%100'lük, %80'lik etanol ve %50'lik etanol) sırasıyla serilerinden geçirildi. Bu işlemten sonra 10 dk distile suda bekletilerek rehidrasyon işlemi tamamlandı.

3.5.1.2. Antijen Açığa Çıkarma (Antijen Retrieval-AR)

Bu çalışmada tüm primer antikörler için üretici firma talimatına göre ısı kaynaklı antijen retrieval yöntemi yapıldı. Antijen retrieval işleminde ısı, otoklav kullanılarak sağlandı. Antijen retrieval için Tablo 3.8'te yapımı açıklanan 10 mM (mikromolar) sitrat tamponu (pH 6) kullanıldı.

Tablo 3.9. Sitrat tamponu hazırlamak için kullanılan malzemeler ve hazırlanışı

Çözelti A: 0,1 M Sitrik Asit Çözeltisi	
Sitrik asit monohidrat	21 gr
Distile Su	100 ml
Hazırlanışı: Sitrik asit monohidrat, 100 ml distile su içerisinde çözülür.	
Çözelti B: 0,1 M Sodyum Sitrat Çözeltisi	
Trisodyum sitrat dihidrat	29,4 gr
Distile Su	100 ml
Hazırlanışı: Trisodyum sitrat dihidrat, 100 ml distile su içerisinde çözülür.	
Çalışma Solüsyonu	
Solüsyon A	9 ml

Tablo 3.9.(Devam) Sitrat tamponu hazırlamak için kullanılan malzemeler ve hazırlanışı

Solüsyon B	41 ml
Distile Su	450 ml
Hazırlanışı: Solüsyon A, Solüsyon B ve Distile Su karıştırılır ve toplam 500 ml distile su ile tamamlanır. pH 6 olacak şekilde HCl ya da NaOH (sodyum hidroksit) ile ayarlanır.	

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

3.5.1.3. İmmunohistokimyasal Boyama

Antijen retrieval sonrası oda ısısında soğuması sağlanan kesitler yapımı Tablo 3.9’da açıklanan PBS içerisinde 5 dakika inkübe edildi.

Tablo 3.10. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) (0,01 M, pH 7,2) hazırlamak için kullanılan malzemeler

Kimyasal Maddeler	Miktar
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄)	1,48 gr
Potasyum Fosfat Monobazik (KH ₂ PO ₄)	0,43 gr
Sodyum klorür (NaCl)	7,20 gr
Distile Su	1 lt
Hazırlanışı: Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NaCl 1 lt distile su ile çözünür. Hazırlanan çözelti pH’sı HCl ya da NaOH ile 7,2 olarak ayarlanır.	

IHC boyama, UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent HRP kit protokolüne göre yapıldı. Endojen peroksidaza bağlı spesifik olmayan arka plan boyamasını azaltmak için, kesitler %3’lük hidrojen peroksit ile 15 dakika inkübe

edildi. İki kez PBS (Fosfat tamponlu salin) içinde 5 dk yıkandı. Ultra V Block uygulanarak spesifik olmayan arka plan boyamasını engellemek amacıyla oda sıcaklığında 10 dakikayı aşmadan inkübe edildi. Ardından PBS uygulanmadan kesitler üzerindeki fazla solüsyon silkelendi. Primer antikorlar uygulandı ve +4 °C’de bir gece inkübe edildi. Dört kez 5’er dk PBS içinde yıkama yapıldı. Biotinli Keçi Anti-Polivalent uygulandı ve kesitler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Dört kez 5’er dk PBS içinde yıkama yapıldı. Streptavidin peroksidaz uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Dört kez 5’er dk PBS içinde yıkama yapıldı. UltraVision Detection System Large Volume DAB Substrate System kitinde önerilen oranda DAB kromojen (40-100 µl) ve DAB substratı (1 ml) karıştırılarak peroksidaz uyumlu kromojen ile 2-10 dk ışık mikroskobunda kontrollü şekilde inkübe edildi. DAB uygulaması sonrası kesitler distile su ile yıkandı. Arkaplan boyaması için Mayer’s Hematoksilen (HX14931949, Sigma-Aldrich, Almanya) 12 saniye uygulandı ve akan suda yıkandı. Ardından kesitler sırasıyla %96 etanol ve absolü etanolden geçirildi ve lam-lamel arasına Entellan damlatılarak kapatıldı.

3.5.2. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi

Tüm fare meme tümör dokuları Carl Zeiss Axioscope 5 (Almanya) ışık mikroskobu altında değerlendirildi. İmmun reaksiyon skorlamaları her bir antikor için ilgili kontrol dokularının boyanma özelliğine ve literatürde belirlenen skorlama yöntemlerine göre belirlendi.

3.5.2.1. Ki-67 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Ki-67 ekspresyonunun ışık mikroskobu altında 400x büyütmede değerlendirilmesinde, her hayvanın tümör dokusundan pozitif boyanan farklı alanlardan fotoğraf çekildi. Ardından görüntüler, hücre görüntü analiz yazılım programı olan QuPath 0.5.1’e yüklendi. Fotoğraf türü olarak H-DAB seçildi. Yüklenen görüntülerin piksel birimi µm’ye dönüştürüldü ve piksel ayarı yapıldı. Sihirbaz çubuğu ile çekirdek boyanması dikkate alınarak pozitif hücreler ve boyanma olmayan alanlar seçilerek negatif hücre tanımlaması gerçekleştirildi. Her alanda toplam hücre sayısı

1000-1500 arasında değişmekteydi. Elde edilen sonuçlar hücrelerin Ki-67 çekirdek boyanmasına göre negatif ve pozitif tümör hücresi ile yüzdesi olarak hesaplandı (Lea ve ark., 2021; Marwah ve ark., 2018; Zhong ve ark., 2016).

3.5.2.2. CD-31 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

CD-31 ekspresyonunun kantitatif olarak değerlendirilmesinde ışık mikroskobu altında 400x büyütmede, her hayvanın primer tümör dokusundan pozitif boyanan farklı alanlardan fotoğraf çekildi. Görüntüler, hücre görüntü analiz yazılım programı olan QuPath 0.5.1'e yüklendi. Fotoğraf türü H-DAB olarak kaydedildi. Yüklenen görüntülerin piksel birimi μm 'ye dönüştürülerek piksel ayarı yapıldı. Sihirbaz çubuğu ile çekirdek boyanması dikkate alınarak pozitif hücreler ve boyanma olmayan alanlar seçilerek negatif hücre tanımlaması gerçekleştirildi. Program içerisinde sınıflandırma sekmesi içerisindeki piksel sınıflandırmasından piksel sınıflandırıcıyı eğit bölümü seçildi. Açılan bölümde rezolüsyon çok yüksek olarak ayarlanarak canlı tahminine tıklandı. Böylece primer tümöral alanda CD-31 pozitif hücrelerin total alana oranı % olarak bulundu (Kerby ve ark., 2022; Kujan ve ark., 2023).

Ayrıca primer tümör hücrelerinin CD-31 ekspresyonları hücre sayısı olarak da değerlendirildi. QuPath 0.5.1'de analiz sekmesinden hücre görüntü analizleri içerisindeki pozitif hücre tespiti bölümü kullanılarak pozitif hücre tespiti otomatik olarak hesaplandı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-2000 arasında değişiyordu. Elde edilen sonuçlar hücrelerin CD-31 boyanmasına göre negatif ve pozitif tümör hücresi ile yüzdesi olarak hesaplandı.

3.5.2.3. PCNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Her hayvanın tümör doku kesitlerinin ışık mikroskobunda x400 büyütmede PCNA ekspresyon değerlendirmesinde farklı alanlardan fotoğraf çekildi. Görüntüler QuPath 0.5.1'e yüklendi ve fotoğraf türü H-DAB olarak seçildi. Yüklenen görüntülerin piksel birimi μm 'ye dönüştürüldü ve piksel ayarı yapıldı. Sihirbaz çubuğu ile çekirdek boyanmasının olduğu hücreler dikkate alınarak pozitif hücre ve boyanma

olmayan alanlar seçilerek negatif hücre sınıf tanımlaması gerçekleştirildi. Analiz yapılacak alan dikdörtgen şeklindeki işaretleyici ile işaretlendi. Analiz sekmesinden hücre görüntü analizleri içerisindeki pozitif hücre tespiti bölümü kullanılarak pozitif hücre tespiti otomatik olarak hesaplandı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-2000 arasında değişiyordu. Elde edilen sonuçlar hücrelerin PCNA çekirdek boyanmasına göre negatif ve pozitif tümör hücresi ile yüzdesi olarak hesaplandı.

3.5.2.4. HSP70 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

HSP70 ekspresyonunun değerlendirilmesinde ışık mikroskobu altında 400x büyütmede, her hayvanın tümör dokusundan pozitif boyanan beş farklı alandan fotoğraf çekildi. Görüntüler, hücre görüntü analiz yazılım programı olan QuPath 0.5.1'e yüklenerek değerlendirildi. Değerlendirme Ki-67 ekspresyonu ölçümünde yapılan işlemlerle aynı şekilde uygulandı. Her alanda toplam hücre sayısı 1000-2000 arasında değişiyordu. Analiz sonuçları ekspresyon yüzdesi olarak belirlendi.

3.6. Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

3.6.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

4T1 hücre hattı implante edilen ve HSP70 uygulamaları yapılan farelerin tümör dokuları fareler kurbanı edildikten sonra eşit iki parçaya ayrıldı. Real-time PCR yöntemi için ayrılan tümör dokularının steril homojenizatör ile homojenizasyonları yapıldı. Homojenizasyon sonrasında örnekler -80 °C'de muhafaza edildi. Elde edilen örneklerle spin kolon metoduna göre RNA ekstraksiyon prosedürü uygulandı.



Şekil 3.10. Homojenize edilen tümör dokuları

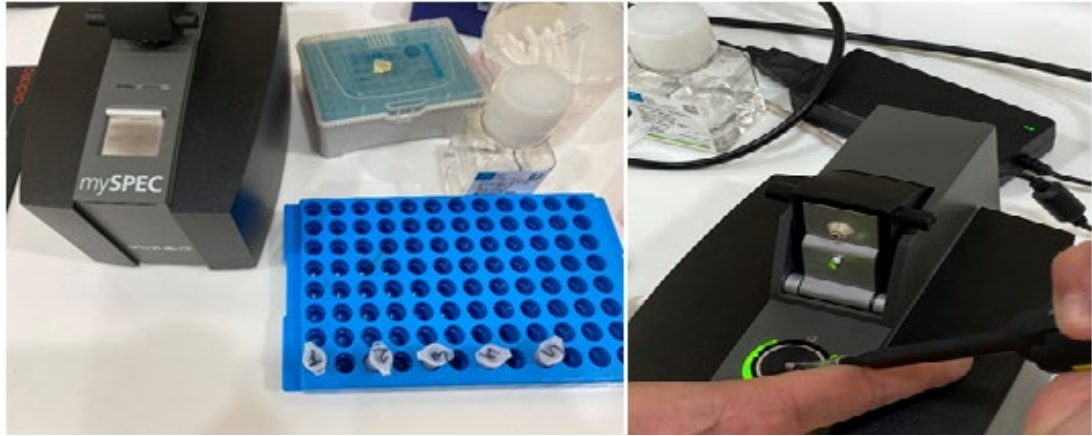
3.6.2. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için Hibrigen Dokudan RNA Ekstraksiyon (cat no: MG-DRNA-01) kiti kullanıldı. Total RNA izolasyonu için kitin prosedürüne uygun olarak aşağıda bahsi geçen işlemler uygulandı. Her 50-100 mg doku için 1 ml Tissue Lysis Buffer kullanıldı ve dokular bu solüsyon içinde homojen hale getirilerek 10 dk buz üzerinde inkübe edildi. Örnekler 12.000 rpm’de, 4 °C’de, 10 dk santrifüjlenerek süpernatant yeni bir RNAaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne alındı. Tüplere 200 µl kloroform eklenip, vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. Tüpler + 4 °C’de 12.000 rpm’de 15 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant yeni bir RNAaz bulundurmeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Aktarılan süpernatantın hacmine göre ½ oranında etanol (%100) eklenerek vorteks ile iyice karıştırıldı ve karışım spin kolona alındı. + 4 °C’de 12.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı. 500 µl Wash Buffer TRP eklendi ve + 4 °C’de 12,000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım alındı. 500 µl Wash Buffer TRW ilave edilerek 1dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı, ardından + 4 °C’de 12.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan sıvı kısım atıldı. Kolon kuruması için 12.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildikten sonra 1,5ml’lik RNAaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Daha sonra direkt olarak membran üzerine dokunun yoğunluğuna göre ortalama 75 µl Rnase-free water kolona eklenerek

2 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Toplama işlemi için 12.000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek Mrna örnekleri elde edildi. Elde edilen RNA’lar Cdna sentezi basamağına kadar -80 °C’de saklandı.



Şekil 3.11. mRNA izolasyonu aşamaları



Şekil 3.12. mRNA miktar tayini testi

3.6.3. c-DNA sentezi

RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezi basamağı uygulandı. c-DNA sentezi için Hibrigen cDNA sentez kiti (cat. No:MG-CDNA-01) uygulandı.



Şekil 3.13. c-DNA sentez kiti

RNA örneği cDNA dönüşümü için 100 ng konsantrasyonunda kullanıldı. Her örnek için RNA + Random 6-mer primer (0,5 µL) + Oligo dTs (0,5 µL) + Nükleaz free su'dan 12 µL eklendi. Hazırlanan 20 µL RNA örneği karışımı 72 °C'de 5 dk süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından buz üzerinde soğutuldu. Son hacim 20 µL olacak şekilde Tablo 3.10'de belirtilen reaksiyon bileşenleri RNA örnekleri üzerine eklenerek 0,2 µL'lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve Thermal Cycler cihazına yerleştirildikten sonra Tablo 3.11'de belirtilen cihaz protokolü ile reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, Real-Time PCR için hazırlandı ve -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.11. Master miks hazırlanması için kullanılan kit içeriği

Reaction Buffer	4 µl
Enzim mix	1 µl
Total RNA	1-6 µl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	20 µl'ye
Total Hacim	20 µl

Tablo 3.12. c-DNA sentezi için kullanılan Thermal Cycler protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman	Adım
42	60 dk	c-DNA sentezi
80	10	Enzim inaktivasyonu

3.6.4. Primer Dizaynı

HSP70 target gen bölgesi ve GAPDH, referans gen bölgeleri için kullanılan primerler, NCBI ve ENSEMBLE gen bankaları kullanılarak elde edilen referans genom üzerinden NCBI Primer Blast Programı ile fare türüne spesifik olarak dizayn edildi. Elde edilen primerlerin spesifitesi, yine NCBI BLAST programı ile kontrol edildi. Housekeeping gen olarak GAPDH geni yapılan literatür araştırması doğrultusunda çalışmaya dahil edildi. Primer ve referans gen dizileri Tablo 3.12.'de gösterildi.

Tablo 3.13. Real-Time qPCR analizi için yapılan primer dizaynı

Primer Adı	Primer Sekansı	Sentezletilen Firma
HSP70-MOU-F	ACCTTCACCACCTACTCGGA	Oligomer
HSP70-MOU-R	GCCCCGAAGCCCCCA	Oligomer
GAPDH-MOU-F	GGGTCCCAGCTTAGGTTCAT	Oligomer
GAPDH-MOU-R	CTCGTGGTTCACACCCATCA	Oligomer

3.6.4.1. Primerlerin Optimizasyonu

İlk olarak primerler, üretici firmanın kullanım kılavuzunda belirtilen talimatlara göre 100 μ M (100 pmol/ μ L) için gerekli su miktarı eklenerek sulandırıldı. Sulandırılan primerlerden her parametre için aşağıda belirtilen ara stoklar oluşturularak Real-Time PCR analizi için hazır hale getirildi.

Primer ara stok hazırlanışı

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

3.6.5. Real-time qPCR

Real-Time qPCR analizi için Hibrigen marka SYBR Green qPCR MIX (Cat.No: MG-SYBR-01) master miks kiti kullanıldı. Master miks kit içeriği Tablo 3.14.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.14. Real-Time qPCR analizi için master miksin hazırlanma koşulları

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

Tablo 3.15. Real-Time qPCR analizi BIO RAD marka CFX96™ Real Time System PCR cihazı ile PCR protokolü

PCR Basamağı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Ön Denatürasyon	95	5 dk	x1
Denatürasyon	95	15 sn	x40
Annealing	57	60 sn	
Melting Curve	60-95	2 dk	x1



Şekil 3.14. Real-Time qPCR analizi için kullanılan BIO RAD marka CFX96™ Real Time System PCR cihazı

3.6.6. Rölatif Kantitasyon Hesaplanması

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

1. Hem hedef grup hem de referans grubundaki her numunenin hem hedef RNA'sı hem de referans RNA'sı için Real-Time PCR sonucunda C_t değerleri elde edildi. Teknik tekrarlı çalışmalarda C_t değerlerinin ortalaması alınarak hesaplamaya devam edildi.

2. Hedef grup ΔC_t değerleri, hedef gruptaki ilgili genin C_t değerinin referans (*housekeeping gene*) C_t değerine oranlanarak elde edildi.

3. Referans grubun ΔC_t değerleri, referans grubundaki hedef gene ait C_t değerinin referans (*housekeeping gene*) C_t değerine oranlanarak elde edildi.

4. C_t değerleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ olarak işlendi ve kat değişimi (Fold Change) hesaplandı.

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

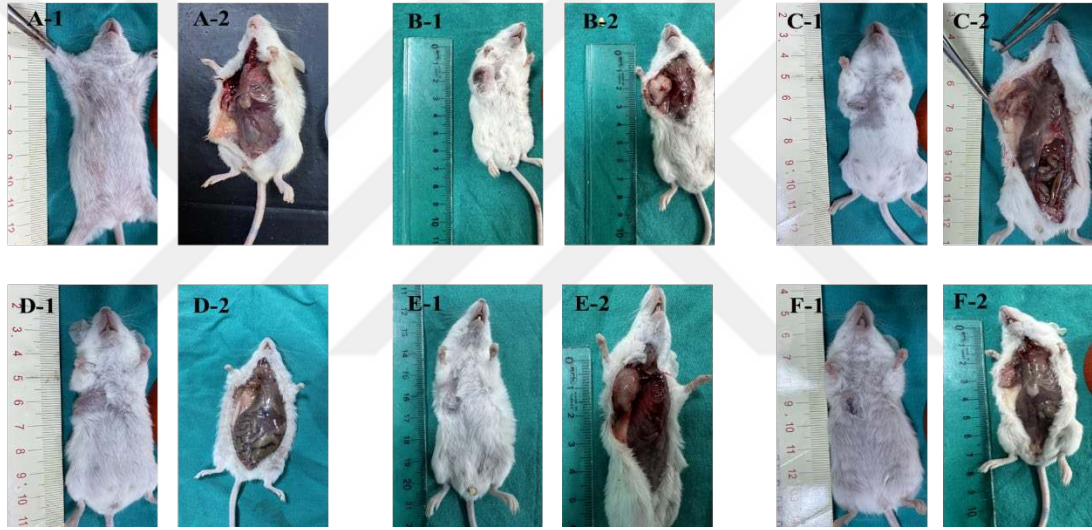
3.7. İstatistiksel Hesaplamalar

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

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Nekropsileri gerçekleştirilen BALB/c ırkı, dişi farelerin sağ torasik meme dokusunda tümör hücresi inokülasyonu yapılan gruplarda tümör şekillendiği gözlemlendi. Primer tümör dokuları ortalama 0,5-2 cm çapında, ovalden silindire kadar değişen şekillerde, solid yapıda, beyaz-krem renginde ve fibroelastik kıvamda bir görünüme sahipti. Çalışma gruplarının tümör kitlelerinin makroskopik görünümü şekil 4.1’de gösterildi.

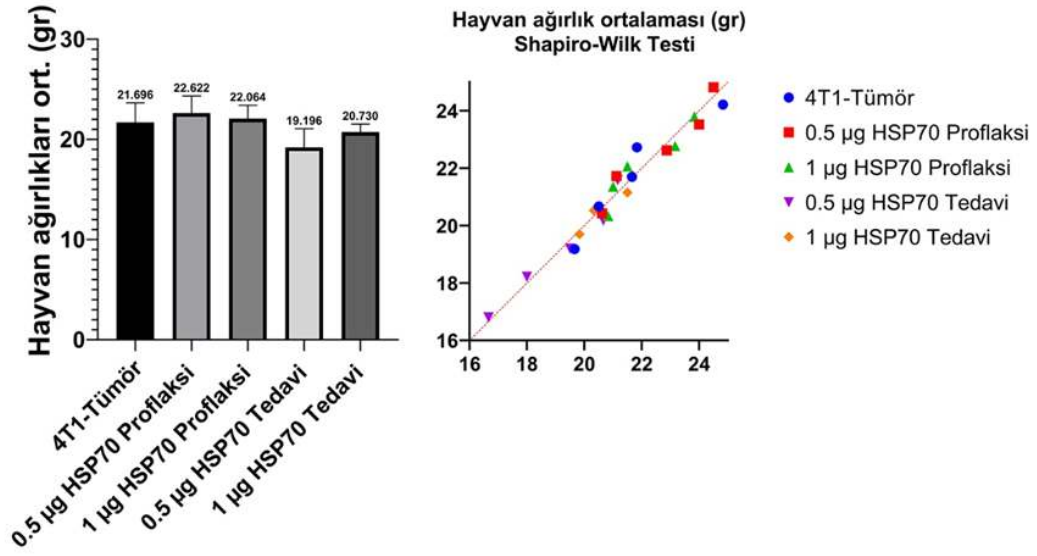


Şekil 4.1. Çalışma gruplarına ait makroskopik görünüm. A-1, A-2; Kontrol grubu, B-1, B-2; 4T1 grubu, C-1, C-2; 0,5 µg HSP70 Profilaksi, D-1, D-2; 1 µg HSP70 Profilaksi, E-1, E-2; 0,5 µg HSP70 Tedavi, F-1, F-2; 1 µg HSP70 Tedavi grubu.

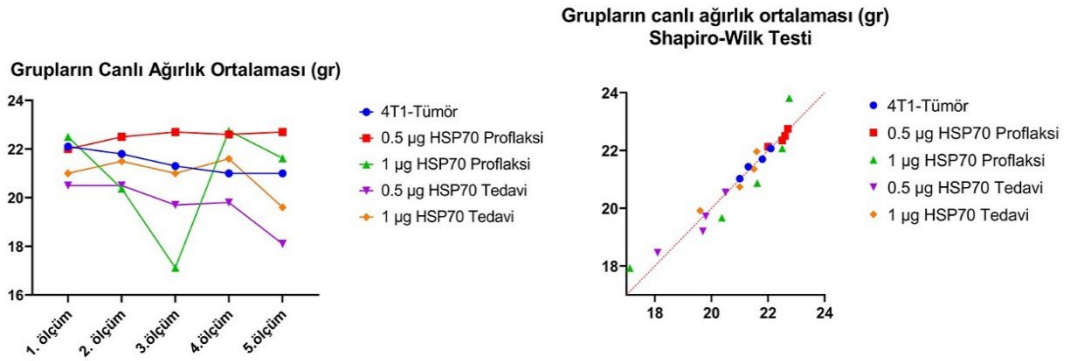
Çalışma sonunda en büyük tümör kitlelerinin tümör inokülasyonu yapıp tedavi veya profilaksi için hiçbir uygulama yapılmayan 4T1 tümör grubunda olduğu görüldü. Tedavi ve profilaksi uygulamaları tümör boyutlarında küçülmeye sebep oldu. Hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubunda herhangi bir tümöral oluşuma rastlanmadı.

4.1.1. Hayvanların Canlı Ağırlıklarında Zamana Bağlı Değişimler

DeneySEL süreç başlamadan önce ve tümör enjeksiyonundan sonraki 7. günden itibaren haftada bir kez olmak üzere hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda hayvanların canlı ağırlıkları arasında herhangi bir istatistiksel farka ($P=0,07$) rastlanmadı. Hayvanların canlı ağırlık değişimleri Şekil 4.2.'de gösterildi.



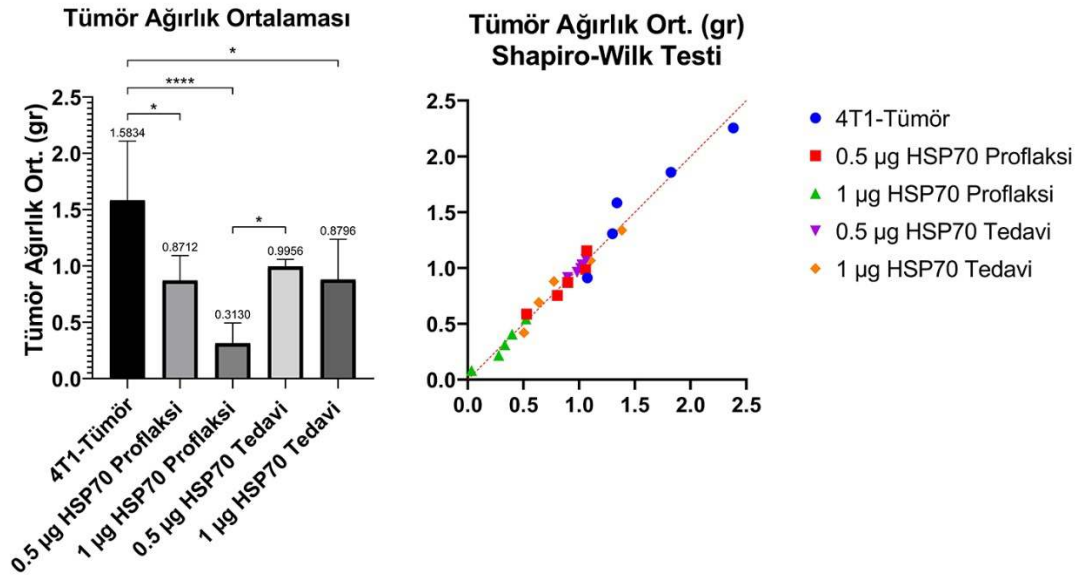
Şekil 4.2. Hayvanların canlı ağırlık analizi sonuçları ($P=0,07$).



Şekil 4.3. Hayvanların zamana bağlı canlı ağırlık değişim grafiği

4.1.2. Primer Tümörün Ağırlığı, Primer Tümörün Günlük Hacim Değişimi

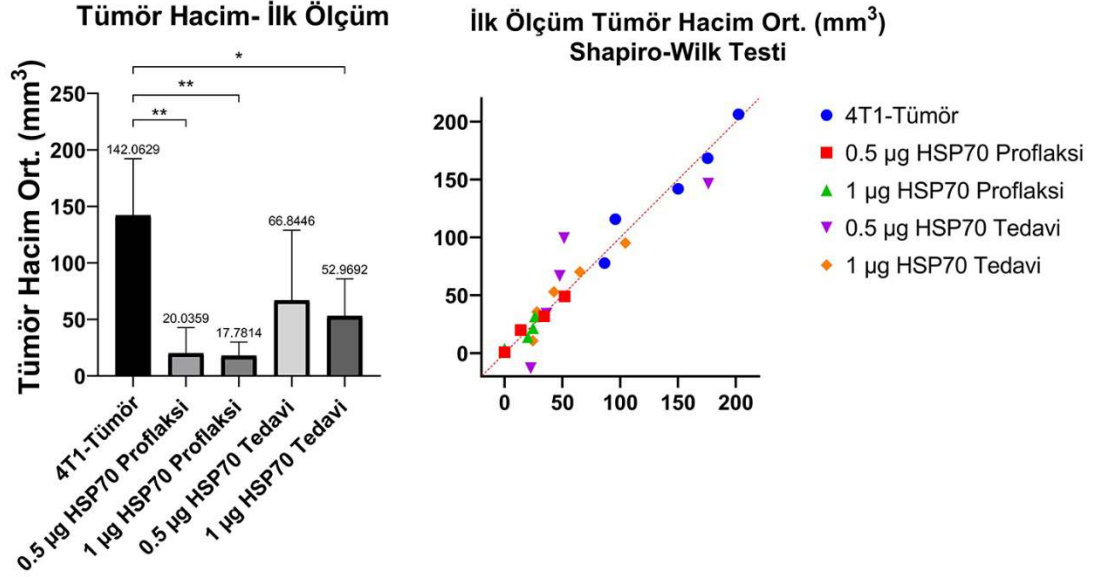
Tüm gruplar primer tümör ağırlıkları açısından kıyaslandığında istatistiksel açıdan 4T1-Tümör grubu ile 1 µg HSP70 profilaksi grubu arasında ($P < 0,001$), 4T1-Tümör grubu ile 0,5 µg HSP70 profilaksi ve 1 µg HSP70 tedavi grubu ($P < 0,05$), 1 µg HSP70 profilaksi ile 0,5 µg HSP70 tedavi grubu ($P < 0,05$) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulundu. 4T1-Tümör grubu ile 0,5 µg HSP70 tedavi grubu arasında istatistiksel açıdan fark bulunmadı ($P = 0,05$). Farelerin primer tümör ağırlıkları analizi şekil 4.4'te gösterildi.



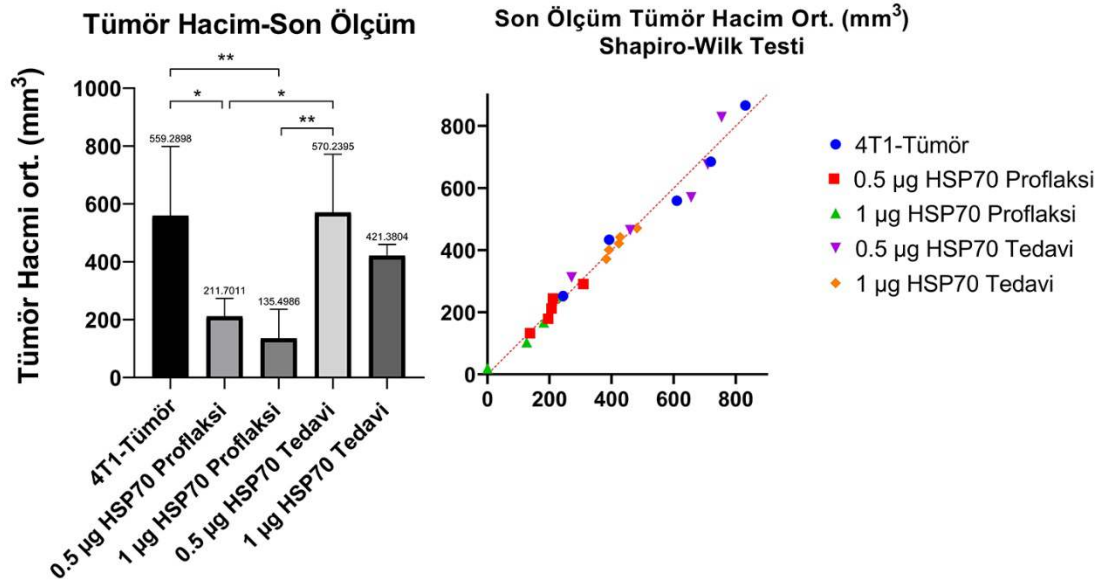
Şekil 4.4. Grupların primer tümör ağırlıkları analizi sonuçları (****: $P < 0,001$; *: $P < 0,05$).

Gruplara ait primer tümör dokusunun zamana bağlı hacim değişimi ilk ölçüm ve son ölçüm hacmi olarak değerlendirildi. Tümör hacminin ilk ölçümünde 4T1-tümör ile ve 1 µg HSP70 tedavi grubu ($P < 0,001$), 4T1-tümör grubu ile 0,5 µg HSP70 profilaksi, 1 µg HSP70 profilaksi grupları ($P < 0,05$) arasında istatistiksel olarak fark bulundu. Diğer gruplar arasında farka rastlanmadı ($P > 0,05$). Tümör hacminin son ölçümünde ise, 1 µg HSP70 profilaksi ile 4T1-tümör ve 0,5 µg HSP70 tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($P < 0,05$). 0,5 µg HSP70 profilaksi grubu ile 4T1-tümör ve 0,5 µg HSP70 tedavi grupları arasında da anlamlı bir fark bulundu ($P < 0,01$).

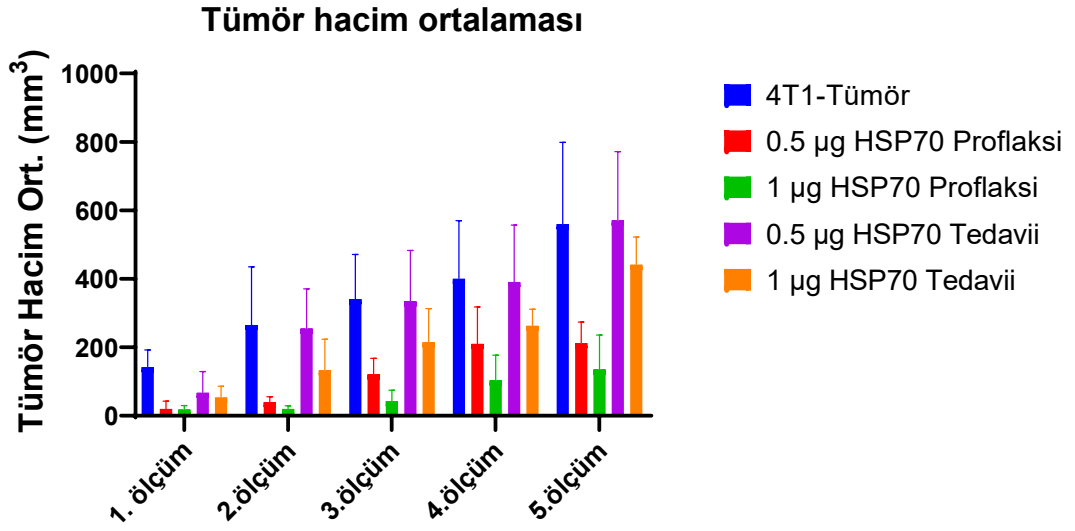
Primer tümör dokusunun ilk ölçüm ve son ölçüm hacim değişimi istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verildi.



Şekil 4.5. Primer tümörün zamana bağlı hacim değişim analizi sonuçları (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

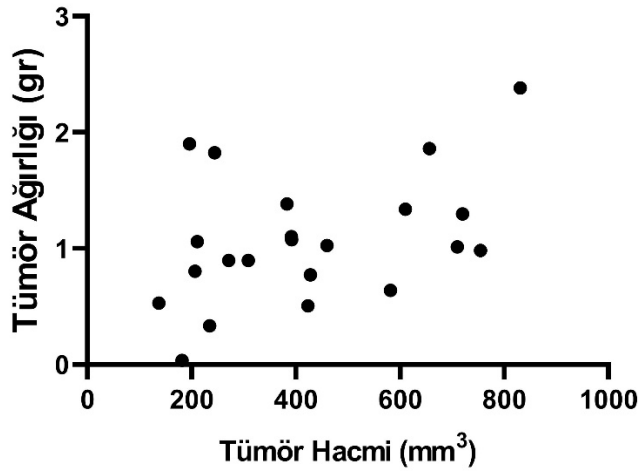


Şekil 4.6. Primer tümörün zamana bağlı hacim değişim analizi sonuçları (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).



Şekil 4.7. Primer tümörün zamana bağlı hacim değişim analizi sonuçları

Tümör ağırlığı (gr) ve tümör hacmi (mm^3) arasında pozitif bir korelasyon vardı ($r: 0,4159$). Ancak $P > 0,05$ olduğu için bu iki değişken arasında belirgin bir ilişki yoktur.

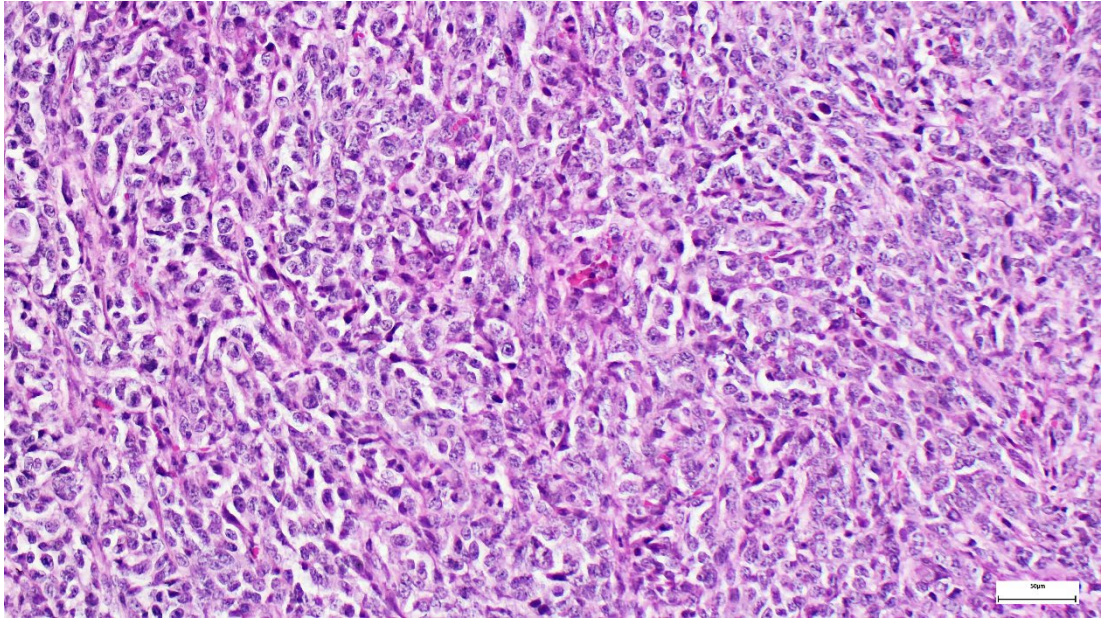


Şekil 4.8. Primer tümör ağırlığı ve hacmi arasındaki korelasyon grafiği

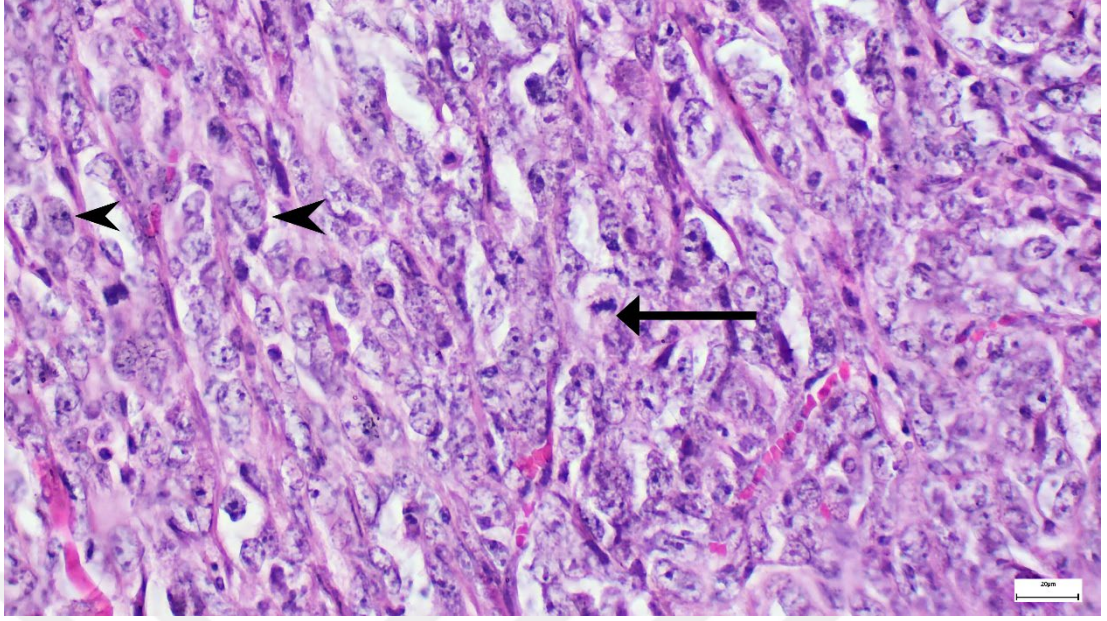
4.2. Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Histopatoloji Bulguları

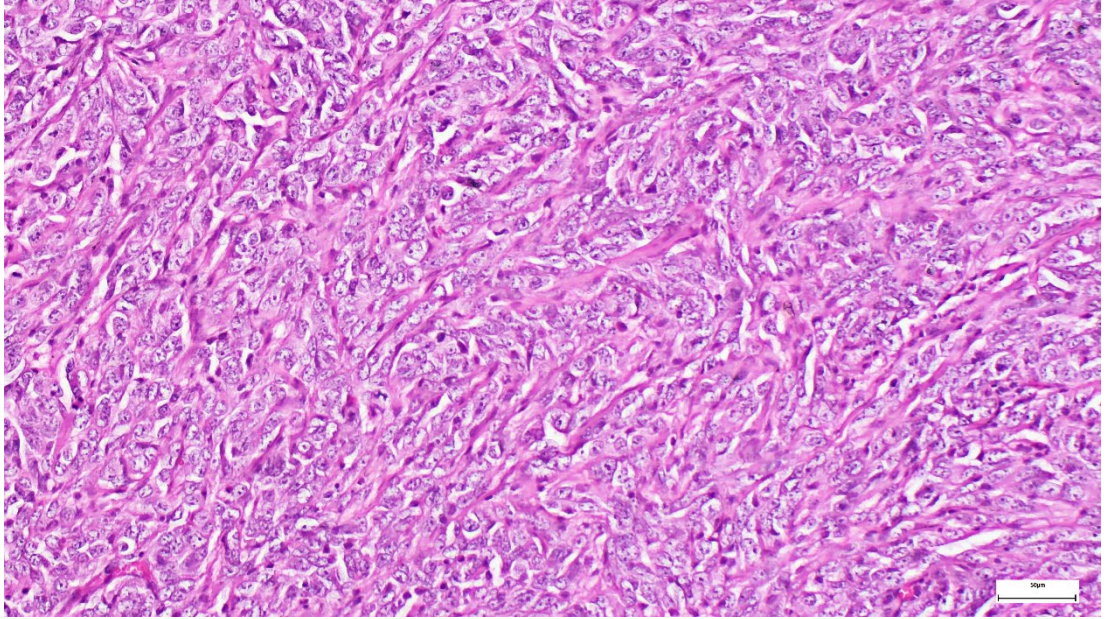
Tümör dokusu incelendiğinde hücrelerin belirgin şekilde anaplastik görünümde oldukları saptandı. Çekirdekler veziküler görünümlüydü; bazı hücrelerde tek bazılarında ise birden fazla belirgin çekirdekçiğin varlığı dikkati çekti. Sitoplazma ve çekirdek boyutlarının birbirinden farklı olduğu hücrelerin belirgin pleomorfizm sergilediği göze çarptı. Çekirdek boyutlarında büyüme ve çekirdek sitoplazma oranında artış tespit edildi. Mitotik aktivite artmıştı ve yer yer anormal mitozlara rastlandı. Tümör dokusu kesitlerinden alınan x400'lük büyütmede ortalama 4-5 adet mitotik figür saptandı. Tümör hücreleri arasına yer yer mononükleer ve polimorfnükleer yangı hücrelerinin infiltre olduğu görüldü. Tüm tümör dokusu kesitlerinin merkezleri nekrotikti ve nekrotik alanlarda çoğunluğu nötrofil lökosit olan yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çekti. Gruplara göre tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü Şekil 4.9-21'de gösterildi.



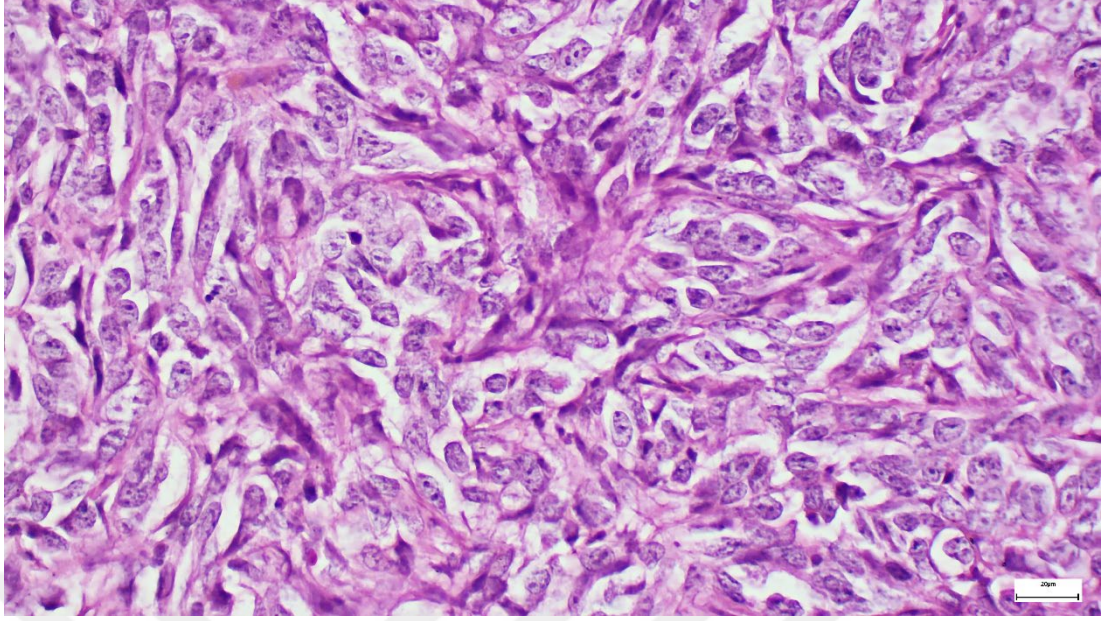
Şekil 4.9. 4T1-tümör grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Yoğun şekilde pleomorfik ve malign hücrelerden oluşan tümör alanının görünümü, H-E boyama, Bar=50 µm.



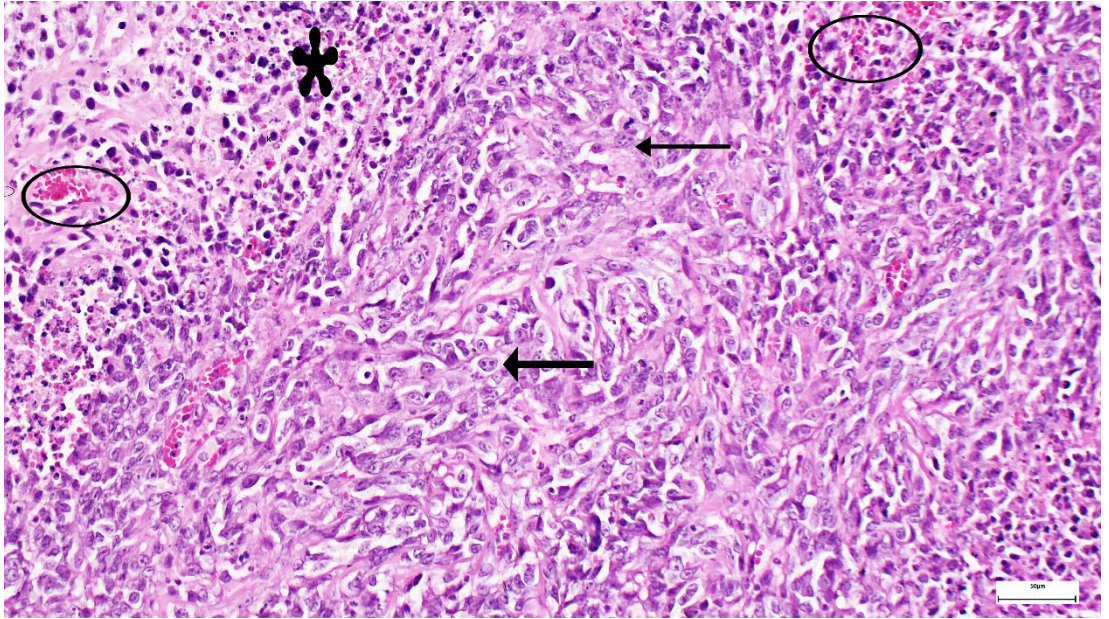
Şekil 4.10. 4T1-tümör grubundaki tümör dokusunun büyük büyütmedeki histopatolojik görünümü. Büyük ve belirgin çekirdekli hücreler (ok başları) ve mitotik figürler (ok), H-E boyama, Bar=20 μ m.



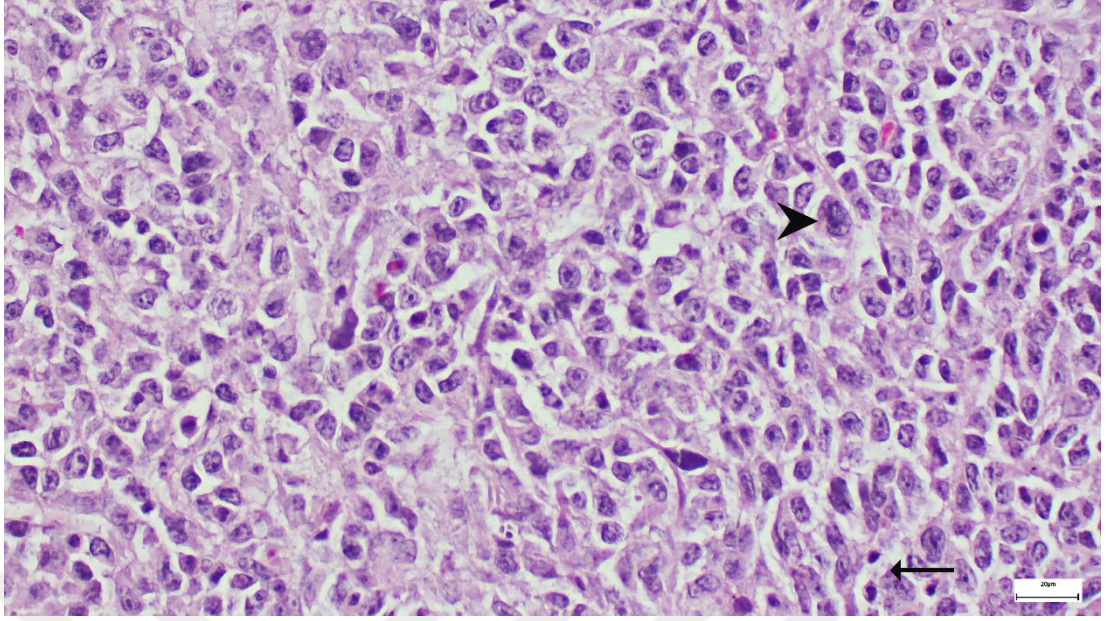
Şekil 4.11. 0,5 μ g HSP70 Proflaksi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Tümör parankimini oluşturan hücrelerin seyrek bağ dokunun ise artmış görünümü, H-E boyama, Bar=50 μ m.



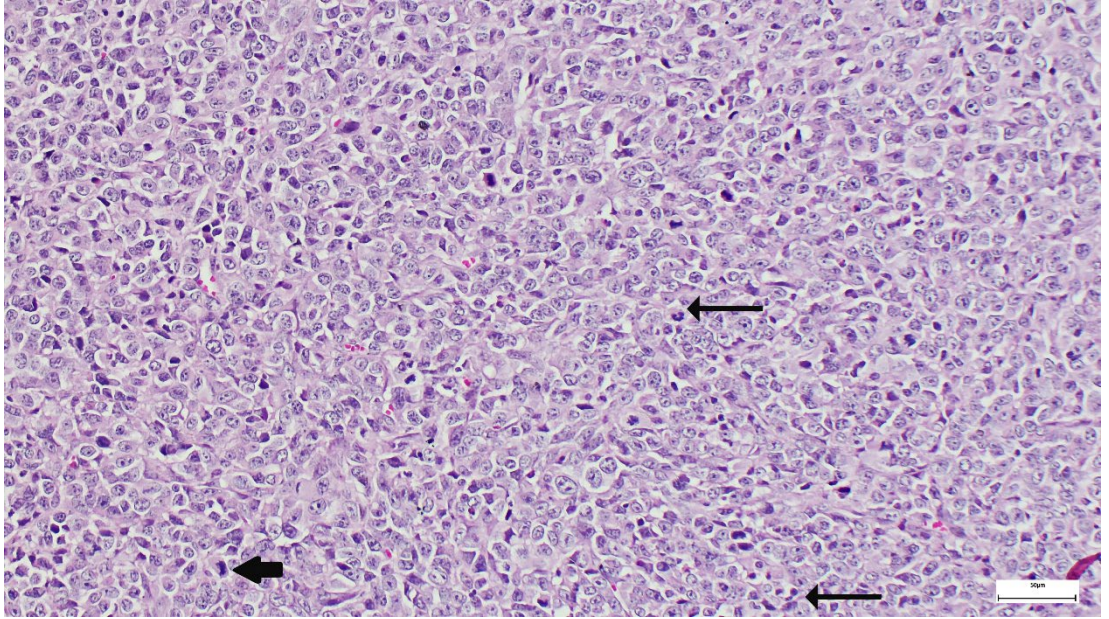
Şekil 4.12. 0,5 µg HSP70 Proflaksi grubunda bağ doku artışının yakından görünümü, H-E boyama, Bar=20 µm.



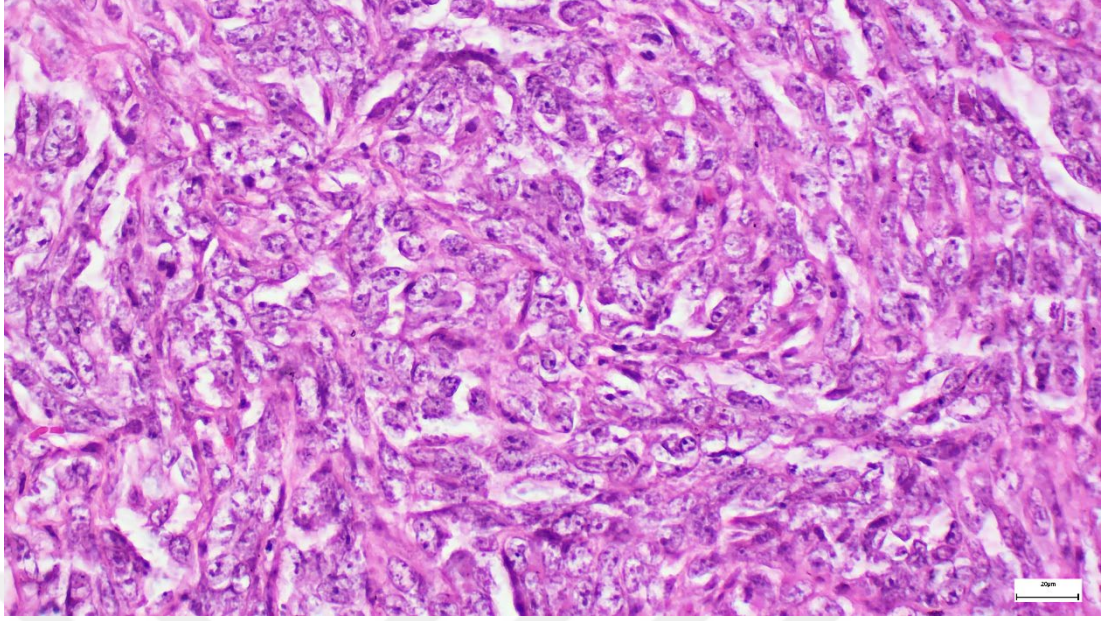
Şekil 4.13. 1 µg HSP70 Proflaksi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Kanama (daireler), nekrotik alan (yıldız), pleomorfik hücreler (kalın ok) ve mitotik figürlerin (ince ok) bulunduğu tümör alanının görünümü, H-E boyama, Bar=50 µm.



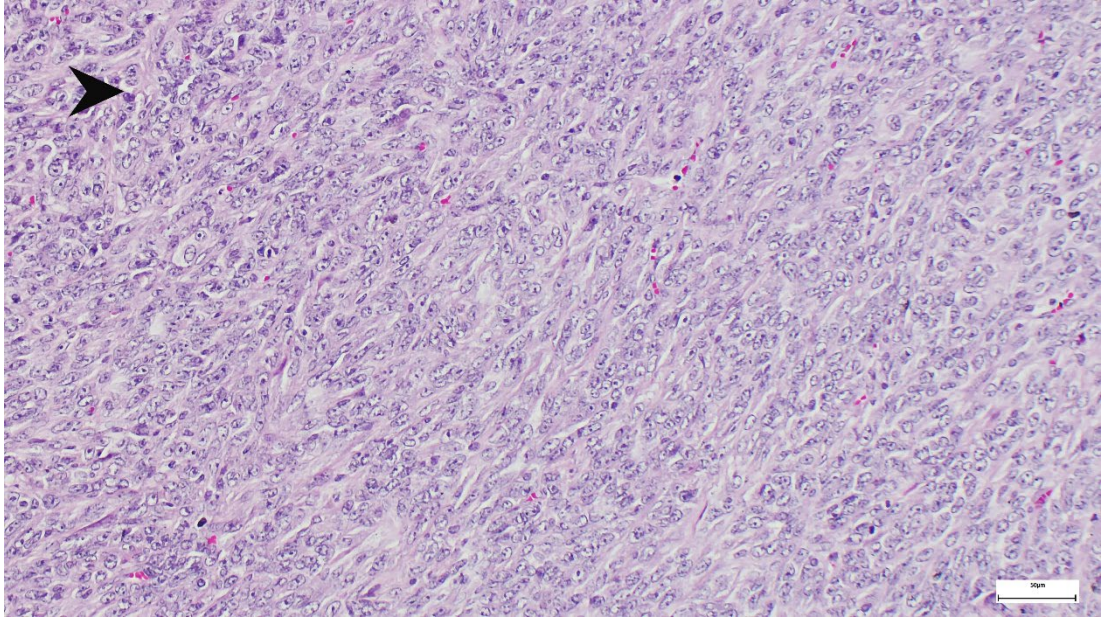
Şekil 4.14. 1 µg HSP70 Profeksi grubunda bir farenin tümör dokusunun büyütülmüş histopatolojik görünümü. Pleomorfik hücre (ok başı) ve yangı hücrelerinin (ok) bulunduğu tümör alanının görünümü, H-E boyama, Bar=20 µm.



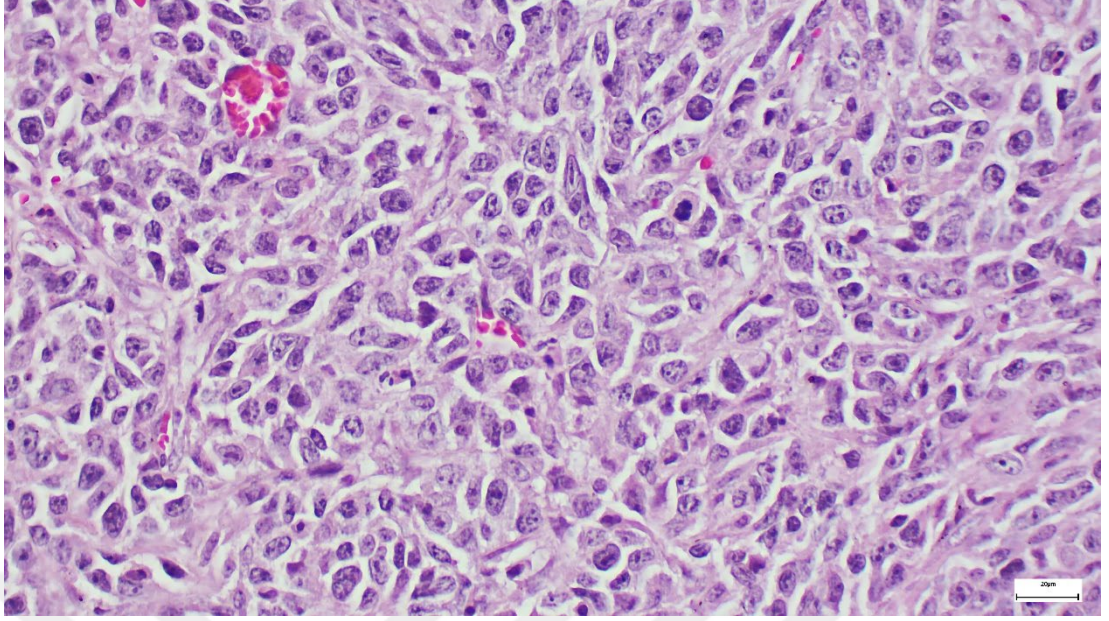
Şekil 4.15. 0,5 µg HSP70 Tedavi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Tümör hücresi artışında azalma, az sayıda mitotik figür (kalın ok) ve yangısal hücre infiltrasyonları (ince oklar) bulunan tümör kitlesi, H-E boyama, Bar=50 µm.



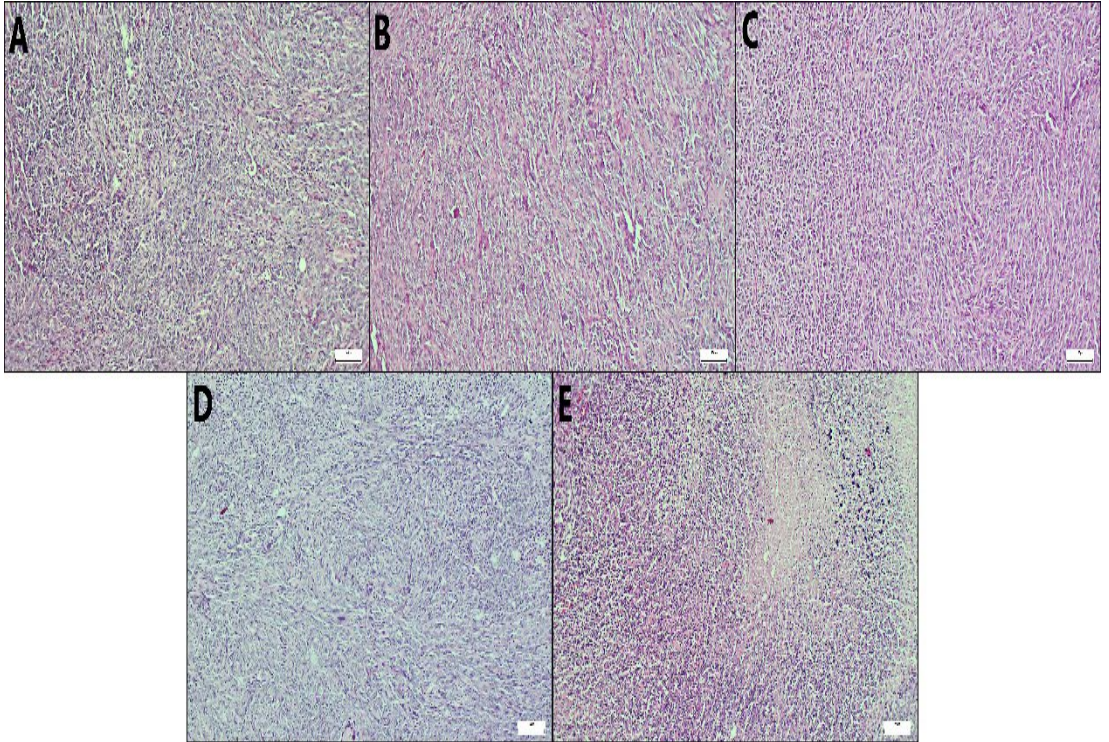
Şekil 4.16. 0,5 µg HSP70 Tedavi grubunda tümör dokusunun büyük büyütmedeki histopatolojik görünümü. Tümör hücresi yoğunluğunda azalma ve bağ dokuda artış, H-E boyama, Bar=20 µm.



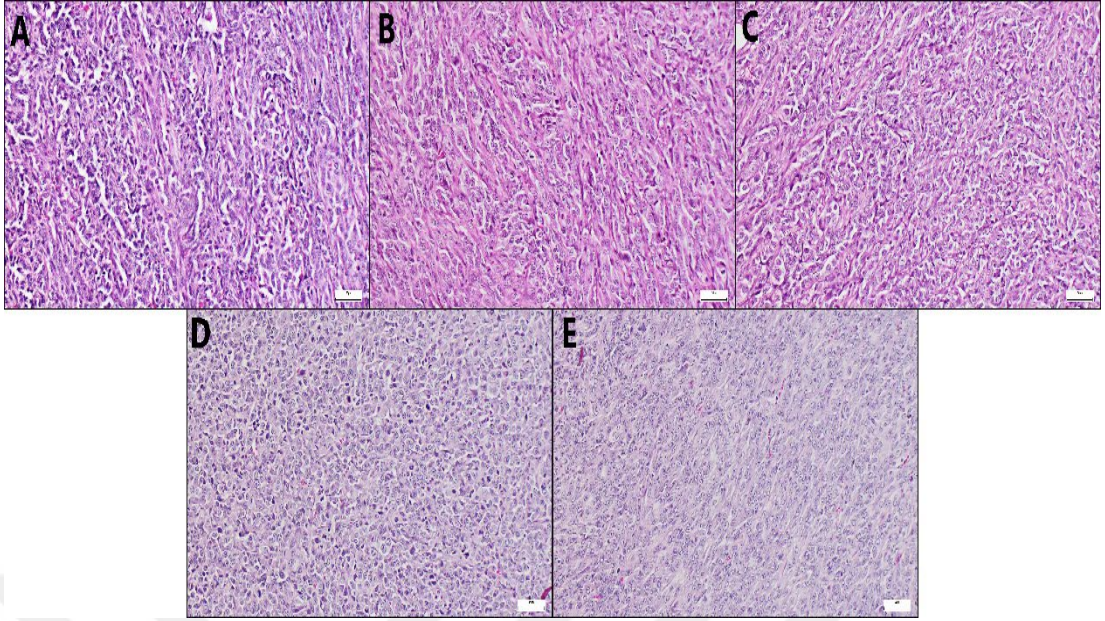
Şekil 4.17. 1 µg HSP70 Tedavi grubunda bir farenin tümör dokusunun histopatolojik görünümü. Tümör hücresi yoğunluğunda azalma ve bağ dokuda artışın olduğu tümör kitlesinin görünümü, H-E boyama, Bar=50 µm.



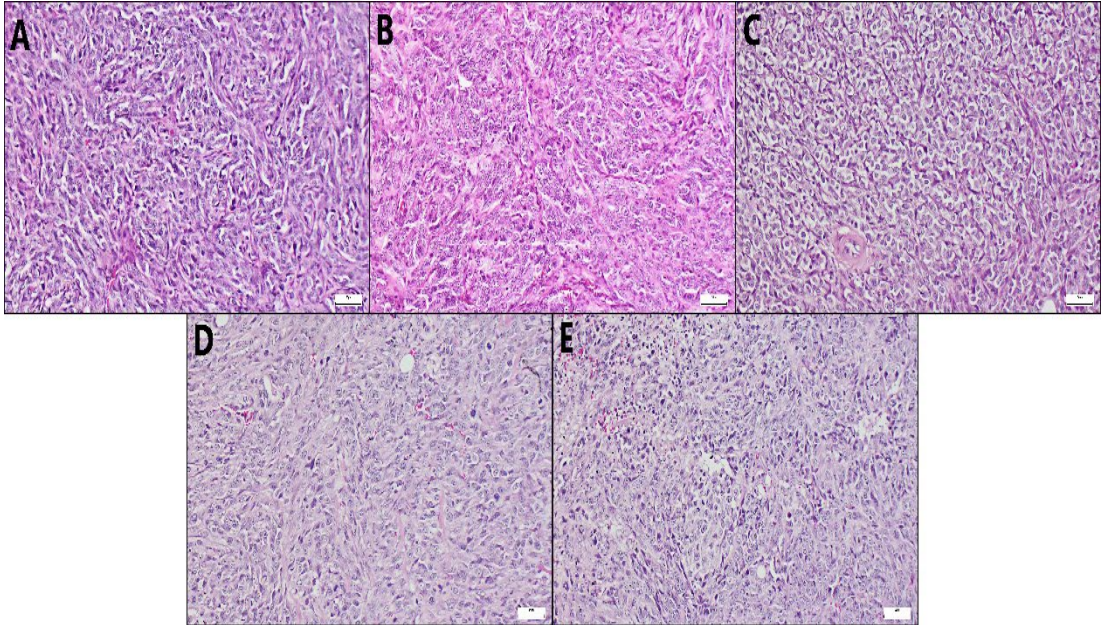
Şekil 4.18. 1 µg HSP70 Tedavi grubunda bir farenin tümör dokusunun büyük büyütmedeki histopatolojik görünümü, H-E boyama, Bar=20 µm.



Şekil 4.19. Gruplara göre tümör dokusunun histopatolojik görünümü. (A) 4T1-Tümör grubu, (B) 0,5 µg HSP70 Proflaksi grubu, (C) 1 µg HSP70 Proflaksi grubu, (D) 0,5 µg HSP70 Tedavi grubu, (E) 1 µg HSP70 Tedavi grubu, H-E boyama, Barlar=100 µm.



Şekil 4.20. Gruplara göre tümör dokusunun histopatolojik görünümü. (A) 4T1-Tümör grubu, (B) 0,5 µg HSP70 Profilaksi grubu, (C) 1 µg HSP70 Profilaksi grubu, (D) 0,5 µg HSP70 Tedavi grubu, (E) 1 µg HSP70 Tedavi grubu, H-E boyama, Barlar=50 µm



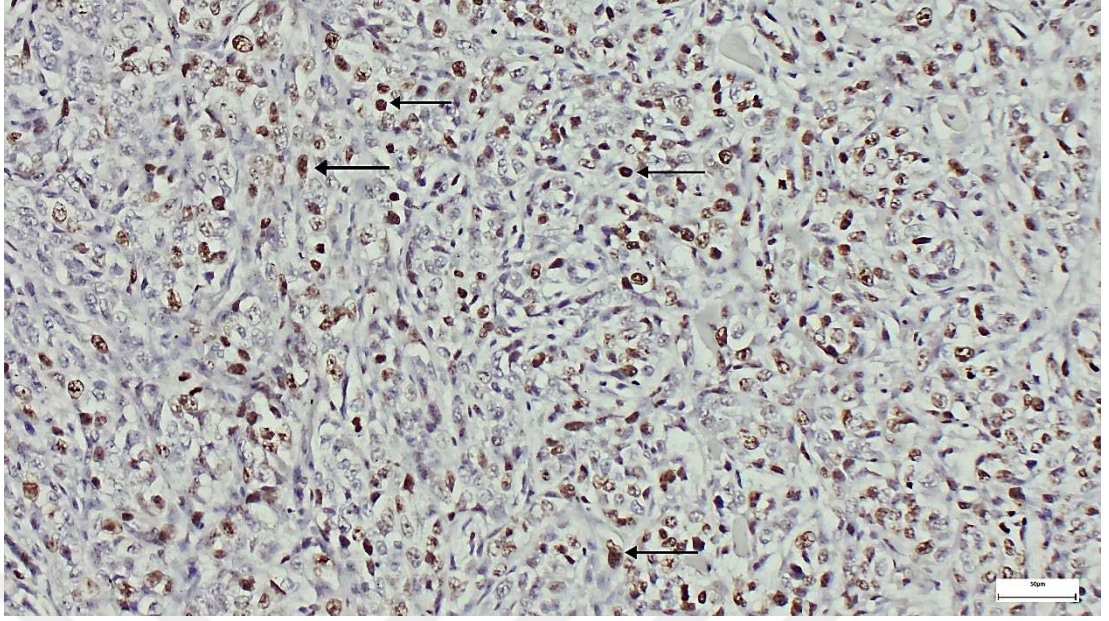
Şekil 4.21. Gruplara göre tümör dokusunun karşılaştırmalı histopatolojik görünümü. (A) 4T1-Tümör grubu, (B) 0,5 µg HSP70 Profilaksi grubu, (C) 1 µg HSP70 Profilaksi grubu, (D) 0,5 µg HSP70 Tedavi grubu, (E) 1 µg HSP70 Tedavi grubu, H-E boyama, Barlar=50 µm.

4.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

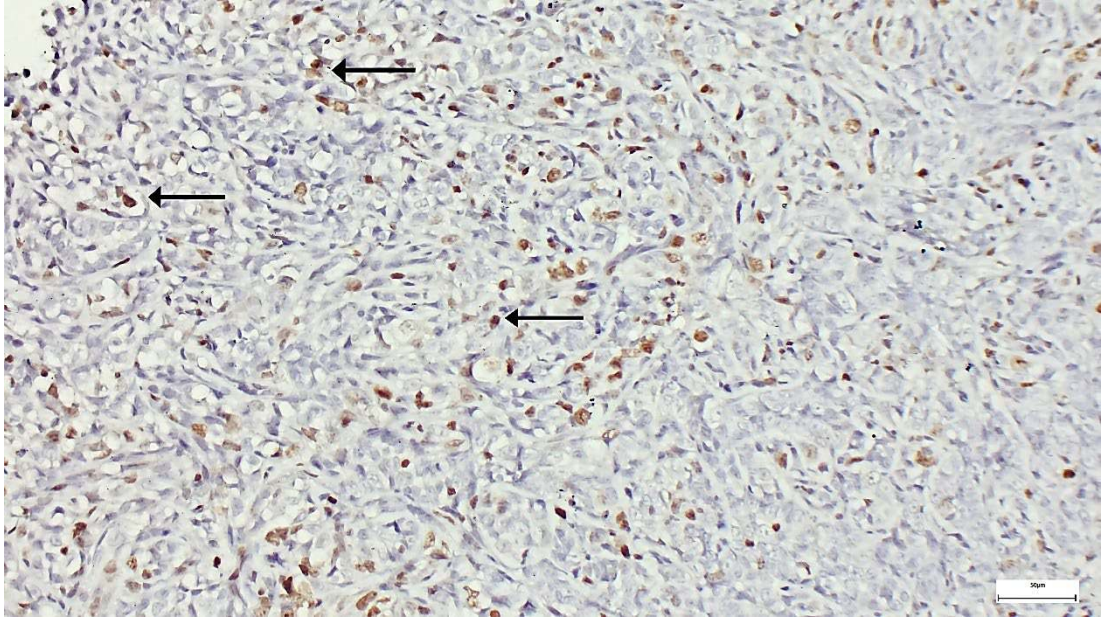
4.2.2.1.Ki-67 Ekspresyonu

Ki-67 ekspresyonlarının gruplar arasındaki karşılaştırmaları yapıldığında meme dokusu kesitlerinde kontrol grubunda ekspresyon gözlenmezken, sadece 4T1 tümör hücresi inokülasyonu yapılan grupta tümör hücrelerinin çekirdeğinde ekspresyonların belirgin şekilde arttığı dikkati çekti. HSP70 tedavisinin genel olarak ekspresyonları azalttığı, 1 µg HSP70 grubunda bu azalmanın 0,5 µg HSP70 grubuna göre daha fazla olduğu dikkati çekti. Profilaksi 0,5 µg HSP70 grubunda hafif ekspresyonlar, profilaksi 1 µg HSP70 uygulanan grupta ise çok hafif ekspresyon gözlenirken, bazı alanlarda ekspresyon gözlenmedi.

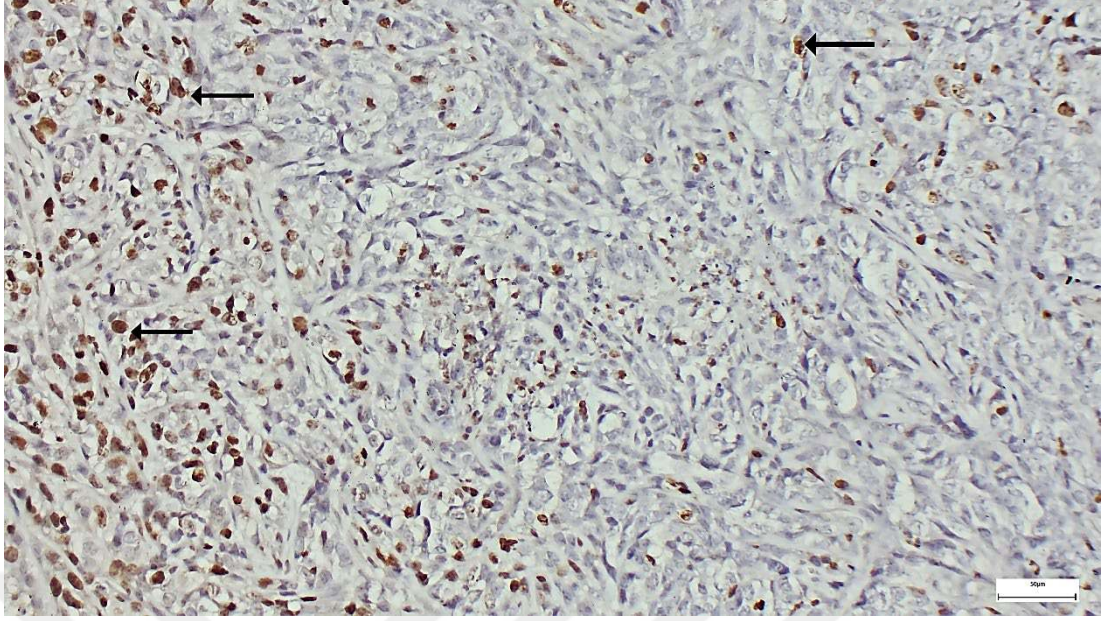
Tümör hücrelerinin nükleer immunohistokimyasal Ki-67 ekspresyonları incelendiğinde en belirgin ekspresyon 4T1 grubunda gözlemlendi. Gruplara göre ekspresyonların değerlendirilmesinde 4T1 tümör grubu ile 0,5 µg HSP70 profilaksi grubu, 1 µg HSP70 profilaksi grubu, 0,5 µg HSP70 tedavi grubu ve 1 µg HSP70 tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi ($P < 0,001$). 0,5µg HSP70 profilaksi grubu, 1 µg HSP70 profilaksi grubu, 0,5 µg HSP70 tedavi grubu ve 1 µg HSP70 tedavi grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait Ki-67 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görüntüleri Şekil 4.22-26'da gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait Ki-67 ekspresyonlarının QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görüntüsü Şekil 4.27'de gösterildi. Şekil 4.28'de Ki-67 ekspresyonlarının istatistiksel analizleri verildi.



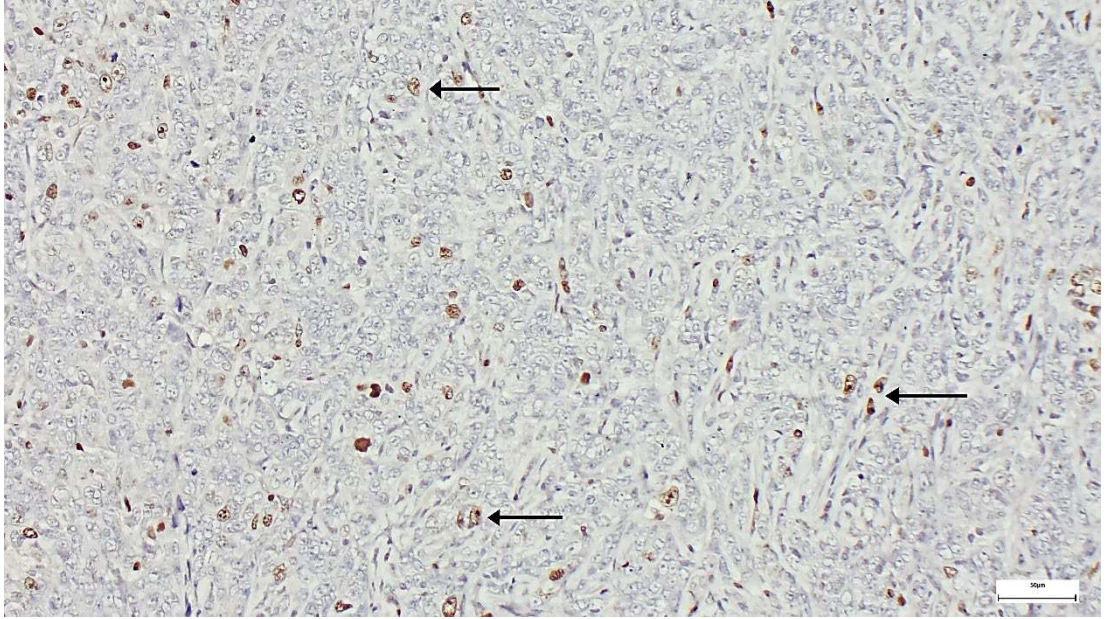
Şekil 4.22. 4T1-Tümör grubunun tümör dokusuna ait yoğun Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli nükleer Ki-67 ekspresyonları (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar = 50 µm.



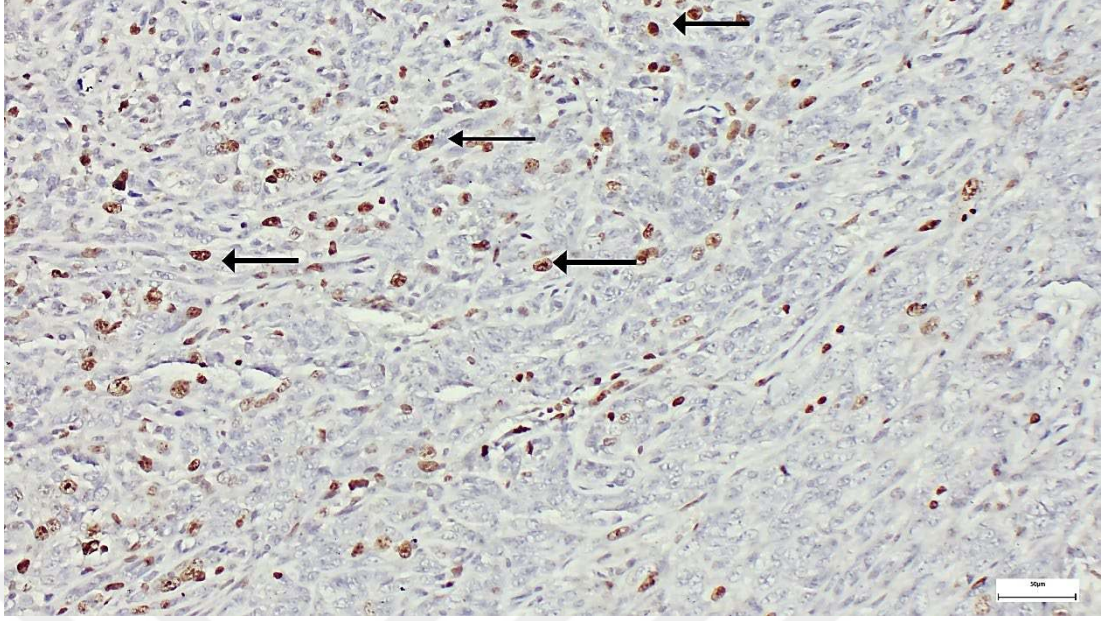
Şekil 4.23. 0,5 µg HSP70 profilaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış Ki-67 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette nükleer Ki-67 pozitif immunoreaksiyonları (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



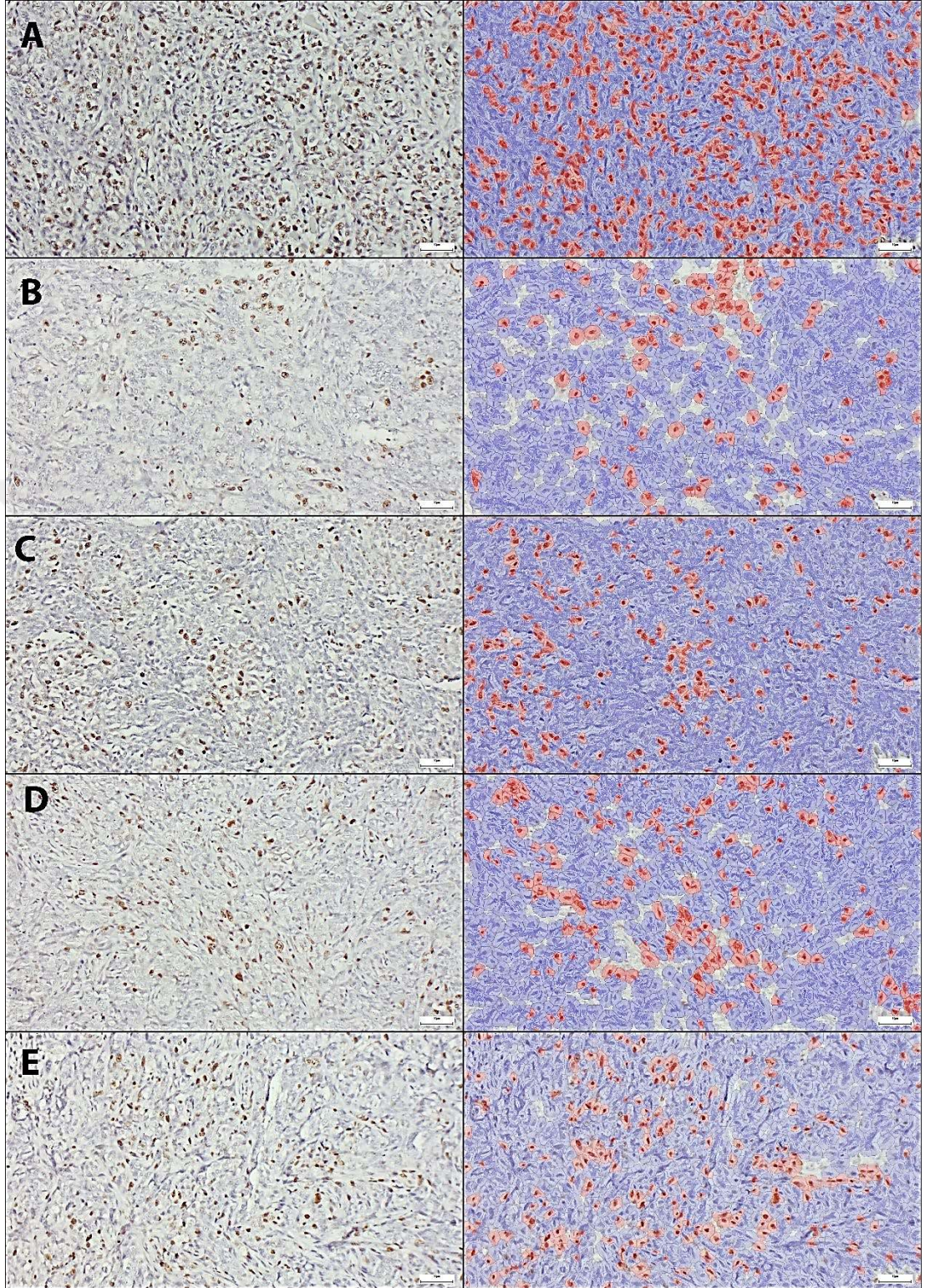
Şekil 4.24. 1 µg HSP70 profilaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer Ki-67 pozitif ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.25. 0,5 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait belirgin şekilde azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde hafif şiddette nükleer Ki-67 pozitif immunoreaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.

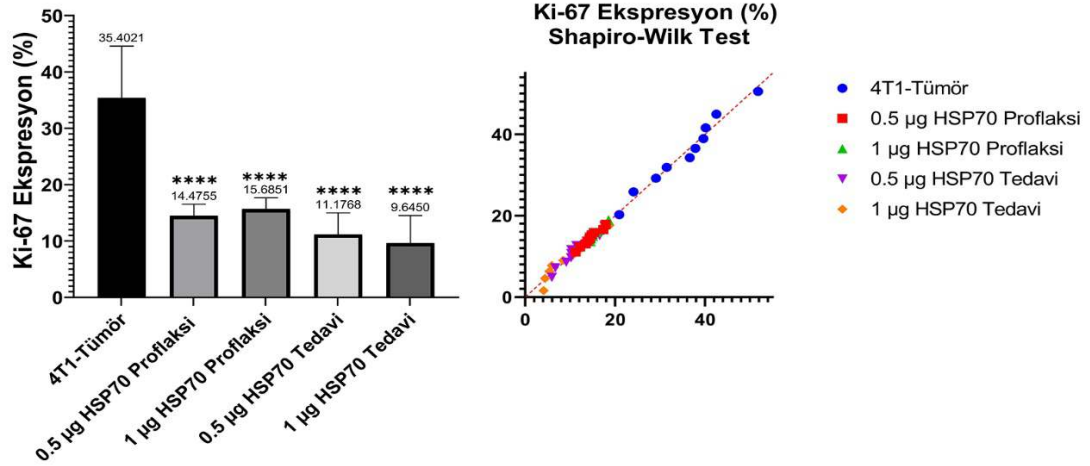


Şekil 4.26. 1 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait belirgin şekilde azalmış Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde hafif şiddette nükleer Ki-67 ekspresyonları (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.27. A; 4T1 tümör grubu, B; 0,5 µg HSP70 tedavi grubu, C; 1µg HSP70 tedavi grubu, D; 0,5 µg HSP70 profilaksi grubu, E; 1 µg HSP70 profilaksi grubu. Çalışma gruplarında tümör dokularına ait Ki-67 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü. Soldaki resimde

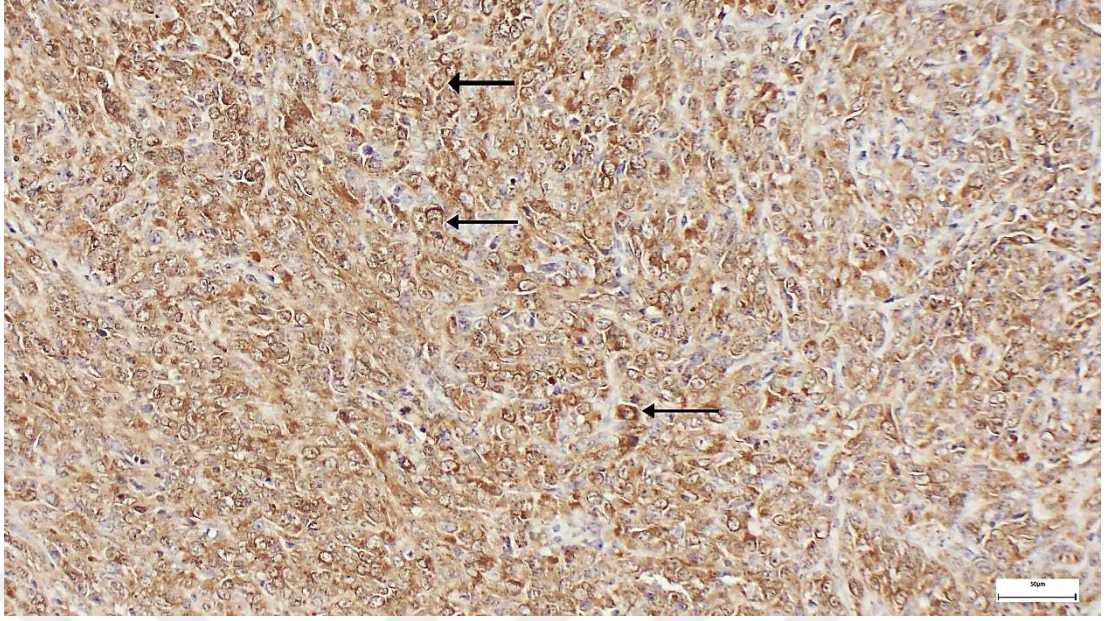
tümör hücrelerinin Ki-67 pozitif immunoreaksiyonu (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise ekspresyonların QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar=50 µm



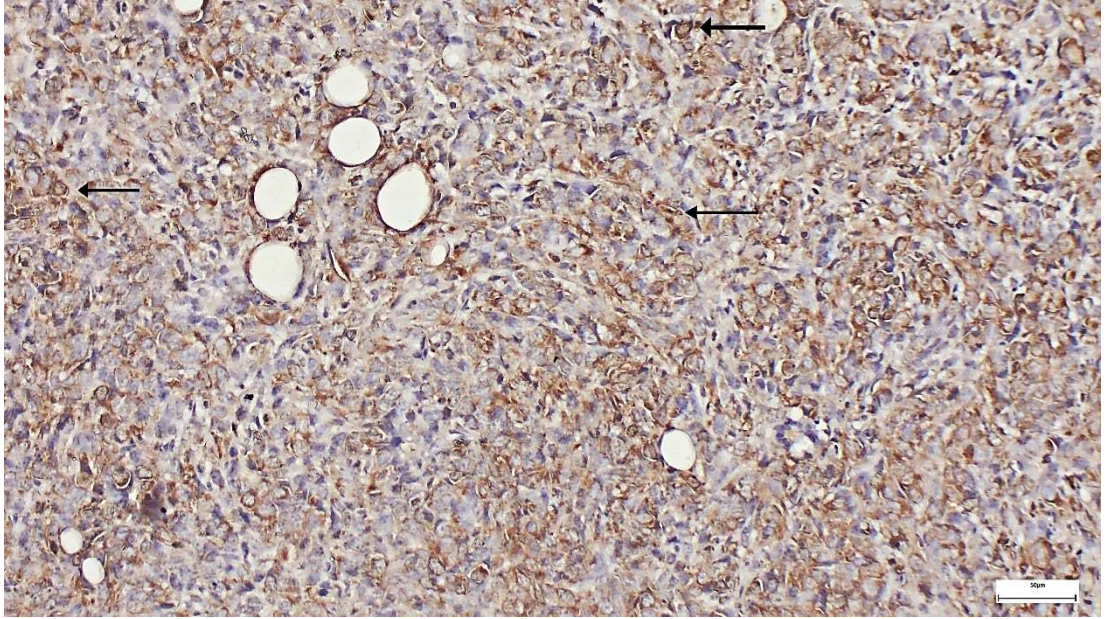
Şekil 4.28. Primer tümör hücrelerinin Ki-67 ekspresyonunun değerlendirilmesi (Tümör grubu ile kıyaslandığında, ****:P <0,001)

4.2.2.2. CD-31 Ekspresyonu

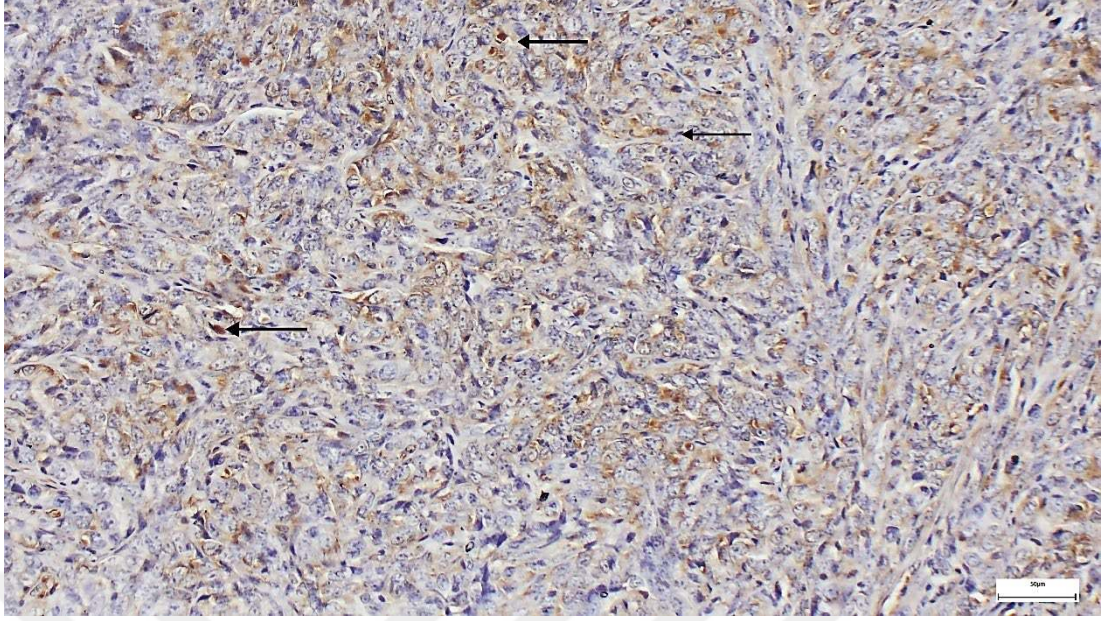
4T1-Tümör grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü. 0,5 µg HSP70 profeksi grubu ile 0,5 µg HSP70 ve 1 µg HSP70 tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu dikkati çekti. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görüntüleri Şekil 4.29-33'de gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait CD-31 ekspresyonunun QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü Şekil 4.34'de gösterildi. Şekil 4.35'de CD-31 ekspresyonunun istatistiksel analizleri gösterilmiştir.



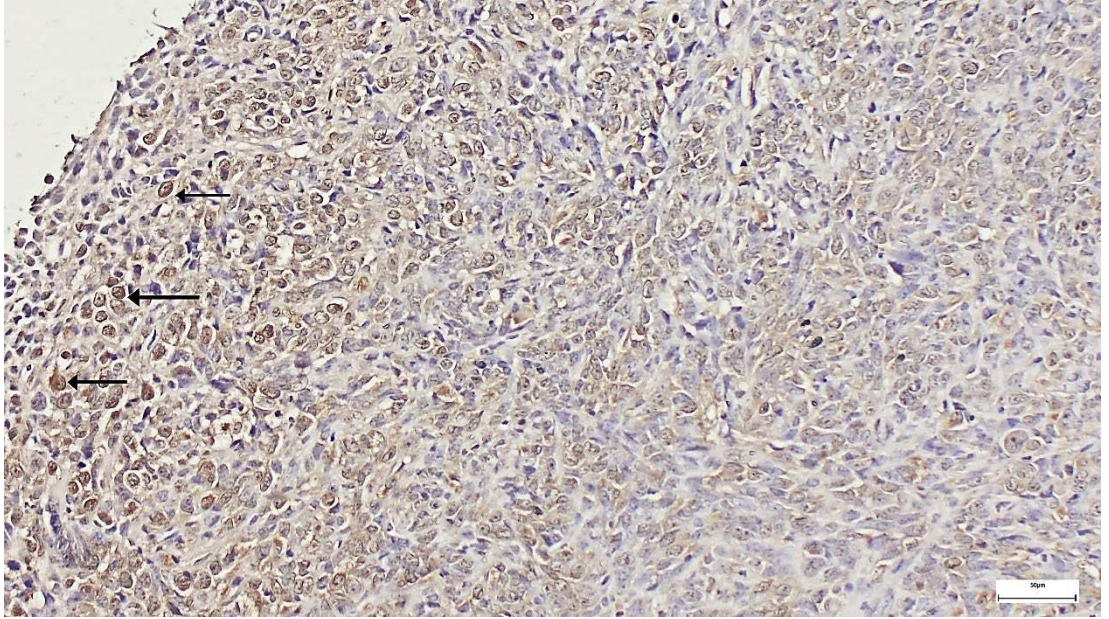
Şekil 4.29. 4T1 tümör grubunun tümör dokusuna ait belirgin CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde şiddetli pozitif CD-31 ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 μ m.



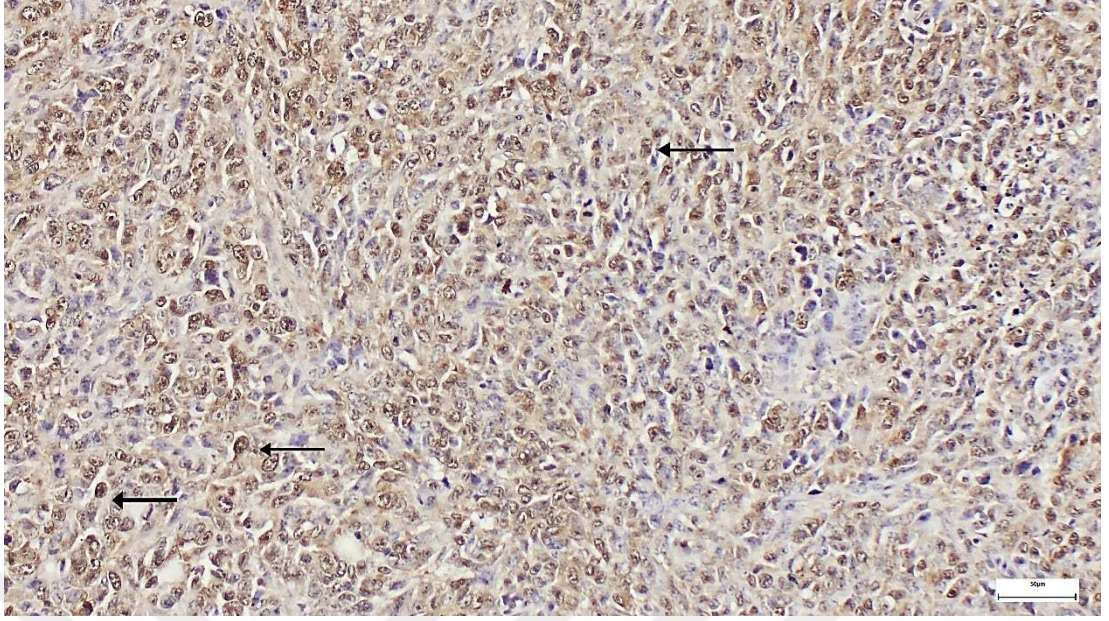
Şekil 4.30. 0,5 μ g HSP70 proflaksi grubunun tümör dokusuna ait CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde azalmış CD-31 ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 μ m.



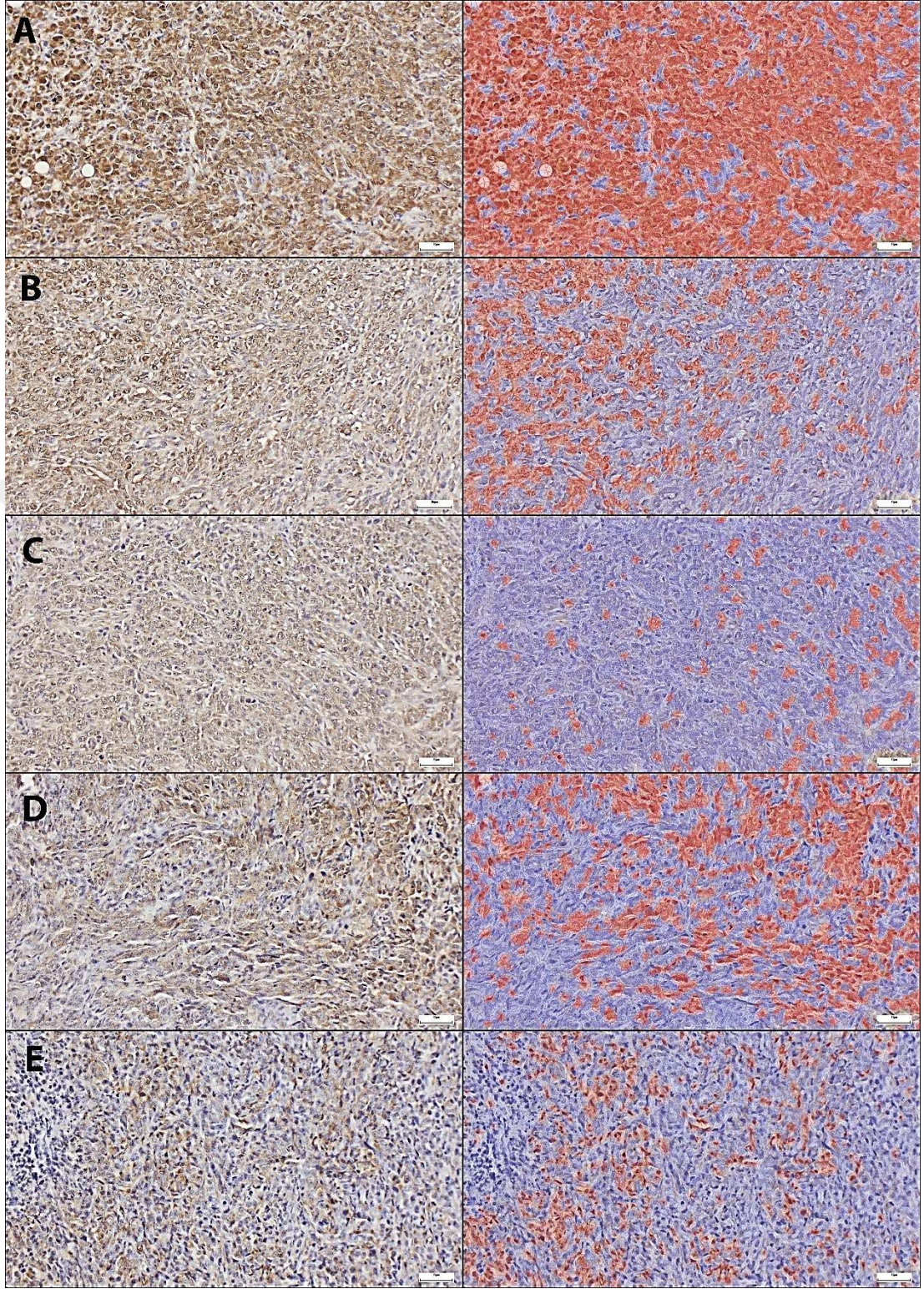
Şekil 4.31. 1 µg HSP70 proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddetli CD-31 pozitif immunoreaksiyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.32. 0,5 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette CD-31 ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.

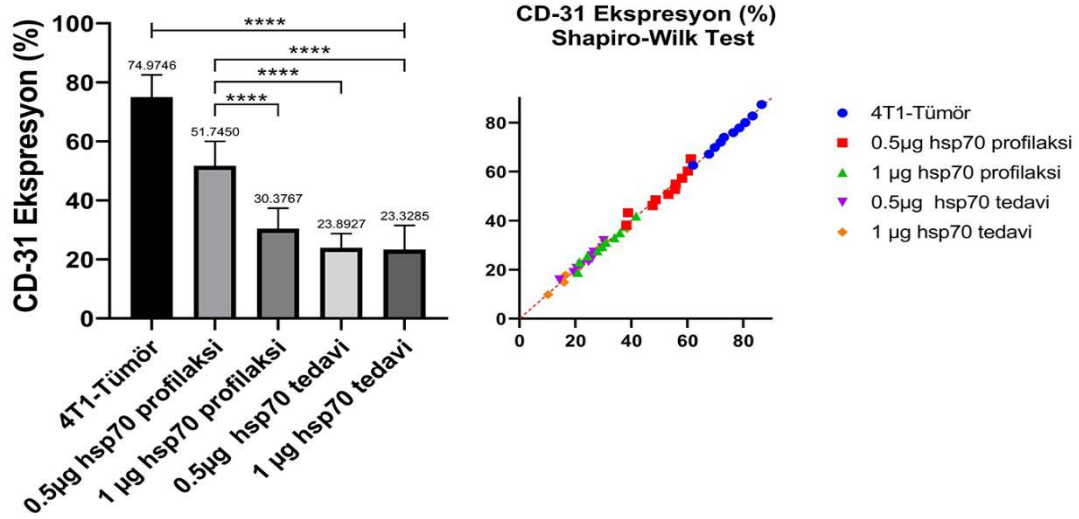


Şekil 4.33. 1 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde orta şiddette CD-31 pozitif immunoreaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.34. (A) 4T1 tümör grubu, (B) 0,5 µg HSP70 tedavi grubu, (C) 1µg HSP70 tedavi grubu, (D) 0,5 µg HSP70 profilaksi grubu, (E) 1 µg HSP70 profilaksi grubu. Çalışma gruplarında tümör dokularına ait CD-31 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin

görünümü. Soldaki resimde tümör hücrelerinin CD-31 sitoplazmik immunoreaksiyon (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immunopozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar=50 μ m



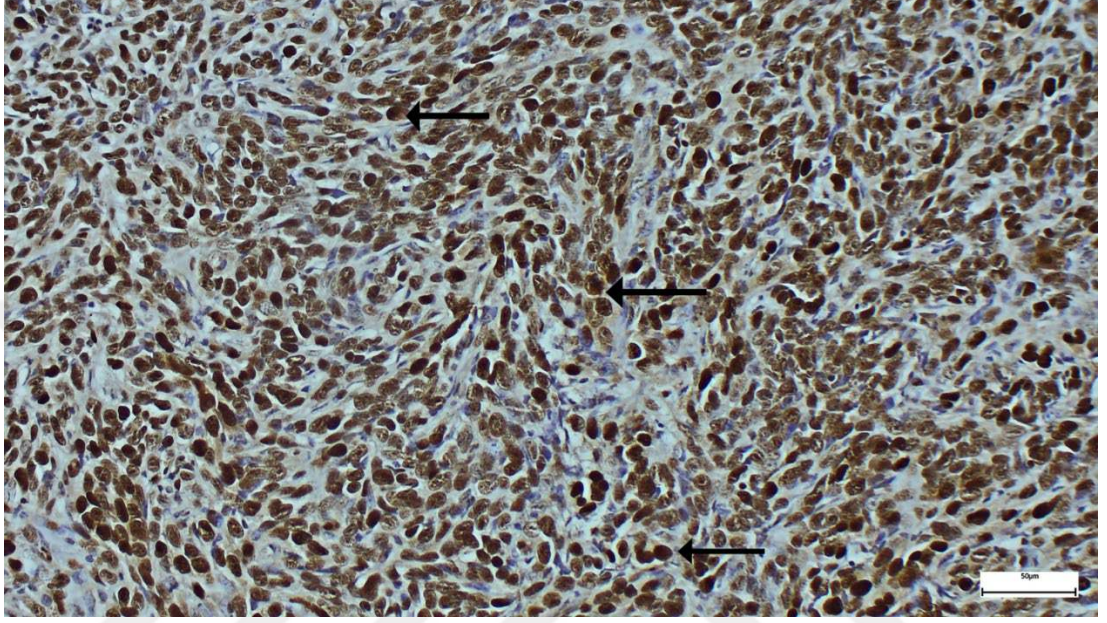
Şekil 4.35. Primer tümör hücrelerinin CD-31 ekspresyonunun değerlendirilmesi (****:P <0,001)

4.2.2.3.PCNA Ekspresyonu

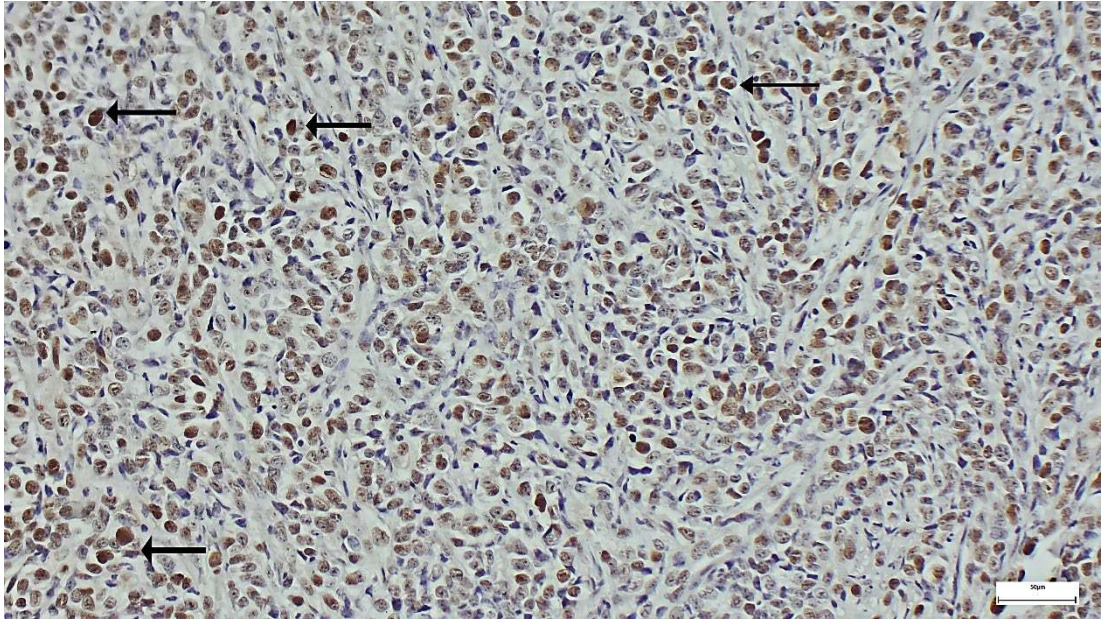
Tümör hücrelerinin nükleer PCNA ekspresyonlarının değerlendirilmesinde 4T1-tümör grubu ile 0,5 μ g HSP70 profilaksi grubu (P <0,001) ve 1 μ g HSP70 profilaksi grubu (P <0,001) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu belirlendi. 0,5 μ g HSP70 profilaksi grubu ile 0,5 μ g HSP70 tedavi grubu (p=0,03) ve 1 μ g HSP70 tedavi grubu (p= 0,003) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü. 0,5 μ g HSP70 profilaksi grubu ve 1 μ g HSP70 profilaksi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait PCNA ekspresyonlarının immunohistokimyasal görüntüleri Şekil 4.36-40'ta gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait PCNA ekspresyonlarının QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görünümü Şekil 4.41'de verildi. Şekil 4.42'de PCNA ekspresyonlarının istatistiksel analizleri gösterilmiştir.

PCNA ekspresyonlarının gruplar arasındaki immunoreaksiyonları değerlendirildiğinde 4T1'in tek başına yapıldığı grupta hücre çekirdeğindeki

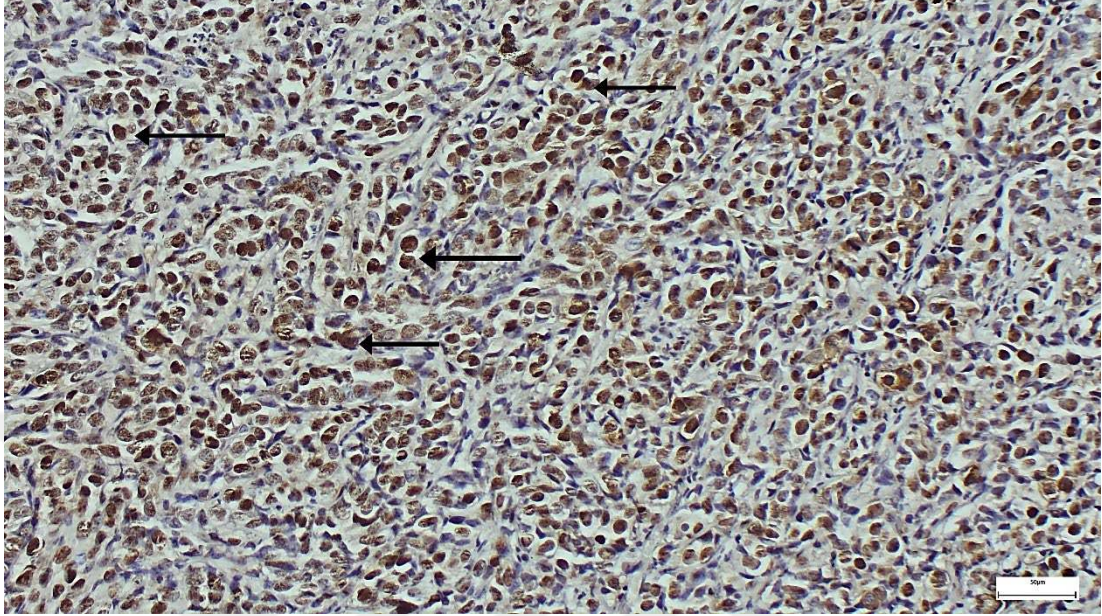
ekspresyonlarda artma görüldü. HSP70 tedavisinin genel olarak ekspresyonları azalttığı, 1 µg HSP70 grubunda bu azalmanın 0,5 µg HSP70 grubuna göre daha fazla olduğu dikkati çekti. Profilaksi 0,5 µg HSP70 grubunda hafif ekspresyonlar, profilaksi 1ml HSP70 uygulanan grupta ise bazı alanlarda negatif ekspresyonlar belirlendi.



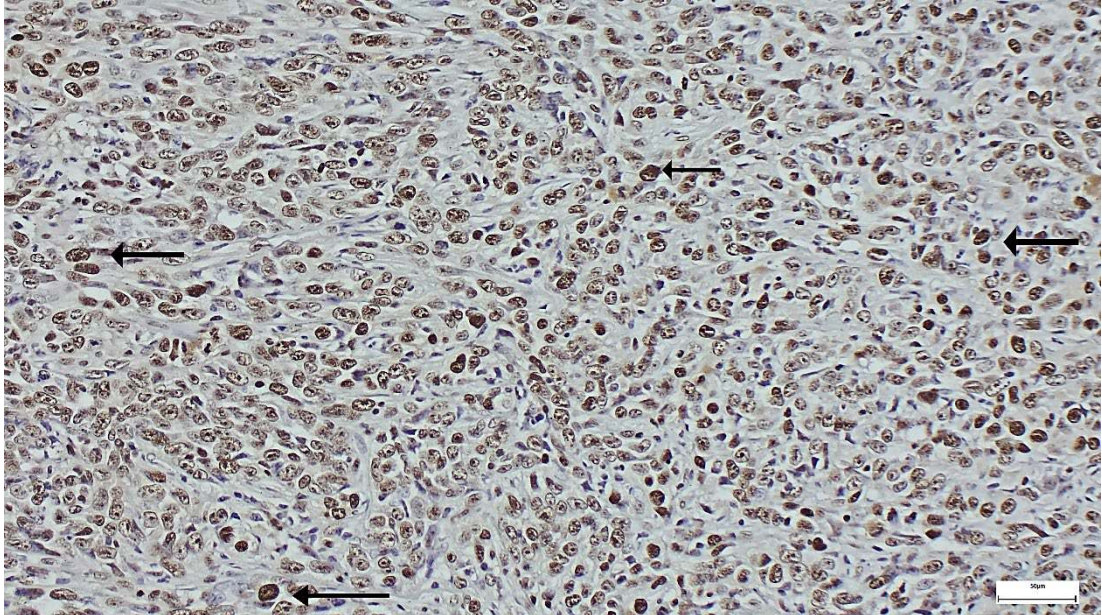
Şekil 4.36. 4T1 Tümör grubunun tümör dokusuna ait şiddetli PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer PCNA immün pozitif reaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



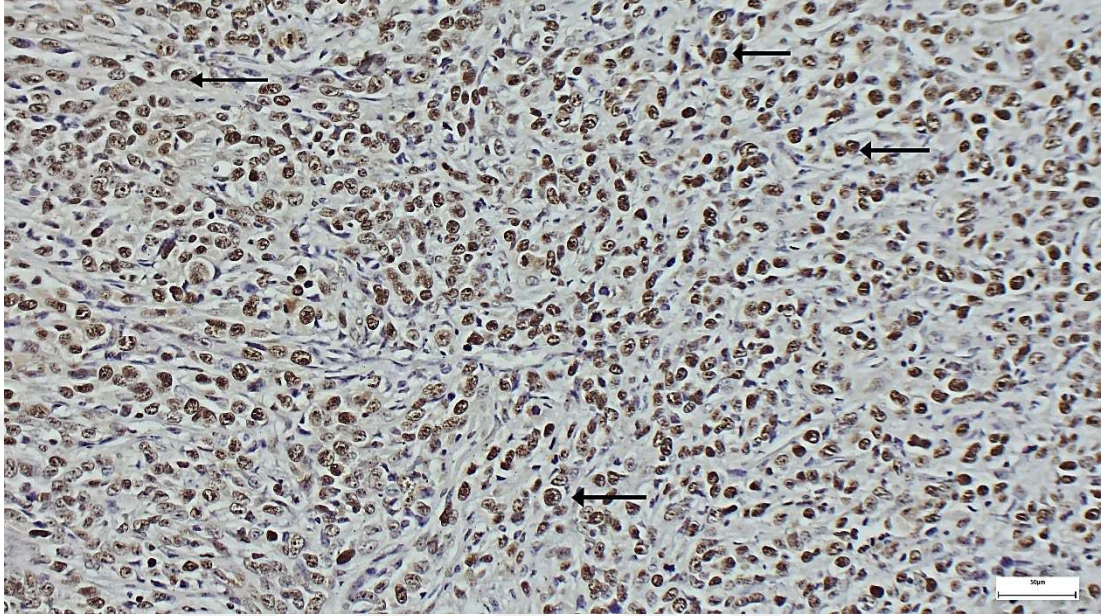
Şekil 4.37. 0,5 µg HSP70 proflaksi grubunun tümör dokusuna ait belirgin şekilde azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer PCNA ekspresyonları (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



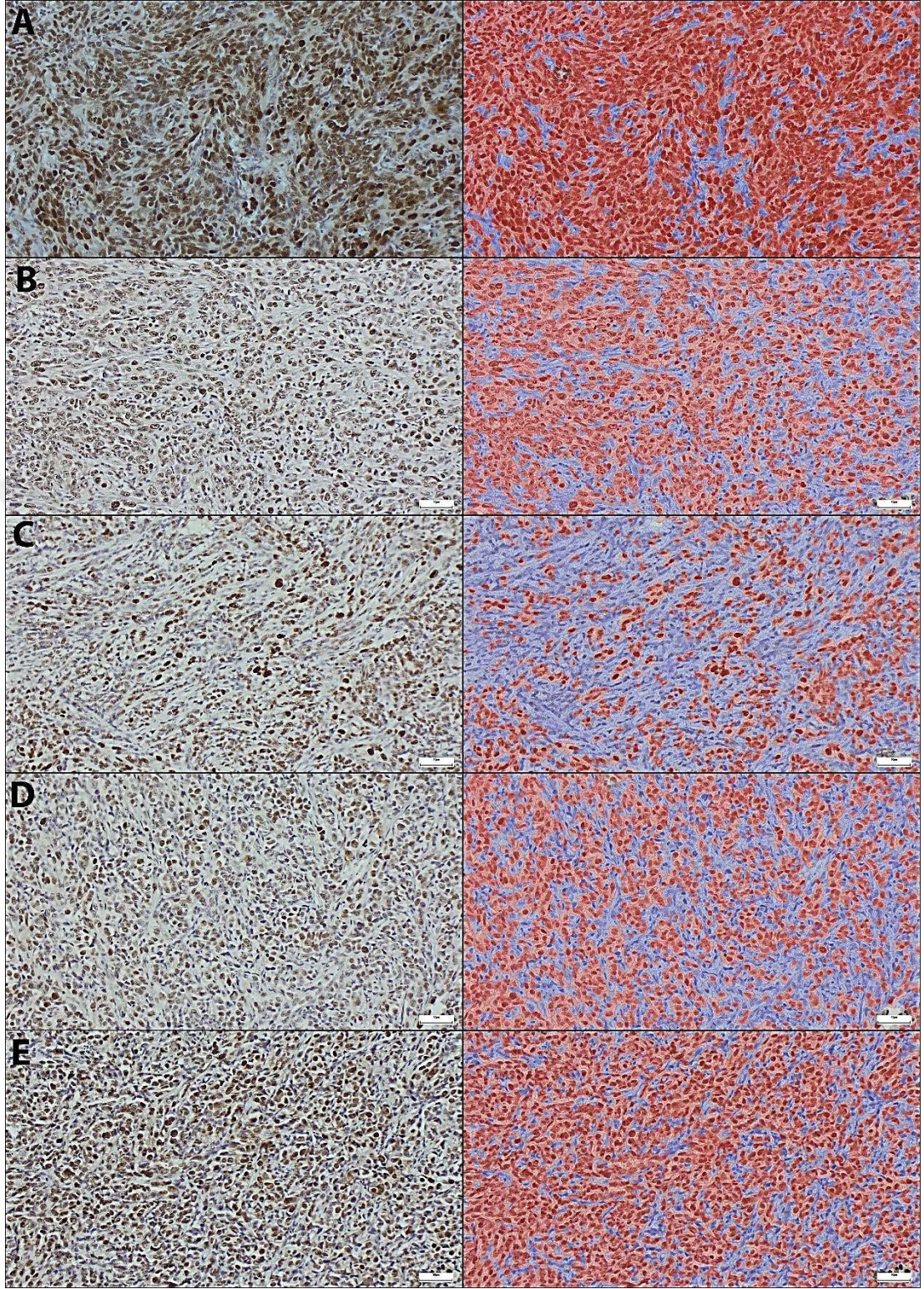
Şekil 4.38. 1 µg HSP70 proflaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer PCNA pozitif immunoreaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.39. 0,5 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer PCNA ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.

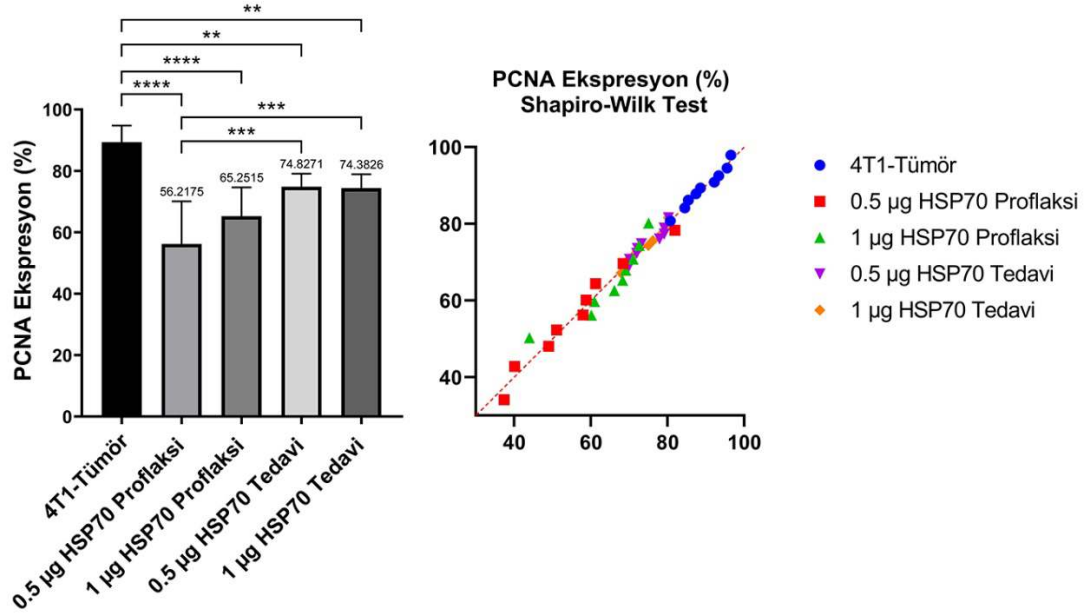


Şekil 4.40. 1 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde nükleer PCNA immun pozitif reaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.41. (A) 4T1 tümör grubu, (B) 0,5 µg HSP70 tedavi grubu, (C) 1µg HSP70 tedavi grubu, (D) 0,5 µg HSP70 profilaksi grubu, (E) 1 µg HSP70 profilaksi grubu. Çalışma gruplarında tümör dokularına ait PCNA ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immunopozitif

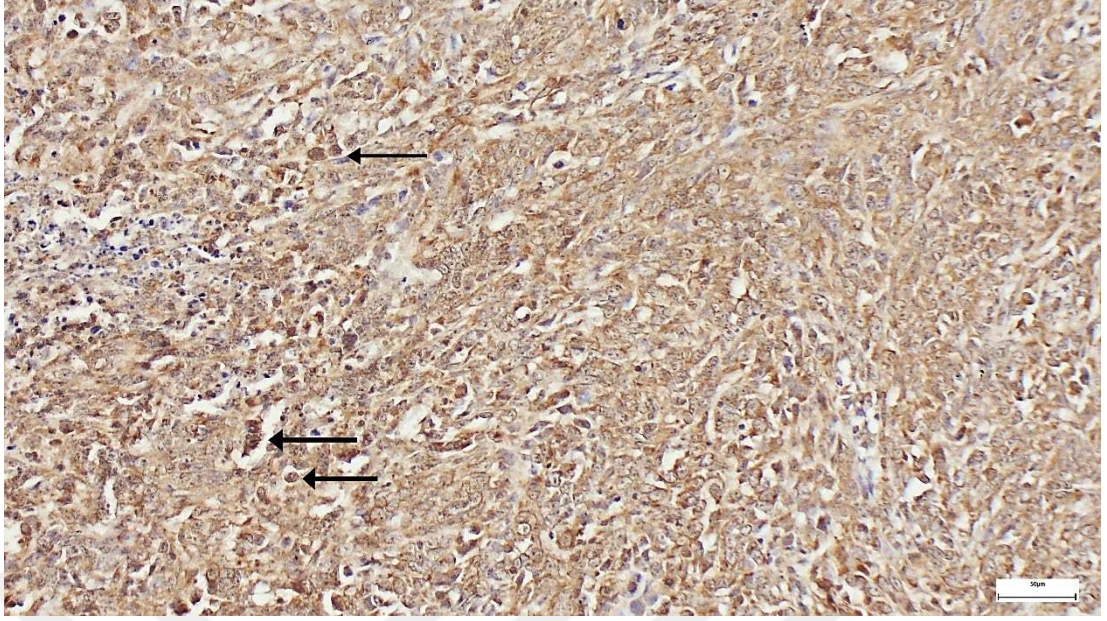
hücrelerin görünümü. Soldaki resimde tümör hücrelerinin PCNA nükleer immün ekspresyonu (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immunopozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Bar=50 μ m



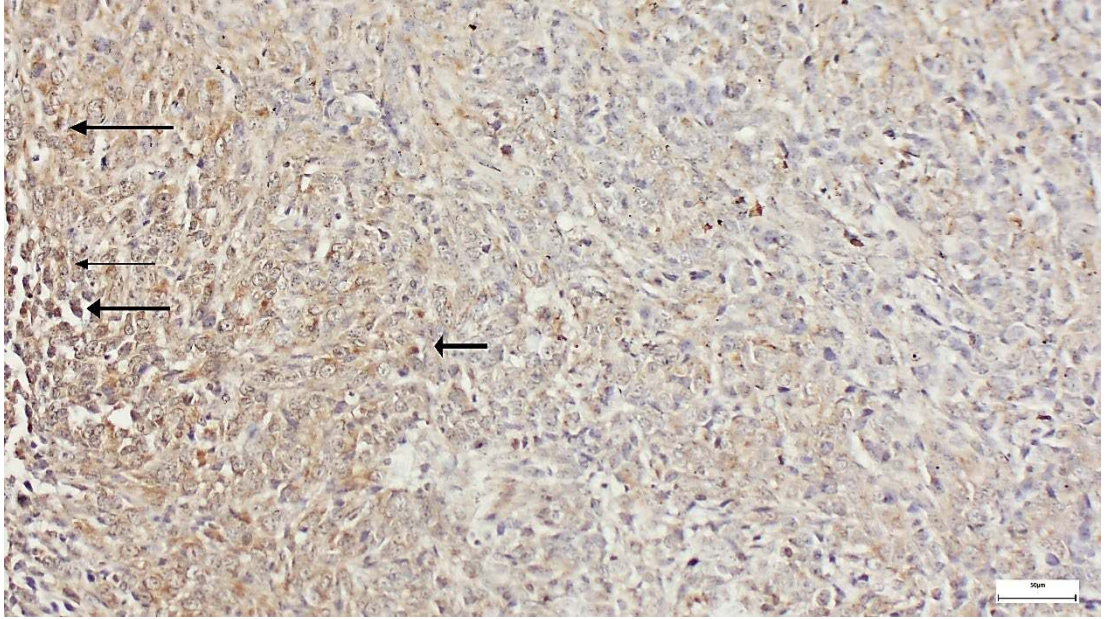
Şekil 4.42. Primer tümör hücrelerinin PCNA ekspresyonunun değerlendirilmesi (****:P<0,001; ***: P<0.01; **: P<0,01).

4.2.2.4. HSP70 Ekspresyonu

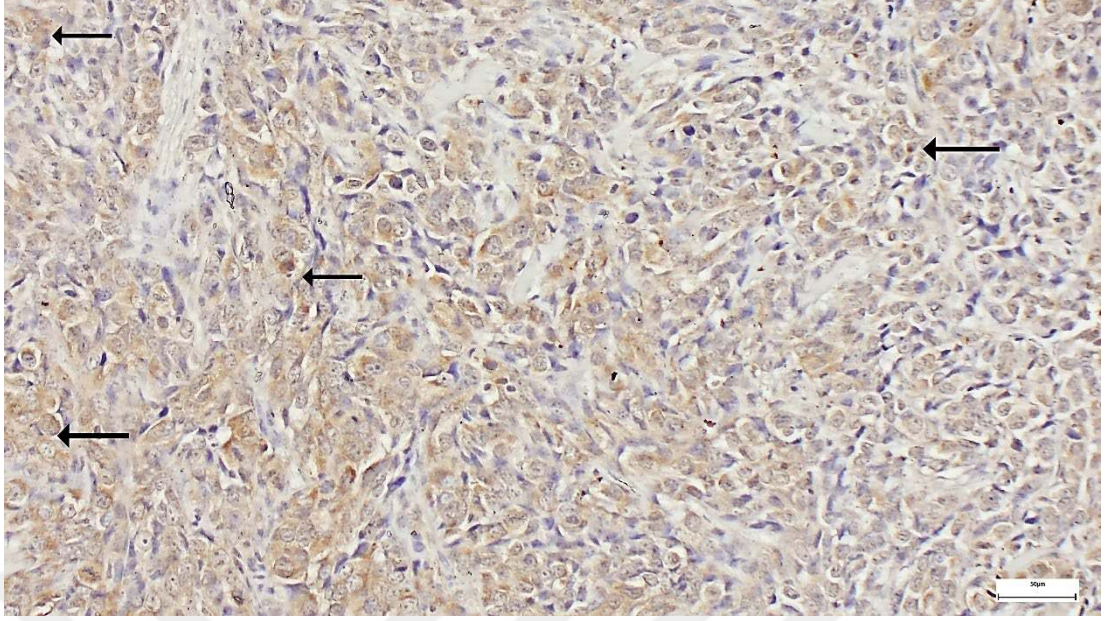
Tümör hücrelerinin HSP70 ekspresyonlarının değerlendirilmesinde 4T1-tümör grubu ile 0,5 μ g HSP70 profilaksi (P=0,002), 1 μ g HSP70 profilaksi grubu (P=0,003) ve 1 μ g HSP70 tedavi grubu (P=0,027) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü. 4T1-tümör grubu ile 0,5 μ g HSP70 tedavi grubu arasında önemli bir fark saptanmadı. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait HSP70 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görüntüleri Şekil 4.43-47’de gösterildi. Çalışma gruplarının tümör dokusuna ait HSP70 ekspresyonlarının QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücrelerin görüntüsü Şekil 4.48’de verildi. Şekil 4.49’da HSP70 ekspresyonlarının istatistiksel analizleri gösterilmiştir.



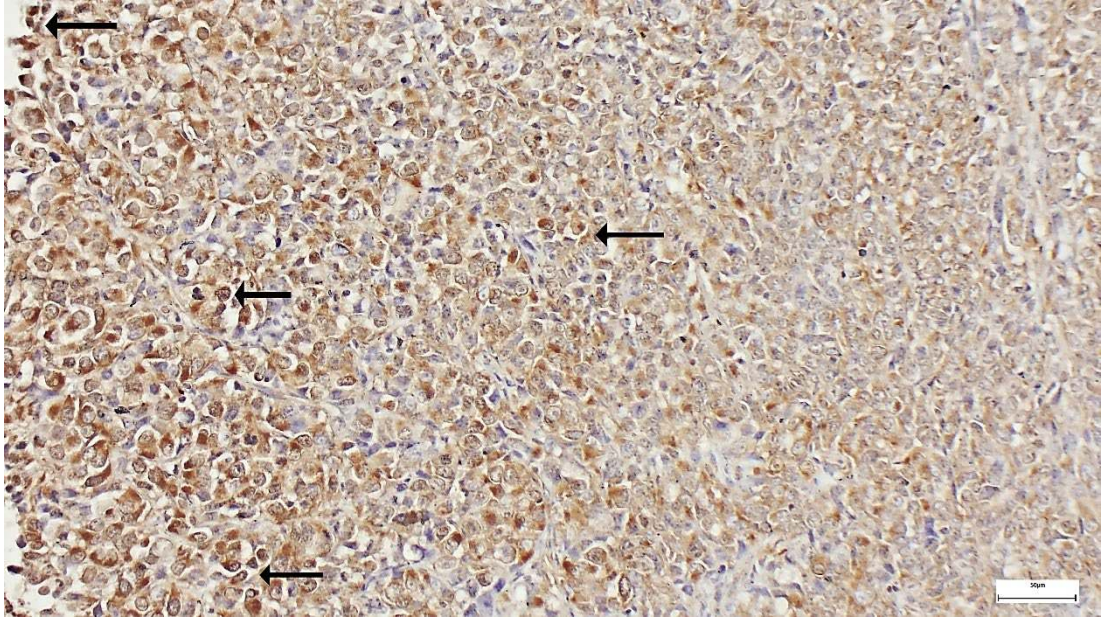
Şekil 4.43. 4T1-Tümör grubunun tümör dokusuna ait belirgin HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde HSP70 immun pozitif reaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



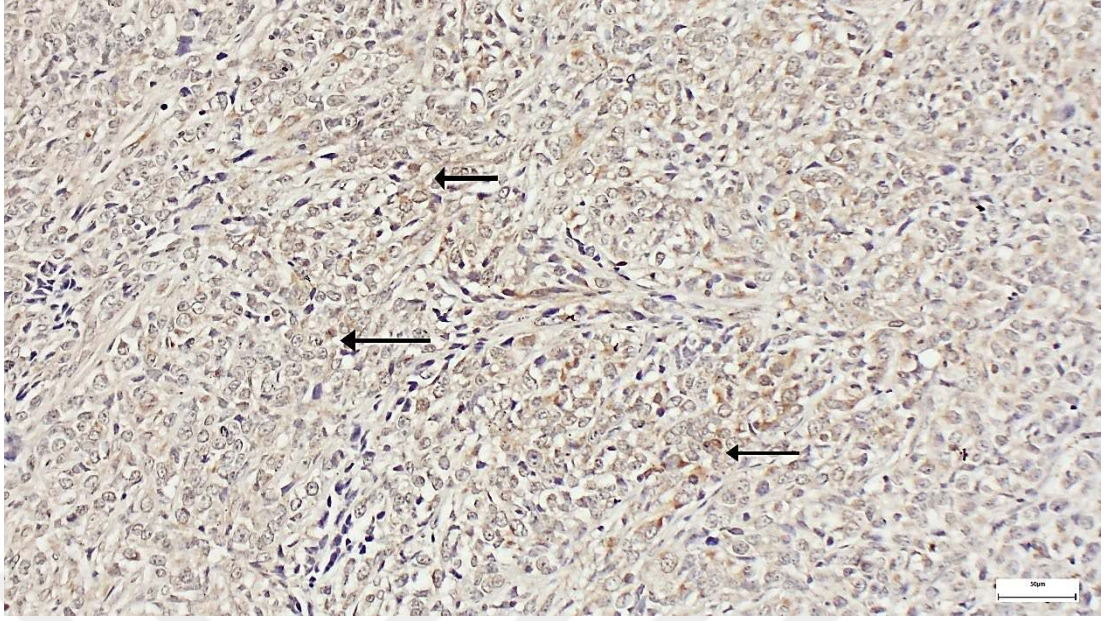
Şekil 4.44. 0,5 µg HSP70 profilaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde HSP70 ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



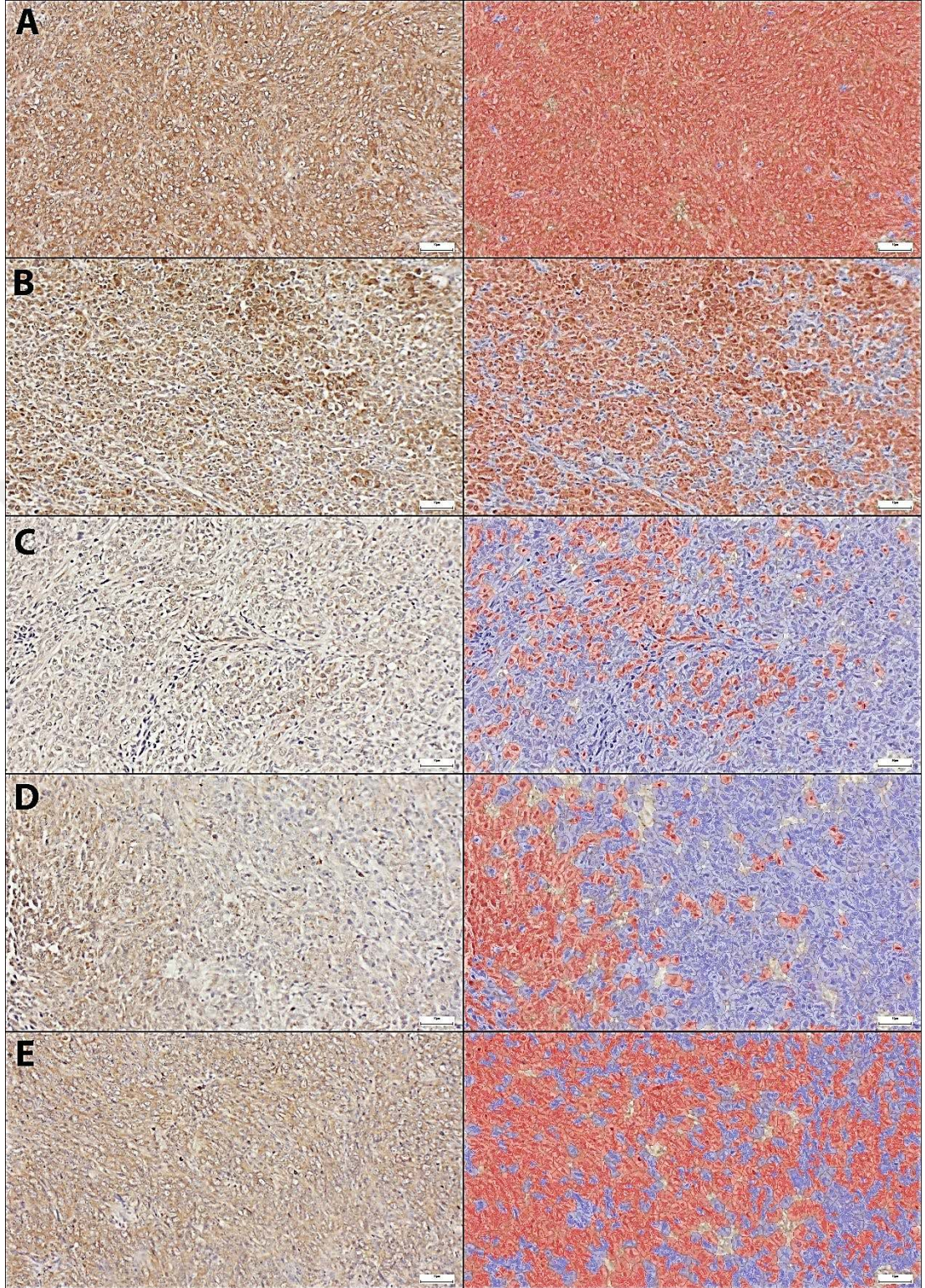
Şekil 4.45. 1 µg HSP70 profilaksi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde HSP70 immun pozitifliği (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.46. 0,5 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde HSP70 ekspresyonu (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.

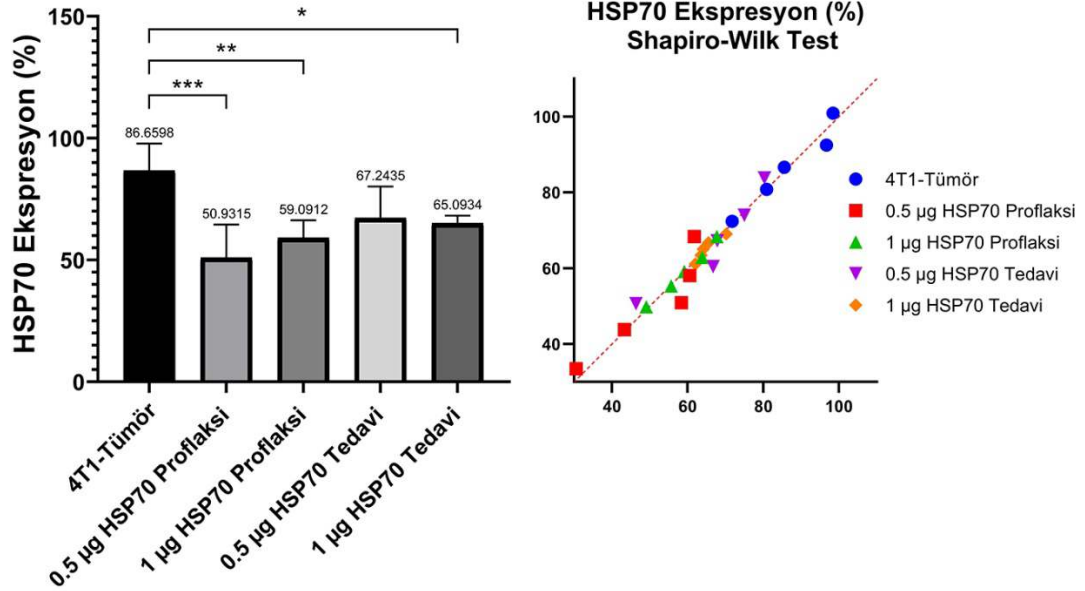


Şekil 4.47. 1 µg HSP70 tedavi grubunun tümör dokusuna ait azalmış HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal görünümü. Tümör hücrelerinde HSP70 immun pozitif reaksiyonlar (oklar), HRP/DAB kromojen, Bar=50 µm.



Şekil 4.48. A; 4T1 tümör grubu, B; 0,5 µg HSP70 tedavi grubu, C; 1µg HSP70 tedavi grubu, D; 0,5 µg HSP70 profilaksi grubu, E; 1 µg HSP70 profilaksi grubu. Çalışma gruplarında tümör dokularına ait HSP70 ekspresyonunun immunohistokimyasal ve QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen immunopozitif hücrelerin görünümü. Soldaki

resimde tümör hücrelerinin HSP70 nükleer ekspresyonları (HRP/DAB kromojen), sağdaki resimde ise immün ekspresyonların QuPath-0.5.1 programı ile belirlenen pozitif hücreler gösterilmektedir. Kırmızı renk pozitif, mavi renk ise negatif boyanan hücreleri temsil etmektedir. Barlar=50 μ m



Şekil 4.49. Primer tümör hücrelerinin HSP70 ekspresyonunun değerlendirilmesi (Tümör grubu ile kıyaslandığında, ***:P <0,01; **:P <0,05. *:P <0,05).

4.3. Gen Ekspresyonu Bulguları

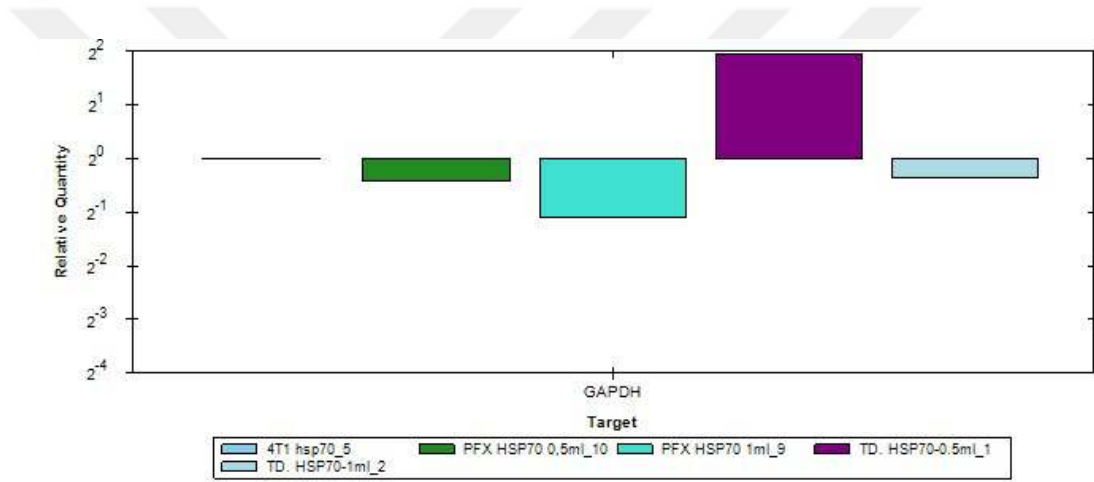
4.3.1. Real-Time PCR

HSP70 mRNA ekspresyon miktar tayini, referans olarak GAPDH transkripti kullanılarak tümör grubuna normalleştirilerek uygulandı. Relative Quantification hesaplama " $\Delta\Delta$ Ct Metodu" kullanılarak yapıldı. Gruplara ait Real-Time PCR HSP70 mRNA ekspresyon miktarları Tablo 4.1'de sunuldu. Çalışma gruplarının HSP70 mRNA ekspresyon rölatif miktarları Şekil 4.50'de gösterildi.

4T1 tümör grubu ile diğer gruplar arasında HSP70 mRNA ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında 0,5 μ g HSP70 tedavi grubunda up-regülasyon görülürken diğer gruplarda down-regülasyon dikkati çekti.

Tablo 4.1 Real-Time PCR HSP70 mRNA ekspresyon miktar tayini

Hedef	Gruplar	Rölatif Miktar	Ortalama Cq
GAPDH	4T1-Tümör	1,00000	31,00
GAPDH	0,5 µg HSP70 profilaksi	0,74392	31,43
GAPDH	1µg HSP70 profilaksi	0,47229	32,08
GAPDH	0,5 µg HSP70 tedavi grubu	3,88347	29,04
GAPDH	1 µg HSP70 tedavi grubu	0,78468	29,04



Şekil 4.50. Çalışma gruplarının HSP70 mRNA ekspresyon rölatif miktarları.

5. TARTIŞMA

Meme kanserleri hem insan hem de hayvanlarda sıklıkla gözlenmekte ve görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır. Tüm tümörlerde olduğu gibi meme tümörlerinde de erken teşhis ve tedavi sağkalım oranını arttırmaktadır. Kanser tedavileri esnasında hastanın dokularında da ciddi hasarlar oluşabilmektedir. Bu sebeple yapılan son çalışmalarda, tedavi stratejilerinin etkinliğini arttıracak ve hastaya yan etkisi düşük yeni moleküller araştırılmaktadır. Bu hem tedavi hem de hastanın tedavi sonrası dönemde normal hayata dönüş periyodunun kısaltılmasında büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, kanser tedavisinde rekombinant heat shock-70 (HSP70) proteininin ekspresyonunun azaltılması, umut verici bir yaklaşım olarak dikkat çekmektedir. Heat shock proteinleri, hücrelerin stres koşullarına yanıt verme yeteneklerini artırarak hayatta kalmalarını sağlar ve azalmaları kanser hücrelerinin tahrip edilmesinde kritik rol oynar. Bunun dışında HSP70'in, bağışıklık sistemini uyarak ve tümör hücrelerinin antijen sunumunu arttırarak, anti-tümöral yanıtı güçlendirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, rekombinant HSP70 ile immunizasyonun meme kanseri modelinde moleküler yöntemlerle incelenmesi, tedavinin etkinliğine dair yeni bulgular ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilen bulgular bu tedavi yaklaşımının kanser hücrelerinin çoğalmasını ve metastaz yapma potansiyelini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir. Elde edilen veriler, rekombinant HSP70'in, meme kanseri tedavisinde etkili bir immunoterapötik ajan olarak kullanılabileceğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Hücreler, hücresel devamlılığı destekleyen stres tepkisi proteinlerini aktive ederek stres koşullarına yanıt verir. HSP'ler, çeşitli streslere yanıt olarak sentezlenen oldukça korunmuş stres tepkisi şaperon proteinleridir. Bunlar kriyoprotektif ve diğer kritik sitoprotektif işlevlere sahiptir. HSP'lerin hücreleri zararlı stresten koruma yeteneği, proteinlerde yanlış katlanmayı önleme, proteinlerin yeniden katlanmasını ve renatürasyonunu hızlandırma şaperon aktivitelerine atfedilmiştir (Edkins ve Boshoff, 2021; Zhang ve Bi, 2024). Bununla birlikte, stres toleransının sınırına ulaşıldığında, hücreler organizmaya geri döndürülemez sistemik hasarı önlemek için programlanmış hücre ölümünü (apoptoz veya otofaji) başlatır. HSP'ler ayrıca JNK, AKT ve nükleer

faktör kappa B (NF- κ B) gibi çeşitli sinyalleme kaskadlarının modülasyonu yoluyla proapoptojenik molekülleri inhibe etmede kritik roller oynarlar (Hu ve ark., 2022). Bu nedenle HSP'ler, hücre ölümü ve hayatta kalma arasında hassas bir dengeyi sürdürmenin merkezinde yer alır ve biyolojik sonuçları önemli ölçüde etkiler. HSP'lerin karsinogenezi düzenlemede ortaya çıkan rolüne ilişkin çalışmalar, bunların önemini basit tanısal biyobelirteçlerden kanser tedavisindeki merkezi hedeflere doğru genişletmiştir (Xiong ve ark., 2020; Yang ve ark., 2021; Javid ve ark., 2022; Hu ve ark., 2024).

Değişik çalışmalar, HSP'lerin tümörlerde karsinogenez mekanizmalarının farklı basamaklarında çeşitli rolleri olduğunu ortaya koymuştur (Cyran ve Zhitkovich, 2022; Kabakov ve Gabai, 2021; Secli ve ark., 2021; Puustinen ve Sistonen, 2020).

Kanser gelişiminde HSP70 önemli roller oynamakla birlikte kanser hücrelerinde anormal derecede yüksek seviyelerde eksprese edilir. HSP70, tümörle ilişkili ekspresyonları ve anti-apoptotik etkileri nedeniyle hayatta kalma faktörleri olarak hareket ederek karsinogenezisi desteklemektedir (Rérole ve ark., 2011). Tümör hücreleri veya tümör stroması ile hücre içi veya hücre dışı lokalizasyonuna bağlı olarak hem tümörü teşvik eden hem de baskılayan yollara aracılık edebildiğinden, tümörün ilerlemesi üzerine farklı etkilere sahiptir. Tümör stromasında HSP70 inhibitör etkileri aynı zamanda tümörü teşvik eden mikro ortamı da ortadan kaldırabildiği için iki ucu keskin bir kılıç gibi davranabilir (Kabakov ve Gabai, 2021). Bu nedenle, HSP70'i ve etkilerini hedeflemek için kullanılan stratejiler öncelikle inhibisyon ve stimülasyon stratejileri dahil olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. İnhibisyon stratejisinde birçok araştırmacı, hücre içi HSP70'in inhibisyonu için uygun yeni bileşikler keşfetmeye yönelik çalışmalar gerçekleştirmektedir. Stimülasyon stratejisinde ise HSP70 bazı aşılarda geliştirilmesi için çaba sarf edilmektedir (Danics ve ark., 2020). Bu çalışma da HSP70'in indüklenebilir formu ile immunizasyon yapılmış ve hem proflaktik hem de teraoptik olarak iyileştire etkileri bulunduğu gözlenmiştir. Ancak 0,5µg tedavi grubunda ekspresyonların 1µg grubuna göre daha fazla olması dozun HSP70'in etkisinin düzenlenmesinde önemli olduğunu göstermiştir

Uyarılmış HSP70 seviyeleri, farklı seviyelerde apoptotik yolu bloke etmektedir. HSP70, kaspaz aktivasyonunu azaltma veya bloke etmekle birlikte mitokondriyal hasarı ve nükleer parçalanmayı baskılamaktadır. Bu bulgular, HSP70'in sitokrom c salınımının aşağısında ve kaspaz-3 aktivasyonunun yukarısında apoptozu inhibe ettiğini ortaya koyan Li ve ark., (2014) tarafından desteklenmiştir. Bu anti-apoptotik etki, apoptozomun HSP70 aracılı modülasyonu ile açıklanmıştır. HSP70'in apoptoz proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) doğrudan bağlandığı böylece prokaspaz-9'un apoptozoma alınmasını önlediği gösterilmiştir. HSP70'in ATPaz alanının bu etkileşim için gerekli olduğu belirlenmiştir (Albakova ve ark.,2020). Bizim çalışmamızda tedavi ve profilaksi gruplarında nekrotik alanların artışı da önceki çalışmaları desteklemiştir.

Tümör hücreleri sıklıkla hipoksik stres, bağışıklık tepkisi, inflamatuvar stres, mikrobiyal uyaranlar ve terapötik stres gibi streslere maruz kalmaktadır. Bu stresler, protein katlanması ve proteostaz ile proteoliz arasındaki denge için gerekli olan HSP'leri indüklemesi sonucunda HSP'ler kanserde anti-apoptotik roller oynarlar (Taha ve ark., 2019). HSP70 üyesi olan HSPA1, HSP90 üyesi olan HSP90B1 gibi HSP'ler anti-apoptotik rollerinin yanı sıra proliferasyon, metastaz ve anjiyogenez süreçlerinde etkinlik göstererek kanser türlerinde malign progresyonu önemli ölçüde etkilemektedirler (Ambrose ve Chapman, 2021; Sanchez-Briñas ve ark., 2023; Wang ve Wang, 2022; Li ve ark., 2024). Yapılan çalışmalarda, HSP60 üyesi olan HSPD1'in, meme kanserinde apoptoz tekrarı içeren protein 5'in (BIRC5) baculoviral inhibitörünü stabilize ederek apoptozu durdurduğu belirlenmiştir (Ghosh ve ark., 2008). HSP70 üyesi olan HSPA8, kolorektal adenokarsinomlarda Ras yollarını düzenleyerek hücre çoğalmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2012). HSP20 üyesi olan CRYAB'ın, mide kanserinde NF-κB yolunu aktive ederek tümör metastazını teşvik ettiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2018). Bu çalışmalar, HSP'lerin hedefli immunoterapötik yaklaşımın kanser tedavisinde büyük bir potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da HSP70 ile immunizasyon sonucunda tümör boyut ve malignitesinde belirgin derecede azalmalar saptanmış bu da HSP70'in meme kanseri gelişim ve malignitesinde önemli bir etkiye sahip olduğu hipotezini desteklemiştir.

HSP70'in ve izoformlarının meme kanserlerinde önemini açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle sitoplazmik HSP70'in prognostik gücünü makrofaj infiltrasyonuna göre karşılaştırdığımızda, sitoplazmik HSP70 pozitif/yüksek makrofaj infiltrasyonu olan grupta nüks ve meme kanserine özgü ölüm riskinin tüm hastalarda ve daha önce bu tedaviyi almış hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Adjuvan kemoterapi, HSP70'in meme kanserinde makrofajların pro-tümörjenik etkisinde önemini ortaya koymaktadır. Makrofaj infiltrasyonunun yalnızca adjuvan kemoterapi alan hastalarda kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle hücre dışı HSP70/makrofaj eksenini tarafından tetiklenen değiştirilmiş TME'nin meme kanserinde kemoterapiye direnci indüklediği düşünülmektedir (Yamaguchi-Tanaka ve ark., 2023). Bu çalışmada tümör mikro çevresi ve makrofajlar incelenmemiş olmakla beraber HSP70'in tümör dokusunda iyileştirici etkileri gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda meme kanseri hücre ortamındaki HSP70'in ko-şaperon görevi görebildiği ve HSP90a ile kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. Bu hücre dışı kompleks, HSP90a'nın matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2)'ye bağlanmasını artırır, bu da karşılığında MMP-2'yi aktive eder ve ardından meme kanseri hücre göçünü ve invazyonunu artırır (Vostakolaei ve ark., 2021).

Kanser gelişimi ve bağışıklık sistemi arasında bir etkileşim olduğu bilinmektedir. HSP70'in de tümör immunitesi üzerinde bazı etkileri ortaya çıkmasına rağmen bu etkileşimdeki rolü ile tümör mikroçevresi ve bağışıklığı üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde HSP70'in bağışıklık baskılayıcı ve aktive edici olmak üzere ikili rolünün büyük ölçüde bu molekülün etkisini uyguladığı bağışıklık hücrelerinin tipine bağlı olduğu bilinmektedir. HSP70'in APC'lerle etkileşimi, NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinlerin uyarılmasına yol açmaktadır. HSP70'in immunojenik doğasının, tümörlerden türetilen antijenik peptitleri (TKD) bağlama yeteneğinden geldiği bilinmektedir. HSP'ler, NK hücrelerinin hücre proliferasyonunu ve tümör hücrelerine karşı sitolitik aktivitesini indükler ve böylece sitotoksik T hücresi yanıtını uyararak tümör büyümesini inhibe etmektedir. Bunun

yanısıra HSP70 yüklü eksozomlar, MDSC'leri aktive ederek IL-6 ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) salgılanmasını artırarak tümör büyümesini desteklemektedir. HSP70 tümör hücrelerinin yüzeyinde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Membranda ve kanser hücresinin dışında açığa çıkan HSP70'in hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık tepkilerini uyardığı bilinmektedir. HSP70-membran pozitif tümör hücrelerinden eksozomlar yoluyla aktif olarak HSP70'in salgılanması, NK hücrelerinin uyarılmasına, IFN- γ üretiminin artmasına ve DC'lerin olgunlaşmasına yol açmaktadır (Vostakolaei ve ark., 2021). Bu çalışmada damar gelişimi açısından CD31 ekspresyonları incelenmiş ve tedavi veya profilaksi uygulamalarının ekspresyonları azalttığı dikkati çekmiştir.

HSP70'in bağışıklık baskılayıcı/aktive edici olarak hareket edebileceği bildirilmektedir. e-HSP70'in rolünün de açıklanması gerekmektedir (Seclı ve ark., 2021). e-HSP70'in uyardığı bağışıklık hücresinin tipine bağlı olarak bağışıklık yanıtın düzenlenmesinde iki yönlü işlevi olduğu bilinmektedir (Kumari ve Choi, 2022). Bu protein NK hücrelerini uyardığında hücre proliferasyonu ve IFN- δ üretimini artırır. Tüm bunlara ilaveten e-HSP70 ayrıca insan monositlerinin yüzeyine de bağlanır, hücre içi kalsiyum akışına yol açar, NF- κ B yolağının aktivasyonunu sağlar, böylelikle IL-1 β , TNF- α ve IL-6 üretimini NF- κ B yolu üzerinden artırır (Annaratone ve ark., 2020; Fico ve Santamaria-Martinez, 2020). Bu nedenle, gelecekteki tümör tedavi keşiflerinin HSP70'in hücre dışı formunu hedefleyen bağışıklık sisteminin bileşenleri üzerinden olacağı düşünülmektedir.

HSP70'in çok işlevli rolü, HSP40 ve HSP90 gibi yardımcı şaperonlar ile olan iş birliği yoluyla belirlenir. Apoptozu, yaşlanmayı, bağışıklık tepkilerini baskılama ve anjiyogenez ile metastazı teşvik etme yeteneği, onu kanser karşıtı tedaviler için ilgi çekici bir hedef haline getirmektedir. HSP70'i hedef alan inhibitörleri geliştirme çabaları umut vericidir, ancak HSP70'in hücre membranı, eksozomlar vb. gibi birden çok yerde bulunan ekspresyonu ve farklı izoformların varlığı dikkate alındığında bunun klinik uygulamaya aktarılması ile ilgili bilgiler çok azdır. HSP70'in kanserdeki işlevlerinin aydınlatılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen hala araştırılması gereken çok fazla noktanın olduğu düşünülmektedir. Örneğin, HSP40'ın

kanserde yüksek düzeyde ekspresyonu ve bunun HSP70 ile sıkı ilişkisi göz önüne alındığında, farklı HSP40 ailesi üyelerinin kanserde oynadığı roller henüz tanımlanmamıştır. HSP70'in farklı moleküler fonksiyonlarının klinik deneme sonuçlarıyla ilişkilendirilmesi sonrasında yapılacak çalışmaların ilerlemesine ve klinik kullanımına yönelik önemli veriler elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Kanser belirteçlerindeki HSP70 fonksiyonlarının daha net aydınlatılması, etkili bir HSP70 bazlı anti-kanser tedavisinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

İmmünizasyon ya da aşılama yoluyla bağışıklığın artırılması başlıca enfeksiyon hastalıklarını önlemeyi amaçlayan bir yöntemdir. Bu yöntem 20. yüzyılın en önemli medikal ilerlemelerinden biri olarak kabul edilir. Aşılamalar sadece bir hastalığı önlemenin ötesinde tedavi edici amaçlarla da kullanılır. Birçok enfeksiyonu tedavi etmek için tasarlanan aşıların, tümör içi uygulamalarıyla ilgili klinik denemelerde umut verici sonuçlar alınmıştır. Tümörler aşılarla tedavi etme fikri, yirminci yüzyılın başlarında öldürülmüş *Streptococcus* ve *Serratia*'ların doğrudan tümör dokularının içine enjeksiyonu ve bunun ardından da tüberküloz aşısının benzer şekilde kullanılması ile başlamıştır. Bu çalışmalar 21. yüzyılda daha da artmış, özellikle büyük tümör kitlelerinin regresyonunu sağlayan ve hayatta kalım süresini uzatan bazı yeni aşı çalışmaları yapılmıştır. Ancak bu klinik denemelerin sınırlı sayıda olmaması ve sonuçlarının değerlendirilmesinde net verilerin elde edilememesi gelişmelerin hızını kesmiştir. Genel olarak düşünüldüğünde kanser tedavileri oldukça uzun süreler gerektiren ve hastaya çok önemli yan etkileri olan uygulamalardır. Bu durumda hastaya zararı çok daha az olan immunoterapilerin çalışmalarında yüz güldürücü prelinik veriler alınmaktadır (Lin ve ark., 2022). Bu tez çalışması, HSP70'in rekombinant olarak üretilmiş indüklenmiş formu ile immünizasyon oluşturularak 4T1 üçlü negatif fare tümör hücreleri ile indüklenen meme kanser modelinde immün sistemin aktive edilerek bu proteini tanıyacağı ve daha güçlü bir immün reaksiyon vereceği fikriyle kurgulanmıştır.

HSP'ler kanser gelişimi ve tedavisinde sıklıkla kullanılan radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi gibi yöntemlere direnç sağlayan proteinler olarak bilinirler. Bu sebeple son yıllarda onkoloji alanında HSP inhibisyonları ile ilgili

tedaviler dikkati çekmektedir. Bu amaçla tümör tedavilerinde HSP'leri hedefleyen aşılama şeklinde ve immün sistemi aktive eden ya da HSP'lerin inhibisyonunu içeren ilaç tedavileri denenmektedir. Günümüzde tümör tedavilerinin altın standartları arasında sayılan kemoterapi ve radyoterapi gibi antikanser tedaviler önemli yan etkilere sahiptir ve bu etkileri azaltmak için adjuvan terapiler düşünülmektedir. HSP'lerin inhibisyonunu hedefleyen az sayıda onaylanmış antikanser ilaç bulunmaktadır. Bunlara en güzel örnek bir HSP70 ekspresyon inhibitörü olan ve böbrek, karaciğer ve tiroid kanserleri gibi kanser türlerini tedavi etmek için onaylanan sorafenibtir. Sorafenib özellikle solid özellikteki tümörlerde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Sorafenib hücrelerde tirozin kinazı inhibe ederek ve hücrede apoptozisi tetikleyerek etkisini gösterir. Bu ilacın aynı zamanda HSP70'in gen ekspresyonunu da inhibe ettiği tespit edilmiştir (Llovet ve ark., 2008). Bu sebeple bu çalışmada indüklenmiş tümör tedavisinde immunizasyon için HSP70 seçilmiş ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

HSP70'in işlevini düzenleyen birçok kanser ilacı adayının prelinik laboratuvar çalışmaları yapılmış ve bazılarının klinik denemeleri de tamamlanmış ancak günümüze kadar onaylanmış genel bir HSP inhibitörü piyasaya sunulamamıştır. Tüm bu sebeplerden dolayı HSP ile ilgili veya HSP'leri doğrudan hedefleyen ilaç veya tedavi yöntemleri önemli bir şekilde değerlendirilmektedir. Bugüne kadar HSP'lerle ilgili geliştirmiş ilaçlar genel olarak hücresel veya humoral bağışıklık sistemini uyarma şeklinde etkilerini gösterirler (Yun ve ark., 2019). HSP70 hücrelerde, tüm protein içeriğinin yaklaşık %5-10'unu oluşturur ve proteostazı devam ettirmek amacıyla bir ağ gibi çalışırlar. Normal dışı aşırı durumlarda, strese cevap olarak ilk önce HSF'ler (heat shock faktör) aktive olur ve bu HSF'ler stres yanıtını en aza indirmek için aşırı miktarda HSP70 oluşumunu uyarırlar. Substrat protein katlama işlevlerine ilave olarak hücre içi iletimi, hücre döngüsünü ve apoptotik aktiviteyi düzenlemede ciddi görevler alırlar. Bu nedenle, HSP'lerin aşırı reaksiyonları kanser oluşumunu tetikler (Hu ve ark., 2020; Hu ve ark., 2022). Çalışmanın kurgulanması sırasında HSP70'in seçilmesine tüm bu verilerin değerlendirilmesi sonucunda karar verilmiştir. Çalışmanın sonuçları HSP70'in meme kanserinde önemli iyileştirici etkileri bulunduğunu göstermiştir.

HSP'ler ile bunların tümörlerdeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmesinin temel nedeninin HSP'lerin formlarından ileri geldiği bildirilmektedir. HSP'ler canlı organizma türleri arasında büyük oranda korunmuş proteinler olarak bilinirler. Birçok canlıda yapısal olarak benzer ancak işlev olarak farklı HSP'ler bulunmaktadır. Hatta bir hücrenin değişik organel veya bölümlerinde (ör. sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum) bile farklı formlarda bulunabilmektedirler. Hücrede bazı HSP'ler sürekli (constitutive) izoformlar olarak bazıları ise indüklenebilir (indüktif) izoformlar şeklinde bulunur (Tutar ve ark., 2010). Canlılarda hücreler sürekli değişen koşullara maruz kalırlar. Hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmesi ve bütünlüğünü koruyabilmesi için hücresel proteinlerin homeostazlarının korunması gereklidir. Çünkü, stres altındaki hücrelerde proteinler yanlış katlanabilir ve agregate olabilirler. Hücrelerin önemli bileşenleri olan protein yapılarında bozulmaların sebep olduğu durumlar çok çeşitli hasar ve hastalıklara yol açabilmektedir. Hem prokaryot hem de ökaryotlardaki korunmuş HSP'ler proteostazları içeren büyük bir protein ailesine aittir. Bu nedenle, yeni sentezlenen proteinlerin katlanmaları, yarı-kararlı proteinlerin yeniden katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması, protein agregatlarının çözülmesi, membran boyunca protein translokasyonu, hücre iskeletinin korunması, yeniden yapılandırılması ve immun sistem dahil olmak üzere çok sayıda hücre fonksiyonunda görev alırlar (Tutar ve ark., 2014). HSP ifadesi; ilaçlar, sıcaklık, enfeksiyonlar, ateş, yangısal reaksiyonlar, kanserler, iskemi, oksidatif stres, büyüme faktörleri veya hormonlar nedeniyle indüklenir ve bu durum hücrelerde indüklenmiş HSP'lerin ekspresyonlarının artmasına sebep olur. Bu nedenle, çok sayıda hastalığın HSP'lerle ilişkili olduğu bilinmektedir ve bu nedenlerle HSP'ler hem tedavi hem de immunizasyon için hedef proteinlerdir (Tutar ve ark., 2022). Bu çalışmada HSP70'in indüktif formu immunizasyon amacıyla kullanılmış ve tümör hücrelerindeki proliferasyonların belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır.

HSP proteinleri benzer şekilde çok sayıda türde korunmuştur ve değişik HSP'ler koşaperonlarla etkileşime girerek farklı fonksiyonları oluşturabilir. Deneysel çalışmalar, farklı türlerde HSP'lerin sürekli ve indüklenebilir formları ile ünite değişimleri yapıldığında bu izoformların değişik proteinler ile etkileşime

girebileceğini göstermiştir (Tutar ve ark., 2006). Bu çalışmada 4T1 üçlü negatif fare meme tümörü hücreleriyle deneysel olarak oluşturulan meme kanseri modelinde HSP70 immunizasyonu ile hem profilaktik hem de terapötik amaçlarla kullanım açısından önemli sonuçlar alınmıştır. Çalışmanın sonuçları muhtemelen insanlarda da bu uygulamaların önemli iyileştirici etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmalar HSP'lerle bunların antikorlarının serumdaki düzeylerinin birçok kanserde çok fazla artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sebeple HSP'ler kanserlerin tiplerinin ve devreleri ile malignitelerinin değerlendirilmesinde mükemmel biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir. HSP'lerin, kanser hücrelerinin proliferasyon, farklılaşma, invazyon ve metastaz olaylarına doğrudan katılabildikleri bilinmektedir (Calderwood ve ark., 2006; Calderwood ve ark., 2010). Bu çalışmanın sonuçları HSP70'in hem tümör gelişiminin engellenmesinde hem de tümörlerde terapötik etkinliğin değerlendirilmesiyle bu proteinin bundan sonra yapılacak çalışmalar için önemli bir hedef olabileceğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda tümörlü hastalardan alınan tümör dokularından proteinlerin ayrılması ve bu proteinlerin tekrar hastalara uygulanması suretiyle immun sistemin bu proteinleri tanınması ve reaksiyon vermesi sonucunda tümörlerde gerileme elde edilmesiyle ilgili yaklaşımlar geliştirilmektedir. HSP'ler bu konuda kullanılan önemli proteinlerdir. HSP temelli aşılar genellikle kanserli hastaların rezeke edilmiş kendi tümörlerinden elde edilmiştir. Bu hastaya özel olarak hazırlanan aşılardan çok önemli avantajları vardır. Bunlardan en önemlisi bu aşılar kanserdeki peptitlerinin büyük bir kısmını içerirler. Böyle aşılama metotları, çok yararlı olmakla birlikte, birçok dezavantajı da mevcuttur. Bu aşılar içinde en çok bilinen vitespen isimli aşıdır. Bu aşı ile yapılan çalışmalar vitespen benzeri otolog aşılar minimum 4 enjeksiyon yapılması gerektiğini göstermiştir (Testori ve ark., 2008). Aslında saflaştırılmış HSP'lerle yapılan otolog aşılardan uygulanması basit ve avantajlı bir yaklaşım olmakla birlikte aşının hazırlanma işlemlerinin pahalı ve zaman alıcı olması ve en önemlisi her hastada aşı yapmak için yeterli dokunun bulunamaması gibi oldukça önemli bazı dezavantajları da vardır. HSP'lerin uyandırdığı savunma hücreleri, sadece köken aldığı tümöral hücreleri değil, ayrıca genotipik yapıları farklı ancak birbirine benzer tümör

antijenleri bulunan farklı tümöral hücreleri de yok etme yeteneğine sahip olabilir. Bu sebeple, rekombinant olarak üretilen HSP70'in, rezeke tümör dokusunun kişisel aşı üretimi için yeterli olmadığı klinik olgularda kullanılabileceği ve etkili olabileceği fikriyle bu çalışma planlanmıştır. Ayrıca bu üretilen aşılardan profilaktik amaçla kullanılabilecek birer aşı olabileceği de düşünülmektedir. Çünkü bu immunoterapi uygulamalarının tümör dokusu küçük veya az olan ya da bu işlem için hiç tümör örneği alınamayan hastalar için de etkili olabileceği düşünülmektedir. Profilaktik yaklaşımlar özellikle meme kanserleri açısından önemlidir. Son zamanlarda kadınların çoğu meme kanseri bilincinin artmasına bağlı olarak yıllık kanser taramalarını yaptırmaktadırlar (Mascara ve Constantinou 2021). Bu taramaların bazılarında henüz kanserin erken evrelerinde olan ya da uyuyan kanser olarak nitelendirilen karsinoma *in situ* vakalarında da bu uygulamaların etkili sonuçlar verebileceği ve bazı olgularda cerrahi uygulamaya gerek kalmadan küçük kitlelerin immun sistem aktivasyonu ile yok edilebileceği fikri oluşmaktadır.

Deney modeli olarak memeli hayvanlar arasında kemirgenler, özellikle fare ve sıçanlar, anatomik, fizyolojik ve genetik açıdan insanlara benzerlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Zeng ve ark., 2020). Deneysel yolla oluşturulan hayvan modellerinden 4T1 hücre hattı, meme kanseri araştırmalarında BALB/c farelerde en çok kullanılan TNBC hücre modellerinden biridir (Moore ve ark., 2022). 4T1 hücre hattı meme tümörü modeli bir allograft transplantasyon modelidir (Moore ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2023). 4T1 hücre hattının spesifik özellikleri arasında epitelyal fenotip, güçlü invazivlik ve yüksek metastatik potansiyel yer almaktadır. ER, PR ve HER2 ekspresyonları bakımından negatiftir. 4T1 hücre hattı, çok zayıf immunojeniteye ve çok düşük oranda tümöre sızan bağışıklık hücrelerine sahiptir. Tüm bu özellikler de 4T1 hücre hattı modelini insan TNBC için uygun bir deneysel model haline getirmektedir (Moore ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2023). 4T1 meme tümörü modeli, özellikle hem primer tümörleri hem de metastazı olan hastalar için anti-kanser tedavilerinin test edilmesi ve doğrulanması açısından oldukça önemlidir. Bu modeller, TNBC tümör gelişimi mekanizması ve tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesinde kısa sürede önemli veriler sağlar (Zhou ve ark., 2023). Bu tez çalışmasında da meme tümörü fare modeli olarak 4T1 hücre hattı kullanılarak kanser

progresyonunu anlamada ve tedaviye yönelik strateji geliştirmede önemli bir katkı sağlanmıştır.

Tümörün proliferasyon potansiyelini belirleyen biyobelirteçler arasında hücre döngüsünü düzenleyerek tümör gelişimini etkileyen Ki-67 ve PCNA yer almaktadır. Tümörün proliferasyon potansiyelinin tahmini, tümör malignitesini ve lokal veya uzak metastaz eğilimini belirlemek için prognostik belirteçlerdir. Ki-67, hücre döngüsü ilerlemesi ve kısa yarı ömür ile birlikte, tümör hücresi büyümesini değerlendirmek için önemli ve etkili bir biyobelirteçtir. Ki-67, meme kanserinde bağımsız bir öngörücü ve prognoz faktörü olarak doğrulanmıştır (Tarighati ve ark., 2023). Ki-67 ekspresyonu, büyük tümör boyutu, meme bezinde inflamasyon ve ülserasyon, çevre dokulara invazyon ve lenf düğümlerine metastaz gibi klinik ve histopatolojik özellikleri kötü olan tümörlerde en yüksektir (Jabbarzadeh ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarda, IHC boyama yöntemi ile meme tümöründe Ki-67'nin seviyeleri belirlenmiş ve iyi huylu meme tümörlerinde malign olanlara göre önemli ölçüde daha düşük ekspresyon sergilediğı ve yüksek metastaz değeri, kötü prognoz ve kötü sağkalım ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Jabbarzadeh ve ark., 2021; Mohamed ve ark., 2020; Soares ve ark., 2022). Ayrıca, çalışmalarda, Ki-67 ifadesi ile meme yoğunluğu ve prekanseröz lezyonlar arasında pozitif korelasyonlar da tanımlanmıştır (Harvey ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2009). Başka bir çalışma, lenf düğümlerine metastazlarda ölçülen Ki-67'nin ekspresyon seviyesinin, tümör dokusundaki ekspresyonu ile pozitif bir korelasyona sahip olduğunu göstermiştir (Zhou ve ark., 2009).

DCIS'de tümörlerin yaklaşık %40'ında Ki-67 ekspresyonunda artış vardır. Ki-67 ekspresyonundaki artış daha ileri evre lezyonlar, nekroz ve daha az invazivlik ile ilişkilidir. Bu nedenle, Ki-67, DCIS'de nüksün önemli bir öngörücüsü gibi görünmektedir (Smolarz ve ark., 2022; Tarighati ve ark., 2023). Pan ve arkadaşları (2017) çalışmalarında, p53 ve Ki-67 proteinlerinin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinin, prognozu ve agresif yapısı nedeniyle TNBC'yi farklı alt gruplara ayırabileceğini belirtmişlerdir. Yüksek p53 veya Ki-67'ye sahip veya ailede kanser öyküsü olan TNBC hastaları, daha kötü bir prognoz sahiptir (Pan ve ark., 2017). Meme kanseri için uygun tedaviyi belirlemede proliferatif belirteçlerin, özellikle Ki-67'nin

kullanılması önerilmektedir (Tarighati ve ark., 2023; Yerushalmi ve ark., 2010). Bu çalışmada Ki-67'nin IHC skorları değerlendirildiğinde, 4T1 tümör grubunda şiddetli ekspresyon görülürken, 0,5 µg ve 1 µg HSP70 profilaksi ile 0,5 µg ve 1 µg HSP70 tedavi gruplarında azalmış ekspresyon dikkati çekmiş ve bu bulgu literatür ile uyum göstermiştir.

Tümör dokusunun büyümesi ve metastazında, anjiyogenezin kritik rolü bilinmektedir. Tümör anjiyogenezisi, önceden var olan damarlardan yeni kan damarı oluşumunu destekleyen bir süreçtir. Yeni kan damarlarının filizlenmesi, tümör hücrelerine yalnızca besin ve oksijen sağlamakla kalmaz, aynı zamanda tümör hücresi yayılmasına ve distal metastaz oluşturmaya yardımcı olan bir yol oluşturur. Anjiyogenezin düzenlenmesi yalnızca tümör hücreleri aracılığıyla değil, aynı zamanda tümör hücreleri ve TME arasındaki etkileşimler aracılığıyla da düzenlenir (Shiau ve ark., 2021). Tümör dokusundaki anjiyogenezi değerlendirmek için IHC analizlerinde sıklıkla CD-31, VEGF ve bFGF belirteçleri kullanılır. Bu belirteçlerin ekspresyonlarının, tümör hacminin 100 mm²'den az olduğu erken dönemde artmaya başladığı dikkati çekmiştir. Ayrıca, CD-31'in IHC sonuçları, erken aşamada artan, ileri aşamada keskin bir şekilde yükselen ve daha sonra orta derecede yükselen VEGF'ye kıyasla ekspresyonunun tutarlı bir formda yükseldiği gösterilmiştir (Koni ve ark., 2022). Bu çalışmada neovaskülarizasyon değerlendirilmesinde CD31 kullanılmış ve profilaktik veya terapötik uygulamaların bu ekspresyonları azalttığını göstermiştir.

Yapılan çalışmada, insan meme karsinomlarında CD-31 ekspresyonunun artması, azalmış sağ kalım oranı ile ilişkilendirilmiştir (Debnath ve Lilly, 2021). Bir başka çalışmada, CD-31'in IHC boyamasında, TNBC hastalarının mikrodamar yoğunluğunun TNBC olmayan hastalara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Li ve ark., (2024), tümör gelişimi ve proliferasyonunda oldukça önemli olan anjiyogenezin rolünü doğrulamak için VEGF-A ile birlikte CD-31 ekspresyonunun IHC boyama yöntemi ile değerlendirilmesinin önemini vurgulamıştır.

Malekian ve ark., (2020) yaptıkları çalışma ile CD-31 ve bFGF gibi anjiyogenez faktörlerinin tümörün çok erken evresinde ekspresyon sergilemeye

başladığını ve daha ileri evrelerinde ise arttığını bildirmişlerdir. Bu da anjiyogenezin TNBC'nin çok erken evrelerinde başladığını düşündürmektedir.

Genetik olarak modifiye edilmiş bir meme tümörü modeli çalışmasında, daha fazla vaskülarizasyon ve mikrovasküler yapı oluşumu gösteren tümör grubunun CD-31 ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Ayrıca, tümör grubunda, kontrol grubuna kıyasla, proliferasyon belirteci Ki-67'yi eksprese eden hücrelerin oranının da daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir. CD-31 ve Ki-67 için IHC sonuçları ayrıca tedavi grubundaki tümörlerin vaskülarizasyon ve proliferasyon derecesinin azaldığını göstermiştir (Hsu ve ark., 2021).

Bu çalışmada tümör dokuları içindeki mikrovasküler oluşumu değerlendirmek için CD-31 immunohistokimyasal skoru kullanıldı. CD-31'in IHC skorları değerlendirildiğinde, 4T1 tümör grubunda belirgin ekspresyonlar gözlenirken, 0,5 µg ve 1 µg HSP70 profeksi ile 0,5 µg ve 1 µg HSP70 tedavi gruplarında azalmış ekspresyonlar dikkati çekti. Sonuçlar, 4T1 tümör hücrelerinin onkolojide de en bilinen anjiyogenez faktörlerinden CD-31'i belirgin şekilde ekspre ettiğini gösterdi.

PCNA ekspresyon düzeyi sıklıkla meme kanseri vakalarında prognostik biyobelirteç olarak değerlendirilir (Kandefer-Gola ve ark., 2016). IHC boyamasında PCNA ekspresyonu ayrıca tümör boyutu, tümör histolojik tipi, farklılaşma derecesi, nükleer derece, mitotik indeks, histolojik malignite derecesi ve lenf nodu metastazı ile pozitif bir korelasyona sahiptir (Bedeer ve ark., 2020). Ek olarak, Ki-67'ye benzer şekilde, daha fazla malignite gösteren, büyük tümör boyutuna sahip, deri ülserasyonlu, histolojik evre II/III ve bölgesel lenf nodu metastazı bulunan tümörlerde ekspresyon daha fazladır (Tarighati ve ark., 2023).

Bununla birlikte, PCNA ekspresyonunun, DNA sentezini indüklemeyen sitokinler tarafından uyarılabileceğine ayrıca PCNA'nın DNA onarımı ile ilişkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, ekspresyonu hücre döngüsü ile sınırlı olduğundan, PCNA'nın ekspresyonunun diğer biyobelirteçlerle, özellikle Ki-67 ile kombinasyon halinde değerlendirilmesi önerilir. PCNA'nın bir belirteç olarak

dezavantajı, proliferasyona özgü olmaması ve aynı zamanda DNA onarımında da yer almasıdır (Cardano ve ark., 2020).

Bir çalışmada, PCNA ekspresyonunun analizi neoplastik olmayan, komşu dokularda da doğrulanmıştır, bu da histolojik olarak doğrulanmış olan erken mikrometastazların ve daha yüksek tümör agresifliğinin varlığını düşündürür. Bu nedenle, PCNA'nın yüksek ekspresyonu, kötü prognoz ve azalmış sağkalım ile ilişkilidir (Bedeer ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında, 4T1 tümör grubunda PCNA'nın şiddetli ekspresyon sergilemesine karşın, 0,5 µg HSP70 profilaksi grubunda belirgin ve 1 µg HSP70 profilaksi ile 0,5 µg ve 1 µg HSP70 tedavi gruplarında ise azalmış ekspresyon sergilediği dikkati çekti.

HSP70 ailesinin bazı üyeleri kanser hücrelerinde bol miktarda bulunmaktadır. HSP70'in kanser gelişimdeki daha önce bahsedilen tümör bağışıklığı, apoptoz, metastaz ile ilgili rollerinden dolayı tümörün hayatta kalması ve büyümesi HSP70 ekspresyonuyla sıkı bir şekilde ilişkilendirir. HSP 70'in farklı tipte meme kanseri hücrelerinde aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. Bu ifadelere sıklıkla artmış hücre çoğalması, lenf nodu metastazı, kemoterapiye zayıf yanıt ve zayıf sağ kalım eşlik eder (Roudbari ve ark., 2023). Bir çalışmada, 4T1 ve MDA-MB-231 gibi TNBC modellerinde HSP70'in membran ekspresyon skoru değerlendirilmiş ve oldukça agresif her iki tümör hücre tipinde de güçlü bir HSP70 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Çok sayıda çalışma, HSP70 seviyesindeki değişikliklerin çeşitli kanserlerle ilişkili olduğunu, dolayısıyla bu proteinin yeni bir potansiyel kanser biyobelirteci olabileceğini göstermiştir (Roudbari ve ark., 2023; Vostakolaei ve ark., 2021). HSP70'in aşırı ekspresyonu metastazı güçlü bir şekilde teşvik eder. HSP70'in onkogeneze yer alan sinyal yollarının önlenmesindeki yeteneği nedeniyle, bunun inhibisyonu meme kanseri tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir (Roudbari ve ark., 2023).

Bu tez çalışmasında, 4T1 tümör grubunda HSP70 belirgin ekspresyon sergilerken, 0,5 µg ve 1 µg HSP70 profilaksi ile 0,5 µg ve 1 µg HSP70 tedavi gruplarında azalmış ekspresyon sergilediği gözlemlendi. Buna göre HSP70 ile immunizasyonun meme tümörlerinin gelişim ve malignitesi üzerinde önemli ölçüde iyileştirici etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Son yıllarda, HSP tabanlı immunoloji alanında birçok önemli ilerleme kaydedilmiştir. Örneğin, Li ve arkadaşları (2014), HSP27 ve HSP90'ın genellikle miyelom hücrelerinde aşırı eksprese edildiğini ve doğal olarak MHC I molekülleri bağlamında eksprese edildiğini gösterdi. İlginç bir şekilde, HSP27 ve HSP90'a özgü peptitleri hedef alan sitotoksik T lenfositleri, miyelom ksenograft fare modelinde tümör büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır ve bu da HSP'lerin miyelom immunoterapisi için yeni tümör antijenleri olabileceğini doğrulamıştır (Li ve ark., 2014). Benzer şekilde, HSP70 genellikle kanser hücrelerinde güçlü ekprese edilir ve membran HSP70 (m-HSP70) fenotipi, artan invazyon, metastaz ve hücre ölümüne karşı direnç ile karakterize edilen oldukça agresif kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir araştırma, T hücreleri yerine NK hücrelerinin m-HSP70 pozitif kanser hücrelerini öldürebileceğini ortaya koymuştur (Bashiri Dezfouli ve ark., 2022). Ayrıca, Shevtsov ve ark., (2019) NK hücrelerinin doğal olarak oluşan HSP70 peptidi ve tümörlerin klinik öncesi modellerinde IL-2 tarafından aktive edildiğinde, NK hücrelerinin akciğer kanseri ve glioblastoma ile savaşma yeteneğinin arttığını göstermiştir (Shevtsov ve ark., 2019).

Kanser tedavisi için antijen-spesifik aktif immunoterapilere ek olarak, HSP'lere dayalı birçok aşı da geliştirilmiştir. HSP'ler, glioblastoma, melanom, kolorektal ve pankreas kanserleri dahil olmak üzere çok çeşitli kanserlerde bağışıklığı uyarmak için kullanılmıştır ve klinik sonuçlar cesaret vericidir. HSP'ler, tümörle ilişkili antijenleri etkili bir şekilde yakalamak ve kararlı HSP-antijen kompleksleri oluşturmak için benzersiz mikro alanlarını kullanabilirler. Bir bağışıklık uyarıcısı olarak mekanizmasına ilişkin çalışmalara dayanarak, HSP aşılmasının, antitümör bağışıklık tepkilerini artırma avantajına sahip etkili bir strateji olduğu varsayılmaktadır. Örneğin, HSP'lerden esinlenerek kendi kendini birleştiren bir

nanochaperone (nChap), yeni bir nano aşı olarak geliştirilmiştir ve etkili bir kanser immünoterapisine dönüşmesi beklenmektedir. Birkaç çalışma, otolog HSP tabanlı antitümör aşı komplekslerinin kanser hastalarının bağışıklık tepkisinde potansiyelini bildirmiştir. Bir çalışmada, faz I ve II klinik denemeleri, tekrarlayan glioblastoma hastalarında HSP peptit kompleksi-96 aşısının etkinliğini incelenmiştir. Benzer şekilde, değişik çalışmalar tümör spesifik HSP90'dan üretilen otolog bir kanser aşısı olan Vitespen'in melanom ve böbrek kanserinde faz III klinik çalışmalarda ümit verici sonuçlar gösterdiğini ortaya koymuştur (Bloch ve ark., 2014; Testori ve ark., 2008; Wood ve ark., 2008; Yang ve ark., 2021).

HSP molekülleri, kanser veya bulaşıcı hastalıklara karşı antijen veya adjuvan olarak DNA tabanlı aşılarda da kullanılmıştır. Örneğin, HerpV, rekombinant insan HSP70 proteini ile kovalent olmayan bir şekilde komplekslenmiş 32 sentetik HSV-2 peptidi içeren bir aşıdır ve güvenliği ve iyi toleransı doğrulanmıştır (Choi ve ark., 2011). Bu, HSV-2 antijenlerine karşı CD4+ ve CD8+ T hücresi bağışıklık tepkilerini önemli ölçüde ortaya çıkaran ilk HSP tabanlı aşıdır. Ayrıca, Choi ve ark., (2011) antijen sunumunu ve tümör baskılayıcı etkinliği artırmak için insan HSP70 genine kaynaştırılmış Muc1 genini (Δ TM) kodlayan bir kimerik Mucin 1 (Muc1) aşısı tasarlamışlardır. Kimerik Muc1 aşısıyla aşılanan farelerin antijen-spesifik lenfosit çoğalmasını ve sitotoksik tepkileri etkili bir şekilde indükleyebildiği gözlemlenmiştir. Özellikle, C57BL/6 farelerinde insan Muc1'i ifade eden B16 melanom hücrelerinin büyümesi Muc1-HSP70 kimerik DNA aşısı tarafından önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir (Wald ve ark., 2011; Choi ve ark., 2011). Ek olarak, HSP tabanlı immünoterapinin diğer antikanser tedavileriyle birleştirilmesinin antikanser etkilerini arttırmak için umut verici bir yaklaşım olduğu da doğrulanmıştır. Örneğin, Rao ve arkadaşları, 17-DMAG'ın (HSP90 inhibitörü), HSP90 istemci proteini EphA2'yi hedef alan aşılarla bir bağışıklık adjuvanı olduğunu, tümör mikro çevresini yeniden şekillendirebileceğini ve hastaların bağışıklık tepkilerini güçlendirebileceğini tespit etmişlerdir. 17-DMAG ve HSP90 istemci proteini EphA2'ye karşı antikorun kombinasyonu, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler ve T-reg hücreleri gibi bağışıklık baskılayıcı hücre popülasyonlarını önemli ölçüde azalttığı

ve ayrıca Tip-1T efektör hücrelerini uyararak CD8 + T hücrelerinin tümör hücrelerini tanıma yeteneğini artırdığı bildirilmiştir (Rao ve ark., 2012).

Ayrıca, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin HSP tabanlı antijen spesifik immunoterapi ile kombinasyonunun özellikle yararlı olabileceği ve T-reg hücre yanıtlarının uyarılmasına yol açabileceği ortaya konmuştur (Duraiswamy ve ark., 2013). Başka bir yaklaşımda, rekombinant HSP'ler, fare melanomuna karşı antikanser etkileri üretmek için manyetit katyonik lipozomlar (MCL'ler) kullanılarak hipertermiyle birleştirilmiş ve rekombinant HSP70 proteininin tümöre uygulanmasının, hipertermi ile indüklenen antitümör bağışıklığını güçlendirdiği bildirilmiştir (Ito ve ark., 2004).

Orijinal olarak *Tripterygium wilfordii*'den izole edilen Triptolid ve suda çözünür ön ilaç türevi minnelid'in, mikroRNA miR-142-3p'nin 3'e bağlanmasını indükleyerek pankreas kanseri, nöroblastoma, mezotelyoma, osteosarkom ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda HSP70 ekspresyonunu inhibe ettiği ve ayrıca 5'UTR ve *HSP70* mRNA seviyesinin aşağı regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle minnelid dirençli pankreas kanserinin tedavisi için faz II klinik denemesine girmiştir. Quercetin ve demethoxycurcumin'in ayrıca sırasıyla meme ve prostat kanseri hücrelerinde HSP70'i inhibe ettiği de gösterilmiştir (Nakajima ve ark., 2020).

Kanser hastalarının tedavisinde daha da erişilebilir hale getirilmek üzere klinik deneylerin tüm aşamalarını geçebilecek güvenli ve etkili bir ilacın geliştirilmesinde büyük bir zorluk bulunmaktadır. Bu bağlamda, HSP70'in *in vitro* ve *in vivo* etkili olduğu gösterilmiştir, ancak HSP70 bazlı tedavilerin kanserdeki başarısı yalnızca bunların klinik deneylerde etkinliği ve güvenliği değerlendirilerek doğrulanabilir. Bu bağlamda, HSP70 bazlı tedavilerin hastalar arasında iyi tolere edildiğinin gösterilmesi cesaret vericidir (Kumar ve ark.,2016).

Onkogenik HSP'ler, anormal protein sinyalizasyonu ile ilişkili birçok hastalık için tanı ve prognozda potansiyel terapötik hedefler ve klinik biyobelirteçler olarak kabul edilmiştir. Şimdiye kadar, HSP'ler ilaç keşfi açısından kapsamlı bir şekilde

araştırılmış olup özellikle son yirmi yılda çalışmalarda çok ilgi görmüşlerdir. HSP70, gp96 ve HSP27 dahil olmak üzere HSP'ler, kanser gibi hastalıkları tedavi etmek için aşılarda veya oligonükleotidlerde incelenmektedir.

Bu bilgiler ışığında, kanser immunoterapisinde tanımlanan en önemli 10 zorluktan biri, tümör bağışıklığının baskın faktörlerini belirlemektir. Bu bağlamda, HSP70'in farklı kanser türlerinde ve tümör immunolojisinde klinik olarak önemli olduğu gösterilmiştir, ancak tümör immunitisini yönlendirmedeki rolünü belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Hu ve ark., 2022; Yang ve ark., 2021).

HSP70 ailesinin bazı üyelerinin kanser hücrelerinde bol miktarda bulunduğu ve kötü prognozla ilişkili olan apoptozis sinyallemesini azaltarak ve metastazı teşvik ederek kötü huylu hücrelere seçici avantajlar sağladığı, böylece onları potansiyel ilaç hedefleri haline getirdiği bilinmektedir. Örneğin, genetik çalışmalar, HSP70'in tümör proliferasyonu ve metastazında kritik roller oynadığını ve bunun tümör baskılama yollarının aşağı düzenlenmesini içerebileceğini güçlü bir şekilde ileri sürmektedir. HSP70 dahil olmak üzere diğer HSP'ler de kanserleri tedavi etmek için aşılarda iyi bir şekilde araştırılmaktadır. HSP70'in kansere bu doğrudan katılımı, tümörün hayatta kalımı ve büyümesini HSP70 ekspresyonu ile sıkı bir şekilde ilişkilendirir. HSP70'ler yalnızca çeşitli apoptozis indükleyen yolları engellemekle kalmaz, aynı zamanda ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşumunu da engeller (Vostakolaei ve., 2021). Dahası, çalışmalar HSP70'in lizozomal membranları stabilize ederek tümör hücrelerinin hücre ölümünden kaçmasını sağladığını göstermiştir. Daha ileri araştırmalar, HSP70 inaktivasyonunun farklı kanser hücre hatlarında (örneğin meme kanseri) tümör invazivliğini ve metastatik potansiyelini azalttığını ortaya koymuştur. Bu araştırmalar, kanser tedavisi için HSP70 aktivitesini inhibe etmek amacıyla ilaç geliştirme için yeni ipuçları verebileceğini göstermiştir (Albakova ve ark.,2020; Kabakov ve Gabai, 202; Vostakolaei ve ark., 2021). Bizim çalışmamızın bulguları da önceki çalışmaları desteklemiş ve HSP70'in gerek tümör gelişimi ve gerekse malignitesinin azaltılmasında hedef belirteçlerden biri olabileceği fikrini desteklemiştir.

HSP'ler kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinden, son yıllarda kanser kaynaklı HSP'lerin immunoterapi için terapötik hedefler olarak potansiyeli giderek daha fazla takdir edilmektedir.

Tedavi yaklaşımı olarak HSP70 fonksiyonel döngüsünü hedef alan ve adenoazin türevi HSP70 inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik girişimlerde bulunulmuştur. HSP70'in ADP'ye bağlı durumda kalması ile anti-kanser ilaçlarının gelecekteki gelişmeleri için umut verici strateji olduğu belirlenmiştir (Chatterjee ve Burns, 2017).

Birden fazla HSP70 izoformunu hedefleyebilen ATPase inhibitörlerinin *in vitro* ve *in vivo* etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu strateji ile birden fazla HSP70 izoformunun aşırı ekspresyonu olan kanser türleri hedeflenmiştir. Bununla birlikte, "herkese uyan tek çözüm" yaklaşımı, belirli kanser türüne dahil olan farklı HSP70 ailesi üyeleri için işe yaramayabilir; bu gibi durumlarda, gelecekteki gelişmeler için izoforma özgü inhibitörlerin dikkate alınması önemlidir. Bu nedenle, HSP70 fonksiyonel döngüsünün, konformasyonel değişiklikler ve iki alanı arasındaki etkileşim, HSP70 oynadığı koşaperonların rolleri ve ayrıca HSP70 izoformlarının farklı kanser türlerindeki rolleri dahil olmak üzere daha iyi anlaşılması, gelecekteki etkin tedavi tasarımı için kritik öneme sahiptir (Kumar ve ark., 2016; Nakajima ve ark., 2020; Alberti ve ark., 2022).

Tümör kaynaklı HSP70 ile otolog aşılama, bağışıklık sistemini aktive eder, APC'lerin tümör antijenlerini hücre yüzeylerine sunmalarına izin verir ve doğrudan CTL tepkisini uyarır. Böylece kanserli hastaların hayatta kalma süresini artırır (Chatterjee ve Burns, 2017).

Primer tümörün günlük hacim ve canlı ağırlık analizi, ilaç uygulamalarının etkinliğinin değerlendirilmesinde en sık izlenilen yöntemlerden biridir. Bu yöntem tedaviye bağlı olarak günlere göre canlı ağırlık kaybı ve tümöral büyümedeki değişimlerin izlenme sürecini içerir (Yang ve ark.,2021). Bu tez çalışmasında primer tümörün günlük hacim ve canlı ağırlık analizinde tümör implantasyonunun 10-39. günü arasında 4T1-tümör grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında gruplardaki hayvanların

primer tümör hacimleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulundu. Ayrıca HSP70'in profilaktik olarak uygulandığı gruplar ile terapötik olarak uygulandığı gruplar arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulundu.

Rekombinant DNA teknolojisi, yeni aşılar ve ilaçlar geliştirerek sağlık koşullarını iyileştirmede hayati bir rol oynamaktadır. Tedavi stratejileri de teşhis kitleri, izleme cihazları ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilerek iyileştirilmektedir. Rekombinant DNA teknolojinin patolojide yaygın bir uygulama alanına sahip olduğu henüz görülmemektedir. Ancak, bazı alanlarda belirli koşullarda oynayacağı yararlı rolleri vardır. Örneğin genetik hastalıklar hakkında kesin tanı bilgisi sağlayabilir, gen terapisi gibi terapötik müdahale için fırsat oluşturabilir. Bir diğer rol ise, mikroorganizmaların taze veya tespit edilmiş doku örneklerinde daha hassas ve spesifik olarak tanımlanabilir ve genomları ince ayrıntılarla analiz edilebilir olmasıdır ki, böylece birçok hastalığın etiyolojisi, epidemiyolojisi ve patogenezi ile ilgili bilgi sağlanabilir. Ayrıca tümör patolojisinde şimdiye kadarki ana uygulama alanı, diğer tanı prosedürleri sonuçsuz kaldığında lösemi ve lenfomalarla ilişkili tanı sorunlarını çözmekteki rolüdür. Solid tümörlere yönelik tanı uygulamaları henüz tanımlanmamıştır, ancak tümör oluşumuna ilişkin önemli bilgiler elde edilmiştir ve bunlar nihayetinde prognostik ve terapötik amaçlar için yararlı belirteçlerin geliştirilmesine yol açabilir (Jackwood ve ark., 2008; Vipra ve ark., 2022).

Rekombinant DNA teknolojisi tarafından birçok alanda hızlı bir yaklaşım sunulmakta ve daha uzun etkili terapötik proteinler geliştirilmektedir. Bu bağlamda, araştırmacılar gen terapisi ve genetik modifikasyon yaklaşımları için vektörler ve birleşik vektörler ortaya koymaktadır. Örneğin şu anda, viral vektörler klinik ortamlarda yoğun bir şekilde dikkate alınmakta olup bunlardan bazıları ticarileştirilmiştir. Kanser de dahil olmak üzere ciddi hastalıkların *in vivo* veya gen terapisi (*ex vivo*), aşılama ve protein transdüksiyon yaklaşımları yoluyla tedavisi dahil olmak üzere çeşitli uygulama alanları vardır (Khan ve ark., 2016; Singh ve ark., 2022; Vipra ve ark., 2022).

Klinik denemelerde iyi gelişmiş rekombinant peptitlerden biri, 450-461 (aa450-461) amino asitlerini içeren HSP70'in C-terminal substrat bağlama alanıdır ve 14-mer HSP70 peptidi (TKD) olarak adlandırılır. TKD, NK hücrelerini IL-2 ile *ex vivo* olarak uyarmış ve farklı hayvan modellerinde veya klinik hastalarda reinfüzyon sonrası potansiyel antitümör aktivitesi göstermiştir. TKD ile tedavi edilen NK hücreleri, HSP70'i yapısal olarak tanıyarak tümör hücrelerine bağlanarak tümör hücresi lizisine aracılık eder. Dahası, TKD tek başına NK hücrelerini uyarmak için yeterli değildir ve ayrıca IL-2 veya IL-15'in varlığını gerektirir (Hu ve ark., 2022; Yang ve ark., 2021).

HSP70 bazlı aşı kavramı, HSP-peptit komplekslerinin çapraz hazırlama yoluyla sitotoksik T lenfosit (CTL) tepkisini ortaya çıkarma yeteneğinden yararlanılarak geliştirilmiştir. Bu bağlamda, tümörden ekstrakte edilen HSP70-peptit kompleksleri, konakçıyı immünize etmek için kullanılmış ve böylece bu komplekslerin, MHC sınıf I yoluyla T hücresinin hazırlanması için APC'lere iletilmesi sağlanmıştır. Özellikle tümör ve DC'lerin füzyonundan izole edilen HSP70-peptit kompleksleri umut verici sonuçları göstermiştir (Chatterjee ve Burns, 2017). HSP70-spesifik peptit kompleksinin antijen-spesifik CD8⁺ T hücre yanıtını indüklediğini göstererek, HSP70'in immünojenik özelliğinin tümörlerden türetilen antijenik peptitlere bağlanma yeteneğinden kaynaklandığını düşünülmektedir (Alberti ve ark., 2022; Kumar ve ark., 2016; Nakajima ve ark., 2020). Bu çalışmanın sonuçları da en sık gözlenen ve yüksek mortaliteye sahip tümör çeşitlerinden biri olan meme kanserlerinde hastaya yan etkisi en az ve etkinliği yüksek bir tedavi seçeneği olarak HSP70'in önemli bir yeri olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın bu konuda yapılacak çalışmalara öncü olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, rekombinant HSP70 ile immunizasyonun, fare meme kanseri modelinde tümör progresyonunu, malignite özelliklerini ve metastatik potansiyelini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Rekombinant HSP70 ile immunize edilen farelerde, kontrol grubuna kıyasla tümör büyümesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. HSP70 ile tedavi edilen grupta, HSP70, Ki-67, PCNA ve CD-31 gibi malignite belirteçlerinin ekspresyonu anlamlı derecede düşük bulunmuştur, bu da proliferatif ve anjiyogenik aktivitenin azaldığını göstermektedir. HSP70 immunizasyonu, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde belirgin bir azalmaya yol açmıştır. IHC bulguları ve PCR analizleri, HSP70 ile immunize edilen farelerde artırılmış bağışıklık yanıtını ortaya koymuştur. Bu da HSP70'in bağışıklık yanıtını anti-tümöral aktiviteyi destekleyecek şekilde modüle edebileceğini düşündürmektedir.

Bu bulguları doğrulamak ve genişletmek için daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Bu çalışmalar, daha büyük örneklem boyutlarını, çeşitli meme kanseri modellerini, HSP70 immunizasyonunun uzun süreli etkilerini ve potansiyel yan etkilerini değerlendirmek için daha uzun gözlem sürelerini içermelidir. Hsp70'in bağışıklık yanıtlarını nasıl modüle ettiği ve tümör malignitesini nasıl azalttığına dair altta yatan mekanizmaların araştırılması, tedavi potansiyelinin daha derinlemesine anlaşılmasını sağlayabilecek ve klinik kullanımla ilgili daha net veriler sağlayabilecektir. Ayrıca HSP70'in kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapiler gibi diğer kanser tedavileriyle kombinasyon halinde kullanılmasıyla genel tedavi etkinliği de değerlendirilmelidir. Bu preklinik çalışmanın sonuçlarına dayanarak, HSP70 immunizasyonunun meme kanseri olan insan hastalarda güvenirliliğini, tolere edilebilirliğini ve ön etkinliğini belirlemek için erken aşama klinik denemeler yapılabilir. İlaveten HSP70 immunizasyonuna yanıtla ilişkili biyobelirteçlerin tanımlanması ve doğrulanması, hasta sınıflandırması ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında yardımcı olabilir.

Bu çalışmanın umut verici sonuçları, rekombinant HSP70'in meme kanseri tedavisinde etkili bir immunoterapötik ajan olarak potansiyelini vurgulamakta ve gelecekteki araştırmalar ve klinik uygulamalar için öncü olacağı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL (2021). Cellular and Molecular Immunology. *Elsevier* (pp. 1056-1051).

Alabbody HK (2019). Mammary tumor in mammals and the risk factors: comparative clinical pathological study. *J. of Biodiversity and Environ. Sci.*, **14**, 83-92.

Al-Akra L, Bae DH, Leck LY, Richardson DR, Jansson PJ (2019). The biochemical and molecular mechanisms involved in the role of tumor micro-environment stress in development of drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1863**, 1390-1397.

Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM (2020). HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells*, **9**, 587.

Alberti G, Vergilio G, Paladino L, Barone R, Cappello F, Conway de Macario Rappa F (2022). The chaperone system in breast cancer: Roles and therapeutic prospects of the molecular chaperones Hsp27, Hsp60, Hsp70, and Hsp90. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7792.

Al-Khaldi S, Almohanna F, Barnawi R, Fallatah M, Islam SS, Ghebeh H, Al-Alwan M (2022). Fascin is essential for mammary gland lactogenesis. *Develop. Biol.*, **492**, 25-36.

Ambrose AJ, Chapman E (2021). Function, therapeutic potential, and inhibition of Hsp70 chaperones. *J. Med. Chem.*, **64**, 7060-7082.

Angeli D, Salvi S, Tedaldi G (2020). Genetic Predisposition to Breast and Ovarian Cancers: How Many and Which Genes to Test? *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1128.

Annaratone L, Cascardi E, Vissio E, Sarotto I, Chmielik E, Sapino A, Marchiò C (2020). The multifaceted nature of tumor microenvironment in breast carcinomas. *Pathobiol.*, **87**, 125-142.

Arroyo-Crespo JJ, Armiñán A, Charbonnier D, Deladriere C, Palomino-Schätzlein M, Vicent MJ (2019). Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *Int J. Cancer*, **145**, 2267-2281.

Aydoğan A. (2010). *Köpek meme tümörlerinin tanısında histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler.* Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın/Türkiye

Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A (2005). Alternative mechanism by which IFN- γ enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *The J. Immunology*, **175**, 2900-2912.

Bashiri Dezfouli A, Yazdi M, Benmebarek MR, Schwab M, Michaelides S, Miccichè A, Multhoff G (2022). CAR T cells targeting membrane-bound Hsp70 on tumor cells mimic Hsp70-primed NK cells. *Frontiers in immunology*, **13**, 883694.

Bedeer A, El-Rashidy M, Elzayat S, Elsherif H (2020). Evaluation of the prognostic significance of P53 and Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer and Biomed. Res.*, **4**, 169-176.

Beňačka R, Szabóová D, Guľašová Z, Hertelyová Z, Radoňák J (2022). Classic and new markers in diagnostics and classification of breast cancer. *Cancers*, **14**, 5444.

Birbrair A (Ed.) (2020). *Tumor Microenvironment: Hematopoietic Cells–Part B* (Vol. 1273). Springer Nature.

Biswas SK, Banerjee S, Baker GW, Kuo CY, Chowdhury I (2022). The mammary gland: basic structure and molecular signaling during development. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3883.

Bloch O, Crane CA, Fuks Y, Kaur R, Aghi MK, Berger MS, Parsa AT (2014). Heat-shock protein peptide complex–96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial. *Neuro-oncology*, **16**, 274-279.

Bożyk A, Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, Milanowski J (2022). Tumor microenvironment—A short review of cellular and interaction diversity. *Biology*, **11**, 929.

Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Leprotti S, Benazzi C (2003b). E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases, *Journal of Veterinary Medicine A*, **50**: 496-500.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR (2006). “Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis.” *Trends in Biochem. Sci.*, **31**, 164–172.

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

Calderwood SK, Mambula SS, Gray Jr, PJ (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Annals of the New York Acad. Sci.*, **1113**, 28-39.

Cardano M, Tribioli C, Prosperi E (2020). Targeting proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an effective strategy to inhibit tumor cell proliferation. *Curr. Cancer Drug Targets*, **20**, 240-252.

Cassali GD, Jark PC, Gamba C, Damasceno KA, Lima AE, Nardi ABD, Nakagaki KY (2020). Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019.

Chamseddine RS, Wang C, Yin K, Wang J Sing P, Zhou J, Robson ME, Braun D, Hughes KS (2022). Penetrance of male breast cancer susceptibility genes: A systematic review. *Breast Cancer Res. Treat.* **191**, 31–38.

Chatterjee S, Burns, T F (2017). Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1978.

Chen H, Wu J, Zhang Z, Tang Y, Li X, Liu S, Li X (2018). Association between BRCA status and triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Front. Pharmacol.*, **9**, 909.

Choi DH, Woo JK, Choi, Seo, HS, Kim CW (2011). A novel chimeric DNA vaccine: enhancement of preventive and therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusion of Mucin 1 to a heat shock protein 70 gene. *Mol. Med. Rep.*, **4**, 885-890.

Cui D, Naftel JP, Lynch JC (2011). *Atlas of histology: with functional and clinical correlations* (pp. 386-387) Wolters Kluwer Health - Lippincott Williams & Wilkins.

Cyran AM, Zhitkovich A (2022). Heat shock proteins and HSF1 in cancer. *Front. Oncol.*, **12**, 860320.

Danics L, Schvarcz CA, Viana P, Vancsik T, Krenács T, Benyó Z, Hamar P (2020). Exhaustion of protective heat shock response induces significant tumor damage by apoptosis after modulated electro-hyperthermia treatment of triple negative breast cancer isografts in mice. *Cancers*, **12**, 2581.

Das JK, Xiong X, Ren X, Yang JM, Song J (2019). Heat shock proteins in cancer immunotherapy. *J. Oncol.*, **2019**(1), 3267207.

Debnath B, Lilly M (2021). A study of microvascular density in carcinoma of breast with CD34 immunostaining. *J. Pharm. Res. Int.*, **33**, 1-12.

Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, Nagini S, Rao DN, Malla, RR (2020). Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol. Res.*, **153**, 104683.

DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert Welm AL (2011). Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature Medicine*, **17**, 1514-1520.

Diamond MS, Kanneganti TD (2022). Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nature Immunol.*, **23**, 165-176.

Dias AS, Almeida CR, Helguero LA, Duarte IF (2019). Metabolic crosstalk in the breast cancer microenvironment. *Eur. J. Cancer*, **121**, 154-171.

Do Nascimento RG, Otoni KM (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: What do we know? *Mastology*, **30**, 1-8.

DuPre' SA, Hunter KW (2007). Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: Association with tumor-derived growth factors. *Ex. Mol. Pathol.*, **82**, 12-24.

Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G (2013). Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.*, **73**, 3591-3603

Ebbesen P, Pettersen EO, Gorr TA, Jobst G, Williams K, Kieninger J, Scozzafava A (2009). Taking advantage of tumor cell adaptations to hypoxia for developing new tumor markers and treatment strategies. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **24(sup1)**, 1-39.

Edkins AL, Boshoff A (2021). General structural and functional features of molecular chaperones. *Heat Shock Proteins of Malaria*, 11-73.

Erin N, Grahovac J, Brozovic A, Efferth T (2020). Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, **53**, 100715.

Fang J, Lu Y, Zheng J, Jiang X, Shen H, Shang X, Fu P (2023). Exploring the crosstalk between endothelial cells, immune cells, and immune checkpoints in the tumor microenvironment: new insights and therapeutic implications. *Cell Death & Disease*, **14**, 586.

Fawzy A, Alqelaiti YA, Almatrafi MM, Almatrafi OM, Alqelaiti EA (2022). Common Sensitive Prognostic Marker in Breast Cancer and their Clinical Significance: A Review Article. *Arch. Pharmacy Practice*, **13**, 40-45.

Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ren G (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, **5**, 77-106.

Fico F, Santamaria-Martinez A (2020). The tumor microenvironment as a driving force of breast cancer stem cell plasticity. *Cancers*, **12**, 3863.

Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Sur. Oncol. Clinics*, **27**, 95-120.

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J (2012). The immune contexture in human tumors: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, **12**, 298-306.

Galland S, Stamenkovic I (2020). Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *The J. Pathol.*, **250**, 555-572.

Gao JJ, Swain SM (2018). Luminal a breast cancer and molecular assays: a review. *The Oncologist*, **23**, 556-565.

Gil Del Alcazar CR, Alečković M, Polyak K (2020). Immune escape during breast tumor progression. *Cancer Immunol. Res.*, **8**, 422-427.

Goedegebuure P, Mitchem JB, Porembka MR, Tan MC, Belt BA, Wang Gillam Linehan DC (2011). Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, **11**, 734-751.

Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V (2016). Tumors of the mammary gland. *Tumors In Domestic Animals*, 723-765.

Hambl JN, Ruby CE, Mourich DV, Bracha S, Dolan BP (2023). Potential Promises and Perils of Human Biological Treatments for Immunotherapy in Veterinary Oncology. *Veterinary Sci.*, **10**, 336.

Harvey JA, Santen RJ, Petroni GR, Bovbjerg VE, Smolkin ME, Sheriff FS, Russo J (2008). Histologic changes in the breast with menopausal hormone therapy use: correlation with breast density, estrogen receptor, progesterone receptor, and proliferation indices. *Menopause*, **15**, 67-73.

He X, Lee B, Jiang Y (2022). Extracellular matrix in cancer progression and therapy. *Medical Review*, **2**, 125-139.

Hellmen E, Lindgren A (1989). The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors, *Veterinary Pathology*, **26**, 420-428.

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

Honvo-Houéto E, Truchet S (2015). Indirect immunofluorescence on frozen sections of mouse mammary gland. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (106), e53179.

Hsu MY, Hsieh CH, Huang YT, Chu SY, Chen CM, Lee WJ, Liu SJ (2021). Enhanced paclitaxel efficacy to suppress triple-negative breast cancer progression using metronomic chemotherapy with a controlled release system of Electrospun Poly-DL-Lactide-co-glycolide (PLGA) nanofibers. *Cancers*, **13**, 3350.

Hu B, Liu G, Zhao K, Zhang G (2024). Diversity of extracellular HSP70 in cancer: advancing from a molecular biomarker to a novel therapeutic target. *Front. Oncol.*, **14**.

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

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

Infanger DW, Lynch ME, Fischbach C (2013). Engineered culture models for studies of tumor-microenvironment interactions. *Annu. Rev. Biomed. Engineering.*, **15**, 29-53

Invrea F, Rovito R, Torchiano E, Petti C, Isella C, Medico E (2020). Patient-derived xenografts (PDXs) as model systems for human cancer. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, **63**, 151-156.

Ito A, Matsuoka F, Honda H, Kobayashi T (2004). Antitumor effects of combined therapy of recombinant heat shock protein 70 and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Immunol., Immunotherapy*, **53**, 26-32.

Jabbarzadeh M, Hamblin MR, Pournaghi-Azar F, Saatloo MV, Kouhsoltani M, Vahed N (2021). Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: A systematic review and meta-analysis. *J. Dental Res.*, **15**, 66.

Jackwood MW, Hickie L, Kapil S, Silva R, Osterrieder K, Prideaux C (2008). Vaccine development using recombinant DNA technology. *Council. Agric. Sci. Technol.*, **38**, 1-11.

Januškevičienė I, Petrikaitė V (2019). Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sci.*, **239**, 117009.

Javid H, Hashemian P, Yazdani S, Sharbaf Mashhad A, Karimi-Shahri M (2022). The role of heat shock proteins in metastatic colorectal cancer: A review. *J. Cellular Biochem.*, **123**, 1704-1735.

Junprung W, Supungul P, Tassanakajon A (2021). Structure, gene expression, and putative functions of crustacean heat shock proteins in innate immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, **115**, 103875.

Kabakov AE, Gabai VL (2021). HSP70s in breast cancer: promoters of tumorigenesis and potential targets/tools for therapy. *Cells*, **10**, 3446.

Kallingal A, Olszewski M, Maciejewska N, Brankiewicz W, Baginski M (2023). Cancer immune escape: the role of antigen presentation machinery. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **149**, 8131-8141.

Karelina TV, Golubeva VA (1983). Immunomorphological identification of myoepithelial cells in mixed mammary gland tumors in dogs, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **96**, 1453-1455.

Kaszak I, Witkowska-Pilaszewicz O, Domrazek K, Jurka P (2022). The novel diagnostic techniques and biomarkers of canine mammary tumors. *Veterinary Sci.*, **9**, 526.

Kerby A, Graham N, Wallworth R, Batra G, Heazell A (2022). Development of dynamic image analysis methods to measure vascularisation and syncytial nuclear aggregates in human placenta. *Placenta*, **120**, 65-72.

Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, Hou H (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International J. Genomics*, **1**, 2405954.

Kita Y, Saito R, Inoue T, Kim WY, Ogawa O, Kobayashi T (2020). Patient-derived urothelial cancer xenograft models: a systematic review and future perspectives. *Bladder Cancer*, **6**, 131-141.

Kleinmanns K, Gjerde CH, Langer A, Fosse V, de Jalón EG, Leitch C, McCormack E (2022). Modeling the Tumor Microenvironment in Patient-Derived Xenografts: Challenges and Opportunities. *Biomarkers of the Tumor Microenviron.*, **329-344**.

Koni M, Castellano I, Venturelli E, Sarcinella A, Lopatina T, Grange C, Brizzi MF (2022). Interleukin-3-receptor- α in triple-negative breast cancer (TNBC): an additional novel biomarker of TNBC aggressiveness and a therapeutic target. *Cancers*, **14**, 3918.

Kujan O, Siddiqui I, Lee C, Idrees M, Shearston K, Farah CS (2023). Automated immunohistochemical quantification of hypoxia biomarkers shows correlation with dysplastic epithelial changes. *J. Oral Pathol. & Med.*, **52**, 504-513.

Kumar P, Parasar MC (2020). Occurrence of mammary tumour in dogs. *J. Agri. Res. Advances*, **2**, 29-32.

Kumar S, Mohan V, Singh RK, Gautam PK, Kumar S, Shukla A, Acharya A (2024). Tumor-derived Hsp70-CD14 interaction enhances the antitumor potential of cytotoxic T cells by activating tumor-associated macrophages to express CC chemokines and CD40 costimulatory molecules. *Int. Immunopharmacol.*, **138**, 112584.

Kumar S, Stokes III J, Singh UP, Gunn KS, Acharya A, Manne U, Mishra M (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters*, **374**, 156-166.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA, Robbins SL, Cotran RS (2015). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease* (pp. 1051-1056) Elsevier; Saunders, Philadelphia

Kumari N, Choi SH (2022). Tumor-associated macrophages in cancer: recent advancements in cancer nanoimmunotherapies. *J. Ex. & Clin. Cancer Res.*, **41**, 68.

Leone K, Poggiana C, Zamarchi R (2018). The interplay between circulating tumor cells and the immune system: from immune escape to cancer immunotherapy. *Diagnostics*, **8**, 59.

Li R, Qian J, Zhang W, Fu W, Du J, Jiang H, Hou J (2014). Human heat shock protein-specific cytotoxic T lymphocytes display potent antitumour immunity in multiple myeloma. *British J. Haematol.*, **166**, 690-701.

Li W, Huang M, Wu Z, Zhang Y, Cai Y, Su J, Liu Z (2024). mRNA-Lipid Nanoparticle-Mediated Restoration of PTPN14 Exhibits Antitumor Effects by Overcoming Anoikis Resistance in Triple-Negative Breast Cancer. *Advanced Sci.*, 2309988.

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

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

Linder M, Pogge von Strandmann E (2021). The role of extracellular HSP70 in the function of tumor-associated immune cells. *Cancers*, **13**, 4721.

Liu Y, Wu W, Cai C, Zhang H, Shen H, Han Y (2023). Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. *Signal Trans. Targeted Therapy.*, **8**, 160.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, Bruix J (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England J. Med.*, **359**, 378-390.

Malekian S, Rahmati M, Sari S, Kazemimanesh M, Kheirbakhsh R, Muhammadnejad A, Amanpour S (2020). Expression of diverse angiogenesis factor in different stages of the 4T1 tumor as a mouse model of triple-negative breast cancer. *Adv. Pharm Bull.*, **10**, 323.

Marcucci F, Rumio C (2021). The tumor-promoting effects of the adaptive immune system: a cause of hyperprogressive disease in cancer?. *Cellular and Mol. Life Sci.*, **78**, 853-865.

Mascara M, Constantinou C (2021). Global perceptions of women on breast cancer and barriers to screening. *Current Oncology Reports*, **23**, 1-9.

Meuten DJ (2020). *Tumors in domestic animals*. 5th Edition John Wiley & Sons.

Masood S (2016). Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization. *Women's Health*, **12**, 103-119.

Milli ÜH, Hazıroğlu R, Aydın Y, Gülbahar MY (2000). Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, vimentin ve alfa- düz kas aktin intermedier ve mikro filamentlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonu, *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, **24**:81-92.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opinion in Immunol.*, **27**, 16-25.

Mohamed AAA, Obaid NE, Abdelghani S, Alfahed A, Waggiallah HA, Eltayeb LB (2020). Immunohistochemical expression of survivin and KI-67 as tumor markers in breast cancer infected females: A cross-sectional study. *Pharmacophore*, **11**, 41-45.

Mondal P, Bailey KL, Cartwright SB, Band V, Carlson MA (2022). Large animal models of breast cancer. *Front. Oncol.*, **12**, 788038.

Monteros AEL, Millan MY, Ordas J, Carrasco L, Reymundo C, Las Mulas JM (2002). Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: Assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium, *Veterinary Patology*, **39**:247-256.

Moore J, Ma L, Lazar AA, Barcellos-Hoff MH (2022). Mammary Tumor-Derived Transplants as Breast Cancer Models to Evaluate Tumor-Immune Interactions and Therapeutic Responses. *Cancer Res.*, **82**, 365-376.

Mortezaee K (2020). Immune escape: A critical hallmark in solid tumors. *Life Sci.*, **258**, 118110.

Nakajima M, Hazama S, Tamada K, Udaka K, Kouki Y, Uematsu T, Nagano H (2020). A phase I study of multi-HLA-binding peptides derived from heat shock protein 70/glypican-3 and a novel combination adjuvant of hLAG-3Ig and Poly-ICLC for patients with metastatic gastrointestinal cancers: YNP01 trial. *Cancer Immunol., Immunotherapy*, **69**, 1651-1662.

Oakes SR, Hilton HN, Ormandy CJ (2006). Key stages in mammary gland development-The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Res.*, **8**, 1-10.

Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T (2020). Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front. Immunol.*, **11**, 583084.

Pan Y, Yuan Y, Liu G, Wei Y (2017). P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. *PloS One.*, **12**, e0172324.

Park D, Sahai E, Rullan A (2020). SnapShot: cancer-associated fibroblasts. *Cell*, **181**, 486-486.

Pastò A, Consonni FM, Sica A (2020). Influence of innate immunity on cancer cell stemness. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3352.

Peipp M, Klausz K, Boje AS, Zeller T, Zielonka S, Kellner C (2022). Immunotherapeutic targeting of activating natural killer cell receptors and their ligands in cancer. *Clin. Exper. Immunol.*, **209**, 22-32.

Pereira JF, Jordan P, Matos P (2021). A signaling view into the inflammatory tumor microenvironment. *Immuno.*, **1**, 91-118.

Pockley AG, Henderson B (2018). Extracellular cell stress (heat shock) proteins—immune responses and disease: an overview. *Philosophical transactions of the royal society B: Biol. Sci.*, **373**, 20160522.

Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi MR (2014). Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immuno Letters.*, **159**, 55-72.

Puustinen MC, Sistonen L (2020). Molecular mechanisms of heat shock factors in cancer. *Cells*, **9**, 1202.

Rakha EA, Tse GM, Quinn CM (2023). An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology*, **82**, 5-16.

Rameshbabu S, Labadie BW, Argulian A, Patnaik A (2021). Targeting innate immunity in cancer therapy. *Vaccines*, **9**, 138.

Rao A, Taylor JL, Chi-Sabins N, Kawabe M, Gooding WE, Storkus WJ (2012). Combination therapy with HSP90 inhibitor 17-DMAG reconditions the tumor microenvironment to improve recruitment of therapeutic T cells. *Cancer Res.*, **72**, 3196-3206.

Rauner G, Kuperwasser C (2021). Microenvironmental control of cell fate decisions in mammary gland development and cancer. *Developmental Cell*, **56**, 1875-1883.

Reis-Sobreiro M, Teixeira da Mota A, Jardim C, Serre K (2021). Bringing macrophages to the frontline against cancer: Current immunotherapies targeting macrophages. *Cells*, **10**, 2364.

Rérole AL, Jegu G, Garrido C (2011). Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Molecular Chaperones: Methods and Protocols*, 205-230.

Richard V, Davey MG, Annuk H, Miller N, Dwyer RM, Lowery A, Kerin MJ (2021). MicroRNAs in molecular classification and pathogenesis of breast tumors. *Cancers*, **13**, 5332.

Rogers MP, Mi Z, Li NY, Wai PY, Kuo PC (2022). Tumor: stroma interaction and cancer. In *Interaction of Immune and Cancer Cells* (pp. 59-87). Cham: Springer International Publishing.

Rojas-Armas JP, Arroyo-Acevedo JL, Palomino-Pacheco M, Herrera-Calderón O, Ortiz-Sánchez JM, Rojas-Armas A, Hilario-Vargas J (2020). *The essential oil of Cymbopogon citratus stap and carvacrol: An approach of the antitumor effect on 7, 12-dimethylbenz-[a]-anthracene (DMBA)-induced breast cancer in female rats. Molecules*, **25**, 3284.

Roudbari LS, Eslami M, Movahedi M, Golab F (2023). Evaluation of the Anti-Metastatic Effect of Foeniculum Vulgare on the Protein Expression of HSP 70 & 90 in Balb/c Mice with 4t1 Model of Breast Cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prevention: APJCP*, **24**, 833.

Saladin KS, Porth C (2010). Anatomy & physiology: the unity of form and function (Vol. 5) (pp. 1058). New York: McGraw-Hill.

Sanchez-Briñas A, Duran-Ruiz C, Astola A, Arroyo MM, Raposo FG, Valle A, Bolivar J (2023). ZNF330/NOA36 interacts with HSPA1 and HSPA8 and modulates cell cycle and proliferation in response to heat shock in HEK293 cells. *Biology Direct.*, **18**, 26.

Sá-Nunes A (2022). Overview of immune responses. *Ess. Aspects Immunometabolism in Heal. Dis.*, 1-11.

Sassi F Sarh G, Brunetti B, Morandi F, Benazzi C (2008). Immunohistochemical characterization of mammary squamous cell carcinoma of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **20**: 766-773.

Secli L, Fusella F, Avalue L, Brancaccio M (2021). The dark-side of the outside: how extracellular heat shock proteins promote cancer. *Cellular and Mol. Life Sci.*, **78**, 4069-4083.

Seliger B, Massa C (2021). Immune therapy resistance and immune escape of tumors. *Cancers*, **13**, 551

Sharma V, Letson J, Furuta S (2022). Fibrous stroma: Driver and passenger in cancer development. *Sci. Signaling*, **15**, eabg3449.

Shevtsov M, Pitkin E, Ischenko A, Stangl S, Khachatryan W, Galibin O, Multhoff G (2019). Ex vivo Hsp70-activated NK cells in combination with PD-1 inhibition significantly increase overall survival in preclinical models of glioblastoma and lung cancer. *Front. Immunol.*, **10**, 454.

Shiau JP, Wu CC, Chang SJ, Pan MR, Liu W, Ou-Yang F, Luo CW (2021). FAK regulates VEGFR2 expression and promotes angiogenesis in triple-negative breast cancer. *Biomedicines*, **9**, 1789.

Singh V, Sengar RS, Kumar M, Singh A, Singh SP, Garg SK, Das R (2022). A Review on Recombinant DNA, Gene Cloning, Molecular Probes, Chimeric DNA and Gene Libraries.

Sivamani Y, Hegde S, Bhat AR, Sajal H, Elayaperumal S (2024). Recombinant DNA technology and gene therapy. In *Biochemical and Molecular Pharmacology in Drug Discovery* (pp. 353-376). Elsevier.

Slepicka PF, Somasundara AVH, Dos Santos CO (2021). The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 114, pp. 93-112). Academic Press.

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

Soares M, Correia AN, Batista MR, Correia J, Ferreira F (2022). fHER2, PR, ER, Ki-67 and Cytokeratin 5/6 Expression in Benign Feline Mammary Lesions. *Animals*, **12**, 1599.

Sokolova A, Johnstone KJ, McCart Reed AE, Simpson PT, Lakhani SR (2023). Hereditary breast cancer: Syndromes, tumour pathology and molecular testing. *Histopathol.*, **82**, 70-82.

Solodneva EV, Kuznetsov SB, Velieva AE, Stolpovsky YA (2022). Molecular-genetic bases of mammary gland development using the example of cattle and other animal species: I. Embryonic and pubertal developmental stage. *Russian J. Genetics*, **58**, 899-914.

Somu P, Mohanty S, Basavegowda N, Yadav AK, Paul S, Baek KH (2024). The Interplay between Heat Shock Proteins and Cancer Pathogenesis: A Novel Strategy for Cancer Therapeutics. *Cancers*, **16**, 638.

Souto EP, Dobrolecki LE, Villanueva H, Sikora AG, Lewis MT (2022). In vivo modeling of human breast cancer using cell line and patient-derived xenografts. *J. Mammary Gland Biol. Neopl.*, **27**, 211-230.

Spina E, Cowin P (2021). Embryonic mammary gland development. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 114, pp. 83-92). Academic Press.

Sutherland TE, Dyer DP, Allen JE (2023). The extracellular matrix and the immune system: A mutually dependent relationship. *Science*, **379**, eabp8964.

Szas A Szigeti GP (2024). Exploring Biocomplexity in Cancer: A Comprehensive Review. *Open J. Biophysics*, **14**, 154-238.

Taha EA, Ono K, Eguchi T (2019). Roles of extracellular HSPs as biomarkers in immune surveillance and immune evasion. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 4588.

Tanriover G, Dilmac S, Aytac G, Farooqi AA, Sindel M (2022). Effects of melatonin and doxorubicin on primary tumor and metastasis in breast cancer model. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, **22**, 1970-1983.

Tarazona R, Lopez-Sejas N, Guerrero B, Hassouneh F, Valhondo I, Pera A, Solana R (2020). Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol., Immunotherapy*, **69**, 879-899.

Tarighati E, Keivan H, Mahani H (2023). A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. *Clin. Exp. Med.*, **23**, 1-16.

Tarin D (2023). The Host Stroma and the Tumour Microenvironment. In *Understanding Cancer: The Molecular Mechanisms, Biology, Pathology and Clinical Implications of Malignant Neoplasia* (pp. 93-110). Cham: Springer International Publishing.

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

Tihanyi B, Nyitray L (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*, **38**, 25-34.

Tsang JY, Gary MT (2020). Molecular classification of breast cancer. *Adv. Anatomic Pathol.*, **27**, 27-35.

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

Tutar Y, Naureen H, Farooqi AA (2022). Heat shock proteins in tumor progression and metastasis. In *Unraveling the Complexities of Metastasis* (pp. 187-201). Academic Press.

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

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

Van Eden W, Jansen MA Ludwig, Van Kooten P, Van der Zee R, Broere F (2017). The enigma of heat shock proteins in immune tolerance. *Front. Immunol.*, **8**, 1599.

Varallo GR, Gelaleti GB, Maschio-Signorini LB, Moschetta MG, Lopes JR, De Nardi AB, De Campos Zuccari DAP (2019). Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. *Oncology Letters*, **18**, 6545-6553.

Vilhena H, Figueira AC, Schmitt F, Canadas A, Chaes R, Gama A, Dias-Pereira P (2020). Canine and feline spontaneous mammary tumours as models of human breast cancer. *Pets as Sentinels, Forecasters and Promoters of Human Health*, 173-207.

Vipra M, Patil N, Sivaram A (2022). Applications of recombinant DNA technology. In *A Complete Guide to Gene Cloning: From Basic to Advanced* (pp. 143-157). Cham: Springer International Publishing.

Vitale I, Manic G, Coussens L M, Kroemer G, Galluzzi L (2019). Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. *Cell Metabol.*, **30**, 36-50.

Vostakolaei MA, Hatami-Baroogh L, Babaei G, Molavi O, Kordi S, Abdolalizadeh J (2021). Hsp70 in cancer: A double agent in the battle between survival and death. *J. Cellular Physiol.*, **236**, 3420-3444.

Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv.*, **465**, 1-14.

Wald A, Koelle DM, Fife K, Warren T, LeClair K, Chicz RM, Srivastava PK (2011). Safety and immunogenicity of long HSV-2 peptides complexed with rhHsc70 in HSV-2 seropositive persons. *Vaccine*, **29**, 8520-8529.

Wang Q, Shao X, Zhang Y, Zhu M, Wang FX, Mu J, Chen K (2023). Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Med.*, **12**, 11149-11165.

Werner C, Stangl S, Salvermoser L, Schwab M, Shevtsov M, Xanthopoulos A, Multhoff G (2021). Hsp70 in liquid biopsies—A tumor-specific biomarker for detection and response monitoring in cancer. *Cancers*, **13**, 3706.

Wood C, Srivastava P, Bukowski R, Lacombe L, Gorelov AI, Gorelov S, Escudier B (2008). An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial. *The Lancet*, **372**, 145-154.

Xanthopoulos A, Samt AK, Guder C, Taylor N, Roberts E, Herf H, Multhoff G (2023). Hsp70—A universal biomarker for predicting therapeutic failure in human female cancers and a target for CTC isolation in advanced cancers. *Biomedicines*, **11**, 2276.

Xiong J, Li Y, Tan X, Fu L (2020). Small heat shock proteins in cancers: Functions and therapeutic potential for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6611.

Yamaguchi-Tanaka M, Takagi K, Miki Y, Sato A, Iwabuchi E, Miyashita M, Suzuki T (2023). The Pro-Tumorigenic Role of Chemotherapy-Induced Extracellular HSP70 from Breast Cancer Cells via Intratumoral Macrophages. *Cancers*, **15**, 1903.

Yang NY, Zheng HH, Yu C, Ye Y, Du CT, Xie GH (2023). Research progress of good markers for canine mammary carcinoma. *Mol. Biol.Rep.*, **50**, 10617-10625.

Yang S, Xiao H, Cao L (2021). Recent advances in heat shock proteins in cancer diagnosis, prognosis, metabolism and treatment. *Biomed. & Pharm.*, **142**, 112074.

Yang Y, Hou J, Liu J, Bhushan S, Wu G (2022). The origins of resident macrophages in mammary gland influence the tumorigenesis of breast cancer. *Int. Immunopharmacol.*, **110**, 109047.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncol.*, **11**, 174-183.

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

Zanella ER, Grassi E, Trusolino L (2022). Towards precision oncology with patient-derived xenografts. *Nature Rev. Clin. Oncol.*, **19**, 719-732.

Zeng L, Li W, Chen CS (2020). Breast cancer animal models and applications. *Zool. Res.*, **41**, 477.

Zhang D, Sun B, Zhao X, Sun H, An J, Lin X, Zheng X (2020). Twist1 accelerates tumour vasculogenic mimicry by inhibiting Claudin15 expression in triple-negative breast cancer. *J Cell Mol Med.*, **24**, 7163-7174.

Zhang M, Bi X (2024). Heat Shock Proteins and Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 876.

Zhou CJ, Zhang QH, Zhang TG, Sun SZ, Li H, Wang Y, Liu ZY (2009). Expression of ER, Ki-67 and cyclinD1 in the pre-cancerous breast of Chinese patients. *Pathol. & Oncol. Res.*, **15**, 153-158.

Zhou Y, Xia J, Xu S, She T, Zhang Y, Sun Y, Lei J (2023). Experimental mouse models for translational human cancer research. *Frontiers in Immunology*, **14**, 1095388.

Zingue S, Mindang ELN, Awounfack FC, Kalgonbe AY, Kada MM, Njamen D., Ndinteh DT (2021). Oral administration of tartrazine (E102) accelerates the incidence and the development of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **21**, 1-11.

